



T.C.
Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü

**CRISPR/Cas YÖNTEMİ İLE MAKAK MORPHEUS
GENİNİN(NPIPA1)
KNOCK-OUT EDİLMESİ**

KÜBRA PASPAL

Yüksek Lisans Tezi

**CRISPR/Cas YÖNTEMİ İLE MAKAK MORPHEUS
GENİNİN(NPIPA1)
KNOCK-OUT EDİLMESİ**

KÜBRA PASPAL



T. C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**CRISPR/Cas YÖNTEMİ İLE MAKAK MORPHEUS GENİNİN(NPIPA1)
KNOCK-OUT EDİLMESİ**

KÜBRA PASPAL

Yrd. Doç. Dr. Elif UZ
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

BURSA - 2015

Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Kübra PASPAL tarafından hazırlanan “CRISPR/Cas YÖNTEMİ İLE MAKAK MORPHEUS GENİNİN(NPIPA1)KNOCK-OUT EDİLMESİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Yrd. Doç. Dr .Elif UZ

Başkan: Yrd. Doç. Dr. Elif UZ
Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

İmza

Üye: Yrd. Doç Dr. Figen ERSOY
Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

İmza

Üye: Yrd. Doç. Dr. Ceren ÇIRACI
İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Ali Osman DEMİR
Enstitü Müdürü

.././...

U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
 - atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
 - kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
 - ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı
- beyan ederim.**

25/06/2015
Kübra PASPAL

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

CRISPR/Cas YÖNTEMİ İLE MAKAK MORPHEUS GENİNİN(NPIPA1) KNOCK-OUT EDİLMESİ

Kübra PASPAL

Uludağ Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Elif UZ

Gen duplikasyonu içinde bir gen bulunan bir DNA bölgesinin herhangi şekilde ikilenmesidir. Mayoz bölünme sırasında homolog kromozomların hatalı hizalanması sonucu eşitsiz krossover olarak adlandırılan bir olay olur. Bu rekombinasyonun sonucu, değişim yerindeki kromozomlardan birinde duplikasyon, öbüründe ise bir delesyon oluşur. Segmental duplikasyonlar genomik DNA da bulunan duplikasyon bloklarıdır. Büyüklükleri tipik olarak 1-200 kb arasında değişir. İnsan genomunda, duplikasyon araştırmaları insan evriminde bilinmeyen kompleksleri ortaya çıkarmaktadır. NPIP (Nuclear Pore Interaction Protein) /Morpheus gen ailesinin primatlarda karşılaştırmalı sekans analizine bakıldığında insan-büyük maymun evrimi sırasında evrimsel bir dinamizm olduğu açıkça görülmüştür. Makak maymununda tek kopya olarak bulunmasına rağmen, insan referans sekansında 23 tane LCR16A (kromozom 16 da düşük-kopya sekansı 'a') vardır. Morpheus gen ailesi bu kadar çok duplikasyona uğramış olduğu halde fonksiyonu bilinmemektedir. Bu çalışmada amaç makak maymunundaki tek kopya olarak bulunan morpheus genini knock-out ederek fonksiyonunu araştırmaktır. Bu amaca yönelik olarak makak maymununun morpheus geni CV1 hücrelerine CRISPR/Cas metodu kullanarak knock-out edilmiştir. Mutasyonun varlığı PZR, Immuno floresan deneyi ve sekans analizi ile kontrol edilmiş ve gösterilmiştir. Mikroskopla yapılan incelemeler sonucu CV1 hücrelerinde fenotipsel farklılık görülmemiştir ancak bu ilk bulgular gen fonksiyonunun hücrelerde morfolojik bir değişikliğe sebep olmadığını göstermiştir. Bu çalışmanın devamında yapılacak olan moleküler analizlerle Morpheus gen fonksiyonu ile ilgili daha çok bilgi edinilmesi planlanmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Segmental Duplikasyon, Morpheus gen ailesi, CRISPR/Cas metodu, Knock-out, İmmunofloresan analizi, PZR

2015, viii + 100 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

MAKING KNOCK-OUT OF MACAQUE MORPHEUS GENE(NPIPA1) USING CRISPR/Cas METHOD

Kübra PASPAL

Uludağ University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Elif UZ

Gene duplication is defined as any duplication of a gene region of DNA. Duplications arise from an event termed unequal crossing-over that occurs during meiosis between misaligned homologous chromosomes. After the homologous recombination, one of chromosomes possesses two copy of the gene, while the other one has no copy of the gene. Segmental duplications are duplication blocks which are located in genomic DNA. Their sizes typically vary from 1-200 kb. Duplication research in human genome reveals unknown complexity in human evolution. The comparative analysis of human genome clearly observed that NPIP/Morpheus gene family has an evolutionary dynamism during human-great ape evolution. Even though there is only one copy of Morpheus gene in the macaque monkey genome, in human referance sequence, it has 23 LCR16a (low-copy repeat sequence 'a' from chromosome 16). Although, Morpheus gene family recently expanded by duplication within human genome, the function of Morpheus gene family is not known yet. The main aim in this study is to knock-out single copy morpheus gene in macaque CV1 cells to investigate the gene function. In order to study the function of morpheus gene in macaque monkey we used CRISPR/Cas system and the presence of mutation has been verified by using different techniques including PCR, immunoflorecense analysis and sequence analysis. Our results show that Morpheus gene is succesfully knocked out. Using light microscopy, no phenotypic differeneeces between mutated and normal CV1 cells observed, indicating that mutation in morpheus gene does not result in any morphologiğcal change in CV1 cells. Further molecular studies are planned in order to discover the function of Morpheus gene.

Key Words: Segmental Duplication, Morpheus gene family, CRISPR/Cas System, Knock-out, Immunoflorecense Analysis, PCR

2015, viii + 100 pages.

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi, yürütülmesi ve bütün çalışmalarım süresince ve sonrasında bana rehber olan, ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, öğrencisi olmaktan onur ve mutluluk duyduğum hocam Dr.Cemalettin Bekpen 'e,

Üniversite eğitimime ilk başladığım andan itibaren bütün eğitimim boyunca özveriyle bilgisini, sabrını ve insani ilgisini esirgemeyen, tez çalışmam için bana imkân sağlayan, beni yönlendiren, destekleyen hocam Prof.Dr. Sezai Türkel'e,

Tez çalışmam boyunca ve sonrasında bana ayırdığı değerli zamanı ve sağladığı destek için danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Elif Uz'a

Hayatımın her döneminde fikirleri ve destekleriyle yanımda olan, yanlarında huzur ve güven duyduğum aileme,

Her zaman samimiyetlerine güvendiğim ve destekleriyle yanımda olan arkadaşlarıma,

Tezimin tamamlanmasına katkıda bulunan ERASMUS programına,

Tez çalışmamda destek sağlayan Max Plack Institute for Evolutionary Biology ve Uludağ Üniversitesine,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Kübra PASPAL
25/06/2015

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLER DİZİNİ	vii
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Segmental Duplikasyonlar	3
2.1.1. İnsan ve Fare Segmental Duplikasyonlarının Özellikleri	4
2.1.2. Primat Segmental Duplikasyonlarının Karşılaştırılması	5
2.1.3. Duplikasyon Organizasyonu ve Çekirdek(Core) Duplikonlar	6
2.2. LCR16a(NPIP/ Morpheus Gen Ailesi)	8
2.3. Programlanabilir Nükleazları Kullanarak Genom Düzenlenmesi.....	14
2.3.1 Programlanabilir Nükleazların Ortak Özellikleri.....	15
2.3.1.1 DNA çift zincir kırıklarını tamir etmeleri	15
2.3.1.2 Gen Engellenmesi	16
2.3.1.3 Gen İnsersiyonu	17
2.3.1.4 Gen Doğrulama ve Nokta Mutasyonları	17
2.3.1.5 Kromozomların Yeniden Düzenlenmesi.....	18
2.3.2 Programlanabilir Nükleazlar	18
2.3.2.1 Çinko Parmak Nükleazlar (ZFN).....	18
2.3.2.2 Transkripsiyonel Aktivatör Benzeri Efektör Nükleazlar(TALEN).....	19
2.3.2.3. RNA Rehberli Tasarlanmış Nükleazlar veya CRISPR/Cas Sistemi	21
3.MATERYAL VE YÖNTEM	23
3.1. Hücre Kültürü.....	23
3.1.1.Hücre Materyali	23
3.1.2.Donmuş Hücrelerden Kültür Yapılması	23
3.1.3 Hücrelerin Pasajlanması.	24
3.1.4 Hücrelerin Sayılması.....	25
3.1.5 Hücrelerin DNA izolasyonuna hazırlanması	26
3.1.6 Hücrelerin Dondurulması.....	27
3.2. px330 CRISPR /CAS Vektörünün hazırlanması.....	28
3.2.1.px330 vektörünün BbsI restriksiyon enzimi ile kesilmesi.	29
3.2.2. Kesilmiş px330 vektörünün jelden saflaştırılması	29
3.2.3.Oligoların Fosforile Edilip Tek Zincirli Hale Getirilmesi	29
3.2.4.Oligoların Vektör ile Ligasyonu	30
3.2.5 Ligasyon Reaksiyonunun İstenmeyen Rekombinasyon Ürünlerinden Kurtulmak İçin Pasmidsafe exonükleaz ile Muamele Yapılması	30
3.2.6.E. coli kompetan hücrelere ligasyon ürününün aktarılması	30
3.2.7 Plazmit izolasyonu	31
3.3. Morpheus gen dizisi taşıyan px330 CRISPR /CAS Vektörünün CV1 hücrelerine transfeksiyonu	32

3.4. Mikroskop ile Hücrelerin Morfolojik Olarak İncelenmesi	34
3.5. İmmüno floresans deneyi	34
3.6. DNA izolasyonu	37
3.7. Primer hazırlanması	38
3.8. PZR reaksiyonu	39
3.9. pGEM-T Easy vektörüne PZR ürününün klonlanması	39
3.10. <i>E. coli</i> kompetan hücrelere ligasyon ürününün aktarılması	40
3.11. Plazmit izolasyonu	41
4. BULGULAR	42
4.1. PZR Reaksiyonu	42
4.2. CV1 hücrelerinin morfolojik incelenmesi	43
4.3 İmmüno floresans deneyi sonuçları	45
4.4.DNA sekanslanması sonuçları	49
5. SONUÇ	50
KAYNAKLAR	54
EKLER	61
EK 1. Kullanılan Solüsyonlar ve Hazırlanması	61
1. Agaroz Jel Hazırlanması	61
2. LB (Leuria Bertani) Besi Ortamı Hazırlanması	61
3. LB-Agar Besi Ortamı Hazırlanması	62
4.Saponin ve Bloklama Solüsyonunun Hazırlanması	62
EK 2. Sekanslama Sonuçları	63
1. px330 Vektör Sekansı	63
2.Normal ve mutant DNA sekansları	68
ÖZGEÇMİŞ	101

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar	Açıklama
bç	Baz çifti
Bkz	Bakınız
ddH ₂ O	Duble Distile Su
dk	Dakika
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dNTP	Deoksi-nükleotid trifosfat
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik asit
qRT-PZR	Kantitatif Eş Zamanlı PZR
kb	Kilo baz
Mbç	Megabaz çifti
mg	Milligram
mL	Mililitre
µl	mikrolitre
NPIP	Nuclear Pore Interaction Protein

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1 Dört primat genomları arasındaki ortak ve soy-spesifik duplikasyonları gösteren Venn diyagramı

Şekil 2.2 Soy ağacındaki her tür için duplikasyon karşılaştırması ve tamini megabaz/milyonyıl oranı

Şekil 2.3 Atasal duplikasyon içeriğine göre insan segmental duplikasyonlarının hiyerarşik analizi

Şekil 2.4 İnsan 16. Kromozomunda LCR16a duplikasyonlarının dağılımının(kırmızı çubuklar)sistematik olarak gösterildiği ideogram

Şekil 2.5 LCR16 duplikasyonlarının dağılımının karşılaştırmalı sistematik gösterimi

Şekil 2.6 Primatlar arasında karşılaştırmalı FISH analizi

Şekil 2.7 İnsan morpheus gen ailesinin RT-PCR analizinin jel görüntüsü.

Şekil 2.8 Yeşil floresan protein ile füzyona uğratılmış morphus proteininin immünolokalizasyon analizi görüntüsü

Şekil 2.9 Çift zincir kırıklarının tamir mekanizmaları

Şekil 2.10 Zinc-finger nükleaz(ZFN) çiftinin sistematik gösterimi

Şekil 2.11 TALEN çiftinin sistematik gösterimi

Şekil 2.12 RNA-guided engineered nucleases (RGENs) şematik gösterimi

Şekil 3.1 Hemositometre

Şekil 3.2 px330 CRISPR/Cas vektörünün şematik gösterimi

Şekil 3.3 İmmüno floresans deneyi örneklerinin sıralanması.

Şekil 3.4 Lam üzerine yerleştirilmiş coverglassların gösterimi

Şekil 3.5 PGEMT easy vektörünün şematik gösterimi

Şekil 4.1 Px330 CRISPR/Cas vektörü transfeksiyonu yapılmayan CV1(Makak maymunu böbrek fibroblast hücreleri)(KONTROL)

Şekil 4.2 Px330 CRISPR/Cas vektörü transfeksiyonu yapılan CV1(Makak maymunu böbrek fibroblast hücreleri)(MUTASYONLU)

Şekil 4.3 px330 vektörü transfeksiyonundan sonra mutasyonlu DNA parçalarının PZR sonrasında %1'lik agaroz jelde görüntüsü.

Şekil 4.4 PGEMT easy ile ligasyondan sonra ileri SP6 ve geri T7 primerleri ile yapılan PZR sonrasında %1'lik agaroz jelde görüntüsü.

Şekil 4.5 1.cil boyamada tubilin boyaması yapılmış immüno floresans deney sonuçları 1:100 morpheus antikoru ile boyama

Şekil 4.6 1.cil boyamada tubilin yerine flag tag boyaması yapılmış immuno floresans deney sonuçları 1:100 morpheus antikoru ile boyama

1.GİRİŞ

Gen duplikasyon olayları, yeni gen fonksiyonlarının ortaya çıkmasında öncelikli kaynaklardan biri olup, türlerin evrimleşmesini anlamamızda da önemlidir (Ohno 1970). Ohno, evrensel ortak atanın ortaya çıkmasından beri en önemli evrimsel kuvvetin gen duplikasyonu olduğunu savunmuştur (Ohno 1967). Ayrıca omurgalı oluşumunu tüm genom duplikasyonuna bağlamış ve gen duplikasyonlarının fonksiyonel artışa ve türsel özelleşmeye neden olduğunu söylemiştir (Ohno ve ark. 1968).

Segmental duplikasyonlar genomik DNA da bulunan duplikasyon bloklarıdır. Büyüklükleri tipik olarak 1-200 kb arasında değişir (IHGSC 2001). Segmental duplikasyonlar yüksek kopyalı tekrarlar ve intron ve ekzon yapısında gen dizileri gibi özel diziler içerirler. İnsan genomunda, duplikasyon araştırmaları insan evriminde bilinmeyen kompleksleri ortaya çıkarmaktadır. Bu çalışmalar yeni insan-büyük maymun genlerinin tanımlanmasına öncülük eder. Ayrıca pediyatrik ve erişkin başlangıçlı hastalıklarla ilişkili olan yeni mutasyonların keşfinde yol haritası olmasını sağlar (Eichler 2009).

Hiyerarşik analiz yapıldığında duplikasyon bloklarının core veya seed (çekirdek veya tohum) duplikon denilen ve tüm duplikasyon bloklarında %67 den daha çok bulunan atasal duplikasyonlar olarak tanımlanan sekanslar etrafında oluştuğu görülmüştür. Bu çekirdek (core) sekanslar duplikasyonlarda en çok bulunan ve en eski olan sekanslardır. Çekirdek (core) duplikonlar tarafından kodlanan ilgili genler ve gen aileleri insan-büyük maymunlar hariç diğer memeli ortologlarında eksiktir. Bu insan ve büyük maymun genlerinin arasındaki ilişkiyi gösterir (Johnson ve ark. 2001, Paulding ve ark. 2003, Ciccarelli ve ark. 2005).

RANBP2, morpheus (NPIP) ve NBF11 (DUF1220 protein domeni ile de bilinir) gen aileleri pozitif seleksiyon gösterir. Bu genler insan popülasyonunda kopya sayısı polimorfik olarak bulunur (Sharp ve ark. 2005, Redon ve ark. 2006).

NPIP /Morpheus gen ailesinin primatlarda karşılaştırmalı sekans analizine bakıldığında insan-büyük maymun evrimi sırasında evrimsel bir dinamizm olduğu açıkça görülür. Makak maymunu sekansında tek kopya halinde bulunmasına rağmen insan referans sekansında 23 tane LCR16A (low-copy repeat sequence 'a' from chromosome 16)

(kromozom 16 da düşük- kopya sekansı 'a') sekans kopyası vardır ve bunlar 40 ila 609 kbç uzunluğundaki 17 kompleks duplikasyon bloğuna dağılmış halde bulunur.

Morpheus geni bu kadar çok duplikasyona uğradığı halde fonksiyonu bilinmemektedir.

Bu tez çalışmasında makak maymununda tek kopya olarak bulunan morpheus geninin programlanabilir nükleazlar ile genom düzenleme yöntemi olan CRISPR/Cas sistemi ile susturulması ve ileriki fonksiyon çalışmalarına hazırlanmasıdır. Böylece makak maymunu genomunda morpheus geni bulunmayacağından bu genin yokluğuna hücrelerde ne gibi değişiklikler olduğu araştırılacaktır. Çalışmadan elde edilen sonuçların fonksiyon çalışmalarına yardımcı olması beklenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Segmental Duplikasyonlar

Gen duplikasyonu, içinde bir gen bulunan bir DNA bölgesinin herhangi şekilde ikilenmesidir; homolog rekombinasyon sırasında bir hata sonucu, retrotranspozisyon olayı veya tüm bir kromozomun ikilenmesi sonucu meydana gelebilir (Zhang 2003). Genin kopyası selektif baskıdan yoksun olduğu için, ondaki mutasyonların organizma üzerinde zararlı etkisi olmaz. Dolayısıyla, organizmanın nesilleri boyunca, işlevsel tek kopyalı bir gene kıyasla daha hızlı mutasyona uğrar.

İkilenmenin meydana gelme mekanizmalarından biri hatalı rekombinasyondur. Bu durumda ikilenme ve silinme (delesyonun) beraber meydana gelir. Mayoz bölünme sırasında homolog kromozomların hatalı hizalanması sonucu eşitsiz krossover olarak adlandırılan bir olay olur. Bu rekombinasyonun sonucu, değişim yerindeki kromozomlardan birinde bir ikilenme, öbüründe ise bir delesyon oluşur.

Duplikasyona uğramış sekansların fenotip ve genotipteki rolünün anlaşılması ilk olarak Drosophiladaki *Bar* lokusunun eşit olmayan krossing-over sonucunda eye-reduction fenotipini oluşturmasının keşfiyle olmuştur (Bridges 1936).

Gen duplikasyon olayları, yeni gen fonksiyonlarının ortaya çıkmasında öncelikli kaynaklardan biri olup, türlerin evrimleşmesini anlamamızda da önemlidir (Ohno 1970). Ohno, evrensel ortak atanın ortaya çıkmasından beri en önemli evrimsel kuvvetin gen duplikasyonu olduğunu savunmuştur (Ohno 1967). Ayrıca omurgalı oluşumunu tüm genom duplikasyonuna bağlamış ve gen duplikasyonlarının fonksiyonel artışa ve türsel özelleşmeye neden olduğunu söylemiştir (Ohno ve ark. 1968).

Segmental duplikasyonlar genomik DNA da bulunan duplikasyon bloklarıdır. Büyüklükleri tipik olarak 1-200 kb arasında değişir (IHGSC 2001). Segmental duplikasyonlar yüksek kopyalı tekrarlar ve intron ve ekzon yapısında gen dizileri gibi özel diziler içerirler.

Bu nedenle normal genomik DNA oluşumunda segmental duplikasyonlar önceden tespit edilemez; birçok intra-ve interkromozomal segmental duplikasyon deneysel analizlerle keşfedilmiştir (Wong ve ark. 1990, Tomlinson ve ark. 1994, Eichler ve ark. 1997,

Mazzarella ve Schlessinger 1997, Regnier ve ark. 1997, Zimonjic ve ark. 1997, Eichler 1998, Trask ve ark. 1998, Jackson ve ark. 1999, Ji ve ark. 1999).

Segmental duplikasyonlar nokta mutasyonu ve retrotranspozon aktivitesiyle yavaş yavaş zamanla oluşmuştur (Wu ve Li 1985, Tanimura 1987, Waterston ve ark. 2002, Consortium 2005).

