

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SK-MEL-30 HÜCRE HATTINDA NRAS GENİ Q61K
MUTASYONUNA CRISPR/Cas9 TEKNİĞİNİN UYGULANMASI**

Tuğçe DURAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Tülin ÇORA

KONYA-2018

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SK-MEL-30 HÜCRE HATTINDA NRAS GENİ Q61K
MUTASYONUNA CRISPR/Cas9 TEKNİĞİNİN UYGULANMASI**

Tuğçe DURAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Tülin ÇORA

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü
tarafından 17202005 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2018

ÖNSÖZ

Günümüzde insidansı hızla artan kanser türlerinden biri olan cilt kanseri malign melanoma, tıbbi açıdan birçok ilaçla tedavi edilmeye çalışılsa da özellikle heterojenik tümörlerde yetersiz kalmaktadır. Bu yüzden NRAS protoonkogenleri ve diğer onkogenler ile ilgili genetik çalışmalar gün geçtikçe önem kazanmaktadır.

Bu çalışmada son yılların etkili genom düzenleme tekniklerinden biri olan CRISPR/Cas9 metodu kullanılarak, NRAS geni Q61K mutasyonunun düzeltilmesi amaçlanmıştır.

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü Birimi (BAP) tarafından 17202005 proje numarası ile desteklenmiştir.

Bu tez çalışması boyunca ilk önce bana hep destek olan, bilimsel anlamda ilminden, tecrübesinden ve hoşgörüsünden faydalandığım çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Tülin ÇORA 'ya, çalışmalarım boyunca beni yönlendiren, benim her zaman başaracağıma inanan ve güvenen değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Nadir KOÇAK 'a, bana uzaktan destek vererek çalışmalarımda yardımcı olan İstanbul Medeniyet Üniversitesi öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Cihan AYDIN 'a ve Abdullah Gül Üniversitesi öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Oktay İsmail KAPLAN 'a, laboratuvar çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen Uzm. Dr. Süleyman NERGİZ 'e teşekkür ederim.

Bu tezi, varlığı benim için mutluluk kaynağı olan kardeşim Saide Gökçe DURAN 'a, karşılıksız desteği ve sevgisiyle her zaman yanımda olan babam Soner DURAN 'a, kurduğu akademide doğruluktan ve çalışmaktan yana asla yılmamayı öğreten, karşılıksız sevginin ve saygının ne demek olduğunu öğrendiğim, bu günlere gelmemde sonsuz emeği olan sevgili annem Hatice DURAN 'a ithaf ediyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....ii

İÇİNDEKİLER iii

SİMGELER VE KISALTMALAR vii

ÖZET.....ix

SUMMARY x

1. GİRİŞ 1

1.1. Cilt Kanseri 2

1.1.1. Cilt Kanseri Tipleri 3

1.2.Melanoma 3

1.2.1.Melanoma Gelişim Evreleri 4

1.2.2. Malign Melanoma Epidemiyolojisi 7

1.2.3. Malign Melanoma Gelişimi Açısından Risk Etmenleri ve Malign
Melanom Oluşumundaki Faktörler 8

1.2.4. Melanoma İnsidansı ve Görülme Sıklığı..... 10

1.2.5. Malign Melanomanın Klinik Özellikleri..... 14

1.2.6. Melanoma ve Genetik ile İlişkisi 17

1.3.CRISPR/Cas9 Teknolojisi 29

1.3.1.CRISPR Genom Düzenleme Devrimi..... 29

1.3.2. Uygulama İçine CRISPR Yerleştirme: İş Akışları ve Vaka Çalışmaları
..... 41

1.3.3. CRISPR Genom Düzenleme Tekniğinde Güçlü Yeni Bulgular	44
2. GEREÇ VE YÖNTEM	47
2.1. Hücre Kültürü	47
2.1.1. Hücre Sayımı.....	47
2.1.2. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması.....	48
2.2. CRISPR Dizayn	48
2.2.1. gRNA Dizaynı.....	49
2.2.2. Uzun Donör Dizilerin Dizaynı	51
2.2.3. Plazmid vektör seçimi	52
2.3. gRNA'ların İlgili Plazmidlere Transformasyonu ve Klonlama.....	55
2.3.1. Plazmidlerin Çoğaltılması.....	55
2.3.2. Plazmidlerin İzolasyonu.....	57
2.3.3. Plazmidlerin Restriksiyon Endonükleaz Enzimi ile Kesimi	57
2.3.4. Plazmidlerin Jelden Saflaştırılması	58
2.3.5. Fosforilasyon ve gRNA Dizilerinin Ortama Eklenmesi	59
2.3.6. Ligasyon.....	59
2.3.7. Oluşturulan Plazmid Yapılarının Transformasyonu	60
2.3.8. Transforme Kompetent Bakteri Hücrelerinin Çoğaltılması.....	60
2.3.9. Mini Kültür Kurulması.....	60
2.3.10. Plazmidlerin İzolasyonu.....	60

