T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

APOBEC1 ENZİMİ VE YARDIMCI KOFAKTÖRLERİ İÇİN HÜCRESEL KLONLARIN ÜRETİLMESİ

Mahmut ÖZER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR
Haziran-2018

T.C

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

DİYARBAKIR

Mahmut ÖZER tarafından yapılan "APOBEC1 Enzimi ve Yardımcı Kofaktörleri İçin Hücresel Klonların Üretilmesi" konulu bu çalışma, jürimiz tarafından BİYOLOJİ Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir

Jüri Üyesinin

Ünvanı	Adı Soyadı
Başkan:	Doç. Dr. Veysel TOLAN
Üye :	Doç. Dr. Sema AGÜLOĞLU FİNCAN
Üye :	Dr. Öğr. Üyesi Nesrin HAŞİMİ

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 22/06/2018

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

...../...../2018

Doç.Dr. Sevtap SÜMER EKER

ENSTİTÜ MÜDÜR V.

(MÜHÜR)

TEŞEKKÜR

Zor ve meşakkatli ancak keyifli bir beş aylık çalışma döneminden sonra, bu teşekkürü tezime son dokunuş bağlamında yazmanın zamanı geldi. Benim için sadece bilimsel çalışmalar anlamında değil, aynı zamanda kişisel düzeyde de yoğun bir öğrenme ve tecrübe etme dönemi oldu.

Her şeyden önce, danışmanın Doç. Dr. Veysel Tolan'a bana gösterdiği sürekli destek ve her problemime karşı uyguladığı açık kapı politikası için minnettarlığımı ifade etmek isterim. Ayrıca tez çalışmalarıma imkân sağlayıp, İtalya'nın Floransa kentindeki laboratuvarının kapılarını açan Dr. Silvo Conticello'ya gösterdiği destek ve misafirperverliğinden dolayı teşekkürü bir borç biliyorum. Gerek tezimin çevirisi esnasında gerekse Erasmus sürecinde tecrübelerini benimle paylaşmaktan çekinmeyen değerli arkadaşlarım Ahmet İsmail ÖZKAN ve Feysel ÇAKMAK'a samimi şükranlarımı sunuyorum.

Bunların yanı sıra, Conticello laboratuvarının çalışanlarına laboratuvar çalışmalarım sırasında samimi karşılama ve rehberliklerinden dolayı, Floransa ve Dicle Üniversitelerinin Erasmus koordinatörlerine başvurularım esnasında gösterdikleri çabalardan dolayı teşekkür etmek isterim.

Son olarak, eşim Gülşah hanımefendiye, kızlarım Elifsu ve Ece'ye İtalya'da bulunduğum süreç içerisinde bensiz kaldıkları dönemde gösterdikleri sabır ve anlayıştan dolayı şükranlarımı sunuyorum.

Mahmut ÖZER

Haziran 2018

İÇİNDEKİLER

		Sayfa
TEŞEKKÜR		I
İÇİNDEKİLER		II
ÖZET		V
ABSTRACT		VI
ÇİZELGE LİSTESİ		VII
ŞEKİL LİSTESİ		VIII
EK LİSTESİ		IX
KISALTMA VE SİMGELER		X
1.	**GİRİŞ**	1
1.1.	Genel Olarak Düzenleme	1
1.2.	DNA Düzenlemesi	1
1.3.	RNA Düzenlemesi	4
1.4.	APOBEC1 Düzenlemesi	5
1.4.1.	Editozom Kompleksinin Elemanları	6
1.5.	APOBEC1 Düzenlemesi ve Kanser	7
1.6.	Genom Düzenlemesi ve CRISPR/Cas9 Sistemi	10
1.7.	Caco2 Hücreleri ve Hücre Farklılaşması	13
2.	**KAYNAK ÖZETLERİ**	17
2.1.	RNA Düzenleme	17
2.2.	APOBEC1 Düzenleme	17
2.3.	ApoB Düzenlemenin Elemanları	19
2.4.	APOBEC1'in Ek Hedefleri ve Tümör Gelişimindeki Potansiyel Rolleri	20
2.5.	Caco-2 Hücrelerinin Hücre Farklılaşması	21
2.6.	CRISPR/Cas9 İçin Caco2 Hücrelerinin Zenginleştirilmesi	22
3.	**MATERYAL VE METOT**	25
3.1.	Materyal	25
3.1.1.	Veri Toplama Araçları	25
3.1.2.	Deneysel Kitler	25
3.1.3.	Hücre Kültüründe Kullanılan Malzemeler	25
3.1.3.1.	Hücre Hattı	25
3.1.3.2.	Kültürleme Ortamı/Besiyeri	25
	- Besiyerinin Hazırlanması	25
3.1.4.	Kullanılan Kimyasal Maddeler, Reaktifler ve Sarf Malzemeleri	26
3.1.5.	Elektroporasyonda Kullanılan Plazmitler	26

3.1.6.	PCR'da Kullanılan Primerler.....	27
3.1.7.	Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Malzemeler.....	27
3.1.7.1.	Agaroz Jel Hazırlanması.....	27
3.1.7.2.	Tris Borik Asit EDTA (TBE) Tamponu 1X.....	28
3.2.	Metot.....	28
3.2.1.	Hücrelerin Çözülmesi.....	28
3.2.2.	Hücrelerin Kültürlenmesi.....	29
3.2.3.	Caco-2 Hücrelerinde APOBEC1 Geninin ve Kofaktörlerinin Knock-out Edilmesi.....	29
3.2.3.1.	APOBEC1 Geninin Knock-out Edilmesi İçin Caco-2 Hücrelerinin Elektroporasyonu.....	29
3.2.3.2.	Blastisidin Direnci ile ACF ve RBM47 Genlerinin Knock-out Edilmesi İçin Caco-2 WT ve Caco-2 R/G Hücrelerinin Elektroporasyonu.....	30
3.2.3.3.	Püromisin Direnci ile ACF ve RBM47 Genlerinin Knock-out Edilmesi İçin Caco-2 WT ve Caco-2 R/G Hücrelerinin Elektroporasyonu.....	31
3.2.4.	Hücre Hattı Bakımı ve Genişletilmesi.....	32
3.2.5.	Knock-out edilmiş Caco-2 ve Caco-2 R/G Hücrelerinden DNA Ekstraksiyonu…….	32
3.2.6.	Caco-2 ve Caco-2 R/G Hücrelerinde Knock-out Edilen Genlerin PCR Amplifikasyonu.....	32
3.2.7.	PCR Ürünlerinin Temizlenmesi.....	33
3.2.8.	Knock-out Edilmiş Hücrelerinin Sekans Analizi.....	33
3.2.9.	Caco-2 Hücrelerinin Hücre Farklılaşması ve RNA düzenlemesinin Taranması.....	34
3.2.9.1.	Caco-2 Hücrelerinin Hücre Farklılaşması.....	34
3.2.9.2.	FACS Analizi İçin Örneklerin Hazırlanması.....	34
3.2.9.3.	Farklılaştırılmış Caco-2 Hücrelerinden RNA Ekstraksiyonu ve cDNA Sentezi.....	34
3.2.9.4.	Sekans analizi için Caco-2 Hücrelerinden apoB cDNA'larının Hazırlanması	34
3.2.9.5.	Ekspresyon Analizi İçin Caco-2 ve Caco-2 R/G Hücrelerinden APOBEC1 cDNA'larının Amplifikasyonu.....	35
3.2.9.6.	PCR Ürünlerinin Saflaştırılması.....	35
3.2.9.7.	ApoB ve APOBEC1'in PCR Ürünlerinin Dizi Analizi.....	35
4.	**BULGULAR VE TARTIŞMA**.....	37
4.1.	Bulgular.....	37
4.1.1.	RNA Düzenlemesinin FACS Analizi İle Tespiti.....	37
4.1.2.	Farklılaştırılmış Caco-2 hHücrelerinden RNA Ekstraksiyonu ve cDNA Sentezi.....	38
4.1.3.	Knock-out Edilmiş Hücrelerinin Sekans Analizi.....	39

4.2. Tartışma..... 44
4.2.1. RNA Düzenlemesinin FACS Analizi İle Tespiti..... 44
4.2.2. Farklılaştırılmış Caco-2 Hücrelerinden RNA Ekstraksiyonu ve cDNA Sentezi..... 44
4.2.3. Knock-out Edilmiş Hücrelerinin Sekans Analizi..... 45
5. SONUÇ VE ÖNERİLER..... 47
5.1. Sonuçlar..... 47
5.1.1. RNA Düzenlemesinin FACS Analizi İle Tespiti..... 47
5.1.2. Farklılaştırılmış Caco-2 Hücrelerinden RNA Ekstraksiyonu ve cDNA Sentezi..... 47
5.1.3. Knock-out Edilmiş Hücrelerinin Sekans Analizi..... 47
5.2. Öneriler..... 47
6. KAYNAKLAR..... 49
EKLER..... 55
ÖZGEÇMİŞ..... 59

ÖZET

APOBEC1 ENZİMİ VE YARDIMCI KOFAKTÖRLERİ İÇİN HÜCRESEL KLONLARIN ÜRETİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mahmut ÖZER

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2018

Bu çalışmada, RNA düzenleme enzimi APOBEC1 tarafından indüklenen RNA düzenlemesinin analizi için uygun bir hücresel model oluşturma amaçlanmıştır. "RNA düzenleme" terimi, DNA üzerinde bulunan nükleotidler tarafından belirlenen RNA nükleotid dizilerinden farklı olan dizilerin oluşmasına yol açan sayısız hücresel süreçleri tarif etmek için kullanılmıştır. RNA'ları etkileyen bu süreçler, değişikliğe uğramış transkriptlerin fonksiyonunu veya kodlama potansiyelini değiştirmekle beraber bu modifikasyonların elde edildiği hücresel mekanizmaların karakterize edilmesinde önemli ilerlemeler kaydedilmiştir.

Genel olarak, bu çalışma araştırmanın iki yönünü ele almaktadır. Birincisi, apolipoprotein B'nin mRNA düzenlemesinin *in vivo* olarak gerçekleştiği ince bağırsak enterositlerine fenotipik olarak benzemelerini sağlamak amacıyla belirli kültür ortamında Transwell filtreleri üzerinde kültürlenen Caco-2 hücrelerinin hücre farklılaşmasına yönelik koşulların düzenlemesi ile ilgilidir. Bu nedenle, APOBEC1 ve onun kofaktörleri olan ACF (Apobec1 Complementation Factor) ve RBM47'nin (RNA Binding Molecule 47) eksik olduğu Caco-2 hücre klonları oluşturulmuştur.

Diğer yönüyle, bu araştırma editozom elementleri olan APOBEC1, ACF ve RBM47'yi kodlayan genleri inaktif hale getirme çalışmasını kapsamaktadır. Bu süreçte, bakteriyel CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)/Cas9 (CRISPR-associated 9) sisteminden türetilen çok popüler bir genom düzenleme aracını kullanılmıştır. Son aşamada ise, APOBEC1, ACF ve RBM47 proteinlerinin eksik olduğu Caco-2 hücreleri, knock-out edilmiş ilgili genlerin dizi analizi için spesifik bir ortamda kültürlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Caco-2, RNA Düzenlemesi, Hücre Farklılaşması, CRISPR/Cas9, Gen Susturma

ABSTRACT

GENERATION OF CELLULAR CLONES FOR APOBEC1 ENZYME AND AUXILIARY COFACTORS

MSc. THESIS

Mahmut ÖZER

DEPARTMENT OF BIOLOGY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DICLE UNIVERSITY

2018

In this study, we aimed the generation of a cellular model suitable for the analysis of RNA editing induced by the RNA editing enzyme APOBEC1. The term RNA editing has been used to describe numerous cellular processes that result in the modification of RNA sequences differing from that designated by their DNA templates. These processes, affecting RNAs can alter the function or coding potential of the modified transcripts, and significant advances have been made in characterizing the largely unrelated cellular mechanisms by which these modifications are achieved.

Overall, my study focused on two aspects of this research. The first one regards the setting up of the conditions for the cytodifferentiation of Caco-2 cells on Transwell filters in specific culture medium to allow them to resemble phenotypically the small intestine enterocytes where the mRNA editing of apolipoprotein B takes place *in vivo*. Therefore, we have generated clones of Caco-2 cells which are deficient for APOBEC1 and its cofactors namely ACF (Apobec1 Complementation Factor) and RBM47 (RNA Binding Molecule 47).

The other aspect regards the work to inactivate the genes that code for the elements of editosome, namely APOBEC1, ACF and RBM47. During this process, we used a very recent and popular genome editing tool derived from the bacterial CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)/Cas9 (CRISPR-associated 9) system. At the final step, APOBEC1, ACF and RBM47 deficient Caco-2 cells have been cultured in specific media ultimately for the sequence analysis of knocked-out genes.

Key Words: Caco-2, RNA Editing, Cytodifferentiation, CRISPR/Cas9, Gene Silencing

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge No		Sayfa
Çizelge 1.1.	AID/APOBEC ailesi üyeleri	2
Çizelge 3.1.	% 20 FBS DMEM ortamı için kullanılan malzemeler ve miktarlar	26
Çizelge 3.2.	Caco-2 hücrelerinin hA1, RBM47 ve ACF genlerini nakavt etmek için elektroporasyonda kullanılan plazmitler ve fonksiyonları	26
Çizelge 3.3.	PCR amplifikasyonunda kullanılan primerler	27
Çizelge 3.4.	APOBEC1 geninin knock-out edilmesi için kullanılan plazmitler ve miktarları	30
Çizelge 3.5.	Blastisidin direnci esas alınarak ACF and RBM47 genlerinin knock-out edilmesi için kullanılan plazmitler ve miktarları	31
Çizelge 3.6.	Püromisin direnci esas alınarak ACF and RBM47 genlerinin knock-out edilmesi için kullanılan plazmitler ve miktarları	31
Çizelge 3.7.	Kullanılan Tripsin-EDTA, DPBS ve besiyerinin miktarları	32
Çizelge 3.8.	PCR'da kullanılan reaksiyon karışımı	33
Çizelge 3.9.	PCR için kullanılan termosikler koşulları	33

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 1.1.	Hidrolitik deaminasyon yoluyla RNA Düzenlemesi	5
Şekil 1.2.	Minimal editozom modeli	7
Şekil 1.3.	C→U editozom holoenzim modeli	7
Şekil 1.4.	Cas9/gRNA kompleksinin çalışma şeması	13
Şekil 1.5.	Bir doku kültürü eklentisi üzerinde Caco-2 hücrelerinin çizimi	15
Şekil 2.1.	Severi ve Conticello (2015)'in Bulguları	18
Şekil 2.2.	Nükleazlar tarafından modifiye edilen hücrelerin zenginleştirilmesi için vekil raportörlerin kullanımı prensibi	24
Şekil 2.3.	Vekil hedefleri kullanarak CH12F3 hücrelerinin zenginleştirilmesi	24
Şekil 3.1.	Çalışma Planı	29
Şekil 4.1.	RNA Düzenlemesinin FACS analizi ile tespiti	38
Şekil 4.2.	Farklılaşan Caco2 hücrelerinde APOBEC1 ekspresyonu	38
Şekil 4.3.	Farklılaşan Caco2 hücrelerinde apoB Düzenlemesi	38
Şekil 4.4.	Knock-out edilmiş olan *hA1*geninin jel elektroforezi	39
Şekil 4.5.	Knock-out edilmiş olan *acf* geninin jel elektroforezi	40
Şekil 4.6.	Knock-out edilmiş olan *rbm47* geninin jel elektroforezi	40
Şekil 4.7.	Knock-out edilmiş olan *hA1*geninin sekans analizi	41
Şekil 4.8.	Knock-out edilmiş olan *acf* geninin sekans analizi	42
Şekil 4.9.	Knock-out edilmiş olan *rbm47*geninin sekans analizi	43

EK LİSTESİ

Ek No		Sayfa
EK.1.	Kullanılan cihazlar	55
EK.2.	Kullanılan kimyasal maddeler	57

KISALTMA VE SİMGELER

ACF	:	APOBEC-1 Complementation Factor
ADAR1	:	Adenosine Deaminase acting on RNA
AID	:	Activation-induced cytidine deaminase
Aicda	:	Activation Induced Cytidine Deaminase gene
apoB	:	Apolipoprotein B
APOBEC1	:	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide1
Caco-2	:	Cancer Coli-2
Cas9	:	CRISPR associated 9
CRISPR	:	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat
crRNA	:	CRISPR RNA
DEPC	:	Diethylpyrocarbonate
DMEM	:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DPBS	:	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
DSB	:	Double-Strand DNA Break
EAC	:	Esophageal Adenocarcinoma
EDTA	:	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
EGFP	:	Green Fluorescent Protein
EMEM	:	Eagle's Minimal Essential Medium
FACS	:	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FBS	:	Fetal Bovine Serum
GEO	:	Gene Expression Omnibus
HDR	:	Homology-Directed Repair
InDel	:	Insertion or Deletion
LDL	:	Low Density Lipoproteins
LINE	:	Long Interspersed Nuclear Elements
LTR	:	Long Terminal Repeat
NF1	:	Neurofibromatosis 1
NHEJ	:	Non-Homologous End Joining
PAM	:	Protospacer Adjacent Motif
PET	:	PolyEthylene-Terephtalate
RBM47	:	RNA Binding Motif 47
RFP	:	Red Fluorescent Protein
sgRNA	:	single guide RNA
SINE	:	Short Interspersed Nuclear Elements
TALEN	:	Transcription Activator-Like Effector-based Nucleases
tracrRNA	:	trans-activating CRISPR RNA
VLDL	:	Very Low Density Lipoproteins
ZFN	:	Zinc Finger Nucleases

1. GİRİŞ

1.1. Genel Olarak Düzenleme

Moleküler biyolojide santral dogma, genetik bilginin genomik DNA'dan mesajcı RNA'ya oradan da hücre yapı ve fonksiyonunu etkileyen üç boyutlu proteinlere aktarılmasını tanımlar. Epigenetik, bir zamanlar proteinlerin oluşmasında kalıp görevi gören RNA'ların oluşumuna sebep olduğunu düşündüğümüz genomun aslında oldukça dinamik ve DNA, RNA, proteinler ve zamansal etkileşimlerin birlikte rol aldığı çoklu bir etkileşimin merkezinde olduğu kanaatini uyandırdı. Özellikle, hücrede işleyen sisteme esneklik sağlayan ve çevresel-epigenom etkileşimleri için bir araç sayılan kapsamlı bir RNA ve DNA düzenlemesinin varlığı ortaya çıkmıştır (Avesson ve Barry 2014).

DNA ve RNA düzenleme yolakları, antijene bağlı antikor çeşitlendirme süreçleri, retroviral kontrol, çevresel olarak tetiklenen genomik ve epigenomik modülasyon, fizyolojik adaptasyon ve bilinç gibi çok çeşitli gelişimsel ve post-gelişimsel süreçlerin düzenlenmesini sağlamak amacıyla evrimleşmiştir (Avesson ve Barry 2014; Conticello 2008; Mattick ve Mehler 2008).

1.2. DNA Düzenlenmesi

Geleneksel olarak, genomik veriler "salt okunur" olarak kabul edilir. Proteomumuzun önemli bir kısmı genomik planı korumak, okumak ve yürütmek için tahsis edilmiştir. Bu durumun bir organizma içindeki tüm hücreler için aynı olması beklenirdi, ancak bir protein ailesi DNA içeriğini yeniden yazarak salt okunur dogmaya meydan okumaktadır. AID (activation-induced cytidine deaminase)/APOBECs (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide) enzim ailesi "DNA düzenlenmesi" diye adlandırılan bir süreçte tek iplikli DNA üzerinde nükleotit sekansını deoksisitidinleri enzimatik olarak deoksiüridine dönüştürerek değiştirebilir (Knisbacher ve ark. 2015). İnsanda 11 enzimden oluşan ve Çizelge 1.1.'de gösterilen bu enzim ailesi AID, APOBEC1, APOBEC2, APOBEC3A, APOBEC3B, APOBEC3C, APOBEC3D (APOBEC3DE), APOBEC3F, APOBEC3G, APOBEC3H ve APOBEC4 proteinlerinden oluşmaktadır (Conticello 2008).

.

Çizelge 1.1. AID/APOBEC ailesi üyeleri

İnsan AID/APOBEC paralogları							
Adı	**Genomik lokasyon**	**Ekzon**	**Deaminaz domainleri**	**Ekspresyon**	**Hücresel lokalizasyon**	**Düzenleme aktivitesi**	**Hedef**
AID	12p13	5	1	Aktive edilmiş B hücreleri, testisler	Başlıca sitoplazmik, çekirdekte çalışır	DNA	İmmunoglobulin gen
APOBECI	12p13.1	5	1	İnce bağırsak	Sitoplazmik / nüklear, çekirdekte çalışır	RNA, DNA	Apolipoprotein B, mRNA
APOBEC2	6p21	3	1	İskelet kası, kalp	Sitoplazmik / nüklear	Bilinmiyor	Bilinmiyor
APOBEC3A	22q13.1	5	1	Keratonistler, kan	Sitoplazmik / nüklear	DNA	
APOBEC3B	22q13.1	8	2	Bağısak, uterus, meme bezi, keratonisitler,	Ağırlıklı olarak nüklear	DNA	Retrovirüsler, retrotraspozonlar, HBV
APOBEC3C	22q13.1	4	1	Birçok doku	Sitoplazmik / nüklear	DNA	Retrovirüsler, retrotraspozonlar, HBV
APOBEC3DE	22q13.1	7	2	Tiroid, dalak, kan	Bilinmiyor	DNA	Retrovirüsler
APOBEC3F	22q13.1	8	2	Birçok doku	Sitoplazmik	DNA	Retrovirüsler, retrotraspozonlar, HBV
APOBEC3G	22q13.1	8	2	Birçok doku, T hücreleri	Sitoplazmik	DNA	Retrovirüsler, retrotraspozonlar, HBV
APOBEC3H	22q13.1	5	1	Kan, timüs, tiroid, plasenta	Bilinmiyor	DNA	Retrovirüsler
LOCI96469	12q23	1	2	Psödogenler (yalancı genler)	-	-	-
APOBEC4	1q25.3	2	1	Testis	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Bilinmiyor

AID, APOBEC1, APOBEC2 ve APOBEC3 alt gruplarını içeren AID/APOBEC familyası, RNA ve/veya DNA'da sitidin deaminleştirebilen üyeler içermektedir. Bu üyelerden örneğin adaptif ve doğuştan gelen immünite yolaklarını tetiklemek için DNA deaminasyonunu sağlayan AID ve APOBEC3 ve apolipoprotein B mRNA'sını

düzenleyen APOBEC1 enzimi değişik fizyolojik fonksiyonlar sergilerler (Conticello ve ark. 2008).