İnsan genomunda, duplikasyon araştırmaları insan evriminde bilinmeyen kompleksleri ortaya çıkarmaktadır. Bu çalışmalar yeni insan-büyük maymun genlerinin tanımlanmasına öncülük eder. Ayrıca pediyatrik ve erişkin başlangıçlı hastalıklarla ilişkili olan yeni mutasyonların keşfinde yol haritası olmasını sağlar. (Eichler 2009). Yüksek oranda benzer paraloglar arasında anormal krossing-over sonucunda velocardiofacial/DiGeorge, Smith-Magenis, ve Prader-Willi/Angelman sendromları gibi genetik hastalıklar oluşabilir (Chen ve ark. 1997, Amos-Landgraf ve ark. 1999, Christian ve ark. 1999, Edelman ve ark. 1999, Shaikh ve ark. 2000).

Memeli hayvanlar arasında insan ve fare genomu assembled sekanslama yöntemi ile sekanslanarak yapı ve organizasyonları belirlenmiştir.

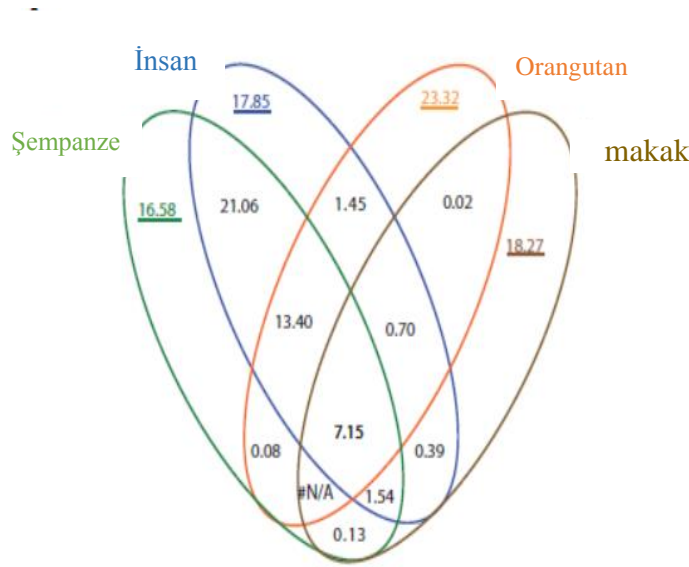
2.1.1.İnsan ve Fare Segmental Duplikasyonlarının Özellikleri

Fare ve insan karşılaştırılmış genomu göstermiştir ki (Collins ve ark. 2004, Church ve ark. 2009), fare ve insan duplikasyonlarında (>%90) benzerlik vardır. Fakat fare ve insan segmental duplikasyonları arasında 3 önemli fark vardır. Birincisi, farede segmental duplikasyonlar ardarda dizili halde bulunurken insan segmental duplikasyonlarının çoğu serpiştirilmiş halde bulunur. Bir genin paraloğu olan başka bir gen ile arasında 1Mbç ten fazla uzaklık vardır veya gen haritalandığında non-homolog kromozomdaki gen ile eşleşir. (She ve ark. 2008). İkincisi insan duplikasyonları spliced transkript oluşturmaya eğilimliyken, farede duplikasyona uğramış genlerde işlevsiz gen ve transkript görülür. (She ve ark. 2008). Üçüncü olarak, insan genomunda daha çok bulunan segmental duplikasyonlar yeni oluşan duplikasyonların göstergesidir. Daha çok lokasyonda bulunan segmental duplikasyonlar eşit olmayan krossing-over sonucudur ve

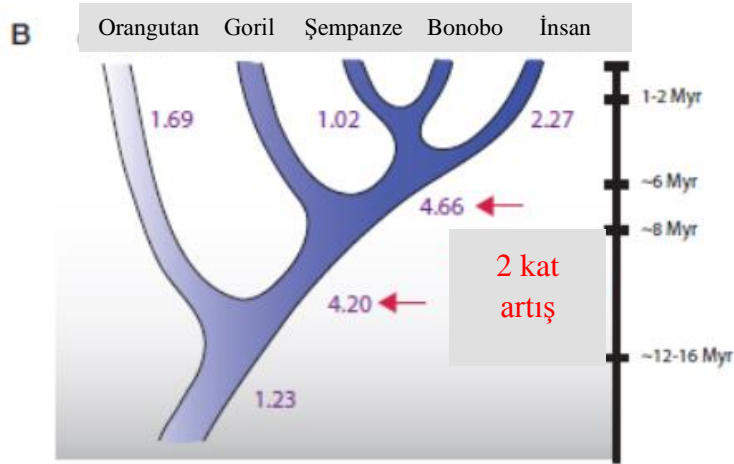
insan genomunu dozaj ve pozisyon etkisine karşı daha hassas olmasını sağlar (Eichler ve ark. 2009).

2.1.2 Primat Segmental Duplikasyonlarının Karşılaştırılması

Whole genom sequence (WGS, tüm genom sekansı) verilerine bakıldığında insan duplikasyonlarının şempanze, orangutan ve makak maymunu genomu ile ilişkili olduğu görülmüştür (Şekil 2.1). Duplikasyon miktarı şempanze ve insanda hemen hemen eşittir (Cheng ve ark. 2005, Marques-Bonet ve ark. 2009). Afrika büyük maymunları ve insanın ortak atası ile Asya maymunları ve eski dünya maymunları karşılaştırdığında, Afrika büyük maymunları ve insanın ortak atasında diğerlerine göre 2-4 kat daha fazla intrakromozomal segmental duplikasyon vardır (Şekil 2.2). Segmental duplikasyonlar primat evrimi boyunca devam eder. (Fortna ve ark. 2004, Dumas ve ark. 2007, Hahn ve ark. 2007).



Şekil 2.1 Dört primat genomları arasındaki ortak ve soy-spesifik duplikasyonları gösteren Venn diyagramı (Marques-Bonet ve ark. 2009).

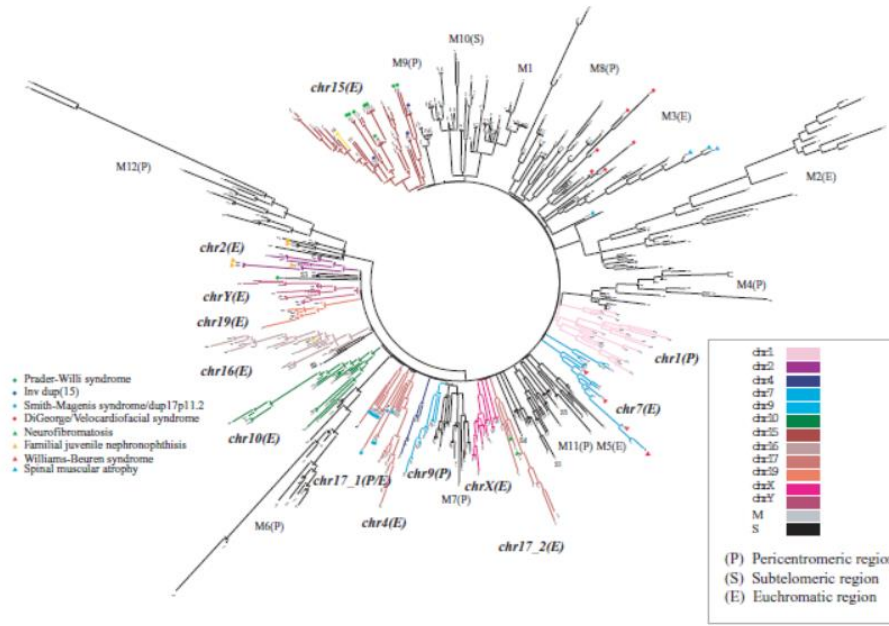


Şekil 2.2 Soy ağacındaki her tür için duplikasyon karşılaştırması ve tamini megabaz/milyonyıl oranı (Marques-Bonet ve ark. 2009).

2.1.3 Duplikasyon Organizasyonu ve Çekirdek (core) Duplikonlar

Modifiye edilmiş Brujin grafi teorisi kullanıldığında, insan genomunda atasal orjinli 4692 tane insan duplikasyon lokasyonu ve 437 duplikasyon bloğu bulunmuştur (Jiang ve ark. 2007) (Şekil 2.3). (Dalların her biri 437 segmental duplikasyon bloğundan birini temsil etmektedir.).

Duplikasyon blokları içeriklerine göre sınıflandırıldıklarında 24 ayrı grup oluşur. Bu gruplar da 2 tiptir: Bir grupta genetiksel bilginin evrimsel akışı homolog olmayan kromozomlar arasında gerçekleşir (n=10). Diğerinde bu mozaik yapılar büyük ölçüde spesifik bir kromozom içinde oluşmuştur (n=14).



Şekil 2.3 Atasal duplikasyon içeriğine göre insan segmental duplikasyonlarının hiyerarşik analizi (Jiang ve ark. 2007).

Hiyerarşik analiz yapıldığında duplikasyon bloklarının core veya seed (çekirdek veya tohum) duplikon denilen ve tüm duplikasyon bloklarında %67 den dah çok bulunan atasal duplikasyonlar olarak tanımlanan sekanslar etrafında oluştuğu görülmüştür. Bu çekirdek (core) sekanslar duplikasyonlarda en çok bulunan ve en eski olan sekanslardır. Çekirdek(core) duplikonlar tarafından kodlanan ilgili genler ve gen aileleri insan- büyük maymunlar hariç diğer memeli ortologlarında eksiktir. Bu insan ve büyük maymun genlerinin arasındaki ilişkiyi gösterir (Johnson ve ark. 2001, Paulding ve ark. 2003, Ciccarelli ve ark. 2005).

Örneğin; *TRE2* onkogeni *U5P32 proteaz* ve *TBC1D3* core duplikonun füzyonu ile oluşmuş bir gendir. Böyle oluşan bu füzyon gen sadece insan ve büyük maymunlarda eksprese olur (Paulding ve ark. 2003).

RANBP2, *morpheus (NPIP)* ve *NBF11* (DUF1220 protein domeni ile de bilinir) gen aileleri pozitif seleksiyon gösterir. Bu genler insan popülasyonunda kopya sayısı polimorfik olarak bulunur (Sharp ve ark. 2005, Redon ve ark. 2006). *TBC1D3* core duplikonun fonksiyonel karakterizasyonu yapıldığında gelişim sırasında büyüme faktör

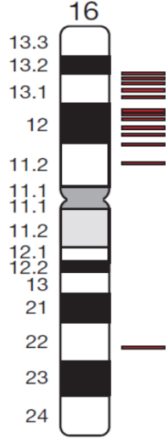
sinyallerini düzenleyebileceği bulunmuştur (Hodzic ve ark. 2006, Wainszelbaum ve ark. 2008).

2.2 LCR16A(NPIP/Morpheus gen ailesi)

NPIP /Morpheus gen ailesinin primatlarda karşılaştırmalı sekans analizine bakıldığında insan–büyük maymun evrimi sırasında evrimsel bir dinamizm olduğu açıkça görülür. İnsan referans sekansında 23 tane LCR16A (low-copy repeat sequence 'a' from chromosome 16) (kromozom 16 da düşük- kopya sekansı 'a') sekans kopyası vardır ve bunlar 40 ila 609 kbç uzunluğundaki 17 kompleks duplikasyon bloğuna dağılmış halde bulunur. LCR16 ya ek olarak, farklı evrimsel kökenli 11 tane daha segmental duplikasyon bloğu kromozom 16 üzerinde bulunmaktadır. 20kb LCR16a bazen tek bir duplikon olarak yani yanında başka duplikon olmadan oluşmasına rağmen, hemen hemen tüm diğer LCR16 elementleri LCR16a core dupliconuyla ilişkili olarak oluşur. Filogenetik analize göre, insan genomunda gözlenen karmaşık duplikasyon blokları incelendiğinde yan yana olan dupliconlar daha çok LCR16a duplikasyonları çevresinde birikmiştir. Makak ve babun karşılaştırmalı dizi analizine bakıldığında (Eski Dünya grup dışı türleri) açığa çıkmıştır ki her bir segmental duplikasyon kromozom 16 daki tek kopya dizisinden kökenlenmiştir.

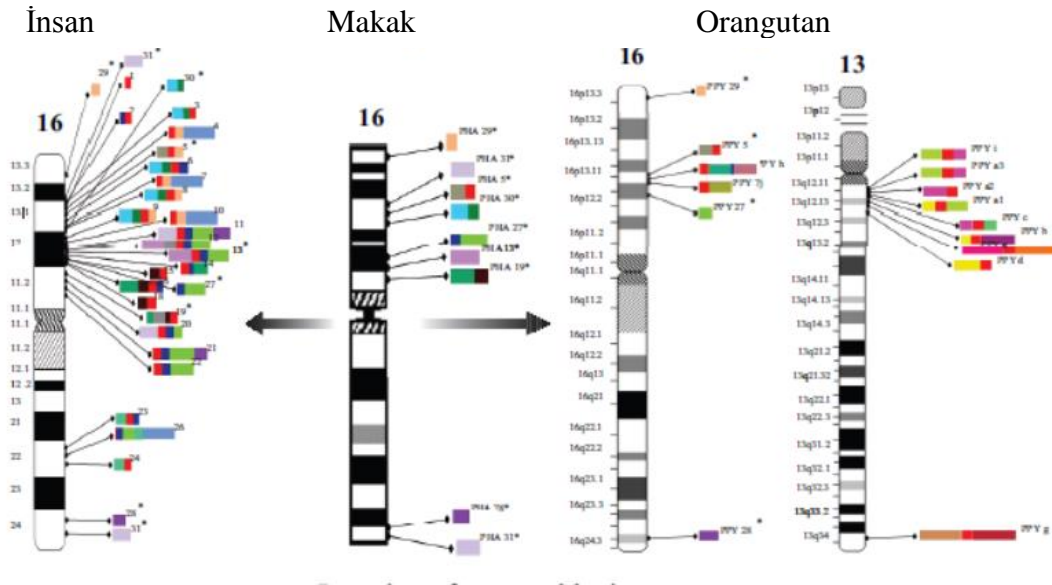
Bu çalışmalar göstermiştir ki LCR16a core dupliconunun duplikasyon için doğal bir eğilimi vardır. Hem orangutan hemde makaklarda oluşan ana soya özel duplikasyonlar büyük duplikasyon bloklarının ortaya çıkmasına katkıda bulunur. İki bağımsız LCR16a oluşumu farklı maymun soylarında 12 milyon yıl önce meydana gelmiştir (Bonet ve Eichler 2009).

İnsan genomunda fiziksel haritalama ve sekans analizi yapıldığında duplikasyona uğramış genomik segmentlerin kromozom 16 da birden çok sitogenetik bant ile eşleştiği görülmüştür. Bu tekrarlar insan 16. Kromozomuna spesifik olarak bulunmaktadır (Şekil 2.4).



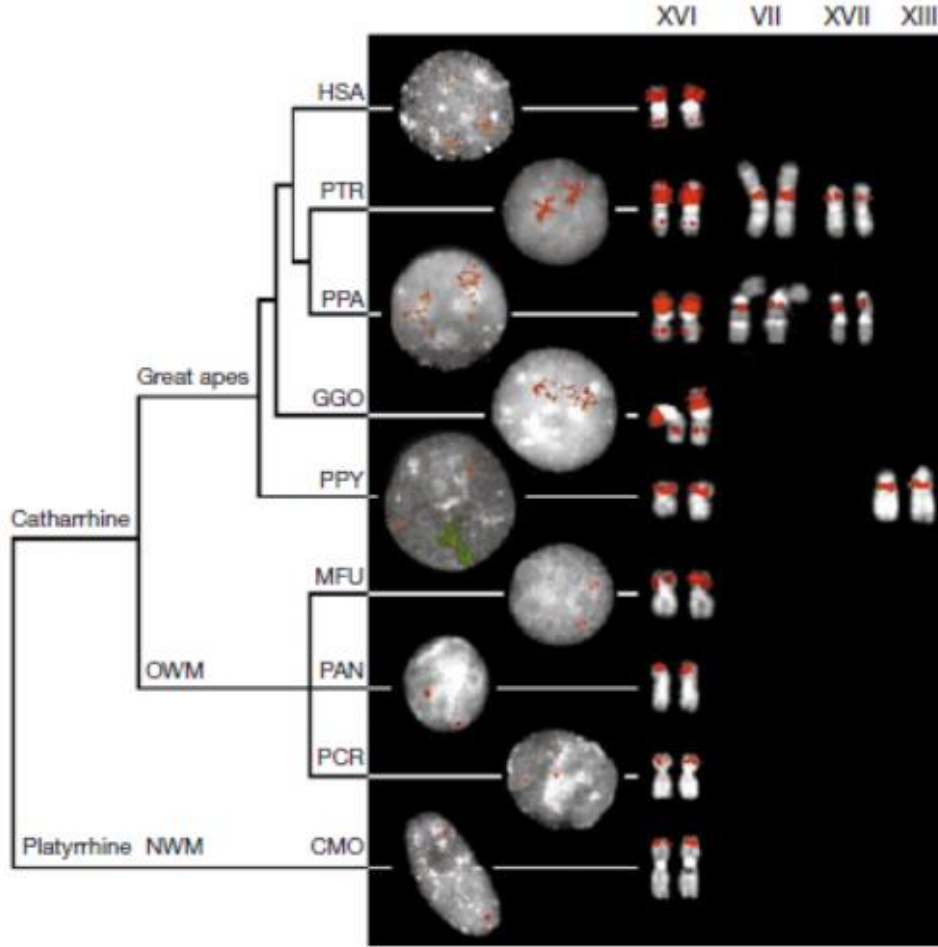
Şekil 2.4 İnsan 16. Kromozomunda LCR16a duplikasyonlarının dağılımının (kırmızı çubuklar) sistematik olarak gösterildiği ideogram (Evan E. Eichler ve ark. 2001).

Orangutanda LCR16a elementlerinin Bakteriyel yapay kromozom (BAC) tabanlı sekans analizi yapıldığında insan ve afrika büyük maymunlarıyla kıyaslandığında orangutanda LCR16a elementlerinin bağımsız olarak duplikasyona uğradığı ve ortolog bölgesinin bulunmadığı görülmüştür. Ayrıca orangutanda LCR16a kromozom 13 te kolonize olmuştur. İnsanda,LCR16a çekirdek duplison (kırmızı) kromozom 16 üzerindedir. Tüm sorumlu duplikasyonlar makakta tek kopya olarak bulunurken, orangutanda, LCR16a nonorthologous yerlerde ve farklı kromozom (kromozom13) üzerinde bulunur. Haritada lokasyonlar insan referans sekansına göre numaralandırılmıştır ve atasal lokasyonlar yıldız ile işaretlenmiştir (Bonet ve Eichler 2009) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5 LCR16 duplikasyonlarının dağılımının karşılaştırmalı sistematik gösterimi. . Renk çubukları LCR16 duplisonlarını gösterir (Bonet ve Eichler 2009).

Primat metefaz kromozomları ve interfaz nükleusları ile LCR16a probu kullanılarak (FISH) Fluorescence in situ hybridization analizi yapıldığında primatlarda LCR16a duplisonunun kopya sayısı ve kromozomal harita lokasyonu tespit edilmiştir (Evan E. Eichler ve ark. 2001) (Şekil 2.6).



