T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PANKREAS KANSERİ GELİŞİMİNDE ETKİLİ OLAN TP53 GENİNDEKİ R273H MUTASYONUNUN CRISPR/CAS9 TEKNİĞİ İLE DÜZELTİLMESİ

Şeyma Hazal ÇETİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Dr.Öğr.Üyesi Dudu ERKOÇ KAYA

Konya-2022

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PANKREAS KANSERİ GELİŞİMİNDE ETKİLİ OLAN TP53 GENİNDEKİ R273H MUTASYONUNUN CRISPR/CAS9 TEKNİĞİ İLE DÜZELTİLMESİ

Şeyma Hazal ÇETİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Dr.Öğr.Üyesi Dudu ERKOÇ KAYA

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 21202127 proje numarası ile desteklenmiştir.

Konya-2022

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince engin bilgi, birikim ve tecrübeleri ile yol gösteren ve bu süreçte desteğini esirgemeyen, çok değerli danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Dudu ERKOÇ KAYA'ya,

Yüksek lisans eğitim süresi boyunca çok değerli bilgi ve birikimlerinden yararlandığım sevgili hocam Prof.Dr. Hilal ARIKOĞLU'na,

Bu süreçte bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, kendisi ile çalışmaktan çok keyif aldığım, tez sürecinde her zaman desteğini üzerimde hissettiğim Arş. Gör. Burak DAĞDELEN'e,

Tez süresince tecrübelerini paylaşması ve desteklerinden dolayı Arş. Gör. Fatma GÖKTÜRK'e,

Her zaman yanımda olan ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, bu süreçte iyi ki tanıdığım dediğim sevgili arkadaşlarım, Gönül AKMEŞE, Batuhan ŞANLITÜRK ve Seren MIZRAK DANACI'ya

Bu süreçte benden maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, her koşulda yanımda olan ve kendilerinden her zaman güç aldığım sevgili babam Ayhan ÇETİN, sevgili annem Gülay ÇETİN ve kardeşlerim Hülya ve Baran ÇETİN'e sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR ... iv
ÖZET ... v
SUMMARY ... vi
1.GİRİŞ ... **1**
1.1. Pankreas ... 3
1.2. Pankreas Kanseri ... 4
1.3. Pankreas Kanser Riski Ve Oluşumundaki Etmenler ... 5
1.4. Pankreas Kanser Epidemiyolojisi ... 7
1.5. Pankreas Kanserinin Histolojik ve Klinik Özellikleri ... 8
1.6. Pankreas Kanserinin Moleküler Patogenezi ... 8
1.6.1. Onkogenler ... 9
1.6.2. DNA Onarım Genleri ... 11
1.6.3. Tümör Baskılayıcı Genler ... 12
1.7. Genom Düzenleme Yöntemleri ... 17
1.7.1. ZFN (Çinko Parmak Nükleazları) ... 17
1.7.2. TALEN (Transkripsiyon Aktivatör Benzeri Efektör Nükleaz) ... 18
1.7.3. CRISPR/Cas9 (Kümelenmiş Düzenli Aralıklı Kısa Palindromik Tekrar Dizileri) ... 19
1.8. Çift Zincir Kırıklarının Onarım Mekanizmaları ... 21
1.8.1. Homolog Rekombinasyon (HR) ... 22
1.8.2. Homolog Olmayan Uç Birleştirme (NHEJ) ... 24
1.9. CRISPR/Cas9 Teknolojisinin Gelişimi ... 25
1.10. CRISPR/Cas9'un Avantajları ve Sınırlamaları ... 26
1.11. CRISPR/Cas9 Yapılarının Hedef Hücrelere Aktarılması ... 28
1.11.1.Viral Vektörler ... 28
1.11.2.Viral Olmayan Vektörler ... 29
1.11.3.Fiziksel Yöntemler ... 30
2. GEREÇ ve YÖNTEM ... **31**
2.1. Gereç ... 31
2.1.1. Ekipmanlar ... 31
2.1.2. Kimyasallar ve Sarf Malzemeler ... 32
2.2.Yöntem ... 33

2.2.1. TP53 Genine Ait Biyoinformatik Bilgilerin Elde Edilmesi 33
2.2.2. pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA Plazmid 34
2.2.3. CRISPR/Cas9 Yapılarının Oluşturulması 36
2.2.4. Hücre Kültürü……..……..…..43
2.2.5. Elektroporasyon…..……...44
2.2.6. DNA İzolasyonu…….…….……44
2.2.7. Melting Curve Analizi…….……...…..……44
2.2.8. PCR/Dizi Analizi Yöntemi İle Doğrulanması…….…….…..…..……..……...45
3. BULGULAR **47**
3.1. Plazmid Kesimi ve Stabilizasyonu 47
3.2. Lineer Haline Getirilen Plazmid Vektörün Jelden İzolasyonu 48
3.3. Tasarlanan sgRNAnın Ligasyon İşleminin Kontrolü 49
3.4. Hücre Kültürü…… 51
3.5. Elektroporasyon Sonrası Hücrelerde GFP+ Işımaların İncelenmesi ……..……...52
3.6. Melting Curve Analizi……..……....……53
3.7. PCR/Dizi Analizi Yöntemi İle Doğrulanması……..……..54
4. TARTIŞMA **55**
5. SONUÇ VE ÖNERİLER **60**
6. KAYNAKLAR **60**
7. EKLER **66**
EK A: ETİK KURUL ONAYI
EK B: TURNİTİN RAPORU
8. ÖZGEÇMİŞ **68**

SİMGELER VE KISALTMALAR

AAV: Adeno İlişkili Virüsler

ACC: Asiner Hücreli Karsinom

AdV: Adenoviral Vektörler

AKT2: AKT Serin/Treonin Kinaz 2

AmpR: Ampisilin Antibiyotik Direnci

ASR: Standardize İnsidans Hızı

BRCA2: Meme Kanseri 2 geni

CDKN2A: Sikline Bağımlı Kinaz İnhibitörü 2A

CRISPR: Kümelenmiş Düzenli Aralıklı Kısa Palindromik Tekrar Dizileri

crRNA: CRISPR RNA

DSB: DNA Çift Zincir Kırıkları

dsDNA: Çift Sarmallı DNA

ε-hücreleri: epsilon Hücreleri

FA: Fanconi Anemisi

FANCC: Fanconi Anemi C Grubu

FANCG: Fanconi Anemi G Grubu

GAP: Gtpaz Aktive Edici Protein

GLOBOCAN: Küresel Kanser Gözlemevi

GLUT-1: Glikoz Taşıyıcı Tip 1

gRNA: Rehber RNA

GTP: Guanozin Trifosfat

HIF-1α: Hipoksi İle İndüklenebilir Faktör-1α

HR:Homolog Rekombinasyon

LV: Lentiviral Vektörler

MARCH2: Membranla İlişkili RING-CH Proteini

MFN2: Mitokondriyal GTPaz Mitofusin-2

MIEN1: Göç ve İstila Güçlendirici-1

MLH1: DNA Uyumsuzluk Onarım Geni

NES: Nükleer İhraç Sinyal Dizisi

NHEJ: Homolog Olmayan Uç Birleştirme

NLS: Nükleer Lokalizasyon Sinyal Dizisi

PAM: Protoaralık İlişkili Motif

PanNEN: Pankreas Nöroendokrin Neoplazmı

PC: Pankreas Kanseri

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PDAC: Pankreas Duktal Adenokarsinomu

SDF-1: Stromal Hücre Kaynaklı Faktör-1

SPN: Katı Psödo-Papiller Neoplazmı

SPT: Solid Psödo-Papiller Tümörü

ssODN: Tek Zincirli Oligonükleotit

TAE: Tris EDTA Buffer

TALEN: Transkripsiyon Aktivatör Benzeri Efektör Nükleazlar

TGF-β: Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta

TP53: Tümor Protein p53

tracrRNA: Trans-Aktive Edici crRNA

ZFN: Çinko Parmak Nükleazlar

α-Hücreleri: Alfa Hücreleri

β-Hücreleri: Beta Hücreleri

δ-Hücreleri: Delta Hücreleri

ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PANKREAS KANSERİ GELİŞİMİNDE ETKİLİ OLAN TP53 GENİNDEKİ R273H MUTASYONUNUN CRISPR/CAS9 TEKNİĞİ İLE DÜZELTİLMESİ

Şeyma Hazal ÇETİN

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2022

Günümüzde yaygın olarak kullanılan genom düzenleme teknolojileri ZFN (Zinc Finger Nucleases), TALEN (Transc ription Activator-Like Effector Nucleases) ve CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)'dir. Çeşitli endonükleazlar aracılığıyla oluşturulan çift zincir DNA kırıklarının homolog rekombinasyon (HR) veya homolog olmayan uç birleştirmeleri (NHEJ) yoluyla tamir edilmesi temeline dayanan bu teknolojiler, hedef genom bölgelerinin düzeltilmesinde hücrenin normal DNA tamir mekanizmalarını kullanmakta ve değişik genetik hastalıklarda genomun manipüle etmek amacıyla uygulanmaktadır. Yakın zamanda keşfedilen ve doğada bakteriyel bir savunma sistemi olarak işlev gören RNA aracılı kümelenmiş düzenli aralıklı palindromik tekrar dizileri (CRISPR) ve CRISPR ilişkili protein 9 (Cas9) sistemi (CRISPR/Cas9), günümüzde en güncel gen modifikasyon yöntemlerinden biri olarak birçok alanda etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Pankreastik Duktal Adenokarsinom (PDAC) pankreas kanserleri içinde en agresif tip olarak bilinmektedir. PDAC da tek bir genden ziyade birden fazla genetik mutasyona rastlanılabilir. Bunlardan en sık karşılaşılan mutasyonlar sırayla *KRAS, TP53, CDKN2A ve SMAD4* genlerinde meydana gelen mutasyonlardır. *TP53* geni bir tümor supresör gendir. Tümör supresör genler hücre çoğalmasında negatif yönde rol oynayan genlerdir. Hücre siklusunu denetlerler. Tamir edilemeyen DNA hasarı tespit edilen hücrelerde hücreyi apoptoza yönlendirme ve anormal hücre çoğalmasını engelleme gibi birçok önemli noktada görev alır. Bu gende en sık meydana gelen mutasyon türü ise yanlış anlamlı mutasyon türüdür ve hücre siklusundaki kilit görevi nedeniyle *TP53* geni mutasyonları birçok kanserde en yaygın değişiklik olarak öne çıkar. Yumurtalık kanseri, meme kanseri, akciğer kanseri ve pankreas kanseri gibi birçok kanser türlerinde *TP53* genindeki mutasyonlar yaygın görülmektedir. PDAC'da, *TP53* geninde görülen mutasyonlardan özellikle R273H (Arg273His) mutasyonunun tümörigenezi başlatma potansiyelini düşünülmektedir. Bu çalışmada, PANC-1 insan pankreas kanseri hücrelerinde, *TP53* geninde meydana gelen R273H mutasyonunun CRISPR/Cas9 tekniği kullanılarak düzeltilmesi amaçlandı. Bunun için gerekli R273H mutasyon bölgesine spesifik ssODN ve gRNA tasarımları yapılarak, sentezlettirildi. Hazır gRNA'lar seçilen plazmid vektöre başarıyla aktarılarak klonlandı. Klonlanan plazmidler ve hedef için donör ssODN ler uygun besiyeri ortamında çoğaltılan PANC-1 hücrelerine elektroporasyon yöntemi ile başarıyla transfekte edildi. Transfeksiyon sonrası 24 saat kültüre dilenPANC-1 hücrelerinden DNA izolasyonları yapıldı. Düzeltme işleminin kontrolü için melting curve analizi ve ayrıca PCR/sanger dizileme yapıldı. Analiz sonuçlarımıza göre; CRISPR yapılarının tasarımı, vektöre klomlanması ve sonrasında bu yapıların hücreye aktarılması adımlarının başarılı bir şekilde tamamlanmasına rağmen PANC-1 pankreas hücrelerinde R273H mutasyonu düzeltilemedi.

Anahtar Kelimeler: CRISPR/Cas9, *TP53* geni, PDAC, R273H mutasyonu

SUMMARY

REPUBLIC OF TURKEY

SELÇUK UNIVERSITY

HEALTH SCIENCES INSTITUTE

EDITING OF THE R273H MUTATION IN TP53 GENE, WHICH IS EFFECTIVE IN THE DEVELOPMENT OF PANCREATIC CANCER, BY USING THE CRISPR/CAS9 TECNIQUE

Şeyma Hazal ÇETİN

DEPARTMENT OF MEDICAL BIOLOGY

MASTER THESIS / KONYA-2022

Today, commonly used genome editing technologies are ZFN (Zinc Finger Nucleases), TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) and CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) technologies. These technologies, which are based on the repair of double-stranded DNA breaks created by various endonucleases by homologous recombination (HR) or non-homologous end joining (NHEJ), use the normal DNA repair mechanisms of the cell to edit target genome regions and are applied for the manipulation of the genome in various genetic diseases. RNA-mediated clustered regularly spaced palindromic repeat sequences (CRISPR) and CRISPR-associated protein 9 (Cas9) system (CRISPR/Cas9), which have been discovered recently and function as a bacterial defense system in nature, are used as an effective method in many fields as one of the most up-to-date gene modification methods. Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is known as the most aggressive type of pancreatic cancer. More than one genetic mutation can be found in pancreatic ductal adenocarcinoma rather than a single gene. The most common mutations among these are the mutations occurring in KRAS, TP53, CDKN2A and SMAD4 genes, respectively. The TP53 gene is a tumor suppressor gene. Tumor suppressor genes are genes that play a negative role in cell proliferation. They control the cell cycle. It plays an important role in many important points such as directing the cell to apoptosis and preventing abnormal cell proliferation in cells with unrepairable DNA damage. The most common type of mutation in this gene is missense mutations and TP53 gene mutations stand out as the most common change in many cancers due to its key role in the cell cycle. Mutations in the TP53 gene are common in many cancer types such as ovarian cancer, breast cancer, lung cancer and pancreatic cancer. In PDAC, mutations in the TP53 gene, especially the R273H (Arg273His) mutation, are thought to increase the potential to initiate tumorigenesis. In this study, it was aimed to correct the R273H mutation in the TP53 gene in PANC-1 human pancreatic cancer cells by using the CRISPR/Cas9 technique. For this, specific ssODN and gRNA for R273H mutation region were designed and synthesized. Ready gRNAs were successfully transferred into the selected plasmid vector and cloned. The cloned plasmids and donor ssODNs were successfully transfected into PANC-1 cells grown in the appropriate medium by electroporation method. DNA isolations were made from PANC-1 cells cultured for 24 hours after transfection. Melting curve analysis and also PCR/sanger sequencing were performed to confirm the correction process. According to our analysis results; despite the successful completion of the designing and cloning of CRISPR constructs and subsequently transfer of these constructs to the cells, the R273H mutation could not be corrected in PANC-1 pancreatic cells.

Keywords: CRISPR/Cas9, *TP53* gene, PDAC. R273H mutation

1. GİRİŞ

Pankreasın en sık görülen kanseri olan pankreas duktal adenokarsinomunun (PDAC), 2030'dan önce kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedeni olacağı ve 2040'a kadar dünya çapında 46.000 ölümle sonuçlanacağı tahmin edilmektedir (Sivapalan ve ark 2022).

Belirgin olarak herhangi bir semptom vermeden sessizce ilerleyen pankreas kanserinde, hastaların %80'inden fazlasında tanı sırasında lokal veya uzak metastaz gerçekleşmiş olduğundan potansiyel olarak küratif cerrahi tedavi uygun olamamaktadır. Cerrahi rezeksiyon geçirmiş olanların dahi %70'inde nüks ve metastaz gelişmektedir (Sohn ve ark 2000). İnsan kanserleri arasında başa çıkılması en zorlu tiplerden olan Pankreas kanseri gelişimini etkileyen, sigara içimi, obezite, diyabet, kalıtsal pankreatit ve kalıtsal genetik faktörler gibi birçok risk faktörleri bulunmaktadır (Klein 2021).

Pankreas kanseri gelişimi ve metastazında en sık mutasyona uğrayan genlerin keşfi, bu maligniteyi yönlendiren temel yolaklara ilişkin bir öngörünün sağlanması ve hedeflenmiş gen tabanlı müdahaleler için yeni fırsatlar yaratılması için çok önemlidir (Du ve ark 2016). Bu kanserin moleküler patolojisine bakıldığı zaman, tümörlerin %90'ından fazlasında *KRAS*'taki aktive edici mutasyonlar hakimdir. Daha sonra *TP53, CDKN2A (Sikline Bağımlı Kinaz İnhibitörü 2A)* ve *SMAD4*'ün inaktive edici mutasyonları, pankreas kanserlerinin %50-80'inde meydana gelirken, *ARID1A, MLL3* ve *TGFBR2* dahil diğer genlerin, tümörlerin yaklaşık %10'unda mutasyona uğradığı görülmüştür (Kleeff ve ark 2016).

P53 proteini, 17 numaralı kromozomun kısa kolunda yer alan 11 ekzon ve 10 intron içeren *TP53* geni tarafından kodlanmaktadır (Gupta ve ark 2019). *TP53,* hücre döngüsünün durdurulması, DNA onarımı, farklılaşması ve apoptoz ile ilgili çok işlevli bir DNA bağlayıcı proteini kodlayan bir tümör baskılayıcı gen olarak adlandırılır ve insan kanserlerinin yaklaşık %50'sinde ve kalıtsal kanser sendromları olan ailelerin germ hattı DNA'sında mutasyona uğradığı görülmektedir (Liu ve Gelmann 2002). *TP53*'ün tümör baskılayıcı fonksiyonunun kaybına ek olarak gende meydana gelen mutasyonlar kanser hücrelerin daha kötü özellikler de kazandırmaktadır (Li ve ark 2014).

Pankreas kanseri 21. yüzyılın tüm bilimsel ve teknolojik ilerlemelerine rağmen, mevcut tedavi seçeneklerinin çok yetersiz ve etkisiz kaldığı, hastaları da, bu konuda çalışan sağlık profesyonellerini çaresiz bırakan zorlu ve ölümcül bir kanser türüdür. Yeni tedavi edici ajanların geliştirilmesi, hastalığın gelişiminde etkili çevresel ve kalıtımsal faktörlerin ortadan

kaldırılmasına yönelik alternatif stratejilerin geliştirilmesi bu zorlu mücadelede başarılı olmak için son derece gereklidir.

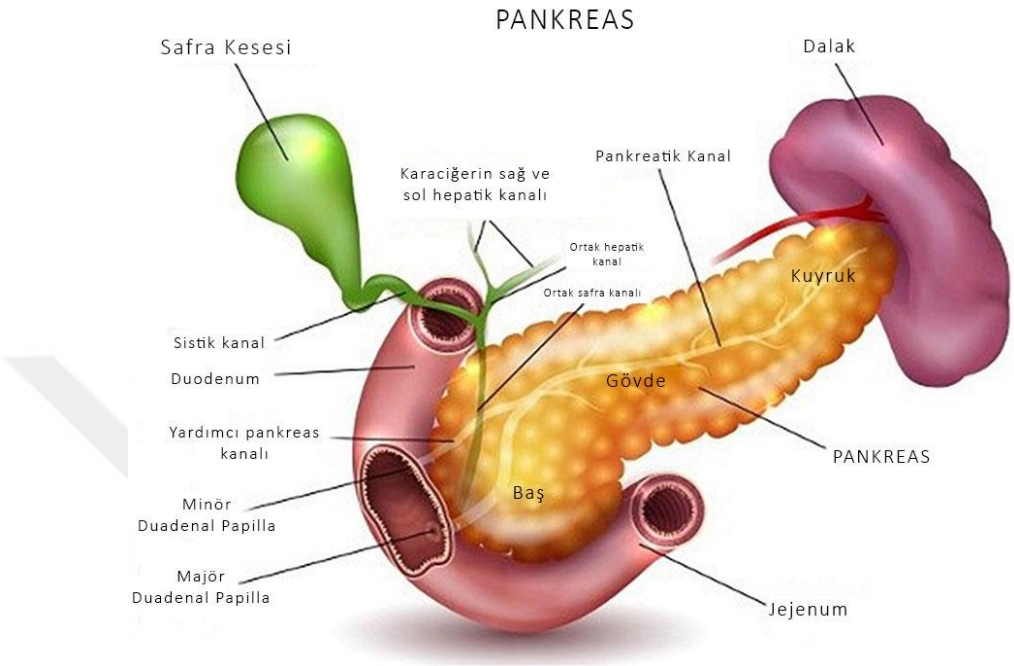
Kanser tedavi edici ajanlar ve yöntemlerin geliştirilmesi çalışmalarında kullanılan stratejiler içinde en yeni olmasına rağmen en çok ümit vaad edeni CRISPR/Cas9 (düzenli aralıklarla bölünmüş kısa palindromik tekrar kümeleri / CRISPR-ilişkili nükleaz-9) genom düzenleme teknolojisi; hedef hücrenin DNA'sında çift iplik kırığı oluşturarak doğal hücresel DNA tamir mekanizmalarından birisi olan homolog rekombinasyon tamir yolu aracılığı ile genom düzenlenmesini amaçlayan bir yaklaşımdır.

Genom düzenleme, hedef bölgeye özgü olarak genomda değişiklikler yapma işlemidir. Hastalığa neden olan genleri devre dışı bırakarak veya yeni koruyucu genler ekleyerek, genetik yapıyı kalıcı olarak değiştirerek hastalıkları tedavi etmek için kullanılabilir (Jiang ve ark 2020). Bu doğrultuda, CRISPR/Cas9 tekniği, pankreas kanseri araştırmalarında hastalık ilerlemesinde rol oynayan genleri devre dışı bırakmak için yaygın olarak kullanılmaktadır (Yang ve ark 2019).

Sunulan tez çalışmasında, yeni nesil genom düzenleme teknolojisi CRISPR/Cas9 kullanılarak, insan PANC-1 pankreas kanser hücrelerinde *TP53* geninde R273H mutasyonunun düzeltilmesi amaçlandı.

1.1. Pankreas

Pankreas, karın boşluğunun suprakolik bölmesinin tabanında yer alan büyük, retroperitoneal bir organdır. Bir baş, boyun, gövde ve kuyruğa sahiptir (Bazira ve Mahadevan 2022) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. İnsan pankreasının genel yapısı (Karpińska ve Czauderna 2022)

Pankreas, önemli endokrin ve ekzokrin fonksiyona sahip olan karmaşık bir organdır. Endokrin rolü, Langerhans adacıkları tarafından, glukoz homeostazını düzenlemek için kan dolaşımına insülin ve glukagon dahil olmak üzere çok sayıda hormon salgılayan özel hücre tipleri tarafından gerçekleştirilir. Pankreasın büyük çoğunluğunu oluşturan ekzokrin rolü ise ince bağırsağa sindirim enzimleri salgılanması sonucu oluşur. Sindirim enzimleri asiner hücreler tarafından üretildikten sonra bir dizi pankreas kanalından epitel hücreler aracılığı ile duodenuma iletilir (Cowan ve Maitra 2014).

Pankreasın endokrin ve ekzokrin rolleri, farklı olmakla birlikte, birbiriyle yakından ilişkili fizyolojik işlevlere sahiptir. Yapısal olarak dört ana bileşene ayrılır; İlk olarak ekzokrin pankreas, asiner hücrelerden ve kanal hücrelerden oluşur ve pankreasın hücresel kütlesinin yaklaşık %80'ini oluşturur. Endokrin pankreas ise kan damarları, hücre dışı boşluklar ve pankreas adacıklarından oluşur (Leung 2010). Adacıklar yapısal olarak küresel biçimdedir ve toplam pankreas kütlesinin hacimce %1-2'sini oluşturur. Adacığı oluşturan hücreler, Alfa hücreleri (α-hücreleri), Beta hücreleri (β-hücreleri), Delta hücreleri (δ-hücreleri), PP hücreleri

(Pankreatik polipeptid) ve epsilon hücreleri (ε-hücreleri) olmak üzere beş ana hücre tipinden oluşur (Leung 2010).

α-hücreleri, düşük kan şekerine yanıt olarak glukagon salgılar ve glukagonun ana işlevi ise karaciğerdeki glikojen depolarından glikozu serbest bırakmaktır (Wendt ve Eliasson 2020). β-hücresinin işlevi, vücuttaki tüm dokuların normal işleyişi için plazma glukoz seviyelerini sıkı bir fizyolojik aralıkta tutmak için besinlere, hormonlara ve sinir uyaranlarına yanıt olarak uygun miktarlarda biyoaktif insülin salgılamaktır (Kulkarni 2004). δ-hücreleri, güçlü bir insülin ve glukagon inhibitörü olan "Somatostatin" üretiminden sorumludur (Gao ve ark 2021). Pankreatik polipeptid, 36 amino asitten oluşan bir peptittir ve pankreas ekzokrin salgısının düzenlenmesinde görev alır (Brereton ve ark 2015, Barbieux ve ark 2016). Ghrelin genini eksprese eden ve ghrelin hormonu üreten pankreas endokrin hücreleri, ε-hücreleri, olarak adlandırılır (Sakata ve ark 2019). Ghrelin hormonu enerji homeostazını, iştahı, glikoz kontrolünü ve gastrointestinal hareketliliği de düzenler (Dominguez Gutierrez ve ark 2018).

1.2. Pankreas Kanseri

Pankreas kanseri, dünya çapında her yıl tahmini 227.000 ölüme yol açan bir kanser türüdür (Vincent ve ark 2011). 21. yüzyılın başında çözülemeyen ya da tedavi edilemeyen büyük bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Son 50 yıldaki çabalara rağmen, cerrahi, radyasyon, kemoterapi veya bunların kombinasyonu gibi geleneksel tedavi yaklaşımlarının bu agresif neoplazmın seyri üzerinde çok az etkisi olmuştur (Li ve ark 2004).

Kanser türleri arasında pankreas kanseri, tüm yaş grupları ve cinsiyetler arasında yaklaşık %4,7 ile en yüksek ölüm oranına sahip ve en ölümcül malign tümördür. Köken aldığı bölgeleri, patogenezdeki farklılıklara ve moleküler temeline göre çeşitli tiplere ayrılmıştır. Bunlar, pankreas duktal adenokarsinomu (PDAC), pankreas nöroendokrin neoplazmı (PanNEN), asiner hücreli karsinom (ACC), pankreatoblastom ve katı psödo-papiller neoplazmıdır (SPN) (Panchal ve ark 2021).

Pankreas nöroendokrin tümörleri, pankreasın ölümcül ve en sık görülen ikinci malignitesidir (Pea ve ark 2015). Adacık hücreli tümörler olarak adlandırılır ve işlevsel (sendromik) veya işlevsiz (sendromik olmayan) tümörler olarak ikiye ayrılır. İşlevsel tümörler, bir veya daha fazla spesifik hormonun aşırı salgılanmasının bir sonucu olarak klinik semptomlar üreten tümörlerdir. İşlevsiz pankreas nöroendokrin tümörleri genellikle kitle ile kendini gösterir (de Wilde ve ark 2012).

ACC, tüm pankreas tümörlerinin sadece %1'ini oluşturan, ekzokrin pankreasın asiner elementlerinden kaynaklanan ve nadir görülen bir tümördür (Xing-Mao ve ark 2018). Malign katı neoplazma-asiner hücreli karsinom (ACC), Benign kistik neoplazma-asiner hücreli kistadenom, Malign kistik neoplazma-asiner hücreli kistadenokarsinom, karışık karsinom olmak üzere 4 gruba ayrılır (Chaudhary 2015).

PB, genellikle çocukluk çağında görülen ama nadiren yetişkinlerde de görülebilen bir tümördür ve pankreasın infantil karsinomu olarak bilinir (Li ve ark 2021, Reggiani ve ark 2021).Nadir olması nedeniyle klinik ve patolojik özellikleri hakkında çok az şey bilinmektedir (Omiyale 2021). Kromozom 11p bölgesinde meydana gelen allel kayıpları ve APC/β-katenin sinyal yollarındaki sapmalar, pankreatoblastom vakalarının yaklaşık %80'inde tespit edilebilir (Sipos ve Klöppel 2005).