Bağışıklık sisteminin temel bir özelliği, reseptör çeşitliliği oluşturmak amacıyla DNA dizisinin değiştirilmesidir. Bu durum spesifik olarak dC→dG katalizini gerçekleştiren APOBEC sitidin deaminaz ailesi tarafından gerçekleştirilir. Bu nedenle AID aracılı DNA düzenlemesi, B hücrelerinde sınıf değişim rekombinasyonu, somatik hipermutasyon ya da gen dönüşümü ile antijen-güdümlü antikor çeşitlemesindeki temel rolü nedeniyle kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır. Asıl fonksiyonu apoB (Apolipoprotein-B) mRNA'sında bir sitozini deamine etmek olmasına rağmen, diğer bir aile üyesi APOBEC1'in de bakteriyel DNA'daki deoksisitozinlerin deaminasyonunu tetikleyebildiği de bildirilmiştir (Avesson ve Barry 2014; Conticello 2008; Mattick ve Mehler 2008; Harris ve ark. 2002).

Başka bir aile üyesi olan APOBEC3 proteinleri, memelilerde en başta retrovirüsler olmak üzere virüsler ve transpoze edilebilen elementler gibi mobil genetik elementlere karşı doğal savunmada hayati bir rol oynamaktadır (Knisbacher ve ark. 2015). Örnek olarak APOBEC3G, antiviral özelliklere sahiptir ve ters transkripsiyon sırasında HIV-1 DNA'sının negatif dizisini hipermutasyona uğratarak virüsü etkisiz hale getirmektedir (Avesson ve Barry 2014). Sonuç olarak, viral genom hücrenin genomuna entegrasyonu engellenmekte ve hücre genomuna nadiren de olsa entegre olabilen retrotranskriptler mutasyona uğratılarak fonksiyonsuz hale getirilmektedir (Conticello 2008).

Ek olarak, transpoze genetik elementler olan retroelementler, çoğu ökaryotik genomun önemli bir kısmını içerir ve bu oran memelilerde genomik kütlenin yarısına yaklaşır. Bu endojen retrovirüs benzeri elemanlar, konakçı genomunda ters transkripsiyon içeren bir kopyala-yapıştır mekanizması ile çoğalırlar. Yeni retrotransposon insersiyonları, konakçı genom için zararlı olabilmekte ve bu nedenle çoklu genom-savunma mekanizmalarının gelişmesine yol açmaktadır. Deneysel çalışmalar, üç ana sınıftan oluşan, LTR (long terminal repeat) retrotranspozonlar, LINE'ler ve SINE'lerin (long/short interspersed elements) entegrasyonunun APOBEC3 sınıfı enzimler tarafından durdurulabildiğini göstermiştir (Knisbacher ve ark. 2015).

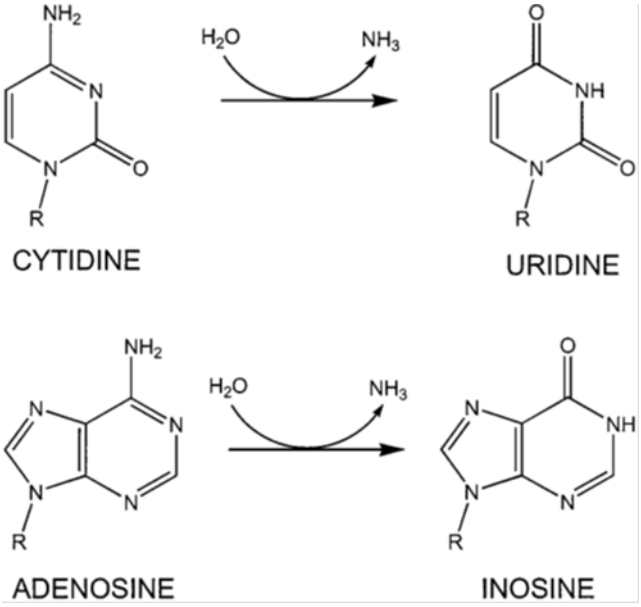
1.3. RNA Düzenlenmesi

Geçtiğimiz yıllarda ökaryotik mRNA ekspresyonunun ve regülasyonunun transkripsiyon, mRNA işleme ve transkriptlerin degredasyonunu içerdiği belgelenmiştir. Çoğu ökaryotik genlerden transkribe edilen RNA'lar RNA öncülerini olgun RNA türlerine dönüştürmek için gerekli olan çeşitli transkripsiyon sonrası RNA işleme olaylarına maruz kalabilirler (splicing, capping, polyadenilasyon). Transkriptom homeostazını etkileyen bu klasik mekanizmalara ek olarak, son yıllarda artan bir RNA düzenleme ve modifikasyon olayları ortaya çıkarılmıştır (Licht ve Jantsch 2016; Gott ve Emeson 2000).

Bunlardan en önemlisi olan RNA düzenleme neredeyse otuz yıl önce keşfedilmiş olan ve bir RNA molekülündeki kodlama özelliklerini değiştiren yapısal değişikliklerle ilişkili bir terimdir. Genellikle iki tip RNA düzenlemesinden bahsedilmektedir. Bu enzim katalizli reaksiyonlar arasında nükleotid ve oligonükleotid eklemeleri ve delesyonları ile baz modifikasyonları bulunur. Bir taraftan, ekleme-delesyon tipi düzenleme ile bir RNA molekülünden tek veya çoklu nükleotidler eklenir veya çıkarılır. Bu tür düzenleme çoğunlukla çeşitli filumların organellerinde bulunur.

Diğer taraftan, deaminasyon tipi düzenleme, şekil 1.1.'de gösterildiği gibi, sitozinleri sitidin deaminasyon enzimleri vasıtasıyla urasile ya da adenozinleri adenozin deaminasyon enzimleri vasıtasıyla inozine dönüştürür. Bu düzenleme, organizmaya, hücre tipi spesifik, gelişimsel olarak düzenlenmiş veya çevresel olarak indüklenmiş protein izoformları ekspresyonuna izin vererek fayda sağlar (Baysal ve ark. 2017; Tariq ve Jantsch 2012).

Bu reaksiyonların yarattığı kodlama izoformlarının çeşitliliği, yüksek organizmaların hücrelerinde bulunan protein çeşitliliğine katkıda bulunur. Örneğin, adenozin deaminasyonu, RNA'daki ilgili nükleotid pozisyonunda inozin üretir. İnozin, translasyon sırasında guanozin olarak algılandığından, bu reaksiyon, kodon değişikliklerine ve gende kodlanmamış aminoasitlerin gen ürününde yer almasına yol açabilir (Maydanovych ve Beal 2006).



Şekil 1.1. Hidrolitik deaminasyon yoluyla RNA düzenlenmesi

Çeşitli çalışmalar bu tip RNA düzenlemesinin gelişimde temel işlevleri olduğunu göstermiştir. Öyleki A→İ RNA düzenlemesinden sorumlu olan enzim olan ADAR1 (Adenosine Deaminase acting on RNA) barındırmayan farelerin embriyonik gelişim sırasında öldüğü, bozuk hematopoez, yaygın apoptoz ve karaciğer disintegrasyonu gösterdiği gözlenmiştir (Hartner ve ark. 2004). Bir diğer bilinen RNA düzenlemesi ise sitozinin urasile deaminasyonudur. RNA üzerinde C→U düzenlemesinin ilk ve en iyi bilinen örneği, bir sonraki bölümde ele alınacak olan APOBEC1 aracılı düzenlenen apoB mRNA düzenlenmesidir.

1.4. APOBEC1 Düzenlemesi

Apolipoprotein B (apoB) lipidleri vücutta bulunan tüm hücrelere taşımaktan sorumlu olan şilomikronlar, LDL (Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler) ve VLDL (Çok Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler) 'in zorunlu ve kilit protein bileşenidir. ApoB, ortak bir gen tarafından kodlanan iki ayrı formda bulunur. ApoB-100, karaciğerde LDL ve VLDL'nin ana protein bileşeni olarak sentezlenirken, apoB-48, şilomikronların bir bileşeni olarak ince bağırsakta üretilir (Chen ve ark. 1987). Yukarıda bahsedilen apoB'nin uzun ve kısa varyantı, sindirim yolundan vücuttaki dokuların geri kalanına kan dolaşımıyla lipit ve kolesterolün taşınmasında görev alır. ApoB'nin kısa şekli dokular tarafından kandan hızla temizlenirken, apoB uzun formu ile ilişkili kolesterol kanda

daha uzun süre kalır ve yüksek ateroskleroz riski ile ilişkili olan "kötü" kolesterole oksitlenebilir (Salter ve ark. 2016).

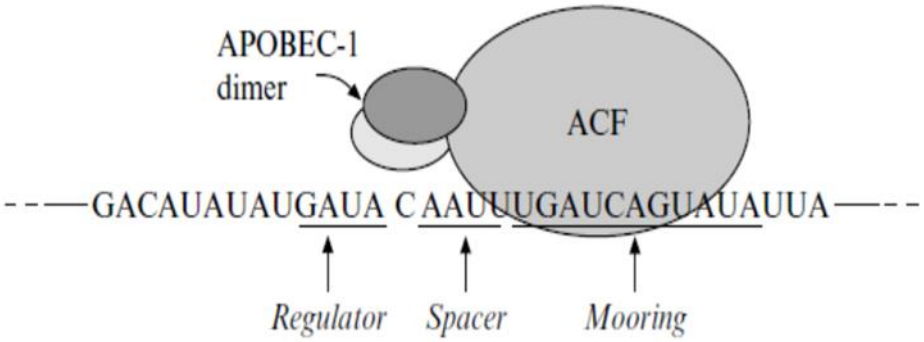
ApoB-48, çekirdekte apoB transkriptine bir translasyon durdurma kodonu getiren C→U deaminasyon reaksiyonunun sonucu olarak insan ince bağırsağı tarafından salgılanır. "ApoB mRNA düzenleme" olarak adlandırılan bu işlem, düşük yoğunluklu lipoproteinin LDL reseptörüne bağlanmasında rol oynadığı düşünülen apoB-100'teki alanların apoB-48'de var olmamasını sağlar. 6666. pozisyondaki sitozinden editlenmiş mRNA'dan eksprese olan protein, tam uzunluktaki apoB proteininin %48'idir çünkü öncül RNA üzerinde bu bölgedeki CAA kodonu bir UAA durdurma kodonuna düzenlenir. C_{6666}'nın deaminasyonundan sorumlu olan katalitik alt birim APOBEC1 ya da A1 (Apolipoprotein B editing catalytic subunit 1) olarak adlandırılır (Salter ve ark. 2016; Hirano ve ark. 1997).

APOBEC1, insan apolipoprotein B'nin transkriptinde C_{6666}'yı U'ya fizyolojik olarak deamine eden bu RNA düzenleme kompleksinin bir parçasıdır. APOBEC1, bu işlevi insanlarda ince bağırsakta ve kemirgenlerde karaciğerde yerine getirir (Saraconi ve ark. 2014). İnsanda *APOBEC1* geni 12p13.1 kromozomunda lokalize olup, 18 kb'lik bir alana yayılan ve hepsinin tercüme edildiği beş ekzon içerir. Bu gen 236 aminoasit uzunluğunda bir protein olan APOBEC1 enzimini kodlamaktadır (Hirano ve ark. 1997).

1.4.1. Editozom Kompleksinin Elemanları

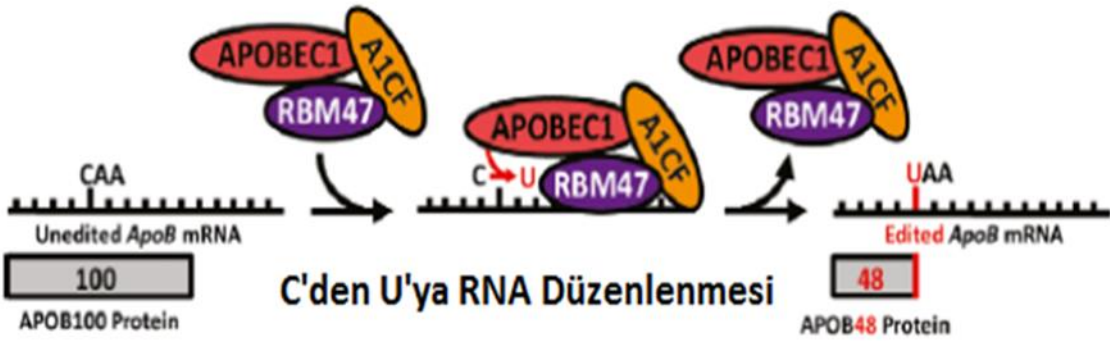
Editozom olarak adlandırılan C→U RNA düzenleme holo-enziminin minimal çekirdeği iki protein içerir; son derece korunmuş çinko-bağımlı 27 kDa ağırlığında bir enzim APOBEC-1 ve hedeflemenin özgüllüğünden sorumlu 64 kDa ağırlığında bir kofaktör ACF (APOBEC-1 Complementation Factor) (Smith 2007; Mehta ve ark. 2000) (Şekil 1.2.).

Daha yakın zamanda yukarıda belirtilen editozom kompleksine ek olarak bir kofaktör daha tespit edilmiştir. Bu 64 kDa ağırlığında, ACF'nin yerini alabilen ve APOBEC1 aracılı düzenleme için *in vitro* olarak gerekli olan yeni bir RNA bağlanma proteini RBM47'dir (RNA Binding Motif47 (Şekil 1.3.) (Fossat ve ark. 2014).



Şekil 1.2. Minimal editozom modeli

Memeli C→U mRNA düzenlemesi için diğer gereksinimler ise düzenleme bölgesinden aşağı doğru 6671 ila 6681 pozisyonlarında AU bakımından zengin bir "demirleme dizisi" içeren düzenleme motifi (UGAUCAGUAUA) (Smith 2007; Mehta ve ark. 2000), iki ila sekiz nükleotid arasında (optimal olarak dört nükleotid uzunluğunda) sitidin ve demirleme dizisi arasında yer alan bir "aralayıcı eleman" ve bir "arttırıcı bölge" dir (Chester ve ark. 2000).



Şekil 1.3. C→U editozom holoenzim modeli

1.5. APOBEC1 Düzenlemesi ve Kanser

AID/APOBEC ailesi, DNA dizilerini deoksisitidinleri deaminasyon yoluyla deoksiüridinlere dönüştüren proteinler içerir. AID/APOBEC'ler, bağışıklık yanıtını geliştiren, genomik istilacılara karşı duran ve genomik DNA'lardan epigenetik modifikasyonları kaldırarak gen regülasyonunu değiştiren güçlü araçlar olsalar da nükleik asitlere mutasyon ekleyebilme becerileri hücresel metabolizmada iki kenarı keskin bir bıçağı andırmaktadır. Kontrol edilemediklerinde, bu güçlü ajanların aşırı ifadesi genom stabilitesini tehdit edebilmekte ve sonunda kanser gelişimine yol

açabilmektedir. Bu durum DNA deaminasyon aktiviteleri nedeniyle APOBEC protein ailesi genlerinin proto-onkogenler olduğunuda düşündürmektedir (Knisbacher ve ark. 2015; Rebhandl ve ark. 2015; Conticello 2008; Navaratnam ve Sarwar 2006).

APOBEC1 ve kanser gelişimi arasındaki bu ilişki fareler üzerinde yapılan RNA düzenleme çalışmaları sırasında ortaya çıkmıştır. İnsanlarda, apoB mRNA düzenlemesi münferit olarak ince bağırsakta meydana gelirken, sıçan ve farelerde bu düzenleme karaciğerde de meydana gelmektedir. İlginçtir ki, sıçanlar koroner kalp hastalığına daha az duyarlıdır ve bu durum karaciğerlerindeki düzenlemenin onları arteroskleroza karşı koruyabileceğini düşündürmektedir. Birçok araştırma grubu, APOBEC-1'in arterosklerozla mücadelede bir gen terapisi aracı olarak kullanılmasının fizibilitesini belirlemek ve plazma LDL kolesterol seviyelerini azaltmak amacıyla APOBEC-1 mRNA'sını karaciğerde aşırı ifade etme girişimleri gerçekleştirmiştir. Yamanaka ve ark. (1995), APOBEC-1'i fare ve tavşanlarda aşırı ifade etmiştir. Karaciğerde APOBEC1'i aşırı eksprese eden transjenik fare ve tavşanlarda karaciğer displazisi ve birçok gelişmiş hepatosellüler karsinomun meydana geldiğini ortaya koymuşlardır. Bu durum, uygun olmayan RNA substrat düzenlenmesinin sonucu olarak ortaya çıkması ile açıklanmıştır (Chester ve ark. 2000). Sıçan hepatik hücre hatları üzerinde yapılan benzer bir çalışmada, APOBEC-1'in aşırı ekspresyonunun, apoB mRNA üzerindeki C_{6666}'nin düzenlemesinin verimliliğinin 3-6 kat stimülasyonu ile sonuçlandığı bulunmuştur. Bu hücre hatlarında asıl editlenme bölgesindeki sitozine ek olarak başka sitozinlerinde deamine edildiği görülmüştür. Bu "rasgele" düzenlemenin ortaya çıkışı ve verimliliği, APOBEC-1'in artan ifadesiyle artmıştır (Sowden ve ark. 1996).

APOBEC1 için tek iyi karakterize edilen hedef, apolipoprotein B mRNA'sıdır ancak bununla birlikte ek hedef mRNA'lar tespit edilmiştir (Severi and Conticello 2015). APOBEC1'in nörofibromatozis tip 1 (NF1) mRNA'sını da düzenlendiği kanıtlanmıştır. APOBEC1 mRNA'sının nörofibromatozis 1 hastalarının nöronal tümörlerinde eksprese edildiğine dair bulgular gastrointestinal kanalın içinde yer alan epitel hücreler dışında başka hücrelerde de *APOBEC1* geninin eksprese edildiğinin ilk kanıtıdır. NF1 mRNA'sında apoB mRNA demirleme dizisine benzer bir dizi tanımlanmıştır. Bu bölgede meydana gelen bir editleme 2914. pozisyondaki sitozini urasile dönüştürerek arjinin aminoasitini kodlayan CGA kodonunu bir çerçeve içi durdurma kodonuna, UGA'ya dönüştürür. *NF1* geni, RAS sinyal yolağının mitojenik

sinyalini bastırmak amacıyla bir tümör baskılayıcı protein olan nörofibromini kodlar. NF1 mRNA'sının düzenlenmesinin GTPaz aktive eden bölgenin kaybolması ve ortaya çıkacak olan proteinin kesintiye uğraması ve muhtemelen NF1 proteininin bir tümör baskılayıcı olarak işlev görme yeteneğini ortadan kaldırması ile sonuçlandığı tahmin edilmektedir (Peltonen ve ark. 2017; Mukhopadhyay ve ark. 2002; Skuse ve ark. 1996).

Öte yandan, RNA'nın dışında APOBEC1 DNA'daki sitozini *in vitro* olarak veya bakterilerdeki tek iplikli DNA'ya özgü olarak deamine edebilir. AID gibi, APOBEC1 ve bazı homologlarının dC deaminasyonu yoluyla DNA mutasyonunu tetiklediği görülmektedir. Bir bakteriyel deneyde DNA mutatörü olarak hareket etmesi elbette bu enzimin baskın fonksiyonunun DNA'yı modifiye etmek olduğunu göstermez. Aslında hem RNA'da bir sitozini deamine eden protein kompleksinin katalitik bileşeni olan APOBEC1'in DNA'daki dC'nin deaminasyonunu tetikleyebilmesi hem ilginç hem de beklenmedik bir durumdur. Bu nedenle, APOBEC ailesi proteinlerinin bazılarının DNA'yı hedef alan aktivitelerinin adaptif immünite, genom dizisindeki evrimsel değişiklikler ve istilacı nükleik asitlere karşı dirençte görev almasının yanı sıra kanserde de rol oynaması ihtimaldir (Petersen-Mahrt ve Neuberger 2003; Harris ve ark. 2002).

Bakterilerin yanı sıra insan APOBEC1 proteini omurgalı hücre hatlarındaki genomik DNA'da mutasyonları indükleyebilmektedir. Özofageal adenokarsinomlardaki (EAC'ler) APOBEC1 ekspresyon seviyeleri, APOBEC1'in en yüksek seviyelerde ifade edildiği ince bağırsakta gözlenenlere benzerdir. İlginç bir şekilde, adenokarsinomlarla yakından ilişkili bir durum olan Barrett özofagusunda belirgin bir APOBEC1 artışı görülmektedir (Saraconi ve ark. 2014).

Son olarak, insan APOBEC-1 geni normal olarak kendi mRNA transkriptinin yaklaşık %50'sinin ince bağırsakta alternatif eklendiğini gösterir. Elde edilen 36 amino asitlik proteinin, APOBEC-T, sadece ilk 6 amino asidi tam uzunlukta olan APOBEC-1 proteiniyle aynıdır ve sitidin deaminasyonu, RNA bağlanması veya RNA düzenlemesi için gerekli fonksiyonel motiflerin hiçbirini muhafaza etmemektedir. APOBEC-1 mRNA'sının alternatif olarak eklenmiş formunu (APOBEC-T) kodlayan mRNA seviyeleri kolon kanseri dokularında normal dokuya kıyasla artmaktadır (Lee ve ark. 1998).