2.4. Transfeksiyon.....	60
2.4.1. Plazmid DNA Örneklerin Konsantrasyonlarının Ayarlanması.....	60
2.4.2. Elektroporasyon	61
2.5. Transfekte Kanser Hücrelerinin Kültüre Edilmesi	61
2.6. Flow (Akış) Sitometri ile GFP+ Hücrelerin Alınması.....	61
2.7. Hücrelerin Kaldırılması	61
2.8. Hücre Sayımı	62
2.9. DNA İzolasyonu	62
2.10. Real-Time PCR.....	62
2.10.1. Real-Time PCR Tekniği ile Mutasyonun Saptanması	62
2.10.2. End-point Mutasyon Analizi	64
2.10.3. Melting Curve Analizi.....	65
2.10.4. Panel ve SYBR Green Kullanılarak Real-time PCR Analizi.....	68
3. BULGULAR	70
3.1. Hücre Kültürü	70
3.2. Klonlama.....	71
3.3. GFP+ Hücrelerin Floresan Mikroskopta Gözlemlenmesi	71
3.4. Akış Sitometri ile GFP+ Hücrelerin Eldesi	72
3.5. Real-time PCR	73
3.5.1. Real-Time PCR Tekniği ile Mutasyonun Saptanması	74

3.5.2. End-point Mutasyon Analizi	77
3.5.3. Melting Curve Analizi.....	79
3.5.4. Panel ve SYBR Green Kullanılarak Gerçekleştirilen Real-time PCR Sonucu Melting Curve Analizleri	81
4. TARTIŞMA	83
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	92
6. KAYNAKLAR.....	94
7. EKLER	103
EK A. Etik Kurul Kararı.....	103
8. ÖZGEÇMİŞ	104

SİMGELER VE KISALTMALAR

A	Adenin
AP	Alkalen fosfataz
ATP	Adenozin Tri Fosfat
C	Sitozin
Cas9	CRISPR-associated protein 9
CRISPR	Düzenli kümelenmiş aralayıcı kısa palindromik tekrar dizileri
crRNA	CRISPR-ribonükleik asit
Δ	Delta
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSB	Çift zincir kırıkları
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
FACS	Florescence Activated Cell Sorting
FBS	Fetal Dana Serum
G	Guanin
GAPDH	Gliseraldehit Fosfat Dehidrogenaz
GFP	Green (Yeşil) Floresan Protein
gRNA	Rehber RNA
HDR	Homoloji ile yönetilen tamir
HR	Homolog rekombinasyon
kDa	Kilo dalton
KI	Knock-in
KO	Knock-out
MAPK	Mitojen-Aktive Protein Kinaz
μ	Mikro

mRNA	Mesajcı RNA
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
N	Nükleotit
NGS	Yeni nesil dizileme
NHEJ	Hata eğilimli homolog olmayan uç birleştirme
P	piko
paCas9	Photo-activatable Cas9
PAM	Protospacer ilişkili motif
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Pol III	Polimeraz III
rAAV	Rekombinant adeno-bağlantılı virüsü
RFN	RNA-aracılı FokI nükleaz
RNA	Ribonükleik asit
sgRNA	Tek kılavuz ribonükleik asit
Sn	Saniye
SpCas9	<i>Streptococcus pyogenes</i> Cas9
T	Timin
TALEs	Transkripsiyon aktivatörü gibi efektörler
tracrRNA	Transkripsiyonla aktive edilmiş CRISPR-ribonükleik asit
ZF	Çinko parmak domainleri

ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SK-MEL-30 Hücre Hattında NRAS Geni Q61K Mutasyonuna CRISPR/Cas9 Tekniğinin Uygulanması

Tuğçe DURAN

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2015

Malign melanom, melanositlerin veya melanositlerden gelişen hücrelerin neoplazmidir. Melanoma önceleri seyrek görülen bir hastalık olmasına rağmen, son yıllarda melanomadan kaynaklı ölümlerin yıllık insidansı çarpıcı bir şekilde artmaktadır. İnsanlardaki 3 RAS geni (HRAS, KRAS ve NRAS) insan kanserinde tespit edilen en yaygın onkogenlerdir; Ras'ı kalıcı olarak aktive eden mutasyonlar, tüm insan tümörlerinin % 20 ila 25'inde ve bazı kanser türlerinde ise % 90'a kadar bulunmaktadır. NRAS geninin 12, 13 ve 61.kodonlarındaki mutasyonları, tüm melanomların % 15-20'sinde ortaya çıkmaktadır. Bu değişiklikler agresif klinik davranış ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Yakın zamana kadar, NRAS mutant melanoma için genetik olarak hedeflenmiş gelecek vaat eden tedavi yaklaşımları az olup, bu konuda sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (ve genel olarak mutant RAS maligniteleri).

Bu çalışmada, genom-düzenleme için günümüzün en etkili tekniklerinden biri olarak kabul edilen CRISPR/Cas9 tekniği kullanılarak, malign melanoma kanserine neden olan Q61K mutasyonunun düzeltilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, Q61K mutasyonunu içeren malign melanoma SK-MEL-30 hücre hattı kullanılmıştır. Hedef mutasyon için gRNA'lar dizayn edildikten sonra, plazmidlere aktarılmış ve klonlanmıştır. Sonra, plazmidler ve donör dizi elektroporasyon tekniği kullanılarak malign melanoma cilt kanseri hücrelerine aktarılmıştır. Başarılı transforme olan hücreler GFP+ hücrelerdir, floresan mikroskop ve flow sitometri kullanılarak diğer hücrelerden ayrılmıştır. HDR-aracılı tamir mekanizması ile hücrelerde sırasıyla knock-out ve knock-in hedeflenmiştir. Yapılan real-time PCR analizleri ile bazı hücrelerde, hedef bölgede knock-out ve knock-in işleminin başarıyla gerçekleştiği gösterilmiştir. Buna ek olarak, end-point analizi de, çalışma sonuçlarını başarıyla desteklemektedir.

