



T. C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PC-3 PROSTAT KANSER HÜCRE HATTINDA MUTANT TP53
GENİNİN CRISPR-Cas9 ARACILIKLI RESTORASYONU**

HAZIRLAYAN: MUHAMMET BURAK BATIR
DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ

TEZ DANIŞMANI
PROF.DR. F. SIRRI ÇAM



T. C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PC-3 PROSTAT KANSER HÜCRE HATTINDA MUTANT TP53
GENİNİN CRISPR-Cas9 ARACILIKLI RESTORASYONU**

HAZIRLAYAN: MUHAMMET BURAK BATIR
DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ

TEZ DANIŞMANI
PROF.DR. F. SIRRI ÇAM

JÜRİ ÜYELERİ
PROF. DR. AFİG BERDELİ
PROF. DR. FAHRİ UÇAR
DOÇ. DR. FEYZAN ÖZDAL KURT
DR. ÖĞR. ÜYESİ BERRİN TUĞRUL

MANİSA-2019-

**PC-3 PROSTAT KANSER HÜCRE HATTINDA MUTANT TP53 GENİNİN
CRISPR-Cas9 ARACILIKLI RESTORASYONU**

Öğrenci:Muhammet Burak BATIR

Danışman:Prof. Dr. F. Sırrı ÇAM

Bu tez çalışması 12.11.2019 tarihinde jürimiz tarafından "Tıbbi Biyoloji Programı"nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı: Prof. Dr. F. Sırrı ÇAM
Manisa Celal Bayar Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Afif BERDELİ
Ege Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Fahri UÇAR
Akdeniz Üniversitesi

Üye: Doç. Dr. Feyzan ÖZDAL KURT
Manisa Celal Bayar Üniversitesi

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Berrin TUĞRUL
Manisa Celal Bayar Üniversitesi

Bu tez, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından başarılı bulunmuştur. 12/11/2019

Prof. Dr. Ömer TETİK
Enstitü Müdürü

T.C
YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
ULUSAL TEZ MERKEZİ

TEZ VERİ GİRİŞ FORMU

Referans No	10241646
Yazar Adı / Soyadı	MUHAMMET BURAK BATIR
T.C.Kimlik No	17906127564
Telefon	5323550487
E-Posta	buraks1@hotmail.com
Tezin Dili	Türkçe
Tezin Özgün Adı	PC-3 PROSTAT KANSER HÜCRE HATTINDA MUTANT TP53 GENİNİN CRISPR-Cas9 ARACILIKLI RESTORASYONU
Tezin Tercümesi	CRISPR-Cas9 DIRECTED TP53 GENE RESTORATION IN HUMAN PROSTATE CANCER CELL LINE PC-3
Konu	Tıbbi Biyoloji = Medical Biology ; Genetik = Genetics
Üniversite	Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Enstitü / Hastane	Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Bilim Dalı	Tıbbi Biyoloji Bilim Dalı
Tez Türü	Doktora
Yılı	2019
Sayfa	84
Tez Danışmanları	PROF. DR. FETHİ SIRRI ÇAM
Dizin Terimleri	Moleküler genetik=Molecular genetic
Önerilen Dizin Terimleri	moleküler genetik; kanser genetiği; CRISPR/Cas9; p53.

23.09.2019

İmza: 

BEYAN

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

Muhammet Burak BATIR

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca benden bilgilerini ve hoŐgörülerini esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. F. Sırrı AM, Prof.Dr. Afig BERDELİ, Prof.Dr. Mehmet KORKMAZ ve Dr. Öğr. Üyesi Berrin TUĞRUL'a içtenlikle teşekkür ederim.

Ayrıca akademik hayatım boyunca güzel sözleriyle, destekleriyle ve sevgileriyle bana moral veren sevgili eşim Sevinç BATIR'a, anneme, ablama, Filiz halama, Aydın Amcama, Őenel teyzeme, Yücel dayıma ve nur içinde yatan babama, Gülçin yengeme ve Yüksel dayıma teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim. Bu tez, Manisa CelalBayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından 2017-144 numaralı proje ile desteklenmiŐtir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1 KANSER.....	5
4.2 PROSTAT KANSERİ.....	7
4.3 TP53 GENİ VE PROTEİN ÜRÜNÜ P53	9
4.4 P53'ÜN TÜMÖR BASKILAYICI FONKSİYONU	9
4.5 CRISPR/Cas9	11
4.6 CRISPR/Cas9 SİSTEMİ İLE GENOM DÜZENLENMESİ.....	12
5. GEREÇ VE YÖNTEM	16
5.1 HÜCRE HATTI VE KÜLTÜRÜ	16
5.3 ssODN'LER VE PLAZMİDLER	17
5.4 PLAZMİD ÇOĞALTIMI VE KÜÇÜK ÖLÇEK İZOLASYONU	20
5.5 KÜÇÜK ÖLÇEK PLAZMİDLERİN POLİMERAZ ZİNCİR (PZR) REAKSİYONLARININ GERÇEKLEŞTİRİLMESİ.....	21
5.6 KÜÇÜK ÖLÇEK PLAZMİD PZR ÇOĞALTIM ÜRÜNLERİNİN AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ.....	23
5.7 KÜÇÜK ÖLÇEK PLAZMİD PZR ÇOĞALTIM ÜRÜNLERİNİN SANGER SEKANS DOĞRULAMA ANALİZLERİ	23
5.8 CRISPR/Cas9 HEDEF BÖLGESİ VE HEDEF BÖLGESİNE ÖZGÜ sGRNA ARALAYICI DİZİ DİZAYNI	24
5.9 PLAZMİDLERİN RESTRİKSİYON ENDONÜKLEAZ ENZİM KESİMLERİ	25
5.10 RESTRİKSİYON ENDONÜKLEAZ ENZİM KESİMİ YAPILAN PLAZMİD DNA PARÇALARININ AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ VE JELDEN GERİ ELDESİ	26

5.11 BAĞLANMA (LİGASYON)	27
5.12. sGRNA1 VE sGRNA2 DUPLEXLERİNİN KLONLANDIĞI PLAZMİDLERİN KİMYASAL KOMPOTENT BAKTERİLERE ÇOĞALTIM AMAÇLI TRANSFORMASYONU	28
5.13 sGRNA1 VE sGRNA2 PLAZMİDLERİNİN TRANSFORME EDİLDİĞİ BAKTERİ KOLONİLERİNDEN BÜYÜK ÖLÇEK ENDOFREE PLAZMİD İZOLASYONU	29
5.14 PC-3 HÜCRELERİNE PX601-GFP PLAZMİDİNİN VE ssODN1 TRANSFEKSİYONU	29
5.15 TRANSFEKSİYON ORANININ IMAGEJ İLE ANALİZİ	31
5.16 PC-3 HÜCRELERİ ÜZERİNDE OPTİMAL PUROMİSİN MİKTARININ BELİRLENMESİ	31
5.17 PC-3 HÜCRELERİNE sGRNA1 VE sGRNA2 PLAZMİDLERİNİN TRANSFEKSİYONU VE PUROMİSİN SELEKSİYONU	32
5.18 KONTROL, sGRNA1 VE sGRNA2 İLE TRANSFEKTE OLAN PC-3 HÜCRELERİNDEN DNA İZOLASYONU	33
5.19 TP53 414 ^{DEL} C HEDEF BÖLGESİNE ÖZGÜ PRİMER NÜKLEOTİD DİZİSİ VE ÖZELLİKLERİ	33
5.20 PC-3 HÜCRELERİNDE CRISPR/Cas9 ARACILIĞIYLA DÜZENLENMİŞ TP53 414 ^{DEL} C HEDEF BÖLGESİNİN PZR ARACILIĞIYLA ÇOĞALTIMI	34
5.21 T7 ENDONÜKLEAZ ANALİZİ	36
5.22 sGRNA2+ssODN1 VE sGRNA2+ssODN2 İLE TRANSFEKTE OLAN PC-3 HÜCRELERİNİN TP53 414 ^{DEL} C HEDEF BÖLGESİNİN YENİ NESİL SEKANS ANALİZİ	37
5.23 KONTROL PC-3 HÜCRELERİ, sGRNA2+ssODN1 VE sGRNA2+ssODN2 İLE TRANSFEKTE OLAN PC-3 HÜCRELERİNDE p53 mRNA EKSPRESYON SEVİYESİNİN BELİRLENMESİ	37
5.24 TEK HÜCRE KÜLTÜRÜ	39
5.25 sGRNA2+ssODN2 TRANSFEKSİYONU YAPILMIŞ HÜCRELERDE p53 PROTEİNLERİNİN İMMÜNOFLORESAN ANALİZİ	40
5.26 sGRNA2+ssODN1 VE sGRNA2+ssODN2 TRANSFEKSİYONU YAPILMIŞ HÜCRELERDE APOPTOZİS ANALİZİ	40
5.27 İSTATİKSEL ANALİZLER	41
6. BULGULAR.....	42

6.1 PC-3 HÜCRELERİNDE UYGUN TRANSFEKSİYON ORANININ BELİRLENMESİ.....	42
6.2 sgrNA ARALAYICI DİZİ VERİMLİLİĞİNİN BELİRLENMESİ.....	43
6.3 TP53 414 ^{DEL} C MUTASYONUNUN HDR ARACILIKLI TAMİR VERİMLİLİĞİNİN BELİRLENMESİ.....	44
6.4 PC-3 HÜCRELERİNDE TP53 414 ^{DEL} C MUTASYONUNUN TAMİR İŞARETİ OLARAK P53 mRNA EKSPRESYONUNUN BELİRLENMESİ	46
6.5 PC-3 HÜCRELERİNDE TP53 414 ^{DEL} C MUTASYONUNUN TAMİR İŞARETİ OLARAK YABANIL (WILD TYPE/WT) P53 PROTEİN EKSPRESYONUNUN BELİRLENMESİ	47
6.6 sgrNA2+ssODN2 SİSTEMİNİN TRANSFEKTE EDİLDİĞİ PC-3 HÜCRELERİNİN TEK HÜCRE KÜLTÜR ANALİZİ.....	48
6.7 PROLİFERE OLMAYAN TEK BİR HÜCRE DURUMUNDAKİ PC-3 HÜCRELERİNDE TP53 414 ^{DEL} C MUTASYON TAMİRİNİN DOĞRULANMASI	49
6.8 sgrNA2+ssODN2 SİSTEMİNİN TRANSFEKTE EDİLDİĞİ PC-3 HÜCRELERİNDE APOPTOZİS ANALİZİ	50
7. TARTIŞMA.....	53
8. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	57
9. KAYNAKLAR	58
10. EKLER	65
11. ÖZGEÇMİŞ	68

TABLO DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1. ssODN nükleotid dizisi.....	18
Tablo 2. px601-GFP ve px459V2,0 plazmid kontrol primer çiftleri.	21
Tablo 3. Küçük ölçek plazmid PZR reaksiyon bileşenleri.	22
Tablo 4. PZR döngü koşulları.....	22
Tablo 5. Sanger sekans PZR reaksiyon bileşenleri.	24
Tablo 6. PZR döngü koşulları.....	24
Tablo 7. Hedef DNA bölgesi, sgRNA aralayıcı dizi adlandırması ve sgRNA aralayıcı dizi nükleotid dizileri.	25
Tablo 8. Restriksiyon endonükleaz enzim kesim reaksiyon bileşenleri.....	26
Tablo 9. T4 polinükleotid kinaz için gereken reaksiyon bileşenleri.	27
Tablo 10. Ligasyon reaksiyon bileşenleri.....	28
Tablo 11. px601-GFP plazmid+ssODN+FuGENE HD transfeksiyon ajan oranları.	31
Tablo 12. TP53 414delC hedef bölgesi primer nükleotid dizisi ve özellikleri.	34
Tablo 13. TP53 414delC çoğaltım bölgesi için PZR bileşenleri.	35
Tablo 14. PZR döngü koşulları.....	35
Tablo 15. cDNA PZR reaksiyon bileşenleri.....	38
Tablo 16. RT-qPZR reaksiyon bileşenleri.....	38
Tablo 17. p53 RT-qPZR primerleri.....	39
Tablo 18. RT-qPZR döngü koşulları.....	39

ŞEKİL DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Klonal gelişim. Tekrarlayan mutasyon oluşumu ve çoğalma sonunda, tek bir hücreden malignant kanser hücre kolonisi meydana gelir.	6
Şekil 2. Normal bir hücreden metastatik tümör oluşuma doğru adımlar.	6
Şekil 3. Erkek üriner sistem ve prostatın anatomik yapısı (www.true.org.au/Health-information/mens-health , Erişim tarihi: 10 Nisan 2019)	7
Şekil 4. Prostat bez kanalı ve kanalı çevreleyen epiteliyal prostat hücre tipleri (Zhang ve ark. 2016).....	8
Şekil 5. p53 sinyal yolağı.....	11
Şekil 6. CRISPR-Cas bağışıklığının kilit basamakları. 1) Adaptasyon: Yeni aralayıcıların CRISPR lokus bölgesine yerleştirilmesi. 2) İfade: CRISPR lokusunun transkripsiyonu ve CRISPR RNA'sının işlenmesi. 3) İnterferens: Mobil genetik elementlerin CRISPR RNA ve Cas proteini ile tespiti ve degradasyonu (Rath ve ark. 2015).	12
Şekil 7. CRISPR/Cas9 sisteminin temel bileşenleri (https://www.addgene.org/crispr/guide/ , Erişim tarihi: 25 Nisan 2019).....	13
Şekil 8. CRISPR/Cas9 sistemi ile hedef DNA bölgesi üzerinde HDR aracılıklı gen düzenlemesinin şematik gösterimi (https://www.addgene.org/crispr/guide/ , Erişim tarihi: 25 Nisan 2019)	15
Şekil 9. px601-GFP plazmid iskelet yapısı: Plazmid omurgası 8138 baz çiftinden oluşmaktadır. Bakteriyel replikasyon için pUC ori ve antibiyotik direnci için amp, silin gen bölgesini içerir. Ampisilin gen bölgesi, plazmid aktarımının gerçekleştiği bakterilerin ortamdaki seçilimine olanak sağlar.	19
Şekil 10. px459 V2.0 plazmid iskelet yapısı: Plazmid omurgası 9174 baz çiftinden oluşmaktadır. Yapısında bulunacak gRNA uzunluğu 19-20 baz olmak zorundadır. Bakteriyel replikasyon için pUC ori ve antibiyotik direnci için Ampisilin gen bölgesini içerir. Ampisilin gen bölgesi, plazmid aktarımının gerçekleştiği bakterilerin ortamdaki seçilimine olanak sağlar. gRNA transkripsiyonu U6 promotörü tarafından sağlanır.	

CMV promotörü Cas9 endonükleaz ve Puromisin ifadesini sağlar. Klonlama işlemi için gerekli BbsI restriksiyon enzim kesim bölgesi şekil üzerinde gösterilmiştir.	20
Şekil 11. px459V2,0 plazmidi üzerindeki BbsI ve restriksiyon endonükleaz enzim kesim bölgesi.	26
Şekil 12. Farklı transfeksiyon oranlarında GFP geni aktarılmış PC-3 hücrelerinde GFP ekspresyonunun görüntülenmesi.	42
Şekil 13. T7 endonükleaz I analizi ile sgRNA1 ve sgRNA2 aralayıcı dizilerinin gen modifikasyon verimliliğinin dijital elektroforez ortamında gösterimi. En üst seviyedeki ok parental PZR ampikonunu ve alt seviyedeki oklar ise T7 endonükleaz I kesimi sonucu oluşan PZR bantlarını göstermektedir. M: Markır; K: Kontrol.....	44
Şekil 14. CRISPR/Cas9 sistemi ve tamir kalıpları ile genetik düzenlemeye uğramış PC-3 hücrelerindeki TP53 414delC mutasyon bölgesinin PZR ampikonlarının yeni nesil sekans okuması. A. Herhangi bir genetik düzenlemeye uğramamış kontrol PC-3 hücrelerindeki TP53 414delC mutasyon bölgesinin nükleotid dizisi. B. sgRNA2+ssODN1 ile genetik düzenlemeye uğramış PC-3 hücrelerindeki TP53 414delC mutasyon bölgesinin nükleotid dizisi. C. sgRNA2+ssODN2 ile genetik düzenlemeye uğramış PC-3 hücrelerindeki TP53 414delC mutasyon bölgesinin nükleotid dizisi.	45
Şekil 15. Yeni nesil sekans sonuçlarının grafik üzerinde yüzdesel gösterimi. A. sgRNA2+ssODN1 ve sgRNA2+ssODN2 sistemlerinin PC-3 hücrelerine transfeksiyonu ve puromisin seleksiyonu sonrası ortamda bulunan genetik düzenlemeye uğramış hücre yüzdesi. B. Ortamda bulunan genetik düzenlemeye uğramış hücrelerin TP53 414delC mutasyon bölgesinde meydana gelen tamir, A>G knock-in, delesyon, insersiyon ve nokta mutasyonu yüzdeleri.	46
Şekil 16. sgRNA2+ssODN1 ve sgRNA2+ssODN2 sistemlerinin transfekte edildiği PC-3 hücrelerinde p53 mRNA relativ ekspresyon oranları.	47
Şekil 17. PC-3 hücrelerinde wt p53 protein varlığının IF analiz yöntemiyle gösterimi. A. Kontrol PC-3 hücrelerinde wt p53 protein varlığının taraması. B. sgRNA2+ssODN1 sisteminin transfekte edildiği PC-3 hücrelerinde wt p53 protein varlığının taraması. C. sgRNA2+ssODN2 sisteminin transfekte edildiği PC-3 hücrelerinde wt p53 protein varlığının taraması.	48
Şekil 18. 21 gün sonunda sgRNA2+ssODN2 sistemi ile transfekte edilmiş ve kontrol PC-3 hücrelerinin tek hücre kültürü analizi. A. sgRNA2+ssODN2 sistemi transfekte edilmiş tek bir PC-3 hücresinden meydana gelen koloni oluşumu. B.	

sgRNA2+ssODN2 sistemi transfekte edilmiş tek bir PC-3 hücrenin proliferasyonunu engelleyen tek hücre durumu. C. Tek bir kontrol PC-3 hücrenden meydana gelen koloni oluşumu.49

Şekil 19. Prolifere olmayan tek hücrelerde wt p53 proteininin immüno Floresan analizi. A. Prolifere olmayan tek bir PC-3 hücrenin ışık mikroskop görüntüsü. B. Prolifere olmayan tek bir PC-3 hücrenin DAPI görüntüsü. C. Prolifere olmayan tek bir PC-3 hücrenin wt p53 antikor boyaması. D. Prolifere olmayan tek bir PC-3 hücrenin hem DAPI hem de wt p53 antikor boyamasının birleşik görüntüsü.50

Şekil 20. Kontrol PC-3 hücrelerinde, sgRNA2 + ssODN3, sgRNA2 + ssODN1 ve sgRNA2 + ssODN2 ile transfekte edilmiş hücrelerde püromisin seleksiyonu olmaksızın 48. ve 72. saatlerde apoptotik hücre oranlarının belirlenmesi.51

Şekil 21. Kontrol hücreleri ile sgRNA2+ssODN1 ve sgRNA2+ssODN2 ile transfekte edilmiş PC-3 hücrelerinden 48. ve 72. saatte elde edilen normalize % apoptotik hücre oranı. Yıldız işareti gruplar arasındaki anlamlı farklılığı belirtir (*p<0,0001).52

Şekil 22. Bu çalışmada TP53 414delC mutasyonunu onarmak için kullanılması planlanan deney ortamının şematik görünümü. Hedef TP53 414delC bölgesi, CRISPR/Cas9 sistemi ile ayrıldı ve daha sonra bölünmüş bölge, tamir şablonları olarak ssODN'ler kullanılarak hücrelerin homolojisine yönelik onarım sistemi ile onarıldı. ssODN'lerin fosforotiyat tarafından modifiye edilmiş uçları, yıldız işaretiyle belirtildi (*).54

KISALTMALAR VE SİMGELER

Kısaltmalar	Açıklamalar
A.B.D	Amerika Birleşik Devletleri
ABI	Applied Biosystems
ATCC	American Type Culture Collection
B2M	β -microtubulin
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Baz çifti
cDNA	Komplementer Deoksiribo nükleik asit
CMV	Sitomegalovirus
CO ₂	Karbon Dioksit
CRISPR/Cas9	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats Cas9
crRNA	CRISPR RNA
ÇİK	Çift iplik kırığı
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoksiribo nükleik asit
dNTP	Deoksiribo nükleotid tri fosfat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
FBS	Fetal Sığır Serumu
GFP	Green fluorescence protein
gRNA	Guide Ribo nükleik asit
HAT	Homoloji aracılıklı tamir
HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase
IGV	Integrative Genomics Viewer
Kb	Kilobazçifti
LB	Luria Bertani
MgCl ₂	Magnezyum Klorür

NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEB	New England Biolabs
PAM	Protospacer adjacent motif
PBS	Posphate buffered saline
RGEN	RNA-guidedendonuclease
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	Ribo nükleik asit
RT	Reverse Transcriptase
RT-PZR	Real time polimeraz zincir reaksiyonu
S.O.C	Super Optimal broth with Catabolite
TAE	Tris-Asetat-EDTA
Taq	Thermus aquaticus
HEMOT	Hata eğilimli homolog olmayan tamir
tiODN	Tek iplikli oligodeoksinükleotid
TP53	Tümör süpressör P53
UV	Ultra viole
YNS	Yeni nesil sekans

Tezin Başlığı: PC-3 PROSTAT KANSER HÜCRE HATTINDA MUTANT TP53 GENİNİN CRISPR-Cas9 ARACILIKLI RESTORASYONU

Öğrencinin Adı: MUHAMMET BURAK BATIR

Danışmanı: PROF.DR. F. SIRRI ÇAM

Anabilim Dalı: TIBBİ BİYOLOJİ

1. ÖZET

Amaç: Prostat kanseri, dünya çapında erkekler arasında yaygın bir sağlık sorunudur ve bu prostat kanseri vakalarının çoğu, disfonksiyonel mutant Tümör Protein P53 (TP53) geni ile ilişkilidir. Bununla birlikte, disfonksiyonel mutant TP53 geni CRISPR/Cas9 sistemi ve tek iplikli oligodeoksinükleotid tamir kalıbı (ssODN) yardımıyla hücrelerin sahip olduğu homoloji aracılıklı tamir mekanizması aracılığıyla tamir edilebilir. Bu çalışmada, insan kanser PC-3 hücre hattı TP53 gen bölgesi üzerinde bulunan TP53 414delC (p.K139fs*31) null mutasyonunun CRISPR/Cas9 sistemi ve donör tek iplikli oligodeoksinükleotid yardımıyla tamir verimliliğinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada iskelet yapısında CRISPR/Cas9 sistemini taşıyan px459V2.0 plazmidi ve iki farklı tamir kalıbı kullanılmıştır. CRISPR/Cas9 sistemiyle düzenlenen TP53 gen bölgesi yeni nesil sekans (YNS) sistemi ile analiz edilmiştir. Düzenlenmiş PC-3 hücrelerinde p53 ekspresyonunun varlığının tespiti için RT-qPCR ve immünofloresan (IF) analizi yapılmıştır. Ayrıca, TP53 gen düzenlemesine bağlı olarak apoptotik hücrelerin tespiti için flow sitometri analizi yapılmıştır.

Bulgular: YNS sonuçlarına göre, sgRNA2 rehberliğindeki CRISPR/Cas9 sistemine eşlik eden iki ayrı ssOND1 ve ssODN2 varlığında TP53 414delC mutasyonu sırası ile %19,95 ve %26,0 oranında tamir edilmiştir. RT-qPCR ve IF analizleri TP53 414delC mutasyonunun tamir olduğu PC-3 hücrelerinde p53 ekspresyonunu göstermiş ve ayrıca, yapılan flow sitometri analizi apoptotik hücre oranında belirgin bir artış olduğunu göstermiştir.

Sonuçlar: Sonuç olarak, CRISPR/Cas9 sistemi aracılığıyla TP53 414delC mutasyonunun başarılı olarak tamir edildiği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: CRISPR/Cas9, prostat kanseri, TP53 geni, p53.

Title of the Study: CRISPR-Cas9 DIRECTED TP53 GENE RESTORATION IN HUMAN PROSTATE CANCER CELL LINE PC-3

Name of the student: MUHAMMET BURAK BATIR

Name of the advisor: PROF.DR. F. SIRRI ÇAM

Department: Medical Biology

2. ABSTRACT

Aim: Prostate cancer is a common health problem among men worldwide and most of these prostate cancer cases are related to a dysfunctional mutant Tumor Protein P53 (TP53) gene. However, the CRISPR/Cas9 system can be used for repairing of a dysfunctional mutant TP53 gene in combination with donor repair template single-stranded oligodeoxynucleotide (ssODN) via cells' own homology-directed repair (HDR) mechanism. In this study, we aimed to evaluate the CRISPR/Cas9 repairing efficiency on TP53 414delC (p.K139fs*31) null mutation, located in the TP53 gene, of human prostate cancer cell line PC-3 in combination with ssODNs.

Material and method: CRISPR/Cas9 backbone carrier px459 plasmids and two different repair template were used in this study. Edited TP53 414delC gene region were analysed with next-generation sequencing (NGS) system. RT-qPCR and immunofluorescence (IF) analysis was performed for detection of p53 expression from the edited PC-3 cells. Flow cytometry analysis was also performed for the detection of apoptotic cells.