1.6. Genom Düzenlenmesi ve CRISPR/Cas9 Sistemi

Genom düzenleme, DNA'nın bir kısmının silinmesi veya eklenmesi yoluyla genomu manipüle etmek için kullanılan güçlü bir araçtır. Geçmişte geliştirilen ilk genomik düzenleme araçları Çinko Parmak Nükleazları (Zinc Finger Nucleases-ZFN) ve Transkripsiyon Aktivatörü gibi efektör tabanlı nükleazlarıdır (Transcription Activator-Like Effector-based Nucleases-TALEN). Bu araçlar protein-DNA etkileşimlerine dayanmakta ve enzim mühendisliğini gerektirmektedir. Son yıllarda, başka bir genomik düzenleme aracı bakteriyel Kümelenmiş Düzenli Aralıklı Kısa Palindromik Tekrar (CRISPR)/CRISPR-ilişkili 9 (Cas9) sistemi temel alınarak tasarlanmıştır (Lau ve Davie 2017). Bu sistem Cas9 proteinini spesifik bir genomik bölgeye hedeflemek için kullanılan bir kılavuz RNA'dan (gRNA) oluşan ve genom mühendisliğinde kullanılan çok yönlü bir araçtır. Son yıllarda, bu RNA rehberli genom düzenleme teknolojisi, moleküler biyolojide devrim yaratan bir araç haline gelmiştir ve farklı alanlarda birçok yenilikçi uygulamaya sahiptir (Çetintaş ve ark. 2017).

Patojenler, özellikle virüsler, gelişmiş organizmalarda oldukları gibi tek hücreli organizmalar için bir tehdit oluşturmaktadırlar. Bu bakımdan, tek hücreli organizmaların genomlarını virüslere karşı korumak için bir savunma sistemine sahip olmaları gerekmektedir. Yirmi yıl önce, bakterilerin bağışıklık sistemi olarak sadece doğal restriksüyon enzimlerine sahip oldukları bilinmekteydi. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar, bakterilerin, karşılaştıkları patojenlere karşı adaptif bir bağışıklık sistemi geliştirebildiğini göstermiştir. CRISPR tabanlı bağışıklık olarak bilinen bu yöntem hücrenin CRISPR lokusuna kısa virüs sekanslarını entegre ederek hücrenin enfeksiyonları hatırlamasını, tanımasını ve temizlemesini sağlamaktadır (Rath ve ark. 2015).

CRISPR lokusu ilk defa Ishino ve meslektaşları tarafından *Escherichia coli*'de *iap* geni tarafından kodlanan proteinleri tanımlamak amacıyla bu geni sekansladıklarında gözlenmiştir. Sekanslama sırasında, *iap* geninin 3' ucu yan bölgesinde sıra dışı bir yapı bulunduğunu keşfettiler. 29 nükleotitlik beş homolog sekansın 32 nükleotid aralıkla direkt tekrarlar şeklinde sıralandığını tespit ettiler (Ishino ve ark. 1987). *Streptococcus pyogenes*'de Cas9 proteininin keşfinden sonra, Jinek ve ark. (2012) CRISPR/Cas9 sistemini genom düzenleme amaçlı bir teknik olarak

manipüle ettiler. O zamandan bu yana CRISPR-Cas9 sistemi daha fazla manipüle edilerek genomik düzenleme ve gen terapisi gibi diğer genomik uygulamalarda kullanılmaya başlandı.

CRISPR-Cas sistemleri genel olarak aynı uzunluktaki benzersiz "aralayıcılar" ile birbirinden ayrılmış 20 ila 50 baz çiftinden oluşan ve AT bakımından zengin "lider" sekansların ardından gelen CRISPR dizisi olarak adlandırılan bir genomik lokusla tanımlanır. Yabancı DNA'daki aralıklar ile eşleşen ara parçalar ise "proto-aralayıcılar" olarak adlandırılır (Wright ve ark. 2016).

CRISPR sisteminin bir diğer önemli bileşeni ise Cas gen bölgeleridir. Fonksiyonları prokaryotik bağışıklık sistemi için çok önemli olan Cas genleri, genellikle CRISPR sisteminin yakınında bulunmaktadır. Cas proteinlerinin helikaz ve nükleaz özelliklerinin varlığı DNA dizilerinin açılmasına ve kesilmesine imkân sağlamaktadır. Bu bağlamda, Cas proteinleri nükleik asitler ile etkileşir ve nükleaz, helikaz veya RNA bağlayıcı proteinler olarak hareket edebilir. Bağışıklık yanıtının her aşaması için spesifik olan farklı Cas proteinleri bulunmaktadır. Tip I, Tip II ve Tip III CRISPR-Cas sistemleri, CRISPR lokuslarının sayısı ve içerdiği Cas proteinlerindeki farklılıklar dikkate alınarak tanımlanmıştır (Çetintaş ve ark. 2017).

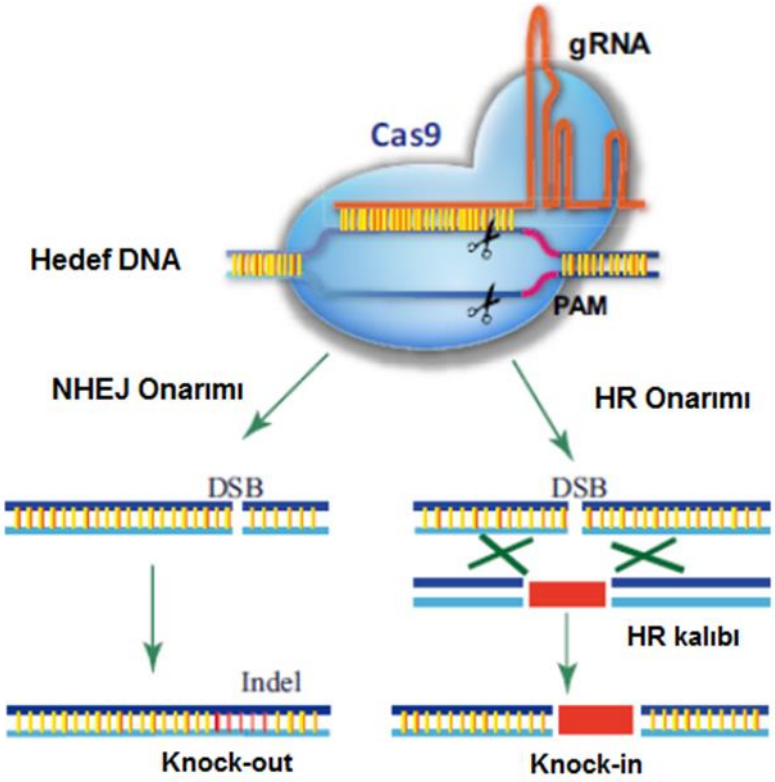
Bu tez çalışmasının kısıtlılıkları nedeniyle, sadece Tip II CRISPR-Cas sistemi ele alınacaktır. Farklı CRISPR-Cas sisteminin en dikkat çeken yanıyla tip II sisteminin bileşenleri ve yardımcı proteini Cas9 heterolog sistemlerde uygulamalar için uyarlanmıştır. Prokaryotlarda, Cas9, yabancı DNA dizilerinin yerel dizilere entegrasyonunu engellemek ve DNA hedeflerinin RNA-rehberli temizlenmezi (protoaralayıcılar) gibi birçok savunma mekanizmasında yer almaktadır. Programlanabilir bir nükleaz olarak *Streptococcus pyogenes*'den elde edilen Cas9, ökaryotik genom ve epigenomun manipüle edilmesi için yaygın olarak kullanılan bir araç haline gelmiştir. Cas9 enzimleri, CRISPR RNA (crRNA), ve trans-aktive edici crRNA (tracrRNA) diye adlandırılan bir çift RNA'dan oluşan bir kompleks yoluyla yönlendirilir. *İn vitro* ve ayrıca ökaryotik uygulamalarda crRNA ve tracrRNA, DNA bölünmelerinin etkinliğini artırmak amacıyla tek bir kılavuz RNA (sgRNA) içine kaynaştırılabilir ve RNA güdümlü bir nükleaz olan Cas9 ile birlikte minimal bir fonksiyonel sistem oluşturur (Ran 2017).

Cas9 nükleazının RuvC ve HNH diye adlandırılan iki fonksiyonel endonükleaz bölgesi vardır. crRNA-kılavuz dizisine tamamlayıcı olan bölgelerde, Cas9 HNH nükleaz domaini komplementer ipliği keserken, Cas9 RuvC domaini komplementer olmayan ipliği ayırır (Jinek ve ark. 2012).

CRISPR-Cas sistemi yabancı ve yerel DNA'yı istilacı DNA'da bulunan ancak CRISPR lokusunda bulunmayan ve Protospacer Adjacent Motif (PAM) olarak adlandırılan bitişik bir DNA sekansını tanıyarak ayırır. Cas9 bölünme domainlerine ek olarak spesifik bir PAM (5'-NGG-3') tanıma alanına sahiptir ve bu hedef DNA'yı tanıma için kullanılır. Cas9-sgRNA kompleksi, Cas9'un C-terminal bölgesindeki iki korunmuş arjinin (R1333, R1335) yoluyla hedef DNA'nın PAM dizisine bağlanır (Lee ve Bae 2016).

Cas9 proteini gRNA'ya bağlandığında DNA substratını aramasına izin vermek amacıyla bir konformasyon değişikliğine uğrar. PAM'in tanınması, dsDNA PAM bölgesine doğru olan 5' ucundan başlayarak çift sarmalın açılmasına yardımcı olur. Açılmış olan DNA iplikleri protein/ssDNA (single stranded DNA) etkileşimi ile geçici olarak stabilize edilir. Tek iplikli DNA kısmı ile gRNA arasındaki başarılı baz eşleşmesi ssDNA ilmiğini daha da genişletir. Kritik bir ilmek boyutu Cas9'un hedef DNA'nın çift ipliği üzerinde kesikler yapmak üzere enzimatik aktivitesini tetikler (Double Strand Break- DSB). Sonrasında Cas9 DNA substratına bağlı kalmaya devam eder. ssDNA ve gRNA arasındaki baz eşleşmesi yanlış eşleşmeler tarafından engellenirse ssDNA ilmiği Cas9 proteinini serbest bırakmak üzere çöker (Shui ve ark. 2016).

Cas9 tarafından uygulanan çift sarmal kırığı genellikle o bölgede bir ekleme veya çıkarma (InDel) oluşturur ve hata eğilimli homolog olmayan birleştirme (Non Homologous End Joining Repair-NHEJ) yolu ile onarılır. Böylece o gen knock-out edilmiş olur. Eğer gen "knock-in" deneylerinde olduğu gibi, hedef bölgedeki dizilime homolojiye sahip bir donör DNA fragmanı mevcutsa, çift sarmal kırığı donör DNA'yı bir şablon olarak kullanarak homoloji-yönelimli onarım (Homology Dependent Repair-HDR) vasıtasıyla onarılır. Sonuç olarak, donör bölgenin dizisi çift sarmal kırığının gerçekleştiği bölgede genoma entegre edilir (Şekil 1.4.) (Ding ve ark. 2016).



Şekil 1.4. Cas9/gRNA kompleksinin çalışma şeması

Farklı gRNA'lar ve Cas9 formları CRISPR/Cas9 uygulamaları için kullanılabildiğinden, bu sistem birçok genetik mühendisliği çalışmaları için uygundur. CRISPR/Cas9 teknolojisi, ilk bakışta gen ekstraksiyon/gen ekleme gibi düzenleyici yönlere odaklanmış gibi görünse de, kromozom yeniden düzenlemeleri, transkripsiyon aktivasyonu/baskılanması ve epigenetik regülasyon gibi farklı amaçlar için de kullanılabimektedir. Cas9 sisteminin terapötik olarak kullanılması için bir potansiyelde vardır. Antimikrobiyal ajan olarak geliştirilen Cas9, bakteriyel antibiyotik dirençli veya yüksek virülans hedefleme suşlarında kullanılabilmektedir (Çetintaş ve ark. 2017).

Onkogenlerdeki ve tümör baskılayıcılarındaki mutasyonlar kansere yol açan olağan şüpheliler arasındadır. Kanser çalışmalarında ise CRISPR teknolojisinin potansiyel uygulamaları, onkogenlerin ve tümör süpresör genlerinin Fonksiyon Kazanımı ve Fonksiyon Kaybı mutasyonları da dâhil olmak üzere mutasyonları düzeltmeyi amaçlamaktadır (Çetintaş ve ark. 2017; Roberts ve Gordenin 2014).

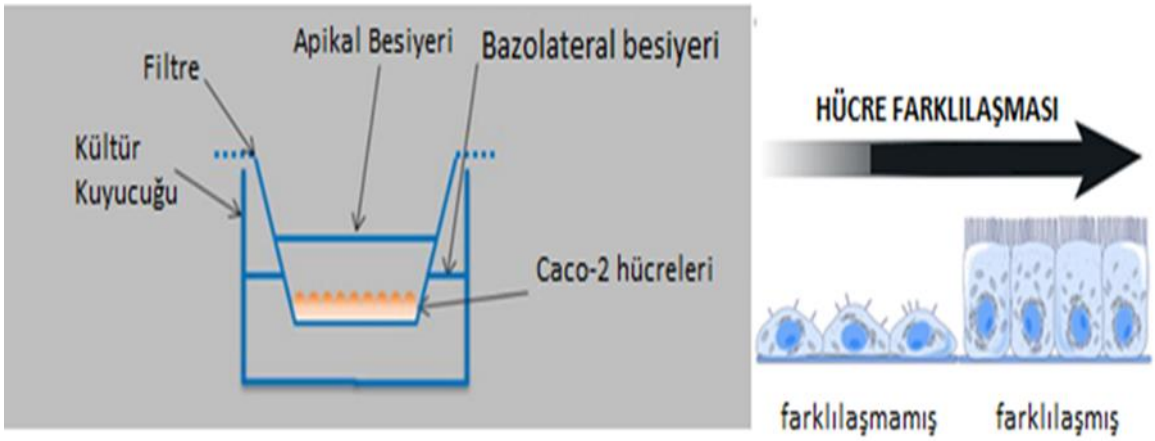
1.7. Caco-2 Hücreleri ve Hücre Farklılaşması

1970'lerde, gastrointestinal tümörlerden çeşitli epitel hücre hatları kuruldu. Amaç kanser gelişiminde mekanizmaların ve bunlara bağlı sitoterapinin etkilerini

incelemekti. Hücre hatlarının bir kısmı ortama sentetik veya biyolojik faktörlerin eklenmesiyle kısmen ayrıştırılabilmekte ancak bu hatlardan bir tanesi olan Caco-2 (Cancer coli-2) belirli bir taşıma kapasitesine ulaştığında kendiliğinden farklılaşabilmesi itibariyle oldukça değerliydi. Parental hücre hattı Caco-2, Sloan-Kettering Kanser Araştırma Enstitüsü'nde Jorgen Fogh tarafından 72 yaşındaki yetişkin bir Kafkasyalı erkeğin kolorektal adenokarsinomundan elde edilmiştir (Verhoeckx 2015). Bu çalışmadan beri, özellikle son yıllarda Caco-2 hücreleri intestinal epitelyum hücrelerinin *in vitro* modeli olarak kullanılmaktadır. Bu hücre hattı 21 gün boyunca kültürlendiğinde, kendiliğinden hücre döngüsü tutukluğuna uğrar ve polarize enterosit benzeri tek bir hücre tabakasına dönüşür. Kültür içerisinde bu hücreler boşluksuz bağlantılar oluşturur, spontane olarak farklılaşır, yüksek seviyelerde fırça sınır sindirim enzimleri (brush border digestive enzymes) salgılar ve bağırsak enterositlerine benzer başka morfolojik, yapısal ve fonksiyonel özellikler sergilerler (Leoni ve ark. 2012; Sambuy ve ark. 2005; Olejnik ve ark. 2003).

Caco-2 hücreleri polikarbonat, polyester veya polietilen tereftalattan yapılabilen geçirgen filtreler üzerinde kültürlenebilir. Caco-2 hücrelerinin filtre destekleri üzerinde yetiştirilmesi, onların morfolojik ve fonksiyonel olarak farklılaşmasını sağlar. Farklılaşma amacıyla hücreler şeffaf polietilen-tereftalat (PET) membran ekleri üzerinde tohumlanır ve besi yeri içinde 21 gün boyunca tutulur. Besi yeri haftada üç kez değiştirilir ve bu koşullarda hücreler 3 gün içinde taşıma kapasitesine ulaşır. Sonuç olarak hücreler Şekil 1.5'te gösterildiği gibi 21 gün içinde tamamen farklılaşır (Natoli ve ark. 2012; Olejnik ve ark. 2003).

Caco-2 hücre kültürleri ayrıca insan ince bağırsak hücre farklılaşması sırasında editleme aktivitesinin indüksiyonu için *in vitro* bir model olarak kullanılmıştır. Plastik tabaklar üzerinde kültürlendiğinde Caco-2 hücreleri sadece apoB-100 üretir. Bu hücrelerden elde edilen cDNA apoB-48'in translasyonu için gerekli olan dur kodonuna sahip değildir.



Şekil 1.5. Bir doku kültürü eklentisi üzerinde Caco-2 hücrelerinin çizimi

Ancak, farklılaştıklarında, Caco-2 hücreleri apolipoprotein-B ile etkileşen şilomikron benzeri lipoprotein partikülleri salgılarlar. Bu farklılaşma apoB mRNA'nın belirli bir bölgesine özgü sitozinin (C_{6666}) urasile editlenerek translasyonel bir dur kodonuna (CAA→UAA) dönüşmesi sonucu oluşur. Bu fenotipin oluşması editlenmeyi katalize eden sitidin deaminaz olan APOBEC1 hem de RNA editlenmesinde ilgili bölgeyi tanımaya yardımcı protein olan ACF'nin (APOBEC1 Complementation Factor) ekspresyonunu gerektirir (Severi ve Conticello 2015; Galloway ve Smith 2010; Jiao ve ark. 1990).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. RNA Düzenleme

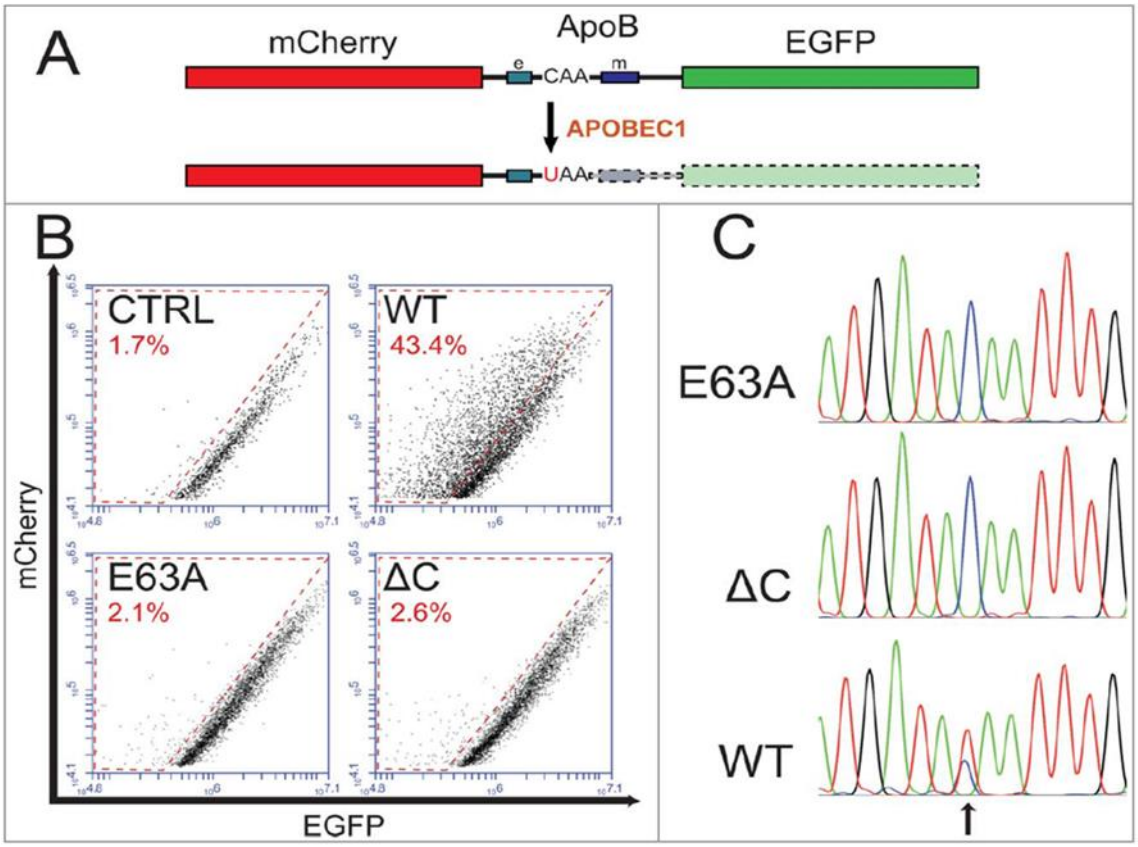
RNA düzenleme genel olarak, RNA ekleme ve poliadenilasyon gibi süreçlerden kaynaklanan değişiklikler hariç, kalıptan kopyalanmış bir RNA dizisindeki herhangi bir yere özgü değişiklik olarak tanımlanabilir. Düzenlemeye dayanan gen ekspresyonundaki değişiklikler, tüm hücre bölmelerinde mevcut olan mRNA, tRNA ve rRNA'yı etkileyebilir. Nükleotidlerin eklenmesi ve silinmesini ve ya bir bazın diğerine dönüştürülmesini içeren bu dizi gözden geçirmeleri, geniş ölçüde birbiriyle alakalı olmayan mekanizmalar içerir. Şimdiye kadar tanımlanmış olan RNA düzenlemelerin çoğu, mRNA dizilerindeki değişiklikleri içerir ve değişikliğe uğramış protein ürünlerinin ortaya çıkması ile sonuçlanmıştır (Gott ve Emeson 2000). Adenozinin 6. karbonu ve sitidinin 4. karbonundaki deaminasyon RNA düzenlemesi amacıyla gerçekleşen baz modifikasyonuna örnektir (Maydanovych ve Beal 2006).