SPT, düşük malignite potansiyeline sahip ve çoğunlukla genç kadınlarda nadir görülen bir ekzokrin pankreas tümörüdür ve bu tümörlerin çoğu iyi huylu olarak karşımıza çıkar (Murhekar ve ark 2013, Bose ve ark 2014).

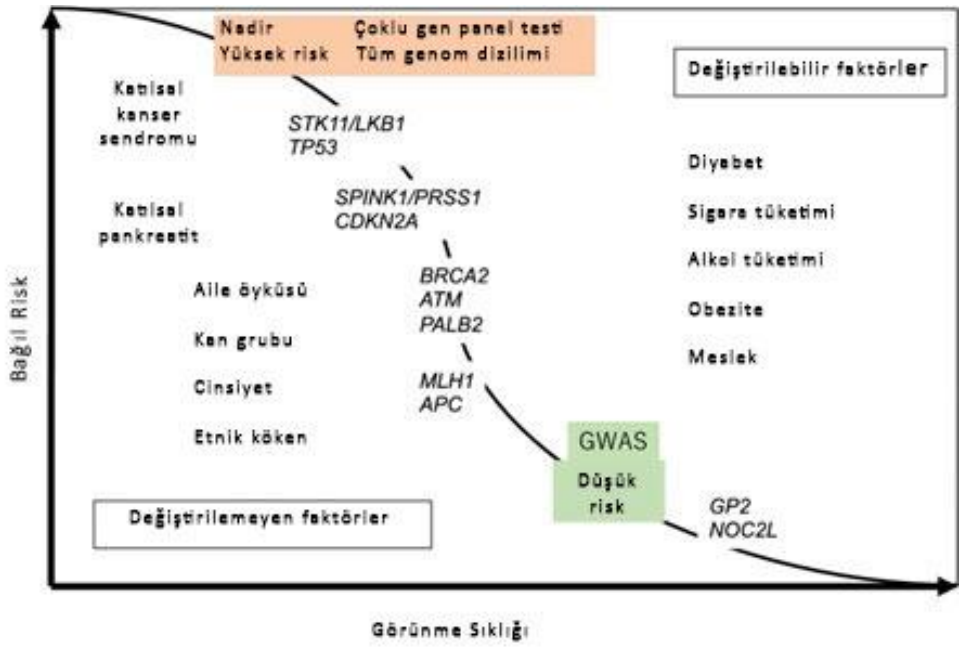
PDAC, pankreasın kanallarında oluşur ve bu nedenle bir ekzokrin tümördür (Panchal ve ark 2021). Bu malignite, nöral ve vasküler yayılım yoluyla yüksek bir metastaz olasılığına sahiptir (Hani ve ark 2021). Patogenezi için olası risk faktörleri arasında kronik pankreatit, obezite ve tip 2 diyabet, insülin direnci ve kronik inflamasyon bulunur. Ayrıca, çeşitli kalıtsal germ hattı mutasyonları, bu kanserin oluşumu ile ilişkilidir (Panchal ve ark 2021).

PDAC, hastalık biyolojisini, ilerlemesini ve tedaviye direnci yöneten çok sayıda genetik ve epigenetik özellik ile ilişkilendirilebilir. Spesifik olarak, yeni nesil dizileme, *KRAS, CDKN2A, BRAF, TP53* ve *SMAD4* dahil olmak üzere birçok gen etkileri PDAC'ta tanımlamıştır. *KRAS* mutasyonları, PDAC tümörlerinin yaklaşık %90'ında meydana gelirken, bu tümörlerinin yaklaşık %70'inde *TP53* genetik mutasyonları bulunur; tümörlerin yaklaşık %50'sinde bir *SMAD4* mutasyonu vardır (Osei-Bordom ve ark 2022).

1.3. Pankreas Kanser Risk Faktörleri

Pankreas kanseri, kanser ölümlerinin önde gelen nedenidir ve bu hastalığın insidansının artmaya devam etmesi beklenmektedir (Mohammed ve ark 2014). Bu hastalık için risk faktörleri, değiştirilebilir ve değiştirilemez risk faktörleri olmak üzere iki kategoriye ayrılmıştır. Değiştirilebilir risk faktörlerinden bazıları aşırı kilo, sigara kullanımı, alkol

kullanımı ve diyet gibi faktörlerdir. Değiştirilemeyen risk faktörleri ise cinsiyet, yaş, pozitif aile öyküsü, diyabetes mellitus, enfeksiyonlar ve genetik bozukluklardır (Hani ve ark 2021).



Şekil 1.2. Pankreas kanseri için göreceli risk ve risk faktörlerinin insidansı (Abe ve ark 2021).

Pankreas kanseri, genellikle yaşlı erişkin bireylerde görülürken, 30 yaşın altındaki gençlerin hastalığa yakalanması son derece nadirdir ancak 30 yaşından sonra insidans oranı katlanarak artar (Midha ve ark 2016, Zhao ve Liu 2020). Bir diğer risk faktörü olan cinsiyet dikkate alındığında ise erkeklerde kadınlara göre %30 daha fazla olduğu görülmektedir. Gelişmiş ülkelerde bu fark daha da belirgindir. Bunun nedeni ise, kadınlarda steroid hormon düzeylerinin erkeklere göre daha yüksek olması ve bu durumun pankreas kanserine karşı koruyucu bir etkiye sahip olabilme ihtimalinin olmasıdır (Midha ve ark 2016, Zhao ve Liu 2020).

Sigara kullanımı pankreas kanseri için değiştirilebilir risk faktörleri arasında ilk akla gelendir. Yapılan bir çalışmada sigara içenlerin pankreas kanseri riskinin %74 arttığını gösterilmiştir. Alkol tüketimine göre ise, günde 30 gramdan fazla içen kişilerde hastalık riskinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Hızla çoğalan kanser hücreleri için lipid oksidasyonu ve biyosentez, hücrenin hayatta kalması için gereklidir. Tümör olmayan doku ile karşılaştırıldığında ise yağ, kanser hücrelerini daha canlı hale getirebilir (Zhao ve Liu 2020).

DM veya bozulmuş glukoz toleransı ise en hızlı ölümcül malignitelerden biri olan PC'li hastaların %50-80'inde eş zamanlı olarak bulunur (Mao ve ark 2015). Diyabet ve

pankreas kanseri arasındaki ilişkinin mekanizması tam olarak belirli değildir fakat tümör büyümesini etkileyen metabolik, hormonal ve immünolojik değişikliklerle bilinmektedir (Li 2012).

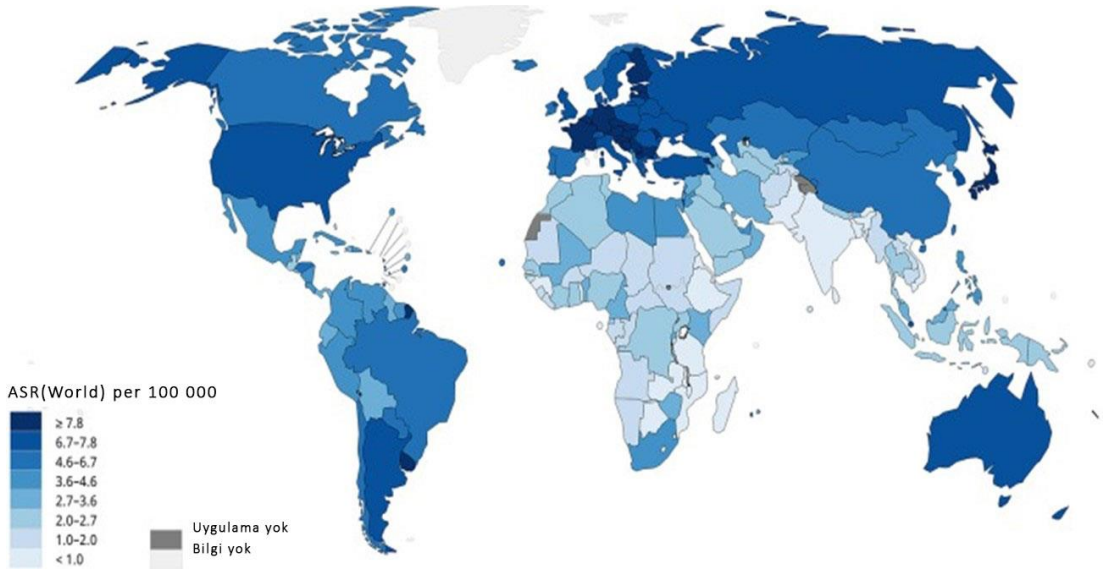
Pankreas kanseri, iki veya daha fazla birinci derece akrabaya daha önce hastalık teşhisi konulmuşsa ve yeni vakaların %5-10'unu oluşturuyorsa, ailesel olarak kabul edilir. Ailesel risk faktörleri olan hastalarda, aile öyküsü olmayanlara göre dokuz kat daha fazla pankreas kanseri gelişme riski vardır, eğer daha önce üç veya daha fazla birinci derece akrabaya tanı konulmuşsa, otuz iki kat daha fazla risk olarak ortaya çıkar (McGuigan ve ark 2018).

1.4. Pankreas Kanseri Epidemiyolojisi

Amerikan Kanser Derneği tarafından, 2015 yılında ABD'de yaklaşık 49.000 kişiye pankreas kanseri teşhisi konulduğu ve 41.000 kişinin bu hastalıktan öleceği ve 2030 yılına kadar da ABD (Amerika Birleşik Devletleri)'de kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedeni olacağını tahmin etmektedir (Kamisawa ve ark 2016).

Küresel Kanser Gözlemevi (GLOBOCAN) 2020 yılındaki verilerine göre, dünya çapında yaklaşık 495,773 hastaya pankreas kanseri teşhisi konulduğu ve tüm malign tümörler arasında pankreas kanseri 12. sırada yer aldı. Küresel basit insidans hızı $6.4/10^5$ ve yaşa göre standardize insidans hızı (ASR) $4.9/10^5$ idi. İnsidans ve mortalite (hem basit hem de ASR) erkeklerde kadınlara göre daha yüksektir. Asya, dünya çapında hem yeni teşhis edilen vakaların (%47.1) hem de kansere bağlı ölümlerin (%48.1) en fazla ortaya çıktığı bölge olmuştur (Cai ve ark 2021).

ASR, en yüksek Avrupa (100.000 kişi başına 7.7) ve Kuzey Amerika'da (100.000 kişi başına 7.6), ardından Okyanusya (100.000 kişi başına 6.4) olarak açıklanmıştır. En düşük oran ise 100.000 kişi başına tahmini 2.2 insidansla Afrika'da gözlenmiştir (Rawla ve ark 2019) (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. Harita, her iki cinsiyet ve tüm yaşlar dahil olmak üzere 2018 yılında dünya çapında pankreas kanseri için tahmini yaşa göre standardize edilmiş insidans oranlarını (ASR) göstermektedir (Rawla ve ark 2019).

Pankreas kanserine neden olan potansiyel risk faktörleri hakkındaki ilerlemeye ve erken teşhis için yeni araçlara rağmen, insidansının artacağı ve 2040 yılında yaklaşık 355.317 yeni vaka içereceği tahmin edilmektedir (Rawla ve ark 2019).

1.5. Pankreas Kanserinin Histolojik ve Klinik Özellikleri

Histolojik özelliklerine göre ekzokrin ve nöroendokrin neoplazmalar olarak sınıflandırılır. Ekzokrin neoplazmalar arasında seröz neoplazm, müsinöz kistik neoplazm, intraduktal neoplazm, PanIN, invaziv duktal karsinom ve asiner hücreli neoplazm yer almaktadır (Huang ve ark 2022).

Pankreas kanserine sıklıkla iyi huylu nedenlere bağlanan ve tanıyı geciktiren spesifik olmayan şikayetler (örn. epigastrik veya sırt ağrısı, şişkinlik, bulantı ve karında dolgunluk) eşlik eder. Bu klinik özellikler; anormal karaciğer fonksiyon testleri (yaklaşık %50), karın ağrısı (%40-60), sarılık (~%30), hazımsızlık (~%20), yeni başlangıçlı diyabet (13-20 %), bulantı veya kusma (~%16), sırt ağrısı (~%12) ve kilo kaybı (~%10) gibi semptomlardır (Huang ve ark 2022).

1.6. Pankreas Kanserinin Moleküler Patogenezi

Genetik faktörler, tüm pankreas kanseri vakalarının tahminen %5-10'unu oluşturur (Lowenfels ve Maisonneuve 2005). Birçok genetik mutasyonlar, PDAC'ın, gelişiminde önemli bir faktördür. Bunlar, onkogenlerin mutasyonel aktivasyonunu, tümör baskılayıcı

genlerin inaktivasyonunu ve DNA onarım genlerinin inaktivasyonunu içerir. Tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu pankreas kanseri patogenezinde önemli bir faktördür (Hani ve ark 2021).

PDAC'de*; KRAS, CDKN2A, TP53* ve *SMAD4* olmak üzere dört anahtar gen sıklıkla mutasyona uğrar. En yaygın gen değişikliği, mutasyonların 12, 13 ve 61 kodonlarında meydana geldiği *KRAS* genindedir. P16, sikline bağımlı kinaz inhibitörü 2A geni *(CDKN2A),* allel kaybı, homozigot delesyon veya gen promotörünün hipermetilasyonu ile bağlantılı intragenik mutasyon nedeniyle PDAC'nın %90 kadarında inaktive edilir. *SMAD4,* allel kaybı ile bağlantılı olarak homozigot silme veya intragenik mutasyon yoluyla PDAC'nın %55'ine kadar inaktive edilir (Takai ve Yachida 2015).

Pankreas karsinomlarının yarısında, başka bir önemli apoptotik bir faktör olan tümör baskılayıcı proteini p53'ün inaktivasyonunu görülür. Bu inaktivasyon, kanser hücrelerinin ilerlemesi ve hayatta kalması ile ilişkilidir (Hani ve ark 2021).

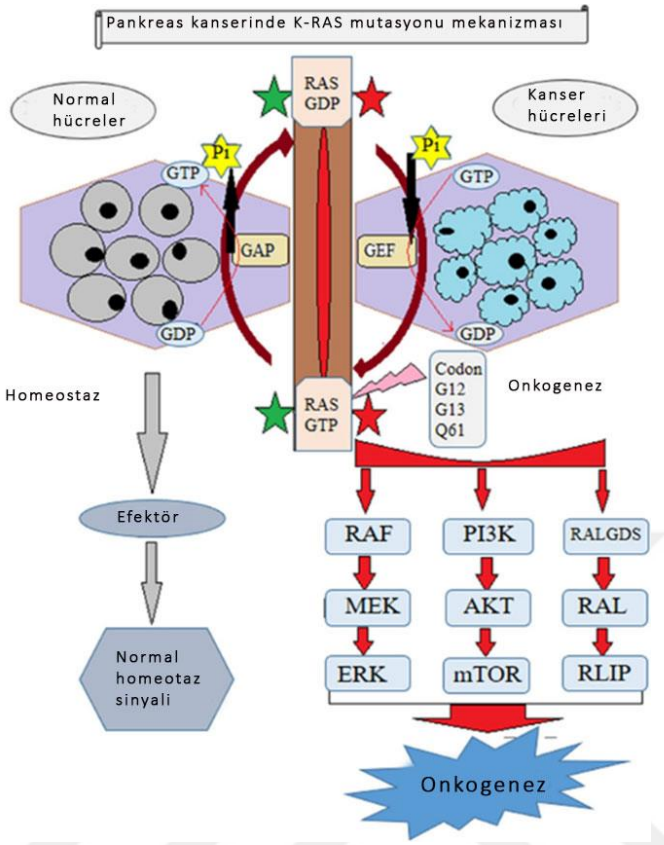
1.6.1. Onkogenler

Onkogenler, hücre büyümesini ve farklılaşmasını kontrol eden proto-onkogenlerin hasarlı türleridir. Bir proto-onkogenin normal bir gen olduğunun anlaşılması önemlidir ve bir onkogen haline gelmesi, gen içindeki nokta mutasyonları ve genin kendisinin amplifikasyonu dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalarla sağlanır (Maitra ve ark 2006, Freedman ve Nierodzik 2007).

1.6.1.1. KRAS2 geni

Molekül ağırlığı yaklaşık 21 kDa olan KRAS geni 12p12 kromozomu üzerinde yer alır. KRAS, aralarında KRAS4B'nin ana izoform olduğu, KRAS4A ve KRAS4B olmak üzere iki varyantından oluşur (Fan ve ark 2021).

KRAS, fizyolojik fonksiyonların sürdürülmesi için gereklidir. Aktive edilmiş KRAS; RAF-MEK-ERK, PI3K-AKT, RalGDS-Ral, Tiam1-Rac1 ve PLCε-PKC yolları vb. dahil olmak üzere birçok sinyalleşme kaskadlarına katılır (Fan ve ark 2021). Guanozin trifosfata (GTP) bağlandığında, hücrenin hayatta kalmasına ve farklılaşmasına aracılık eder. Yaygın KRAS mutasyonları, GTP'yi hidrolize etme yeteneğini engelleyerek onu yapısal olarak aktif hale getirir (Heestand ve Kurzrock 2015). Ayrıca, KRAS geninde oluşan mutasyonlar, KRAS'ın sürekli aktivasyonuna yol açar ve çeşitli kanser türlerinin başlamasına sebep olur (Fan ve ark 2021).



Şekil 1.4. Pankreas kanserinde K-RAS mutasyon mekanizması (Khan ve ark 2021)

RAS, guanin nükleotid değişim faktörleri (GEF'ler) yoluyla GTP'ye bağlandığında aktive olur ve GTPaz aktive edici proteinler (GAP'ler) yardımıyla GDP'ye bağlandığında deaktive olur. Bu durumda, RAS proteini inaktif bir durumdadır ancak G12, G13 ve Q61 kodonlarındaki SNP'lere bağlı stres yoluyla veya mutasyona uğraması sonucunda aktive olur. Resmin sol tarafı, dokulardaki RAS proteininin normal homeostatik mekanizmasını göstermektedir. Resmin sağ tarafında KRAS proteinindeki bir mutasyonun RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT/mTOR veya RALGDS/RAL/RLIP yolunun aktivasyonu ile sonuçlanarak pankreas kanserine neden olduğu görülmektedir (Khan ve ark 2021) (Şekil 1.4.).

Pankreas kanserinde *KRAS* genindeki aktive edici nokta mutasyonlarının büyük çoğunluğu kodon 12'de meydana gelir. Diğer birkaç mutasyon ise kodon 13 veya 61'i hedef alır (Maitra ve ark 2006). *KRAS*, katı tümörlerde en sık görülen mutasyonları içerir ve pankreas karsinomu, kolorektal karsinom ve akciğer adenokarsinomu dahil olmak üzere RAS kaynaklı kanserlerin %85'i ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (Fan ve ark 2021).

1.6.1.2. BRAF geni

7q kromozomunda bulunan, 766 amino asit içeren *BRAF* geni, MAP kinaz/ERK sinyal yolağına katılan BRAF proteinini kodlar. Bu yolak; hücresel büyüme, farklılaşma, çoğalma, yaşlanma ve apoptoz gibi önemli hücre fonksiyonlarını düzenler (Hussain ve ark 2015, Sun ve ark 2022). *BRAF* geninde %80'den fazla mutasyon çeşitli frekanslarda belirlenmiştir. Örneğin, melanomların yaklaşık %67'sinde BRAF mutasyonları görülürken, tiroid kanseri (%15), akciğer kanseri (%3) ve kolorektal kanser (%12) gibi diğer tümörlerin %30'unda BRAF mutasyonları bulunur (Hussain ve ark 2015).

1.6.1.3. AKT2 geni

AKT'nin memeli hücrelerinde bulunan ve farklı işlevlere sahip AKT1, 2, ve 3 olmak üzere üç izoformu olan bir gendir (Abe ve ark 2014). AKT2 geni, 22 ekzondan oluşur. Kromozomun 19q13.2 lokusunda bulunur ve mitojenik sinyal yollarının yanı sıra insülin, apoptotik ile ilgili hücrelerde yüksek oranda eksprese edildiği bulunmuştur (SHEK ve ark). Pankreas kanserlerinin %10-15'inde amplifiye edilir (Lowenfels ve Maisonneuve 2005).

1.6.2. DNA Onarım Genleri

DNA, sürekli olarak ekzojen ve endojen ajanların neden olduğu hasara maruz kalır. Tamir edilmeyen DNA hasarı, gen mutasyonuna ve ardından malign transformasyona neden olabilir. DNA hasarının sonuçlarını en aza indirgemek ve genomik bütünlüğü korumak için insanlarda çoklu onarım mekanizmaları gelişmiştir (Jiao ve ark 2006).

1.6.2.1. BRCA2 geni

BRCA2 geni, 27 ekzon ve 3418 aminoasitten oluşan ve kromozom 13q12-13 üzerinde bulunan büyük bir gendir (Gayther ve Ponder 1997, Shailani ve ark 2018).Bu gen, homolojiye yönelik onarım mekanizması için gereklidir. RAD51, DSS1, RPA, MRE11, PALB2 ve p53 dahil olmak üzere çeşitli diğer proteinlerle etkileşime girerek, DNA çift zincir kırıklarının onarımı ve homolog rekombinasyon yoluyla genom stabilitesinin korunmasında önemli bir rol oynar (Abe ve ark 2014, Shailani ve ark 2018).

1.6.2.2. FANCC- FANCG geni

Fanconi anemisi (FA), ilerleyici kemik iliği yetmezliği (etkilenen gene bağlı olarak), konjenital defektler ve kanser yatkınlığı gibi değişken penetrasyonun geniş klinik özelliklerine bağlı olarak bir DNA onarım eksikliğinden kaynaklanan nadir bir genetik durum olarak ortaya çıkar. Şimdiye kadar 22 FA geni tanımlanmıştır (Del Valle ve ark 2020). Bunlardan biri *FANCG* geni, kromozom 9p13.3 bölgesinde bulunur (Solanki ve ark 2017).

Bir diğer FA geni ise *FANCC* geni kromozom 9q22.32 bölgesinde bulunur (Abe ve ark 2014). FA, C grubu olarak adlandırılan *FANCC* geni, hücreleri çapraz bağlama maddelerinin sitotoksik ve genotoksik etkilerinden koruma işlevi görür. FANCC ayrıca sitokin ve büyüme faktörlerine yanıt olarak STAT1'in optimal aktivasyonu ve çift sarmallı RNA'ya bağlı protein kinazın aktivitesini modüle ederek sitokin kaynaklı apoptozu baskılamak için gereklidir (Pang ve ark 2001).

1.6.2.3. MLH1 geni

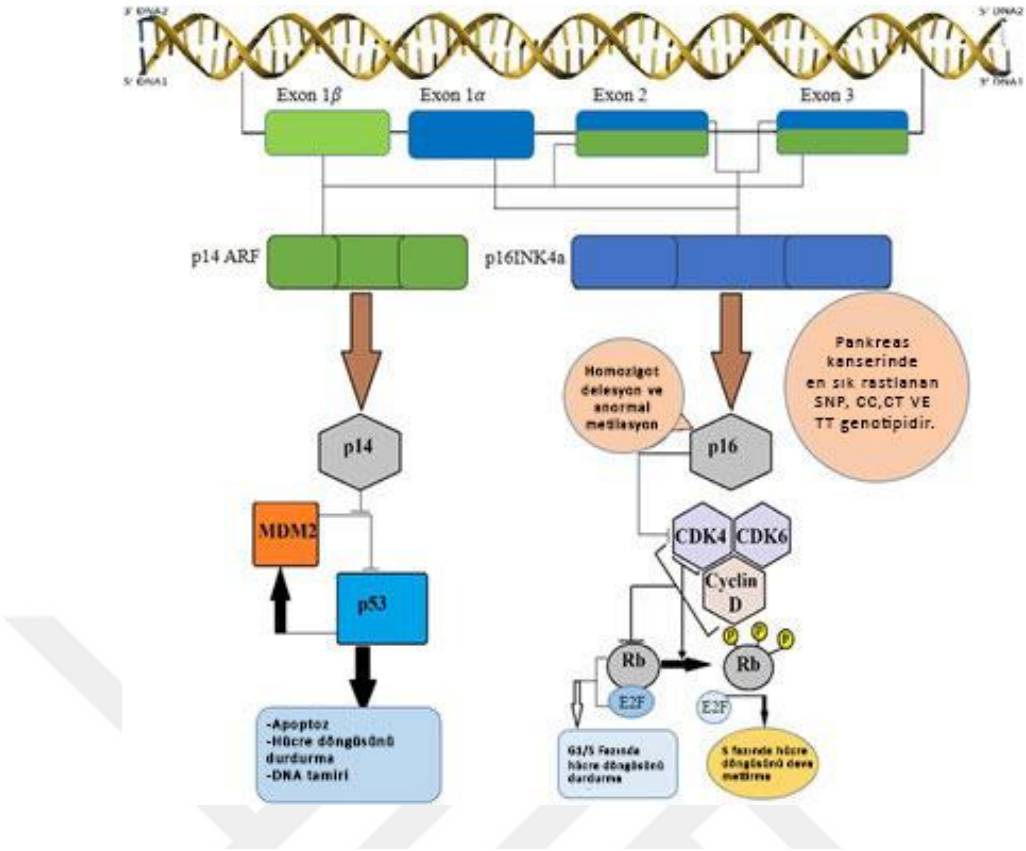
DNA uyumsuzluk onarımı (MMR), proteinlerin DNA replikasyonu veya genetik rekombinasyon sırasında çoğunlukla meydana gelen uyumsuz bazları tanımladığı ve onardığı bir mekanizmadır. Bu mekanizmanın bozulması durumunda birçok kanser türünün oluşumuna ve ilerlemesine yol açar (Inaguma ve ark 2013, Dal Buono ve ark 2021). DNA uyumsuzluk onarım geni olan *MLH1* geninde meydana gelen germ hattı mutasyonlarının, birçok kanser türlerinde görülme oranının yüksek olduğu bilinmektedir (Inaguma ve ark 2013).

1.6.3. Tümör Baskılayıcı Genler

Tümör baskılayıcı genler, inaktive edildiğinde tümör büyümesini destekleyen genlerdir (Maitra ve ark 2006). Pankreas kanserinde somatik olarak hedeflenen genler ve pankreas kanserinde en sık inaktive edilen tümör baskılayıcı genler arasında *p16/CDKN2A*, *TP53* geni ve *MADH4/DPC4* geni yer alır. Bu genler; promotör hipermetilasyonu, ikinci allel kaybı ile birleşen intragenik mutasyonlar ve homozigot delesyon (genin her iki kopyasının silinmesi) gibi bir dizi mekanizma tarafından etkisiz hale getirilir (Hruban ve ark 2008).

1.6.3.1. p16/CDKN2A geni

p14ARF ve p16INK4 olarak da tanınan sikline bağımlı kinaz inhibitörü 2A geni (CDKN2A), kromozom 9p21.3 üzerinde bulunur (Khan ve ark 2021). CDKN2A, G1/S faz geçişini başlatmaktan sorumlu siklin D-CDK4 ve siklin D-CDK6 komplekslerini inhibe ederek hücre döngüsünün ilerlemesini düzenleyen tümör baskılayıcı gendir. Kanserlerde en sık mutasyona uğrayan genlerden bir tanesidir. Pankreas kanseri vakaların %98'inde inaktivasyon meydana gelir (Cicenas ve ark 2017) (Şekil 5).