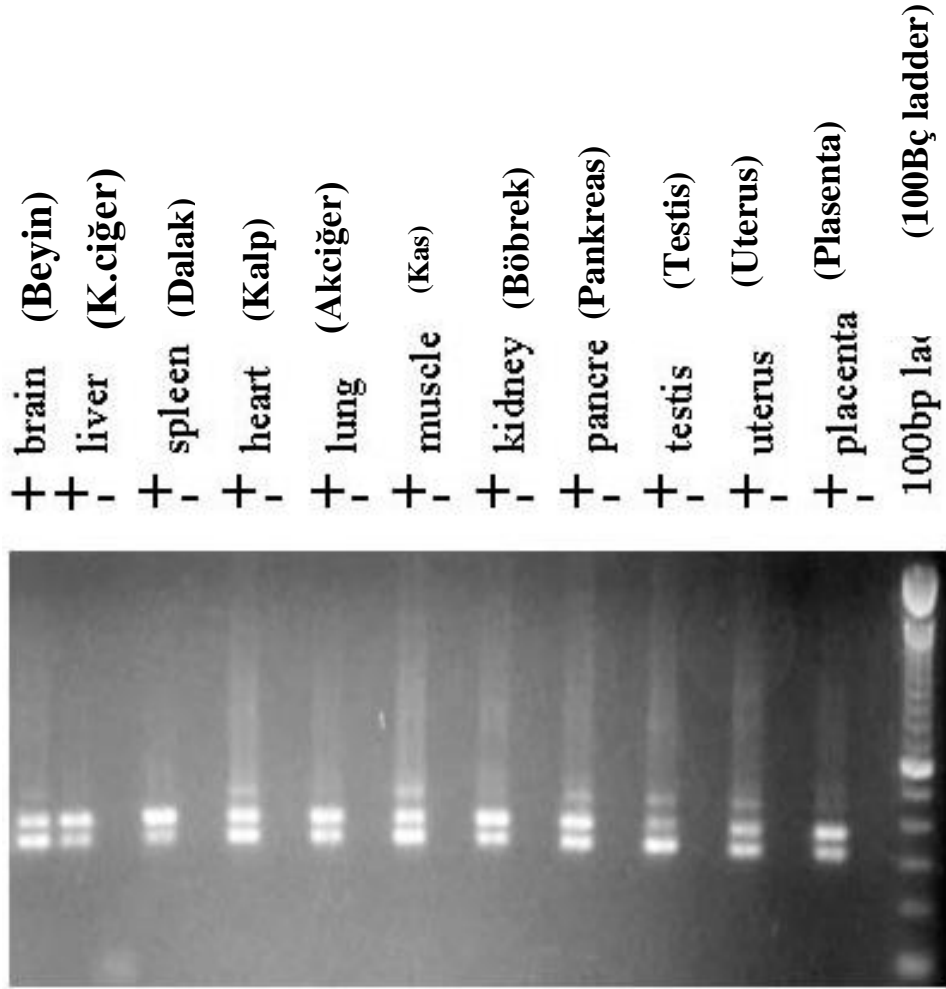
Şekil 2.6 Primatlar arasında karşılaştırmalı FISH analizi. Metefaz kromozomları (sağda) ve interfaz nükleusları (solda). New World monkeys (yeni dünya maymunları) (NWM: CMO, *Callicebus mollochus*), Old World monkeys (eski dünya maymunları) (OWM: MFU, *Macaca fascicularis*; PAN, *Papio anubis*; PCR, *Presbytis cristata*) and hominin türleri (HSA, *Homo sapiens*; PTR, *Pan troglodytes*; PPA, *Pan paniscus*; GGO, *Gorilla gorilla*; PPY, *Pongo pygmaeus*). Hominin türlerinde tekrar eden bölge 16. Kromozomun kısa kolunda bulunmaktadır. Orangutan'da (PPY) LCR16a duplikonları hem 16. Kromozomda hem de 13. kromozomun perisentromerik bölgesine dağılmışlardır. İnterfaz nükleusunda yeşil floresan boya ile gösterilmiştir. (Evan E. Eichler ve ark. 2001).

İnsan 16. Kromozomunun kısa kolunun 15 Mb'ında transpozisyon, poliferasyon ve seleksiyon tanımlanmıştır. Homininlerde bu segmentin kromozomal olarak yeri ve kopya sayısı çeşitlilik göstermektedir. İnsanda bu duplike olmuş segmentte *morpheus* adı verilen bir gen ailesi tanımlanmıştır. Protein kodladığı varsayılan exonlar karşılaştırıldığında homininler arasında pozitif seleksiyon görüldüğü açığa çıkarılmıştır. Ana aminoasid değişimi insan ve büyük maymun soylarının orangutandan ayrılmasından sonra olduğu saptanmıştır.

Pozitif seleksiyon ile aminoasid kompozisyonunun değişimi insan ve şempanze soylarının ayrımından sonra da devam ettiği görülmüştür. İnsan ve Afrika maymunlarının ortaya çıkması sırasında morpheus gen ailesinin adaptif evrimi, nükleotid değişimine bağlı olarak aminoasiddeğişimi ile olmuştur.

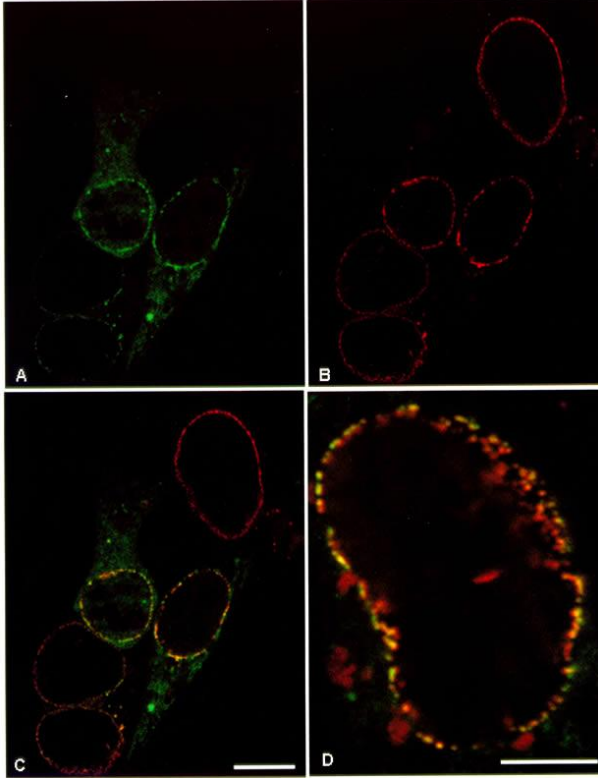
Eğer eş anlamlı olmayan aminoasiddeğişiminin (Ka) eş anlamlı aminoasiddeğişimine (Ks) oranı (Ka/Ks) 1'den büyükse pozitif seleksiyon gerçekleşmiş demektir. Morpheus geninin 2. Ekzon ($Ka/Ks = 35.0$) ve 4. Ekzonlarında ($Ka/Ks = 4.67$) insan ve şempanze soylarının orangutandan ayrıldıktan sonra önemli ölçüde pozitif seleksiyon görüldüğü saptanmıştır (Eichler ve ark. 2001).

Morpheus gen ailesinin cDNA'larından reverse transkriptaz enzimi ile RT-PCR analizi yapıldığında insanda hemen hemen tüm dokularda ekspresyonunun olduğu görülmüştür (Şekil 2.7).



Şekil 2.7 İnsan morpheus gen ailesinin RT-PCR analizinin jel görüntüsü (Evan E. Eichler ve ark. 2001).

Morpheus gen ailesi immüno-lokolizasyon çalışmalarında yeşil floresan protein ile füzyon edildiğinde nükleer membranda lokalize olduğu görülmüştür. (Eichler ve ark. 2001) (Şekil 2.8).



Şekil 2.8 Yeşil floresan protein ile füzyona uğratılmış morphus proteininin immünolokalizasyon analizi görüntüsü (Eichler ve ark. 2001).

2.3. Programlanabilir Nükleazları Kullanarak Genom Düzenlenmesi

Hedeflenmiş genom düzenlenmesi (önceden kararlaştırılmış bir lokusta genom modifikasyonu yapılması) biomedikal araştırmalarda, tıpta ve biyoteknolojide kullanılmaktadır. Örneğin; spesifik genin veya non-coding (kodlanmayan) elementin (microRNA gibi) fonksiyonunu bulmak için onlar seçilip inaktive edilir ve hücrede veya tüm organizmadaki fenotipik değişimler incelenir. Small interfering RNA 'lar (siRNA) gen fonksiyon çalışmalarında yaygın olarak kullanılmasına rağmen siRNA 'lar ile gen knockdown (susturma) genellikle yetersizdir ve spesifik değildir (Krueger ve ark. 2007, Jackson ve ark. 2003).

Geleneksel gen hedefleme metodları homolog rekombinasyon ile gen inaktivasyonuna dayanır. Fakat yüksek ökaryotik hücrelerde homolog rekombinasyon olayının etkisi çok düşüktür ($1/10^6$ - $1/10^7$). Bu nedenle rutinde kullanımlarını engellemektedir.

Programlanabilir nükleazlar ise ; bölgeye özgü DNA çift zincir kırıkları oluşturmaktadırlar. Böylece hedeflenmiş mutasyona sebep olan homolog olmayan uçların birleştirilmesi tamir mekanizmana eğilimli bir hata oluşmasıyla homolog rekombinasyonun etkisi artmaktadır (Bibikova ve ark. 2002).

Genom düzenleme teknolojisi hızla gelişmektedir. *Zinc finger nukleases* (ZFN , çinko parmak nükleaz) önceleri genom düzenlemesi ile ilgilenen araştırmacıların tek seçeneği iken 2011 yılının sonlarından itibaren *transcription activator-like effector nucleases* (TALEN) genom düzenlemede kullanılmaya başlanmıştır. Ocak 2013 te bakteriyel adaptif immün sistemi olan ve DNA bağlanma proteini yerine küçük rehber RNA bulunduran *CRISPR /Cas sistemi* (*clustered regulary interspaced short palindromic repeat, RGEN*, RNA-guided engineered nucleases) bir çok grup tarafından bağımsız olarak rapor edilmiştir (Cho ve ark. 2013, Cong ve ark. 2013, Hwang ve ark. 2013, Jiang ve ark. 2013, Mali ve ark. 2013, Jinek ve ark. 2013).

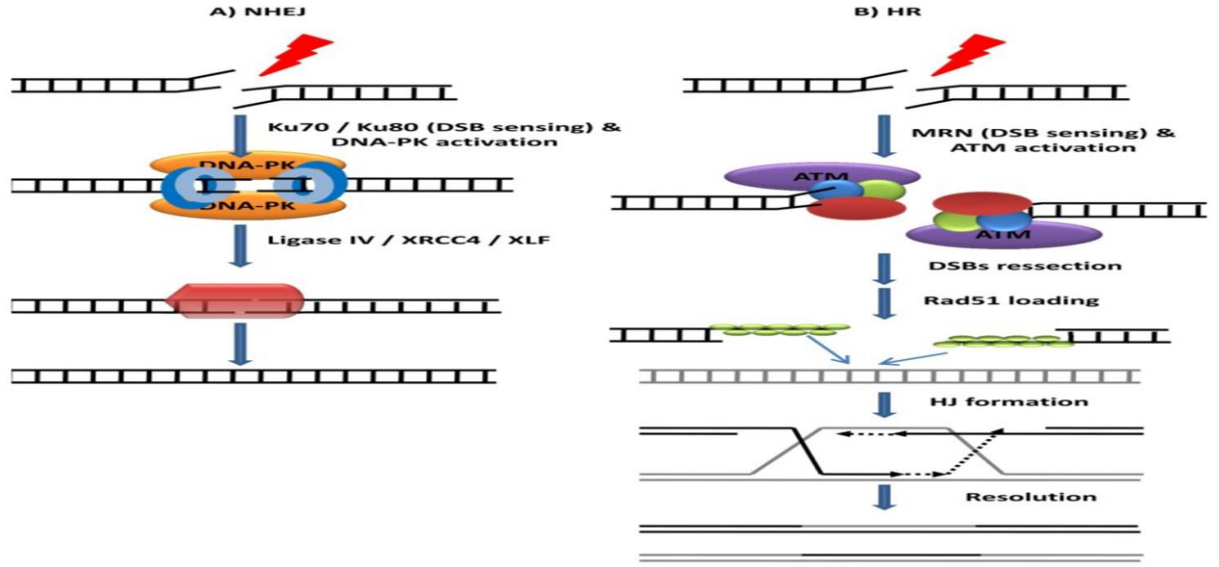
2.3.1 Programlanabilir Nükleazların Ortak Özellikleri

2.3.1.1 DNA Çift Zincir Kırıklarının Tamir Etmeleri

DNA'yı nadir kesen endonükleazlara hedef bölge tanıtılarak çift zincir kırığı oluşturulmuş ve böylece fare kök hücrelerinde homolog rekombinasyon oranının arttığı gözlemlenmiştir (Rouet, Smih ve Jasin 1994). Homolog rekombinasyon yaparken ya DNA kendisinin homoloğu olan DNA yı ya da dışarıdan donör olarak verilen sağlam DNAyı kullanmaktadır.

Çift zincir kırıkları homolog rekombinasyon yapacak donör DNA veya sağlam homolog DNA bulunmadığı durumlarda NHEJ (nonhomolog end joining, homolog olmayan uçların birleştirilmesi) tamir mekanizmayla tamir edilir (Bibikova ve ark. 2002). Bu tamir mekanizmanda DNA ligaz kırık uçları hiçbir işlem yapmadan birleştirmektedir. (Şekil 2.9).

Her iki tamir mekanizması da **gen engellenmesi, gen eklenmesi, gen düzeltilmesi ve kromozomun yeniden düzenlenmesi** gibi hedeflenmiş genetik modifikasyonlara neden olur.



Şekil 2.9 Çift zincir kırıklarının tamir mekanizmaları. A)NHEJ tamir mekanizması B) Homolog rekombinasyon tamir mekanizması (<http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/38812.pdf>).

2.3.1.2 Gen Engellenmesi

Gen knock-out (susturulması) genom düzenlenmesinin en basit şeklidir. NHEJ tamir mekanizmasını kullanarak hedeflenmiş bölgede insersiyon ve delesyonlar oluşması sağlanır. Bunun sonucunda genellikle frameshift (çerçeve kayması) mutasyonu oluşur ve genetik bilgi kesintiye uğrar. Böylece gen susturulmuş olur. Bu işlem için donör DNA içeren bir vektöre ihtiyaç yoktur.

Gen susturulması, organizmada ve hücrede gen fonksiyonu bulma çalışmalarında çok önemli bir yere sahiptir.

2.3.1.3 Gen İnsersiyonu

İlgilenilen geni genoma yerleştirmek için genellikle plazmid DNA'sı veya viral vektörler kullanılır. Bu metodlar kullanıldığında insersiyon bölgesi kontrol edilemez. Transgen ve onun düzenleyici sekansı istenmeyen bir bölgeye eklenebilir. Bu da hayati öneme sahip bir genin inaktivasyonuna veya protoonkogenin aktivasyonuna neden olabilir (Haccin-Bey-Abina ve ark. 2003).

Nükleazlar homolog rekombinasyonun etkisini arttırmakta ve bunu bölgeye spesifik olarak yapmaktadır. Böylece genin istenilen bölgeye yerleşmesi daha güvenli olmaktadır (Li ve ark. 2011, Doyon ve ark. 2011, Hockemeyer ve ark. 2011). Bu işlemi gerçekleştirmek için nükleaz ile birlikte eklenmek istenen geni ve kırık oluşturulan bölgenin homologunu içeren 'hedef vektör' trasfekte edilir.

Bu metod ayrıca genlerin ekspresyonunu izlemek için genlere reporter gen veya peptid tag (işaret) eklemek için kullanılmaktadır (Doyon ve ark. 2011).

2.3.1.4 Gen Doğrulama ve Nokta Mutasyonları

Hücrelere programlanabilir nükleazlar ve hedef vektör birlikte transfekte edildiğinde nokta mutasyonları düzeltilebilir ya da tek nükleotidten oluşan genetik varyasyonlar genoma tanımlanabilir (Bibikova ve ark. 2001, Bibikova ve ark. 2003, Porteus ve Baltimore 2003, Urnov ve ark. 2005).

Bu işlem hayvanlarda hastalık modeli oluşturmada da kullanılabilir (Cui ve ark. 2011, Wefers ve ark. 2013, Wang ve ark. 2013).

2.3.1.5 Kromozomların Yeniden Düzenlenmesi

Çift zincir DNA kırığı ile indüklenen DNA tamiri sırasında kromozomal değişimler veya yapısal varyasyonlar artış gösterebilir. Programlanabilir nükleazlarla hücrelerde veya tüm organizmada megabaz boyutunda insersiyon ve delesyonlar oluşturulabilir.

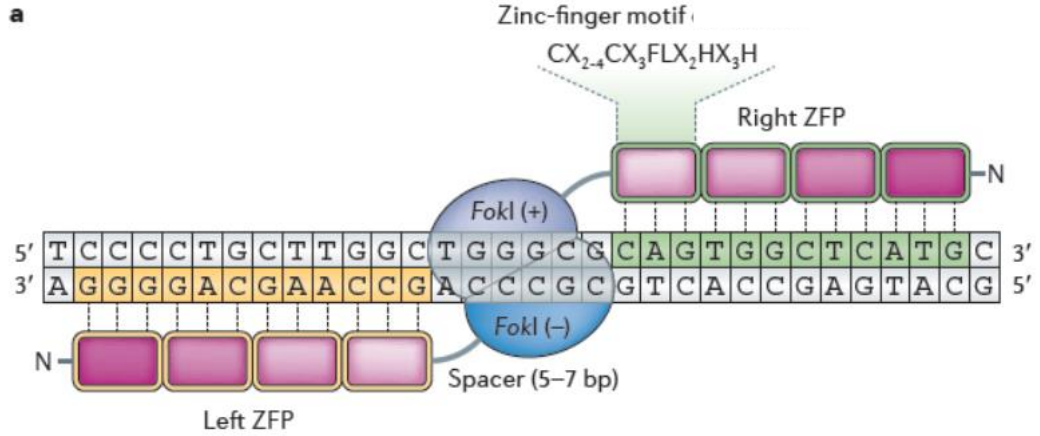
Böylece büyük kromozom değişimleriyle oluşan genetik bozuklukların düzeltilme olasılığı artmış olur. Eğer çift zincir kırığı iki farklı kromozomda meydana gelmişse kromozomal translokasyonlar oluşabilir. Bu translokasyonlar birçok kanser ilişkili mutasyonun temelinde bulunmaktadır. İstenmeyen kromozomal değişimler nükleazların yanlış hedefleri kesmesinden (off-target) kaynaklanmaktadır.

2.3.2 Programlanabilir Nükleazlar

2.3.2.1 Zinc Finger Nucleases (Çinko Parmak Nükleazlar, ZFN)

ZFN'ler virüs, bakteri, nematod, kurbağa, bitki, böcek, fare, sıçan, domuz gibi organizmalarda endojen gen modifiye edilmesinde ve kültüre edilmiş memeli hücrelerinde gen düzenlenmesi amacıyla kullanılmaktadır (Gaj ve ark. 2013, Urnov ve ark. 2010).

ZFN'ler iki domenden oluşurlar. Bunlar DNA-bağlanma çinko parmak protein domeni (ZFP) ve *Fok I* restriksiyon enziminden oluşan nükleaz domenidir (Kim, Cha ve Chandrasegaran 2006). ZFN oluşturulurken *FokI* enziminin DNA bağlanma domeni çıkartılmış onun yerine ZFP eklenmiştir. *Fok I* DNA da çift zincirli kırık oluşturabilmesi için dimerize haldedir ve *Fok I* restriksiyon enzimi 5-7 bç uzunluğunda bir parçayı genomdan keserek ayırır (Bitinaite ve ark. 1998). Bu dimerleşme tanıma bölgesinin uzun olması için gereklidir. Böylece ZFN'lerin spesifitesi artar. ZFN'lerin spesifitesi ZFP'ler tarafından belirlenir. ZFP'ler yüksek ökaryotik organizmalarda en çok bulunan DNA bağlanma motifi olan C2H2 zinc finger (çinko parmak) motifi içerir. (Tupler ve ark. 2001). Her bir zinc finger 3 bazçifti DNA sekansını tanır ve 3-6 tane zinc-finger motifi 9-18 bç DNA sekansına bağlanacak olan tek bir ZFN alt birimini oluşturmak için kullanılır (Desjarlais ve Berg 1992, Rebar ve Pabo 1994). Zinc finger nükleazlar genellikle guanin nükleotidi bakımından zengin ve 5'- GNN- 3' tekrar sekansı içeren hedef bölgelerde başarılı olurlar (Kim ve ark. 2009) (Şekil 2.10).



Şekil 2.10 Zinc-finger nükleaz(ZFN) çiftinin sistematik gösterimi (Carroll ve ark. 2011).

2.3.2.2 Transcriptional Activator-like Effector Nucleases (Transkripsiyonel Aktivatör Benzeri Efektör Nükleazlar, TALEN)

TALEN'ler virüs, maya, nematod, kurbağa, bitki, böcek, fare, rat, domuz gibi organizmalarda endojen gen modifiye edilmesinde ve kültüre edilmiş memeli hücrelerinde gen düzenlenmesi amacıyla kullanılmaktadır (Gaj ve ark. 2013, Segal ve Meckler 2013, Sun ve Zhao 2013, Joung ve Sander 2013).

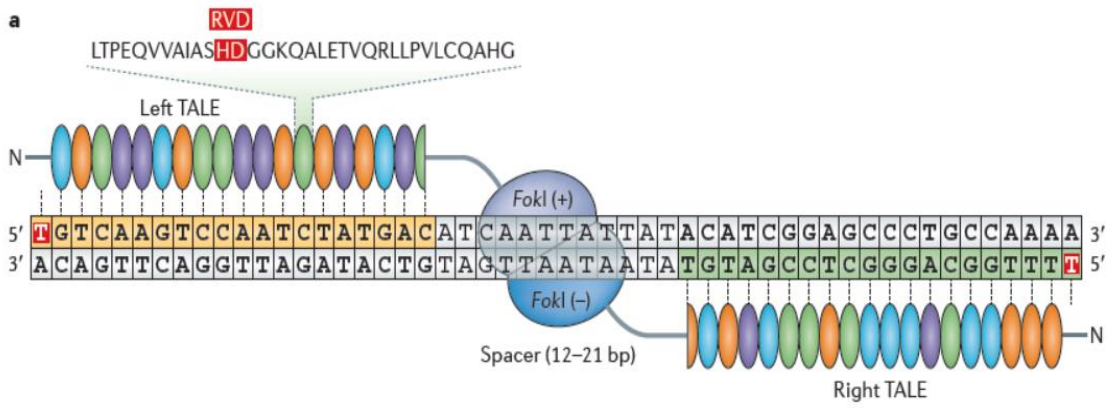
TALEN'ler zing finger nükleazlara yapı organizasyonu bakımından benzer (Miller ve ark. 2011). TALEN'ler de zinc finger nükleazlar gibi karboksi uçlarında *FokI* nükleaz domeni bulundurlar. Fakat TALEN 'lerde Transcriptional Activator-like Effector (Transkripsiyonel Aktivatör Benzeri Efektör, TALE) olarak bilinen ve bitki patojeni olan *Xanthomonas spp.* bakterisinden elde edilen farklı sınıf DNA bağlanma domeni kullanılır (Li ve ark. 2013, Doyle ve ark. 2013).