Smith ve ark. (1997) göre, sırasıyla Chen ve ark. (1987) tarafından ince bağırsakta, Powell ve ark. (1987) tarafından karaciğerde ve Sommer ve ark. (1991) tarafından merkezi sinir sistemlerinde gerçekleşen deaminasyon yoluyla bölgeye özgü baz modifikasyonun keşfi RNA düzenlemesine dikkatleri çekmiştir. Özellikle Chen ve ark. (1987) tarafından yapılan çalışma bu yüksek lisans tezine konu olmuştur.

2.2. APOBEC1 Düzenleme

RNA düzenlemesinin bilinen ilk örneği, Chen ve ark. (1987) ve Powell ve ark. (1987) tarafından gerçekleştirilen, apoB pre-mRNA'sının düzenlenmesidir. Bu araştırmacılar apoB mRNA düzenlemesinin ilgili mRNA transkriptinde bulunan belirli bir sitidinin (6666. nükleotit) üridine deaminasyonu olarak tespit etmişlerdir. Bu deaminasyon, bir glutamin kodonunu (CAA) bir sonlandırma kodonuna (UAA) dönüştürür ve tam uzunlukta genomik olarak kodlanmış apoB'nin (apo-B100) yaklaşık yarısı kadar bir apoB (apo-B48) proteininin oluşumuyla sonuçlanır. Teng ve arkadaşları tarafından 1993 yılında 6666. sitozinin deaminasyonundan sorumlu bir katalitik alt birimin olduğu keşfedilmiştir ve bu katalitik yapı Davidson ve arkadaşları tarafından 1995 yılında, APOBEC protein ailesinin bilinen ilk üyesi olan apolipoprotein B düzenleme katalitik altbirim 1 (APOBEC1) olarak adlandırılmıştır.

APOBEC1'in apoB mRNA düzenlemesini niceliksel olarak canlı hücrelerde test etmek amacıyla, Severi ve Conticello (2015) bir yöntem geliştirmişlerdir**.** Bu yöntemde, apoB mRNA'sı üzerinde RNA düzenlemesinin gerçekleştiği yaklaşık 300 bp'lik bir fragmanı içeren bir çift floresan mCherry-EGFP kimerik yapı kullanmışlardır. APOBEC1 ile apoB fragmanının RNA düzenlemesine neden olan bu kimerayı birlikte eksprese etmişlerdir. mCherry ve EGFP arasına yerleştirilen fragman üzerinde bir dur kodonunun editlenme yoluyla ortaya çıkması EGFP floresanının eksprese edilmemesine ve dolayısıyla kaybına neden olmuştur. Bu düzenleme olayını hepatosit kaynaklı kanser hücreleri olan Huh-7 hücrelerinde denemişlerdir. APOBEC1 ve onun kofaktörleri tarafından apoB mRNA'sının düzenlenmesinin bir sonucu olarak EGFP olmaksızın mCherry-ApoB chimera ifadesinin arttığını göstermişlerdir. Bulguları Şekil 2.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Severi ve Conticello (2015)'in Bulguları

Şeklin A kısmı kimerik transkriptin şematik gösterilmesini temsil etmektedir. APOBEC1 tarafından gerçekleşen RNA düzenlemesi, EGFP kodlama dizisinin translasyonunu bloke eden bir durdurma kodonunu oluşturur. EGFP kaybı RNA düzenleme seviyesinin göstergesi iken, mCherry proteini transfeksiyon seviyesi için bir

kontrol görevi görür. Baz modifikasyonu yapılan bölgenin sağ ve sol kenarındaki sırasıyla “e” ve “m” ile işaretlenen kutucuklar, etkinlik ve bağlama sekansını gösterir. Şekilde B kısmı ise HuH-7 hücrelerinin bir taraftan mCherry-ApoB-EGFP ile geçici olarak transfekte edilirken diğer taraftan sırasıyla fare APOBEC1’i, katalitik olarak inaktif bir APOBEC1 mutantı (E63A), C-terminalinde 40 aminoasiti eksik bir mutant ve kontrol plazmitleri ile transfekte edilmesinin ardından elde edilen FACS analizini temsil etmektedir. Sadece fare APOBEC1’i ile transfekte edilmiş olan hücrelerde EGFP seviyelerinde azalma gözlenmiş ve bu durum mCherry/EGFP diyagonalında bir kaymayla tespit edilmiştir. Son olarak şekildeki C kısmı, ya kontrol plazmitleri ile ya da APOBEC1 ile transfekte olan hücrelerdeki mCherry-ApoB-EGFP transkriptinin düzenlenme bölgesinin kromatogramlarını gösterir. APOBEC1 örneğinde kromatogramda C→U deaminasyonuna karşılık gelen okla işaretlenmiş bölgede bir "çift tepe" gözlenir.

2.3. ApoB Düzenleme Elemanları

Hodges ve ark. (1991) tarafından sıçan bağırsak hücrelerinden elde edilen enterosit S100 ekstraktlarınının in vitro analizi ve ardından Johnson ve ark. (1993) tarafından kullanılan radyoaktif-işaretli apoB mRNA substratları sayesinde araştırmacılar apoB mRNA’sını düzenleyen mekanizmanın ilgili mRNA üzerindeki 6666. sitozinin 4. karbon konumunda hidrolitik deaminasyon youlyla bu düzenlenmenin gerçekleştiğini görebilmişlerdir.

Smith ve ark. (2012), yaptıkları çalışmada apolipoprotein-B mRNA'sındaki 6666. sitozinin bu deaminasyonunu düzenleme alanının aşağı akış yönünde bir 11 nükleotitlik bağlanma dizisini tanıyan bir editozom kompleksi tarafından katalizlenmektedir. Bu katalitik yapının alt birimi olan APOBEC1 proteininin sitidin deaminaz aktivitesi olduğunu ancak apoB mRNA’sını düzenlemek için ek proteinler gerektiğini bildirmişlerdir. Mehta ve ark. (2000), APOBEC1 Tamamlama Faktörü’nün (ACF) yeni bir RNA bağlayıcı protein olduğunu, *in vitro* ve *in vivo* ortamlarda apoB mRNA'sındaki bağlanma dizisine bağlanarak ve hedef sitidini deamine etmek amacıyla APOBEC1'i bu bölgeye yerleştirdiğini göstermişlerdir. Daha yakın bir zamanda Blanc ve ark. (2005), apoB RNA'sının C→U düzenlemesinde ACF gereksinimini belirlemek için farelerde hedeflenmiş *acf* geninin silinmesini gerçekleştirmişlerdir. Elde ettikleri

sonuçlara göre, heterozigot ACF +/- farelerin görünüşte sağlıklı ve verimli olmasına karşın, homozigot ACF -/- farelerinin hayatta kalamadıklarını ortaya çıkarmışlardır. Bu karakterizasyondan elde ettikleri sonuçlar ACF'in RNA düzenlenmesindeki rolünün ötesinde embriyolojik gelişimde bazı bilinmeyen roller gibi başka işlevlerinin de olabileceğini öne sürmüşlerdir.

Ayrıca, son zamanlarda Fossat ve ark. (2014), APOBEC1 ve ACF ile etkileşime giren aynı zamanda ApoB transkriptlerinin *in vitro* düzenlemesinde APOBEC1 ile hareket etmek için editozomun holoenziminde ACF'nin yerini alabildiği belirlenen yeni bir RNA bağlayıcı proteini, RBM47'yi tespit etmişlerdir. Fossat ve ark. (2014) ayrıca RBM47 eksik farelerde RNA düzenlemesinin bozulmasının RBM47'yi *in vivo* olarak gerçekleşen apoB mRNA düzenlenmesinin vazgeçilmez bir elemanı olduğunu ortaya koymuşlardır.

2.4. APOBEC1'in Ek Hedefleri ve Tümör Gelişimindeki Potansiyel Rolleri

APOBEC1 proteini insanın ince bağırsağında fizyolojik olarak apoB mRNA'sını hedef alan RNA düzenleme kompleksinin katalitik bir bileşenidir. Ancak Yamanaka ve ark. (1995), hepatik ekspresyonunun düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) kolestrol konsantrasyonunu düşürüp düşürmeyeceğini belirlemek amacıyla karaciğerlerinde APOBEC1'i eksprese eden transjenik tavşan ve fareler üretmişlerdir. Beklemedikleri bir şekilde transjenik farelerin tümünde ve transjenik tavşanların ise birinde karaciğer dizplazisi olduğunu ve de transjenik farelerin çoğunda hepatoselüler karsinoma geliştiğini gözlemlemişlerdir. Başka bir takım mRNA'ların aşırı eksprese edilmiş düzenleyici enzim tarafından düzenlendiğini ve hücre gelişimi ile regülasyonunda görev alan hepatik mRNA'ların uygunsuz düzenlenmesinin tümör gelişiminin nedeni olduğu sonucuna varmışlardır.

Ayrıca, Skuse ve ark. (1996) tarafından yapılmış bir diğer çalışmada, nörofibromatoz tip I (NF1) gen ürünü olan tümör baskılayıcı nörofibromini kodlayan mRNA içinde, apoB mRNA düzenlenmesi için gerekli olduğu bilinen fonksiyonel bir bağlama dizisine sahip olan bir düzenleme alanı tanımlanmıştır. Bu bölgedeki düzenleme C'yi U'ya değiştirir, böylece bir çerçeve içi durdurma kodonu oluşturur. Bu kodonun oluşması nedeniyle tümör süpresör gen üretim fonksiyonunun kaybıyla sonuçlanacağı tahmin edilmiştir.

Bunların ardından, Cappione ve ark. (1997), NF1 tümör oluşumundaki düzenlemeyle ilgili oynadığı rolü araştırmak amacıyla 19 NF1 ve 4 NF1 olmayan tümörlerden elde ettikleri RNA'yı analiz etmişlerdir. İyi huylu tümörlere kıyasla kötü huylu tümörlerde daha yüksek bir düzenleme seviyesiyle karşılaşmışlardır.

Mukhopadhyay ve ark. (2002) bir takım tümör örneklerinin NF1 mRNA'sının C'den U'ya düzenlenmesi üzerine yaptıkları çalışmada, bu hücrelerde belirgin olarak APOBEC1 mRNA'sının varlığını rapor etmişlerdir. Bu bulgular, APOBEC1'in asıl olarak belirlenen hedefi olan apoB'nin ötesinde ek hedeflere sahip olabileceği hipotezini desteklemektedir.

RNA düzenlemesindeki rolünün yanı sıra, Harris ve ark. (2002) tarafından yapılan çalışmada, APOBEC1 ve bazı homologlarının *in vitro E. coli* deneyinde kuvvetli DNA mutator aktivitesi gösterdiği belirtilmiştir. Bu proteinlerin, dC kalıntılarını deamine ederek ve dU/dG lezyonlarını oluşturarak ssDNA üzerinde DNA mutasyonunu tetikleyebildikleri sonucuna varmışlardır.

Daha yakın bir zamanda Saraconi ve ark. (2014), Gen Ekspresyon Omnibus (GEO) veritabanından yaptıkları APOBEC1'in aşırı ifade edildiği kanser türlerine yönelik araştırmada APOBEC1'in en fazla ifade edildiği ince bağırsakta gözlenen seviyeleriyle kıyas edilebilecek derecede özofajal adenokarsinomalarda (EACs) aşırı ifade edildiğini bulmuşlardır. Ayrıca iki hücre hattı olan bakteri ve tavuk lenfomasında da APOBEC1'in DNA mutatörü olarak etkili olduğunu göstermişlerdir.

2.5. Caco-2 Hücrelerinin Hücre Farklılaşması

İnsan epitel hücre hattı Caco-2 bağırsak epitel bariyerinin bir modeli olarak yaygın bir şekilde kullanılmıştır. Caco-2 hücre hattı, asıl olarak bir kolon karsinomasından türetilmiştir. Bununla birlikte, en avantajlı özelliklerinden biri tek tabakalı, tipik olarak ince bağırsakta bulunan fırça şeklinde uzantılı emici enterositlere kendiliğinden farklılaşabilme yeteneğidir (Verhoeckx 2015).

Bununla bağlantılı olarak Natoli ve ark. (2012), Caco-2 hücrelerini membran ekli PET üzerine ektikten sonra tam besiyeri içerisinde 21 gün boyunca saklamışlardır; besiyerini haftada 3 defa değiştirmişlerdir. Bu koşullarda hücrelerin 3 gün içinde taşıma

kapasitelerine ulaştıklarını ve 21 günde tamamiyle enterositlere farklılaştıklarını göstermişlerdir.

Normalde Caco-2 hücrelerinin farklılaşması için kullanılan besiyeri kullanılan filtrenin hem apikal (AP) hem de bazolateral (BL) bölmelerinde Fetal Sığır Serumu (FBS) takviyesi içermektedir. FBS'nin hücre kültürü ortamı takviyesi olarak kullanımı, bilimsel ve de etik olarak sıklıkla ve artan bir şekilde sorgulanmaktadır. Bu nedenle daha yeni olan Ferruzza ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmada, sadece bazolateral besiyerine %10'luk FBS serum ilavesinin ön görüldüğü asimetrik protokolün, hem apikal hem de bazolateral besiyerine %10'luk FBS takviyesini ön gören simetrik protokole kıyasla Caco-2 hücrelerinin farklılaşmasına olanak sağlamak için yeterli olabileceğini göstermişlerdir. Sonuç olarak, asimetrik besiyerinde farklılaşan hücrelerin, simetrik koşullarda büyütülen hücrelere benzer değerlere sahip oldukları sonucuna varmışlardır.

Farklılaşmış Caco-2 hücrelerinde APOBEC1 ekspresyonunu ölçmeyi amaçlayan başka bir çalışmada Jiao ve ark. (1990), Caco-2 hücreleri filtreler üzerinde kültürlendiğinde apoB mRNA'nın düzenlenmesinin bir belirteci olan apoB-48'in kültür ortamına salgılanmasının apoB-100'ün salgılanmasına kıyasla daha baskın olduğunu öne sürmüşlerdir. Bunlara ek olarak, Galloway ve Smith (2010), farklılaşmış Caco-2 hücrelerinin kendi bazal membranlarından kültürlendikleri besiyerlerine apolipoprotein-B48 üzerinde toplanan şilomikron-benzeri lipoprotein parçacıkları salgıladıklarını da göstermişlerdir. Sonuç olarak, bu farklılaştırma fenotipinin apoB mRNA'sının bölgeye özgü C'den U'ya düzenlenmesinden doğan bir translasyonal dur kodonuyla, apoB proteininin ekspresyonunu bu gen tarafından kodlanan proteinin uzunluğunun %48'ine sınırlayan APOBEC1 enziminden kaynaklandığı sonucuna varmışlardır.

2.6. CRISPR/Cas9 İçin Caco-2 Hücrelerinin Zenginleştirilmesi

Son yıllarda, RNA-kılavuzlu genom düzenleme metodu olan CRISPR/Cas9, moleküler biyolojide devrim yaratan bir araç haline gelmiş olup farklı alanlarda birçok yenilikçi uygulamaya sahiptir. Genom düzenleme aracı olarak kullanılan CRISPR sistemi, Cas9 proteininin kısa kılavuz RNA moleküllerine bağlandıktan sonra DNA'da çift iplik kırılmasına neden olma özelliği taşımaktadır (Çetintaş ve ark. 2017).

Bu genom düzenleme araçları tarafından sunulan kolay ve geliştirilmiş hedeflemeye rağmen, hedefleme verimliliği hala zahmetli bir faktör olabilmekte, hedeflenen hücresel klonları tanımlamak için zahmetli taramalara yol açabilmektedir. Belirli genlerin inaktivasyonunun gerçekleştiği klonların tanımlanmasını kolaylaştırmak için, bir tanesi "vekil raportörler" olan bir takım araçlar ve yaklaşımlar geliştirilmiştir. Bu sistemde, ilgili gen üzerinde homolog olan bir vekil hedef dizisi, çerçeve dışı bir raportör genini korumak için kullanılır ve nükleazlar tarafından indüklenen çift iplik kırığı onarımı raportör genin aktivasyonuna yol açar. Bu yaklaşım, aktif ve ilgilenilen genin hedeflenmesi daha olası olan nükleazların (bizim durumumuzda Cas9), hücrelere floresan ve antibiyotik dirençliği gibi özel karakteristikler vermek için kullanılabilirler (Niccheri ve ark. 2017).

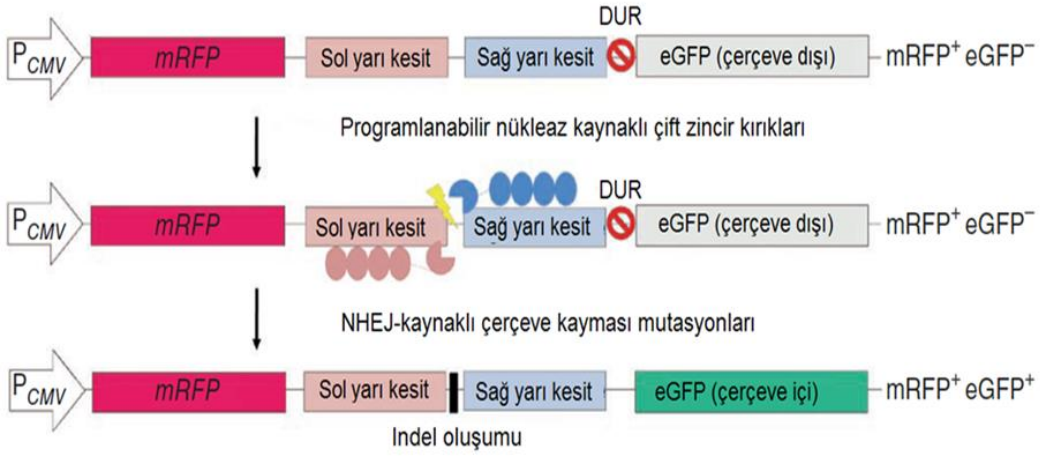
İlk olarak vekil hedefler, mRFP-eGFP füzyon proteini formundaki monomerik RFP (Red Fluorescent Protein) ve gelişmiş GFP (Green Fluorescent Protein) kodlayan raportör plazmit hazırlayan Kim ve ark. (2011) tarafından rapor edilmiştir. mRFP kodlayan DNA dizisi ile eGFP arasında vekil hedef olarak tanımladıkları programlanabilir nükleaz hedef bölgesi eklenmiş, öyle ki çerçeve dışı olan eGFP dizisi çerçeve içi mRFP dizisine kaynaştırılmıştır. Bu nedenle, bu raportör plazmit ile transfekte edilmiş hücreler, mRFP'yi eksprese etmekte, ancak eGFP'yi eksprese etmemektedir. Fakat eğer nükleaz, raportördeki DNA'yı hedef bölgeden keser, çift zincir kırığı oluşturur ve ardından hata-eğilimli homolog olmayan uç birleşme onarımı çerçeve kayması mutasyonlarına yol açan indeller (insertion or deletion) oluştururlarsa, eGFP çerçeve içine kayacak ve böylece aşağıdaki şekilde gösterildiği gibi mRFP-eGFP'nin ifadesine yol açacaktır (Şekil 2.2.).

Bu bilgiler ışığında, Niccheri ve ark. (2017), Blastisidin S direnç geninin (*bsr*) vekil bir hedef dizisi ile çerçeve dışına yerleştirildiği kimerik bir yapıya sahip olmayı ve bunu hedef memeli hücrelerinin hem gen inaktivasyonu hem de knock-in/mutasyonu için zenginleştirmek için kullanmayı amaçlamışlardır.

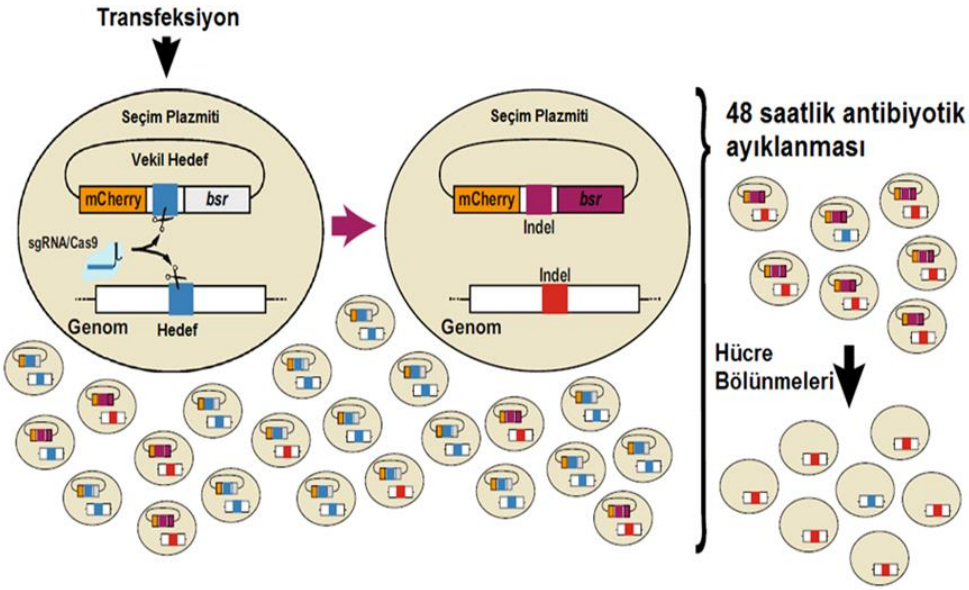
Spesifik olarak B-hücresi lenfoma hücre hattı olan CH12F3'deki *Aicda* (Aktivasyon indüklenmiş sitidin deaminaz) genini susturmayı amaçlamışlardır. Bu sebeple mCherry (floresan marker) ve Blastisidin S direnç (bsr) kodlama sekansları arasına vekil bir hedef geni yerleştirilmiştir. Daha sonra Cas9 nükleazı eksprese eden

hücreleri ayıklamak için bu plazmiti, sgRNA/Cas9 plazmitleri ile birlikte hücrelere transfekte etmişlerdir.

