



T.C

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***KCNQ1* GENİ CRISPR/CAS9 SİSTEMİ İLE DÜZENLENMİŞ
İNSAN UYARILMIŞ PLURİPOTENT KÖK HÜCRE KAYNAKLI
KARDİYOMİYOSİTLERİN KARAKTERİZASYONU**

TUĞCE TORUN

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

DOÇ. DR. ESRA ÇAĞAVİ

İSTANBUL, 2019

TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans (X) Doktora ()
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyoloji
Tez Sahibi : Tuğce TORUN
Tez Başlığı : KCNQ1 Geni CRISPR/Cas9 Sistemi İle Düzenlenmiş İnsan Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre Kaynaklı Kardiyomyositlerin Karakterizasyonu
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Kavacık Yerleşkesi
Sınav Tarihi : 19.08.2019

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve nitelik yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman

Doç.Dr. Esra ÇAĞAVI

Kurumu

İstanbul Medipol Üniversitesi

İmza



Sınav Jüri Üyeleri

Prof.Dr. Arzu KARABAY
KORKMAZ

İstanbul Teknik Üniversitesi



Doç.Dr. Bilal Ersen KERMAN

İstanbul Medipol Üniversitesi



Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun 20./08./2019 tarih ve 2019.../26.... - 09.... sayılı kararı ile şekil yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof. Dr. Nesrin EMEKLİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü V.



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içerisinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tuğce TORUN



TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince değerli bilgilerini ve tecrübelerini benimle paylaşan, karşılaştığım problemler karşısında analitik düşünebilmemi sağlayan, beni sürekli teşvik eden, deney yaparken özgür bırakan, her zaman şans veren, bu sefer olacak diyen, sabırlı ve güler yüzlü başarılı bir bilim kadını olan danışman hocam Doç. Dr. Esra Çağavi'ye,

Tez çalışmam sırasında vektör sarfı ve burs desteğinde bulunan Dr. Öğr. Üyesi Turan Demircan'a; bugünlere gelmemde katkısı bulunan tüm kıymetli lisans & yüksek lisans hocalarıma ve değerli tez jüri üyelerime,

Tüm moleküler tekniklerde bilgi ve tecrübesini benimle paylaşan, sorunları çözmemde her zaman akıl veren, tatlı sert ablalık yapan, birlikte deney yaparken çok şey öğrendiğim ve zevk aldığım Sevilay Şahoğlu Göktaş'a; analizler hakkında bildiklerini bana aktaran, tez çalışmamda kullandığım MATLAB kodunu yazan, her zaman moral ve destek veren, güldürürken öğreten Yusuf Enes Kazcı'ya,

Çağavi LAB stajyeri iken bana laboratuvarı tanıtan, sevdiren ve tecrübelerini benimle paylaşan Tuba Akgül Çağlar'a,

Laboratuvarı ev sıcaklığında hissettiren çalışma arkadaşlarım Arzuhan Koç'a, Gökçe İlayda Söztekin'e, Gizem Örs'e, tez yazım ve Western Blot teknik desteğinde Zeynep Begüm Durdu'ya, çizim öğretilerinde Mehmet Uğurcan Turhan'a,

Destekleri ve yardımları için bütün REMER idari ve akademik personeline; İstanbul Medipol Üniversitesi Genetik Tanı bünyesinde bulunan tüm Genomiks ve Proteomiks Bölümü çalışanlarına,

Tez çalışmamı destekleyen TÜBİTAK ve İstanbul Medipol Üniversitesi BAP Komisyonu'na,

Her zaman yol gösteren, düştüğümde kaldıran, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili annem Nilgün Torun'a, akıl hocam ablam Hülya Torun'a ve her zaman destekçim olan abim Yusuf Torun'a,

Her ihtiyacım olduğunda yardımına koşan, beni her zaman motive eden, kendimi
şanslı hissettiren başta ev arkadaşım Esra Kaynak'a ve biricik dostlarıma,

Sonsuz teřekkürler...



İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI FORMU	i
BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
KISALTMALAR LİSTESİ.....	viii
TABLolar LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
1 ÖZET	1
2 ABSTRACT.....	1
3 GİRİŞ VE AMAÇ	2
4 GENEL BİLGİLER.....	6
4.1 İnsanda Kalp Gelişimi ve Fizyolojisi	6
4.2 Elektriksel Akımın İletilmesi ve Elektrokardiyografi.....	6
4.3 Uzun QT (UQT) Sendromu	8
4.4 Embriyonik ve Uyarılmış Pluripotent Kök (UPK) Hücreler	9
4.5 İnsan Temelli UPK Hücrelerinden Kardiyomiyosit Farklılaşması	10
4.6 Kişiyeye Özgü UPK Hücreleri Kullanılarak Kalp Hastalıklarının Modellenmesi	11
4.7 CRISPR/Cas9 Sistemi ile Genom Düzenleme.....	12
4.8 Kardiyak Hücrelerde <i>in vitro</i> Elektrofizyolojik Analizler.....	15
4.8.1 Ca ²⁺ Görüntüleme	16
4.8.2 Çoklu Elektrot Dizileri (MEA)	18
4.8.3 RTCA xCELLigence CardioECR.....	19
4.8.4 Yama Kıskaçı (Patch Clamp).....	20
4.9 İyon Kanalı Modülatörleri ve Beta Blokörler.....	22
5 MATERYAL VE METOT.....	25
5.1 Deney Dizaynı	25
5.2 Kullanılan Sarf Malzemeler ve Besiyerleri	25
5.3 Cihazlar	30

5.4	Kontrol ve Hasta Grubuna ait Hücrelerin Belirlenmesi.....	31
5.5	İnsan UPK Hücre Kültürü ve Karyotip Analizleri	31
5.6	İnsan UPK Hücrelerinin Kardiyomiyositlere Farklılaştırılması, Kültürü ve Yeniden Ekim Protokolü.....	31
5.7	TA Klonlama Stratejisi	34
5.7.1	Genomik DNA'dan <i>KCNQ1</i> Bölgesinin Çoğaltılması	35
5.7.2	Vektör İçerisine <i>KCNQ1</i> Geninin Klonlanması.....	36
5.7.3	Diyagnostik Kesim ve Plazmid İzolasyonu	39
5.8	Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PZR) 40	
5.8.1	Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi	40
5.8.2	Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PZR) 41	
5.9	İmmünohistokimyasal (ICC) Boyamalar	43
5.10	Total Protein İzolasyonu ve Western Blot Analizleri.....	44
5.11	Elektrofizyolojik Analizler.....	46
5.11.1	Ca ⁺² Görüntüleme	46
5.11.2	XCELLigence RTCA Cardio ECR ve İlaç Analizleri	47
5.12	İstatistiksel analizler	47
6	BULGULAR.....	48
6.1	İnsan UPK Hücrelerinin Moleküler Karakterizasyonu	49
6.1.1	İnsan UPK Hücrelerinin qRT-PZR Yöntemi ile Moleküler Olarak İncelenmesi	49
6.1.2	İnsan UPK Hücrelerinin İmmünohistokimyasal İncelenmesi.....	50
6.1.3	İnsan UPK Hücrelerinin Karyotip Analizleri ve Kültürleri	51
6.2	Genetik Olarak Düzenlenmiş UPK Hücrelerinde Sekansların Ayrıştırılması	52
6.3	TA Klonlama Sonrası Sekansları Ayrıştırılan Genetik Düzenlenmiş UPK Hücreleri	53
6.3.1	TA Klonlama Sonrası Enzim Kesimi ile Seleksiyon	55
6.3.2	TA Klonlama Sonrası Sanger Sekanslama	56
6.4	UPK Hücre Kökenli Kardiyomiyositlerin qRT-PZR Yöntemi ile Moleküler Olarak İncelenmesi.....	58

6.5	UPK Hücre Kökenli Kardiyomiyositlerde <i>KCNQ1</i> Protein Düzeyinin Western Blot Yöntemiyle İncelenmesi.....	61
6.6	UPK Hücre Kökenli Kardiyomiyositlerin Elektrofizyolojik Karakterizasyonu	67
6.6.1	UPK Hücre Kökenli Kardiyomiyositlerde Ca ⁺² Görüntüleme.....	67
6.6.2	Beta Blokör ve İlaç Denemeleri.....	71
7	TARTIŞMA ve SONUÇ	74
8	KAYNAKLAR	84
9	ETİK KURUL ONAYI.....	92
10	ÖZGEÇMİŞ.....	95

KISALTMALAR LİSTESİ

APD :	Aksiyon potansiyel süresi
BF :	Aydınlık alan (Bright field)
BMP4 :	Kemik morfojenetik proteini 4 (Bone morphogenetic protein 4)
bp :	Baz çifti
Ca ⁺² :	Kalsiyum
CRISPR :	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat
CTNT :	Kardiyak troponin T
D :	Kardiyomiyosit Farklılaşma Günü
DPBS :	Fosfat tampon çözeltisi (Dulbecco's phosphate-buffered saline)
EAD :	Early after depolarization
ECM :	Ekstraselüler matriks
EKG :	Elektrokardiyografi
EKH :	Embriyonik kök hücre
F:	Forward Primer
FBS :	Fetal sığır serumu (Fetal bovine serum)
FEF :	Fare embriyo fibroblast
FGF2 :	Fibroblast büyüme faktörü 2 (Fibroblast growth factor 2)
HDR :	Homoloji yönlendirmeli tamir (Homology directed repair)
kb :	Kilo baz
kDa :	Kilo Dalton
IKr :	Hızlı potasyum akımı

IKs :	Yavaş potasyum akımı
Ks :	Yavaş potasyum kanalı
Kv :	Voltaj kapılı potasyum kanalı
K ⁺ :	Potasyum
mRNA :	Haberci RNA
Na ⁺ :	Sodyum
ng :	Nanogram
NHEJ :	Homolog olmayan uçlardan birleşme (Non-homologous end joining)
MYH6 :	Miyozin ağır zincir 6
MYH7 :	Miyozin ağır zincir 7
PZR :	Polimeraz zincir reaksiyonu
PFA :	Paraformaldehit
R:	Reverse Primer
qRT-PZR :	Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
QTc :	Doğrulanmış QT aralığı (corrected QT)
sgRNA :	Kılavuz RNA (single guide RNA)
sn :	Saniye
SSNs :	Sekans-spesifik nükleazlar
UPK :	Uyarılmış pluripotent kök
UQT :	Uzun QT
μg :	Mikrogram

TABLolar LİSTESİ

Tablo 5.1. Moleküler tekniklerde kullanılan sarf malzemeler	25
Tablo 5.2. TA Klonlanmada kullanılan sarf malzemeler	26
Tablo 5.3. Hücre kültüründe kullanılan sarf malzemeler	27
Tablo 5.4. Hücre kültüründe kullanılan besiyeri içerikleri.....	28
Tablo 5.5. Protein izolasyonu ve Western Blot çalışmalarında kullanılan sarf malzemeler	29
Tablo 5.6. İmmunokimyasal boyamalarda kullanılan birincil ve ikincil antikorlar ..	30
Tablo 5.3.1. Tez çalışması kapsamında kullanılan cihazlar	30
Tablo 5.6.1. Kardiyak farklılaştırmada kullanılan protokoller.....	32
Tablo 5.6.2. Kardiyak farklılaştırmada kullanılan küçük moleküller	34
Tablo 5.7.1.1. Genomik DNA'dan yapılan PZR'de kullanılan malzemeler	35
Tablo 5.7.1.2. Genomik DNA'dan yapılan PZR'de kullanılan protokol	36
Tablo 5.7.2.1. Ligasyon işlemi sırasında kullanılan malzemeler	37
Tablo 5.7.2.2. M13 primer sekansları.....	38
Tablo 5.7.2.3. Koloni PZR'de kullanılan malzemeler.....	38
Tablo 5.7.2.4. Koloni PZR'da kullanılan prosedür	39
Tablo 5.7.3.1. KpnI diyagnostik kesimde kullanılan malzemeler.....	39
Tablo 5.8.1.1. cDNA sentezinde kullanılan malzemeler.....	41
Tablo 5.8.1.2 PZR'de kullanılan prosedür	41
Tablo 5.8.2.1 qRT-PZR'de kullanılan primer çiftleri.....	41
Tablo 5.8.2.2. qRT-PZR'da kullanılan malzemeler	43
Tablo 5.8.2.3. qRT-PZR'de izlenen prosedür	43
Tablo 5.9.1. Bloklama ve dilüsyon solüsyonları	44
Tablo 5.10.1. Örneklerden izole edilen protein konsantrasyonları	45
Tablo 5.10.2. Western Blot'da kullanılan birincil - ikincil antikorlar ve dilüsyonlar	46
Tablo 5.11.2.1. Kullanılan ilaçlar ve uygulama konsantrasyonları.....	47
Tablo 6.1. Tez çalışması kapsamında kullanılan hücrelere ait genel bilgiler.....	48

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.2.1. İnsana ait şematik EKG görüntüsü.	7
Şekil 4.2.2. İyonların hücre içine giriş-çıkışlarını gösteren ventriküler aksiyon potansiyeli	8
Şekil 4.3.1. Sağlıklı ve UQT (A) Sağlıklı EKG görüntüsü, (B) UQT sendromuna ait EKG görüntüsü.....	9
Şekil 4.5.1. Somatik hücrelerin, UPK hücrelerine yeniden programlanması ve UPK hücrelerinin kardiyomiyositlere farklılaşması.....	11
Şekil 4.6.1. UPK kök hücre temelli hastalık modellenme basamaklarının şematik gösterimi.....	12
Şekil 4.7.1. Temel genom düzenleme mekanizmaları.	13
Şekil 4.7.2. CRISPR/Cas9 sisteminin genetik düzenleme ve DNA tamir mekanizmasının çalışması.....	14
Şekil 4.9.1. Hasta ve sağlıklı bireylerde UPK kök hücre temelli kardiyomiyositlerin elektrofizyolojik çıktılarının şematik olarak gösterimi.	16
Şekil 4.9.1.1. EKG, aksiyon potansiyel, alan potansiyel ve Ca^{+2} görüntüleme yöntemleri kullanılarak sağlıklı ve UQT sendromuna sahip kardiyomiyosit hücrelerinden elde edilen sinyallerin örnek gösterimi	17
Şekil 4.9.3.1. xCELLigence RTCA Cardio ECR cihazının elektrotlarla kaplı ticari hücre kaplarının ışık mikroskobu altında görüntüsü.....	20
Şekil 4.9.4.1. Yama kıskacı ile kardiyomiyositlerden alınan aksiyon potansiyelinin sınıflandırılması.....	21
Şekil 4.9.4.2. Yama kıskacı ile sağlıklı ve hasta UPK hücre kökenli kardiyomiyositlere ait aksiyon potansiyel ve kanal geçirgenliğinin örnek gösterimi	21
Şekil 5.1.1. Tez çalışmasının grafiksel özeti.....	25
Şekil 5.6.1. STEMdiff kardiyomiyosit farklılaştırma kit protokolü	33
Şekil 5.7.1. Klonlama sırasında kullanılan (A) TA klonlama stratejisi, (B) pGEM-T vektörü (Promega).	35
Şekil 5.7.2.1. Klonlama sırasında kullanılan hesaplama.	37
Şekil 6.1. UPK hücrelerinin köken aldığı hastaların soy ağacı.....	48
Şekil 6.1.1.1. Sağlıklı ve mutant hücelere ait pluripotensi genlerinin RNA düzeyinde incelenmesi.....	49

Şekil 6.1.1.2. Sağlıklı ve mutant hücrelere ait 3 germ yaprağı genlerinin RNA düzeyinde incelenmesi	50
Şekil 6.1.2.1. UPK hücrelerinin immunositokimyasal karakterizasyonu	51
Şekil 6.1.3.1. UPK hücrelerine ait karyotip analiz sonuçları.....	52
Şekil 6.2.1. CRISPR/Cas9 ile genetik olarak düzenlenmiş UPK hücrelerine ait heterozigot formdaki DNA sekans bilgisi.....	53
Şekil 6.3.1. TA klonlama işleminde kullanılan (A) pGEM-T vektörü (Promega), (B) <i>KCNQ1</i> primerleri kullanılarak cr211, cr36 ve cr152 hücrelerine ait DNA PZR sonrasında oluşan 473 bp boyundaki ürünler.....	54
Şekil 6.3.2. DH5 α hücrelerine verilen vektörlerin insertle beraber ligasyon reaksiyonu sonucunda gözlemlenen (A) cr36 insert, (B) cr211 insert, (C) cr152 insert ve (D) Sadece vektör içeren koloniler.	54
Şekil 6.3.3. M13 primerleri ile koloni PZR sonucunda jel görüntüsü	55
Şekil 6.3.1.1 İnsert içeren plazmid PZR DNA fragmanlarının KpnI enzim kesim sonuçları	56
Şekil 6.3.2.1 CRISPR/Cas9 ile genetik olarak düzenlenen UPK hücrelerinde NHEJ sonucunda oluşan delesyonlar.....	57
Şekil 6.3.2.2. cr152 UPK hücresinde meydana gelen 1 bp'lik delesyonun erken durdurucu kodon oluşturması.....	58
Şekil 6.4.1. UPK kök hücre kaynaklı kardiyomyositlerin RNA düzeyinde incelenmesi.....	60
Şekil 6.5.1. Abcam, Santa Cruz ve Alomone marka <i>KCNQ1</i> antikörlerinin <i>KCNQ1</i> kanal proteinini tanıma bölgeleri	62
Şekil 6.5.2. <i>KCNQ1</i> antikörlerinin Western Blot analiz optimizasyonu.....	63
Şekil 6.5.3. UPK hücre kökenli kardiyomyositlerde Western Blot yöntemi ile <i>KCNQ1</i> protein analizleri.....	64
Şekil 6.5.4. Jel içerisinde bulunan proteinlerde kütle spektrofotometri analizi.....	66
Şekil 6.6.1.1. UPK kök hücre kökenli kardiyomyositlerde Ca ⁺² görüntüleme.	67
Şekil 6.6.1.2. UPK kök hücre kökenli kardiyomyositlerin Ca ⁺² bağımlı Fluo-4 yoğunluklarının incelenmesi	68
Şekil 6.6.1.3. MATLAB programı tarafından çizilen kardiyomyositlerin kasılma grafiği	69

Şekil 6.6.1.4. cr152 UPK hücre kökenli kardiyomiyositlerde gözlemlenen farklı fenotipteki kasılma grafiği	70
Şekil 6.6.1.5. UPK hücre kökenli kardiyomiyositlerin karşılaştırılmalı Ca ⁺² analizi.	71
Şekil 6.6.2.1 Sağlıklı SP1-2S kardiyomiyositlerinde ilaç denemeleri.....	71
Şekil 6.6.2.2. İlaç aday moleküllerinin uygulanması.....	72



1 ÖZET

KCNQ1 GENİ CRISPR/CAS9 SİSTEMİ İLE DÜZENLENMİŞ İNSAN UYARILMIŞ PLURİPOTENT KÖK HÜCRE KAYNAKLI KARDİYOMİYOSİTLERİN KARAKTERİZASYONU

Kalp ritim bozukluklarından klinikte sıklıkla rastlanan kalıtsal Uzun QT (UQT) sendromu, hastaya özgü uyarılmış pluripotent kök (UPK) hücre kökenli kardiyomiyositler kullanılarak *in vitro* modellenenmektedir. UQT sendromu Tip 1 tanısı konulmuş hastalardan ürettiğimiz UPK hücrelerinde var olan heterozigot *KCNQ1* c.965 C/T gen mutasyonu CRISPR sistemi ile vahşi tip alele laboratuvarımızda çevrilmiştir. Tez kapsamında, CRISPR/Cas9 genom düzenleme sonrası homolog olmayan uçların birleşmesini esas alan DNA tamir mekanizması ile düzenlenen 3 farklı *KCNQ1* delesyon varyantı TA klonlama yöntemi ile ayrıştırıldı. Yeni gelişen mutasyonların ikisi *KCNQ1* protein sekansında çerçeve kaymasına sebep olurken, bir varyantta erken durdurucu kodon oluşturduğu ön görüldü. CRISPR ile düzenlenen ve köken aldıkları sağlıklı ile mutant UPK hücrelerinden elde edilen kardiyomiyositler, moleküler ve elektrofizyolojik olarak incelendi. *KCNQ1* varyantlarına sahip olan kardiyomiyositlerin farklılaşma süreçlerinde, ürettikleri gen ve protein miktarlarında sağlıklı hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi. Yapılan Ca^{+2} a bağlı Fluo-4 görüntüleme analizlerinde, hastalarda gözlenen QT aralığındaki uzamaya benzer olarak mutant *KCNQ1* geni ifade edilen kardiyomiyositlerin kasılma-gevşeme mesafesinin sağlıklı kardiyomiyositlere göre uzadığı gözlemlendi. *KCNQ1* kanal modülatörü ML277 ve JNJ303, sağlıklı, mutant ve genetik olarak düzenlenmiş hücrelerde uygulanarak elektrofizyolojik etkileri incelendi. Gelecek çalışmalarda oluşturulan bu *in vitro* modelde ve farklı iyon kanalı mutasyonuna sahip kardiyomiyositlerde farklı ilaçlar ve dozları incelenebilir. Böylece ilaç moleküllerinin klinikte UQT sendromunun tedavisine yönelik yeni uygulamalar geliştirilebilir ve hastalık mekanizması detaylı incelenebilir.

Anahtar kelimeler: Uzun QT Sendromu Tip 1, Uyarılmış Pluripotent Kök (UPK) Hücre, UPK Hücre Kökenli Kardiyomiyosit, CRISPR/Cas9, Homolog Olmayan Uçlardan Birleşme

*Bu araştırma TÜBİTAK 1003 Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı tarafından 213S192 nolu proje ve İstanbul Medipol Üniversitesi BAP Komisyonu tarafından 2018/17 nolu proje kapsamında desteklenmiştir.

2 ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF CRISPR/CAS9 EDITED *KCNQ1* GENE VARIANTS IN HUMAN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELL-DERIVED CARDIOMYOCYTES

Hereditary Long QT (LQT) syndrome is frequently encountered in the clinic and it causes cardiac rhythm disorders. LQT syndrome can be modelled *in vitro* using patient specific induced pluripotent stem cells (iPSCs) derived cardiomyocytes. Genome editing studies were performed by targeting the heterozygous c.965 C/T mutation in *KCNQ1* gene of iPSCs obtained from patients diagnosed with Long QT (LQT) syndrome type 1. After genetic modification by CRISPR/Cas9 system, random deletions were detected in 3 different variants of iPSCs which edited DNA repair mechanism by NHEJ. Heterozygous sequences generated after genome editing were separated by TA subcloning. Newly developed mutations were shown to cause frame shifts in the *KCNQ1* protein sequences while producing an early stop codon in one variant. Cardiomyocytes obtained from CRISPR-edited cells and from healthy and mutant iPSCs were examined at the molecular and electrophysiological level. In the differentiation processes of cardiomyocytes with *KCNQ1* variants, there was no statistically significant difference in expression of cardiac specific genes and proteins when compared to healthy cells. However, in electrophysiological analyses, the QT interval of cardiomyocytes with mutant *KCNQ1* gene were found to be longer than healthy cells similar to the clinical phenotype. Several drug candidates allosterically interacting with *KCNQ1* protein, such as ML277 and JNJ303, have been studied for therapeutic potential in genome-edited iPSCs derived cardiomyocytes. In the future studies, therapeutic application can be screened in the *in vitro* platform developed in this study that has various forms *KCNQ1* mutations. This way, disease mechanism can be explored in greater detail and new drug candidates can be developed.

Key words: Long QT Syndrome Type 1, Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs), iPSCs-Derived Cardiomyocytes, CRISPR/Cas9, Non-Homologous End Joining

*This study was supported via TÜBİTAK under 1003 Scientific and Technological Research Projects Funding Program by project no: 213S192 and supported via İstanbul Medipol Üniversitesi BAP Committee by project no: 2018/17.

3 GİRİŞ VE AMAÇ

Somatik hücreler embriyonik kök hücelere özgü Oct-4, Sox2 ve Klf4 gibi transkripsiyon faktörlerinin aktarılmasıyla yeniden programlanarak uyarılmış pluripotent kök (UPK) hücelere dönüştürülebilmektedir. Kişiyeye veya hastaya özgü elde edilen ve laboratuvar ortamında sınırsız üretilebilen UPK hüceleri son yılların en önemli bilimsel buluşları içerisinde yer almaktadır. UPK hüceleri, *in vitro* ortamda hücrel sinyal mekanizmalarını manipüle edebilen küçük moleküller kullanılarak kardiyomiyositler de dahil çeşitli özelleşmiş hücelere farklılaştırılmaktadır. Böylelikle hasta bireylerden elde edilen UPK hücelere köken alan farklılaştırılmış hücelere kullanılarak *in vitro* hastalık modelleri oluşturularak hastalık mekanizmalarının aydınlatılması amaçlanmaktadır. UPK hücelereinden elde edilen kardiyomiyositler başta olmak üzere farklılaştırılan hücelere, sağlıklı ya da hasta bireyin genetik bilgisini tamamen taşıdığından genotip-fenotip ilişkisini *in vitro* inceleme olanağı vermektedir.

In vitro kardiyak hastalık modelleri kalıtsal kalp hastalığına sahip bireylerden üretilen UPK hücelereinin kardiyomiyositlere farklılaştırılmasıyla oluşturulabilmektedir. Toplumda 1:2000 sıklıkta görülen (1) ve ölümcül kalp ritim bozukluğuna sebep olan Uzun QT (UQT) sendromu UPK hücre kökenli kardiyomiyositler kullanılarak modelleyebilmekteyiz (Makale gönderim aşamasında). UQT sendromu en yaygın alt tipi olan Tip 1 teşhisi konulan hastaların kan ve deri hücelereinden elde edilen UPK hücelereini çoğaltıp, Wnt sinyal yolağını düzenleyen küçük moleküller kullanarak hastaya özgü kardiyomiyositleri üretebilmekteyiz (2). Son yıllarda geliştirilen en ileri genom düzenleme sistemi olan CRISPR tekniğı ile knock-out, knock-in veya baz değışikleri yapılmak istenen sekans bölgesine özgü tasarlanan rehber RNA ile Cas9 hedef bölgeye yönlendirilebilmekte ve genetik değışiklik yapılabilmektedir (3). Genetik olarak düzenleme sırasında Cas9 enzimi tarafından çift zincirde oluşan kesik homolog rekombinasyon (HDR) veya serbest uçların homolog olmayan bağlanması (NHEJ) ile tamir edilmektedir. HDR ile düzenlenen DNA'da kayıp bazların eşlenmesi kalıp DNA zinciri kullanılarak yapılır. Böylece orijinal sekans dizisi korunur. NHEJ ile kırık zincir uçların birleştirilmesi kalıp bir DNA kullanılmadan çok hızlı bir şekilde gerçekleştirilmektedir. Bu sebeple

NHEJ ile düzenlenen hücreler fonksiyonel olarak farklı fenotipte hastalık modeli oluşturabileceği gibi fonksiyonel düzelmeye sebep olabilecek çeşitli yeni mutasyonlara neden olabilir.

Laboratuvarımızda TÜBİTAK destekli tamamlanan bir çalışma kapsamında hastaya özel üretilen UPK hücrelerinde *KCNQ1* gen bölgesinde bulunan heterozigot c.965 C/T mutasyonu sağlıklı tipe; sağlıklı hücrelerde ise mutant tipe CRISPR/Cas9 teknolojisi kullanılarak dönüştürülebilmektedir. Genetik değişikliğe sahip olan hücrelerden NHEJ ile meydana gelen UPK hücrelerinde mutasyonlar gözlemlenmiştir. Bu yüksek lisans tez projesi kapsamında CRISPR/Cas9 sistemi ile NHEJ DNA tamir mekanizmasını seçerek genetik düzenlenen UPK hücrelerinden farklılaştırılan kardiyomyositler; moleküler, morfolojik ve elektrofizyolojik düzeyler incelenerek karakterize edilmiştir. UPK hücre kökenli kardiyomyositlerin uygulanan çeşitli ilaç adayları ile sağlıklı ya da mutant tipte c.965 C/T mutasyonunun etkileri incelenmesine yönelik çalışmalar başlatılmıştır.

Elde edilen hasta ve sağlıklı bireylere spesifik UPK hücreleri moleküler olarak karakterize edilmişlerdir. Embriyonik kök hücreye özgü olan pluripotensi genleri olan *Oct4*, *Sox2* ve *Nanog* ile *Tra1-60* ve *Tra1-80*'nin hem RNA hem de protein düzeyinde ifade edildiği tespit edilmiştir. Yapılan immunositokimyasal boyamalar, pluripotent kök hücrelere özgü olan yüzey ve nükleer proteinlerini ürettiklerini göstermiştir. Pluripotent kök hücreler 3 germ yaprağı olan ve gelişimsel süreçte ektoderm, endoderm ve mezoderm tabakalarına dönüşebilmektedir. Yapılan qRT-PZR çalışmaları ile UPK hücrelerinin spontan farklılaşma yetenekleri gösterilmiştir.

Genetik düzenleme sonrasında heterozigot sekans bilgisi içeren NHEJ ile oluşmuş 4 varyant hücre seçilmiştir. Hem sağlıklı hem de mutant allellerden gelen sekans bilgileri alt klonlama tekniklerinden olan TA klonlama ile ayrıştırılmıştır. Varyant dizileri Sanger sekanslama sonrasında incelenerek UPK hücrelerinde meydana gelen delesyonlar tespit edilmiştir. Mutant SP2-9 hücresinde yapılan genetik düzenleme sonucunda elde edilen cr211 hücresinde 2 bp'lik delesyon oluşmuşken, cr152 hücresinde 1 bp'lik delesyon ile çerçeve kayması meydana gelmiştir. Sağlıklı SP1-2S hücresinde izogenik kontrol amaçlı yapılan CRISPR/Cas9 düzenlemesi sonrasında oluşan cr36 15 bp'lik delesyona sahiptir. Cr152 kolonisinin protein sekansı incelendiğinde meydana gelen delesyonun erken durdurucu kodona sebep olduğu

dolayısıyla kesilmiş KCNQ1 proteinini kodlayacağı tespit edilmiştir.

Tez kapsamında sağlıklı SP1-2S, mutant SP2-9 ve bu hücrelerden köken alınarak CRISPR/Cas9 sistemi ile oluşturulan delesyonlara sahip UPK hücreleri küçük moleküller ve ticari protokoller kullanılarak kişiye özgü kardiyomiyositlere farklılaştırıldılar. Kardiyomiyositler matürasyonu sağlayan D50-65 günleri arasındayken izole edilen RNA ve proteinler kullanılarak moleküler olarak karakterize edilmişlerdir. Gen ekspresyon analiz sonuçlarına göre oluşan delesyonların kardiyak genlerin ekspresyon seviyesini etkilemediği görülmüştür. Diğer iyon kanalları üzerinde de bir etki gözlemlenmemiştir.

Sağlıklı ve mutant allele sahip UPK hücre temelli kardiyomiyositlerde KCNQ1 protein boyutu ve seviyesi Western Blot çalışmalarıyla incelemeler yapıldı. Elimizde bulunan üç farklı ticari markadan KCNQ1 antikoru ile optimizasyon çalışmaları yapıldı. Sonuç olarak Abcam marka KCNQ1 proteinini amino ucundan tanıyan antikorun, Alomone ve Santa Cruz marka KCNQ1 antikorlarına göre literatürle tutarlı ve spesifik sonuçlar tespit edildi. cr152 UPK, cr211 UPK ve sağlıklı kontrol olarak EKH kökenli kardiyomiyositlerinden elde edilen proteinler Western Blot çalışması ile analiz edildi. Tüm örneklerde ~75 kDa civarında KCNQ1 protein ekspresyonu gözlemlendi. Yükleme kontrolü kullanılan α -Tubulin protein ekspresyonlarının hücreler arasında farklılıklar göstermesinden her bir örneği kendi kontrol proteinine oranlayarak kantitatif protein analizi yapıldı. Cr152 UPK hücresinde NHEJ sonrasında oluşan 1 bp'lik delesyonun mutant allelede erken durdurucu kodon oluşturduğu ön görülmektedir. Bu yüzden yapılan Western Blot çalışmalarında cr152 UPK hücre kökenli kardiyomiyositlerde KCNQ1 protein ekspresyonunun sağlıklı allel tarafından sentezlendiğinden membran üzerinde görülmektedir.

KCNQ1 geninde meydana gelen mutasyon LQT sendromu tip 1 tanısı konulan hastaların EKG'lerinde QT aralıklarının uzaması şeklinde görülmektedir. Dolayısıyla hastalardan elde edilen UPK hücre kökenli kardiyomiyositlerin klinikle benzer fenotip göstermesi beklenmektedir. Sağlıklı SP1-2S, mutant SP2-9 ve CRISPR ile düzenlenmiş hücreler Ca^{+2} bağımlı floresan bir boya olan Fluo-4 kullanılarak elektrofizyolojik olarak atımları gözlemlenmiştir. MATLAB programı kullanılarak yazılmış analiz programı ile hücrelerin kasılıp-gevşemesi sırasında sitoplazmaya saldıkları Ca^{+2} yoğunluğu hesaplanarak oluşturulan atım sıklıkları incelendi. Mutant

allele sahip hücrelerin QT aralığının sağlıklı olan hücrelere göre uzun olduğu tespit edilmiştir. Böylelikle verilerimiz klinik veriler ile örtüşmektedir.

Literatürde sınırlı bilgi bulunan, *KCNQ1* kanal proteini ile direkt olarak ilişkili ilaç aday moleküller olan ML277 ve JNJ303 UPK kökenli hücrelerde uygulandı. ML277 molekülünün I_{K_s} 'yi arttırarak QT aralığının kısalmasına sebep olurken yapılan ilaç çalışmalarında literatürle farklı olarak QT aralıklarının uzadığı tespit edildi. I_{K_s} blokörü olan JNJ303 molekülünün uygulaması sonrasında literatürle ters olarak QT aralığının kısaldığı görüldü. İstatiksel analizlerin yapılabilmesi amacıyla ilaç doz uygulamalarının arttırılması planlandı. β -adrenerjik antagonist olan isoproterenol uygulaması sonucunda CRISPR ile düzenlenmiş UPK hücre kökenli kardiyomyositlerin bir dakikadaki atım sayıları artmıştır. Böylelikle elde ettiğimiz kardiyomyositlerde bulunan *KCNQ1* mutasyonlarının β -adrenerjik reseptörler üzerinde olumsuz etkileri saptanmamıştır.

Bu tez çalışması kapsamında *KCNQ1* geninde gerçekleşen farklı mutasyonların kardiyomyositlerin morfolojik yapısında ve kanal proteinleri dışında kardiyak hücrelere özgü olan genlerin ekspresyonunda etkileri moleküler düzeyde araştırılmaktadır. Protein anomalisine sebep olacak düzeydeki ağır mutasyonların ilaçlarla ve/veya mutasyonun olduğu kanal ile allosterik ilişkide bulunan ilaç aday moleküllerin tedaviye yönelik yaklaşımları incelenmesi için değerli bir model ortaya konmuştur. Farklı mutasyonlar bulunduran *KCNQ1* geninin kardiyomyosit elektrofizyolojisi üzerindeki etkileri ilk defa incelenmesi yönüyle özgün değere sahiptir.