Bu projede, bir nokta mutasyonunun bile CRISPR/Cas9 tekniği ile düzeltilebileceğinin mümkün olduğu ispatlanmıştır. CRISPR tekniği kullanılarak, benzer mutasyonların çalışılması açısından literature yeni bir vizyon kazandırdığımız kanaatindeyiz.

Anahtar Sözcükler: CRISPR/Cas9; Genom-düzenleme; Malign Melanoma; Q61K.

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Application of CRISPR/Cas9 Technique to the NRAS Gene Q61K Mutation in SK-MEL-30 Cell Line

Tuğçe DURAN

Department of Medical Genetics

MASTER THESIS / KONYA-2015

Malignant melanoma is a neoplasm of melanocytes or of the cells that develop from melanocytes. Although melanoma was once considered an uncommon disease, the annual incidence has increased dramatically over the past few decades, as have deaths from melanoma. The 3 Ras genes in humans (HRas, KRas, and NRas) are the most common oncogenes in human cancer; mutations that permanently activate Ras are found in 20% to 25% of all human tumors and up to 90% in certain types of cancer. NRAS mutations in codons 12, 13, and 61 arise in 15–20 % of all melanomas. These alterations have been associated with aggressive clinical behavior and a poor prognosis. Until recently, there has been a paucity of promising genetically targeted therapy approaches for NRAS-mutant melanoma (and RAS-mutant malignancies in general).

In this study, it was aimed to correct the Q61K mutation causing malignant melanoma cancer using the CRISPR / Cas9 technique, which is considered as one of the most effective techniques for genome editing. For this purpose, malignant melanoma SK-MEL-30 cell line containing the Q61K mutation was used. Once the gRNAs for the target mutation have been designed, they are transferred to plasmids and cloned. Then, plasmids and donor sequence were transferred to malignant melanoma skin cancer cells using electroporation technique. Successful transformed cells which are GFP + cells, sorted from other cells using fluorescence microscopy and flow cytometry. With the HDR-guided repair mechanism, knock-out and knock-in were targeted respectively. Real-time PCR analysis showed successful knock-out and knock-in in target cells in some cells. In addition, end-point analysis supports the results of working successfully.

In this project, it has been proved that even a point mutation can be corrected by the CRISPR / Cas9 technique. Using the CRISPR technique, we believe that we have given literature a new vision in terms of studying similar mutations.

Key words: CRISPR/Cas9; Genome-editing; Malignant Melanoma; Q61K.

1. GİRİŞ

Kanser vücut hücrelerinin kontrolsüz bir şekilde üreyerek komşu dokuları işgal etmesi (invazyon) veya kaynağını aldığı organdan daha uzak bir yere kan-lenf yoluyla yayılması (metastaz) ile oluşan bir hastalıktır. Hücreler DNA replikasyonları esnasında meydana gelen bozulmalar nedeniyle yapı değiştirirler. Normal vücut hücre ve dokuları, orijinal büyüklük ve yapılarını korurken kanser hücreleri saldırgan bir tablo çizerler (Kizilbey ve AKDESTE 2013).

Bir kanser hücresi oluştuğunda vücudun bağışıklık sistemi bu yabancı hücreyi tanır ve parçalar. Bu sayede vücutta oluşan binlerce kanser hücresi bağışıklık sistemi tarafından yok edilir. Her hücrede, onkogenlerin aktivasyonunu baskılayan antionkogenler (tümör baskılayıcı gen) bulunmaktadır. Antionkogenlerin kaybolması veya inaktive olması durumunda onkogen aktivitesine izin verilmiş olur. Bunu da kanserin oluşumu izler. Vücutta mutasyona uğrayan hücrelerin ancak çok küçük bir kısmı kansere yol açar. Bunun birçok nedeni vardır. İlk nedeni mutasyon gösteren hücrelerin yaşama yüzdelerinin normal hücrelere göre daha düşük olmasıdır. Diğer bir neden ise, hücrelerdeki feedback mekanizmasıdır. Mutasyon gösteren hücrelerin pek çoğunda bile hala aşırı büyümeyi önleyen normal feedback kontrol mekanizması (Tümör baskılayıcı genler) bulunur. Bu yüzden hayatta kalabilen mutant hücrelerin çok azı kanserli hücreye dönüşür (Kizilbey ve AKDESTE 2013).

Sıklıkla, kanser potansiyeli taşıyan bu hücreler büyüyüp kanser oluşturmadan önce vücudun bağışıklık sistemi tarafından yok edilirler. Mutant hücrelerin çoğu değişikliğe uğramış genleri nedeniyle kendi içlerinde anormal protein oluştururlar. Bu anormal proteinler vücudun bağışıklık sistemini uyararak antikor yapımına veya kanserli hücreye karşı duyarlılık kazanmış lenfositlerin oluşmasına neden olarak kanserli hücrenin yok edilmesini sağlarlar. Bağışıklık sisteminin etkinliğini bozan durumlar kanseri hazırlayıcı etmenler (predispozan) olarak bilinir. Bağışıklık sistemi tarafından yok edilmemiş olan bu hücreler kontrolsüz biçimde üreyerek bulundukları dokuyu işgal ederler. İnvazyon ile sadece o dokuyla sınırlı kalmayıp komşu dokulara da yayılabilirler. Metastaz yoluyla kan ve lenf dolaşımı yoluyla vücudun ilgisiz bölgelerine de taşınabilirler (Kizilbey ve AKDESTE 2013).