Sonuç olarak homolog olmayan uç eklenmesi onarımı (NHEJ) yoluyla vekil hedef üzerinde çift zincir kırıklarının tamiri, *bsr* kodlama sekansını çerçeve içerisine alan ve Blastisidin S'ye geçici bir direnç sağlayan indellerin oluşumunu indüklemişlerdir. Transfeksiyonun ardından hücreler, Blastisidin S'ye 48 saat boyunca maruz bırakılmıştır. Son olarak, mCherry-bsr kimerasının ifadesi, ilgilenilen genomik bölgede potansiyel olarak düzenlenmiş hücrelerin ayıklanmasını mümkün kılmıştır. Şekil 2.3. bu çalışmayı kısaca özetlemektedir.



Şekil 2.2. Nükleazlar tarafından modifiye edilen hücrelerin zenginleştirilmesi için vekil raportörlerin kullanımı prensibi



Şekil 2.3. Vekil hedefleri kullanarak CH12F3 hücrelerinin zenginleştirilmesi

3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışma İtalya Floransa Üniversitesi Dr. Silvo Conticello sorumluluğunda olan ITT (Instituto Toscano Tumori) Kanser Genetiği laboratuvarında yapıldı. Deneylerde kullanılan tüm malzeme ve ekipmanlar çalışmanın yapıldığı laboratuvar tarafından sağlanmıştır.

3.1. Materyal

3.1.1. Veri Toplama Araçları

Deneylerde kullanılan veri toplama araçları ve ekipmanları Ek-2'de listelendi.

3.1.2. Deneysel Kitler

- DNA Ekstraksiyon Kiti: Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega)
- cDNA Sentez Kiti: iScript cDNA Synthesis Kit (Bio Rad)
- PCR Kiti: AB Taq Polimerase Code 06-32 (ABAnalitica)
- PCR Temizleme Kiti: NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel)

3.1.3. Hücre Kültüründe Kullanılan Malzemeler

3.1.3.1. Hücre Hattı

Çalışmamızda, ilk olarak Sloan-Kettering Kanser Araştırma Enstitüsü'nden Jorgen Fogh tarafından 72 yaşındaki yetişkin bir Kafkasyalı erkeğin insan kolorektal adenokarsinomundan (Verhoeckx 2015) elde edilmiş olan Caco-2 (Cancer coli-2) hücreleri kullanıldı. Kullanılan Caco-2 örnekleri ATCC & LGC Standards S.r.l., Milano, İtalya'dan satın alındı.

3.1.3.2. Kültürleme Ortamı/Besiyeri

Bu çalışmada, Caco-2 hücrelerinin kültürlenmesi için %20 FBS (Fetal Bovine Serum) içeren, yüksek glikozlu ve sodyum piruvatlı, L-glutamin içermeyen DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) kullanıldı.

Besiyerinin Hazırlanması

Caco-2 hücreleri için kültür ortamının hazırlanması Natoli ve ark. tarafından tanımlanan protokole göre gerçekleştirildi (Natoli ve ark. 2012). Ancak farklı olarak

%10 FBS yerine %20 FBS içeren besiyeri hazırlandı. Buna göre; 100 ml FBS (Carlo Erba), 5 ml L-Glutamin (Carlo Erba) ve 5 ml Penisilin-Streptomisin (EuroClone) solüsyonları, steril kabin altında 60 ml'lik bir şırınga ve 0.22 mikron şırınga filtresi şırınganın ucuna eklenerek 500 ml komple DMEM (EuroClone) besiyeri oluşturuldu.

Çizelge 3.1. %20 FBS DMEM ortamı için kullanılan malzemeler ve miktarlar

Malzemeler	Kullanılan Miktar
DMEM Solüsyonu	500 ml
FBS	100ml
L-Glutamin	5 ml
Penisilin-Streptomysin solüsyonu 100X	5 ml

3.1.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler, Reaktifler ve Sarf Malzemeleri

Kullanılan kimyasal maddeler, reaktifler ve sarf malzemeleri satın alındıkları firma isimleri ile Ek-3'te listelendi.

3.1.5. Elektroporasyonda Kullanılan Plazmitler

Hücrelerin CRISPR/Cas9 elemanlarının vektörleri ile transfekte edilebilmesi için kullanılan yöntemler genel olarak kimyasal ve fiziksel yöntemler olarak sınıflandırılabilir. Fiziksel yöntemlerden biri olan elektroporasyon, hücre zarının geçirgenliğini arttırmak için hücrelere uygulanacak bir elektrik alanı gerektirir ki bu sayede vektörün hücrenin içine girmesi sağlanabilir (Çetintaş ve ark. 2017).

Çalışmamızda kullanılan Caco-2 hücrelerini elektroporasyon yoluyla transfekte edebilmek için kullanılan plazmitler ve bunların işlevleri Çizelge 3.2.'de gösterildi.

Çizelge 3.2. Caco-2 hücrelerinin hA1, RBM47 ve ACF genlerini knock-out etmek için elektroporasyonda kullanılan plazmitler ve fonksiyonları

Plazmit	Fonksiyonu
pX330-hA1(3exon)	Knock-out için APOBEC1 genini hedefleyen CRISPR/Cas9 elemanlarını kodlar
pBML5-mcherry-hA1-bsrR	Seçim için Blastisidin direnci kodlayan mCherry-hA1-BSR kasetini içerir
pX330-RBM47	Knock-out için RBM47 genini hedefleyen CRISPR/Cas9 elemanlarını kodlar
pBML5-mcherry-RBM47-bsrR	Seçim için Blastisidin direnci kodlayan mCherry-RBM47-BSR kasetini içerir
pX330-A1CF	Knock-out için ACF genini hedefleyen CRISPR/Cas9 elemanlarını kodlar
pBML5-mcherry-A1CF-bsrR	Seçim için Blastisidin direnci kodlayan mCherry-ACF-BSR kasetini içerir
pBML4	Seçilebilir bir işaretçi olarak kullanılan Puromisin direnci için raportör geni içerir

3.1.6. PCR'da Kullanılan Primerler

PCR primerleri ilgili hedef bölgelerine bağlanan, o bölgedeki DNA dizilerine komplementer olan, uzunluk olarak 15-30 nükleotitlik, tek iplikli DNA fragmanlarıdır. PCR primerlerinin amacı, DNA polimerazın dNTP'leri ekleyebildiği serbest bir 3'-OH grubu sağlamaktır. Çalışmamızda, ApoB, APOBEC1, ACF ve RBM47 genlerini PCR kullanarak amplifiye etmek için aşağıda sıralanan primerler kullanıldı.

Çizelge 3.3. PCR amplifikasyonunda kullanılan primerler

Primer	**Nükleotit Dizilimi**
MC_26ApobCanonical/2 Rev	GCTAGGTGCTGGATGTCTAT
MC_26ApobCanonical/2 Frw	ACAAGTTTCACATGCCAAGG
FN140_hA1exon3 Rev	GCTACTATCACCACAGTCTGTT
FN141_hA1exon3 Frw	AAGAATCGAACCCTGGGAGTTTGAC
FN142_hA1CFexon4 Frw	ATCCCACATCTTCAGGCAAC
FN143_hA1CFexon4 Rev	GCAGGCAGGATAGGCAGAGAA
FN145_hRBM47exon1 Frw	GTGGATGCCTTTGACATTATGACC
FN146_hRBM47exon1 Rev	CTTGTGGCAGTACATGACGAA
PCR ApoB editing Frw	ATGACTTCTGAGAAAGGTCC
PCR ApoB editing Rev	ACTTAGAATTATGCAGTGCAGC

3.1.7. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Malzemeler

Agaroz jel elektroforezinde kullanılan malzemeler Ek-2'de listelendi.

3.1.7.1. Agaroz Jel Hazırlanması

Çalışmamızda çoğunlukla %1 agaroz jeli kullanılmış olup aşağıdaki protokole göre hazırlandı;

	100 ml için
Agar	1 g
TBE	100 ml

Hazırlanışı: Hassas terazi kullanılarak 1 g agar bir kabın içerisine alındı ve aynı kabın içinde 100 ml TBE ile karıştırıldı. Karışım, berrak bir karışım elde edilene kadar birkaç dakika süreyle bir mikrodalga kullanılarak kaynatıldı. Daha sonra 5 µl (1: 20000 µl) nükleik asit boyama çözeltisi jele ilave edildi. Daha sonra son karışım, uygun ebattaki elektroforez kasedine aktarıldı ve soğumaya bırakıldı.

3.1.7.2. Tris Borik Asit EDTA (TBE) Tamponu 1X

Jel elektroforezinde tamponlar, elektrik akımının taşınmasını sağlayan iyonları içerir ve pH seviyesisinin belli bir değerde tutulmasını sağlar. Tris baz, borik asit ve EDTA (Etilen Diamin Tetraasetik Asit) karışımı olan TBE tamponu jel üzerinde daha keskin bantlar elde etmek için 1 kb'den az olan DNA fragmanları için tavsiye edilmektedir. Jelin hazırlanması sırasında kullanılan TBE tamponu, aşağıda listelenen miktarlara göre hazırlandı.

	Her 5 litre için
Tris Bazı	54 gram
EDTA	4.56 gram
Boric Asit	23.5 gram
dH_2O	1 litre

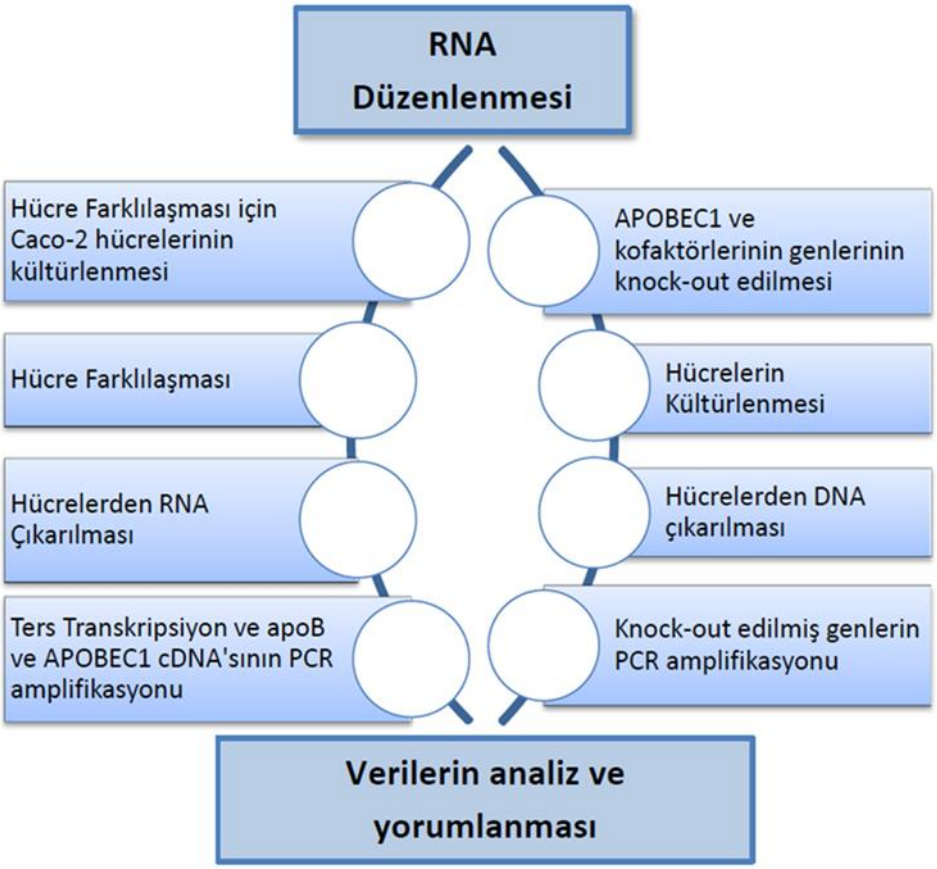
Hazırlanışı: 54 g Tris, 4.56 g EDTA ve 23.5 g Borik asit, 1000 ml damıtılmış su içinde çözülerek, son hacim 4 litre dH_2O eklenerek 5 litreye sabitlendi ve oda sıcaklığında muhafaza edildi.

3.2. Metot

Bu çalışma temel olarak, RNA düzenleme olayının saptanması için Caco-2 hücrelerinin klonlarını hazırlamayı amaçlayan iki deney setini içermektedir. İlk deney dizisi, APOBEC-1'in ve onun kofaktörlerini kodlayan ACF ve RBM47 genlerinin knock-out edilmesinden ibarettir. İkincisi, farklılaşmış Caco-2 hücrelerinde FACS analizi ve sekanslama/dizi analizi ile apoB mRNA'nın düzenlenmesini analiz etmek için Caco-2 hücrelerinin hücre farklılaşmasını içerir. Genel çalışma planı aşağıdaki Şekil 3.1. olarak tasvir edilebilir.

3.2.1. Hücrelerin Çözülmesi

Natoli ve arkadaşları (2012) tarafından tanımlanan protokol izlenerek Caco-2 WT (Yabanıl Suş) ve Caco-2 R/G (Kırmızı/Yeşil) hücreleri çözüldü. Buna göre ilk olarak hücrelerin kriyoviyalleri bir dakikadan daha kısa bir süre boyunca 37°C'lik bir su banyosunda tutuldu. Kriyovialler daha sonra santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre pelleti, 25 cm^3'lük flasklara konulmuş olan %20 FBS içeren besiyerinde süspanse edildi. Her bir flask daha sonra 37°C derecede inkübe edildi.



Şekil 3.1. Çalışma Planı

3.2.2. Hücrelerin Kültürlenmesi

Caco-2 WT and Caco-2 R/G hücreleri 37^0C'de, %5CO_2 içeren inkübatör içerisinde, %20 FBS (Fetal Bovine Serum; Carlo Erba), 200 mM L-glutamin (Carlo Erba), and 1 mM penisilin/streptomysin solüsyonu (EuroClone) ile takviye edildi DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, EuroClone) besiyerinde kültürlendi.

3.2.3. Caco-2 Hücrelerinde APOBEC1 Geninin ve Kofaktörlerinin Knock-out Edilmesi

3.2.3.1. APOBEC1 Geninin Knock-out Edilmesi İçin Caco-2 Hücrelerinin Elektroporasyonu

Knock-out deneylerini başlatmak için ilk olarak Caco-2 WT ve Caco-2 R/G hücrelerinin bulunduğu 2 flask içerisindeki eski besiyeri çıkarıldı ve hücreler yeterli miktarda PBS ile yıkandı. PBS'in flasklardan çıkarılmasından sonra, 1 ml Tripsin eklendi. Flasklar daha sonra hücreler flaskların zemin yüzeyinden ayrılana kadar

37°C'de 5-6 dakika tutuldu. Her bir flask içerisine 16 ml %20 FBS içeren yeni DMEM besiyeri ilave edilerek tripsin inhibe edildi ve hücreler yeniden süspanse edildi. Herbir flask içerisindeki hücreler her birinde 8 ml bulunacak şekilde 2 adet p-100 petri kabına yayıldı. Tabaklar daha sonra 24 saat boyunca 37°C'de elektroporasyon için gerekli olan minimum %70'lik taşıma kapasitesine ulaşılıncaya kadar inkübe edildi.

İstenilen taşıma kapasitesine ulaşıldıktan sonra, 10^6 Caco-2 WT and 10^6 Caco-2 R/G hücreleri Çizelge 3.4.'te listelenen plazmitlerle 250V voltaj, 1000 uF kapasitans, ∞ rezistans ve 4 mm küvet büyüklüğü değerleri sabitlenerek Gene Pulser II elektroporatör yardımıyla transfekte edildi.

Çizelge 3.4. APOBEC1 geninin knock-out edilmesi için kullanılan plazmitler ve miktarları

Plazmit	**Miktar (µg)**	
pX330-hA1(3exon)	4 µg	**BSR**
pBML5-mcherry-hA1-bsrR	4 µg	
pX330-hA1(3exon)	9 µg	**PURO**
pBML4	1 µg	

Elektroporasyonu takip eden 24 saatin ardından, pBSR konstraktı ile transfekte edilen Caco-2 WT ve Caco-2 R/G hücreleri BlastisidinS (1µg/ml) ile antibiyotik direnci seçimine tabi tutuldu. Bundan 48 saat sonra, antibiyotik seçimi sonlandırıldı ve her iki türe (Caco-2 WT ve Caco-2 R/G) ait tüm hücreler dört adet 96 kuyucuklu tabaklarda kültürlendi.

sgRNA/Cas9 konstraktı ve pBML4 kontrol plazmiti ile transfekte edilen Caco-2 WT ve Caco-2 R/G hücreleri Püromisin (0.1 µg/ml) ile antibiyotik direnci seçimine tabi tutuldu. 48 saatin ardından, antibiyotik seçimi sonlandırıldı ve her iki türe (Caco-2 WT ve Caco-2 R/G) ait tüm hücreler 96 kuyucuklu tabaklarda 1 hücre/kuyucuk, 10 hücre/kuyucuk, 50 hücre/kuyucuk, 100 hücre/kuyucuk dilüsyonlarında kültürlendi.

3.2.3.2 Blastisidin Direnci ile ACF ve RBM47 Genlerinin Knock-out Edilmesi İçin Caco-2 WT ve Caco-2 R/G Hücrelerinin Elektroporasyonu

Çalışmanın bu bölümünde, $4x10^5$ Caco-2 WT ve $4x10^5$ Caco-2 R/G hücreleri Çizelge 3.5.'te listelenen plazmitlerle 250V voltaj, 1000 uF kapasitans, ∞ rezistans ve 4 mm küvet büyüklüğü değerleri sabitlenerek Gene Pulser II elektroporatör yardımıyla transfekte edildi.

Çizelge 3.5. Blastisidin direnci esas alınarak ACF and RBM47 genlerinin knock-out edilmesi için kullanılan plazmitler ve miktarları

Plazmit	Miktar (µg)	
pX330&&A1CF	4 µg	**ACF**
pBML5&&mcherry-A1CF-bsrR	4 µg	
pX330&&RBM47	4 µg	**RBM47**
pBML5&&mcherry-RBM47-bsrR	4 µg	

İstenilen taşıma kapasitesi gözlenemediğinden elektroporasyonu takip eden 48 saatin ardından, pBSR konstraktı ile transfekte edilen Caco-2 WT ve Caco-2 R/G hücreleri BlastisidinS (1µg/ml) ile antibiyotik direnci seçimine tabi tutuldu. Bundan 48 saat sonra, antibiyotik seçimi sonlandırıldı ve her iki türe ait tüm hücreler dört adet 96 kuyucuklu tabaklarda kültürlendi.

3.2.3.3 Püromisin Direnci ile ACF ve RBM47 Genlerinin Knock-out Edilmesi İçin Caco-2 WT ve Caco-2 R/G Hücrelerinin Elektroporasyonu

Çalışmanın bu bölümünde, $4x10^5$ Caco-2 WT and $4x10^5$ Caco-2 R/G hücreleri aşağıdaki Çizelge 3.6.'da listelenen plazmitlerle 250V voltaj, 1000 uF kapasitans, ∞ rezistans ve 4 mm küvet büyüklüğü değerleri sabitlenerek Gene Pulser II elektroporatör yardımıyla transfekte edildi.

Çizelge 3.6. Püromisin direnci esas alınarak ACF and RBM47 genlerinin knock-out edilmesi için kullanılan plazmitler ve miktarları

Plazmit	Miktar (µg)	
pX330&&A1CF	9 µg	**ACF**
pBML4	1 µg	
pX330&&RBM47	9 µg	**RBM47**
pBML4	1 µg	

İstenilen taşıma kapasitesi gözlenemediğinden elektroporasyonu takip eden 48 saatin ardından, sgRNA/Cas9 konstraktı ve pBML4 kontrol plazmiti ile transfekte edilen Caco-2 WT ve Caco-2 R/G hücreleri püromisin ile antibiyotik direnci seçimine tabi tutuldu. Yine aynı sebepten ötürü; Caco-2 R/G KO (Knock-out) ACF örneği 0.1 µl/ml püromisin ve Caco-2 KO ACF, Caco-2 R/G KO RBM47, Caco-2 KO RBM47 örnekleri 0.03 µl/ml püromisine tabi tutuldu

Bundan 48 saat sonra, antibiyotik seçimi sonlandırıldı. Caco-2 KO ACF ve Caco-2 KO RBM47 hücre örnekleri bir adet 96 kuyucuklu tabağa ve Caco-2 R/G KO ACF, Caco-2 R/G KO RBM47 hücre örnekleri üç adet 96 kuyucuklu tabaklara üç farklı dilüsyonlarla (10 hücre/kuyucuk, 50 hücre/kuyucuk, 100 hücre/kuyucuk) kültürlendi.

3.2.4 Hücre Hattı Bakımı ve Genişletilmesi

Elektroporasyonun ardından kültürlenen hücrelere ait koloniler 15-20 gün sonra görülmeye başlandı. Sadece tek koloni taşıyan kuyucuklar, Natoli ve arkadaşları (2012) tarafından tanımlanan protokole göre daha fazla analiz için 96 kuyucuklu tabaklardan 24 kuyucuklu tabaklara, oradan 6 kuyucuklu tabaklara ve nihayet p100 petri kaplarına kadar genişletildi. Hücreler, alt kültür yoğunluğu olan %50 taşıma kapasitesine ulaştığında, besi yeri kuyucuklardan çıkarıldı ve hücreler DPBS çözeltisi ile yıkandı. DPBS'in çıkarılmasından sonra, kuyucuklara tripsin-EDTA çözeltisi ilave edildi ve 4 dakika boyunca inkübatörde bırakıldı. Hücrelerin kuyucukların alt yüzeyinden ayrılması görevini gören Tripsin'in aktivitesi kuyucuklara besiyeri ilavesiyle sona erdirildi. Hücreler yeniden süspansiyonun ardından başka bir tabakta kuyucuk içerisinde yeni besiyerine aktarıldı. Kullanılan Tripsin-EDTA, DPBS ve besiyerinin miktarları Çizelge 3.7.'de gösterildi.