4 GENEL BİLGİLER

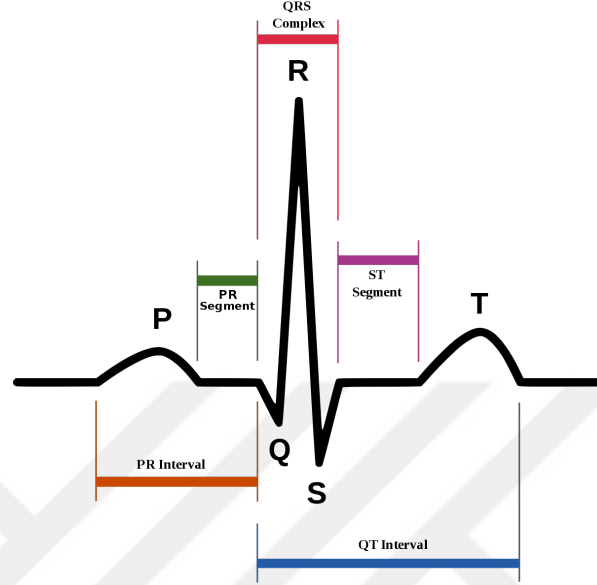
4.1 İnsanda Kalp Gelişimi ve Fizyolojisi

İnsan kalbi, embriyogenez sırasında ilk fonksiyonellik kazanan organdır. Fertilizasyon sonrasında ilk 20-22 gün arası süreçte kalp kasılmaya ve kan pompalamaya başlamaktadır. Kalp, iç tabakasını ve atria-ventriküler boşlukları kaplayan endokardiyum, koroner damarlarca zengin olan ve kasılmayı sağlayan miyokardiyum ve dış yüzeyi saran epikardiyum tabakalarından oluşmaktadır. Miyokardiyum elektriksel iletkenlik sayesinde kalbin bütünsel olarak kasılıp gevşemesini senkronize edebilmektedir (4). Gastrulasyon sırasında asimetrik bir yapıya sahip olan kalbin oluşumunda önemli rol alan kardiyak progenitör hücreler embriyonun mezodermal kraniyal lateral bölgesine yerleşerek primer kalp alanını oluştururlar. Oluşan kardiyojenik bölgede vasküler endokardiyal tüpler insanda 15. günde gelişir. Kraniyal endodermden salgılanan vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) ile vaskülogenez tetiklenir. Sadece endotelden oluşan primitif kalp tüpü atriyum, ventrikül ve endokardiyum progenitör hücrelerini içerir (5). İlkel endokardiyal tüpler ve miyokardiyum, miyokardiyum tarafından salgılanan kardiyak jelly ile birbirinden ayrılır. BMP ve FGF sinyal yolları tarafından kontrol edilen mezodermal hücrelerden oluşan miyokardiyumun dış çevresine göç eden hücreler, ektodermal yapıyı oluşturmaktadır (6). Wnt sinyal yolağının regülasyonu sonucunda primer kalp alanı oluşumu devam ederken miyokardiyal hücreler çoğalmaya başlayarak arteriyal ve venöz boşlukları oluşturur (4). Böylece sekonder kalp alanı oluşmaya başlar. Posteriyor sekonder kalp alanı oluşumu Wnt sinyal yolağı üzerinden gerçekleşirken; anterior sekonder kalp alanı retinoik asit tarafından düzenlenen mekanizmalar üzerinden gerçekleşmektedir (7).

4.2 Elektriksel Akımın İletilmesi ve Elektrokardiyografi

Klinikte kalbin kasılıp gevşeme sırasında sergilediği elektrofizyolojik patern, elektrokardiyografi (EKG) ile deriye elektrotların bağlanması sonucunda ölçülebilmektedir. Sağlıklı bir kalbin EKG sinyali; P, QRS kompleksi ve T dalgası olmak üzere üç dalgadan oluşmaktadır (Şekil 4.2.1). P dalgası kulakçıkların kasılmasını (depolarizasyon), QRS kompleksi karıncıkların aktifleşerek kasılmasını ve T dalgası aktif halde bulunan kulakçıkların gevşemesini (repolarizasyon) işaret

etmektedir. EKG sinyalinin analizi sırasında dikkate alınan QT uzunluğu, QRS kompleksinin başlangıcından T dalgasının bitimine kadar olan süreyi göstermektedir (8).



Şekil 4.2.1. İnsana ait şematik EKG görüntüsü.

Kalpte ritmik kasılmalar; sinoatriyal düğümde oluşan impulsların, atriyum miyokardından ventrikül miyokardına düzenli olarak yayılması sonucunda oluşmaktadır. Ritmik kasılmalar sebep olan elektriksel uyarılar kardiomyosit membran potansiyelinde değişikliklere sebep olmaktadır. Ventriküler, miyokardiyal ve purkinje liflerinden kayıt edilen aksiyon potansiyelleri Faz 0, 1, 2, 3 ve 4 olarak adlandırılmaktadır (9) (Şekil 4.2.2):

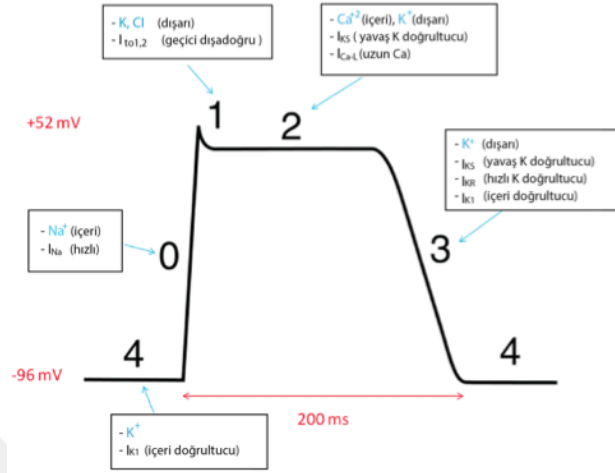
Faz 0: En kısa süren fazdır. Na^+ kanalları hızlıca açılır, sodyum hücre içine girer ve membran depolarizasyonu başlar.

Faz 1: Na^+ kanalları kapanır, Cl^- hücre içerisine girer ve kısmi repolarizasyon gerçekleşir.

Faz 2: K^+ hücre dışına yavaş olarak çıkarken; Na^+ ve Cl^- hücre içine yavaşça girer. Plato fazı olduğundan dolayı aksiyon potansiyelinin en uzun aşaması gerçekleşir.

Faz 3: Na^+ ve Ca^{+2} yavaş giriş kanalları kapanırken K^+ hızlı kanal aktivasyonu devam etmektedir. Böylece repolarizasyonun son fazı gerçekleşir.

Faz 4: Aksiyon potansiyeli biter ve sonrasında dinlenme fazı başlar. Kardiyomiyositler, Sodyum/Potasyum pompası kullanarak iyonların dinlenme fazındaki hücre içi konsantrasyonlarına dönmesini sağlar.



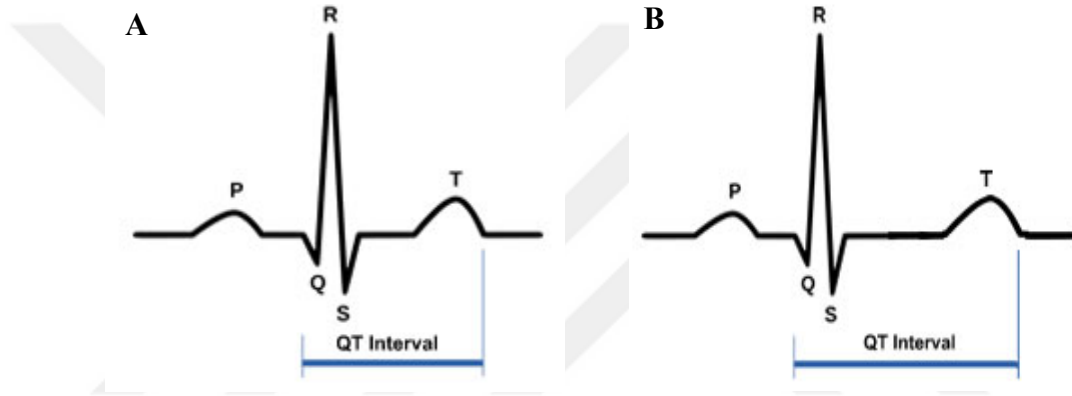
Şekil 4.1.2. İyonların hücre içine giriş-çıkışlarını gösteren ventriküler aksiyon potansiyeli (9).

4.3 Uzun QT (UQT) Sendromu

Uzun QT (UQT) sendromu, konjenital kardiyak aritmi bozukluklarının en yaygın formlarından biridir. Miyokardiyal repolarizasyonun gecikmesinin sonucunda QT aralığının uzaması ile karakterize edilmektedir (10,11). Sağlıklı bir erkekte QT uzunluğu <440 milisaniye (ms); kadında ise <460 ms'dir. Şekil 4.3.1'de sağlıklı bir birey ile UQT sendromu'na sahip bireyler arasındaki QT uzunluğunda artış görülmektedir. QT aralığının 500 ms üzerine çıkması kalpte aritmilere sebep olmaktadır. Bu sendromun toplumda görülme sıklığı 1/2000'dir (1). Kalıtsal olarak aktarılan UQT sendromu ikiye ayrılmaktadır: 1. otosomal dominant olan Romano-Ward Sendromu (12,13), 2. otosomal resesif olan Jervell and Lange-Nielsen Sendromu (14). UQT sendromunun dominant veya resesif kalıtım gösterebilen en az 17 farklı tipi (UQT1-17) mevcuttur. Bu alt tipler arasında hastaların % 40-50 oluşturan klinikte en yaygın görülen UQT sendromu Tip 1'dir (11,15).

UQT sendromu Tip 1, voltaj kapılı potasyum kanalını kodlayan *KCNQ1* geninde mutasyon oluşması sonucunda meydana gelmektedir (11). *KCNQ1* geni yavaş geçişli potasyum (K_s) kanalının α -altünitesini kodlamaktadır. Fonksiyonel K_s kanalı;

α -altünitesi ile β -altünitesi olan KCNE1 ve adaptör protein olan Yotiao'nun bir araya gelerek makromoleküler kompleks bir yapı oluşturması ile fonksiyonel hale gelmektedir (10, 16, 17). Yotioa proteini, K_s kanalının ikincil mesajcılar üzerinden kontrol edilmesinde görev alırken; *KCNQ1* geni kanalı oluşturan temel proteindir. Gen tarafından kodlanan KCNQ1 proteini, aksiyon potansiyeli oluşumunda plato ve repolarizasyon aşamasında görev almaktadır. *KCNQ1* geninde meydana gelen mutasyonlar K_s kanalının fonksiyonunun bozulmasına, aksiyon potansiyel süresinin (APD) uzamasına sebep olur (18). *KCNQ1* geninde tespit edilen yaklaşık 300 farklı mutasyonun UQT sendromuna neden olduğu bilinmektedir (19,20).



Şekil 4.2.1. Sağlıklı ve UQT (A) Sağlıklı EKG görüntüsü, (B) UQT sendromuna ait EKG görüntüsü (18).

4.4 Embriyonik ve Uyarılmış Pluripotent Kök (UPK) Hücreler

Embriyoların iç hücre külesinden elde edilen embriyonik kök hücreler (EKH), embriyonik gelişim süresinde vücuttaki tüm doku ve organları oluşturma potansiyeline sahip olduklarından pluripotent karaktere sahiptirler. EKH'ler, fertilizasyon sonrasında gerçekleşen içi boşluklu blastosist denen hücre topluluğu yapısını oluşturmaktadırlar. Blastosistin içerisinde bulunan hücreler ektoderm, endoderm ve mezodermden oluşan 3 germ yaprağı hücrelerine farklılaşabilmektedir. Bu nedenden dolayı rejenerasyon yetenekleri yüksektir. EKH'ler, telomeraz aktivitelerinin yüksek olmasından dolayı sınırsız bölünme ve çoğalma özelliklerine sahiptirler (21).

Çeşitli insan somatik hücrelerine Oct-3/4, Sox-2, c-Myc ve Klf4 transkripsiyon faktörlerinin viral transdüksiyon yöntemiyle aktarılmasıyla pluripotent özellikli insan

kök hücreler elde edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda UPK hücrelerinin EKH gibi sınırsız bölünebildikleri, 3 germ yaprağı hücrelerine dönüşebildikleri ve pluripotent hücre belirteç genlerini ürettikleri tespit edilmiştir (22). UPK hücrelerinin sınırsız bölünebilme yeteneği sayesinde rejeneratif tıp, yapay doku ve/veya organ üretiminde önemli bir rol oynamaktadır. Bununla birlikte UPK hücreleri köken aldıkları somatik hücrenin genetik bilgisini taşıdıklarından kişiye özgü hastalık modellemelerinde ve yeni tedavi yöntemlerini destekleyici ilaç denemelerinde yaygın kullanılabilir (23). Genetik hastalık tanısı konulmuş bir bireyden üretilen UPK hücreleri hastalık fenotipi gösteren kardiyomiyositlere farklılaştırılabilirliklerinden dolayı *in vitro* hastalık modellenmektedir. Böylece yeniden programlanma teknolojisi ile oluşturulan uyarılmış pluripotent kök (UPK) hücreler, son yıllarda kişiselleştirilmiş tıp gibi bireye özgü hastalık genotip ve fenotiplerin derinlemesine çalışılabilmesi için önemli bir alan yaratmaktadır.

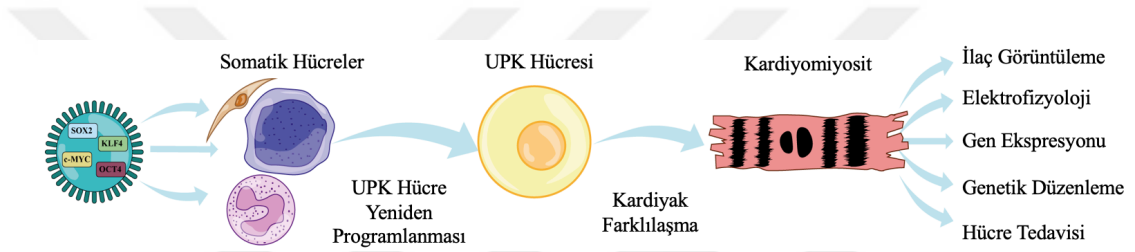
Laboratuvarımızda çalışılan ve aritmi çeşidi olan UQT sendromuna sahip olan hastalardan alınan somatik hücrelerden yeniden programlanarak elde edilen UPK hücreleri farklılaştırılarak oluşturulan kardiyomiyositlerin hasta fenotipi sergilediği hem moleküler hem de elektrofizyolojik olarak gösterilmiştir (Makale aşamasında). Bu çalışmalara ek olarak embriyonik kök hücrelerde eksprese edilen *NANOG*, *OCT3/4*, *Sox2* ve *Tra1-60* gibi pluripotent genler UPK hücrelerinde de üretilmektedir.

4.5 İnsan Temelli UPK Hücrelerinden Kardiyomiyosit Farklılaşması

Hastadan elde edilen UPK hücrelerinin farklılaştırılması ile elde edilen kardiyomiyositler, kişiye ait mutasyon bilgilerini genetik materyallerinde taşımalarından dolayı *in vitro* hastalık modellemelerinin oluşturulmasında temel rol oynamaktadır (Şekil 4.5.1). UPK hücreleri sinyal yollarının çeşitli küçük moleküller ile regülasyonu sonucunda olgun hücre tiplerine farklılaştırılabilir (2). Kalp kası hücreleri olan kardiyomiyositlerin bölünme yeteneklerinin kısıtlılığından dolayı hücre kültürü çalışmaları sınırlı olarak yapılabilmektedir. UPK hücrelerinin sınırsız bölünme özelliklerinden faydalanarak elde edilen farklılaştırılmış kardiyomiyositler sayesinde kardiyak doku çalışmaları, ilaç denemeleri ve genetik düzenlemeler gibi pek çok alanda çalışmalar yapılabilmektedir (24).

Kardiyak gelişimde evrimsel olarak en önemli rol alan WNT ve TGF-beta sinyal yollarının regülasyonu sonucunda kardiyomiyosit farklılaştırılması yapılmaktadır. Fakat farklılaştırılma süresince elde edilen hücre kültürlerinde genellikle ventriküler, atrial, nodal vb. kalp hücre tiplerinin bulunduğu heterojen kültürler elde edilmektedir (2, 25, 26, 27).

Literatürde birçok farklılaştırma metodu bulunmakla beraber sıkça kullanılan tek katmanlı farklılaştırma metodudur. UPK hücreleri direkt olarak buldukları kültür içerisine CHIR99021, IWP, BMP-4, aktivin A, askorbik asit gibi kimyasal moleküller ve/veya büyüme faktörleri ile manipülasyon sonucunda kardiyomiyositlere farklılaştırılmaktadır (2, 25, 26, 27).



Şekil 4.5.1. Somatik hücrelerin, UPK hücrelerine yeniden programlanması ve UPK hücrelerinin kardiyomiyositlere farklılaşması. UPK hücre: uyarılmış pluripotent kök hücre (28).

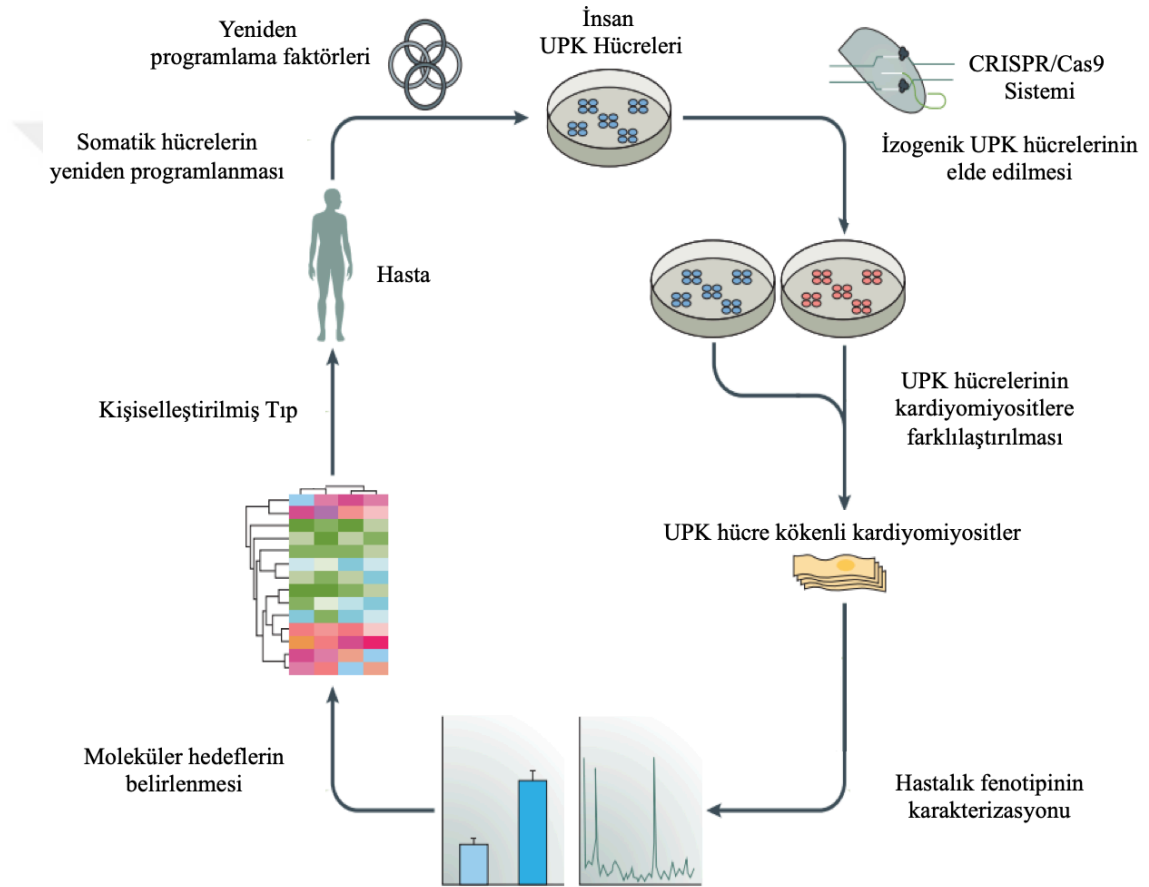
4.6 Kişiyeye Özgü UPK Hücreleri Kullanılarak Kalp Hastalıklarının Modellenmesi

Genetik hastalıkların patolojik mekanizmalarının anlaşılabilmesi için son yıllarda UPK hücreleri terapötik yaklaşımların keşfi için sıkça kullanılmaktadır. *In vivo* hayvan modellemeleri hastalık mekanizmalarının çözümlenmesi için uygun bir araç iken; kişiyeye özgü hücresel tedavi için sınırlayıcı bir etkinliktedir (29).

UPK hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen hastalık modellemelerinde öncelikle mutasyona sahip olan kişiden elde edilen UPK hücreler elde edilmektedir. Sonrasında bu hücreler kardiyomiyositlere farklılaştırılarak çeşitli kardiyak hastalıklar modellenmektedir. CRISPR/Cas9 gibi genetik araçlar sayesinde mutasyona sebep olan değişim düzeltilerek aynı zamanda izogenik hat oluşturularak mutasyon mekanizması da çözümlenebilmektedir. Aynı zamanda hastalığı tedavi etmeye yönelik

potansiyel ilaç hedefleri belirlenebilmekte, böylece kişiye özgü tedavi yapılabilmektedir (Şekil 4.6.1).

İnsan UPK hücre teknolojisi sayesinde farklı kalıtsal mekanizmalara sahip olan hastalıklar modellenmektedir: UQT Sendromu (29, 30, 31), Katekolaminerjik polimorfik ventriküler taşikardi (32), ailesel dilate kardiyomyopati (33), ailesel hipertrofik kardiyomyopati (34), aritmojenik sağ ventriküler kardiyomyopati (35), Brugada sendromu (36).

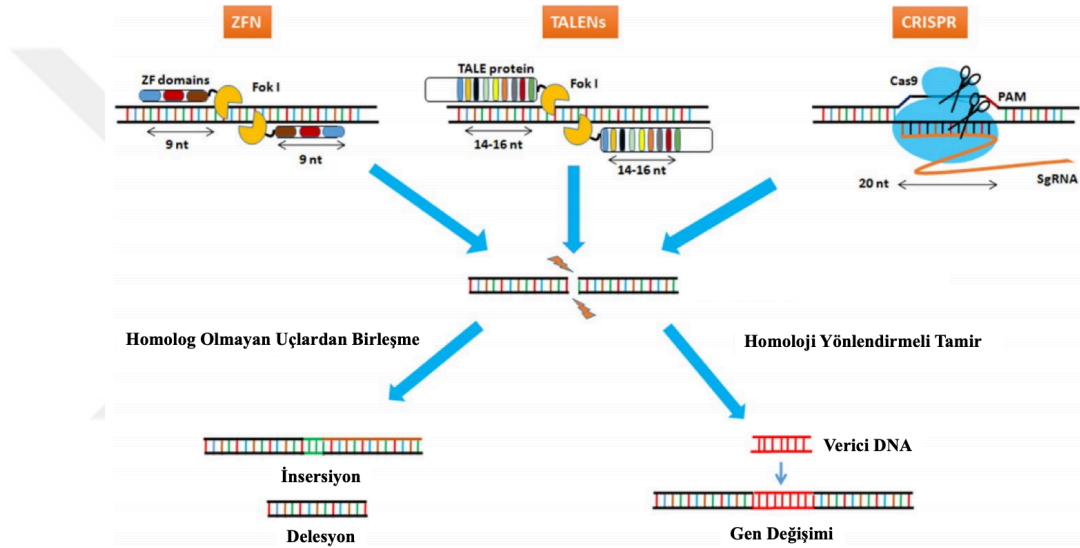


Şekil 4.6.1. UPK kök hücre temelli hastalık modellenme basamaklarının şematik gösterimi (29, 30).

4.7 CRISPR/Cas9 Sistemi ile Genom Düzenleme

DNA boyutunda knock-out, knock-in veya baz değişiklikleri ile genomik düzenlemeler yapılabilmektedir. Meganükleazlar, çinko-parmak nükleazlar (ZFNs), transkripsiyon aktivatörü gibi efektör nükleazlar (TALENs) ve son yıllarda geliştirilen

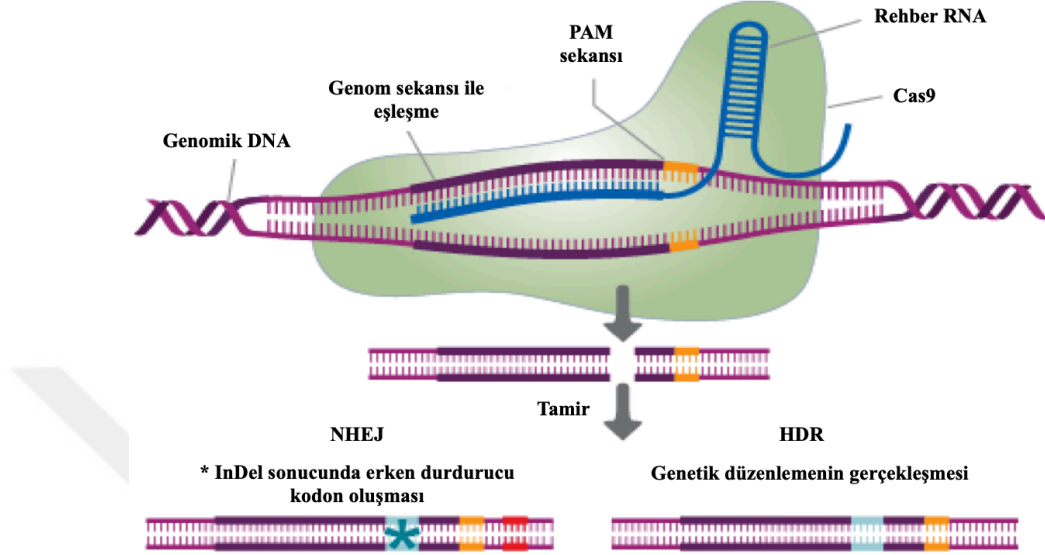
clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR/Cas9) ilişkili nükleaz Cas9 yer almaktadır (Şekil 4.7.1). Genom düzenleme araçları sekans-spesifik nükleazların (SSNs) mutasyona ilişkili bölgelere yönlendirilerek DNA’da çift zincir yarıklarının oluşturulması ve düzenlenmesini temel almaktadır (37). Hücre içerisinde iyonize radyasyon, replikasyon hataları, okside edici ajanlar gibi etkenler DNA’da çift zincir kırıkları oluşturabilmektedir. Gerçekleşen kırıklar, homoloji gösteren taslak DNA varlığında sırasında iki tamir mekanizmasından birini tercih etmektedir: homoloji yönlendirmeli tamir (Homology directed repair, HDR) ya da homolog olmayan uçlardan birleşme (Non-homologous end joining, NHEJ) (38).



Şekil 4.7.1. Temel genom düzenleme mekanizmaları (39).

CRISPR/Cas9 genomik düzenleme sisteminden önce kullanılan TALENs sisteminde hedef DNA’ya her bir nükleotidi tanıyacak TALEN; ZFNs sisteminde her üç nükleotidi tanıyan protein tasarımı yapılmaktadır (39). Bakteri ve arkealarda CRISPR / Cas9 sistemi RNA yönlendirici adaptif bağışıklık sistemi olarak işlev görür. (3, 40, 41, 42). CRISPR sistemi temel olarak iki bileşenden oluşmaktadır: DNA’yı çift zincirinden aynı anda kesebilen Cas9 proteini ve hedef DNA bölgesini tanıyabilecek olan kısa yönlendirici RNA’dır (Şekil 4.7.2) (43). CRISPR/Cas9 sistemi ile knock-out, knock-in veya baz değişiklikleri ile genomik düzenleme sırasında DNA’da oluşan çift zincir kırıkları tamir amaçlı HDR ya da NHEJ’den birini seçmektedir. HDR sisteminde kardeş kromatit zincirinin hasarlı bölgeye invazyonu sayesinde oluştuğundan hata oranı bu tamir sisteminde düşük iken NHEJ sisteminde ise yüksektir. CRISPR/Cas9

sistemi ile genomik modifikasyon sonucunda gerçekleşen tamir mekanizmalarında NHEJ'in hücreler tarafından seçilmesi istenmeyen delesyon, insersiyon ve baz değişikliklerine sebep olabilmektedir (44).



Şekil 4.3.2. CRISPR/Cas9 sisteminin genetik düzenleme ve DNA tamir mekanizmasının çalışması (45). NHEJ: homolog olmayan uçlardan birleşme, HDR: homoloji yönlendirilmiş tamir, InDel: insersiyon ve delesyon.

Bakteride bulunan doğal CRISPR sistemi, hücre içerisine giren viral DNA'da bulunan kısa tekrarların bakteri genomuna dahil edilmesi ile bakterilerin virüslere karşı direnç kazanmasını sağlar. Böylece bir bakteri kolonisi aynı virüs ile ikinci kez enfekte olduğunda, bu genom tekrarlarının transkriptleri istilacı virüsün tamamlayıcı DNA'sına bir nükleaz yönlendirir ve böylece viral DNA'nın yıkılması sağlanır (41, 42). Ökaryotik hücrelerde gen hedefleme kapasitesini sağlamak için CRISPR/Cas9 sistemi üç temel bileşen kullanmaktadır: Cas9, spesifiklik belirleyici CRISPR RNA (crRNA) ve yardımcı trans-aktive edici RNA (tracrRNA). CrRNA ve tracrRNA ikilileri kimerik bir tekli oluşturmak için kaynaştırılabilir böylece kılavuz RNA (sgRNA) oluşturulur. sgRNA'nın ilk ~20 nükleotitleri, hedef DNA dizisine tamamlayıcıdır. Bu bölgeyi takip eden tipik bir NGG dizisi olan protonpacer bitişik motif (PAM), bulunmaktadır (44, 45). PAM motifi ve sgRNA'nın Cas9'u yönlendirmesi sonucunda hedefleme özgünlüğü sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. Buna rağmen sgRNA yönlendirici sekansın PAM-distal kısmındaki üç ila beş baz çifti uyumsuzluğu bile potansiyel olarak hedef dışı DNA zincirlerinin kesilmesini mümkün

kılmaktadır (45). DNA üzerinde gerçekleştirilen konformasyonel deneyler, PAM bölgesinin dışında PAM'a doğrudan bitişik olan crRNA tamamlayıcı dizisinin 3' ucunun tanıma kapasitesi de Cas9 bağlanması özgünlüğünü ve nükleaz aktivitesinin başlamasını etkilemektedir. Buna ek olarak yapılan çalışmalar göstermiştir ki farklı kılavuz RNA yapılarının, hedef ve hedef dışı DNA zincirlerinin kesilmesini etkilemektedir (46, 47).

4.8 Kardiyak Aritmilerde Terapatik Genom Düzenlemeleri

Genetik kardiyovasküler hastalıklar gen düzenleme teknolojisi kullanılarak tedavi edilebilmektedir. Genom düzenlenerek monogenik kardiyovasküler hastalıklara sahip bireylerin yavrularından kalıcı olarak genom bozuklukları çıkartılabilir. Literatürde yaygın olarak kullanılan birkaç tekniğin yan etkileri bulunmasına ve çalışmaların henüz küçük hayvan modellerini geçememesine rağmen somatik genom düzenlemeleri çeşitli kardiyovasküler hastalıklar için yararlı olabilir. Teknik olarak uygulanabilir olan bu tedavi yöntemi yakın gelecekte insanlar tarafından etik olarak tartışılacaktır (48).

Hipertrofik kardiyomyopati, kardiyak kaslarda meydana gelen ve ventriküler hipertrofi, aritmi eğilimi, senkop ve kalp yetmezliğine sebep olan kalıtsal bir hastalıktır. *MYBPC3* geninde meydana gelen mutasyon popülasyonda üçte bir oranında gözlemlenen kalıtsal kardiyomyopatiye sebep olmaktadır. İnsan kaynaklı germ hücrelerinde *MYBPC3* geninde meydana gelen mutasyonun CRISPR/Cas9 genetik düzenleme sistemi ile sağlıklı tipe düzenlendiği gösterilmiştir (49).

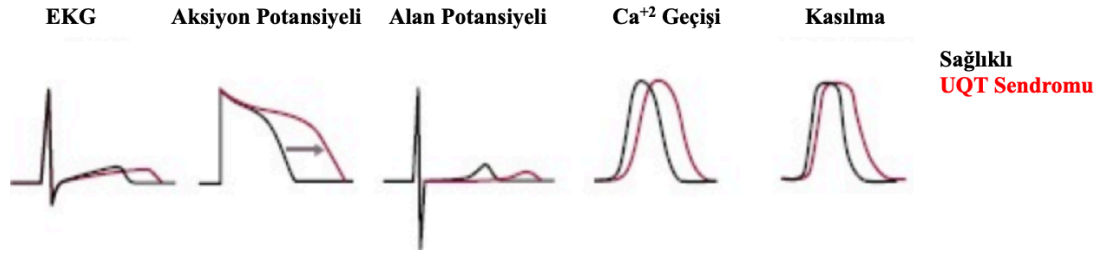
Duchenne muskular distrofi, X'e bağlı olarak kalıtılan, iskelet kaslarında zayıflığa neden olan ve ölümcül kardiyomyopatidir. Hastalığa sebep olan distrofin geni 79 ekson uzunluğundadır. Farelerde yapılan CRISPR/Cas9 genetik düzenleme çalışmalarında mutasyonun düzenlendiği genin uzun olmasından dolayı stabil sonuçlar elde edilememiştir. Yapılan çalışmaların artırılması gerekmektedir (50).

Kalıtsal olarak aktarılan iyon kanalı bozuklukları ve diğer kardiyak aritmilerde de CRISPR/Cas9 sistemi ile genetik düzenleme çalışmaları yapılmaktadır. Popülasyonda 1:2000 oranında gözlemlenen ve 17 alt tipi bulunan UQT sendromu literatürde sıkça genetik düzenleme çalışmaları için kullanılmaktadır.

Kalsiyuma bağlanan ve L-tipi kalsiyum kanalı ile yakın ilişkide bulunan kalmodulin proteinini kodlayan gende (*CALM1*, *CALM2* ve *CALM3*) meydana gelen mutasyon sonucunda aksiyon potansiyel süresi uzamaktadır. Mutasyon sonucunda *CALM1*, *CALM2* ve *CALM3* genleri mRNA seviyesinde yüksek ifade edilmektedir. CRISPR/Cas9 sistemi ile yapılan çalışmalar sonucunda *in vitro* koşullarda mRNA ekspresyon seviyesinin azaldığı görülmektedir. *In vivo* çalışmalar ve UQT sendromunun diğer tiplerinde yeni çalışmalar yapılmalıdır (51).

4.9 Kardiyak Hücrelerde *in vitro* Elektrofizyolojik Analizler

UPK hücrelerinden farklılaştırılan kardiyomiyositler somatik hücrenin elde edildiği hasta veya sağlıklı bireyin klinik fenotipini sergilerken aynı zamanda hasta veya sağlıklı bireyde gözlemlenen benzer elektrofizyolojik çıktıyı da yansıtmaktadır (Şekil 4.9.1). Hücre bazlı elektrofizyolojik çıktılar; Ca^{+2} görüntüleme, çoklu elektrot dizileri veya yama kısılacı ile hücre kültüründe tespit edilebilmektedir (52, 53, 54).