İyi huylu (benign) tümörler genellikle sınırları belirgin kitlelerdir. Ancak kötü huylu (malign) tümörler sınırları belirsiz ve çevre dokuya sıkıca yapışık halde bulunurlar. Kanser hücreleri civarlarındaki dokulara ulaşarak, kan dolaşımı, lenf sistemi ya da vücut boşlukları ve yüzeyleri yollarıyla vücudun diğer taraflarına yayılırlar. Buna metastaz denir. Kadınlarda en çok meme, rahim ve kalın barsak kanseri; erkeklerde ise en çok akciğer, prostat, mide ve kalın barsak kanserleri görülmektedir. Vücutta görüldüğü bölgelere bakıldığında; beyin ve omurilik %1, cilt %10, genital bölgeler- erkeklerde %20, kadınlarda %8, meme %14, sindirim sistemi %25, solunum yolları- erkeklerde %2, kadınlarda %3, karaciğer ve safra kesesinde %3' lük bir dilime sahiptir. Tüm kanser türleri birlikte değerlendirildiğinde erişkin kanserlerinde % 60, çocuk kanserlerinde ise % 77 oranında iyileşme mümkündür. Ancak hastalığın cinsi, yaygınlığı, uygulanan tedavi gibi bazı faktörler tedavi şansını doğrudan etkiler (Blanchard ve ark 2013, Lee ve ark 2013).

Kanser türleri arasında sık rastlanan ve insidansı gün geçtikçe artan cilt kanserleri gün geçtikçe önem kazanmaktadır.

1.1. Cilt Kanseri

Bütün kanser türleri içinde deri kanseri en sık görülen kanser türlerinden biridir. Deri kanserinden korunmak için yapılması gereken güneşten korunmaktır. Güneşe aşırı maruz kalma deri kanserinin temel sebebidir. Diğer faktörler tekrarlayan tıbbi ve endüstriyel X ışınlarına maruz kalma, yanık veya yara izi bırakarak iyileşen cilt hastalıkları, kömür katranı veya arsenik içeren maddelere mesleki olarak maruz kalma ve ailede cilt kanseri bulunmasıdır. Güneş ışınları deri kanserine sebep olan etkenlerin başında geldiğinden en önemli koruyucu önlem güneşten kaçınmaktır. Cilt kanserleri vücudun herhangi bir bölgesinde bulunabileceği gibi %80 baş-boyun bölgesindedir. Vücudun güneş gören bölgeleri deri kanserlerine daha çok adaydır (Kizilbey ve AKDESTE 2013).

Cilt genel olarak 3 farklı tabakadan meydana gelir. Epidermis, cildin en üst tabakasıdır. Vücudu dış etkenlerden korur. Su, elektrolit ve ısı kaybını önler. Ortadaki dermis katının hemen üstünde bazal hücreler dizisi, onun da üstünde dikensi hücreler olarak da adlandırılan skuamöz hücreler, daha yüzeyde ise granüllü hücrelerin arasında yer alan ve melanosit olarak bilinen hücreler bulunur. Melanositlerden melanin pigmenti sentezi yapılır. Bu pigment diğer epidermis

hücrelerine de geçerek derinin normal rengini verir. Dermis, epidermisin altındadır. Kıl folikülleri, ter ve yağ bezleri, damarlar, sinirler bu kattadır. Subcutis ise deri altı yağ dokusudur (Kizilbey ve AKDESTE 2013).

1.1.1. Cilt Kanseri Tipleri

    tip cilt (deri) kanseri bulunmaktadır.

a) Bazal hücreli karsinoma: Bu kanser tipi genellikle deride küçük etli kabarıklık şeklinde sıklıkla y  z, boyun ve el sırtlarında ortaya çıkar. Bu kanser tipi nadiren metastaz yapmasına rağmen, derinin altındaki kemiğe yayılabilir ve kanserli dokunun yakınındaki dokuları harap edebilir.

b) Squam  z hücreli karsinoma: Deride kabarıklıklar veya kırmızı kabuklu yaralar şeklinde ortaya çıkabilir. B   k kitleler oluşturabilir. Bazal hücreli karsinomanın tersine diğer organlara yayılabilir. Erken yakalandığında tedavi oranı y  ksektir. Bazal hücreli karsinoma ve squam  z hücreli karsinomada tedavi başarısı % 95'dir.

c) Malign Melanom: B   t  n deri kanserleri içinde en   ld  r  c   olanıdır. Bazal hücreli ve squam  z hücreli karsinoma da olduğu gibi melanomada da erken tanı tedavi şansını arttırır. Melanoma melanin pigmentini (deriye rengini veren madde)  reten melanosit dediğimiz hücrelerde ba lar. Melanin derinin rengini verir ve cildi g  ne ten kısmi olarak korur. Melanoma hücreleri melanin üretmeye devam eder ve bu nedenle kanser alanı kahverengi veya siyahtır. Fakat melanoma beyaz ve kırmızı da olabilir. Melanoma yayılma özelliği g  sterdiğinden muhakkak tedavi edilmelidir. Melanoma dikkat çekmeden hızla b   y  yebilir. Genellikle bir ben olarak veya kahve renkli bir benin üzerinde ya da yakınında ortaya çıkar. Melanomun kalıtsal özelliği de vardır. Ailesinde melanoma olan kişilerin hastalığa yakalanma riski daha fazladır (Rajpar ve Marsden 2009).