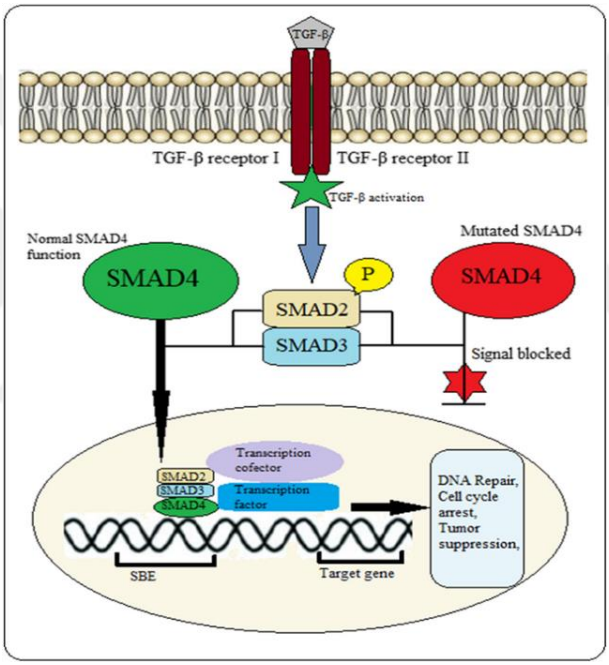
Şekil 1.5. Pankreas kanserinde CDKN2A (p16INK4a ve p14ARF) değişikliğinin mekanizması (Khan ve ark 2021)

CDKN2A geni, p14ARF ve p16INK4 olmak üzere iki farklı proteini kodlar. Şekil 1.5'te gösterilen mekanizmada sol tarafta, stres koşullarında, p14ARF kısmı p53 tümör baskılayıcı genin negatif regülatörünü (MDM2) bloke eder ve apoptoz, hücre döngüsünün durmasına ve hücre DNA'sının onarımına yol açar. Sağ tarafta, p16INK4, siklin-bağımlı kinaz 6 (CDK6), siklin-bağımlı kinaz 4 (CDK4) ve siklin D1 kompleksini sınırlama işlevini yerine getirir ve bu da G1'in S fazına geçişinin tıkanmasına yol açan retinoblastom (Rb proteini) ailesi proteininin aktivasyonunu tetikler.

1.6.3.2. DPC4 (MADH4, SMAD4) geni

Bir tümör baskılayıcı gen olan DPC4 geni kromozom 18q21.1 üzerinde bulunur ve 552 amino asit kodlama dizisi ve 11 ekzondan oluşur (McCarthy ve ark 2003, Miyaki ve Kuroki 2003). SMAD4 olarak da bilinen bu gen epitel hücre büyümesini baskılayan TGFβ sinyal yoluna aracılık eden SMAD ailesi üyesidir (Miyaki ve Kuroki 2003, Khan ve ark 2021). SMAD4 geni, pankreas kanserlerinin %55'inde, %35'inde ise homozigot delesyon (genin hem maternal hem de paternal alellerinin silinmesi) ve %20'sinde ise intragenik mutasyon ile inaktive edilir (Maitra ve ark 2006).

SMAD4, DNA onarımı, hücre döngüsünün durması ve tümör baskılanmasında yer alan bir tümör baskılayıcı gendir. Şekil 6'daki mekanizma, sinyali çekirdeğe ileterek TGF-β sinyal yolunda bir aracı olarak yer alan bir transkripsiyon faktörünü kodlayan yüksek oranda korunmuş bir proteindir. TGF-β'nın aktivasyonu üzerine, TGF-β'nın SMAD2/3'ün fosforilasyonunu tetikleyen ve son olarak bir SMAD2/3/4 kompleksi oluşturmak üzere SMAD4 ile birleşen SMAD2 ve SMAD3 reseptörlerine bağlanması ile sonuçlanır (Şekil 1.6). Kompleks çekirdeğe girer, burada diğer transkripsiyon kofaktörleri, transkripsiyon faktörü ve SMAD4 bağlama elemanları (SBE) ile birlikte hedef genlerini susturmaya veya uyarmaya yol açar ve DNA onarımı, hücre döngüsü durdurma ve proliferasyonu inhibe etme işlevini yerine getirir (Khan ve ark 2021).

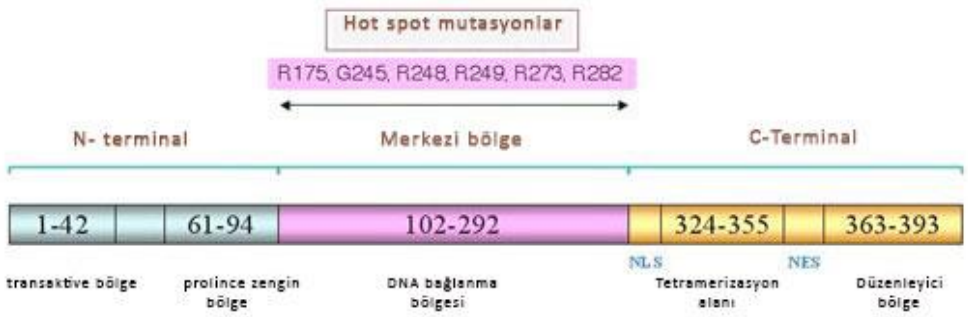


Şekil 1.6. Pankreas kanserinde SMAD4'ün etki mekanizması (Khan ve ark 2021)

1.6.3.3.TP53 geni

Kromozom 17p13.1'de yerleşik olan *TP53* geni pankreas kanserlerinin %50-75'inde inaktif haldedir. 11 ekzon ve 10 intron bölgesi içeren ve 20 Kb'lik *TP53* geninden sentezlenen protein p53, hem hücre döngüsünün kontrolünde hem de hücre ölümünün düzenlenmesinde önemli işlevlere sahiptir (Bai ve Zhu 2006, Hruban ve ark 2008). Telomer kısalması, onkogen aktivasyonu, DNA hasarı, besin açlığı, virüs enfeksiyonu, ısı şoku, pH değişikliği ve hipoksi gibi çoklu hücresel streslere yanıt olarak aktive edilir ve aynı zamanda tümör oluşumunu baskılayıcı olarak işlev gören bir transkripsiyon faktörü olarak bilinmektedir (Baugh ve ark 2018, Khan ve ark 2021)

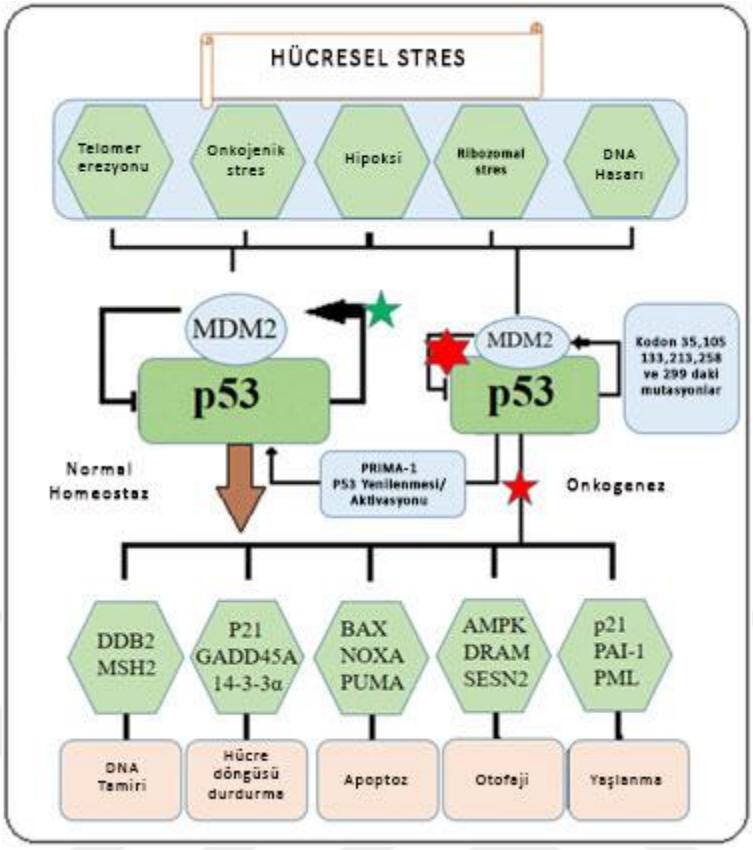
TP53, genomun koruyucusu (gardiyanı) olarak kabul edilir ve kanserin başlaması ve ilerlemesi arasındaki temel olaylara katılarak kanser biyolojisinde kritik bir rol oynar (Mei ve ark 2021). Çoğunlukla TP53 geninde sadece bir nükleotid mutasyona uğrayarak p53 proteininde tek bir amino asit değişikliğine yol açar (Mirgayazova ve ark 2020)



Şekil 1.7. p53 protein yapısının şematik gösterimi (Bai ve Zhu 2006).

Şekil 1.7'de gösterildiği gibi p53, 393 amino asit ve üç fonksiyonel alandan oluşur. Bir N-terminal aktivasyon alanı, DNA bağlanma alanı ve C-terminal tetramerizasyon alanı içerir. N-terminal etki alanı, transaktivasyon alt etki alanı ve prolin bakımından zengin bir parça olan bir PXXP bölgesi içerir. Merkezi DNA bağlanma alanı ise, diziye özgü DNA bağlanması için gereklidir ve bu alandaki amino asit kalıntıları sıklıkla insan kanser hücrelerinde ve tümör dokularında mutasyona uğrar. Arg175, Gly245, Arg248, Arg249, Arg273 ve Arg282 farklı çeşitli insan kanser türlerinde görülen sıcak nokta mutasyonlarıdır. C-terminal bölgesinin düzenleyici bir işlevi yerine getirdiği düşünülmektedir. Bu temel C-terminal alanındaki amino asit kalıntıları, fosforilasyon ve asetilasyon dahil olmak üzere post-translasyonel modifikasyonlara uğrar (Bai ve Zhu 2006).

TP53 geninde ortaya çıkan mutasyonların çoğu, merkezi DNA bağlanma alanında meydana gelir (Donehower ve ark 2019). Temas mutasyonları ve konformasyonel mutasyonlar olmak üzere iki geniş p53 mutasyonu türü tanımlanmıştır. Temas mutasyon sonucu, vahşi tip katlanmış protein konformasyonunu büyük ölçüde korur, ancak mutasyona uğramış spesifik kalıntılar nedeniyle, p53'e özgü DNA promotör bölgelerine bağlanamazlar (Duffy ve ark 2017).



Şekil 1.8. Pankreas kanserinde p53 mutasyonunun mekanizması (Khan ve ark 2021).

P53 proteini; telomer erozyonu, onkojenik stres, hipoksi, ribozomal stres ve DNA hasarı dahil olmak üzere çoklu hücresel stres sinyallerinin alınmasıyla etkinleştirilir. Aktivasyon üzerine, p53, çoklu gen yapılarını teşvik eder ve DNA onarımı, hücre döngüsünü durdurma, apoptoz, otofaji ve yaşlanma işlevlerini yerine getirir (Şekil 1.8) (Khan ve ark 2021).

MDM2, p53'ün negatif düzenleyicisi olarak çalışır. Meydana gelen mutasyonlar, sinyalin p53'ten gen yapılarına yayılmasının durdurulması ile sonuçlanır. Tümör baskılayıcı işlevi yerine getiremez ve kanser hücreleri kontrolsüz bir şekilde çoğalır. Bununla birlikte, PRIMA-1 adlı yeni bir bileşik, şekilde gösterildiği gibi mutasyona uğramış p53'ün vahşi tip işlevini geri yükleme yeteneğine sahiptir (Khan ve ark 2021).

TP53'ün etkisizleştirilmesinin, pankreas kanseri ilerlemesinde kritik bir adım olduğu düşünülmektedir (Abrams ve ark 2018). Pankreas kanserinde *TP53* en sık mutasyona uğrayan tümör baskılayıcıdır ve p53 mutasyonlarının yaklaşık üçte ikisi yanlış anlamlı mutasyonlardan oluşur (Voutsadakis 2021). Genellikle kanserlerde meydana gelen R248H, R273H ve R175H en yüksek frekansa sahip yanlış anlamlı mutasyonlardır (Jahedi ve ark 2019).

1.7. Genom Düzenleme Sistemleri

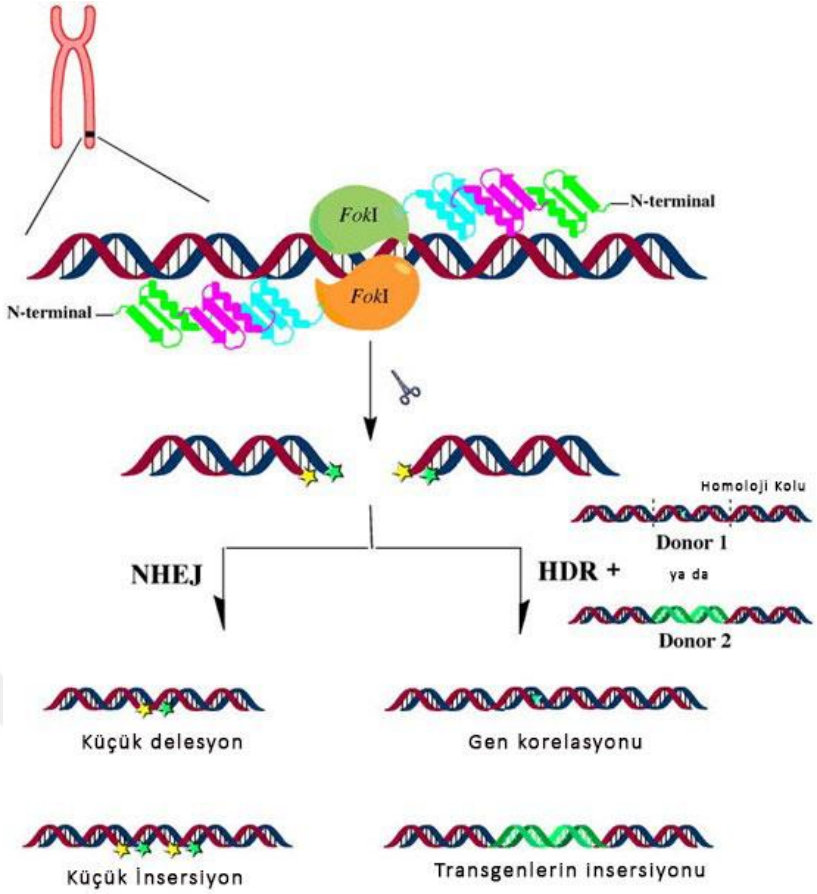
Yirmi yıldan biraz daha uzun süre önce, genom düzenleme kavramı, homolog rekombinasyonu 1000 kattan fazla uyarabilen bölgeye özgü DNA çift zincir kırıkları (DSB) oluşturmak için nükleazların tasarlanabileceğinin keşfiyle yeni bir döneme girmiştir ve bu sayede genom düzenleme alanında önemli ilerlemeler kaydedilmiştir (Bak ve ark 2018, Shamshirgaran ve ark 2022).

Rekombinant DNA teknolojisinin 1970'lerde gelişmeye başlaması, biyoloji için yeni bir çağın başlangıcı olmuştur (Hsu ve ark 2014). Bu teknoloji sayesinde Çinko parmak nükleazlar (ZFN'ler), Transkripsiyon aktivatör benzeri efektör nükleazlar (TALEN'ler) ve CRISPR/Cas9'a dayalı olanlar klinik deneyler ile ilerlemeye devam etmektedir (Hirakawa ve ark 2020).

1.7.1. ZFN (Çinko Parmak Nükleazları)

DNA'ya spesifik bağlanma afinitesine sahip olan ilk çinko parmak (ZF) motifi, Xenopus oositlerinde transkripsiyon faktörü IIIa'nın bir parçası olarak keşfedildi. Klasik bir çinko parmak (Cys_2His_2), bir alfa sarmalına karşıt iki anti-paralel beta yaprağı oluşturan 30 amino asitten oluşur. Bu alan, bir çinko iyonunu bağlayan iki sistein ve iki histidin rezidüsü ile stabilize edilir, böylece sıkı bir küresel alan oluşturur (Petersen ve Niemann 2015). Cys2 - His2 çinko-parmak alanı, ökaryotlarda bulunan en yaygın DNA bağlayıcı motif türleri arasındadır ve insan genomunda en sık kodlanan ikinci protein alanını oluşturur (Gaj ve ark 2013).

FokI'in, DNA'yı kesmesi için dimerizasyon gerekir. Tasarlanmış ZFN-FokI hibrit moleküllerinin iki heterodimerinin, 6 baz çifti bölünme bölgesi ile ayrılan her DNA zincirindeki iki bitişik hedef diziye bağlanması, FokI dimerizasyonu ve ardından DNA kopması ile sonuçlanır. Bir ZFN tarafından bir DNA çift sarmal kopmasının uyarılması, DNA hasar yanıtı olarak bilinen bir hücresel yanıtın aktivasyonu ile sonuçlanır (Rémy ve ark 2010).



Şekil 1.9. Çinko Parmak Nükleazının (ZFN) bileşenleri ve mekanizmaları (Chou ve ark 2012)

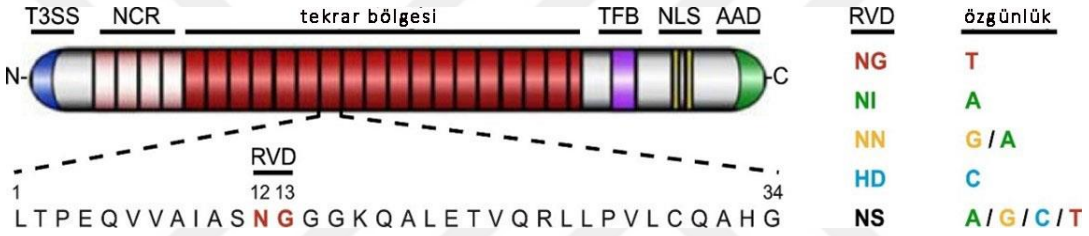
ZFN, bir bağlayıcı ile bağlanan üç parmaklı bir bağlanma alanına sahiptir. Bir FokI nükleaz bölünme alanından oluşur ve her parmak üç baz çiftine bağlanır. Alana özgü DSB, endojen lokuslarda ZFN tarafından indüklenebilir. Onarım işlemi, homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) yolunda küçük gen kayıplarına veya eklemelerine yol açar (Chou ve ark 2012) (Şekil 1.9).

1.7.2. TALEN (Transkripsiyon Aktivatör Benzeri Efektör Nükleaz)

TALEN'ler, Ralstonia solanacearum'da da TALE homologları olan bir grup Gram-negatif bakteriyel bitki patojeni olan Xanthomonas spp.'den elde edilen en büyük tip III efektör protein ailesini temsil eder. TALE'ler bir N-terminal bakteriyel salgılama ve translokasyon sinyali, tekrar "0" olarak adlandırılan tek bir benzersiz DNA bağlama alanı, ardından bir merkezi tekrarlayan modüler DNA bağlama alanı, iki veya daha fazla C-terminal NLS (nükleer lokalizasyon sinyali) ve yüksek oranda korunmuş bir asidik AD (aktivasyon alanı) içerir (Wright ve ark 2014).

N-terminal alanları, bakteriyel salgı sinyalini ve proteinin DNA'ya genel afinitesi için gerekli olan spesifik olmayan bir DNA bağlama aktivitesini barındırır. Spesifik ve programlanabilir DNA bağlanma alanları, genel olarak 33-35 amino asit uzunluğunda tandem tekrarından oluşan değişken sayıdaki bir merkezi tekrar bölgelerinden oluşur. Bir TALE veya TALEN'in DNA özgüllüğünü tanımlayan iki amino asit, her tekrarın 12 ve 13 pozisyonunda, tekrar değişken di-rezidü (RVD) kısmında bulunur. Tekrarları yeniden düzenleyerek, TALE'lerin ve TALEN'in DNA bağlama özellikleri istenildiği takdirde değiştirilebilir (Becker ve Boch 2021).

TALEN'ler yapay kısıtlama enzimleri olarak da söylenebilir ve DNA ipliklerini istenen herhangi bir dizide kesebilir, bu da onları genetik mühendisliği için çekici bir araç haline getirir (Ellenbroek ve Karl 2016).



Şekil 1.10. TALEN'nin yapısı (Becker ve Boch 2021)

TALEN yapısında, N-terminal bölgesi tip III salgı sinyali (T3SS) ve dört kanonik olmayan tekrar (NCR), C-terminal kısmı bir transkripsiyon faktörü bağlama bölgesi (TFB), iki nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) ve bir asidik aktivasyon alanı (AAD) içerir. Her bir TALE aynı zamanda, birbiri ardına yerleştirilmiş 33-35-amino asit'lık değişen sayıda yüksek oranda korunmuş tekrarlara sahip bir tekrar bölgesini de içerir (Becker ve Boch 2021)(Şekil 1.10).

1.7.3. CRISPR/Cas9 (Kümelenmiş Düzenli Aralıklı Kısa Palindromik Tekrar Dizileri)

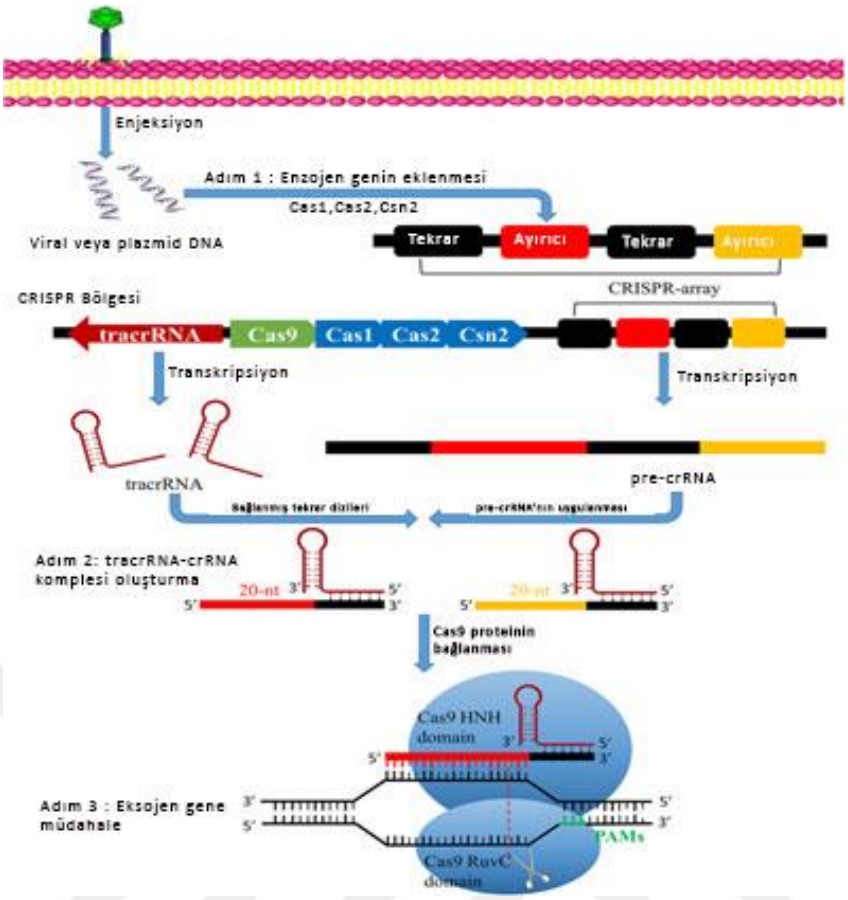
CRISPR aracılı genom düzenleme sistemi, biyolojik bilimler ve klinik tıpta çeşitli uygulamalarla genetik manipülasyon için güçlü bir araçtır. Bu sistem, özellikle bakteriyofajlar ve plazmitler gibi hareketli genetik unsurlara karşı koruma sağlamak için prokaryotlarda doğal olarak gelişmiştir (Kozovska ve ark 2021). CRISPR ilk olarak 1987'de, Escherichia coli'nin IAP geninde garip bir DNA paterni fark edildiği zaman keşfedilmiştir. Bu gen, kısa ~30 baz çift palindromik DNA tekrarlarından oluşur. Doğrudan tekrarların yinelenen modeli ve benzer boyutta tekrarlamayan diziler, prokaryotların her iki alanındaki birçok bakterilerde yaygın olarak bulunduğu gözlemlenmiştir (Xu ve ark 2021).

Prokaryotik genomlar, tekrarlanan DNA dizilerinin kendine özgü bir ailesini içerir. Tekrarlanan kısma benzer büyüklükteki ardışık dizilerle, düzenli aralıklarla yerleştirilmiş 24 ile 40 nükleotid tekrarlayan motiflerden oluşurlar. Bu tekrarlayan kısımlar, kısa düzenli aralıklı tekrarlar (SRSR) olarak ve 2002'de ise, Kümelenmiş Düzenli Aralıklı Kısa Palindromik Tekrarlar (CRISPR) olarak adlandırılmıştır (Mojica ve ark 2005, Peng ve ark 2016). Bu süreçten sonra çok sayıda mikrobiyal türde birkaç CRISPR lokusu keşfedilmiş olmasına rağmen, bunların biyolojik önemi 2005 yılına kadar bir bilmece olarak kaldı. 2007'de, daha fazla analiz ve karşılaştırmadan sonra, CRISPR sistemlerinin, bakterileri plazmitlere ve fajlara karşı koruyan bir tür bakteriyel adaptif bağışıklık savunma mekanizması olduğu doğrulandı (Peng ve ark 2016).

Bu çalışmalardan kısa bir süre sonra farklı bakterilerde CRISPR lokuslarına bitişik olarak Cas1-Cas4 şeklinde adlandırılan dört gen bulundu ve bu, tekrarlanan diziler ile fonksiyonel bir ilişki olduğunu düşünülmesini sağladı. Çalışmanın devamında CRISPR yapılarının oluşumunun, Cas genleri tarafından DNA parçalanmasını içerdiğini ve bakteri genomlarında CRISPR'lerin görünür stabilitesinin ve yaygın varlığının, yabancı DNA istilasına karşı koruyucu işlevlerinden kaynaklanabileceğini ileri sürüldü (Bolotin ve ark 2005).

PAM (Protospacer ilişkili motif), ekzojen DNA'nın yanında bulunan, genellikle 2-5 bp uzunluğunda kısa ve korunmuş dizilerdir. PAM, çeşitli organizmaların genomlarında yaygın olarak bulunur ve "NGG" şeklinde görünür. Burada verilen N ise, Adenin, Guanin, Sitozin veya Timin nükleotitlerden birini temsil etmektedir (Pan ve Zhang 2021). Kısaca PAM, CRISPR lokusunun kendisinin hedeflenmesini önlemek için kendi kendine karşı kendi kendini tanımayan bir sistem olarak da hizmet eden temel bir hedefleme bileşeni olarak karşımıza çıkmaktadır (Mali ve ark 2013).

Cas proteinlerinin çeşitli homolojilerine dayanarak, CRISPR sistemleri tip I, tip II ve tip III olmak üzere üç kategori şeklinde sınıflandırılmaktadır. Tip II sistemin, hedef bölgeleri tanımak ve parçalamak için yalnızca bir Cas proteinine ihtiyacı varken, tip I ve tip III CRISPR sistemlerinin bir dizi Cas proteinine ihtiyacı vardır (Peng ve ark 2016). Buradan anlaşılacağı gibi Tip II sistemi diğer sistemlere göre kullanım kolaylığı açısından daha avantajlı görünmektedir



Şekil 1.11. CRISPR/Cas9'un gen düzenleme mekanizması(Wu ve ark 2020)

CRISPR/Cas9 sisteminde, viral veya plazmit DNA, protospacerlere işlenerek ve Cas1, Cas2 ve Csn2 aracılığıyla CRISPR dizisini oluşturmak için tekrar dizilerine bağlanır. CRISPR lokusu (Streptococcus pyogenes'ten), tracrRNA dizisinden, birkaç Cas geninden, lider diziden ve CRISPR dizisinden oluşur. CRISPR dizisi, pre-crRNA'ya kopyalanır. tracrRNA (trans-aktive edici crRNA), nükleazlar tarafından işlenen olgun bir tracrRNA-crRNA kompleksi oluşturmak için pre-crRNA (crRNA öncüsü) ile birleştirir. Eksojen gen müdahalesi sırasında, bu kompleks Cas9 endonükleazını aktive eder ve eksojen gen içindeki 20 nükleotitlik crRNA (CRISPR RNA) tamamlayıcı dizisini tanır, Cas9 ise PAM'leri bulur. Çift sarmallı DNA, Cas9 endonükleaz tarafından PAM 'larin olduğu 3 nükleotitlik upstream kısmından kırar (Wu ve ark 2020) (Şekil 1.11).

