

**T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**CRİSPR\CAS9 YÖNTEMİ ARACILIĞI İLE İNSAN CCDC 124 GENİ
DELESYONUNUN HÜCRE BÖLÜNMESİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

**SİNEM GÜL
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**GEBZE
2015**

**T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**CRİSPR\CAS9 YÖNTEMİ ARACILIĞI İLE İNSAN
CCDC 124 GENİ DELESYONUNUN HÜCRE
BÖLÜNMESİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

**SİNEM GÜL
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**DANIŞMANI
PROF. DR. UYGAR HALİS TAZEBAY**

**GEBZE
2015**

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

**EFFECTS OF CRISPR\CAS9 MEDIATED
HUMAN *CCDC124* GENE DELETION ON
CELLULAR DIVISION**

SİNEM GÜL
**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE**
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR
PROF. DR. UYGAR HALİS TAZEBAY

GEBZE

2015



YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 29/01/2015 tarih ve 2015/41 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 22/07/2015 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Sinem GÜL'ün tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Prof Dr. Uygur Halis TAZEYBAY

ÜYE

: Doç Dr. Batu ERMAN

ÜYE

: Doç Dr. Nuri ÖZTÜRK

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Mantardan insana kadar tüm ökaryotlarda korunmuş bir protein olan Ccdc124 lokalizasyonu ve işlevi yeni tanımlanmış bir sentrozom proteindir. Memeli hücrelerinde, hücre döngüsünün anafaz evresine kadar sentrozomda konumlanan Ccdc124 proteini post-anafaz evresinde orta cisimciğe (midbody) göç etmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarla *CCDC124* geninin ifadenmesinin baskılandığı veya aşırı arttırıldığı durumlarda hücrelerin sitokinezi başarıyla tamamlayamadığı ve çok çekirdekli hücrelerin meydana geldiği belirlenmiştir. Yapılan bu çalışmayla bu proteine ait genin, günümüzde en çok çalışılan yöntemlerinden biri olan CRISPR\Cas9 yöntemi ile delesyona uğratılması amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, HEK293T hücrelerinde *CCDC124* geninin 2. ve 3. ekzonlarını hedefleyen CRISPR\Cas9 rehber oligoları tasarlanmış ve bu bölgelerde oluşan çeşitli uzunluklarda delesyon ve insersiyonlar sekans analizleriyle doğrulanmıştır. Elde edilen *CCDC124* geni modifikasyonlarının, bazı mutant hücre hatlarında proteinin ifadenmesinin tamamen ortadan kalkması ile bazı mutant hücre hatlarında ise daha küçük bir proteinin sentezlenmesi ile sonuçlandığı immüno blot teknikleriyle saptanmıştır. Mutant hücre hatlarında meydana gelen morfolojik değişiklikler mikroskopik görüntüleme teknikleri kullanılarak kaydedilmiştir. Akım sitometri analizleriyle genin mutasyona uğratılmasının sitokinez mekanizmasında olumsuz bir etki yaratarak sitoplazma bölünmesini engellediği ve popülasyondaki çok çekirdekli hücre sayısında belirgin bir artışa sebep olduğu tespit edilmiştir. Bunu takiben immünboyama çalışmalarında çekirdeğe özgü antikor kullanılarak tek bir hücre zarı içerisinde çoklu çekirdek yapısı gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Coiled-Coil Domain İçeren 124 (Ccdc124), Sitokinez, CRISPR/Cas9, İmmüno blot, Hücre-Akım Sitometri, İmmünboyama, HEK293T.

SUMMARY

Ccdc124 (Coiled-coil domain-containing 124), conserved from fungi to humans, is a centrosome protein whose function and localisation is recently identified. In mammals, it is localized at centrosome until anaphase and migrates to the midbody in post anaphase during the cell cycle. In previous studies it was shown that cells with under/over expressed *CCDC124* gene failed to complete cytokinesis and turned into multinucleated cells. The aim of this study is the deletion of the *CCDC124* gene by CRISPR\Cas9 system which is one of the most recent common techniques nowadays. Accordingly, CRISPR\Cas9 guide oligonucleotides targeting the second and third exons of *CCDC124* gene in HEK293T cells are designed as well as various deletion and insertion mutations in the relevant locus were validated by sequence analysis technique. The *CCDC124* gene modifications in some of the mutant cell lines resulted in a total disappearance of the protein expression whereas some other mutant cell lines appeared with a little protein expression which are detected with a immunoblotting techniques. The morphological changes of mutant HEK293T cells are analyzed by microscopic screening techniques. Mutations of the gene has caused a negative effect on the cytokinesis machinery and prevented the cytoplasmic division and along with the significant increase in the polynuclear cell number. In addition to this, the nuclei of polynuclear cells are observed by using specific antibodies in immunostaining study.

Key words: Coiled-Coil Domain Containing 124 (Ccdc124), Cytokinesis, CRISPR/Cas9, Westernblot, Flow-Cytometry, Immunostaining, HEK293T.

TEŞEKKÜR

Öncelikle tez çalışmamda beni destekleyen, eğitimim boyunca ilminden faydalandığım her türlü yardımlarını eksik etmeyen değerli danışmanım Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Uygur Halis TAZEBAY'a teşekkür ederim.

Bana bir anlamda eş danışmanlık yapmış olan maddi ve manevi her türlü desteklerini sunan değerli hocam Sabancı Üniversitesi öğretim üyesi Doç. Dr. Batu ERMAN'a ve onun ekibinden çok sevgili arkadaşlarım Bahar SHAMLOO, Nazlı KESKİN, Emre DENİZ, Canan SAYITOĞLU, Asma ALMURTADHA, Yasemin YOZGAT, Ayhan PARLAR, Gülperi YALÇIN ve tabi ki Ahsen ÖZCAN'a teşekkür ederim.

Birlikte çalışmaktan onur duyduğum çok değerli ekip arkadaşlarım Merve T. ÖZTÜRK, Ömer GÜLLÜLÜ, Özge ARSLAN, Eda KARAKAŞ ve aynı ofisi paylaştığımız sevgili arkadaşlarım Emrah ÖZÇELİK, Abdullah Abdul WAHEED, Türkan ÇAKAR ve Z. Onur ÇALIŞKANER'e her türlü bilgi ve birikimlerini benimle paylaştıkları için teşekkür ederim.

İkinci ofisim olarak kullandığım ofisin değerli sakinleri Nurettin AYVALI, Ekin KESTEVUR, Zeynep SAYYAR, Zeynep ULUPINAR, Özge ÇAVUŞ, Birkan GİRGİN ve Ezgi YILDIZ'a paylaştığımız güzel anlar için teşekkür ederim.

Uygur hocam ile çalışmama vesile olan bölüm başkanımız Sayın Prof. Dr. Tamer YAĞCI'ya, tüm MBG öğretim üyelerine ve aynı binayı paylaştığımız lisansüstü öğrencilerine teşekkür ederim.

Hayatım boyunca desteklerini hep arkamda hissettiğim her düştüğümde kaldıran benim için herşeyden daha değerli olan canım aileme hayatımdaki varlıkları için teşekkür ederim.

Ve tabi ki iyi ki tanımışım dediğim, varlığına şükrettiğim hiçbir desteğini esirgemeyen çok değerli hayat arkadaşım Hüseyin GÜL'e teşekkürü bir boş bilirim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. HÜCRE DÖNGÜSÜ	3
2.1. Mitoz Bölünme	4
2.1.1. Sentrozom Döngüsü	6
2.2. Sitokinez	6
2.2.1. Kasılma Halkası Merkezli Ayrılma Yarığı Oluşumu	8
2.2.2. Orta Cisimcik (Midbody) Organizasyonu	11
2.2.3. Ayrılma	13
3. COILED-COIL DOMAIN CONTAINING PROTEİN 124 (Ccdc124)	14
4. CRISPR\CAS9 SİSTEMİ	16
4.1. Tip II CRISPR\Cas9 Sistemi Moleküler Mekanizması	18
4.2. CRISPR/Cas9 Tekniği Uygulama Alanları	20
4.2.1. Programlanabilir RNA Aracılı Gen Düzenlemesi	20
4.2.2. Transkripsiyon Kontrolü	22
4.2.3. Genom Tarama Kütüphanesi	22
5. MATERYAL VE YÖNTEM	23
5.1. Materyal	23
5.1.1. Hücre Hattı Seçimi	23
5.1.2. Hücre Kültürü Solüsyonları	23
5.1.3. Liziz Solüsyonu	24
5.1.4. İmmünoblot Solüsyonları	24
5.1.5. Flow Sitometri Solüsyonları	26

5.1.6. İmmünofloresan Solüsyonları	26
5.1.7. Diğer Tampon ve Solüsyonlar	26
5.1.8. Kimyasal Malzemeler	27
5.1.9. Kullanılan Cihazlar	27
5.1.10. Vektör ve Primerler	27
5.2. Yöntem	29
5.2.1. CRISPR\Cas9 Sistemi ve sgRNA Tasarlanması	29
5.2.2. Bakteriyel Hücre Kültürü	29
5.2.2.1. Bakteri Kültürü Büyüme Koşulları	29
5.2.2.2. Kompetan Hücre Hazırlanması ve Transformasyon	30
5.2.2.3. Plazmid DNA İzolasyonu	30
5.2.3. Kontrol Enzim Kesimi	30
5.2.4. Hücre Kültürü	31
5.2.4.1. Hücre Kültürü Ortamı	31
5.2.4.2. Alt kültürleme ve Kültür saklama	31
5.2.4.3. Geçici Transfeksiyon	31
5.2.5. FACS Analizi	32
5.2.6. Antibiyotik Seçilimi	32
5.2.7. Tek hücre Düşürme Yöntemi	32
5.2.8. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) Analizi	33
5.2.9. Liziz ve Protein Miktar Tayini	33
5.2.10. İmmüno blot Analizi	34
5.2.11. Akım Sitometri Analizi	35
6. SONUÇLAR	37
6.1. CCDC124 Geninin 2. ve 3. Ekzonlarını Hedefleyecek sgRNA'lar Tasarlanması	37
6.2. Tasarlanan sgRNA Oligolarının pSpCas9n(BB)-2A-Puro (PX462) Plazmidine Klonlanması	41
6.3. Rehber Oligo Klonlanmış Plazmidlerin HEK293T Hücrelerine Transfekte Edilmesi	42
6.4. Tek Hücre Düşürme Deneyleri	44
6.5. RFLP Analizi Sonuçları	45
6.6. Mutant Hücre Hatları Dizi Analizi Sonuçları	48

6.7. Mutant Hücre Hatlarında Meydana Gelen Fenotipik Değişikliklerin Ters Işık Mikroskobu İle Görüntülenmesi	53
6.8. İmmü Floresan Boyama İle Mutant Hücre Hatlarının Görüntülenmesi	56
6.9. Mutant Hücre Hatlarındaki Çoklu Çekirdekli Hücre Oranının Akım Sitometri Analizi İle Tayini	57
6.10. Mutasyona Uğratılmış Genin İmmü noblot Analizi ile Protein Düzeyinde Kontrolü	59
7. YORUMLAR	61
KAYNAKLAR	66
ÖZGEÇMİŞ	72
EKLER	73

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u>	<u>Acıklamalar</u>
<u>Kısaltmalar</u>	
μg	: Mikrogram
μl	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
$^{\circ}\text{C}$: Derece Celsius
APS	: Amonyumsülfat
C	: Sitokinez
Ccdc124	: Coiled-coildomain containing 124
HEK 293	: İnsan embriyonik böbrek hücre hattı 293
ICB	: Hücreler arası köprü
IF	: İmmünofloresan
kDa	: Kilodalton
L	: Litre
M	: Mitoz
MBG	: Moleküler Biyoloji ve Genetik
mM	: Milimolar
NIS	: Sodyum iyodid simporter
Nm	: Nanometre
PBS	: Tuzlu fosfat tamponu
Plk1	: Polo-benzeri-kinaz1
PRC1	: Sitokinez düzenleyici protein1
RasGEF1B	: Ras guanin nükleotit değıştirici faktör 1B
RPM	: Rotorun dakikadaki dönme hızı
SSC	: Side scatter
TEMED	: Tetrametiletilediamin
WB	: İmmünoblot

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Hücre döngüsü ve döngünün düzenlenmesinde yer alan G1, G2, M kontrol noktalarının şematik gösterimi.	5
2.2: Sitokinez sırasında aktomiyozin halkası, ayrılma yarığı ve orta cisimcik oluşumu.	8
2.3: RhoA sinyal yolağı aktivasyonu ile aktomiyozin halkasının oluşumu.	9
2.4: Erken anafaz evresiyle başlayıp fiziksel ayrılmayla sonuçlanan sitokinez evreleri.	10
2.5: Elektron mikroskobu ile yakalanmış ayrılmakta olan kardeş hücreler arasında beliren köprü ve bu köprünün merkezinde orta cisimcik oluşumu kırmızı ölçek 1 µm boyundadır.	11
2.6: Orta cisimciğı oluşturan bölümler ve bu bölümlerde lokalize olan sitokinezin tamamlanmasında görev alan proteinler.	12
4.1: Tip I, Tip II ve Tip III CRISPR sistemlerinin moleküler mekanizması.	17
4.2: Tip II CRISPR/Cas9 sitemi moleküler mekanizması	19
4.3: tracrRNA:crRNA kompleksi programlı ve geliştirilmiş kimerik sgRNA programlı Cas9 DNA hedeflemesi.	20
4.4: Çift Cas9 nickase modeli; 5'-3' zinciri hedefleyen sgRNA ve 3'-5' zinciri hedefleyen başka bir sgRNA ile D10ACas9n enzimi kullanılarak DNA üzerinde DSB oluşturulmaktadır. Siyah oklar kırık bölgesini göstermektedir.	21
6.1: 2.ekzon için tasarlanan CRISPR/Cas9n modeli. Sarı ok:kırıkların meydana geldiğı noktalar, mavi ok:PCR primeri, pembe ok:PAM sekansı, kırmızı ok:sgRNA.	38
6.2: 3.ekzon için tasarlanan CRISPR/Cas9n modeli. Sarı ok:kırıkların meydana geldiğı noktalar, mavi ok:PCR primeri, pembe ok:PAM sekansı, kırmızı ok:sgRNA.	38
6.3: Şekil 6.3: PX462 plazmidi gen haritası.	39

6.4:	PX462 Plazmidi Gen Dizilimi ve Rehber Oligo Ligasyonu. Kırmızı ok uçları BbSI enzimi kesim bölgelerini simgelemektedir.	40
6.5:	BbSI ile kontrol enzim kesimi. Uncut: enzim kesimi yapılmamış örnek, cut: enzim kesimi yapılmış örnek.	41
6.6:	Sırasıyla 7, 55, 23 ve 64 rehber oligoları klonlanmış PX462 plazmidleri sekans analizi sonuçları. Kırmızı ile işaretlenmiş kısımlar rehber oligoları simgelemektedir. Reverse primer ile sekanslatılmışlardır.	42
6.7:	Akım Sitometri analizi ile transfeksiyon verimliliği tayini. Mavi grafik GFP negatif hücreleri, yeşil grafik GFP pozitif hücreleri göstermektedir.	43
6.8:	1.transfeksiyon sonrası RFLP sonuçları. Kırmızı oklar kesilmemiş bandı göstermektedir. 2.ekzon için SmaI, 3.ekzon için PvuII enzimi kullanılmıştır. wt: transfekte edilmemiş HEK293T, uncut: enzim ile kesilmemiş, cut: enzim ile kesilmiş.	43
6.9:	2.transfeksiyon sonrası RFLP sonuçları. Kırmızı ok kesilmemiş bandı göstermektedir. 2. ekzon için SmaI, 3. ekzon için PvuII enzimi kullanılmıştır. wt: transfekte edilmemiş HEK293T, uncut: enzim ile kesilmemiş, cut: enzim ile kesilmiş.	44
6.10:	7-55 hücre havuzundan elde edilen kolonilere ait RFLP analizi sonuçları. wt: transfekte edilmemiş HEK293T, uncut: enzim ile kesilmemiş, cut: enzim ile kesilmiş.	45
6.11:	#15'den elde edilen tek hücre kolonilerine ait RFLP sonuçları. wt: transfekte edilmemiş HEK293T, uncut: enzim ile kesilmemiş, cut: enzim ile kesilmiş.	46
6.12:	23-64 hücre havuzundan elde edilen kolonilere ait RFLP sonuçları. wt: transfekte edilmemiş HEK293T, uncut: enzim ile kesilmemiş, cut: enzim ile kesilmiş.	46
6.13:	#15 sekans analizi ve 7-55 PCR bölgesi ile karşılaştırması.	48
6.14:	#6 sekans analizi ve 23-64 PCR bölgesi ile karşılaştırması.	49
6.15:	#26 sekans analizi ve 23-64 PCR bölgesi ile karşılaştırması.	49
6.16:	#27 sekans analizi ve 23-64 PCR bölgesi ile karşılaştırması.	50

6.17:	#50 sekans analizi ve 23-64 PCR bölgesi ile karşılaştırması.	51
6.18:	#60 sekans analizi ve 23-64 PCR bölgesi ile karşılaştırması.	52
6.19:	7-55 ve #15 tek hücre kolonilerine ve transfekte edilmemiş WT HEK293T hücrelerine ait mikroskop görüntüleri, hücre isimleri görüntülerin sol üst köşelerinde yer almaktadır.	53
6.20:	23-64 tek hücre kolonilerine ve transfekte edilmemiş WT HEK293T hücrelerine ait mikroskop görüntüleri, hücre isimleri görüntülerin sol üst köşelerinde yer almaktadır.	54
6.21:	İmmünfloresan boyama ile #60 mutant hücre hattındaki çoklu çekirdekli hücre görüntülenmesi.	56
6.22:	Akım Sitometri analizi ile çoklu çekirdekli hücre oranı tayini.	57
6.23:	Mutant hücre hatlarına ait N-terminal antikor kullanılarak elde edilen Ccdc124 ve calnexin proteinleri ifadenme profili.	59
6.24:	Mutant hücre hatlarına ait Mid-Ccdc124 antikor kullanılarak elde edilen Ccdc124 ve calnexin proteinleri ifadenme profili.	60

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
5.1: Yürütme jeline ait kimyasal oranları.	22
5.2 Ayırma jeline ait kimyasal oranları.	27
5.3: Kullanılan vektörler ve kullanım amaçları.	35
5.4: Kullanılan primerler ve kullanım amaçları.	36
5.5: Standart grafik oluşturmak için kullanılan BSA konsantrasyonları.	38
6.1: wt HEK29T hattının hücre döngüsünün evresine göre yüzde dağılımı.	57
6.2: #6 hattının hücre döngüsünün evresine göre yüzde dağılımı.	57
6.3: #27 hattının hücre döngüsünün evresine göre yüzde dağılımı.	57
6.4: #60 hattının hücre döngüsünün evresine göre yüzde dağılımı.	58

1. GİRİŞ

Hücre bölünmesi, insan sağlığını olumsuz etkileyen başta replikatif yaşlanma ve kanser olmak üzere pek çok güncel oluşumla doğrudan bağlantılı olduğu için üzerinde en çok çalışılan konulardan biri haline gelmiştir. Ömür uzunluğunu ve kalitesini arttırmak amacıyla yapılan araştırmalar hücre bölünmesinin moleküler mekanizmasını aydınlatmak üzerine yoğunlaşmıştır. Hücre bölünmesi tek hücreli canlılarda soy aktarımı, çok hücreli canlılarda ise büyüme, gelişme, gen aktarımı ve doku yenilenmesi gibi kritik öneme sahip süreçlerden sorumludur.

Mitoz bölünme kromozom sayısının sabit tutularak atasal bir hücreden birbirine eş iki yavru hücrenin meydana getirildiği kritik bir süreçtir. Genel olarak mitoz bölünme hücrenin bölünmeye hazırlandığı interfaz evresinden, karyokinez olarak isimlendirilen sırasıyla profaz, metafaz, anafaz ve telofaz evrelerinden oluşan çekirdek bölünmesinden ve bunu takip eden sitokinez olarak isimlendirilen sitoplazma bölünmesinden meydana gelmektedir.

Hücre döngüsünün son safhası olan sitokinez absisyon denilen iki kardeş hücrenin fiziksel olarak ayrılmasıyla sonlandırılmaktadır. Yapılan çalışmalar absisyon sürecinde en büyük rolün orta cisimcik olarak adlandırılan aktomiyozin kasılma halkasının anti-paralel mikrotübülleri sıkıştırmasıyla ortaya çıkan geçici bir organel üzerinde olduğunu göstermiştir [D'Avino et al., 2015]. İlk olarak 1981 yılında Walter Flemming tarafından tanımlanan bu organel absisyon için gerekli olan proteinlerin organizasyonunu yapan ve bu proteinler için platform görevi gören elektronca yoğun bir yapıdır [Paweletz, 2001].

Geç-anafaz evresine kadar sentrozomda konumlanan Ccdc124 (Coiled-coil domain containing-124) proteini sitokinezin başlamasıyla orta cisimciğe göç etmektedir. Mantardan insana kadar tüm ökaryotlarda korunmuş olan bu protein pek çok sentrozom proteininde olduğu gibi sarılı sarmal bölge motifine sahiptir. Yapılan çalışmalarda Ccdc124 protein ifadesinin azaltıldığı veya artırıldığı durumlarda sitokinezin tamamlanmadığı ve çoklu çekirdekli hücre oluşumu gözlemlendiği kaydedilerek bu proteinin sitokinez için önemi aydınlatılmıştır [Telkoparan et al., 2013], [Arslan, 2015]. Ccdc124 proteininin orta cisimcikte Ras guanin nükleotit değiştirici faktör 1B (RasGEF1B) ile etkileşim içerisinde olduğu daha önce yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur [Yaman et al., 2009]. RasGEF1B ise hücre

bölünmesini takip eden hücre-hücre arası ve hücre-hücreler arası matrix bağlantılarının kurulması ve kontrol edilmesi gibi süreçlerde görevli olan Rap 2 nin aktive edilmesini sağlamaktadır .

Ccdc 124 proteini ifadelenmesini baskılamak amacıyla kullanılan Crispr\Cas sistemi ilk olarak arkealar ve bakterilerde keşfedilmiş, organizmaya giren virüs ve plazmitlere karşı oluşturulmuş kazanılmış bağışıklık sistemidir. CRISPR, arkeaların yaklaşık % 90' ında ve bakterilerin yaklaşık %40 ' ında bulunan DNA tekrarlarıdır [Jansen et al., 2003]. Bu diziler "cas" adı verilen CRISPR bağlantılı (CRISPR-associated) genlerle komşulardır. Cas genleri genel olarak nükleaz, helikaz ve polimeraz bölgeleri taşıyan geniş bir protein ailesini kodlar [Haft et al., 2005]. Tip I, II ve III olarak adlandırılan 3 farklı çeşidi olmakla beraber Tip II sistemi genom mühendislik teknolojileri için en uygun temeli oluşturmaktadır. Genom içindeki CRISPR dizisi protospacer adı verilen yabancı DNA'sı ile homolog olan sekanslar bulundurulur. Protospacer sekansları kısa palindromik tekrarlar ile birbirinden ayrılır. CRISPR dizisi transkribe edilerek pre-CRISPR RNA (pre-crRNA) oluşturulur, bu diziler daha sonra homolog olduğu tracrRNA (trans-activating crRNA), cas9 ve RNase III enzimleriyle "crRNA" dizilerine dönüştürülür. Oluşan crRNA-tracrRNA-cas9 kompleksi tamamlayıcısı olan yabancı DNA bölgesini bulup bağlanır ve cas9 enzimi bu bölgedeki çift iplik yapısını açarak çift iplik kesimi meydana getirir.

Yapılan bu çalışmada öncelikle *CCDC124* geninin ifadelenmesini engellemek amacıyla 2. ve 3.ekzonlarını hedefleyecek CRISPR\Cas9 modelleri tasarlanmıştır. Genom içerisindeki off-target aktivitesini azaltmak amacıyla Cas9n (Cas9-nickase) enzimleri kullanımı uygun görülmüştür. HEK293T hücre hattı kullanılarak, tasarlanan CRISPR/Cas9n modelleri uygulanmış ve hedeflenen gen bölgesindeki modifikasyonlar öncelikle RFLP analizi ile sonrasında DNA dizi analizi ile belirlenmiştir. Mutant hücre hatlarında meydana gelen fenotipik değişimler ters ışık mikroskobu ile görüntülenmiştir. Takip eden süreçlerde akım sitometri analizi ile mutasyon sonucu meydana gelen çoklu nükleuslu hücre oranı belirlenmiş ve bu hücrelerde çekirdek immün floresan boyama yapılarak çekirdek durumu gözlemlenmiştir. Gen modifikasyonunun protein düzeyinde analizi immüno blot deneyleri ile gerçekleştirilmiştir.

2. HÜCRE DÖNGÜSÜ

Çoğalmak üzere uyarılmış bir hücrede gerçekleşen, bir dizi biyokimyasal aktivitenin ve morfolojik değişikliğin görüldüğü fiziksel bölünmeyle sonuçlanan sürece “hücre döngüsü“ denir. Bir döngüye giren hücre, morfolojik ve genetik olarak birbirine tıpa tıp benzeyen iki hücre oluşumuyla döngüyü tamamlar ve bir sonraki döngünün hazırlık evresine geçer [Albert et al., 2002].

Ökaryotik organizmalarda hücre döngüsü genel olarak iki safhadan oluşur. Hücrenin bölünmeye hazırlandığı interfaz safhası G1, S, G2 evrelerinin birbirini izlediği bir süreçtir. İnterfazı takip eden mitoz (M) safhası ise çekirdek bölünmesinin gerçekleştiği karyokinez ve sitoplazma bölünmesinin gerçekleştiği sitokinez evrelerinden oluşur. Hücre döngüsünün %95'i bölünmeye hazırlanarak geçerken, mitoz bölünme döngüsünün yalnızca %5'lik kısmını teşkil etmektedir.

Hücrelerdeki bölünebilme kapasitesi ve hızı canlıdan canlıya değişiklik gösterebildiği gibi aynı canlıdaki farklı hücrelerde de değişiklik gösterebilmektedir. En kısa hücre döngüsü 8 dakika ile sinek embriyosunda görülürken, insan karaciğer hücresinde bu süre 1 yıldan fazla olabilmektedir. Bölünebilme kapasitesi ve hızına göre üç tip hücre bulunmaktadır;

Statik hücreler: Bölünmeyi tamamen durduran (nöronlar ve iskelet kas hücreleri) veya nadiren bölünen (düz kas-kalp kası) hücrelerdir. Bu hücreler sadece doğum öncesi dönemde bölünmektedirler.

Stabil Hücreler: Mitotik hızları normalde yavaş olan ancak doku kaybı ve zedelenme gibi durumlarda hızla bölünebilen hücrelerdir. Bölünme uyarısı gelene kadar G0 (dinlenme) fazında beklemektedirler. Fibroblast, osteoblast ve kondroblast örnek olarak verilebilir.

Yenilenen Hücreler: Mitotik hızları yüksek olan hücrelerdir. İnce bağırsak epitel hücreleri (3-4 günde bir yenilenir), pankreasın ekzokrin bölümü, epidermis hücreleri ve kan hücreleri örnek olarak verilebilir.

Bu hücre çeşitlerinin hücre döngüsünden çıkış ve döngüye tekrar giriş noktaları şekil 2.1'de şematik olarak gösterilmektedir.

2.1. Mitoz Bölünme

Tek hücreli canlılarda üremeyi, çok hücreli canlılarda ise yaraların onarılması, büyüme ve gelişmeyi sağlayan mitoz bölünme kromozom sayısının sabit tutularak tek bir hücreden iki yeni hücrenin oluştuğu yaygın bir hücre bölünme şeklidir [Watson et al., 2004]. Bölünmeyle, iki katı büyüklükteki atasal hücre orijinal büyüklüğüne ve kromozom sayısına ulaşırken tekrar diğer bir hücre döngüsünün hazırlık evresine geçmektedir.

Mitoz bölünmenin başlayabilmesi için hazırlıkların yapıldığı, hücrenin hacminin yaklaşık iki katına çıkarıldığı, bölünme için gerekli olan düzenleyici proteinler ve makromoleküllerin (DNA) seztelendiği interfaz safhası kendi içinde sırasıyla G1, S, G2 evrelerinden oluşur. Bu süreçte kromozomlar yoğunluğunu kaybederek çekirdek içine yayılırlar ve çekirdek morfolojik olarak homojen görünür. G1 fazı, hücre döngüsünün süre açısından en değişkenlik gösteren fazıdır ve bu fazın süresi döngünün süresinin en önemli belirleyicisidir. G1 fazında hücre metabolik olarak aktiftir, sürekli büyüyerek DNA sentezi için gerekli proteinleri sentezlemektedir. Hücre döngüsüne giren her hücre bölünerek çıkmamaktadır. G1 fazında hücre bölünmek, diferansiye olmak veya ölmek için karar verir. Bu karar noktasına restriksiyon noktası denir. Uygun büyüme faktörlerinin varlığında, hücre restriksiyon noktasından geçerek S evresine girmektedir. Ancak G1'de uygun büyüme faktörleri yoksa hücre döngüsü bu noktada durdurulur ve G0 denilen durağan evreye girilir. G0 evresinde hücre metabolik olarak aktif olsa da büyümesi durmuş ve protein sentezi hızı azaltılmıştır [Cooper and Hausman, 2004]. Uygun sinyali alan hücre DNA sarmalının kendini eşlediği sentez (S) fazı ile döngüye devam etmektedir. DNA sentezinin tamamlanmasını, hücre büyümesinin devam ettiği ve mitoz için gerekli proteinlerin sentezlendiği G2 evresi takip etmektedir.