TALE'ler 33-35 aminoasid tekrarlarının arka arkaya dizilmesiyle oluşurlar. Her bir aminoasid DNA da bir bazçiftini tanır (Mak ve ark. 2012, Deng ve ark. 2012). Tekrar domenindeki nükleotid spesifitesi 12 ve 13. pozisyonda bulunan ve repeat variable diresidues (RVDs) olarak adlandırılan iki aminoasit tarafından belirlenir (Boch ve ark. 2009, Moscou ve Bogdano 2009). Guanin, adenin, sitozin ve timin bazlarını tanıması

için farklı RVD modülü yaygın olarak kullanılır. Bunlar; Asn-Asn, Asn-Ile, His-Asp ve Asn-Gly modülleridir.

TALEN'lerin herhangi bir DNA sekansına göre dizayn edilebilmesi, diğer nükleazlarla karşılaştırıldığında avantaj olarak görülmektedir. Örneğin; küçük DNA sekansları (enhancerlar ve miRNA kodlayan sekanslar gibi) hedef bölge bakımından ZFN ve RGEN'ler ile mutasyona uğratılamazlar fakat TALENler kullanılarak kolayca mutasyona uğratılabilirler.

TALENlerin dizayn edilmesindeki tek zorluk hedef sekansın 5' ucunda iki amino-terminal şifreli tekrar içeren katlanmalar tarafından tanınan timin nükleotidine ihtiyaç duyulmasıdır (Mak ve ark. 2012).



Şekil 2.11 TALEN çiftinin sistematik gösterimi (Mak ve ark. 2012).

2.3.2.3. RNA-guided Engineered Nucleases(RNA rehberli tasarlanmış nükleazlar) veya CRISPR/Cas sistemi (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)(DNA’da düzenli olarak bulunan ve palindromik tekrarlarla aralara serpiştirilmiş diziler)

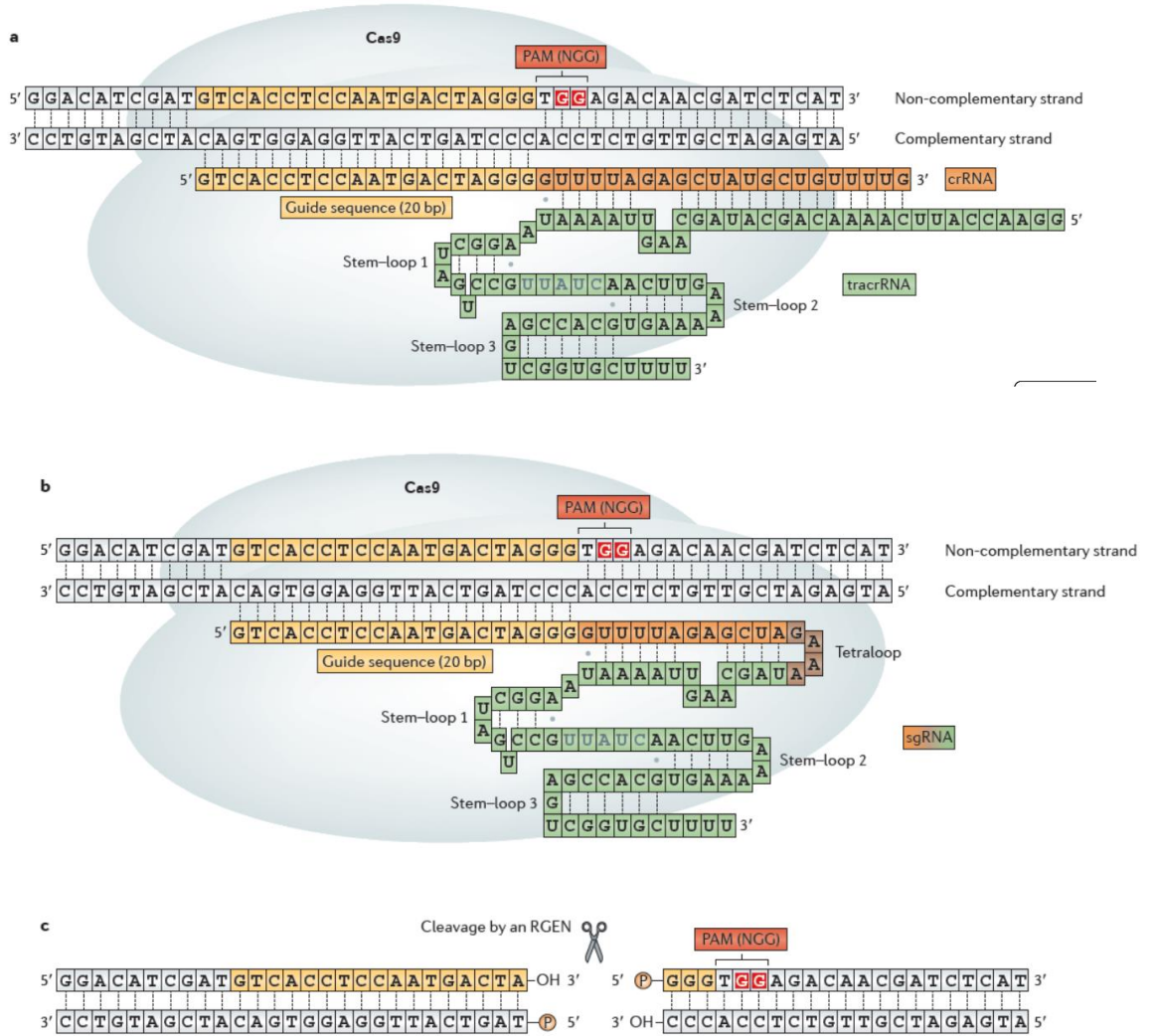
Başlangıçta bu RNA rehberli sistemler, bakteri, zebra balığı embriyosu ve memeli hücrelerinde hedeflenmiş mutasyonu indüklemek için kullanılmıştır. Daha sonra RGEN’lerin genom düzenlenmesinde kullanımı bitki, nematod, meyve sineği, fare, sıçan, insan olamayan primat ve insan pluripotent kök hücreleri gibi birçok organizmada artmıştır (Li 2013, Nekrasov ve ark. 2013, Shan ve ark. 2013, Friedland ve ark. 2013, Dickinson ve ark. 2013, Cho ve ark. 2013, Gratz ve ark. 2013, Li ve ark. 2013, Sung ve ark. 2014, Shen ve ark. 2013. Li ve ark. 2013, Niu ve ark. 2014, Ding ve ark. 2013, Wang ve ark. 2013, Mali ve ark. 2013).

RNA rehberli DNA kırıcı sistem, arkelerde ve bakterilerde faj ve plasmidlere karşı adaptif bağışıklık sistemi oluşmasını sağlar (Makarova ve ark. 2006, Barrangou ve ark. 2007). Bu organizmalar karşılaştıkları faj ve plasmid DNA’larının genellikle 20 bç uzunluğundaki parçalarını (protospacer) kendi genomlarına CRISPR formunda entegre ederler.

CRISPR/Cas sisteminde bu CRISPR alanları pre-CRISPR RNA (pre-crRNA) olarak transkribe edilir ve hedefe özgün crRNA(crispr RNA) oluşturmak için işlenir. Ayrıca lokustan hedeften bağımsız olarak *trans*-activating crRNA (tracrRNA) transkribe edilir. *Trans*-activating crRNA (tracrRNA) da pre-crRNA işlenmesine katkıda bulunur (Deltcheva ve ark. 2011).

Daha sonra genellikle dualRNA–Cas9 olarak adlandırılan aktif DNA endonükleazı oluşturmak için crRNA ve tracrRNA birlikte CRISPR-associated protein 9 (Cas9) ile kompleks oluşturular (Jinek ve ark. 2013). Sonuç olarak endonükleaz 23 bç uzunluğundaki hedef DNA sekansını çift zincirli olarak kırar. Bu 23 bç’nin 20 si crRNA’daki rehber sekansın hedef sekanstaki karşılığı (protospacer) , 3’ü ise *Streptococcus pyogenes* bakterisinden elde edilen DNA da çift zincir kırık oluşturan Cas9 proteinin tanıdığı 5’-NGG-3’ nükleotidlerinden oluşan protospacer adjacent motif

(PAM) sekansıdır (Hsu ve ark. 2013, Mali ve ark. 2013, Mojica ve ark. 2009) (Şekil 2.12).



Şekil 2.12 RNA-guided engineered nucleases (RGENs) şematik gösterimi (Hyongbum Kim ve Jin-Soo Kim 2014).

3.MATERYAL VE YÖNTEM

3.1Hücre Kültürü

3.1.1 Hücre Materyali

Çalışmada kullanılan CV1 (makak maymunu böbrek fibroblast) hücreleri Max Plack Institute for Evolutionary Biology de doktora sonrası araştırmacı olarak çalışan Cemalettin Bekpen tarafından sağlanmıştır. Çalışmalar sadece laboratuvar koşullarında yapılmıştır.

3.1.2Donmuş Hücrelerden Kültür Yapılması

- Cemallettin Bekpen tarafından -80°C sıvı azot tankında saklanan 1 ml CV1 hücre süspansiyonu -80 °C den alınıp hücre kültürü laboratuvarına getirilmiştir. Hücre süspansiyonunun erimesi sağlanmıştır. Eriyen hücre süspansiyonu içinde 10 ml DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium), yüksek glukoz, pirüvat (gibco)besiyeri bulunan 20 ml hacmindeki falkona konmuştur. Böylece hücreler çözdürülmüştür.
- Çözünen hücreler Ependorf Centrifuge 5810 R cihazında 300 g de 4 °C derecede 5 dk santrifüj edilmiştir Santrifüjden sonra süpernatant atılıp geriye kalan pelet 4ml DMEM, yüksek glukoz, pirüvat (gibco) besiyerinde pipetaj ile çözdürülmüştür.

Çözdürülen hücreler içinde 10 ml DMEM, yüksek glukoz, pirüvat (gibco) mediumu bulunan 75 cm'lik flaslara alınmıştır. Flaslardaki hücreler Leica ışık mikroskobu ile gözlenmiştir.

Hazırlanan kültürler %5 CO₂ li 37 °C etüvde saklanmıştır.

3.1.3 Hücrelerin Pasajlanması

37 °C ,%5 CO₂ li etüvde üreyen hücreler pasajlanmıştır. Etüvden çıkarılan 75 cmlik flasklar önce ışık mikroskobunda kontrol edilmiştir. Doluluk oranı %80 nin üzerinde olan hücre kültürleri seyreltilerek pasajlanmıştır.

Pasajlama işlemi şu şekilde yapılmıştır:

Flask güvenilir kabine alındıktan sonra kapağı açılıp vakum makinesiyle içindeki DMEM, yüksek glukoz, pirüvat (gibco) besiyeri flasktan uzaklaştırılmıştır.

Flasktaki hücreler 10ml DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) (without Ca, Mg)(PAN) ile 2 kere yıkanmıştır.

Hücreleri yüzeyden kaldırmak amacıyla 4 ml tripsin (%0,05 tripsin-EDTA(1-X)-fenol red) (gibco) eklenmiş ve 37 °C %5 CO₂ li etüvde 5 dk bekletilmiştir.

Etüvden çıkarılmış hücre kültürü ışık mikroskobunda incelendikten ve hücrelerin yüzeyden kalktığı saptandıktan sonra tripsinin reaksiyonunu sonlandırmak amacıyla tripsin (%0,05 tripsin-EDTA(1-X)-fenol red) (gibco) oranının 2 katı olacak şekilde 8 ml DMEM, yüksek glukoz, pirüvat (gibco) besiyeri eklenmiştir.

Flaskın içinde 12 ml olan hücre süspansiyonu 20ml hacmindeki falkona alınarak, hücreler ile DMEM, yüksek glukoz, pirüvat (gibco) ve tripsin (%0,05 tripsin-EDTA(1-X)-fenol red) (gibco) karışımını ayırmak için 300 g de 4 °C'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra süpernatant atılıp, geriye kalan pelet 4ml DMEM, yüksek glukoz, pirüvat (gibco) besiyerinde pipetaj ile çözdürülmüştür.

Çözdürülen hücrelerin 1ml si alınarak 1/4, seyreltme olacak şekilde içinde 10 ml DMEM, yüksek glukoz, pirüvat (gibco) mediumu bulunan 75 cm'lik flasklara alınmıştır (duruma göre 1/2, 1/10 vb. seyreltmeler de yapılmıştır). Seyreltme oranını bulmak için hücre sayımı yapılmıştır. 1milyon hücre olan bir süspansiyondan 250.000 hücre olacak şekilde pasajlama yapılmıştır. Hazırlanan kültürler %5 CO₂ li 37 °C etüvde saklanmıştır.

3.1.4 Hücrelerin sayılması

İçinde bulunan hücrelerin sayısını tespit etmek istediğimiz flask güvenilir kabine alındıktan sonra kapağı açılıp vakum makinesiyle içindeki DMEM, yüksek glukoz, pirüvat (gibco) besiyeri flasktan uzaklaştırılmıştır.

Flasktaki hücreler 10ml DPBS (without Ca, Mg) (PAN) ile 2 kere yıkanmıştır.

Hücreleri yüzeyden kaldırmak amacıyla 4 ml tripsin (%0,05 tripsin-EDTA(1-X)-fenol red) (gibco) eklenmiş ve 37 °C %5 CO₂ li etüvde 5 dk bekletilmiştir.

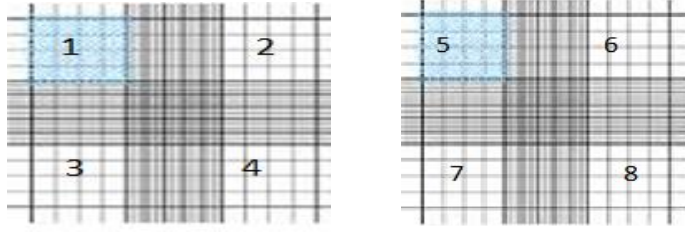
Etüvden çıkarılmış hücre kültürü ışık mikroskopunda incelendikten ve hücrelerin yüzeyden kalktığı saptandıktan sonra tripsinin reaksiyonunu sonlandırmak amacıyla tripsin oranının 2 katı olacak şekilde 8 ml DMEM, yüksek glukoz, pirüvat (gibco) besiyeri eklenmiştir.

Flaskın içinde 12 ml olan hücre süspansiyonu, 20ml hacmindeki falkona alınarak hücreler ile DMEM, yüksek glukoz, pirüvat (gibco) ve tripsin karışımını ayırmak için 300 g de 4 °C de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra süpernatant atılıp, geriye kalan pelet 4ml DMEM, yüksek glukoz, pirüvat (gibco) mediumunda pipetaj ile çözdürülmüştür.

Bir endorff tüpü alınıp içine 20 µl tripan blue (sigma) çözeltisi ve 20 µl hücre süspansiyonu eklenmiştir ve 37 °C %5 CO₂ li etüvde 2 dk bekletilmiştir.

Hemositometrenin olukları arasına 10µl alttan 10µl üstten olmak üzere karışım yüklenmiştir.

Işık mikroskopunda küçük karelerin etrafındaki büyük 8 kare sayılıp 2x1.000.000 ile çarpılarak 1ml deki toplam hücre sayısı bulunmuştur.



Şekil 3.1 Hemositometre

3.1.5 Hücrelerin DNA izolasyonuna hazırlanması

DNASını almak istediğimiz hücrelerin bulunduğu flask güvenilir kabine alındıktan sonra kapağı açılıp vakum makinesiyle içindeki DMEM, yüksek glukoz, pirüvat (gibco) besiyeri flasktan uzaklaştırılmıştır.

Flasktaki hücreler 10ml DPBS (without Ca, Mg) (PAN) ile 2 kere yıkanmıştır.

Hücreleri yüzeyden kaldırmak amacıyla 4 ml tripsin (%0,05tripsin-EDTA(1-X)-fenol red) (gibco) eklenmiş ve 37 °C %5 CO₂ li etüvde 5 dk bekletilmiştir.

Etüvden çıkarılmış hücre kültürü ışık mikroskopunda incelendikten ve hücrelerin yüzeyden kalktığı saptandıktan sonra tripsinin reaksiyonunu sonlandırmak amacıyla tripsin oranının 2 katı olacak şekilde 8 ml DMEM, yüksek glukoz, pirüvat (gibco) besiyeri eklenmiştir.

Flaskın içinde 12 ml olan hücre süspansiyonu 20ml hacmindeki falkona alınarak, hücreler ile DMEM, yüksek glukoz, pirüvat (gibco) ve tripsin karışımını ayırmak için 300 g de 4 °C derecede 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra süpernatant atılıp, geriye kalan pelet üzerine 5ml DPBS (without Ca, Mg) (PAN) eklenip pipetaj ile çözdürülmüştür. DPBS (without Ca, Mg) (PAN) te çözünen hücreler 300 g de 4 °C de 5 dk tekrar santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılıp pelet, DNA izolasyonu yapılana kadar -20 °C dolapta saklanmıştır.

3.1.6 Hücrelerin dondurulması

İşlem uygulanmayacak hücreler daha sonra kullanmak amacıyla dondurulmuştur.

Dondurma işlemi için kullanılan 1ml hacimli tüpler önceden üzerine hücrelerin isimleri ve tarih yazılarak buzda bekletilmiştir.

Ayrıca önceden dondurma solüsyonu hazırlanmıştır. Dondurma solüsyonu içinde % 5 oranında DMSO (sigma) bulunan DMEM besiyeridir. 14 ml DMEM, yüksek glukoz, pirüvat (gibco) besiyerine 700µl DMSO (sigma) 20ml hacmindeki falkona konularak hazırlanmıştır. Dondurma solüsyonu filtreden geçirildikten sonra 20ml hacmindeki falkona alınarak buzda bekletilmiştir.

Dondurma solüsyonu hazırlandıktan sonra, dondurmak istediğimiz hücrelerin bulunduğu flask güvenilir kabine alınmış, sonra kapağı açılıp vakum makinesiyle içindeki DMEM, yüksek glukoz, pirüvat (gibco) besiyeri flasktan uzaklaştırılmıştır.

Flasktaki hücreler 10ml DPBS (without Ca, Mg) (PAN) ile 2 kere yıkanmıştır.

Hücreleri yüzeyden kaldırmak amacıyla 4 ml tripsin (%0,05tripsin-EDTA(1-X)-fenol red) (gibco) eklenmiş ve 37 °C %5 CO₂ li etüvde 5 dk bekletilmiştir.

Etüvden çıkarılmış hücre kültürü ışık mikroskopunda incelendikten ve hücrelerin yüzeyden kalktığı saptandıktan sonra tripsinin reaksiyonunu sonlandırmak amacıyla tripsin oranınının 2 katı olacak şekilde 8 ml DMEM, yüksek glukoz, pirüvat (gibco) besiyeri eklenmiştir.

Flaskın içinde 12 ml olan hücre süspansiyonu 20ml hacmindeki falkona alınarak, hücreler ile DMEM ve tripsin karışımını ayırmak için 300 g de 4 °C de 5 dk santrifüj edilmiştir.

Santrifüjden sonra süpernatant atılıp, geriye kalan pelete 800µl dondurma solüsyonu eklenip pipetaj ile çözdürülmüştür ve buzda bekletilen 1 ml lik tüplere aktarılmıştır.

Hücre solüsyonunun bulunduğu tüpler içinde izopropanol bulunan kutulara konularak -80 °C buzdolabında 24 saat saklanmıştır. 24 saat sonra tüpler kutudan çıkarılıp -180°C olan sıvı azot tankında daha sonra kullanılmak üzere saklanmıştır.

3.2. px330 CRISPR /CAS Vektörünün Hazırlanması

Addgene firmasından sağlanan px330 CRISPR /CAS Vektörünün transfeksiyona hazırlanması üretici firma tarafından gönderilen px330 vektörü CRISPR Genom Engineering toolbox Target Sequence Cloning Protocol 'üne göre yapılmıştır (Şekil 3.2).

Bu işlemler Max Plack Institute for Evolutionary Biology de doktora sonrası araştırmacı olarak çalışan Cemalettin Bekpen tarafından yapılmıştır.

Öncelikle Morpheus geninin 4. Exonunun PAM (NGG) dizisine göre oligolar dizayn edilmiş ve oligolar Eurofins Genomic firmasından sağlanmıştır.