1.2.Melanoma

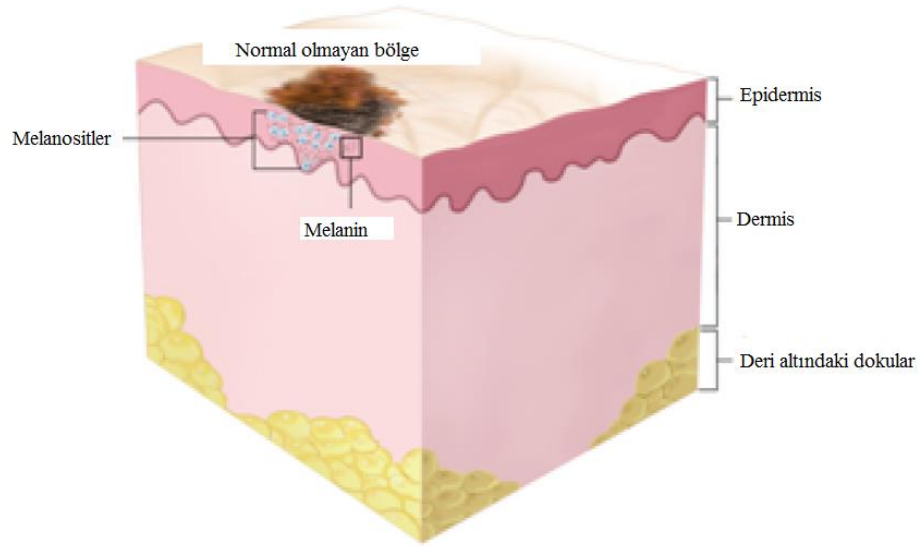
Melanoma cildin y  zeyinde derinin pigment üreten hücrelerinde ba layan bir kanser tipidir. Melanositler, derinin   st katmanına yerle mi , deriye rengini veren hücrelerdir. Kanser, deriye renk veren melanosit hücrelerinin sınırsız ve dağınık bir şekilde b   y  mesiyle ortaya çıkan bir durumdur. Hücrelerin b   y  mesi için zaman gerekir ve bunlar cildin derinliklerine doğru b   y  r. Tabiatları değişen melanositler normal dokuların yerini alarak veya fonksiyonunu bozarak hızla diğer dokulara

yayılabilir. Kan ve lenf damarlarına ulaşarak vücuda yayılan hayatı tehdit eden hastalık haline gelebilirler. Hala cilt yüzeyinde ise melanoma kolay teşhis edilir. Melanoma erken teşhis edilirse tamamen iyileşebilirken, yayılmış ve ilerlemiş ise tehlike boyutlara ulaşabilir (Kizilbey ve AKDESTE 2013).

1.2.1.Melanoma Gelişim Evreleri

0.Evre

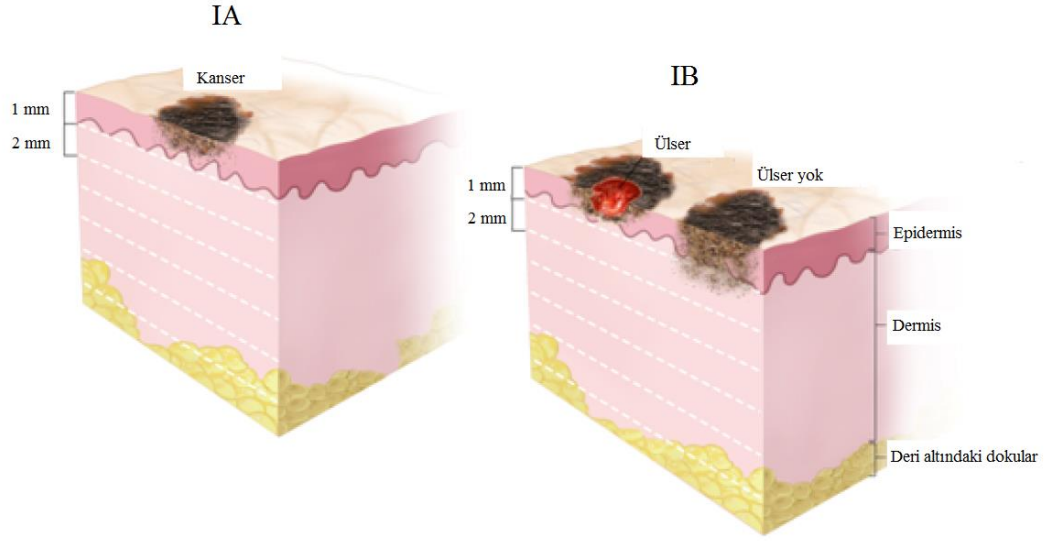
0. evrede, normal olmayan melanositler epidermiste (cildin en dış katmanı) yer alır. Bu normal olmayan melanosit hücreleri kansere dönüşebilir ve normal dokulara sıçrayabilir. 0. evre melanoma in situ olarak da tanımlanmaktadır.



Şekil 1.1. Melanoma sıfırıncı evre (Kizilbey ve AKDESTE 2013).

I.Evre

I. evrede kanser oluşmaktadır. I. evre IA ve IB olarak ikiye ayrılır. IA evresinde tümör epidermiste yer alır, 1 mm'den daha kalın değil ve cilt içinde kesinti oluşturmamıştır. IB evresinde ise hastalık iki şekilde gelişmektedir. Birincisinde tümör 1 mm'den kalın değil ve cilt içinde kesikler gelişerek tümör dermise doğru yayılmaktadır. İkincisinde ise tümör 1-2 mm arasında oluşur ve ciltte kesikler meydana gelmez. Çünkü cilt kalınlığı vücudun farklı bölgelerinde değişiklikler göstermektedir.