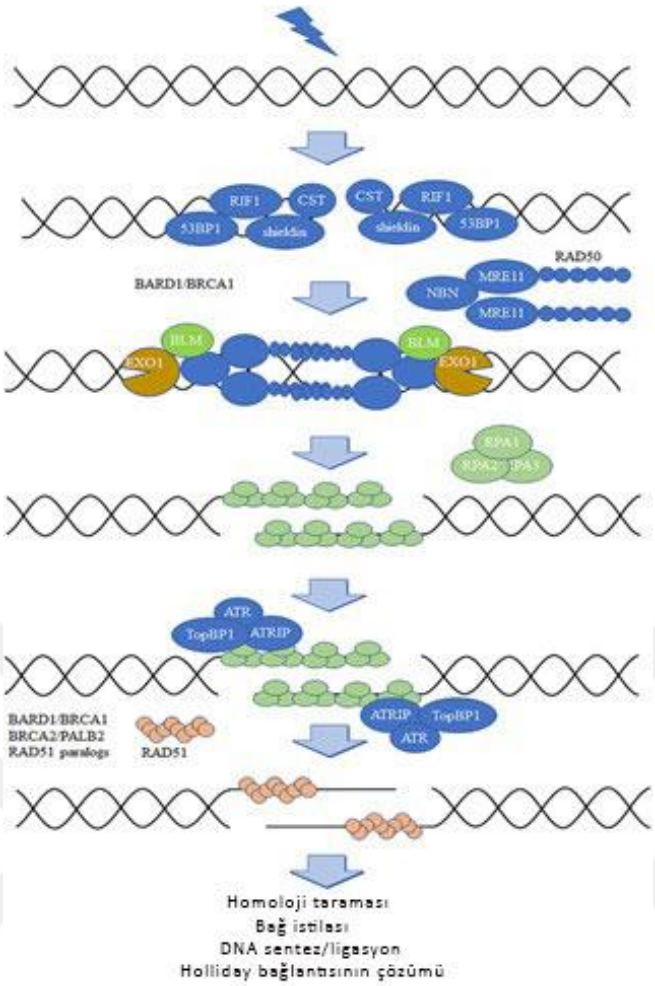
1.8. Çift Zincir Kırıklarının Onarım Mekanizmaları

DNA çift zincir kırıkları (DSB), hücrelerde DNA yapısına endojen ve eksojen saldırılardan kaynaklanır, aynı zamanda replikasyon hatalarının doğrudan bir sonucu olarak da ortaya çıkar ve genom stabilitesini korumak için aslına uygun olarak onarılması gerekmektedir (McVey ve Lee 2008, Pardo ve ark 2009).

DNA'daki DSB'ler homolog rekombinasyon (HR) ve homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) olmak üzere iki mekanizma ile onarılır (Gorbunova ve ark 2007).

1.8.1. Homolog Rekombinasyon (HR)

Homolog Rekombinasyon, hücre döngüsünün S ve G_2 fazları sırasında DNA çift zincir kırıklarının tamirinde kullanılır (Iyama ve Wilson 2013). Bu mekanizma, DNA çift zincir kırıklarını taşıyan DNA molekülü ile başka bir bozulmamış DNA molekülü arasında aynı veya yarı benzer dizilerin bir değiş tokuşuna veya transferine karşılık gelir. Onarım için kullanılan DNA şablonu, DSB'de bulunan orijinal DNA dizisiyle aynıysa, HR güvenilir bir mekanizma olarak karşımıza çıkar. Aksi takdirde bölgesel mutasyonlara veya yeniden daha da zararlı genom düzenlemelerine yol açabilir. Çoğunlukla HR; RAD50, RAD51, RAD52, RAD54, RAD55, RAD57, RAD59, RDH54, MRE11 ve XRS2'den oluşan RAD52 epistasis grubuna ait genler tarafından kodlanan proteinleri içerir. Bu genlere ek olarak, spesifik HR reaksiyonlarını tamamlamak için DNA nükleazlar (Exo1, Sae2, Rad1-Rad10), helikazlar (Sgs1, Srs2), topoizomerazlar (Top3), polimerazlar (Pol32) ve ligazlar da gerekebilir (Pardo ve ark 2009).



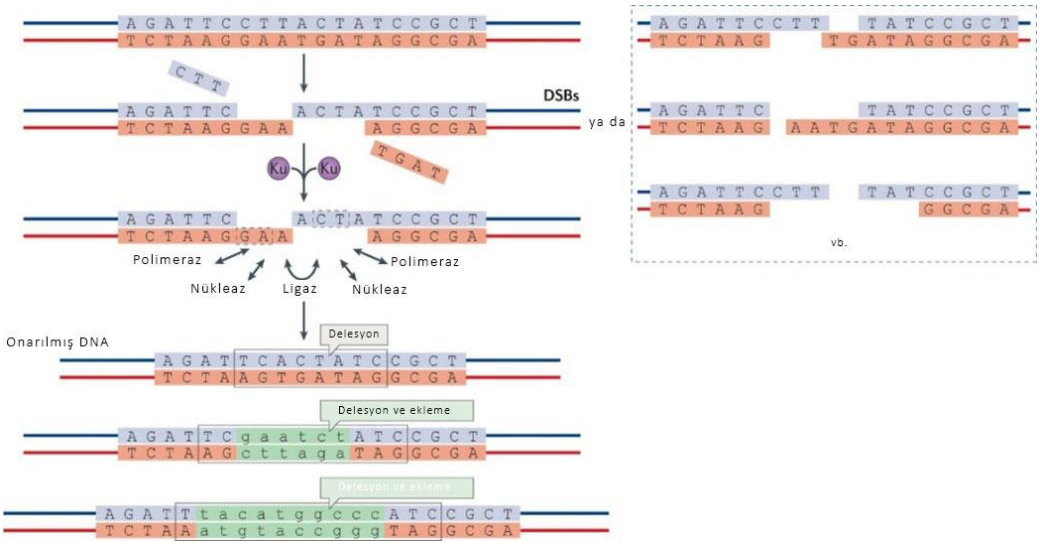
Şekil 1.12. Homolog rekombinasyon onarım mekanizması (Toh ve Ngeow 2021)

Homolog Rekombinasyon mekanizmasında, ilk önce herhangi bir sebep ile meydana gelen çift zincir kırıkları, bir 53BP1-RIF1-shieldin-CST kompleksi aracılığıyla DSB bölgesinde kromatini stabilize eden 53BP1'i aktive eder. Bu, DNA rezeksiyonunu inhibe eder ve homolog olmayan uç birleştirmeyi destekler. BRCA1, HR öncelikli aktivasyonu için 53BP1 ile yarışır. DSB'ler daha sonra, 5'-3' DNA rezeksiyonu başlatmak için çift sarmallı DNA (dsDNA) uçlarına BLM helikaz ve EXO1 nükleaz yükleyen MRE11-RAD50-NBN kompleksi tarafından algılanır. Tek sarmallı DNA (ssDNA) çıkıntıları oluşturulduktan sonra, bunlar dsDNA rezeksiyonunu baskılayan RPA ile kaplanır. ATR daha sonra ssDNA uçlarına yerleşir ve ATRIP ve TopBP1'in yardımıyla ATR'ye bağlı kontrol noktasını açar ve HR'nin ilerlemesi için hücre döngüsünü durdurur. RAD51, BRCA1/BARD1, BRCA2/PALB2 ve RAD51 paraloglarının tarafından bir hız sınırlayıcı adım olan ssDNA'da birleşir. Presinaptik filament daha sonra homoloji araştırması, iplik istilası ve DNA sentezi ile ligasyonundan geçer. Son olarak, BTRR kompleksi Holliday bağlantılarını çözer ve HR'yi tamamlar (Şekil 1.12) (Toh ve Ngeow 2021).

53BP1, DSB'lerin onarım yoluna karar vermek için BRCA1 ile birlikte çalışan bir DNA hasar sensörüdür. ATM tarafından fosforile edilmiş 53BP1, bir 53BP1-RIF1-shieldin-CST kompleksi aracılığıyla DSB'leri stabilize eder ve DNA uç rezeksiyonunu inhibe eder. ATR ise hücre döngüsü durması ve HR onarımında önemlidir. DNA hasar sensörlerinin düzgün çalışması, TopBP1 gibi yapı iskelesi proteinlerini gerektirir. TopBP1, protein-protein etkileşimleri için sekiz BRCT alanı içerir. Bunlar hücre döngüsü kontrol noktası, p53 bağlanması ve ATR-Chk1 yolu için çok önemlidir. MRN kompleksi, DNA hasarının hem sensörü hem de efektörüdür. MRE11 alt birimi, kompleksi ssDNA uçlarına lokalize etmek için DNA bağlama alanlarına sahip bir eksonükleaz iken RAD50, ATP hidrolizi ve MRE11'i ortaya çıkarmak için bir ATPaz alanı içerir. Son olarak, NBN alt birimi ise hem ATM'yi hem de ATR'yi ssDNA uçlarına bağlar ve alır (Toh ve Ngeow 2021).

1.8.2. Homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ)

İnsan hücrelerinde Homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ), hücre döngüsünün S ve G_2 fazları dışındaki hemen hemen tüm DSB'leri onarımında iş gören sistemdir (Zhao ve ark 2020). Homolog rekombinasyondan farklı olarak NHEJ, DNA hasarının onarımı için homolog bir şablon gerektirmez. NHEJ homolog bir şablon gerektirmediğinden teorik olarak hücre döngüsünün belirli bir aşamasıyla sınırlı değildir. NHEJ mekanizması 4 aşamalıdır. İlk aşama, DNA çift iplik kopmasında NHEJ kompleksinin DNA uç tanıması, yerleştirilmesi ve stabilizasyonudur. İkinci ise DNA uçlarının köprülenmesi ve uç stabilitesinin desteklenmesidir. Üçüncüsü DNA uç işleme; ve son olarak dördüncü aşamada kırık uçların ligasyonu ve NHEJ kompleksinin dağılmasıdır (Davis ve Chen 2013).

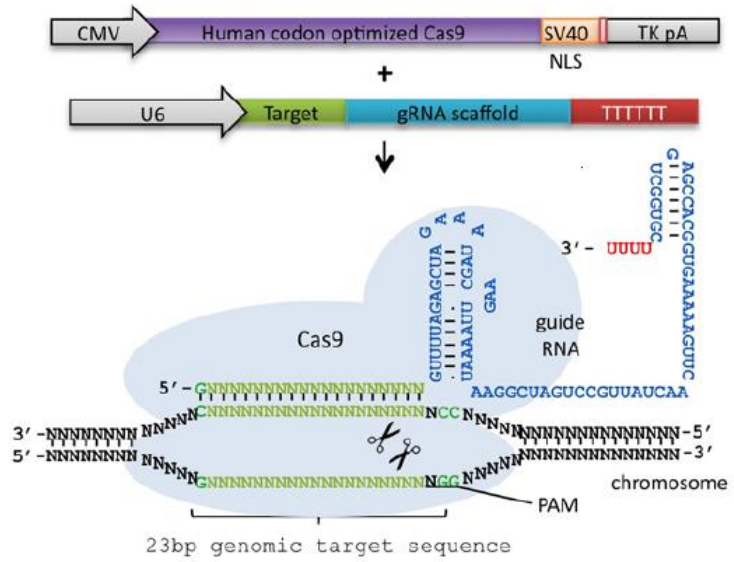


Şekil 1.13. Homolog olmayan uç birleştirmeye (NHEJ) onarımı (Chang ve ark 2017)

NHEJ sisteminde, Ku70-Ku80 heterodimer, DSB'lere bağlanır ve daha sonra NHEJ polimeraz, nükleaz ve ligaz kompleksleri tarafından bağlanmalarını güçlendirir. Bu enzimler, nükleotidleri çıkarmak ve eklemek için herhangi bir sırayla DSB'ler üzerinde hareket edebilir. Çoklu rezeksiyon ve ekleme daireleri mümkündür ve iki DNA ucunun her birinde nükleaz ve polimeraz aktiviteleri bağımsız görünmektedir. İki DNA ucu arasındaki, ya zaten var olan (kesikli kutular) ya da polimerazlar şablondan bağımsız bir şekilde nükleotidler eklediğinde yeni oluşturulan mikrohomoloji, genellikle uç birleştirmeyi yönlendirmek için kullanılır. Bu işlem hata olasılığına açıktır ve onarım bağlantısında alt kısımda gösterilen çeşitli DNA dizileriyle sonuçlanabilir. Bununla birlikte, NHEJ DNA uçlarından herhangi birinde nükleotid kaybı olmaksızın ve herhangi bir ekleme olmaksızın iki DNA ucunu birleştirebilir (Chang ve ark 2017) (Şekil 1.13).

1.9. CRISPR/Cas9 Teknolojisinin Gelişimi

Genom düzenleme teknolojileri neslinden en hızlı gelişen, mikrobiyal adaptif bağışıklık sistemi CRISPR'den Cas9 olarak bilinen ve kısa bir RNA kılavuzu ile neredeyse herhangi bir genomik konuma kolayca hedeflenebilen RNA kılavuzlu endonükleaz sınıfıdır. Bugüne kadar, Streptococcus pyogenes Cas9 (SpCas9), memeli hücre dizileri, bakteriler, zebra balığı, maya, fare vb. dahil olmak üzere çeşitli türlerde ve hücre tiplerinde genom düzenlemesi için kullanılmıştır. SpCas9, crRNA veya sgRNA olmak üzere hedef bölge ile doğrudan eşleşen bir 20 nükleotid kılavuz dizisi içerir. Cas9 hedef bölgelerini seçimi için tek gerekli olan, hedef bölgenin hemen aşağısında bir protospacer-bitişik motifin (PAM) bulunmasıdır (Hsu ve ark 2014).



Şekil 1.14. CRISPR/Cas9 Teknolojisi ile memeli hücrelerinde RNA kılavuzlu gen hedefleme (Mali ve ark 2013)

CRISPR/Cas9 Teknolojisi ile memeli hücrelerinde RNA kılavuzlu gen hedeflemesi, insan U6 polimeraz III promotöründen eksprese edilen bir veya daha fazla kılavuz RNA'lar (gRNA'lar) ile bir C terminali SV40 nükleer lokalizasyon sinyali taşıyan Cas9 proteininin birlikte ekspresyonunu içerir. Cas9, 3' ucunda doğru PAM dizisi mevcutsa, gRNA tarafından hedef sekansın tanınması üzerine DNA dupleks yapısını çözer ve her iki ipliği de keser (Mali ve ark 2013).

1.10. CRISPR/Cas9'un Avantajları ve Sınırlamaları

CRISPR/Cas9, en yaygın kullanılan genom düzenleme aracıdır. Düzenlenmesinin kolay olması ve dolayısıyla maliyetinin düşük olması bu araç için avantaj haline gelmektedir ve diğer genom düzenleme araçları (ZFN ve TALEN) ile karşılaştırıldığında, CRISPR daha az karmaşık süreç ve yüksek verimlilik gösterir (Huo ve ark 2020, Mitra ve ark 2022).

Tablo 1.1. Genom düzenleme araçları avantajları ve dezavantajları (Mitra ve ark 2022)

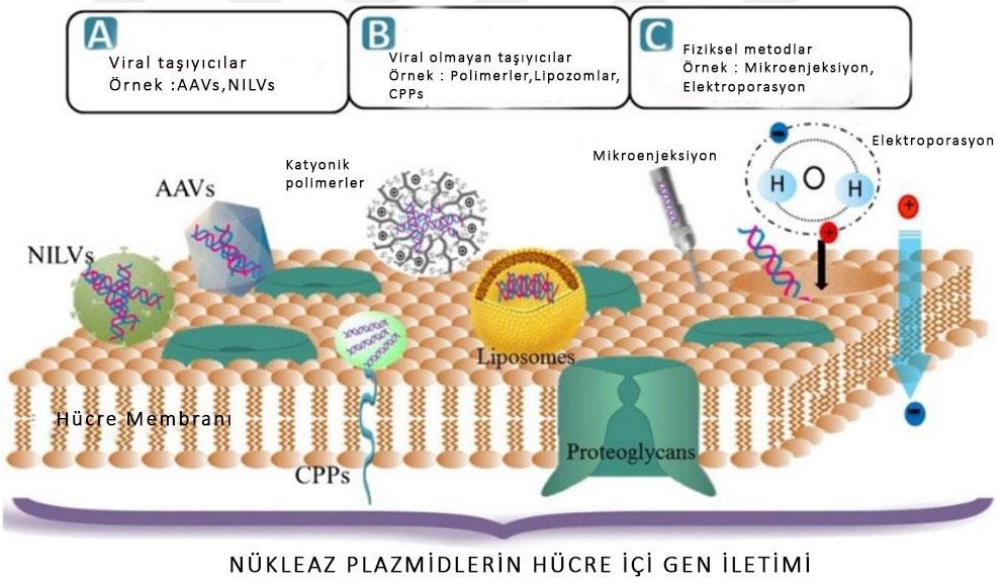
Genom düzenleme tekniği	Avantajlar	Dezavantajlar
CRISPR	✓ Yüksek verimli ve hızlı ✓ Düşük maliyetli ✓ Çoklu hedeflenmiş genomik bölge ✓ Üretimi ve çalıştırması kolay ✓ Son derece uyarlanabilir.	✓ Nispeten yüksek hedef dışı etkiler
TALEN	✓ Düşük sitotoksisite ✓ Düşük hedef dışı etkiler ✓ Son derece uyarlanabilir.	✓ Düşük verimlilik ✓ Karmaşık tasarım ve montaj ✓ Tek nükleotid hedefleme sitesi ✓ Yüksek fiyat
ZFN	✓ Yüksek afinite	✓ Karmaşık tasarım ✓ Tek nükleik asit hedefleme bölgesi ✓ Nispeten yüksek hedef dışı etki ✓ Nispeten en pahalı

Diğer programlanabilir nükleazlara kıyasla CRISPR/Cas9 teknolojisinin üstün verimliliğine, kullanım kolaylığına ve düşük maliyeti bu teknolojiye avantaj sağlarken, bazı sınırlamalar mevcuttur. Cas9 nükleazlarının özgüllüğü üzerine yapılan araştırmalar, bu proteinlerin kılavuz dizilimdeki uyumsuzlukları tolere edebildiğini ve bunun da hedef dışı bölünme etkilerine yol açabildiği ve aynı zamanda Cas9 proteinlerinin konsantrasyonunun yanı sıra hücrelerde ekspresyon süresinin de, enzimlerin hedef dışı aktivitesini etkilediği gösterilmiştir (Memi ve ark 2018). Cas9 proteinlerinin hedefleme özgüllüğünü geliştirmeyi amaçlayan mevcut yöntemler, gRNA'ların, crRNA ve tracrRNA'nın kimerik gRNA füzyonlarına modifikasyonunu ve hücrelerde Cas9 protein aktivitesinin ve yarı ömrünün azaltılmasını içerir. Bu, Cas9 eksprese eden plazmitlerin transfeksiyonu yerine Cas9/sgRNA Ribonükleotid Protein komplekslerinin (RNP'ler) hücrelere doğrudan teslimi ile elde edilebilir, bu da geçici Cas9 aktivitesi ve hedef-dışı gen düzenleme oranının artması ile sonuçlanır (Memi ve ark 2018).

Yapılan çalışmalarda hedef dışı etkilerin azaltılması için birçok stratejiler geliştirilmeye çalışılmıştır. Bunlardan bazıları ise sgRNA tasarımı için hedef sitelerin iyi seçilmesi, Cas9 ve sgRNA konsantrasyonlarını azaltılması, Cas9 ve bir sgRNA ekspresyon plazmidi yerine Cas9 mRNA/protein ve sgRNA kullanımı, eşleştirilmiş sgRNA'ları ve Cas9 nickazlarını kullanımı gibi stratejilerin hedef dışı etkilerin azaltılmasında yardımcı olabileceği düşünülmektedir (Ma ve ark 2014).

1.11. CRISPR/Cas9 Yapılarının Hedef Hücrelere Aktarılması

CRISPR/Cas9 genom düzenleme, hedeflenen genlerin düzenlenmesini sağlar ancak genom düzenleme araçlarının hedef hücrelere etkili bir şekilde iletilmesini gerektirir (Hamilton ve ark 2021). Bu nedenden dolayı araştırmacılar, CRISPR/Cas9 ve sgRNA komplekslerini aktarım için viral ve viral olmayan vektörler dahil olmak üzere çeşitli aktarım sistemlerini değerlendirmişlerdir (Liang ve ark 2022).



Şekil 1.15. Gen aktarımı için kullanılan teknikler (Ain ve ark 2015).

1.11.1. Viral Vektörler

Viral vektörler, yüksek transfeksiyon oranı ve stabil transgen ekspresyonu ile CRISPR/Cas sistemini taşımak için in vitro ve in vivo olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadırlar. Şu anda kullanılan viral vektörler arasında adenoviral vektörler (AdV'ler), adeno-ilişkili virüsler (AAV'ler), lentiviral vektörler (LV'ler) ve bakteriyofajlar bulunur (Yu ve ark 2021).

AAV'ler, düşük immünojenisiteye sahip olduklarından dolayı CRISPR/Cas9 sistemini iletmek için en yaygın kullanılan viral vektörlerdir. Ancak, AAV yaklaşık genom boyutu 4.6

kb olduğu için bu hacim mRNA, sgRNA ile ilgili promotörlerin ve düzenleyici dizilerin genomunu AAV'lere paketlemek için yeterli değildir (Dong ve ark 1996, Yu ve ark 2021). AdV'ler, DNA'larını konak hücre genomuna entegre etmeden hücreleri de enfekte edebilir, ancak bu durum hayvanlarda güçlü bir bağışıklık tepkisine yol açabilir. LV'ler bölünmeyen hücrelere enfekte edilebilir ve en büyük paketleme limiti yaklaşık 8,5 kb'dir (Yu ve ark 2021).

Yani kısaca özetlenecek olursa, viral vektörler, küçük paketleme boyutları ve düşük yükleme verimlilikleri nedeniyle proteinleri, mRNA'ları ve büyük plazmitleri taşımakta güçlük çekerler ve klinik açıdan sorunlara yol açabileceği için kullanımları bu sebeple kısıtlanmıştır (Yu ve ark 2021).

1.11.2. Viral Olmayan Vektörler

CRISPR/Cas9 sistemi amacına bağlı olarak hücrelere DNA, RNA veya protein şeklinde aktarılabilir ve bu yapılara dayalı çeşitli aktarım sistemleri geliştirilmiştir. Aktarım sistemleri genel olarak lipidler, polimerler, peptit/protein nanoveziküller ve hücre dışı veziküller olarak sınıflandırılabilir (Kim ve ark 2020).

Viral olmayan vektörler, viral vektörlerle karşılaştırıldığında, düşük immünojenisite, endojen virüs rekombinasyonu olmaması vb. gibi avantajlara sahip olduğu görülür (Yu ve ark 2021).

Polimerik aktarım sistemlerinin tasarlanması Cas9'un yapısına bağlıdır. Plazmit DNA veya mRNA'nın aktarımı için vektörler genellikle katyoniktir ve pozitif yüklerinin negatif yüklü yüklerle kompleks oluşturmasına olanak sağlar. Bu yük-yük etkileşimleri, katyonik polimerler ve nükleik asit genom düzenleme bileşenleri arasında kolayca polipleks oluşumunu sağlar. Polipleksler, nükleik asit yüklerini sterik engelleme yoluyla nükleaz aracılı bozulmadan koruyabilir ve bu sayede hücresel alım verimliliğini artırabilen yapılardır (Kim ve ark 2020).

Son yıllarda lipozomlar, hidrofobik ilaçlar, terapötik proteinler, RNazlar ve genler dahil olmak üzere çeşitli terapötikler için terapötik etkinliği artırmak ve yan etkileri azaltmak için yaygın olarak kullanılmaktadır (Yu ve ark 2021). İncelendiği takdirde nükleik asitler tipik olarak hücre dışında kararsızdır ve yüksek oranda anyonik yapıları nedeniyle hücre zarından kolayca geçemezler. Bununla birlikte, katyonik lipozomlar içinde nükleik asitleri kapsülleyerek, hücrelere kolaylıkla aktarılabilirler. Lipid nanoparçacıkları, güvenlik ve immünojenisite endişelerini en aza indirmeye yardımcı olan herhangi bir viral bileşen

içermez. Ayrıca viral partiküller gibi in vitro veya in vivo olarak da kullanılabilirler (Lino ve ark 2018).

Proteinler ve peptitler, biyouyumluluk ve biyobozunurluk açısından avantajları göz önünde bulundurulduğunda kısmen genom düzenleme bileşenleri için dağıtım sistemleri olarak büyük ilgi çekmiştir. Hücre zarından türetilen veziküller ise hücreden hücreye iletişimde ve hücresel materyal transferinde önemli bir rol oynar (Kim ve ark 2020).

1.11.3.Fiziksel Yöntemler

CRISPR/Cas9 sistemini aktarım için fiziksel yöntemler arasında mikroenjeksiyon, elektroporasyon ve hidrodinamik dağıtım vb. yer alır (Yu ve ark 2021).

Mikroenjeksiyon yöntemi, tek bir hücrenin hızlı gen düzenlemesini gerçekleştirerek ve hücreye uygulanan doz doğruluğu üzerinde kontrol sağlayarak CRISPR/Cas9 sistemini doğrudan hücreye aktarılmasıdır (Yu ve ark 2021). Bu yöntem ile hem Cas9 proteinini hem de sgRNA'yı kodlayan plazmit DNA, Cas9 ve sgRNA'yı kodlayan mRNA veya sgRNA'lı Cas9 proteini doğrudan tek tek hücrelere enjekte edilebilir. Bir mikroskop ve 0,5–5,0 μm çapında bir iğne kullanılarak, bir hücre zarı delinir ve aktarımı yapılacak yükler doğrudan hücre içindeki hedef bölgeye iletilir (Lino ve ark 2018).

Hidrodinamik dağıtım, Endotelyal ve parankimal hücre geçirgenliğini artırmak için kılcal damarlarda kontrollü hidrodinamik basıncın uygulanması olan bu teknik, tüm hayvanlarda gen aktarımı için plazmid DNA çözeltisinin intravasküler enjeksiyonu üzerine kurulu bir yöntemdir. Bu yöntemin en başarılı uygulaması, farelerde hepatositlere uygulanan gen aktarımında görülür. Bu uygulanan prosedür, vücut ağırlığının %8-10'una eşdeğer, 5-7 saniyelik fizyolojik solüsyonda kuyruk damarı enjeksiyonunu içerir (Suda ve Liu 2007).

Elektroporasyon yöntemi, gen düzenleme araçlarının bir hücre popülasyonuna verilmesi için uzun süredir devam eden fiziksel yöntemlerden biridir. Bu yöntem hücre zarını geçici olarak yeniden düzenlemek, hücre zarının geçirgenliğini artırmak ve makromoleküler maddelerin hücreye girmesine izin vermek için hücre zarına güçlü bir elektrik alanı uygular (Lino ve ark 2018, Yu ve ark 2021). Bu yöntem etkilidir ancak hücre zarına zarar vermesi sebebiyle çok toksik olabilir. Bazı durumlarda bu, zarın kalıcı geçirgen hale gelmesine yol açar (Wilbie ve ark 2019).