Results: According to the NGS results, TP53 414delC mutation was repaired with an efficiency of 19.95% and 26.0% at the TP53 414delC position with ssODN1 and ssODN2 accompanied by sgRNA2 guided CRISPR/Cas9, respectively. Besides, RT-qPCR and IF analysis showed that PC-3 cells, the TP53 414delC mutation of which were repaired, expressed wild type p53 again. Also, significantly increased number of apoptotic cells, driven by the repaired TP53 gene were detected compared to the control cells by flow cytometry analysis.

Discussion: As a result, CRISPR/Cas9 system accompanied by ssODN was shown to effectively repair the TP53 414delC gene region

Keywords: CRISPR/Cas9, prostate cancer, TP53 gene, p53.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Prostat kanseri erkeklerde dünya çapında görülen sağlık sorunlarından biridir ve kanser progresyonu boyunca sıklıkla Tümör Protein P53 (TP53) geninde mutasyonlar meydana gelmektedir (Zhang ve ark. 2003). TP53 geni hücrede apoptozis, hücre döngüsü ve DNA tamirinin transkripsiyonel aktivasyonundan sorumludur. p53 proteini ise hücrede TP53 geni tarafından eksprese edilir ve kanser hücrelerinde çoğunlukla inaktif formda ya da ekspresyonu gerçekleşmeyen null durumunda bulunur. Prostat kanserinde ise TP53 geni üzerinde meydana gelen 414delC (p.K139fs*31) mutasyonu, yani 414. sitozin nükleotid delesyonu, belirgin bir şekilde kanser hastalığının progresyonu ve metastazı ile ilişkili haldedir (Zacharias ve ark. 2011). Bu mutasyon TP53 geninde erken bir stop kodonunun oluşumuna yol açarak TP53 geninin ekspresyonunu engeller. Dolayısıyla, PC-3 hücrelerinde TP53 geni etkisiz null bir durumda bulunur (Shenk ve ark. 2001).

Son yıllarda ise özellikle DNA dizilerine spesifik programlanabilir endonükleazların kullanımı DNA üzerinde çeşitli değişimlerin yani gen düzenlenmesinin meydana getirilebilmesi amacıyla kullanılmaktadır (Ding ve ark. 2013; Bialk ve ark. 2011). Bu endonükleazlardan biri de RNA-rehberli düzenli aralıklarla bölünmüş palindromik tekrar kümeleri ilişkili-Cas9 (CRISPR-Cas9) nükleaz sistemidir (Cong ve ark. 2013; Mali ve ark. 2013). Cas9 enzimi gen düzenlenmesinde canlı genom DNA'sı üzerinde double-strand break (DSB) yani çift iplik kırıkları meydana getirerek aracı olur. DNA üzerinde Cas9 aracılıklı çift iplik kırılması sonrası ilgili bölge hücrede iki ana yolak tarafından tamir edilir: (1) "non-homologous end-joining" (NHEJ) yani homolog olmayan uç birleştirme veya (2) "homology-directed repair" (HDR) yani homoloji yönelimli tamir. Hücrede kırılan DNA bölgesinin tamiri için gerekli olan bölgeye özgü homolog bir tamir kalıbı yani donör single-stranded oligodeoxynucleotide (ssODN) olmadığı durumlarda hücrede çoğunlukla NHEJ tamir mekanizması kullanılır. Fakat, bu durumda homolog bir tamir gerçekleşmediğinden tamir edilen bölgede bulunan DNA dizisinde insersiyon,

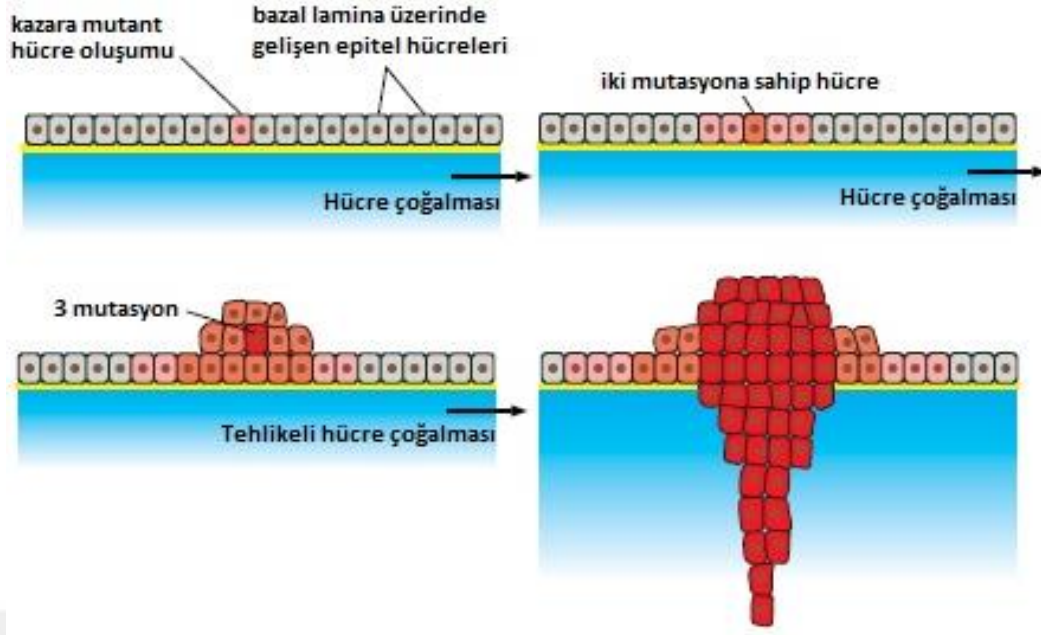
delesyon mutasyonları gözlemlenebilir (Urnov ve ark. 2010; Hsu ve Zhang 2012). Tamir kalıbının bulunduğu durumlarda ise DSB bölgesi HDR mekanizmasıyla tamir edilir. Bu durumda kullanılan tamir kalıbının içerdiği nükleotid dizisine göre DSB bölgesi hücrede tamir edilir (Aird ve ark. 2018). Bu şekilde, HDR tamir mekanizmasının hücrede kullanılması bize canlı genom DNA'sı üzerinde kontrollü tek nokta mutasyonu, insersiyon veya delesyon meydana getirmemize olanak sağlar (Kocher ve ark. 2017).

Bu projede tüm bu literatür verilerine bağlı olarak PC-3 prostat kanser hücre hattında TP53 geni üzerinde ki 414delC mutasyonunun HDR tamir mekanizması ile ne derecede tamir edilebildiği ve olası tamirin PC-3 hücre karakteri üzerine ne gibi etkilerinin olabileceği incelenmiştir.

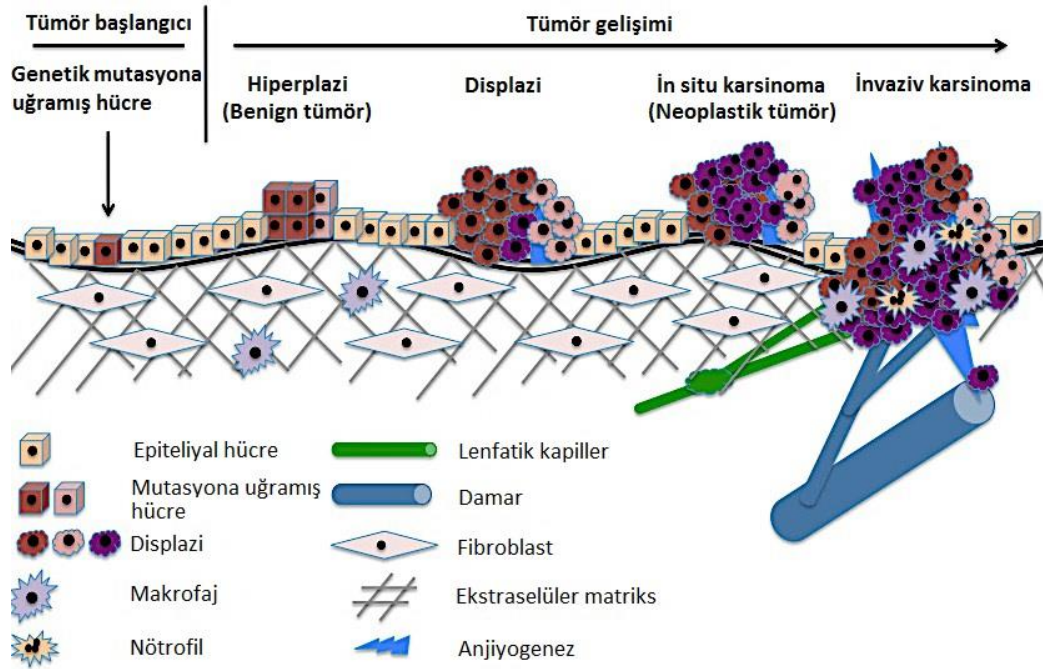
4. GENEL BİLGİLER

4.1 KANSER

Kanser, normal hücre sel ve çevresel kontrollerden kurtulmayı sağlayan, giderek artan genetik anomalilerin ve epigenetik değişimlerin neden olduğu karmaşık bir hastalıktır (Fouad ve Aanei 2017). Kanser, hastalığın bu karmaşıklığına bağlı olarak, dünya genelinde meydana gelen ölümlerin %14,4'üne neden olmaktadır (Bray ve ark. 2018). Ayrıca, kontrolsüz olarak çoğalan kanser hücreleri buldukları primer tümör dokulardan, çevre doku ve organlara kan veya lenfatik sistem aracılığıyla yayılarak sekonder tümör dokuları (metastaz) meydana getirebilirler (Fidler 1989; Rusciano ve Burger 1992). Şekil 1 ve 2'de gösterildiği üzere, epitel hücrelerinde kanser oluşumunda ilk adım kazara hücrede genetik bir mutasyonun meydana gelmesidir (Potter ve ark. 2018). Bu şekilde genetik mutasyona uğramış ilk hücrede mutasyon oranının artması ise beraberinde farklılaşmayı ve proliferasyonu meydana getirir (Şekil 1) (Yamada ve Yamada 2018). Kanserleşme iki geniş gen ailesi olan proto-onkogenler (*Ras*, *Raf*, *Src* ve *Myc* genleri gibi) ve tümör baskılayıcı genler (*TP53*, *ATM/ATR*, *PTEN* genleri gibi) grubundaki mutasyonlarla ilişkilidir (Lee 1989; Muthuswamy ve ark. 1994; Tang ve ark. 2000; Leslie ve Downes 2004; Liu ve ark. 2005; Chen 2016). İlerleyen adımlarda ise mutasyona uğramış hücre sayısında artış (hiperplazi), çoğalan hücrelerde ki artan mutasyon oranına bağlı olarak hücrelerde fenotipik değişim (displazi), tedavi edilmediği durumda hücrelerin, çevre dokulara kesin olarak yayılma ihtimalinin bulunduğu, gelişim sinyallerine gerek duymadığı, gelişim inhibitörlerine karşı duyarsız olduğu erken evre kanser tümör formuna kavuşması (in situ karsinom) ve son olarak hücrelerin malignant tümör formuna kavuşarak çevre dokulara metastaz olması (invaziv karsinom) gerçekleşir. Bu şekilde ki malign tümörler kanser olarak tanımlanmaktadır.



Şekil 1. Klonal gelişim. Tekrarlayan mutasyon oluşumu ve çoğalma sonunda, tek bir hücreden malignant kanser hücre kolonisi meydana gelir.



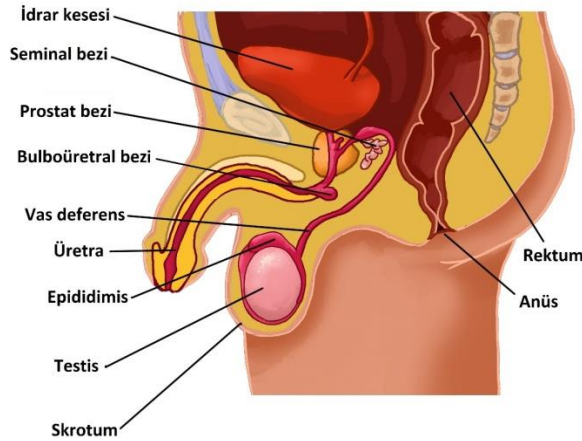
Şekil 2. Normal bir hücreden metastatik tümör oluşuma doğru adımlar.

Genetik mutasyona uğramış anormal hücre içinde bulunduğu dokudaki komşu hücrelerden daha fazla çoğalmadığı sürece çok zararlı değildir, fakat, anormal

hücrenin çoğalması kontrolden çıktığında neoplastik evreye girerek (gelişim sinyallerine gerek duymadığı, gelişim inhibitörlerine karşı duyarsız olduğu), sürekli büyüyen anormal hücrelerden meydana gelen bir tümör kitlesinin oluşumuna yol açar. Bu evrede, kitleye cerrahi müdahale yoluyla tedavi sağlanabilir. Tümör kitlesinin çevre dokuya yayılabilme yeteneğini kazandığı duruma “malignansi” denirken, kanser hücresinin kan damarı veya lenfatik sistem aracılığıyla çevre dokulara yayılarak sekonder tümör kitleleri oluşturmasına ise “metastaz” adı verilmektedir. Ayrıca, kanser dokuları oluştukları hücre ve doku tipine göre sınıflandırılmaktadırlar. Genel olarak insan kanserlerinin çoğunluğunu oluşturan ve epitel hücrelerinden oluşan tümörler “karsinoma” olarak adlandırılırken, kas, kemik veya bağ dokudan oluşan solid tümörlere ise “sarkoma” adı verilmektedir. Yukarıda bahsi geçen kanser formlarına uymayan ve hemopoietik hücrelerden oluşan kanser durumuna ise “lösemi” (kemik iliğinde lökositlerden oluşur) ya da “lenfoma” (lenf nodunda lökositlerden oluşur) adını alır (Lodish ve ark 2011).

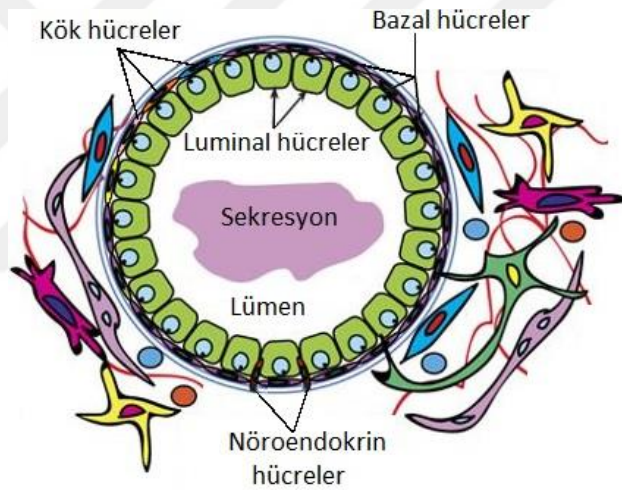
4.2 PROSTAT KANSERİ

Prostat bezi, erkek üreme sistemindeki üç salgı bezinden biri olup, seminal sıvı üretiminden sorumludur. Kestane büyüklüğündeki bez, mesanenin altında bulunur ve üretrayı çevreler (Şekil 3). Küçük kanallar, salgı bezini doğrudan idrar yoluna ileterek sperm koruyucusu olan seminal sıvının boşalmasını sağlar (Prscott ve ark. 1998).



Şekil 3. Erkek üriner sistem ve prostatın anatomik yapısı (www.true.org.au/Health-information/mens-health, Erişim tarihi: 10 Nisan 2019)

Prostatik kanalı oluşturan normal prostat epitelyumu 4 farklı türde hücreden meydana gelir, bunlar; bazal hücreler, luminal hücreler, bazal kök hücreler ve nöroendokrin hücrelerdir (Şekil 4) (Josson ve ark. 2010). Prostat bezinde sekresyonu sağlayan luminal hücrelerin doğru ekzokrin işlevselliği androjen hormonu aracılığıyla düzenlenir ve bu hücreler aynı zamanda prostat spesifik antijen (PSA) üretiminden sorumludur (Liu ve ark. 1997). Androjen reseptörü (AR) eksprese etmeyen AR-negatif bazal hücreler ise östrojen veya progesteron gibi diğer steroid hormonları tanıyan reseptörleri eksprese ederler. AR-negatif bazal kök hücreler ise, P63 bazal hücre spesifik protein eksprese etmeleri ile tanımlanırlar ve prostat gelişimi için gerekli olan tüm hücreler proliferatif bazal kök hücrelerinden farklılaşırlar (Huang ve ark. 2015; Zhang ve ark. 2016). AR-negatif epitelyal nöroendokrin hücreler ise sekretuar sisteme dahil olmayıp, bez dinamiğini kontrol ederler (Bonkhoff 1998).



Şekil 4. Prostat bez kanalı ve kanalı çevreleyen epitelyal prostat hücre tipleri (Zhang ve ark. 2016)

Prostat kanseri, prostat hücrelerinin çoğalma ve ölüm oranındaki dengenin bozulması sonucu bez hacminin malign büyümesiyle meydana gelir. Erkek bireylerde görülme sıklığı ise yaş bağlantılı olarak artmakta ve özellikle 65 yaş üstü bireylerde görülmesi sıklığı artmaktadır (Patel ve Klein 2009). Prostatik adenokarsinoma yani prostat kanseri Avrupa'da en çok görülen üçüncü, erkeklerde ise en çok teşhisi konulan kanser formudur (Ferlay ve ark. 2013). Hastaların çoğunda, hastalığın erken evrelerinde semptomlar yoktur, ancak ileri evreler sıklıkla prostatın fizyolojik fonksiyonlarını etkiler ve pelvik bölgede ağrıların eşlik ettiği çeşitli erektil ve idrar

fonksiyon bozukluklarına neden olur (Kgatle ve ark. 2016). Prostatik adenokarsinoma, yukarıda bahsi geçen mutasyona uğramış olan sekresyon özelliğine sahip AR pozitif epiteliyal hücrelerden gelişir. Meydana gelen bu mutasyonlar ise tümör baskılayıcı ve proto-onkogen ailesinde yer alan genlerin ekspresyonunda düzensizliğe yol açarak prostat kanserinin gelişimini başlatır ve bu mutasyonlardan malign tümör gelişimi ile en çok ilişkilendirileni ise tümör baskılayıcı gen ailesinde bulunan “Tümör protein P53” (TP53) geni üzerinde meydana gelen mutasyonlardır (Josson ve ark. 2010).

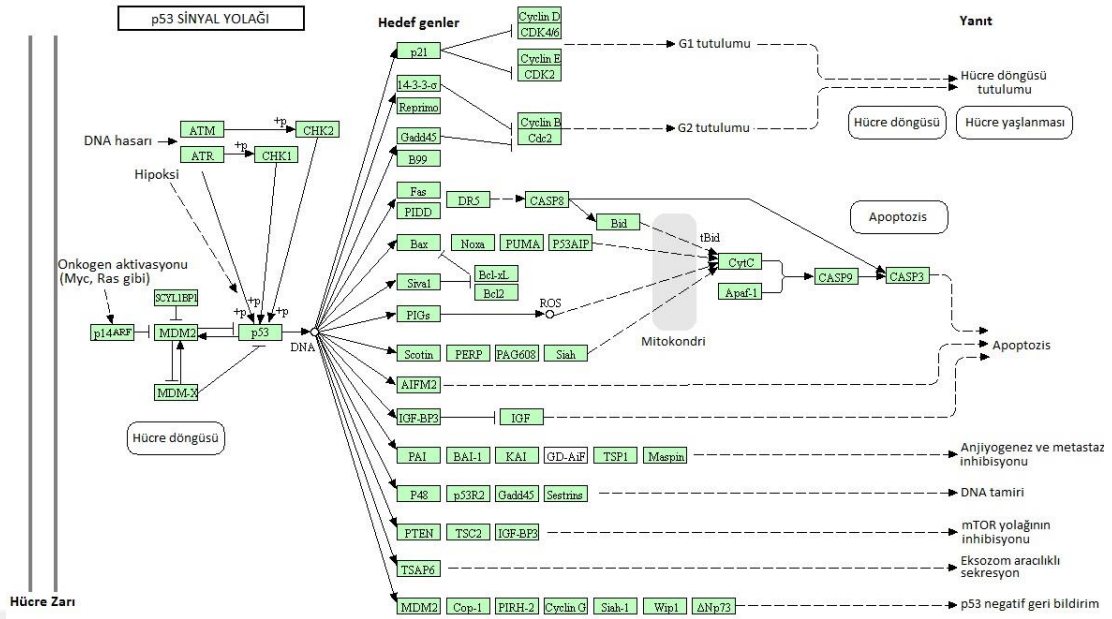
4.3 TP53 GENİ ve PROTEİN ÜRÜNÜ p53

1970'li ve 80'li yıllarda, birçok kanser araştırmacısının odak noktası olduğu tümör virüsleri ve onkogenler üzerine yapılan çalışmaların çoğunda, birçok tümörde aşırı eksprese edilen hücreyel bir proteinin varlığını bildirmiştir. Yaklaşık olarak 53 kDa moleküler ağırlığa sahip olan ve 17. kromozomun p kolu üzerindeki TP53 geninden eksprese olan bu protein ise “p53” (p53 proteini) olarak adlandırılmıştır. Yapılan bu çalışmalarda p53 proteinin, onkojenik tümör virüslerinden olan simian virüs 40 (SV40) tarafından ekspresyonu sağlanan large-T onkoproteini, insan papillomavirüs E6 proteini ve adenovirüs E1B proteini ile kompleks oluşturdukları gözlemlenmiş ve bu yüzdende ilk başta p53 proteininin onkojenik özelliğe sahip olduğunu düşünmüşlerdir (Lane ve Crawford 1979; Roth ve Dobbelstein 2003; Travé ve Zanier 2016). Fakat, daha sonraları yapılan çalışmalarda p53 proteinin tıpkı Retinoblastoma proteini gibi onkojenik virüs proteinlerinin hedefi olduğu ve bu şekilde onkojenik virüs proteinleri ile kompleks oluşturarak inaktive olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca, Li-Fraumeni sendromu gibi TP53 geninin kalıtsal mutasyonlarına sahip bireylerde farklı kanser türlerinin gelişebildiği görülmüştür. TP53 geninin asıl olarak tümör baskılayıcı fonksiyonu olduğunun onaylanması, TP53 geni knock-out edilmiş mutant farelerde tümör gelişimi sıklığının yabancıl TP53 genine sahip bireylere göre çok daha fazla olduğu gözlemlenmesi ile gerçekleşmiştir (Baker ve ark. 1990; Donehower ve ark. 1992; Malkin ve ark. 1993).

4.4 p53'ÜN TÜMÖR BASKILAYICI FONKSİYONU

Normal hücrelerde p53 seviyesi ana inhibitörü olan Mouse double minute 2 (Mdm2) ile sıkı bir şekilde kontrol edilir. Mdm2, p53 tümör baskılayıcı proteininin

negatif regülatördür. Mdm2'nin p53 üzerinde iki esas rolü vardır. Bunlardan birincisi Mdm2, E3 ubikutin ligaz özelliği ile p53'ü N-terminal trans-activation domain (TAD) bölgesinden tanıyarak ubikutinler ve ikinci olarak ise hali hazırda bazal seviyede eksprese olan p53 proteinine bağlanarak etkisini inhibe eder. Hücrenin genomik bütünlüğünü bozan onkogen aktivasyonu, DNA hasarı, hipoksi ve besin yoksunluğu gibi stres durumları inaktif durumdaki p53 proteinini aktive eder. Hücrede DNA hasarının meydana gelmesi durumunda, bu hasarı tanıyan Ataxia telangiectasia mutated (ATM) ve Ataxia telangiectasia and Rad3 related (ATR) protein kinazları sırasıyla Checkpoint kinase 1 (Chk1) ve Checkpoint kinase 2 (Chk2) hücre döngüsü kontrol noktası kinazlarını fosforilleyerek aktive ederler. Aktive olan Chk 1/2 kinazları ise p53 proteinini N-terminal bölgesindeki serin 15, 20, 33, 46 ve treonin 18 bölgelerinden fosforille ederek Mdm2 aracılıklı protein degradasyonundan korur. Böylece stabil hale gelen ve bir transkripsiyon faktörü olan p53 proteini, hücre döngüsünü siklin bağımlı kinaz inhibitörü olan p21 proteinin ekspresyonunu artırarak durdurur. Hücredeki DNA hasarının tamir edilemez olduğu durumlarda ise p53 proteini Bcl-2 ailesine üye P53-Upregulated Modulator Of Apoptosis (PUMA) ve PMA-Induced Protein 1 (NOXA) proteinlerinin transkripsiyonunu sağlar. PUMA ve NOXA ise daha sonra Bax proteinlerinin ekspresyonunu sağlar ve Bax proteinleri ise mitokondriden sitokrom C salınımına neden olarak kaspaz-9 ve kaspaz-3 aracılığıyla hücrenin apoptoza girmesini sağlar. Ayrıca, hücrede Ras, Myc ve E1A gibi onkogenlerin ekspresyonlarının aşırı artması sonucu p14ARF, Mdm2 proteinine bağlanarak p53'ün stabil hale gelmesini sağlar ve hücre yine kaspaz-9 ve kaspaz-3 aracılığıyla apoptoza girer (Şekil 5).