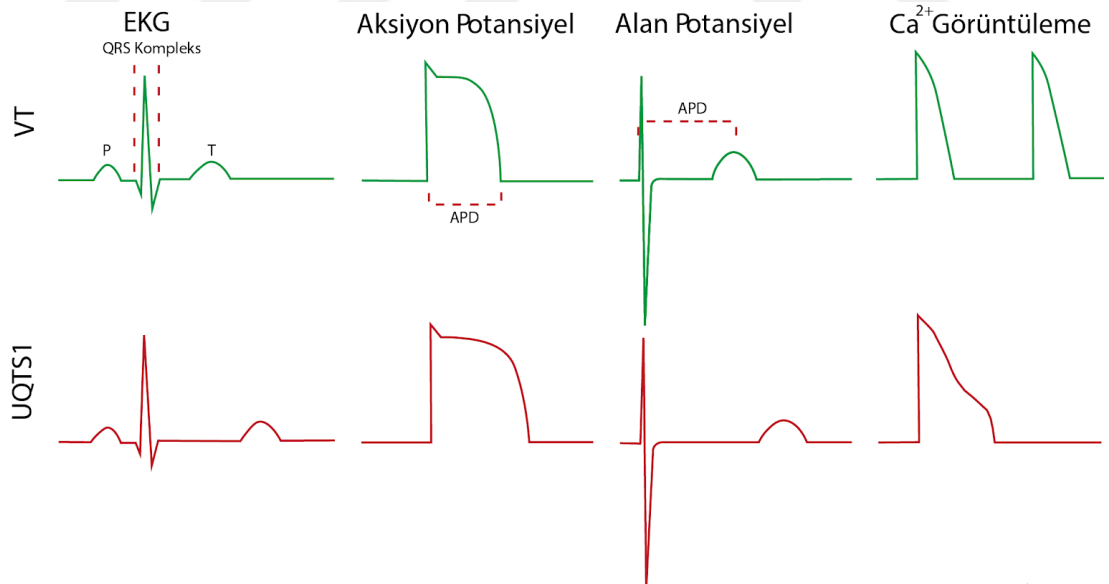
Şekil 4.9.1. Hasta ve sağlıklı bireylerde UPK kök hücre temelli kardiyomiyositlerin elektrofizyolojik çıktılarının şematik olarak gösterimi.

4.9.1 Ca^{+2} Görüntüleme

Kalbin miyokardiyum hücrelerin kasılıp-gevşemesi sırasında hücre içi iyon akışı değişmektedir. Elektriksel sinyal ile hücre dışında yoğun olan konsantrasyonu yoğun olan Na^{+} iyonu hücre içine girerken oluşturduğu elektriksel potansiyel değişimi ile voltaj duyarlı Ca^{+2} kanalları açılır ve hücre içine Ca^{+2} girişi gerçekleşir. Hücre içi Ca^{+2} seviyesindeki artış sarkoplazmik retikulumdaki Ca^{+2} rezervlerinin boşalmasına ve kas kasılmasına sebep olmaktadır (55). Bu nedenle Ca^{+2} iyonunun konsantrasyonunun ve hücre içi-dışı arasındaki geçişlerinin görüntülenmesi kardiyomiyosit hücrelerinin elektrofizyolojik incelenmesinde başvurulan önemli bir tekniktir. Bu nedenle, hücre içi serbest Ca^{+2} 'ya bağlanabilen floresan özellikli Fluo-4,

Fura-2 ve Rhod-2 gibi kalsiyum değişimine duyarlı sentetik boyalar sayesinde hücre içi kalsiyumun değişimi boyaların sahip olduğu floresan şiddetinin değişiminden tespit edilebilmektedir (56). Kalsiyum metabolizmasının takibi sayesinde hücrelerin elektrofizyolojisi incelenebilmektedir (57, 58).

Kardiyomiyosit kültürleri ile yapılan çalışmalarda Ca^{+2} görüntüleme hücrelerin sağlık durumları veya uygulanan müdahalenin incelenmesinde sıklıkla başvurulan bir tekniktir (59, 60). Benzer şekilde, UPK hücre temelli kardiyomiyosit çalışmalarında da kullanılan Ca^{+2} görüntüleme kardiyomiyosit hücrelerinin karakterizasyonuna ve ilaç moleküllerinin etki mekanizmasını incelemeye olanak sağlamaktadır (61). UQT Sendromu'na sahip UPK hücre temelli kardiyomiyositlerin Ca^{+2} değişimleri sağlıklı hücelere göre daha uzun sürede gerçekleşmektedir. Bu nedenle Early After Depolarization (EAD) veya Delayed After Depolarization (DAD) gözlemlenmektedir. EAD'ler, kardiyomiyositlerin repolarize olma haline geçtikleri fazda birden gerçekleşen aksiyon potansiyel sonucunda beklenmeyen depolarizasyonun gerçekleşmesidir. Hücreler tamamen repolarize olduktan sonra depolarizasyon olduğunda DAD gerçekleşmektedir. DAD, aritmi başlangıcı ile doğru orantılıdır (62).



Şekil 4.9.1.1. EKG, aksiyon potansiyel, alan potansiyel ve Ca^{+2} görüntüleme yöntemleri kullanılarak sağlıklı ve UQT sendromuna sahip kardiyomiyosit hücrelerinden elde edilen sinyallerin örnek gösterimi. EKG: Elektrokardiogram, APD: Aksiyon Potansiyel veya Alan Potansiyel Süresi, VT: Sağlıklı hücre (28).

Literatürde Fura-2 boyası ile yapılan gözlemlerde hasta kökenli UPK hücrelerden farklılaştırılan kardiyomiyositlerin kasılma kinetiği ve aksiyon potansiyel sürelerinin klinik veriler ile doğru orantılı olduğu gözlemlenmiştir. Fura-2 ile yapılan bir çalışmada UQT Sendromu Tip 1 hastalığına sahip UPK hücre kökenli kardiyomiyositlerin kasılmasının sağlıklı kardiyomiyositlere göre uzun sürdüğü ve bu hücrelerin aksiyon potansiyel sürelerinin de uzun olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.9.1.1). Bu çalışma sayesinde Ca^{+2} görüntüleme tekniğinin UPK hücre kökenli kardiyak hastalık modeli çalışmalarında kullanabilecek bir metot olduğu gösterilmiştir (63, 64).

UQT sendromu tip 1 ve UQT sendromu tip 2 kökenli UPK hücrelerden farklılaştırılan kardiyomiyositlerde Fluo-4 ile yapılan farklı bir çalışmada kalsiyum değişiminin sağlıklı hücrelere göre uzun sürede gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Kalsiyum görüntüleme ile eş zamanlı olarak alınan yama kıskacı kayıtları Ca^{+2} floresan değişimi ile elektriksel aktivitenin benzer profile sahip olduğu gösterilmiştir. Bu çalışma ile, alt tipleri farklı olan UQT sendromuna sahip kardiyomiyositlerin kasılma kinetikleri serbest Ca^{+2} 'ye bağlanabilen Fluo-4 molekülü ile saptanabileceği gösterilmiştir. Böylece hastalıklı ve sağlıklı kardiyomiyositlerin QT uzunlukları arası fark tespit edilebilmektedir (64).

4.9.2 Çoklu Elektrot Dizileri (MEA)

Çoklu elektrot dizi (Multi Electrode Array, MEA) sistemlerinin içerisinde bulundurduğu elektrotlar sayesinde hücrelerin anlık kasılıp-gevşemeleri ve empedansları ölçülebilmektedir. Bu sistemler sayesinde ölçülen kardiyomiyosit alan potansiyeli ile organ bazlı ölçülen EKG kayıtlarının örtüştüğü gösterilmiştir (52, 53).

MEA sistemleri içerdikleri elektrotların fonksiyonel yapılarına göre çeşitlenmektedirler. Bu elektrotlar sayesinde MEA sistemleri hücrelerin empedans ve alan potansiyelini ölçebilmektedir. Empedans elektrotları bulunan sistemlerde elektrotların üzerine ekilen kardiyomiyositlerin yoğunluğu dolayısıyla canlılığını ve yüzeye bağlanma gücüne paralel olan değeri ölçmektedir. Aynı zamanda kardiyomiyositlerin kasılıp gevşeme durumları anlık empedans değişimleri olarak kayıt edilmektedir. Eğer empedans elektrotlarının üzerine çoğalabilme özelliğine sahip olan hücreler ekilirse zamana bağlı olarak hücre sayısındaki artış miktarı da

hesaplanabilmektedir (52). Alan potansiyeli ölçen elektrot bulunduran MEA sistemlerinde ise hücrelerdeki aksiyon potansiyel değişimi toplu olarak görüntülenebilmektedir. Grup halinde bulunan kardiyomiyositlerin aksiyon potansiyelindeki anlık değişim, hücre dışı alandaki anlık dalgalanmalar elektrotlar sayesinde ölçülerek saptanabilmektedir. Kardiyomiyositler tarafından üretilen aksiyon potansiyeli birbirleri arasında ilgili elektrotta göre yayılırken alan potansiyelinde meydana gelen değişimler MEA tarafından ölçülür (52, 53).

İyon kanallarının aktivitesinde meydana gelen değişimler alan potansiyelinde zamana bağlı saptamalara neden olabilir. Voltaj-kapılı Na^+ kanalının hızla açılıp kapanması kardiyomiyositlerin depolarize olmasına ve alan potansiyelinde hızlı bir artış-azalışa neden olur. *KCNQ1* gibi gecikmeli doğrultucu tipteki potasyum kanallarının açılıp hücre dışına K^+ iyonu geçişi kardiyomiyositlerin tekrar repolarize olmasına ve alan potansiyelinde EKG grafiğine benzer bir T-dalgası oluşmasına sebep olur (52).

4.9.3 RTCA xCELLigence CardioECR

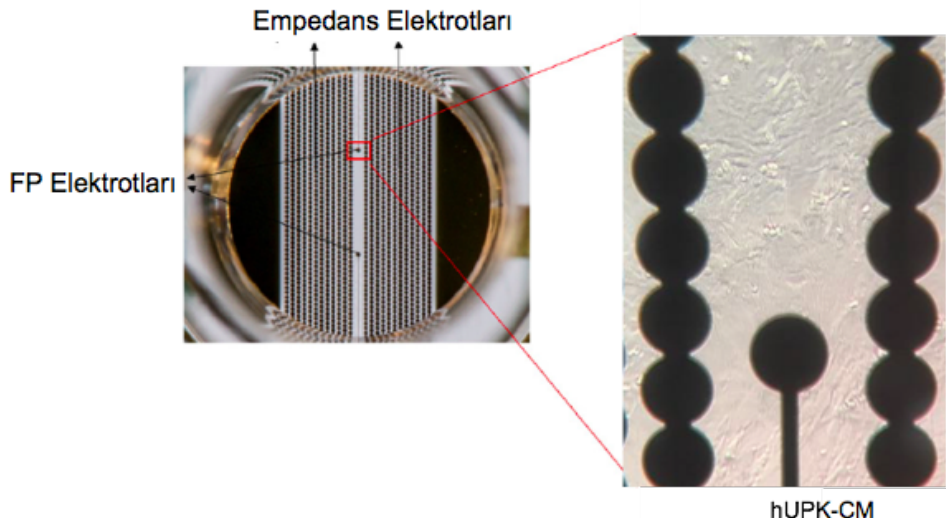
Organ bazlı EKG ölçümlerindeki QT aralığının hücresel karşılığı kardiyomiyositlerin depolarize ve tekrar repolarize duruma gelmeleri arasında geçen zamana denk gelmektedir. Bu süreç, alan potansiyeli süresi (FPD) olarak adlandırılmaktadır. Elektrotlar ile ölçülebilen FPD sayesinde kardiyomiyositlerin hem elektriksel aktivitelerindeki anlık değişimler gözlemlenebilmektedir hem de kasılma kinetikleri ölçülebilmektedir.

Empedans elektrotlarını içeren sistemler kardiyomiyositlerin kasılma kinetiğindeki anlık değişimleri ölçebilmektedir. Fakat yapılan literatür çalışmalarında kalp ile ilgili klinik vakalarda ve yapılan klinik ile karşılaştırmalı deneysel çalışmalarda, organ ve hücre düzeyinde elektriksel uyarım ve kontraktilitenin her zaman eş zamanlı ya da düzenli gerçekleşmediği gözlemlenmiştir (65). Böyle farklı elektrofizyolojik çıktılarının değerlendirilebilmesi için hem FPD'yi hem de kontraktilitiyi eş zamanlı ölçebilecek bir MEA sistemi geliştirilmiştir (52).

2014 yılında üretilen xCELLigence RTCA CardioECR sistemi içerisinde bulunan elektriksel potansiyel ve empedans elektrotları sayesinde,

kardiyomiyositlerin, hem elektriksel uyarımı hem de kasılma aktivitesini ölçebilmektedir (Şekil 4.9.3.1).

Ticari olarak elektriksel aktiviteyi ya da kardiyomiyositlerin kontraktilesini etkileyen moleküller ve ilaçlar bulunmaktadır. xCELLigence RTCA CardioECR cihazı aynı anda iki farklı elektrot sistemi bulundurduğundan hem hasta hem de sağlıklı hücrelerden elde edilen UPK hücre kökenli kardiyomiyositlere uygulanan ilaçlar analiz edilebilir. Böylece piyasaya sürülecek ilaçların toksisite testleri hızlı bir şekilde yapılabilmektedir (52, 66, 67).



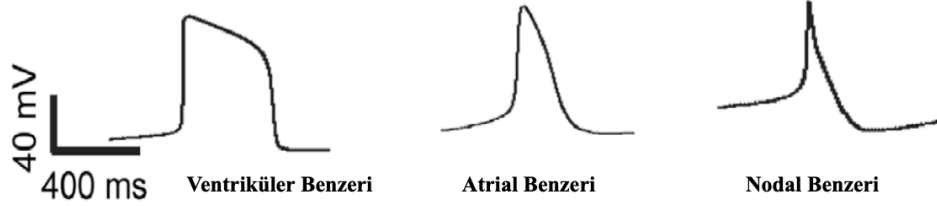
Şekil 4.9.3.1. xCELLigence RTCA Cardio ECR cihazının elektrotlarla kaplı ticari hücre kaplarının ışık mikroskobu altında görüntüsü. FP: Alan Potansiyeli, hUPK-CM: İnsan kaynaklı UPK hücre kökenli kardiyomiyosit.

4.9.4 Yama Kıskaçı (Patch Clamp)

Tek hücreye ait elektriksel aktivitenin, aksiyon potansiyelinin ve iyon kanalı kinetiğinin ölçülmesi yama kıskaçı (patch clamp) sayesinde gerçekleştirilmektedir. Literatürde gösterilen çalışmalar göre yama kıskaçı ile kayıt alınan UPK hücre kökenli kardiyomiyositlerin iyon kanalı kinetiklerinin klinikte elde edilen elektrofizyolojik kayıtlarla benzer olduğu saptanmıştır (52, 53, 54).

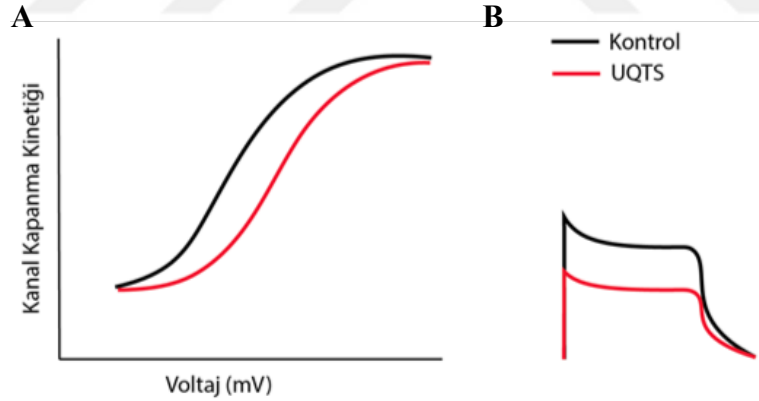
Yama kıskaçı, aksiyon potansiyelini ölçen voltaj kıskaçı ve iyon kanal kinetiğini ölçen akım kıskaçından oluşmaktadır. Voltaj kıskaçında hücrenin sahip olduğu elektriksel potansiyel sabit tutularak akım değişimleri ölçülmektedir. Aynı

zamanda akım kıskaçında ise akım sabit tutularak hedef hücredeki voltaj değişimleri ya da aksiyon potansiyeli kaydedilmektedir. Akım kıskaçı metodu kullanılarak UPK hücre kökenli kardiyomiyositlerden alınan aksiyon potansiyel sinyallerinde frekans, genlik ve sinyal oluşum süresi kullanılarak kardiyomiyositler kulakçık benzeri, karıncık benzeri ve nodal benzeri olmak üzere sınıflandırabilmektedir (Şekil 4.9.4.1) (68).



Şekil 4.9.4.1. Yama kıskaçı ile kardiyomiyositlerden alınan aksiyon potansiyelinin sınıflandırılması (68).

UQT Sendromu hastalarından elde edilen UPK hücre kökenli kardiyomiyositlerden alınan yama kıskaçı kayıtları hastalığın klinik fenotipine benzer aksiyon potansiyel süresinde de uzama gözlemlenmektedir (68, 69) (Şekil 4.9.4.2).



Şekil 4.9.4.2. Yama kıskaçı ile sağlıklı ve hasta UPK hücre kökenli kardiyomiyositlere ait aksiyon potansiyel ve kanal geçirgenliğinin örnek gösterimi. (A) Voltaj-akım oranı grafiği, (B) Voltaj kenetleme ile iyon geçirgenliği.

Literatüre bakıldığında UQT sendromu tip 1 hastalarından elde edilen UPK hücre kökenli kardiyomiyosit çalışmalarını ilk defa Moretti ve arkadaşları ortaya koymuştur (29). Bu çalışmada, hasta fenotipine benzer elektriksel aktivite sergileyen UPK hücre temelli kardiyomiyositlere K_s bloklayıcısı Chromanol 293B ve K_r

bloklayıcısı E4031 eklenerek iyon kanalların kinetikleri incelenmiştir. Yapılan voltaj kıskacı kayıtları sonucunda *KCNQ1* gen mutasyonlarının K_s fonksiyonel bozukluğuna sebep olduğu elektrofizyolojik düzeyde tespit edilmiştir. UQT sendromu hastalarından üretilmiş UPK hücre kökenli kardiyomiyositlerle yapılan çalışmalarda yama kıskacı ile hastalığın karakterizasyonun yanında ilaç taramaları da bu teknik kullanılarak test edilmektedir (29). Wang ve arkadaşları tarafından *KCNQ1* ve *KCNH2* gen mutasyonlarını taşıyan UPK hücre temelli kardiyomiyositlerden alınan yama kıskacı kayıtlarında aksiyon potansiyel süresinde normale göre uzama tespit edilmiştir. Kliniğe benzer fenotip sergileyen hücrelere Ca^{+2} iyonun hücre içine girişini engelleyici bir ilaç olan Nifedipin uygulanmıştır. İlaç uygulaması sonunda AP zamanın kısaltıldığı ve normal fenotipe yaklaştığı tespit edilmiştir (70) Bir başka çalışmada ise UQT sendromu tip 1 hastasından elde edilen UPK hücre kökenli kardiyomiyositlerde aksiyon potansiyel süresinde uzama gözlemlenmiştir. Uygulanan K_s aktivatörü ML277 ile alınan yama kıskacı kayıtlarında aksiyon potansiyel süresinin normal süreye yaklaştığı tespit edilmiştir (71).

4.10 İyon Kanalı Modülatörleri ve Beta Blokörler

Çeşitli genetik ve/veya epigenetik değişimler sonucunda sinoatriyal düğümde oluşan impulsların miyokarda iletilmesi sırasında aksaklıklar meydana gelebilir. Kalp ritim bozukluklarının tedavisine yönelik anti-aritmik ilaçlar sıklıkla klinikte kullanılmaktadır (72).

Taşiaritmik ilaçlar etki mekanizmalarına göre yapıya özgü olan ve olmayanlar olmak üzere ikiye ayrılır. Reseptörlerle kompleks oluşturarak etki gösteren beta-blokörler yapıya özgü; membran yüzeylerine birikerek membran bileşenlerinin yüzey basıncı artışı ile görevlerini yapmasını engelleyen yapıya özgü olmayan ilaçlardır. Bunların yanı sıra taşiaritmik ilaçlar kardiyak etki potansiyellerine göre aşağıdaki şekilde sınıflandırılmaktadırlar (72):

Sınıf I: membran stabilize edici Na^+ kanal blokörleri (lidokain, meksiletin, flekainit vb.) Faz 0 aşamasında kalp hücrelerine Na^+ girişini yavaşlatır. Böylece Faz 0'ın hızı ve seviyesi düşerek aksiyon potansiyel amplitüdü azalır. Na^+ antagonistleri, membran stabilizatörleri veya antifibrilan olarak adlandırılırlar. Örneğin, flekainit (N-

(2-Piperidinilmetil)-2,5-bis(2,2,2-trifluoroetoksi)benzamid) Na⁺ kanallarının yanı sıra K⁺ kanallarını da kuvvetli biçimde bloke eder. Böylece ventriküler aritmilerle birlikte atriyal aritmileri de önlemektedir.

Sınıf II: beta-adrenerjik blokörler (propranolol vb.) kardiyak beta-adrenoreseptörlerin bloklanması ve miyokardiyal cevap inhibisyonu, membran stabilizasyonu gibi iki mekanizma ile etkilerini gösterirler.

Sınıf III: aksiyon potansiyelini dolayısıyla repolarizasyon süresini uzatan ilaçlardır (amiodaron, sotalol vb.). Faz 0'ın hızını, amplitüdünü ve dinlenme membran potansiyelini etkilemeden Faz 3'ün yavaşlamasını ve potasyum kanallarının inhibisyonunu sağlarlar. Diğer antiaritmik ilaçlara cevap vermeyen ventriküler taşikardi ve ventriküler fibrilasyon tedavisinde kullanılırlar.

Sınıf IV: Ca⁺² kanal bloklayıcıları (verapamil, diltiazem vb.) yavaş depolarizasyondan sorumlu olan kalsiyum iyonlarının sinoatriyal (SA) ve atriyoventriküler (AV) düğüm hücrelerinden girişini inhibe etmektedirler.

Sınıf V: diğer antiaritmikler (kalp glikozitleri, magnezyum vb.)

Literatürde bulunan hücresel çalışmalarda ve klinikte sıkça kullanılan ventriküler ve atriyal aritmileri Na⁺ kanalını bloklayarak düzenleyen Flekainit, Meksiletin; sempatik sinirlerin uyarılmasıyla ritmi düzenleyen Propranolol; repolarizasyon süresini uzatan Amiodaron, Sotalol ve Ca⁺² bloklayan Vapamil gibi ilaçlar UQT sendromuna için kullanılmaktadır. Fakat UQT sendromunun genetik bir hastalık olmasından dolayı hastalık için bir tedavi değil, hastalık belirtileri için kalıcı bir çözüm olmamakla beraber hastalık belirtilerinin iyileştirilmesinde kullanılmaktadır.

Anti-aritmik ilaçlar kalp ritmini düzenleyerek taşikardi gibi olağan dışı atım paternlerini önlemek için sıkça klinikte kullanılmaktadır (73). (Flecainit vb.),

ML277: UQT sendromu tip 1 hastalığında direkt olan rol alan *KCNQ1* proteinine yönelik direkt etki gösterme potansiyeline sahip olan literatürde belirtilen iki temel molekül bulunmaktadır. ML277 küçük molekülü, potasyum kanalının yavaş doğrultucu akımı (adrenerjik-duyarlı kardiyak potasyum akımı-IKS) arttırarak aksiyon

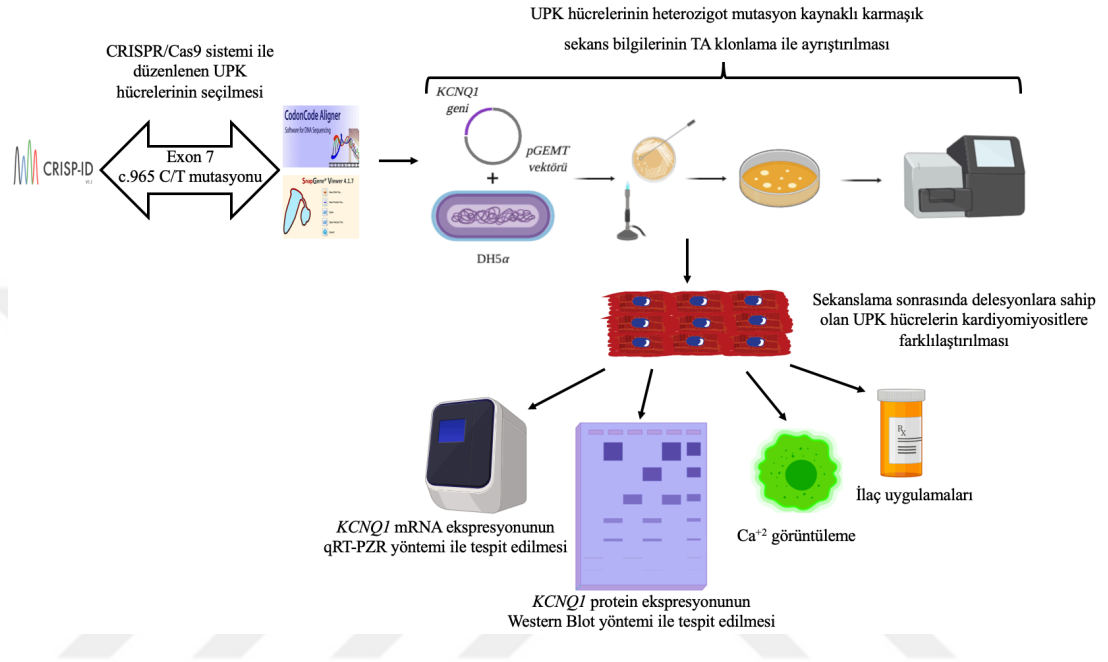
potansiyel süresini kısaltarak aritmiyi düzenlemektedir (74, 75). UQT sendromuna sahip hastadan elde edilen UPK hücrelerinden farklılaştırılan kardiyomiyositlerin ML277 eklemesi sonucunda aksiyon potansiyel süresinin normale yaklaştığı gösterilmiştir (76).

JNJ300: IK_s 'i bloklayarak aksiyon potansiyel süresini uzatmaktadır (76). IK_s kanalı, IK_r kanalının aktivasyonu üzerinde önemli bir rol oynamaktadır. IK_r kanalı hERG tarafından sentezlenmektedir. hERG kanalında meydana gelebilecek bir mutasyon repolarizasyonun yavaşlamasını dolayısıyla APD'nin uzamasına sebep olmaktadır. APD'nin uzaması ölümlere sebep olabilecek aritmilere sebep olmaktadır. Herhangi bir başka kanal üzerinde etkisinin olmadığı belirlenen JNJ303 molekülü kullanılarak direkt olarak IK_s kaynaklı aritmiler tedavi edilebilmektedir (77).

5 MATERYAL VE METOT

5.1 Deneysel Dizayn

Tez çalışması kapsamında izlenen basamaklar Şekil 5.1.1’de grafiksel olarak özetlenmiştir.



Şekil 5.1.1. Tez çalışmasının grafiksel özeti (78).

5.2 Kullanılan Sarf Malzemeler ve Besiyerleri

Yapılan tez çalışması kapsamında uygulanan tüm moleküler tekniklerde Tablo 5.2.1’de yer alan sarf malzemeler kullanılmıştır.

Tablo 5.1. Moleküler tekniklerde kullanılan sarf malzemeler

Sarf Malzemeler	Firma	Katalog Numarası
QIAamp DNA Mini Kit (50)	Qiagen	51304
QIAquick PCR Purification Kit (50)	Qiagen	28104
DNaseI Set, RNase-Free (50)	Qiagen	79254
iScript™ Advanced cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR	Bio-Rad	172-5037
iTaq Universal SYBR Green Supermix	Bio-Rad	172-5124

SYBR Safe DNA Gel Stain	Invitrogen	S33102
TriDye™ 1 kb Plus DNA Ladder	Thermo Scientific	N3270S
One Taq Hot Start Mix	BioLabs	M0488L
Gel Loading Dye Purple	BioLabs	B7024S
Agarose Jel	Multicell	800-015-EG
Rnase/Dnase İçermeyen Su	Sigma	W4502
Qubit RNA HS Assay Kit, 100 Assays	Invitrogen	Q32852
Individual PCR Tubes 8-Tube Strip	Bio-Rad	TLS0801
Eppendorf Tüpleri	Axygen	MCT-150-R

CRISPR/Cas9 genetik düzenlemesi sonucunda NHEJ ile oluşan UPK hücrelerinin karışık sekansı alt klonlama tekniği olan TA klonlama ile ayrıştırılmıştır. Kullanılan tüm malzemeler Tablo 5.2.2’de sunulmuştur.

Tablo 5.2. TA Klonlanmada kullanılan sarf malzemeler

Sarf Malzemeler	Firma	Katalog Numarası
Taq DNA Polimeraz	BioLab	M0320S
pGEM-T Vektör	Promega	A1360
LB Broth (Miller)	Biomatik	A8515
LB Agar (Miller)	Biomatik	A8517
Ampisilin (100mg/ml)	Multicell	450-110-EL
Plazmid Isolation Kit	AMBRD Laboratories	10-13-01-010
Plastik Öze	ISOLAB	S.082.01.003.010
100 mm Bakteri Petrisi	Corning	CLS430167

UPK hücre, UPK hücre kökenli kardiyomyositle ve insan kaynaklı fibroblastların pasajlanması, bakımı ve dondurulması gibi temel hücre kültürü tekniklerinde kullanılan sarf malzemeler Tablo 5.2.3’de listelenmiştir.

Tablo 5.3. Hücre kültüründe kullanılan sarf malzemeler

Sarf Malzemeler	Firma	Katalog Numarası
Matrigel Matrix	Corning	354277
%0.05 Trypsin/EDTA	Gibco	25300054
%0.25 Trypsin/EDTA	Gibco	25200056
TrypLE Express	Gibco	12604-013
ROCK Inhibitor (Y-27632)	Millipore	SCM075
DPBS (-CaCl ₂ , -MgCl ₂)	Gibco	14190-094
Primocin	InvivoGen	ant-pm-2
Normocin	InvivoGen	ant-nr
Stem-Cell Banker	ZENOAQ	CB046
mFreSR	Stem Cell Technologies	05853
Fluo-4, AM	Life Technologies	F14201
6 well plate	Corning	3516
12 well plate	Cell Star	665 180
E-Plate CardioECR 48	ACEA	00 300 600 940
15 ml Falkon	Falcon	352096
50 ml Falkon	Falcon	352070
Cryotube Vial	Nunc	363401
0.22 µm Filtre	Millipore	SLGP033RS
0.22 µm Filtre – 13mm	Thermo Scientific	720-1320
Multipipet	GILSON, pipetman	FA10009

UPK ve UPK hücre kökenli kardiyomyositlerin bakımı, farklılaştırılması ve dondurulmasında kullanılan temel besiyerlerinin içerikleri Tablo 5.2.4’te belirtilmiştir.

Tablo 5.4. Hücre kültüründe kullanılan besiyeri içerikleri

Sarf Malzeme	Miktar	Marka	Katalog Numarası
UPK Hücre Besiyeri-1			
Essential 8 Basal Medium	500 ml	Gibco	A15169-01
Essential 8 Suppement	50X	Gibco	A15171-01
P/S	%1	Gibco	15140-122
UPK Hücre Besiyeri-2			
mTESR1 Basal Medium	500 ml	Stem Cell Technologies	05851
mTESR1 5X Supplement	5X	Stem Cell Technologies	05852
P/S	%1	Gibco	15140-122
UPK Hücre Dondurma Besiyeri			
FBS	%90	Gibco	10270-106
DMSO	%10	ATCC	4-X-5
Kardiyak Farklaştırma Besiyeri			
RPMI	500 ml	Gibco	52400-025
B-27 Minus Insulin	50X	Gibco	A18956-01
Glutamax	%1	Gibco	35050-61
MEM NEAA	%1	Gibco	11140-050
P/S	%1	Gibco	15140-122
1-Thioglycerol	40000X	Sigma Aldrich	M6145
STEMdiff Kardiyomiyosit Farklaştırma Kiti			
Supplement A	10X	Stem Cell Technologies	05012
Supplement B	10X	Stem Cell Technologies	05013
Supplement C	10X	Stem Cell Technologies	05014
Kardiyomiyosit Bakım Besiyeri			
RPMI 1640	500 ml	Gibco	52400-025
B-27 Supplement	50X	Gibco	17504-044
Glutamax	%1	Gibco	35050-61
MEM NEAA	%1	Gibco	11140-050

P/S	%1	Gibco	15140-122
1-Thioglycerol	40000X	Sigma Aldrich	M6145
L-ascorbic asit	50 µg/ml	Sigma Aldrich	A4544
Laktat Besiyeri			
RPMI 1640 (without/ D-Glucose)	500 ml	Multicell	350-060-CL
Sodium L-Lactate	560 mg	Sigma-Aldrich	71718
HEPES Buffer (1M)	40X	Sigma-Aldrich	H0887
STEMdiff Kardiyomiyosit Bakım (Maintenance) Kiti			
Maintenance Supplement	50X	Stem Cell Technologies	05016
FEF Besi Yeri			
DMEM	%87	Gibco	41966-029
FBS	%10	Gibco	10270-106
Glutamax	%1	Gibco	35050-61
MEM NEAA	%1	Gibco	11140-050
P/S	%1	Gibco	35050-61

Total protein izolasyonu ve Western Blot çalışmasında kullanılan sarf malzemeler Tablo 5.2.5'te listelenmiştir.

Tablo 5.5. Protein izolasyonu ve Western Blot çalışmalarında kullanılan sarf malzemeler

Sarf Malzemeler	Firma	Katalog Numarası
Amonyum Persülfat (%10)	Bio-Rad	161-0700
TEMED	Bio-Rad	161-0800
Precision Plus Protein Dual Color Standards	Bio-Rad	161-0374
4x Laemmli Sample Buffer	Bio-Rad	161-0747
Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate	Thermo Fischer	32132

Tablo 5.6. İmmunokimyasal boyamalarda kullanılan birincil ve ikincil antikorlar

Sarf Malzemeler		Firma	Katalog Numarası	Konsantrasyonu
Birincil Antikorlar	cTNT	Thermo Scientific	MS-295-P	1:500
	Sarcomeric α Actinin	Sigma	A7811	1:2500
	DAPI	Sigma	D9542	1:1000
İkincil Antikorlar	Alexa Flour 488	Cell Signaling	4408S	1:1000
	Alexa Flour 633	Molecular Probes	A21050	1:500
Çekirdek Boyası	DAPI	Sigma	D9542	1:1000

5.3 Cihazlar

Tez çalışması kapsamında kullanılan tüm cihazlar Tablo 5.3.1’de belirtilmiştir.

Tablo 5.3.1. Tez çalışması kapsamında kullanılan cihazlar

Cihaz/Yazılım Programı	Marka	Model
Konfokal Mikroskopu	Zeiss	LSM780
Spinning Disk Konfokal Mikroskopu	Zeiss	-
Santrifüj	Thermo Scientific	ST16R
Elektroforez Cihazı	BIO-RAD	PowerPac Basic Power
Jel görüntüleme Cihazı	BIO-RAD	ChemiDoc
Thermal Cycler	BIO-RAD	T100
Mikrosantrifüj	Thermo Scientific	MicroCL 17R
NanoDrop	Thermo Scientific	NanoDrop One

5.4 Kontrol ve Hasta Grubuna ait Hücrelerin Belirlenmesi

Laboratuvarımızda daha önce sonuçlandırılan 213S192 proje numaralı 1003 TÜBİTAK projesi kapsamında, UQT sendromu Tip 1'e sebep olan *KCNQ1* geninde bulunan T322M mutasyonu CRISPR/Cas9 genetik düzenleme yöntemi kullanılarak düzeltilmiştir. Genetik düzenleme sonucunda DNA tamir mekanizmalarından biri olan NHEJ'i seçen hücrelerde mutasyonlar oluşmuştur. Tez kapsamında genomunda çeşitli uzunluklarda delesyonlar meydana gelen cr36, cr211 ve cr152 kodlu UPK hücreleri seçilmiştir. Oluşan delesyonların kardiyomiyositlerin morfolojik, fizyolojik ve elektrofizyolojik karakterlerine olan etkileri araştırılmak istenmiştir.