G2 evresi ile hazırlığını sonlandıran hücre, çekirdek bölünmesini takiben sitoplazma bölünmesinin gerçekleşeceği mitoz (M) safhasına geçer. Mitoz temel olarak dört evrede incelenir;

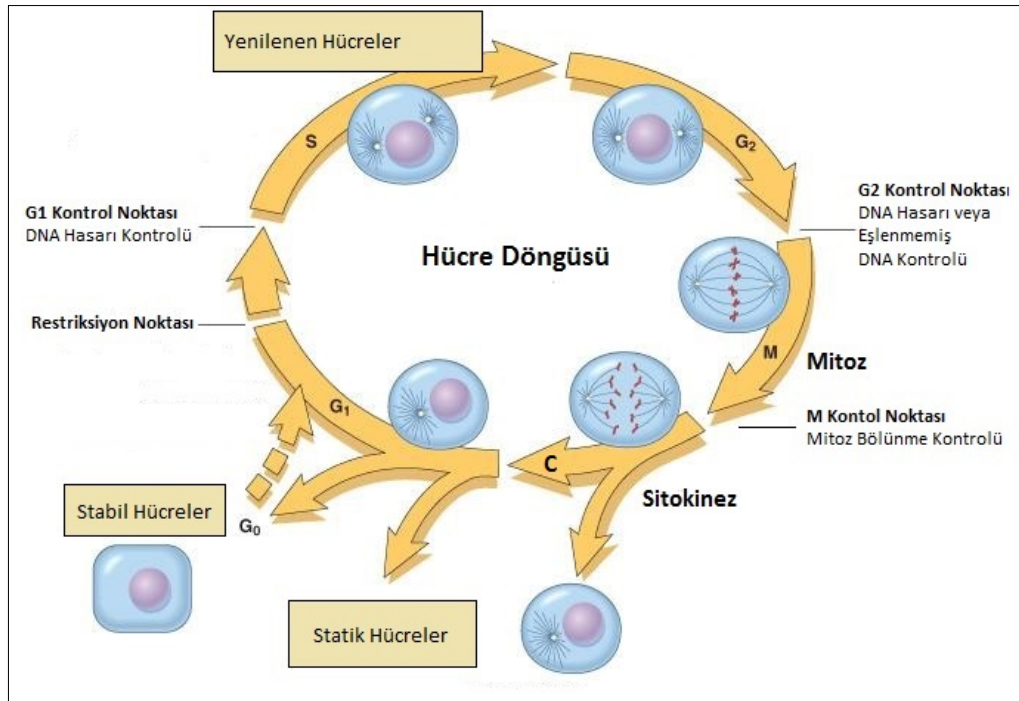
Profaz: Her biri iki kardeş kromotitten oluşan kromozomların yoğunlaşmasıyla başlar. Eşlenmiş olan sentrozomlar zıt kutuplara çekilirken aralarında iç iplikleri oluşur ve çekirdek zarı yıkılmaya başlar.

Metafaz: Kromozomlar iç ipliklerine tutunarak ekvator düzlemi boyunca sıralanır.

Anafaz: Birbirinden ayrılan kardeş kromotidler iğ ipliklerinin hareketi ile kutuplara doğru çekilir.

Telofaz: Kutuplara tamamen çekilen kromozomlar yoğunluğunu kaybederek kromotin iplik halini alır ve tekrar bir çekirdek zarı ile çevrelenir. Böylece karyokinez tamamlanmış ve sitokinez başlamış olur.

Hücre döngüsünün kritik öneme sahip evreleri korunmuş bir denetleyici sistem tarafından kontrol edilmektedir. Bu sistem, hücre çoğalmasını kontrol eden hücre-dışı sinyallerle hücre döngüsü arasındaki bağlantıyı da dengede tutmaktadır [Cooper and Hausman, 2004]. Hücre döngüsü olaylarının doğru zamanda, doğru sırada ve her döngüde sadece bir kez gerçekleşmesini sağlayan, G₁, G₂ ve M kontrol noktalarına (şekil 2.1) sahip bu denetim sisteminin merkezinde siklin bağımlı kinazlar (Cdk) olarak da bilinen bir protein kinaz ailesi bulunmaktadır. Hücreler döngü boyunca ilerlerken bu kinazların etkinlikleri de artar veya azalır. Bu dalgalanmalar doğrudan, DNA replikasyonu, mitoz ve sitokinez gibi döngüsel değişikliklere yol açar. Cdk etkinliğindeki döngüsel değişiklikler siklin adındaki karmaşık bir protein ailesi tarafından denetlenir [Albert et al., 2002].



Şekil 2.1: Hücre döngüsü ve döngünün düzenlenmesinde yer alan G₁, G₂, M kontrol noktalarının şematik gösterimi.

2.1.1. Sentrozom Döngüsü

Sentrozom hayvan hücrelerinde bulunan temel mikrotübül düzenleme merkezidir (MTOC). Yapısal olarak, birbirine dik konumlanan ve herbiri dokuz mikrotübül üçlemesinden oluşan bir çift sentriyolden ve bunları çevreleyen perisentriyolar matriks (PCM) denilen amorfoz materyal bulutundan oluşur. Matrikste mikrotübüle bağımlı motor proteinleri, bunlarla sentrozom arasında bağlantı yaptığı düşünülen coiled coil proteinleri, yapısal proteinler ve hücre döngüsünün denetim sisteminin bileşenleri dahil çok çeşitli proteinler bulunmaktadır.

Deneysel analizler sentrozom kompleksinin mikrotübül oluşturma kapasitesinin sentriyol çiftinde değil, perisentriyolar matrikste olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle matrikste bulunan gama tübülün halka kompleksi bu görevden sorumludur.

Sentrozomun eşlenerek ayrı kutuplara çekilmesine sentrozom döngüsü denilmektedir. İnterfaz safhasında sentriyoller ve sentrozomun diğer bileşenleri eşlenmektedir. Mitoz başladığında ise her sentriyol çifti kendi aster mikrotübüllerini oluşturur ve bu iki aster çekirdeğin zıt taraflarına hareket ederek mitotik iğn iki kutbunun oluşmasını başlatmaktadır.

Mikrotübül organizasyonundan sorumlu olması sebebiyle, mikrotübüllerin yer aldığı hücre şeklinin ve kutbunun belirlenmesi, hücre bölünmesi, hücre içi proteinlerin ve organellerin taşınması gibi pek çok kritik süreci sentrozom düzenlemektedir.

2.2. Sitokinez

Hücre döngüsü, sitokinez olarak adlandırılan iki kardeş hücrenin çekirdeksel ve sitoplazmik içeriklerinin eşit olarak paylaştırıldığı fiziksel ayrılımla sonlanmaktadır [D'Avino et al., 2015]. Bu süreç, anafaz sırasında kromozomların kutuplara çekilmesini takiben aktomiyozin kasılma halkasının meydana getirdiği ayrılma yarığıyla başlamakta ve kardeş hücrelerin fiziksel olarak ayrılmasıyla tamamlanmaktadır [Barr and Gruneberg, 2007], [Pollard, 2010], [Fededa and Gerlich, 2012].

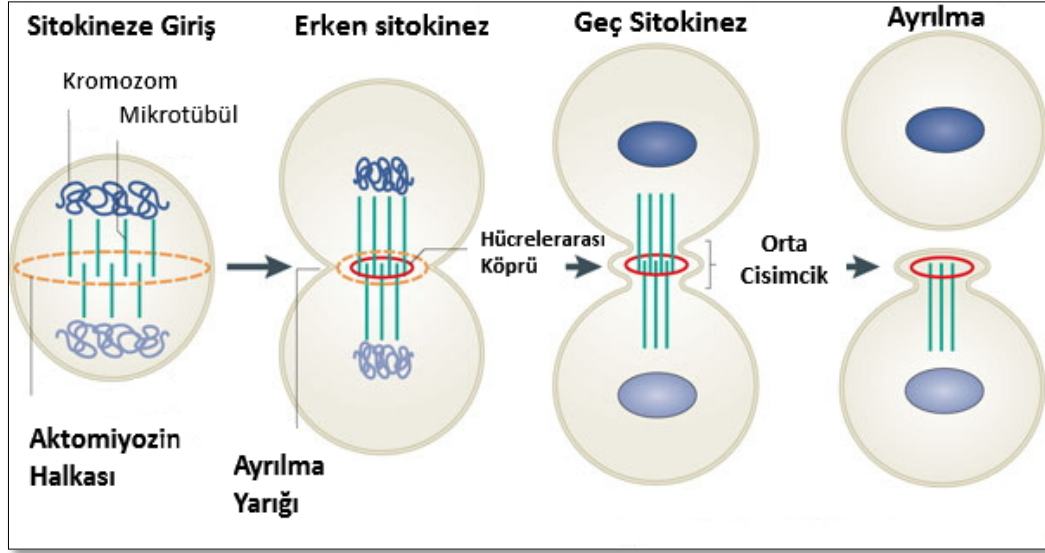
Sitokinezin gerçekleşme zamanı ve gerçekleşme düzlemi kritik öneme sahiptir. Hücre bölünme düzleminin doğru bölgede yer almaması kromozom setlerinin yavru hücrelere eşit dağılmamasına ve iki katı genoma (tetraploidi) sahip hücrelerin oluşmasına neden olmaktadır [Ganem et al., 2007] . Farede yapılan transplantasyon deneyleri ile tetraploid hücrelerin tümör oluşumunu arttırdığı ortaya koyulmuştur [Fujiwara et al., 2005]. Buna ek olarak tetraploid hücrelerin ilgili bölgeye enjeksiyonu malignant meme kanserlerinin büyümesiyle sonuçlanmıştır. Zamanından erken gerçekleşen sitokinez ise ayrılma yarığı ile henüz ayrılmamış kromozomların temas etmesine neden olmakta sonuç olarak DNA hasarı ve translokasyon gibi kromozom anomalileri meydana gelebilmektedir [Janssen et al., 2011]. Sitokinez sırasında meydana gelen hatalar ve sitokinetik faktörlerdeki mutasyonlar kanser dışında da insanlarda çeşitli hastalıklara neden olmaktadır. Bu hastalıklara örnek olarak Lowe sendromu, konjenital anemi, kadın infertilitesi ve yaş ile bağımlı sarı nokta hastalığı verilebilir [Lacroix and Maddox, 2012].

Sitokinezin başlangıç basamağı, anafaz sırasında kutuplara çekilmekte olan kromozomlar arasında meydana gelecek bölünme düzleminin belirlenmesidir. Bu süreçte merkezi iğ iplikleri anahtar görevi görmektedir. Anafaz başlangıcından sonra mitotik mikrotübüller, özellikle sentrozomdan salınan interpolar mikrotübüller, merkezi iğ ipliklerini oluşturmak amacıyla tekrar organize olmaktadırlar. Merkezi iğ ipliği sentezlenmesinin bir diğer yolu ise augmin kompleksi aracılı sentrozomal olmayan mikrotübül polimerizasyonu ile *de novo* sentezlemektir [Uehara et al., 2009], [Uehara and Goshima, 2010].

Bir çok sinyal ve hücre iskeleti proteini merkezi iğ toplanmasına ve organizasyonuna dahil olmaktadır. Kromozomal taşıyan kompleks (CPC), mikrotübül bağlantılı protein (MAP), sitokinezin protein düzenleyicisi 1 (PRC1) ve çeşitli kinesin benzeri motorlar; KIF4A, KIF20A ve KIF23 bunlardan bazılarıdır [D'Avino et al., 2015].

50 yılı aşkın süredir yapılan çeşitli çalışmalar, bölünme düzleminin belirlenmesinde hem aster hem de merkezi mikrotübüllerin iki farklı modelde birlikte rol oynadığını kanıtlamaktadır [Glutzer, 2004], [D'Avino et al., 2005], [von Dassow, 2009].

Şekil 2.2'de sırasıyla sitokinez aşamaları ve ayrılma yarığını takiben oluşan orta cisimcik yapısı gözlemlenmektedir [Chen et al., 2012].

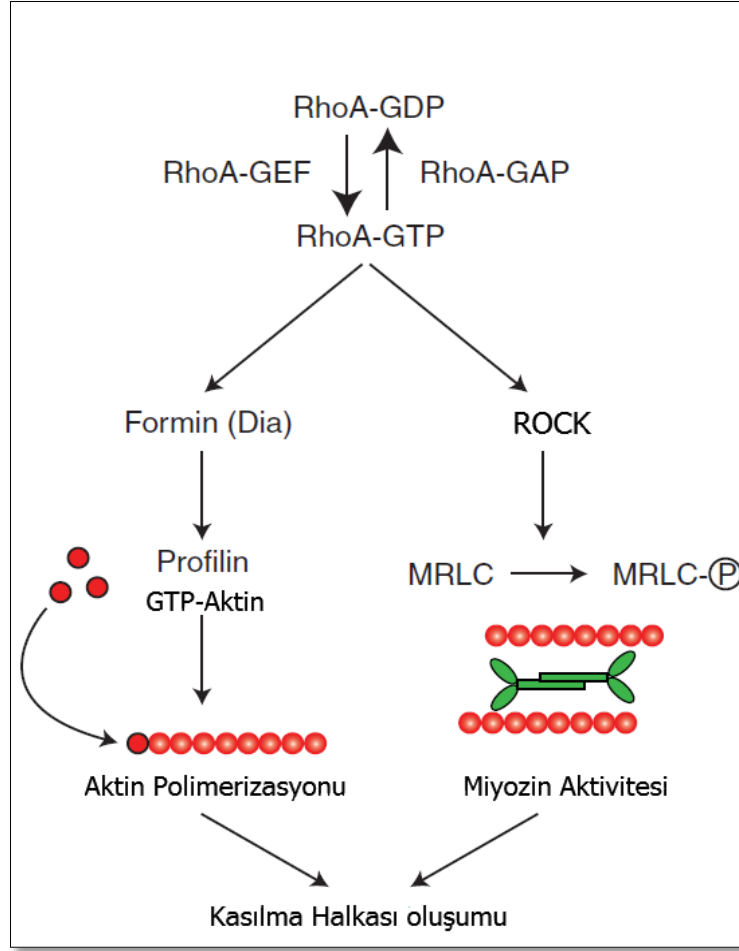


Şekil 2.2: Sitokinez sırasında aktomyozin halkası, ayrılma yarığı ve orta cisimcik oluşumu.

2.2.1. Aktomyozin Kasılma Halkası Merkezli Ayrılma Yarığı Oluşumu

Hayvan hücrelerinde fiziksel ayrılmanın ilk basamağı olan ayrılma yarığı, aktin ve miyozin II filamentlerinden oluşan aktomyozin kasılma halkasının uyguladığı bir kuvvet sonucu meydana gelmektedir [Wang, 2005]. Aktomyozin kasılma halkasının oluşturulması ayrılma düzleminin de belirlendiği kritik bir süreçtir ve small GTPaz RhoA tarafından paralel iki sinyal yolağının aktivasyonu ile kontrol edilmektedir [Piekny et al., 2005], [Jordan and Canman, 2012]. Diğer tüm GTPaz'lar gibi RhoA, GTP bağlı olan aktif ve GDP bağlı olan pasif formlarda bulunduğundan aktif forma geçebilmek için bir GEF (Guanin nükleotid değiştirici faktör) olan ECT2 ile ve pasif forma geçebilmek için ise bir GAP (GTPaz aktive eden protein) olan centralspindlin ile bağlanmaktadır. Polo benzeri kinaz 1 (Plk1) aktivasyonu ile ECT2 centralspindlin ile bağlanır ve merkezi iğ mikrotübülleri boyunca RhoA ile etkileşime geçeceği noktaya kadar taşınır [Yuce et al., 2005], [Nishimura et al., 2006]. Şekil 2.2' de GTPaz RhoA aktivasyonu ve alt yolları şematize edilmiştir. RhoA aktivasyonunu akabinde sinyal, iki paralel yolak üzerinden devam etmektedir. Bu yollardan ilkinde, diaphanous (Dia)-related formin aktive ederek profilin aracılı aktin polimerizasyonu gerçekleşmektedir. İkinci yolakta ise RhoA bağlantılı kinaz (ROCK) aktivasyonu ile miyozin düzenleyici hafif zincir (MRLC) fosforile edilerek miyozinin kasılması sağlanmaktadır [Severson et al., 2002], [Watanabe et al., 2008],

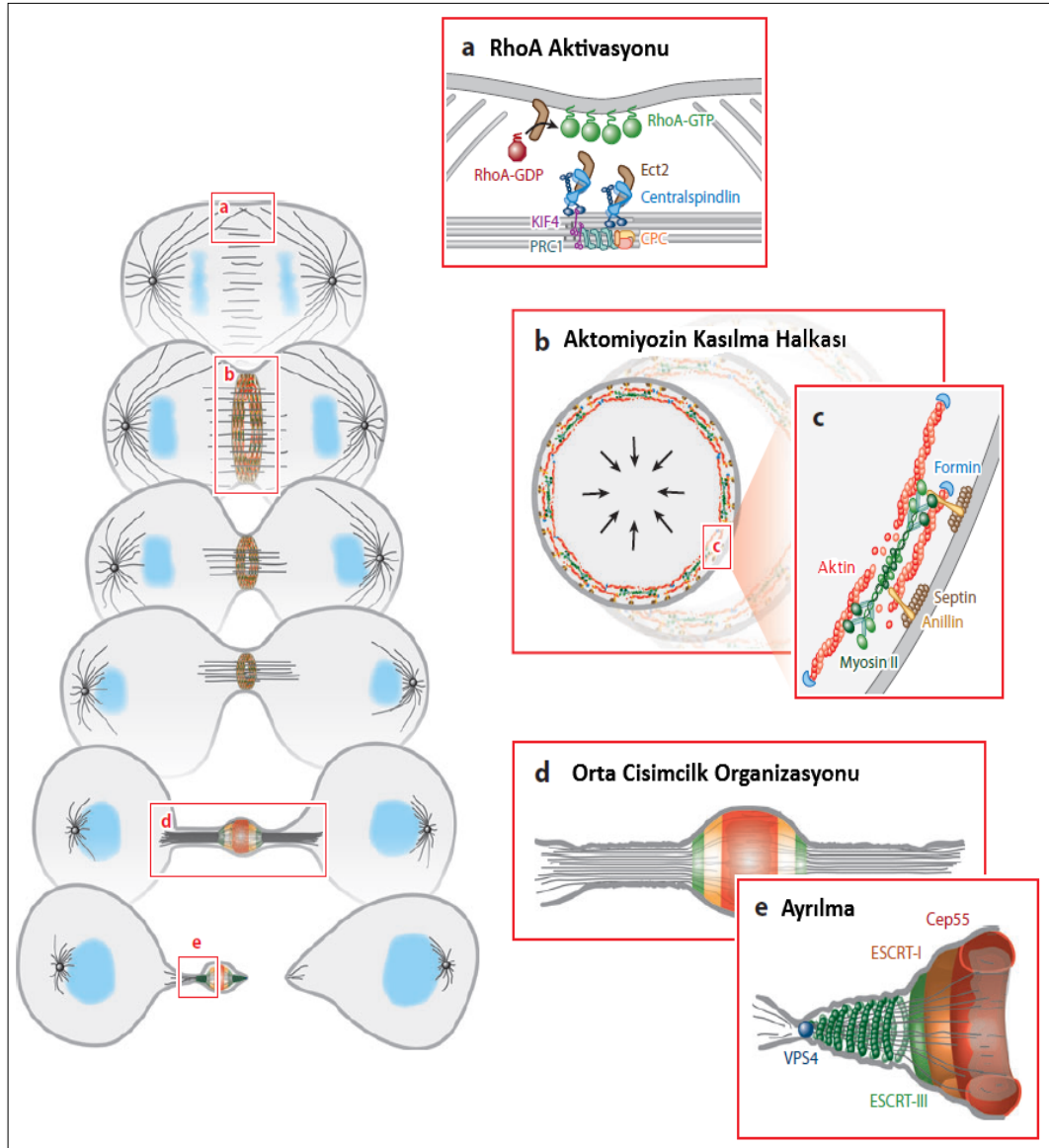
[Fededa and Gerlich, 2012], [Matsumura, 2005], [D'Avino et al., 2015]. Şekil 2.3'te RhoA sinyal yolağı şematize edilmiştir [D'Avino et al., 2015].



Şekil 2.3: RhoA sinyal yolağı aktivasyonu ile aktomyozin kasılma halkasının oluşumu.

Kasılma halkası, miyozin II ve aktine ek olarak anillin isimli bir scaffold proteinini ve septin filamentlerini içermektedir [Maddox et al., 2007]. Anillin aktin, miyozin, RhoA, centralspindlin (CYK-4) ve merkezi iğ ipliğinden gelen sinyaller arasında bağlantı kurmaktadır [Piekný et al., 2008], [Gregory et al., 2008], [D'Avino et al., 2008].

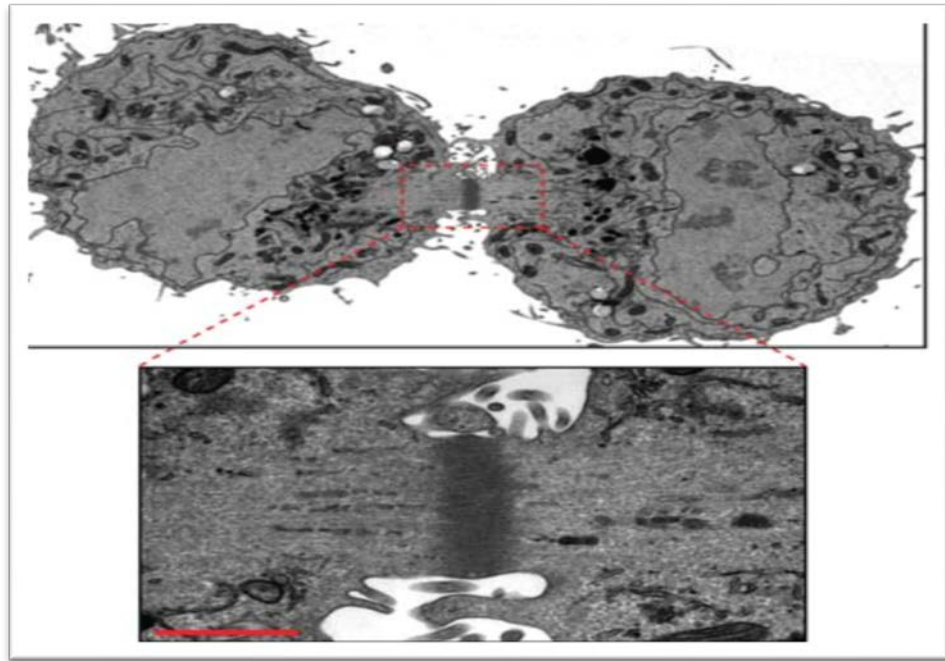
Ayrılma yarığını oluşturmak amacıyla aktomyozin kasılma halkasının nasıl bir mekanizma izlediği henüz tam olarak aydınlatılamamıştır fakat klasik modele göre, miyozin filamentleri aktin filamentlerinin üzerinden kayma hareketi yaparak bir çekme kuvveti oluşturmakta ve bu kuvvet hücre membranının merkeze doğru çekilmesini sağlamaktadır [Fededa and Gerlich, 2012]. Şekil 2.4'te sitokinez evreleri ve aktomyozin halkası moleküler organizasyonu gösterilmiştir [Green et al., 2012].



Şekil 2.4: Erken anafaz evresiyle başlayıp fiziksel ayrılmaya sonuçlanan sitokinez evreleri. a) Ekvatoryal RhoA aktivasyonu, b) Aktomyozin kasılma halkası siyah oklar kasılma yönünü gösterir, c) Aktomyozin kasılma halkası moleküler organizasyonu, d) Orta cisimcik , e) Ayrılma bölgesi proteinleri.

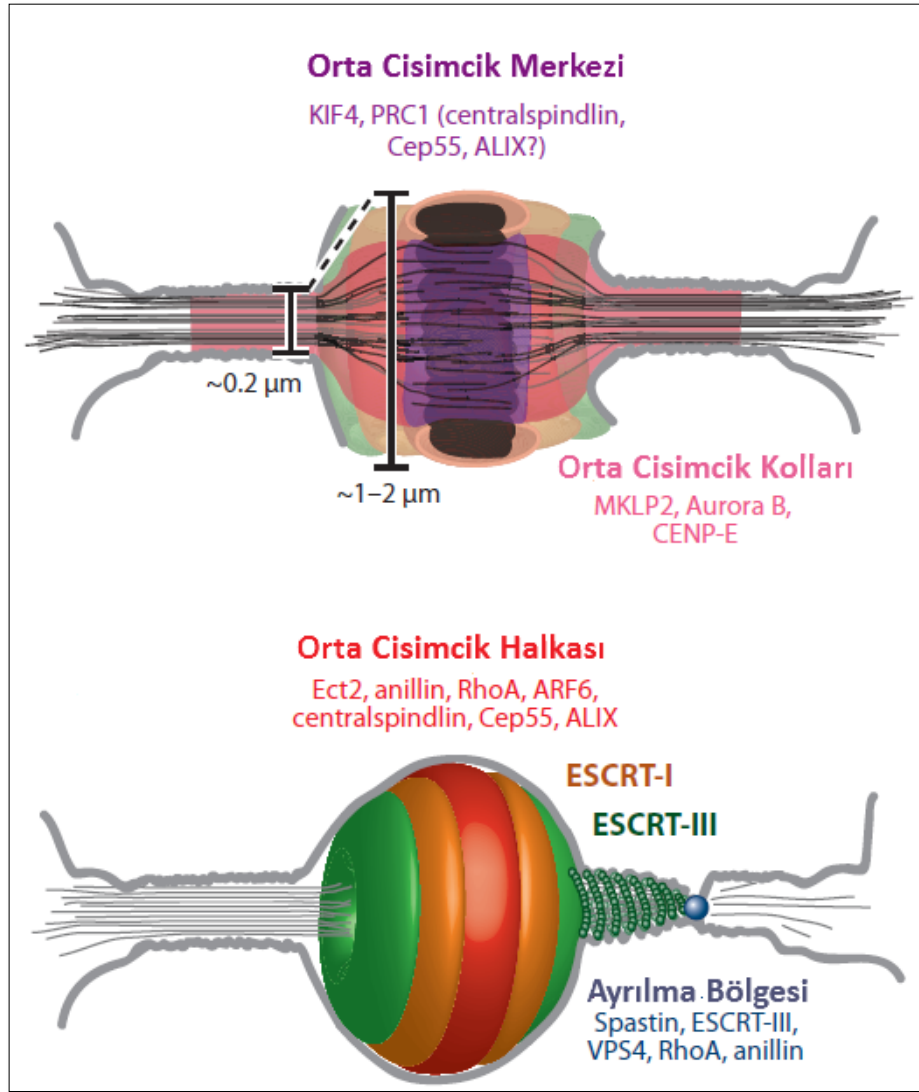
2.2.2. Orta Cisimcik (Midbody) Organizasyonu

Ayrılma yarığı oluşumunu takiben aktomiyozin kasılma halkası daralarak merkezi iğ ipliklerini sıkıştırır ve orta cisimcik (midbody-Flemming body) olarak adlandırılan, kardeş hücrelerin ayrılması için gerekli olan proteinlerin organizasyonunu yapan ve bu proteinler için platform görevi gören geçici bir organel oluşturmaktadır [D'Avino et al., 2015]. İlk olarak 1891 yılında Walther Flemming tarafından keşfedilen orta cisimcik, daha sonra 20.yüzyılda elektron mikroskopunun keşfiyle daha detaylı olarak araştırılmıştır [Buck and Tisdale 1962a,b], [Byers and Abramson 1968], [Mullins and Biesele, 1977]. Bu yapı, merkezinde elektronca yoğun amorf matriks bulunan sıkıştırılmış antiparalel mikrotübüllerden meydana gelmektedir. Farklı kaynaklarca çeşitli görüşler bulunsa da genel olarak orta cisimcik iki ana bölgeyle karakterizedir. Orta cisimcik merkezini de içeren elektronca yoğun orta cisimcik halkası, immün boyama çalışmalarında mikrotübül yoğunluğuna bağlı olarak koyu bir bölge ile temsil edilmektedir. Orta cisimcik kolları ise orta cisimcik halkasına komşu iki bölgeden oluşmaktadır. Şekil 2.5'te bu bölgeler görüntülenmektedir [D'Avino et al., 2015].



Şekil 2.5: Elektron mikroskobu ile yakalanmış ayrılmakta olan kardeş hücreler arasında beliren köprü ve bu köprünün merkezinde orta cisimcik oluşumu. Kırmızı ölçek 1 μm boyundadır.

Orta cisimcik organizasyonunda görevli proteinler yer aldıkları alana göre 3 ana grupta incelenmektedir (şekil 2.6), [Green et al., 2012]. KIF4 ve PRC1'in bulunduğu birinci grup orta cisimcik merkezinde konumlanmaktadır [Hu et al. 2012a]. Centralspindlin ve ECT2 birlikte hareket edecekleri anillin, RhoA, ARF6, ve Cep55 ile orta cisimcik halkasında lokalize olmaktadır [Elia et al., 2011],[Guizetti et al., 2011], [Huet al., 2012a]. CENP-E, MKLP2 ve Aurora B'nin bulunduğu grup ise orta cisimcik kollarında görev alırken, Polo benzeri kinaz 1(Plk1) tüm bu orta cisimcik proteinlerinin farklı bölgelerde lokalize olmasını kontrol etmektedir [Hu et al. 2012a]. Şekil 2.6' da orta cisimcik proteinlerinin hangi bölgelerde lokalize olduğu şematize edilmiştir [Green et al., 2012].



Şekil 2.6: Orta cisimciği oluşturan bölümler ve bu bölümlerde lokalize olan sitokinezin tamamlanmasında görev alan proteinler.

2.2.3. Ayrılma

İki kardeş hücrenin fiziksel ayrılması, ayrılma yarığının aktomyozin halkasını 1-2 μ m'ye kadar sıkıştırmasıyla başlamaktadır. Pek çok hayvan hücresi bu olayı takiben birkaç saat daha hücreler arası köprü ile bağlı kalmaya devam etmekte ve ardından absisyon olarak isimlendirilen aktin bağımsız bir proses ile ayrılmaktadır [Steigemann and Gerlich, 2009], [Guizetti and Gerlich, 2010]. Absisyon asimetrik bir süreçtir, ayrılma orta cisimciğin tek tarafında meydana gelmektedir.