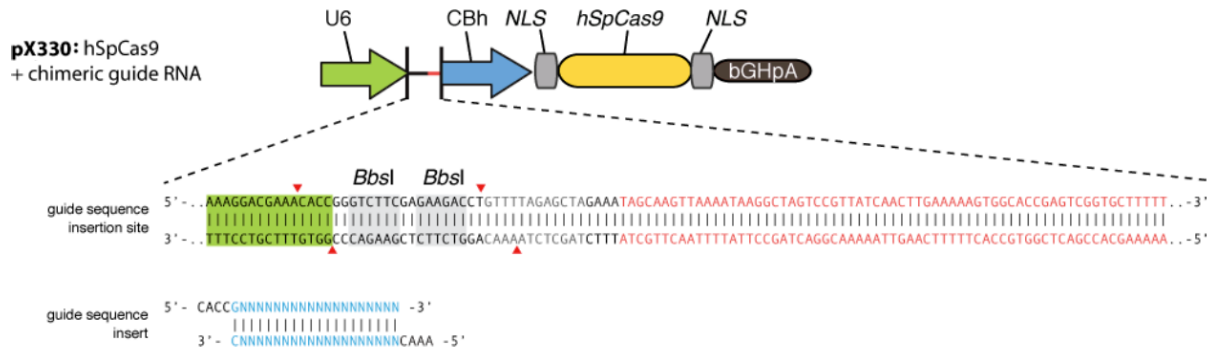
Sekans (5'den 3'e)

>RhNPIP exon 4 ileri primeri

caccgtggaagacctctttacttca

>RhNPIP exon 4 geri primeri

aaactgaagtaagaggcttccac



Şekil 3.2 px330 CRISPR/Cas vektörünün şematik gösterimi

3.2.1.px330 vektörünün *BbsI* restriksiyon enzimi ile kesilmesi.

200 µL steril PZR tüpünün içerisinde 1µg pX330 vektörü, 1µl FastDigest *BbsI*(Fermentas), 1µl FastAP (Fermentas), 2µl 10X FastDigest Buffer, 15µl ddH₂O son hacim 20µl olacak şekilde karıştırılmıştır. 30 dk 37°C de Applied Biosystem veriti 96 well fast thermal cyler cihazı kullanılarak vektörün kesim işlemi yapılmıştır ve %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür.

3.2.2.Kesilmiş px330 vektörünün jelden saflaştırılması

Kesilen bantlar “Qiagen QIAquick Gel Extraction Kit” kullanılarak üreticinin tavsiye ettiği şekilde jelden temizlenmiştir.

Kesilen Jel parçası tartılarak, 3 birim tampon QG 1 birim jele eklenmiştir (100mg~100µL). Tüp 10 dk 50 °C’de inkübe edilmiştir (jel tamamen çözünene kadar). 1 birim izopropanol eklenerek karıştırılmıştır. DNA’nın bağlanması için, örnekler QIAquick kolonuna yüklenmiş ve 1 dk 13 000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Akışkan kısım atılarak, QIAquick kolon tekrar aynı toplama tüplerinin içine yerleştirilmiştir. 0,5 mL tampon QG, QIAquick tampona eklenerek 1 dk 13 000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Yıkamak için, 0,75 mL tampon PE QIAquick kolona eklenmiş ve 13 000 rpm’de 1 dk santrifüj yapılmıştır. Akışkan kısım atılarak, QIAquick kolon 1 dk daha 13 000 rpm’de santrifüj edilmiştir. QIAquick kolon 1,5 mL’lik temiz mikrosantrifüj tüplerine yerleştirilmiş ve DNA’yı ayırtmak için 50 µL tampon EB, QIAquickmembran’ın ortasına eklenerek 1 dk santrifüj yapılmıştır.

3.2.3.Oligoların fosforile edilip çift zincirli hale getirilmesi

Dizayn edilen ve addgene firmasından alınan oligolar kesilen vektör ile birleştirilmeden önce fosforile edilip çift zincirli hale getirilmiştir.

200 µL steril PZR tüpünün içerisinde 1µl oligo 1 (caccgtggaagacctttacttca) (100mM) , 1µl oligo 2 (aaactgaagtaaagggtttccac) (100mM), 1µl 10X T4 Ligation Buffer

(NEB), 6.5µl ddH₂O, 0.5µl T4 PNK (NEB) son hacim 10µL olacak şekilde karıştırılmıştır.

Reaksiyonun gerçekleşmesi için Applied Biosystem veriti 96 well fast thermal cyler cihazı kullanılarak PZR tüpleri 37°C 'de 30 dk, 95°C' de 5 dk, 25 °C'de 5dk beketilmiştir.

3.2.4 Oligoların Vektör ile Ligasyonu

200 µL steril PZR tüpünün içerisinde 1 µl *Bbs*I restriksiyon enzimi ile kesilmiş px330 vektörü (50 ng) , 1µl fosforile edilip çift zincirli hale getirilen oligo çifti (1:200 dilisyon), 5µl 2X Quick Ligation Buffer (NEB), 3 µl ddH₂O, 1µl Quick Ligase (NEB) son hacim 11µl olacak şekilde karıştırılmıştır ve oda sıcaklığında 10 dk inkübe edilmiştir.

3.2.5 Ligasyon Reaksiyonunun İstenmeyen Rekombinasyon Ürünlerinden Kurtulmak İçin Pasmidsafe exonükleaz ile Muamele Yapılması

200 µL steril PZR tüpünün içerisinde 11µl ligasyon reaksiyonu, 1.5 µl PlasmidSafe Buffer, 1.5 µl 10 mM ATP, 1 µl ddH₂O son hacim 15µl olacak şekilde karıştırılmıştır ve Applied Biosystem veriti 96 well fast thermal cyler cihazı kullanılarak 37°C 'de 10 dk inkübe edilmiştir.

3.2.6 px330 Vektörünün *E.Coli* 'ye Trasformasyonu

E. coli DH5- α (invitrogen TOP10 chemically competent cell) kompetan hücrelerine px330 vektörü üreticinin tavsiye ettiği şekilde aktarılmıştır.

50µL *E. coli* DH5- α (invitrogen TOP10 chemically competent cell) kompetan hücre üzerine 5 µL ligasyon ürünü eklenmiştir.

Karışım 30 dk buzda bekletildikten sonra 42 °C'de 1dk ısı şoku uygulanmıştır. Karışım 1 dk buzda bekletildikten sonra üzerine 250 µl SOC (invitrogen) besi yeri eklenmiştir. Daha sonra hücreler 37 °C 250 rpm çalkalamalı etüvde 1,5 saat büyütülmüştür ve

ampisilin içeren LB agar besiyerine ekilerek gece boyunca 37 °C etüvde'de büyümüştür. Koloniler rastgele seçilerek hücrelerden plazmit izolasyonu yapılmıştır.

3.2.7 Maxi Plasmid izolasyonu

Plazmid izolasyonu "Qiagen EndoFree Plasmid Maxi Kit" kullanılarak üreticinin tavsiye ettiği şekilde yapılmıştır.

2 mL bakteri kültürü alınıp 15 dk 6000g 4°C'de santrifüj edilerek toplanmıştır. Santrifüj sonrası üstte kalan sıvı dökülerek, tüp ters düz edilmiş ve fazlalık oluşturan maddeleri uzaklaştırmak için kâğıt havlu ile kurutulmuştur. Tüpe tampon P1 (10ml) eklenerek ve hücre peleti vorteks yapılarak tamamen akıcı hale getirilmiştir. Tampon P2 (10ml) eklenerek ve tüp dört kere yavaşça ters düz edilerek karıştırılmış, yaklaşık 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Örneklere buzda bekletilmiş tampon P3(10ml) eklenerek, dört sefer ters düz edilerek karıştırılmıştır. Lizat Qiafilter kartuşuna dökülmüş ve oda sıcaklığında 10dk bekletilmiştir. Lizat 50ml lik falkona filtre edilmiştir. 2,5ml tampon ER eklenmiş ve on kere ters düz edilerek karıştırılmıştır ve 30 dk buzda bekletilmiştir.

Boş 50 ml lik falkona kolon yeleştirilmiştir ve kolonun ıslanması için 10ml tampon QBT eklenmiştir. Kolona lizat yüklenmiştir ve 2 kere 30ml tampon QC eklenip kolona bağlanması sağlanmıştır. Kolon çıkarılıp başka 20 ml lik boş falkona alınmıştır ve 15ml tampon QN eklenip DNA'nın kolondan falkona geçmesi sağlanmıştır. Kolon çıkarılıp falkona 10,5 ml %100'lük isopropanol eklenmiştir ve 4 °C, 15000 g'de 30 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılıp kitte bulunan endotoxin free ile hazırlanmış oda sıcaklığında %70 lik EtOH eklenmiştir ve 4 °C, 15000 g'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılıp oda sıcaklığında 5-10dk kurumaya bırakılmıştır.

Kuruyan örneklerin üzerine DNA'yı ayrıştırmak için 20µL endotoxin free tampon eklenerek Nanodrop ile DNA konsantrasyonları ölçülmüştür. İzole edilen plazmitlerin Sanger sekanslama metodu ile sağlanması yapılmıştır.

3.3. Morpheus Gen Dizisi Taşıyan px330 CRISPR /CAS Vektörünün CV1 Hücrelerine Transfeksiyonu

Transfeksiyon ‘‘Lonza Nükleofection Amaxa Kit’’ kullanılarak üreticinin tavsiye ettiği şekilde yapılmıştır.

İçinde CV1 hücre kültürü olan ve px330 vektörünün transfeksiyonunu yapmak istediğimiz istediğimiz flask güvenilir kabine alındıktan sonra kapağı açılıp vakum makinesiyle içindeki DMEM, yüksek glukoz, pirüvat (gibco) besiyeri flasktan uzaklaştırılmıştır.

Flasktaki hücreler 10ml DPBS (without Ca, Mg) (PAN) ile 2 kere yıkanmıştır.

Hücreleri yüzeyden kaldırmak amacıyla 4 ml tripsin (%0,05tripsin-EDTA(1-X)-fenol red) (gibco) eklenmiş ve 37 °C %5 CO₂ li etüvde 5 dk bekletilmiştir.

Etüvden çıkarılmış hücre kültürü ışık mikroskopunda incelendikten ve hücrelerin yüzeyden kalktığı saptandıktan sonra tripsinin reaksiyonunu sonlandırmak amacıyla tripsin oranının 2 katı olacak şekilde 8 ml DMEM, yüksek glukoz, pirüvat (gibco) besiyeri eklenmiştir.

Flaskın içinde 12 ml olan hücre süspansiyonu, 20ml hacmindeki falkona alınarak hücreler ile DMEM, yüksek glukoz, pirüvat (gibco) ve tripsin karışımını ayırmak için Ependorf Centrifuge 5810 R cihazında 300 g de 4 °C de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra süpernatant atılıp, geriye kalan pelet 4ml DMEM, yüksek glukoz, pirüvat (gibco) mediumunda pipetaj ile çözdürülmüştür.

Hücre sayımı yapılmıştır.

Bir ependorf tüpü alınıp içine 20 µl tripan blue (sigma) çözeltisi ve 20 µl hücre süspansiyonu eklenmiştir ve 37 °C %5 CO₂ li etüvde 2 dk bekletilmiştir.

Hemositometrenin olukları arasına 10µl alttan 10µl üstten olmak üzere karışım yüklenmiştir.

Işık mikroskopunda küçük karelerim etrafındaki büyük 8 kare sayılıp 2x1.000.000 ile çarpılarak 1ml deki toplam hücre sayısı bulunmuştur.

Hücre solüsyonunda 1 milyon hücre olacak şekilde dilisyon yapılmıştır ve 300 g de 4 °C de 5 dk santrifüj edilmiştir.

1,5 ml lik ependorf tüpte her reaksiyon için 82µl Nucleofactor™ Solution 18 µl Supplement, 5 µl px330 vektörü (1 µg / µl), 5 µl delition prob karıştırılıp santrifüj edilen hücrelerin bulunduğu falkona konmuştur. Hücreler bu karışım ile pipetaj yapıp iyice çözüldükten sonra hava kabarcığı olmayacak şekilde kuvete aktarılıp kuvetin kapağı kapatılmıştır. Kuvet Lonza Nucleofactor™ 2b cihazına yerleştirilip A-033 programı seçilmiştir.

Delition probunun sekansı aşağıda belirtilmiştir. Buna göre gölgelendirilmiş A ve T nükleotidlerinin arasında normalde bir C nükleotidi bulunurken deletion probunda bu nükleotid bulunmamaktadır.

5'-TCCAGGAATTA AAAATTGGCCTGGAAGACCTCTTTATTCATGGAGATATAT
GGAAGCCAAAGTTCGAGCTGAGGTCCATA-3'

Ayrıca aynı işlem reaksiyona delition prob konulmadan da yapılmıştır. Lonza Nucleofactor™ 2b cihazında transfeksiyon işlemi tamamlandıktan sonra hücre solüsyonudamlalıkla 24 kuyucuklu platelere alınmıştır. Kuyucukların her birine 1 ml DMEM, yüksek glukoz, pirüvat (gibco) besiyeri konulup dilisyon yapılmıştır. Kuyucuktaki hücre solüsyonu pipet yardımı ile alınarak içimde 10 ml DMEM, yüksek glukoz, pirüvat (gibco) besiyeriu bulunan 75 cm 'lik flaslara konmuştur. Hücrelere kültür oluşturmaları için 48 saat hiçbir işlem yapılmamıştır. 37 °C %5 CO₂ li etüvde 5 dk bekletilmiştir.

3.4. Mikroskop ile Hücrelerin Morfolojik Olarak İncelenmesi

Transfeksiyon yapılan hücreler transfeksiyondan 72 saat sonra Leica ışık mikroskobu ile morfolojik olarak incelenmiştir. Ayrıca Las ez bilgisayar programı kullanılarak hücrelerin fotoğrafları çekilmiştir.

3.5. İmmüno Floresan Deneyi

İmmüno floresans görüntülenme yapılmadan önce transfeksiyon yapılan CV1 hücreleri ve kontrol hücreleri 24 well plate'e aktarılmıştır.

İmmüno floresans görüntüleme yapmak istediğimiz hücrelerin bulunduğu flask güvenilir kabine alındıktan sonra kapağı açılıp vakum makinesiyle içindeki DMEM, yüksek glukoz, pirüvat (gibco) besiyeri flasktan uzaklaştırılmıştır.

Flasktaki hücreler 10ml DPBS (without Ca,Mg) (PAN) ile 2 kere yıkanmıştır.

Hücreleri yüzeyden kaldırmak amacıyla 4 ml tripsin (%0,05tripsin-EDTA(1-X)-fenol red) (gibco) eklenmiş ve 37 °C %5 CO₂ li etüvde 5 dk bekletilmiştir.

Etüvden çıkarılmış hücre kültürü ışık mikroskobunda incelendikten ve hücrelerin yüzeyden kalktığı saptandıktan sonra tripsinin reaksiyonunu sonlandırmak amacıyla tripsin oranının 2 katı olacak şekilde 8 ml DMEM, yüksek glukoz, pirüvat (gibco) besiyeri eklenmiştir.

Flaskın içinde 12 ml olan hücre süspansiyonu, 20ml hacmindeki falkona alınarak hücreler ile DMEM, yüksek glukoz, pirüvat (gibco) ve tripsin karışımını ayırmak için Ependorf Centrifuge 5810 R cihazında 300 g de 4 °C de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra süpernatant atılıp, geriye kalan pelet 4ml DMEM, yüksek glukoz, pirüvat (gibco) mediumunda pipetaj ile çözdürülmüştür.

24 well plate içindeki her bir kuyucuğa 500µl DMEM, yüksek glukoz, pirüvat (gibco) eklenip her bir kuyucuğun içine lamel konulmuştur. Lamellerin kuyucuk tabanına yapışabilmesi için pipet yardımıyla bastırılmıştır.

Kuyucukların içine görüntüleme yapmak istenilen hücre süspansiyonundan 50 µl konulmuştur.

İmmüno floresans deneyi kontrollü olarak yapılmıştır. Kontrol için CV1 hücrelerine sadece prob ile transfeksiyon uygulanmıştır. Diğer kontrol ise hiçbir işlem yapılmamış CV1 hücreleri ile yapılmıştır. Mutasyonlu hücreler ise sadece px330 vektör transfeksiyonu yapılan CV1 hücreleri ve px330 vektörü ile birlikte delesyon probu transfeksiyonu yapılan CV1 hücreleridir.

24 well plateteki hücreler 24 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra protein ekspresyonunun UV ışığı uygulanan ve uygulanmayan hücrelerdeki farkını görmek amacıyla kuyucukların bir kısmına 200 µjoule UV ışığı uygulanmıştır.

UV ışığı uygulamasından sonra her iki well plate de fiksasyon işlemi uygulanmıştır.

Kuyucukların içindeki DMEM, yüksek glukoz, pirüvat (gibco) besiyeri vakum makinesi ile uzaklaştırıldıktan sonra her bir kuyucuğa 500µl -20 °C de bekletilen soğuk metanol eklenip 24well plateler 10dk -20 °Cda bekletilmiştir. Daha sonra metanol kuyucuklardan vakum makinesiyle uzaklaştırılmıştır ve lamellerin kuruması için 5 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir.

Kuruyan kuyucuklar 4kere 1ml DPBS (without Ca,Mg) (PAN) ile yıkanmıştır

Kuyucukların içindeki DPBS (without Ca,Mg) (PAN) uzaklaştırıldıktan sonra her bir kuyucuğa 500µl binde birlik saponin solüsyonu eklenmiştir ve 10dk çalkalayıcıda bekletilmiştir.

Kuyucuklardan saponin solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra her bir kuyucuğa yüzde 3'lük 300µl bloklama çözeltisi spesifik olmayan antikor bağlanmalarını önlemek amacıyla konulmuştur ve üzerleri parafin ile kaplanarak 30 dk oda sıcaklığında çalkalayıcıda bekletilmiştir.

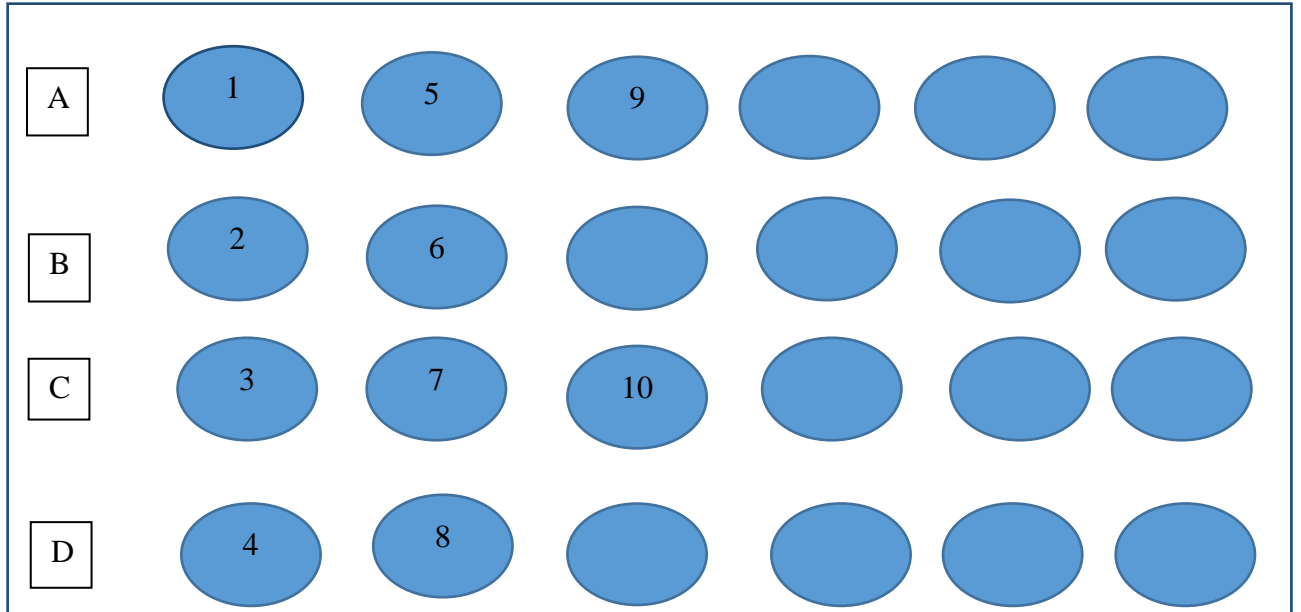
Kuyucuklardan bloklama çözeltisi uzaklaştırıldıktan sonra cas proteinini görüntülemek için Vektörde Cas geninin yukarı kısmında bulunan FLAG işaretleyicisi vasıtasıyla görüntülenmiştir. Bunun için binde birlik M2 fare monoklonal antikor flag-tag (sigma) eklenmiştir. Daha sonra 1:100 oranında seyreltilmiş MP4 tavşan morpheus antikoru şekil 3.3 ' te belirtilen farklı kuyucuklara eklenmiştir ve 48 saat 4°C de bekletilmiştir.