5.5 İnsan UPK Hücre Kültürü ve Karyotip Analizleri

Fibroblast ve/veya venöz kandan elde edilen somatik hücrelerin genoma entegre olmayan yöntemler kullanılarak yeniden programlama teknolojisi ile kişiye özgü oluşturulan kök hücreler; insan fizyolojisi, patofizyolojisi ve hücre temelli ilaç denemeleri gibi kişiselleştirilmiş tıp çalışmalarında kullanılmaktadır. UPK hücreleri besleyici içermeyen (feeder-free) Matrigel ekstraselüler matriks proteini ile kaplanmış çoklu kuyucuklu ticari hücre kültürü kaplarında E8 ya da besiyeri ile kültür edildi. Kültür edilen hücreler 37°C ve %5 CO₂ ortamda inkübe edildi. Günlük gözlem yapıldı ve besiyeri değiştirildi. UPK hücreleri %80-90 yoğunluğa ulaştıklarında pasajlandılar. DPBS (-Ca⁺², -Mg⁺²) yıkaması yapılan UPK hücreleri 0.5mM EDTA solüsyonu sayesinde enzimatik olmayan yöntemle pasajlanarak çoğaltıldı.

UPK hücreleri kişiye özgü kardiyomiyosite farklılaştırılmadan önce 35 mm'lik Matrigel kaplı petri kaplarına ekildi. Hücreler % 70-80 yoğunluğa ulaştıklarında İstanbul Genetik Grubu, Genetik Tanı Merkezi'ne teslim edilerek karyotip analizi yapılabilmesi için hizmet alımı yapıldı.

5.6 İnsan UPK Hücrelerinin Kardiyomiyositlere Farklılaştırılması, Kültürü ve Yeniden Ekim Protokolü

% 80-90 yoğunluğa ulaşan UPK hücrelerini kardiyomiyosite tek katmanlı tabaka halinde farklılaşabilmesi için hücreler insülin içermeyen kardiyak farklılaştırma besiyeri alındı. GSK-3 inhibitörü olan CHIR99021 (Tablo 5.6.1)

molekölü içeren besiyeri ilk 24 saat içerisinde UPK hücrelerin Brachury protein ekspresyonunu artırarak mezodermal hücrelere dönüşmesini teşvik eder. Bu safhadan sonra Wnt sinyal yolağının inhibisyonu ile mezodermal hücreler kardiyak farklılaşmaya yönlendirilirler. IWP2, IWP4 ve/veya IWR1 (Tablo 5.6.1) küçük molekülleri farklılaşmanın 3-5. günlerinde kültüre eklenerek Wnt sinyal yolağının inhibisyonu gerçekleştirilir. Kültürün 7-8. gününden itibaren insülin içeren içeren kardiyomiyosit bakım besiyeri ile değişim gerçekleştirildi. Besiyeri değişimine paralel olarak spontan kasılmalar gözlemlendi.

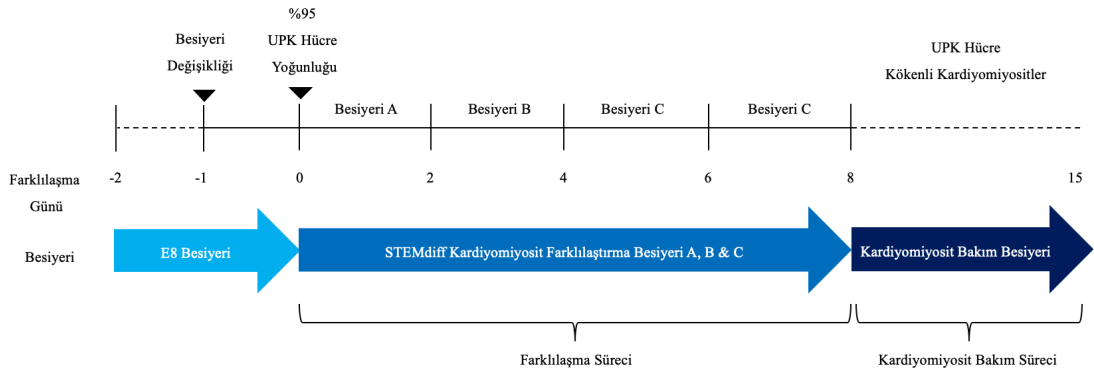
Tez çalışması kapsamında Lian ve arkadaşlarının raporladığı temel farklılaştırma yöntemi; farklılaştırma günleri, kullanılan küçük molekül ve konsantrasyonları değiştirilerek çeşitli protokollerde uygulanmıştır (2). Ek olarak β -adrenerjik reseptör agonisti olan isoproterenol destekli kardiyomiyosit farklılaştırma protokolü de optimize edilmiştir. Kullanılan protokoller Tablo 5.6.1’de gösterilmiştir. Farklılaştırma sürecinde kullanılan tüm küçük moleküller (Tablo 5.6.2) insülin içermeyen RPMI/B27 besiyeri ile hazırlanmıştır. Kültürlerde spontan kasılmalar görülmeye başladıktan sonra iki günde bir insülin içeren RPMI/B27 ile kültürlerin besiyeri değiştirilmiştir.

Tablo 5.6.1. Kardiyak farklılaştırmada kullanılan protokoller D: Farklılaştırma Günü

Protokol Adı	Farklılaştırma Süreci
Temel Protokol (IWR1)	D0-1: 6 μ M CHIR99021 D1-2: RPMI/B27-insülin D3-5: 5 μ M IWR1 + 5mg/ml Vitamin C D5-7: RPMI/B27-insülin D7’den sonra spontan kasılmalar
Temel Protokol (IWP4)	D0-2: 6 μ M CHIR99021 D2-3: RPMI/B27-insülin D3-5: 10 μ M IWP4 + 5mg/ml Vitamin C D5-7: RPMI/B27-insülin D7’den sonra spontan kasılmalar
Protokol 4	D0-1: 6 μ M CHIR99021

	D1-2: RPMI/B27-insülin D3-5: 5 μ M IWR1 + 5mg/ml Vitamin C D5-8: 5 μ M IWR1 + 5mg/ml Vitamin C D8' den sonra spontan kasılmalar
Protokol 6	D0-2: 6 μ M CHIR99021 D2-3: RPMI/B27-insülin D3-5: 5 μ M IWR1 + 5mg/ml Vitamin C D5-8: 5 μ M IWR1 + 5mg/ml Vitamin C D8' den sonra spontan kasılmalar
Protokol 7	D0-3 arası hergün: 20ng/ml BMP4 + 10ng/ml Activin A + 10ng/ml FGF2 + 5mg/ml Vitamin C + 3 μ M İsopterenol + 2 μ M CHIR99021 D3-10: 5 μ M IWR + 20ng/ml BMP4 + 5mg/ml VitC D10' dan sonra spontan kasılmalar

Literatürde yer alan ve hücrelerimize göre optimize edilen küçük molekül yönlendirmeli kardiyak farklılaşmanın yanında ticari olarak satılan STEMdiff Cardiomyocyte Differentiation Kit marka farklılaştırma besiyeri temin edildi (Tablo 5.2.2). Ticari protokole (Şekil 5.6.1) uyularak farklılaştırma işlemi tamamlandı. Kültürlerde 8-10. günden itibaren spontan kasılmalar gözlemlendi.



Şekil 5.6.1. STEMdiff kardiyomyosit farklılaştırma kit protokolü

Tablo 5.6.2. Kardiyak farklılaştırmada kullanılan küçük moleküller

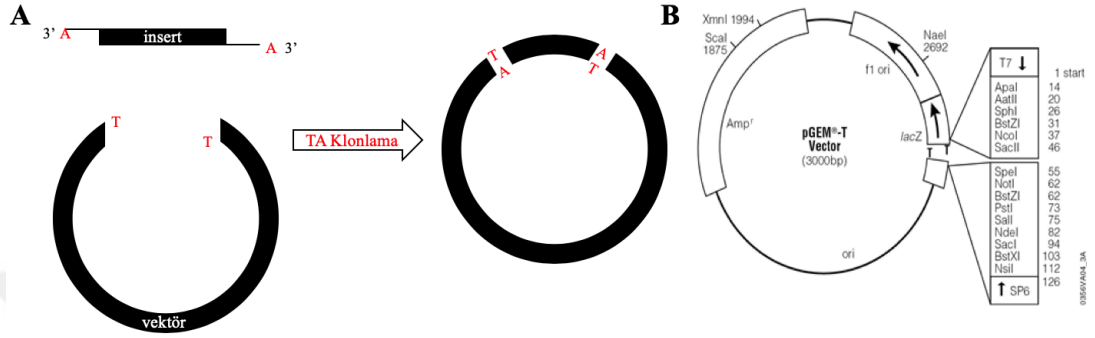
Küçük Moleküller	Firma	Katalog Numarası
CHIR99021	Sigma Aldrich	SML1046
<i>endo</i> -IWR1	Tocris	3532
IWP4	Stemgent	04-0036
IWP4	Tocris	5214
BMP4	RD Systems	314-BP
Activin A	RD Systems	ACFP338
FGF2 (bFGF)	Millipore	GF003AF-MG
Isopropanol	Sigma	35100
Vitamin C (Askorbik Asit)	Sigma Aldrich	A4544

Kardiyak farklılaşmanın 12-15. gününden itibaren hücreler elektrofizyolojik analizlerinin yapılabilmesi için cam kaplı petrilere ve/veya XCELLigence RTCA cihazına ait olan kuyucukları altında elektrotları bulunan ticari petri kaplarına yeniden ekildi. Yeniden ekim aşamasında hücrelerin besiyerleri çekildi. DPBS (-Ca²⁺, -Mg²⁺) ile 5 dakika boyunca hücreler oda sıcaklığında inkübe edildi. DPBS (-Ca²⁺, -Mg²⁺) çekilip atılarak 1 ml TrypLE (Tablo 5.2.4) eklendi. 37°C’de 3-5 dakika inkübasyon sonrasında enzim yardımıyla dokulaşmış hücre katmaları homojen hale gelene kadar pipetaj yapıldı. Enzimi inaktif hale getirebilmek için içerisinde FBS bulunan FEF besiyeri (Tablo 5.2.2) kullanıldı. Kardiyomiyositler 1500 rpm’de 3 dakika santrifüj edildikten sonra elektrofizyolojik analizlerin yapılacağı ticari kaplara ekildi.

5.7 TA Klonlama Stratejisi

CRISPR/Cas9 ile genetik düzenleme sonucunda NHEJ ile oluşan UPK hücrelerinin sekans bilgileri, oluşan heterozigot değişikliklerden dolayı kullanılan CodonCode Aligner ve SnapGene Viewer gibi dizi analizi programları ile ayrıştırılmadılar. En hızlı ve etkili klonlama yöntemlerinden biri olan TA klonlama kullanıldı. Şekil 5.7.1.-A’da gösterildiği gibi 3’ uçlarında A nükleotidi bulunan insert

ile lineer halde bulunan ve 3' ucunda T nükleotidi içeren vektör ligasyonu sonucunda klonlama işlemi gerçekleşir (78). Ticari olarak temin edilen pGEM-T (Promega) vektörü (Şekil 5.7.1-B) 3' uçlarında yer alan serbest T nükleotidlerinin, insert DNA'nın 3' uçlarında bulunan serbest A nükleotidleri ile eşleşmesi sonucunda hızlı bir alt klonlama yapıldı.



Şekil 5.7.1. Klonlama sırasında kullanılan (A) TA klonlama stratejisi, (B) pGEM-T vektörü (Promega).

5.7.1 Genomik DNA'dan *KCNQ1* Bölgesinin Çoğaltılması

Kültür koşullarında büyütülen UPK hücrelerinden genomik DNA izolasyonu kit (Tablo 5.2.1) kullanılarak yapıldı. NCBI Primer-BLAST programı kullanılarak tasarlanan hedef bölgeyi tanıyan Tablo 5.8.2.1'de bulunan *KCNQ1* primerleri sayesinde izole edilen genomik DNA'lardan polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) işlemi gerçekleştirildi (Tablo 5.7.1.1). PZR işlemi sırasında reaksiyonda oluşan her ürünün sonuna serbest A nükleotidi ekleyen Taq polimeraz tercih edildi. 3' ucunda A nükleotidi bulunduran insert, pGEM-T vektörünün içerisine aktarılabilecek hale getirildi. PZR reaksiyonu cr211 ve cr152 numaralı hücrelerden 200 ng, cr36 numaralı hücreden ise 150 ng genomik DNA kullanılarak yapıldı. PZR işlemi gerçekleştirilirken Tablo 5.7.1.2'de bulunan protokol izlendi.

Tablo 5.7.1.1. Genomik DNA'dan yapılan PZR'de kullanılan malzemeler

Malzemeler	Final Konsantrasyonu	cr36/cr211/cr152
10X Taq Buffer	1X	2.5 µl
25 mM MgCl ₂	1.5 mM	1.5 µl
10 mM dNTP	0.2 mM	0.5 µl

10 mM <i>KCNQI</i> F	0.2 mM	0.5 μ l
10 mM <i>KCNQI</i> R	0.2 mM	0.5 μ l
Taq Polymerase (5000 units/ml)	0.625 units	0.125 μ l
Genomik DNA	150-200 ng	0.2-2 μ l
H ₂ O	-	19.175-17.375 μ l
Toplam Hacim		25 μl

Tablo 5.7.1.2. Genomik DNA'dan yapılan PZR'de kullanılan protokol

Sıcaklık	Zaman
95°C	1 dakika
95°C	30 saniye (34 Döngü)
58°C	1 dakika (34 Döngü)
72°C	1 dakika (34 Döngü)
72°C	5 dakika
12°C	∞

PZR sonrasında örnekler % 1'lik agaroz jelde Tablo 5.3.1'de bulunan Chemidoc jel görüntüleme cihazı kullanılarak incelendi. Tüm PZR ürünleri Qiagen PCR Purification Kit kullanılarak temizlendi. Saflaştırılan örneklerin konsantrasyonu NanoDrop cihazı kullanılarak ölçüldü.

5.7.2 Vektör İçerisine *KCNQI* Geninin Klonlanması

TA klonlamada kullanılan pGEMT vektörü lineer olduğundan tekrar restriksiyon enzimleri ile kesilmedi. Şekil 5.7.2.1'deki formüle göre kullanılacak olan vektör ve insert oranı belirlendi. Klonlama olasılığını arttırmak amacıyla insert:vektör oranı 3:1 olarak belirlendi. Klonlama sırasında pGEMT vektörü 40 ng olacak şekilde kullanıldı. Ligasyon işlemi için kullanılan malzemeler ve hesaplanan vektör ve insert miktarları Tablo 5.7.2.1'de gösterilmektedir. Ligasyon işlemi sırasında vektörün kendi üzerine kapanıp kapanmadığını (self-ligasyon) 10 ng sadece vektör kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyon ile test edildi. Reaksiyon 1 saat oda koşullarında (20-25°C) veya gece boyunca 4°C'de yapıldı.

$$\frac{\text{Vektör (ng)} \times \text{İnsert (kb)}}{\text{Vektör(kb)}} \times \text{İnsert : Vektör (Molar)} = \text{İnsert(ng)}$$

Şekil 5.7.2.1. Klonlama sırasında kullanılan hesaplama.

Tablo 5.7.2.1. Ligasyon işlemi sırasında kullanılan malzemeler

Malzemeler	cr36/cr211/cr152	Sadece Vektör
T4 Enzim	1 μ l (0.4 units)	1 μ l (0.4 units)
10X T4 Buffer	1 μ l (1X)	1 μ l
İnsert	0.86-1.40 μ l (18.92 ng insert)	-
Vektör	0.8 μ l (40 ng vektör)	0.2 μ l (10 ng vektör)
H ₂ O	5-7 μ l	7.8 μ l
Toplam Hacim	10 μl	10 μl

Vektörün DH5 α Bakterisine Transfeksiyon Protokolü

Transfeksiyon işlemine başlamadan önce LB agar 40 g/L olacak şekilde hazırlandı. Otoklavlanıp soğuduktan sonra 100 μ g/ml Ampisilin eklenerek bakteri petrilere döküldü. LB besiyeri 25 g/L olacak şekilde hazırlandı ve otoklavlandıktan sonra kullanıldı. Transfeksiyon aşamasında kullanılan LB besiyeri içerisine Ampisilin eklendi (Tablo 5.2.2).

İnsert eklenmesi ile halkasal bir form alan pGEMT vektörü kompetent bir bakteri olan DH5 α 'ya aşağıdaki basamaklar izlenerek transfeksiyonu gerçekleştirildi:

- 1) -80°C DH5 α bakterileri transfeksiyon işlemine başlanmadan 5 dakika önce çözümleri için buz içerisine alındı. Aynı zamanda soğuması için 1.5 ml mikrosantrifüj tüpler de buza konuldu.
- 2) Her örnek için tüpler işaretlendi ve 50 μ l DH5 α tüplere dağıtıldı.
- 3) Vektör+insert örnekler 2.5 μ l olacak şekilde tüp içerisinde konuldu. Pipetleme işlemi yapılmadan nazikçe karıştırıldı.

- 4) 30 dakika boyunca buz içerisinde inkübasyon yapıldı.
- 5) İnkübasyon sonrasında 42°C’de 20 saniye ısı şoku yapıldı. Isı şoku sırasında tüpler sıcak su içerisinde çalkalanmadan tutuldu.
- 6) Isı şoku sonrasında tüpler hızlıca buz içerisine alındı ve 2 dakika boyunca inkübe edildi.
- 7) Oda sıcaklığında bulunan 500 µl LB Broth (-Ampisilin) hücrelerin üzerine eklendi.
- 8) Tüpler 37°C’de 1 saat boyunca 225 rpm’de çalkalandı.
- 9) İnkübasyon sonrasında iki farklı konsantrasyonda örnekler tüplerden alınarak tek kullanımlık öze yardımıyla agarlı petri kaplarına çizgi yöntemiyle ekildi. 200 µl örnek direkt olarak tüp içerisinden alınarak dilüe halde ve tüpte kalan örnekler 5 dakika 6000 rpm’de santrifüj edilerek konsantre halde ekildi.
- 10) Petriler gece boyunca 37°C’de inkübe edilerek halkasal hale gelen vektörleri alan bakterilerin koloni halinde büyümesi sağlandı.

Pozitif Kolonilerin Seçilmesi

pGEMT vektörünün içerisinde ampisilin direnç geni bulunduğundan vektörü içerisine alan DH5α bakterileri, 24 saat sonra agar kaplı petri kaplarında büyüebilmektedirler. Büyüyen ve agar üzerinde beyaz renkli noktalar halinde görülen koloniler seçildi. pGEMT vektörü içerisinde bulunan M13 (Tablo 5.7.2.2) primerleri kullanılarak koloni PZR yapıldı (Tablo 5.7.2.3). Koloni PZR reaksiyonu Tablo 5.7.2.4’te belirtilen prosedür izlenerek gerçekleştirildi. % 1.5’lik agaroz jelde PZR bant boyları gözlemlendi. PZR sonucu pozitif çıkan koloniler restriksiyon enzim kesimi ile doğrulandı.

Tablo 5.7.2.2. M13 primer sekansları

M13 – F. Primer Dizisi	TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA C
M13 – R. Primer Dizisi	CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC

Tablo 5.7.2.3. Koloni PZR’de kullanılan malzemeler

Malzemeler	Final Konsantrasyonu	Kullanılan Miktar
2X One Taq Hot Start Mix	1X	12.5 µl
10 mM M13 F	0.2 mM	0.5 µl

10 mM M13 R	0.2 mM	0.5 μ l
Koloni DNA	-	5 μ l
H ₂ O	-	6.5 μ l
Toplam Hacim		25 μl

Tablo 5.7.2.4. Koloni PZR’da kullanılan prosedür

94°C	30 saniye
94°C	30 saniye (34 Döngü)
57°C	1 dakika (34 Döngü)
68°C	1 dakika (34 Döngü)
68°C	5 dakika
4°C	∞

5.7.3 Diyagnostik Kesim ve Plazmid İzolasyonu

CRISPR/Cas9 ile genetik olarak düzenlenen UPK hücrelerine KpnI restriksiyon enzimi kesim bölgesi de eklenmiştir. Böylece pozitif çıkan kolonilerde hücrelerin *KCNQ1* genine sahip olan insert DNA’ları alıp almadığı kontrol edilmek amacıyla KpnI enzimi ile diyagnostik kesim yapıldı (Tablo 5.7.3.1). Beklenen bant boyları % 2’lik agaroz jel dökülerek gözlemlendi.

Tablo 5.7.3.1. KpnI diyagnostik kesimde kullanılan malzemeler

KpnI-HF (Neb)	0.2 μ l
10X Cut Smart	1 μ l
Koloni PZR Ürünü	3 μ l
H ₂ O	5.8 μ l
Toplam Hacim	10 μl

Kesim sonrasında pozitif olduğu gözlemlenen plazmidler AMBRD plazmid izolasyon kiti (Tablo 5.2.2) kullanılarak izole edildi. İzolasyon sırasında ticari protokol izlendi. İzole edilen plazmidler NanoDrop kullanılarak ölçüldü

KpnI enzimi ile kesilip kontrol edilen pozitif örnekler, 500 ng olacak şekilde hesaplanarak 10 μ M M13 R primeri kullanılarak tek yönlü Sanger sekanslama yapıldı. Sanger sekanslama için İstanbul Medipol Üniversitesi Genetik Tanı Merkezi'nden hizmet alımı yapıldı.

5.8 Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PZR)

5.8.1 Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

CRISPR/Cas9 sistemi ile genetik olarak düzenlenen UPK hücreleri ve onlardan köken alınarak kişiye özgü farklılaştırılan kardiyomyosit hücrelerinden total RNA'lar RNeasy Plus Mini Kit (Tablo 5.2.1) kullanılarak izole edildi. UPK hücre kökenli kardiyomyositler 30-60 gün aralıklarında olacak şekilde kültüre edildikten sonra RNA'ları izole edildi. İzole edilen RNA'lar NanoDrop cihazı ile ölçüldü.

Ölçüm sonucunda elde edilen A280/260 değeri izole edilen RNA'lar için ~2 olanlar tercih edildi. Bu orandan yüksek veya düşük değerler nükleik asit kontaminasyonunu göstermektedir. Bu durumdaki RNA'lara tekrar DNaseI (Tablo 5.2.1) uygulaması yapıldı. RNA'lar sodyum asetat çöktürmesi ile saflaştırıldı. Saflaştırma sırasında aşağıdaki basamaklar izlendi:

- 1) Her örnekten ~1 μ g RNA alındı.
- 2) 10 μ l DNaseI üzerine RDD buffer eklendi ve pipetlemeden karıştırıldı.
- 3) RNA'lar DNaseI karışımı ile birleştirilerek oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.
- 4) Final konsantrasyonu 0.3 M olacak şekilde sodyum asetat eklendi.
- 5) Toplam hacmin 2.5 katı olacak şekilde buzda soğutulmuş EtOH (% 100) eklendi ve -20°C'de gece boyunca inkübasyon yapıldı.
- 6) Örnekler +4°C'de 13.000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi.
- 7) Pelletlerin üzerine 200 μ l buzda soğutulmuş EtOH (% 75) yavaşça eklendi ve tekrar örnekler +4°C'de 13.000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi.
- 8) Supernatantlar atıldıktan sonra pelletlerin üzerinden EtOH'un uçabilmesi için eppendorfların kapakları 30-45 dakika oda sıcaklığında açık bırakıldı.
- 9) 10 μ l RNase ve DNase'dan temiz H₂O ile RNA pelletleri sulandırıldı.
- 10) RNA konsantrasyonları tekrar NanoDrop kullanılarak ölçüldü.

100-200 ng arasında RNA alınarak iScript Advanced cDNA Synthesis Kit for RT-qPZR (Tablo 5.2.1) kullanılarak cDNA sentezi (Tablo 5.8.1.1) gerçekleştirildi. Tablo 5.8.1.2’de bulunan protokol izlendi.

Tablo 5.8.1.1. cDNA sentezinde kullanılan malzemeler

5x iScript advanced reaction mix	4 μ l
iScript advanced reverse transcriptase	1 μ l
RNA Örneği	0.5 - 1.30 μ l (200ng)
H ₂ O (-DNase, -RNase)	14.7 - 15.5 μ l
Toplam Hacim	20 μl

Tablo 5.8.1.2. PZR’de kullanılan prosedür

25°C	5 dakika
42°C	30 dakika
85°C	5 dakika
4°C	∞

5.8.2 Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PZR)

Sentezlenen cDNA’lar 1:10 oranında dilue edildikten sonra qRT-PZR reaksiyonu iTaq (Tablo 5.2.1) ile gerçekleştirildi. Reaksiyon sırasında kullanılan tüm primerler Tablo 5.8.2.1’de listelenmiştir. Reaksiyon Tablo 5.8.2.2’de yer alan malzemeler kullanılarak Tablo 5.8.2.3’te bulunan protokol izlenerek gerçekleştirildi. Analizlerde relatif gen ekspresyonu *GAPDH*’ye göre normalize edildi ve qRT-PZR sonuçları delta C_T yöntemiyle hesaplandı.

Tablo 5.8.2.2. qRT-PZR’de kullanılan primer çiftleri

	qRT-PZR primeri	Primer dizisi
	NANOG-F	GACAGGGGGAGGGGAGGAGCTAGG

İnsan UPK Hücre Primerleri	NANOG-R	CTTCCCTCCAACCAGTTGCCCCAAAC
	OCT4-F	CCCGGTACGCTCAAAAAGAA
	OCT4-R	GGTTTTTGCGTGAGTGTGGAT
	SOX2-F	TTCCTGCATGCCAGAGGAGCCC
	SOX2-R	AATGTATCGAAGGTGCTCAA
	Klf4-F	TAACTGACTAGCAGGCTTGTCG
	Klf4-R	TCCACATACAGTCCTGGATGATGATG
	c-Myc-F	AGTCCCAAAGGCAAACAACCCACTTC
	c-Myc-R	TGCTGGAGGCTGAGGTATTTCTGTCTC
Kardiyomiyosit Primerleri	CTNT-F	TTCACCAAAGATCTGCTCCTCGCT
	CTNT-R	TTATTACTGGTGTGGAGTGGGTGTGG
	MYH6-F	GGGATAACCAGGGGAAGCACCAAGA
	MYH6-R	TGCCTCCCTCCCGGGACAAAAT
	MYH7-F	TTGAGTAGCCCAGGCACAGCCAT
	MYH7-R	TGCCACCCTCTCGAGACACGAT
Kardiyak İyon Kanalı Primerleri	<i>KCNQ1</i> -F	AACCTCATGGTGCGCAT
	<i>KCNQ1</i> -R	CCGCGATCCTTGCTCTT
	KCNH2-F	CACCGCCCTGTACTTCATCT
	KCNH2-R	AGGCCTTGCATACAGGTCA
	HCN4-F	GACTGCTGGGTGTCCATCAA
	HCN4-R	AGAGCGCGTAGGAGTACTGCTT

3 Germ Tabaka Primerleri	AFP-F	GAATGCTGCAAACCTGACCACGCTGGAAC
	AFP-R	TGGCATTCAAGAGGGTTTTTCAGTCTGGA
	MSX1-F	CGAGAGGACCCCGTGGATGCAGAG
	MSX1-R	GGCGGCCATCTTCAGCTTCTCCAG
Housekeeping Gen Primeri	GAPDH-F	CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTATTG
	GAPDH-R	GCTCCTGGAAGATGGTGATGGGATTT

Tablo 5.8.2.3. qRT-PZR’da kullanılan malzemeler

Malzemeler	Final Konsantrasyonu	Kullanılan Miktar
100-200 ng cDNA	10-20 ng	1 μ l
2X iTaq SYBR Mix	1X	5 μ l
10 mM Primer-F	0.2 mM	0.5 μ l
10 mM Primer-R	0.2 mM	0.5 μ l
H ₂ O	-	3 μ l
Toplam Hacim		10 μl

Tablo 5.8.2.4. qRT-PZR’de izlenen prosedür

95°C	3 dakika
95°C	10 saniye (45 Döngü)
58°C	10 saniye (45 Döngü)
72°C	30 saniye (45 Döngü)

5.9 İmmünotokimyasal (ICC) Boyamalar

UPK ve UPK hücre kökenli kardiyomyositlerde protein ekspresyon düzeyi ve hücre içi lokalizasyonunu belirlemek amacıyla immünotokimyasal boyamalar yapıldı. Hücrelerin besiyeri çekildi ve iki kez fosfat tampon solüsyonu ile yıkanarak

besiyeri tamamen ortamdan uzaklaştırıldı. Hücrelerin yüzeyini kaplayacak kadar % 4 PFA eklendi ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilerek hücreler fiksleildi. PBS ile yıkama sonrası bloklama solüsyonu (Tablo 5.9.1) ile 45 dakika oda sıcaklığında muamele edildi. Tablo 5.2.3’de belirtilen konsantrasyonlarda birincil antikolar eklendi ve gece boyunca 4°C’de inkübasyon yapıldı. Hücreler tekrar PBS ile yıkandıktan sonra birincil antikoları tanıyıp bağlanabilen floresan özellikli ikincil antikolar kullanıldı. Tablo 5.2.3’de belirtilen konsantrasyonlarda ikincil antikolar petriye eklendi. Işığa duyarlı oldukları için karanlıkta oda sıcaklığında 1 saat inkübasyon yapıldı. Birincil ve ikincil antikolar dilüsyon solüsyonu (Tablo 5.9.1) ile hazırlandı. Floresan boyama sonrası hücreler üç kez % 0.02 Tween-20 PBS ile yıkanarak bağlanmamış antikolar ortamdan uzaklaştırıldı. Görüntüleme öncesi hücrelere çekirdek boyası DAPI eklenerek 3 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi. DAPI ile boyama işlemi tamamlandıktan sonra kurumaması için PBS eklenen örnekler Zeiss 780 veya 800 konfokal floresan mikroskobu ile görüntüledi.

Tablo 5.9.1. Bloklama ve dilüsyon solüsyonları

Bloklama Solüsyonu	PBS (+Ca ⁺² , +Mg ⁺²) içerisinde hazırlandı: % 3 BSA % 1 Goat Serum % 0.01 Triton-X
Dilüsyon Solüsyonu	PBS (+Ca ⁺² , +Mg ⁺²) içerisinde hazırlandı: % 3 BSA % 1 Goat Serum % 1 Tween20

5.10 Total Protein İzolasyonu ve Western Blot Analizleri

Total protein izolasyonu yapılmadan önce kullanılacak tüm ependorflar ve hücre kaldırıcı plastikler (cell lifter) soğutuldu. Tüm protein izolasyon işlemleri buz üstünde yapıldı. Hücre lizatları, 1 M Tris HCl, 5 M NaCl, % 1 Triton X-100, 0.5 M

EDTA içeren liziz tampon çözeltisi kullanılarak elde edildi. Örnekler 5'er dakika arayla 5-6 kez pipetaj yardımıyla homojenize edildikten sonra 4°C'de 12000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Supernatantlar, konsantrasyonu Qubit 3.0 cihazında ölçüldükten sonra -20°C'de saklandı (Tablo 5.10.1).

Tablo 5.10.1. Örneklerden izole edilen protein konsantrasyonları (D: Farklılaşma Günü, hESC: insan kaynaklı embiyonik kök hücre)

İnsan Fibroblast Hücresi	1.36 µg/ml
UPK Hücresi	2.21 µg/ml
hESC D57	4.54 µg/ml
hESC D93	1.67 µg/ml
AKY D61	2.19 µg/ml
SP2-9 D62	1.08 µg/ml
cr211 D6s	2.14 µg/ml
cr152 D59	1.57 µg/ml
cr43 D65	5 µg/ml
Fare Embriyonik Kalbi	1.74 µg/ml

Protein konsantrasyonları toplam hacim 40 µl olacak şekilde 20 µg olarak hesaplandı. Hazırlanan örneklere Laemmli Buffer (4X) ve beta-mercaptoetanol eklendi ve 95°C'de 5 dakika proteinlerin denatürasyonu yapıldı. Örnekler %10'luk SDS-PAGE jel (Bio-Rad) kullanılarak 100 V akımda toplam 135 dakika yürütüldü. Transfer öncesinde PVDF membran metanol içerisinde 2-3 dakika inkübe edilerek aktifleştirildi. Jeldeki proteinler membrana transfer edildi. TBS-T (NaCl, Tris-HCl, Tween 20) ile yıkanan membran ve % 5 yağsız süt tozu eklenerek 1 saat boyunca oda koşullarında inkübe edilerek bloklandı. Bloklama sonrası TBS-T ile membran yıkayıp primer antikorlar eklendi (Tablo 5.10.2). Antikorla muamele edilen membran 4°C 'de gece boyunca inkübe edildi. TBS-T yıkama sonrasında ikincil antikorlar (Tablo 5.10.2). eklenerek 1 saat oda koşullarında inkübasyona devam edildi. İnkübasyon sonrasında TBS-T yıkaması ile ortamdan fazla olan ikincil antikor uzaklaştırıldı. Membran, Pierce ECL Solüsyonu ile 5 dakika oda sıcaklığında muamele edildi ve Chemidoc görüntüleme cihazında membran görüntüleri alındı.

Tablo 5.10.2. Western Blot’da kullanılan birincil - ikincil antikorlar ve dilüsyonlar

Antikor		Marka	Katalog Numarası	Dilüsyon
Birincil Antikorlar	α -Tubulin	Proteintech	11224-1-AP	1:1000
	KCNQ1	Abcam	ab84819	1:1000
	KCNQ1	Alomone	APC-022	1:1000
	KCNQ1 (G-8)	Santa Cruz	sc365186	1:1000
İkincil Antikorlar	Goat Anti Rabbit IgG (H+L)-HRP Conjugate	Bio-Rad	170-6515	1:3000
	Goat Anti Mouse IgG (H+L)-HRP Conjugate	Bio-Rad	170-6516	1:3000

Kullanılan *KCNQ1* antikorlarının doğru proteini tanıyıp tanımadığını test etmek ve protein düzeyinde *KCNQ1*'in ekspresyon seviyesini belirleyebilmek için Ingel Digestion Mass Spectrophotometry yapıldı. İstanbul Medipol Üniversitesi Genetik Tanı Merkezi'nden hizmet alımı yapıldı. Örnekler hazırlanıp % 10'luk SDS-PAGE jelde yürütüldükten sonra Coomassie Brilliant Blue (Tablo 5.2.5) ile oda sıcaklığında 1 saat çalkalayıcı üzerinde jel boyandı. Yaklaşık 70 kDa'da bulunan proteinler jelden kesilerek ayrıştırıldı. Coomassie blue boyasından jeli ayrıştırabilmek amacıyla 60°C'de % 30 etanol kullanılarak yaklaşık 1 saatlik yıkama yapıldı. Jellerin şeffaflaştığı görüldükten sonra analiz için teslim edildi.

5.11 Elektrofizyolojik Analizler

5.11.1 Ca⁺² Görüntüleme

Spontan kasılan UPK hücre kökenli kardiyomiyosit hücre toplulukları farklılaşmanın 12-15. günleri arasında olgunlaşmaya başlamaktadırlar. Olgunlaşan kardiyomiyositlerin elektrofizyolojik özellikleri Fluo-4 (Life Technology) kalsiyum görüntüleme ile incelendi. 990 μ l insülin içeren RPMI/B27 besiyeri içerisine 5 μ l 5 uM Fluo-4 ve 5 μ l pluronik asit eklendi. Hazırlanan karışım UPK hücre kökenli kardiyomiyositlerin üzerine eklenerek 30 dakikalık oda sıcaklığında gerçekleşen inkübasyon edildi. Uygun fizyolojik koşullarda kalsiyum değişikliğini saptayabilmek

amacıyla mediumu değiştirilen kardiyomiyositler 15 dakika boyunca 37°C’de tekrar inkübasyon edildi. İnkübasyon sonrasında Zeiss Spinning Discs Mikroskobu ile alınan gerçek zamanlı floresan kardiyomiyosit görüntüleri Image-J (Fiji) ile analiz edildi. Hürelere özgü yazılan ve her bir Ca⁺² salınımında % 90’lık depolarizasyon olma durumu hesaplayan MATLAB programı kullanılarak analizler yapılmıştır.