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Ekipmanlar

• -20 buzdolabı (Arçelik)

• -80 dondurucu (Haier)

• Elektroforez Güç Kaynağı (Thermo Scientific EC 300XL)

• Hassas Terazi (Sartorius GE212)

• İnkübatör (WG/WF model)

• Jel Görüntüleme Sistemi (Uvitec transilluminators GD45482 BTS20MS)

• Laminar Kabin (Cyto ultra telstar class II cabinet)

• Mikrosantrifüj (Wisespin CF-10)

• Nanodrop (Thermo Scientific)

• PCR Cihazı (Biorad)

• Soğutmalı Santrifüj (Thermo microCL 17R)

• Su Banyosu (Wisebath WB22)

• Thermal Cycler (Biorad)

• Vortex (Wisemix VW-10)

• Karbondioksitli İnkübatör (Thermo Scientific)

• Inverted Mikroskop (Nikon Eclipse TS100)

• Real-time PCR (Roche)

• +4 Buzdolabı (Uğur)

2.1.2. Kimyasallar ve Sarf Malzemeler

• Agarose (Sigma)

• Ampisilin (Sigma)

• BbsI R0539S Restriksiyon Kesim Enzimi (Biolabs)

• Gliserol (Sigma)

• Jel İzolasyon Kiti (Qiagen, 163045849)

• LB Broth (Sigma, MKCK6324)

• LB Broth (Sigma, SLCB8886)

• rSAP enzimi (Biolabs)

• T4 DNA Ligase (Promega)

• T4 DNA Ligase Buffer (Promega)

• T4 Polynucleotide Kinase M0201S (BioLabs)

• Tris-EDTA tampon solüsyonu (Sigma)

• Vektör İzolasyon Kiti (Promega, 0000387910)

• RPMI 1640 (Gibco)

• DMEM (Gibco)

• Fosfat tamponlu su (PBS) (Sigma)

• Fetal Sığır Serumu (FBS) (Gibco)

• Tripsin-EDTA (%0.05) (Gibco)

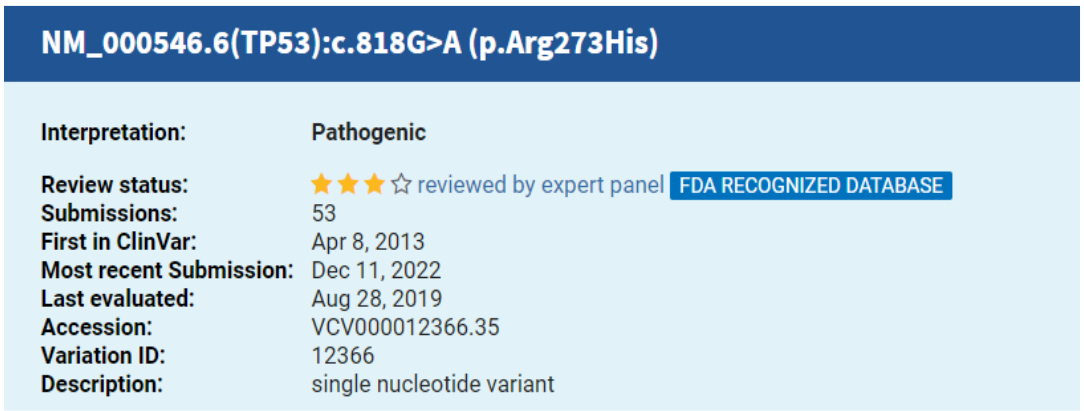
2.2.Yöntem

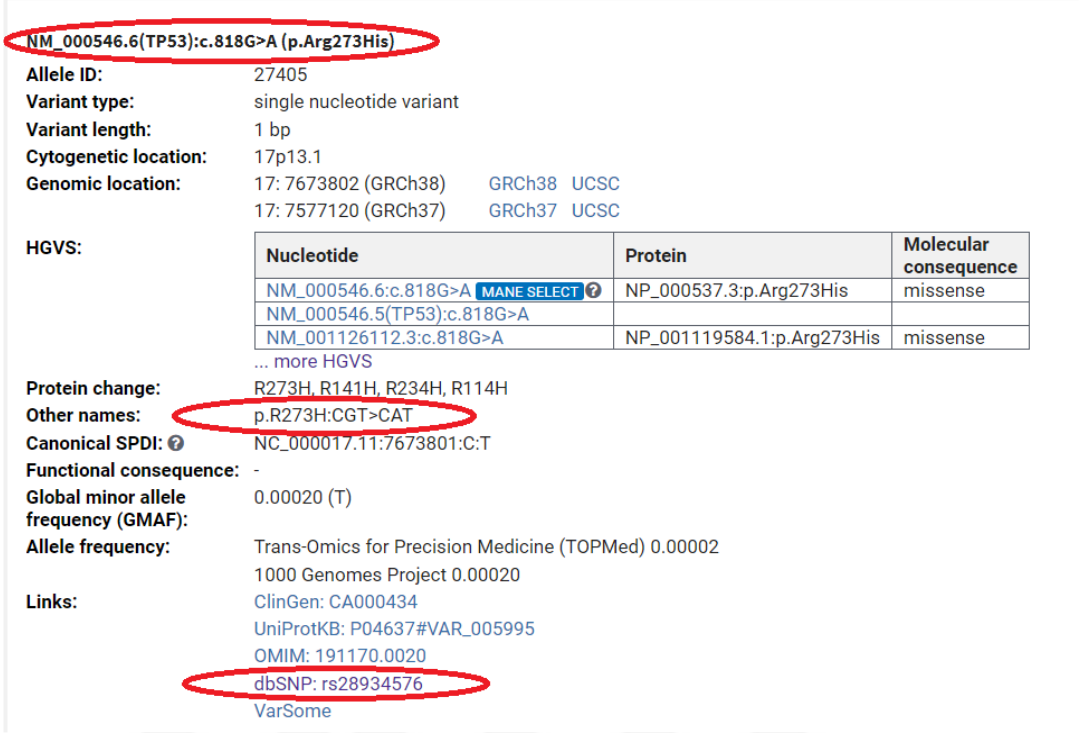
2.2.1. TP53 Genine Ait Biyoinformatik Bilgilerin Elde Edilmesi

TP53 gen dizisi, NC_000017.11 numarası kullanılarak NCBI veri tabanında erişim sağlandı (Şekil 2.1). Pankreas Duktal Adenokarsinomu, TP53 genin 8. ekzonunda meydana gelen özellikleri R273H mutasyonunun biyoinformatik özellikleri Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. İnsan TP53 geni (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7157)





NM_000546.6(TP53):c.818G>A (p.Arg273His)

Allele ID:	27405
Variant type:	single nucleotide variant
Variant length:	1 bp
Cytogenetic location:	17p13.1
Genomic location:	17: 7673802 (GRCh38) GRCh38 UCSC 17: 7577120 (GRCh37) GRCh37 UCSC

HGVS:

Nucleotide	Protein	Molecular consequence
NM_000546.6:c.818G>A MANE SELECT	NP_000537.3:p.Arg273His	missense
NM_000546.5(TP53):c.818G>A		
NM_001126112.3:c.818G>A	NP_001119584.1:p.Arg273His	missense

... more HGVS

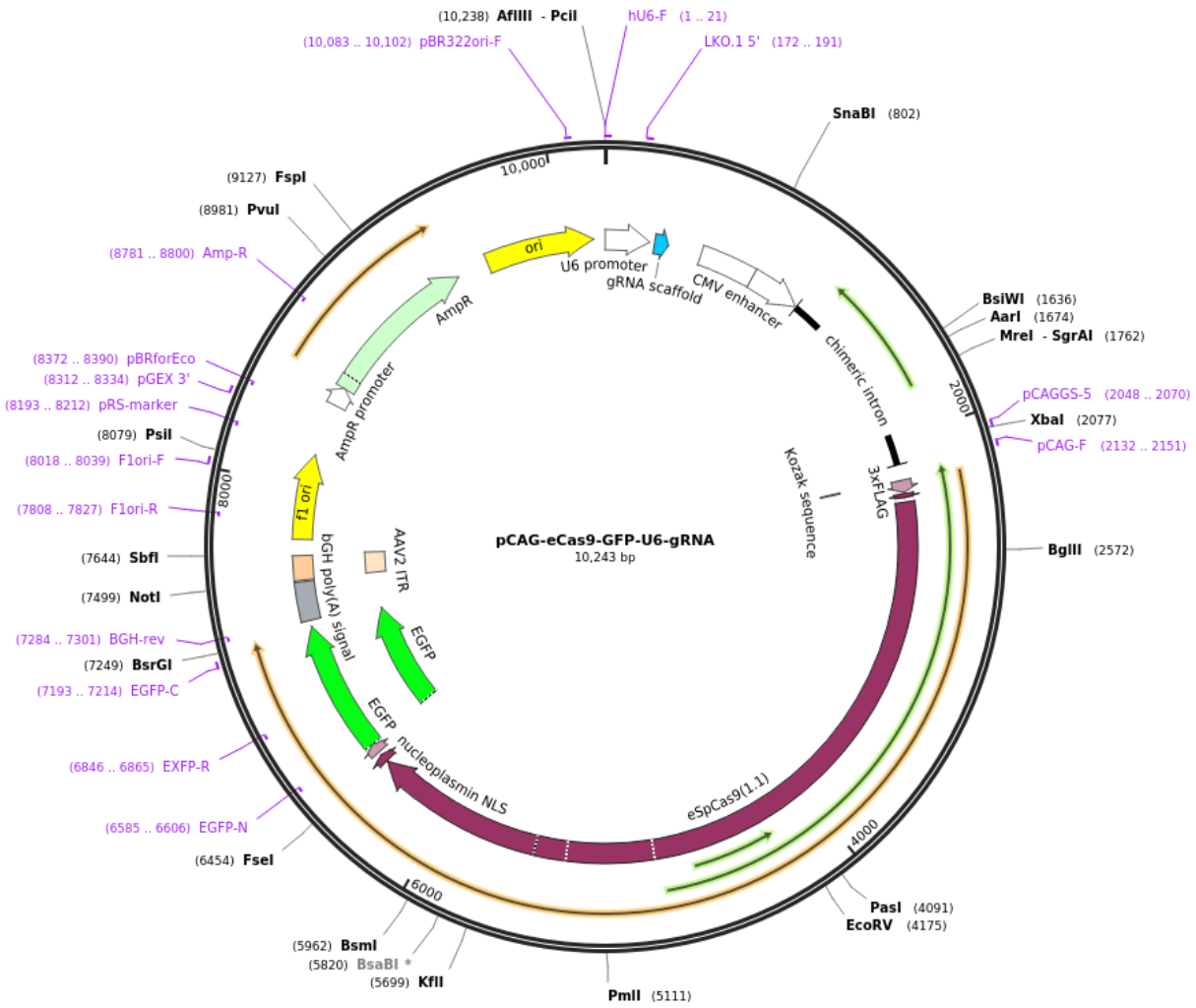
Protein change:	R273H, R141H, R234H, R114H
Other names:	p.R273H:CGT>CAT
Canonical SPDI:	NC_000017.11:7673801:C:T
Functional consequence:	-
Global minor allele frequency (GMAF):	0.00020 (T)
Allele frequency:	Trans-Omics for Precision Medicine (TOPMed) 0.00002 1000 Genomes Project 0.00020
Links:	ClinGen: CA000434 UniProtKB: P04637#VAR_005995 OMIM: 191170.0020 dbSNP: rs28934576 VarSome

Şekil 2.2. TP53 genindeki R273H mutasyonunun biyoinformatik özellikleri https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/12366

2.2.2. pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA Plazmid

Çalışmamızda daha önceden temin edilen 2.1.'de gösterilen sirküler yapıda bulunan ve 10243 bp oluşan pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA (Addgene,79145) plazmid vektörü kullanıldı.

Created with SnapGene®



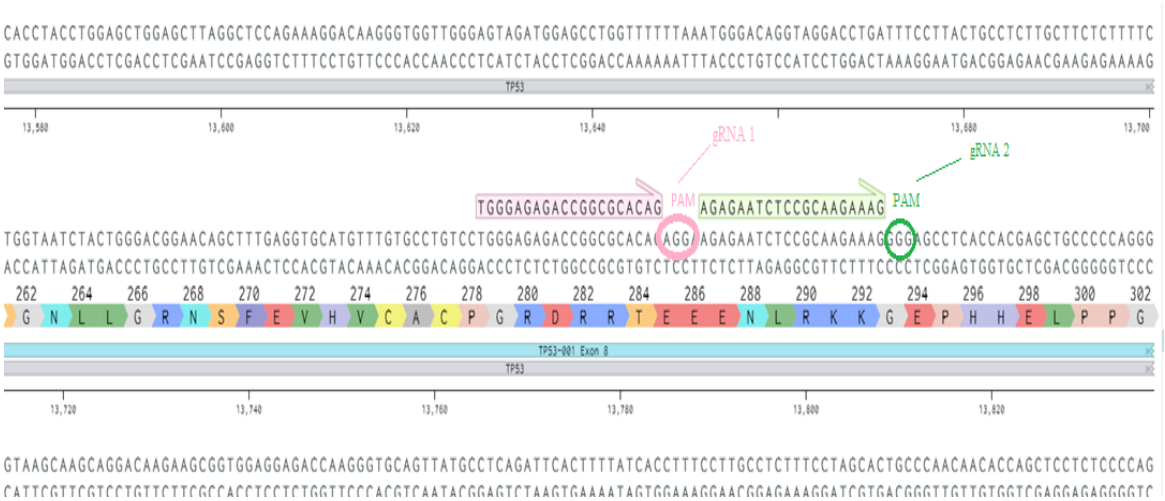
Şekil 2.3. pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA Plazmit Yapısı (https://www.addgene.org/79145/)

Şekil 2.3'te görüldüğü gibi pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid vektörü, bakteriyel replikasyon bölgesi (ori), transkripsiyon için promotor bölge (U6), transkripsiyon düzenleyici bölge (CMV), restriksiyon kesim ve gRNA scaffold bölgesi, Cas9 endonükleaz kodlama bölgesi (eSpCas9), plazmid transformasyonu gerçekleştirilen bakterilerin seçilimini sağlayan ampisilin antibiyotik direnç (AmpR) ve promotor bölgeleri, plazmid transfeksiyonu gerçekleştirilen ökaryotik hücrelerin seçilimini sağlayan yeşil floresan protein (EGFP) bölgesini içerir.

2.2.3. CRISPR/Cas9 Yapılarının Oluşturulması

2.2.3.1 gRNA ve ssODN (Donör DNA) dizaynı

Çalışmada hedeflenen *TP53* geni ekzon 8 bölgesi R273H mutasyonunun düzenlenmesine spesifik gRNA oligolarının dizaynları Şekil 2.1.'de gösterilen https://www.benchling.com/ adresi üzerinden ulaşılabilen online software uygulaması kullanılarak yapıldı. Dizayn edilen gRNA oligolarının 20-25 nükleotit uzunluğunda olması, PAM dizisi bitişiğinde yer alması, düzenleme yapılacak bölge ya da 50-100 nükleotit mesafede DSB oluşturması ve hedef dışı (*off-target*) ve hedefleme (*on-target*) değerleri dikkate alınarak tasarımlar yapıldı.



Şekil 2.4. gRNA1 ve 2 yapılarının PAM (NGG) dizilerine göre konumları.

*NGG; N (değişken), G (Guanin)

Dizayn edilen gRNA1 ve 2 oligoları Tablo2.1.'de gösterilen şekilde forward ve revers gRNA çiftleri olarak liyofilize halde "SENTEBİOLAB" firmasından temin edildi. Seçilen sgRNA'lar ile uyumlu olacak şekilde mutasyon bölgesini düzeltmeye uygun ssODN (Tablo 2.2.) tasarımı yapıldı.

Tablo 2.1. CRISPR/Cas9 yapısı için dizayn edilen gRNA oligo yapıları

*TP53*_gRNA1_Forward	caccGTGGGAGAGACCGGCGCACAG
*TP53*_gRNA1_Reverse	aaacCTGTGCGCCGGTCTCTCCCAC
*TP53*_gRNA2_Forward	caccGAGAGAATCTCCGCAAGAAAG
*TP53*_gRNA2_ Reverse	aaacCTTTCTTGCGGAGATTCTCTC

*Kırmızı renkte gösterilen diziler gRNA oligolarına aittir.

*Siyah renkte gösterilen diziler; Guanin (G) nükleotiti ve restriksiyon kesimi sonrası vektöre ligasyon için yapışkan uç oluşturacak eklentilerdir.

Tablo 2.2. Dizayn edilen ssODN dizilimi

TP53_e8_ ssODN1	TAAATGGGACAGGTAGGACCTGATTTCCTTACTGCCTCTTGCTTC TCTTTTCCTATCCTGAGTAGTGGTAATCTACTGGGACGGAACAGC TTTGAGGTGCGTGTTTGTGCCTGTCCTGGAAGGGACCGGCGCAC AGAGGAAGAGAATCTCCGCAAGAAAGGGGAGCCTCACCACGA GCTGCCCCCAGGGAGCACTAAGCG

2.2.3.2. Sirküler Yapıdaki Plazmid Vektörün Kesimi ve Defosforilasyonu

Sirküler yapıda bulunan plazmid DNA'sını linearize etmek amacıyla "gRNA scaffold" bölgesinden kesim için BbsI (NEB, İngiltere) restriksiyon enzimi kullanıldı.

Aşağıda verilen Tablo 2.3'de BbsI restriksiyon enzim reaksiyonu oluşturuldu.

Tablo 2.3. BbsI restriksiyon enzim reaksiyon bileşenleri

Reaksiyon bileşenleri	
10x NEBuffer	2 µl
pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid	1 µg
BbsI restriksiyon enzim	1 µl
ddH_2O	? µl
Toplam hacim	20 µl

Kurulan reaksiyonun ardından hazırlanan PCR tüpleri Thermocycler PCR cihazına yerleştirildi. Aşağıda Tablo 3.'de verilen sıcaklık parametleri takip edildi.

Tablo 2.4. BbsI enzim reaksiyonu sıcaklık parametreleri

BbsI enzim aktivasyonu	**37°C**	2,5 saat
BbsI enzim inaktivasyonu	**65°C**	20 dakika

Reaksiyon sonunda lineer formda bulunan plazmidlerin yapısını korumak için defosforilizasyon yapıldı. Kesim reaksiyonu sonrası PCR tüplerine 1 µl rSAP (Karides Alkalin Fosfataz, NEB) enzimi eklenerek PCR cihazında 37 ºC'de 30 dk defosforilizasyon yapıldı.

2.2.3.3. Restriksiyon Kesim ve Defosforilizasyon İşlemlerinin Doğrulanması

Sirküler yapıda bulunan plazmidin enzim kesimi reaksiyonu ile oluşan lineer plazmid yapısını doğrulamak için 2 farklı transformasyon reaksiyonu kuruldu. Transformasyon reaksiyonu ilk olarak kontrol amaçlı Sirküler ve doğrulama amaçlı lineer ısı-şok metodu ile kimyasal kompotent DH5α *(E.coli)* bakteri hücrelerine aktarıldı.150 µl transformasyon reaksiyon ürünü alınarak daha önceden hazırlanan LB agar ampisilin içeren plaklara aktarıldı ve gece boyu 37ºC'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası ısı-şok metodu ile lineer plazmid aktarılan plakta koloni oluşumu gözlemlenmedi. Bu sonuç restriksiyon kesimi ve defosforilizasyon işlemlerini doğrulamış oldu.

Sirküler Plazmid eldesinin kontrolü için agaroz jel elektroforez yöntemi kullanılarak da doğrulama işlemi yapıldı. Bunun için 1gr agaroz tartılarak erlen içerisine alındı ve üzerine 100 ml TAE eklendi ve Mikrodalga fırında ısıtılarak çözünmesi sağlandı. Oluşan çözelti hafif soğutulduktan sonra 5 µl Etidyum bromür eklenerek jel kasetine döküldü. Jel donduktan sonra elektroforez tankına alınarak kuyucuklar oluşturuldu. Kesim yapılan sirküler pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid örneği ve 1000 baz çiftlik (bp) DNA moleküler boyut belirteci, 6X yükleme boyası ile renklendirilerek oluşturulan farklı kuyulara yüklendi. 60 dakika ve 90 V (Volt) elektrik potansiyeli uygulanarak yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jeli görüntelemek için görüntüleme cihazı kullanıldı.

2.3.3.4. Lineer Haline Getirilen Plazmidlerin Jelden Eldesi

Agaroz jel elektroforezinde bant oluşumu gözlendikten sonra oluşan jel bölgesindeki bantı X-tracta™ jel ekstraktör (Promega, ABD) yardımıyla alındı. Lineer yapıda bulunan plazmid örneklerinin jelden eldesi ise "QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hollanda; Katalog No 28704)" kiti ile üretici firmanın hazırlamış olduğu protokol adımları takip edilerek yapıldı. Lineer yapıda bulunan plazmid DNA konsantrasyonu ve A_{260}/A_{280} oranları nanodrop cihazında ölçüldü.

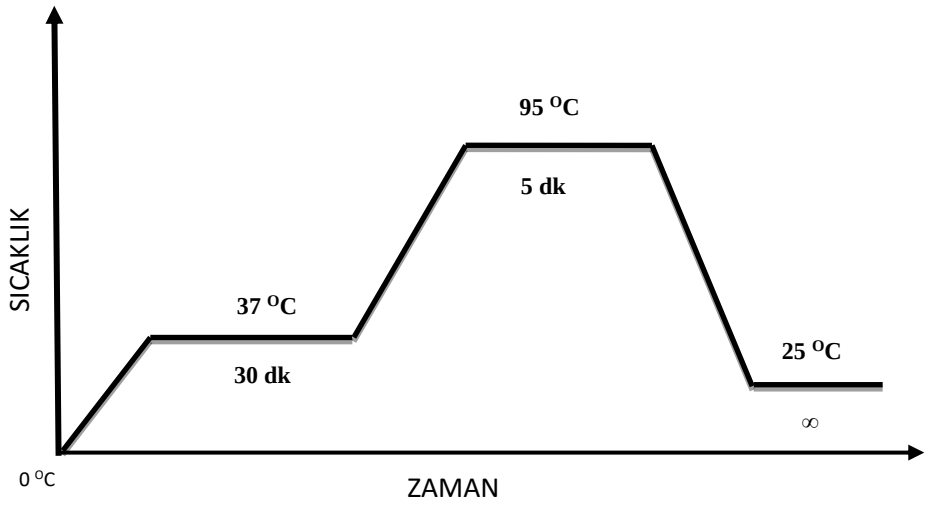
2.3.3.5. gRNA Oligo Yapılarının Fosforilasyonu ve Dupleks Haline Getirilmesi

Liyofilize olarak alınan gRNA oligo yapıları (SENTEBİOLAB), 1 µl' sinde 100 pmol gRNA oligo yapısı olacak şekilde TE (Tris-Edta) Buffer (Sigma-Aldrich, ABD) ile çözülmesi sağlandı. Çözünen gRNA oligo yapıları 5' uçlarına fosfat grupları eklemek için T4 Polinükleotit Kinaz (T4PNK) enzimi kullanıldı.

Aşağıda verilen tabloda oluşturulan T4PNK enzim reaksiyon koşulları yer almaktadır.

Tablo 2.5. T4PNK enzimi reaksiyon bileşenleri

Reaksiyon bileşenleri	
DNA	300 pmol
T4 PNK Buffer(10X)	5 µl
ATP (10mM)	5 µl
T4 PNK	1 µl (10 units)
ddH_2O	-
Toplam Reaksiyon	**50 µl**



Şekil 2.5. Reaksiyon Parametreleri

Aşağıda verilen grafikte hazırlanan reaksiyona ait sıcaklık parametleri verilmiştir.

Reaksiyon sonucunda 5'uçları fosfatlanan gRNA1 ve gRNA2 oligo dubleks yapıları elde edildi.

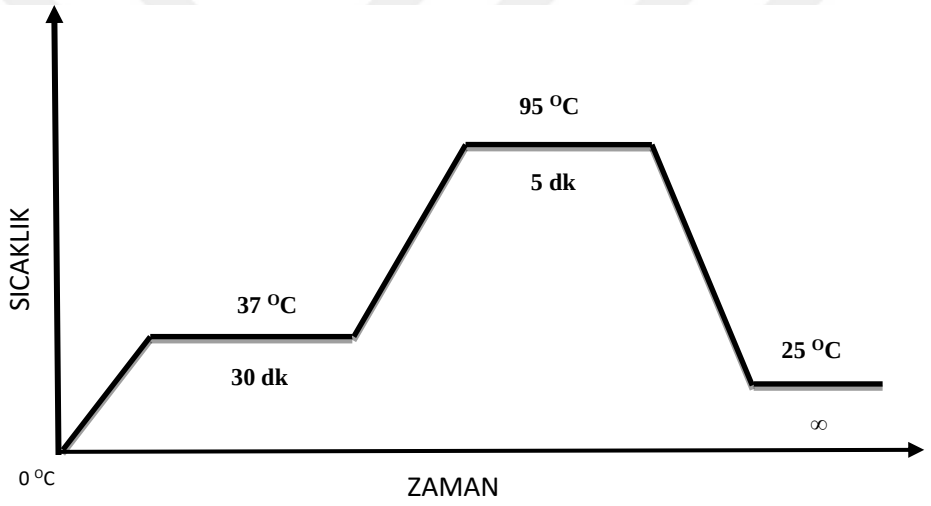
2.3.3.6. Ligasyon

gRNA oligo dubleks yapılarının, lineer plazmid yapısına ligasyonu için T4 DNA Ligaz enzimi kullanıldı (Tablo 2.6.).

Tablo 2.6. Ligasyon için reaksiyon bileşenleri

Reaksiyon bileşenleri	
T4 DNA Ligaz Buffer (10X)	2 µl
Vektör DNA (4 kb)	50 ng (0.020 pmol)
Insert DNA (1 kb)	37,5 ng (0.060 pmol)
ddH_2O	?
T4 DNA Ligaz	1 µl
Toplam Reaksiyon	**20 µl**

Hazırlanan reaksiyon PCR cihazına yerleştirildikten sonra aşağıdaki sıcaklık parametreleri verilmiştir.



Şekil 2.6. Reaksiyon Parametreleri

Kurulan ligasyon reaksiyonu sonucunda gRNA1 ve gRNA2 oligo dubleks yapılarının klonlandığı iki ayrı sirküler plazmid yapısı elde edildi.

2.3.3.6. gRNA Klonlanmış Plazmidlerin Kompotent Bakteriye Transformasyonu

Sirküler yapıda plazmid örnekleri ısı-şok transformasyon metodu ile ticari olarak temin edilen kimyasal kompotent bakteri olan DH5α (*E.coli*) (NEB, İngiltere) hücrelerine aktarıldı. Isı-şok yöntemi, kompotent bakteri hücrelerinin zarlarında porlar açarak, sgRNA klonlanmış plazmid vektörlerin bakteri içerisine girmesini sağlar. Bakteriye transformasyon için öncelikle; için 3,5 g LB Agar tartılarak 100 ml ddH_2O ile çözüldü ve çözeltiye 100 µg/ml antibiyotik eklenerek katı besiyeri hazırlandı. Kimyasal kompotent DH5α (*E.coli*) bakteri hücresi içeren ependorf tüp -80°C' den alınıp buz içerisinde çözünmesi sağlandı. Çözünen

DH5α (*E.coli*) bakteri hücresi içerisine 10ng sirküler yapıda bulunan plazmid eklendi. Ependorf tüpe sırası ile buz üzerinde 30 dk, su banyosunda 42°C 30 sn ve buz üzerinde 5 dk bekletilerek hücrelere ısı-şok işlemi uygulandı. Bu işlemden sonra ependorf tüpe 950 µl SOC Medium (NEB, UK) eklendi. 37°C 250 rpm'de 60 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası ependorf tüpten 250 µl numune alınarak önceden hazırlanan LB Broth-ampisilin plaklarına aktarıldı. 37°C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı ve LB-ampisilin plaklarında koloni oluşumu gözlemlendi.

2.3.3.7. gRNA taşıyan Plazmid Vektörlerin Bakterilerden İzolasyonu

Transformasyon sonrası LB-ampisilin plaklarında oluşan bakteri kolonilerinden steril öze yardımıyla seçilip içerisinde ampisilin içeren 10 ml LB Broth sıvı besiyeri içerisine aktarıldı.16 saat 37 ºC' 150 rpm'de çalkamalı etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası oluşan kültürden 2 ml bakteri kültürü alınarak steril 2 mm'lik ependorf tüpe aktarıldı.10000 g'de 5'dk santrifüj yapılarak ve süpernatant uzaklaştırılarak bakteri hücreleri elde edildi.

Elde edilen DH5α (E.coli) bakteri hücrelerinden sirküler yapıda bulunan plazmit eldesi için "Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, ABD; Katalog No A1330)" kiti kullanılarak ve kit içerisinde bulunan protokol yardımıyla yapıldı ve elde edilen sirküler plazmid DNA konsantrasyon ve A_{260}/A_{280} oranları için nanodrop (Thermo, NanoDrop^{TM}2000) cihazında ölçüldü ve plazmid örnekleri -20 ºC'de saklandı.