Çizelge 3.7. Kullanılan Tripsin-EDTA, DPBS ve besiyerinin miktarları

	96 kuyucuklu plaka→ 24 kuyucuklu plaka	**24 kuyucuklu plaka→ 6 kuyucuklu plaka**	**6 kuyucuklu plaka → 10 cm petri kabı**
Trypsin-EDTA	20 µl	60 µl	1 ml
DPBS	40 µl	120 µl	2 ml
Besiyeri	500 µl	2 ml	10 ml

3.2.5 Knock-out Edilmiş Caco-2 ve Caco-2 R/G Hücrelerinden DNA Ekstraksiyonu

APOBEC1, ACF ve RBM47 genleri knock-out edilen Caco-2 ve Caco-2 R/G hücrelerinden DNA Ekstraksiyonu, Promega'nın DNA ekstraksiyon kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Üretici tarafından tanımlanan öneriler ve protokol takip edildi.

3.2.6 Caco-2 ve Caco-2 R/G Hücrelerinde Knock-out Edilen Genlerin PCR Amplifikasyonu

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), DNA'nın amplifikasyonu için güçlü ve hassas bir tekniktir (Saiki ve ark. 1988). Taq DNA Polimeraz, PCR amplifikasyonlarında yaygın olarak kullanılan bir enzimdir (Powell ve ark. 1987).

Genomik DNA ekstraksiyonundan elde edilen genomik DNA'lar PCR ile amplifiye edildi. Bizim çalışmamızda PCR amplifikasyonu AB Analitica; AB Taq Polimeraz (5U/µl), Tampon Solüsyonu 10X ve 50mM $MgCl_2$ ihtiva eden bir PCR Kiti

ile yapıldı. PCR tüplerini hazırlamak için Çizelge 3.8.'de gösterilen reaksiyon girdileri belirtilen miktarlarda kullanıldı.

Çizelge 3.8. PCR'da kullanılan reaksiyon karışımı

Bileşen	**50 µl Reaksiyon Karışımında**
Örnek DNA	Değişken
10X Standart Taq Reaksiyon Tamponu	5 µl
$MgCl_2$	1.5 µl
10 µM İleri Primer	1 µl
10 µM Geri Primer	1 µl
10 mM dNTPs	1 µl
AB Taq DNA Polimerazı	1 µl
Nükleaz içermeyen su	50 µl tamamlayacak kadar
TOPLAM HACİM	50 µl

Ayrıca, PCR tüpleri buz içeren bir kapta hazırlandıktan sonra bir termosiklere transfer edildi. Termosikler içerisinde yer alan bloklar önceden 95°C'ye ısıtıldı. PCR için termosiklerde uygulanan koşullar Çizelge 3.9.'da yer alan koşullara göre ayarlandı.

Çizelge 3.9. PCR için kullanılan termosikler koşulları

Basamak		**Sıcaklık**	**Zaman**
İlk Denaturasyon		95°C	30 saniye
Denaturasyon	X 30-35 defa	95°C	20 saniye
Tavlama		Primere göre değişken	15-30 saniye
Uzatma		DNA fragmanının uzunluğuna göre değişken	1 dakika/kb
Son Denaturasyon		72°C	5-7 dakika
Tutma		4°C	∞

3.2.7 PCR Ürünlerinin Temizlenmesi

Sekanslama gibi PCR sonrası manipülasyonların sonuçlarını etkiledikleri için kontaminant veya fazlalıklar olarak kabul edilen kalan dNTP'leri, primerleri, Taq Polimerazı ve Mg^{++} iyonlarını gidermek amacıyla PCR ürünleri Macherey-Nagel PCR Clean-up kiti kullanarak temizlendi.

3.2.8 Knock-out Edilmiş Hücrelerinin Sekans Analizi

PCR ürünleri pürifikasyon işleminin ardından Macrogen Europe'a (Hollanda) sekanslanmak üzere gönderildi.

3.2.9 Caco-2 Hücrelerinin Hücre Farklılaşması ve RNA Düzenlemesinin Taranması

3.2.9.1 Caco-2 Hücrelerinin Hücre Farklılaşması

Caco-2 WT ve Caco-2 R/G hücreleri 12 mm yarıçapında, 0.4 μm por yarıçapına sahip polikarbonat filtreler (Transwell, Corning Inc. Lowell, MA, USA) üzerinde $3.5x10^5$ hücre/cm^2 hücre yoğunluğunda, filtrenin üst kısmına serumsuz alt kısmına %10 FBS içeren besiyeri eklenecek şekilde (asimetrik) olarak kültürlendi. Hücreler 21 gün boyunca haftada üç kez düzenli besiyeri değişiklikleri ile farklılaşmaya bırakıldı.

3.2.9.2 FACS Analizi İçin Örneklerin Hazırlanması

200 μl hücre içeren 3 test tüpü her birinde 4 ml PBS olacak şekilde süspanse edildi:

- TEST TÜP-1: Filtrede yetiştirilen Caco-2 WT hücreleri (boş olarak kullanılmak üzere)
- TEST TÜP -2: Filtrede yetiştirilen Caco-2 R/G hücreleri
- TEST TÜP -3: Filtrede yetiştirilmeyen Caco-2 R/G hücreleri (negatif kontrol)

FACS analizinden elde edilen veriler Bölüm-4'te sunuldu.

3.2.9.3 Farklılaştırılmış Caco-2 Hücrelerinden RNA Ekstraksiyonu ve cDNA Sentezi

Farklılaşma işleminden sonra $3x10^6$ Caco-2 WT ve Caco-2 R/G hücreleri, 500 ul TRIzol kullanılarak RNA ekstraksiyonu işlemine tabi tutuldu. cDNA sentezi iScript cDNA Sentez Kiti (Bio Rad) kullanılarak (filtrede/filtresiz kültürlenmiş Caco-2 WT ve Caco-2 R/G hücreleri için) gerçekleştirildi. Üreticinin protokolü ve önerileri takip edildi.

3.2.9.4 Sekans Analizi İçin Caco-2 Hücrelerinden apoB cDNA'larının Hazırlanması

Filtrede kültürlenmemiş Caco-2 R/G hücrelerinden (negatif kontrol), hücre farklılaşması sırasında filtre üzerinde kültürlenmiş Caco-2 R/G hücrelerinden (deney grubu) ve filtrede yetiştirilen Caco-2 WT hücrelerinden (boş olarak kullanılmak üzere)

elde edilen apolipoprotein-B cDNA'ları PCR kullanılarak amplifiye edildi. PCR ürünleri % 2 ultrasaf agaroz jeli üzerinde yürütüldü. Sonuçlar Bölüm-4'te sunuldu.

3.2.9.5 Ekspresyon Analizi İçin Caco-2 ve Caco-2 R/G Hücrelerinden APOBEC1 cDNA'larının Amplifikasyonu

Caco-2 ve Caco-2 R/G hücrelerinden APOBEC1 cDNA'ları, ekspresyon analizi için ilgili primerler kullanılarak amplifiye edildi. PCR ürünleri, %1'lik agaroz jeli üzerinde yürütüldü. Sonuçlar Bölüm-4'te sunuldu.

3.2.9.6 PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

PCR ürünlerinin jel saflaştırması elde edilen bulguların yetersizliği nedeniyle gerçekleştirilemedi.

3.2.9.7 ApoB ve APOBEC1'in PCR Ürünlerinin Dizi Analizi

PCR ürünlerinin sekans analizleri elde edilen bulguların yetersizliği nedeniyle yapılamadı.

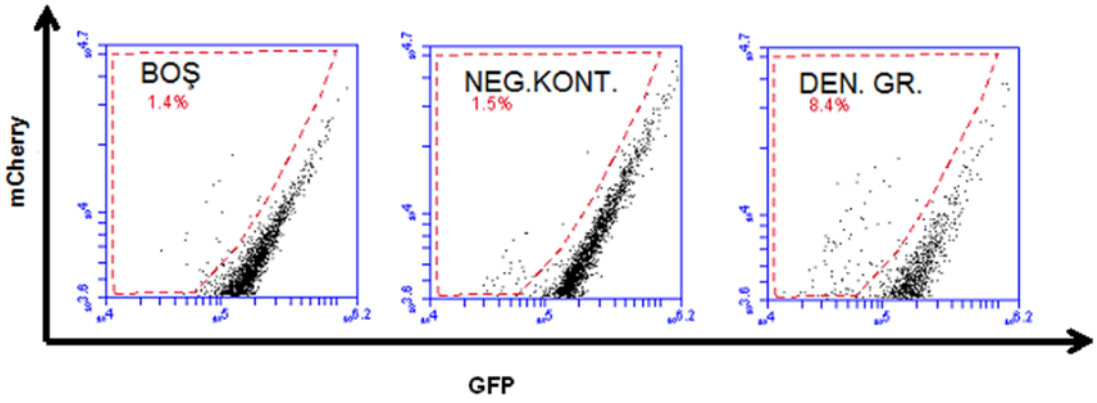
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

Bu çalışmada apoB mRNA'sı üzerinde gerçekleşen RNA düzenleme olayının saptanması için Caco-2 hücre klonlarını hazırlamak amaçlanmıştır. Bu nedenle, bir taraftan APOBEC-1 enzimini ve onun kofaktörleri olan ACF ve RBM47'yi kodlayan genler CRISPR/Cas9 genom düzenleme yöntemi kullanılarak knock-out edilmeye çalışılırken, diğer taraftan adenokarsinom hücreleri olan Caco-2 hücreleri 21 günlük hücresel farklılaşma (cytodifferentiation) işlemine tabi tutulmuştur. Bununla Caco-2 hücrelerinin apoB mRNA'sının düzenlenerek, ilgili lipoproteinin kısa formu olan apoB-48'in oluşumunun gerçekleştiği ince bağırsak enterositlerine dönüşmeleri hedeflenmiştir. Bu sayede bu hücrelerden elde edilen mRNA'lardan ters transkripsiyon yoluyla cDNA'lar elde edilmiş ve ancak elde edilen bulguların yetersizliği nedeniyle elde edilen bu DNA parçacıkları sekanslama/dizi analizi ile analiz edilerek RNA düzenlenmesinin gerçekleşip gerçekleşmediği tespit edilememiştir. Buna ek olarak, bu hücresel farklılaşma sürecinde Caco-2 hücreleri ve daha önceden bu hücrelerin yabanıl suşlarının "mCherry-apoB-GFP" birleşik proteinini kodlayan plazmitlerle transfekte edildiği Caco-2 R/G (Red/Green) suşları kullanılmıştır. Bu hücreler hücresel farklılaşmaya tabi tutulmuş ve 21 günlük sürecin ardından FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting) analizi ile RNA düzenlenmesinin gerçekleşip gerçekleşmediği belirlenmeye çalışılmıştır.

4.1.1. RNA Düzenlenmesinin FACS Analizi İle Tespiti

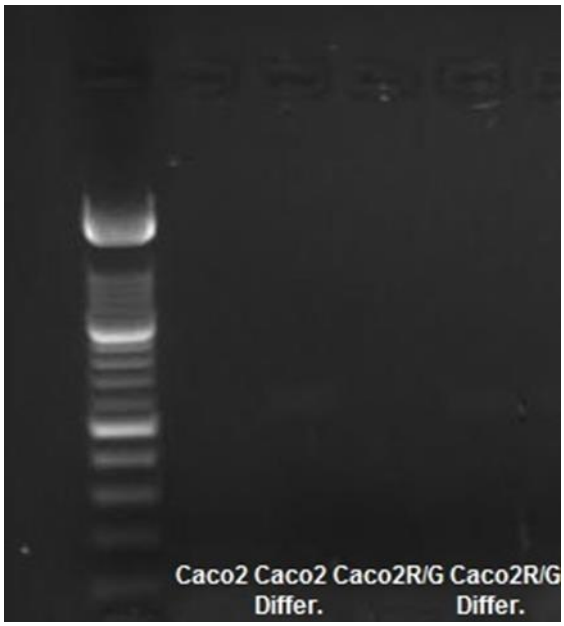
Çalışmanın bu bölümünde Severi ve Conticello (2015)'in Huh-7 hücreleri üzerinde uyguladıkları protokol Caco-2 yabanıl suşları ve bunlardan türetilen Caco-2 R/G hücreleri üzerinde denenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Bu şekilde Transwell filtreleri üzerinde kültürlenen Caco-2 hücresinin yabanıl suşları boş (blank), filtre üzerinde kültürlenmeyen Caco-2 R/G suşları negatif kontrol ve filtre üzerinde kültürlenen Caco-2 R/G hücreleri ise deney grubu olarak gösterilmektedir.



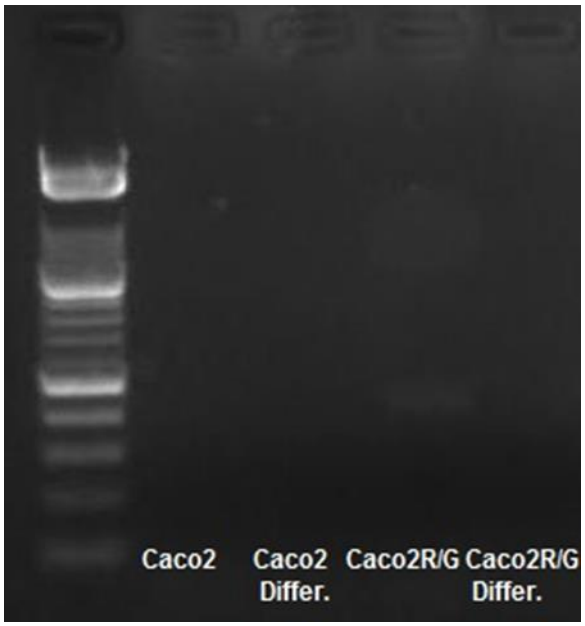
Şekil 4.1. RNA düzenlenmesinin FACS analizi ile tespiti

4.1.2. Farklılaştırılmış Caco-2 Hücrelerinden RNA Ekstraksiyonu ve cDNA Sentezi

Transwell filtreler üzerinde hücre farklılaşmasına tabi tutulan Caco-2 ve Caco-2 R/G hücreleri 21 günlük bu sürecin ardından RNA ekstraksiyonuna tabi tutuldu. Farklılaşan bu hücrelerde APOBEC1 ekspresyonunu ve apolipoproteinB editlenmesini görüntülemek amacıyla ters transkripsiyon yoluyla bu mRNA'lardan komplementer DNA'lar elde edilmeye çalışıldı. Bu komplementer DNA'ların jel üzerinde yürütülmesiyle elde edilen bulgular Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'te gösterilmiştir.



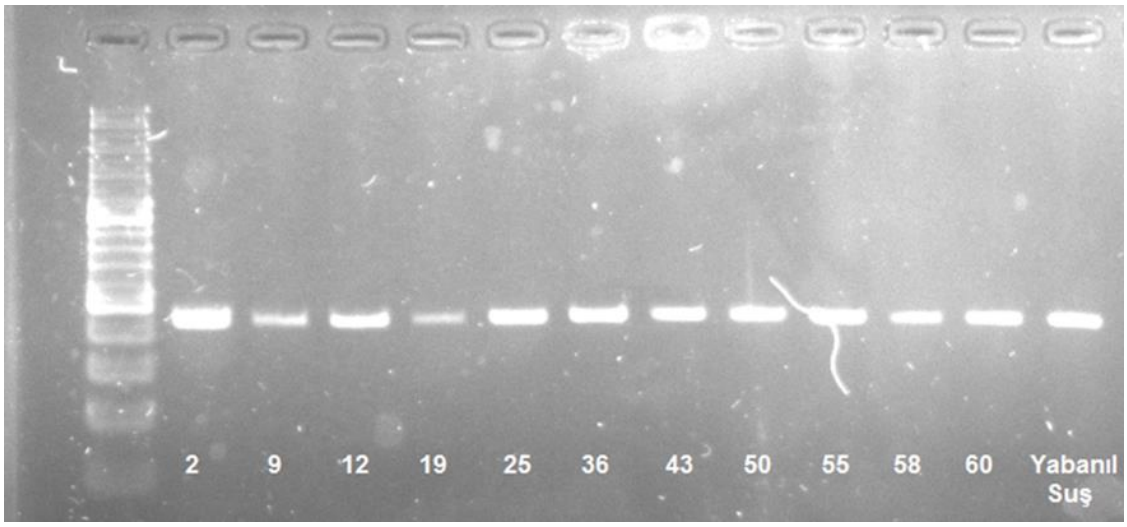
Şekil 4.2. Farklılaşan Caco-2 hücrelerinde APOBEC1 ekspresyonu. Standart olarak DNA Ladder (100bp) kullanıldı.



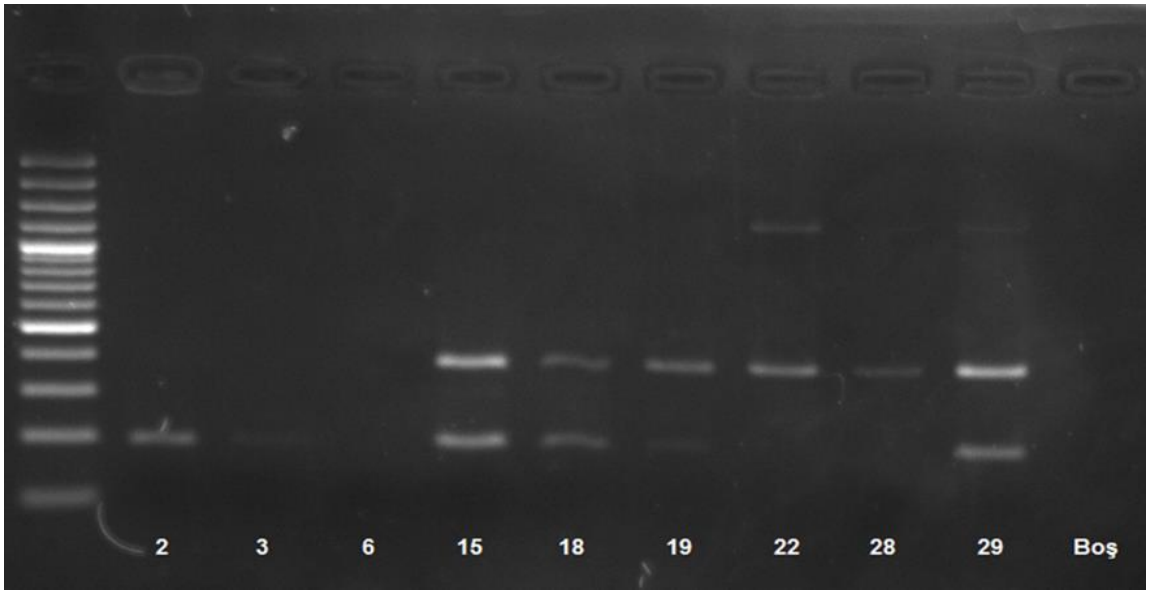
Şekil 4.3. Farklılaşan Caco-2 hücrelerinde apoB düzenlenmesi. Standart olarak DNA Ladder (100bp) kullanıldı.

4.1.3. Knock-out Edilmiş Hücrelerinin Sekans Analizi

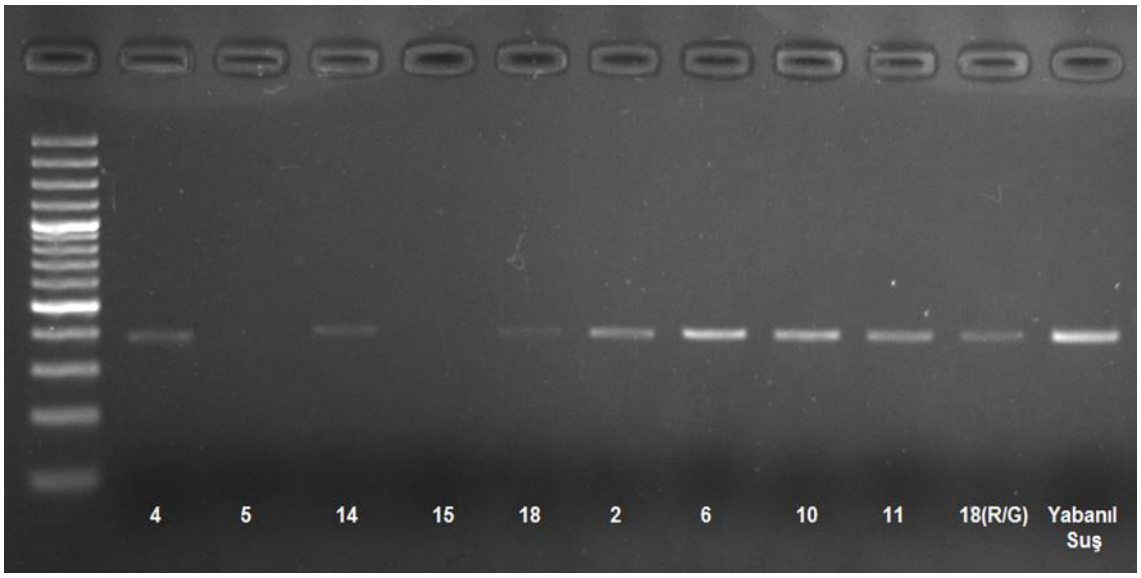
Transfeksiyon işleminin ardından Caco-2 ve Caco-2 R/G hücreleri, knock-out edilmiş olan APOBEC-1 enzimini ve onun kofaktörleri olan ACF ve RBM47'yi kodlayan genlerin gen analizlerinin yapılabilmesi için kültürlendi. Kültürlenen hücrelerden DNA çıkarımı, PCR amplifikasyonu ve agaroz jel elektroforezinin ardından elde sonuçlar Şekil 4.4, Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Şekiller üzerindeki bantlara verilen numaralar genlerin elde edildiği hücre örneklerine verilen numaraları temsil etmektedir.



Şekil 4.4. Knock-out edilmiş olan *hA1*geninin jel elektroforezi. Standart olarak DNA Ladder (100bp) kullanıldı.