5.11.2 XCELLigence RTCA Cardio ECR ve İlaç Analizleri

Hastalık ve sağlıklı fenotipine sahip olan UPK hücre kaynaklı kardiyomiyositler elektrofizyolojik olarak incelenmek amacıyla enzimatik yöntemlerle kaldırılarak XCelligence Cardio ECR cihazına özel olarak üretilmiş 48 kuyucuklu elektrot kaplı ticari petrilere ekildi. Tablo 5.12.1’de bulunan iyon kanal modülatörleri DMSO içerisinde dozun en az 1000 katı olacak şekilde çözülerek 0.1, 1, 10 ve 100 uM konsantrasyonunda kardiyomiyositlere uygulandı. Uygulama sırasında ilaçlar kardiyomiyosit bakım besiyeri ile sulandırılacak ve filtrelenip 37°C’de 15 dakika inkübe edildi. İlaçların UPK hücre kökenli kardiyomiyositlere eklenmesinden sonra belirli aralıklarla kayıtlar alındı. 1 saatlik ilaç uygulamasından sonra kardiyomiyositler yıkanarak ilaç sonrası kasılma özellikleri (frekans, alan potansiyeli, Ca⁺² geçişi) gözlemlendi.

Tablo 5.11.2.1. Kullanılan ilaçlar ve uygulama konsantrasyonları

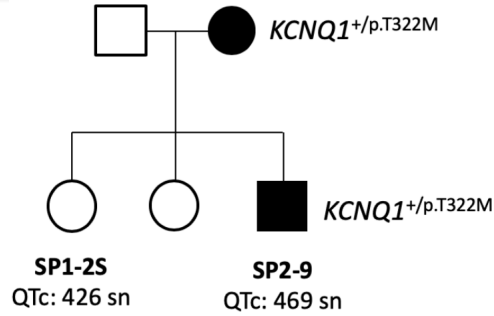
İlaçlar	Firma	Katalog Numarası	Konsantrasyonu
ML277	Tocris	4777	300 nM
JNJ303	Tocris	3899	300 nM
Isoproponol	Sigma	35100	100 nM

5.12 İstatistiksel analizler

Normal dağılım göstermiş iki grubun istatistiksel analizi Student’s t-test kullanılarak yapıldı. Detaylı ilaç analizi çalışmalarında Two Tailed Paired T-Test kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık <0.05 olarak kabul edildi.

6 BULGULAR

Laboratuvarımızda TÜBİTAK destekli tamamlanan 213S192 proje numaralı çalışma kapsamında Şekil 6.1’de gösterilen soy ağacına sahip hasta ve sağlıklı bireylerden UPK hücreler elde edilmiştir. Proje kapsamında ilerleyen çalışmalarda hastaya özel üretilen SP2-9 UPK hücrelerinde *KCNQ1* gen bölgesinde bulunan heterozigot c.965 C/T (p.T322M) mutasyonu sağlıklı tipe; sağlıklı SP1-2S UPK hücrelerde ise mutant tipe CRISPR/Cas9 teknolojisi kullanılarak dönüştürüldü. Genetik düzenleme sırasında NHEJ ile meydana gelen UPK hücrelerinde mutasyonlar gözlemlendi. Bu yüksek lisans tez çalışması kapsamında sağlıklı SP1-2S ve mutant SP2-9 hücreleri ile CRISPR-Cas9 sistemi NHEJ ile genetik düzenlenen cr211 ve cr152 hücrelerine ait veriler öncelikli olarak sunulmuştur. CRISPR-Cas9 sonucunda NHEJ ile oluşan cr36 ve HDR ile oluşan cr43 hücrelerinden elde edilen moleküler ve elektrofizyolojik verilerden yararlanılmıştır. Tablo 6.1’de tez çalışması kapsamında kullanılan tüm hücreler, hücrelerin genetik durumları ve CRISPR/Cas9 sistemi ile düzenleme sonucunda seçilen DNA tamir mekanizmaları ve sekans bilgileri özet halinde sunulmuştur.



Şekil 6.1. UPK hücrelerinin köken aldığı ailenin soy ağacı. QTc: Doğrulanmış QT uzunluğu

Tablo 6.1. Tez çalışması kapsamında kullanılan hücrelere ait genel bilgiler (Cr: CRISPR, NHEJ: Homolog olmayan uçlardan birleşme, HDR: Homoloji yönlendirmeli tamir)

Hücre Adı	Hücrenin Genetik Durumu	CRISPR Genetik Düzenleme	
		DNA Tamir Mekanizması	Sekans Bilgisi
SP1-2S	Sağlıklı	-	-
SP2-9	<i>KCNQ1</i> ^{+/p.T322M}	-	-

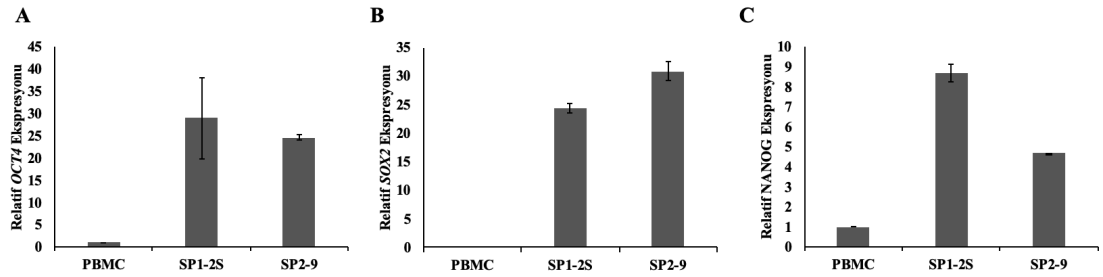
cr211	KCNQ1 ^{+/p.T322M} ->Sağlıklı	NHEJ	2 bp delesyon
cr152	KCNQ1 ^{+/p.T322M} ->Sağlıklı	NHEJ	1 bp delesyon
*cr36	Sağlıklı->Mutant	NHEJ	15 bp delesyon
*cr43	Sağlıklı->Mutant	HDR	-

*Hücrelerden elde edilen moleküler ve elektrofizyolojik verilerden yararlanılmıştır.

6.1 İnsan UPK Hücrelerinin Moleküler Karakterizasyonu

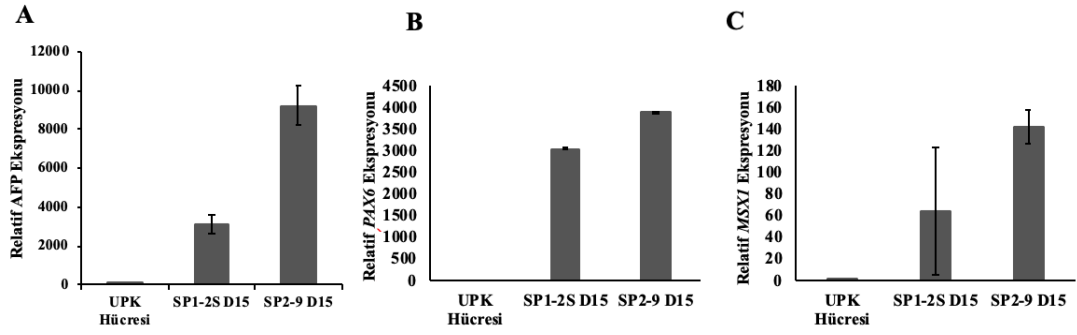
6.1.1 İnsan UPK Hücrelerinin qRT-PZR Yöntemi ile Moleküler Olarak İncelenmesi

Sağlıklı ve mutant kolonilerin pluripotent özelliklerinin varlığı mRNA ekspresyonu seviyesinde incelendi. Kök hücelere ait olan *OCT4*, *SOX2* ve *NANOG* gibi nükleer ifade edilen pluripotent marker genlerin ekspresyon seviyesi analiz edildi (Şekil 6.1.1.1). Elde edilen sağlıklı KCNQ1 geni içeren SP1-2S ve mutant KCNQ1 proteini içeren SP2-9 UPK hücreleri köken aldıkları somatik hücreye göre istatistiksel olarak pluripotent kök hücre belirteç genlerini ifade etmektedir.



Şekil 6.1.1.1. Sağlıklı ve mutant hücelere ait pluripotensi genlerinin RNA düzeyinde incelenmesi. (A) OCT4, (B) SOX2 ($\times 10^3$), (C) NANOG. (n=3).

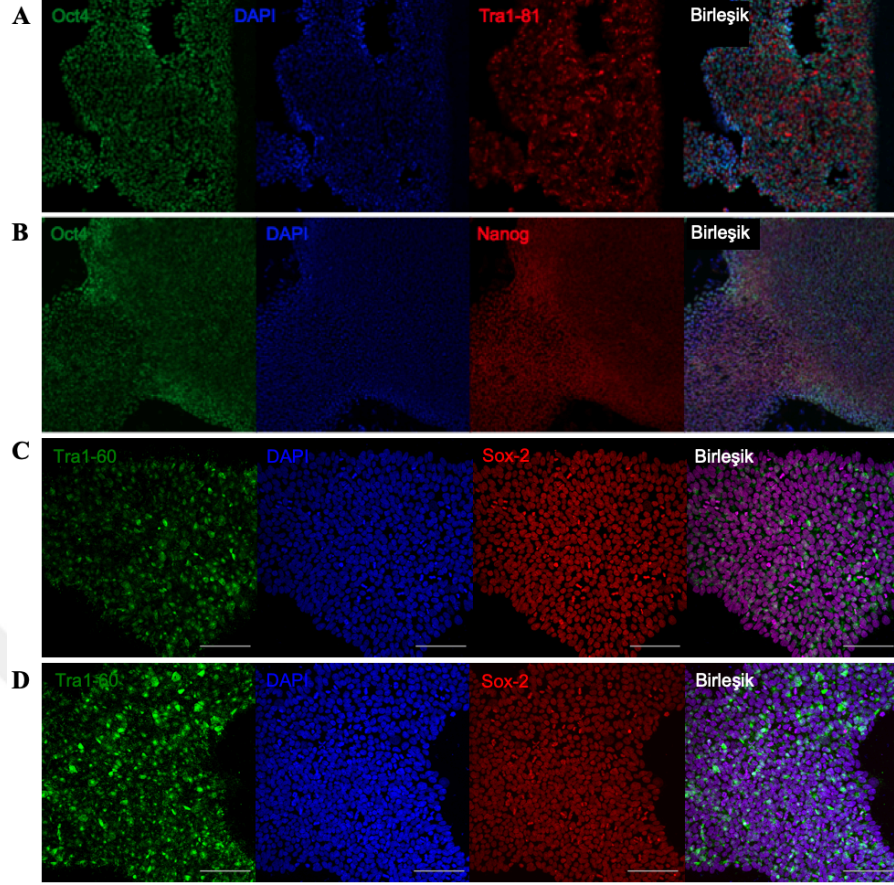
Pluripotent kök hücreler, EKH'lerin karakteristik özellikleri olan ektodermal, mezodermal ve endodermal 3 germ yaprağına dönüşebilmektedirler. Sağlıklı ve mutant hücrelerden elde edilen UPK hücrelerinin pluripotent karaktere sahip olduğunu gösterebilmek amacıyla ektoderm (*MSX1*), mezoderm (*PAX6*) ve endoderme (*AFP*) ait olan genlerin ekspresyon seviyeleri incelendi (Şekil 6.1.1.2). Tez çalışması kapsamında kullanılan temel hücrelerin 3 germ yaprağını temsil eden marker genleri ürettiği tespit edilmiştir.



Şekil 6.1.1.2 Sağlıklı ve mutant hücelere ait 3 germ yaprağı genlerinin RNA düzeyinde incelenmesi. (A) AFP, (B) PAX6, (C) MSX1. (n=3).

6.1.2 İnsan UPK Hücrelerinin İmmunositokimyasal İncelenmesi

SP1-2S sağlıklı ve SP2-9 mutant UPK hüceleri ile CRISPR-Cas9 sistemi ile genetik olarak düzenlenmiş UPK hücelerinin EKH benzeri pluripotent kök hücre özelliğı taşıdığı ait olan belirteç proteinler ile immunositokimyasal olarak tespit edildi. Pluripotensi genleri olarak bilinen *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* gibi transkripsiyon faktörleri ile *TRAI-60* ve *TRAI-81* gibi yüzey belirteçlerinin varlığı CRISPR genetik düzenleme sonrası UPK kolonileri karakterize edildi. EKH hücelerinin membran ve nükleer var olan proteinler ile karşılaştırmalı olarak incelenen UPK hücre kolonilerinin tüm pluripotensi proteinlerini ürettiğı gözlemlendi. Ek olarak çekirdek içerisinde bulunan transkripsiyon faktörlerinin, çekirdek boyası olan DAPI ile kolokelize oldukları gözlemlendi (Şekil 6.1.2.1).



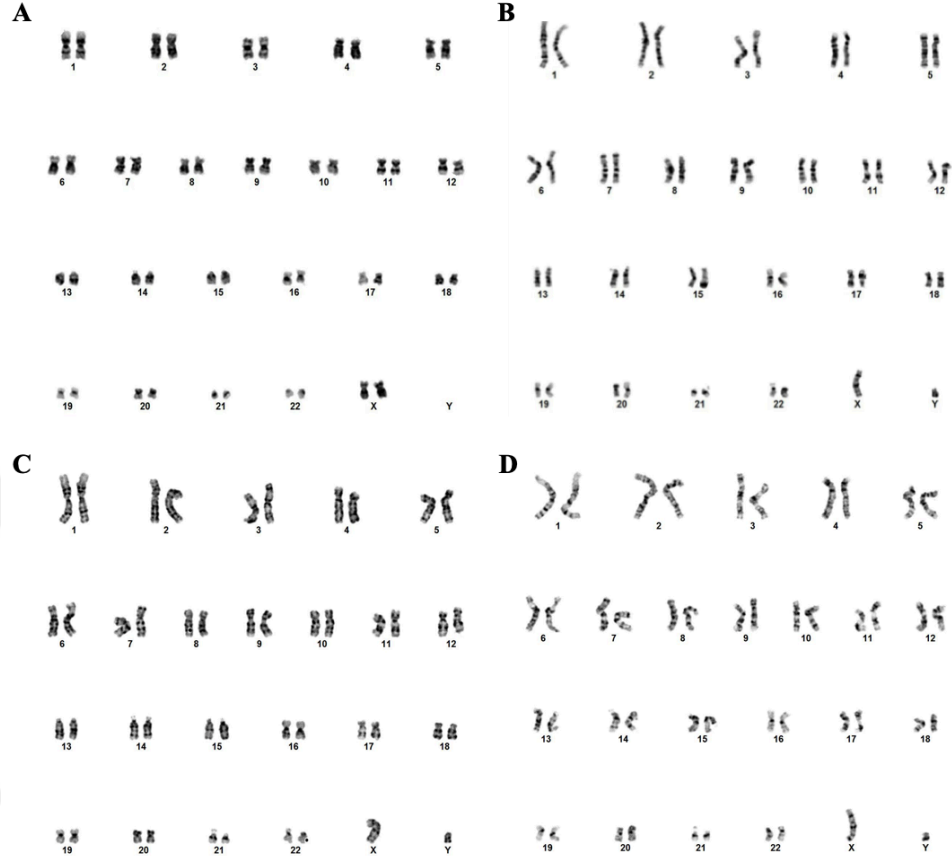
Şekil 6.1.2.1 UPK hücrelerinin immunositokimyasal karakterizasyonu (A) SP1-2S, (B) SP2-9, (C) cr211, (D) cr152 hücrelerinde Oct4 ve Tra1-60 (yeşil), Nanog ve Tra1-81 (kırmızı), DAPI (mavi) ve birleşik floresan mikroskop görüntüleri. Ölçek çubuğu: 50 µm.

6.1.3 İnsan UPK Hücrelerinin Karyotip Analizleri ve Kültürleri

Yeniden programlama sırasında hücrelerde nadiren de olsa kromozomal anomaliler gerçekleşebilmektedir. Bu sebeple tez kapsamında kullanılacak olan SP1-2S sağlıklı hücresi, *KCNQ1* geninde c.965 C/T mutasyonu taşıyan SP2-9 hücresi ve CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak elde edilen cr211, cr152, cr36 ve cr43 hücreleri için İstanbul Genetik Tanı Merkezi'nde karyotip analizi hizmeti alındı.

Sağlıklı SP1-2S ve *KCNQ1* geninde c.965 C/T mutasyonu taşıyan SP2-9 mutant UPK hücrelerinde kromozomal bir bozukluk olmadığı tespit edildi (Şekil 6.1.3.1.A-B). Mutant SP2-9 UPK hücrelerinden CRISPR/Cas9 sistemi ile *KCNQ1* mutasyonu genetik düzenlenmesi sonucunda NHEJ ile oluşan cr211 ve cr152 UPK

hücrelerinde CRISPR/Cas9 düzenleme kaynaklı makro düzeyde kromozomal bozukluk gözlemlenmedi (Şekil 6.1.3.1.C-D).



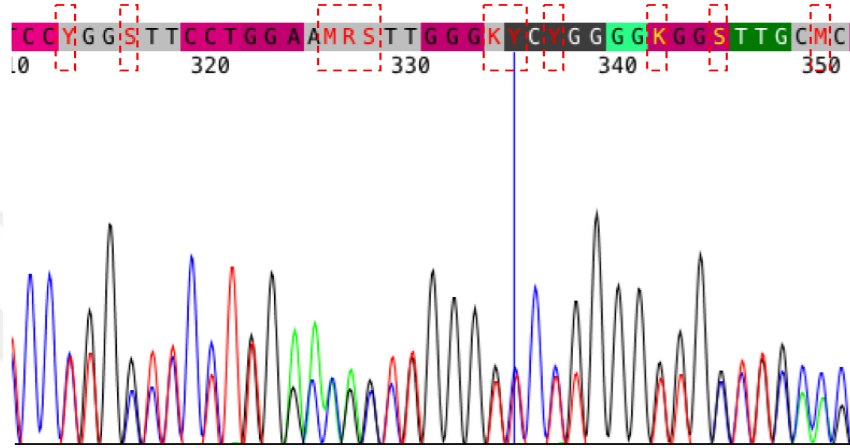
Şekil 6.1.3.1. UPK hücrelerine ait karyotip analiz sonuçları (A) SP1-2S, (B) SP2-9, (C) cr211, (D) cr152.

Sağlıklı SP1-2S hücresinde CRISPR/Cas9 genetik düzenleme aracı ile *KCNQ1* geninde c.965 C/T mutasyonu oluşturularak izogenik UPK hücreleri elde edilmiştir. DNA tamir mekanizmalarından NHEJ ile cr36 ve HDR ile cr43 UPK hücreleri oluşmuştur. Bu hücrelerde yapılan karyotip analizi sonucunda kromozomal bir anomali gözlemlenmemiştir.

6.2 Genetik Olarak Düzenlenmiş UPK Hücrelerinde Sekansların Ayırıştırılması

Sanger sekanslama sonucunda NHEJ ile oluşan cr211, cr152 ve cr36 kolonilerine ait DNA dizileri CRISP-ID (<http://crispid.gbiomed.kuleuven.be/>) programı kullanılarak allelerine ayırıştırıldı. Herbir allel Snap Gene Viewer ve Codon Code Aligner gibi programlar kullanılarak incelendi. Ancak net bir DNA dizi bilgisine

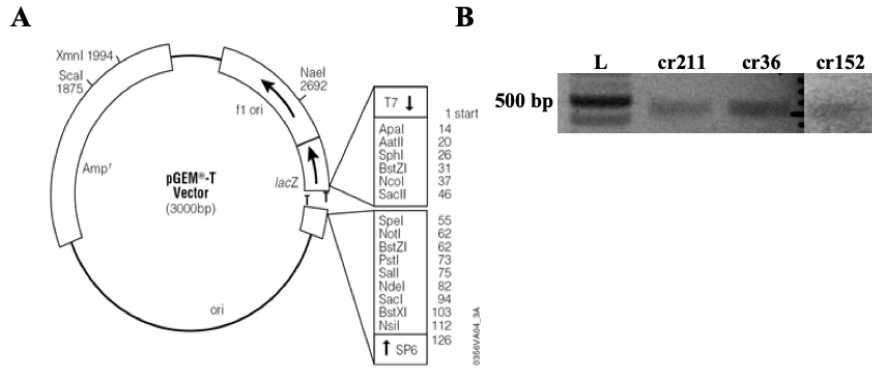
ulaşmadı (Şekil 6.2.1). Genetik düzenleme sonucunda meydana gelen heterozigot formdaki delesyonlar, kullanılan dizi analizi programlarının ATGC nükleotitleri yerine Şekil 6.2.1’de dikdörtgen içerisinde gösterilen MRSK gibi aynı anda iki farklı nükleotiti ifade eden harf kodları koymasına neden olmuştur. Sekans bilgisini netleştirmek ve heterozigot halde bulunan dizilerin ayrıştırılabilmesi için TA klonlama yapılmasına karar verildi.



Şekil 6.2.1. CRISPR/Cas9 ile genetik olarak düzenlenmiş UPK hücrelerine ait heterozigot formdaki DNA sekans bilgisi.

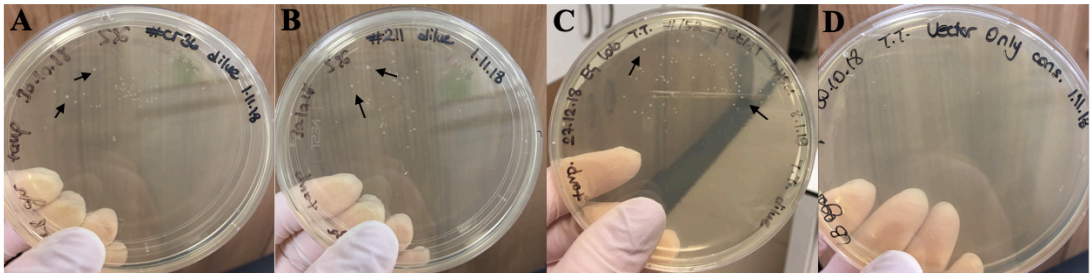
6.3 TA Klonlama Sonrası Sekansları Ayrıştırılan Genetik Düzenlenmiş UPK Hücreleri

CRISPR/Cas9 sistemi ile mutant hücreden sağlıklı UPK hücresi ve sağlıklı hücreden mutant UPK hücresi elde edilirken NHEJ ile oluşan cr211, cr152 ve cr36 UPK hücrelerinin DNA sekanslarının TA klonlama yöntemi ile ayrıştırılması amaçlandı. TA klonlama sisteminde kesik uçlarında T nükleotidi bulunduran PGEMT vektörü kullanıldı (Şekil 6.3.1.A). Cr211, cr152 ve cr36 UPK hücrelerinden genomik DNA izole edildi ve *KCNQ1* primerleri kullanılarak plazmid içerisine aktarılmak istenen DNA bölgesi PZR ile çoğaltıldı. Oluşan 473 bp'lik ürünler tek bant halinde % 1'lik jel içerisinde gözlemlendi (Şekil 6.3.1.B). Çoğaltılan DNA bölgesinin ligasyon sırasında vektörün serbest T uçlarıyla eşleşebilmesi için PZR'de oluşan ürünün sonuna A nükleotidi ekleyen Taq polimeraz kullanıldı. Jel içerisinde tek bant halinde görülen PZR ürünleri saflaştırıldıktan sonra transformasyon gerçekleştirildi.



Şekil 6.3.1. TA klonlama işleminde kullanılan (A) pGEM-T vektörü (Promega), (B) *KCNQ1* primerleri kullanılarak cr211, cr36 ve cr152 hücrelerine ait DNA PZR sonrasında oluşan 473 bp boyundaki ürünler.

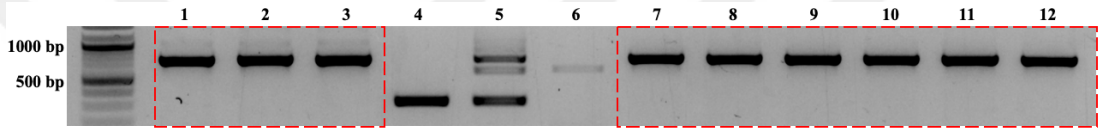
Vektörün içerisinde bulunan ampisilin direnç geni, insert DNA ile ligasyon sonrasında seçilim için kullanıldı. İntert içeren plazmid, DH5 α hücrelerine transforme edildikten sonra ampisilin içeren agar kaplı petriyelerde gece boyunca büyütüldüler. Ertesi gün yapılan gözlemlerde plazmidi alan kolonilerin Şekil 6.3.2.A-C’de okla gösterilen şekilde koloni oluşturarak büyüdükleri gözlemlendi. Kontrol amaçlı insert içermeyen ligasyon işlemi yapıldığında vektör kapanamadığından ampisilin direnç geni üretilmemiş ve koloni gözlemlenmemiştir (Şekil 6.3.2.D). Böylece seçilen kolonilerin insert ile vektörün ligasyonu sonrasında geliştiği tespit edildi.



Şekil 6.3.2. DH5 α hücrelerine verilen vektörlerin insertle beraber ligasyon reaksiyonu sonucunda gözlemlenen (A) cr36 insert, (B) cr211 insert, (C) cr152 insert ve (D) Sadece vektör içeren koloniler.

Seçilen kolonilerin insert DNA bölgesini içermeye durumunu tespit edebilmek amacıyla M13 primerleri kullanılarak koloni PZR yapıldı. İçerisine ilgili DNA bölgesini bulunduran plazmidi alan kolonilerin M13 primeri ile PZR sonucunda % 1’lik agaroz jel içerisinde 721 bp’lik DNA fragmanları beklendi. Şekil 6.3.3’te

içerisine plazmid alan ve/veya almayan vektörlerin PZR sonuçlarını temsil eden bir jel görüntüsü bulunmaktadır. Jel görüntüsünde 1-3 ve 7-12 numaralı kolonilerden çoğaltılan PZR ürünlerinin boyları beklenen 721 bp uzunluğunda olması nedeniyle plazmidlerin insert içerdiği düşünüldü. Dört numaralı koloniden çoğaltılan 500 bp'lik DNA beklenen bant boyunun altında olduğundan insert içermediğini göstermektedir. 5 numaralı koloniden yapılan PZR sonucunda elde edilen üründe hem 721 bp'lik ürün gözlemlenirken hem de 500 bp'nin altında ürün gözlemlenmiştir. Bu koloninin tek bir plazmid yerine hem insert içeren hem de ilgili DNA bölgesini bulundurmayan en az iki adet plazmid aldığı şeklinde yorumlandı. Plazmid içermeyen örnekler ve M13 PZR sonucunda tek bant yerine çoklu bant gözlemlenen koloniler çalışma dışı bırakılmıştır.

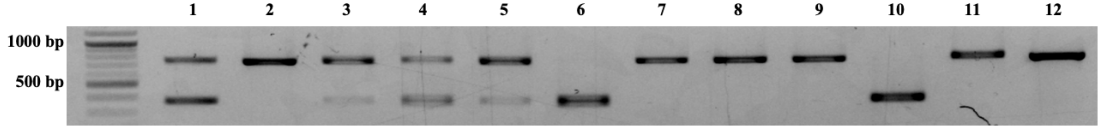


Şekil 6.3.3. M13 primerleri ile koloni PZR sonucunda jel görüntüsü. 1-3 ve 7-12: insert içeren plazmidler, 5: iki plazmid içeren koloni, 4 ve 6: tanımlanamayan insert.

6.3.1 TA Klonlama Sonrası Enzim Kesimi ile Seleksiyon

Çalışmanın bu tez öncesi aşamalarında, CRISPR-Cas9 ile genetik olarak düzenlenen kolonilerin düzenlenme durumunu kontrol edebilmek amacıyla tasarlanan sgRNA içerisine KpnI restriksiyon enzim kesim bölgesi aminoasit sekansını değiştirmeyecek şekilde eklenmiştir. Böylelikle TA klonlama sonucunda ayrıştırılan plazmid sekansların içerdikleri insertlerin vahşi tip *KCNQ1* ya da mutant *KCNQ1* allellerinden hangisine sahip olduğunun bu strateji kullanılarak tespit edilebileceği düşünüldü. Bu amaçla, plazmid izolasyonu yapılmadan önce M13 koloni PZR sonucunda pozitif çıkan kolonilerde KpnI enzim kesimi yapıldı. Enzim kesimi sonrasında oluşan 314 ve 407 bp'lik iki bantın ayrışabilmeleri amacıyla %1.5'lik agaroz jelde inceleme yapıldı. Jel elektroforezi sonucu yapılan gözlemler iki bantın tamamen ayrışmadığı ve tek bir kalın bant oldukları tespit edildi (Şekil 6.3.1.1). KpnI enzim kesimi sonucunda kesimin gerçekleşmediği 2, 7, 8, 9 ve 11 numaralı bantların *KCNQ1* geni PZR sonucunda elde edilen ve hiç kesilmemiş 12 numaralı kontrol bantı ile aynı boyda olduğu tespit edildi. 1, 3, 4 ve 5 numaralı örneklerde ise hem kesilmemiş bant olduğu hem de kesilen bantların olduğu görüldü. Kesim sonucunda bu kolonilerin

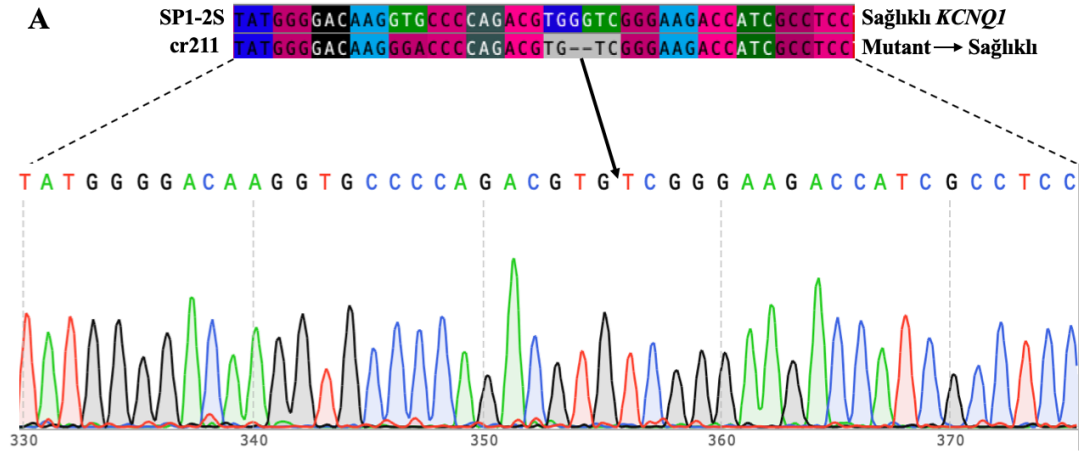
aynı anda iki farklı plazmid aldıkları düşünüldü ve çalışma dışı bırakıldı. 6 ve 10 numara ile gösterilen bantların KpnI kesim sonucunda ~400 bp oldukları tespit edildi (Şekil 6.3.1.1).

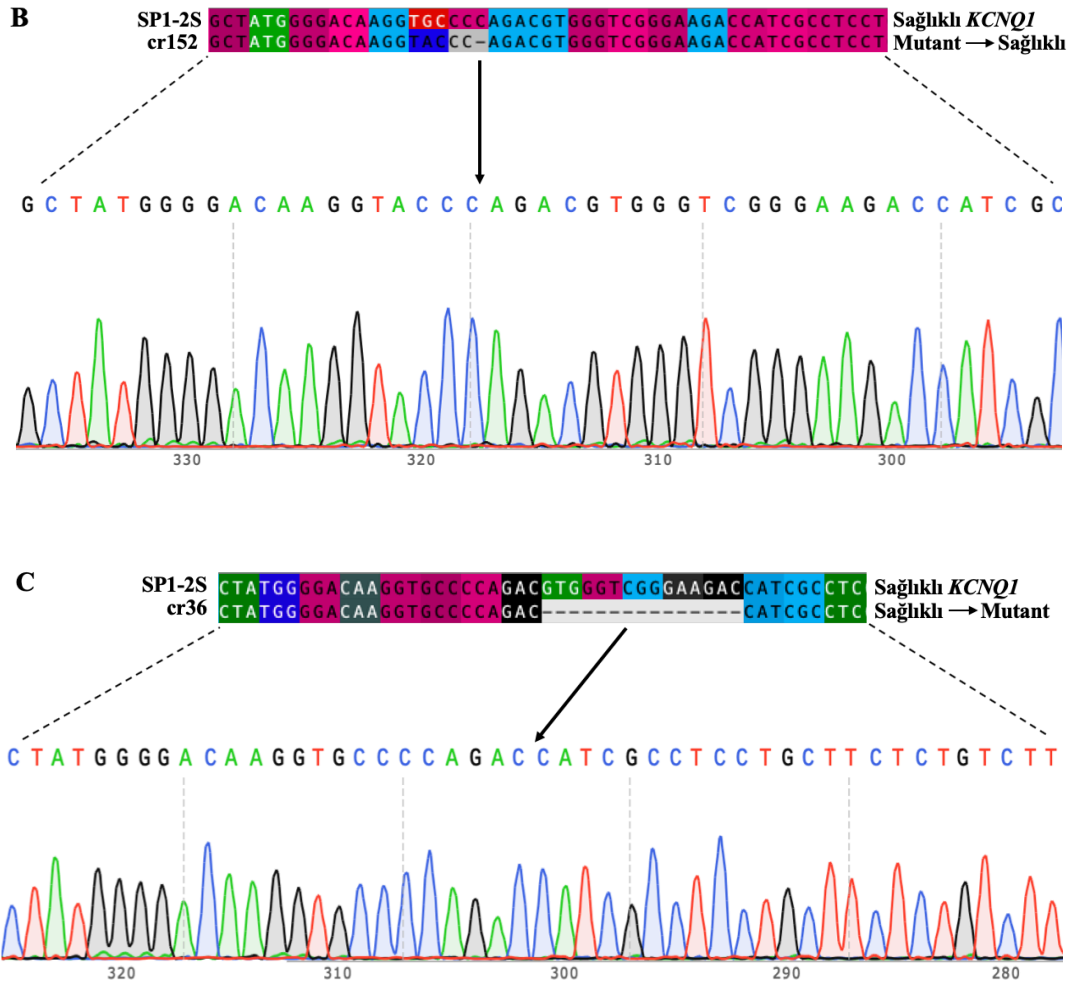


Şekil 6.3.1.1. İnsert içeren plazmid PZR DNA fragmanlarının KpnI enzim kesim sonuçları. 2, 7-9, 11: kesim olmayan plazmidler, 1, 3, 4, 5: hem mutant hem de sağlıklı insert içeren plazmidler, 6,10: kesilen plazmidler, 12: kesim yapılmayan kontrol plazmid.

6.3.2 TA Klonlama Sonrası Sanger Sekanslama

İnsert DNA'yı alan ve KpnI kesimi ile doğru insert olduğu doğrulanan plazmidlerde Sanger sekanslama ile cr211, cr152 ve cr36 hücrelerinin dizi analizi yapıldı. cr211 UPK hücresinde 2 bp'lik delesyon (Şekil 6.3.2.1.A), cr152 UPK hücresinde 1 bp'lik delesyon (Şekil 6.3.2.1.B) ve cr36 UPK hücresinde 15 bp'lik delesyon (Şekil 6.3.2.1.C) olduğu saptandı. Delesyonların bulunduğu bölgeler Şekil Şekil 6.3.2.1'de ok ile gösterildi.





Şekil 6.3.2.1. CRISPR/Cas9 ile genetik olarak düzenlenen UPK hücrelerinde NHEJ sonucunda oluşan delesyonlar (A) cr211, (B) cr152 ve (C) cr36.

KpnI restriksiyon enzimi ile kesilen örneklerle beraber kontrol amaçlı olarak kesilmeyen örneklerde de Sanger sekanslama işlemi gerçekleştirildi. Sekanslama sonrasında kesimin gerçekleşmediği kolonilerde enzim kesim bölgesinin oluşmamasına rağmen NHEJ sonrasında mutasyonların olduğu tespit edildi. Bu nedenle KpnI enziminin CRISPR/Cas9 sonucunda NHEJ ile düzenlenen hücrelerin belirlenmesi için sekanslama ile doğrulanması gerektiği düşünüldü.