Ayrılma yarığı oluşumundan hemen sonra, endozom ve golgi tarafından oluşturulan veziküller orta cisimcikte birikmeye başlamakta, sonrasında veziküllerin plazma membranıyla birleşmesi kardeş iki hücrenin birbirinden ayrılmasıyla sonuçlanmaktadır [Gromley et al., 2005], [Goss and Toomre, 2008], [Schiel et al., 2011]. Bu süreçte sentriolin, Rab 35 [Kouranti et al., 2006], Rab11 [Fielding et al., 2005], t- ve v-SNARES [Low et al., 2003], [Gromley et al., 2005] ve BRUCE [Pohl and Jentsch, 2008] gibi ayrılmada etkili rol oynayan veziküllerle etkileşim halinde olan birçok faktör de görev almaktadır. Geri dönüşüm endozomları absisyonda önemli role sahiptir özellikle RAP11-FIB3 içeren endozomlar geç telofazda ayrılma yarığına taşınır ve kortikal aktin iskeletinin yıkılmasını regüle ederek absisyonu başlatmaktadır [Wilson et al., 2004], [Schiel et al., 2012], [Dionne et al., 2015].

Absisyonun tamamlanmasında anahtar rol oynayan faktör ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) kompleksidir [Morita, 2012]. Bu kompleks membran deformasyonu içeren pek çok biyolojik processte yer almaktadır. Plk1'in fosforillemesiyle Cep55, ESCRT proteini olan TSG101 ve ALIX ile bağlantı kurarak orta cisimcikte ESCRTIII kompleksinin birikmesini başlatmaktadır [Carlton and Martin-Serrano, 2007], [Morita et al., 2007]. ESCRT partneri spastin mikrotübüllerin depolimerizasyonunu sağlayarak absisyondaki son fiziksel bağlantıyı sonlandırmaktadır [Connel et al., 2009], [Lacroix et al., 2010].

3. SARILI-SARMAL BÖLGE BULUNDURAN PROTEİN 124 (Ccdc124)

Sarılı-sarmal bölge içeren-124 (Coiled-coil domain containing-124, CCDC-124) proteini ilk olarak sodyum/iyodid simportunda görevli NIS geniyle ilgili yapılan çalışmalar sırasında keşfedilmiş bir sentrozom proteinidir [Telkoparan et al., 2013]. Sarılı-sarmal bölge çoğu sentrozom proteininde bulunan bir motiftir. Ccdc124 proteini mantardan insana tüm yüksek ökaryotlarda korunurken, prokaryotlarda bulunmamaktadır. 19. kromozomun kısa kolunda (19p13.11) bulunan bir gen tarafından kodlanan bu protein 223 aminoasit uzunluğundadır ve yapılan karşılaştırmalı sekans analizleri sonucunda kodlanmayan 1 exon olmak üzere, 5 adet exona sahip olduğu tespit edilmiştir [Telkoparan, 2013]. Tavşanlarda poliklonal anti-N-terminus antikolar kullanılarak yapılan immünolojik analizler sonucunda bu gene ait protein ürünü büyüklüğünün yaklaşık 32 kDa olduğu gösterilmiştir [Telkoparan, 2013]. İkinci bir alternatif ribozom bağlanma dizisine sahip olması nedeniyle, 176 aminoasitten oluşan ve 26 kDa ağırlığında bir izoformunun bulunduğu da tespit edilmiştir [Telkoparan, 2013], [Lee et al., 2012]. Protein yapısında %42 gibi çok yüksek oranda artı veya eksi yüklü amino asitler (K, R, D, E, H) bulundurmaktadır. Bir fosfoprotein olarak tanımlanan bu proteinin, yapılan biyoinformatik çalışmalar sonucunda olası 5 serin, 7 tireonin ve 1 tirozin fosforilasyon bölgesine sahip olduğu düşünülmektedir.

Hücre bölünmesi sırasında geç anafaza kadar sentrozomda konumlanan Ccdc124 proteini, sitokinetik absisyon esnasında sentrozomdan ayrılarak, ilk olarak geç anafazda hücreler arası orta bölgeye ardından telofazda orta cisimciğe hareket etmektedir [Telkoparan, 2013]. Yapılan çalışmalarda, Ccdc124 proteini ifadenmesi azaltılmış [Telkoparan, 2013] yada aşırı arttırılmış [Arslan, 2015] hücrelerde sentrozom oluşumu etkilenmezken, sitokinezi tamamlayamamış çoklu çekirdekli hücre sayısında büyük bir artış gözlemlenmiştir.

Önceki çalışmalarda Ras süper ailesine ait endozom lokalize RasGEF1B'nin Ccdc124 proteini ile etkileşim içinde bulunduğu aydınlatılmıştır [Yaman et al., 2009]. RasGEF1B guanin nükleotiti değiştirici faktördür ve küçük G proteini Rap2 aktivasyonundan sorumludur. Rap sinyali ise hücre-hücre arası bağlantılarda, hücre-hücre dışı matris adezyonunda ve hücre içi kutupların belirlenmesinde görev almaktadır [Gloerich et al., 2011].

Northern blot analizleri sonucu CCDC124 geninin beyin, plesanta, yumurtalık, testis, karaciğer ve özellikle iskelet kasında yüksek ekspresyon seviyesine sahip oldukları gösterilmiştir [Erkek, 2008]. Daha sonraki çalışmalarda ise dalak ve prostatta da yüksek CCDC124 seviyesine rastlanmıştır [Telkoparan, 2013].

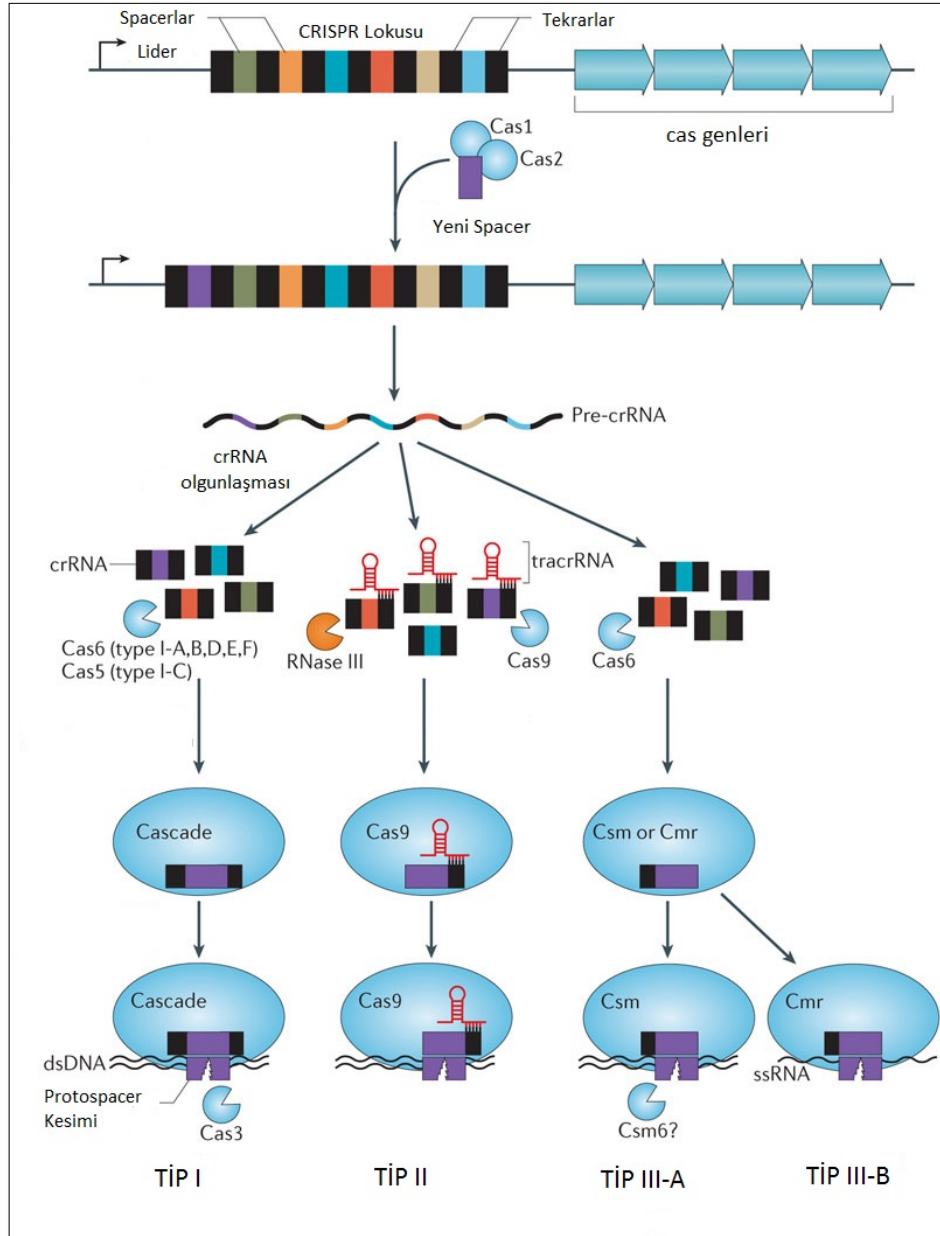
4. CRISPR \ CAS9 SİSTEMİ

CRISPR, yaklaşık olarak bakterilerin %40 ve arkeaların %90'ında bulunan virüs ve plazmid gibi yabancı DNA'lara karşı oluşturulmuş prokaryotik adaptif immün sistemidir [Grissa et al., 2007], [Horvath et al., 2010]. Bu sistem, palindromik düzenli tekrarlardan oluşan CRISPR gen kümesi ve bu kümeye eşlik eden Cas gen bölgesinden oluşmaktadır.

İlk olarak 1987 yılında Ishino tarafından *Escherichia coli* K12'de tekrar dizileri olarak keşfedilmiştir [Ishino et al., 1987]. 2000 yılında çeşitli arkealarda ve bakterilerde yapılan çalışmalarla kümelenmiş düzenli tekrarlar SRSR (Short Regularly Spaced Repeats) olarak isimlendirilmiştir [Mojica et al., 2000]. 40 farklı bakteri ve arkeal organizmanın genomlarını inceleyen Jansen ve ekibi bu tekrarlı dizi ailesine “düzenli aralıklarla yerleşmiş kısa palindromik tekrar kümesi“ anlamına gelen CRISPR (**C**lustered **R**egularly **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**epeats) akronimini vermiştir [Jansen et al., 2002]. Daha sonra 2005 yılında üç farklı grubun CRISPR gen kümesindeki spacer DNA'ların bakteriyofaj ve plazmid gen parçaları ile benzerlik gösterdiğini açıklamasıyla, bu sistemin ökaryotik RNA interferans sistemine benzer bir biçimde yabancı DNA'ya karşı prokaryotların sahip olduğu bir immün sistemi olabileceği tartışılmaya başlanmıştır [Mojica et al., 2005], [Pourcel et al., 2005], [Bolotin et al., 2005]. 2007 yılında Barrangou ve ekibi bu düşünceyle CRISPR sistemine sahip olan *Streptococcus thermophilus* suşlarını bakteriyofajlarla enfekte etmiş ve virüsten kaynaklanan yeni spacer'ların CRISPR kümesine eklenmesi ile bakterinin virüse karşı dirençli hale geldiğini kanıtlamışlardır [Barrangou et al., 2007]. CRISPR çalışmalarını bir üst aşamaya ise Jeniffer Doudna ve Emmanuelle Charpentier 2012 yılında Cas proteinlerinin rollerini ve Tip II CRISPR sisteminin moleküler mekanizmasını aydınlatarak çıkarmışlardır [Jinek et al., 2012]. Aynı zamanda bu çalışmalarıyla ilk kez CRISPR sistemini kullanarak insan hücrelerinde *in vitro* gen düzenlemesi yapmışlardır.

Genel olarak 3 tip CRISPR sistemi (I-III) bulunmaktadır (şekil 4.1). Cas1 ve cas2 proteini tüm tiplerde görülürken, tip I cas3 proteininin varlığıyla, tip 2 cas9 proteininin varlığıyla, tip 3 ise cas 10 proteininin varlığıyla karakterizedir [Makarova et al., 2011a,b]. Tip I ve tip III sistemlerinde yabancı DNA'nın yok edilmesi için multiprotein kompleksi gerekirken, tip II sisteminde cas9 enzimi bu görevi tek

başına üstlenmektedir. Buna ek olarak tip I ve tip III sistemlerinde crRNA'nın olgunlaşması için cas proteinleri kullanılırken, tip II'de tracrRNA kullanılmaktadır [Makarova et al., 2011b]. Moleküler mekanizması en iyi açıklanmış ve gen mühendisliği çalışmalarında en çok kullanılan sistem olan tip II sistemi, diğer tiplerin aksine yalnızca bakterilerde bulunmaktadır [Chylinski et al., 2013]. Tüm CRISPR tipleri şekil 4.1'de kısaca özetlenmiştir [Westra et al., 2014].



Şekil 4.1: Tip I, Tip II ve Tip III CRISPR sistemlerinin moleküler mekanizması.

4.1. Tip II CRISPR/Cas9 Sistemi Moleküler Mekanizması

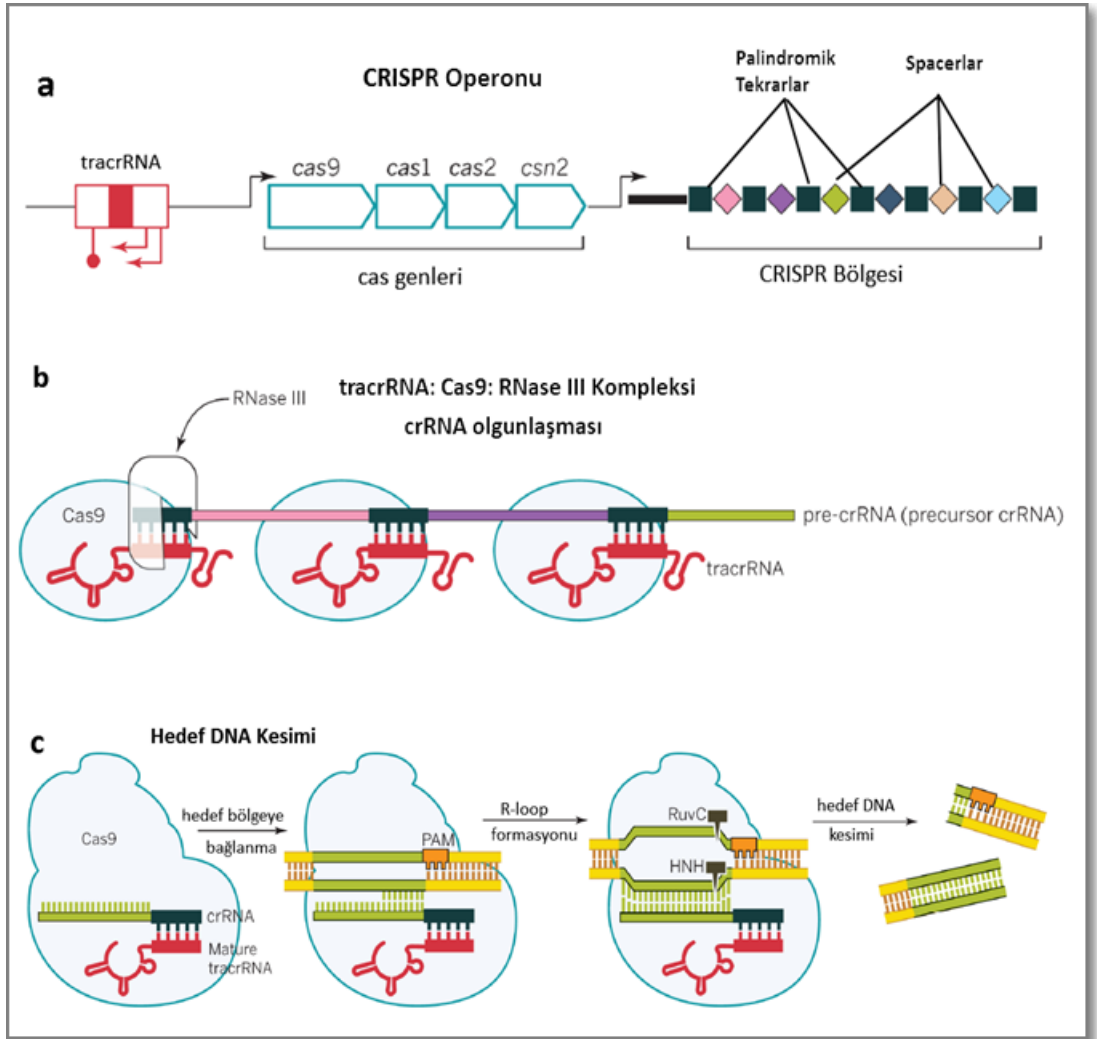
Günümüzde kullanılan çeşitli gen düzenleme teknolojileri ile kıyaslandığında CRISPR/Cas9, dizayn edilmesi ve uygulanması oldukça kolay, tasarlanan sgRNA ile hedeflenen gen bölgesi arasında Watson-Crick baz eşleşmesi olduğundan spesifikliğı ve verimliliğı yüksek ve aynı süreç içerisinde birden fazla gen düzenlemesine olanak sağlayan programlanabilir RNA aracılı gen mühendisliğı tekniğıdir.

Tip II CRISPR sistemi 3 temel öğeden oluşmaktadır. Bunlardan ilki yalnızca tip II'de bulunan hedef bölgede çift zincirli DNA kesişe neden olan Cas9 endonükleazıdır. Cas9 enzimine rehberlik yapan crRNA (CRISPR-RNA) ve crRNA'nın olgunlaşmasında görev alan tracrRNA (trans-activating crRNA) diğere önemli tip II CRISPR bileşenleridir. Belli bir organizasyon içinde bir arada çalışan bu genler CRISPR operonunda kümelenmiştir.

CRISPR operonu, palindromik tekrarlar ve bu tekrarları ayıran virüs veya plazmid kaynaklı spacerların yer aldığı CRISPR bölgesi, bu bölgeye komşuluk eden ve düzenleyen Cas (CRISPR-assoiated) genlerden ve tracrRNA sekansından meydana gelmektedir. Tüm CRISPR operonlarında olmamakla birlikte, CRISPR bölgesinin yukarısında 100-550 baz çifti uzunluğunda Adenin ve Timin nükleotitlerince zengin korunmuş bir lider (öncü) sekansı bulunmaktadır [Jansen et al., 2002]. Bir organizmada birden fazla CRISPR operonu bulunabilmektedir ve her organizmadaki tekrar sekansları ve sayıları aynı değildir.

CRISPR\Cas9 immün sistemi yabancı genetik materyalin hücreye girişiyile başlamaktadır. Cas proteinleri aracılığıyla yabancı genomu (protospacer) parçalanmakta ve CRISPR lokusuna, lider dizisinden sonra gelen palindromik tekrarlar arasına spacer olarak eklenmektedir. Aynı organizma tekrar hücreye girdiğinde, CRISPR lokusu transkribe edilerek yaklaşık 511 nükleotitlik olgunlaşmamış pre-crRNA (precursor-crRNA) oluşturulmaktadır. Pre-crRNA'nın palindromik tekrar bölümleriyle baz eşleşmesi gösteren tracrRNA bu bölümlere bağlanır ve RNaz III ve Cas9 enzimlerini bölgeye çekerek crRNA'nın olgunlaşmasını gerçekleştirmektedir [Deltcheva et al., 2011]. Hücreye giren yabancı DNA, crRNA'daki kendi genomundan kaynaklı spacer ile baz eşleşmesi gösterdiğinden hedef bölgeye crRNA, tracrRNA ve Cas9 üçlü kompleksi bağlanır. Komplementary ipliğı kesen HNH ve non-komplementary ipliğı kesen RuvClike domainlerinden

oluşan Cas9, üçlü kompleksin bağlandığı hedef DNA'da çift zincirli DNA kesimi oluşturur [Jinek et al., 2012].



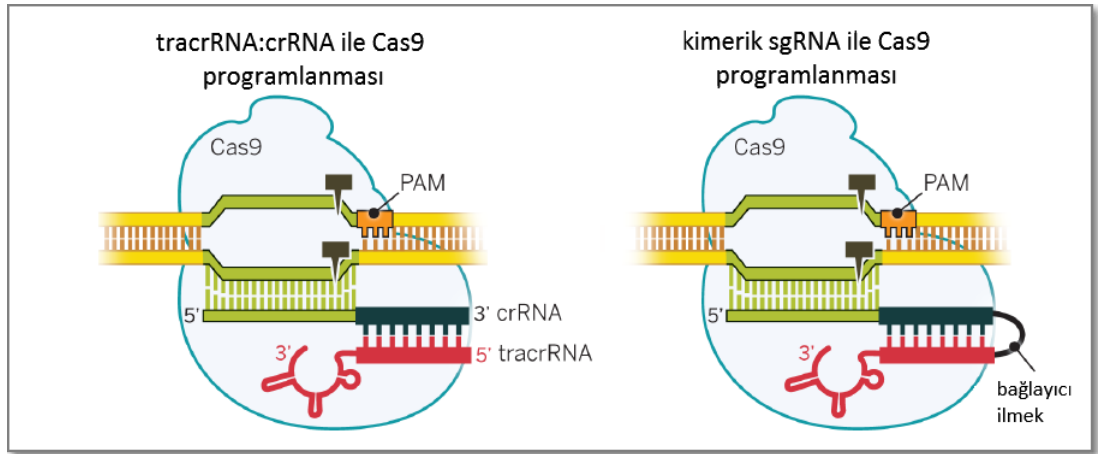
Şekil 4.2: Tip II CRISPR/Cas9 sistemi moleküler mekanizması, a) CRISPR operonu haritası, b) crRNA olgunlaşması için tracrRNA: RNazIII: Cas9 kompleksi oluşumu, c) RNA rehberli Cas9 enziminin hedef bölgeye bağlanması ve DSB oluşumu.

Cas9 endonükleazın hedef bölgeye bağlanabilmesi için tracrRNA-crRNA kompleksine ek olarak, hedef bölgede yer alması gereken PAM (protospacer adjacent motif) olarak isimlendirilen bir sekans bulunması gerekmektedir. PAM sekansı protospacer bölgesine komşudur (şekil 4.2) ve çift zincirli DNA kırığı (DSB) bu sekanstan 3-4 nükleotit önce meydana gelmektedir. Organizmadan organizmaya değişebilen PAM, *S.pyogenes* için NGG'dir [Jinek et al., 2012].

4.2. CRISPR/Cas9 Tekniği Uygulama Alanları

4.2.1. Programlanabilir RNA Aracılı Gen Dzenlemesi

2012 yılında Jeniffer Doudna'nın ekibinden Martin Jinek, crRNA'nın 3' ucu ile tracrRNA'nın 5' ucu arasında bağlayıcı bir ilmek oluşturarak küçük rehber RNA anlamına gelen sgRNA isimli sentetik bir molekül geliştirmiştir (şekil 4.3), [Jinek et al., 2012]. Bu rehber RNA'nın 5' ucunda hedeflenen DNA'yı Watson-Crick baz eşleşmesi ile belirleyen 20 nükleotitlik bir sekans ve 3' ucunda ise Cas9 enziminin bağlanmasını sağlayan çift zincirli tracrRNA bulunmaktadır [Jinek et al., 2012]. Tasarlanan bu iki bileşenli sgRNA ile 5' ucundaki rehber bölge değiştirilerek, PAM sekansı iğerdiği sürece, istenilen herhangi bir DNA bölgesinde değişiklik yapılabilmektedir.

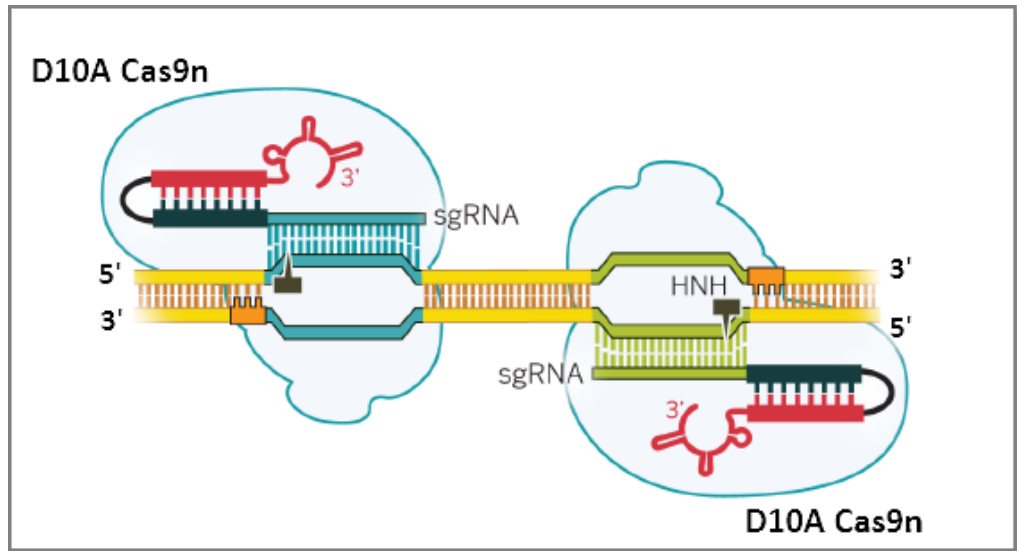


şekil 4.3: tracrRNA:crRNA kompleksi programlı ve geliştirilmiş kimerik sgRNA programlı Cas9 DNA hedeflemesi.

Tip II CRISPR sisteminde çığır açan sgRNA'nın Cas9 enzimiyle birlikte ekspresyonu pek çok organizmada başarılı bir genom dzenlemesi yapılabilmesini mümkün kılmıştır. İnsan [Mali et al., 2013], [Cong et al., 2013], [Cho et al., 2013], fare [Shen et al., 2013], [Whang et al., 2013], *Drosophila melanogaster*[Gratz et al., 2013], zebra balığı [Hwang et al., 2013], [Chang et al., 2013], *Saccharomyces cerevisiae* [DiCarlo et al., 2013] çalışılan organizmalardan bazılarıdır.

Hedef bölgede DSB oluşturulduktan sonra DNA, bu bölgeyi iki farklı tamir sistemiyle onarmaya çalışmaktadır [Wyman et al., 2006]. Bunlardan ilki NHEJ (non-homologous end joining) [Shuman and Glickman, 2007], diğeri donör DNA bağımlı HDR (homology-directed repair) [Smith, 2001] DNA tamir mekanizmalarıdır. NHEJ, oluşturulan DNA kesiğini baz ekleme veya çıkarma yöntemiyle tamir etmektedir. Bu özelliğinden dolayı, DNA üçlü baz diziliminde çerçeve kayması yaratmak ve erken sonlanma kodonu oluşturarak genin ifadenmesini tamamen ortadan kaldırmak (knock-out) amacıyla kullanılmaktadır. DNA kesiğinin her iki koluna homoloji gösteren, çift iplikli veya tek iplikli donör DNA kullanıldığında ise hücre HDR tamir yolağını seçmekte ve donör DNA'yı kalıp olarak kesik bölgesini tamamlamaktadır.

CRISPR/Cas9 sisteminde programlanan sgRNA'nın hedeflenen bölge dışında genomda başka bölgelere (off-target) bağlanması sonuçları değiştirebilecek istenmeyen bir durumdur. Bunu önlemek amacıyla Cas9n (Cas9-nickase) modeli geliştirilmiştir [Ran et al., 2013]. Cas9 enziminin DNA'nın farklı ipliklerini kesen iki domaini vardır (HNH, RuvC). RuvC domainini mutasyona uğratarak D10A Cas9, HNH domainini mutasyona uğratarak H840ACas9 mutant enzimleri geliştirilmiştir. Bu enzimlerin kullanımıyla DNA üzerinde farklı ipliklerde iki kırık oluşturulmuş ve off-target kesimleri 50 ile 1500 kat azaltarak istenilen bölgede düzenleme yapılabilmektedir [Ran et al., 2013].



Sekil 4.4: Çift Cas9 nickase modeli; 5'-3' zinciri hedefleyen sgRNA ve 3'-5' zinciri hedefleyen başka bir sgRNA ile D10ACas9n enzimi kullanılarak DNA üzerinde DSB oluşturulmaktadır. Siyah oklar kırık bölgesini göstermektedir.

4.2.2. Transkripsiyon Kontrolü

CRISPR/Cas9 sistemiyle genom düzenlemesine ek olarak transkripsiyonel kontrol de yapılabilmektedir. CRISPRi (CRISPR interference) olarak isimlendirilen bu sistemde endonükleaz aktivitesini kaybetmiş katalitik olarak inaktif Cas9 enzimi olan dCas9 (dead cas9) enzimi kullanılmaktadır [Qi et al., 2013]. RNA Polimerazın bağlanma bölgesine bağlanan fakat enzimatik aktivite göstermeyen dCas9 ile transkripsiyonun başlamasının ve uzamasının baskılanması *E. coli* ve insan hücreleri üzerinde test edilmiş ve yüksek verim elde edilmiştir [Qi et al., 2013].

CRISPRi tekniğinin geliştirilmesiyle, dCas9 enzimi çeşitli transkripsiyonel efektör proteinlerle sentetik olarak birleştirilmiş ve oluşturulan kimerik enzim transkripsiyonun aktivasyonunda ve baskılanmasında başarı elde etmiştir [Gilbert et al., 2013]. Transkripsiyonel kontrol efektör proteinin çeşidine göre değişmektedir; KRAB veya SID gibi baskılayıcı efektörler kullanılırsa transkripsiyon baskılanmakta, VP16/VP64 veya p65 gibi aktive edici efektörler kullanılırsa transkripsiyon aktivasyonu sağlanmaktadır [Gilbert et al., 2013], [Konermann et al., 2013].