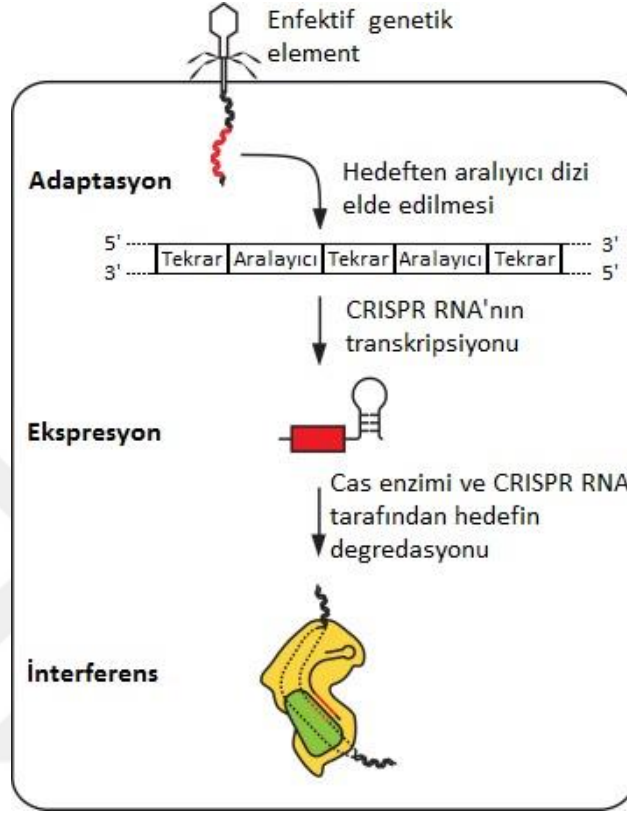


Şekil 5. p53 sinyal yolağı

4.5 CRISPR/Cas9

Bakteri ve arkelerde yabancı virüs veya bakteriyofajlara karşı kazanılmış bağışıklık sisteminin temelini oluşturan Clustered regularly interspaced palindromic repeats (CRISPR) yani düzenli aralıklarla bölünmüş palindromik tekrar dizileri, 21-48 baz çifti (bp) uzunluğunda olup her bir tekrar arasında 26-72 nükleotidlik “aralayıcı” DNA bölgeleri bulunmaktadır. Bu CRISPR dizilerinin hemen bitişiğindeki DNA bölgelerinde ise CRISPR-ilişkili endonükleaz özelliğine sahip Cas9 enziminin bulunduğu *cas* genleri bulunmaktadır (Haft ve ark. 2005; Barrangou ve ark. 2007). CRISPR/Cas9 sistemi bakterilerde genomik yapıyı enfektif virüs veya bakteriyofajlara karşı 3 aşamalı bir şekilde korur. Birinci aşamada, enfektif yapının bakterideki ilk istilasını sonunda, enfektif yapıya ait genetik materyal fragmanları konak bakteriye ait CRISPR bölgelerinin arasına “aralayıcı” olarak ilave edilir. İkinci aşamada, bakteride aynı enfektif yapı istilasının tekrarlanması CRISPR bölgesinin transkribe olmasına neden olur. Bu aşamada primer transkript olgun CRISPR RNA (crRNA) oluncaya kadar işlenir. Üçüncü aşamada, olgun crRNA'lar bir iskele vazifesi gören kodlamayan trans-aktive edici crRNA (noncoding trans-activating crRNA-tracrRNA) ile hibridize olarak Cas9 proteinleri ile kompleks oluşturur ve Cas9 enzimlerini istilacı DNA veya RNA'nın hedef dizisine komplementer olan nükleotid

dizi bölgesine yönlendirir. Aralayıcı crRNA ise istilacı DNA veya RNA dizisi ile eşleştğinde Cas9 enzimi aktive olur ve yabancı DNA veya RNA'da kırıklar meydana getirerek tahribata neden olur (Barrangou ve Marraffini 2014) (Şekil 6).

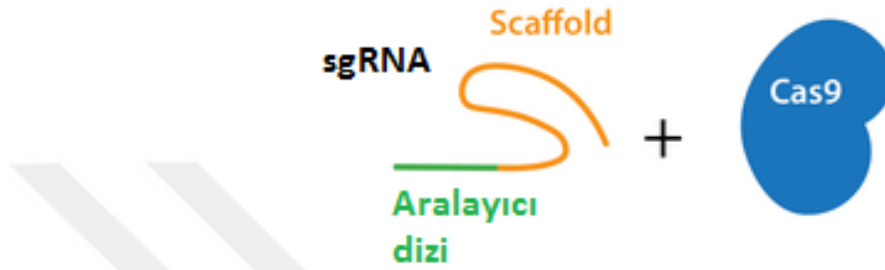


Şekil 6. CRISPR-Cas bağışıklığının kilit basamakları. 1) Adaptasyon: Yeni aralayıcıların CRISPR lokus bölgesine yerleştirilmesi. 2) İfade: CRISPR lokusunun transkripsiyonu ve CRISPR RNA'sının işlenmesi. 3) İnterferens: Mobil genetik elementlerin CRISPR RNA ve Cas proteini ile tespiti ve degradasyonu (Rath ve ark. 2015).

4.6 CRISPR/Cas9 SİSTEMİ ile GENOM DÜZENLENMESİ

CRISPR aracılı prokaryotik bağışıklık mekanizması aracılığıyla in vitro ve in vivo genomun hedeflenmesi ve düzenlenmesinde kullanılacak olan CRISPR sistemi bir small guide/guide RNA (gRNA/sgRNA) yani bir rehber RNA ve bir CRISPR ile ilişkili endonükleaz (Cas9) olmak üzere iki temel bileşenden oluşur (Şekil 7). Bunlardan birincisi olan sgRNA yapısı, crRNA ve tracrRNA nükleotid dizilerinin uygun bir plazmidin iskelet yapısına ardışık olarak yan yana birleştirilmesi ile

oluşturulmuştur. Böylece, yeni oluşan hibrit yapının U6 promotor nükleotid dizisi sonrası ilk ~20 nükleotidini hedef DNA bölgesine eşlenik olan “small guide RNA” (sgRNA) yani küçük rehber RNA dizisi oluştururken, geri kalan diziyi ise Cas9 enziminin bağlanması için iskele vazifesi gören “stem loop” yani sap ilmek yapısındaki “sgRNA scaffold” oluşturur. Böylece, sgRNA yapısındaki ilk ~20 nükleotidlik aralayıcı bölge Cas9 endonükleazını çalışılacak olan canlı genomdaki hedef DNA dizisine yönlendirir.



Şekil 7. CRISPR/Cas9 sisteminin temel bileşenleri (<https://www.addgene.org/crispr/guide/>, Erişim tarihi: 25 Nisan 2019).

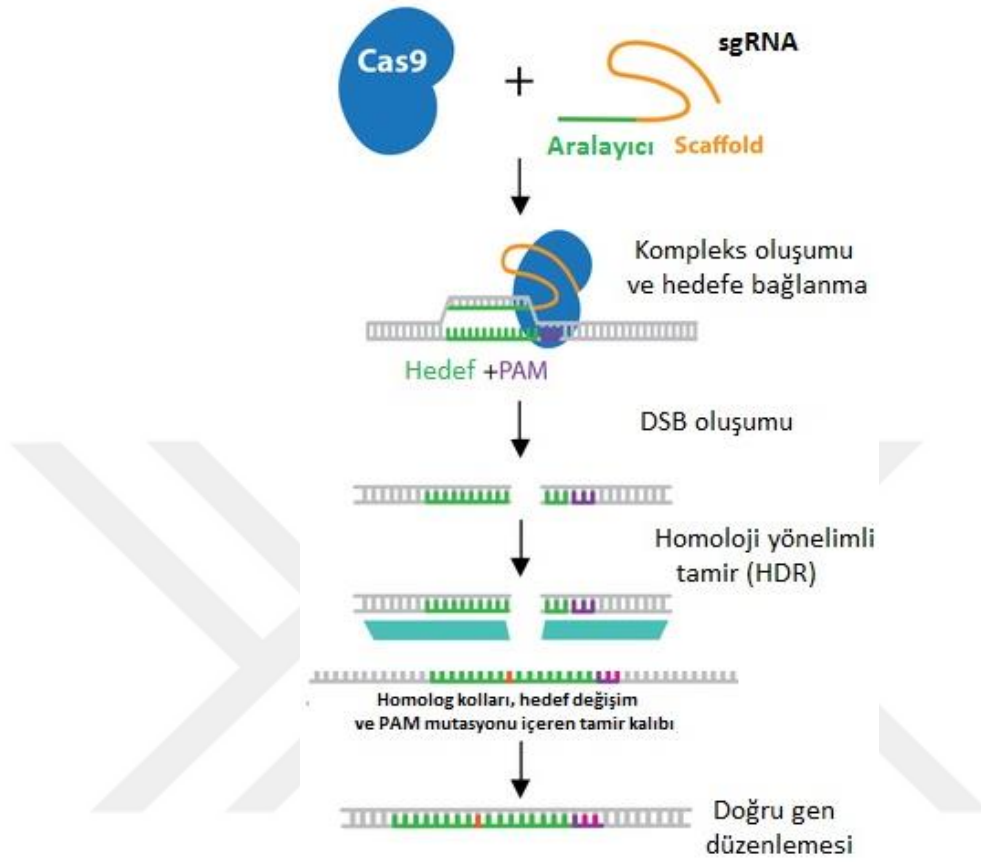
CRISPR/Cas9 sistemi ile hedeflenen DNA bölgesinde arzu edilen genetik modifikasyonu sağlayabilmek amacıyla, Cas9 endonükleazının çalışılacak olan canlı genomunda tek bir DNA dizisine eşlenik olan sgRNA aralayıcı dizisi ile hedef DNA dizisine yönlendirilmesi gerekir. Bunun içinde genetik modifikasyonun yapılacağı hedef DNA dizisine spesifik sgRNA aralayıcı dizi dizayn edilir. Fakat, dizayn edilen 20 nükleotidlik sgRNA aralayıcı dizisinin canlı genomunda karşılık geldiği dizinin 3' bölgesinde, Cas9 endonükleaz enziminin çalışabilmesi amacıyla, enzimin elde edildiği bakteri türüne göre nükleotid dizisi ve uzunluğu (3-5 nt) değişebilen bir “Protospacer Adjacent Motif” (PAM) bulunma zorunluluğu vardır. Cas9 endonükleazının aktif bir şekilde çalışabilmesi için enzimin C terminal bölgesinde bulunan iki arjinin biriminin (R1333 ve R1335) hedef aralayıcı dizi sonrası PAM motiflerindeki belirli nükleotid dizilerini tanıma zorunluluğu vardır. Streptococcus pyogenes bakterisinden elde edilen Cas9 enziminin ihtiyaç duyduğu PAM tanıma dizisi “NGG” iken, Staphylococcus aureus bakterisinden elde edilen Cas9 enziminin ihtiyaç duyduğu PAM tanıma dizisi ise “NNGRRT” dir. Ayrıca, farklı bakteri türlerinden elde edilen Cas9 enzimleri farklı uzunlukta (20-22) sgRNA aralayıcı dizilerine ihtiyaç duyarlar. Streptococcus

pyogenes bakterisinden elde edilen Cas9 enziminin ihtiyaç duyduğu sgRNA aralayıcı dizi uzunluğu 20 nükleotid iken, Staphylococcus aureus bakterisinden elde edilen Cas9 enziminin ihtiyaç duyduğu sgRNA aralayıcı dizi uzunluğu 21-22 nükleotidtir.

sgRNA aralayıcı dizisi ile hedef DNA bölgesine bağlanan Cas9 enzimi burada çift iplikli DNA yapısını bir fermuar gibi açar ve iki fonksiyonel endonükleaz bölgesi olan RuvC ve HNH domaini ile sgRNA aralayıcı dizisinin bağlandığı downstream bölgesinin ~3-4 nükleotid aşağısında double strand break (DSB) yani çift iplik kırığı oluşturur (Jinek ve ark 2012). CRISPR/Cas9 sistemi ile oluşan DSB ise hücre iki farklı tamir sisteminden birinin aracılığıyla tamir edilir. Bunlardan birincisi; “homology-directed repair” (HDR) yani homoloji yönelimli tamir ve ikincisi ise; “non-homologous end-joining” (NHEJ) yani homolog olmayan uç birleştirme tamir mekanizmasıdır. NHEJ tamir mekanizması hücrede en aktif onarım mekanizmasıdır ve genellikle DSB sahasında küçük nükleotid insersiyonlarına veya delesyonlarına neden olur. HDR tamir mekanizması ise DSB bölgesini tamir etmek amacıyla sağlam olan alleli ya da hücre içine sokulan hedef bölgenin değişime uğramamış sağlam nükleotid dizisini içeren bir kalıp DNA parçasını kullanarak tamir etmeye çalışır. Yani, NHEJ tamir mekanizması hedef genin açık okuma çerçevesini bozsa da, HDR tamir mekanizması hedef gen bölgesinde tek bir nükleotid değişiminden, florofor gen eklenmesi gibi daha büyük nükleotid değişikliklerini üretmek için kullanılabilir. HDR aracılığıyla gen düzenlemesi yapabilmek için, hücre içine arzu edilen değişimi taşıyan DNA tamir kalıbı ile birlikte CRISPR/Cas9 sistemi aktarılmalıdır. Tamir kalıbı, istenen değişimin yanı sıra, hedef DNA bölgesinin hemen yukarısında ve aşağısında (sol ve sağ homoloji kolları) rekombinasyon sırasında kılavuz görevi görecek ek homolog nükleotid dizileri içermelidir (Şekil 8).

Uygulamaya bağlı olarak, tamir kalıbı single-stranded oligodeoxynucleotide (ssODN) yani tek iplikli bir oligonükleotid, double-stranded oligodeoxynucleotide (dsODN) yani çift iplikli bir oligonükleotid veya çift iplikli bir DNA plazmidi olabilir. Fakat, çoğu çalışmada ssODN tamir kalıbının HDR aracılıklı tamir mekanizmasında daha verimli olarak kullanıldığı gösterilmiştir. Ayrıca, tamir kalıbı tasarlanırken, hedef DNA bölgesinde bulunan PAM dizisinin dahil edilmemesi gerekir. Bu adım, tamir kalıbının Cas9 enzimi için uygun bir hedef olmasını önler. Diğer bir yol olarak da, tamir kalıbı içinde bulunan PAM DNA dizisini, amino asit dizisini değiştirmeyen

sessiz bir mutasyon ile değiştirmek suretiyle Cas9 enzim kesiminden korumak mümkündür (Şekil 8).



Şekil 8. CRISPR/Cas9 sistemi ile hedef DNA bölgesi üzerinde HDR aracılıklı gen düzenlemesinin Şematik gösterimi (<https://www.addgene.org/crispr/guide/>, Erişim tarihi: 25 Nisan 2019).

CRISPR/Cas9 sisteminin ve ssODN gibi bir tamir kalıbının aktarıldığı hücrelerde HDR aracılıklı tamir ilk çalışmalarda %5-10 arasında gerçekleŐirken, günümüzde tamir kalıbının PAM dizisinde değişimlerin meydana getirilmesi gibi çeşitli geliŐmeler ıŐıęında HDR oranı %40'lara kadar yükselmiŐtir. Sonuç olarak, gen düzenlemesi yapılmak istenen hücrelere CRISPR/Cas9 sisteminin ve ssODN gibi bir tamir kalıbının aktarılmasıyla hedef gen üzerinde HDR tamir mekanizması aracılığıyla mutasyona uğramış nükleotidler yeniden yabancı tipleri ile deęiŐtirilerek birçok hastalığın önüne geçilebilir.

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1 HÜCRE HATTI ve KÜLTÜRÜ

Kuru buz ile gelen ve kriyo tüpde American Type Culture Collection (ATCC, A.B.D)'den alınan PC-3 insan prostat kanser hücre hattı ilk olarak 37⁰C'de su banyosunda bekletilerek çözüldü. Hücrelerin çözülmesi tamamlandıktan sonra kriyo tüpün kapakları kontaminasyonu önlemek için %70'lik etil alkolle silindikten sonra laminar flow kabin içerisinde (EuroClone, Italy) açılarak hücreler 1 ml'lik steril mikropipetle çekilerek, içerisinde %10 fetal sığır serumu (FBS) (Gibco, A.B.D), 1X Penisilin/Streptomisin (Gibco, A.B.D) ve 1X Glutamax (Gibco, A.B.D) bulunana 10 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) (Gibco, A.B.D) besi yeri bulunan 15 ml'lik kapaklı steril tüplere aktarıldı. Aktarılan hücreler 1000 RPM'de, 25⁰C'de, 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra tüpteki sıvı kısım olan supernatant döküldü ve hücrelerin dibe çökerek oluşturduğu pellet elde edildi. Pelletin üzerine 10 ml DMEM/F-12 besiyeri eklenip pipet tabancası yardımıyla 10 mL'lik pipetlerle pipetaj yapılarak hücrelerin besiyerinde homojen olarak dağılması sağlandı. Pipetaj işleminden sonra toplanan hücreler içinde 40 ml DMEM/F-12 bulunan 75 cm²'lik kapağı filtreli olan hücre kültür flaskına aktarıldı. Ardından, hücreler 37⁰C ve %5 CO₂'li nemli inkübatöre kaldırıldı. Hücre hattının 3 gün boyunca besi yeri tazelenip günlük bakımı yapıldıktan sonra eski besi yeri flasktan uzaklaştırıldı. Flasktaki besiyeri kalıntılarını uzaklaştırmak amaçlı hücre kültürü PBS (phosphate buffered saline) tamponu ile yıkandı ve işlem sonrası PBS flasktan uzaklaştırıldı. Hücrelerin pasajlanması amacıyla, flask yüzeyine yapışan hücreleri kaldırmak için ortam 4 ml Trypsin-EDTA (0,25%) ile 3 dakika boyunca 37⁰C inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tripsinin hücre ölümüne sebep olmaması için ortam üzerine 10 ml DMEM/F-12 eklendi. Ardından hücreler başka bir flaskta alınıp üzerine yeterli miktarda besiyeri eklendi. Ardından hücreler tekrar 25⁰C'de, 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra tüpteki sıvı kısım olan supernatant döküldü ve hücrelerin dibe çökerek oluşturduğu pellet elde edildi. Elde edilen hücrelerin bir kısmı 900 µl

Dimethyl sulfoxide (DMSO) + 100 µl FBS ile kriyo tüpler içinde ileri analizler için - 86°C’de stoklanırken, arta kalan hücreler devam çalışmaları için 75 cm²’lik kültür flasklarına aktarılıp inkübasyona alındı.

5.2 HÜCRE SAYIMI ve CANLILIĞININ ÖLÇÜMÜ

Her pasajlama işlemi sırasında tripsinizasyon işlemi sonrası hücrelerin canlılığının ölçümü ve sayımı amacıyla DMEM/F-12 içinde olan hücreler 10 mL’lik pipetle narin bir şekilde pipetaj yapılarak hücrelerin besiyerinde homojen olarak dağılması sağlandı. Homojenize edilen hücrelerin bulunduğu besi yerinden 20 µl alınarak 1,5 mL’lik santrifüj tüpüne aktarıldı. 20 µl üzerine 380 µl Muse® Count & Viability Assay Kit (Merck, Almanya) solüsyonundan ilave edilerek 5 dakika beklendi. 5 dakika sonunda toplam 400 µl karışım içinde bulunan hücreler hafif vortekslenerek sayım için MUSE (Merck, Almanya) cihazında sayıldı.

5.3 ssODN’LER ve PLAZMİDLER

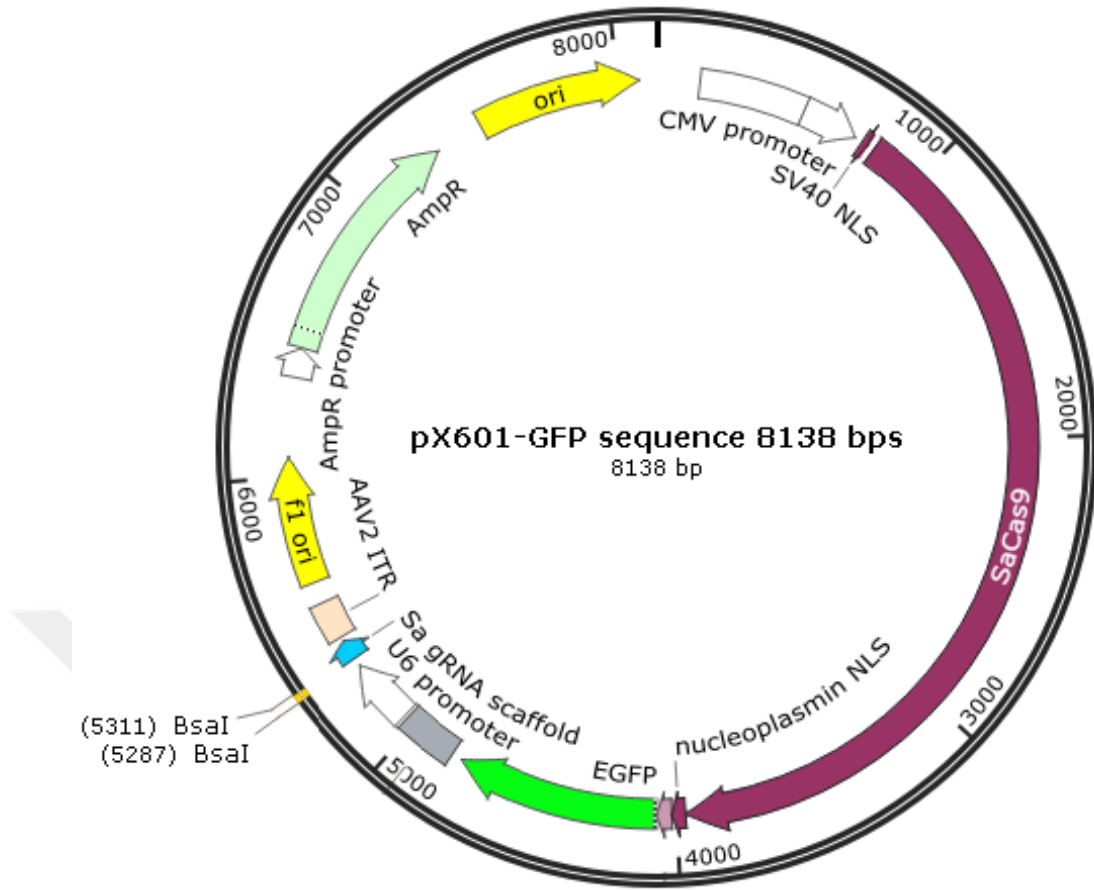
Bu çalışmada üç farklı ssODN kullanılmıştır. Birinci ssODN olan ssODN1 DNA sarmalındaki kalıp ipliğe komplementer olup TP53 414delC mutasyonunun bulunduğu bölgenin mutasyonsuz halini taşımaktadır. Kullanılan ssODN uzunluğu 80 nükleotid olup 5’ uçtan itibaren 41. nükleotid PC-3 hücresinde delesyona uğramış C nükleotidine karşılık gelmektedir. 35. nükleotid ise TP53 414delC bölgesi tamir olduktan sonra mutasyon bölgesinde CRISPR/Cas9 sisteminin tekrar çift iplik kırığı oluşturmasını engellemek amacıyla p53 amino asit dizisinde bir değişikliğe neden olmayacak şekilde yani sessiz mutasyonu sağlamak için A nükleotidi G nükleotidine dönüştürülmüştür (Tablo 1). Bu şekilde ssODN1 aracılığıyla HDR tamir etkinliğini arttırmak için 17. kromozomun 7 578 522. nükleotidinde (chr17:7.578.522) rehber-blokaj mutasyonunun (A>G) meydana getirilmesi planlanmıştır (Tablo 1). İkinci ssODN olan ssODN2 DNA sarmalındaki kalıp olmayan ipliğe komplementer olup TP53 414delC mutasyonunun bulunduğu bölgenin mutasyonsuz halini ve sessiz rehber-blokaj mutasyonu (T>C) taşımaktadır (Tablo 1). Üçüncü ssODN olan ssODN3 ise DNA sarmalındaki kalıp ipliğe komplementer olup PC-3 hücrelerinde bulunan TP53 414delC mutasyon bölgesinde herhangi bir değişime neden olmayan diziye sahiptir (Tablo 1). ssODN3, apoptozis deneylerinde kontrol amacıyla kullanılmıştır. Tüm

ssODN'lerin 5' ve 3' uçları nükleaz aktiviteden korunmak amacıyla fosforotiat'lanmış ve yıldız işareti ile gösterilmiştir. Tüm ssODN'lerin sentezi Metabion (Almanya) firması tarafından gerçekleştirilmiştir.

Tablo 1. ssODN nükleotid dizisi.