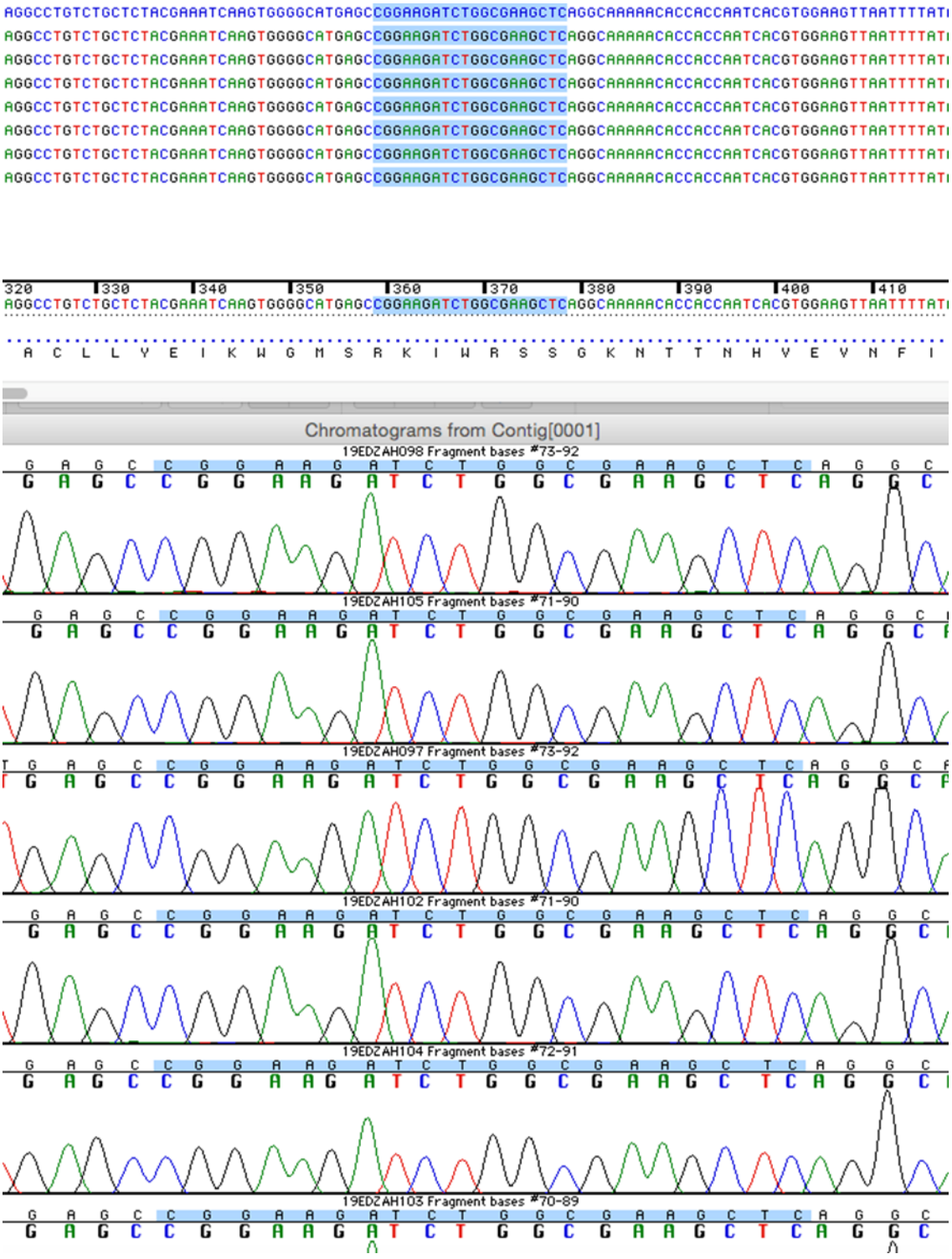


Şekil 4.5. Knock-out edilmiş olan *acf* geninin jel elektroforezi. Standart olarak DNA Ladder (100bp) kullanıldı.

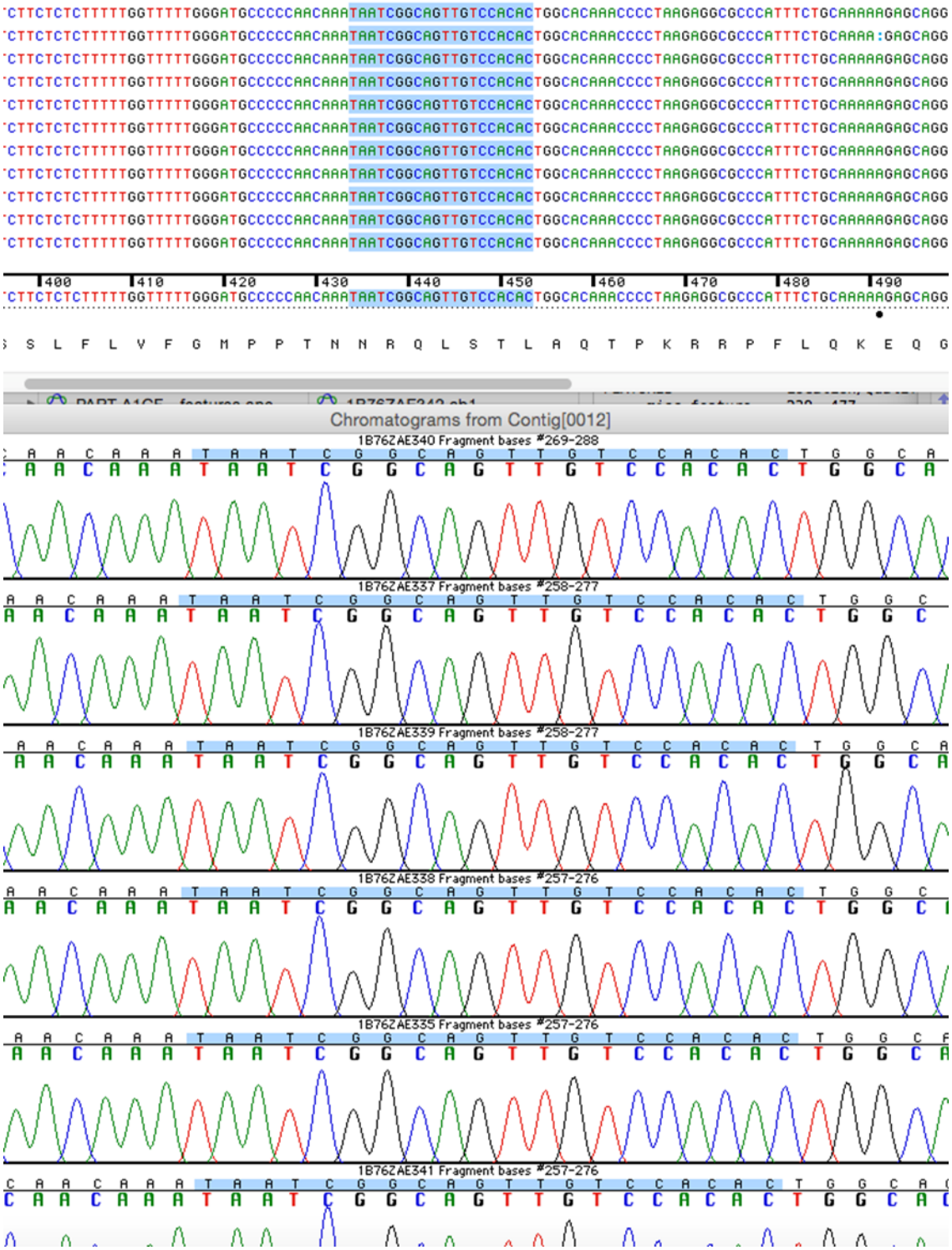


Şekil 4.6. Knock-out edilmiş olan *rbm47* geninin jel elektroforezi. Standart olarak DNA Ladder (100bp) kullanıldı.

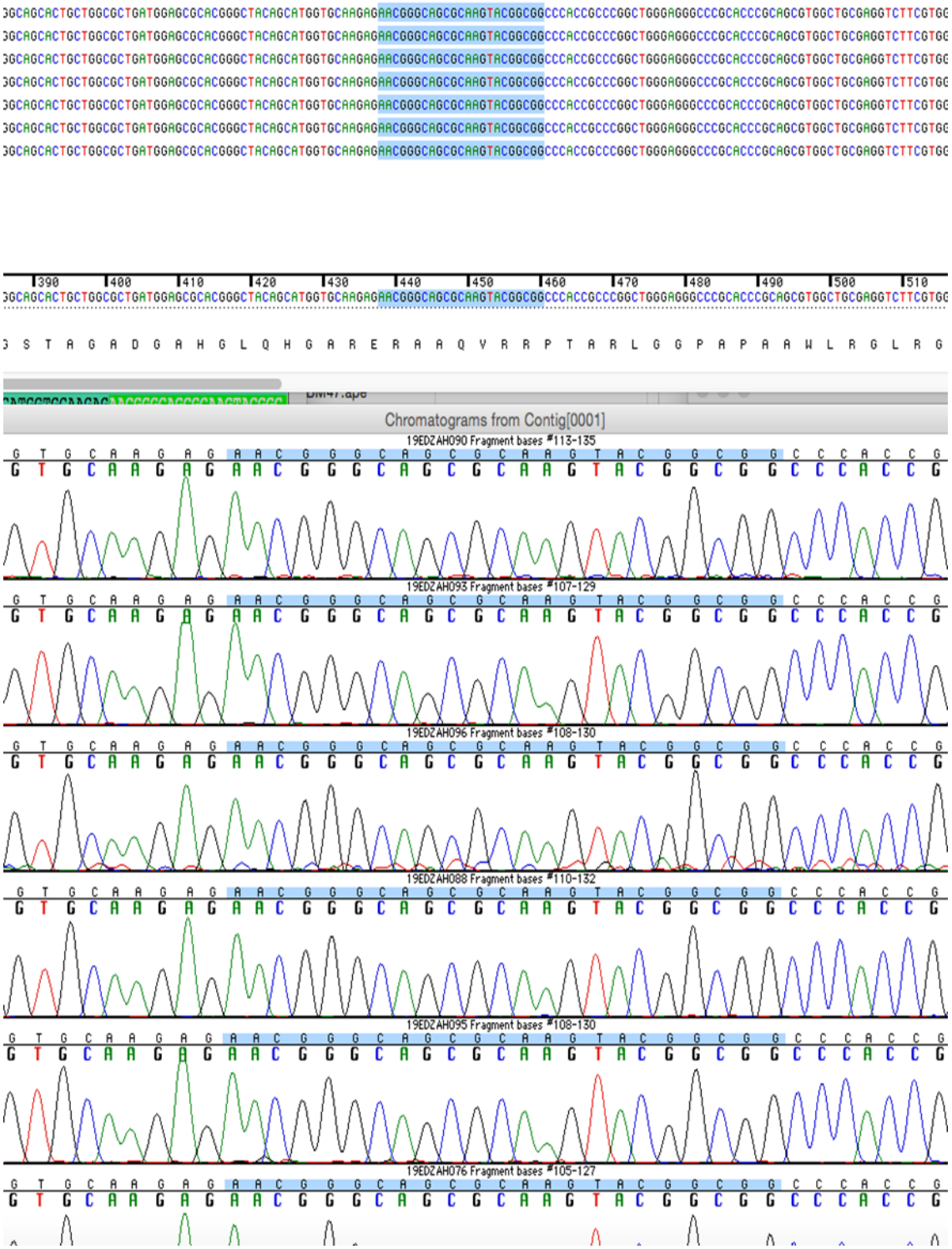
Yukarıda verilen hücre örneklerine ait sekans analizleri ise Şekil 4.7, Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da gösterilmiştir. Sekans analizlerinin gösterildiği şekillerde mavi renk ile renklendirilmiş birinci sıra yabanıl suşun nükleotid dizilimini belirtirken altında sıralanan diğer satırlar ise gen dizilimi kıyaslanan örnekleri temsil etmektedir.



Şekil 4.7. Knock-out edilmiş olan *hA1*geninin sekans analizi



Şekil 4.8. Knock-out edilmiş olan *acf* geninin sekans analizi



Şekil 4.9. Knock-out edilmiş olan *rbm47* geninin sekans analizi

4.2. Tartışma

4.2.1. RNA Düzenlenmesinin FACS Analizi İle Tespiti

Çalışmanın bu bölümünde Transwell filtreleri üzerinde farklılaşmaya tabi tutulan Caco-2 yabanıl suş ve Caco-2 R/G hücrelerinde apoB mRNA'sı üzerinde meydana gelen RNA düzenlenmesi incelenmiştir.

Şekil 4.1'e göre hem boş hem de negatif kontrol gruplarına ait FACS analiz grafiklerinde sıfıra yakın oranda mCherry/GFP diyagonalından bir sapma görülmektedir. Diğer taraftan deney grubu olan Transwell filtreleri üzerinde kültürlenen Caco-2 R/G suşlarında ise diğer gruplara kıyasla daha fazla bir sapma gözlenmektedir.

Bu durumun RNA düzenlenmesinin bir sonucu olarak ortaya çıktığı görülmektedir. Severi ve Conticello (2015)'in yaptığı çalışma ışığında ve Şekil 2.2'nin ilk bölümünde gösterildiği gibi, mCherry-apoB-GFP birleşik proteini kodlayan kimerik yapıya sahip Caco-2 R/G hücreleri hücre farklılaşması gerçekleştiğinde ince bağırsak enterositlerine benzemektedir. Bununla birlikte kimera üzerindeki apoB gen bölgesinden transkribe edilen mRNA üzerinde bulunan hedef sitozin APOBEC1 enzimi ve kofaktörlerinden oluşan editozom tarafından urasile dönüştürülecektir. Bu baz modifikasyonu nedeniyle bir translasyonel dur kodonu (UAA) oluşacağından yeşil florasan geni olan GFP'nin ekspresyonu engellenecektir. Sonuç olarak apoB mRNA'sı üzerindeki bu RNA düzenlenmesinin gerçekleştiği hücrelerde kırmızı-yeşil florasan proteinleri yerine sadece kırmızı florasan proteini üretilecektir. Bu durum ise sadece mCherry florasan geninin eksprese edildiği hücre sayısının mCherry ve GFP florasan genlerinin birlikte eksprese edildiği boş ve negatif kontrol gruplarına oranla daha fazla olması sonucunu doğurmaktadır.

4.2.2. Farklılaştırılmış Caco-2 Hücrelerinden RNA Ekstraksiyonu ve cDNA Sentezi

Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'te gösterildiği üzere 21 günlük farklılaşma sürecinin ardından Caco-2 hücrelerinden ve Caco-2 R/G suşlarından elde edilen mRNA'ların dağıldığı düşünülmektedir. Buna bağlı olarak komplementer DNA'lara karşılık gelmesi beklenen jel üzerindeki bantlar görülememektedir. Bunun hücrelerin farklılaşması aşamasında istenmeyen bir durumdan kaynaklandığı düşünülmektedir.

4.2.3. Knock-out Edilmiş Hücrelerinin Sekans Analizi

Bölüm 1.6.'da belirtildiği üzere i*n vitro* ve ökaryotik uygulamalarda crRNA ve tracrRNA tek bir kılavuz RNA (sgRNA) içine kaynaştırılmaktadır ve RNA güdümlü bir nükleaz olan Cas9 ile birlikte minimal bir fonksiyonel sistem oluşturmaktadır. Bu kompleks kılavuz RNA yardımıyla tanımlanan hedef bölgede çift zincir DNA kırıklarına sebep olmaktadır.

Ancak Şekil 4.7, Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da görüldüğü üzere hedef bölgelerdeki nükleotid dizilimleri birbirinin aynısı olup, yabanıl suştaki nükleotid dizilimiyle birebir benzerlik göstermektedir. Niccheri ve ark. (2017) tarafından yapılan çalışmadan yola çıkarak ilgili deneyde 48 saatlik Blasticidin antibiyotiği yardımıyla seçilimin ardından canlı kalan hücrelerde Cas9 nükleazının vekil hedef üzerinde bir indel meydana getirdiği düşünülmektedir. Ancak aynı nükleazın genomdaki hedef DNA üzerinde herhangi bir etki oluşturamaması kılavuz RNA'nın hedef bölgeye bağlanmasını engelleyen bir yada daha fazla etkenin varlığını düşündürmektedir.

Bu durum Çetintaş ve ark. (2017) tarafından sıralanan kılavuz RNA'ların oluşturulmasında dikkate alınması gereken parametrelerden (PAM dizilerinin tanımlanması, hedef bölge seçimi gibi) kaynaklandığı ve buna bağlı olarak Cas9 nükleaz ve helikaz aktivitelerinin gerçekleşememesi ile açıklanabilir. Zira CRISPR/Cas9 sisteminin etkinliği üzerine yapılmış olan bir araştırmada Thyme ve ark. (2016) kılavuz RNA'ların aktivitelerini kontrol eden mekanizmaların henüz tamamen aydınlatılamadığını belirtmiş ancak sistemin etkin olarak çalışmasına engel olabilecek muhtemel iki etken sıralanmıştır. Bunlar ya etkin bir Cas9-gRNA sisteminin kurulamaması yada kurulsa bile *in vivo* ortamlarda hedef bölgenin tanınamaması olarak ifade edilmiştir. Konuyu biraz daha açmak gerekirse, *in vitro* ortamlarda kılavuz RNA'nın primer yapısının değişikliğe uğrayarak sekonder bir yapıya sahip olabileceği ve bununda Cas9-gRNA kompleksinin çalışmasına etki edeceği belirtilmiştir. Bundan ayrı olarak, transkripsiyonel baskılayıcı proteinleri gibi dizi-spesifik genomik faktörlerin ve hedef bölgedeki kromatin yapısının aktif olan kompleksin bu bölgeyi tanımasına engel olabileceği ifade edilmiştir. Bu çalışmada bir transkripsiyonel repressor protein olan CTCF'nin Cas9-gRNA kompleksinin hedef bölgeye

bağlanmasını etkilediğini ve bu durumun ileriki çalışmalarda dikkate alınması gereken bir faktör olduğunun altı çizilmiştir.

Yuen ve ark. (2017) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise Thyme ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmaya benzer olarak kılavuz RNA'nın Cas9'a bağlanma ve yönlendirme kapasitesinin knock-out işlemini etkilediği ifade edilmiştir. Buna ek olarak, Yuen ve ark. (2017) gRNA ve Cas9'un ifade düzeyininde kompleksin çalışmasını etkileyeceğini belirtmişlerdir. Bölüm 3.2.3.2 ve Bölüm 3.2.3.3'te de belirtildiği üzere elektroporasyon sonrası hücrelerde istenilen taşıma kapasitesine ulaşılamamıştır. Bu durum transfeksiyon sonrası hücrelerde gRNA ve Cas9'un ifade düzeyinde bir problem olabileceğini akla getirmektedir. Bununla birlikte, kanser hücrelerinin genomik instabilitesinin CRISPR knock-out görüntülenmesinin önündeki en önemli engellerden biri olduğu ifade edilmiştir. Çalışmanın bu bölümünde Yuen ve ark. (2017) özellikle epitel tümörlerden elde edilen kanser hücrelerinde kromozomal instabilite ile karşılaşıldığından bahsetmektedirler. Bu durumda Cas9-aracılı gene düzenlenmesinin kromozomal instabiliteden etkilendiği düşünüldüğünde, hedef geninin artan kopyalarının bulunduğu bu tür kanser hücre hatlarında kılavuz RNA'nın hedef bölgeye yönlenmesinin zorlaşabileceği belirtilmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

5.1.1. RNA Düzenlenmesinin FACS Analizi İle Tespiti

Şekil 4.1'e göre deney grubu olarak kullanılan ve Transwell filtresi üzerinde kültürlenen Caco-2 R/G hücrelerinde boş ve negatif kontrol gruplarına oranla daha fazla mCherry/GFP diyagonalından bir sapma belirlenmiştir. Bu durum apoB mRNA'sının editlenmesi ile açıklanmaktadır.

5.1.2. Farklılaştırılmış Caco-2 Hücrelerinden RNA Ekstraksiyonu ve cDNA Sentezi

Hücre farklılaşması sürecinin ardından APOBEC1 ekspresyonu ve apolipoprotein düzenlenmesinin tespiti amacıyla yapılan RNA ekstraksiyonunun ardından cDNA sentezinin görüntülendiği jeller Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'te gösterilmiştir. Bu şekillere göre Caco-2 hücrelerinden ve Caco-2 R/G suşlarından elde edilen mRNA'ların dağıldığı düşünülmektedir.

5.1.3. Knock-out Edilmiş Hücrelerinin Sekans Analizi

Gen susturma amacıyla transfeksiyon uygulanan ve kültürlenen hücrelerden DNA çıkarımı ve PCR amplifikasyonunun ardından elde edilen gen örnekleri agaroz jel elektroforezine tabi tutulmuştur. Şekil 4.4, Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da gösterilen sonuçlar ışığında jel üzerindeki en belirgin bantlardan seçilen PCR ürünleri saflaştırmanın ardından sekanslanmak üzere Macrogen Europe'a (Hollanda) gönderilmiştir. Buna dair kromatografik sekans analizleri Şekil 4.7, Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre sekans analizi yapılan örneklerin hedef bölgelerinde baz dizilimlerinin yabanıl suşlarla aynı olduğu gözlemlenmektedir. Bu sonuç CRISPR/Cas9 gen düzenleme aracının işlevini yerine getirmemesi ile açıklanabilir.

5.2. Öneriler

Severi ve Conticello (2015)'in bulguları ile kıyaslandığında çalışmanın bu bölümünde deney grubunda %8.4' ten daha fazla bir sapmanın gözlenmesi beklenirdi. Bu durum şu şekilde açıklanabilir; Caco-2 yabanıl suşlarından üretilen Caco-2 R/G

suşları kültürlendikleri besiyerlerinde taşıma kapasitesine ulaştıklarında öncül numuneler alınarak yeni besiyerlerine aktarılmaktadır. Kimerik yapının transkribe edilme etkinliği zaman içerisinde her aktarımda düşmektedir. Dolayısıyla elde edilen %8.4' lük oranın artırılması yeni bir transfeksiyon ile Caco-2 yabanıl suşlarından türetilen Caco-2 R/G suşlarının hücre farklılaşmasına tabi tutulması ile sağlanabilir.