4.2.3. Genom Tarama Kütüphanesi

CRISPR/Cas9 ile genom düzenlemesi aynı anda birden fazla genin hedeflenmesine olanak sağlamaktadır. Bu özellik ise ilgilenilen fenotipte rol oynayan genlerin saptanması için genom genelindeki genlerin fonksiyon taramasını mümkün kılmaktadır. Tüm genleri hedefleyen sgRNA kütüphanesinin lentivirüs aracılığıyla dağıtımı yapılarak aynı anda binlerce gende mutasyon yaratılmaktadır [Shalem et al., 2014]. Bu mutasyon havuzunda, pozitif ve negatif seçimlerle fonksiyon kaybı taraması yapılarak ilgilenilen fenotipe hangi genlerin yol açtığını aydınlatılmaktadır [Wang et al., 2014].

5. MATERYAL ve YÖNTEM

5.1. Materyal

5.1.1. Hücre Hattı Seçimi

CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak *CCDC124* geninin knock-out edilmesi çalışmalarında gen aktarımı diğer hatlara görece olarak yüksek olan HEK 293T hücre hattının kullanılması uygun görülmüştür.

İnsan embriyonik böbrek hücre hattı olan (HEK 293) 1970'lerin başında Hollanda'da Alex van der Eb'in laboratuvarında embriyonik böbrek hücrelerinin adenovirüs 5 DNA'sı ile transfekte edilmesi sonucu elde edilmiştir. Günümüzde kolay kültüre edilebilmesi ve kolay transfekte edilebilmesiyle en çok kullanılan hücre hatları arasında yer almaktadır.

Yapılan çalışmada ise HEK293T vektöre ait SV40 enhanser bölgesine bağlanarak protein ifadesini arttıran büyük T antijenini sürekli olarak eksprese eden hücre hattı seçilmiştir. Böylece T antijeni sayesinde hücre döngüsünü inhibe eden proteinlere bağlanan ve sürekli hücre döngüsüne giren populasyonda transfeksiyon, transdüksiyon, plazmid amfikasyonunu uygulamalardaki başarı oranını yükseltmiştir.

5.1.2. Hücre Kültürü Solüsyonları

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM): Besiyeri olarak kullanılan DMEM, bizim yaptığımız deneylerde %10 fetal serum, %10 penisilin ve 3.3 mM L-glutamin içerecek şekilde hazırlanmıştır.
- Tripsin: Hücrelerin kültüre edildikleri petriyle temaslarını ortadan kaldıran bir enzimdir. Çalışmalar sırasında -20 °C'de saklanan enzim, tripsin-Etilendiamin tetraasetik asit şeklinde PBS içerisinde 3X olacak şekilde hazırlanmıştır.
- PBS: Ticari olarak satın alınmış olan 10X PBS, hücre kültürü çalışmalarında 1:10 oranında steril distile su ile seyreltilerek 1X PBS olarak kullanılmıştır.

- Hücresel Dondurma Besiyeri: Fetal sığır serumu içerisine %10 DMSO eklenerek hazırlanan besiyeri, alüminyum folyo ile sarılıp, steril olarak +4 °C 'de inkübe edilmiştir.

5.1.3. Liziz Solüsyonu

- Liziz Tamponu: Son konsantrasyonda 500 mM Tris (pH=8), 250 mM NaCl, %1 NP40 ve 1X proteaz inhibitörü konularak üzeri ddH₂O ile 1L'ye tamamlanmıştır. Deneylerde kullanılan liziz tamponunun taze olarak hazırlanması gerekmektedir.

5.1.4. İmmünoBlot Solüsyonları

- Jel Formülasyonları (10 ml): Tris tamponu, SDS ve % 40 akrilamid ddH₂O içerisinde aşağıdaki tablolarda yer alan oranlar göz önüne alınarak hazırlanmıştır (Tablo 5.1 ve Tablo 5.2). %10 APS and TEMED ise hızlı polimerleşmeye neden oldukları için en son eklenmiştir.

Tablo 5.1: Yürütme jeline ait kimyasal oranları.

YÜRÜTME JELİ	12%		
	1	2	4
1.5 Tris HCl pH 8.8	1250	2500	5000
ddH ₂ O	2175	4350	8700
40% Acryl/bis	1500	3000	6000
25 % SDS	20	40	80
10% APS	50	100	200
TEMED	5	10	20

Tablo 5.2: Ayırma jeline ait kimyasal oranları.

AYIRMA JELİ	4%			
	1	2	3	4
0.5 Tris HCl pH 6.8	1250	2500	3750	5000
ddH ₂ O	3175	6350	9525	12700
40% Acryl/bis	500	1000	1500	2000
25 % SDS	20	40	60	80
10% APS	50	100	150	200
TEMED	5	10	15	20

- Yürütme Tamponu, 5X: 15.1 g tris, 95 g glisin, 50 ml 10% SDS ddH₂O ile 1L'ye tamamlanmıştır.
- Transfer Tamponu, 10X: 30.3 g tris ve 144 g glisin ddH₂O içerisinde çözülerek 1L'ye tamamlanmıştır. Deneyde kullanılmadan önce taze olarak hazırlanan solüsyon ddH₂O ile 1X olacak şekilde seyreltilerek ve %20 metanol eklenerek 4 C°'de saklanmıştır.
- TBS, 10X: 12.1 g tris ve 87.6 g NaCl 1 L ddH₂O içerisinde çözülerek, pH'ı 8.0 olacak şekilde ayarlanmıştır.
- TBS-T: Hazırlanmış olan 1X TBS solüsyonunun içine %0.1 tween-20 eklenmiştir.
- 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8: 200ml ddH₂O içerisinde 121.1 g trizma base çözülmüş ve pH 8.8 olarak ayarlanmıştır.
- 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8: 200ml ddH₂O içerisinde 121.1 g tris çözülerek hazırlanan solüsyonun pH'ı, HCl ve NaOH kullanılarak 6.8 olacak şekilde ayarlanmıştır.
- APS: 0.1 g amonyum sülfat, 1 ml ddH₂O içerisinde çözülerek filtre edilmiş ve taze hazırlanan solüsyon -20°C'de muhafaza edilmiştir.
- Strip Solüsyonu: Son konsantrasyon 100 mM β-mercaptoethanol, %2 SDS, 62.5 mM Tris-HCl içerecek ve pH: 6.7 olacak şekilde hazırlanmıştır.

5.1.5. Flow Sitometri Solüsyonları

- 7AAD Boyama Solüsyonu: PBS'in içinde 1/1000 Triton-X, 1 ml de 10µg RNAaz ve 500.000 hücre için 10 µl 7AAD çözülmüştür.

5.1.6. İmmüno Floresan Solüsyonları

- Yıkama Solüsyonu: 1X PBS'in içerisine Triton-X %0.1 olacak şekilde eklenerek hazırlanmıştır.
- Bloklama Solüsyonu: 1X PBS'in içerisinde %0.1 Triton-X ve %2 BSA çözümlenerek hazırlanmıştır.
- DAPI Boyası: 1X bloklama solüsyonu içerisinde 1/100.000 oranında DAPI çözümlenerek hazırlanmıştır.

5.1.7. Diğer Tampon ve Solüsyonlar

- Kalsiyum Klorür Solüsyonu: 60 mM CaCl₂, 15% glycerol and 10mM PIPES pH 7.00 olacak şekilde karıştırılmış ve filtreden geçirilip kompetent hücre hazırlamak için 4°C'de saklanmıştır.
- 5X Tris-Borate-EDTA (TBE) Tamponu: 54 gr Tris base, 27.5 gr Boric acid ve 20mL of 0.5 M EDTA pH 8.00 olacak şekilde 1Lt dH₂O içinde çözülmüş oda sıcaklığında saklanmıştır.
- %1 (w/v) Agaroz Jel: 1 gr agaroz 100 ml 0.5X TBE içinde çözümlenerek mikrodalga fırında ısıtılmıştır. Nükleik asitleri görüntüleyebilmek için 0.001 (w/v) etidyum bromür eklenmiştir.
- Polyethylenimine (PEI) (1µg/µL): 50 mg PEI 50 ml dH₂O içerisinde çözülmüş ve 80 °C' de ısıtılıp ardından oda sıcaklığında soğutulmuştur. pH 7.00 olacak şekilde ayarlanıp filtre ile steril edilmiş ve porsiyonlanıp -20 °C'de saklanmıştır.
- FACS Tamponu: 0.5 gr Bovine serum albumin (BSA) ve 0.5 gr sodium azide 500 mL 1X HBSS içerisinde çözülmüş ve 4°C'de depolanmıştır.

5.1.8. Kimyasal Malzemeler

Deney için kullanılan kimyasallar ve kimyasalların markaları Ek-A'da tablo halinde listelenmiştir.

5.1.9. Kullanılan Cihazlar

Deney için kullanılan cihazlara ve cihazların markalarına/model numaralarına ait tablo Ek-B' de yer almaktadır.

5.1.10. Vektör ve Primerler

Tablo 5.3: Kullanılan Vektörler ve Kullanım Amaçları.

Vektör Adı	Kullanım Amacı
pcDNA-GFP	Transfeksiyon verimliliği kontrolü
pUC19	Transformasyon verimliliği kontrolü
pJET1.2/blunt	PCR ürünü klonlamak
pSpCas9n(BB)-2A-Puro (PX462)	CRISPR Plazmidi

Tablo 5.4: Kullanılan Primerler ve Kullanım Amaçları.

Plazmid Adı	Sekansı	Kullanım Amacı
pJET1.2 forward primeri	C G A C T C A C T A T A G G G A G A G C G C C	Sekans primeri
pJET1.2 reverse primeri	T T C T T G T A G C T A A A A G G T A C C G T C	Skans Primeri
CCDC124 7 Forward	C A C C G T T C T C A C C C T G G A A C T T C T	CRIPR Oligosu
CCDC124 7 Reverse	A A A C A G A A G T T C C A G G G T G A G A A C	CRIPR Oligosu
CCDC124 55 Forward	C A C C G G C A G C G G C C C G G G C A C G T A	CRIPR Oligosu
CCDC124 55 Reverse	A A A C T A C G T G C C C G G G C C G C T G C C	CRIPR Oligosu
CCDC124 23 Forward	C A C C G T C T T A C G T T C C A G C T G G T C G	CRIPR Oligosu
CCDC124 23 Reverse	A A A C C G A C C A G C T G G A A C G T A A G A C	CRIPR Oligosu
CCDC124 64 Forward	C A C C G G A G A C G C A G C G C C T A C T G G	CRIPR Oligosu
CCDC124 64 Reverse	A A A C C C A G T A G G C G C T G C G T C T C C	CRIPR Oligosu
7-55 Forward Primer	T C C C C C A T C C C C A T C C T C T T	PCR Primeri
7-55 Reverse Primer	C C C T C T C G C T A T T C A C C C A C A	PCR Primeri
23-64 Forward Primer	C G T T G G C T G A G A T G A A A A	PCR Primeri
23-64 Reverse Primer	G G C T A A T G G A C T C A A G G T	PCR Primeri

5.2. Yöntem

5.2.1. CRISPR/Cas9 sistemi ve sgRNA Tasarlanması

Beş ekzona sahip *CCDC124* geni 32kDA ve 26kDA olmak üzere iki protein varyantını kodlamaktadır. Tasarlanan iki farklı sgRNA oligosu çifti ile bu iki proteinin işlevleri anlaşılmasına çalışılmıştır. İkinci ekzonu hedef alan 7-55 isimli sgRNA çifti ile yalnızca 26kDA boyundaki ürünün oluşması amaçlanmış, transkripsiyon başlangıç metiyonini ve RNA Polimerazın bağlanma bölgesini yaralamayacak şekilde tasarlanmıştır. Üçüncü ekzonu hedef alan 23-64 isimli sgRNA çifti ise her iki ürünün oluşmasını engellemek amacıyla tasarlanmıştır.

Yapılan çalışmada Cas9n (Cas9-nickase) enzimi kullanılarak hedeflenen bölgeye spesifikliğin artırılması ve off-target aktivitesinin en aza indirilmesi amaçlanmıştır. 7-55 isimli sgRNA rehberliğindeki Cas9n enzimi ile, 2.ekzonun 5'-3' yönündeki iplikte 7. nükleotitte bir kırık ve 3'-5' yönündeki iplikte 55. nükleotitte bir kırık yaratmak suretiyle DSB oluşturarak 32kDA boyundaki ürünün oluşmaması hedeflenmiştir. Aynı şekilde 23-64 isimli sgRNA rehberliğindeki Cas9n enzimi ile 3.ekzonun 5'-3' yönündeki iplikte 23. nükleotitte bir kırık ve 3'-5' yönündeki iplikte 64. nükleotitte bir kırık yaratmak suretiyle DSB oluşturarak her iki ürünün oluşumunun engellenmesi hedeflenmiştir.

5.2.2. Bakteriyel Hücre Kültürü

5.2.2.1. Bakteri Kültürü Büyüme Koşulları

E. coli DH5 α bakteri hücresi Luria Broth (LB) içerisinde 37 °C'de, 250 rpm'de çalkalanarak overnight (~16 saat) büyütülmüştür. Bakteri hücreleri, hücreler tek düşecek şekilde LB agar üzerine ekilerek overnight 37 °C'de büyütülmüştür. Uygulanılacak deneye göre seçilen antibiyotik besiyerine eklenmiştir.

5.2.2.2. Kompetan Hücre Hazırlanması ve Transformasyon

Daha önce hazırlanmış kompetent hücreler kullanılarak *E.coli* DH5 α kompetent hücresi hazırlanmıştır. 50 ml LB içerisinde daha önce hazırlanmış kompetent hücreden 50 μ l konularak 37 °C'de, 250 rpm'de çalkalanarak overnight (~16 saat) büyütülmüştür. Ertesi gün 400 ml içerisinde 4 ml overnight büyüyen kültürden eklenerek OD₅₉₀ 0.375 olana kadar aynı şartlarda büyütülmüştür. Ardından önceden hazırlanıp buz üzerinde soğutulmuş CaCl₂ eklenerek santrifüj aşamalarından sonra 200 μ l olacak şekilde porsiyonlanmış ve hiç bekletilmeden sıvı nitrojende dondurularak -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

Transformasyon için buz üzerinde çıkarılan DH5 α kompetent hücresi üzerinde tamamen çözünmeden ~100 pg plazmid DNS'sı eklenip 30 dk buz üzerinde inkübe edilmiştir. Ardından 42 °C'de 90 saniye bekletilip buz üzerinde alınarak 1 dk inkübe edilmiştir. 800 μ l steril LB eklenerek 45 dk, 37°C'de inkübe edilmiştir. Maximum hızda 1 dk santrifüj edildeikten sonra antibiyotik içeren LB agar petriye ekilerek 37°C'de gece boyu inkübe edilmiştir.

5.2.2.3. Plazmid DNA İzolasyonu

Plazmid DNA izolasyonu, Alkalın Lizis protokolü QIAGEN Plazmid Midi Kit kullanılarak yapılmıştır. Bunun için transformasyon sonrası overnight büyüyen LB agar petriden tek bir koloni seçilmiş veya bakteri gliserol stoktan alınmıştır. Plazmid izolasyonu sonrası DNA miktarı Nanodrop kullanılarak ölçülmüştür.

5.2.3. Kontrol Enzim Kesimi

Cas9n plazmidine klonlanan sgRNA oligolarının plazmide girdiğini kontrol etmek amacıyla plazmidin haritasında bulunan BbSI enzimi kullanılmıştır. Oligo girdiği taktirde plazmid üzerinde enzimin bağlanma bölgesi değiştiğinden plazmidi kesemeyecektir. Bu hipotezden yola çıkarak izole edilen plazmid DNA'ları kontrol plazmid DNA'sı ile karşılaştırılarak sekans öncesi kontrol sağlanmıştır.

5.2.4. Hücre Kültürü

5.2.4.1. Hücre Kültürü Ortamı

HEK293T hücreleri %10 (v/v) FBS ve %1 (v/v) penisilin/streptomisin ve yüksek glikoz içeren besiyeri ortamında kültüre edilerek, 37°C'de ve %5 CO₂ içeren koşullarda inkübatörde muhafaza edilmiştir. Hücrelerinin besiyerleri ortalama 2-3 günde bir taze besiyeri ile değiştirilmiş ve hücre yoğunluğu %70-80'e ulaştığında alt kültürlenme yapılmıştır.

5.2.4.2. Alt kültürlenme ve Kültür saklama

Alt kültürlenme için hücrelerin besiyeri uzaklaştırılarak 1X PBS ile yıkama yapılmış ve hücre-hücre/ hücre-yüzey bağlantılarını koparmak için 1ml 1X tripsin-etilendiamin tetraasetik asit eklenerek yaklaşık 2-3 dk 37°C'de, %5 CO₂ inkübatöründe enzimin aktive olması beklenmiştir. Enzimatik aktivitenin durdurulması için ortama tekrar besiyeri eklenmiş ve kalkmış olan hücreler pipet yardımıyla toplanarak oda sıcaklığında 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst sıvı uzaklaştırılarak hücrelerin üzerine taze besiyeri eklenmiş ve pipetaj yapılarak homojenize edilmiştir. Hücre yoğunluğuna bağlı olarak %20-30 oranında hücre her bir besiyerine ekilecek şekilde bölünerek inkübasyona bırakılmıştır.

Hücrelerin sıvı nitrojende dondurularak saklanması santrifüj edilerek çöktürülen hücreler dondurma besiyerinde homojenize edilerek dondurma tüplerine bölünmüş ve sıvı nitrojende (buhar fazı) muhafaza edilmiştir.

5.2.4.3. Geçici Transfeksiyon

HEK 293T hücreleri her kuyucukta 2×10^5 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu kültür kabına ekilerek 24 saat boyunca kültüre edilmiştir. Ekimden 24 saat sonra bir tüpün içine 200 µl miktar serumsuz besiyeri konulmuş ve tüpün duvarlarına gelmeyecek şekilde üzerine transfeksiyon ajanı (PEI) ve tranfekte edilecek plazmid DNA'sı oranı 3 olacak şekilde ortama eklenerek 15 dakika oda sıcaklığında

inkübasyon sağlanmıştır. İnkübasyonun ardından besiyeri içerisindeki hücrelerin üzerine damla damla eklenmiş ve inkübatöre kaldırılmıştır. Cas9n enzimi kullanıldığından sgRNA çiftlerini içeren plazmidler birlikte transfecte edilerek aynı hücre kuyucuğuna eklenmiştir (7 ile 55 aynı hücreye, 23 ile 64 aynı hücreye olacak şekilde). Kontrol olarak transfeksiyon yapılmamış HEK293T ve pcDNA-GFP plazmidi konulmuştur.

5.2.5. FACS Analizi

Transfeksiyondan 24 saat sonra kontrol olarak koyulan pcDNA-GFP plazmidi içeren hücre FACS analizi için kullanılmıştır. BD FACSCanto cihazı kullanılarak GFP floresans proteini ekspres eden hücelere bakılmıştır. Bunun için 10^6 hücre kullanılmış, iki kere FACS solüsyonu ile yıkandıktan sonra 500 µl FACS solüsyonu eklenip analiz edilmiştir. GFP ekspresyon seviyesi FITC kanalı kullanılarak saptanmıştır.

5.2.6. Antibiyotik Seçilimi

Kullanılan PX462 Cas9n plazmidi üzerinde puromycin direnç geni bulunduğundan antibiyotik seçilimi için puromycin kullanılmıştır. Transfeksiyondan 24 saat sonra hücreler üzerindeki besiyeri çekilerek, 1µg/ml olacak şekilde puromycin içeren besiyeri hücrelerin üzerine eklenmiştir.72 saat sonra puromycinli besiyeri çekilerek temiz besiyeri eklenir.

5.2.7. Tek Hücre Düşürme Yöntemi

CRISPR/Cas9n sistemi sonrasında devreye giren NHEJ tamir mekanizması aynı gen dizilimi üzerinde rastgele ve farklı mutasyonlara neden olabilmektedir. Bu nedenle transfecte edilen hücre havuzundan tek tip mutasyon çoğaltabilmek amacıyla tek hücre düşürme deneyleri yapılmıştır. Bunun için 96 kuyucuklu kültür kabı kullanılmıştır. Hücre sayıldıktan sonra seri dilüsyonlarla 96 kuyunun tamamında

50-60 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. 7-10 günden sonra geniş bir kültür kabına alınmış ve takip eden analizler için büyütülmeye devam edilmiştir.

5.2.8. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) Analizi

CRISPR tasarlanan bölgelerde sekans analizi öncesi kontrol amacıyla mutasyonu saptamak için RFLP yöntemi kullanılmıştır. Mutasyon oluşması planlanan bölgede bir kesim enzimi seçilerek, mutasyondan sonra bölgede oluşan değişime bağlı olarak enzimin kesebilirliğine bakılmıştır. QIAGEN Genomic DNA kiti kullanılarak hücrelerden genomik DNA elde edilip PCR yapıldıktan sonra 7-55 sgRNA için SmaI, 23-64 sgRNA için PvuII enzimi kullanılarak enzim kesimi yapılmıştır. Daha sonra %1.5 lik agaroz jelde yürütülerek bantlar analiz edilmiştir.

5.2.9. Liziz ve Protein Miktar Tayini

Protein miktar tayininin yapılması için hücre örneklerinin besiyeri uzaklaştırılarak, 2 ml 37°C'deki PBS kullanılarak iki kere yıkama yapılmış ve hücrelerin üzerine 0°C'de ki 2 ml PBS eklenerek kazıyıcı yardımıyla hücreler kaldırılmıştır. +4°C'de 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilen örneklerin üstündeki supernatant uzaklaştırılarak peletler -80 °C'de saklanmıştır.

Hazırlanan örnekler daha sonra buz kabına alınarak peletlerin yavaşça çözülmesi sağlanmış ve peletin 3 katı kadar taze olarak hazırlanmış olan liziz tamponu eklenmiştir. Liziz tamponunun eklenmesinin ardından vorteks yapılarak, 5-10 dakika buzda bekletilen örneklerin daha sonra tekrar vorteks yapılarak tamamen çözünmesi sağlanmıştır. En son aşamada ise 14000 rpm'de 30 dakika +4 °C'de santrifüj edilen örneklere ait hücre artıkları çöktürülmüş ve süpernatantlar dikkatlice yeni tüplere aktarılarak lizat eldesi sağlanmıştır.

Protein miktar tayininin yapılması için ise öncelikle, albumin (BSA)'nın 1.5 mg/ml, 1.25 mg/ml, 1 mg/ml, 0.75 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml'lik örnekleri

hazırlanarak bir standart grafik oluşturulmuştur. Blank için ise hazırlanan liziz buffer kullanılmıştır.

Standart grafik oluşturmak için kullanılan BSA konsantrasyonları ve bu konsantrasyonları belirlemek amacıyla kullanılan Bradford yöntemine ait sayısal veriler Tablo 5.5'de gösterilmiştir.

Tablo 5.5: Standart grafik oluşturmak için kullanılan BSA konsantrasyonları.

TÜP NUMARASI	1	2	3	4	5	6	7	8 (BLANK)
BSA konsantrasyonu (mg/ml)	0,25	0,5	0,75	1	1,25	1,5	2	-
Yüklenen BSA(μ l)	5	5	5	5	5	5	5	-
Yüklenen Bradford(μ l)	250	250	250	250	250	250	250	250
dH ₂ O(μ l)	-	-	-	-	-	-	-	5
Son Hacim(μ l)	255	255	255	255	255	255	255	255

Daha önceden oda sıcaklığına getirilmiş Bradford'dan 96 kuyucuklu kültür kabına 5'er μ l yüklenen örneklerin, standart grafik verilerinin ve blanklerinin üzerine 250 μ l eklenerek üzeri ışıktan etkilenmesini önlemek amacıyla alüminyum folyoyla kapatılmış ve 20 dakika çalkalayıcıda, 20-25 oda sıcaklığında bekletildikten sonra ölçüm alınmıştır.

5.2.10. İmmünoblot Analizi

Ccdc124 ile çalışılırken %10 ile % 12'lik SDS gel kullanılabilir. Tablo 5.1 ve 5.2'deki oranlar esas alınarak %12'lik yürütme jeli APS ve TEMED donabileceğinden en son eklenerek hazırlanmış ve üzerine izopropanol konularak jelin hava alması önlenmiştir. Yürütme jeli donduktan sonra ise üzerine %4'lük ayırma jeli dökülerek onluk tarak yerleştirilmiş ve jellerin donması beklenmiştir.

Örnekler ve marker kaynayan suda 5 dakika tutularak proteinlerin denatüre olması sağlanmış ve beta-mercaptoethanol eklenerek hazırlanmış olan 4X yükleme boyası, son hacimde 1X olacak şekilde ayarlanarak örneklerin üzerine eklenmiştir. Her kuyuda 40 µg protein olacak şekilde yükleme yapılmış ve jel 70 mA de 30 dakika yürütülmüştür. Jel yürüdükten sonra membran methanol ile bir kez yıkandıktan sonra ddH₂O'dan geçirilmiştir. Önceden 1X'e indirilmiş methanol eklenmiş +4 °C'de bekleyen transfer tamponu eklenerek wattman kağıtları da aynı şekilde ıslatılmıştır. 100 voltta 1 saat transfer yapıldıktan sonra membran 1 saat %5 süt tozu ile bloklanmıştır. Bloklamanın ardından 2 saat birincil antikolarla (C-ter ve Mid Ccdc124ab için 1/1000, N-ter ab için 1/ 5000) muamele edilen membran, 3 kez 10'ar dakika 1X TBS-tween ile yıkanarak 1 saat 1/5000 anti-rabbit antikoru ile tekrar inkübe edilmiştir. İnkübasyon bitiminde yine üçer kez 10 dakika TBS-T ile yıkama yapıldıktan sonra görüntü alınmıştır.

5.2.11. Akım Sitometri Analizi

10'luk kültür kabında kültüre edilmiş olan hücreler PBS ile yıkanarak 1 ml 3X tripsin eklenmiş ve 37 °C'de 2 dakika bekletilerek hücrelerin kalkması sağlanmıştır. Tripsinle kaldırılan hücrelerin üzerine 2 ml complete DMEM eklenerek tripsin inaktive edilmiş ve 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürülmüştür. Elde edilen peletin üstünde kalan sıvı kısım uzaklaştırılarak üzerine -20 °C'de 20 dakika bekletilmiş, 4ml %70' lik ethanol eklenmiş ve örneklerin en az 24 saat +4 °C'de inkübasyonu sağlanmıştır.

24 saat inkübasyonun ardından +4 °C'de saklanan hücreler +4 °C'de 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve peletin üzerindeki sıvı uzaklaştırılmıştır. 500.000 hücre için PBS'in içerisinde son konsantrasyon 1/1000 Triton X, 10 µl 7AAD ve 1ml'de 10 µg RNAaz olacak şekilde bir çözelti hazırlanarak peletlerin üzerine eklenmiş ve örnekler içinde homojenize edilmiştir.

Elde edilen çözeltiler ve hücre süspansiyonu polipropilen tüplerin içine alınarak etrafı folyoyla sarılmış ve 37 °C'de 1.5 saat inkübe edildikten sonra gerekli analizler yapılmıştır.

6. SONUÇLAR

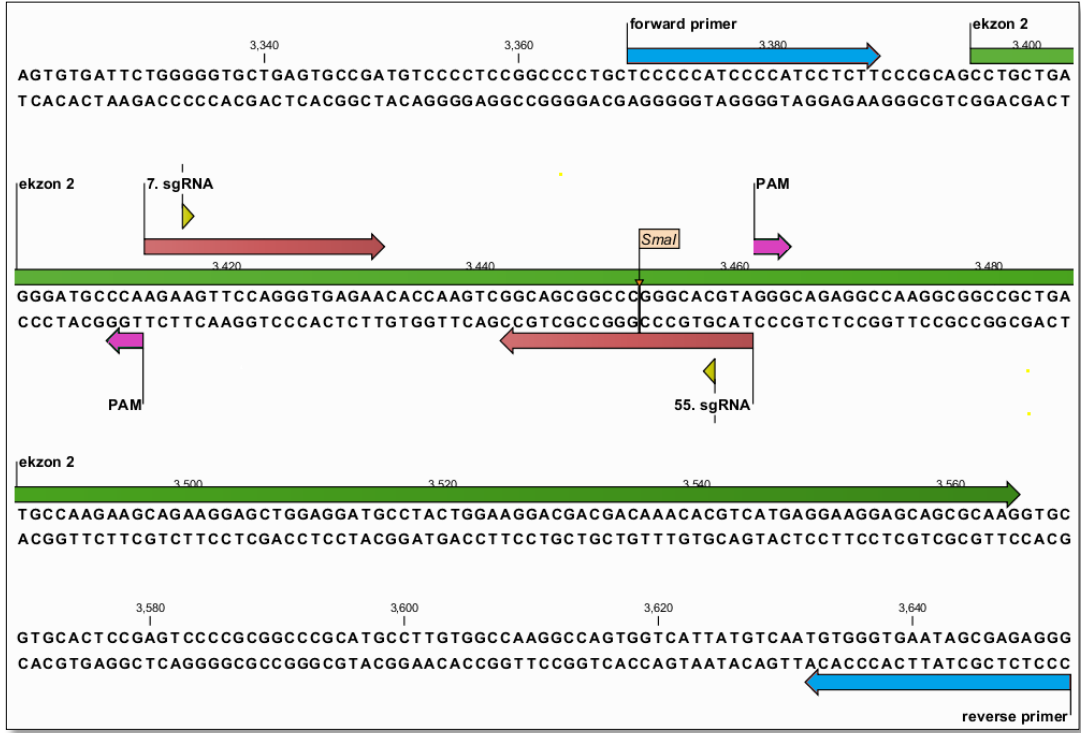
6.1. *CCDC124* Geninin 2. ve 3. Ekzonlarını Hedefleyecek sgRNA'lar Tasarlanması

Daha önce de bahsedildiği gibi *CCDC124* geni, biri kodlanmayan 5 ekzona sahiptir ve boyları 32 kDA ve 26 kDA olan iki farklı protein kodlayabilmektedir. Yapılan bu çalışma ile bu iki farklı transkripsiyon ürününün görevleri, kodlayan genlerin delesyonlarında veya mutasyonlarında oluşacak genotipik ve fenotipik anomaliler araştırılarak aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bu amaçla farklı ekzonları hedefleyen, 20 baz çifti uzunlukta sgRNA oligoları tasarlanmıştır. Genom içindeki off-target aktivitesini en aza indirmek amacıyla “double nickase” tekniği başka bir deyişle çift Cas9n enzimi kullanılmıştır.