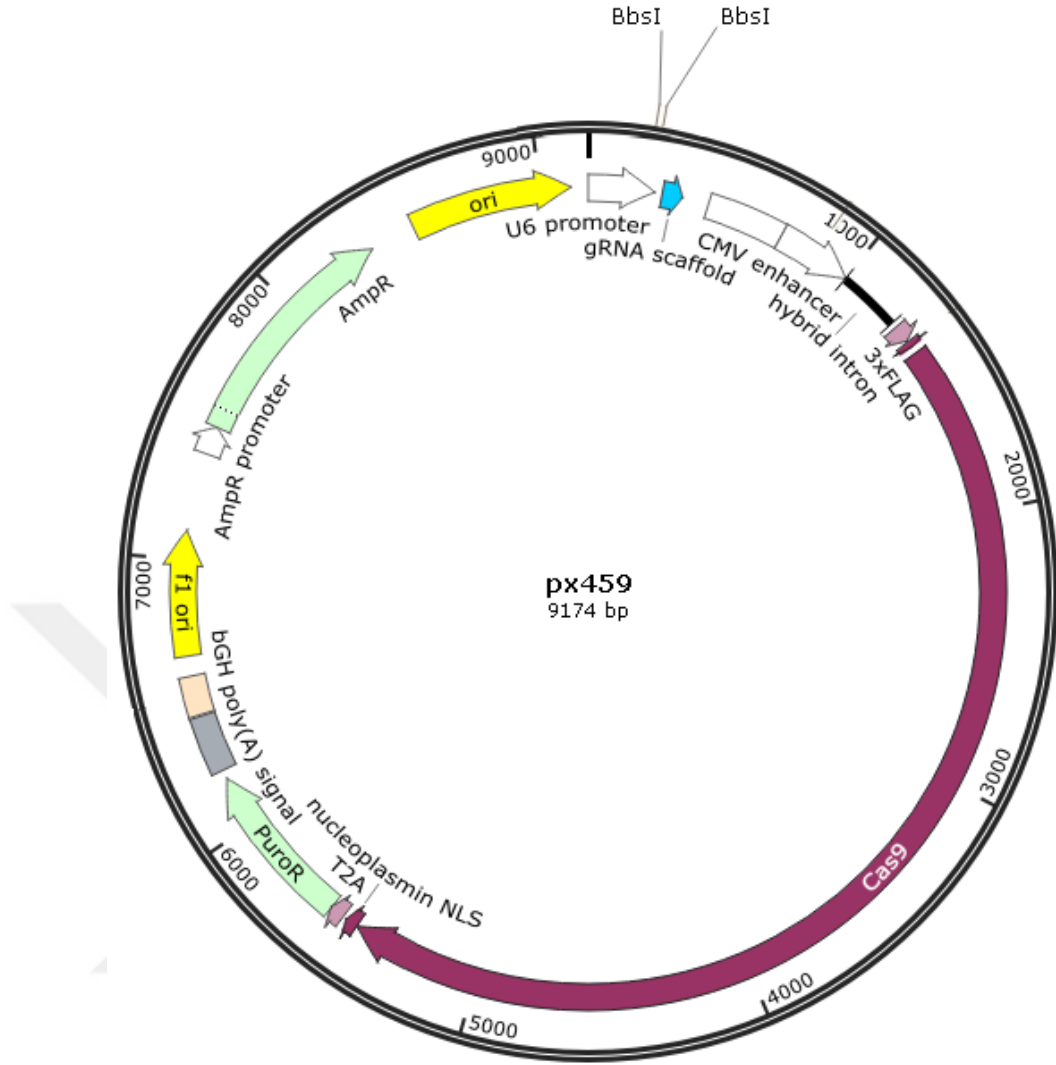
ssODN adı	Nükleotid Dizisi
ssODN1 nükleotid dizisi	5'A*G*T*ACTCCCCTGCCCTCAACAAGATGTT TTGCCAG <u>CTGGCC</u> AAGACCTGCCCTGTGCAG CTGTGGGTTGATTCCACAC*C*C*3'
ssODN2 nükleotid dizisi	5'G*G*G*TGTGGAATCAACCCACAGCTGCAC AGGGCAGGTCTT <u>GCCAGCT</u> GGCAAAACATC TTGTTGAGGGCAGGGGAGTA*C*T*3'
ssODN3 nükleotid dizisi	5'A*G*T*ACTCCCCTGCCCTCAACAAGATGTT TTGCCAACTGGCAAGACCTGCCCTGTGCAGC TGTGGGTTGATTCCACACC*C*C*3'

Çalışma için kullanılan plazmidler Addgene firmasından tedarik edilen kompetent Escherichia coli bakterilerinden izole edilerek elde edilmiştir. Bu çalışma için yapısında bakteriyel replikasyon için gerekli olan diğer özellikler dışında, ekspresyonları Sitomegalovirus (CMV) promotörü (Bisistronik) tarafından sağlanan Staphylococcus aureus Cas9 (SaCas9) endonükleaz ve green fluorescence protein yani yeşil floresan proteini (GFP) belirteç geni kodlama bölgesine sahip px601-GFP plazmidini (Şekil 9; Addgene, Catalog No 84040) kullanıldı. Çalışma için px601-GFP plazmidinin seçilmesinin nedeni yapısında bulundurduğu yeşil floresan protein geni sayesinde ilgili plazmid ve tek iplikli donör tamir kalıbı DNA oligodeoksinükleotidlerinin yani ssODN'lerin (Tablo 1) hücrelere hangi transfeksiyon yöntemi ya da plazmid+ssODN miktarı ile daha etkili transfekte edildiğinin gözlemlenebilecek olmasıdır.



Şekil 9. px601-GFP plazmid iskelet yapısı: Plazmid omurgası 8138 baz çiftinden oluşmaktadır. Bakteriyel replikasyon için pUC ori ve antibiyotik direnci için amp, silin gen bölgesini içerir. Ampisilin gen bölgesi, plazmid aktarımının gerçekleştiği bakterilerin ortamdan seçilimine olanak sağlar.

Ayrıca, çalışmada ekspresyonları yine CMV promotörü (Bisistronik) tarafından sağlanan *Streptococcus pyogenes* Cas9 (SpCas9) endonükleaz ve Puromycin direnç geni kodlama bölgesine sahip px459V2.0 (Şekil 10; Addgene, Catalog No 62988) plazmidi kullanıldı. px601-GFP ve px459V2.0 plazmidlerinde yer alan 20 baz uzunluğundaki gRNA'ların transkripsiyonu ise U6 promotörü tarafından sağlanmaktadır. px459V2.0'ın seçilmesinin nedeni ise ilgili plazmidin girmedığı yani CRISPR/Cas9 sistemi ile genomu modifiye edilmemiş hücrelerin puromycin aracılığıyla ortamdan eliminasyonunu sağlayacak olmasıdır.



Şekil 10. px459 V2.0 plazmid iskelet yapısı: Plazmid omurgası 9174 baz çiftinden oluşmaktadır. Yapısında bulunacak gRNA uzunluğu 19-20 baz olmak zorundadır. Bakteriyel replikasyon için pUC ori ve antibiyotik direnci için Ampisilin gen bölgesini içerir. Ampisilin gen bölgesi, plazmid aktarımının gerçekleştiği bakterilerin ortamdaki seçilimine olanak sağlar. gRNA transkripsiyonu U6 promotoru tarafından sağlanır. CMV promotoru Cas9 endonükleaz ve Puromisin ifadesini sağlar. Klonlama işlemi için gerekli BbsI restriksiyon enzim kesim bölgesi şekil üzerinde gösterilmiştir.

5.4 PLAZMİD ÇOĞALTIMI ve KÜÇÜK ÖLÇEK İZOLASYONU

Addgene'den katı Luria Bertani (LB) agar stab içerisinde getirtilen ve kompetent *E. coli* bakterilerinin bünyesinde bulundurduğu px601-GFP ve px459 V2,0 plazmidlerinin eldesinde ilk adım olarak ilgili taşıyıcı bakterilerin stabdan 100 µg/ml

ampisilin içeren seçici LB agar plate'de çizgi plaka yöntemiyle tek koloniye düşürüldü. İkinci adımda, 100 µg/ml ampisilin içeren 5 ml'lik sıvı LB medyum bulunduran iki ayrı 15 ml'lik tüplerden birincisine bünyesinde px601-GFP plazmidi, ikincisine ise bünyesinde px459V2,0 plazmidi bulunduran tek koloni bakterilerine değiştirilen steril pipet ucu atıldı. Medyum 37°C'de, 150 rpm'de çalkalayıcı inkübatörde 16 saat inkübe edildi. 16 saat sonunda çoğalan ve bünyelerinde px601-GFP ve px459V2,0 plazmidleri bulunduran farklı tüplerde inkübe edilen bakterilerden ilgili plazmidlerin izolasyonu ticari Plasmid Miniprep İzolasyon kitinin (GenemarkBio, Tayvan) ilgili prosedürüne göre gerçekleştirildi. Elde edilen plazmidlerin miktar ve saflığı Nanodrop cihazı (Maestrogen, Tayvan) aracılığıyla kontrol edildi. Tüm yapılan bu işlemler ileriki aşamalarda elde edilen gRNA1 ve gRNA2 duplexlerinin klonlandığı plazmidler içinde gerçekleştirildi.

5.5 KÜÇÜK ÖLÇEK PLAZMİDLERİN POLİMERAZ ZİNCİR (PZR) REAKSİYONLARININ GERÇEKLEŞTİRİLMESİ

Sanger sekans yöntemi ile küçük ölçek plazmidlerin doğruluğunu sağlamak amacıyla ilk olarak hedef px601-GFP plazmidinin U6 promotorunun 3' bölgesi ile sgRNA nükleotid bölgesi px601GFPP1 ve px601GFPR1 primer çiftiyle ve px459V2,0 plazmidinin U6 promotorunun 3' bölgesi ile sgRNA nükleotid bölgesi ise px459F1 ve px459R1 primer çifti (Tablo 2) ile polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) aracılığıyla çoğaltıldı. Tüm yapılan bu işlemler ileriki aşamalarda elde edilen sgRNA1 ve sgRNA2 duplexlerinin klonlandığı plazmidler içinde gerçekleştirildi.

Tablo 2. px601-GFP ve px459V2,0 plazmid kontrol primer çiftleri.

Primer adı	Primer nükleotid dizisi
px601GFPP1	5' TTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTT 3'
px601GFPR1	5' ACTCCATCACTAGGGGTTCC 3'
px459F1	5' TTTGTGATGCTCGTCAGGGG 3'
px459R1	5' CCAAGTGGGCAGTTTACCGT 3'

Hedef bölgelerin PZR aracılığıyla çoğaltımı toplam 50 µl reaksiyon hacmiyle gerçekleştirildi. Aşağıdaki bileşenlere standart 50 µl hacime ulaşacak şekilde Tablo 3’de belirtildiği gibi ultra distile su eklendi.

Tablo 3. Küçük ölçek plazmid PZR reaksiyon bileşenleri.

Reaksiyon bileşenleri
X µl 100 ng plazmid DNA
5 µl 10x reaksiyon tamponu
4 µl 2.5 mM MgCl ₂
2 µl 20 µM dNTPs
2 µl PrimerForward (10 pmol/µl)
2 µl PrimerReverse (10 pmol/µl)
0,5 µl 5U/µL HotStart Taq polimeraz (GenemarkBio, Tayvan)
X µl ddH ₂ O
50 µl Total

PZR döngü koşulları; ısı döngü cihazının kapak sıcaklığı 105°C olacak biçimde, 35 döngü (denatürasyon, bağlanma ve uzama işlemi) ısı döngü cihazında (SensoQuest, Almanya) gerçekleştirildi (Tablo 4).

Tablo 4. PZR döngü koşulları.

Döngü koşulları
94°C’de 15 dakika (ön denatürasyon)
94°C’de 45 saniye (denatürasyon)
61°C’de 45 saniye (bağlanma)
72°C’de 1 dakika (uzama)
72°C’de 5 dakika (son uzama)

5.6 KÜÇÜK ÖLÇEK PLAZMİD PZR ÇOĞALTIM ÜRÜNLERİNİN AGAROS JEL ELEKTROFOREZİ

Elektroforez adımıında kullanılacak olan %1'lik agaroz, 100 ml 1XTris-Asetat-EDTA (TAE) tampon içine 1 gram agaroz (GMbiolab, Tayvan) ilavesi ardından ısıtılarak elde edilmiştir. %1'lik agaroz jel hazırlandıktan sonra karışıma 5µl SafeView DNA Stain (GMbiolab, Tayvan) ilave edildi. SafeView DNA Stain'in iyice karışması için jel bir süre dairesel olarak erlen-mayer içinde karıştırıldıktan sonra, kuyucukların oluşmasını sağlayan tarakların bulunduğu traye döküldü. Bir süre sonra donan jelden taraklar çıkarılmış ve jel, içinde 1XTAE tamponu bulunan elektroforez tankına kondu. PZR sonucu elde edilen ürünler ve 100 bazçiftlik (bp) DNA moleküler boyut belirteçleri (M/marker) (Solis BioDyne, Estonya) jelde bulunan kuyucuklara yüklendi. Sonuçta, PZR ürünleri ve DNA moleküler boyut belirteçleri (M/marker) %1 agaroz konsantrasyonu ve 0,5 µl /ml SafeView DNA Stain içeren jellerde, 1XTAE tamponu içerisinde 5 V/cm olacak şekilde yaklaşık 1 saat yürütüldü. Jelde SafeView DNA Stain varlığında UV ışığı altında görülen PZR çoğaltım ürünlerinin fotoğrafları UV görüntüleme cihazıyla (Gene Genius, Birleşik Krallık) çekildi. Tüm yapılan bu işlemler ileriki aşamalarda elde edilen sgRNA1 ve sgRNA2 aralayıcı duplexlerinin klonlandığı plazmidler içinde gerçekleştirildi.

5.7 KÜÇÜK ÖLÇEK PLAZMİD PZR ÇOĞALTIM ÜRÜNLERİNİN SANGER SEKANS DOĞRULAMA ANALİZLERİ

Elde edilen PZR ürünleri %1'lik agaroz jelde 1 saat yürütülüp amplifikasyonun olduğu doğrulandıktan sonra her bir PZR reaksiyonundan 10 µl alındı ve üzerlerine 2,5 µl shrimp alkalen fosfataz ve 1 µl Ekzonükleaz I ilave edildi. Ardından örnekler ısı döngü cihazında, artan primer ve dNTP'lerin ortamdan eliminasyonu için, 37°C'de 30 dakika ve 95°C'de 5 dakika ısı döngü cihazında (SensoQuest, Almanya) temizlik aşamasına tabi tutulmuştur. Temizlik aşamasından sonra her bir hedef plazmidin PZR örneği için ayrı ayrı PCR tüplerine aşağıdaki bileşenler ilave edilmiştir (Tablo 5).

Tablo 5. Sanger sekans PZR reaksiyon bileşenleri.

Reaksiyon bileşenleri
2 µl PCR örneği
1 µl 10X BigDye Buffer (ABI/ A.B.D)
0,5 µl px601gfpF1 veya px459F1 primeri
0,5 µl BigDye (ABI/ A.B.D)
6 µl ddH ₂ O
10 µl total

Hazırlanan bileşenlerin sekans PZR reaksiyonları, kapak sıcaklığı 105°C olacak biçimde, 35 döngü (denatürasyon, bağlanma ve uzama işlemi) ısı döngü cihazında (SensoQuest, Almanya) gerçekleştirildi (Tablo 6).

Tablo 6. PZR döngü koşulları.

Döngü koşulları
96°C'de 1 dakika (ön denatürasyon)
96°C'de 10 saniye (denatürasyon)
50°C'de 5 saniye (bağlanma)
60°C'de 4 dakika (uzama)
4°C'de ∞ (son uzama)

Son olarak elde edilen sekans PZR ürünleri sanger sekans cihazında (ABI genetic analyzer 3130, A.B.D) okutularak hedef bölgenin nükleotid dizileri elde edilerek hedef plazmidlerin doğrulaması yapıldı. Tüm yapılan bu işlemler ileriki aşamalarda elde edilen sgRNA1 ve sgRNA2 aralayıcı duplexlerinin klonlandığı plazmidler içinde gerçekleştirildi.

5.8 CRISPR/Cas9 HEDEF BÖLGESİ ve HEDEF BÖLGESİNE ÖZGÜ sgRNA ARALAYICI DİZİ DİZAYNI

Çalışmada hedeflenen genom bölgesi PC-3 hücrelerinin genomunda yer alan TP53 gen bölgesi üzerinde yer alan 414delC mutasyonunun bulunduğu 17.

kromozomun 7 578 516. nükleotitidir (chr17:7.578.516). Canlı genomunda düzenlenmesi istenen DNA sekansının hedeflemesi için gerekli olan sgRNA aralayıcı dizaynı “CCTop – CRISPR/Cas9 targetonlinepredictor” ve “RNA-guidedendonuclease (RGEN) Tools: Cas-OFFinder&Cas-Designer” online software programları aracılığıyla dizayn edilmiştir. Bu sebeple, canlı genomu üzerinde hedef dışı kesimleri yani off-target seviyesi en az olan ve TP53 414delC hedef mutasyon noktasına en yakın 2 farklı sgRNA aralayıcı (Tablo 7) dizayn edildi. sgRNA1 aralayıcı dizisi canlı genomunda TP53 414delC hedef mutasyon noktasının 17 baz çifti uzaklıkta DSB oluştururken, sgRNA2 aralayıcı dizisi ise TP53 414delC hedef mutasyon noktasının direk olarak üzerinde DSB oluşturmaktadır. sgRNAF1 ve gRNAF2 primerlerinin 5’ uçlarına plazmidlerde enzim kesimi sonucu açığa çıkacak olan yapışkan uçlara ligasyon işlemi ile bağlanabilmesi için “5’ CACC 3’ ” nükleotid dizisi eklenirken, sgRNAR1 ve sgRNAR2 primerlerinin 5’ uçlarına “5’ AAAC 3’ ” nükleotid dizisi ilave edilmiştir.

Tablo 7. Hedef DNA bölgesi, sgRNA aralayıcı dizi adlandırması ve sgRNA aralayıcı dizi nükleotid dizileri.

Hedef DNA bölgesi	sgRNA adı	sgRNA nükleotid dizisi
TP53 414delC	sgRNAF1	5’ caccCAACAAGATGTTTTGCCAAC 3’
	sgRNAR1	5’ aaacGTTGGCAAACATCTTGTTG 3’
TP53 414delC	sgRNAF2	5’ caccACAGGGCAGGTCTTGCCAGT 3’
	sgRNAR2	5’ aaacACTGGCAAGACCTGCCCTGT 3’

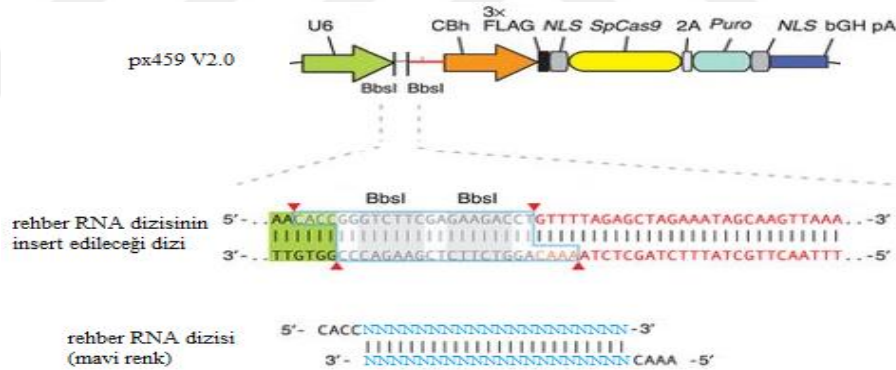
5.9 PLAZMİDLERİN RESTRİKSİYON ENDONÜKLEAZ ENZİM KESİMLERİ

Çalışmada kullanılan tüm yüksek verimli restriksiyon endonükleaz kesim enzimleri, alkalin fosfat ve bu enzimlere ait tampon çözeltiler New England Biolabs (NEB, İngiltere) firmasından sağlandı. Tüm kesim reaksiyonları için aşağıda verilen reaksiyon karışımları kullanıldı (Tablo 8).

Tablo 8. Restriksiyon endonükleaz enzim kesim reaksiyon bileşenleri.

Reaksiyon bileşenleri
1 µg px459 V2.0 plazmidi
1 µl BsaI-HF veya BbsI-HF enzimi (NEB)
1 µl Alkaleen Fostataz (NEB)
2 µl 10X CutSmart Buffer (NEB)
X µl ddH ₂ O
20 µl total

px459 plazmidi BbsI restriksiyon endonükleaz kesim enzimiyle (Şekil 11) 37 °C’de 1 saat ısı döngü cihazında (SensoQuest, Almanya) ilgili hedef bölgesinden kesildi. Kesim ile birlikte plazmidlere sgRNA aralayıcı dizilerinin ligasyonunu sağlamak ve yapışkan uçların kesim sonrası tekrar bağlanmalarını engellemek amacıyla açıkta kalan fosfat grupları alkaleen fosfataz ile muamele edildi.



Şekil 11. px459V2,0 plazmidi üzerindeki BbsI ve restriksiyon endonükleaz enzim kesim bölgesi.

5.10 RESTRİKSİYON ENDONÜKLEAZ ENZİM KESİMİ YAPILAN PLAZMİD DNA PARÇALARININ AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ ve JELDEN GERİ ELDESİ

Enzim kesimi yapılmış 9153 baz çiftlik px459 V2,0 plazmid DNA parçalarının elektroforezi için %1'lik agaroz jel hazırlandıktan sonra karışıma 5µl SafeView DNA

Stain (GMbiolab, Tayvan) ilave edildi ve boya ile jelin homojen olması için jel bir süre erlen-mayer içinde karıştırıldıktan sonra, kuyucukların oluşmasını sağlayan tarakların bulunduğu traye döküldü. Bir süre sonra donan jelden taraklar çıkarıldı ve jel, içinde 1X TAE tamponu bulunan elektroforez tankına kondu. Enzim kesimi yapılan plazmid ve 1 Kilobazçiftlik (Kb) DNA moleküler boyut belirteçi (M/marker) (Solis BioDyne, Estonya) jelde bulunan kuyucuklara yüklendi. Ardından örnekler 5 V/cm olacak şekilde yaklaşık 1 saat agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Jelde SafeView DNA Stain varlığında UV ışığı altında görülen plazmid DNA bantı bistüri yardımıyla agaroz jelden ince bir şekilde kesilip alındı. İçinde plazmid DNA parçalarının bulunduğu agaroz jel parçaları mikrosantrifüj tüpüne kondu. Plus Gel Elution izolasyon kiti (GMbiolab, Tayvan) aracılığıyla üretici firmanın ilgili kit prosedürüne göre agaroz jelden plazmid DNA parçaları geri elde edildi.

5.11 BAĞLANMA (LİGASYON)

Agaroz jelden geri kazanılan ve restriksiyon endonükleaz muamelesi ile kesilen plazmid DNA parçalarına sgRNA aralayıcı dizilerinin bağlanması için bağlanma (ligasyon) reaksiyonları yapıldı. Bunun için ilk başta, sgRNA aralayıcı dizi oligolarının 5' uçları T4 polinükleotid kinaz (NEB, İngiltere) enzimi ile 37°C'de 30 dakika, 95°C'de 5 dakika ve 95°C'den 25°C'ye dakikada 5°C incek şekilde ısı döngü cihazında (SensoQuest, Almanya) fosforile edilip oligo duplexi haline getirildi. T4 polinükleotid kinaz için gereken reaksiyon bileşenleri Tablo 9'da belirtilmiştir.

Tablo 9. T4 polinükleotid kinaz için gereken reaksiyon bileşenleri.

Reaksiyon bileşenleri
1 µl gRNAF1 + 1 µl gRNAR1 veya 1 µl gRNAF2 + 1 µl gRNAR2 (100 pmol)
1 µl 10X T4 Ligation Buffer (NEB)
6,5 µl ddH2O
0,5 µl T4 PNK (NEB)
10 µl Total

Fosforile edilen ve duplex formuna kavuşturulan sgRNAF1 ve sgRNAR1 aralayıcı dizi duplexine sgRNA1 adı verildi. Fosforile edilen ve duplex formuna

kavuşturulan sgRNAF2 ve sgRNAR2 aralayıcı dizi duplexine ise sgRNA2 adı verildi. Ardından jelden geri elde edilen px459 V2.0 plazmid DNA parçalarına sgRNA1 ve sgRNA2 duplexlerinin ligasyonu için ayrı ayrı 0.2 mililitrelik (ml) PZR tüplerinde Quick Ligase (NEB) ligasyon enzimi ile ligasyon reaksiyonu kuruldu. Son olarak, hazırlanan aşağıdaki bileşenler pipetaj yardımıyla karıştırılarak oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi (Tablo 10).

Tablo 10. Ligasyon reaksiyon bileşenleri.

Reaksiyon bileşenleri
X µl BsaI veya BbsI ile kesilmiş px601-GFP veya px459 V2.0 plazmidi (50 ng)
1 µl fosforile oligo gRNA1 veya gRNA2 duplexi (1:250 dilüe edilmiş)
5 µl 2X Quickligation Buffer (NEB)
1 µl Quick Ligase (NEB)
X µl ddH ₂ O
10 Total

Ligasyon işlemi sonunda, sgRNA1 ve sgRNA2'lerin klonlandığı ya da insert edildiği iki ayrı px459V2,0 plazmidi elde edildi.

5.12. sgRNA1 ve sgRNA2 DUPLEXLERİNİN KLONLANDIĞI PLAZMİDLERİN KİMYASAL KOMPOTENT BAKTERİLERE ÇOĞALTIM AMAÇLI TRANSFORMASYONU

sgRNA'lar ile klonlama işlemi tamamlanan plazmidlerin çoğaltılması için plazmid aktarımına uygun OneShot Stbl3 kimyasal kompotent E. coli (Thermo Fisher Scientific, A.B.D) bakterileri kullanıldı. İki adet 1,5 ml'lik santrifüj tüpü içinde bulunan 100 µl OneShot kimyasal kompotent E. coli bakterileri ile önceki aşamada hazırlanan 3 µl klonlama ürünleri ayrı ayrı pipetaj yardımıyla karıştırıldı. Hazırlanan karışım buz üzerinde 30 dakika inkübe edildi. Bakterilere su banyosunda 30 saniye 42°C'de bekletilerek ısı şoku uygulandı ve ardından hemen tekrar buza geçirildi. Bakterilerin üzerine 250 µl oda sıcaklığında Super Optimal broth with Catabolite baskılayıcı (S.O.C) besiyeri eklendi. Tüplerin ağzı sıkıca kapatıldı ve yatay vaziyette 1 saat 200 rpm'de 37°C de çalkalayıcı inkübatörde inkübe edildi. Plazmidlerin

aktarıldığı kompetent bakteriler içinde 100 µg/ml ampisilin bulunan seçici besi yeri Luria Broth agar plağa dağıtıldı ve gece boyu 37°C’de etüvde inkübe edildi. Bu şekilde plazmidlerin bünyesinde bulundurduğu ampisilin direnç geni ile plazmidlerin aktarıldığı kompetent bakterilerin seçilimi sağlanmış oldu. Ertesi gün agar plaktan 5’er bakteri kolonisi alınarak sıvı besiyerine ekildi ve gece boyu çalkalayıcı inkübatörde 37°C’de inkübe edildi. gRNA1’in klonlandığı px459 plazmidi sgRNA1px459 ve sgRNA2’nin klonlandığı px459 plazmidi ise sgRNA2px459 olarak adlandırıldı.