Şekil 1.2. Melanoma birinci evre (Kızilbey ve AKDESTE 2013).

II.Evre

II. evre IIA, IIB ve IIC evresi olarak üçe ayrılmaktadır.

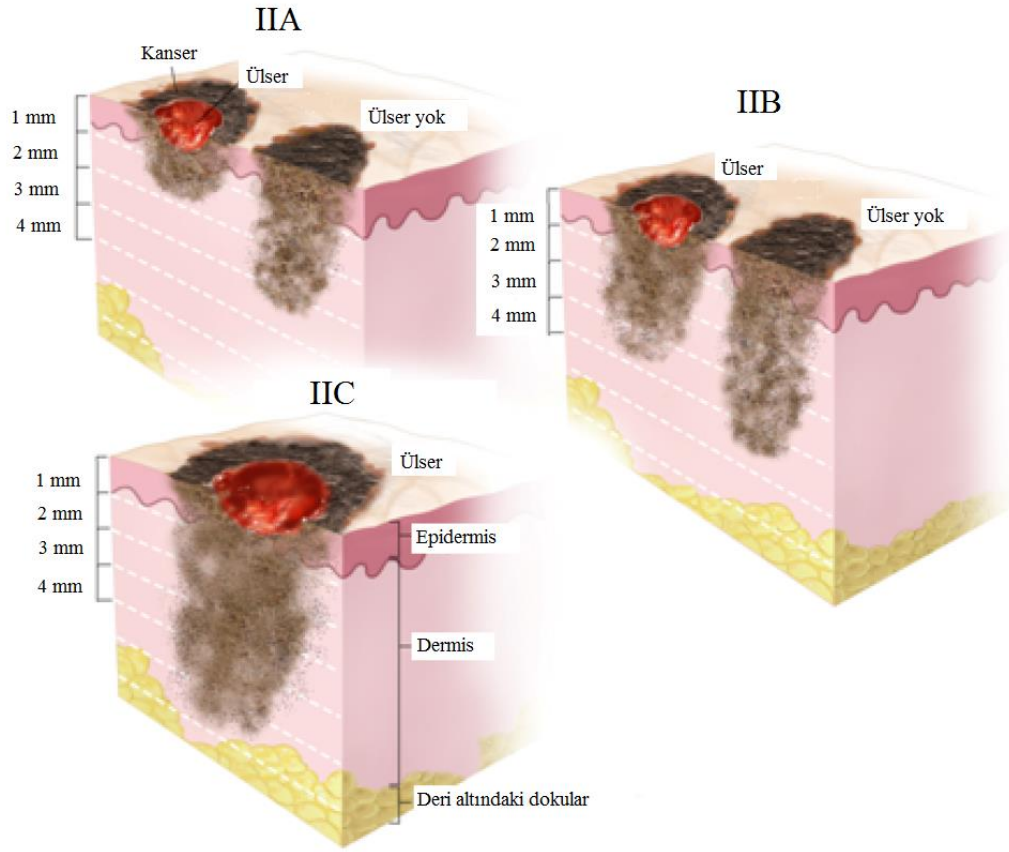
IIA Evresi: Tümör her iki şekilde de olabilir;

- 1-2 mm arasında ve kanamaya sahiptir.
- 2-4 mm arasında cilt içinde kesikler oluşturmaz.

IIB Evresi: Tümör her iki şekilde de olabilir;

- 2-4 mm arasında ve cilt içinde kesikler yani ülser (kanama) gerçekleşir.
- 4 mm'den kalın ve kanamaya sahip değildir.

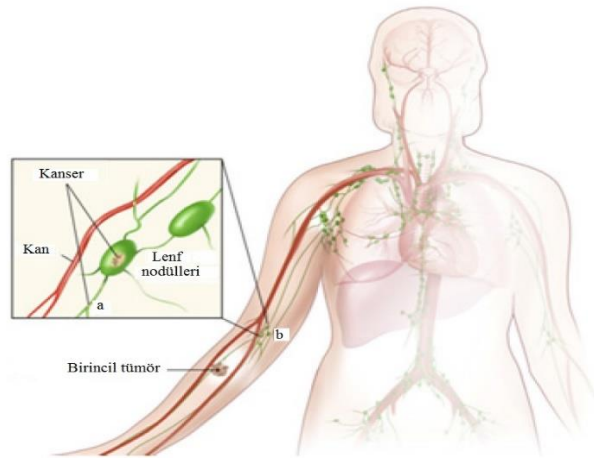
IIC Evresi: Tümör 4 mm'den kalın ve kanamaya sahiptir.



Şekil 1.3. Melanoma ikinci evre (Kizilbey ve AKDESTE 2013).