Ayrıca, Ferruzza ve ark. (2012) tarafından tarif edilen asimetrik kültürleme protokolünün diğer araştırmacılar tarafından kullanılan simetrik protokole kıyasla Caco-2 hücrelerinin farklılaşmasına olanak sağlamak için yeterli olabileceği gösterilmiştir. Buna ek olarak, asimetrik protokole göre sadece bazolateral besiyerinde FBS takviyesinin olması apikal besiyerine eklenen Caco-2 hücrelerinin Transwell hücrelerinin gözeneklerinden geçme eğilimlerini artırmaktadır. Bu sayede Caco-2 hücreleri farklılaşmalarının etkinliği artırılacaktır. Sonuç olarak elde edilen sonuçların geliştirilebilmesi adına asimetrik besiyeri protokolünün kullanılması ile sağlanabilir.

Hücre farklılaşması deneyinde ise APOBEC1 ekspresyonu ve ApolipoproteinB proteininin editlenmesi amacıyla yapılan RNA ekstraksiyonu sonucunda RNA'ların dağıldığı gözlemlenmiştir. Bu deney birkaç defa tekrarlanmasına rağmen aynı şekilde sonuçlanmıştır. Bu nedenle bu deneyin sonuçlarının geliştirilmesi adına hücreler yeni baştan Ferruzza ve ark. (2012) tarafından tarif edilen asimetrik kültürleme protokolüne uygun olarak farklılaşma sürecine tabi tutulmalıdır.

Knock-out deneyinde ise Bölüm 4.2.3' te tartışılan faktörler dikkate alınıp, kılavuz RNA'ların yeni baştan tasarlanması sağlanabilir ve bu yapılırken Çetintaş ve ark. (2017) tarafından belirtilen ilgili parametreler dikkatle ele alınabilir. Yine Bölüm 4.2.3'te bahsedilen özellikle epitel tümörlerden elde edilen kanser hücre hatlarında görülen kromozomal instabilite ve hedef bölgenin genomik yapısının dikkate alınması kullanılan Caco-2 hücre hatlarının kolorektal adenokarsinom kökenli olmasından dolayı ileriki çalışmalardan elde edilecek sonuçların geliştirilmesi adına fayda sağlayabilir.

6. KAYNAKLAR

Avesson L., Barry G. 2014. The emerging role of RNA and DNA editing in cancer. ***Biochimica et Biophysica Acta, Reviews on Cancer***, 1845: 308-316.

Baysal B.E., Sharma S., Hashemikhabir S., Janga S.C. 2017. RNA Editing in Pathogenesis of Cancer. ***Cancer Research***, 77 (14).

Blanc V., Henderson J.O., Newberry E.P., Kennedy S., Luo J., Davidson N.O. 2005. Targeted deletion of the murine apobec-1 complementation factor (ACF) gene results in embryonic lethality. ***Molecular and Cellular Biology***, 25; 7260–7269.

Blanc V., Henderson J.O., Newberry R.D., Xie Y., Cho S.J., Newberry E.P., Kennedy S., Rubin D.C., Wang H.L., Luo J., Davidson N.O. 2007. Deletion of the AU-rich RNA binding protein Apobec-1 reduces intestinal tumor burden in Apc(min) mice. ***Cancer Research***, 67: 8565–8573.

Cappione A.J., French B.L., Skuse G.R. 1997. A Potential Role for NFl mRNA Editing in the Pathogenesis of NFl Tumors. ***Am. J. Hum. Genet***. 60: 305-312.

Chen S.H., Habib G., Yang C.Y., Gu Z.W., Lee B. R., Weng S.A., Silberman S. R., Cal S.J., Deslypere J. P., Rosseneu M., Gotto A. M., Jr. Li W.H., Chan L. 1987. Apolipoprotein B-48 is the product of a messenger RNA with an organ-specific in-frame translational stop codon. ***Science*** 328, 363-366.

Chester A., Scott J., Anant S., Navaratnam N. 2000. RNA editing: cytidine to uridine conversion in apolipoprotein B mRNA. ***Biochimica et Biophysica Acta***, 1494; 1-13.

Conticello S.G. 2008. The AID/APOBEC family of nucleic acid mutators. ***Genome Biology***, 9: 229.

Conticello S.G., Thomas C.J., Petersen-Mahrt S.K., Neuberger M.S. 2005. Evolution of the AID/APOBEC family of polynucleotide (deoxy) cytidine deaminases. ***Mol Biol Evol***, 22(2): p. 367-377.

Çetintaş V.B., Kotmakçı M., Kaymaz B.T. 2017. Bağışıklık Yanıtından Genom Tasarımına; CRISPR-Cas9 Sistemi. ***Türkiye Klinikleri Journal of Med. Sci***.; 37(1): 27-42.

Davidson N.O., Innerarity T.L., Scott J., Smith H., Driscoll D.M., Teng B., Chan L. 1995. Proposed nomenclature for the catalytic subunit of the mammalian apolipoprotein B mRNA editing enzyme: APOBEC-1. RNA 1, 3.

Ding Y., Li H., Chen L.L., Xie K. 2016. Recent Advances in Genome Editing Using CRISPR/Cas9. ***Frontiers in Plant Science***; 7: 703.

Ferruzza S., Rossi C., Scarino M.L., Sambuy Y. 2012. A protocol for differentiation of human intestinal Caco-2 cells in asymmetric serum-containing medium. ***Toxicology in Vitro*** 26: 1252–1255.

Fossat N., Tourle K., Radziewic T., Barratt K., Liebhold D., Studdert J.B., Power M., Jones V., Loebel D.A.F., Tam P.P.L. 2014. C to U RNA editing mediated by APOBEC1 requires RNA-binding protein RBM47. ***EMBO Reports***, 15: 903–910.

Galloway C.A., Smith H.C. 2010. The expression of ApoB mRNA editing factors are not the sole determinants for the induction of editing in differentiating Caco-2 cells. ***Biochem. Biophys. Res. Commun***, 391(1): 659.

Gott J.M., Emeson R.B. 2000. Functions and mechanisms of RNA editing. ***Annual Reviews of Genetics***, 34: 499–531.

Harris R.S., Petersen-Mahrt S.K., Neuberger M.S.2002. RNA editing enzyme APOBEC1 and some of its homologs can act as DNA mutators. ***Molecular Cell***, 10: 1247–1253.

Hartner J.C., Schmittwolf C., Kispert A., Muller A.M., Higuchi M., and Seeburg P.H. 2004. Liver disintegration in the mouse embryo caused by deficiency in the RNA-editing enzyme ADAR1**.** ***Journal of Biol. Chem***. 279: 4894–4902.

Hirano, K., Mm, J., Funahashi, T., Baunoch, D.A., Davidson, N.O. 1997. Characterization of the human apobec- I gene: expression in gastrointestinal tissues determined by alternative splicing with production of a novel truncated peptide. ***Journal of Lipid Research***, 38; 847-859.

Hodges P.E., Navaratnam N., Greeve J.C., Scott J. 1991. Site-specific creation of uridine from cytidine in apolipoproteinB mRNA editing. ***Nucleic Acids Res***. 19 :1197–1201.

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: 5429-5433.

Izumi, M., Miyazawa, H., Kamakura, T., Yamaguchi, I., Endo, T., and Hanaoka, F. (1991). Blasticidin S-Resistance Gene (bsr): A Novel Selectable Marker for Mammalian Cells. ***Exp. Cell Res***. 197, 229-233.

Jiao S., Moberly J.B., and Schonfeld G. 1990. Editing of apolipoprotein B messenger RNA in differentiated Caco-2 cells. ***Journal of Lipid Research***, 31: 695-700.

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 (6096):816-821.

Johnson D.F., Poksay K.S., Innerarity T.L. 1993. The mechanism for apo-B mRNA editing is deamination. ***Biochem. Biophys. Res. Commun***. 195:1204–1210.

Kim H., Um E., Cho S.R., Jung C., Kim H., Kim J.S. 2011. Surrogate reporters for enrichment of cells with nuclease-induced mutations. ***Nature Methods***, 8 :941–943.

Kimura, M., Takatsuki, A., and Yamaguchi, I. (1994). Blasticidin S Deaminase Gene from Aspergillus terreus (BSD): A New Drug Resistance Gene for Transfection of Mammalian Cells. ***Biochim. Biophys. ACTA*** 1219, 653-659.

Knisbacher B.A., Gerber D., Levanon E.Y. 2015. DNA Editing by APOBECs: A Genomic Preserver and Transformer. ***Trends in Genetics***, 10: 005.

Lau V., Davie J.R. 2017. The discovery and development of the CRISPR system in applications in genome manipulation. ***Biochem Cell Biol***., 95(2):203-210.

Lee R.M., Hirano K.I., Anant S., Baunoch D., Davidson N.O. 1998. An alternatively spliced form of Apobec-1 messenger RNA is overexpressed in human colon cancer. ***Gastroenterology***, 115:1096–1103.

Lee S.H., Bae S. 2016. Structural and dynamic views of the CRISPR-Cas system at the single-molecule level. ***BMB Reports***; 49(4):201-207.

Leoni B.D., Natoli M., Nardella M., Bucci B., Zucco F., D'Agnano I., Felsani A. 2012. Differentiation of Caco-2 cells requires both transcriptional and post-translational down-regulation of Myc. ***International Society of Differentiation***, 83: 116-127.

Licht K., Jantsch M.F., 2016. Rapid and dynamic transcriptome regulation by RNA editing and RNA modifications. ***Journal of Cell Biology***, 213: 15–22.

Mattick J.S., Mehler M.F. 2008. RNA editing, DNA recoding and the evolution of human cognition. ***Trends Neuroscience***. 31: 227–233.

Maydanovych O., Beal P.A. 2006. Breaking the central dogma by RNA editing. ***Chem. Rev***., 106: 3397-3411.

Mehta A., Kinter M.T., Sherman N.E., Driscoll D.M. 2000. Molecular cloning of apobec-1 complementation factor, a novel RNA-binding protein involved in the editing of apolipoprotein B mRNA. ***Molecular and Cellular Biology***, 20(5):1846–1854.

Mukhopadhyay D., Anant S., Lee R.M., Kennedy S., Viskochil D., Davidson N.O. 2002. C→U editing of neurofibromatosis 1 mRNA occurs in tumors that express both the type II transcript

and apobec-1, the catalytic subunit of the apolipoprotein B mRNA-editing enzyme. ***Ann. Journal Human Genetics***, 70 (1): 38–50.

Natoli M., Leoni B.D., D'Agnano I., Zucco F., Felsani A. 2012. Good Caco-2 cell culture practices. ***Toxicology in Vitro***, 26: 1243–1246.

Navaratnam, N., Sarwar, R. 2006. An overview of cytidine deaminases. ***Int. Journal of Hematology***, 83, 195–200.

Niccheri F., Pecori R., Conticello S.G. 2017. An efficient method to enrich for knock-out and knock-in cellular clones using the CRISPR/Cas9 system. ***Cellular and Molecular Life Sciences***, 74: 3413–3423.

Olejnik, A., Lewandowska, M., Grajek, W., Czaczyk, K. 2003. New rapid method of Caco-2 cell differentiation. ***Polish Journal of Food And Nutrition Sciences***, 12/53: 60–64.

Peltonen S., Kallionpää R.A., Peltonen J. 2017. Neurofibromatosis type 1 (NF1) gene: Beyond café au lait spots and dermal neurofibromas. ***Experimental Dermatology***, 26 (7): 645–648.

Petersen-Mahrt S.K., Neuberger M.S. 2003. In vitro deamination of cytosine to uracil in single-stranded DNA by apolipoprotein B editing complex catalytic subunit 1 (APOBEC1). ***Journal of Biol Chem***, 278:19583–19586.

Powell, L. M., Wallis, S. C., Pease, R. J., Edwards, Y. H., Knott, T. J. and Scott, J. 1987. A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine. ***Cell***, 50; 831-840.

Ran F.A. 2017. Adaptation of CRISPR nucleases for eukaryotic applications. ***Analytical Biochemistry***, 532; 90-94.

Rath D, Amlinger L, Rath A, Lundgren M. 2015. The CRISPR-Cas immune system: biology, mechanisms and applications. ***Biochimie***, 117:119-128.

Rebhandl S., Huemer M., Greil R., Geisberger R. 2015. AID/APOBEC deaminases and cancer. ***Oncoscience***, 2 (4); 320-333.

Roberts, S.A., Gordenin, D.A. 2014. Hypermutation in human cancer genomes: footprints and mechanisms. ***Nat. Rev. Cancer***, 14(12): 786–800.

Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. ***Science***, 239: 487-491.

Salter J.D., Bennett R.P., Smith H.C. 2016. The APOBEC Protein Family: United by Structure, Divergent in Function. ***Trends in Biochemical Sciences***, 41: 7.

Sambuy Y., De Angelis I., Ranaldi G., Scarino M.L., Stammati A., Zucco F. 2005. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. ***Cell Biology and Toxicology***, 21: 1-26.

Saraconi G., Severi F., Sala C., Mattiuz G., Conticello S.G. 2014. The RNA editing enzyme APOBEC1 induces somatic mutations and a compatible mutational signature is present in esophageal adenocarcinomas. ***Genome Biology***, 15: 417.

Severi F., and Conticello S.G. 2015. Flow-cytometric visualization of C→U mRNA editing reveals the dynamics of the process in live cells. ***RNA Biology***, 12: 389–397.

Shui B., Hernandez Matias L., Guo Y., Peng Y. 2016. The Rise of CRISPR/Cas for Genome Editing in Stem Cells. ***Stem Cells Int.*** 8140168: 1-17.

Skuse G.R., Cappione A.J., Sowden M., Metheny L.J., and Smith H.S. 1996. The neurofibromatosis type I messenger RNA undergoes base-modification RNA editing. ***Nucleic Acids Research***, 24;3, 478-486.

Smith H.C., Gott J.M., Hanson M.R. 1997. A guide to RNA editing. ***RNA*** 3: 1105–1123.

Smith C.H. 2007. Measuring Editing Activity and Identifying Cytidine-to-Uridine mRNA Editing Factors in Cells and Biochemical Isolates. ***Methods in Enzymology***, 42: 389-410.

Smith H.C., Bennetta R.P., Kizilyer A., McDougalla W.M., Prohaskaa K.M. 2012. Functions and regulation of the APOBEC family of proteins. ***Seminars in Cell & Developmental Biology***, 23: 258– 268.

Sowden M.P., Eagleton M.J., Smith H.C. 1996. Overexpression of APOBEC-1 results in mooring sequence dependent promiscuous RNA editing. ***The Journal of Biological Chemistry***, 271-6; 3011–3017.

Tariq A., Jantsch M.F. 2012. Transcript diversification in the nervous system: A to I RNA editing in CNS function and disease development. ***Frontiers in Neuroscience***, 6: 99.

Teng B., Burant C.F., Davidson N.O. 1993. Molecular cloning of an apolipoprotein B messenger RNA editing protein. ***Science*** 260, 1816–1819.

Thyme S.B., Akhmetova, L., Montague, T.G., Valen, E., Schier, A.F. 2016. Internal guide RNA interactions interfere with Cas9-mediated cleavage. **Nature Communications**, 7: 11750.

Verhoeckx, K. 2015. The Impact of Food Bioactives on Health In Vitro and Ex Vivo Models. Editors; Paul Cotter, Iván López-Expósito, Charlotte Kleiveland, Tor Lea, Alan Mackie, Teresa Requena, Dominika Swiatecka, Harry Wichers. Springeropen, 103-111. Netherlands.

Van der Valk, J., Brunner D., De Smet, K., Fex Svenningsen, A., Honegger, P., Knudsen, L.E., Lindl, T., Noraberg, J., Price, A., Scarino, M.L., Gstraunthaler, G. 2010. Optimization of chemically defined cell culture media – Replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. ***Toxicology in Vitro***, 24: 1053–1063.

Wright, A.V., Nunez, J.K., Doudna, J.A. 2016. Biology and Applications of CRISPR Systems: Harnessing Nature's Toolbox for Genome Engineering. ***Cell***, 164: 29-44.

Yamanaka S., Balestra M.E., Ferrell L.D., Fan J., Arnold K.S., Taylor S., Taylor J.M., Innerarity T.L. 1995. Apolipoprotein B mRNA-editing protein induces hepatocellular carcinoma and dysplasia in transgenic animals. ***Proc. Natl. Acad. Sci***., 92:8483–8487.

Yuen, G., Khan, F.J., Gao, S.,Stommel, J.M., Batchelor, E., Wu, X., Luo, J. 2017. CRISPR/Cas9-mediated gene knockout is insensitiveto target copy number but is dependent on guide RNA potency and Cas9/sgRNA threshold expression level. **Nucleic Acids Research**, 45;20, 12039–1205.

URL-1 Erişim: [http://bio.classes.ucsc.edu/bio105l/EXERCISES/PCR%20cleanup.pdf], Erişim Tarihi: 13.02.2018.

URL-2 Erişim: [http://www.eeescience.utoledo.edu/Faculty/Sigler/Von_Sigler/LEPR_ Protocols_files/PCR.pdf], Erişim Tarihi: 15.02.2018.

EKLER

EK.1. Kullanılan cihazlar

Dondurucu (-20^{0}C)	Sanyo
Dondurucu (-4^{0}C)	Bio Rad
Işık Mikroskopu	Leica DMIL Inverted
Steril Kabin	BioAir Safe Flow 1.2
Termosikler	BIOER LifeEco PCR
Dijital İnkübatör	Thermo Scientific 8000DH
Santrifüj	Thermo Scientific Megafuge 40R
Soğuk Santrifüj	Eppendorf
Otoklav	Steristeam
Su Banyosu	Nüve BM302
Dijital Mikrosantrifüj Isıtıcı	Labnet International
FACS Analiz Cihazı	BD Accuri C6
Elektroporatör	Gene Pulser Xcell-BioRad
Yatay DNA Elektroforezi	SciePlus CHU20 Maxi
Transilluminatör	UVP Benchtop 2UV
Jel Görüntüleme Kamerası	Uvitec Gel Doc HD2
Buz Makinesi	Nuove SL60
Mikrodalga Fırın	Delonghi
Mikropipet Seti	Gilson
Mikropipet Uçları (10, 20, 200 and 1000 µl)	Sarstedt Biosphere
Vorteks	VELP Scientifica
Spektrofotometre	Eppendorf Biophotometer UV/VIS
Hassas Terazi	PBI Model BC
Pipet Tabancası	SwiftPet+
Serolojik Pipetler (2 ml, 5ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt
Mikroplaka (96, 24 and 6 wells)	EuroClone
Petri Kutusu (6 and 10 cm)	EuroClone

EK.2. Kullanılan kimyasal maddeler

Fetal Bovine Serum	Carlo Erba
Dulbecco's Modified Eagle Medium	EuroClone
L-Glutamine 100X, 200mM	Carlo Erba
Penicillin-Streptomycin Solution 100X	EuroClone
Trypsin-EDTA Solution	Lonza
Dulbecco’s Phosphate Buffered Saline Solution	Gibco
Blasticidin	Invivogen
Puromycin	Invivogen
TRIzol	Thermo Fisher
Chloroform	Panreac
Isopropanol	Panreac
Ethanol	DiaPath
Diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated nuclease-free water	B-Braun
Taq Polimerase	ABAnalitica
dNTPs	ABAnalitica
Agarose	Experteam
Ultrapure Agarose	Invitrogen
Tris Base	Sigma-Aldrich
EDTA	Alfa Aeasar
Boric Acid	Sigma-Aldrich
Nucleic Acid Staining Solution (Eurosafe)	EuroClone
Loading Dye 6X	Thermo Scientific
DNA Ladder (100bp)	Thermo Scientific

ÖZGEÇMİŞ

Adı	:	Mahmut
Soyadı	:	ÖZER
Doğum Yılı	:	1977
Doğum Yeri	:	ADIYAMAN
Yabancı Dil	:	İngilizce
İlkokul	:	Cumhuriyet İlkokulu
Ortaokul	:	Gazi Ortaokulu
Lise	:	Malatya Akçadağ Anadolu Öğretmen Lisesi
Lisans	:	Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Biyoloji Öğretmenliği Bölümü
Yüksek Lisans	:	Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI İNTİHAL RAPORU FORMU

ÖĞRENCİ BİLGİLERİ	
ADI VE SOYADI	MAHMUT ÖZER
ÖĞRENCİ NO	16801001
EĞİTİM – ÖĞRETİM YILI	2017-2018
YARIYIL	☐ Güz ☒ Bahar
ANABİLİM DALI	BİYOLOJİ
PROGRAM	Yüksek Lisans
TEZ KONUSU	APOBEC1 ENZİMİ VE YARDIMCI KOFAKTÖRLERİ İÇİN HÜCRESEL KLONLARIN ÜRETİLMESİ
İNTİHAL RAPORU BİLGİLERİ	
RAPOR TÜRÜ	Tez Savunma Sınavı Sonrası
SAYFA SAYISI	60
BENZERLİK ORANI	% 18
RAPORLAMA TARİHİ	29/06/ 2018

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın kapak sayfası, giriş, ana bölümler, sonuç ve tartışma kısımlarından oluşan toplam 60 sayfalık kısmına ilişkin, 29/06/2018 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından .....*TURNİTİN*..... adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan intihal raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 18 'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

- ☒ Kabul/Onay sayfaları hariç,
- ☐ Kaynakça hariç
- ☐ Alıntılar hariç/dâhil
- ☐ Diğer

Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Programlarda Tez Çalışması İntihal Raporu Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edilmesi durumunda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

(İmza)

Mahmut Özer

(İmza)	(İmza)
29/06/2018	29/06/2018
Doç. Dr. Veysel TOLAN **Tez Danışmanı**	Prof. Dr. Yüksel COŞKUN **Anabilim Dalı Başkanı**