5.13 sgRNA1 ve sgRNA2 PLAZMİDLERİNİN TRANSFORME EDİLDİĞİ BAKTERİ KOLONİLERİNDEN BÜYÜK ÖLÇEK ENDOFREE PLAZMİD İZOLASYONU

sgRNA1 ve sgRNA2 plazmidlerinin bulunduğu bakteri kolonilerine steril pipet ucu değdirildi. sgRNA1 plazmidini içeren bakteri kolonisi ve sgRNA2 plazmidini içeren bakteri kolonisine değdirilen 2 pipet ucu 100 µg/ml ampisilin içeren ve 2 ayrı 50 ml’lik falkon tüp içinde bulunan 5 ml LB besi yeri içine atıldı. Besi yeri 37°C’de 8 saat 200 rpm’de inkübe edilerek başlangıç kültürü oluşturuldu. Başlangıç kültürü 1/500 oranında 100 µg/ml ampisilin içeren besi yeri ile seyreltildi. Daha sonra seyreltilen başlangıç kültürünün 200 µl’si 100 µg/ml ampisilin içeren 100 ml’lik besi yeri içine ilave edildi. Kullanılan kültür kabının içinde bulundurduğu besin yerinden hacimce en az 4 katı olmasına dikkat edildi. Başlangıç kültürü ile ilavesi yapılan besi yeri 37°C’de 16 saat 200 rpm’de inkübe edildi ve daha sonra kültürden plazmid izolasyonu Maxiprep EndoFree Plasmid kit (Qiagen/Almanya) aracılığıyla ilgili kitin prosedürüne göre gerçekleştirildi. Elde edilen plazmidlerin miktar ve saflığı ise NanodDrop cihazı (Maestrogen, Tayvan) aracılığıyla kontrolü yapıldı. Seçilen kolonilerden izole edilen plazmidlere sgRNA’ların doğru nükleotid dizisi ile aktarıldığının doğrulanması amacıyla bölüm 5.4-5.7 işlemleri tekrar uygulandı.

5.14 PC-3 HÜCRELERİNE PX601-GFP PLAZMİDİNİN ve ssODN1 TRANSFEKSİYONU

PC-3 hücrelerinde optimal transfeksiyon oranının belirlenmesi amacıyla ilk olarak hücrelere aktarıldığında yeşil floresan proteini eksprese eden ve green fluorescent

protein (GFP) genini yapısında bulunduran px601-GFP plazmidi, ssODN1 ve FuGENE HD (Promega, A.B.D) transfeksiyon ajanı hücelere transfekte edildi.

Bu amaçla, en az 3 pasajlama ve tripsinizasyon işlemi sonrası Merck Muse® Count & Viability Assay kitiyle MUSE cihazında hücre sayımı işlemi ardından 2 ml sıvı DMEM/F12 besi yeri içinde bulunan PC-3 hücreleri 2 adet 6 kuyucuklu kültür kabının her bir kuyucuğuna 250 000 hücre olacak şekilde aktarıldı. Ardından, her bir kuyucuğa 2 ml %10 fetal sığır serumu, 1X L-Glutamin ve 1X Penisilin/Streptomisin içeren DMEM/F12 tam besi yeri ilave edildi. 6 kuyucuklu kültür kaplarına aktarılan hücreler plazmid transfeksiyonundan önce kuyucuklarda %70-80 hücre doluluğu sağlamak üzere 12-18 saat 37°C ve %5 CO₂'li nemli ortamda inkübe edilmek üzere inkübatöre kaldırıldı. İnkübasyon işlemi sonrası, optimal px601-GFP plazmidi+ssODN+FuGENE HD transfeksiyon ajanı oranının belirlenmesi amacıyla 2 adet 6 kuyucuklu kültür kabının 9 kuyucuğuna farklı oranlarda px601-GFP plazmidi+ssODN+FuGENE HD transfeksiyon ajanı (Tablo 11) ilave edildi. Bunun için ilk olarak, her bir kuyucuktaki eski besi yeri transfeksiyondan 1 saat önce çekilerek yerine 2 ml tam besi yeri ilavesi yapıldı. Yine transfeksiyon işleminden önce FuGENE HD transfeksiyon ajanı, plazmid stoku, ssODN stoku ve serum içermeyen Opti-Mem (Gibco, A.B.D) besi yeri oda sıcaklığı ısısına getirildi. 9 adet 0,5 ml'lik PZR tüplerine sırasıyla 1.-9. oranların sağlanması amacıyla 1-3 µg px601-GFP plazmidıyla, 0,75 µg ssODN bulunduğu hacimler ilave edildi ve son olarak tüm tüplerdeki hacimler Opti-Mem besi yeri ile 150 µl'ye tamamlandı. Ardından kullanılan plazmid+ssODN miktarına orantılı olarak 1:2, 1:3 ve 1:4 (w/v) oranlarında FuGENE HD transfeksiyon ajanı plazmid+ssODN+Opti-Mem karışımının üzerine ilave edildi. Son karışım oda sıcaklığında tüplerin kapakları kapalı olarak 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda karışımlar hücrelerin içinde bulunduğu kuyucuklara damla damla mikropipet yardımıyla ilave edildi. Son olarak hücrelerde yeşil floresan protein ekspresyonunun gözlemlenmesi amacıyla 24 saat 37°C ve %5 CO₂'li nemli ortamda inkübe edilmek için inkübatöre kaldırıldı.

Tablo 11. px601-GFP plazmidi+ssODN+FuGENE HD transfeksiyon ajan oranları.

Oran	Plazmid(μg)		ssODN1 (μg)	Plazmid+ssODN:FuGENE HD oranı (w/v)
1.	1	+	0,75	1:2
2.	1	+	0,75	1:3
3.	1	+	0,75	1:4
4.	2	+	0,75	1:2
5.	2	+	0,75	1:3
6.	2	+	0,75	1:4
7.	3	+	0,75	1:2
8.	3	+	0,75	1:3
9.	3	+	0,75	1:4

5.15 TRANSFEKSİYON ORANININ ImageJ ile ANALİZİ

Farklı oranlarda px601-GFP plazmidi+ssODN+FuGENE HD transfeksiyon ajan ile transfeksiyonu gerçekleştirilen PC-3 hücrelerinin analizi IX71 invert floresans (Olympus/Japonya) mikroskobu ile gerçekleştirilmiştir. Buna göre incelenecek hücrelerin bulunduğu alanın normal ışık ve BG floresan filtre ile fotoğrafı çekildi. Ardından ImageJ programının cell count sekmesiyle aynı alanda floresans ışık ve normal ışık görüntüsü ile sayılan hücrelerin oranları birbirlerine göre %cinsinden hesaplandı. Buna göre en başarılı px601-GFP plazmidi+ssODN+FuGENE HD transfeksiyon ajan oranı ileri çalışmalar için kullanıldı.

5.16 PC-3 HÜCRELERİ ÜZERİNDE OPTİMAL PUROMİSİN MİKTARININ BELİRLENMESİ

Memeli hücreleri için selektif antibiyotik olan puromisin bir protein sentez inhibitörüdür. Bu çalışmada, yapısında puromisin direnç geni bulduran px459 V2,0 plazmidinin transfekte edilmediği hücrelerin çoğu ortamdan puromisin ilavesi ile selektif olarak elimine edildi.

Bu amaçla çalışmada, PC-3 hücreleri üzerinde en az toksik etkiyi gösterecek optimal puromisin miktarının bulunması için plazmid aktarımı yapılmamış PC-3 hücreleri üzerinde puromisin optimizasyon çalışması yapıldı. En az 3 pasajlama ve tripsinizasyon işlemi sonrası Merck Muse® Count & Viability Assay kitiyle MUSE cihazında hücre sayımı işlemi ardından 2 ml sıvı DMEM/F12 besi yeri içinde bulunan PC-3 hücreleri 1 adet 12 kuyucuklu kültür kabınının her bir kuyucuğuna 150.000 hücre olacak şekilde aktarıldı. Ardından, her bir kuyucuğa 1 ml DMEM/F12 tam besi yeri ilave edildi. 12 kuyucuklu kültür kaplarına aktarılan hücreler 18 saat 37°C ve %5 CO₂'li nemli ortamda inkübe edilmek üzere inkübatöre kaldırıldı. İnkübasyon işlemi sonrası, ilk kuyucuk kontrol olmak üzere diğer kuyucuklara içerisinde sırasıyla 0,5 µg/µl, 1 µg/µl, 2 µg/µl, 3 µg/µl, 4 µg/µl, 5 µg/µl, 6 µg/µl, 7 µg/µl, 8 µg/µl, 9 µg/µl, 10 µg/µl puromisin bulunan 1 ml DMEM/F12 tam besi yeri ilave edildi.

Puromisinin hücreler üzerindeki antibiyotik etkisi 24 saatte bir olmak üzere 72 saat boyunca IX71 invert floresans (Olympus/Japonya) mikroskobu ile takip edilerek optimal puromisin miktarı belirlendi.

5.17 PC-3 HÜCRELERİNE sgRNA1 ve sgRNA2 PLAZMİDLERİNİN TRANSFEKSİYONU ve PUROMİSİN SELEKSİYONU

Optimal plazmid+ssODN1+FuGENE HD transfeksiyon ajanı oranının belirlenmesinin ardından 6 kuyucuklu kültür kabınının 3 kuyucuğuna 250 000 PC-3 hücresi aktarıldı. Ardından, her bir kuyucuğa DMEM/F12 tam besi yeri ilave edildi. Kuyucuklardaki hücrelerin plazmid transfeksiyonundan önce %70-80 hücre doluluğa ulaşması amacıyla 16 saat 37°C ve %5 CO₂'li nemli ortamda inkübe edilmek üzere inkübatöre kaldırıldı. İnkübasyon işlemi sonrası ilk kuyucuk kontrol amaçlı olarak kullanılacağından herhangi bir işleme maruz bırakılmazken diğer kuyucuklardan birine 1:4 oranında olacak şekilde, 3 µg sgRNA1 plazmid+0,75 µg ssODN1+15 µl FuGENE HD transfeksiyon ajanı, diğer kuyucuğa ise 3 µg sgRNA2 plazmid+0,75 µg ssODN1+15 µl FuGENE HD transfeksiyon ajanı ilave edildi. Transfeksiyon sonrası hücreler plazmid ekspresyonunun sağlanması için 24 saat 37°C ve %5 CO₂'li nemli ortamda inkübe edilmek üzere inkübatöre kaldırıldı. 24 saat inkübasyon sonunda hücrelerin üzerine içinde 0,5 µg/ml puromisin bulunan 2 ml tam besi yeri ilave edildi. Hücrelere puromisin uygulaması, her 24 saatte bir içinde ölü hücrelerin bulunduğu

eski besi yerinin çekilmesi ve yeni puromisinli besi yerinin ilavesiyle birlikte 72 saat süre ile gerçekleştirildi.

5.18 KONTROL, sgRNA1 ve sgRNA2 ile TRANSFEKTE OLAN PC-3 HÜCRELERİNDEN DNA İZOLASYONU

Herhangi bir transfeksiyon işleminin uygulanmadığı kontrol hücreleri ile plazmid transfeksiyonun ve puromisin seleksiyonun gerçekleştiği hücrelerden DNA izolasyonu QuickExtract™ DNA Extraction (Lucigen/A.B.D) solüsyonu ile gerçekleştirilmiştir.

Bunun için, plazmid ve ssODN transfeksiyonu yapılmış ve 72 saat boyunca puromisin uygulamasına maruz kalmış iki kuyucuktaki hücreler 1 ml tripsinle muamele sonucu yapışmış oldukları yüzeyden kaldırıldı ve 2 dakika sonunda hücrelerin üzerlerine tripsinin hücreler üzerindeki negatif etkisini azaltmak amacıyla yeni 2 ml tam besi yeri ilave edildi. Ardından tripsinle kaldırılan 2 farklı kuyucuktaki hücreler 2 farklı 15 mL'lik kapaklı santrifüj tüplerine aktarıldı ve 1000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonrası süpernatant atıldı ve hücreler üzerine 50 µl QuickExtract™ DNA Extraction solüsyonu ilave edildi. Son olarak QuickExtract solüsyonunun ilave edildiği hücreler 0.2 ml'lik PZR tüplerine aktarıldı ve tüplerde ısı döngü cihazına (SensoQuest, Almanya) konuldu. Isı döngü cihazında ise şartlar, 15 dakika 68°C, 8 dakika 95 °C ve son olarak süresiz 4 °C olarak ayarlandı. Reaksiyon sonunda hücre DNA materyalleri tüpün sıvı üst fazında bulunurken, artık hücre bileşenleri ise alt fazda bulunmaktadır.

5.19 TP53 414delC HEDEF BÖLGESİNE ÖZGÜ PRİMER NÜKLEOTİD DİZİSİ ve ÖZELLİKLERİ

CRISPR/Cas9 sisteminin hedeflediği TP53 414delC hedef bölgesinin PZR aracılığıyla çoğaltılması amacıyla, TP53 414delC bölgesinde içine alan ve 409 baz çiftlik bir PZR ürününün oluşmasını sağlayan primer çifti dizayn edildi. Dizayn edilen primer çiftinin T7 endonükleaz analizinde kullanılabilmesi amacıyla, TP53 414delC hedef bölgesinin PZR aracılığıyla oluşan ampikonun merkez bölgesinde bulunmamasına dikkat edildi. T7 endonükleaz enzimi yanlış eşleşmiş nükleotid dizilerinde kesime neden olur. Bu sebeple, T7 endonükleaz enziminin kesime neden

olduğu bölgenin oluşan amplikonun merkez bölgesine denk gelmesi halinde yaklaşık iki eşit boyuta sahip amplikon parçası meydana gelecektir. Bu durumda, iki eşit boyuta sahip amplikon parçası jel analizinde üst üste denk geleceğinden farklı sgRNA aralayıcı dizilerinin yönlendirdiği CRISPR/Cas9 sisteminin ne derecede hedef bölge üzerinde etkili düzenleme yaptığı analiz edilemeyecektir.

Bu amaçla, çalışmada TP53 414delC hedef bölgesinin içinde kaldığı PZR ürün amplikonunun 5' ucuna 173 baz çifti ve 3' ucuna 236 baz mesafede kaldığı primer (Tablo 12) çifti dizayn edilerek kullanıldı. Dizayn edilen primer çiftinin sadece TP53 gen bölgesine bağlandığının doğrulaması için National Center for Biotechnology Information (NCBI) veri bankası üzerinden Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) analizi yapıldı. Analiz sonucu dizayn edilen primer çiftinin sadece hedef TP53 gen bölgesine özgü olduğu doğrulandı.

Tablo 12. TP53 414delC hedef bölgesi primer nükleotid dizisi ve özellikleri.

Primer Adı	Nükleotid Dizisi	Amplikon boyutu (Bp)	Primerin hedef bölgeye uzaklığı (Bp)
TP53kont F1	5' ACGCCAACCTCTCTCTAGCTC 3'	409	173
TP53kont R1	5' GCCAGACCTAAGAGCAATCAG 3'		236

5.20 PC-3 HÜCRELERİNDE CRISPR/Cas9 ARACILIĞIYLA DÜZENLENMİŞ TP53 414delC HEDEF BÖLGESİNİN PZR ARACILIĞIYLA ÇOĞALTIMI

Herhangi bir transfeksiyon işleminin uygulanmadığı kontrol hücreleri ile plazmid transfeksiyonun ve puromisin seleksiyonun gerçekleştiği hücrelerden QuickExtract™ DNA Extraction solüsyonu ile elde edilen DNA ve TP53 414delC bölgesine özgü dizayn edilen primer çifti aracılığıyla hedef TP53 414delC bölgesinin PZR işlemi

gerçekleştirildi. Bunun için, aşağıdaki bileşenlere standart 50 µl hacime ulaşacak şekilde ultra distile su eklendi (Tablo 13).

Tablo 13. TP53 414delC çoğaltım bölgesi için PZR reaksiyon bileşenleri.

Reaksiyon bileşenleri
25 µl Hot-Start Taq polimeraz master mix (Qiagen/Germany)
1 µl TP53kontF1 (10 pmol)
1 µl TP53kontR1 (10 pmol)
2 µl genomik DNA
21 µl ddH ₂ O
50 µl Total

PZR döngü koşulları; ısı döngü cihazının kapak sıcaklığı 105°C olacak biçimde, 35 döngü (denatürasyon, bağlanma ve uzama işlemi) ısı döngü cihazında (SensoQuest, Almanya) gerçekleştirildi (Tablo 14).

Tablo 14. PZR döngü koşulları.

Döngü koşulları
94°C'de 15 dakika (ön denatürasyon)
94°C'de 45 saniye (denatürasyon)
61°C'de 45 saniye (bağlanma)
72°C'de 1 dakika (uzama)
72°C'de 5 dakika (son uzama)

PZR işlemi sonunda elde edilen amplikonlar SafeView DNA boyasının bulunduğu %1'lik agaroz jelde 1 saatlik yürütmenin ardından 100 baz çiftlik DNA moleküler boyut belirteçi eşliğinde yürütülerek 409 baz çiftlik hedef bölgeye özgü PZR amplikonunun olduğu kontrol edildi. Kontrol sonucu olduğu belirlenen PZR amplikonları T7 endonükleaz analizinde kullanılmak üzere +4°C'de muhafaza edildi.

5.21 T7 ENDONÜKLEAZ ANALİZİ

T7 endonükleaz enzimi çift iplikli DNA'daki yanlış eşleşmeleri tespit eder ve bu bölgede kesim yapar. Bu özellikleri nedeniyle T7 endonükleaz enzimi, CRISPR/Cas9 aracılıklı genom düzenlemesinin etkili bir şekilde değerlendirmesi için kullanılabilir. PZR ile hedef bölgenin çoğaltımından sonra PZR örneklerinden 12 µl ve 10X NEB2.1 tamponundan 2 µl ve 5 µl ddH₂O 0,2 ml'lik PZR tüpünde pipetaj yapılarak karıştırıldı. Ardından örnekler ısı döngü cihazında 95°C'de 5 dakika tutuldu ve sonra sıcaklık 95°C'den 85°C'ye saniyede 2°C incek şekilde, son olarak ise 85°C'den +4°C'ye saniyede 0,1°C incek şekilde inkübe edildi. İşlem sonunda ise buz blok üzerinde bulunan örnekler üzerine 1 µl T7 endonükleaz (NEB) ilave edildi ve örnekler hemen ısı döngü cihazında 37 °C'de 15 dakika inkübe edildi. 15 dk sonunda reaksiyon, örnek ortamına 4 µl 0.25 M EDTA içeren 6X NEB loading dye ilavesi ile sonlandırıldı. Tüm işlemler sonunda örnekler kapiller elektroforez sistemi olan QIAXCEL (Qiagen, A.B.D) cihazında 10 dakika yürütüldü. Elektroforez işlemi sonunda, TP53 414delC hedef bölgesi üzerine sgRNA aralayıcı dizilerinin CRISPR/Cas9 sistemini etkili bir şekilde yönlendirememesinden dolayı düzenleme yapılamayan hücrelerin PZR amplikonları T7 endonükleaz tarafından kesilemediğinden jel üzerinde yaklaşık 400 baz çiftlik bir bölgede tek bir bant olarak görülür. CRISPR/Cas9 sisteminin transfekste edildiği ve TP53 414delC hedef bölgesi üzerine sgRNA aralayıcı dizilerinin CRISPR/Cas9 sistemini etkili bir şekilde yönlendirdiği durumda ise PZR amplikonları T7 endonükleaz tarafından kesildiğinden jel üzerinde yaklaşık 170 ve 240 baz çiftlik bölgede iki ayrı bant görülür. Oluşan bu iki farklı bant yoğunluğu ne kadar fazla ise sgRNA aralayıcı dizilerinin CRISPR/Cas9 sistemini hedef bölgeye yönlendirme ve gen modifikasyon (hedef gen üzerinde değişiklik yapma oranı) oranında o kadar fazla olur. Böylece daha fazla kesim yapıldığı görülen PZR amplikonun elde edildiği hücrelere transefekte edilen sgRNA+CRISPR/Cas9 sistemi ileri analizler içinde kullanılmaya devam edilir.

Gen modifikasyon oranı aşağıdaki formül ile belirlenir:

$$\% \text{gen modifikasyonu} = 100 \times (1 - (1 - \text{kesilen amplikon oranı})^{0.5})$$

Kesilen amplikon oranı ise kesime uğramayan hedef bölgenin jel üzerindeki tek bant yoğunluk değerinin, kesime uğrayan hedef bölgenin jel üzerindeki iki bant yoğunluğuna bölünmesi ile elde edilir.

5.22 sgRNA2+ssODN1 ve sgRNA2+ssODN2 ile TRANSFEKTE OLAN PC-3 HÜCRELERİNİN TP53 414 delC HEDEF BÖLGESİNİN YENİ NESİL SEKANS ANALİZİ

Bölüm 5.17’de belirtilen yöntemle benzer şekilde, kontrol, sgRNA2+ssODN1 ve sgRNA2+ssODN2 ile transfekte olan PC-3 hücrelerinden bölüm 5.18 ve 5.20’de belirtilen yöntemle elde edilen PZR amplikonlarının TP53 414delC hedef bölgesinin yeni nesil sekans analizi Mi-Seq (Illumina, A.B.D) cihazı ile gerçekleştirildi. Yeni nesil sekans analizi bir PZR reaksiyonunda bulunan bütün amplikonların teker teker okunmasını sağlayarak her bir amplikonun nükleotid dizisini çıkartmaktadır. Böylece ortamda bulunan farklı hücrelerin farklı DNA dizi bölgelerinden çoğaltılan amplikonlar varsa, yeni nesil sekans sistemi tüm bu farklı nükleotid dizisine sahip amplikonların teker teker okunmasına ve nükleotid dizilerinin çıkarılmasına olanak verir. Bu nedenle projede, aynı kuyucuktaki sgRNA2+ssODN sistemleri ile transfekte olan PC-3 hücreleri ve transfekte olamayan, püromisin seleksiyonundan sağ kalan PC-3 hücreleri aynı ortamda karışık bir şekilde bulunsalar bile, her bir hücreye ait PZR amplikonu yeni nesil sekans sistemi ile teker teker okunmuş ve hedef TP53 414delC mutasyonunun ne oranda CRISPR/Cas9+ssODN sistemi tarafından tamir olabildiği belirlenmiş olacaktır. Yeni nesil sekans sisteminden elde edilen veriler ise Bütünleştirici Genomik Görüntüleyici/Integrative Genomics Viewer (IGV) programı aracılığıyla incelendi.

5.23 KONTROL PC-3 HÜCRELERİ, sgRNA2+ssODN1 ve sgRNA2+ssODN2 ile TRANSFEKTE OLAN PC-3 HÜCRELERİNDE p53 mRNA EKSPRESYON SEVİYESİNİN BELİRLENMESİ

Kontrol PC-3 hücreleri ve sgRNA2+ssODN1 ve sgRNA2+ssODN2 ile transfekte olan ve püromisin seleksiyonu yapılmış PC-3 hücrelerinin p53 mRNA ekspresyon seviyesinin belirlenebilmesi için ilk olarak hücrelerden High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Almanya) RNA izolasyon kitiyle ilgili prosedüre göre RNA izolasyonu

gerçekleştirildi. Elde edilen RNA'ların konsantrasyon ve saflıkları ise NanoDrop (Maestrogen, Tayvan) cihazı ile ölçüldü. Ardından total RNA'lardan cDNA sentezi High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (AppliedBiosystems, A.B.D) bileşenleri (Tablo 15) kullanılarak ısı döngü cihazında 25°C'de 10 dakika, 85°C'de 5 dakika, 4°C'de süresiz olarak gerçekleştirildi.

Tablo 15. cDNA PZR reaksiyon bileşenleri.

Reaksiyon bileşenleri
10 µl RNA
2 µl 10X RT buffer
0,8 µl 25X dNTP Mix (100mM)
2 µl 10X RT Random Primer
1 µl RNase Inhibitor
3,2 µl Nuclease-free Water
1 µl Reverse Transcriptase
20 µl Total

Elde edilen cDNA'lerden p53 ekspresyon analizi ise EvaGreen (Biotum, A.B.D) floresan boya yöntemi kullanılmasıyla toplamda 25 µl reaksiyon hacmiyle Rotor-Gene Real-Time qPCR (Qiagen, A.B.D) cihazında gerçekleştirildi (Tablo 16).

Tablo 16. RT-qPZR reaksiyon bileşenleri.

Reaksiyon bileşenleri
2 µl cDNA
1,25 µl EvaGreen
0,3 µl 10 pmol Primer Forward
0,3 µl 10 pmol Primer Reverse
12,5 µl 2X HotStart Master Mix
8,65 µl Nuclease-free Water
25 µl Total

Primer olarak ise kendi dizayn ettiğimiz p53RNAF1 ve p53RNAR1 primerleri ve normalizasyon amaçlı olarak kullanılan β -microtubulin (B2M), Hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT1), house keeping genlerine ait primerler kullanıldı (Tablo 17).