III. Evre

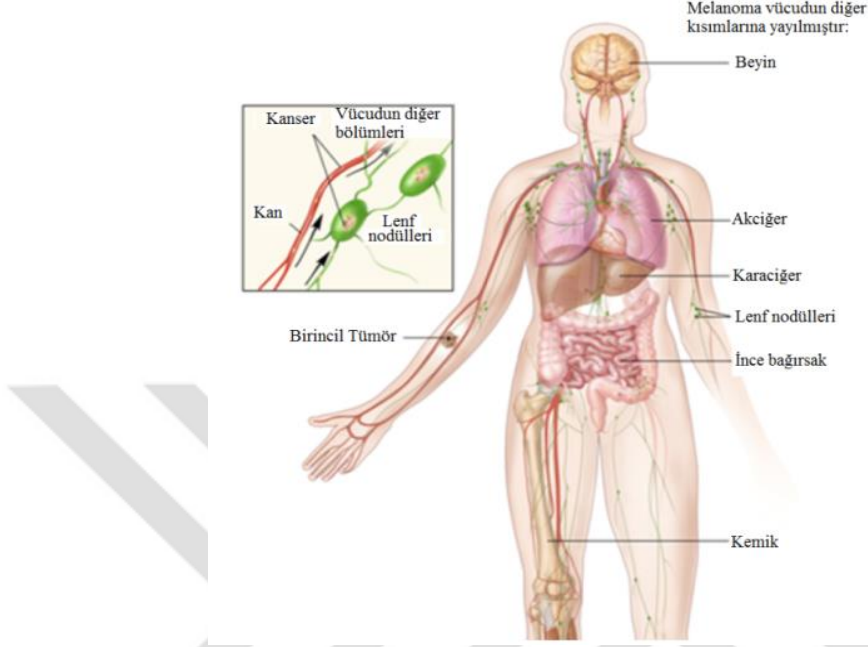
Tümör herhangi bir kalınlıkta kanamalı ya da kanamasız olabilir. Tümör, yakında bulunan lenf damarına ve düğümlerine yayılabilir ya da hareketsiz olan birbirine dolanmış bir veya daha fazla lenf düğümüne yayılabilir.



Şekil 1.4. Melanoma üçüncü evre (Kizilbey ve AKDESTE 2013).

IV.Evre

Tümör, vücudun diğer bölümlerine de yayılmıştır.



Şekil 1.5. Melanoma dördüncü evre (Kızilbey ve AKDESTE 2013).

1.2.2. Malign Melanoma Epidemiyolojisi

Geçtiğimiz 20-30 yıl içinde malign melanoma insidansında ve mortalitesinde diğer kanserlere göre belirgin bir artış gözlenmiştir. Değişik çalışmaların sonuçları melanoma insidansının 100.000’de 5-50 arasında değiştiğini göstermektedir ve ABD’de 25-30 yaş arası kadınlarda en sık görülen kanserin malign melanom olduğu saptanmıştır (Vandaele ve ark 2000, Wang ve ark 2001). Malign melanomların tüm kanserler içindeki oranı % 1,5-2,5 arasında değişmektedir (Ocaña-Riola ve ark 2001, Youl ve ark 2002).

Epidemiyolojik araştırmalar göstermiştir ki güneş ışınları tüm cilt kanserleri gibi malign melanom etyolojisinde de önemli bir role sahiptir ve güneşe aşırı maruziyet önlenirse cilt kanseri oluşma riski azalmaktadır. Hatta çocukluk döneminde aşırı derecede güneş ışınına maruz kalanların ileriki yaşamlarında cilt kanseri olma riski yüksektir (Armstrong ve Krickler 2001). Ultraviyole ışınların etyolojideki rolüne ilişkin önemli bulgular olmakla birlikte, malign melanoma

oluşması için ne kadar şiddette ve ne kadar süreyle güneş ışınına maruz kalmak gerektiği bilinmemektedir (Siskind ve ark 2002).

Malign melanom etyolojisinde rol oynayan UV tipinin UVB (280-320 nm) olduğu bilinmekte ve bu konuda UVA (320-400 nm) daha az sorumlu tutulmaktadır. Ancak son yıllarda psoralen ve PUVA tedavisi uygulanan hastalarda malign melanom olgularına sık rastlanması ve hayvan deneylerinde UVA 'nın DNA yapısını bozucu etkisinin gösterilmesi, UVA 'nın da malign melanom etyolojisinde rolü olduğunu düşündürmektedir (Wang ve ark 2001).

1.2.3. Malign Melanoma Gelişimi Açısından Risk Etmenleri ve Malign Melanom Oluşumundaki Faktörler

Malign melanoma, genetik duyarlılık ve çevresel faktörlerin etkileşimi sonucu ortaya çıkan multifaktöriyel bir kanserdir (Psaty ve ark 2010). Malign melanoma gelişimi açısından günümüze kadar birçok risk etmeni ve oluşum sebebi tanımlanmıştır.

Güneş ışınlarına aşırı maruziyet

Güneş maruziyeti, malign melanoma gelişimi için en önemli çevresel faktördür (Duman 2014). Vücudun açıkta kalan ve bol güneş alan bölgelerinde malign melanom gelişme riski yüksektir. Güneş ışınları malign melanom etyolojisinde önemli bir role sahiptir, bu nedenle güneş yanıkları üzerinde gelişen lezyonlar dikkatli değerlendirilmelidir (Çöl 2003).

Malign melanom karsinogenez basamaklarında, UV'ye bağlı DNA hasarına ikincil oluşmuş mutasyonlar primer rolü oynar. Son yıllarda UV'nin CDKN2A, PTEN, NRAS ve BRAF gibi malign melanom ile ilişkili genlerle de mutasyon oluşturduğu gösterilmiştir (Garibyan ve Fisher 2010). Yoğun aralıklı güneş maruziyeti yüzeysel yayılan malign melanoma gelişimini ve ayrıca kişinin multiple primer malign melanom geliştirme riskini de arttırmaktadır. Kronik sürekli paternde güneş maruziyeti özellikle lentigo malign melanom riskinde artışa yol açmaktadır. Ayrıca çocuklukta güneş yanığı varlığı malign melanoma riskini 2 kat artırırken, erişkinlikteki yanıklar malign melanoma riskinde yaklaşık 1.53 kat artışa yol açmaktadır (Psaty ve ark 2010).