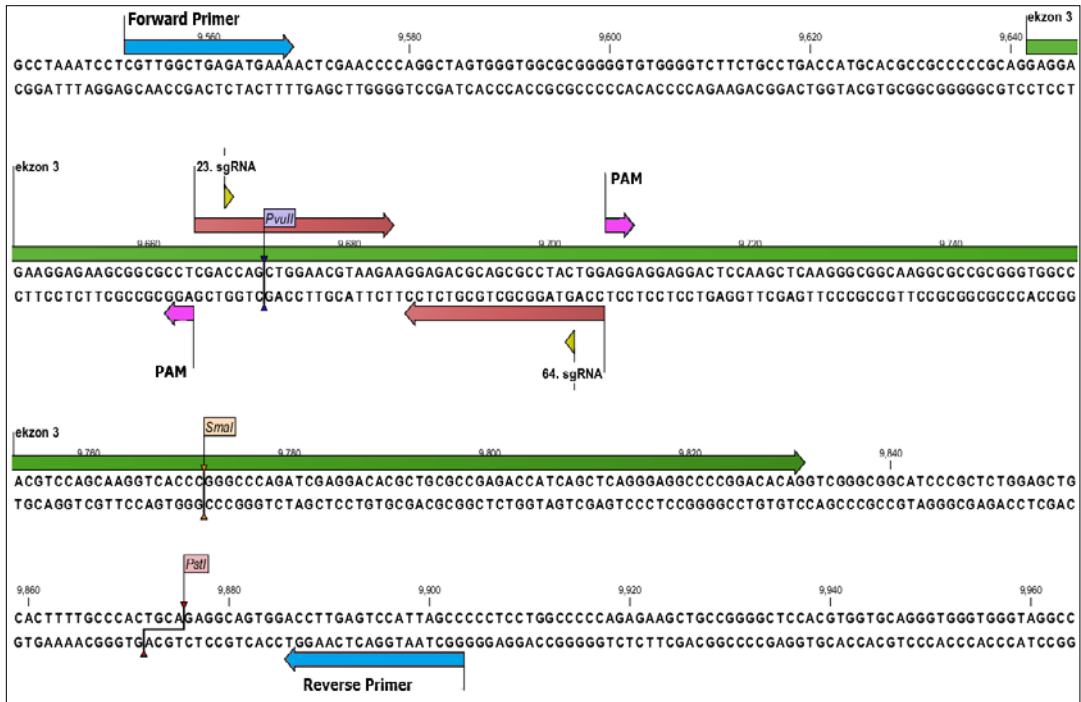
İkinci ekzonu hedeflemek için tasarlanan CRISPR/Cas9 sisteminde, başlangıç metiyonininden 7 nükleotit uzakta bir kırık ve karşı iplikte 55 nükleotit uzakta başka bir kırık oluşmasına rehberlik eden iki sgRNA oligosu dizayn edilmiştir (şekil 6.1). Dizayn edilen bu sgRNA çifti ile 32 kDA'luk ürünün N terminal kısmının zarar görmesi ve NHEJ tamir mekanizması ile erken sonlanma kodonu oluşturularak yalnızca 26kDA boyundaki ürünün oluşması amaçlanmıştır. Bu sebeple sgRNA'lar, ikinci başlangıç kodonuna ve RNA Polimerazın bağlanma bölgesine zarar vermeyecek şekilde tasarlanmıştır.

Üçüncü ekzonu hedeflemek için tasarlanan CRISPR/Cas9 sisteminde ise, ekzonun başından 23 nükleotit uzakta bir kırık ve karşı iplikte 64 nükleotit uzakta başka bir kırık oluşmasına rehberlik eden iki farklı sgRNA oligosu dizayn edilmiştir (şekil 6.2). Böylece her iki *CCDC124* gen bölgesi de zarar görecektir ve devreye NHEJ tamir mekanizması girecektir. Zarar gören bölgenin baz ekleme-çıkarma yöntemiyle tamir edilmesiyle rastlantısal olarak çerçeve kayması ve bunun sonucu erken sonlanma kodonu oluşabilecektir.

Şekil 6.1 ve 6.2'de her iki ekzon için tasarlanan CRISPR sistemleri şematize edilmiştir. Kırmızı ok ile gösterilen sgRNA'lar tasarlandıklarının aksi ipliğe homoloji gösterdikleri için bağlanırlar ve Cas9n enzimini bölgeye çekerek kırık oluşmasına öncülük ederler.



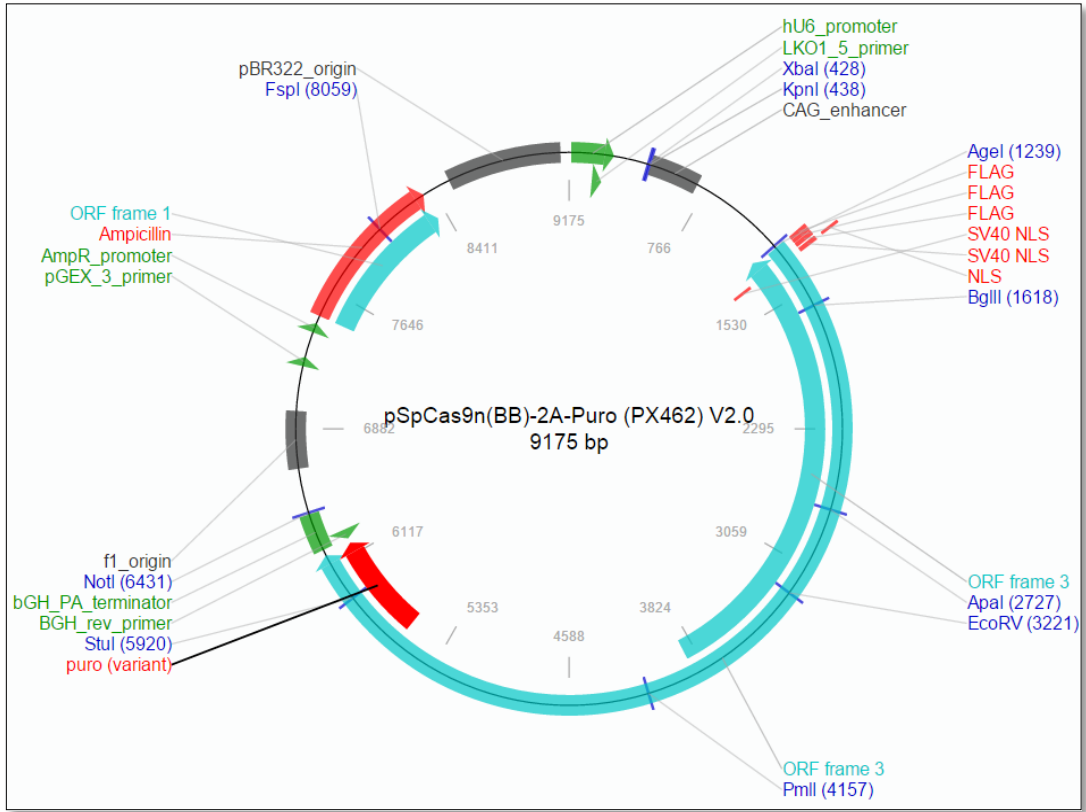
Şekil 6.1: 2.ekzon için tasarlanan CRISPR/Cas9n modeli. Sarı ok:kırıkların meydana geldiği noktalar, mavi ok:PCR primeri, pembe ok:PAM sekansı, kırmızı ok:sgRNA.



Şekil 6.2: 3.ekzon için tasarlanan CRISPR/Cas9n modeli. Sarı ok:kırıkların meydana geldiği noktalar, mavi ok:PCR primeri, pembe ok:PAM sekansı, kırmızı ok:sgRNA.

S. pyogenes kökenli CRISPR/Cas9 sistemi kullanıldığından hedef DNA seçilirken, ilgilenilen bölgeye komşu PAM sekansının (NGG) bulunmasına dikkat edilmiştir. Hedef DNA 5'-N...NGG-3' sekansına sahip bir bölgeden seçilmiş PAM sekansı tasarlanan sgRNA oligo sekansına dahil edilmemiştir.

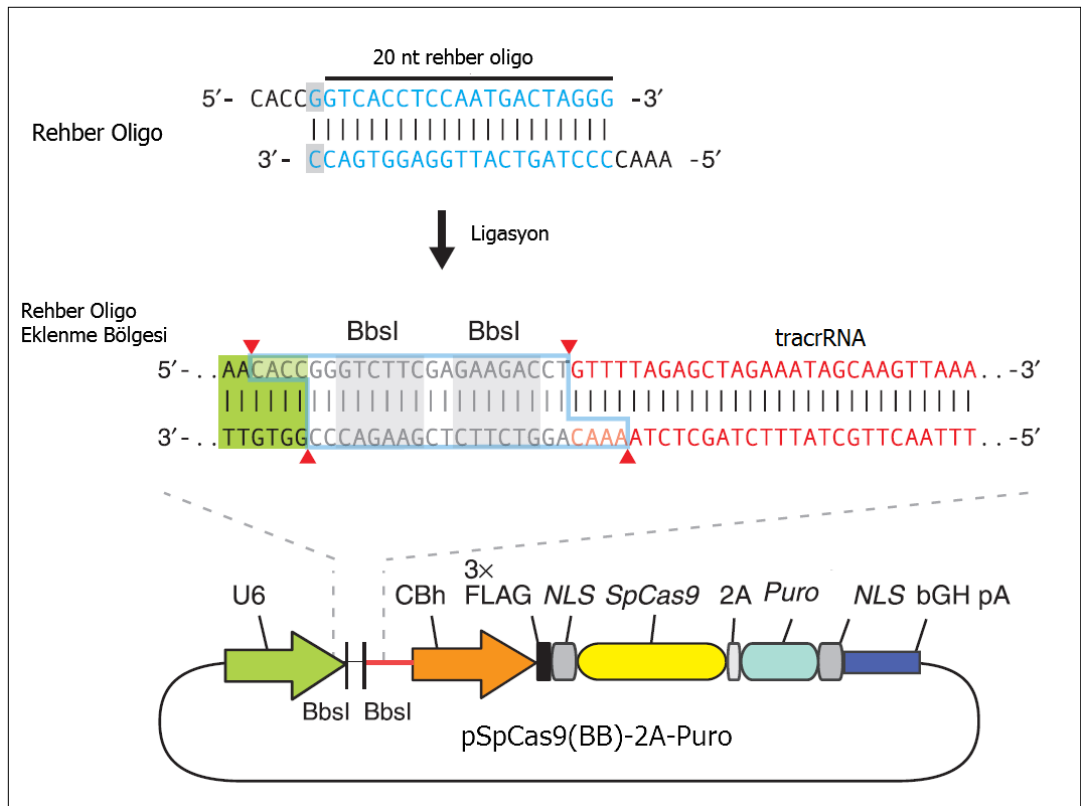
Yapılan çalışmamızda kullanılan pSpCas9n(BB)-2A-Puro (PX462) plazmid Addgene'den (Feng Zhang Lab.) ticari olarak satın alınmıştır. Şekil 6.3'te plazmidin gen haritası gösterilmektedir.



Şekil 6.3: PX462 plazmid gen haritası.

U6 RNA Polimeraz III promotörünün hemen arkasına eklenen tasarlanan oligo sgRNA'nın 5' ucundaki hedef belirleyici sekanstır. Bunu sgRNA'nın diğer bir bileşeni olan tracrRNA sekansı, Cas9n enzimi geni ve puromycin direnç geni takip etmektedir (şekil 6.4). Böylece aynı plazmid üzerinde hem hedef bölge için rehberlik yapan sgRNA, hemde ilgilenilen bölgede DSB yaratacak olan Cas9n enzimi hücreye verilmiştir.

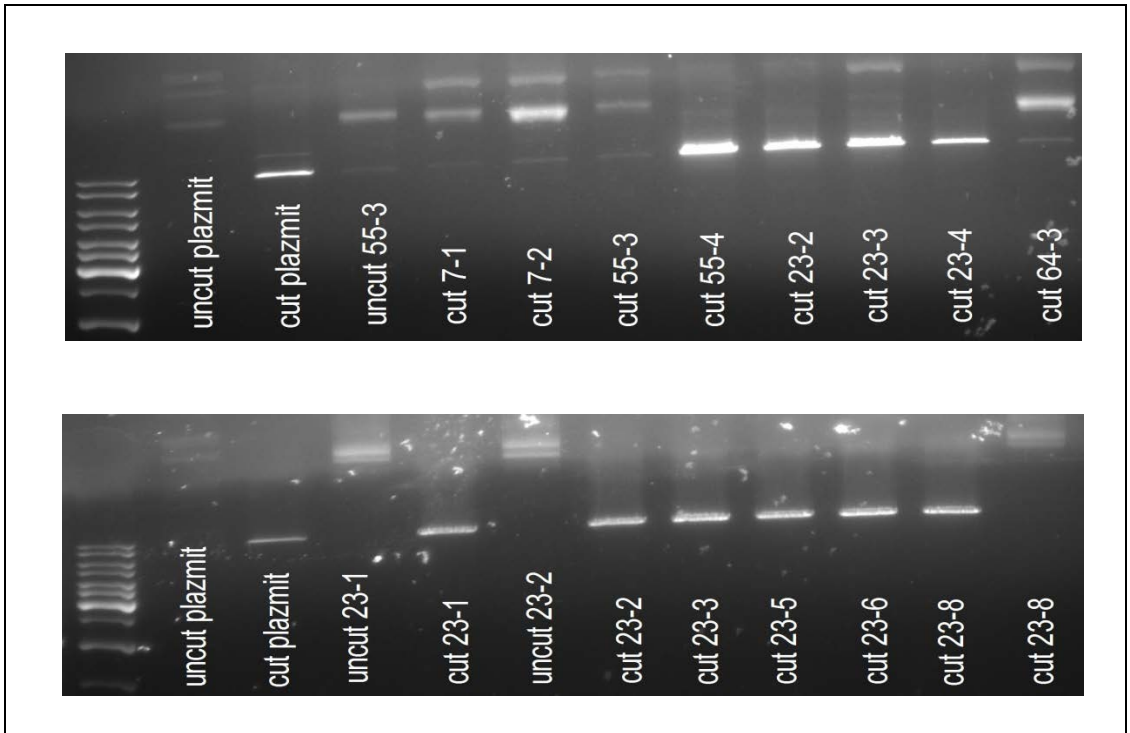
Tasarlanan rehber oligonun plazmide girmesinin planlandığı bölümde iki adet BbSI restriksiyon enzimi kesim bölgesi bulunmaktadır. Bu enzim 5'-3' yönünde "GAAGAC" sekansını tanıyarak 2 nükleotit sonra, 3'-5' yönünde "CTTCTG" sekansını tanıyarak 6 nükleotit sonra kesmektedir. Rehber oligolara, paralel BbSI enzimleri bölgeyi kestikten sonra açıkta kalan uçlardaki sekans ile homoloji göstermesi için, anlamlı ve anlamlı olmayan ipiklerin 5' uçlarına sırasıyla "CACCC" ve "CAAAA" sekansları eklenmiştir (şekil 6.4). Buna ek olarak insan U6 promotörü transkripsiyona başlangıç için Guanin nükleotidine ihtiyaç duyduğundan Guanin ile başlamayan sgRNA oligolarına "G" bazı eklenmiştir.



Şekil 6.4: PX462 Plazmidi Gen Dizilimi ve Rehber Oligo Ligasyonu. Kırmızı ok uçları BbSI enzimi kesim bölgelerini simgelemektedir.

6.2. Tasarlanan sgRNA Oligolarının pSpCas9n(BB)-2A-Puro (PX462) Plazmidine Klonlanması

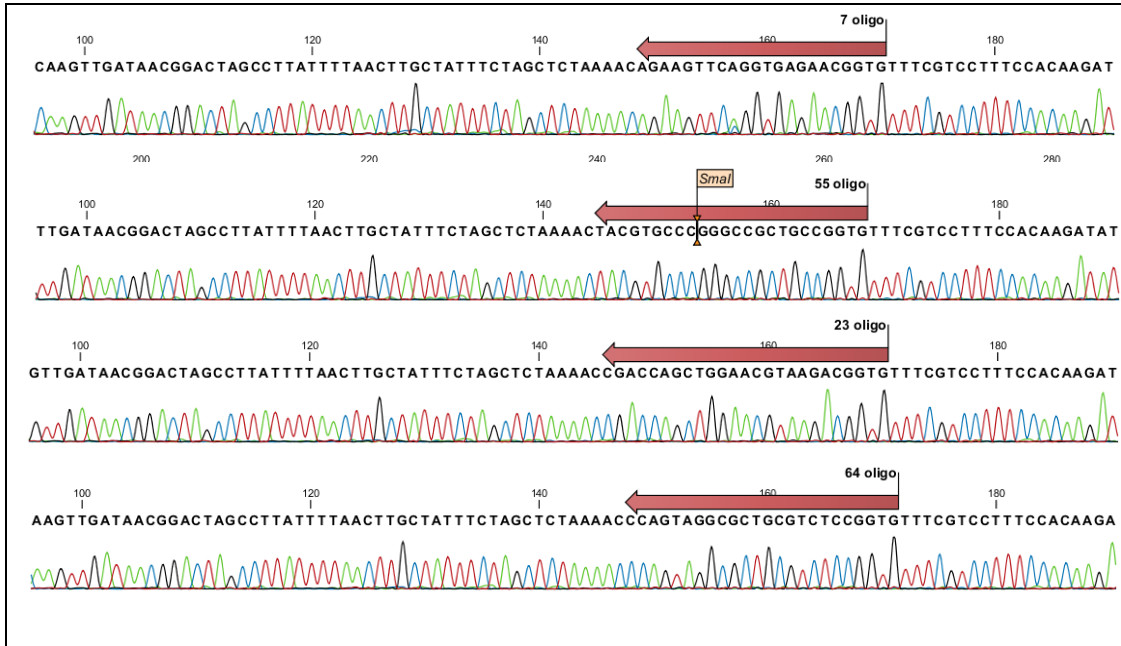
CRISPR\Cas9 sistemi uygulamaları için Feng Zhang ve ekibinin oluşturdukları protokol takip edilmiştir [Ran et al., 2013]. Tasarlanan rehber oligo, bahsedilen protokolda belirtilen ligasyon şartlarında BbSI enzimi kullanılarak PX462 plazmidine klonlanmıştır. Sonrasında plazmidler *E.coli* DH5 α suşuna transforme edilmiş, seçilen bakteri kolonilerine mini-prep DNA izolasyonu uygulanarak BbSI enzim kesimiyle kontrol edilmiştir.



Şekil 6.5: BbSI ile kontrol enzim kesimi. Uncut: enzim kesimi yapılmamış örnek, cut: enzim kesimi yapılmış örnek.

Rehber oligo plazmide girdikten sonra BbSI enziminin tanıma bölgesi kaybolduğundan dolayı enzim kesimi gerçekleşmeyecektir. Bu teoriden yola çıkarak oligo klonlamanın başarılı olduğu koloniler; 7. oligonun 1. kolonisi, 55. oligonun 3. kolonisi, 64. oligonun 3. kolonisi ve 23. oligonun 8. kolonisi devam eden deneyler için seçilmiştir.

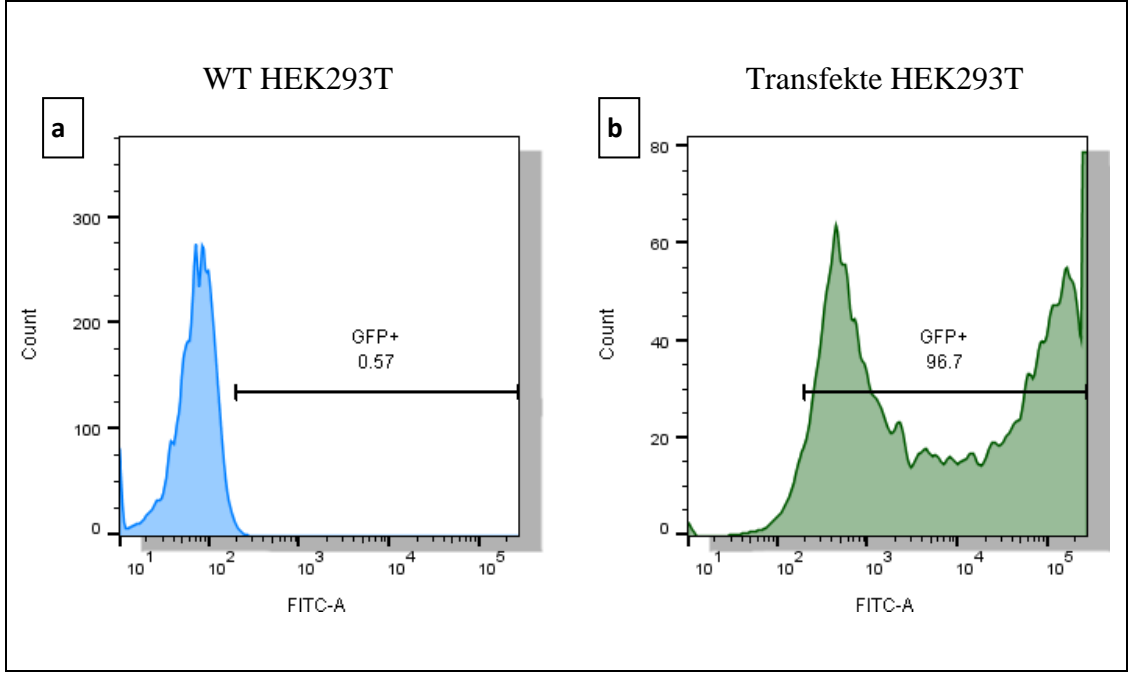
Kontrol enzim kesimiyle elde edilen sonuçlar sekans analizleriyle de doğrulanmıştır (şekil 6.6).



Şekil 6.6: Sırasıyla 7, 55, 23 ve 64 rehber oligoları klonlanmış PX462 plazmidleri sekans analizi sonuçları. Kırmızı ile işaretlenmiş kısımlar rehber oligoları simgelemektedir. Reverse primer ile sekanslatılmışlardır.

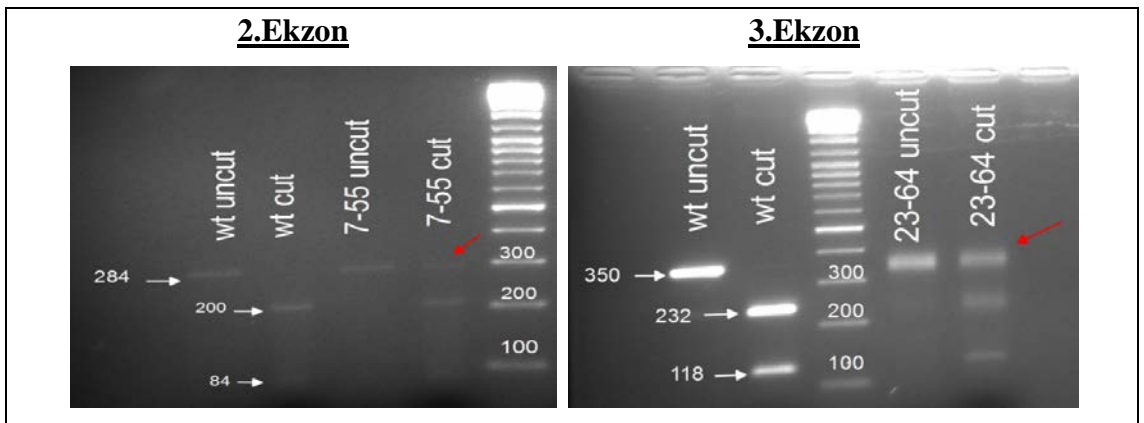
6.3. Rehber Oligo Klonlanmış Plazmidlerin HEK293T Hücrelerine Transfekte Edilmesi

Kullanılan HEK293T hücrelerinin PEI transfeksiyon için uygun olması ve verimliliğinin yüksek olması sebebiyle bu yöntem kullanılmıştır. Transformasyondan sonra seçilen plazmidlere Midi-Prep DNA izolasyonu yapılarak PEI transfeksiyon için kullanılmıştır. "Double nickase" sistemi kullanıldığından dolayı karşılıklı kırık oluşturacak sgRNA plazmidleri (7-55, 23-64) aynı hücreye birlikte transfekte edilmişlerdir. Transfeksiyondan 24 saat sonra puromycin eklenerek antibiyotik seçilimi başlatılmıştır. Aynı gün kontrol amacıyla ekilen transfekte edilmeyen HEK293T ve pcDNA-GFP plazmidini transfekte edilen HEK293T kullanılarak FACSCanto cihazıyla floresan proteini ışımaya oranına göre transfeksiyon verimliliği %96.7 olarak tayin edilmiştir. GFP miktarını belirlemek amacıyla FITC-A kanalı kullanılmıştır.



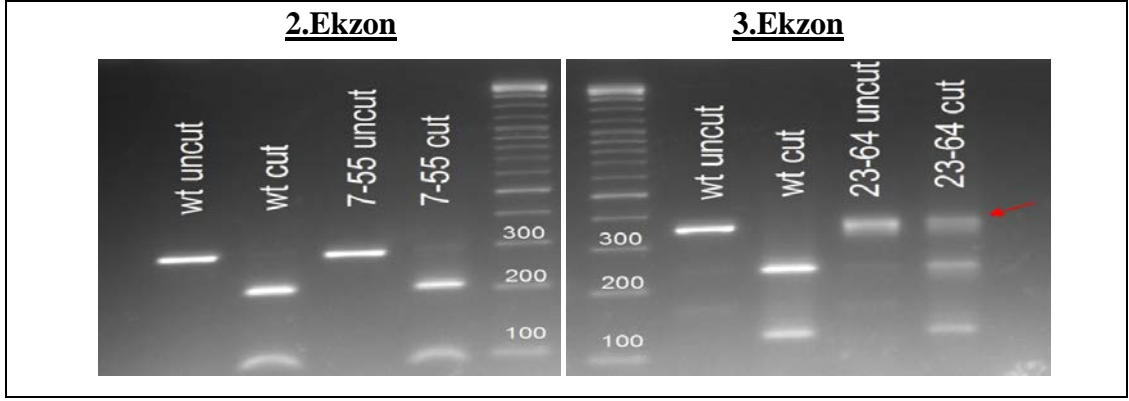
Şekil 6.7: Akım Sitometri analizi ile transfeksiyon verimliliği tayini. a) Mavi grafik GFP negatif hücreleri, b) yeşil grafik GFP pozitif hücreleri göstermektedir.

Puromycin eklenmesinden 72 saat sonra besi ortamı değiştirilmiş ve ardından 24 saat sonra genomik DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. İzole edilen DNA'ların CRISPR tasarlanan bölgeleri PCR yöntemiyle çoğaltılarak RFLP yapılmıştır. RFLP sırasında 2.ekzonu hedefleyen 7-55 CRISPR için SmaI, 3. ekzonu hedefleyen 23-64 CRISPR için PvuII enzimi kullanılmıştır. Sonrasında %1.5 lik agaroz jelde yürütülerek DNA bantları analiz edilmiştir.



Şekil 6.8: 1.transfeksiyon sonrası RFLP sonuçları. Kırmızı oklar kesilmemiş bandı göstermektedir. 2.ekzon için SmaI, 3.ekzon için PvuII enzimi kullanılmıştır. wt: transfekte edilmemiş HEK293T, uncut: enzim ile kesilmemiş, cut: enzim ile kesilmiş.

İlk transfeksiyondan sonra PCR optimizasyonu için belirli bir süre geçmiş, bu süreçte hücreler pasajlanmaya devam edilmiştir. Mutasyon olduğunu düşündüğümüz hücrelerde meydana gelen ve pasaj sayısı ile değişebilen fenotipik değişimleri sağlıklı bir şekilde takip edebilmek için transfeksiyon tekrar edilmiştir.



Şekil 6.9: 2.transfeksiyon sonrası RFLP sonuçları. Kırmızı ok kesilmemiş bandı göstermektedir. 2. ekzon için SmaI, 3. ekzon için PvuII enzimi kullanılmıştır. wt: transfekte edilmemiş HEK293T, uncut: enzim ile kesilmemiş, cut: enzim ile kesilmiş.

2. transfeksiyonda 23-64 CRISPR modelinde mutasyonun olduğu, bu sebeple enzimin kesemediği bir populasyon saptanmışken, 7-55 CRISPR modelinde anlamlı bir kesilmemiş bant görülemedi. Daha sonra yapılan 3. ve 4. transfeksiyon tekrarlarında da saptanamadığından tek hücre düşürme deneylerine 7-55 hattı için 1.transfeksiyondan elde edilen hücre havuzu ile, 23-64 hattı için 2. transfeksiyondan elde edilen hücre havuzu ile devam edilmiştir.