Tablo 17. p53 RT-qPZR primerleri.

Primer adı	Nükleotid dizisi
p53RNAF1	5' GTTGGCTCTGACTGTACCACC 3'
p53RNAR1	5' CCAGTGTGATGATGGTGAGGA 3'
B2MF1	5'- TCTCTCTTTCTGGCCTGGA-3'
B2MR1	5'- TGTCGGATGGATGAAACCC-3'
HPRTF1	5'-CGTCTTGCTCGAGATGTGAT-3'
HPRTR1	5'-TTCAGTGCTTTGATGTAATCCAG-3'

Kantitatif PZR döngü koşulları; kantitatif PZR cihazında 35 döngü (denatürasyon, bağlanma ve uzama işlemi) ısı döngü cihazında (SensoQuest, Almanya) gerçekleştirildi (Tablo 18).

Tablo 18. RT-qPZR döngü koşulları.

Döngü koşulları
95°C'de 15 dakika (ön denatürasyon)
95°C'de 15 saniye (denatürasyon)
60°C'de 1 dakika (bağlanma ve uzama)

5.24 TEK HÜCRE KÜLTÜRÜ

sgRNA2+ssODN2 ile transfekte edilmiş ve püromisin seleksiyonu yapılmış PC-3 hücrelerinin tripsin ile kaldırılması ve sayımının yapılmasının ardından DMEM / F-12 tam besi yeri içindeki stok hücreler üzerine, 200 μ l'de 4 hücre olacak şekilde 20 ml DMEM / F-12 tam besi yeri ilavesi yapıldı. Ardından elde edilen bu dilüsyondan 200 μ l, 8 adet 96 kuyucuklu kültür kabının herbir kuyucuğuna ilave edildi. 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekilen hücreler 7 günde bir tek hücreden oluşan koloni ya da TP53

gen tamirine bağlı proliferasyonu durmuş tek hücre gözlemlenmesi amacıyla sayılarak 21 gün boyunca 37°C ve %5 CO₂'li nemli ortamda inkübe edildi. 21 gün sonunda toplamda 768 kuyucuk teker teker hücre varlığının gözlemlenmesi ve %ekim veriminin belirlenmesi amacıyla IX71 invert mikroskobu (Olympus Corporation, Japonya) aracılığıyla sayıldı.

5.25 sgRNA2+ssODN2 TRANSFEKİYONU YAPILMIŞ HÜCRELERDE p53 PROTEİNLERİNİN İMMÜNOFLORESAN ANALİZİ

p53 protein ekspresyon analizleri, 6 kuyucuklu kültür kaplarında sgRNA2+ssODN2 transfeksiyonu ve püromisin seleksiyonu yapılmış PC-3 hücrelerinde immünofloresan yöntemi ile yapıldı. 72 saatlik püromisin seleksiyonundan sonra PC-3 hücreleri %10'luk nötral formalin tamponu ile fikse edildi ve daha sonra 3 kez 5 dakika boyunca DPBS ile yıkandı (Gibco, 14190144). Yıkanan hücreler oda sıcaklığında 1 saat süreyle %10 keçi serumu ile (Sigma, G9023) bloke edildi ve daha sonra 3 kez 5 dakika boyunca DPBS ile yıkandı. Bloklanmış hücreler, 4°C'de gece boyunca 1:200 oranında %10 keçi serumu içinde seyreltilen primer Anti-p53 (yabanıl tip) antikor (Sigma-Aldrich, klon PAb1620) ile inkübe edildi. İnkübasyonun ardından hücreler, 5 dakika boyunca 3 kez DPBS ile yıkandı ve daha sonra 1:100 oranında DPBS ile seyreltilen FITC işaretli sekonder keçi antikor (Abcam, ab7064) ile 2 saat süreyle oda sıcaklığında inkübe edildi. 5 dakika boyunca 3 kez DPBS ile yıkama ardından hücreler son olarak DAPI ile 5 dakika boyandı ve son olarak 3 kez daha DPBS ile 5 dakika yıkandı. Öte yandan, tek hücre kültür immünofloresan analizleri, yukarıda belirtilen yöntemlerle aynı şekilde gerçekleştirilmekle beraber tek fark olarak DPBS ile yıkama işlemleri proliferasyon olmayan tek hücrelerin sınırlı yüzey alanlarından dolayı 1 kez 10 dakika olarak yapıldı. İmmünofloresan analize hazır hücreler IX73 invert floresan mikroskobu (Olympus Corporation, Japonya) ile analiz edildi.

5.26 sgRNA2+ssODN1 ve sgRNA2+ssODN2 TRANSFEKİYONU YAPILMIŞ HÜCRELERDE APOPTOZİS ANALİZİ

Apoptozis analizi, sgRNA2+ssODN1, sgRNA2+ssODN2 ve sgRNA2+ssODN3 transfeksiyonu yapılmış PC-3 hücrelerinde puromisine bağlı hücre ölümünden

kaçınmak için puromisin seçimi olmadan 48 ve 72 saatlik transfeksiyon sonrası Muse Annexin V and Dead Cell kiti (Millipore, Billerica, MA, ABD, MCH100105) kullanılarak yapıldı. PC-3 hücre transfeksiyonunda px459sgRNA2+ssODN3 kullanımı, hücrelerin hedef sekansında herhangi bir nükleotid değişimine veya TP53 414delC onarımına neden olmaz. Bu nedenle sgRNA2+ssODN3 kullanımı, transfeksiyonun PC-3 hücrelerinde neden olduğu apoptotik etkiyi ölçmek ve TP53 414delC onarımından kaynaklanan asıl apoptotik etki değerini belirlemek için kullanılmıştır. 48 ve 72 saatlik transfeksiyon sonrası 6 kuyucuklu platelerde bulunan PC-3 hücrelerinin kaldırılması ve santrifüjü sonrası 1 ml full besi yeri içinde bulunan süspanse hücrelerin 100 µl'si ayrı ayrı 1,5 ml'lik santrifüj tüplerine akatırıldı ve üzerlerine 100 µl Muse Annexin V and Dead Cell sıvısı ilave edildi. Hücrelerin karanlıkta oda sıcaklığında en az 20 dakika inkübasyonundan sonra, hücreler otomatik Muse Cell® Analyzer (Merck Millipore, Billerica, MA, ABD) cihazında analiz edildi. Analizin sonunda da, negatif kontrol olarak sgRNA2+ssODN3 ile transfekte edilmiş hücreleri kullanıldı.

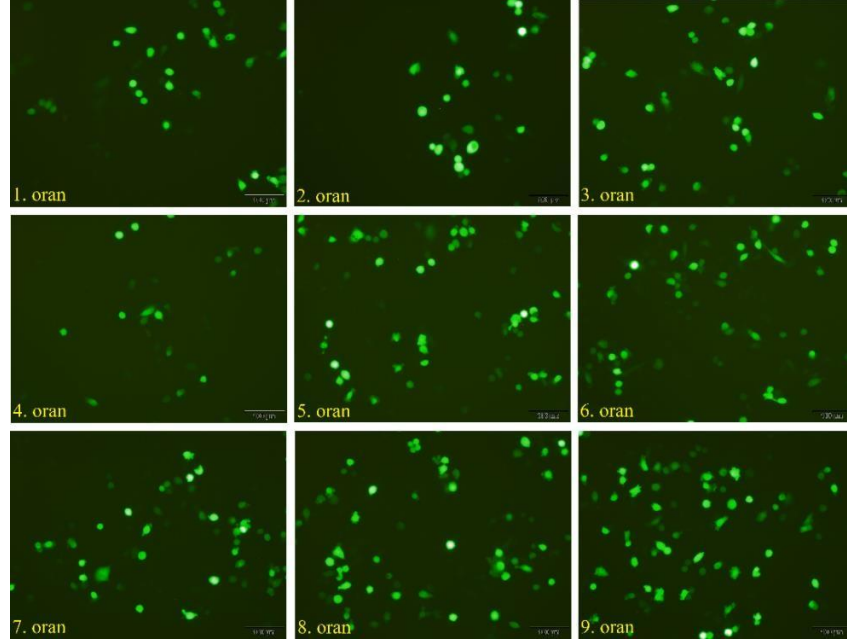
5.27 İSTATİKSEL ANALİZLER

Gruplar arası farklılıkların analizi için SPSS (istatistiksel paket yazılım, Windows 23.0) kullanılmıştır. Elde edilen veriler One-Way ANOVA ve Tukey post hoc testi ile test edilmiştir. 0,05'den küçük p değerleri anlamlı olarak kabul edilirken, elde edilen tüm veriler üç deney tekrarını temsil etmektedir. Veriler ortalama \pm standart sapma (SD) olarak sunulmuştur. RT-qPCR verilerinin istatistiksel olarak değerlendirmesi Kenneth J. Livak ve Thomas D. Schmittgen 2001'e ait $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemine göre yapılmıştır. Bu yolla hedef genlerin hasta grupları uygulamalarında gen ekspresyon (Ct değeri olarak) sonuçlarının Housekeeping gen olarak seçilen B2M ve HPRT1 geni ekspresyonlarının ortalama seviyesine göre anlamlılık dereceleri belirlenmiştir.

6. BULGULAR

6.1 PC-3 HÜCRELERİNDE UYGUN TRANSFEKSİYON ORANININ BELİRLENMESİ

PC-3 hücrelerinde sitotoksik etkiyi en az miktarda tutmak ve en uygun transfeksiyon oranının belirlenmesi amacıyla PC-3 hücrelerine yeşil floresan proteini eksprese eden ve green fluorescent protein (GFP) genini yapısında bulunduran px601-GFP plazmidi, ssODN1 ve FuGENE HD (Promega, A.B.D) transfeksiyon ajanı hücrelere transfekte edildi. Böylece ölçüm yapılan alandaki toplam hücre miktar oranına göre GFP-pozitif hücrelerin yüzdesel değerleri elde edildi. Buna göre, materyal ve metod da belirtilen transfeksiyon oranlarından, hücrelerde aşırı toksik etki göstermeden en uygun ve en yüksek transfeksiyon oranının şekil 12’de görüldüğü üzere %38 transfeksiyon oranı ile 9. oran olduğu görüldü. Bu sebeple yapılan ileri analizler bu oran üzerinden devam ettirildi.

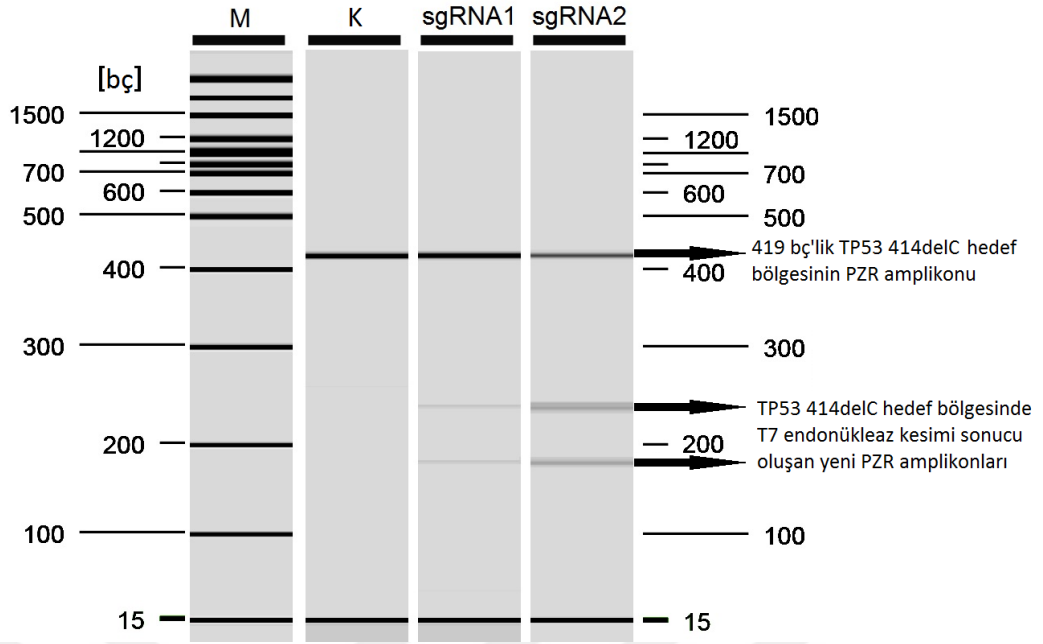


Şekil 12. Farklı transfeksiyon oranlarında GFP geni aktarılmış PC-3 hücrelerinde GFP ekspresyonunun görüntülenmesi.

6.2 sgRNA ARALAYICI DİZİ VERİMLİLİĞİNİN BELİRLENMESİ

PC-3 hücrelerinde TP53 414delC mutasyon noktasına en yakın (<10 bp) bölgede DSB oluşumunu sağlamak amacıyla CRISPR/Cas9 sistemine rehberlik etmesi amacıyla iki farklı sgRNA aralayıcı dizisi tasarlanmıştır. Tasarlanan sgRNA1 aralayıcı dizisi “5’ CAACAAGATGTTTTGCCAAC 3’” genomda kalıp ipliğe bağlanıp TP53 414delC mutasyon noktasının 3’ bölgesinden 7 baz uzakta ve sgRNA2 aralayıcı dizisi “5’ ACAGGGCAGGTCTTGCCAGT 3’” genomda kalıp olmayan ipliğe bağlanıp TP53 414delC mutasyon noktasının 5’ bölgesinden 3 baz uzakta DSB oluşumunu sağlamaktadır.

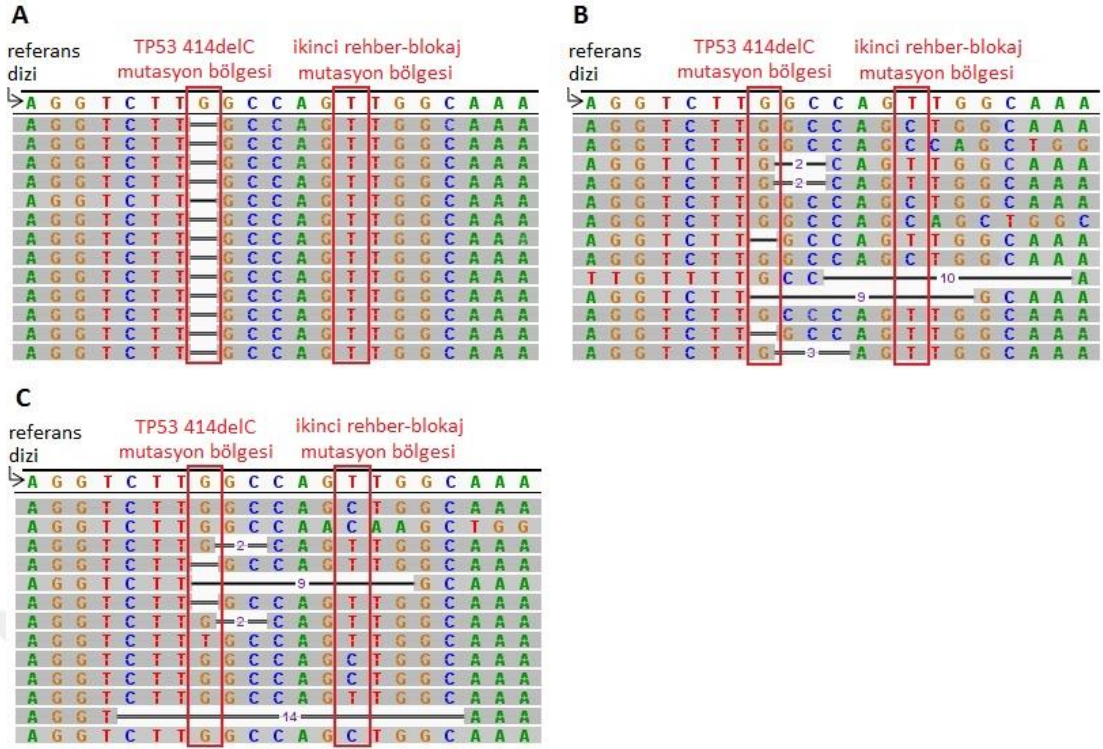
Transfeksiyondan 24 saat sonraki 72 saatlik püromisin seleksiyonunun sonunda, sgRNA1 ve sgRNA2 aralayıcı dizilerinin rehberliğindeki gen modifikasyonları T7 endonükleaz I (T7E1) analiz deneyi kullanılarak değerlendirildi. T7 endonükleaz I enzimi, CRISPR/Cas9 sisteminin neden olduğu daha tam olarak tamir olmamış DSB bölgesindeki yanlış nükleotid eşleşmelerini tanır ve bu eşleşmenin bir ya da üç nükleotid upstream bölgesinde çift iplikli DNA üzerinde kesim meydana getirir. Böylece, çift iplikli DNA üzerinde T7 endonükleaz I aracılığıyla meydana kesim oranı bize sgRNA aralayıcı dizinin verimliliğini, yani sgRNA aralayıcı dizinin CRISPR/Cas9 sistemini ne kadar verimlilikle hedef DNA bölgesine yönlendirdiğini verir. sgRNA1 ve sgRNA2 aralayıcı dizilerinin yönlendirdiği CRISPR/Cas9 sisteminin hedef TP53 414delC mutasyon bölgesinde meydana getirdiği gen modifikasyon oranları sırası ile %4 ve %30 olarak bulundu (Şekil 13). Bu sonuçlara göre, sgRNA2 aralayıcı dizi rehberliğindeki CRISPR/Cas9 sisteminin hedef bölgede daha fazla gen modifikasyonu sağladığı bulundu ve bu nedenle ilerleyen analizlerde PC-3 hücrelerinde TP53 414delC mutasyonunu onarmak için sgRNA2 aralayıcı dizi rehberliğindeki CRISPR/Cas9 sistemi ile ssODN'lerin kombine transfeksiyonu gerçekleştirildi.



Şekil 13. T7 endonükleaz I analizi ile sgRNA1 ve sgRNA2 aralayıcı dizilerinin gen modifikasyon verimliliğinin dijital elektroforez ortamında gösterimi. En üst seviyedeki ok parental PZR amplikonunu ve alt seviyedeki oklar ise T7 endonükleaz I kesimi sonucu oluşan PZR bantlarını göstermektedir. **M:** Markır; **K:** Kontrol.

6.3 TP53 414delC MUTASYONUNUN HDR ARACILIKLI TAMİR VERİMLİLİĞİNİN BELİRLENMESİ

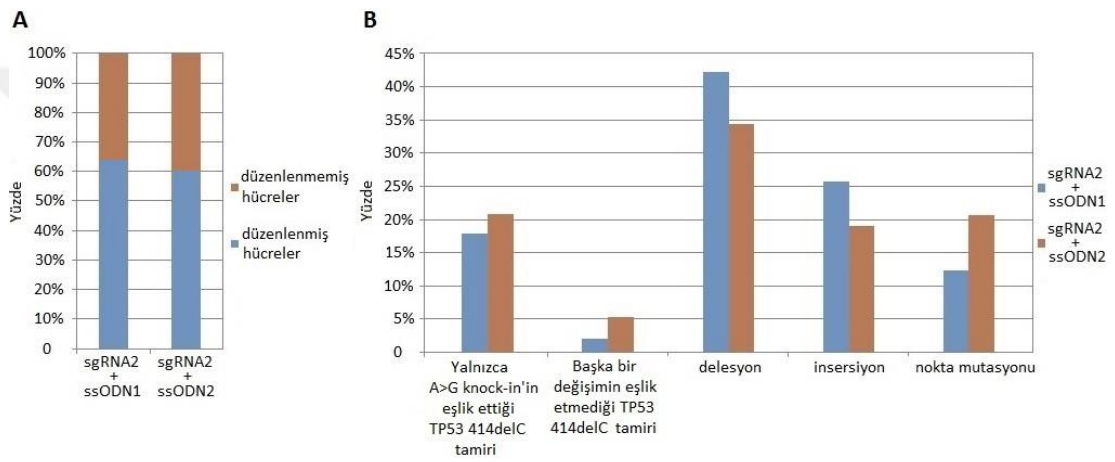
Yeni nesil sekans analizi, CRISPR/Cas9 sistemi ve ssODN1, ssODN2 tamir kalıpları aracılığıyla TP53 414delC mutasyon bölgesinde genetik düzenleme yapılan PC-3 hücrelerinde, tamir olan TP53 414 delC mutasyonunu, A>G knock-in'lerini, delesyonları, insersiyonları ve nokta mutasyonlarını görmemizi sağladı (Şekil 14 A, B, C).



Şekil 14. CRISPR/Cas9 sistemi ve tamir kalıpları ile genetik düzenlemeye uğramış PC-3 hücrelerindeki TP53 414delC mutasyon bölgesinin PZR amplikonlarının yeni nesil sekans okuması. **A.** Herhangi bir genetik düzenlemeye uğramamış kontrol PC-3 hücrelerindeki TP53 414delC mutasyon bölgesinin nükleotid dizisi. **B.** sgRNA2+ssODN1 ile genetik düzenlemeye uğramış PC-3 hücrelerindeki TP53 414delC mutasyon bölgesinin nükleotid dizisi. **C.** sgRNA2+ssODN2 ile genetik düzenlemeye uğramış PC-3 hücrelerindeki TP53 414delC mutasyon bölgesinin nükleotid dizisi.

Transfeksiyon ve püromisin seçiliminin ardından, sgRNA2+ssODN1 sistemi ile genetik düzenlenmeye uğramış ve uğramamış hücre yüzdeleri, yeni nesil sekans analizine göre %63,86 ve %37,14 olarak belirlendi (Şekil 15 A). sgRNA2+ssODN1 sistemi ile genetik düzenlemeye uğrayan hücrelerde ise hem A>G knock-in'i hem de TP53 414delC mutasyon tamirinin aynı anda bulunduğu hücre sayısı %17,89 olarak belirlenirken, sadece TP53 414delC mutasyon tamirinin bulunduğu hücre sayısı %2,06 olarak belirlendi (Şekil 15 B). Delesyon, insersiyon ve nokta mutasyon yüzdeleri ise sırasıyla %42,27, %25,77, %12,37 olarak bulundu (Şekil 15 B). Bunların yanı sıra, sgRNA2+ssODN2 sistemi ile yapılan transfeksiyon ve püromisin seçiliminin ardından genetik düzenlemeye uğramış ve uğramamış hücre yüzdeleri, yeni nesil sekans

analizine göre %60,0 ve %40,0 olarak belirlendi (Şekil 15 A). sgRNA2+ssODN2 sistemi ile genetik düzenlemeye uğrayan hücrelerde ise hem A>G knock-in'i hem de TP53 414delC mutasyon tamirinin aynı anda bulunduğu hücre sayısı %20,74 olarak belirlenirken, sadece TP53 414delC mutasyon tamirinin bulunduğu hücre sayısı %5,26 olarak belirlendi (Şekil 15 B). TP53 414delC mutasyon tamiri ve A>G knock-in'i dışındaki delesyon, insersiyon ve nokta mutasyon yüzdeleri ise sırasıyla %34,21, %19,08, %20,71 olarak bulundu (Şekil 15 B). sgRNA2+ssODN1 ve sgRNA2+ssODN2 sistemi ile sadece TP53 414delC mutasyonu tamir olmuş PC-3 hücre oranı ise sırasıyla, %19,95 ve %26,0 olarak belirlendi.

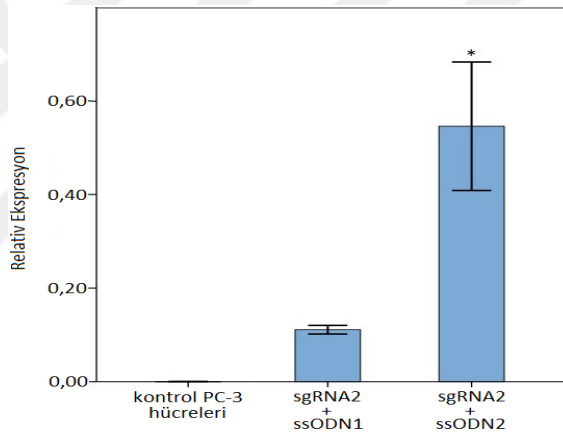


Şekil 15. Yenil nesil sekans sonuçlarının grafik üzerinde yüzdesel gösterimi. **A.** sgRNA2+ssODN1 ve sgRNA2+ssODN2 sistemlerinin PC-3 hücrelerine transfeksiyonu ve püromisin seleksiyonu sonrası ortamda bulunan genetik düzenlemeye uğramış hücre yüzdesi. **B.** Ortamda bulunan genetik düzenlemeye uğramış hücrelerin TP53 414delC mutasyon bölgesinde meydana gelen tamir, A>G knock-in, delesyon, insersiyon ve nokta mutasyonu yüzdeleri.