UPK hücrelerinde oluşan delesyonların protein sekanslarına neden olacağı öngörülen değişiklikler etkileri Snap Gene Viewer ve/veya Codon Code Aligner programları kullanılarak incelendi. cr211 gerçekleşen delesyon sadece çerçeve kayması mutasyonuna sebep olurken cr152'de meydana gelen 1 bp'lik delesyonun

DNA sekansında erken durdurucu kodonun (early stop codon) oluşmasına hem de çerçeve kayması mutasyonuna sebep olduğu tespit edildi. cr36'da 15 bp'lik delesyon 5 aminoasitin silinmesine sebep olmuştur. Şekil 6.3.2.2'de cr152 UPK hücresine ait olan protein sekansında kırmızı dikdörtgen içerisinde alınan bölgelerde durdurucu kodonlar gösterilmektedir. Erken durdurucu kodonların oluşmasından dolayı cr152 UPK hücrelerinin kesik proteine sahip olduğu ön görüldü. Aynı zamanda 1 bp'lik delesyon cr152 protein sekansında çerçeve kayması mutasyonuna sebep olmuştur. Çerçeve kayması mutasyonu sonucunda oluşan protein sekansı sağlıklı KCNQ1 protein dizisi ile karşılaştırıldığında delesyonun olduğu bölge sonrasında aminoasit dizisinin farklılaştığı tespit edilmiştir. Şekil 6.3.2.2'de protein sekansının farklılaşmaya başladığı aminoasit ok ile belirtilmiştir.



Şekil 6.3.2.2. cr152 UPK hücresinde meydana gelen 1 bp'lik delesyonun erken durdurucu kodon oluşturması. Ok ile sekans değişikliğinin başlangıcı, kırmızı çizgi ile STP belirtilmiştir. STP: Durdurucu kodon.

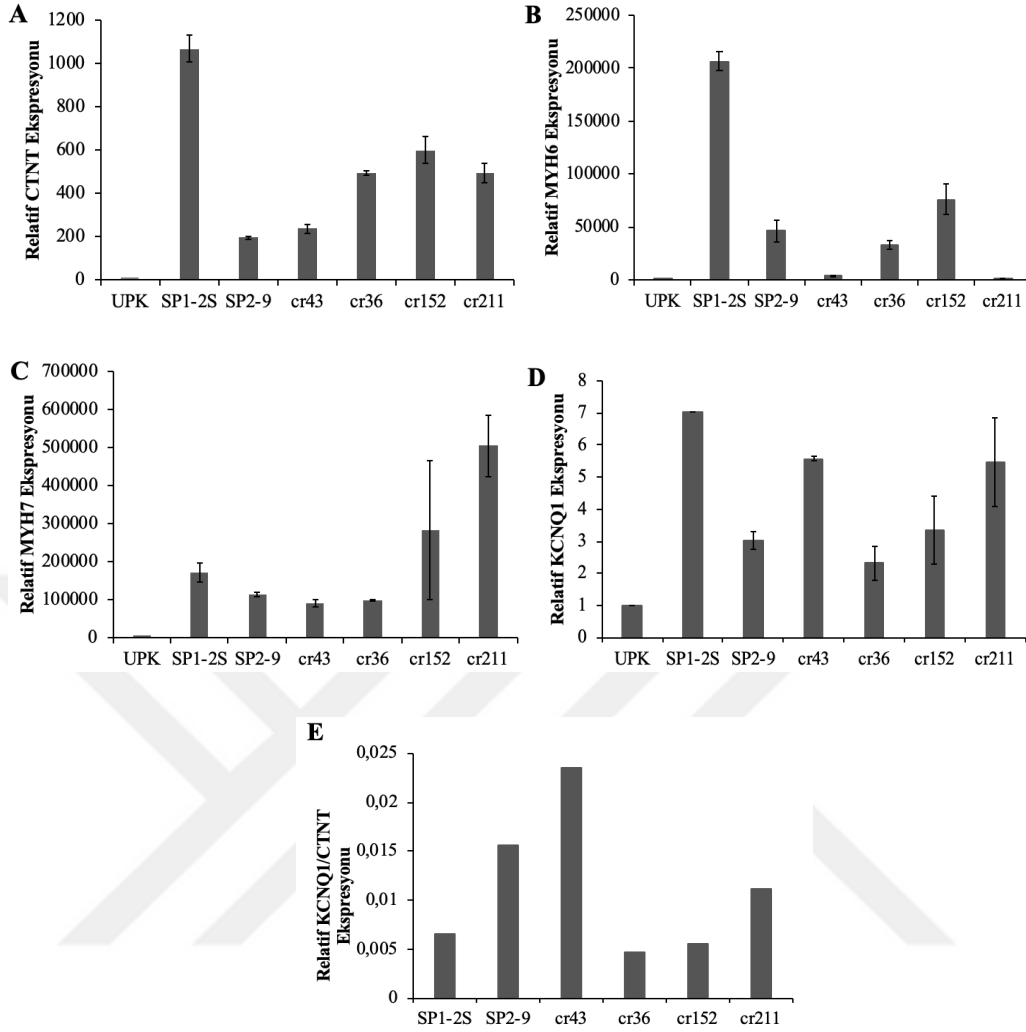
6.4 UPK Hücre Kökenli Kardiyomiyositlerin qRT-PZR Yöntemi ile Moleküler Olarak İncelenmesi

Mutant KCNQ1 proteininin kardiyomiyosit fonksiyonu üzerine etkilerini incelemek amacıyla spontan olarak kasılan insan UPK hücre kökenli kardiyomiyositlerin morfolojik olarak ışık mikroskobu ile gözlemlenmesinin yanı sıra

kardiyak belirteç genleri olan *CTNT*, *MYH6*, *MYH7* ve *KCNQ1* gen ekspresyonu seviyeleri incelendi. Yapılan qRT-PZR analizlerinde incelenen kardiyak genlerin kontrol amaçlı kullanılan ve bu genleri ifade etmesi beklenmeyen UPK hücrelerine göre qRT-PZR analizleri yapıldı.

Sağlıklı SP1-2S UPK hücre kökenli kardiyomiyositlerin *CTNT* gen ekspresyon seviyesinin diğer UPK kök hücre kökenli kardiyomiyositlere göre yüksek olduğu tespit edildi (Şekil 6.4.1.A). SP2-9 mutant hücre kaynaklı kardiyomiyositlerin *CTNT* gen ekspresyon seviyesi sağlıklı kardiyomiyositlere göre düşük olduğu tespit edildi. CRISPR/Cas9 sonucunda NHEJ ile genetik olarak düzenlenen UPK hücre kökenli kardiyomiyositlerin *CTNT* gen ekspresyon seviyesinin sağlıklı kardiyomiyosit kültürlerine göre düşük iken mutant SP2-9 kardiyomiyosit kültürlerine göre yüksek olduğu gözlemlendi (Şekil 6.4.1.A).

MYH6 (miyozin ağır zincir α) ve *MYH7* (miyozin ağır zincir β) gibi kardiyak genlerin negatif kontrol olan UPK hücrelerine göre mRNA ifadesinin arttığı qRT-PZR analizi ile tespit edildi (Şekil 6.4.1.B-C). UPK hücre kökenli kardiyomiyositlerin kardiyak gen ekspresyon seviyelerine karşılaştırmalı olarak bakıldığında *MYH7* gen ekspresyonunun *MYH6* gen ekspresyonuna göre yüksek olduğu tespit edildi. *MYH7* geni insan kökenli yetişkin kardiyomiyositlerde *MYH6*'ya göre baskın olarak ifade edildiğinden D60-80 gün aralığında bulunan UPK hücre kökenli kardiyomiyositlerin olgun kardiyomiyosit oldukları tespit edildi. Atrial kökenli kardiyomiyositlerde *MYH6* geni baskın olarak ifade edilmektedir. Şekil 6.4.1.B'de sağlıklı UPK hücre olan SP1-2S kökenli kardiyomiyositlerde *MYH6* gen ekspresyon seviyesinin mutant UPK hücre olan SP2-9 ve CRISPR/Cas9 ile genetik olarak düzenlenen UPK hücre kökenli kardiyomiyositlere göre yüksek olduğu tespit edildi. Böylece SP1-2S UPK hücre kökenli kardiyomiyosit kültürlerinde atrial kaynaklı kardiyomiyositlerin diğer UPK hücre kökenli kardiyomiyosit kültürlerine göre fazla olduğu görüldü. *KCNQ1* geninde mutasyona sahip olan SP2-9 UPK hücre kökenli kardiyomiyositlerin *MYH6* ve *MYH7* kardiyak genlerini sağlıklı SP1-2S UPK hücre kökenli kardiyomiyositlere göre düşük ifade ettiği tespit edildi. cr152 ve cr211 UPK hücre kökenli kardiyomiyositlerin olgun kardiyomiyosit belirteci olan *MYH7* genini *MYH6*'ya göre istatistiksel olarak yüksek ifade ettiği belirlendi (Şekil 6.4.1.C).



Şekil 6.4.1. UPK kök hücre kaynaklı kardiyomiyositlerin RNA düzeyinde incelenmesi. (A) *CTNT*, (B) *MYH6*, (C) *MYH7*, (D) *KCNQ1*, (E) *CTNT*'ye göre normalize edilmiş *KCNQ1* genlerinin ekspresyon seviyeleri. (n=1-3)

Kardiyak genlerin karakterizasyonunun yanında *KCNQ1* kanal protein geninin ekspresyon seviyesi RNA düzeyinde ölçüldü (Şekil 6.4.1.D). UPK hücre kökenli kardiyomiyosit kültürlerinin hücre çeşitliliği açısından heterojen olmasından dolayı *KCNQ1* gen ekspresyonu *CTNT* gen ekspresyonu ile karşılaştırmalı olacak şekilde incelendi (Şekil 6.4.1.E). Böylece kardiyomiyosit hücrelerinde ifadelenen *KCNQ1* gen ekspresyonları karşılaştırıldı. SP2-9 ve CRISPR/Cas9 sonucunda HDR ile mutant karakter kazandırılmış cr43 kardiyomiyosit kültürlerinin *CTNT* ekspresyon seviyeleri benzer olarak gözlemlenmişken, cr43 kardiyomiyosit kültürlerinin SP2-9 kardiyomiyosit kültürlerine göre yüksek *KCNQ1* geni sentezlediği tespit edildi. CRISPR/Cas9 sistemi sonucunda NHEJ ile düzenlenen UPK hücre kökenli cr36, cr152

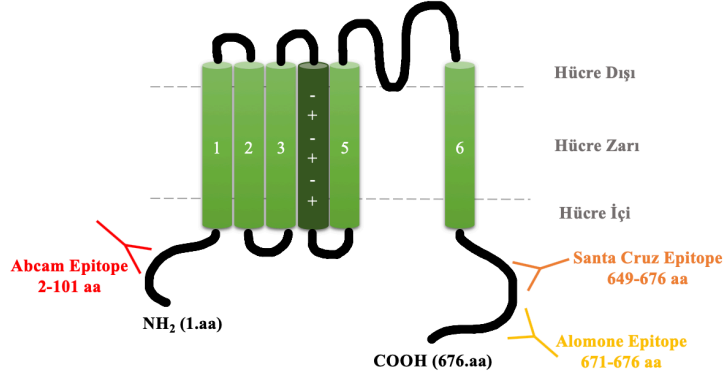
ve cr211 kültürlerinde CTNT gen ekspresyon seviyesi benzer gözlemlenirken, cr211'in cr36 ve cr152'ye oranla daha yüksek KCNQ1 sentezlediği tespit edildi. cr152'de bulunan erken durdurucu kodon KCNQ1 ifadesinin düşük olmasına sebep olabilir. cr36'nın 15 bp'lik delesyona sahip olması diğer CRISPR ile düzenlenen hücrelere oranla KCNQ1 gen ekspresyonunun düşük sentezlenmesinin sebebi olabilir (Şekil 6.4.1.E).

6.5 UPK Hücre Kökenli Kardiyomiyositlerde *KCNQ1* Protein Düzeyinin Western Blot Yöntemiyle İncelenmesi

CRISPR/Cas9 genetik düzenlemesi sonucunda NHEJ ile oluşan UPK hücrelerinde meydana gelen delesyonların *KCNQ1* protein ekspresyon seviyesinde meydana getirdiği değişiklikleri incelendi. Farklılaşmanın 60. gününde total protein izolasyonu yapılarak UPK hücre kökenli kardiyomiyositlerde Western Blot yöntemi kullanılarak *KCNQ1* protein ekspresyon seviyesi araştırıldı. UPK hücre kültür örnekleri ve insan kaynaklı fibroblastlar *KCNQ1* protein ekspresyonu yapmadıklarından negatif kontrol olarak kullanıldı. İnsan doku örneğine ulaşamadığından dolayı 13.5 günlük embriyonik fare kalp dokusundan elde edilen total protein *KCNQ1* protein ekspresyonu analizi için pozitif kontrol olarak kullanıldı. Potasyum iyon kanalı için anti-*KCNQ1* antikorunu kullanılırken örnek yükleme kontrolü olarak α -Tubulin antikorunu kullanıldı.

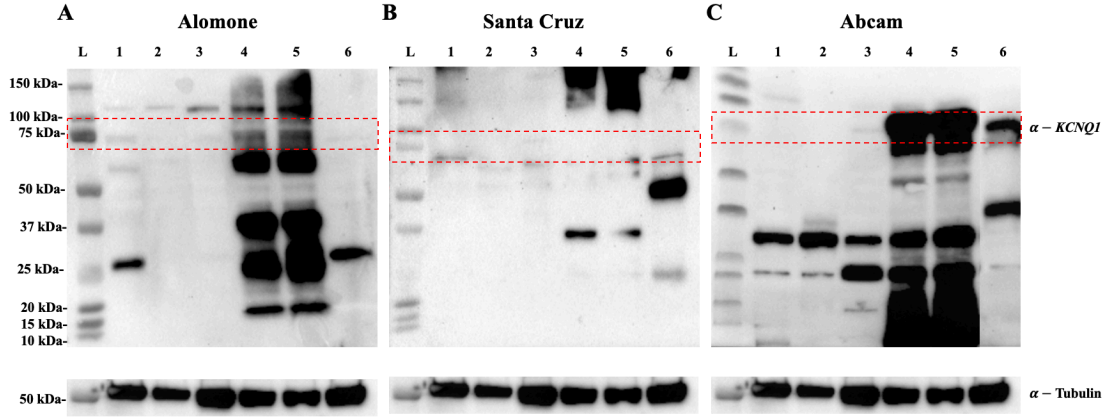
KCNQ1 proteinini Western Blot analizlerinde spesifik olarak tespit edilebilmek amacıyla temin edilen Alomone, Santa Cruz ve Abcam marka üç farklı *KCNQ1* birincil antikorları kullanıldı (Şekil 6.5.1). Antikorların optimizasyon çalışması aynı örneklerden elde edilen total proteinler kullanılarak yapıldı. *KCNQ1* protein ekspresyonu için pozitif kontrol olarak sağlıklı ve mutant *KCNQ1* transfekte edilmiş HEK293FT hücrelerinden elde edilen hücre lizatı kullanıldı. Ek olarak, *KCNQ1* transfeksiyon kontrolü amaçlı transfeksiyon yapılmamış HEK293FT hücrelerinden izole edilen proteinler de incelendi. Aynı zamanda EKH kaynaklı D93 kardiyomiyositlerinin *KCNQ1* protein üretim seviyesi de incelendi. Proteinler SDS-PAGE jeli kullanılarak ayrıştırıldı. Jelde bulunan proteinler, membranlara aktarıldıktan sonra üç farklı birincil *KCNQ1* antikorunu kullanılarak karşılaştırmalı

incelemeler yapıldı. Literatürde *KCNQ1* proteini için değişik izoformlar ve modifiye formlar 37-75 kDa aralığında bulunmaktadır.



Şekil 6.5.1. Abcam, Santa Cruz ve Alomone marka *KCNQ1* antikorlarının *KCNQ1* kanal proteinini tanıma bölgeleri. aa: aminoasit

Alomone marka *KCNQ1* antikor epitopu, proteini karboksil (-COOH) ucunda bulunan 661-676 aminoasit bölgesinden tanımaktadır (Şekil 6.5.1). Şekil 6.5.2.A'da 1 numara ile gösterilen EKH D93 kardiyomiyositlerde ~75 kDa civarında bir bant gözlemlenmektedir. Aynı zamanda 2 numaralı insan kaynaklı fibroblast ve 3 numaralı *KCNQ1* transfeksiyonu yapılmamış örneklerde bant gözlemlenmedi. Sağlıklı ve mutant *KCNQ1* transfeksiyonu yapılan hücrelerde ~75 kDa civarında *KCNQ1* proteinine ait spesifik bantlar olduğu görüldü. HEK293FT hücrelerine transfeksiyon sonucunda protein üretimi teşvik edildiğinden gözlemlenen kalın bantlar, hücrelerin yüksek seviyede protein ürettiğini göstermektedir. Membran üzerinde 4 ve 5 numaralı örneklerde farklı kDa seviyelerinde bantların gözlemlenmesi transfeksiyon sonucunda birden fazla proteinin ekspresyonunun arttığı göstermektedir. Literatüre göre 6 numara ile gösterilen embriyonik fare kalbinde 37 kDa civarında ikili bir bant ve 25 kDa civarında tek bant olarak 3 farklı bant görmemiz gerekirken ~37 kDa civarında tek bant gözlemlendi. *KCNQ1* proteinin var olduğu düşünülen 1, 4 ve 5 numaralı örneklerde ~37 kDa'da bulunan bantlar *KCNQ1* proteinin degradasyonu sonucunda oluşmuş protein parçalarını temsil ettiği düşünüldü.



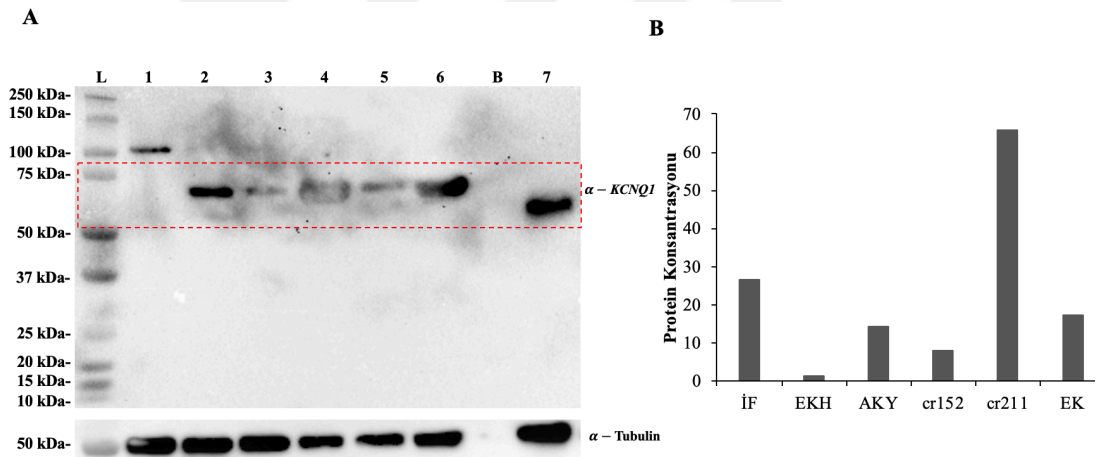
Şekil 6.2.2. KCNQ1 antikorlarının Western Blot analiz optimizasyonu. Örnekler: 1-EKH D93, 2-İnsan kaynaklı fibroblast, 3-KCNQ1 transfeksiyonu yapılmamış HEK293FT, 4-Sağlıklı KCNQ1 transfeksiyonu yapılmış HEK293FT, 5-Mutant KCNQ1 transfeksiyonu yapılmış HEK293FT, 6-Embriyonik fare kalbi. L: Protein belirteci.

Santa Cruz marka *KCNQ1* antikor epitopu, proteini karboksil (-COOH) ucunda bulunan 649-676 aminoasit bölgesinden tanımaktadır (Şekil 6.5.1). Şekil 6.5.2.B’de bulunan örneklerde 75 kDa’da net bantlar gözlenmedi. Net bantların gözlenmemesi protein ekspresyonunun düşük seviyede olmasından kaynaklı olabileceği düşünüldü. 2 numaralı negatif kontrol örneği olan insan kaynaklı fibroblast örneğinde bant görülmezken, 4 ve 5 numaralı *KCNQ1* transfekte edilmiş HEK293FT hücrelerinde de 75 kDa’da bant görülmedi. Aynı zamanda 4 ve 5 numaralı örneklerde 150 kDa üzerinde yoğun bant birikmesi gözlemlendiğinden bu örneklerin yüksek miktarda glikozillenme olduğu düşünüldü. Aynı zamanda HEK293FT hücrelerine dış kaynaklı yüksek seviyede *KCNQ1* proteininin ürettirilmesi proteinlerin oligomerleşmesine sebep olmuş olabilir. 6 numaralı embriyonik fare protein örneğinde literatürle tutarlı ~75, 50 ve 37 kDa’da bulunan üç farklı *KCNQ1* protein izoformu gözlemlendi., ancak insan kaynaklı hğcrelerde *KCNQ1* proteini beklenen moleküler büyüklükte tespit edilemedi.

Abcam marka *KCNQ1* antikor epitopu, proteini amino (-NH₂) ucunda bulunan 2-101 aminoasit bölgesinden tanımaktadır (Şekil 6.5.1). Şekil 6.5.2.C’de 2 numaralı insan kaynaklı fibroblast ve 3 numaralı HEK293FT UPK hücrelerinde 75 kDa’da bir bant gözlemlenmedi. Dört ve 5 numaralı *KCNQ1* transfeksiyonu yapılan HEK293FT 75 kDa’da yüksek yoğunlukta bantlar gözlemlendi. Bu örneklerde 20-37 kDa arasında

bulunan bantların negatif örnekler olan insan kökenli fibroblast ve HEK293FT hücrelerinde de gözlenmesi bu spesifik olmayan bir reaktiviteye işaret ettiği düşünüldü. Fare embriyonik kalbinde beklenen 3 bant da gözlenmesi Abcam marka *KCNQ1* antikorunun Alomone ve Santa Cruz marka *KCNQ1* antikorlarına göre spesifitesinin yüksek olduğunu düşündürdü. Böylece UPK hücre kökenli kardiyomiyositlerden elde edilen total proteinlerde *KCNQ1* protein analizleri Abcam marka antikor kullanılarak gerçekleştirilmesine karar verildi.

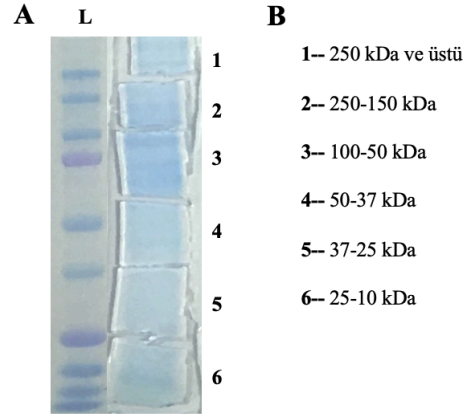
Örneklerin miktar olarak birbirleriyle eşit yüklendiğini kontrol etmek amacıyla α -Tubulin proteini standart olarak kullanıldı. Üç farklı jelde de aynı miktarlarda protein konsantrasyonu ve aynı lizatlar kullanılmasından dolayı tek bir membran seçildi ve deterjan ile beta merkaptolanol kullanılarak *KCNQ1* blotlama yapılan membran temizlendi. Yeniden blotlanan membranlarda yapılan 50 kDa civarında α -Tubulin ait bantlarında birbirleriyle eşit olduğu görüldü (Şekil 6.5.2).



Şekil 6.5.3. UPK hücre kökenli kardiyomiyositlerde Western Blot yöntemi ile *KCNQ1* protein analizleri. **(A)** Örnekler: 1-UPK hücresi, 2-insan kaynaklı fibroblast, 3-EKH D93, 4-AKY D61, 5-cr152 D59, 6-cr211 D60, 7-embriyonik fare kalbi, B: boşluk, L: protein belirteci, **(B)** karşılaştırmalı kantitatif *KCNQ1* protein konsantrasyon grafiği, İF: insan kaynaklı fibroblast, EK: embriyonik fare kalbi.

Antikor optimizasyon sonrasında sağlıklı ve hasta kaynaklı kardiyomiyositler ile CRISPR/Cas9 ile düzenlenen hücre kaynaklı kardiyomiyositlerde elde edilen *KCNQ1* proteinlerinin ekspresyon seviyeleri belirlenmek istendi. EKH, sağlıklı AKY, mutant SP2-9 ve CRISPR/Cas9 genetik düzenlemesi sonucunda NHEJ ile oluşan UPK

hücre kökenli kardiyomyositlerden D50-95 günleri arasında izole edilen total proteinlerde KCNQ1 protein konsantrasyon seviyeleri karşılaştırmalı olarak incelendi (Şekil 6.5.3). Şekil 6.5.3.A'da sağlıklı KCNQ1 proteini içeren 3 numaralı D93 EKH kökenli kardiyomyosit ve 4 numaralı pozitif kontrol olarak kullanılan sağlıklı UPK hücre kökenli AKY D61 kardiyomyositlerinde düşük konsantrasyonda KCNQ1 protein bantları ~75 kDa'da gözlemlendi. CRISPR/Cas9 sonucunda NHEJ ile düzenlenen ve KCNQ1 proteininde erken durdurucu kodon bulunduğu ön görülen 5 numara ile gösterilen cr152 kolonisinde ~75 kDa'da sağlıklı allelin kodladığı protein gözlemlendi. KCNQ1 geninde bulunan c.965 C/T mutasyonunun heterozigot karaktere sahip olması sağlıklı allelden KCNQ1 proteinin sentezlenmesine sebep olmuştur. Altı numara ile gösterilen cr211'de sağlıklı UPK hücre kökenli kardiyomyositlere göre KCNQ1 protein ekspresyonunun daha fazla olduğu gözlemlendi. Literatürde embriyonik fare kalbinde 3 farklı izoformda KCNQ1 proteini bulunurken jel sonucunda göre ~75 kDa'da tek bir bant tespit edildi. Bir numaralı UPK hücresinde KCNQ1 protein ekspresyonu gözlenmezken insan kaynaklı fibroblast hücresinde literatürle farklı olarak KCNQ1 protein ekspresyonu tespit edilmiştir (Şekil 6.5.3.A). Yükleme kontrolü olarak kullanılan α -Tubulin protein ekspresyonları arasında fark olduğu için her örneğe ait olan KCNQ1 protein konsantrasyonu, α -Tubulin protein ekspresyonuna oranlanarak kantitatif protein ekspresyon analizi yapılmıştır (Şekil 6.5.3.B). cr211 UPK hücre kökenli kardiyomyositin KCNQ1 protein ekspresyonunun diğer hücrelere oranla yüksek olduğu tespit edilmiştir. Mutant allelinde erken durdurucu kodon olduğu ön görülen cr152 UPK hücre kökenli kardiyomyositin KCNQ1 protein ekspresyonunun sağlıklı UPK hücre kökenli olan AKY kardiyomyositlerine oranla düşük olduğu gözlemlendi. Literatüre göre KCNQ1 protein ekspresyonu gerçekleştirilmeyen insan kaynaklı fibroblast hücrelerinden elde edilen KCNQ1 protein konsantrasyonunun diğer UPK hücre kökenli kardiyomyositlere oranla yüksek olduğu saptandı (Şekil 6.5.3.B).



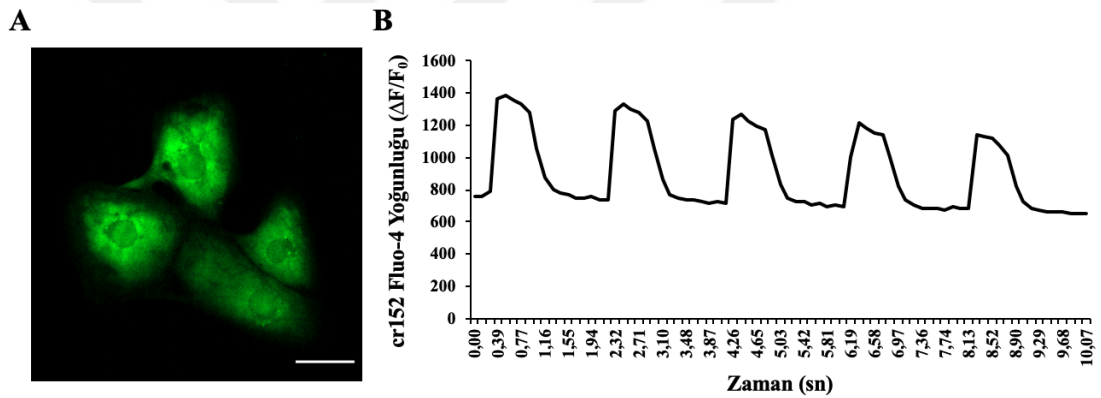
Şekil 6.5.4. Jel içerisinde bulunan proteinlerde kütle spektrofotometri analizi **(A)** Coomassie brilliant blue ile jel içerisinde bulunan protein bantlarının gösterilmesi, **(B)** Kütle spektrofotometri analizi için kesilen jel parçalarının ağırlıkları.

KCNQ1 proteinini tanıyan antikorların birbirleriyle tutarsız sonuç vermeleri, Western Blot çalışmaları sonucunda elde edilen reaktif bantların literatürle uyuşmaması ve UPK hücre kökenli kardiyomyositlerin izole edilen proteinlerin düşük konsantrasyonlarda olmasından dolayı jel içerisinde bulunan proteinlerden kütle spektrofotometri analizi yapıldı (Şekil 6.5.4). Yapılan analizin optimizasyonunun yapılabilmesi için öncelikli olarak UPK hücre kökenli kardiyomyositler yerine KCNQ1 transfeksiyonu yapılmış HEK293FT hücrelerinden elde edilen proteinler kullanıldı. Belirli protein boylarında jeller küçük parçacıklar halinde kesilerek analiz edildi (Şekil 6.5.4.A). Literatüre göre KCNQ1 protein bantlarını Şekil 6.5.4.B’de 3 numaralı jel aralığı olan 100-50 kDa’da görmemiz gerekirken analiz sonucuna göre sadece 5 numaralı 37-50 kDa aralığında bulunan jel bölgesinde tespit edildi. KCNQ1 proteinin 70-75 kDa aralığında bulunması gerekirken daha küçük protein bölgesinde tespit edilmesi KCNQ1 transfeksiyonu yapılmış HEK293FT hücre kaynaklı total proteinin degrade olduğunu göstermektedir. Jel içerisinde yapılan analize ek olarak total protein lizatı da kütle spektrofotometrisinde kontrol olarak analiz edildiğinde KCNQ1 transfeksiyonu yapılmış HEK293FT hücrelerinin KCNQ1 proteinini ürettiği tespit edildi.

6.6 UPK Hücre Kökenli Kardiyomiyositlerin Elektrofizyolojik Karakterizasyonu

6.6.1 UPK Hücre Kökenli Kardiyomiyositlerde Ca^{+2} Görüntüleme

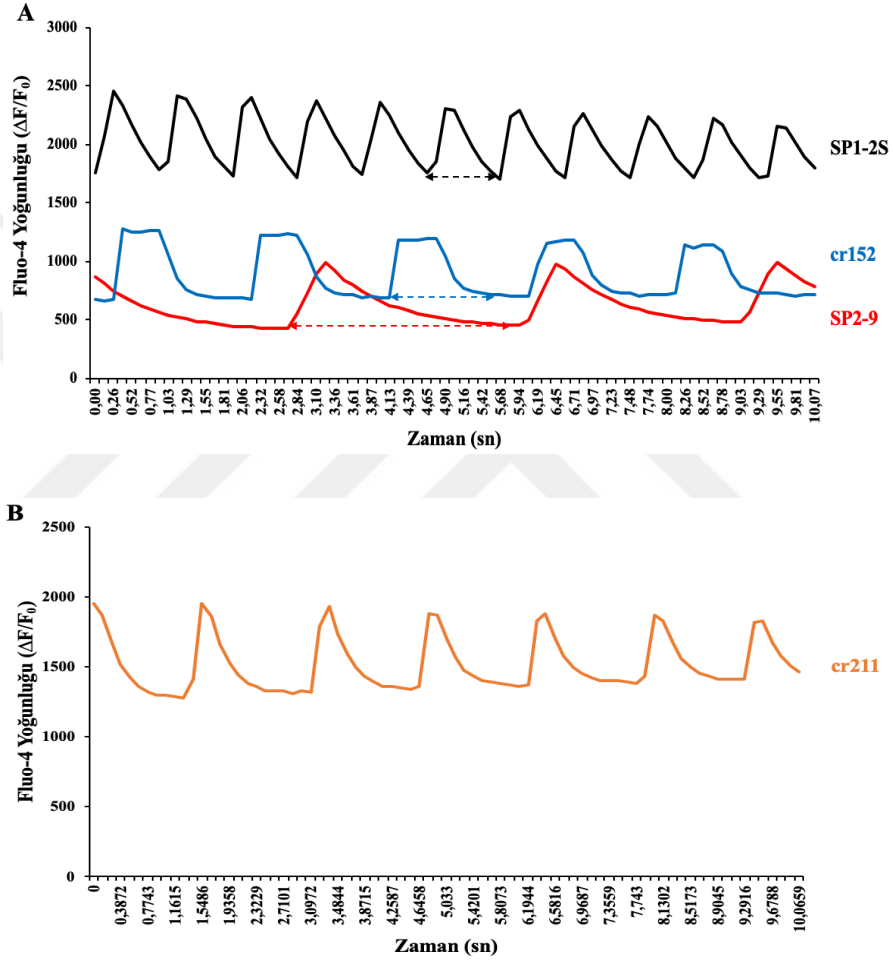
Ca^{+2} iyonunun kas kasılma ve gevşemesi sırasında salınımı incelenerek UPK hücre kökenli kardiyomiyositlerin karakterizasyonu yapılabilmektedir. Hücre içi Ca^{+2} değişimini tespit edebilmek amacıyla serbest Ca^{+2} 'ya bağlanabilen Fluo-4'u kullanıldı. Ca^{+2} varlığında yeşil floresan ışık yayan Fluo-4 ile yüklü hücreler Spinning konfokal mikroskobu altında gözlemlendi. Şekil 6.6.1.1.A'da temsili olarak gösterilen yeşil floresan işaretli UPK hücre kökenli kardiyomiyositler ImageJ/Fiji programı kullanılarak analiz edildi. Şekil 6.6.1.1.B'de kasılan UPK kök hücre kökenli kardiyomiyositlerin 10 saniyelik zamana bağlı floresan değişimi gösterilmektedir.



Şekil 6.6.1.1. UPK kök hücre kökenli kardiyomiyositlerde Ca^{+2} görüntüleme. (A) Fluo-4 ile işaretlenmiş UPK kök hücre kökenli kardiyomiyositlerin mikroskop altında görüntüsü, (B) cr152 UPK kök hücre kökenli kardiyomiyositlerin 10 saniyelik zamana bağlı floresan değişim grafiği. Ölçek çubuğu: 30 μm .