2.3.3.8. PCR/Dizi Analizi Yöntemi ile Ligasyonun Doğrulanması

Sirküler plazmid DNA'sına, sgRNA oligo yapısının ligasyonu PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu) dizi analiz yöntemi ile doğrulandı. Bunun için vektör üzerinde gRNA scaffold bölgesinin dahil olduğu alanı kapsayacak şekilde PCR yapıldı. Daha önce dizayn edilen Sirküler plazmid DNA'sına özgü hU6-F (Forward) (Sentebiolab) ve Cmv-R (Reverse) (Sentebiolab) primerleri Tablo 2.7.'de verilmiştir.

Tablo 2.7. hU6-F ve Cmv-R primerleri

Primer	Nükleotit Dizisi
hU6-F	5'-GAGGGCCTATTTCCCATGATT-'3
Cmv-R	5'-GGATAACCGCAATGATACCCT-'3

PCR reaksiyon koşulları Tablo 2.8'de verildiği şekilde hazırlanarak tüpler Thrmocycler cihazına yerleştirildi ve Tablo 2.9.'da verilen PCR protokolü uygulandı.

Tablo 2.8. PCR reaksiyon karışımı bileşenleri

Reaksiyon bileşenleri	
ddH_2O	20,7 µl
PCR Buffer (10x)	3 µl
$MgCI_2$ (50mM)	1,4 µl
dNTP (10mM)	0,6 µl
hU6-F primer	1 µl
Cmv-R primer	1 µl
Taq DNA Polimeraz	0,3 µl
Klonlanan sirküler plazmit DNA (50ng)	2 µl
Toplam Reaksiyon	**30 µl**

Tablo 2.9. PCR reaksiyon protokolü

Sıcaklık	**Döngü**	**Zaman**
95 ^{0}C	1	5 dk
95 ^{0}C	33	1 dk
52.4 ^{0}C	33	1 dk
72 ^{0}C	33	1 dk
72 ^{0}C	1	5 dk
4 ^{0}C	1	∞

Sirküler pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid DNA'sı yaklaşık 624 baz çiftinden oluşur. Reaksiyon ürünleri, Jel elekroforezinde %1.5'luk agaroz jel hazırlanarak 100 baz çiftlik (bp) DNA Marker, 6X yükleme boyası ile renklendirilerek kuyulara yüklendi. 60V'da 90 dakika yürütüldükten sonra görüntüleme cihazında görüntüleme gerçekleştirildi. Elde edilen PCR ürünlerinin ligasyonu doğrulama amaçlı dizi analizi, BM Labosis Biyoteknoloji firması tarafından Sanger dizileme yöntemiyle yapıldı. Pikler şeklinde elde edilen dizi sonuçları Finch TV programı ile görüntülendi ve değerlendirildi.

2.2.4. Hücre Kültürü

American Type Culture Collection (ATCC)'dan temin edilen PANC-1 insan pankreas kanseri hücre hattı, saklandığı -80 °C derin dondurucudan çözme işlemi için alındı. 37˚C'deki su banyosunda hızlıca çalkanarak 1 dakika içerisinde çözünmesi sağlandı. Çözülen hücreler, içerisinde 6 ml ısıtılmış besiyeri (%10 fetal sığır serum (FBS), 100 IU/ ml penisilin, 100 mg/ml streptomisin ilave edilmiş DMEM) bulunan falkon tüplere yavaşça aktarıldıktan sonra 1500 rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek bu işlem bir kez daha tekrarlandı. Santrifüj sonrası üst kısımda kalan süpernatant uzaklaştırıldı ve dibe çöken hücre pelleti, uygun miktarda besiyeri ile pipetaj yapılarak çözdürüldükten sonra hücre sayıları dikkate alınarak uygun büyüklükteki kültür flaskına alındı ve 37 °C'de %5 CO_2'li etüvde inkübasyona bırakıldı.

PANC-1 hücreleri, iki günde bir flask içerisindeki eski besiyeri uzaklaştırıp taze besiyeri ilave edilerek inverted mikroskop ile takip edildi. Flasktaki hücre yoğunluğu %80-90 seviyelerine ulaştığında, canlılığın devamı için pasajlama işlemi gerçekleştirildi. Pasajlama işleminde, öncelikle eski besiyeri uzaklaştırıldı ve ardından 1-2 ml 1X'lik DPBS ile yıkama işlemi yapıldı. Hücreleri flask yüzeyinden kaldırmak amacıyla flaska 1-2 ml %0.05'lik Tripsin-EDTA eklendi, hücreler 37˚C'de %5 CO_2'li etüvde 1-2 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında inverted mikroskopta hücrelerin kalktığı belirlendikten sonra, flaska Tripsin-EDTA miktarının yaklaşık üç katı kadar taze besiyeri ilave edildi ve hücre-besiyeri içeriği pipet ile homojenize edildikten sonra falkon tüpe aktarıldı. 1500 rpm'de 3 dk santrifüj yapıldıktan sonra, süpernatant atılarak bu işlem tekrar edildi. Pellet 5 ml besiyeri ile homojenize edildi. Thoma lamı kullanılarak tripan mavi boyası ile hücreler ışık mikroskobu altında sayıldı. Hücre sayımı sonrasında hücre yoğunluğuna göre hücreler flasklara bölündü, inverted mikroskobu altında hücreler incelendi ve çoğalmaları için 37 ˚C'de %5 CO_2'lik etüvde inkübasyona bırakıldı.

2.2.5. Elektroporasyon

Kültür sonrası yeterli hücre sayısına ulaşıldığında, hücreler hazırlanarak transfeksiyon aşamasına geçildi. PANC-1 hücre hattına plazmidlerin transfeksiyonu için elektroporasyon tekniği uygulandı. Elektroporasyon, hücrelerin veya dokuların kısa süreli olarak yüksek güçte elektriksel alana marus bırakılmasıyla hücre zarında nanometre boyutunda geçici gözeneklerin açılmasını sağlar. Çalışmamızda elektroporasyon işlemi için; OPTI-MEM içerisinde süspanse edilmiş $1x10^6$ PANC-1 hücreleri ile 2 µg plazmid DNA ve 1 µg ssODN olacak şekilde 2:1 oranında plazmid ve ssODN karışımı 0,2 cm'lik elektroporasyon küvetine eklendi. Elektroporasyon cihazında (BIORAD, ABD), 500V elektrik akımı verilerek 0,9 ms ve 1 vuruş uygulaması yapıldı. Elektroporasyon sonrasında PANC-1 hücreleri uygun miktarda besiyeri ile T25 hücre kültürü flasklarına ekildi ve 24 saat boyunca 37 ˚C'de %5 CO_2'lik etüvde inkübasyona bırakıldı.

2.2.6. PANC-1 Hücrelerinden DNA İzolasyonu

Elektroporasyon sonrası 24 saat kültüre edilen PANC-1 hücreleri santrifüj edildi. Çöken hücre pelleti için "Wizard® Genomic DNA Purification Kiti (Promega)" içerisinde bulunan protokol uygulanarak hücrelerden DNA izolasyonları yapıldı. Daha sonra Nanodrop cihazında (Thermo Scientific) konsantrasyonları ve A260/A280 oranları ölçüldü.

2.2.7. Melting Curve Analizi

Melting Curve Analizi için "FastStart Essential DNA Green Master (Roche)" kiti kullanıldı. Bunun için öncelikle, PANC-1 hücre hattından izolasyonu yapılan DNA'lar 10 ng olacak şekilde seyreltildi. Tablo 2.10.'da verilen şekilde hazırlanan reaksiyon karışımı gerçek zamanlı PCR (Light Cycler96, Roche) cihazına yerleştirildi ve Tablo 2.11.'de verilen koşullar altında PCR reaksiyonu kuruldu.

Tablo 2.10. qPCR reaksiyon karışımı bileşenleri

Reaksiyon	Hacim
ddH_2O	3 µl
Primer-F (10X)	1 µl
Primer-R (10X)	1 µl
Master Mix (2X)	10 µl

TOPLAM HACİM	15 µl

Tablo 2.11. qPCR reaksiyon koşulları

	Sıcaklık	Döngü	Zaman
Pre-inkübasyon	**95 ^{0}C**	**1**	**10 dk**
Amplifikasyon	**95 ^{0}C** **59 ^{0}C** **72 ^{0}C**	**45** **45** **45**	**10 sn** **10 sn** **10 sn**
Melting curve	**95 ^{0}C** **65 ^{0}C** **97 ^{0}C**	**1** **1** **1**	**10 sn** **1 dk** **1 sn**

2.2.8. Düzeltme işleminin PCR/Dizi Analizi Yöntemi İle Doğrulanması

Elektroporasyon sonrası DNA izolasyonu yapılan PANC-1 hücrelerinde düzeltilmesi beklenen mutasyonu içeren bölgenin çoğaltılması için PCR reaksiyonunda kullanılmak üzere Tablo 2.12'de verilen primerler tasarlandı.

Tablo 2.12. Hedef mutasyonu (R273H) kapsayan bölgeye özgü primerler

Primer	Nükleotit Dizisi
İleri	5'-CAAGGGTGGTTGGGAGTAGA- '3
Geri	5'-TAACTGCACCCTTGGTCTCC- '3

PCR reaksiyon koşulları Tablo 2.13'de verildiği şekilde hazırlanarak tüpler Thermocycler cihazına yerleştirildi ve Tablo 2.14.'de verilen PCR protokolü uygulandı.

Tablo 2.13. PCR reaksiyon karışımı bileşenleri

Reaksiyon bileşenleri	
ddH_2O	22.84 µl
PCR Buffer (10x)	4,8 µl
$MgCI_2$ (50mM)	4,8 µl
dNTP (10mM)	4,8 µl
Primer (F)	0,24 µl
Primer (R)	0,24 µl
Taq DNA Polimeraz	0,28 µl
DNA (50ng)	2 µl
Toplam Reaksiyon	**40 µl**

Tablo 2.14. PCR reaksiyon koşulları

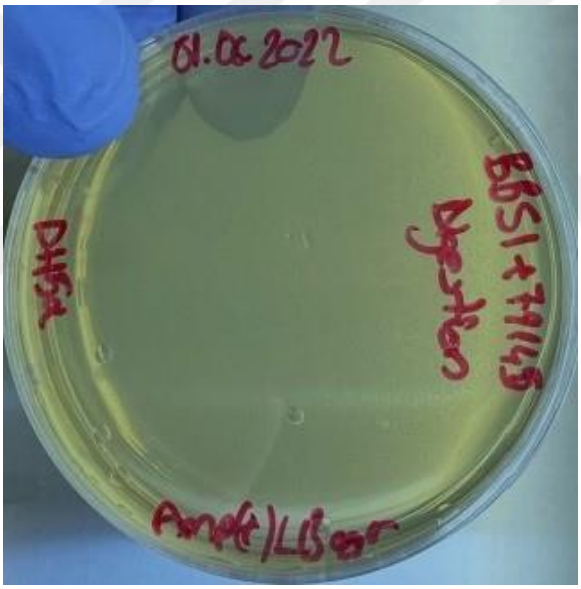
Sıcaklık	**Döngü**	**Zaman**
95 ^{0}C	1	5 dk
94 ^{0}C	35	30 sn
58,9 ^{0}C	35	40 sn
72 ^{0}C	35	20 sn
72 ^{0}C	1	3 dk
4 ^{0}C	1	∞

Hedef mutasyonu kapsayan DNA bölgesinin büyüklüğü yaklaşık 285 baz çiftidir (bç). PCR sonrası reaksiyon ürünleri, %1,5'luk agaroz jeline, 100 bç lik DNA Marker ve 6X yükleme boyası ile renklendirilerek yüklendi. 80V'da 60 dakika yürütüldükten sonra görüntüleme cihazında görüntülendi. Hedeflenen DNA parçalarının elde edildiği doğrulandıktan sonra, mutasyon bölgesinde düzeltmenin doğrulanması için sanger dizileme yapıldı (BM Labosis Biyoteknoloji, Ankara). Pikler şeklinde elde edilen dizi sonuçları Finch TV programı ile görüntülendi ve değerlendirildi.

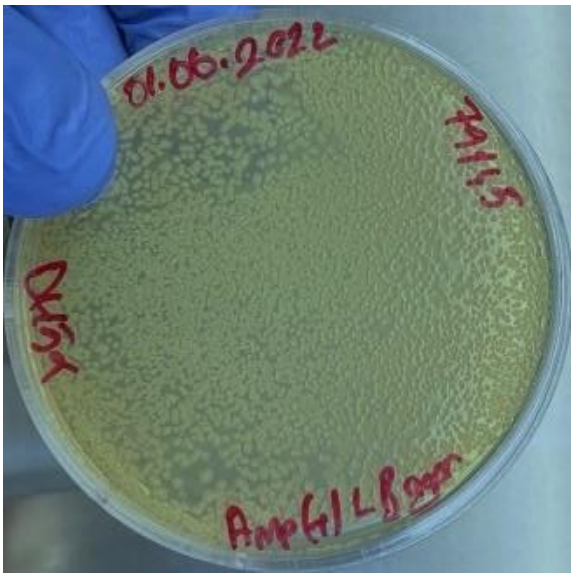
3. BULGULAR

3.1. Plazmid Kesimi ve Stabilizasyonu

Sirküler yapıda bulunan plazmid DNA'sını "gRNA scaffold" bölgesinden kesmek için BbsI restriksiyon enzimi kullanıldı ve kesim reaksiyonunu doğrulamak için kesilmiş plazmid ile sirküler yapıda bulunan plazmidi ayrı ayrı DH5α bakteri hücresine transformasyon işlemi uygulandı ve ampisilin içeren plaklara ekimi yapıldı, koloni oluşumu izlendi. 24 saatlik inkübasyon sonrasında, kesilmiş vektörün ekim yapıldığı besiyerinde herhangi bir koloni oluşumu gözlenmedi (Resim 3.1) Ampisilin direnç geninin aktif olduğu kesilmemiş vektörün ekim yapıldığı besiyerinde ise yoğun bir koloni oluşumu gözlendi (Resim 3.2). Koloni oluşumunun gözlenmesinin yanı sıra, %1 lik agaroz jel hazırlanarak kesim yapılmış ve yapılmamış vektörler jelde yürütülüp görüntülendi (Resim 3.3). Bu sonuçlar ile plazmid vektörünün kesimi doğrulandı.



Resim 3.1 Kesilmiş plazmidin, DH5α bakterilerine transformasyonu sonucunda koloni oluşumu gözlenmedi.



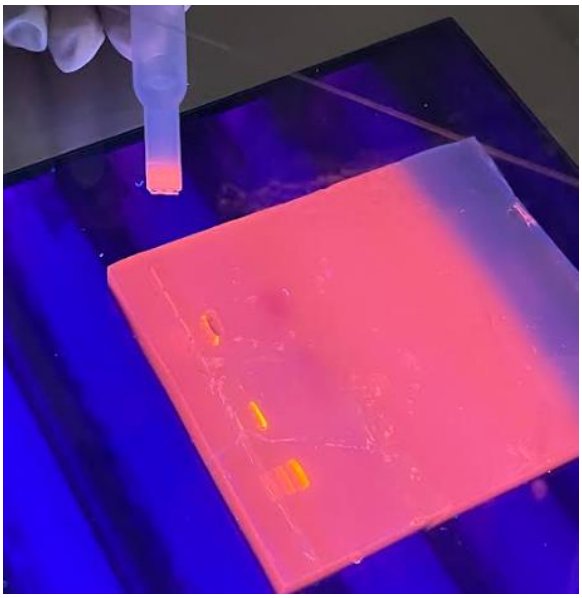
Resim 3.2 Sirküler plazmidin, DH5α bakterilerine transformasyonu sonucunda koloni oluşumu gözlemlendi.

3.2. Lineer Haline Getirilen Plazmid Vektörün Jelden İzolasyonu

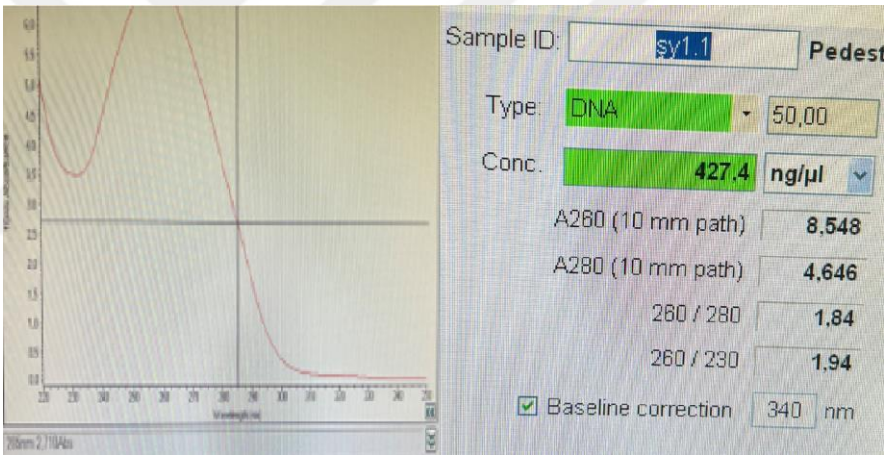
Linearize edildikten sonra agaroz jelde yürütülen vektör, kesimin doğrulanması sonucunda UV ışık altında jel ekstraktör kullanılarak jelden izole edildi (Resim 3.4). İzole edilen plazmid vektörün kalite ve konsatrasyon tayini nanodrop cihazı ile yapıldı (Resim 3.5).



Resim 3.3. Enzim kesim reaksiyonu sonrası jel elektroforez işleminden sonra görüntülenmesi. 3 numaralı kuyu ise herhangi bir kesim enzimi ile müdahale edilmemiş plazmid olarak gösterilmiştir. 5 ve 8 numaralı kuyular ise BbsI kesim reaksiyonu sonrası lineer formda bulunan plazmid olarak gösterilmiştir.



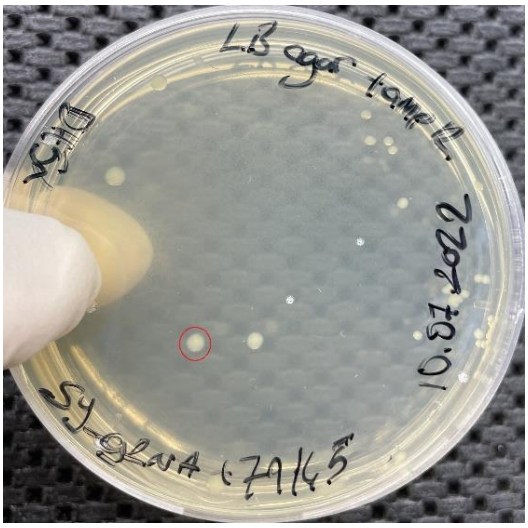
Resim 3.4. Linearize edildikten sonra agaroz jelde yürütülen vektörün, UV altında jelden alınması işlemi



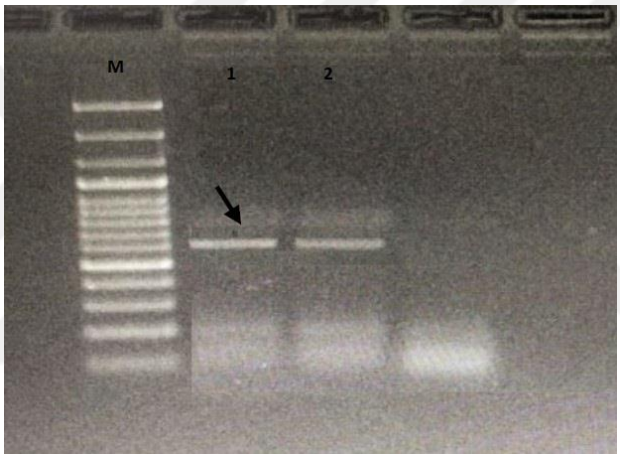
Resim 3.5. Vektör konsantrasyonlarının nanodrop ölçüm sonuçları.

3.3. Tasarlanan gRNA'nın Ligasyon İşleminin Kontrolü

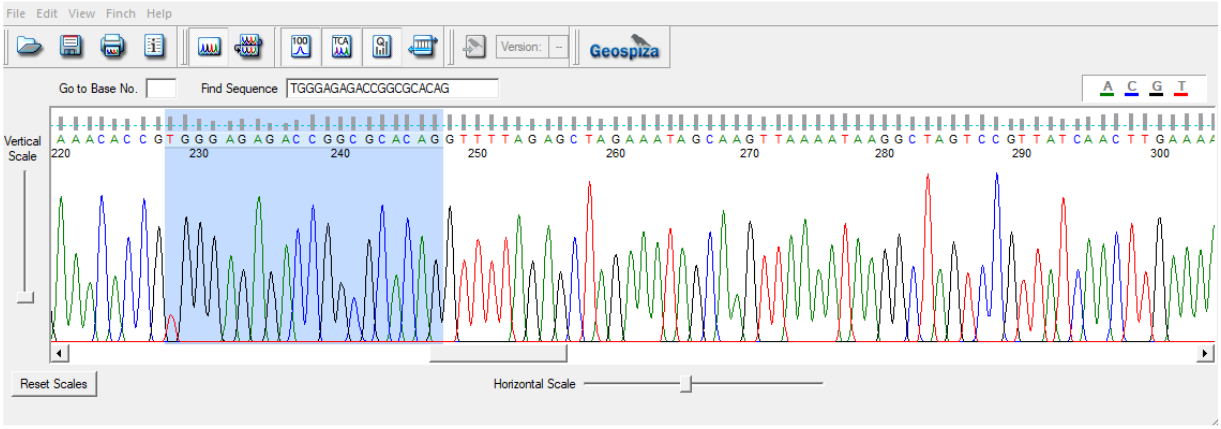
sgRNA'ların yüklendiği plazmidler, DH5α hücrelerine transforme edilerek koloni oluşumu izlendi (Resim 3.6). Koloni oluşumu gözlendikten sonra, konfirmasyon için rastgele seçilen kolonilerden vektör izolasyonu yapıldı. gRNA1'i içeren DNA bölgesi PCR ile çoğaltıldı. 624 bç büyüklüğündeki DNA parçası agaroz jelde yürütülerek ön değerlendirme yapıldı (Resim 3.7) ve PCR ürünleri ileri konfirmasyon için dizi analizine gönderildi. Dizi sonuçlarının görüntülenmesi ile yapılan değerlendirme ile gRNA1'in plazmid vektöre ligasyonu kesin olarak doğrulandı (Resim 3.8.).



Resim 3.6. Ligasyon ürünü, DH5α bakteri hücrelerine transforme edildi ve koloni oluşumu gözlendi.



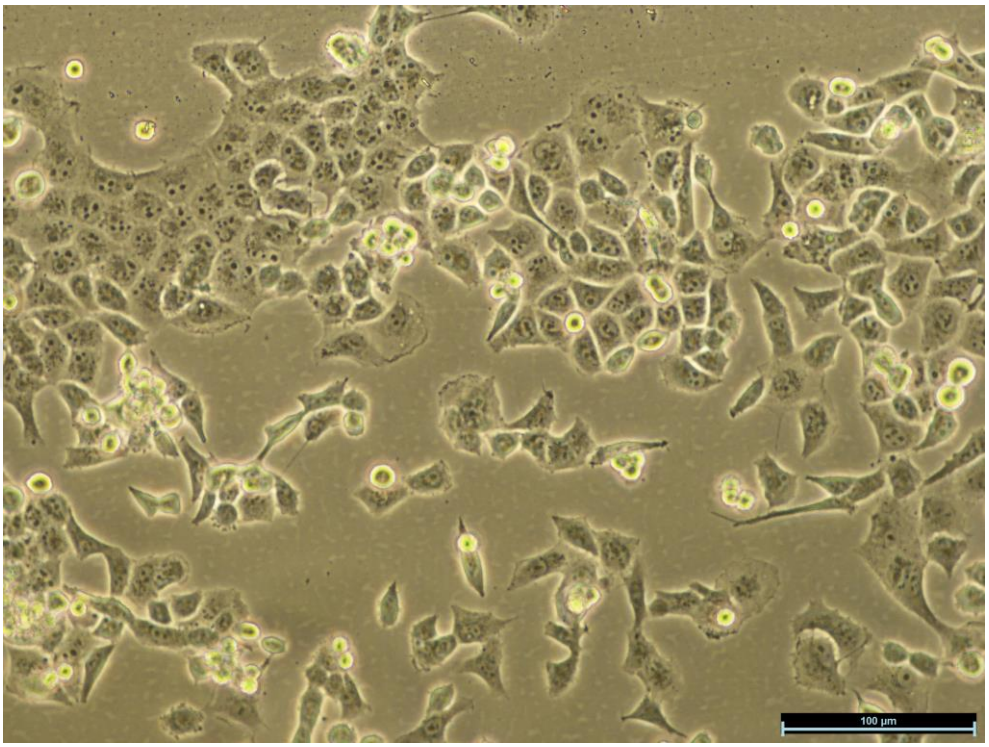
Resim 3.7. PCR sonrası ürünler jel elektroforezine yüklenerek yürütme işlemi gerçeklestirildi.



Resim 3.8. sgRNA vektöre ligasyonunun dizi analizi ile doğrulanması.

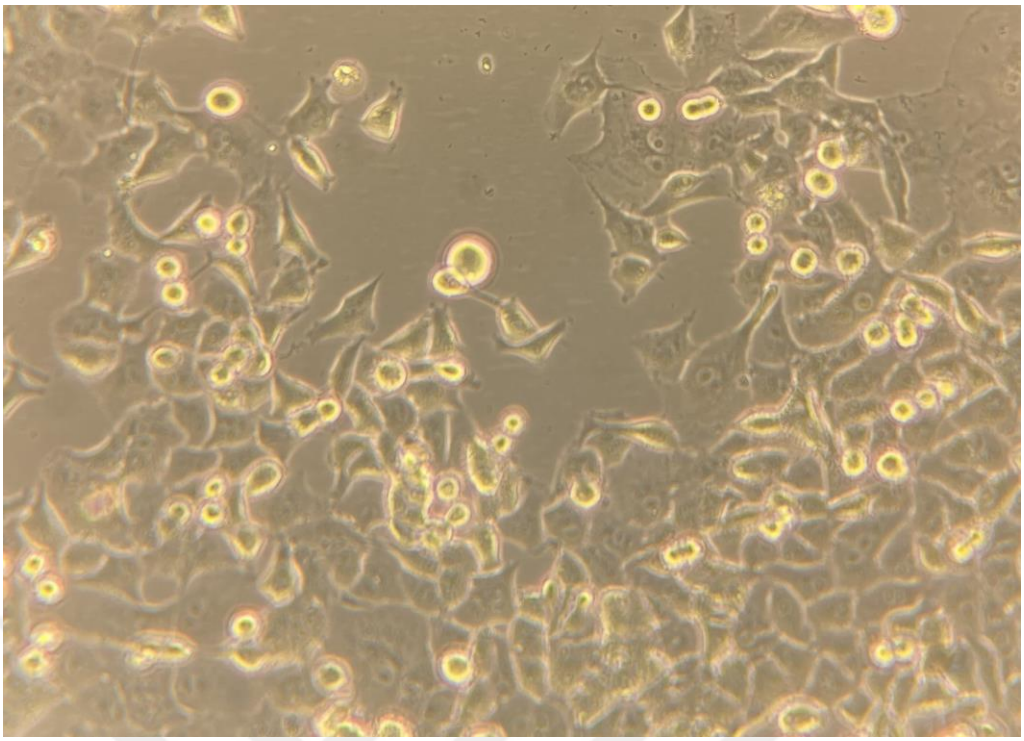
3.4. Hücre Kültürü

ATCC'den temin edilen PANC-1 hücre hattı %10 fetal sığır serumu (FBS), 100 IU/ ml penisilin ve 100 mg/ml streptomisin içeren DMEM besiyeri ortamında, 37 ˚C'de %5 CO_2'lik etüvde kültüre edildi. Kültür süresince mikroskop altında takip edilen PANC-1 kanser hücrelerinin morfolojik olarak normal bir şekilde çoğaldığı gözlendi (Resim 3.9).