6.4 PC-3 HÜCRELERİNDE TP53 414delC MUTASYONUNUN TAMİR İŞARETİ OLARAK p53 mRNA EKSPRESYONUNUN BELİRLENMESİ

ssODN'ler ile birlikte sgRNA2 aralayıcı dizisinin rehberlik ettiği CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak TP53 414delC mutasyonunun tamir olduğu PC-3 hücrelerinde tamir işareti olarak p53 mRNA ekspresyonu araştırıldı. Bunun için, sgRNA2+ssODN1 ve sgRNA2+ssODN2 sistemlerinin transfekte edildiği PC-3 hücrelerinde p53 mRNA

ekspresyonu kantitatif PZR sistemi ile analiz edildi. Kantitatif PZR sonuçlarına göre, kontrol grubuna kıyasla sgRNA2+ssODN2 ile transfekte edilmiş PC-3 hücrelerinde p53 mRNA relativ ekspresyon seviyesinde (0,5459 kat) anlamlı bir artış belirlendi ($p<0,001$) (Şekil 16). Bununla birlikte, sgRNA2+ssODN1 ile transfekte edilmiş PC-3 hücrelerinde, kontrol hücrelerine ($p>0,669$) göre anlamlı bir değişiklik olmadan p53 mRNA relativ ekspresyon oranında artış (0,1110) olduğu belirlendi (Şekil 16). Ayrıca, sgRNA2+ssODN1 ile transfekte edilmiş PC-3 hücrelerine göre sgRNA2+ssODN2 ile transfekte edilmiş PC-3 hücrelerinde p53 mRNA ekspresyon oranının anlamlı bir şekilde ($p<0,004$) fazla olduğu belirlendi. Sonuç olarak, NGS sonuçlarına paralel olarak sgRNA2+ssODN2 ile transfekte olan hücrelerde TP53 414delC mutasyonunun daha fazla tamir olması sonucu kantitatif PZR analizlerine p53 mRNA ekspresyonunun oranında daha fazla artış olarak yansdı.

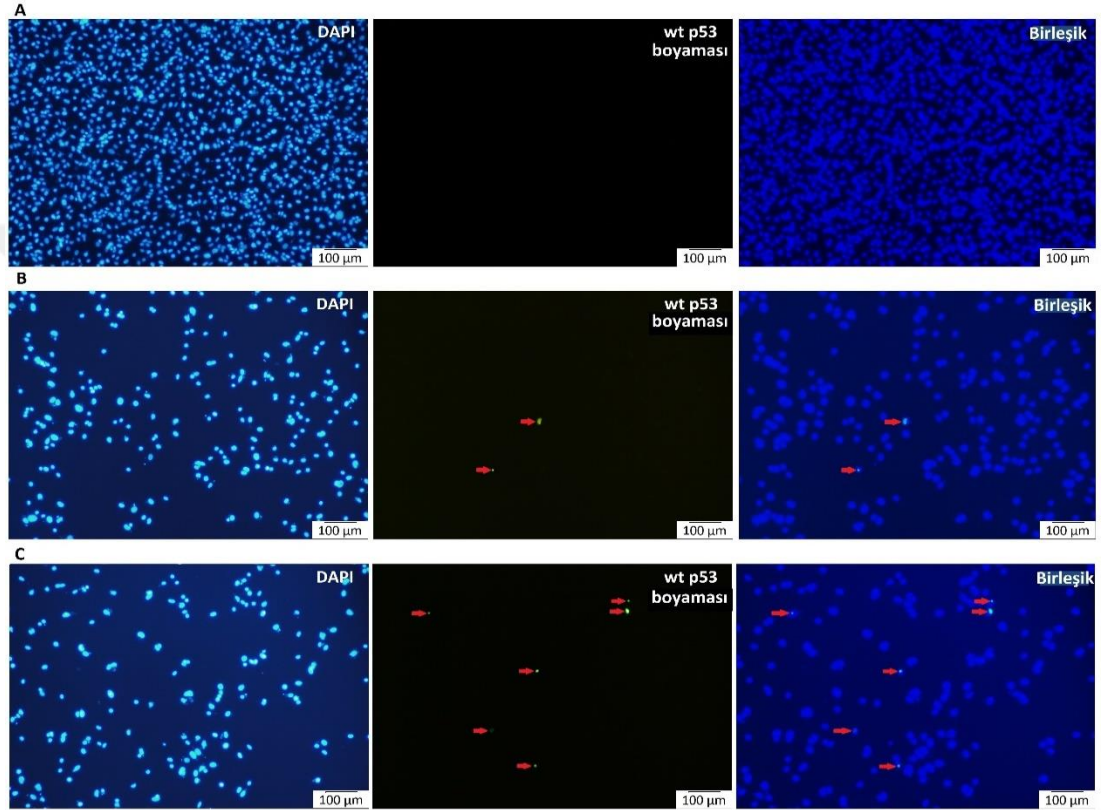


Şekil 16. sgRNA2+ssODN1 ve sgRNA2+ssODN2 sistemlerinin transfekte edildiği PC-3 hücrelerinde p53 mRNA relativ ekspresyon oranları.

6.5 PC-3 HÜCRELERİNDE TP53 414delC MUTASYONUNUN TAMİR İŞARETİ OLARAK YABANIL (wild type/wt) p53 PROTEİN EKSPRESYONUNUN BELİRLENMESİ

Kantitatif RZR analizlerinden ayrı olarak TP53 414delC mutasyonunun PC-3 hücrelerinde, ssODN'ler ile birlikte sgRNA2 aralayıcı dizisinin rehberlik ettiği CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak tamir olduğunun belirlenmesi amacıyla immüno Floresans (IF) analizi kullanarak bir tamir belirteci olarak protein seviyesinde wt p53 proteinlerinin varlığı araştırıldı. Beklendiği gibi, sgRNA2+ssODN1 ve

sgRNA2+ssODN2 sistemlerinin transfekte edildiği PC-3 hücrelerinde wt p53 proteinlerinin varlığı gözlemlenirken, herhangi bir transfeksiyona maruz kalmamış kontrol PC-3 hücrelerinde wt p53 protein varlığı gözlemlenmedi (Şekil 17 A, B, C). Kantitatif PZR analizleri ile benzer olarak IF analizlerinde de, sgRNA2+ssODN2 sisteminin transfekte edildiği PC-3 hücrelerinde sgRNA2+ssODN1 sisteminin transfekte edildiği hücelere göre daha fazla wt p53 protein varlığı belirlendi.



Şekil 17. PC-3 hücrelerinde wt p53 protein varlığının IF analiz yöntemiyle gösterimi. **A.** Kontrol PC-3 hücrelerinde wt p53 protein varlığının taraması. **B.** sgRNA2+ssODN1 sisteminin transfekte edildiği PC-3 hücrelerinde wt p53 protein varlığının taraması. **C.** sgRNA2+ssODN2 sisteminin transfekte edildiği PC-3 hücrelerinde wt p53 protein varlığının taraması.

6.6 sgRNA2+ssODN2 SİSTEMİNİN TRANSFEKTE EDİLDİĞİ PC-3 HÜCRELERİNİN TEK HÜCRE KÜLTÜR ANALİZİ

p53 mRNA ve protein ekspresyonlarının PC-3 hücre karakteri üzerindeki olası etkilerini inceleyebilmek için sgRNA2+ssODN2 sisteminin transfekte edildiği, yüksek

tamir oranından dolayı, PC-3 hücreleri 8 adet 96 kuyucuklu kültür kabının her bir kuyucuğuna tek bir tane düşecek şekilde aktarıldı ve 21 gün boyunca inkübe edildi. Bir hafta sonunda yapılan incelemelerde toplamda ki 768 kuyucuğun 120'sinde en az bir hücrenin olduğu belirlendi. Elde edilen 120 kuyucuktaki hücrelerin %80'ninde (96 kuyucuk) tek bir hücreden çoğalan koloni formasyonu gözlemlendi ve %20'sinde ise (24 kuyucuk) tek bir hücrenin proliferasyona uğramadan yani çoğalmadan durduğu gözlemlendi (Şekil 18 A ve B). Ayrıca, proliferatif olmayan tek hücrelerin yarısının, 21 günlük inkübasyonun sonunda öldüğü gözlemlendi. Ayrıca, kontrol PC-3 hücrelerinin tüm tek hücre kültürlerinin koloniler oluşturduğu gözlemlendi (Şekil 18 C).

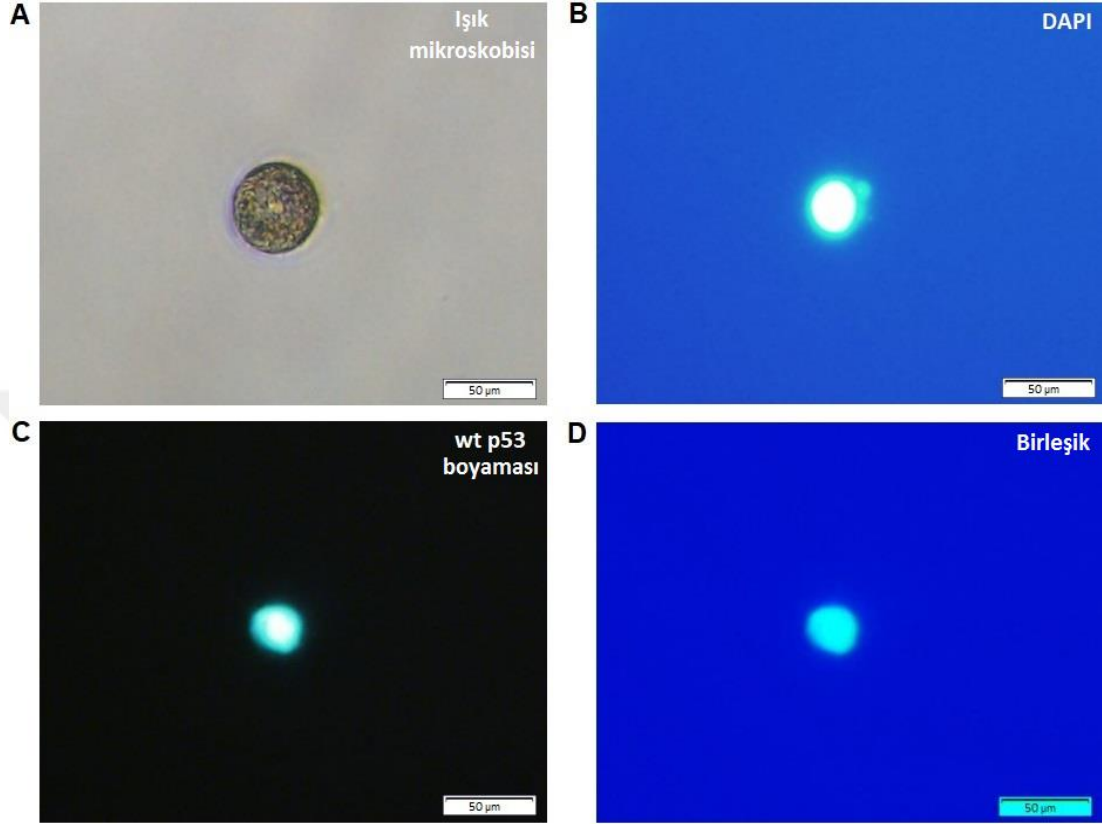


Şekil 18. 21 gün sonunda sgRNA2+ssODN2 sistemi ile transfekte edilmiş ve kontrol PC-3 hücrelerinin tek hücre kültürü analizi. **A.** sgRNA2+ssODN2 sistemi transfekte edilmiş tek bir PC-3 hücresinden meydana gelen koloni oluşumu. **B.** sgRNA2+ssODN2 sistemi transfekte edilmiş tek bir PC-3 hücresinin proliferasyon olamayan tek hücre durumu. **C.** Tek bir kontrol PC-3 hücresinden meydana gelen koloni oluşumu.

6.7 PROLİFERE OLMAYAN TEK BİR HÜCRE DURUMUNDAKİ PC-3 HÜCRELERİNDE TP53 414delC MUTASYON TAMİRİNİN DOĞRULANMASI

Kanser hücrelerinde aktive edilen p53 gen ürünlerinin hücre proliferasyonunu engellediği bilindiğinden, sgRNA2+ssODN2 sistemi ile transfekte olmuş tek hücre kültürlerinin analizinden elde ettiğimiz sonuçlar, proliferatif olmayan tek hücrelerin wt p53 protein durumunu araştırmamıza neden oldu. Bu nedenle, sgRNA2+ssODN2 sistemi ile transfekte olmuş proliferatif olmayan tek bir hücre durumundaki PC-3 hücrelerinde wt p53 protein ekspresyonunun doğrulanması için IF analizi kullanıldı. Yapılan IF analizinde, proliferatif olmayan bu tek hücrelerde wt p53 protein

ekspresyonunu bulundu (Şekil 19 A, B, C, D). Elde edilen sonuçlar, TP53 414delC mutasyonunun CRISPR/Cas9 sistemi ile onarılmasının kanser PC-3 hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiğini gösterdi.

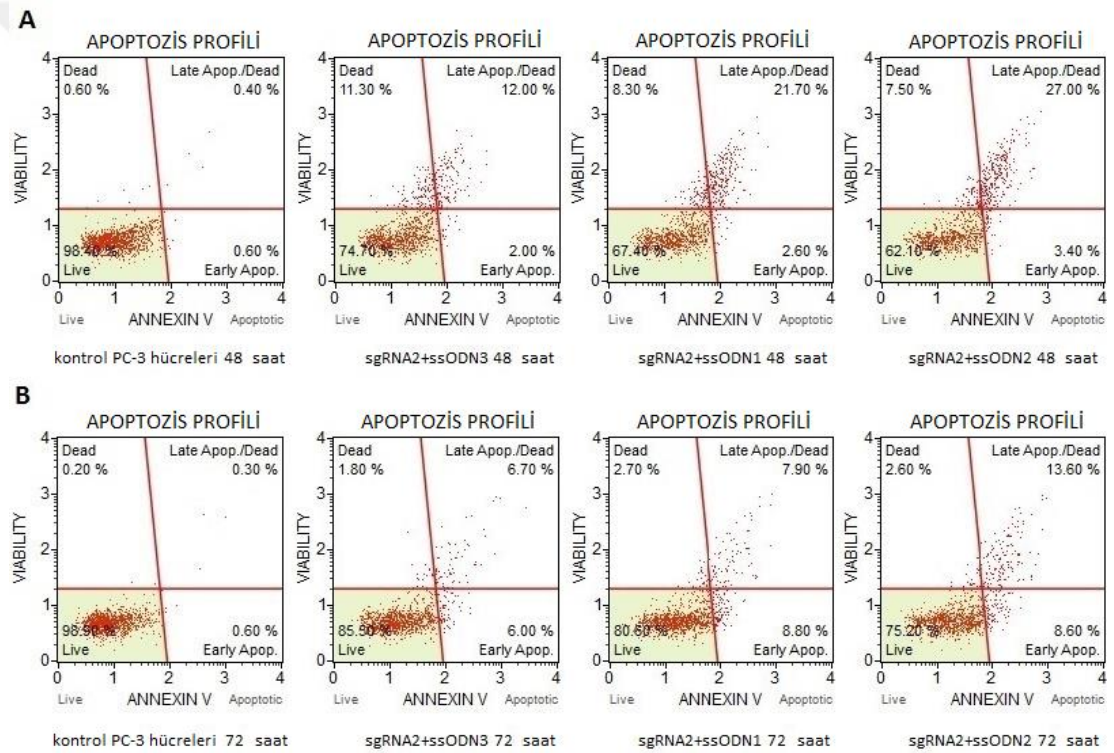


Şekil 19. Prolifere olmayan tek hücrelerde wt p53 proteininin immünofloresan analizi. **A.** Prolifere olmayan tek bir PC-3 hücrenin ışık mikroskop görüntüsü. **B.** Prolifere olmayan tek bir PC-3 hücrenin DAPI görüntüsü. **C.** Prolifere olmayan tek bir PC-3 hücrenin wt p53 antikor boyaması. **D.** Prolifere olmayan tek bir PC-3 hücrenin hem DAPI hem de wt p53 antikor boyamasının birleşik görüntüsü.

6.8 sgRNA2+ssODN2 SİSTEMİNİN TRANSFEKTE EDİLDİĞİ PC-3 HÜCRELERİNDE APOPTOZİS ANALİZİ

CRISPR/Cas9 sistemi ile gen düzenlemesi sonucu PC-3 hücrelerinde p53 ekspresyonunun varlığı hem kantitatif PZR hem de IF analizi ile doğrulandıktan sonra sgRNA2+ssODN1 ve sgRNA2+ssODN2 sistemlerinin transfekte edildiği hücrelerde flow sitometri yöntemi ile wt p53 aracılıklı apoptozis analizi yapıldı. Herhangi bir

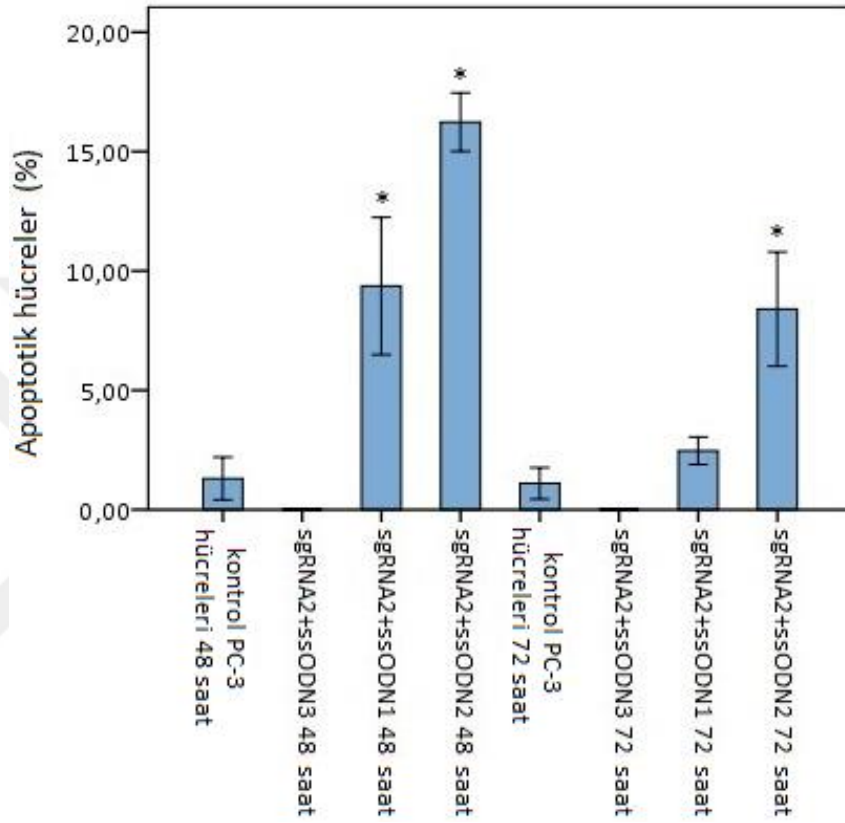
DNA molekülü ile hücrelerin transfeksiyonu da belli bir derecede apoptozis sürecini tetikleyebileceğinden (Li ve ark. 1999), transfeksiyon işlemi sırasında meydana gelen apoptozis değerlerini normalize edebilmek sgRNA2 aralayıcı dizisinin rehberlik ettiği CRISPR/Cas9 sistemi ile birlikte deneyde negatif kontrol olarak ssODN3 tamir kalıbı kullanıldı. ssODN3, hedef genom sekansında nükleotid değişimi yaratmayacak şekilde tasarlanmış olup, diğer ssODN'lerle aynı uzunluğa sahiptir. Bu şekilde, sgRNA2+ssODN3 ile transfekte edilmiş PC-3 hücrelerinden elde edilen apoptozis sonuçlarına göre sgRNA2+ssODN1 ve sgRNA2+ssODN2 ile transfekte edilmiş hücrelerden elde edilen apoptozis sonuçları normalize edilmesini sağlayacak şekilde apoptozis deneyi kuruldu (Şekil 20).



Şekil 20. Kontrol PC-3 hücrelerinde, sgRNA2 + ssODN3, sgRNA2 + ssODN1 ve sgRNA2 + ssODN2 ile transfekte edilmiş hücrelerde püromisin seleksiyonu olmaksızın 48. ve 72. saatlerde apoptotik hücre oranlarının belirlenmesi.

Post-transfeksiyon sonrasındaki 48. saatte sgRNA2+ssODN1 ve sgRNA2+ssODN2 ile transfekte edilmiş PC-3 hücrelerinden elde edilen normalize apoptotik hücre oranı, kontrol hücrelerine kıyasla (Şekil 20) anlamlı farklılık göstermiştir ($p < 0,0001$). Post-transfeksiyon sonrasındaki 72. saatte ise

sgRNA2+ssODN1 ile transfekte edilmiş PC-3 hücrelerinin normalize apoptotik hücre oranı, kontrol hücrelerine göre anlamlı bir farklılık göstermezken ($p>0,087$), sgRNA2+ssODN2 ile transfekte edilmiş PC-3 hücrelerinden elde edilen normalize apoptotik hücre oranı, kontrol hücrelerine kıyasla anlamlı farklılık göstermiştir ($p<0,0001$) (Şekil 21).



Şekil 21. Kontrol hücreleri ile sgRNA2+ssODN1 ve sgRNA2+ssODN2 ile transfekte edilmiş PC-3 hücrelerinden 48. ve 72. saatte elde edilen normalize %apoptotik hücre oranı. Yıldız işareti gruplar arasındaki anlamlı farklılığı belirtir ($*p<0,0001$).

7. TARTIŞMA

TP53 geni (17p13.1 kromozom bandı), apoptozis, hücre döngüsünün durması ve hücre yaşlanmanın tetiklenmesi yoluyla tümör büyümesini sınırlamak için gerekli olan p53 proteininin üretiminden sorumludur (Chen 2016). Kanser türlerinin çoğu ise disfonksiyonel TP53 geni ile ilişkili olup, kanser veritabanındaki TP53 geni ile ilişkili 26.000'den fazla somatik mutasyon bildirilmiştir. Bu nedenle, birçok kanser tedavisi araştırması, farklı yaklaşımlar kullanarak kanser tedavisi için TP53 geni ve ürünü p53 proteininin yeniden fonksiyonel hale getirilmesi üzerine kurgulanmıştır (Janic ve ark. 2018). Bu sebeple, PC-3 prostat kanser hücrelerinde CRISPR/Cas9 sistemi ile TP53 414delC mutasyonunun onarılması TP53 genin yabancıl forma dönüşmesini sağlamak ve bu onarımın olası etkilerinin değerlendirilmesi bu çalışmanın ana amacı olarak ele alındı. TP53 geninin deneysel onarım mekanizmasının ayrıntılı tasarımını gösteren bir şema ise Şekil 22'de sunulmuştur. Tamir kalıplarının hücrelere transfeksiyonu nedeniyle meydana gelecek olan toksik etkiyi azaltmak ve konak genoma entegrasyonunu engellemek amacıyla bu çalışmada tamir kalıbı olarak çift iplikli bir tamir kalıbı yerine tek iplikli ssODN'ler kullanıldı (Song ve Stieger 2017). Bu nedenle, hedef bölgede çift iplik kırık oluşumunu sağlayan en etkili sgRNA aralayıcı dizisini belirledikten sonra, PC-3 hücrelerine TP53 gen bölgesinin 414delC mutasyonunu içermeyen 80 nükleotidlik bölgesi ssODN şeklinde tamir kalıbı olarak transfekte edildi. PC-3 hücrelerinde TP53 414delC mutasyonu sonucu delesyona uğrayan C nükleotidinin ssODN'ler aracılığıyla PC-3 hücrelerine transfeksiyonu ve bunların HDR aracılıklı tamir mekanizmasında kullanılması, sadece mutasyonun onarımına neden olmakla kalmaz, aynı zamanda, tamir edilen TP53 414delC mutasyon bölgesinde CRISPR/Cas9 sisteminin yeniden DSB oluşturmasını önleyen, sgRNA2 aralayıcı dizisinin hedef bağlanma bölgesinde, bir rehber-blokaj mutasyonuna neden olur. Öte yandan, HDR aracılıklı tamir etkinliğinin daha fazla artırılması için sgRNA2 aralayıcı dizisine komplementer hedef nükleotid dizisinde ssODN'ler aracılığıyla ikinci bir rehber-blokaj mutasyonu meydana getirildi. Meydana getirilen bu mutasyon, kodlanan amino asit sekansını değiştirmeden hücre genomunda adenin (A) > guanin

PC-3 prostat kanser hücrelerinde TP53 414delC mutasyonu başarılı bir şekilde sgRNA2+ssODN1 ve sgRNA2+ssODN2 sistemlerinin öncülük ettiği HDR aracılıklı tamir mekanizması aracılığıyla %19,95 ve %26,0 oranında tamir edilmiştir. Yapılmış olan diğer çalışmalarda ise HDR aracılıklı mutasyon düzeltme oranlarının, sgRNA aralayıcı dizisinin bağlanma bölgesinde herhangi bir rehber-blokajı veya PAM-blokajı yapılmadığı takdirde, %3, %8 ve %10 olarak gerçekleştiği görülmüştür (Bialk ve ark. 2011; Aird ve ark. 2018). Bu çalışmada ise, TP53 414delC mutasyonunun bu denli yüksek oranda tamirinin gerçekleşmesi sgRNA2 aralayıcı dizisinin bağlanma bölgesinde HDR aracılıklı tamir sonrası 2 farklı rehber-blokaj mutasyonunun gerçekleştirilmiş olmasına bağlıdır.

Ayrıca, HDR aracılıklı tamirin ilk adımlarında PC-3 hücrelerinde TP53 genindeki TP53 414delC mutasyonu henüz tamir olmadığından yani TP53 geni inaktif olduğundan, hücrede Cas9 enziminin neden olduğu çift iplik kırıklarına karşı p53 aracılıklı toksik hasar cevabı oluşmamış ve bu sayede arzu edilen nükleotid dizisine sahip HDR aracılıklı tamir yapılmış hücre sayısında artış gözlemlenmiştir. Yapılan diğer çalışmalarda da bu çalışmayla benzer şekilde, tamir kalıbı olarak kalıp olmayan DNA ipliğine komplementer bir ssODN (ssODN2) kullanıldığında HDR aracılıklı tamir mekanizmasının % verimliliğinin daha fazla olduğu görülmüştür (Bialk ve ark. 2011; Prykhozhiy ve ark. 2018).