Tübilin proteinini görüntülemek için aynı işlemler uygulanmış M2 fare monoklonal antikor flag-tag yerine 1:2000 oranında Tübilin antikoruna eklenmiştir.

4°C ' den çıkarılan 24 well plateteki kuyucuklardaki çözelti uzaklaştırıldıktan sonra saponin çözeltisi eklenmiş ve 20 dk çalkalayıcıda beklenmiştir. Bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır.

Yüzde 3'lük bloklama çözeltisi hazırlanarak ikincil (secondary) antikor boyanması gerçekleştirilmiştir. Alexa fluor 488 goat-anti Mouse (life technologies) ve Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit (life technologies) antikorları 1/2000 oranında aynı falkon içinde bloklama çözeltisi ile seyreltilmiş ve her kuyucuğa 250µl eklenmiştir. 45 dk çalkalayıcıda bekletilmiştir.

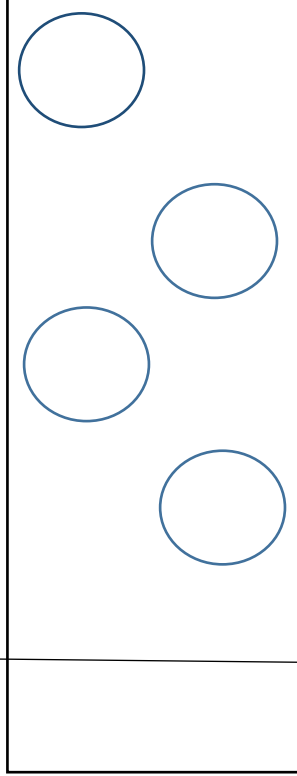
24 well plate teki kuyucuklardaki çözelti uzaklaştırıldıktan sonra saponin çözeltisi eklenmiş ve 20 dk plate shaker da beklenmiştir. Bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır.



Şekil 3.3 İmmüno floresans deneyi örneklerinin sıralanması. 1,2,3,4. kuyucuklara UV ışığı uygulanmıştır ve 1:100 oranında MP4 morpheus antikoruna muamele edilmiştir. 5,6,7,8 kuyucuklara UV ışığı uygulanmamıştır ve 1:100 oranında MP4 morpheus antikoruna muamele edilmiştir. 9. ve 10. kuyucuklara UV uygulanmamıştır ve cas proteininin aktivitesini ölçmek için Birincil antikor tubilin yerine flag tag antkoru kullanılmıştır.

A sırasında px330 vektörü ile birlikte delesyon probu transfeksiyonu yapılan CV1 hücreleri, B sırasında sadece prop ile transfeksiyon uygulanan CV1 hücreleri, C sırasında px330 vektör transfeksiyonu yapılan CV1 hücreleri, D sırasında hiçbir işlem uygulanmayan CV1 hücreleri bulunmaktadır.

Lam (superfrost ultrofrost) (25*75*1.0mm) (Thermo scientific) üzerine 10µl Prolong®Gold antifade reagent with DAPI (life technologies) damlatılarak kuyucuklardan pens yardımıyla çıkarılan cover glasslar üzerlerine kapatılmıştır.4°Cda gece boyunca bekletilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 Lam üzerine yerleştirilmiş coverglassların gösterimi

Lamların üzerlerine bir damla gliserol damlatılıp axiophot2(Zeiss) immüno floresans mikroskopunda görüntülenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.

3.6. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu “Qiagen Blood & Cell Culture Mini Kit” kullanılarak üreticinin tavsiye ettiği şekilde yapılmıştır.

Önceden DNA izolasyonu için hazırlanan hücreler -20 °C buzdolabından alınarak buzda eritilmiştir. Ayrıca tampon C1, PBS, distile su buza konarak soğutulmuştur.

DNA izolasyonu yapılacak hücrelerin bulunduğu falkona 0.5 ml soğuk PBS, hücreyi parçalamak için 0.5ml tampon C1, 1.5ml distile su konulup pipetaj yapılarak karıştırılmıştır ve 10 dk buzda bekletilmiştir.

Buzdan alınan karışım 4 °C,1300 g ‘de 15 dk santrifüj edilip nükleer pellet oluşması sağlanmıştır. Süpernetant atılmıştır.

Nükleer pelletten hücre artıklarını ayırmak için yıkama basamağı uygulanmıştır.

Nükleer pelletin üstüne 0.25 ml soğuk tampon C1, 0.75 ml soğuk distile su eklenip nükleer pellet pipetaj yapıp çözdürülmüştür. Karışım 4 °C, 1300 g 'de 15 dk santrifüj edilip supernatant atılmıştır.

Nükleer pelletin üzerine 1ml tampon G2 eklenerek iyice çözdürülmüş, nükleusun parçalanması ve proteinlerin denature edilmesi sağlanmıştır.

25µl Qiagen Protease eklenmiştir ve 1.5 ml'lik ependorf tüpe aktarılmıştır. 50°C'de 60 dk inkübe edilmiştir. Böylece proteinlerin fragmentlere ayrılması ve DNA'ya bağlı proteinlerin DNA'dan ayrılmaları sağlanmıştır.

Boş 20 ml lik falkona kolon yerleştirilmiştir ve kolonun ıslanması için 1ml tampon QBT eklenmiştir.

Inkübasyondan çıkan DNA karışımı kolona yüklenmiştir ve 3 kere 1ml tampon QC eklenip kolona bağlanması sağlanmıştır.

Kolon çıkarılıp başka 20 ml lik boş falkona alınmıştır ve 2 kere 1ml tampon QF eklenip DNA'nın kolondan falkona geçmesi sağlanmıştır.

Kolon çıkarılıp falkona 1,4 ml %100'lük isopropanol eklenmiştir ve 4 °C, 5000 g 'de 35 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılıp buzda soğutulmuş %70 lik EtOH eklenmiştir ve 4 °C, 5000 g 'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernetant atılıp oda sıcaklığında gece boyunca kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan örneklerin üzerine DNA'yi ayırtırmak için 20µL tampon EB, eklenerek Nanodrop ile DNA konsantrasyonları ölçülmüştür.

3.7.Primer hazırlanması

Makak maymunu Morpheus genine ve delesyon mutasyonuna özgü ileri ve geri primerler tasarlanmıştır.

Rh_NPIP İleri primeri

5'AACAGCTTCTTGCCCTCAGGTTTCT3'

Rh_NPIP geri primeri

5'GTTTGTGTCAAGGCACATCTTACCC3'

Rh_NPIP delesyon ileri primeri

5'AATTGGCCTGGAAGACCTCTTTAT3'

Rh_NPIP delesyon geri primeri

5'TGGCTTCCATATATCTCCATGAAT3'

Primerler Eurofins Genomic firmasından sağlanmıştır. Primerler mutasyonun kontrolü için PZR reaksiyonunda kullanılmıştır.

PGEMT easy vektörü ile mutasyonlu morpheus gen parçası ligasyon yapıldıktan sonra E.coli DH5α 'ya transforme edilmiştir. Koloni seçilimi yapıp plasmid izolasyonu yapıldıktan sonra seçilen kolonilerde morpheus gen parçalarının olup olmadığını kontrol etmek için T7 ileri ve SP6 geri primeri kullanılarak PZR reaksiyonu gerçekleştirilmiş ve %1'lik agaroz jelde görüntülenmiştir.

SP6 geri primeri

5'TATTTAGGTGACACTATAG 3'

T7 ileri primeri

5'TAATACGACTCACTATAGGG3'

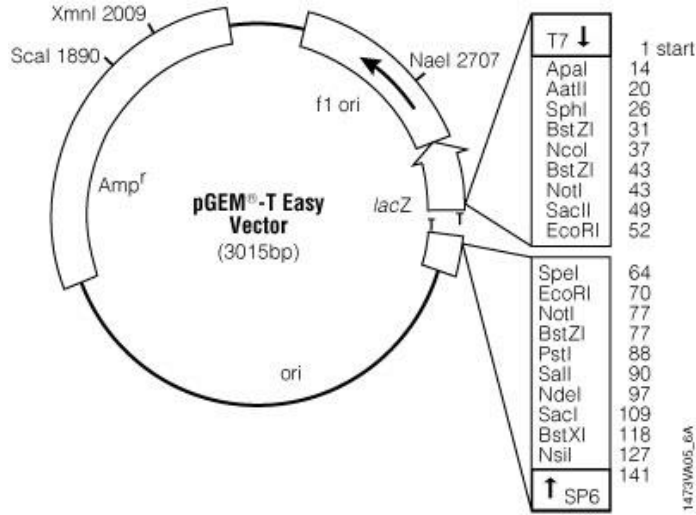
3.8. PZR Reaksiyonu

200 µL steril PZR tüpünün içerisinde 4 µL 5X PZR Tamponu (5X Green Go Taq Flexi Buffer) (Promega), 0,25 mM dNTP karışımı (Roche), 1,5 mM MgCl₂ (Promega), 1 ünite *Taq* DNA polimeraz, 15 pmol ileri primer, 15 pmol geri primer ve steril distile su son hacim 20 µL olacak şekilde karıştırılmıştır.

PZR döngü koşulları: 95 °C'de 5dk başlangıç denatürasyonu, 42 döngü; 95 °C'de 30 sn, 55 °C'de (optimizasyon sonrasında en iyi çalışan bağlanma sıcaklığı olarak tespit edilmiştir) 15 sn ve 72 °C'de 30 sn, yapıldıktan sonra en son 7dk 72 °C'de tutularak tamamlanmıştır. PZR ürünleri %1'lik agaroz jelde görüntülenmiştir.

3.9. pGEM-T Easy Vektörüne PZR Ürününün Klonlanması

PZR ürünleri pGEM-T Easy (Promega) vektörüne (Şekil 3.5) klonlanmıştır. 3µL PZR ürünü, 50 ng pGEM-T Easy vektörü (Promega), 1X ligaz tampon çözeltisi (Promega) ve 2 ünite T4 DNA ligaz enzimi (Promega) son hacim 10 µL olacak şekilde PZR tüpüne konulmuştur. Karışım gece boyunca 4 °C’de (yaklaşık 16 saat) inkübe edilmiştir.



Şekil 3.5 PGEMT easy vektörünün şematik gösterimi

3.10. E. coli Kompetan Hücrelere ligasyon Ürününün Aktarılması

E. coli DH5- α (invitrogen TOP10 chemically competent cell) kompetan hücrelerine pGEM-T Easy Vektörü üreticinin tavsiye ettiği şekilde aktarılmıştır.

50µL *E. coli* DH5- α (invitrogen TOP10 chemically competent cell) kompetan hücre üzerine 5 µL ligasyon ürünü eklenmiştir.

Karışım 30 dk buzda bekletildikten sonra 42 °C’de 1dk ısı şoku uygulanmıştır. Karışım 1 dk buzda bekletildikten sonra üzerine 250 µl SOC (invitrogen) besi yeri eklenmiştir. Daha sonra hücreler 37 °C 250 rpm çalkalamalı etüvde 1,5 saat büyütülmüştür ve ampisilin içeren LB agar besiyerine ekilerek gece boyunca 37 °C etüvde’de büyümüştür. Koloniler seçilerek hücrelerden plazmit izolasyonu yapılmıştır.

3.11. Plazmit izolasyonu

Plazmidler ‘‘QIAGEN QIAprep Spin Miniprep Kit’’ kullanılarak üretici firmanın tavsiye ettiği şekilde izole edilmiştir.

2 mL bakteri kültürü alınıp 5 dk 15 000 rpm’de santrifüj edilerek toplanmıştır. Santrifüj sonrası üstte kalan sıvı dökülerek, tüp ters düz edilmiş ve fazlalık oluşturan maddeleri uzaklaştırmak için kâğıt havlu ile kurutulmuştur. Tüpe tampon P1 (250 µL) eklenerek ve hücre peleti vorteks yapılarak tamamen akıcı hale getirilmiştir. Tampon P2 (250 µL) eklenerek ve tüp dört kere yavaşça ters düz edilerek karıştırılmış, yaklaşık 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Örneklere N3 solüsyonu (350 µL) eklenerek, dört sefer ters düz edilerek karıştırılmıştır. Örnek tüpler 10 dk 15 000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Lizat temizlenerek üstteki faz dönme kolonuna transfer edilmiş ve oda sıcaklığında 1 dk 15 000 rpm’de santrifüj yapılmıştır.

Santrifüjden sonra, toplama tüpündeki alt faz atılarak toplama tüpü geri çıkartılmıştır. 750 µL Kolon Yıkama solüsyon tamponu PE dönme kolonuna eklenerek oda sıcaklığında 1 dk 15 000 rpm’de santrifüj yapılmıştır. Akışkan kısım atılarak toplama tüpüne tekrar yerleştirilmiş ve 1 dk daha santrifüj yapılarak kalan yıkama tamponu tamamen uzaklaştırılmıştır. Dönme kolonu içeriği 1,5 mL yeni steril bir tübe aktarılmış, plazmid DNA’sı 50 µL tampon EB (elution buffer) eklenerek ve 1 dk 15 000 rpm’de santrifüj yapılarak ayrıştırılmıştır. İzole edilen plazmid DNA’sı -20 °C’de saklanmıştır.

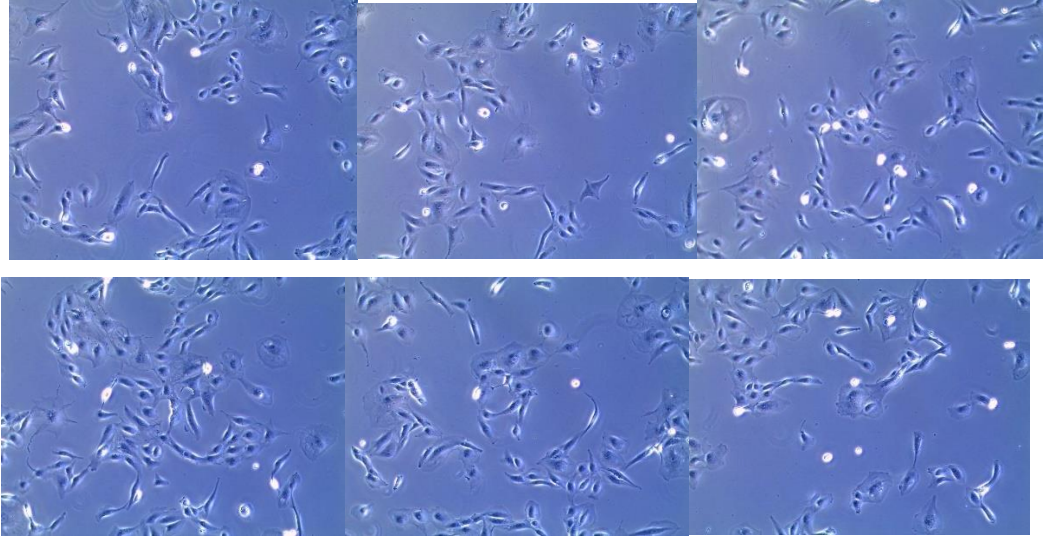
İzole edilen plazmidler (600 ng) SP6 geri primeri kullanılarak Sanger sekanslama teknolojisi ile sekanslatılmıştır.

4. BULGULAR

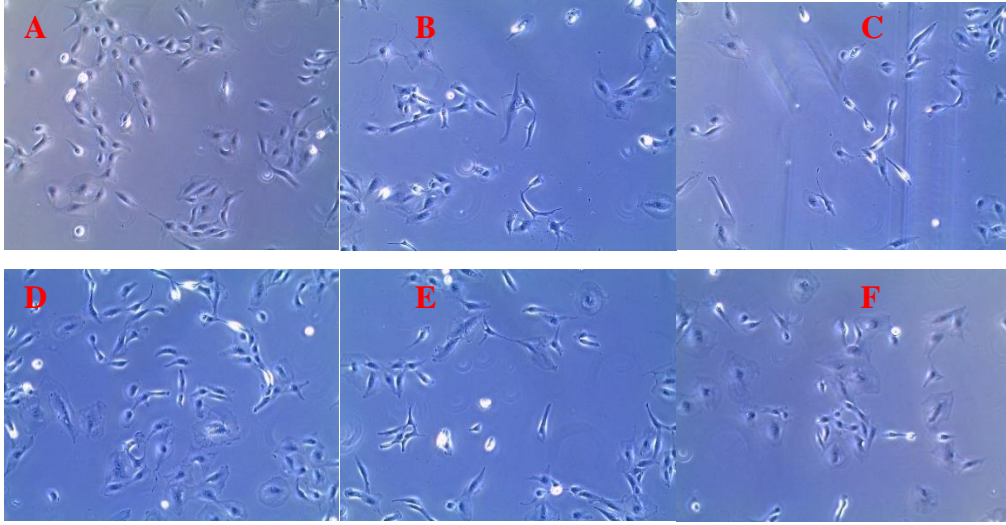
4.1 CV1 Hücrelerinin Morfolojik Olarak İncelenmesi

Dr. Cemalettin BEKPEN'den temin edilen morpheus geninin exon 4 hedef bölgesini içeren px330 CRISPR/Cas vektörünün CV1 hücrelerine nükleofactor 2b cihazıyla transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir.

Transfeksiyondan 72 saat sonra CV1 hücreleri mikroskop altında incelenmiştir. Deney kontrollü olarak gerçekleşmiştir. CV1 hücrelerinde hiçbir morfolojik farklılık gözlemlenmemiştir (Şekil 4.1 ve 4.2)



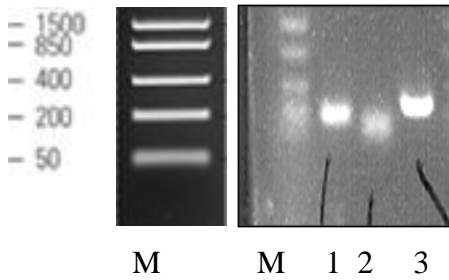
Şekil 4.1 px330 CRISPR/Cas vektörü transfeksiyonu yapılmayan CV1(Makak maymunu böbrek fibroblast hücreleri)(KONTROL)



Şekil 4.2 Px330 CRISPR/Cas vektörü transfeksiyonu yapılan CV1 (Makak maymunu böbrek fibroblast hücreleri) (MUTASYONLU) (A,B,C 1. Transfeksiyondan 72 saat sonra CV1 hücreleri, D,E,F 2. Transfeksiyondan 72 saat sonra CV1 hücreleri)

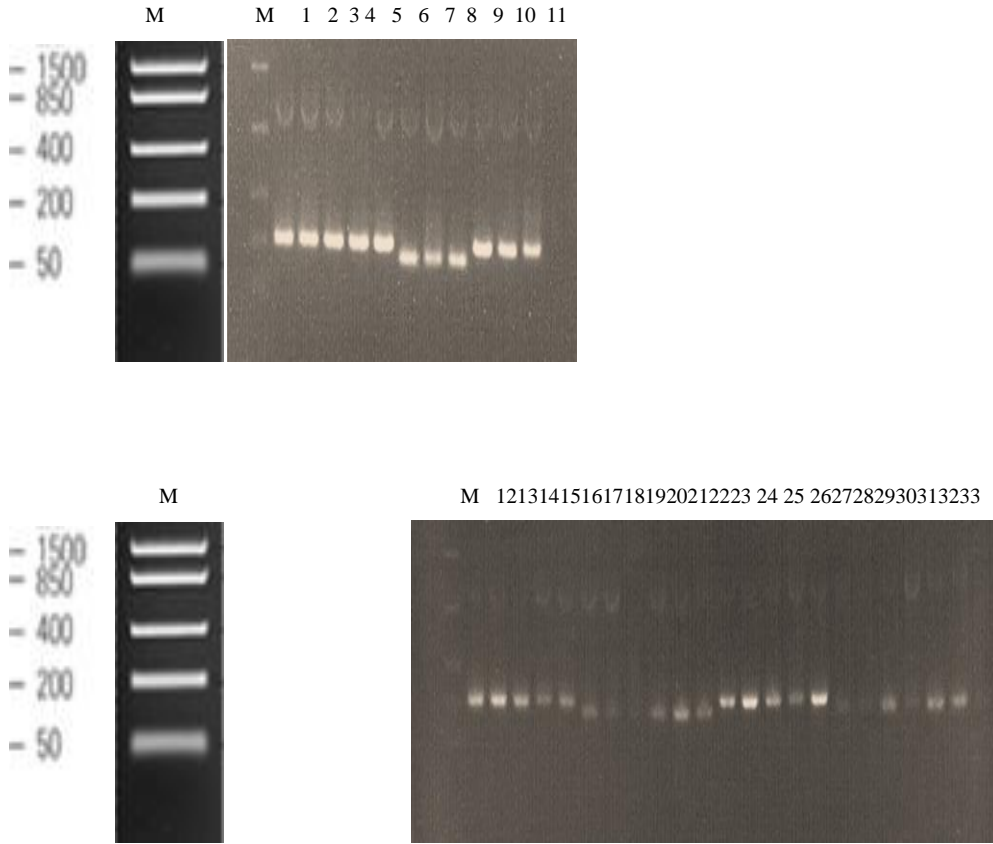
4.2 PZR Reaksiyonu Sonuçları

px330 vektör transfeksiyonu yapılmış CV1 hücresinden DNA izolasyonu yapılarak PZR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Makak maymunu Morpheus genine özgü, delesyon mutasyonuna özgü ileri ve geri primerler tasarlanarak reaksiyon gerçekleştirilmiş ve %1'lik agaroz jelde görüntülenmiştir. Görüntülenme sonucu mutasyonun gerçekleştiği saptanmıştır. (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 px330 vektörü transfeksiyonundan sonra mutasyonlu DNA parçalarının PZR sonrasında %1'lik agaroz jelde görüntüsü. 1. kuyucuk ileri morpheus primeri ile geri delesyona özgü primerin reverse primer olarak kullanıldığı PZR (155 bç) 2. kuyucuk geri morpheus primeri ile ileri delesyona özgü primerin forward primer olarak kullanıldığı PZR (130) 3. Kuyucuk morpheus primerlerinin kullanıldığı PZR (260 bç)M: Moleküler ağırlık markörü (FastRuler Low Range DNA Ladder, Thermo scientific)