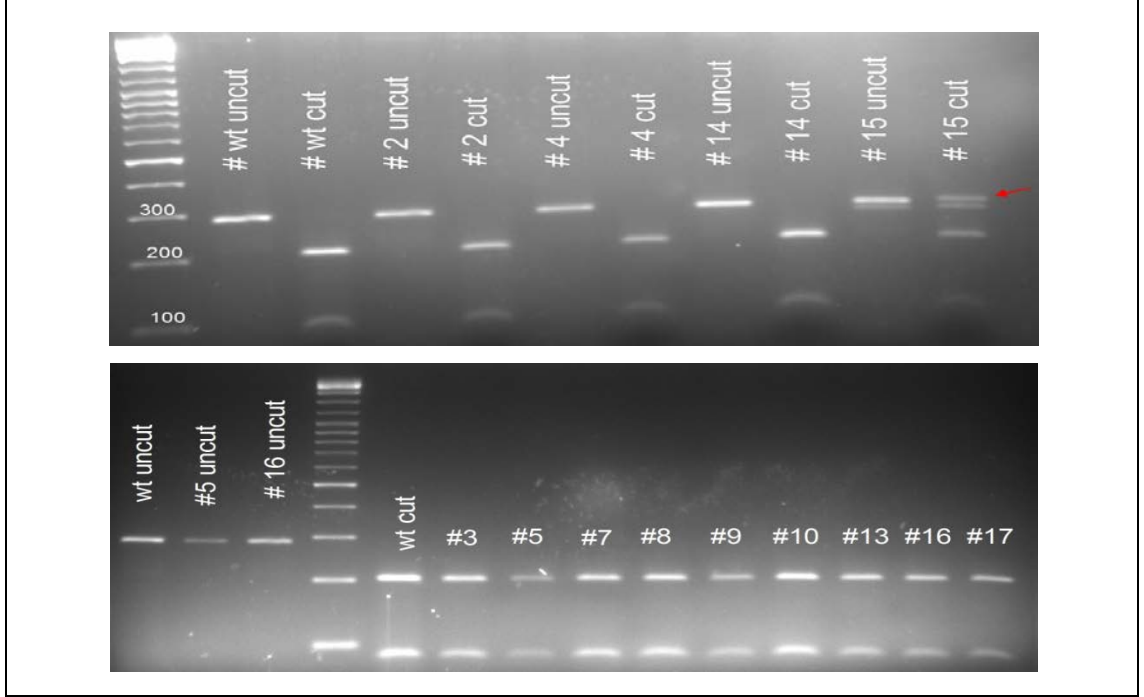
6.4. Tek Hücre Düşürme Deneyleri

Transfeksiyondan sonra, farklı mutasyonlara sahip hücrelerin bulunduğu bir havuz elde edilmiştir. Bu havuzun içerisindeki tek bir mutasyonu saptamak ve onun fenotipik ve genotipik etkilerini anlamak amacıyla tek hücre düşürme deneyleri yapılmıştır.

Hücreler bölüm 5.2.7'de anlatıldığı gibi 96 kuyucuklu kültür kabına ekildikten 7-10 gün sonra kuyulara tek düşen koloniler seçilerek 24 kuyucuklu kültür kabına, oradanda 6 kuyucuklu kültür kabına alınmıştır. Yeteri miktarda hücre elde edildikten sonra genomik DNA izole edilerek bir önceki bölümde belirtilen enzimlerle ve aynı şartlarda RFLP yapılmıştır.

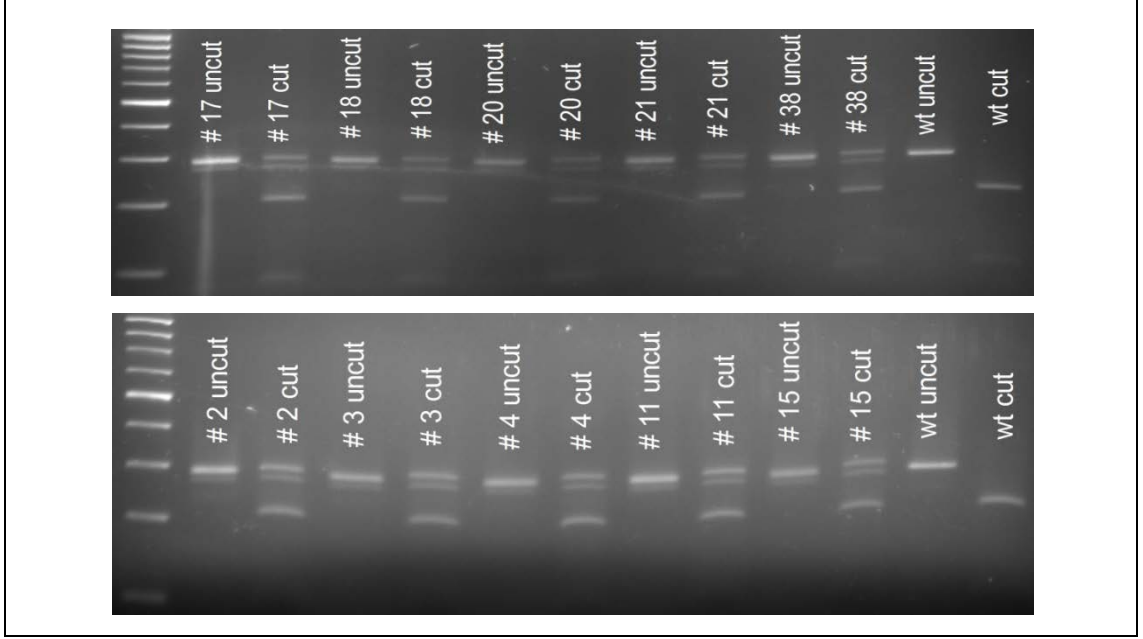
6.5. RFLP Analizi Sonuçları

7-55 hücre havuzundan elde edilen kolonilere ait RFLP sonuçları şekil 6.10'da gösterilmektedir.



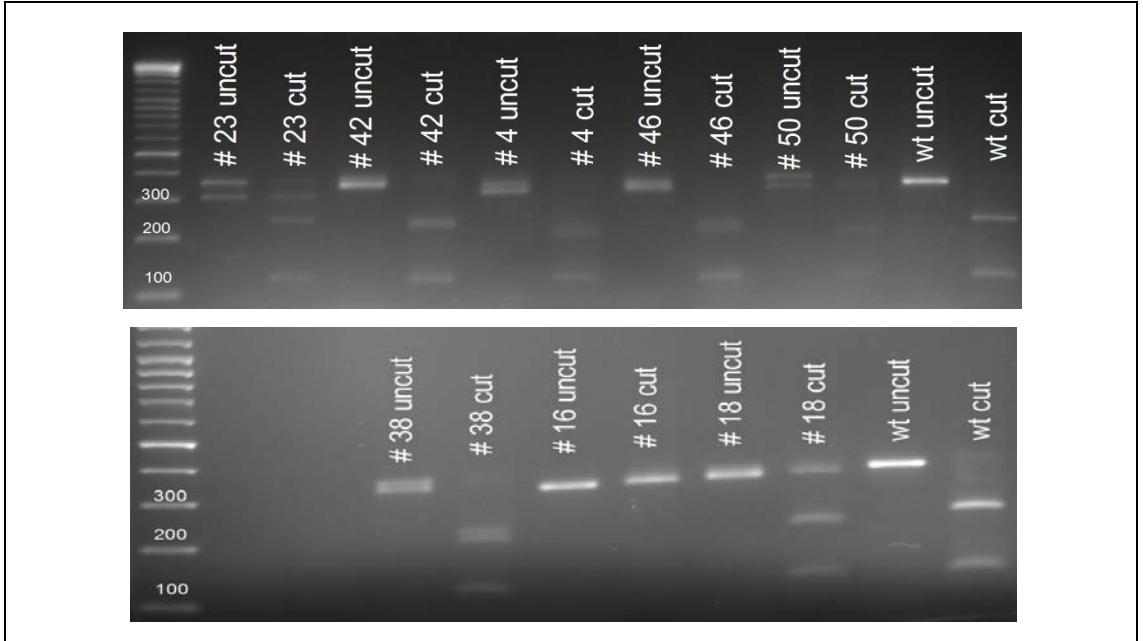
Şekil 6.10: 7-55 hücre havuzundan elde edilen kolonilere ait RFLP analizi sonuçları. wt: transfekte edilmemiş HEK293T, uncut: enzim ile kesilmemiş, cut: enzim ile kesilmiş.

Elde edilen kolonilerden yalnızca #15 mutasyona uğratılmıştır. Enzim kesimi yapılan örnekte biri kesilmiş ikisi kesilmemiş üç farklı boyda bant bulunduğundan dolayı karışım koloni olup olmadığını aydınlatmak amacıyla #15'e tekrar tek hücre düşürme deneyi uygulanmıştır. Elde edilen #15 kolonilerinin de kendisi ile aynı bantlaşma hikayesi vermesi sebebiyle #15'in karışım koloni olmadığı anlaşılmıştır (şekil 6.11).

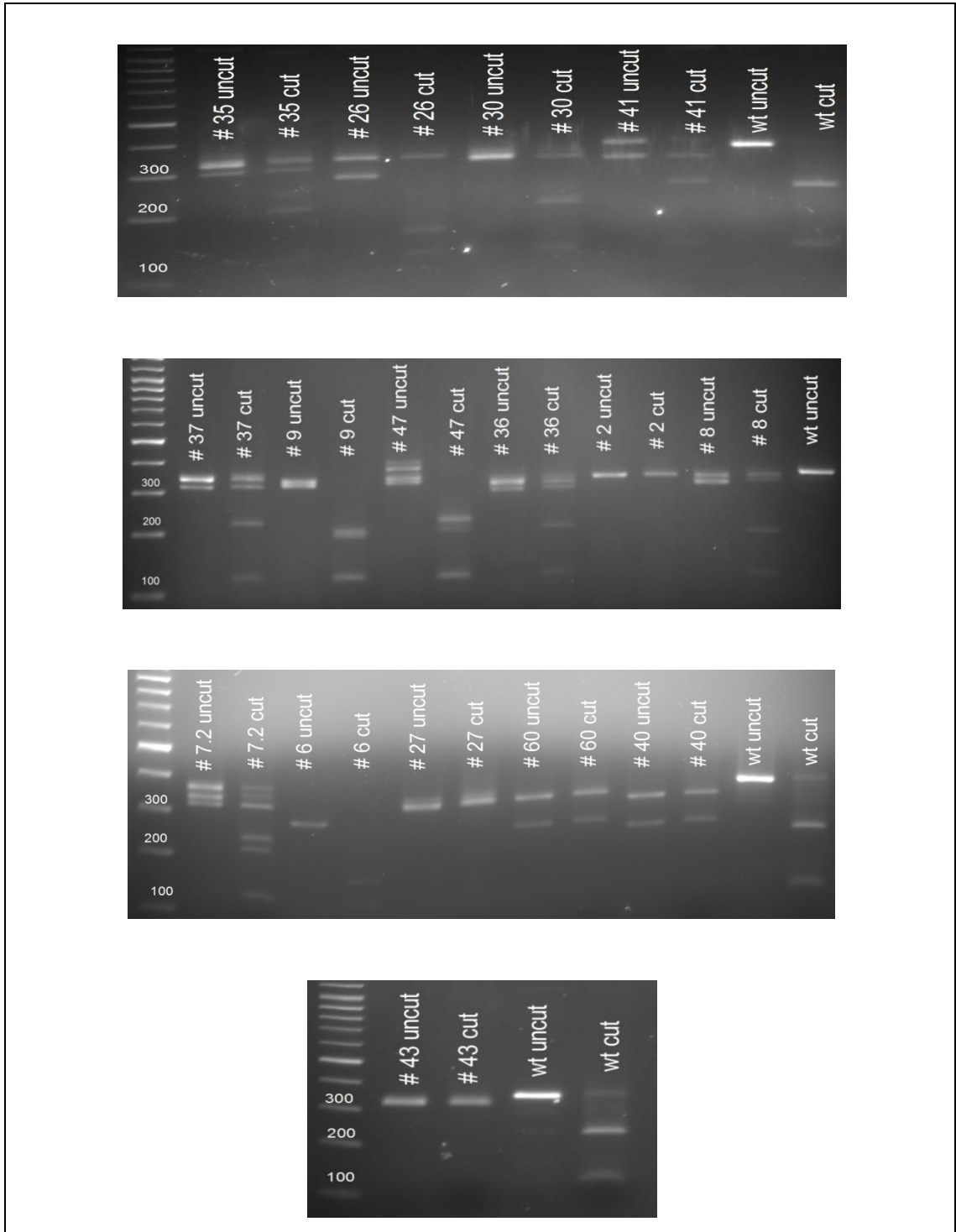


Şekil 6.11: #15'den elde edilen tek hücre kolonilerine ait RFLP sonuçları. wt: transfekte edilmemiş HEK293T, uncut: enzim ile kesilmemiş, cut: enzim ile kesilmiş.

23-64 hücre havuzundan elde edilen kolonilere ait RFLP sonuçları şekil 6.12'de gösterilmektedir.



Şekil 6.12: 23-64 hücre havuzundan elde edilen kolonilere ait RFLP sonuçları. wt: transfekte edilmemiş HEK293T, uncut: enzim ile kesilmemiş, cut: enzim ile kesilmiş.



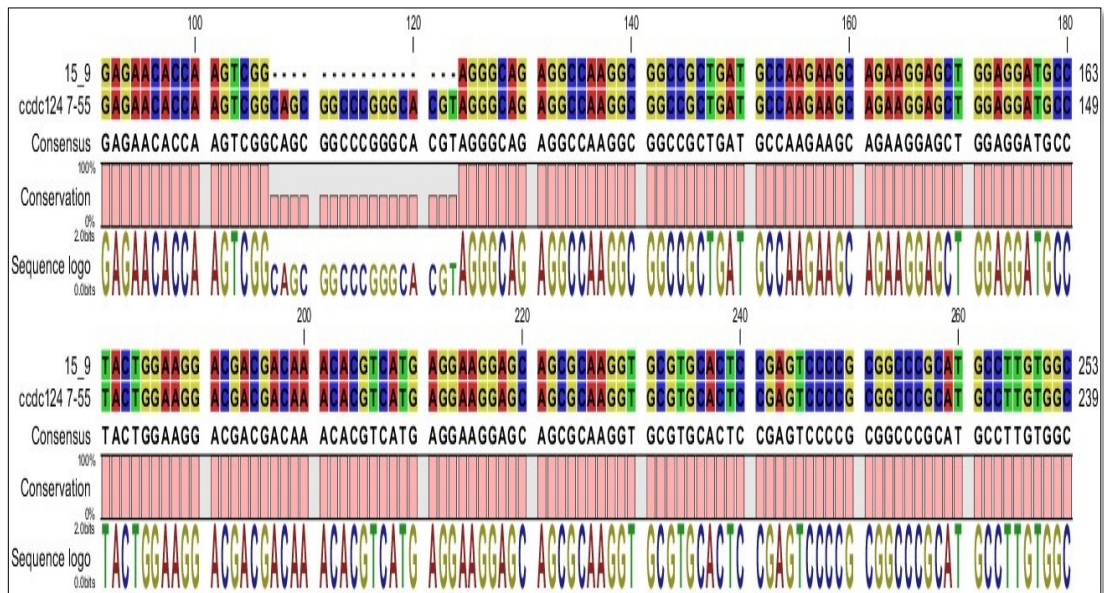
Şekil 6.12: Devam.

6.6. Mutant Hücre Hatları Dizi Analizi Sonuçları

RFLP analizleriyle tespit edilmiş *CCDC124* geni modifikasyonlarını doğrulamak amacıyla mutant hücre hatlarına DNA dizi analizi yaptırılmıştır. Sekans analizleri Molecular Cloning Laboratories (MCLAB) tarafından yapılmıştır.

Her iki model CRISPR sisteminden çeşitli hücre hatları seçilmiş ve bu hücre hatlarında NHEJ tamir mekanizmasının yaratmış olduğu indel (ekleme-çıkarma) mutasyonlar ve bunların sebep olabileceği erken sonlanma kodonları tespit edilmiştir.

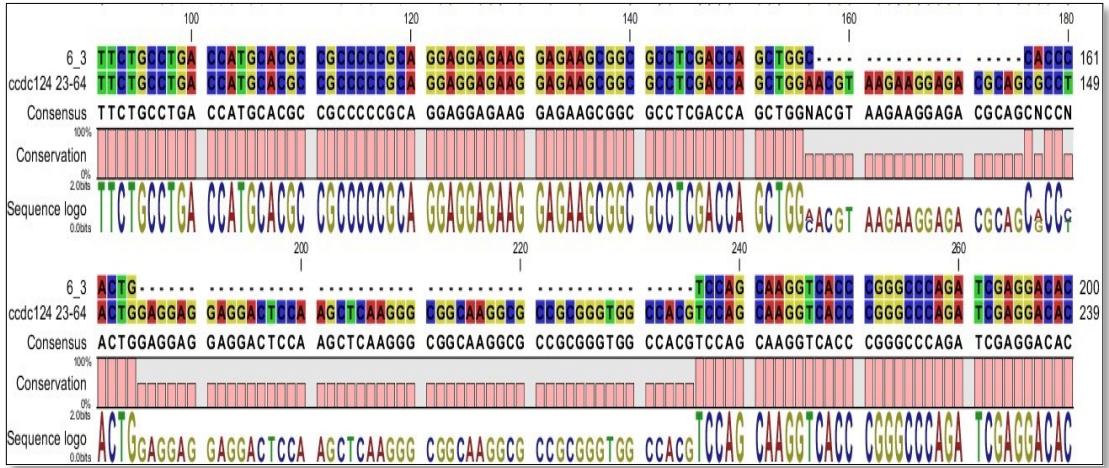
7-55 CRISPR sisteminden yalnızca #15 mutant hücre hattı için sekans analizi yapılmıştır. Sekans plazmidine klonlama sırasında, hücrenin sahip olduğu her alel farklı bir plazmide girdiğinden birbirlerinden ayrı sekanslanmaktadır. #15'te bir alel wt iken diğer alel 17 nükleotit delesyona uğratılmıştır (şekil 6.13).



Şekil 6.13: #15 sekans analizi ve 7-55 PCR bölgesi ile karşılaştırması.

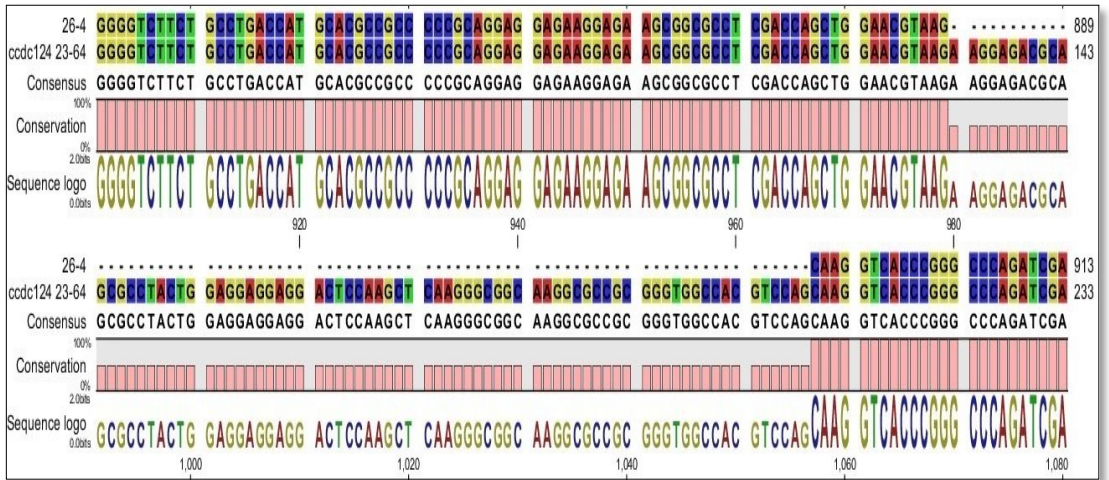
23-64 CRISPR sisteminden ise #6, #26, #27, #50 ve #60 mutant hücre hatları için sekans analizi yaptırılmıştır.

#6 için yapılan RFLP sonrası agaroz jel görüntüsü enzim ile kesilebilen tek bir bant vermiş bunu doğrular nitelikte sekans analizi sonucunda ise 70 nükleotit delesyona uğratılmış tek tip alel görülmüştür.



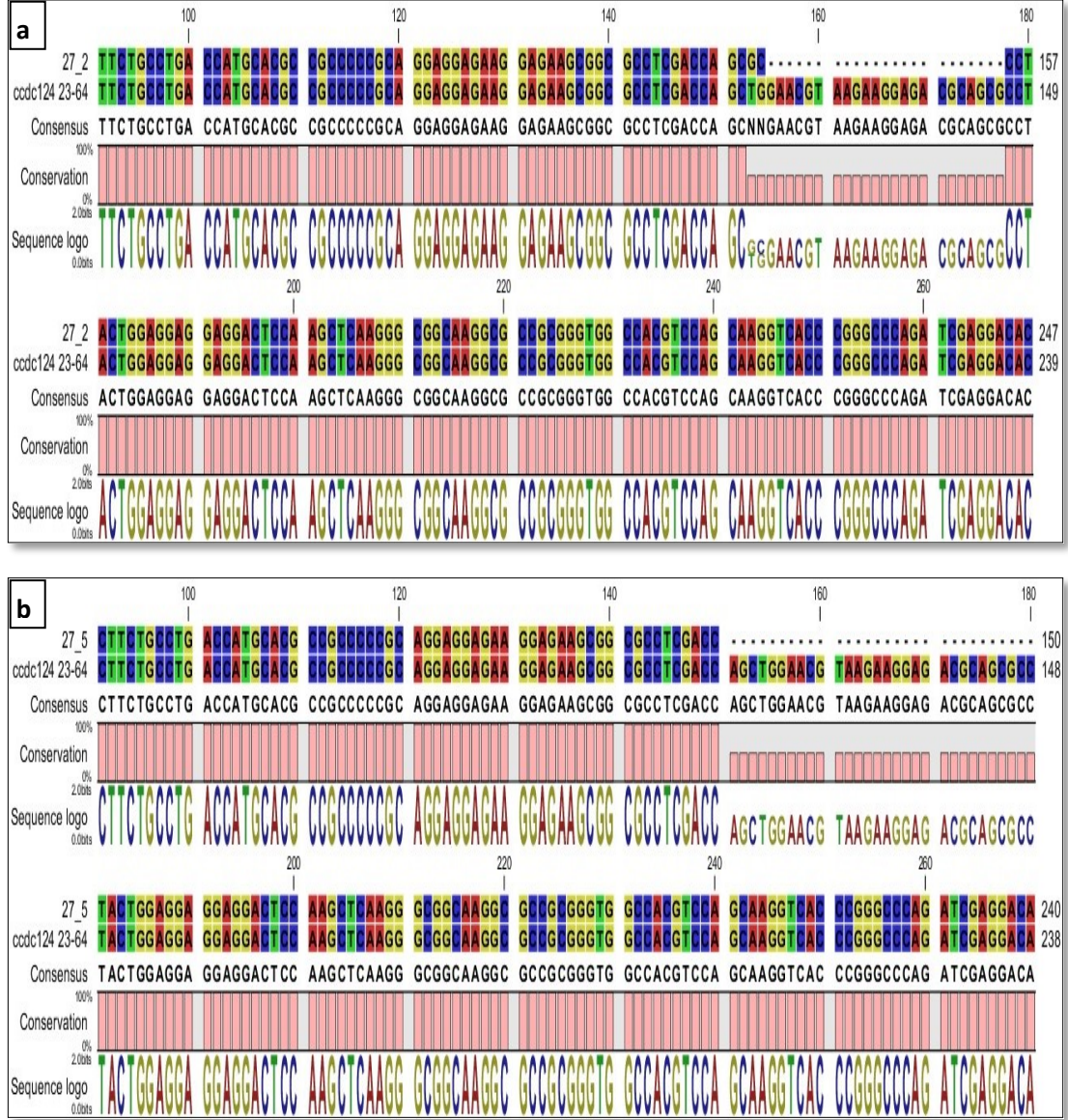
Şekil 6.14: #6 sekans analizi ve 23-64 PCR bölgesi ile karşılaştırması.

#26 için iki tip alel olması gerekirken yapılan sekans analizinde 77 nükleotit delesyona uğratılmış tek bir alel tespit edilmiştir.



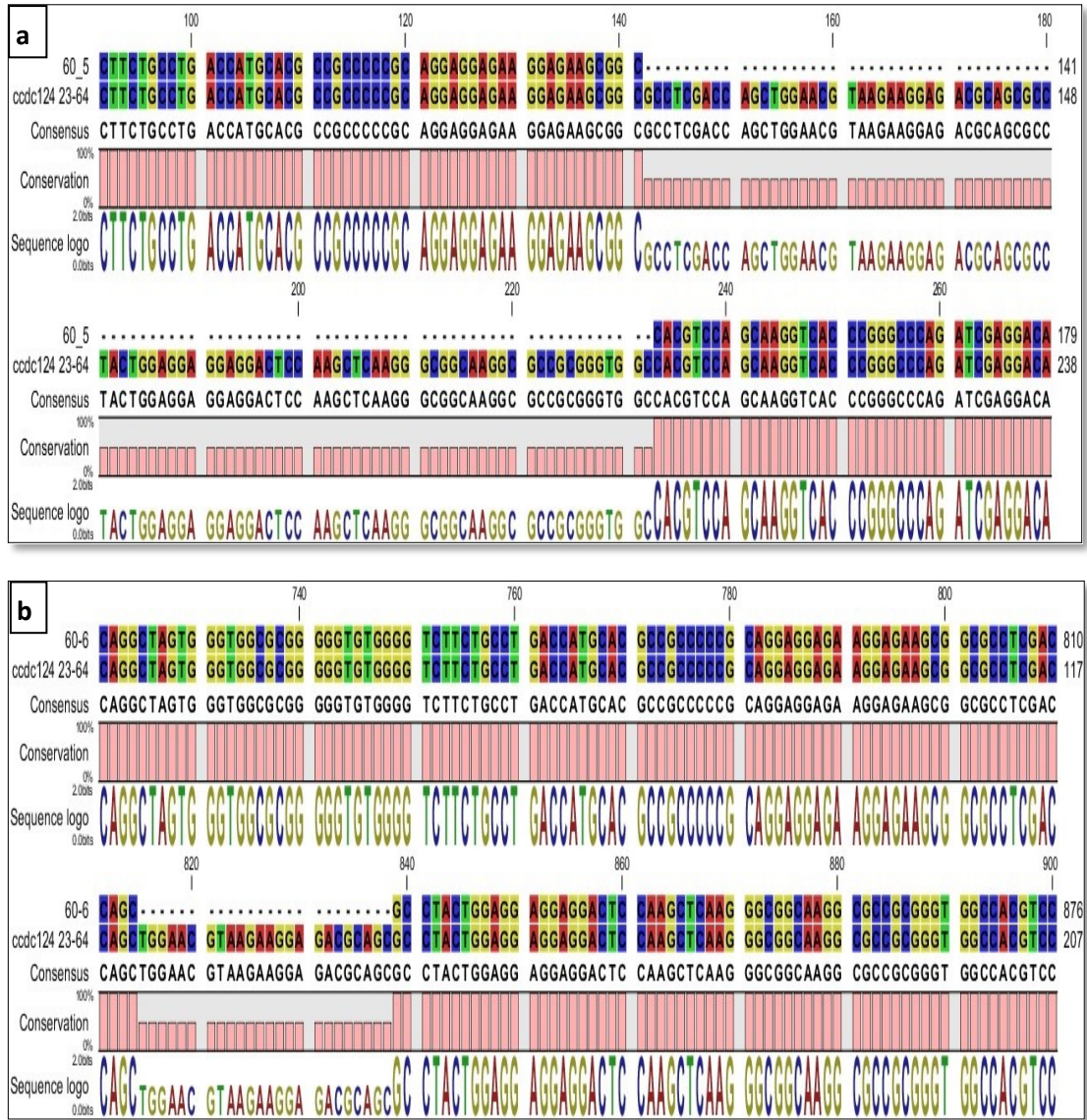
Şekil 6.15: #26 sekans analizi ve 23-64 PCR bölgesi ile karşılaştırması.

#27 için yapılan sekans analizinde RFLP sonuçlarıyla paralel 30 nükleotit delesyon bulunduğu ve 25 nükleotitlik delesyona ek 2 nükleotit insersiyonun bulunduğu iki tip alel tespit edilmiştir.



Şekil 6.16: #27 sekans analizi ve 23-64 PCR bölgesi ile karşılaştırması.
a) 1. allel b) 2. allel.

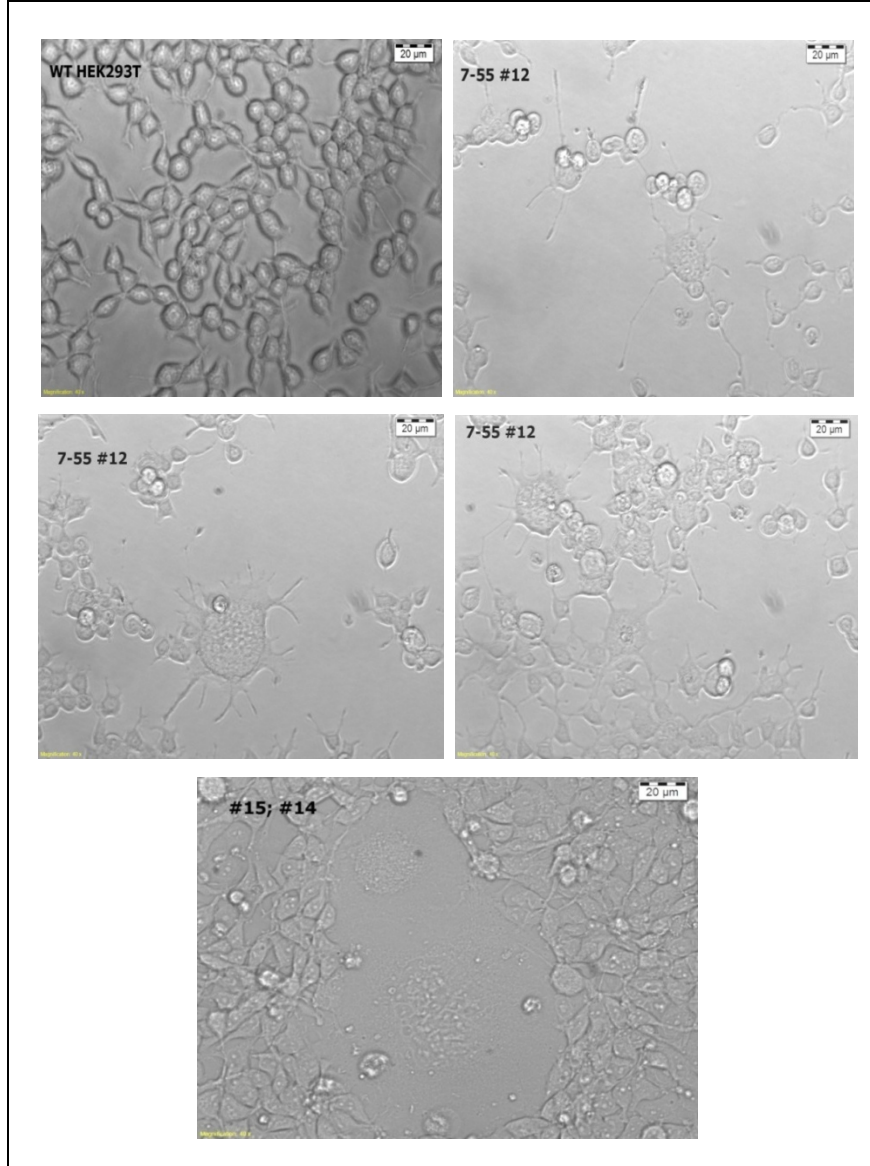
#60 için yapılan sekans analizi sonucunda RFLP analizi ile paralel, 91 ve 24 nükleotit delesyonların bulunduğu iki farklı alel tespit edilmiştir.