PC-3 hücrelerinde mutasyona uğramış TP53 geninin doğru düzenlenmesinin bir işareti olarak, tamir edilen TP53 geninin wt ekspresyon ürünlerini mRNA ve protein seviyesinde bulduk. İnaktif TP53 geninin sgRNA2+ssODN1 ve sgRNA2+ssODN2 sistemleri tarafından tamir edilerek tekrar aktive edilmesinin bir sonucu olarak, wt p53 ekspresyonunun 48 saat sonunda PC-3 prostat kanser hücrelerini kontrol hücrelerine göre apoptozise sürüklediği görülmüştür ($p < 0,001$). Bununla birlikte, CRISPR/Cas9 ve ssODN sistemleri ile 72 saatlik transfeksiyon sonrası kontrol hücrelerine kıyasla apoptotik hücre oranındaki anlamlı farkın ($p < 0,001$) sadece sgRNA2+ssODN2 sistemi ile transfekte edilmiş PC-3 hücrelerinde görülmesinin nedeni olarak, TP53 414delC mutasyonunun sgRNA2+ssODN2 sistemi ile daha fazla verimle tamir edilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca, PC-3 hücrelerinin tek hücre kültürünün 21 günlük süresi sonunda dahi hücre döngüsünün tutulu halde kaldığı bir çok proliferasyon olmamış ve de wt p53 protein ekspresyonu IF analizi ile doğrulanmış tek hücre

formunda PC-3 hücreleri gözlemlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlara göre, PC-3 prostat kanser hücrelerinde mutant halde bulunan tek bir TP53 gen allelinin (diğer TP53 gen alleli delesyona uğramıştır) bile tamir edilip aktive olmasının, hücrelerin apoptozise sürüklenmesi veya hücre döngüsünde tutulu kalması için yeterli olduğu görülmüştür. Tüm bunlarla birlikte, TP53 geni aracılığıyla PC-3 hücrelerinde tetiklenen p53 ekspresyonu ve dolayısıyla apoptozis oranı hücrelerde gerçekleşen HDR verimliliğinin artırılması yoluyla yükseltilebilir. Bu bağlamda, genoma entegrasyonu kaldırılmış mutant lentivirüslerin veya adeno-ilişkili virüslerin PC-3 hücrelerinde vektör olarak kullanılması HDR verimliliğini artırabilir, aynı zamanda bu virüslerin yine CRISPR/Cas9 sistemlerinin hücrelere aktarımında kullanılması bizlere in vivo olarak mutant TP53 genin tamirini mümkün kılar (Wang ve ark. 2007; Nishiyama ve ark. 2017). Tüm bunların yanında ise in vivo araştırmalar için CRISPR/Cas9 aracılığıyla mutant TP53 geninin tamirinde bazı iyileştirmelere hala ihtiyaç vardır. Çünkü sağlıklı hücrelere CRISPR/Cas9 sisteminin kanser tedavisi için viral bir vektörle teslim edilmesi, CRISPR/Cas9 sisteminin hedef dışı etkisine bağlı olarak hedeflenen nükleotid dizisine benzer nükleotid dizilerinde DSB'lerin oluşumuna yol açabilme ihtimali vardır ve bu durum in vivo araştırmalar için büyük bir problemdir (Sternberg ve Doudna 2015). Bu durum ise, Cas9 geninin ekspresyonunda tümör-seilimli survivin genine ait promotörün kullanılması yoluyla aşılabilir (Chira ve ark. 2018). Survivin geni erişkin bireye ait normal hücrelerde çok azalmış şekilde eksprese olur iken tümör hücrelerinde aşırı eksprese olmaktadır (Groner ve Weiss 2014). Bir diğer iyileştirme ise, CRISPR/Cas9 sisteminin kullanımında iki farklı sgRNA aralayıcı dizisinin aynı anda kullanımını olabilir. Aralayıcı dizilerden biri MDM2 geninin, birçok tümör hücre tipinde p53 proteininin degradasyonunu kontrol eder, ekspresyonunu engellemek için kullanılırken, diğer aralayıcı dizi mutant TP53 geninin tamirinde kullanılabilir. Bununla birlikte, iki farklı sgRNA aralayıcı dizisinin kullanılmasıyla mutant TP53 geninin, komşu nükleotid dizilerinin hedeflenmesiyle, tam bir fonksiyonel TP53 gen kopyasıyla değişimide sağlanabilir (Zhou ve ark. 2014). Genel olarak, CRISPR/Cas nükleazlarının geliştirilmesi için araştırmalar halen devam etmektedir, Cas12 ve CasX gibi hedef dışı DSB etkisinin ve fiziksel boyutlarının azaltılması için yapılan çalışmalar ise bizlere kanser tedavisi için yeni araştırma perspektifleri sunmaya devam etmektedir (Strohkendl ve ark. 2018; Liu ve ark. 2019).

8. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak bu çalışmada, PC-3 hücrelerinde TP53 414delC mutasyonunun onarımı için CRISPR/Cas9 sistemi başarıyla kullandı ve bu onarımın bir sonucu olarak, PC-3 hücrelerinin proliferasyonu engellendi ve apoptozise sürüklendi.



9. KAYNAKLAR

Aird EJ, Lovendahl KN, St Martin A, Harris RS, Gordon WR. Increasing Cas9-mediated homology-directed repair efficiency through covalent tethering of DNA repair template. *Commun Biol.* 2018 May 31;1:54.

Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Paraskeva C, Markowitz S, Willson JK, Hamilton S, Vogelstein B. p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res.* 1990 Dec 1;50(23):7717-22.

Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science.* 2007 Mar 23;315(5819):1709-12.

Barrangou R, Marraffini LA. CRISPR-Cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Mol Cell.* 2014 Apr 24;54(2):234-44.

Bialk P, Rivera-Torres N, Strouse B, Kmiec EB. Regulation of Gene Editing Activity Directed by Single-Stranded Oligonucleotides and CRISPR/Cas9 Systems. *PLoS One.* 2015 Jun 8;10(6)

Bonkhoff H. Neuroendocrine cells in benign and malignant prostate tissue: morphogenesis, proliferation, and androgen receptor status. *Prostate Suppl.* 1998;8:18-22.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018 Nov;68(6):394-424.

Chen J. The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016 Mar 1;6(3):a026104.

Chira S, Gulei D, Hajitou A, Berindan-Neagoe I. Restoring the p53 'Guardian' Phenotype in p53-Deficient Tumor Cells with CRISPR/Cas9. *Trends Biotechnol.* 2018 Jul;36(7):653-660.

Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science.* 2013 Feb 15;339(6121):819-23.

Ding Q, Lee YK, Schaefer EA, Peters DT, Veres A, Kim K, Kuperwasser N, Motola DL, Meissner TB, Hendriks WT, Trevisan M, Gupta RM, Moisan A, Banks E, Friesen M, Schinzel RT, Xia F, Tang A, Xia Y, Figueroa E, Wann A, Ahfeldt T, Daheron L, Zhang F, Rubin LL, Peng LF, Chung RT, Musunuru K, Cowan CA. A TALEN genome-editing system for generating human stem cell-based disease models. *Cell Stem Cell.* 2013;12(2):238-51.

Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA Jr, Butel JS, Bradley A. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature.* 1992 Mar 19;356(6366):215-21.

Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer.* 2013 Apr;49(6):1374-403.

Fidler IJ. Origin and biology of cancer metastasis. *Cytometry.* 1989 Nov;10(6):673-80.

Fouad YA, Aanei C. Revisiting the hallmarks of cancer. *Am J Cancer Res.* 2017 May 1;7(5):1016-1036.

Groner B, Weiss A. Targeting survivin in cancer: novel drug development approaches. *BioDrugs.* 2014 Feb;28(1):27-39.

Haft DH, Selengut J, Mongodin EF, Nelson KE. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput Biol.* 2005 Nov;1(6):e60.

Hsu PD, Zhang F. Dissecting neural function using targeted genome engineering technologies. *ACS Chem. Neurosci.* 2012; 3:603–610.

Huang Y, Hamana T, Liu J, Wang C, An L, You P, Chang JY, Xu J, McKeehan WL, Wang F. Prostate Sphere-forming Stem Cells Are Derived from the P63-expressing Basal Compartment. *J Biol Chem.* 2015 Jul 17;290(29):17745-52.

Janic A, Valente LJ, Wakefield MJ, Di Stefano L, Milla L, Wilcox S, Yang H, Tai L, Vandenberg CJ, Kueh AJ, Mizutani S, Brennan MS, Schenk RL, Lindqvist LM, Papenfuss AT, O'Connor L, Strasser A, Herold MJ. DNA repair processes are critical mediators of p53-dependent tumor suppression. *Nat Med.* 2018 Jul;24(7):947-953.

Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 2012 Aug 17;337(6096):816-21.

Josson S, Matsuoka Y, Chung LW, Zhau HE, Wang R. Tumor-stroma co-evolution in prostate cancer progression and metastasis. *Semin Cell Dev Biol.* 2010 Feb;21(1):26-32.

Kgatle MM, Kalla AA, Islam MM, Sathekge M, Moorad R. Prostate Cancer: Epigenetic Alterations, Risk Factors, and Therapy. *Prostate Cancer.* 2016;2016:5653862.

Kocher T, Peking P, Klausegger A, Murauer EM, Hofbauer JP, Wally V, Lettner T, Hainzl S, Ablinger M, Bauer JW, Reichelt J, Koller U. Cut and Paste: Efficient Homology-Directed Repair of a Dominant Negative KRT14 Mutation via CRISPR/Cas9 Nickases. *Mol Ther.* 2017 Nov 1;25(11):2585-2598.

Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*. 1979 Mar 15;278(5701):261-3.

Lee WM. The myc family of nuclear proto-oncogenes. *Cancer Treat Res*. 1989;47:37-71.

Leslie NR, Downes CP. PTEN function: how normal cells control it and tumour cells lose it. *Biochem J*. 2004 Aug 15;382(Pt 1):1-11

Li LH, Sen A, Murphy SP, Jahreis GP, Fuji H, Hui SW. Apoptosis induced by DNA uptake limits transfection efficiency. *Exp Cell Res*. 1999 Dec 15;253(2):541-50.

Liu A, Takakuwa T, Fujita S, Ham MF, Luo WJ, Daibata M, Aozasa K. Alterations of DNA damage-response genes ATM and ATR in pyothorax-associated lymphoma. *Lab Invest*. 2005 Mar;85(3):436-46.

Liu JJ, Orlova N, Oakes BL, Ma E, Spinner HB, Baney KLM, Chuck J, Tan D, Knott GJ, Harrington LB, Al-Shayeb B, Wagner A, Brötzmann J, Stahl BT, Taylor KL, Desmarais J, Nogales E, Doudna JA. CasX enzymes comprise a distinct family of RNA-guided genome editors. *Nature*. 2019 Feb;566(7743):218-223.

Liu A Y, True L D, LaTray L, Nelson P S, Ellis W J, Vessella R L, Lange P H, Hood L, van den Engh G. Cell-cell interaction in prostate gene regulation and cytodifferentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Sep 30;94(20):10705-10.

Lodish H, Berk A, Kaiser C A, Krieger M, Scott M P, Bretscher A, Ploegh H, Matsudaria P. *Molecular Cell Biology*. 6. basım. Palme Yayıncılık: Ankara; s:1107-1148.

Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*. 2013 Feb 15;339(6121):823-6.

Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF Jr, Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA, et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science*. 1990 Nov 30;250(4985):1233-8. Erratum in: *Science*. 1993 Feb 12;259(5097):878.

Muthuswamy SK, Siegel PM, Dankort DL, Webster MA, Muller WJ. Mammary tumors expressing the neu proto-oncogene possess elevated c-Src tyrosine kinase activity. *Mol Cell Biol*. 1994 Jan;14(1):735-43.

Nishiyama J, Mikuni T, Yasuda R. Virus-Mediated Genome Editing via Homology-Directed Repair in Mitotic and Postmitotic Cells in Mammalian Brain. *Neuron*. 2017 Nov 15;96(4):755-768.e5.

Patel AR, Klein EA. Risk factors for prostate cancer. *Nat Clin Pract Urol*. 2009 Feb;6(2):87-95.

Potter JW, Jones KB, Barrott JJ. Sarcoma-The standard-bearer in cancer discovery. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2018 Jun;126:1-5.

Prsott J L, Blok L, Tindall D J. Isolation and Androgen Regulation of Human Homeobox cDNA, NKX3.1. *Prostate* 1998; 35(1): 71 - 80.

Prykhozhij SV, Fuller C, Steele SL, Veinotte CJ, Razaghi B, Robitaille JM, McMaster CR, Shlien A, Malkin D, Berman JN. Optimized knock-in of point mutations in zebrafish using CRISPR/Cas9. *Nucleic Acids Res*. 2018 Sep 28;46(17):e102.

Rath D, Amlinger L, Rath A, Lundgren M. The CRISPR-Cas immune system: biology, mechanisms and applications. *Biochimie*. 2015 Oct;117:119-28.

Roth J, Dobbstein M. Interaction of p53 with the adenovirus E1B-55 kDa protein. *Methods Mol Biol*. 2003;234:135-49.

Rusciano D, Burger MM. Why do cancer cells metastasize into particular organs? *Bioessays*. 1992 Mar;14(3):185-94.

Shenk JL, Fisher CJ, Chen SY, Zhou XF, Tillman K, Shemshedini L: p53 represses androgen-induced transactivation of prostate-specific antigen by disrupting hAR amino- to carboxyl-terminal interaction. *J Biol Chem*. 2001, 276: 38472-38479.

Song F, Stieger K. Optimizing the DNA Donor Template for Homology-Directed Repair of Double-Strand Breaks. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2017 Jun 16;7:53-60.

Sternberg SH, Doudna JA. Expanding the Biologist's Toolkit with CRISPR-Cas9. *Mol Cell*. 2015 May 21;58(4):568-74.

Strohkendl I, Saifuddin FA, Rybarski JR, Finkelstein IJ, Russell R. Kinetic Basis for DNA Target Specificity of CRISPR-Cas12a. *Mol Cell*. 2018 Sep 6;71(5):816-824.

Tang Y, Zhou H, Chen A, Pittman RN, Field J. The Akt proto-oncogene links Ras to Pak and cell survival signals. *J Biol Chem*. 2000 Mar 31;275(13):9106-9.

Travé G, Zanier K. HPV-mediated inactivation of tumor suppressor p53. *Cell Cycle*. 2016 Sep;15(17):2231-2.

Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat. Rev. Genet*. 2010; 11:636–646.

Wang Y, Wang Y, Chang T, Huang H, Yee JK. Integration-defective lentiviral vector mediates efficient gene editing through homology-directed repair in human embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res*. 2017 Mar 17;45(5):e29.

www.true.org.au/Health-information/mens-health, Erişim tarihi: 10 Nisan 2019

Yamada Y, Yamada Y. The causal relationship between epigenetic abnormality and cancer development: in vivo reprogramming and its future application. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2018;94(6):235-247.

Zacharias J, Romanova LG, Menk J, Philpott NJ. p53 inhibits adeno-associated viral vector integration. *Hum Gene Ther.* 2011;22(11):1445-51.

Zhang D, Park D, Zhong Y, Lu Y, Rycaj K, Gong S, Chen X, Liu X, Chao HP, Whitney P, Calhoun-Davis T, Takata Y, Shen J, Iyer VR, Tang DG. Stem cell and neurogenic gene-expression profiles link prostate basal cells to aggressive prostate cancer. *Nat Commun.* 2016 Feb 29;7:10798.

Zhang Z, Li M, Wang H, Agrawal S, Zhang R. Antisense therapy targeting MDM2 oncogene in prostate cancer: effects on proliferation, apoptosis, multiple gene expression, and chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:11636–11641.

Zhou J, Wang J, Shen B, Chen L, Su Y, Yang J, Zhang W, Tian X, Huang X. Dual sgRNAs facilitate CRISPR/Cas9-mediated mouse genome targeting. *FEBS J.* 2014 Apr;281(7):1717-25.

10. EKLER

Ek 1: Enstitü Tez Konusu Yönetim Kurul Karar Örneği

Evrak Tarih ve Sayısı: 13/07/2017-E.55797



T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü

Sayı : 28233352-302.14.01-
Konu : Muhammet Burak Batır'ın Tez Konusu
hk.

SBE-TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

Enstitümüzün 05.07.2017 tarihli Yönetim Kurulu Toplantısında, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı'nın, Doktora Programı öğrencisi Muhammet Burak BATIR'ın Tez Konusunun etik kurul onayı almasına gerek olmadığı için "PC-3 Prostat Kanseri Hücre Hattında Mutant TP53 Geninin CRISPR-Cas9 Aracılıklı Restorasyonu" olmasına **OY BİRLİĞİ** ile karar verildi. Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

e-İmzalıdır
Prof. Dr. Ayşe AKTAŞ
Enstitü Müdürü

Adres: Tıp Fakültesi Dekanlığı Zemin Kat Uncubozköy Kampüsü Manisa
Telefon: (0 236) 2360989 Faks: (0 236) 2382158
E-Posta: saglik.sekreterlik@cbu.edu.tr Elektronik Ağ: saglikbe.cbu.edu.tr

Bilgi için: Ayşe Ertik
Unvanı: Memur



Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Ek 2: Doktora Tez Çalışması Orjinallik Raporu

T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orjinallik Raporu

Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı Başkanlığı'na

Tez Adı

PC-3 PROSTAT KANSER HÜCRE HATTINDA MUTANT TP53 GENİNİN CRISPR-Cas9 ARACILIKLI RESTORASYONU

Tezime ilişkin 01/10/2019 tarihinde yapılan Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orjinallik raporuna göre, tezin benzerlik oranı % 4'tür.

Belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

04.10.2019

Adı Soyadı : Muhammet Burak BATIR
Öğrenci No : 141369002
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyoloji
Programı : Tıbbi Biyoloji

DANIŞMAN ONAYI
UYGUNDUR
Prof.Dr. F. Sırrı ÇAM

Açıklamalar

- 1-Tez Çalışması Orjinallik Raporu (TÇOR), TURNITIN İntihal Tespit Programı kullanımı için kişisel hesap alma hakkı bulunan tez danışmanları, Enstitülerde görevlendirilen personeller, Kütüphane ve Dokümantasyon Daire Başkanlığı'nda görevlendirilen kütüphaneciler tarafından alınır.
- 2-Sayfa sayısı 400'den az olan tezler için tez savunmasından önce ve başarılı olması durumunda düzeltmelerden sonra olmak üzere 2 kez TÇOR alınır.(400 sayfadan fazla olan tezler 400 ve katları şeklinde bölünerek Turnitin veri tabanına yüklenmesi gerekmektedir. Bu gibi durumlarda benzerlik oranının hesaplanmasına ilişkin detaylı forma, kütüphane web sayfasında bulunan Turnitin kullanım kılavuzlarının altından erişilebilir.)
- 3-TÇOR, tezin yalnızca Kapak Sayfası, Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan kısmının tek bir dosya olarak intihal tespit programına yüklenmesi ile alınır.
Programa yükleme yapılırken Dosya Başlığı (document title) olarak tez başlığının tamamı, Yazar Adı (author's first name) olarak öğrencinin adı, Yazar Soyadı (author's last name) olarak öğrencinin soyadı bilgisi yazılır.
- 4- TURNITIN İntihal tespit programına yüklenen dosyanın süreçlenmesinde, ilgili programdaki filtreleme seçenekleri aşağıdaki şekilde ayarlanır: - Kaynakça hariç, - Alıntılar hariç, - 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 5 words)
- 5-**İsteğe bağlı ayarlar kısmından; "Ödevleri şuraya gönder?" seçeneği mutlaka DEPO YOK şeklinde işaretlenmesi gerekmektedir;** aksi durumda aynı tezin ikinci kez yüklenmesi durumunda benzerlik %100 çıkacaktır ve depodan tezi silmek çok uzun süre gerektirecektir.
- 6- Raporlama işlemi tamamlandıktan sonra, kaydedilmiş olan ekranın görüntüsünü sağ üst köşesinde yüzdelik sayı olarak belirtilen "benzerlik oranı," raporlamaya tabi tutulmuş olan dosyanın "toplam sayfa sayısı" ve raporlama işleminin yapıldığı "tarih" bilgisi, "Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orjinallik Raporu" formuna işlenir.
- 7- **Benzerlik oranında tüm sorumluluk öğrenciye aittir.**
- 8-Tez savunma sınavı sonrasında başarılı bulunan öğrenci, tez savunma sınavı tarihi sonrasında tezde yapılmış muhtemel değişiklikleri içeren dosya kullanılarak alınmış ikinci bir intihal raporundaki bilgiler kullanılarak hazırlanmış ve tez danışmanı tarafından onaylanarak imzalanmış ikinci bir "Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orjinallik Raporu"nu Enstitüye teslim etmekle yükümlüdür.
- 9-Turnitin Hakkında Bilgiler: <http://kutuphane.cbu.edu.tr/turnitin.9370.tr.html>

Ek 3: Doktora Tez Çalışmasından Çıkarılan Yayın

Molecular Biology Reports
https://doi.org/10.1007/s11033-019-05093-y

ORIGINAL ARTICLE



Evaluation of the CRISPR/Cas9 directed mutant TP53 gene repairing effect in human prostate cancer cell line PC-3

Muhammet Burak Batır¹ · Ergin Şahin² · Fethi Sırrı Çam³

Received: 28 February 2019 / Accepted: 22 September 2019
© Springer Nature B.V. 2019

Abstract

Prostate cancer is a common health problem among men worldwide and most of these prostate cancer cases are related to a dysfunctional mutant Tumor Protein p53 (TP53) gene. However, the CRISPR/Cas9 system can be used for repairing of a dysfunctional mutant TP53 gene in combination with donor single-stranded oligodeoxynucleotide (ssODN) via cells' own homology-directed repair (HDR) mechanism. In this study, we aimed to evaluate the CRISPR/Cas9 repairing efficiency on TP53 414delC (p.K139fs*31) null mutation, located in the TP53 gene, of human prostate cancer cell line PC-3 in combination with ssODNs. According to the next-generation sequencing results, TP53 414delC mutation was repaired with an efficiency of 19.95% and 26.0% at the TP53 414delC position with ssODN1 and ssODN2 accompanied by sgRNA2 guided CRISPR/Cas9, respectively. Besides, qPCR and immunofluorescence analysis showed that PC-3 cells, the TP53 414delC mutation of which were repaired, expressed wild type p53 again. Also, significantly increased number of apoptotic cells, driven by the repaired TP53 gene were detected compared to the control cells by flow cytometry analysis. As a result, sgRNA2 guided CRISPR/Cas9 system accompanied by ssODN was shown to effectively repair the TP53 414delC gene region and inhibit the cell proliferation of PC-3 cells. Therefore, the effects of the TP53 414delC mutation repairment in PC-3 cells will be investigated in the in vivo models for tumor clearance analysis in the near future.

Keywords CRISPR/Cas9 · Prostate cancer · TP53 gene · p53 · Homology-directed repair (HDR)

Introduction

Prostate cancer is the third most common form of cancer type and the most commonly diagnosed male malignant tumor in Europe [1]. On the other hand, the development of cancer disease is driven by the genetic and epigenetic alterations on the structure and function of the genome. These alterations can be different according to the cancer cell and tissue type. Hence, the progression of each cancer cell type can vary substantially due to their behavior and response to treatment [2, 3]. However, among these genetic alterations, Tumor Protein p53 (TP53) gene mutations are the

most common type of cancer-related mutations found in at least 50% of all human cancer cell type. Most of the human prostate cancer cases and cell lines derived from these cases related to the dysfunctional TP53 gene mutations. These mutations on TP53 gene result in impairment or loss of p53 function, which is responsible for transcriptional activation of apoptosis, cell cycle arrest, DNA repair, and senescence-related genes. Hence, many studies have set out to the clearance of the tumor tissue by restoring the lost function of p53 in cancer [4, 5]. These include the introduction of the wild-type form of TP53 with gene therapy, reactivation of mutant p53 to the wild-type form and elimination of mutant p53 [6–9]. For this reason, many of the contemporary cancer therapy strategies are based on the concept of restoration of p53. So far these undertaken strategies aim to repair the defects in the p53 pathway that are caused by somatic genetic mutations or alterations in the genome which are either selected for or acquired during carcinogenesis.

The recent advances in genome engineering enable us to introduce specific genomic modifications in human genome and one of these new techniques is called CRISPR/Cas9.

✉ Muhammet Burak Batır
burak.batir@cbu.edu.tr

¹ Department of Biology, Faculty of Science and Letters, Manisa Celal Bayar University, Manisa, Turkey

² Department of Biology, Faculty of Science, Ankara University, Ankara, Turkey

³ Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Manisa Celal Bayar University, Manisa, Turkey

Published online: 30 September 2019

Springer

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı	Muhammet Burak	Soyadı	BATIR
Doğum Yeri	Düzce	Doğum Tarihi	11.01.1984
Uyruğu	Türkiye Cumhuriyeti	Tel	+905323550487
E-mail	burak.batir@cbu.edu.tr		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi	2014
Lisans	Manisa Celal Bayar Üniversitesi	2009
Lise	Muzaffet Çil Anadolu Lisesi	2002

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl – Yıl)
Araştırma Görevlisi	Manisa Celal Bayar Üniversitesi/Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı	2010-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama	Konuşma	Yazma
İngilizce	İyi	İyi	İyi

Yabancı Dil Sınav Notu
ÜDS
85.00

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	75.028	75.476	74.801