Sağlıklı SP1-2S, mutant SP2-9 ve CRISPR/Cas9 sistemi ile genetik olarak düzenlenen UPK kök hücre kökenli kardiyomiyositlerde yapılan Fluo-4 analizi sonucunda çizilen 10 saniyelik atım grafiği Şekil 6.6.1.2'de gösterilmiştir. Mutant KCNQ1 genine sahip olan SP2-9 kökenli kardiyomiyositlerin kasılma sıklığının sağlıklı UPK hücre kökenli SP1-2S'e göre seyrek olduğu gözlemlendi. Kasılmanın başlama noktası ile bitiş noktası arasında ok ile gösterilen mesafenin mutant hücrelerde sağlıklı hücrelere göre uzun olduğu tespit edildi. Mutant SP2-9 hücresinde bulunan c.965 C/T değişiminin CRISPR/Cas9 genetik düzenleme ile sağlıklı UPK hücresi

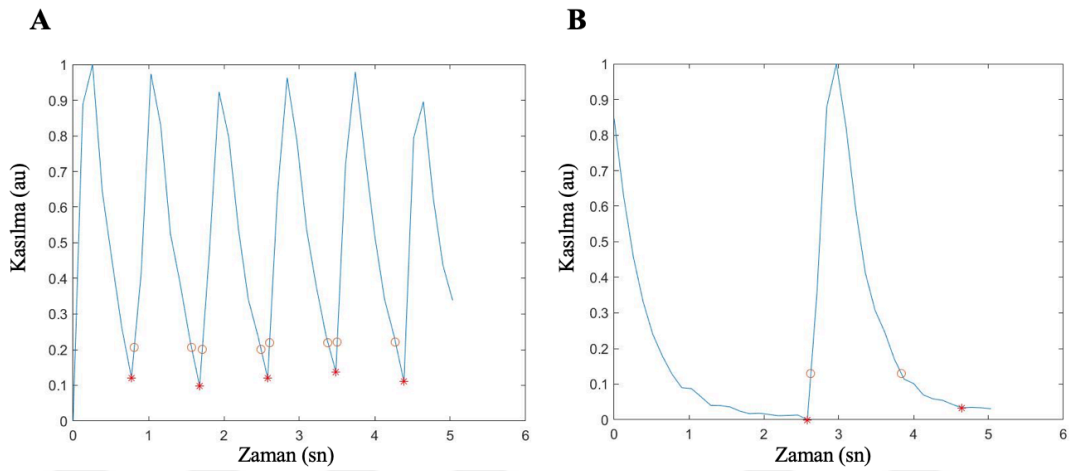
oluşturma strateji izlenirken NHEJ ile düzenlenerek oluşan cr152 UPK kök hücre kökenli kardiyomiyositlerin kasılma sıklığı, sağlıklı UPK hücre kökenli kardiyomiyositlerin kasılma sıklığına yakın olduğu gözlemlendi. Bununla birlikte cr152'ye ait olan kasılma başlama ve bitiş noktası arasında bulunan mesafenin mutant SP2-9 UPK hücre kaynaklı kardiyomiyositlere göre kısa olduğu tespit edildi (Şekil 6.6.1.2-A).



Şekil 6.6.1.2. UPK kök hücre kökenli kardiyomiyositlerin Ca^{+2} bağımlı Fluo-4 yoğunluklarının incelenmesi. (A) SP1-2S, SP2-9 ve cr152 hücrelerinin karşılaştırmalı analizleri, (B) cr211 hüresinin Ca^{+2} analizi.

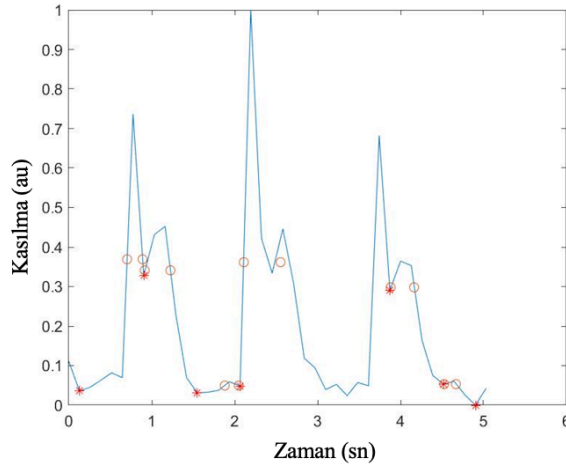
Kardiyomiyositlerin kasılıp gevşeme sırasında sitoplazmaya salınan Ca^{+2} yoğunluğu hücelere özgü atım patternlerini yansıtmaktadır. Sağlıklı SP1-2S, mutant SP2-9, cr211 ve cr152 UPK hücre kökenli kardiyomiyositlerin ortalama floresan değerlerine bağlı Ca^{+2} aktivitesi MATLAB programında yazılan hücrelerimize özgü

kod kullanılarak analiz edildi. Analiz sonucunda her bir hücre için Şekil 6.6.1.3’de örnek olarak gösterilen atım patternleri program tarafından çizildi. Şekil üzerinde “*” ile belirtilen noktalar Ca^{+2} salınımının en düşük olduğu zamanı gösterirken; “o” ile gösterilen noktalar maksimum şiddette Ca^{+2} salınımının %90’lık oranını göstermektedir. Dolayısıyla “o” işaretli noktalar kardiyomiyositlerin depolarizasyon sürelerine işaret etmektedir. Böylece her “o” işaretli bölge arasındaki mesafenin ortalaması alınarak UPK kökenli kardiyomiyositlerin QT aralıkları belirlenmek istenmiştir.



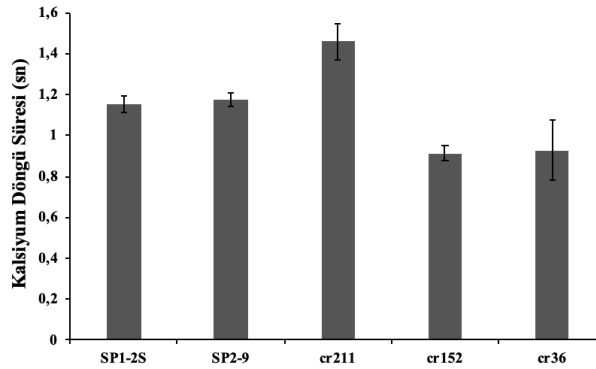
Şekil 6.6.1.3. MATLAB programı tarafından çizilen kardiyomiyositlerin kasılma grafiği. (A) SP1-2S (B) SP2-9 UPK hücre kökenli kardiyomiyositler. (au:arbitrary unit)

CRISPR/Cas9 genetik düzenlemesi sonucunda NHEJ ile 1 bp’lik delesyon meydana gelerek oluşan cr152 UPK hücre kökenli kardiyomiyositlerin Ca^{+2} kasılma analizlerinde Şekil 6.6.1.4’te görüldüğü şekilde tek bir keskin tepe yerine iki tepe gözlemlendi. Tespit edilen farklı fenotipteki kasılmaların yaklaşık ~%70-80 aralığındaki hücrelerin şekilde temsili olarak gösterilen grafik ile benzer olduğu tespit edildi. cr152’de bulunan erken durdurucu kodon oluşturan 1 bp’lik delesyonun hücrelerde depolarizasyonun tamamlanamadan yeni bir aksiyon potansiyelinin oluştuğunu düşündürdü.



Şekil 6.6.1.4. cr152 UPK hücre kökenli kardiyomiyositlerde gözlemlenen farklı fenotipteki kasılma grafiği. (au:arbitrary unit)

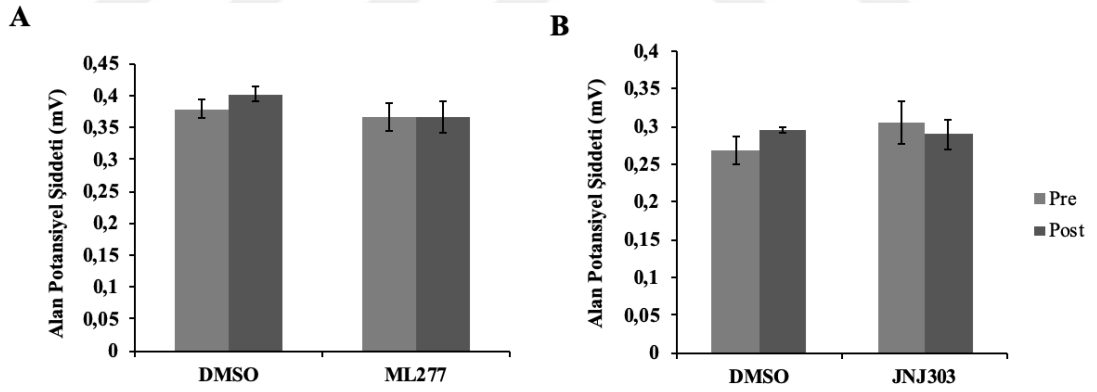
Ca^{+2} bağımlı floresan değişiminin işaret ettiği tüm QT aralıklarının her bir UPK hücre kökenli kardiyomiyosit hücresi için ortalaması alındıktan sonra Şekil 6.6.1.4'te bulunan grafik çizilmiştir. UPK kök hücre kökenli kardiyomiyositlerin analizi yapılırken dakikada 12-36 aralığında atım sayısına sahip olan kardiyomiyositler birbirleriyle karşılaştırılmıştır. UQT sendromu tip 1 hastalık kökenli SP2-9 UPK hücre kökenli kardiyomiyositlerin QT aralığı sağlıklı olan SP1-2S kardiyomiyositlerine göre uzun olduğu klinikle benzer şekilde gözlenmiştir. CRISPR/Cas9 sistemi ile SP2-9 UPK hücresinde bulunan mutasyonun genetik olarak düzeltilmesi sırasında elde edilen cr211 hücrelerinin ortalama QT aralıkları SP2-9 mutant hücre kökenli kardiyomiyositlere göre uzamış olduğu tespit edilmiştir. Sağlıklı SP1-2S kardiyomiyositleri ile NHEJ sonucunda sekans bilgilerinde 1 bp ve 15 bp delesyon bulunduran cr152 ve cr36 kardiyomiyositleri karşılaştırıldıklarında QT aralıklarının sağlıklı hücre kökenli kardiyomiyositlere oranla kısaldığı belirlendi (Şekil 6.6.1.5).



Şekil 6.6.1.5. UPK hücre kökenli kardiyomiyositlerin karşılaştırılmalı Ca^{+2} analizi.

6.6.2 Beta Blokör ve İlaç Denemeleri

UPK hücre kökenli kardiyomiyositlerin alan potansiyellerinin ve kasılma sıklıklarının ölçülebildiği xCelligence RTCA Cardio ECR cihazı için özel olarak tasarlanmış içerisinde altın elektrotlar bulunan ticari petrilere ekildiler. Atım gözlemlendikten sonra kültürlerde çeşitli ilaç denemeleri yapıldı. Yapılan tüm ilaç denemelerinde kontrol olarak ilaçların çözüm taşıyıcısı %1 DMSO kullanıldı. Bu yüzden uygulanan ilaçlar analiz edilirken DMSO'nun etkisinin görülmesinin tamamlandığı 30. dakikadan sonraki veriler kullanıldı. *KCNQ1* proteini ile allosterik ilişkili olan 300 nM ML277 molekülü ile IK_s 'yi bloklayarak aksiyon potansiyeli süresini uzatan 300 nM JNJ303 molekülleri sağlıklı SP1-2S UPK hücre kökenli kardiyomiyositlerinde incelendi. ML277 molekülünün aksiyon potansiyelini kısaltması beklenirken, yaptığımız deneylerde uygulama öncesi ve sonrasında bir fark görülmedi (Şekil 6.6.2.1.A). JNJ303 molekülü uygulandığı zaman aksiyon potansiyelinin ilaç deneme öncesine göre kısaltıldığı Şekil 6.6.2.1.B'de görüldü.

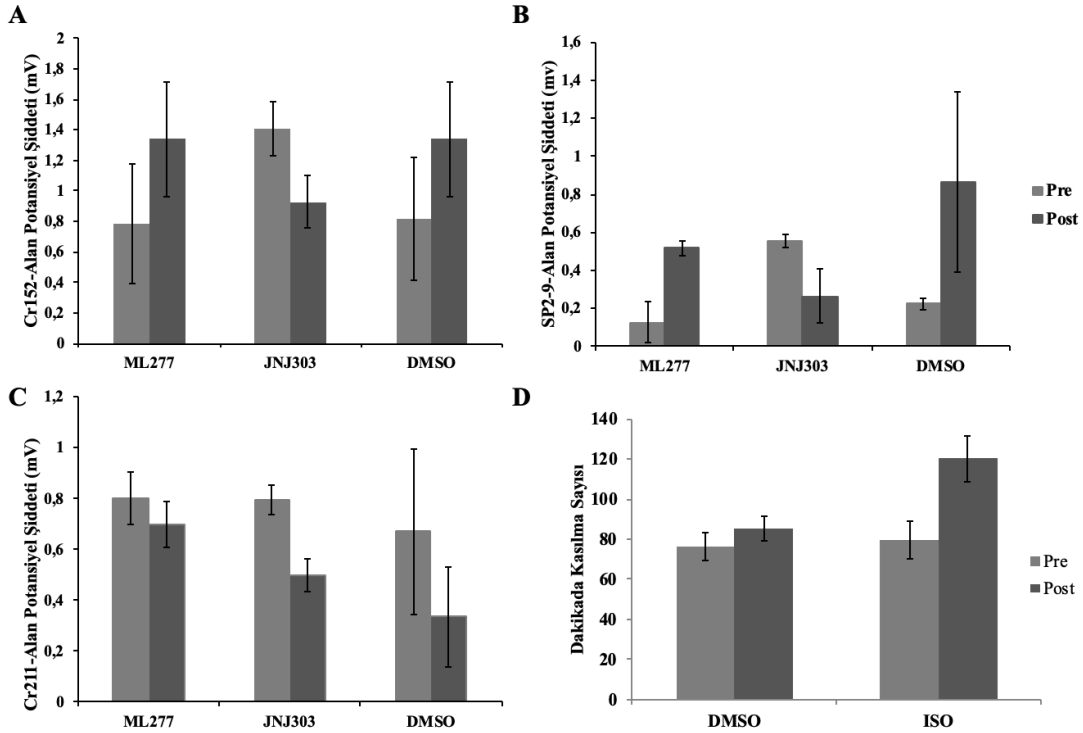


Şekil 6.6.2.1. Sağlıklı SP1-2S kardiyomiyositlerinde ilaç denemeleri. (A) 300 nM ML277, (B) 300 nM JNJ303. Pre: İlaç uygulama öncesi. Post: İlaç uygulama sonrası.

300 nM ML277 ilaç molekülü cr211, cr152 ve SP2-9 UPK hücre kökenli kardiyomiyositlerde uygulandı. cr152 ve SP2-9 UPK hücre kökenli kardiyomiyositlerde ML277 uygulaması sonrasında aksiyon potansiyel süresinin uzadığı gözlemlendi (Şekil 6.6.2.2.A-B). cr211 kökenli kardiyomiyositlerde ML277 uygulaması ile aksiyon potansiyel süresinin düştüğü gözlemlendi (Şekil 6.6.2.2.C). Üç farklı hücrede de yapılan analizlerde DMSO'nun da aynı zamanda aksiyon potansiyel

süresini ML277 ile doğru oranda arttırdığı ya da azalttığı görüldü. Dolayısıyla ML277'nin bu deney kapsamındaki sonuçlarında DMSO'nun etkisi olduğu tespit edildi.

300 nM JNJ303 ilaç molekülü cr211, cr152 ve SP2-9 UPK hücre kökenli kardiyomiyositlerde uygulandı. cr152 ve SP2-9 UPK hücre kökenli kardiyomiyositlerde JNJ303 uygulaması sonrasında aksiyon potansiyel süresinin kısaldığı gözlemlendi (Şekil 6.6.2.2.A-B). cr211 kökenli UPK hücrelerinde aksiyon potansiyel süresinin uzamasına sebep olmuştur (Şekil 6.6.2.2.C). Cr152, cr211 ve SP2-9 UPK hücrelerinde yapılan tüm ilaç denemelerinde istatistiksel anlamlılık bulunmamaktadır. 300 nM ML277 ve JNJ303 molekülleri literatüre göre en uygun doz olmasına rağmen tez çalışma kapsamında kullanılan UPK kökenli kardiyomiyositler için uygun olmayabilir. Bunun için ilerleyen çalışmalarda ilaç deneyleri tekrarlanacaktır ve uygun doz denemeleri yapılacaktır.



Şekil 6.6.2.2. İlaç aday moleküllerinin uygulanması. 300 nM ML277 ve 300 nM JNJ303 moleküllerinin (A) cr152, (B) SP2-9, (C) cr211 UPK kökenli kardiyomiyositlerde uygulamaları. (D) cr211 kardiyomiyositinde 100 nM Isoproterenol uygulaması

β -adrenerjik antagonisti olan isoproterenol 100 nM olacak şekilde DMSO içerisinde hazırlandıktan sonra cr211 hücrelerine uygulandı. İlaç öncesi ve sonrasında kaydedilen videolar MUSCLEMOTION uygulaması ile analiz edildikten sonra Şekil 6.6.2.2.D'de görüldüğü gibi hücrelerin atım hızlarını arttırmıştır. Böylece CRISPR ile genetik olarak düzenlenmiş UPK kökenli kardiyomiyositlerde NHEJ sonucunda oluşan delesyonların β -adrenerjik reseptörlerin uyarılmasını etkilemediği görülmüştür.



7 TARTIŞMA ve SONUÇ

Kalp hastalıkları ülkemizde ve dünya genelinde ölüme sonuçlanan hastalıkların başında gelmektedir. Kalp ritminin düzensizleşmesi ve anormal kalp atışı sonucunda oluşan kalıtsal aritmiler. Kardiyak iyon kanallarında meydana gelen mutasyonlar sonucunda iyon geçişlerinde bozukluklar sonucu görülür. Kardiyak aritmi hastalıklarından biri olan UQT sendromu, EKG grafiğinde QT aralığının uzaması olarak tanımlanmaktadır. Klinikte, UQT sendromunun 17 farklı alt tipi bulunmaktadır. Toplumda görülme sıklığı 1:2000 olan UQT sendromu, yılda yaklaşık dünyada 3000-4000 ani ölüme sebebiyet vermektedir (10, 11). Ritim bozukluğuna bağlı fibrilasyon, ani kalp durması, senkop ve sara benzeri nöbetler UQT sendromu hastalık belirtilerindedir. Hastalığın tedavisi için genellikle kalp ritmini düzenleyici etkisi olan beta blokörler ya da cerrahi olarak kardiyak defibrillatör veya aritmojenik bölge ablasyonu yapılmaktadır (11).

Somatik hücrelerden yeniden programla sonucunda oluşturulan kişiye özgü UPK hücrelerinden elde edilen kardiyomiyositler ile *in vitro* koşullarda UQT sendromu dahil birçok hastalık modelleri yapılabilmektedir (79, 80). Bu sayede sağlıklı veya kalıtsal olarak hastalık genotipi taşıyan bireylerden elde edilen UPK hücrelerinden köken alan kardiyomiyositlerin, bireylerin klinikte gösterdikleri fenotipe özgü moleküler, fizyolojik ve elektrofizyolojik benzerlik göstermesi *in vitro* modellerin geliştirilmesine olanak sağlamıştır (69, 70).

Laboratuvarımızda UQT sendromu tip 1 hastalığına neden olan *KCNQ1* geninde bulunan heterojen c.965 C/T mutasyonu, CRISPR/Cas9 sistemi ile hedeflenerek laboratuvarımızda ilk kez 213S192 numaralı TÜBİTAK projesi kapsamında düzeltildi. Paralel olarak sağlıklı bireylerde c.965 C/T mutasyonu CRISPR/Cas9 ile oluşturularak sadece *KCNQ1* geninde mutasyona sahip izogenik hatlar elde edildi. Genetik düzenleme sırasında değişim olan DNA zincirlerinde aminoasit sekansını değiştirmeyecek şekilde KpnI restriksiyon enzim kesim bölgesi eklenerek hücrelerin moleküler olarak belirlenmesi ve seleksiyonu amaçlandı. CRISPR/Cas9 sistemi ile genetik düzenleme sırasında DNA zincirlerinde meydana gelen çift zincir kırıkları tamir edilirken kullanılan HDR sonucunda genetik olarak düzenlenen DNA zincirlerinde herhangi bir değişiklik oluşmazken, NHEJ sonucunda

farklı sayıda insersiyon ve delesyonların oluşabilmektedir (44). Literatürle benzer şekilde *KCNQ1* geninde bulunan c.965 C/T mutasyonu CRISPR/Cas9 düzenlemesi sonucunda HDR sistemi ile genetik değişikliğin olduğu hücreler dışında NHEJ ile düzenlenen hücreler de gözlemlendi. Bu tez çalışması kapsamında CRISPR/Cas9 genetik düzenlemesi sonucunda NHEJ ile meydana gelen UPK hücrelerinde oluşan mutasyonların UPK hücre kökenli kardiyomiyositlerin genotip ve fenotipleri morfolojik, fizyolojik ve elektrofizyolojik karakterleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

CRISPR ile genetik düzenleme sırasında Cas9 enzimi ile çift zincir kırığı oluşturulan DNA zincirleri tamir olurken NHEJ sistemini seçtiklerinde kalıp bir DNA zinciri kullanmazlar (38). NHEJ yöntemi ile genetik olarak düzenlenmiş UPK hücrelerinin DNA sekans bilgileri SnapGene Viewer ve CodonCode Aligner gibi programlar kullanılarak incelenmiştir. NHEJ sonrasında birleşen DNA zincirlerinde meydana gelen heterozigot değişiklikler, programların “A, T, G, S” nükleotitleri yerine “M, R, S, K” gibi geçerliliği olmayan ifadeler koymasına neden olmuştur. Bu nedenle UPK hücrelerinde oluşan insersiyon ve delesyonlar, allellerin birbirlerinden ayrıştırılarak çözümlenmesi amacıyla hızlı ve etkili klonlama yöntemlerinden biri olan TA klonlama ve ardından Sanger sekanslama yapıldı. TA klonlama sonucunda cr211 kolonisinde 2 bp, cr152 kolonisinde 1 bp ve cr36 kolonisinde 15 bp ile sekans bilgileri heterozigot ayrıştırılabilir.

Literatür çalışmalarında UPK hücrelerinin EKH gibi sınırsız bölünebildikleri, 3 germ yaprağı hücrelerine dönüşebildikleri ve pluripotent hücre belirteç genlerini ürettikleri tespit edilmiştir (21). Tez kapsamında, insan somatik hücrelerinden elde edilen UPK hücrelerinin ve CRISPR/Cas9 ile genetik olarak düzenlen UPK hücrelerinin pluripotent özelliklerinin karakterizasyonu yapılmıştır. Yapılan immunositokimyasal boyamalar sonucunda UPK hücrelerinin EKH'lere özgü olan Tra1-60 ve Tra1-81 membran proteinleri ile Oct4 ve Sox2 gibi nükleer proteinleri ürettikleri görüldü. İmmunositokimyasal boyamalara ek olarak *SOX2*, *OCT4* ve *NANOG* genleri için yapılan qRT-PZR çalışmalarında UPK hücrelerinin köken aldıkları somatik hücrelere göre istatistiksel anlamlı yüksek seviyede olarak EKH genlerini ifade ettikleri belirlendi. UPK hücrelerinin 3 germ yaprağına dönüşebilme

potansiyelleri *AFP* (endodermal), *PAX6* (mezodermal) ve *MSX1* (ektodermal) gen ekspresyon çalışmaları ile gösterildi. Yapılan qRT-PZR çalışmasına göre UPK hücrelerinin istatistiksel olarak 3 germ yaprağına ait genleri ifade etmesi gelişimsel potansiyelini doğrulamaktadır.

UPK hücre kökenli kardiyomyositler kullanılarak birçok kalıtsal aktarılan kardiyak hastalıklar modellenabilmektedir (30-36). Elde edilen sağlıklı ve c.965 C/T mutasyonunu taşıyan UPK hücreleri ile CRISPR/Cas9 sistemi ile genetik düzenleme sonucunda mutasyonların olduğu UPK hücreleri *in vitro* kardiyomyositlere farklılaştırıldılar. Lian ve arkadaşlarının (2) kullandıkları kardiyak farklılaşma metodunu UPK hücrelerimize göre yeniden düzenlenmesine rağmen aynı hücrenin farklı pasajlarında kardiyak farklılaşmanın verimli gerçekleşmediği UPK hücrelerinin kardiyomyosit dışında farklı hücrelere farklılaştıkları tespit edildi. Kardiyak farklılaşmanın verimini arttırmak amacıyla kullanılan küçük moleküllerin konsantrasyonları ve/veya uygulama günlerinin değiştirilmesine rağmen kardiyak farklılaşmada yaşanan tutarsızlık sonucunda ticari olarak satılan kardiyak farklılaştırma kiti kullanıldı. Kit kullanımı sonucunda UPK kökenli kardiyomyosit farklılaşmasının yüzdesel olarak arttığı gözlemlendi.

UPK hücre kökenli kardiyomyositlerden farklılaşmanın 60-80 gün aralığında erişkin fizyolojisini daha iyi yansıtan kültürde gen ifade analizleri yapıldı. Sağlıklı SP1-2S, mutant SP2-9 ve CRISPR/Cas9 sonucunda NHEJ ile genetik olarak düzenlenen UPK hücre kökenli kardiyomyositler karşılaştırıldığında, *CTNT* gen ekspresyon seviyesinin sağlıklı kardiyomyositlerde yüksek olduğu görüldü. UPK hücre kökenli kardiyomyositlerin kardiyak gen ekspresyon seviyelerine karşılaştırmalı olarak bakıldığında *MYH7* gen ekspresyonunun *MYH6* gen ekspresyonuna göre yüksek olduğu tespit edildi. *MYH7* geni insan kökenli yetişkin kardiyomyositlerde *MYH6*'ya göre baskın olarak ifade edilmektedir (81). Literatüre göre D60-80 gün aralığında bulunan UPK hücre kökenli kardiyomyositler olgunlaşmışlar. *KCNQ1* geninde c.965 C/T mutasyona sahip olan SP2-9 UPK hücre kökenli kardiyomyositlerin *MYH6* ve *MYH7* kardiyak genlerini sağlıklı SP1-2S UPK hücre kökenli kardiyomyositlere göre düşük ifade ettiği tespit edildi. cr152 ve cr211 UPK hücre kökenli kardiyomyositlerin olgun kardiyomyosit belirteci olan *MYH7*

genini *MYH6*'ya göre yüksek ifade ettiği gözlemlendi. Atrial kökenli kardiyomyositlerde *MYH6* geni baskın olarak ifade edilmektedir (81). Yapılan qRT-PZR çalışmalarında sağlıklı UPK hücre olan SP1-2S kökenli kardiyomyositlerde *MYH6* gen ekspresyonunu mutant UPK hücre olan SP2-9 ve CRISPR/Cas9 ile genetik olarak düzenlenen UPK hücre kökenli kardiyomyositlere göre yüksek olduğu tespit edildi. Böylece SP1-2S UPK hücre kökenli kardiyomyosit kültürlerinde atrial kaynaklı kardiyomyositlerin diğer UPK hücre kökenli kardiyomyosit kültürlerine göre yüksek olduğu tespit edildi. Tez çalışması kapsamında kullanılan protokoller UPK hücrelerini ventriküler, atrial ya da nodal olarak spesifik kardiyomyositlere farklılaştırma özelliğine sahip olmadığından kardiyak kültürlerimiz tüm kardiyomyosit alt tiplerini bulundurmaktadır. Bu sebeple bir kültürde atrial kardiyomyositler daha yoğun iken bir başka kültürde ventriküler kardiyomyositler yoğun olarak bulunabilmektedir.

UPK hücrelerinden farklılaştırılarak elde edilen kardiyomyosit kültürlerimizde bölgesel kasılan kardiyomyositlerin yanında tanımlanamayan ve kardiyomyosit morfolojisi göstermeyen hücrelerde bulunmaktadır. Bu sebeple kardiyak kültürlerimiz heterojen bir kimliğe sahiptir. Kardiyak kültürlerden elde edilen total RNA'da yapılan qRT-PZR çalışmasında kardiyak özgü *KCNQ1* ekspresyon seviyesini belirleyebilmek amacıyla *KCNQ1* gen ekspresyonu *CTNT* ekspresyon seviyesine göre normalize edilmiştir. Böylece sadece UPK hücre kökenli kardiyomyositlerden elde edilen *KCNQ1* ekspresyon seviyesi karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. SP2-9 ve HDR ile düzenlenerek mutant karakter kazandırılmış cr43 kardiyomyosit kültürlerinin *CTNT* ekspresyon seviyeleri benzer olarak gözlemlenmişken, cr43 kardiyomyosit kültürlerinin SP2-9 kardiyomyosit kültürlerine göre yüksek *KCNQ1* geni sentezlediği tespit edildi. CRISPR/Cas9 sistemi sonucunda NHEJ ile düzenlenen UPK hücre kökenli cr36, cr152 ve cr211 kültürlerinde *CTNT* gen ekspresyon seviyesi benzer gözlemlenirken, cr211'in cr36 ve cr152'ye oranla daha yüksek *KCNQ1* sentezlediği tespit edildi. cr152'de bulunan erken durdurucu kodon *KCNQ1* geninin ifade seviyesinin düşük olmasına ya da cDNA sentezinde sadece sağlıklı allelin çoğaltılmasına sebep olmuş olabilir. Cr36'da NHEJ sonucunda 15 bp'lik delesyon olması sekansta çerçeve kayması mutasyonuna sebep olduğundan qRT-PZR çalışmasında kullanılan *KCNQ1* primerlerinin bağlanmasına engel olmuş olabilir. Bundan dolayı *KCNQ1* gen ekspresyonu düşük gözlenmiş

olabilir. İlerleyen çalışmalarda delesyonlar bulunan cr152, cr211 ve cr36 kolonilerinin ön görülen DNA sekans bilgilerine göre spesifik *KCNQ1* primerleri tasarlanacaktır. Böylece mutasyonlar sonucunda elde edilen ürünler karşılaştırmalı olarak incelenecektir.

KCNQ1 proteininde tespit edilen delesyonların protein seviyesindeki etkisini gözlemleyebilmek amacıyla Western Blot analizleri yapıldı. Gerçekleştirilen gen ekspresyon çalışmalarında insan kaynaklı UPK hücrelerinin *KCNQ1* genini ifade etmesinden dolayı ikinci bir negatif kontrol seçildi. Yapılan literatür araştırmaları sonucunda insan kaynaklı fibroblast hücrelerinde *KCNQ1* gen ekspresyonu olduğu fakat kardiyomiyositlere oranla çok düşük miktarda protein sentezlendiği görüldü (71). Bu nedenle Western Blot analizlerinde insan kaynaklı fibroblast hücrelerinden elde edilen proteinler kullanılmaya başlandı.

Üç farklı firmadan temin edilmiş *KCNQ1* proteini tanıyan birincil antikorları Western Blot deneylerinde karşılaştırmalı olarak incelendi. UPK hücre kaynaklı kardiyomiyositlerde yapılacak olan çalışmalardan önce antikor spesifikliğinin belirlenebilmesi amacıyla *KCNQ1* transfeksiyonu yapılmış HEK hücreler lizatları kullanıldı. Alomone ve Santa Cruz markalı *KCNQ1* antikorları proteine karboksil ucundan bağlandıkları için proteinin uç bölgesinde meydana gelmiş olabilecek proteolitik işlemlerden dolayı antikorların bağlandığı epitop bölgesi hasar görmüş olabileceğinden proteinler tanınmamış olabilir. Bununla birlikte kullanılan total protein donup çözme kaynaklı sıcaklık farkından etkilenerek *KCNQ1* proteini degrades olmuş olabilir. Aynı zamanda Santa Cruz ile analiz edilen Western Blot çalışmasında 150 üzerinde yoğun bir bant görülmektedir. Proteinlerin glikozillenme gibi post-translasyonel modifikasyonlar geçirmesi ya da HEK293T hücrelerine yüksek seviyede protein üretmesinin teşvik edilmesi oligomerleşmiş protein yapılarına sebep olabilir. Dolayısıyla antikorlar protein içerisinde bulunan spesifik epitoplara açık olmadığından tanıyamamış olabilirler. Abcam marka *KCNQ1* antikoru proteine amino ucundan bağlanmaktadır. İnsan kaynaklı fibroblast ve HEK293FT hücrelerinde *KCNQ1* protein ekspresyonunun gözlenmemesi *KCNQ1* transfeksiyonu yapılan HEK293T hücrelerinde 75 kDa'da görülen yoğun protein bantlarının spesifik olduğunu gösterdi. *KCNQ1* protein üretimi yapmayan insan kaynaklı fibroblast ve transfeksiyon yapılmamış

HEK293FT hücreleri dahil tüm örneklerde 20-37 kDa arasında protein bantlarının bulunması bu bantların antikör kaynaklı spesifik olmayan bantların olduğu belirlendi. Abcam marka *KCNQ1* antikoru ile fare embriyonik kalbinden elde edilen proteinler incelendiğinde literatürle benzer olarak 3 farklı bant gözlemlendi. Böylece Abcam marka *KCNQ1* antikörünün Alomone ve Santa Cruz marka *KCNQ1* antikörlerine göre spesifik proteine daha iyi reaktivite gösterdiği tespit edildi. UPK hücre kökenli kardiyomyositlerden elde edilen total proteinlerde *KCNQ1* protein analizleri Abcam marka *KCNQ1* antikoru kullanılarak gerçekleştirildi. NHEJ ile düzenlenen cr152 genine ait sekanstaki 1 bp'lik bir delesyon proteinin karboksil ucunda erken durdurucu kodon oluşturmaktadır. Dolayısıyla *KCNQ1* proteinini karboksil ucundan tanıyan antikörler mutasyona uğramış proteini tanıyamayacaklardır. Yapılan antikör karşılaştırmalı Western Blot çalışmalarında proteini amino ucundan tanıyan Abcam antikoru kullanıldığında cr152 UPK hücre kökenli kardiyomyositlerden elde edilen *KCNQ1* protein bantları net bir şekilde görülmektedir.

EKH, sağlıklı UPK hücre, mutant SP2-9 ve CRISPR/Cas9 genetik düzenlemesi sonucunda NHEJ ile oluşan UPK hücre kökenli kardiyomyositlerde *KCNQ1* protein konsantrasyon seviyeleri Abcam marka antikör kullanılarak karşılaştırmalı olarak incelendi. EKH kökenli, sağlıklı UPK hücre kökenli AKY ve cr211 kardiyomyositlerinde ~75 kDa'da *KCNQ1* proteini gözlemlendi. Literatürde embriyonik fare kalbinde 3 farklı izoformda *KCNQ1* proteini bulunurken jel sonucunda ~75 kDa'da tek bir bant tespit edildi. Kullanılan embriyonik fare kalbinin degrade olabileceğinden 75kDa altında kalan diğer 2 izoform bantlar membran üstünde gözlemlenmediği ön görüldü. Her hücrede eşit oranda sentezlenen α -Tubulin proteininin farklı konsantrasyonlarda olması proteinlerin jelle yüklenirken eşit olmadıklarını gösterdi. Bundan dolayı UPK kök hücre kökenli kardiyomyositlerin *KCNQ1* protein ekspresyon seviyesi her örneğe ait olan α -Tubulin protein ekspresyonuna oranlanarak kantitatif protein ekspresyon analiz edildi. Delesyon bulunduran cr211 UPK hücre kökenli kardiyomyositin *KCNQ1* protein ekspresyonunun diğer hücrelere oranla yüksek olduğu tespit edildi. Bunun sebebi total proteinin izole edildiği kültürdeki hücre miktarının diğer kültürlerden fazla olduğunu düşündürdü. Mutant allelinde erken durdurucu kodon olduğu ön görülen cr152 UPK hücre kökenli kardiyomyositin sağlıklı allel tarafından sentezlenen *KCNQ1* protein ekspresyonunun membranda

gözlendi. Bu yüzden Western Blot çalışmalarında cr152’de kesik *KCNQ1* protein tespiti yapılamadı.