Resim 3.9. PANC-1 hücre hattının invert mikroskop görüntüsü

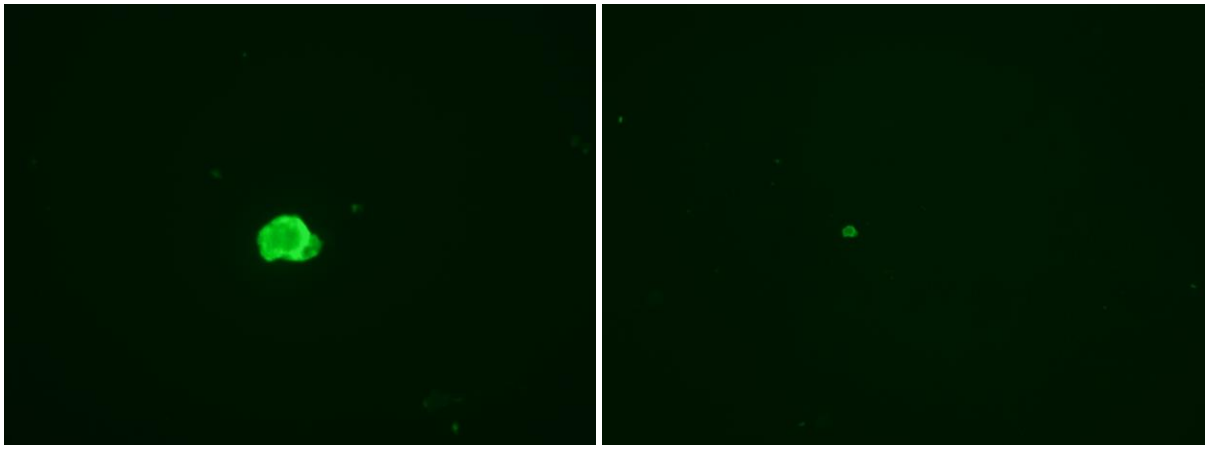
Normal morfolojide ve yeterli yoğunlukta olan hücrelere, R273H mutasyonunun düzeltilmesi için gerekli CRISPR yapılarını taşıyan plazmidlerin transfeksiyonu için elektroporasyon uygulandı. Elektroporasyon hızlı bir şekilde tekrar kültür ortamına alınan PANC-1 hücreleri işlemin hemen sonrası ve 24 saatlik inkübasyon sonrasında da mikroskop altında görüntülendi. Normal morfolojide ve sayıda yaşamaya devam ettikleri gözlendi (Resim 3.10).



Resim 3.10. Elektroporasyon sonrası PANC-1 hücre hattının invert mikroskop görüntüsü

3.5. Elektroporasyon Sonrası Hücrelerde Tranfeksiyonun Kontrolü için GFP+ Işımaların İncelenmesi

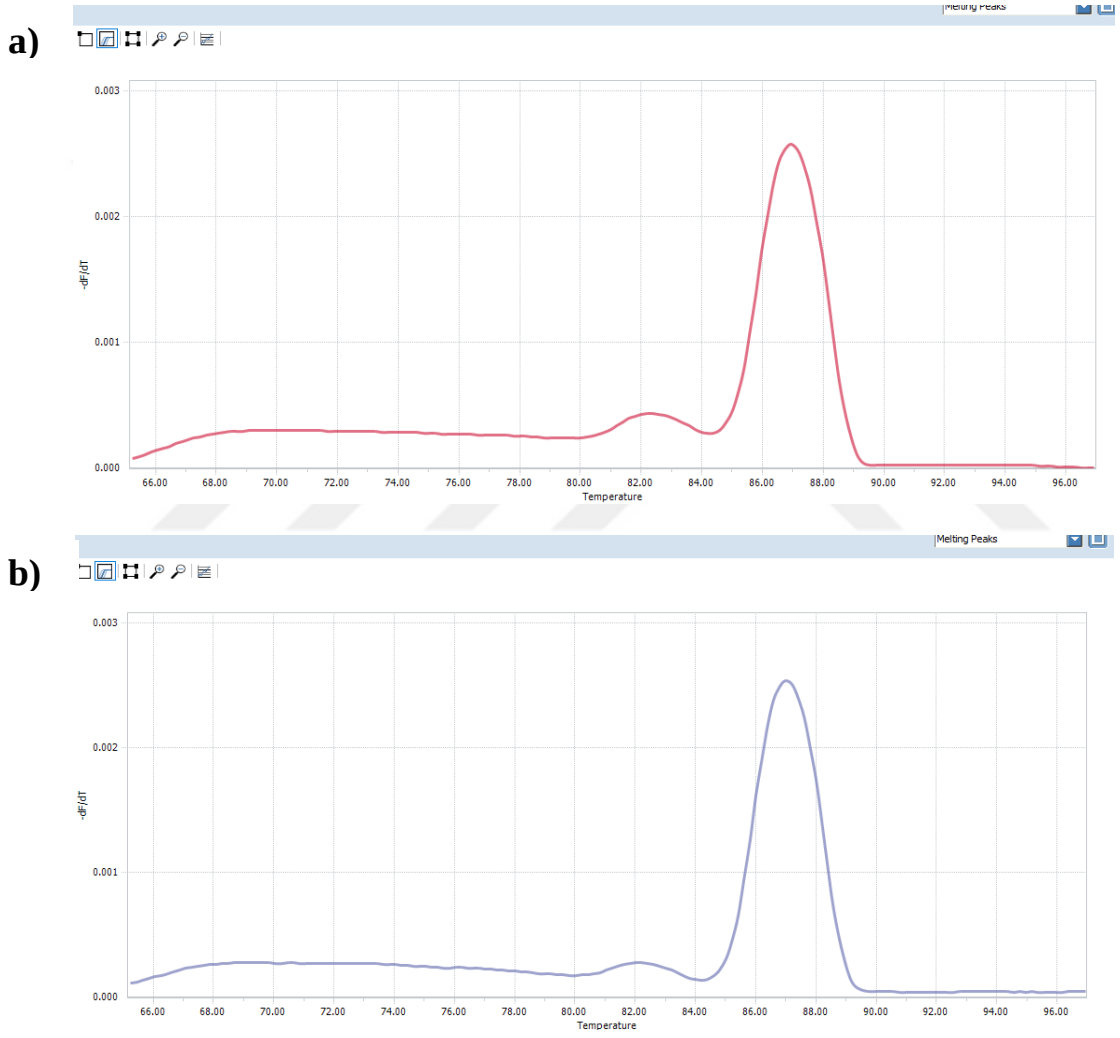
GFP geni bulunan plazmidler elektroporasyon işlemi ile PANC-1 hücre hattına transfekte edildikten sonra hücreler uygun besiyeri ile T25 hücre kültürü flasklarına ekildi ve 24 saat boyunca 37 ˚C'de %5 CO_2'lik etüvde inkübasyona bırakıldı. 24 saat inkübasyon sonrası Floresan mikroskop altında GFP+ ışımaları olan hücreler gözlemlendi (Resim 3.11). Elektroporasyon sonrasıgözlenen GFP+ hücreler CRISPR yapılarını taşıyan plazmitlerin PANC-1 hücrelerine başarılı bir şekilde aktarıldığını göstermektedir.



Resim 3.11. Hücrelerde GFP+ ışımasının floresan mikroskoptaki görüntüsü

3.6. Erime Eğrisi (Melting Curve) Analizi

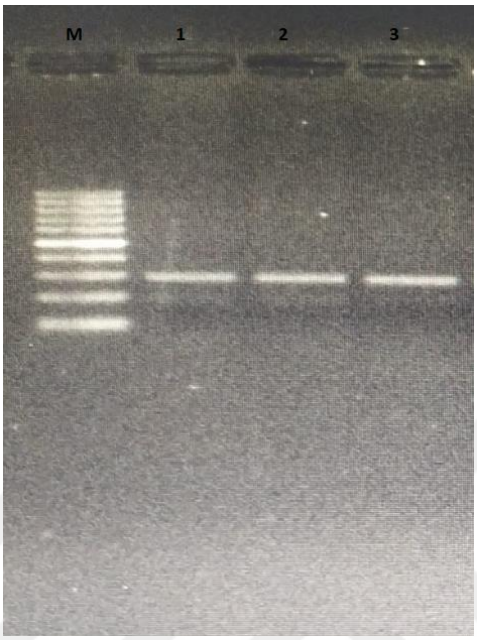
Dizayn edilen primerler kullanılarak Light Cycler96 (Roche) cihazı ile real-time PCR reaksiyonu kurulmuş ve reaksiyon koşullarına Melting Curve basamakları da eklenerek melting curve analizi de yapılmıştır. Melting curve analizi sonuçları değerlendirildiğinde; CRISPR/Cas9 tekniği uyguladığımız hücrelerde, düzeltmeyi hedeflediğimiz mutasyonun bulunduğu bölgede, erime piklerinin dalgalanmalarında herhangi bir değişiklik meydana gelmediği (Resim 3.12) ve CRISPR uygulanmamış hücrelerle karşılaştırıldığında mutasyonda gözlenebilir bir değişiklik olmadığı tespit edildi.



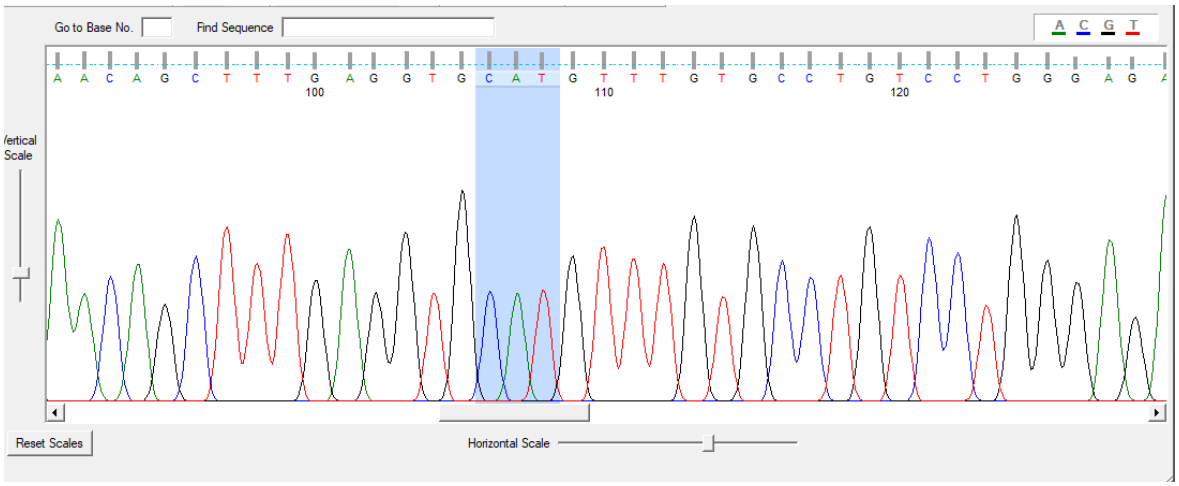
Resim 3.12. Melting curve analiz görüntüleri a) CRISPR uygulanmamış kontrol grubu sonucu görüntüsü b) CRISPR uygulaması yapılmış grup sonucu görüntüsü.

3.7. Düzeltme işleminin Doğrulanması için PCR/Dizi Analizi Sonuçları

PANC-1 hücrelerinden izolasyonu yapılan ve PCR ile çoğaltılan 285 bç büyüklüğündeki DNA bölgesi agaroz jelde yürütülerek ön değerlendirme yapıldı (Resim 3.11) ve PCR ürünleri ileri konfirmasyon için dizi analizine gönderildi (Resim 3.12).



Resim 3.13. PCR sonrası yapılan agaroz jel elektroforezi görüntüsü



Resim 3.14. Dizi analizi sonuçlarının görüntüsü

TP53 geninde meydana gelen R273H (CGT< CAT) değişimi PANC-1 kanser hücrelerinde homozigot (AA) olarak taşınmaktadır. Dizi analizi sonuçları değerlendirildiğinde mutasyonun olduğu bölgede düzeltmenin yapılamadığı tespit edildi (Resim 3.14).

4. TARTIŞMA

En ölümcül hastalıklardan biri olan kanser, insan yaşamı için büyük tehdit oluşturmaktadır. Şimdiye kadar kanser tedavisi için radyasyon tedavisi, kemoterapi veya cerrahi dahil olmak üzere birçok terapötik yöntem uygulandı fakat yüksek oranda nüksetme sıklığına engel olunamamıştır (Xu ve ark 2021). CRISPR olarak tanımlanan, bakterilerin ve arkelerin doğal adaptif bağışıklığı sayesinde, istenen genomu elde etmek için bir düzenlemeyi yeniden tasarlamanın yeni bir yolu keşfedildi ve daha da önemlisi, bu yeni tasarımın kanserli ve genetik hastalıklara karşı bir terapi olarak kullanılmasına olanak sağlandı (Carvalho ve Peixoto 2022).

Felzheng ve arkadaşları tarafından 2017 yılında Kolorektal kanser (CRC) üzerine yapılan çalışmada, C-X-C kemokin reseptörü tip 4'ün (CXCR-4) ve onun ligandı olan stromal hücre kaynaklı faktör-1'in (SDF-1), kanserin ilerlemesinde ve metastazında önemli bir rol oynadığını gösteren sonuçlar olduğunu açıkladı. Felzheng ve arkadaşları tarafından 2017 yılında yapılan bu çalışma, CRISPR/Cas9 tekniği kullanılarak CXCR4'ü devre dışı bıraktı ve bu delesyonun kolokteral kanser üzerinde meydana gelen değişimleri inceledi (ZHENG ve ark 2017). Bir başka çalışma olan Belvedere ve arkadaşları tarafından 2016 yılında yapılan çalışmada hücre içi ANXA1'in FPR (Formil Peptid Reseptör) yolundan bağımsız olarak pankreas kanseri hücre fenotipine, davranışına ve metastatik potansiyeline katkıda bulunduğu mekanizmaları araştırıldı. CRISPR/Cas9 knock-out (KO) tekniği sayesinde MIA PaCa-2 PC hücre hattında bu proteinin genomik bir delesyonu elde edildi. Daha sonra yapılan proteomik analizler sonucunda CRISPR/Cas9 nakavt edilen MIA PaCa-2 PC hücre hattında diğer kontrol MIA PaCa-2 hücrelerine göre daha hızlı yayıldığı fark edildi. Ayrıca ara filamentlerin (IF'ler) bir proteini olan “vimentin” ekspresyonunun azaldığını gösterdi (Belvedere ve ark 2016).

Bir kanser kök hücre belirteci olan CD133, kolon kanserinde hücre proliferasyonu ve invazyonunda önemli bir rol oynar. Yapılan bir çalışmada, CRISPR-Cas9 gen düzenleme teknolojisi kullanarak CD133 nakavt olan kolon kanseri hücreleri üretildi ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında CRISPR-Cas9 aracılı CD133 nakavt olan hücrelerde hücre çoğalmasında ve koloni oluşumunda önemli bir azalma olduğu gözlemlendi (Li ve ark 2019). Mitokondriyal GTPaz mitofusin-2'nin (MFN2) daha önce bir dizi hücre tipinde hücre proliferasyonu, apoptoz ve farklılaşmayı düzenlemede rol oynandığı bilinmektedir. Bu çalışmada meme kanseri üzerinde yapılan araştırmada düşük MFN2 ekspresyonuna sahip hastaların, yüksek MFN2 ekspresyonuna sahip hastalara kıyasla kötü prognozla ilişkili olduğu rapor edildi.

CRISPR-Cas9 tekniği ile MCF7 ve A549 hücre hatlarında oluşturulan MFN2 nakavtının, hücre canlılığını, koloni oluşumunu ve kanser hücrelerinin in vitro ve in vivo istilasını büyük ölçüde artırdığı bulunmuştur (Xu ve ark 2017). Pankreas kanseri, CRISPR/Cas9 aracılı ile yapılan başka bir çalışmada SUIT-2 ve Panc-1 hücre hatlarında oluşan c.35G>A KRAS mutasyonunu ortadan kaldırması amaçlanmıştır ve bu amaç doğrultusunda transfeksiyon, klonlama ve iki negatif kontrolden oluşan (5-7) klon oluşturulduktan sonra nakavtın doğrulanması için analizler yapıldı ve sonuç olarak CRISPR/Cas9 tarafından Kras G12D mutasyonunun ortadan kaldırılmasının mümkün olabildiğini belirtildi (Lentsch ve ark 2019). MIEN1 (Göç ve İstila Güçlendirici), aktin dinamikleri ve gen ekspresyonu yoluyla kanser hücrelerinin hareketliliğini kolaylaştıran bir onkogendir. Birçok tümör tipinde artan MIEN1 ekspresyonu, hastalığın ilerlemesine ve metastatik eğilimine yol açar. CRISPR/Cas9 tekniği kullanılarak MIEN1 geninde, meme kanseri hücrelerinde bu ekspresyonunun engellenmesine yol açan spesifik genomik silmeler etkili bir şekilde uygulandı. MIEN1 geninin bozulması, hücre morfolojisini, büyümesini, çoğalmasını veya hayatta kalmasını değiştirmedi, fakat gelecekteki çalışmaların MIEN1'in meme tümörü metastazında oynadığı kesin rolü belirlemesine olanak tanıyacak ve diğer kanserleri tedavi etmek için yeni terapötiklerin üretimini sağlayabilecektir (Van Treuren ve Vishwanatha 2018). Meme kanseri üzerinden yapılan başka bir çalışmada meme kanseri hücrelerinde artan HER2 (ERBB2) genini hedeflemek için CRISPR/Cas9 teknolojisi kullanıldı. HER2 iyi bilinen bir onkogendir ve monoklonal antikor Herceptin (trastuzumab) için ise terapötik hedeftir. CRISPR/Cas9 aracılı hedeflemesinin hücre proliferasyonunu ve tümörijenisiteyi inhibe ettiğini göstermiştir (Wang ve Sun 2017).

Glikoz taşıyıcı-1 (GLUT-1) ve hipoksi ile indüklenebilir faktör-1α (HIF-1α), hücre hipoksisinin yaygın belirteçleridir ve bunların yüksek düzeyde ekspresyonu, çeşitli kanser türlerinin biyolojik davranışlarıyla ilişkilendirilmiştir. Bu çalışmada CRISPR/Cas9 sisteminin kullanılarak Hep-2 hücre hattında HIF-1 α geninde çerçeve kayması, GLUT-1 geninde yanlış anlamlı mutasyonları indükleyerek çift gen nakavtı ile sonuçlandı ve Hep-2 hücrelerinin çoğalmasını, göçünü ve istilasını önemli ölçüde azalttığını bulundu (Lu ve ark 2019). MARCH ailesinin bir üyesi olan membranla ilişkili RING-CH proteini 2 (MARCH2), hücrede vezikül kaçakçılığı ve otofajinin düzenlenmesini sağlar. Kolon kanserindeki rolünü in vitro ve in vivo olarak araştırılmıştır. Bunun için CRISPR/Cas9 aracılı genom düzenlemesini kullanarak HCT116 hücre hattında *MARCH2* nakavt edilmiştir. *MARCH2*'nin devre dışı

bırakılması, hücre proliferasyonunu bastırmıştır ve otofajiyi, apoptozu ve G2/M fazı hücre döngüsü durmasını sağlamıştır (Xia ve ark 2017).

Tümör anjiyogenezi, yumurtalık kanserinin ilerlemesinde ve metastazında önemli bir rol oynar ve bu noktada EGFL6 proteini incelendiği takdirde, yumurtalık kanserinde yüksek oranda eksprese edildiği ve tümör anjiyogenezini desteklemede önemli bir rol oynadığı görülür. Yumurtalık kanseri SKOV3 hücre hattında yapılan bir çalışmada CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak EGFL6 geni devre dışı bırakılmıştır. EGFL6'nın devre dışı bırakılması sonucunda, SKOV3 hücre hatlarında proliferasyonunun, göçünün ve istilasının ve ayrıca tümör hücrelerinin apoptozunu belirgin şekilde inhibe edildiği ortaya çıkmıştır (Zhu ve ark 2020).

Gonzalez-Salinas ve arkadaşlarının 2020 yılında meme kanseri üzerinde yaptığı başka bir çalışmada, birçok genin mutasyona uğradığını ancak mutasyonların yalnızca küçük bir yüzdesinin kanser gelişimine katkıda bulunduğu belirtilmiştir. *FASN (Fatty Acid Synthase)* geninin önemi bu noktada anlaşılmıştır. Bu gende novo lipogenez ve ERa (Östrojen reseptörleri alfa) sinyalinin düzenlenmesinde yer alır ancak meme kanserinde FASN'yi etkileyen genetik mutasyonların etkisi tam olarak araştırılmamıştır. MCF-7 hücre hattında FASN lokusunu düzenlemek için CRISPR/Cas9 tekniği kullanılarak ve biyolojik etkisi araştırılmıştır. Bu çalışma doğrultusunda FASN'nin asil-transferaz alanında mutasyonlar ve çerçeve kaymaları taşıyan dört klon elde edilmiştir. Bu klonların çoğalmayı, göçü, canlılığı azalttığı ve hücre döngüsü profillerinde değişiklikler gösterdiği bulunmuştur. FASN'deki fonksiyonel nakavtların, meme kanseri hastalarında nokta mutasyonlarının aksine meme kanseri hücrelerinin çoğalmasını ve göçünü azaltmaya katkıda bulunduğu sonucuna varılmıştır (Paterni ve ark 2014, Gonzalez-Salinas ve ark 2020).

Fare modellerinde kanser genlerinin incelenmesi, genellikle, embriyonik kök hücrelerde transgenez veya gen hedefleme yoluyla yapılan genetik olarak tasarlanmış suşlara dayanmaktadır. Bu çalışmada, vahşi tip farelerde in vivo olarak CRISPR/Cas sistemini kullanan yeni bir kanser modeli oluşturma yöntemi çalışılmıştır. Tek başına ve kombinasyon halinde tümör baskılayıcı genler *Pten* ve *p53*'ü doğrudan hedefleyen, karaciğere Cas9 ve rehber RNA'ları (gRNA'lar) ifade eden bir CRISPR plazmid DNA'sı iletmek için hidrodinamik enjeksiyon yöntemi kullanılmıştır. CRISPR aracılı *Pten* mutasyonu, hepatositlerde yüksek Akt fosforilasyonuna ve lipid birikimine yol açmıştır. Karaciğer ve tümör dokusunun DNA dizilimi, tümörlerde hem *Pten* hem de *p53*'ün bialelik mutasyonları

dahil olmak üzere tümör baskılayıcı genlerin ekleme veya silme mutasyonlarını ortaya çıkardı. Ayrıca, β-katenin genini hedefleyen sgRNA'ları barındıran Cas9 plazmitlerinin ve aktive edici nokta mutasyonları taşıyan tek sarmallı bir DNA oligonükleotid donörünün birlikte enjeksiyonu, β-katenin'in nükleer lokalizasyonu ile hepatositlerin oluşumuna yol açmıştır. Bu çalışma, karaciğer kanseri modellerinin ve fonksiyonel genomiklerin hızlı gelişimi için yeni bir yol sunan CRISPR/Cas sistemini kullanarak karaciğerdeki tümör baskılayıcı genlerin ve onkogenlerin doğrudan mutasyonunun uygulanabilirliğini göstermiştir (Xue ve ark 2014). Batır ve arkadaşlarının prostat kanseri üzerinde yaptığı başka bir çalışmada, CRISPR/Cas9 tekniği, hücrelerin kendi homoloji yönlendirmeli onarım (HDR) mekanizması aracılığıyla ssODN ile kombinasyon halinde işlevsiz bir mutant TP53 geninin onarımı için kullanılmıştır. Bu çalışmada ise, ssODN'ler ile kombinasyon halinde insan prostat kanseri hücre hattı PC-3'ün TP53 geninde yer alan TP53 414delC sıfır mutasyonu üzerindeki CRISPR/Cas9 onarımını değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Yeni nesil dizileme sonuçlarına göre TP53 414delC mutasyonu, ssODN1 ve ssODN2 eşliğinde sgRNA2 kılavuzlu CRISPR/Cas9 ile TP53 414delC'da sırasıyla %19.95 ve %26.0 verimlilikle onarılmıştır (Batır ve ark 2019).

Çalışmamızda, TP53 geni R273H mutasyonu bakımından homozigot olduğu bilinen PANC-1 insan pankreas kanseri hücrelerinde, mutasyonun düzeltilmesi için sgRNA ve ssODN ler tasarlandı. Hedef mutasyona yönelik hazırlanan bu CRISPR yapıları, hücreye aktarımda kullandığımız pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid vektörüne başarılı bir şekilde klonlandı. CRISPR yapılarını taşıyan vektörün PANC-1 hücrelerine elektroporasyon yöntemi ile transfeksiyonu yapıldı. Elektroporasyon sonrasında gözlenen GFP+ pozitif hücreler, CRISPR araçlarının kanser hücrelerine başarılı bir şekilde aktarıldığını göstermektedir. Ancak melting curve ve dizi analizi sonuçları değerlendirildiğinde tüm adımlar başarılı bir şekilde geçilmesine rağmen mutasyon bölgesinde düzeltme yapılamadı. Ancak bu sonuç, çalışmamızda var olan bazı kısıtlamalar da dikkate alınarak değerlendirilmelidir. Elektroporasyon sonrasında kültüre edilen hücrelerde GFP+ hücrelerin gözlenmesi ancak bu hücrelerin GFP- olan hücrelerden seçici bir şekilde ayrıştırılamamış olması, düzeltme işleminin değerlendirilmesi için kullandığımız sanger dizilemenin, mutasyon düzeltmesinin olduğu olası bazı hücrelerin DNA larındaki bu değişimi ortaya koymada yetersiz kalması durumları çalışmamızdaki en önemli limitasyonlardır. Ayrıca çalışmamızda tek bir sgRNA ve ona uyumlu tek bir ssODN kullanılmış olması da bir diğer limitasyondur. Literatürde CRISPR/Cas9 tekniği ile yapılan genom düzenleme çalışmaları genel olarak

değerlendirildiğinde kullanılan vektör, transfeksiyon yöntemi, hücre seçilimi gibi yöntemlere de bağlı olarak değişken oranda düzeltme başarıları rapor edilmekte ve oranlar hala oldukça düşük seviyelerde gözlenmektedir. Çalışmamız için ifade edilen limitasyonların üstesinden gelinerek, çalışmanın tekrar edilmesi ve özellikle sonuçlarımızın daha açık ve net ortaya koyulmasının sağlanması ile hedef mutasyonun düzeltilmesinde başarılı sonuçlar alınabileceği düşünülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, PANC-1 pankreas kanseri hücrelerinde TP53 geninin 8. Ekzonunda meydana gelen R273H mutasyonunun CRISPR/Cas9 genom düzenleme aracı kullanarak düzeltilmesi amaçlandı. Bu çalışmada düzenlemenin ilk önemli adımı olarak, TP53 genindeki R273H mutasyonunu hedefleyen PANC-1 hücrelerine transfeksiyon için kullanıma hazır CRISPR/Cas9 araçları olan gRNA, klonlanmış plazmid vektörü ve bir ssODN oluşturuldu. Sorasında uygun şekilde kültüre edilen PANC-1 hücrelerine elektroporasyon tekniği kullanılarak plazmid vektör ve ssODN transfeksiyonu yapıldı. Elektroporasyon sonrası 24 saat kültüre edilen PANC-1 hücrelerinde transfekte edilen plazmidin eksprese ettiği GFP ışımalarının Floresan mikroskobunda görüntülenmesiyle transfeksiyon teyit edildi. GFP ışıması gözlenen PANC-1 hücrelerinde mutasyon bölgesinde düzeltmenin kontrolü için hücrelerden DNA izolasyonu yapılarak ilk önce Melting Curve Analizi daha sonra ise PCR/sanger dizi analizi yapıldı. Sonuçlarımıza göre, hedef mutasyonun düzeltilmesi için CRISPR yapılarının tasarlanması, plazmid vektöre klonlama ve bu yapıların Kanser hücreleribe transfeksiyon aşamalarındaki başarıya rağmen, mutasyonun düzeltilmesinde başarılı olunamadı.

Genomun gardiyanı namıyla da bilinen TP53 geninde (p53 proteini), görülen yaygın mutasyonlar pek çok kanser gelişiminde ve ilerlemesinde görülmektedir. Bunlardan, özellikle R273H (Arg273His) mutasyonunun Pankreatik duktal adenokarsinomada tümörigenezi başlatma potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir. Pek çok farklı hücresel süreçteki anormal işeyişin işe karıştığı kanserin gelişiminde, bu süreçlerin yönetiminden sorumlu olan genlerde meydana gelen mutasyonların düzeltilebilmesinin, kanserin gelişiminin engellenmesi ya da seyrinin yavaşlatılması ve tedavi edilmesinde çok büyük katkılarının olacağı şüphesizdir.