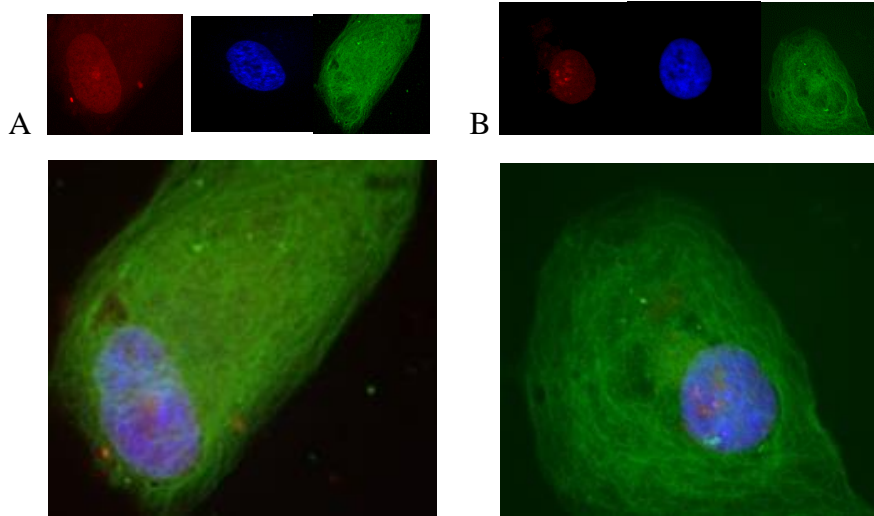
PGEMT easy vektörü ile mutasyonlu morpheus gen parçası ligasyon yapıldıktan sonra E.coli DH5α 'ya transforme edilmiştir. Koloni seçilimi yapıp plasmid izolasyonu yapıldıktan sonra seçilen kolonilerde morpheus gen parçalarının olup olmadığını kontrol etmek için T7 ileri ve SP6 geri primeri kullanılarak PZR reaksiyonu gerçekleştirilmiş ve %1'lik agaroz jelde görüntülenmiştir. Görüntülenme sonucu morpheus gen parçalarının plasmidlerde bulunduğu saptanmıştır (Şekil 4.4).



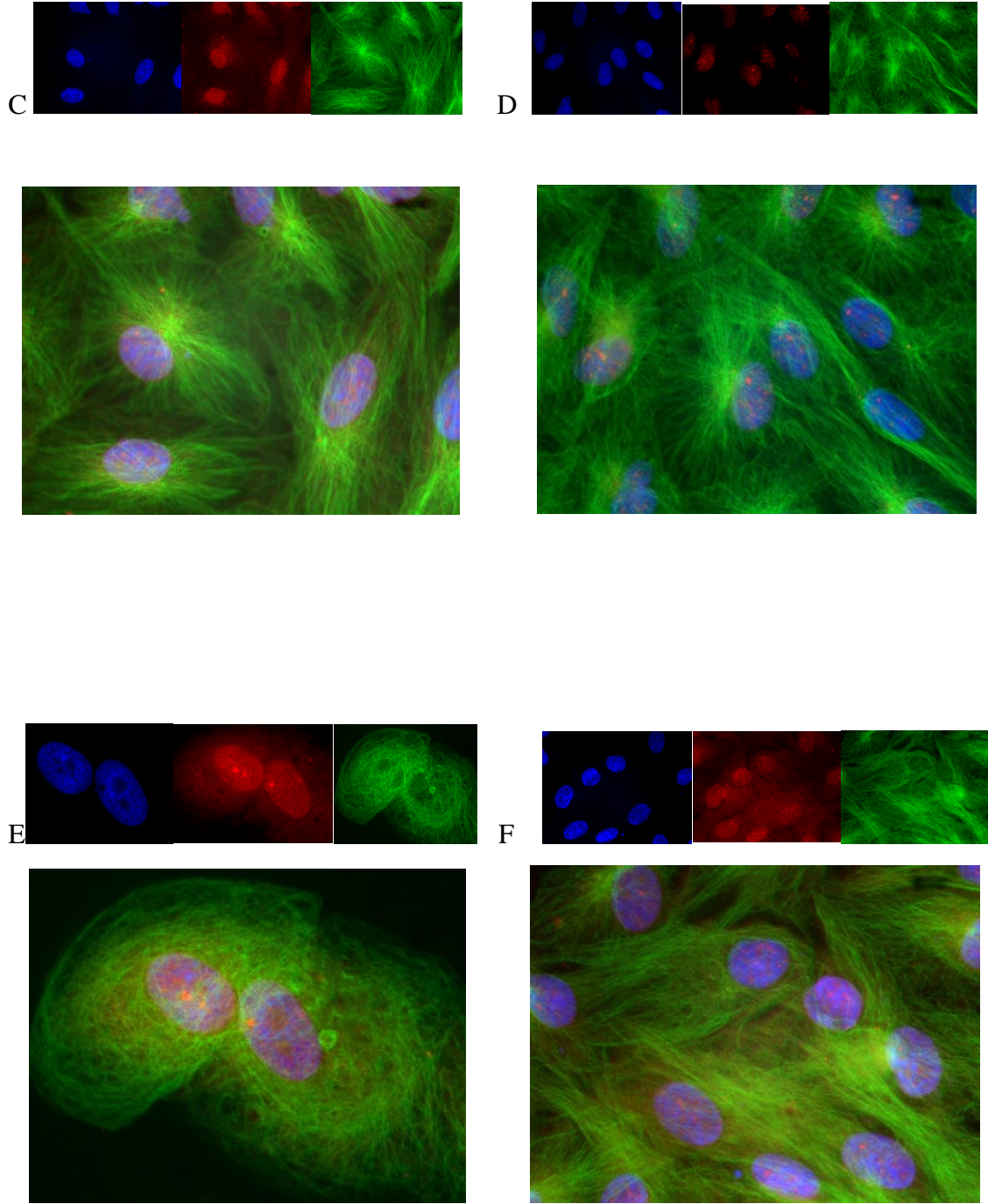
Şekil 4.4 PGEMT easy ile ligasyondan sonra ileri SP6 ve ger T7 primerleri ile yapılan PZR sonrasında %1'lik agaroz jelde görüntüsü. 1-11. Kuyucuklar propsuz yapılan 2.transfeksiyondan elde edilen DNA ile PGEMT easy vektör ligasyonu. 12-22 . kuyucuklar proflu yapılan 2.transfeksiyondan elde edilen DNA ile PGEMT easy vektör ligasyonu. 23-33 Kuyucuklar propsuz yapıla 1.transfeksiyondan elde edilen DNA ile PGEMT easy vektör ligasyonu. 34. kuyucuk negatif kontrol M: Moleküler ağırlık markörü (FastRuler Low Range DNA Ladder,Thermo scientific)

4.3 İmmüno floresans deneyi sonuçları

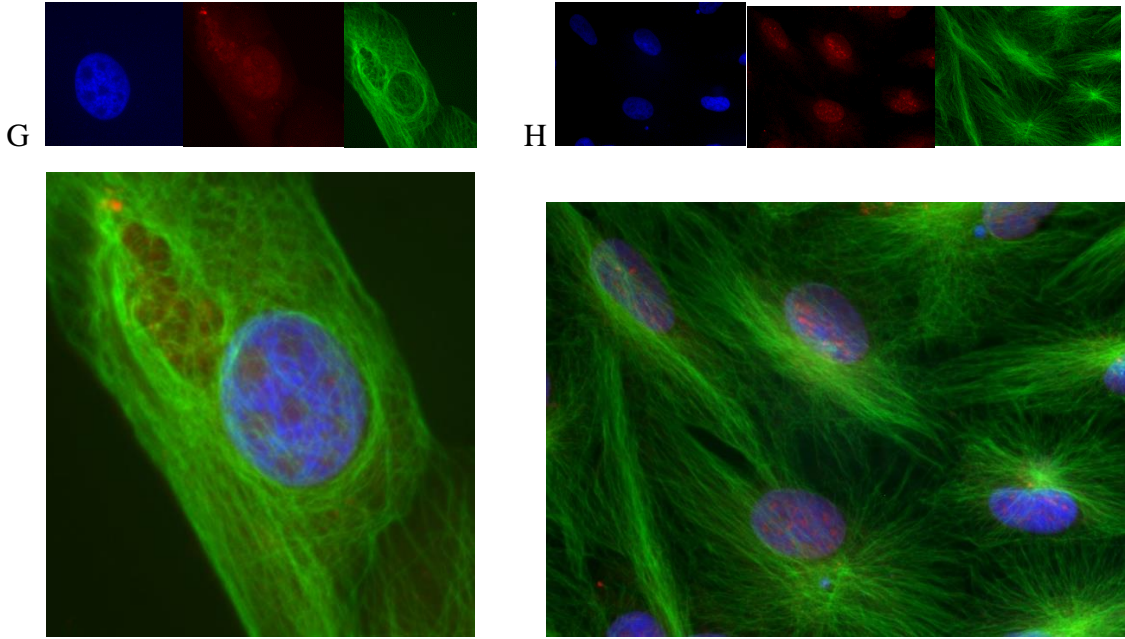
Kontrol ve px330 vektörü ile transfekte edilmiş CV1 hücreleriyle immüno floresans deneyi yapılmıştır. Deneyler hem UV ile muamele edilen CV1 hücreleriyle hem de UV ile muamele edilmeyen CV1 hücreleriyle gerçekleştirilmiştir. (Şekil 4.5 ve 4.6). Bulgularda da görüldüğü gibi px330 vektörü ile transfekte edilen hücrelerde M4 morpheus proteini transfeksiyon olmayan hücrelerde de olduğu gibi çekirdekte lokalize olmuş ve ekspresyonunda belirli bir azalma gözlenmiştir. Daha önce aynı laboratuarda yapılmış olan deneylerin bulguları ışığında UV ışınlarına maruz bırakılan CV1 hücrelerinde morpheus ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir. Bu çalışmada da hücrelerin UV ile muamele edilmesini takiben vektörle transfekte olmuş olduklarından morpheus gen ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiştir. (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 İmmüno floresans deney sonuçları 1:100 morpheus antikoru ile boyama.

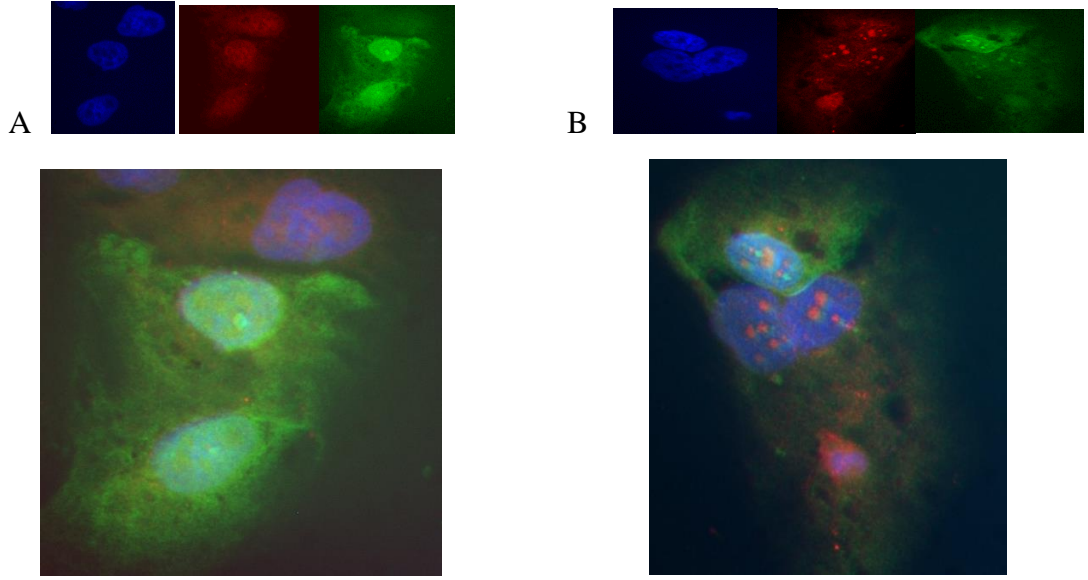


Şekil 4.5 İmmuno floresans deney sonuçları 1:100 morpheus antikoru ile boyama.



Şekil 4.5 İmmuno floresans deney sonuçları 1:100 morpheus antikoru ile boyama(devam).A.UV ile stimüle edilen kontrol CV1 hücreleri. B. UV ile stimüle edilen px 330 morpheus crispr/ cas vektörü ile transfekte edilmiş CV1 hücreleri C.UV ile stimüle edilmemiş kontrol CV1 hücreleri D. UV ile stimüle edilmemiş px 330 morpheus crispr/ cas vektörü ile transfekte edilmiş CV1 hücreleri E. UV ile stimüle edilen delesyon probu ile transfekte edilmiş CV1 hücreleri F. UV ile stimüle edilmeyen delesyon probu ile transfekte edilmiş CV1 hücreleri G. UV ile stimüle edilen delesyon probu ve px330 morpheus crispr/cas vektörü ile transfekte edilmiş CV1 hücreleri H. . UV ile stimüle edilmeyen delesyon probu ve px330 morpheus crispr/cas vektörü ile transfekte edilmiş CV1 hücreleri (Mavi: DAPI, kırmızı:M4 morpheus, yeşil:Tübilin antikor boyamasını göstermektedir.)

Transfeksiyon işlemi takiben 48 saat içinde Cas proteini en yüksek ekspresyon seviyesine ulaştığından vektörün CV1 hücrelerine alıp alınmadığını kontrol amacıyla ayrıca hücreler anti-Flag proteinin birincil antikoru ile boyanmıştır. Bu işlemde Flag proteini Cas proteinin üst kısmında (upstream) bulunduğu için dolaylı olarak Cas proteinin ekspresyonu gösterilmiştir (Şekil 4.6). Şekilden de anlaşılacağı gibi delesyon probunun varlığında ve yokluğunda Cas proteini ekspresyonu gözlenmekte ancak delesyon probu hücredeyken Cas'ın aktivitesi daha fazla olmaktadır.



Şekil 4.6 Birincil boyamada tubilin yerine flag tag boyaması yapılmış immuno floresans deney sonuçları 1:100 morpheus antikoruna boyama
A. px330 vektörü ile birlikte delesyon probu transfeksiyonu yapılan CV1 hücreleri
B. px330 vektör transfeksiyonu yapılan CV1 hücreleri(Mavi: DAPI, kırmızı:M4 morpheus, yeşil:anti-flag(cas) antikor boyamasını göstermektedir.)

4.4.DNA Sekanslanması Sonuçları

Mutasyonlu hücrelerden elde edilen PZR ürünleri pGEMTeasy vektörüne ligasyon yöntemiyle aktarıldıktan sonra *E.coli* hücrelerine tranforme edilmiş ve rastgele seçilen 33 adet koloniden plasmid izolasyonlarını takiben Sanger yöntemi ile sekanslanmıştır. Sekanslama sonrası gelen sonuçların tamamı blast (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start>) yazılımı kullanılarak hizalama yapılmıştır. Şekil 4.7’de kontrol ve mutasyona uğramış morpheus gen dizisine ait sekans sonuçları örnek olarak gösterilmiş olup seçilen 33 koloniye ait sekans sonuçları EK-3’de belirtilmiştir.



Şekil. 4.7 Mutasyonlu DNA sekansı ve kontrol DNA sekansı karşılaştırmalı örneği

5.SONUÇ

Segmental duplikasyonlar genomik DNA da bulunan duplikasyon bloklarıdır. Büyüklükleri tipik olarak 1-200 kb arasında değişir (IHGSC 2001). Segmental duplikasyonlar yüksek kopyalı tekrarlar ve intron ve ekzon yapısında gen dizileri gibi özel diziler içerirler.

Segmental duplikasyonlar nokta mutasyonu ve retrotranspozon aktivitesiyle yavaş yavaş zamanla oluşmuştur (Wu ve Li 1985, Tanimura 1987, Waterston ve ark. 2002, Consortium 2005).

İnsan genomunda, duplikasyon araştırmaları insan evriminde bilinmeyen kompleksleri ortaya çıkarmaktadır. Bu çalışmalar yeni insan /büyük maymun genlerinin tanımlanmasına öncülük eder. Ayrıca pediyatrik ve erişkin başlangıçlı hastalıklarla ilişkili olan yeni mutasyonların keşfinde yol haritası olmasını sağlar.(Eichler 2009)Yüksek oranda benzer paraloglar arasında anormal krossing-over sonucunda velocardiofacial/DiGeorge, Smith-Magenis, ve Prader-Willi/Angelman sendromları gibi genetik hastalıklar oluşabilir (Chen ve ark. 1997, Amos-Landgraf ve ark. 1999, Christian ve ark. 1999, Edelman ve ark. 1999, Shaikh ve ark. 2000).

İnsan 16. Kromozomunun kısa kolunun 15 Mb' ında transpozon ve tekrar dizilerinde poliferasyon ve seleksiyon tanımlanmıştır. Homininlerde bu segmentin kromozomal olarak yeri ve kopya sayısı çeşitlilik göstermektedir. İnsanda bu duplike olmuş segmentte *morpheus* adı verilen bir gen ailesi tanımlanmıştır. Protein kodladığı varsayılan exonlar karşılaştırıldığında homininler arasında pozitif seleksiyon görüldüğü açığa çıkarılmıştır. Ana aminoasid değişimi insan ve büyük maymun soylarının orangutandan ayrılmasından sonra olduğu saptanmıştır.

Morpheus geni makak maymunu genomunda tek kopya olarak bulunmasına rağmen insan genomunda 23 kopya olarak bulunmaktadır. Bu kadar çok duplikasyona uğrayan genin fonksiyonu bilinmemektedir.

Bu çalışmada amaç makak maymununda tek kopya olarak bulunan morpheus genini sürdürmek ve fonksiyon çalışmalarına katkıda bulunmaktır.

Çalışmada nükleazlarla genom düzenleme yöntemlerinden en gelişmiş olan CRISPR/Cas sistemi ile morpheus geni susturulmuştur. Bu işlem makak maymunu CV1 hücrelerine CRISPR/Cas vektörü transfeksiyonu ile gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemin siRNA yöntemine göre avantajı DNA’da istenilen değişikliği yapması ve nesiller boyunca yapılan değişikliğin aktarılmasıdır. Halbuki siRNA veya benzerleri olan bir yöntem kullanıldığında yapılan değişiklik kalıcı olmamakta, hücreler pasajlandıkça etkisi kaybolmaktadır. CRISPR/Cas sisteminin Zinc Finger Nükleazlar ya da TALEN’lere göre avantajı istenmeyen yerlere bağlanma tehlikesi daha azdır (off-target etkileri daha stringentdir).

Transfeksiyon yapılan CV1 hücrelerinden DNA izolasyonu yapılarak mutasyon öncelikle PZR ile kontrol edilmiştir. Pozitif sonuçlar alınmıştır. PZR ürünleri PGEMTeasy vektörüne klonlanıp *E.coli* ye transforme edilmiştir. Besi ortamında büyüyen *E.coli* ‘lerden 33 koloni rastgele seçilip plazmid izolasyonu yapılmıştır. Plazmidler sanger yöntemi ile sekanslanmıştır. Hizalama (Blast) sonucunda 28 koloniden elde edilen gende mutasyon olduğu saptanmış, böylece mutasyon oranı %85 olarak hesaplanmıştır.