Western Blot çalışmaları için temin edilen 3 farklı *KCNQ1* antikorda bulunan tutarsızlıklar, antikorların literatürdeki bilgilerle uyuşmaması ve UPK hücre kökenli kardiyomyositlerden elde edilen proteinlerin konsantrasyonlarının düşük olması sebebiyle ileri protein analizine ihtiyaç duyuldu. Yapılan optimizasyon çalışmalarında kullanılan *KCNQ1* transfeksiyonu yapılmış HEK293T hücrelerinden elde edilen protein örneği jelde yürütüldükten sonra protein ağırlıklarına göre jeller küçük parçalara bölünerek In-Gel digestion kütle spektrofotometri analizleri yapıldı. Protein örnekleri kütle spektrofotometrisi kullanılarak analiz edildiğinde literatürde 75 kDa civarında tespit edilen *KCNQ1* proteinlerinin 50-37 kDa aralığında olduğu saptanmıştır. Örneklerin degradasyona uğradığı düşünüldü. Jel içerisinde yapılan kütle spektrofotometrisine kontrol olarak tüm lizat örneği LS/MS’de analiz edilmiştir. Analiz sonucunda dışarıdan *KCNQ1* transfeksiyonu yapılan HEK293T hücrelerinde *KCNQ1* proteinin sentezlendiği tespit edilmiştir.

UQT sendromu tip 1 hastalarına özel geliştirdiğimiz UPK hücre kökenli kardiyomyosit kültürlerinin elektrofizyolojik analizlerini çoklu elektrot dizileri ve Ca^{+2} değişim analizleri ile gerçekleştirildi. Kalsiyuma bağlanarak ışıma verebilen bir boya olan Fluo-4 kullanılarak spontan kasılan kardiyomyositlerde 10 saniyelik kasılma grafikleri çizildi. *KCNQ1* geninde nokta mutasyonu taşıyan SP2-9 kökenli kardiyomyositlerin kasılma sıklığının, sağlıklı UPK hücre kökenli SP1-2S’e göre seyrek olduğu kültürlerde gözlendi. Hücre içine Ca^{+2} girişi ile başlayan kasılmanın noktası ile bitiş noktası arasında bulunan mesafenin mutant hücrelerde sağlıklı hücrelere göre uzun olduğu tespit edildi. Mutant SP2-9 hücrelerinde bulunan c.965 C/T değişiminin CRISPR/Cas9 genetik düzenleme ile sağlıklı UPK hücresi oluşturma strateji izlenirken NHEJ ile düzenlenerek oluşan cr152 UPK kök hücre kökenli kardiyomyositlerin kasılma sıklığı, sağlıklı UPK hücre kökenli kardiyomyositlerin kasılma sıklığına yakın olduğu tespit edildi. Bununla birlikte cr152’ye ait olan kardiyomyosit kasılma başlama ve bitiş noktası arasında bulunan mesafenin mutant SP2-9 UPK hücre kaynaklı kardiyomyositlere göre kısa olduğu gözlendi. Yapılan tüm Ca^{+2} analizlerinin *KCNQ1* mutasyonu taşıyan UPK hücre kökenli kardiyomyositlerin

kasılma döngüleri arasında bulunan mesafenin sağlıklı UPK hücre kökenli kardiyomiyositlerden elde edilen kasılma mesafesinden uzun olduğu belirlendi. Mutasyon taşıyan UPK hücre kökenli kardiyomiyositlerden elde edilen sonuç köken aldığı hastanın klinikteki EKG fenotipinde uzun QT aralığını işaret etti. Yapılan analizlerde dakikada kasılma sayısı benzer olan hücreler kullanıldığından sayıca az ve elenmiş bir popülasyon incelenebildi. İstatistik anlamlılık analizleri için Ca^{+2} görüntüleme deneylerin artırılması gerekmektedir.

CRISPR/Cas9 genetik düzenlemesi sonucunda NHEJ ile oluşan cr152 UPK hücresinde erken durdurucu kodon olduğu ön görülmektedir. cr152 UPK hücre kökenli kardiyomiyositlerde yapılan Ca^{+2} analizleri sonucunda hücreler tam repolarize olmadan yeni bir depolarizasyonun başlaması ile ritim bozukluğuna işaret eden EAD'ler alınan verilerin %70-80 gibi yüksek bir oranında gözlemlendi. *KCNQ1* proteinin kesik oluşmasından dolayı kanal protein kompleksi tamamen etkin hale geçemediğinden kardiyomiyositler repolarizasyonu tamamlayamadan yeni bir sinyal ile tekrar aksiyon potansiyelin yükselmesi ile abnormal depolarizasyon gerçekleşmiş olabilir.

Literatürde kısıtlı bilgi bulunan ML277 ve JNJ303 ilaç aday moleküllerinin farklı *KCNQ1* varyant genleri üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla kullanıldılar. UPK hücre kökenli kardiyomiyositlerin eldesinin güç olması ve elektrofizyolojik analizlerde kullanılacak olan multielektrot dizi analizi cihazında gerçekleşen teknik problemlerden dolayı iki ilaç molekülü için literatürde etki görülen en yaygın doz olan 300nM her iki ilaç için de denendi. Çalışma kapsamında ilaçlar DMSO içerisinde çözüldüğünden DMSO'nun kardiyomiyositlerin bazı kültürlerinde QT değişimi yaptığı görülmüştür.

Tez kapsamında çalışılan UQT sendromu tip 1 hastalığında direkt olarak rol alan *KCNQ1* proteinine ML277 küçük molekülü direkt etki gösterebilmektedir. Potasyum kanalının yavaş doğrultucu akımını (I_{Ks}) arttırarak aksiyon potansiyel süresinin kısalmasını ve aritminin düzenlenmesini sağlamaktadır (75). Cr152 ve SP2-9 UPK hücre kökenli kardiyomiyositlerde literatürle ters olarak ML277 uygulaması sonrasında aksiyon potansiyel süresinin uzadığı gözlenmiştir. Cr211 kökenli kardiyomiyositlerde ML277 uygulaması ile aksiyon potansiyel süresi düşmüştür. Üç

farklı hücrede de yapılan analizlerde DMSO'nun da aynı zamanda aksiyon potansiyel süresini ML277 ile doğru oranda arttırdığı ya da azalttığı görülmüştür. Dolayısıyla ML277'nin bu deney kapsamındaki sonuçlarında DMSO'nun etkisi olduğu tespit edildi. JNJ303, IK_s 'i bloklayarak aksiyon potansiyel süresini uzatmaktadır (77). Böylece aksiyon potansiyel süresinin kısalmasında rol oynamaktadır. Cr152 ve SP2-9 UPK hücre kökenli kardiyomyositlerde literatürle benzer olarak JNJ303 uygulaması sonrasında aksiyon potansiyel süresinin kısaltıldığı gözlenmiştir. Literatür ile ters olacak şekilde cr211 kökenli UPK hücrelerinde aksiyon potansiyel süresinin uzamasına sebep olmuştur. Cr152, cr211 ve SP2-9 UPK hücrelerinde yapılan tüm ilaç denemelerinde istatistiksel anlamlı bir fark çıkmamıştır. 300 nM literatüre göre en uygun doz olmasına rağmen tez çalışma kapsamında kullanılan UPK kökenli kardiyomyositler için uygun olmayabilir. Bunun için ilerleyen çalışmalarda ilaç deneyleri tekrarlanacaktır ve uygun doz denemeleri yapılacaktır. CRISPR/Cas9 ile genetik olarak düzenlenen hücreler ve mutant *KCNQ1* genine sahip SP2-9 hücre analizlerine kontrol amaçlı SP1-2S UPK hücre kökenli kardiyomyositlerde de ilaç uygulamaları yapıldı. Literatüre göre ML277 molekülünün aksiyon potansiyelini kısaltması beklenirken, yaptığımız deneylerde uygulama öncesi ve sonrasında bir fark görülmedi. JNJ303 molekülü aksiyon potansiyelini kısalttığı görülmesine rağmen sonuçlar istatistiksel olarak anlamlığın tespiti için örnek sayısı gelecek çalışmalarda arttırılabilir.

NHEJ sonrasında oluşan mutasyonların etkisinin farklı reseptörlerde bir yan etkisinin olup olmadığını araştırmak amacıyla 2 bp'lik delesyon bulunduran cr211 kökenli kardiyomyositlerde β -adrenerjik antogonisti olan 100 nM isoproterenol uygulandı. İlaç uygulaması sonrasında hücrelerin atım hızlarını arttırdığı belirlendi. Böylece CRISPR ile genetik olarak düzenlenmiş UPK kökenli kardiyomyositlerde NHEJ sonucunda oluşan delesyonların β -adrenerjik reseptörlerin uyarılmasını etkilemediği tespit edildi.

Tez çalışması kapsamında çeşitli *KCNQ1* gen varyantlarına sahip olan UPK hücre kökenli kardiyomyositlerde farklı mutasyonların potasyum kanalı üzerindeki etkileri incelendi. CRISPR/Cas9 sonrasında oluşan heterozigot DNA dizileri ayrıştırılan UPK hücre kökenli kardiyomyositlerde ve atasal hücreleri olan sağlıklı SP1-2S ile mutant SP2-9 kardiyomyositlerinde yapılan analizler karşılaştırmalı olarak

incelendi. Yapılan Ca^{+2} analizlerinde klinikle benzer olarak mutant hücrelerde QT aralıklarının sağlıklı hücrelere göre uzadığı gözlemlendi. Yapılan ilaç çalışmalarında ML277 ile elde edilen veriler literatürden farklı olarak aksiyon potansiyel süresini uzatırken; JNJ303 literatürle benzer olarak aksiyon potansiyel süresini kısaltmaktadır. Yapılan ilaç denemelerinin istatistiksel olarak anlamlılığını incelemek için tekrarlanmaları gerekmektedir. Cr152 UPK hücresinde ön görülen erken durdurucu kodonun mutant allelden kesik protein üretimine sebep olduğu düşünülmektedir. Ancak yapılan Western Blot çalışmalarında sağlıklı allelden üretilen proteinler görüldüğünden ileri teknikler olan proteomiks ve/veya kütle spektrofotometri analizleri yapılması planlanmıştır.

Sonuç olarak, CRISPR/Cas9 sistemi ile NHEJ tamir mekanizmasını sonucunda *KCNQ1* genlerinde meydana gelen tanımlanmamış mutasyonlar alt klonlama ile ayrıştırılarak incelenmiştir. Yeni gelişen mutasyonların UPK hücre kökenli kardiyomiyositlerdeki moleküler ve elektrofizyolojik karakterizasyonu yapılmıştır. *KCNQ1* gen mekanizması üzerindeki etkileri incelenmiştir. Yapılan kalsiyum görüntüleme analizlerinde, mutant hücrelerin temin edildiği hastalarda gözlenen QT aralığındaki uzamaya benzer olarak mutant *KCNQ1* geni ifade eden kardiyomiyositlerin kasılma-gevşeme mesafesinin sağlıklı kardiyomiyositlere göre uzadığı gözlemlendi. İlaç aday molekülleri olan ve *KCNQ1* kanalı üstünde aktif rol alan ML277 ve JNJ303, sağlıklı, mutant ve genetik olarak düzenlenmiş hücrelerde uygulanarak elektrofizyolojik etkilerini incelemek amacıyla ön çalışmalar yapıldı. İlerleyen çalışmalarda oluşturulan bu *in vitro* UPK hücre kökenli kültürlerde farklı dozları incelenebilir. Böylece ilaç moleküllerinin klinikte UQT sendromunun tedavisine yönelik yeni uygulamalar geliştirilebilir ve hastalık mekanizması detaylı incelenebilir.

8 KAYNAKLAR

1. Kallergis, E. M., Goudis, C. A., Simantirakis, E. N., Kochiadakis, G. E., Vardas, P.E. Mechanisms, risk factors, and management of acquired long QT syndrome: a comprehensive review. *Scientific World Journal*. 2012; p. 8, 2012.
2. Lian, X., Zhang, J., Azarin, S.M., Zhu, K., Hazeltine, L.B., Bao, X. ve ark. Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signaling under fully defined conditions. *Nature Protocol*. 8(1); p. 162-75, 2012.
3. Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E., ve ark. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*. 339(6121); p. 823-6, 2013.
4. Brand, T. Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis. *Dev Biol*. 258(1); 1-19, 2003.
5. Fishman, M.C. ve Stainier, D.Y. Cardiovascular development. Prospects for a genetic approach. *Circ Res*. 74(5); 757-763, 1994.
6. Moorman, A., Webb, S., Brown, N. A., Lamers, W., Anderson, R.H. Development of the heart: (1) formation of the cardiac chambers and arterial trunks. *Heart*. 89(7); p. 806-814, 2003.
7. Ryckebusch, L., Wang, Z., Bertrand, N., Lin, S.C., Chi, X., Schwartz, R. ve ark. Retinoic acid deficiency alters second heart field formation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105(8); 2913-2918, 2008.
8. Behere, S.P., Weindling, S.N. Inherited arrhythmias: The cardiac channelopathies. *Ann Pediatr Cardiol*. 8(3); 210-220, 2015.
9. Jurko, S. ve Rozinaj, G., High Resolution of the ECG signal by polynomial approximation. *Radioengineering*. 15; p. 1, April 2006.
10. Schwartz, P.J., Crotti, L., Insolia, R. Long-QT syndrome: from genetics to management. *Circ. Arrhythm Electrophysiol*. 5(4); p. 868-77, August 2012.
11. Wu, J., Ding, W.G., Horie, M. Molecular pathogenesis of long QT syndrome type 1. *J Arrhythm*. 32(5); p. 381-388, October 2016.
12. Romano, C., Gemme, G., Pongiglione, R., Romano C.C. Aritmie cardiache rare dell'età pediatrica. ii. Accessi sincopali per fibrillazione ventricolare

parossistica (presentazione del primo caso della letteratura pediatrica italiana), *Clin Pediatr. (Bologna)*. 45; p. 656–683, 1963.

13. Ward, O.C. A new familial cardiac syndrome in children. *J. Ir. Med. Assoc.* 54; p. 103–106, 1964.
14. Jervell, A., Lange-Nielsen F. Congenital deaf-mutism, functional heart disease with prolongation of the Q-T interval and sudden death. *Am Heart J.* 54(1); p.59-68, July 1957.
15. Napolitano, C., Priori, S.G., Schwartz, P.J., Bloise, R., Ronchetti, E., Nastoli, ve ark. Genetic testing in the long QT syndrome: development and validation of an efficient approach to genotyping in clinical practice. *JAMA.* 21. 294(23); p. 2975-80, December 2005.
16. Schwart, P.J., Ackerman, M.J., George, A.L., Jr, Wilde, A.A.M. Impact of genetics on the clinical management of channelopathies. *Journal of the American College of Cardiology.* 62(3); p. 169-180.
17. Marx, S.O., Kurokawa, J., Reiken, S., Motoike, H., D'Armiento, J., Marks, A.R. ve ark. Requirement of a macromolecular signaling complex for beta adrenergic receptor modulation of the *KCNQ1-KCNE1* potassium channel. *Science.* 295(5554); p. 496-9, Jan 18 2002.
18. Goldenberg, I., Horr, S., Moss, A.J., Lopes, C.M., Barsheshet, A., McNitt, S., ve ark. Risk for life-threatening cardiac events in patients with genotype-confirmed long-QT syndrome and normal-range corrected QT intervals. *J Am Coll Cardiol.* 57(1); p. 51-9, Jan 4 2011.
19. Wang, D.W., Yazawa, K., George, A.L. Jr, Bennett, P.B. Characterization of human cardiac Na⁺ channel mutations in the congenital long QT syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93(23); p. 13200-5, Nov 12 1996.
20. Sanguinetti, M.C., Curran, M.E., Zou, A., Shen, J., Spector, P.S., Atkinson, D.L. ve ark. Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel. *Nature.* 384(6604); p. 80-3, Nov 7 1996.
21. Nichols, J., Smith, A. The origin and identity of embryonic stem cells. *Development.* 138(1); p. 3-8, Jan 2011.
22. Takahaski, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., ve ark. Induction of pluripotent stem cells from human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 30;131(5); p. 861-72, 2007.

23. Moretti, A., Laugwitz, K.L., Dorn, T., Sinnecker, D., Mummery, C. Pluripotent Stem Cell Models of Human Heart Disease. *Cold Spring Harb. Perspect Med.* 3(11); p. a014027, 2013.
24. Braam, S.R., Passier, R., Mummery, C.L. Cardiomyocytes from human pluripotent stem cells in regenerative medicine and drug discovery. *Trends Pharmacol Sci.* 30(10): p. 536-45, 2009.
25. Mummery, C. L., Zhang, J., Ng, E. S., Elliott, D. A., Elefanty, A. G., Kamp, T. J. Differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells to cardiomyocytes: a methods overview. *Circulation Research.* 111, 344–358, 2012.
26. Burridge, P.W., Matsa, E., Shukla, P., Lin, Z.C., Churko, J.M., Ebert, A.D. ve ark. Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nat Methods.* 11(8); p. 855-60, 2014.
27. Shi, Y., Inoue, H., Wu, J.C., Yamanaka, S. Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nat Rev Drug Discov.* 16(2); p.115-130, Feb 2017.
28. Cagavi, E., Caglar, T.A., Haider, K.H., Soztekin, G.I. 8. Patient-specific induced pluripotent stem cells for cardiac disease modeling. In, (Eds.) *Stem Cells-From Hype to Real Hope.* Berlin, Boston: De Gruyter. pp. 146-172, 2018.
29. Moretti, A., Bellin, M., Welling, A., Jung, C. B., Lam, J. T., Bott-Flügel, L., ve ark. Patient-specific induced pluripotent stem-cell models for long-QT syndrome. *N. Engl J Med.* 363(15); p. 1397-1409, 2010.
30. Itzhaki, I., Maizels, L., Huber, I., Zwi-Dantsis, L., Caspi, O., Winterstern, A., ve ark. Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells. *Nature.* 471(7337); p. 225–230, 2011.
31. Ma, D., Wei, H., Zhao, Y., Lu, J., Li, G., Sahib N.B., ve ark. Modeling type 3 long QT syndrome with cardiomyocytes derived from patient-specific induced pluripotent stem cells. *International Journal of Cardiology.* 168(6); p 5277–5286, 2013.
32. Jung, C.B., Moretti, A., Mederos y Schnitzler, M., Iop, L., Storch, U., Bellin, M. ve ark. Dantrolene rescues arrhythmogenic RYR2 defect in a patient-specific stem cell model of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *EMBO Mol Med.* 4(3); p. 180-91, Mar 2012.

33. Sun, N., Yazawa, M., Liu, J., Han, L., Sanchez-Freire, V., Abilez, O.J., ve ark. Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cell as a Model for Familial Dilated Cardiomyopathy, *Sci Transl Med.* 4(130); p. 130ra47, Apr 18 2012.
34. Lan, F., Lee, A.S., Liang, P., Sanchez-Freire, V., Nguyen, P.K., Wang, L., ve ark. Abnormal calcium handling properties underlie familial hypertrophic cardiomyopathy pathology in patient-specific induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 12(1); p. 101-13, Jan 3 2013.
35. Kim, C., Wong, J., Wen, J., Wang, S., Wang, C., Spiering, S., ve ark. Studying arrhythmogenic right ventricular dysplasia with patient-specific iPSCs. *Nature.* 494(7435); p. 105-10, Feb 7 2013.
36. Singh, M., Morin, D.P., Link, M.S. Sudden cardiac death in Long QT syndrome (LQTS), Brugada syndrome, and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT). *Prog Cardiovasc Dis.* 62(3); p. 227-234, 2019 May – Jun.
37. Tang, L., Zeng, Y., Du, H., Gong, M., Peng, J., Zhang, B., ve ark. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human zygotes using Cas9 protein. *Mol Genet Genomics.* 292(3); p. 525-533, 2017 Jun.
38. *Molecular Biology of The Cell*, 6th Edition
39. Gaj, T., Gersbach, C.A., Barbas, C.F. ZFN, TALEN and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.* 31(7); p. 397–405, 2013.
40. Cong I., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., ve ark. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science.* 339; p. 819–823, 2013.
41. Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., Siksnys, V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109; p. E2579–E2586, 2012.
42. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna J.A., Charpentier, E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 337:816–821, 2012.
43. Hsu, P. D., Scott, D.A., Weinstein, J.A., Ran, F.A., Konermann, S., Agarwala, V., ve ark. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat. Biotechnol.* 31(9):827-32, 2013.

44. Zhang, X., Guo, L., Zeng H., White, S.L., Furniss, M., Balasubramanian, B., ve ark. Multi-parametric assessment of cardiomyocyte excitation-contraction coupling using impedance and field potential recording: A tool for cardiac safety assessment. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 81; p. 201-216, 2016.
45. Jinek, M., Jiang, F., Taylor, D.W., Sternberg, S.H., Kaya, E., Ma, E., ve ark. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science*. 14;343(6176):1247997, 2014.
46. URL 1: <https://theness.com/neurologicablog/index.php/crispr-and-a-hypoallergenic-peanut/>
47. Schaefer, K.A., Wu, W.H., Colgan, D.F., Tsang, S.H., Bassuk, A.G., Mahajan, V.B. Unexpected mutations after CRISPR-Cas9 editing in vivo. *Nat.Methods*. 30;14(6):547-548, 2017.
48. German, D.M., Mitalipov, S., Mishra, A., Kaul, S. Therapatutic genome editing in cardiovascular diseases. *JACC: Basic to Translational Science*. 4(1);122-31, February 2019.
49. Mearini, G., Stimple, D., Geertz, B. Mybpc3 gene therapy for neonatal cardiomyopathy enables long-term disease prevention in mice. *Nat. Commun*. 5:5515, 2014.
50. El Refaey, M, Xu, L., Gao, Y. In vivo genome editing restores dystrophin expression and cardiac function in dystrophic mice. *Circ. Res*. 121:923-9, 2017.
51. Limpitikul, W.B., Dick, I.E., Tester, D.J. A precision medicine approach to the rescue of function on malignant calmodulinopathic long-QT syndrome. *Circ. Res*. 120:39-48, 2017.
52. Zhang, X. Multi-parametric assesment of cardiomyocyte excitation-contraction coupling using impedance and field poteential recording: A tool for cardiac safety assesment. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 81;p. 201-216, 2016.
53. Clements, M. Multielectrode array (MEA) assay for profiling electrophysiological drug effects in human stem cell-derived cardiomyocytes. *Current Protocols in Toxicology*, p. 22.4.1-22.4.32, 2016.
54. Fearnley, C. J., Roderick, H. L., Bootman, M. D. Calcium signaling in cardiac myocytes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 3(11), a004242, 2011.

55. Paredes, R.M., Etzler, J.C., Watts, L.T., Zheng, W., Lechleiter, J.D., Chemical calcium indicators. *Methods*. 46(3); p.143-51, 2008 Nov.
56. Guatimosim, S., Guatimosim, C., Song, L. S. Imaging calcium sparks in cardiac myocytes. *Methods Mol Biol*. 689, 205-214, 2011.
57. Russell, J.T. Imaging calcium signals in vivo: a powerful tool in physiology and pharmacology. *Br J Pharmacol*. 163(8); p. 1605–1625. 2011 Aug.
58. Lee, Y.K., Ng, K.M., Lai, W.H., Chan, Y.C., Lau, Y.M., Lian, Q., ve ark. Calcium homeostasis in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cell Rev*. 7(4), 976-986, 2011.
59. Walter, A., Saric, T., Hescheler, J., Papadopoulos, S. Calcium imaging in pluripotent stem cell-derived cardiac myocytes. *Methods Mol Biol*. 1353, 131-146, 2016.
60. Xie, Y., Sato, D., Garfinkel, A., Qu, Z., Weiss, J.N. So little source, so much sink: requirements for afterdepolarizations to propagate in tissue. *Biophys J*. 99(5); p. 1408–1415, 2010 Sep 8.
61. Fink, M., Noble, P.J., Noble D. Ca²⁺-induced delayed afterdepolarizations are triggered by dyadic subspace Ca²⁺ affirming that increasing SERCA reduces aftercontractions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 301(3); p. H921-35, 2011 Sep.
62. Pogwizd, S.M., Bers, D.M. Cellular basis of triggered arrhythmias in heart failure. *Trends Cardiovasc Med*. 14(2); p. 61-6, 2004 Feb.
63. Kiviahho, A.L., Ahola, A., Larsson, K., Penttinen, K., Swan, H., Pekkanen-Mattila, M., ve ark. Distinct electrophysiological and mechanical beating phenotypes of long QT syndrome type 1-specific cardiomyocytes carrying different mutations. *Int J Cardiol Heart Vasc*, 8, 19-31.
64. Spencer, C.I., Baba, S., Nakamura, K., Hua, E. A., Sears, M.A., Fu, C.C., ve ark. Calcium transients closely reflect prolonged action potentials in iPSC models of inherited cardiac arrhythmia. *Stem Cell Reports*. 3(2), 269-281, 2014.
65. Ewy, G. A. Defining electromechanical dissociation', *Annals of Emergency Medicine*. 13(9 PART 2), pp. 830–832, 1984.
66. Fedorov, V.V., Lozinsky, I.T., Sosunov, E.A., Anyukhovskiy, E.P., Rosen, M.R., Balke, C.W., ve ark. Application of blebbistatin as an excitation-contraction uncoupler for electrophysiologic study of rat and rabbit hearts. *Heart Rhythm*. 4(5), pp. 619–626, 2007.

67. Scott, C.W., Zhang, X., Abi-Gerges, N., Lamore, S.D., Abassi, Y.A., Peters, M.F. An impedance-based cellular assay using human iPSC-derived cardiomyocytes to quantify modulators of cardiac contractility. *Toxicological Sciences*. 142(2), pp. 331–338, 2014.
68. Kane, C., Couch, L. and Terracciano, C.M.N. Excitation–contraction coupling of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. pp. 1–8, 2015 September 3.
69. Ma, J., Guo, L., Fiene, S.J., Anson, B.D., Thomson, J.A., Kamp, T.J., ve ark. High purity human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: electrophysiological properties of action potentials and ionic currents. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 301(5), H2006–H2017, 2011.
70. Wang, Y., Liang, P., Lan, F., Wu, H., Lisowski, L., Gu, M., ve ark. Genome editing of isogenic human induced pluripotent stem cells recapitulates long QT phenotype for drug testing. *J Am Coll Cardiol*. 64(5), 451-459, 2014.
71. Shi, Y., Inoue, H, Wu, J.C., Yamanaka S., Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nature Reviews Drug Discovery*. 16; p. 115–130, 2017.
72. Mann, D., Zipes, D., Libby, P., Bonow, R. Braunwald’s Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine (10th Edition). Elsevier Inc. 2014.
73. Andrikopoulos, G.K., Pastromas, S., Tzeis, S. Flecainide: current status and perspectives in arrhythmia management. *World J Cardiol*. 26; 7(2): 76–85, 2015.
74. Yu, H., Lin, Z., Mattmann, M.E., Zou, B., Terrenoire, C., Zhang, H., ve ark. Dynamic subunit stoichiometry confers a progressive continuum of pharmacological sensitivity by KCNQ potassium channels. *Proc Natl Acad Sci USA*. 21;110(21):8732-7, 2013.
75. Mattmann, M.E., Yu, H., Lin, Z., Xu, K., Huang, X., Long, S., ve ark. Identification of (R)-N-(4-(4-methoxyphenyl)thiazol-2-yl)-1-tosylpiperidine-2-carboxamide, ML277, as a novel, potent and selective K(v)7.1 (KCNQ1) potassium channel activator. *Bioorg Med Chem Lett*. 15;22(18):5936-41, 2012.
76. Moss, A.J., Schwartz, P.J., Crampton, R.S., Tzivoni, D., Locati, E.H., MacCluer, J., ve ark. The long QT syndrome. Prospective longitudinal study of 328 families. *Circulation*. 84(3); p. 1136-1144, 1991.

77. Kang, C., Badiceanu, A., Brennan, J.A., Gloschat, C., Qiao, Y., Trayanova, N.A., ve ark. β -adrenergic stimulation augments transmural dispersion of repolarization via modulation of delayed rectifier currents I_{Ks} and I_{Kr} in the human ventricle. *Sci Rep.* 21;7(1):15922, 2017.
78. URL 2: <https://biorender.com/>
79. Bayzigitov, D.R., Medvedev, S.P., Dementyeva, E.V., Bayramova, S.A., Pokushalov, E.A., Karaskov, A.M., ve ark. Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes afford new opportunities in inherited cardiovascular disease modeling. *Cardiol Res Pract.* 3582380, 2016.
80. Shi, Y., Inoue, H., Wu, J.C., Yamanaka, S. Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nature Reviews Drug Discovery.* 16; p. 115-130, 2017.
81. Mahdavi, V., Chambers, A.P., Nadal-Ginard, B. Cardiac alpha- and beta-myosin heavy chain genes are organized in tandem. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 81: 2626-2630, 1984.

9 ETİK KURUL ONAYI



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı

E-İmzalıdır

Sayı : 10840098-604.01.01-E.30221
Konu : Etik Kurulu Kararı

25/07/2018

Sayın Tuğçe TORUN

Üniversitemiz Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna yapmış olduğunuz “KCNQ1 Geni CRISPR/Cas9 Sistemi ile Düzenlenmiş İnsan Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre Kaynaklı Kardiyomyositlerin Karakterizasyonu” isimli başvurunuz incelenmiş olup etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Ek:
-Karar Formu (2 sayfa)

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi OZBEK tarafından 25.07.2018 tarihinde e-imzalanmıştır. Evrağınızı <https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden 2248CE29XB kodu ile doğrulayabilirsiniz.

İstanbul Medipol Üniversitesi

Kavacık Mah. Ekinciler Cad. No.19 Kavacık Kavşağı - Beykoz
34810 İstanbul

Tel: 444 85 44

İnternet: www.medipol.edu.tr

Ayrıntılı Bilgi İçin : bilgi@medipol.edu.tr

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU







BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	KCNQ1 Geni CRISPR/Cas9 Sistemi ile Düzenlenmiş İnsan Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre Kaynaklı Kardiyomyositlerin Karakterizasyonu			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Tuğçe Torun			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Öğrenci			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul			
	DESTEKLEYİCİ	-			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU

Değerlendirilen Belgeler	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI			
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU				Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
Karar Bilgileri	Karar No: 426	Tarih: 25/07/2018		
	Yukarıda bilgileri verilen Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve araştırmanın etik ve bilimsel yönden uygun olduğuna "oybirliği" ile karar verilmiştir.			

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof. Dr. Şeref DEMİRAYAK	Eczacılık	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK	Farmakoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. İlknur KESKİN	Histoloji ve Embriyoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Devrim TARAKCI	Ergoterapi	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Sibel DOĞAN	Psiko-onkoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Hikmet ÜÇİŞİK	Biyoteknoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Keziban OLCAY	Endodonti	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

* :Toplantıda Bulunma

10 ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Tuçce	Soyadı	TORUN
Doğum Yeri	Çarşamba	Doğum Tarihi	02/03/1992
Uyruğu	TC	TC Kimlik No	
E-mail	tuce.torun@gmail.com	Tel	

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans	Gebze Teknik Üniversitesi (3.76/4.00)	2016
Lise	Çarşamba Anadolu Lisesi	2010

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre
Araştırmacı	İstanbul Medipol Üniversitesi, BAP Proje No: 2018/17	9 ay
Bursiyer	İstanbul Medipol Üniversitesi, TÜBİTAK COST Proje No: 315S027	9 ay
Bursiyer	İstanbul Medipol Üniversitesi, TÜBİTAK 1001 Proje No: 116S443	7 ay
Yürütücü	Gebze Teknik Üniversitesi-İstanbul Medipol Üniversitesi, TÜBİTAK 2209/A Proje No: 1919B011500282	12 ay

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	Çok iyi	İyi	İyi
Almanca	Başlangıç Düzeyi	Başlangıç Düzeyi	Başlangıç Düzeyi

Yabancı Dil Sınav Notu

YDS/YÖKDİL	87,50
------------	-------

ALES	80,08 (ALES-EA) & 79,70 (ALES-SAY)
------	------------------------------------

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma Becerisi
Windows Office	İyi
Illustrator	Orta
Fiji / Image J	İyi
C Programlama	Başlangıç Seviyesi
MATLAB	Başlangıç Seviyesi

Uluslararası ve Ulusal Yayınları/Bildirileri/Sertifikaları/Ödülleri

Sözlü Sunum

1. **Torun, T., Çağavi, E.** “*KCNQ1* Geni CRISPR/Cas Sistemi ile Düzenlenmiş İnsan Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre Kaynaklı Kardiyomiyositlerin Karakterizasyonu” Istanbul Medipol University 2nd Master and PhD. Days, 28 June 2019. **(Oral Presentation)**
2. Göktaş Şahoğlu, S., Örs, G., **Torun, T.**, Durdu, Z. B., Kazcı, Y. E., Tuzcu, V., Deniz, E., Erman, B., Çağavi, E. “ İnsan Uzun QT Sendromu Kökenli Uyarılmış Pluripotent Kök Hücrelerde İlgili Mutasyonun CRISPR/Cas9 ile

Düzeltilerek Hastalık Fenotipini İncelenmesi”, XV. National Medical Biology and Genetics Congress- International Participation, Fethiye-Muğla/TURKEY, 26-29 September 2017. **(Oral Presentation, 2nd Place Award)**

3. Göktaş Şahoğlu, S., Örs, G., **Torun, T.**, Durdu, Z. B., G.rgülü, G. İ., Kazcı, Y. E., Deniz, E., Erman, B., Tuzcu, V., Çağavi, E. “Correction of *KCNQ1* Gene Mutation in Long QT Syndrome Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells by CRISPR/Cas9 System”, 5th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, Abstract Book-43 (Short Talk-15), Boğaziçi University/Istanbul, 8-10 September 2017. **(Oral Presentation)**

Poster Sunumları

1. Çağavi, E., Sahoğlu Göktaş, S., Kazcı, Y. E., Tuzcu, V., **Torun, T.** “Modeling Sustained Ventricular Tachycardia with Patient Derived iPSC Carrying A Novel *SCN5A* Missense Mutation” ISSCR 2019 Annual Meeting, Los Angeles/USA, 26-29 June 2019 **(Poster Presentation)**
2. Çağavi, E., Sahoğlu Göktaş, S., **Torun, T.**, Kazcı, Y. E., Durdu, Z. B., Örs, G., Akgül Çağlar, T. “Functional Evaluation of CRISPR/CAS9 Edited *KCNQ1* Mutations in Cardiomyocytes Derived from iPSC Cells of Long QT Syndrome Patients” ISSCR-Stem Cells & Organoids in Development & Disease International 2019 Symposia, Amsterdam/NETHERLANDS, 20-22 February 2019 **(Poster Presentation)**
3. Şahoğlu Göktaş, S., **Torun, T.**, Örs, G., Durdu, Z.B., Görgülü, G.İ., Akgül Çağlar T., Kazcı, Y.E., Tuzcu, V., Çağavi, E. “İnsan Uzun QT Sendromu Kökenli Uyarılmış Pluripotent Kök Hücrelerde İlgili Mutasyonun CRISPR/Cas9 ile Düzeltilerek Hastalık Fenotipinin İncelenmesi” Istanbul Medipol University 1st Master and PhD. Days, 27 June 2018. **(Poster Presentation)**
4. **Torun, T.**, Kibar, H., Akgül Çağlar, T., Şahoğlu Göktaş, S., Çağavi, E. “Kardiyomiyositlerin Kasılma ve Tutunma Özelliklerinin Üç Boyutlu Protein Jellerinde ve Kardiyak Hücre Tabakalarında İncelenmesi”, XV. National Medical Biology and Genetics Congress- International Participation, Fethiye-Muğla/TURKEY, 26-29 September 2017. **(Poster Presentation)**

5. **Torun, T.**, Kibar, H., Akgül Çağlar, T., Şahoğlu Göktaş, S., Çağavi, E. “Comparative Characterisation of Three-Dimensional Cultures and the Cell-Sheets Derived From Neonatal Mouse Cardiomyocyte”, 5th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, Abstract Book-192, Boğaziçi University/Istanbul, 8-10 September 2017. **(Poster Presentation)**