Bu çalışma sonrasında, flow sitometri ya da ökaryotik seçilimi sağlayabilecek vektörlerin kullanılması ile sadece transfekte edilmiş hücrelerin seçilmesi, DNA nın görüntülenmesinde CRISPR uygulamasının yapıldığı hücrelerden izole edilen replikonların daha ayrıntılı analiz edilmesini sağlayacak yeni nesil sekanslama (NGS) yöntemlerinin kullanılması, CRISPR yapılarının hücreye aktarılmasında elektroporasyon yanı sıra lipofektamin vb yöntemlerin kullanılması, daha fazla sayıda ve farklı sgRNA ve ssODN tasarımlarının kullanılması gibi farklı yaklaşımların kullanılması ile daha ileri çalışmaların yapılması hedeflenmektedir.

6. KAYNAKÇA

Abe K, Kitago M, Kitagawa Y, Hirasawa A, 2021. Hereditary pancreatic cancer. Int J Clin Oncol, 26, 10, 1784-92.

Abe T, Ichikawa K, Fujita R, Okada M, Tanaka K, Ohkubo M, Yonekura K, Shimomura T, Utsugi T, 2014. 373 AKT2 gene amplification is a marker for sensitivity to allosteric but not ATP-competitive AKT inhibitors. European Journal of Cancer, 50, 120.

Abrams SL, Lertpiriyapong K, Yang LV, Martelli AM, Cocco L, Ratti S, Falasca M, Murata RM, Rosalen PL, Lombardi P, Libra M, Candido S, Montalto G, Cervello M, Steelman LS, McCubrey JA, 2018. Introduction of WT-TP53 into pancreatic cancer cells alters sensitivity to chemotherapeutic drugs, targeted therapeutics and nutraceuticals. Advances in Biological Regulation, 69, 16-34.

Ain QU, Chung JY, Kim Y-H, 2015. Current and future delivery systems for engineered nucleases: ZFN, TALEN and RGEN. Journal of Controlled Release, 205, 120-7.

Bai L, Zhu W-G. p 53 : Structure , Function and Therapeutic Applications.

Bak RO, Gomez-Ospina N, Porteus MH, 2018. Gene Editing on Center Stage. Trends in Genetics, 34, 8, 600-11.

Barbieux C, Parnaud G, Lavallard V, Brioudes E, Meyer J, Alibashe Ahmed M, Berishvili E, Berney T, Bosco D, 2016. Asymmetrical distribution of δ and PP cells in human pancreatic islets. Journal of Endocrinology, 229, 2, 123-32.

Batır MB, Şahin E, Çam FS, 2019. Evaluation of the CRISPR/Cas9 directed mutant TP53 gene repairing effect in human prostate cancer cell line PC-3. Molecular Biology Reports, 46, 6, 6471-84.

Baugh EH, Ke H, Levine AJ, Bonneau RA, Chan CS, 2018. Why are there hotspot mutations in the TP53 gene in human cancers? Cell Death & Differentiation, 25, 1, 154-60.

Becker S, Boch J, 2021. TALE and TALEN genome editing technologies. Gene and Genome Editing, 2, 100007.

Belvedere R, Bizzarro V, Forte G, Dal Piaz F, Parente L, Petrella A, 2016. Annexin A1 contributes to pancreatic cancer cell phenotype, behaviour and metastatic potential independently of Formyl Peptide Receptor pathway. Scientific Reports, 6, 1, 29660.

Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD, 2005. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. Microbiology, 151, 8, 2551-61.

Bose B, Majumder S, Khan AU, 2014. Solid pseudopapillary tumour of pancreas. Mymensingh Med J, 23, 2, 392-4.

Brereton MF, Vergari E, Zhang Q, Clark A, 2015. Alpha-, Delta- and PP-cells: Are They the Architectural Cornerstones of Islet Structure and Co-ordination? J Histochem Cytochem, 63, 8, 575-91.

Cai J, Chen H, Lu M, Zhang Y, Lu B, You L, Zhang T, Dai M, Zhao Y, 2021. Advances in the epidemiology of pancreatic cancer: Trends, risk factors, screening, and prognosis. Cancer Letters, 520, 1-11.

Carvalho J, Peixoto M, 2022. CT-205 CRISPR/Cas9 System: Use of Genetic Engineering in Healing Cancer and Other Genetic Diseases. Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia, 22, S438-S9.

Chang HHY, Pannunzio NR, Adachi N, Lieber MR, 2017. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. Nat Rev Mol Cell Biol, 18, 8, 495-506.

Chaudhary P, 2015. Acinar Cell Carcinoma of the Pancreas: A Literature Review and Update. Indian Journal of Surgery, 77, 3, 226-31.

Chou ST, Leng Q, Mixson AJ, 2012. Zinc Finger Nucleases: Tailor-made for Gene Therapy. Drugs Future, 37, 3, 183-96.

Cicenas J, Kvederaviciute K, Meskinyte I, Meskinyte-Kausiliene E, Skeberdyte A, Cicenas J, 2017. KRAS, TP53, CDKN2A, SMAD4, BRCA1, and BRCA2 Mutations in Pancreatic Cancer. Cancers, 9, 5, 42.

Cowan RW, Maitra A, 2014. Genetic Progression of Pancreatic Cancer. The Cancer Journal, 20, 1, 80-4.

Dal Buono A, Gaiani F, Poliani L, Correale C, Laghi L, 2021. Defects in MMR Genes as a Seminal Example of Personalized Medicine: From Diagnosis to Therapy. J Pers Med, 11, 12.
Davis AJ, Chen DJ, 2013. DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. Transl Cancer Res, 2, 3, 130-43.
de Wilde RF, Edil BH, Hruban RH, Maitra A, 2012. Well-differentiated pancreatic neuroendocrine tumors: from genetics to therapy. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 9, 4, 199-208.
Del Valle J, Rofes P, Moreno-Cabrera JM, López-Dóriga A, Belhadj S, Vargas-Parra G, Teulé À, Cuesta R, Muñoz X, Campos O, Salinas M, de Cid R, Brunet J, González S, Capellá G, Pineda M, Feliubadaló L, Lázaro C, 2020. Exploring the Role of Mutations in Fanconi Anemia Genes in Hereditary Cancer Patients. Cancers (Basel), 12, 4.
Dominguez Gutierrez G, Kim J, Lee AH, Tong J, Niu J, Gray SM, Wei Y, Ding Y, Ni M, Adler C, Murphy AJ, Gromada J, Xin Y, 2018. Gene Signature of the Human Pancreatic ε Cell. Endocrinology, 159, 12, 4023-32.
Donehower LA, Soussi T, Korkut A, Liu Y, Schultz A, Cardenas M, Li X, Babur O, Hsu TK, Lichtarge O, Weinstein JN, Akbani R, Wheeler DA, 2019. Integrated Analysis of TP53 Gene and Pathway Alterations in The Cancer Genome Atlas. Cell Rep, 28, 5, 1370-84.e5.
Dong J-Y, Fan P-D, Frizzell RA, 1996. Quantitative Analysis of the Packaging Capacity of Recombinant Adeno-Associated Virus. Human Gene Therapy, 7, 17, 2101-12.
Du Y-X, Liu Z-W, You L, Wu W-M, Zhao Y-P, 2016. Advances in understanding the molecular mechanism of pancreatic cancer metastasis. Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International, 15, 4, 361-70.
Duffy MJ, Synnott NC, Crown J, 2017. Mutant p53 as a target for cancer treatment. Eur J Cancer, 83, 258-65.
Ellenbroek BA, Karl T, 2016. Chapter 18 - Genetic Rat Models for Schizophrenia. In: Handbook of Behavioral Neuroscience. Eds: Pletnikov MV, Waddington JL: Elsevier, p. 303-24.
Fan G, Lou L, Song Z, Zhang X, Xiong X-F, 2021. Targeting mutated GTPase KRAS in tumor therapies. European Journal of Medicinal Chemistry, 226, 113816.
Freedman ML, Nierodzik MLR, 2007. Cancer and Age. In: Encyclopedia of Gerontology (Second Edition). Eds: Birren JE. New York: Elsevier, p. 191-212.
Gao R, Yang T, Zhang Q, 2021. δ-Cells: The Neighborhood Watch in the Islet Community. Biology, 10, 2, 74.
Gayther SA, Ponder BA, 1997. Mutations of the BRCA1 and BRCA2 genes and the possibilities for predictive testing. Mol Med Today, 3, 4, 168-74.
Gonzalez-Salinas F, Rojo R, Martinez-Amador C, Herrera-Gamboa J, Trevino V, 2020. Transcriptomic and cellular analyses of CRISPR/Cas9-mediated edition of FASN show inhibition of aggressive characteristics in breast cancer cells. Biochem Biophys Res Commun, 529, 2, 321-7.
Gorbunova V, Seluanov A, Mao Z, Hine C, 2007. Changes in DNA repair during aging. Nucleic Acids Research, 35, 22, 7466-74.
Gupta A, Shah K, Oza MJ, Behl T, 2019. Reactivation of p53 gene by MDM2 inhibitors: A novel therapy for cancer treatment. Biomedicine & Pharmacotherapy, 109, 484-92.
Hamilton JR, Tsuchida CA, Nguyen DN, Shy BR, McGarrigle ER, Sandoval Espinoza CR, Carr D, Blaeschke F, Marson A, Doudna JA, 2021. Targeted delivery of CRISPR-Cas9 and transgenes enables complex immune cell engineering. Cell Reports, 35, 9, 109207.
Hani U, Osmani RAM, Siddiqua A, Wahab S, Batool S, Ather H, Sheraba N, Alqahtani A, 2021. A systematic study of novel drug delivery mechanisms and treatment strategies for pancreatic cancer. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 63, 102539.
Heestand GM, Kurzrock R, 2015. Molecular landscape of pancreatic cancer: implications for current clinical trials. Oncotarget, 6, 7, 4553-61.
Hirakawa MP, Krishnakumar R, Timlin JA, Carney JP, Butler KS, 2020. Gene editing and CRISPR in the clinic: current and future perspectives. Biosci Rep, 40, 4.
Hruban RH, Maitra A, Schulick R, Laheru D, Herman J, Kern SE, Goggins M, 2008. Emerging molecular biology of pancreatic cancer. Gastrointest Cancer Res, 2, 4 Suppl, S10-5.

Hsu Patrick D, Lander Eric S, Zhang F, 2014. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. Cell, 157, 6, 1262-78.
Huang X, Zhang G, Liang T, 2022. Subtyping for pancreatic cancer precision therapy. Trends in Pharmacological Sciences, 43, 6, 482-94.
Huo Z, Tu J, Lee D-F, Zhao R, 2020. Engineering Mutation Clones in Mammalian Cells with CRISPR/Cas9. In: Immune Mediators in Cancer: Methods and Protocols. Eds: Vancurova I, Zhu Y. New York, NY: Springer US, p. 355-69.
Hussain MRM, Baig M, Mohamoud HSA, Ulhaq Z, Hoessli DC, Khogeer GS, Al-Sayed RR, Al-Aama JY, 2015. BRAF gene: From human cancers to developmental syndromes. Saudi Journal of Biological Sciences, 22, 4, 359-73.
Inaguma S, Riku M, Hashimoto M, Murakami H, Saga S, Ikeda H, Kasai K, 2013. GLI1 Interferes with the DNA Mismatch Repair System in Pancreatic Cancer through BHLHE41-Mediated Suppression of MLH1. Cancer Research, 73, 24, 7313-23.
Iyama T, Wilson DM, 2013. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. DNA Repair, 12, 8, 620-36.
Jahedi H, Fahud AL, Lim CL, 2019. Role of p53 family isoforms in enhancing aggressiveness and chemoresistance in pancreatic cancer (Review). World Acad Sci J, 1, 5, 236-46.
Jiang C, Meng L, Yang B, Luo X, 2020. Application of CRISPR/Cas9 gene editing technique in the study of cancer treatment. Clinical Genetics, 97, 1, 73-88.
Kamisawa T, Wood LD, Itoi T, Takaori K, 2016. Pancreatic cancer. Lancet, 388, 10039, 73-85.
Karpińska M, Czauderna M, 2022. Pancreas—Its Functions, Disorders, and Physiological Impact on the Mammals' Organism. Frontiers in Physiology, 13.
Khan AA, Liu X, Yan X, Tahir M, Ali S, Huang H, 2021. An overview of genetic mutations and epigenetic signatures in the course of pancreatic cancer progression. Cancer and Metastasis Reviews, 40, 1, 245-72.
Kim D, Le QV, Wu Y, Park J, Oh YK, 2020. Nanovesicle-Mediated Delivery Systems for CRISPR/Cas Genome Editing. Pharmaceutics, 12, 12.
Kleeff J, Korc M, Apte M, La Vecchia C, Johnson CD, Biankin AV, Neale RE, Tempero M, Tuveson DA, Hruban RH, Neoptolemos JP, 2016. Pancreatic cancer. Nature Reviews Disease Primers, 2, 1, 16022.
Klein AP, 2021. Pancreatic cancer epidemiology: understanding the role of lifestyle and inherited risk factors. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 18, 7, 493-502.
Kulkarni RN, 2004. The islet β-cell. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 36, 3, 365-71.
Lentsch E, Li L, Pfeffer S, Ekici AB, Taher L, Pilarsky C, Grützmann R, 2019. CRISPR/Cas9-Mediated Knock-Out of Kras(G12D) Mutated Pancreatic Cancer Cell Lines. Int J Mol Sci, 20, 22.
Leung PS, 2010. Overview of the Pancreas. In: The Renin-Angiotensin System: Current Research Progress in The Pancreas: The RAS in the Pancreas. Eds. Dordrecht: Springer Netherlands, p. 3-12.
Li D, 2012. Diabetes and pancreatic cancer. Molecular carcinogenesis, 51, 1, 64-74.
Li D, Xie K, Wolff R, Abbruzzese JL, 2004. Pancreatic cancer. The Lancet, 363, 9414, 1049-57.
Li J, Peng C, Fan X, Wang L, Wang J, 2021. Adult pancreatoblastoma: a case report. J Int Med Res, 49, 8, 3000605211039565.
Li J, Yang L, Gaur S, Zhang K, Wu X, Yuan Y-C, Li H, Hu S, Weng Y, Yen Y, 2014. Mutants TP53 p.R273H and p.R273C but not p.R273G Enhance Cancer Cell Malignancy. Human Mutation, 35, 5, 575-84.
Li W, Cho MY, Lee S, Jang M, Park J, Park R, 2019. CRISPR-Cas9 mediated CD133 knockout inhibits colon cancer invasion through reduced epithelial-mesenchymal transition. PLoS One, 14, 8, e0220860.
Liang Y, Iqbal Z, Wang J, Xu L, Xu X, Ouyang K, Zhang H, Lu J, Duan L, Xia J, 2022. Cell-derived extracellular vesicles for CRISPR/Cas9 delivery: engineering strategies for cargo packaging and loading. Biomaterials Science, 10, 15, 4095-106.

Lino CA, Harper JC, Carney JP, Timlin JA, 2018. Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. Drug Deliv, 25, 1, 1234-57.
Liu MC, Gelmann EP, 2002. P53 gene mutations: Case study of a clinical marker for solid tumors. Seminars in Oncology, 29, 3, 246-57.
Lowenfels AB, Maisonneuve P, 2005. Risk factors for pancreatic cancer. Journal of cellular biochemistry, 95, 4, 649-56.
Lu ZJ, Yu Q, Zhou SH, Fan J, Shen LF, Bao YY, Wu TT, Zhou ML, Huang YP, 2019. Construction of a GLUT-1 and HIF-1α gene knockout cell model in HEp-2 cells using the CRISPR/Cas9 technique. Cancer Manag Res, 11, 2087-96.
Ma Y, Zhang L, Huang X, 2014. Genome modification by CRISPR/Cas9. The FEBS Journal, 281, 23, 5186-93.
Maitra A, Kern SE, Hruban RH, 2006. Molecular pathogenesis of pancreatic cancer. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, 20, 2, 211-26.
Mali P, Esvelt KM, Church GM, 2013. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. Nature Methods, 10, 10, 957-63.
Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM, 2013. RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. Science, 339, 6121, 823-6.
Mao Y, Tao M, Jia X, Xu H, Chen K, Tang H, Li D, 2015. Effect of Diabetes Mellitus on Survival in Patients with Pancreatic Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. Scientific Reports, 5, 1, 17102.
McCarthy DM, Hruban RH, Argani P, Howe JR, Conlon KC, Brennan MF, Zahurak M, Wilentz RE, Cameron JL, Yeo CJ, Kern SE, Klimstra DS, 2003. Role of the DPC4 Tumor Suppressor Gene in Adenocarcinoma of the Ampulla of Vater: Analysis of 140 Cases. Modern Pathology, 16, 3, 272-8.
McGuigan A, Kelly P, Turkington RC, Jones C, Coleman HG, McCain RS, 2018. Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. World J Gastroenterol, 24, 43, 4846-61.
McVey M, Lee SE, 2008. MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. Trends in Genetics, 24, 11, 529-38.
Memi F, Ntokou A, Papangeli I, 2018. CRISPR/Cas9 gene-editing: Research technologies, clinical applications and ethical considerations. Seminars in Perinatology, 42, 8, 487-500.
Midha S, Chawla S, Garg PK, 2016. Modifiable and non-modifiable risk factors for pancreatic cancer: A review. Cancer Letters, 381, 1, 269-77.
Mirgayazova R, Khadiullina R, Chasov V, Mingaleeva R, Miftakhova R, Rizvanov A, Bulatov E, 2020. Therapeutic Editing of the TP53 Gene: Is CRISPR/Cas9 an Option? Genes, 11, 6, 704.
Mitra S, Sarker J, Mojumder A, Shibbir TB, Das R, Emran TB, Tallei TE, Nainu F, Alshahrani AM, Chidambaram K, Simal-Gandara J, 2022. Genome editing and cancer: How far has research moved forward on CRISPR/Cas9? Biomedicine & Pharmacotherapy, 150, 113011.
Miyaki M, Kuroki T, 2003. Role of Smad4 (DPC4) inactivation in human cancer. Biochemical and Biophysical Research Communications, 306, 4, 799-804.
Mohammed S, Van Buren G, 2nd, Fisher WE, 2014. Pancreatic cancer: advances in treatment. World J Gastroenterol, 20, 28, 9354-60.
Mojica FJM, Díez-Villaseñor Cs, García-Martínez J, Soria E, 2005. Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. Journal of Molecular Evolution, 60, 2, 174-82.
Murhekar K, Ramakrishnan A, Ramani B, Sunil B, Majhi U, 2013. Solid pseudo-papillary tumor of pancreas: A rare case report and review of Indian literature. Journal of Cancer Research and Therapeutics, 9, 3, 507-10.
Omiyale AO, 2021. Adult pancreatoblastoma: Current concepts in pathology. World J Gastroenterol, 27, 26, 4172-81.

Osei-Bordom DC, Serifis N, Brown ZJ, Hewitt DB, Lawal G, Sachdeva G, Cloonan DJ, Pawlik TM, 2022. Pancreatic ductal adenocarcinoma: Emerging therapeutic strategies. Surgical Oncology, 43, 101803.
Pan S, Zhang H, 2021. Discovery in CRISPR-Cas9 system. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 46, 12, 1392-402.
Panchal K, Sahoo RK, Gupta U, Chaurasiya A, 2021. Role of targeted immunotherapy for pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) treatment: An overview. International Immunopharmacology, 95, 107508.
Pang Q, Christianson TA, Keeble W, Diaz J, Faulkner GR, Reifsteck C, Olson S, Bagby GC, 2001. The Fanconi anemia complementation group C gene product: structural evidence of multifunctionality. Blood, 98, 5, 1392-401.
Pardo B, Gómez-González B, Aguilera A, 2009. DNA Repair in Mammalian Cells. Cellular and Molecular Life Sciences, 66, 6, 1039-56.
Paterni I, Granchi C, Katzenellenbogen JA, Minutolo F, 2014. Estrogen receptors alpha (ERα) and beta (ERβ): subtype-selective ligands and clinical potential. Steroids, 90, 13-29.
Pea A, Hruban RH, Wood LD, 2015. Genetics of pancreatic neuroendocrine tumors: implications for the clinic. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 9, 11, 1407-19.
Peng R, Lin G, Li J, 2016. Potential pitfalls of CRISPR/Cas9-mediated genome editing. The FEBS Journal, 283, 7, 1218-31.
Petersen B, Niemann H, 2015. Advances in genetic modification of farm animals using zinc-finger nucleases (ZFN). Chromosome Research, 23, 1, 7-15.
Rawla P, Sunkara T, Gaduputi V, 2019. Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. World J Oncol, 10, 1, 10-27.
Rawla P, Sunkara T, Gaduputi V, 2019. Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. World J Oncol, 10, 1, 10-27.
Reggiani G, Affinita MC, Dall'Igna P, Virgone C, Sorbara S, Bisogno G, 2021. Treatment Strategies for Children With Relapsed Pancreatoblastoma: A Literature Review. Journal of Pediatric Hematology/Oncology, 43, 8, 288-93.
Rémy S, Tesson L, Ménoret S, Usal C, Scharenberg AM, Anegon I, 2010. Zinc-finger nucleases: a powerful tool for genetic engineering of animals. Transgenic Research, 19, 3, 363-71.
Sakata N, Yoshimatsu G, Kodama S, 2019. Development and Characteristics of Pancreatic Epsilon Cells. Int J Mol Sci, 20, 8.
Shailani A, Kaur RP, Munshi A, 2018. A comprehensive analysis of BRCA2 gene: focus on mechanistic aspects of its functions, spectrum of deleterious mutations, and therapeutic strategies targeting BRCA2-deficient tumors. Medical Oncology, 35, 3, 18.
Shamshirgaran Y, Liu J, Sumer H, Verma PJ, Taheri-Ghahfarokhi A, 2022. Tools for Efficient Genome Editing; ZFN, TALEN, and CRISPR. Methods Mol Biol, 2495, 29-46.
SHEK AP, SWITHA VD, CHILLARA CS, AKT2 GENE POLYMORPHISMS IN INDIAN WOMEN WITH POLYCYSTIC OVAR-IAN DISEASE (PCOD).
Sipos B, Klöppel G, 2005. Azinuszellkarzinome und Pankreatoblastome. Der Pathologe, 26, 1, 37-40.
Sivapalan L, Kocher HM, Ross-Adams H, Chelala C, 2022. The molecular landscape of pancreatic ductal adenocarcinoma. Pancreatology, 22, 7, 925-36.
Solanki A, Kumar Selvaa C, Sheth F, Radhakrishnan N, Kalra M, Vundinti BR, 2017. Characterization of two novel FANCG mutations in Indian Fanconi anemia patients. Leukemia Research, 53, 50-6.
Suda T, Liu D, 2007. Hydrodynamic Gene Delivery: Its Principles and Applications. Molecular Therapy, 15, 12, 2063-9.
Sun C, España S, Buges C, Layos L, Hierro C, Manzano JL, 2022. Treatment of Advanced BRAF-Mutated Colorectal Cancer: Where We Are and Where We Are Going. Clinical Colorectal Cancer, 21, 2, 71-9.
Takai E, Yachida S, 2015. Genomic alterations in pancreatic cancer and their relevance to therapy. World J Gastrointest Oncol, 7, 10, 250-8.

Toh M, Ngeow J, 2021. Homologous Recombination Deficiency: Cancer Predispositions and Treatment Implications. Oncologist, 26, 9, e1526-e37.
Van Treuren T, Vishwanatha JK, 2018. CRISPR deletion of MIEN1 in breast cancer cells. PLoS One, 13, 10, e0204976.
Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M, 2011. Pancreatic cancer. The Lancet, 378, 9791, 607-20.
Voutsadakis IA, 2021. Mutations of p53 associated with pancreatic cancer and therapeutic implications. Ann Hepatobiliary Pancreat Surg, 25, 3, 315-27.
Wang H, Sun W, 2017. CRISPR-mediated targeting of HER2 inhibits cell proliferation through a dominant negative mutation. Cancer Letters, 385, 137-43.
Wendt A, Eliasson L, 2020. Pancreatic α-cells - The unsung heroes in islet function. Semin Cell Dev Biol, 103, 41-50.
Wilbie D, Walther J, Mastrobattista E, 2019. Delivery Aspects of CRISPR/Cas for in Vivo Genome Editing. Acc Chem Res, 52, 6, 1555-64.
Wright David A, Li T, Yang B, Spalding Martin H, 2014. TALEN-mediated genome editing: prospects and perspectives. Biochemical Journal, 462, 1, 15-24.
Wu X, Ma W, Mei C, Chen X, Yao Y, Liu Y, Qin X, Yuan Y, 2020. Description of CRISPR/Cas9 development and its prospect in hepatocellular carcinoma treatment. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 39, 1, 97.
Xia D, Ji W, Xu C, Lin X, Wang X, Xia Y, Lv P, Song Q, Ma D, Chen Y, 2017. Knockout of MARCH2 inhibits the growth of HCT116 colon cancer cells by inducing endoplasmic reticulum stress. Cell Death & Disease, 8, 7, e2957-e.
Xing-Mao Z, Hong-Juan Z, Qing L, Qiang H, 2018. Pancreatic acinar cell carcinoma-case report and literature review. BMC Cancer, 18, 1, 1083.
Xu K, Chen G, Li X, Wu X, Chang Z, Xu J, Zhu Y, Yin P, Liang X, Dong L, 2017. MFN2 suppresses cancer progression through inhibition of mTORC2/Akt signaling. Scientific Reports, 7, 1, 41718.
Xu X, Liu C, Wang Y, Koivisto O, Zhou J, Shu Y, Zhang H, 2021. Nanotechnology-based delivery of CRISPR/Cas9 for cancer treatment. Advanced Drug Delivery Reviews, 176, 113891.
Xue W, Chen S, Yin H, Tammela T, Papagiannakopoulos T, Joshi NS, Cai W, Yang G, Bronson R, Crowley DG, Zhang F, Anderson DG, Sharp PA, Jacks T, 2014. CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver. Nature, 514, 7522, 380-4.
Yang H, Bailey P, Pilarsky C, 2019. CRISPR Cas9 in Pancreatic Cancer Research. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 7.
Yu M, Liu X, Cheng H, Kuang L, Zhang S, Yan X, 2021. Latest progress in the study of nanoparticle-based delivery of the CRISPR/Cas9 system. Methods, 194, 48-55.
Zhao B, Rothenberg E, Ramsden DA, Lieber MR, 2020. The molecular basis and disease relevance of non-homologous DNA end joining. Nat Rev Mol Cell Biol, 21, 12, 765-81.
Zhao Z, Liu W, 2020. Pancreatic Cancer: A Review of Risk Factors, Diagnosis, and Treatment. Technol Cancer Res Treat, 19, 1533033820962117.
ZHENG F, ZHANG Z, FLAMINI V, JIANG WG, CUI Y, 2017. The Axis of CXCR4/SDF-1 Plays a Role in Colon Cancer Cell Adhesion Through Regulation of the AKT and IGF1R Signalling Pathways. Anticancer Research, 37, 8, 4361-9.
Zhu W, Liu C, Lu T, Zhang Y, Zhang S, Chen Q, Deng N, 2020. Knockout of EGFL6 by CRISPR/Cas9 Mediated Inhibition of Tumor Angiogenesis in Ovarian Cancer. Frontiers in Oncology, 10.

EK B: TURNITIN RAPORU

Pankreas kanseri gelişiminde etkili olan TP53 genindeki R273H mutasyonunun CRISPR/Cas9 tekniği ile düzeltilmesi

ORİJİNALLİK RAPORU

%4	%3	%1	%2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	adudspace.adu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%1
2	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<%1
3	libratez.cu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
4	www.unife.it İnternet Kaynağı	<%1
5	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	<%1
6	acikerisim.iku.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
7	tr.wikipedia.org İnternet Kaynağı	<%1
8	tur.kyhistotechs.com İnternet Kaynağı	<%1