Morpheus proteinindeki değişiklikleri saptamak amacıyla immunofloresans analiz gerçekleştirilmiş ve px330 vektör transfeksiyonu yapılan hücrelerde yapılmayan hücrelere göre morpheus proteininin azaldığı görülmüştür. Morpheus geninde gerçekleştirmeye çalıştığımız mutasyonlar prob göndererek delsyona uğratma yönündedir. Gönderilen probda oluşturulan delesyon 1 bazlık olup devamında çerçeve kayması yaratarak proteinin hasarlı ya da güdük halde ifade edilmesi hedeflenmiştir. Yapacağımız 3 bazlık delsyon yanlış anlamlı mutasyona sebep olabileceği için oluşturulan mutasyonun proteinde çok belirgin hasara sebep olamama riskine karşı yapmaya çalıştığımız mutasyon 1 bazlıktır. Prob gönderilmeyen kolonilerde DNA hasarı homolog olmayan uç birleştirmesi (non-homologus end joining-NHEJ) yöntemiyle tamir edilme yoluna gidildiği için çerçeve kayması(frameshift), anlamsız (nonsense) ya da yanlış anlamlı (missense) mutasyonlara sebep olduğu düşünülecek olursa morpheus protein ekspresyonunda beklediğimiz gibi azalma meydana gelmiştir. Cas proteininin çalışıp çalışmadığını kontrol etmek için yapılan immuno floresan analizlerde plasmid içine yerleştirilen cas proteinin üst bölgesine flag tag yerleştirilmiş ve anti-flag antikoru ile deney gerçekleştirilmiş, sonucunda cas proteininin çalıştığı

tespit edilmiştir. Böylece Crispr/Cas yöntemi ile gerçekleştirmiş olduğumuz transfeksiyonun başarıyla sonuçlandığı iki ayrı görüntüleme ile sağlaması yapılarak ispatlanmıştır.

Dr. Bekpen'in daha önce laboratuarda gerçekleştirdiği çalışmaların sonucunda UV ile muamele edilen normal fibroblast hücrelerinde morpheus geninin ifadesinin arttığı gözlenmiştir (basılmamış sonuç). Bu gözlemlere dayanarak henüz fonksiyonu belirlenmemiş olan morpheus proteinin DNA hasar mekanizmasında ya da apoptoz mekanizmasında rol oynayabileceği fikrini kuvvetlendirmektedir. Bu fikir UV ile muamele edilen hücrelerimizin bir kısmının sayısının azalması, UV ile muamele edilmeyen hücrelerin yoğunluğunun daha fazla olması ile de desteklenmiştir. Ayrıca morpheus geninde mutasyon oluşturduğumuz hücrelerde mutasyon olmayan hücrelere göre morpheus gen ifadesinde azalma gözlenmiştir. Bu gözlemler morpheus gen ürününün UV hasarı/apoptoz/DNA tamir mekanizmalarından bir ya da birkaçında rol oynayabileceği hipotezimizi güçlendirmektedir.

NPIP (Nuclear Pore Interaction Protein) olarak da bilinen morpheus proteinin hücredeki sub-lokalizasyonlarına bakıldığı zaman en çok çekirdek içinde, çevresinde kümelenildiği gözlenmiştir. Bütün immuno-floresan boyamalarımız bu bulguyu desteklemektedir. Bu bulgular morpheus proteinin çekirdekle sitoplazma arasındaki transfer işlemi sırasında görev alabileceği fikrini doğrulamaktadır. Her ne kadar makak maymunu genom dizilemesi tamamlanmamış olsa da, insan genom projesi tamamlandığı için yapılan sinteni çalışmalarına göre insanda 16. Kromozomda lokalize olmuş olan morpheus gen kopyalarına maka maymunu genomunda sadece 20. Kromozomda tek kopya halinde rastlanmıştır. Bu da primatların evrimi sırasında insan genomunda bu genin kopyalarına ihtiyacın arttığı fikrini güçlendirmekte fakat neden bu artışın olması gerektiği konusunda bir fikir vermemektedir.

Transfeksiyon yapılan hücreler mikroskop altında incelendiğinde ve transfeksiyon yapılmayan hücrelerle fenotipsel olarak karşılaştırıldığında farklılık gözlemlenmemiştir. Morpheus protein fonksiyonu günümüze kadar bulunabilmiş değildir. Bu çalışma ile makak hücrelerinde tek kopya olduğunu bildiğimiz morpheus gen fonksiyonu ile ilgili hücre morfolojisini etkileyip etkilemediğini anlamaya çalışmak atacağımız ilk adımdı. Ancak hücrelerin mikroskop altında incelenmesi sonucu gözle görülür bir

şekil/büyükük/morfoloji değişikliğine rastlanmaması bu proteinin fonksiyonunun daha moleküler düzeyde olduğunu anlamamızı sağlamış ve çalışmamızı takiben yapılacak olan daha detaylı araştırmalarla fonksiyonun tanımlanabileceği tahmin edilmektedir.

Bu çalışmanın morpheus geninin fonksiyon çalışmalarına ve diğer gen fonksiyonu araştırma çalışmalarına yardımcı olması ve duplikasyona uğrayan genlerden kaynaklanan hastalıkların keşfine, evrimsel bağlantıların keşfine yardımcı olacağı düşünölmektedir.

KAYNAKLAR

Amos-Landgraf, JM., Ji ,Y., Gottlieb, W., Depinet, T., Wandstrat, AE., Cassidy ,SB., Driscoll ,DJ., Rogan, PK., Schwartz S., Nicholls ,RD.,1999 ¹

.Chromosome breakage in the Prader-Willi and Angelman syndromes involves recombination between large, transcribed repeats at proximal and distal breakpoints. *Am J Hum Genet.* 1999 Aug;65(2):370-86.

Barrangou, R. et al. 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* **315**, 1709–1712.

Bibikova, M. et al. 2001. Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases. *Mol. Cell. Biol.* 21, 289–297.

Bibikova, M., Beumer, K., Trautman, J. K. & Carroll, D. 2003.Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Science* 300, 764.

Bibikova, M., Golic, M., Golic, K. G. & Carroll, D. 2002. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics* 161,1169–1175.

Bitinaite, J., Wah, D. A., Aggarwal, A. K. & Schildkraut, I. 1998. FokI dimerization is required for DNA cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 10570–10575.

Boch, J. et al. 2009. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* **326**, 1509–1512.

Bridges ,CB. 1936. The Bar “gene”—A duplication. *Science* **83**:210–211.
Carroll, D. Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics* **188**, 773–782.

Cheng Z, Ventura M, She X, Khaitovich P, Graves T, Osoegawa K, Church D, DeJong P, Wilson RK, Paabo S, et al. 2005. A genome-wide comparison of recent chimpanzee and human segmental duplications. *Nature* **437**: 88–93..

Cho, S. W., Kim, S., Kim, J. M. & Kim, J. S. 2013. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nature Biotech.* 31, 230–232.

Cho, S. W., Carroll, D., Kim, J. S. & Lee, J. 2013. Heritable gene knockout in *Caenorhabditis elegans* by direct injection of Cas9–sgRNA ribonucleoproteins. *Genetics* **195**, 1177–1180.

Church DM, Goodstadt L, Hillier LW, Zody MC, Goldstein S,She X, Bult CJ, Agarwala R, Cherry JL, DiCuccio M, et al.2009. Lineage-specific biology revealed by a finished genome assembly of the mouse. *PLoS Biol* **7**: e1000112.

Ciccarelli FD, von Mering C, Suyama M, Harrington ED, Izaurralde E, Bork P. 2005. Complex genomic rearrangementslead to novel primate gene function. *Genome Res* **15**: 343–351.

Collins FS, Lander ES, Rogers J, Waterston RH, et al. (International Human Genome Sequencing Consortium). 2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* **431**: 931–945.

Cong, L. et al. 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* **339**, 819–823.

Consortium (Chimpanzee Sequencing and Analysis Consortium). 2005. Initial sequence of the chimpanzee genome and comparison with the human genome. *Nature* **437**: 69–87.

Cui, X. et al. 2011. Targeted integration in rat and Mouse embryos with zinc-finger nucleases. *Nature Biotech.* **29**, 64–67.

Deltcheva, E. et al. 2011. CRISPR RNA maturation by *trans*-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* **471**, 602–607.

Deng, D. et al. 2012. Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors. *Science* **335**, 720–723.

Desjarlais, J. R. & Berg, J. M. 1992. Redesigning the DNA-binding specificity of a zinc finger protein: a data base-guided approach. *Proteins* **12**, 101–104.

Dickinson, D. J., Ward, J. D., Reiner, D. J. & Goldstein, B. 2013. Engineering the *Caenorhabditis elegans* genome using Cas9-triggered homologous recombination. *Nature Methods* **10**, 1028–1034.

Ding, Q. et al. 2013. Enhanced efficiency of human pluripotent stem cell genome editing through replacing TALENs with CRISPRs. *Cell Stem Cell* **12**, 393–394.

Doyle, E. L. et al. 2013. TAL effector specificity for base 0 of the DNA target is altered in a complex, effector- and assay-dependent manner by substitutions for the tryptophan in cryptic repeat –1. *PLoS ONE* **8**, e82120.

Doyon, J. B. et al. 2011. Rapid and efficient clathrin-mediated endocytosis revealed in genome-edited mammalian cells. *Nature Cell Biol.* **13**, 331–337.

Dumas L, Kim YH, Karimpour-Fard A, Cox M, Hopkins J, Pollack JR, Sikela JM. 2007. Gene copy number variation spanning 60 million years of human and primate evolution. *Genome Res* **17**: 1266–1277.

Eichler EE. 2001. Segmental duplications: What's missing, misassigned, and misassembled—and should we care? *Genome Res* **11**: 653–656.

Fortna A, Kim Y, MacLaren E, Marshall K, Hahn G, Meltesen L, Brenton M, Hink R, Burgers S, Hernandez-Boussard T, et al. 2004. Lineage-specific gene duplication and loss in human and great ape evolution. *PLoS Biol* **2**: E207.

Friedland, A. E. et al. 2013. Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR–Cas9 system. *Nature Methods* **10**, 741–743.

Gaj, T., Gersbach, C. A. & Barbas, C. F. 2013. 3rd. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.* **31**, 397–405.

Gratz, S. J. et al. 2013. Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease. *Genetics* **194**, 1029–1035.

Hacein-Bey-Abina, S. et al. 2003. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID_{X1}. *Science* **302**, 415–419.

Hahn MW, Demuth JP, Han SG. 2007. Accelerated rate of gene gain and loss in primates. *Genetics* **177**: 1941–1949.

Hockemeyer, D. et al. 2011. Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nature Biotech.* **29**, 731–734.

Hodzic D, Kong C, Wainszelbaum MJ, Charron AJ, Su XO, Stahl PD. 2006. TBC1D3, a hominoid oncoprotein, is encoded by a cluster of paralogues located on chromosome 17q12. *Genomics* **88**: 731–736.

Hsu, P. D. et al. 2013. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature Biotech.* **31**, 827–832.

Hwang, W. Y. et al. 2013. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR–Cas system. *Nature Biotech.* **31**, 227–229.

Hyongbum Kim and Jin-Soo Kim. 2014. A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nature Reviews Genetics* **15**.321–334.

J. Zhang, 2003. Evolution by gene duplication: an update, *TRENDS in Ecology and Evolution* Vol.18 No.6 292-298

Jackson, MS., Rocchi, M., Thompson, G., Hearn, T., Crosier, M., Guy, J., Kirk, D., Mulligan, L., Ricco, A., Piccininni, S., Marzella, R., Viggiano, L., Archidiacono, N. 1999. Sequences flanking the centromere of human chromosome 10 are a complex patchwork of arm-specific sequences, stable duplications and unstable sequences with homologies to telomeric and other centromeric locations. *Hum Mol Genet.* Feb;8(2):205-15.

Jackson, A. L. et al. 2003. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nature Biotech.* **21**, 635–637.

Jiang ,Z., Tang, H., Ventura, M., Cardone, MF., Marques-Bonet ,T., She ,X., Pevzner ,PA., Eichler, EE. 2007. Ancestral reconstruction of segmental duplications reveals punctuated cores of human genome evolution. *Nat Genet* **39**: 1361–1368

Jiang Z, Tang H, Ventura M, Cardone MF, Marques-Bonet T, She X, Pevzner PA, Eichler EE. 2007. Ancestralreconstruction of segmental duplications reveals punctuated cores of human genome evolution. *Nat Genet* **39**: 1361–1368.

Jiang, W., Bikard, D., Cox, D., Zhang, F. & Marraffini, L. A. 2013. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR–Cas systems. *Nature Biotech.*31, 233–239

Jinek, M. et al. 2013.RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife* 2, e00471.

Jinek, M. et al. 2014. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science* <http://dx.doi.org/10.1126/science.1247997>.

Johnson, ME., Viggiano, L., Bailey, JA., Abdul-Rauf ,M., Goodwin, G., Rocchi, M., Eichler, EE. 2001. Positive selection of a gene family during the emergence of humans and African apes. *Nature* **413**: 514–519

Joung, J. K. & Sander, J. D. 2013. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 49–55.

Kim, H. J., Lee, H. J., Kim, H., Cho, S. W. & Kim, J. S. 2009. Targeted genome editing in human cells with zinc finger nucleases constructed via modular assembly

Kim, Y. G., Cha, J. & Chandrasegaran, S. 1996 .Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to FokI cleavage domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 1156–1160.

Krueger, U. et al. 2007. Insights into effective RNAi gained from large-scale siRNA validation screening. *Oligonucleotides* **17**, 237–250.

Li, D. et al. 2013. Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR–Cas system. *Nature Biotech.* **31**, 681–683).

Li, H. et al. 2011. In vivo genome editing restores haemostasis in a mouse model of haemophilia. *Nature*475, 217–221 .

Li, J. F. et al. 2013. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nature Biotech.* **31**, 688–691.

Li, L. et al. 2013. Characterization and DNA-binding specificities of *Ralstonia* TAL-like effectors. *Mol. Plant* **6**, 1318–1330.

Li, W., Teng, F., Li, T. & Zhou, Q. 2013. Simultaneous generation and germline transmission of multiple gene mutations in rat using CRISPR–Cas systems. *Nature Biotech.* **31**, 684–686 .

Mak, A. N., Bradley, P., Cernadas, R. A., Bogdanove, A. J. & Stoddard, B. L. 2012. The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target. *Science* **335**, 716–719.

Makarova, K. S., Grishin, N. V., Shabalina, S. A., Wolf, Y. I. & Koonin, E. V. 2006. putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol. Direct* **1**, 7.

Mali, P. et al. 2013. CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nature Biotech.* **31**, 833–838.

Mali, P. et al. 2013. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* **339**, 823–826.

Marques-Bonet T, Kidd JM, Ventura M, Graves TA, Cheng Z, Hillier LW, Jiang ZS, Baker C, Malfavon-Borja R, Fulton LA, et al. 2009. A burst of segmental duplications in the genome of the African great ape ancestor. *Nature* **457**: 877–881.

Mazzarella R, Schlessinger D 1997. Duplication and distribution of repetitive elements and non-unique regions in the human genome. *Gene*. Dec 31;205(1-2):29-38

Miller, J. C. et al. 2011. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nature Biotech.* **29**, 143–148 .

Mojica, F. J., Diez-Villasenor, C., Garcia-Martinez, J. & Almendros, C. 2009. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology* **155**, 733–740.

Moscou, M. J. & Bogdanove, A. J. 2009. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science* **326**, 1501.

Nekrasov, V., Staskawicz, B., Weigel, D., Jones, J. D. & Kamoun, S. 2013. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nature Biotech.* **31**, 691–693.

Niu, Y. et al. 2014. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell* **156**, 836–843 .

Ohno, S. 1967. *Sex Chromosomes and sex-linked genes*. Berlin:Springer-Verlag

Ohno, S. Wolf, u. Ve Atkin, N B. 1968. Evolution from fish to mammals by **gene duplication**. *Hereditas*, **59**: 169–187

Ohno, S. 1970. Evolution by Gene Duplication .(Springer, Berlin, 1970)

Paulding CA, Ruvolo M, Haber DA. 2003. The *Tre2 (USP6)* oncogene is a hominoid-specific gene. *Proc Natl Acad Sci* **100**: 2507–2511

Pearson CE, Eichler EE, Lorenzetti D, Kramer SF, Zoghbi HY, Nelson DL, Sinden RR(1998) .Interruptions in the triplet repeats of SCA1 and FRAXA reduce the propensity and complexity of slipped strand DNA (S-DNA) formation. *Biochemistry*. Feb 24;37(8):2701-8.

Porteus, M. H. & Baltimore, D. 2003. Chimeric nucleases stimulate gene targeting in human cells. *Science* 300,763.

Rebar, E. J. & Pabo, C. O. 1994. Zinc finger phage: affinity selection of fingers with new DNA-binding specificities. *Science* **263**, 671–673.

Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen W, et al. 2006. Global variation in copy number in the human genome. *Nature* **444**: 444–454

Régnier ,V., Meddeb, M., Lecointre, G., Richard, F., Duverger, A., Nguyen ,VC., Dutrillaux, B., Bernheim, A., Dangelot, G.(1997). Emergence and scattering of multiple neurofibromatosis (NF1)-related sequences during hominoid evolution suggest a process of pericentromeric interchromosomal transposition. 1
 Hum Mol Genet. Jan;6(1):9-16.

Segal, D. J. & Meckler, J. F. 2013. Genome engineering at the dawn of the golden age. *Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.* **14**, 135–158.

Shan, Q. et al. 2013. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR–Cas system. *Nature Biotech.* **31**, 686–688.

Sharp AJ, Locke DP, McGrath SD, Cheng Z, Bailey JA, VallenteRU, Pertz LM, Clark RA, Schwartz S, Segraves R, et al. 2005. Segmental duplications and copy-number variation in the human genome. *Am J Hum Genet* **77**: 78–88.,

She X, Cheng Z, Zöllner S, Church DM, Eichler EE. 2008. Mouse segmental duplication and copy number variation. *Nat Genet.* **40**: 909–914.

Shen, B. et al. 2013. Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting. *Cell Res.* **23**, 720–723.

Sun, N. & Zhao, H. 2013. Transcription activator-like effector nucleases (TALENs): a highly efficient and versatile tool for genome editing. *Biotechnol. Bioeng.* **110**, 1811–1821.

Sung, Y. H. et al. 2014. Highly efficient gene knockout in mice and zebrafish with RNA-guided endonucleases. *Genome Res.* **24**, 125–131.

Tomlinson IM, Cook GP, Carter NP, Elaswarapu R, Smith S, Walter G, Buluwela L, Rabbitts TH, Winter G.(1994) Human immunoglobulin VH and D segments on chromosomes 15q11.2 and 16p11.2. *Hum Mol Genet.* 1994 Jun;3(6):853-60.

Trask BJ, Massa H, Brand-Arpon V, Chan K, Friedman C, Nguyen OT, Eichler E, van den Engh G, Rouquier S, Shizuya H, Giorgi D. (1998) Large multi-chromosomal duplications encompass many members of the olfactory receptor gene family in the human genome. *Hum Mol Genet.* Dec;7(13):2007-20

Tupler, R., Perini, G. & Green, M. R. 2001. Expressing the human genome. *Nature* 409, 832–833 .

Urnov, F. D. et al. 2005. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature* 435, 646–651.

Urnov, F. D., Rebar, E. J., Holmes, M. C., Zhang, H. S. & Gregory, P. D. 2010. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nature Rev. Genet.* 11, 636–646.

Wainszelbaum MJ, Charron AJ, Kong C, Kirkpatrick DS, Srikanth P, Barbieri MA, Gygi SP, Stahl PD. 2008. The hominoid-specific oncogene TBC1D3 activates *ras* and modulates epidermal growth factor receptor signaling and trafficking. *J Biol Chem* **283**: 13233–13242.

Wang, H. et al. 2013. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* 153, 910–918.

Waterston, RH., Lindblad-Toh ,K., Birney, E., Rogers ,J., Abril ,JF.,Agarwal ,P., Agarwala ,R., Ainscough, R., Alexandersson ,M., An,P. et al. 2002. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* **420**: 520–562

Wefers, B. et al. 2013. Direct production of mouse disease models by embryo microinjection of TALENs and oligodeoxynucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 3782–3787.

Wong ,YW., Williams ,AF., Kingsmore, SF., Seldin, MF .1990. Structure, expression, and genetic linkage of the mouse BCM1 (OX45 or Blast-1) antigen. Evidence for genetic duplication giving rise to the BCM1 region on mouse chromosome 1 and the CD2/LFA3 region on mouse chromosome 3. *J Exp Med.* Jun 1;171(6):2115-30.

Wu ,CI., Li ,WH. 1985. Evidence for higher rates of nucleotide substitution in rodents than in man. *Proc Natl Acad Sci* **82**: 1741–1745.

Zimonjic, DB., Kelley ,MJ., Rubin ,JS., Aaronson ,SA., Popescu ,NC.1997. Fluorescence in situ hybridization analysis of keratinocyte growth factor gene

amplification and dispersion in evolution of great apes and humans. Proc Natl Acad Sci U S A. Oct 14;94(21):11461-5.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı :Kübra PASPAL

Doğum Yeri ve Tarihi : BURSA 17.11.1989

Yabancı Dili :İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Bursa Cumhuriyet Lisesi (Y.D.A) 2003-2007

Lisans : Uludağ Üniversitesi Biyoloji Bölümü 2008-2013

Yüksek Lisans : Uludağ Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
2013-2015

İletişim (e-posta) :kubra.paspal@gmail.com