Şekil 6.18: #60 sekans analizi ve 23-64 PCR bölgesi ile karşılaştırması.
a) 1. alel b) 2. alel.

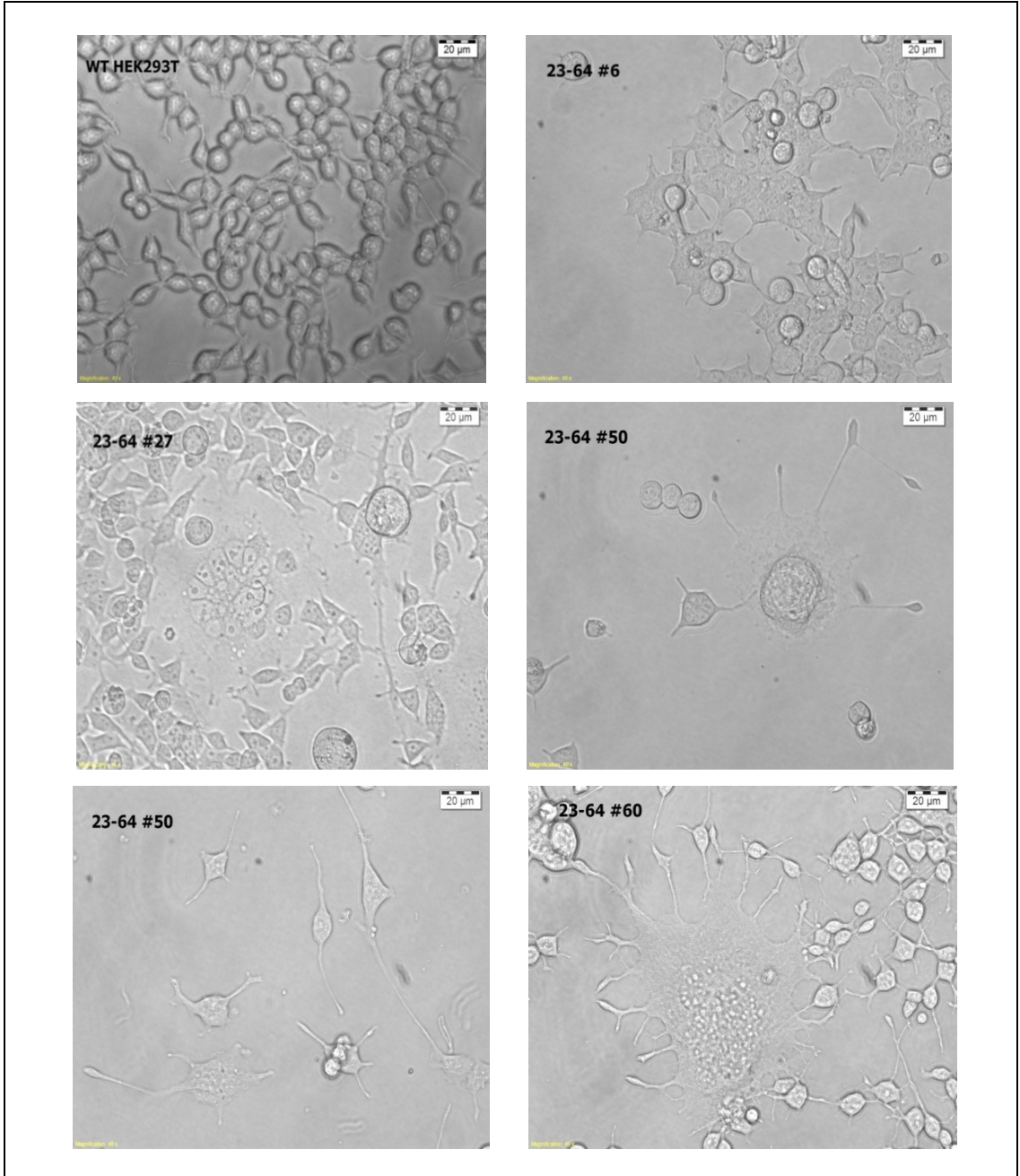
6.7. Mutant Hücre Hatlarında Meydana Gelen Fenotipik Değişikliklerin Ters Işık Mikroskobu İle Görüntülenmesi

Dizi analizi ile saptadığımız çeşitli indel (ekleme-çıkarma) mutasyonların hücrelerin fenotiplerinde yaratmış oldukları farklılıklar ters ışık mikroskobu kullanılarak görüntülenmiştir. #15 kolonilerinde ve 7-55'in diğer mutant hücre hatlarında meydana gelen fenotipik değişiklikler şekil 6.19'da gösterilmektedir.

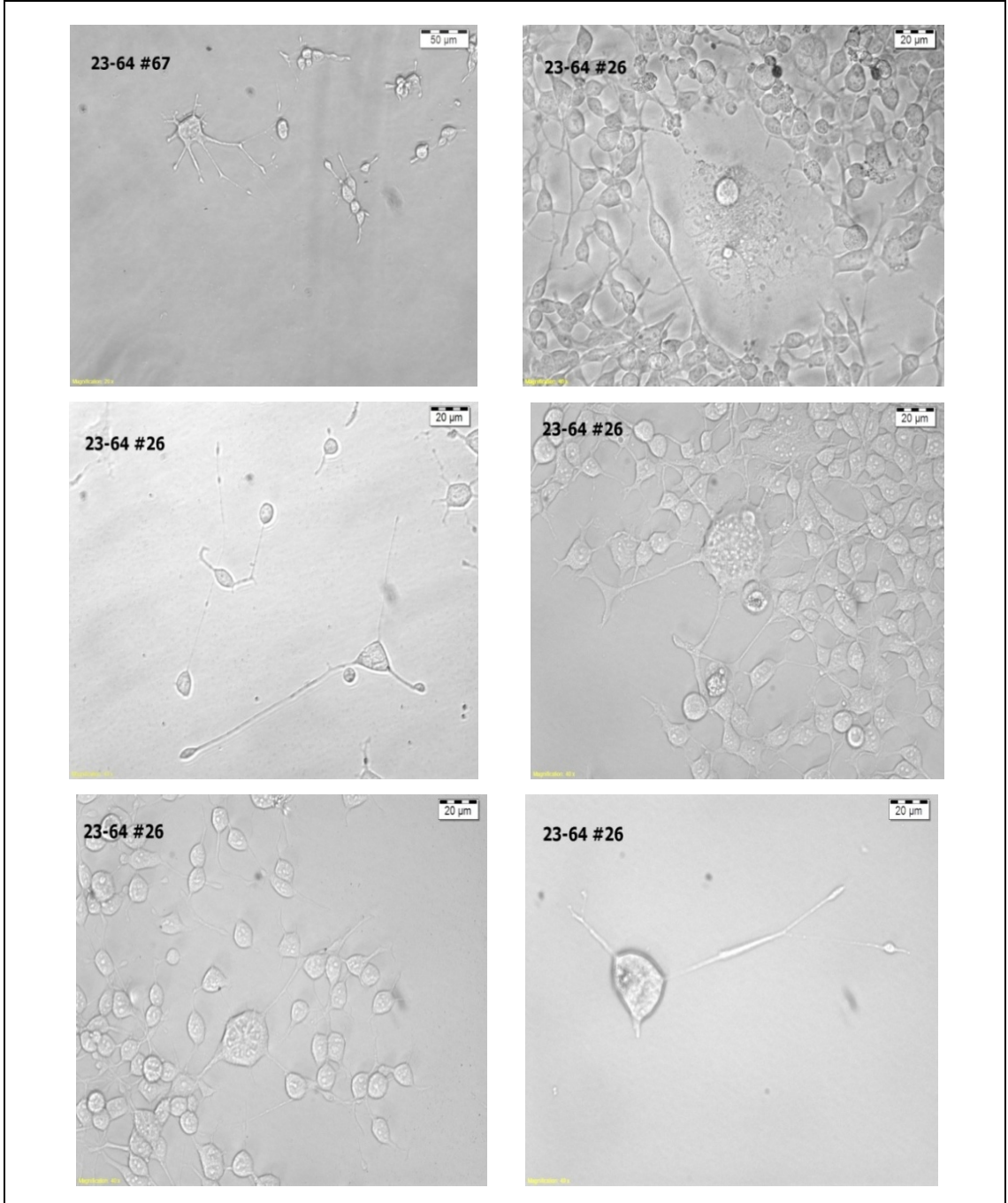


Şekil 6.19: 7-55 ve #15 tek hücre kolonilerine ve transfekte edilmemiş WT HEK293T hücrelerine ait mikroskop görüntüleri, hücre isimleri görüntülerin sol üst köşelerinde yer almaktadır.

23-64 mutant hücre hatlarında meydana gelen fenotipik değişiklikler şekil 6.20'de gösterilmektedir.



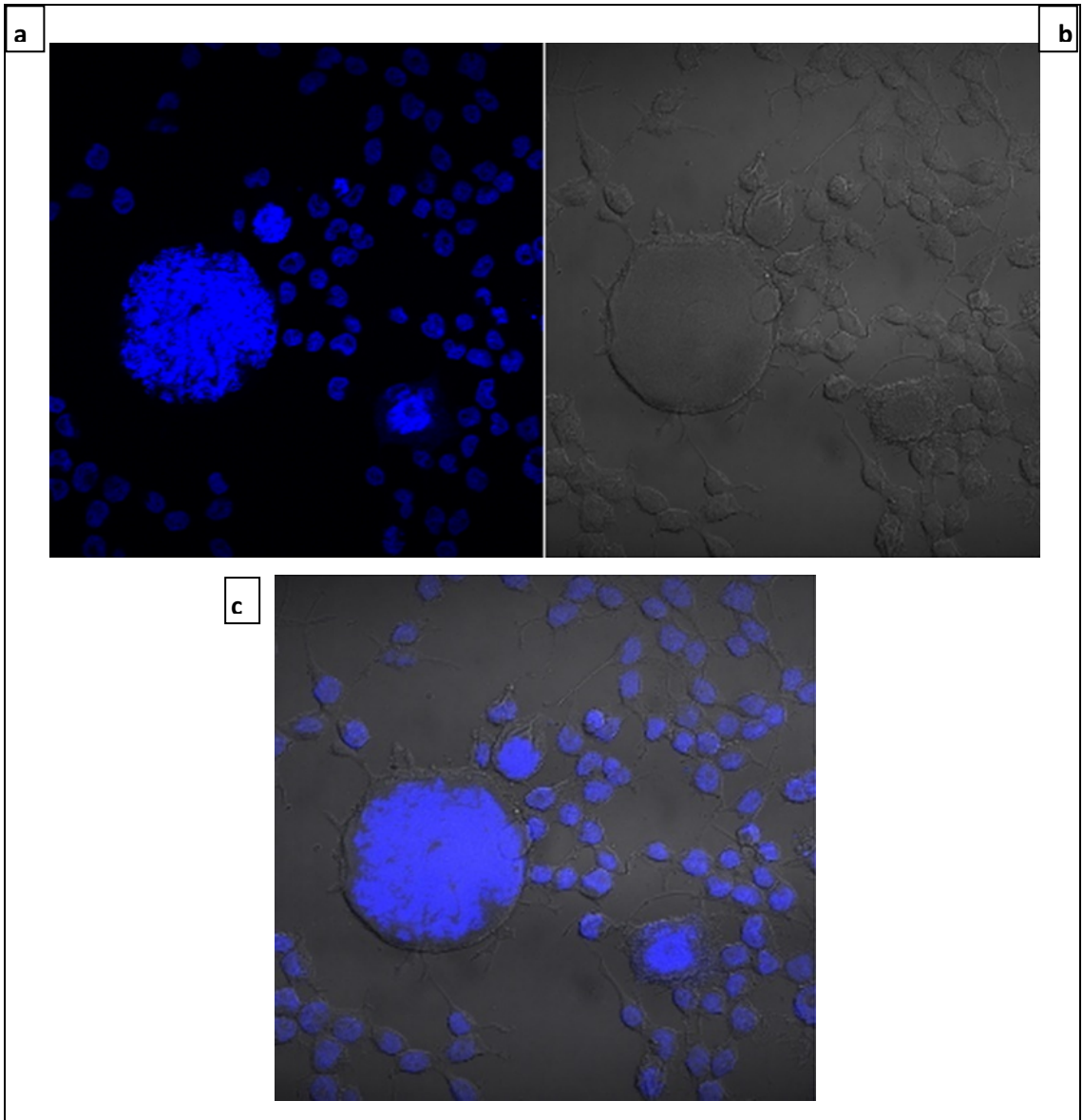
Şekil 6.20: 23-64 tek hücre kolonilerine ve transfekte edilmemiş WT HEK293T hücrelerine ait mikroskop görüntüleri, hücre isimleri görüntülerin sol üst köşelerinde yer almaktadır.



Şekil 6.20: Devam.

6.8. İmmü Floresan Boyama İle Mutant Hücre Hatlarının Görüntülenmesi

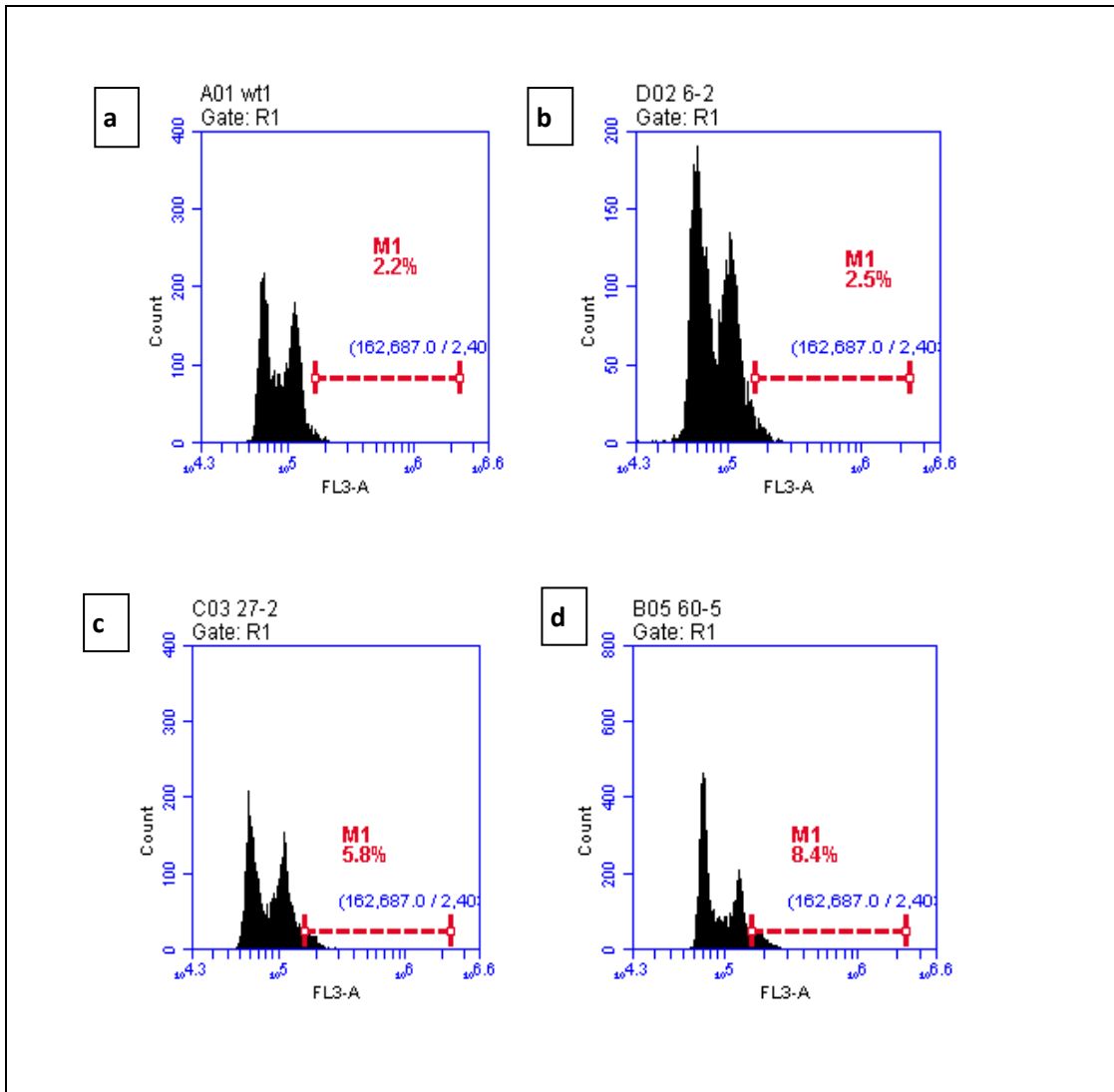
Ccdc124 geninin mutasyona uğratıldığı hücre hatlarında gözlemlenen, hacim olarak normal hücrelerden daha büyük hücrelerin, sitokinez mekanizmasında meydana gelen bozuklukların sonucunda oluşan çoklu çekirdekli hücreler olduklarını test etmek amacıyla immü floresan boyama yapılmıştır. Bu analiz için 23-64 CRISPR modeli uygulanan #60 mutant hücre hattı ve hücre içinde yalnızca çekirdeği boyayan DAPI boyası kullanılmıştır.



Şekil 6.21: İmmü floresan boyama ile #60 mutant hücre hattındaki çoklu çekirdekli hücre görüntülenmesi, a) Çekirdek görüntüsü, b) Hücre yüzeyi görüntüsü, c) Merge görüntüsü.

6.9. Mutant Hücre Hatlarındaki Çoklu Çekirdekli Hücre Oranının Akım Sitometri Analizi İle Tayini

BDAccuri C6 cihazı kullanılarak, seçilen hücre hatlarındaki çoklu çekirdekli hücre oranı transfekte edilmemiş wt HEK293T hücreleriyle karşılaştırılmıştır. Bu analiz için #60, #27 ve #6 hücre hatları seçilerek, wt HEK293T hücresine göre çoklu çekirdekli hücre oranındaki artış belirlenmiştir (şekil6.22).



Şekil 6.22: Akım Sitometri analizi ile çoklu çekirdekli hücre oranı tayini. a) wt HEK293T, b) #6 hücre hattı, c) #27 hücre hattı, d) #60 hücre hattı için yapılan analizleri göstermektedir. M1: çoklu çekirdekli hücre yüzdesi.

Yapılan akım sitometri analizleri sonucunda belirlenen wt HEK293T, #6, #27 ve #60 hatlarındaki hücrelerin bulunduğu döngü evresine göre değişen yüzde miktarları tablolaştırılarak tablo 6.1, tablo 6.2, tablo 6.3 ve tablo 6.4'te verilmiştir.

Tablo 6.1: wt HEK29T hattının hücre döngüsünün evresine göre yüzde dağılımı.

Wt HEK293T (ALINAN KAPIYA GÖRE)	HÜCRE YÜZDESİ
G0\G1 evresindeki diploid hücre yüzdesi	%42.8
S evresindeki diploid hücre yüzdesi	%26.6
G2 evresindeki diploid hücre yüzdesi	%35
Çoklu çekirdekli hücre yüzdesi	%2.2

Tablo 6.2: #6 hattının hücre döngüsünün evresine göre yüzde dağılımı.

#6 (ALINAN KAPIYA GÖRE)	HÜCRE YÜZDESİ
G0\G1 evresindeki diploid hücre yüzdesi	%35.6
S evresindeki diploid hücre yüzdesi	%16.1
G2 evresindeki diploid hücre yüzdesi	%27.7
Çoklu çekirdekli hücre yüzdesi	%2.5

Tablo 6.3: #27 hattının hücre döngüsünün evresine göre yüzde dağılımı.

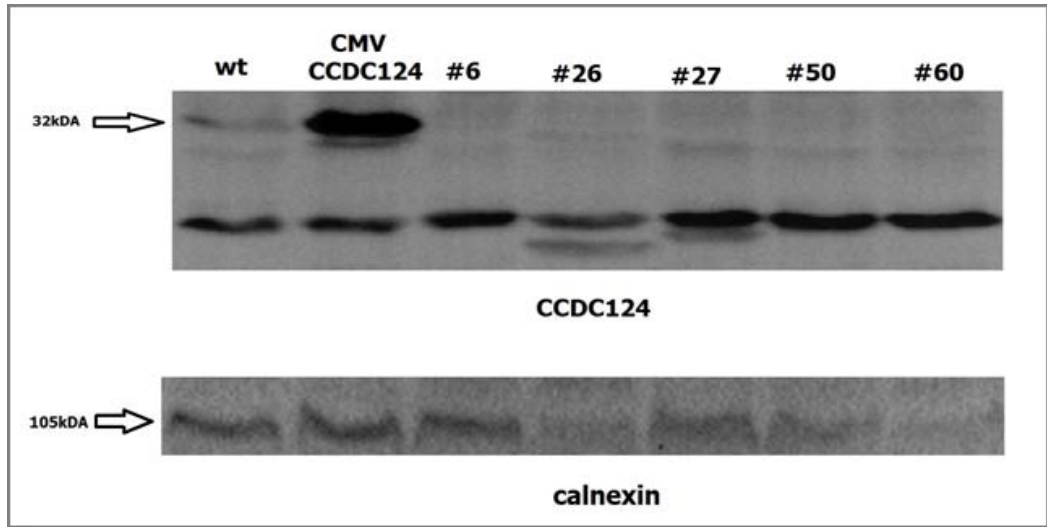
#27 (ALINAN KAPIYA GÖRE)	HÜCRE YÜZDESİ
G0\G1 evresindeki diploid hücre yüzdesi	%48.6
S evresindeki diploid hücre yüzdesi	%13.3
G2 evresindeki diploid hücre yüzdesi	%31
Çoklu çekirdekli hücre yüzdesi	%5.8

Tablo 6.4: #60 hattının hücre döngüsünün evresine göre yüzde dağılımı.

#60 (ALINAN KAPIYA GÖRE)	HÜCRE YÜZDESİ
G0\G1 evresindeki diploid hücre yüzdesi	%44
S evresindeki diploid hücre yüzdesi	%13.7
G2 evresindeki diploid hücre yüzdesi	%21.5
Çoklu çekirdekli hücre yüzdesi	%8.2

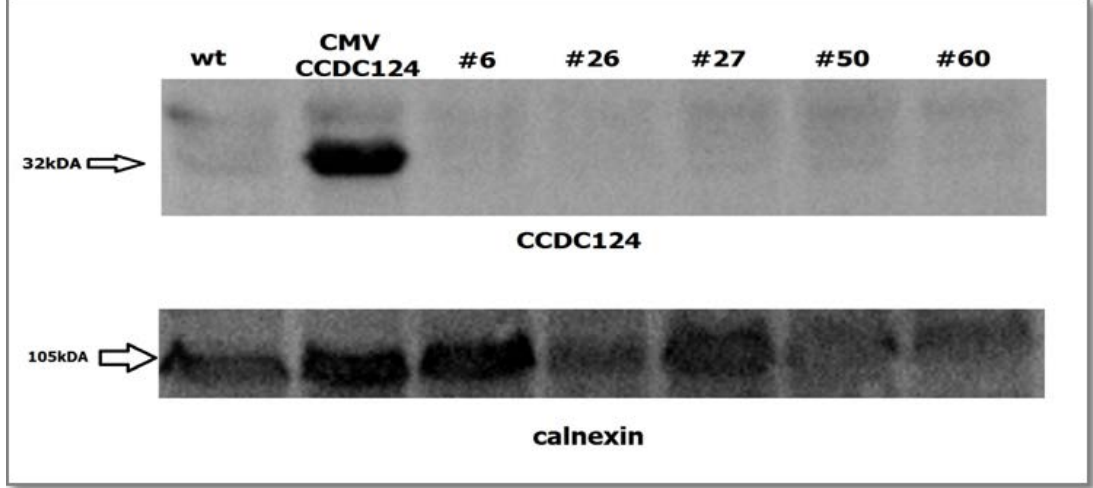
6.10. Mutasyona Uğratılmış Genin İmmünoiblot Analizi ile Protein Düzeyinde Kontrolü

CCDC124 geninde yaratılmış olan modifikasyonların protein düzeyinde etkilerini belirlemek amacıyla immünoiblot analizleri yapılmıştır. 23-64 CRISPR modeli uygulanan #6, #26, #27, #50, #60 mutant hücre hatları analiz edilmiş ve kontrol olarak wt HEK293T hücre hattı ve *Ccdc124* lokusu klonlanmış CMV promotörü kullanılmıştır. Yüklenen örnek miktarları her örnek için calnexin proteininin ifadesine bakılarak belirlenmiştir. *Ccdc124* proteininin N ucundan ilk 24 aminoasiti tanıyan antikor ile elde edilen görüntü şekil 6.23'te gösterilmelidir.



Şekil 6.23: Mutant hücre hatlarına ait N-terminal antikor kullanılarak elde edilen *Ccdc124* ve calnexin proteinleri ifadenme profili.

Ccdc124 proteininin ortasından 100-150 aralığındaki aminoasitleri tanıyan anti-mid-Ccdc124 antikor ile elde edilen membran görüntüsü şekil 6.24'te gösterilmektedir.



Şekil 6.24: Mutant hücre hatlarına ait anti-mid-Ccdc124 antikor kullanılarak elde edilen Ccdc124 ve calnexin proteinleri ifadenme profili.

7. YORUMLAR

Sonuçlarını sunduğumuz tez çalışmamda öncelikle Ccdc124 genine ait 2. ve 3.ekzonları hedefleyen sırasıyla 7-55 ve 23-63 CRİSPR\Cas9 modelleri tasarlanmıştır. Tasarlanan bu modellerle, 32 kDA ve 26 kDA büyüklüğündeki proteinlerin görevleri ve genin ifadenmemesi durumunda meydana gelebilecek genotipik ve fenotipik anomaliler aydınlatılmaya çalışılmıştır.

20 nükleotit boyunda tasarlanan sgRNA oligoları bir Cas9n plazmidi olan PX462'ye klonlanmıştır. Kontrol BbSI enzim kesiminin ardından yapılan DNA dizi analizi çalışmaları 55, 23 ve 64 oligolarının plazmide hatasız girdiğini doğrulamıştır. Fakat 7. oligonun 5' ucundan 10. nükleotit olan sitozinin (C) delesyona uğradığı dizinin hem forward hem de reverse yönünde sekanslatılmasıyla tespit edilmiştir. Jinek ve ark. yaptığı bir çalışmada PAM sekansından 10 nükleotit uzaklıkta olan nokta mutasyonunun tolere edilebildiği fakat 7 nükleotit uzaklıkta olan nokta mutasyonunun edilemediği ortaya konmuştur [Jinek et al., 2012]. Buna ek olarak Cas9n enzimi kullanıldığından DNA üzerinde oluşan tek bir kırık mutasyona sebep olmadan hatasız tamir edilecek ancak farklı ipliklerde iki kırık mutasyona yol açabilecektir. Tüm bu sebepler 7. oligodaki nokta mutasyonunun tolere edilerek 7-55 modelinin başarılı olduğunu düşündürmektedir.

PX462 plazmidlerinin HEK293T hücrelerine transfeksiyonu ile tasarlanan her iki modelde de farklı mutasyonlara sahip hücrelerin bulunduğu düşünülen hücre havuzları elde edilmiştir. RFLP yöntemi kullanılarak, yalnızca sekans değişikliğinin meydana geleceği bölgeleri tanıyan enzimler ile bu hücre havuzlarındaki mutant populasyon varlığı test edilmiştir. 1. transfeksiyon sonucunda her iki modelde de mutant hücre varlığını kanıtlar nitelikte, kullanılan enzimlerin tanıma bölgelerinin değiştiği ve enzim kesiminin gerçekleşmediği bir bant görülmüştür. Ancak 2. transfeksiyonda 23-64 modeli için aynı bant görülürken, 7-55 modeli için beklenen bant görülememiştir. Tekrar eden yüksek verimli transfeksiyonlarda da istenilen sonucun elde edilememesi ile mutasyonun enzimin tanıma bölgesi dışında bir bölgede gerçekleşmiş olabileceği, mutasyon meydana gelmiş olsa da enzimin tanıma bölgesi kaybolmadığından kesimin gerçekleştiği sonucu çıkarılmıştır.

NHEJ DNA tamir mekanizması hasarlı bölgeyi tamir ederken rastlantısal olarak baz ekleyip çıkardığı için aynı kültür ortamında birbirinden farklı çok sayıda mutasyon meydana gelebilmektedir. Tek tip mutasyon saptayabilmek ve yalnızca bu mutasyonun yol açtığı genotipik ve fenotipik anomalileri aydınlatabilmek amacıyla tek hücre düşürme deneyleri yapılmış ve bunun sonucunda farklı mutasyonlara sahip olduğu düşünülen hücre hatları elde edilmiştir. Bu hücre hatlarına RFLP analizi yapılarak içlerinden mutant hücre hatları seçilmiştir. 1. transfeksiyon havuzundan elde edilen 7-55 hücre hatlarından yalnızca #15 hücre hattında mutasyon tespit edilebilmiştir. Bu mutant hücre hattı için yapılan RFLP analizi sonucu jel görüntüsünde üç farklı bantlaşma göze çarpmaktadır. Mutasyonun bulunmadığı wt olarak kalan ve enzim ile kesilebilen bir alel, enzim tanıma bölgesi kaybolmuş ama yaklaşık aynı uzunlukta kalan bir alel ve yine enzim tanıma bölgesi kaybolmuş fakat delesyona uğramış başka bir alel belirlenmiştir. Tek hücre düşürme sırasında karışım koloni alınmış olabileme ihtimaline karşı #15 hattına tek hücre düşürme analizi yapılmış ve elde edilen tüm kolonilerde aynı sonuç ile karşılaşmıştır. Bu durum ya kullanılan HEK293T hücre hattında 19. kromozomun üç kopyası olabileceği ya da *CCDC124* geninin kopya sayısının fazla olabileceği ihtimallerini düşündürmüştür. 23-64 modelinde #7.2 ve #47 mutant hücre hatlarının karışım koloni olabilecekleri düşünülmüş, #27, #60, #43, #2, #40 ve #16 mutant hücre hatlarının ise homozigot mutasyona sahip oldukları saptanmıştır.

Elde edilen mutasyonların uzunluklarını ve gen diziliminde sebep oldukları değişimleri saptamak amacıyla mutant hücre hatlarına DNA dizi analizi yaptırılmıştır. 7-55 modeli için seçilen #15'e ait dizi analizi sonuçlarında birbirinden farklı üç alel beklenirken yalnızca iki alel tespit edilebilmiştir. Bunlardan ilkinde mutasyon oluşmamış wt genotip görülmektedir. İkincisinde ise 17 nükleotit delesyon meydana gelmiş ve bunun sonucunda 26kDA'luk ürünün başlangıç kodundan önce RNA Polimeraz bağlanma bölgesine zarar vermeyecek biçimde erken sonlanma kodonu oluşmuştur.

23-64 modelinden #6 mutant hücre hattının dizi analizi sonuçlarına göre tüm alellerde 70 nükleotitlik bir delesyon meydana gelmiştir. Çerçeve kayması sonucunda oluşan erken sonlanma kodonu ile yalnızca ilk 64 amino asiti *CCDC124* protein dizilimine sahip 108 amino asitten meydana gelen modifiye edilmiş bir protein oluşmaktadır.

#26 mutant hücre hattı için yapılan dizi analizinde, iki farklı tip alel görülmesi beklenirken bunlardan yalnızca biri tespit edilebilmiştir. 77 nükleotitlik bir delesyona sahip bu alelde ilk 67 amino asiti normal protein dizilimine sahip 150. amino asitten sonra erken sonlanma kodonu bulunan bir protein oluşmaktadır.

#27 mutant hücre hattında iki farklı alel tespit edilmiştir. 30 nükleotitlik delesyonun bulunduğu alelde çerçeve kayması oluşmadığından yalnızca 63-72 aralığındaki amino asitler sentezlenmemektedir. İkinci alelde ise 25 nükleotit delesyona uğramış, G ve C nükleotitleri eklenmiştir. Bunun sonucunda ilk 63 amino asiti normal protein diziliminde 168 amino asitten meydana gelen modifiye bir protein oluşmaktadır.

#50 hücre hattında dizi analizleri ile iki tip alel tespit edilmiştir. 24 nükleotit delesyonun bulunduğu ilk alelde çerçeve kayması oluşmadığından yalnızca 64-71 aralığındaki amino asitler sentezlenmemektedir. 10 nükleotit insersiyonun bulunduğu ikinci alelde ise erken sonlanma kodonu ile ilk 73 amino asiti normal protein diziliminde 179 amino asite sahip bir protein oluşmaktadır.

#60 mutant hücre hattında ise tespit edilen iki alelin ilkinde 24 nükleotitlik bir delesyon meydana gelmiş ve bu durumda 63-70 aralığındaki amino asitler sentezlenmemiştir. İkinci alelde ise 91 nükleotitlik bir delesyon ile okuma çerçevesinin kayması sonucu yalnızca ilk 59 amino asiti Ccdc124 protein dizilimine sahip 101 a.a. boyunda modifiye bir protein oluşmaktadır.

CRISPR\Cas9 sistemi kullanarak 2. ve 3. ekzon bölgelerinde çeşitli uzunluklarda mutasyonlar oluşturduğumuz *CCDC124* geni bir sentrozom-orta cisimcik proteinini kodlamaktadır. Gelişmiş ökaryotik hücrelerde, sentrozom ve onun etafını çevreleyen perisentriyoler matriks mikrotübül polimerizasyonundan ve depolimerizasyonundan sorumlu olduğundan birincil mikrotübül organize edici kompleks (MTOC) olarak isimlendirilmektedir. Orta cisimcik ise sitokinez esnasında kontraktıl halkanın anti-paralel mikrotübülleri sıkıştırmasıyla meydana gelmiştir ve yapılan çalışmalar bir çok mikrotübül polimerizasyonu bağlantılı proteinin sentrozom ve orta cisimcik arasında paylaşıldığını ortaya çıkarmıştır [Fededa and Gerlich, 2012]. Bu sebeple orta cisimcik ikincil mikrotübül organize edici kompleks olarak nitelendirilmektedir. Ccdc124 proteininin hücre döngüsünün farklı evrelerinde hem sentrozomda hem de orta cisimcikte konumlanmasıyla bu proteinin bir MTOC proteini olduğu düşünülmektedir. Mikrotübüller, hücre şeklinin belirlenmesi, hücre içi organel ve proteinlerin taşınması, hücre bölünmesi ve motor proteinlerin

hareketliliği gibi hayati öneme sahip pek çok süreçte görev almaktadır. Yapılan bu çalışma ile *CCDC124* geninin çeşitli bölgelerinde yaratılmış olan mutasyonların mikrotübül organizasyonunun yer aldığı bu süreçleri olumsuz etkilediği ve bunun sonucunda mutant hücre hatlarında görülen çeşitli morfolojik değişikliklerin meydana gelmiş olabileceği düşünülmektedir.

Mikrotübül organizasyonunun bozulması sonucu ortaya çıkan morfolojik değişimlerden ilki anormal hücre uzantılarıdır. Mikrotübül organizasyonu sırasında mikrotübüllerin depolimerizasyonundan sorumlu proteinler bulunmaktadır. Kataninin de içinde bulunduğu bu ATPaz proteinleri mikrotübüllerin yıkılarak düzenlenmesinde görevlidir. P60 ve P80 olarak isimlendirilen iki alt ünitesi bulunan kataninin nöron hücrelerinde inhibe edilmesi sonucu akson boylarında uzamalar gözlemlenmiştir [Yu et al., 2008]. Mitoz esnasında sentrozomda konumlanan katanin proteini tıpkı *Ccdc124* proteini gibi sitokinez sırasında orta cisimciğe göç etmektedir [Matsuo et al., 2013]. Bu durumdan yola çıkarak #26 ve #50 mutant hücre hatlarında görülen anormal hücre uzantılarının *Ccdc124* mutasyonuna bağlı olarak katanin veya diğer mikrotübül depolimerizasyon proteinlerinin yolağında meydana gelen bir bozukluktan kaynaklı olabileceği sonucu çıkarılmıştır.

Tespit edilen morfolojik değişikliklerden bir diğeri çoklu çekirdekli hücre oluşumudur. Daha önce yapılan çalışmalar sırasında da *Ccdc124* proteininin ifadenmesinin azaltılması [Telkoparan et al., 2013] veya aşırı artırılması [Arslan, 2015] ile çoklu çekirdekli hücre oluşumunun yüksek oranlarda arttığı ortaya koyulmuştur. Karyokinez ile çekirdek bölünmesini tamamlayan *CCDC124* mutant hücreler, sitokinez esnasında orta cisimcik organizasyonunda meydana gelen çeşitli anomaliler sonucu bu evreyi başarıyla sonlandıramamaktadır. Çoklu çekirdekli hücre oluşumunun yüksek oranda gözlemlendiği #27 ve #60 mutant hücre hatlarına akım sitometri analizi yapılmış, kontrol olarak çoklu çekirdekli hücre oluşumunun daha az gözlemlendiği #6 ve transfeksiyon yapılmamış wt HEK293T hücre hatları kullanılmıştır (şekil 6.22). Wt HEK293T hücre hattında çoklu çekirdekli hücreler seçilen alanın %2.2'sini oluştururken, #60 hücre hattında bu oran %8.2'dir. Tespit edilen çoklu çekirdekli hücre yüzdesi ışık mikroskobu ile gözlemlenenden az olmuştur. Bunun nedeninin, bu hücrelerin içerdiği çekirdek miktarının fazla olmasına bağlı olarak yüzey alanlarının geniş olması (şekil 6.21; immün floresan boyama) ve birbirine yapışmış hücreler öbeğinden meydana geldiği farz edilerek program tarafından analiz dışı bırakılması olduğu düşünülmektedir.

Ccdc124 proteininin RasGEF1B ile etkileşimi daha önce yapılmış çalışmalar ile gösterilmiştir [Telkoparan et al., 2013]. RasGEF1B Guanin nükleotit değiştirici faktörüdür ve bir küçük G proteini olan Rap2'nin orta cisimcikte aktivasyonunda görev almaktadır [Yaman et al., 2009]. Rap2 sinyali hücre bölünmesini takip eden hücre kutuplaşması, hücre-hücreler arası matriks adezyonu, hücre-hücre bağlantısı gibi süreçlerden sorumludur. Yaptığımız çalışma ile Ccdc124 proteininde oluşturduğumuz mutasyonun bu sinyal yolağını bozarak hücre-hücre arası bağlantıları etkilediği ve bunun sonucunda ise #6 mutant hücre hattında olduğu gibi birbirine tamamen yapışık hücrelerden meydana gelen kümelerin oluşturduğu bir morfolojinin görüldüğü düşünölmektedir.

CCDC124 geninin 3.ekzonunda, CRISPR\Cas9 sistemi uygulanarak meydana getirilen mutasyonların protein düzeyindeki etkileri immünoblot analizleri ile kontrol edilmiştir. #6, #26, #27, #50, #60 mutant hücre hatları analiz edilmiş ve kontrol olarak wt HEK293T hücre hattı ve CMV-Ccdc124 transfekte hücre lizatı kullanılmıştır. N-terminal Ccdc124 antikoru kullanılarak elde edilen membran görüntüsünde, #26 ve #27 haricinde diğer mutant hücre hatlarında bir protein bandı belirlenmemiş ve bu durumun nedeninin gende meydana gelen mutasyonlar sonucu oluşan modifiye proteinin stabilitesini koruyamaması olabileceği sonucu çıkarılmıştır. #26 ve #27 mutant hücre hatlarında ise meydana gelen delesyonlar ve erken sonlanma kodonu sonucu beklenilenden daha küçük bir proteinin sentezlendiği düşünölmektedir. Anti-mid-Ccdc124 antikoru kullanılarak elde edilen membran görüntüsünde ise beklenildiği gibi antikorun bağlanacağı bölgede meydana getirilen modifikasyonlar nedeniyle herhangi bir protein bandı gözlenmemiştir.

KAYNAKLAR

Alberts B., Johnson A., Lewis J. (2002), “Molecular Biology of the Cell”, 4th Edition, Garland Science.

Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romero D.A., Horvath P. (2007), “CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes”, *Science*, 315, 1709–12.

Buck R. C., Tisdale J. M. (1962a), “An electron microscopic study of the development of the cleavage furrow in mammalian cells”, *The Journal of Cell Biology*, 13(1), 117-125.

Buck R. C., Tisdale J. M. (1962b), “The fine structure of the mid-body of the rat erythroblast”, *The Journal of Cell Biology*, 13(1), 109-115.

Byers B., Abramson D. H. (1968), “Cytokinesis in HeLa: post-telophase delay and microtubule-associated motility”, *Protoplasma*, 66(4), 413-435.

Carlton J. G., Martin-Serrano J. (2007), “Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery”, *Science*, 316(5833), 1908-191.

Chang N., Sun C., Gao L., Zhu D., Xu X., Zhu X., Xiong J.W., Xi J.J. (2013), “Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in Zebrafish embryos”, *Cell Research*, 23, 465–72.

Chen C. T., Hehnlly H., Doxsey S. J. (2012), “Orchestrating vesicle transport, ESCRTs and kinase surveillance during abscission”. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(8), 483-488.

Cho S.W., Kim S., Kim J.M., Kim J.S. (2013), “Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease”, *Nature Biotechnology*, 31, 230–32.

Chylinski K., Le Rhun A., Charpentier E. (2013), “The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems”, *RNA Biology*, 10, 726–37.

Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., Zhang F. (2013), “Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems”, *Science* 339, 819–23.

Connell J. W., Lindon C., Luzio J. P., Reid E. (2009), “Spastin couples microtubule severing to membrane traffic in completion of cytokinesis and secretion”. *Traffic*, 10(1), 42-56.

Cooper G.M., Hausman R.E. (2004), “The Cell: A Molecular Approach”, 3rd Edition, American Society for Microbiology.

D'Avino P. P., Giansanti M. G., Petronczki M. (2015), "Cytokinesis in Animal Cells", Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 7(4), a015834.

D'Avino P. P., Takeda T., Capalbo L., Zhang W., Lilley K. S., Laue E. D., Glover, D. M. (2008), "Interaction between Anillin and RacGAP50C connects the actomyosin contractile ring with spindle microtubules at the cell division site". Journal of Cell Science, 121(8), 1151-1158.

Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C.M., Gonzales K., Chao Y., Pirzada Z.A., Eckert M. R., Vogel J., Charpentier E. (2011), "CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III", Nature, 471, 602–07.

DiCarlo J.E., Norville J.E., Mali P., Rios X., Aach J., Church G.M. (2013), "Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems", Nucleic Acids Research, 41, 4336–43.

Elia N., Sougrat R., Spurlin T.A., Hurley J.H., Lippincott-Schwartz J. (2011), "Dynamics of endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) machinery during cytokinesis and its role in abscission", Proceedings of the National Academy of Sciences, 108, 4846–51.

Erkek S. (2008), "Hanein-1, a novel conserved eukaryotic protein ubiquitously expressed in human tissues", Yüksek Lisans Tezi, Bilkent Üniversitesi.

Fededa J. P., Gerlich, D. W. (2012), "Molecular control of animal cell cytokinesis", Nature Cell Biology, 14(5), 440-447.

Fujiwara T., Bandi M., Nitta M., Ivanova E. V., Bronson R. T., Pellman D. (2005), "Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells", Nature, 437(7061), 1043-1047.

Ganem N. J., Storchova Z., Pellman D. (2007), "Tetraploidy, aneuploidy and cancer", Current Opinion in Genetics and Development, 17(2), 157-162.

Gilbert L.A., Larson M.H., Morsut L., Liu Z., Brar G.A., Torres S.E., Stern-Ginossar N., Brandman O., Whitehead E.H., Doudna J.A., Lim W.A., Weissman J.S., Qi L.S. (2013), "CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes", Cell, 154, 442–51.

Gloerich M., Bos J. L. (2011), "Regulating Rap small G-proteins in time and space", Trends in Cell Biology, 21(10), 615-623.

Gratz S.J., Cummings A.M., Nguyen J.N., Hamm D.C., Donohue L.K., Harrison M.M., Wildonger J., O'Connor-Giles K.M. (2013), "Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease", Genetics, 113, 152710.

Gregory S. L., Ebrahimi S., Milverton J., Jones W. M. Bejsovec A., Saint, R. (2008), "Cell division requires a direct link between microtubule-bound RacGAP and Anillin in the contractile ring". Current Biology, 18(1), 25-29.

Grissa I., Vergnaud G., Pourcel C. (2007), “CRISPR Finder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats”, *Nucleic acids research*, 35, 527.

Guizetti J., Gerlich D. W. (2010), “Cytokinetic abscission in animal cells”, *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 21, 909-16.

Guizetti J., Schermelleh L., Mantler J., Maar S., Poser I., et al. (2011), “Cortical constriction during abscission involves helices of ESCRT-III-dependent filaments”, *Science*, 331, 1616–20.

Horvath P., Barrangou R. (2010), “CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea”, *Science*, 327, 167-70.

Hu C.K., Coughlin M., Mitchison T.J. (2012a), “Midbody assembly and its regulation during cytokinesis”, *Molecular Biology Cell*, 23, 1024–34.

Hwang W.Y., Fu Y.F., Reyon D., Maeder M.L., Tsai S.Q., Sander J.D., Peterson R.T., Yeh J.R.J., Joung J.K. (2013), “Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system”, *Nature Biotechnology*, 31, 227–229.

Ishino Y., Shinagawa H., Makino K., Amemura M., Nakata A. (1987), “Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product”, *Journal of Bacteriology* 169 (12), 5429–33.

Jakobsen L., Vanselow K., Skogs M., Toyoda Y., Lundberg E. (2011), “Novel asymmetrically localizing components of human centrosomes identified by complementary proteomics methods”, *The European Molecular Biology Organization Journal*, 30, 1520-35.

Jansen R., Embden J.D., Gaastra W., Schouls L.M. (2002), “Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes”, *Molecular Microbiology*, 43 (6), 1565–75.

Janssen A., van der Burg M., Szuhai K., Kops G. J., Medema R. H. (2011), “Chromosome segregation errors as a cause of DNA damage and structural chromosome aberrations”, *Science*, 333(6051), 1895-1898.

Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. (2012), “A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity”, *Science*, 337, 816–21.

Jordan S. N., Canman J. C. (2012), “Rho GTPases in animal cell cytokinesis: an occupation by the one percent”, *Cytoskeleton*, 69(11), 919-930.

Kent W. J., Sugnet C. W., Furey T. S., Roskin K. M., Pringle T. H., Zahler A. M., Haussler D. (2002), “The human genome browser at USCS”, *Genome Research*, 12, 996-1006.

Konermann S., Brigham M.D., Trevino A.E., Hsu P.D., Heidenreich M., Cong L., Platt R.J., Scott D.A., Church G.M., Zhang, F. (2013), "Optical control of mammalian endogenous transcription and epigenetic states", *Nature*, 500, 472–76.

Lacroix B., Maddox, A. S. (2012), "Cytokinesis, ploidy and aneuploidy", *The Journal of Pathology*, 226(2), 338-351.

Lacroix B., Van Dijk J., Gold N. D., Guizetti J., Aldrian-Herrada G., Rogowski K., Janke, C. (2010), "Tubulin polyglutamylation stimulates spastin-mediated microtubule severing", *The Journal of Cell Biology*, 189(6), 945-954.

Maddox A. S., Lewellyn L., Desai A., Oegema, K. (2007), "Anillin and the septins promote asymmetric ingression of the cytokinetic furrow", *Developmental Cell*, 12(5), 827-835.

Makarova K.S., Haft D.H., Barrangou R., Brouns S.J., Charpentier E., Horvath P., Moineau S., Mojica F.J., Wolf Y.I., Yakunin A.F., et al. (2011b), "Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems", *Nature Reviews*.

Makarova K.S., Aravind L., Wolf Y.I., Koonin E.V. (2011a), "Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR/Cas systems", *Biology Direct*, 6, 38.

Mali P., Yang L., Esvelt K.M., Aach J., Guell M., DiCarlo J.E., Norville J.E., Church G.M. (2013), "RNA-guided human genome engineering via Cas9", *Science*, 339, 823–26.

Matsuo M., Shimodaira T., Kasama T., Hata Y., Echigo A., Okabe M., Kishimoto T. (2013), "Katanin p60 contributes to microtubule instability around the midbody and facilitates cytokinesis in rat cells", *PLoS ONE*, 8(11), e80392.
Microbiology, 9, 467–77.

Mojica F.J., Díez-Villaseñor C., Soria E., Juez G. (2000), "Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria", *Molecular Microbiology*, 36(1), 244–46.

Mojica F.J., Díez-Villaseñor C., García-Martínez J., Soria E. (2005), "Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements", *Journal of Molecular Evolution*, 60, 174–82.

Morita E. (2012), "Differential requirements of mammalian ESCRTs in multivesicular body formation, virus budding and cell division", *FEBS J.*, 279, 1399–406.

Morita E., Sandrin V., Chung H. Y., Morham S. G., Gygi S. P., Rodesch C. K., Sundquist, W. I. (2007), "Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis", *The EMBO journal*, 26(19), 4215-4227.

Mullins J., Biesele J. J. (1977), "Terminal phase of cytokinesis in D-98s cells", *The Journal of Cell Biology*, 73(3), 672-684.

Nishimura Y., Yonemura S. (2006), “Centralspindlin regulates ECT2 and RhoA accumulation at the equatorial cortex during cytokinesis”, *Journal of Cell Science*, 119(1), 104-114.

Paweletz N. (2001), “Walther Flemming: pioneer of mitosis research”, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(1), 72-76.

Piekny A., Werner M., Glotzer M. (2005), “Cytokinesis: welcome to the Rho zone”, *Trends in Cell Biology*, 15(12), 651-658.

Qi L.S., Larson M.H., Gilbert L.A., Doudna J.A., Weissman J.S., Arkin A.P., Lim W.A. (2013), “Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression”, *Cell*, 152, 1173–83.

Ran F.A., Hsu P.D., Lin C.Y., Gootenberg J.S., Konermann S., Trevino A.E., Scott D.A., Inoue A., Matoba S., Zhang Y., Zhang F. (2013), “Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity”, *Cell*, 154, 1380–89.

Schiel J. A., Simon G. C., Zaharris C., Weisz J., Castle D., Wu C. C., Prekeris R. (2012). “FIP3-endosome-dependent formation of the secondary ingression mediates ESCRT-III recruitment during cytokinesis”, *Nature Cell Biology*, 14(10), 1068-1078.

Shalem O., Sanjana N.E., Hartenian E., Shi X., Scott D.A., Mikkelsen T.S., Heckl D., Ebert B.L., Root D.E., Doench J.G., Zhang F. (2014), “Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells”, *Science*, 343, 84–87.

Shen B., Zhang J., Wu H., Wang J., Ma K., Li Z., Zhang X., Zhang P., Huang X. (2013), “Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated genotyping”, *Cell Research*, 23, 720–23.

Shuman S., Glickman M.S. (2007), “Bacterial DNA repair by non homologous end joining”, *Nature Review Microbiology*, 5, 852–61.

Smith G.R. (2001), “Homologous recombination near and far from DNA breaks: alternative roles and contrasting views”, *Annual Review of Genetics*, 35, 243–74.

Steigemann P., Wurzenberger C., Schmitz M. H., Held M., Guizetti J., Maar S., Gerlich D. W. (2009), “Aurora B-mediated abscission checkpoint protects against tetraploidization”, *Cell*, 136, 473-484.

Telkoparan P., Erkek S., Yaman E., Alotaibi H., Bayik D., Tazebay U. H. (2013), “Coiled-coil domain-containing protein 124 is a novel centrosome and midbody protein that interacts with the Ras-guanine nucleotide exchange factor 1B and is involved in cytokinesis”, *Public Library of Science One*, 8, e69289.

Telkoparan P. (2013), “Characterization of the coiled-coil domain-containing protein 124 (Ccdc124) as a novel centrosome and midbody component involved in cytokinesis”, *Doktora Tezi, Bilkent Üniversitesi*.

- Uehara R., Goshima G. (2010), "Functional central spindle assembly requires de novo microtubule generation in the interchromosomal region during anaphase", *The Journal of Cell Biology*, 191(2), 259-267.
- Uehara R., Nozawa R. S., Tomioka A., Petry S., Vale R. D., Obuse C., Goshima G. (2009), "The augmin complex plays a critical role in spindle microtubule generation for mitotic progression and cytokinesis in human cells", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(17), 6998-7003.
- Wang H.Y., Yang H., Shivalila C.S., Dawlaty M.M., Cheng A.W., Zhang F., Jaenisch R. (2013), "One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering", *Cell*, 153, 910–18.
- Wang T., Wei J.J., Sabatini D.M., Lander E.S. (2014), "Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system", *Science*, 343, 80–88.
- Wang Y. L. (2005), "The mechanism of cortical ingression during early cytokinesis: thinking beyond the contractile ring hypothesis", *Trends in cell biology*, 15(11), 581-588.
- Watson, J. D., Baker, T., Bell, S., Gann, A., Levine, M., Losick, R. (2003), "Molecular Biology of the Gene".
- Westra E. R., Buckling A., Fineran P. C. (2014), "CRISPR-Cas systems: beyond adaptive immunity", *Nature Reviews Microbiology*, 12(5), 317-26.
- Wilson G. M., Fielding A. B., Simon G. C., Yu X., Andrews P. D., Hames R. S., Prekeris R. (2005). "The FIP3-Rab11 protein complex regulates recycling endosome targeting to the cleavage furrow during late cytokinesis". *Molecular Biology of The Cell*, 16(2), 849-860.
- Wyman C., Kanaar R. (2006), "DNA double-strand break repair: all's well that ends well", *Annual Review of Genetics*, 40, 363–83.
- Yaman E., Gasper R., Koerner C., Wittinghofer A., Tazebay U. H. (2009), "RasGEF1A and RasGEF1B are guanine nucleotide exchange factors that discriminate between Rap GTP-binding proteins and mediate Rap2-specific nucleotide Exchange", *Federation of European Biochemical Societies Journal*, 276, 4607-16.
- Yu W., Qiang L., Solowska J. M., Karabay A., Korulu S., Baas P. W. (2008), "The microtubule-severing proteins spastin and katanin participate differently in the formation of axonal branches", *Molecular Biology of Cell*, 19(4), 1485-98.
- Yüce Ö., Piekny A., Glotzer M. (2005), "An ECT2–centralspindlin complex regulates the localization and function of RhoA", *The Journal of cell biology*, 170(4), 571-582.

ÖZGEÇMİŞ

Sinem Gül 18.08.1987 tarihinde İstanbul'da doğdu. Lisans eğitimini 2005-2009 tarihleri arasında Balıkesir Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde tamamladı. Lisansüstü eğitimine başladığı Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalından 2015 yılında yüksek lisans derecesiyle mezun oldu.

EKLER

Ek-A: Kimyasal Malzeme Tablosu

Tablo A1.1: Kimyasal Malzeme Tablosu.

<u>KİMYASAL</u>	<u>KİMYASALIN MARKASI</u>
Acetic Acid	Sigma, Almanya
Agarose	Sigma, Almanya
Ampicillin sodium salt	Cellgro,Amerika
Boric acid	Molekula,Ukrayna
Calcium chloride	Sigma, Almanya
Distilled water	Milipore,Fransa
DMEM	Gibco,Amerika
DMSO	Sigma, Almanya
EDTA	Sigma, Almanya
Ethanol	Sigma, Almanya
Ethidium bromide	Sigma,Almanya
Fetal Bovine Serum(FBS)	Lonza,İsviçre
Glycerol	Sigma, Almanya
HBSS	Gibco,Amerika
HydrochloricAcid	Sigma, Almanya
Isopropanol	Sigma, Almanya
LB Agar	BD,Amerika
LB Broth	Sigma, Almanya
L-glutamine	Hyclone,Amerika
Liquid nitrogen	Karbogaz,Türkiye
2-mercaptoethanol	Sigma, Almanya
Penicillin-Streptomycin	Sigma, Almanya

Tablo A1.1: Devam.

SDS	Sigma, Almanya
Sodium Azide	Amresco,Amerika
Promycine	Sigma, Almanya
Trisbase	Sigma, Almanya
TrypanBlue	Fluca,Almanya
Trypsin-EDTA	Gibco,Amerika
2- Mercapto ethanol	Aldrich, Almanya
Albumin	Sigma, Almanya
Anti-Flag Affinity Gel	Sigma, Almanya
Bradford Reagent	Sigma, Almanya
Fuegene6	Roche, Almanya
Liqui-gel 3751	MP, Fransa
TEMED	Sigma, Almanya
Tergitol solüsyonu	Sigma, Almanya
Tween 20	Sigma, Almanya
RNase A	Roche, Almanya
PBS	Sigma, Almanya
PIPES	Sigma, Almanya

Ek B: Kullanılan Cihazların Tablosu

Tablo B1.1: Kullanılan Cihazlar ve Markalarının Tablosu.

<u>EKİPMAN</u>	<u>FİRMA</u>
Otoklav	Priorclave,UK
Balance	Sartorius, BP221S,Almanya
Balance	Schimadzu, Libror EB-3200 HU,Japan
Santrifüj	Hitachi, Sorvall RC5C Plus,Amerika
Santrifüj	Eppendorf, 5415D,Almanya
Santrifüj	Eppendorf, 5418R,Almanya
Santrifüj	Beckman Coulter, Allegra®X-15R,AMERIKA
CO2 Incubator	Binder,Almanya

Tablo B1.1: Devam.

Deepfreeze	-80°C, Forma, ThermoElectronCorp., AMERIKA
Deepfreeze	-20°C, Bosch, Almanya
Distile Su	Millipore, Elix-S, France
Elektroforez Cihazı	Biorad Inc., Amerika
Flow Cytometer	BD FACSCanto, Amerika
Gel Documentation	Biorad, UV-Transilluminator 2000, Amerika
Heater	Thermomixer Comfort, Eppendorf, Almanya
Hematocytometer	Hausser Scientific,Blue BellPa, Amerika
Ice Machine	Scotsman Inc., AF80, Amerika
Incubator	Memmert, Modell 300, Almanya
LaminarFlow	Kendro Lab. Prod., Heraeus, HeraSafe Almanya
Liquid NitrogenTank	Taylor-Wharton,3000RS, Amerika
Magnetic Stirrer	StuartTM,SB162, Ukrayna
Microliter Pipettes	Gilson, Pipetman, Fransa
Mikroskop	Olympus IX70, Japonya Olympus CK40, Japonya
MicrowaveOven	Bosch,Almanya
pHmetre	Mettler Toledo, S220 Seven Compact™ pH/Ion, Amerika
Buzdolabı	Bosch,Almanya
ShakerIncubator	New Brunswick Sci., Innova 4330, Amerika
Spectrophotometer	Amersham Biosciences,Ukrayna
Thermocycler	Eppendorf, Mastercycler Gradient, Almanya
Vortex	Velp Scientifica,İtalya