Solaryum, fototerapi gibi artifisyonel UV maruziyeti de malign melanom riskinde artışa yol açmaktadır. On dokuz çalışmanın dahil edildiği bir meta-analizde solaryumun malign melanoma riskini yaklaşık 1,15 kat arttırdığı gösterilmiştir. 35 yaş altındaki deney grubunda ise solaryum riskinin 1,75 kat arttığı görülmüştür (Green ve ark 2007). Ayrıca, 250 seans üzerinde psoriyazis UVA (PUVA) tedavisi alan psoriyazis hastalarında malign melanoma riskinin 5 kat arttığı, bu artışın da tedaviden 15 yıl sonra arttığı gözlemlenmiştir (Stern ve ark 1997, Duman 2014).

Fenotipik etkenler

Derideki melanin UV ışınlarına karşı koruyucu etkiye sahip olduğundan açık tenli insanlar esmerlere göre daha yüksek riske sahiptir (Çöl 2003). Kızıl ve sarı saç, açık renk ten, çillerin varlığı, açık renk göz ve deri fototipi I gibi fenotipik özellikler malign melanoma riskini artırmaktadır. Kızıl saç varlığında en yüksek risk artışı (rölatif risk:3.64) mevcuttur. Özellikle sırt bölgesinde artmış çillenme gösteren kişilerde risk 2 kat artmaktadır. Fitzpatrick deri fototipi I'e sahip bireylerde fototip IV'e göre iki kat artış mevcuttur (Gandini ve ark 2005, Duman 2014). Açık renk göz rengine (mavi, yeşil) sahip bireylerde malign melanoma riski %50 oranında artmaktadır (Psaty ve ark 2010, Duman 2014).

Önceden mevcut olan nevüsler

Vücudunda nevüs taşıyanlarda malign melanoma riski belirgin olarak yükselmektedir. Benign nevüslerin özellikleri ve nevüslerde meydana gelen değişiklikler dikkatle değerlendirilmelidir (Çöl 2003).

Ailevi yatkınlık ve genetik etmenler

Ailede malign melanoma öyküsü de malign melanoma riskini artırmaktadır. Ailede birinci derece yakınında malign melanoma öyküsü, malign melanoma riskini 1,7 kat artırırken, iki tane malign melanomalı yakın varlığında ise bu risk 9 kat artmaktadır (Hemminki ve ark 2003, Duman 2014).

Bazı malign melanomlarda ailevi öykü ve genetik yatkınlık söz konusu olabilmektedir. Malign melanom gelişiminde 1p, 6q, 7 ve 9. kromozomlarda değişiklikler olduğu gösterilmiştir (Çöl 2003). Ayrıca ksedorma pigmentozum, okulokutanöz albinizm gibi bazı genetik sendromlarda ve BRCA2 mutasyonu taşıyan

meme-over kanser ailelerinde malign melanoma riskinin arttığı bilinmektedir (Kraemer ve ark 1994, Ingraffea 2013, Duman 2014).

Ayrıca displastik nevus sendromu olarak da bilinen ve melanositik lezyonlarla karakterli bir hastalık olan atipik melanoma sendromunda da (AMS) melanom riskinin arttığı bilinmeli ve AMS tanısı almış hastalar daha dikkatli kontrol edilmelidir (Çöl 2003).

1.2.4. Melanoma İnsidansı ve Görülme Sıklığı

Son yıllarda beyaz ırkta melanoma görülme sıklığı artmıştır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) her yıl 132.000 yeni melanoma olgusu tahmin etmektedir, bu rakam ülkeler arasında 150 kata kadar varan farklı oranlarda değişiklik göstermektedir. Hastalık en çok Avustralya'da görülmektedir. Avustralya'da melanoma insidansındaki artış %3-7'dir. Avustralya'da melanoma 100.000 kişide 40 iken, solar radyasyona daha az maruz kalan Kuzey Avrupa'da 100.000 de 5'tir. Tüm Avrupa'da melanoma insidansı 12/100.000, Almanya Münich bölgesinde 14/100.000'tür. Yaşam boyu melanoma riski, Avrupa ve Amerika'da 1/100 ile 1/200 arasında değişmektedir. Avustralya'da yaşam boyu melanoma riski 1/25, ABD'de 1/75'dir. ABD'de melanoma gelişme riski 1935'te 1/1500 iken, 1960'da 1/500, 1980'de 1/250, 1992'de 1/105 ve 2002'de 1/75'dir; 2010 yılında ise 1/50 olduğu tahmin edilmektedir. Tüm kanserler içinde melanoma görülme oranı kadınlarda %4, erkeklerde %5'tir. Non melanoma deri kanserleri melanomadan 18-20 kat daha fazla görülmektedir; bunlar içinde de bazal hücreli karsinom, skuamoz hücreli deri kanserlerinin 4 katıdır. 2004 yılında yeni melanoma sayısı 55.000, ölüm sayısı ise 7900'dür. Avrupa dışındaki koyu tenliler arasındaki insidans rakamları çok düşük, fakat güvenilir-tutarlı değildir. Buradaki rakamlar 100.000'de 0,1-3 arasındadır. Togo'da yapılan çalışmada melanoma insidansı yılda 0.07/100.000 olarak bildirilmektedir. En çok görülen kanserler sıralamasında melanoma, Avustralya ve Yeni Zelanda'da dördüncü, Amerika ve Kanada'da yedinci, İskandinavya'da onuncu ve İngiltere'de ise on sekizinci sıradadır (Kizilbey ve AKDESTE 2013).

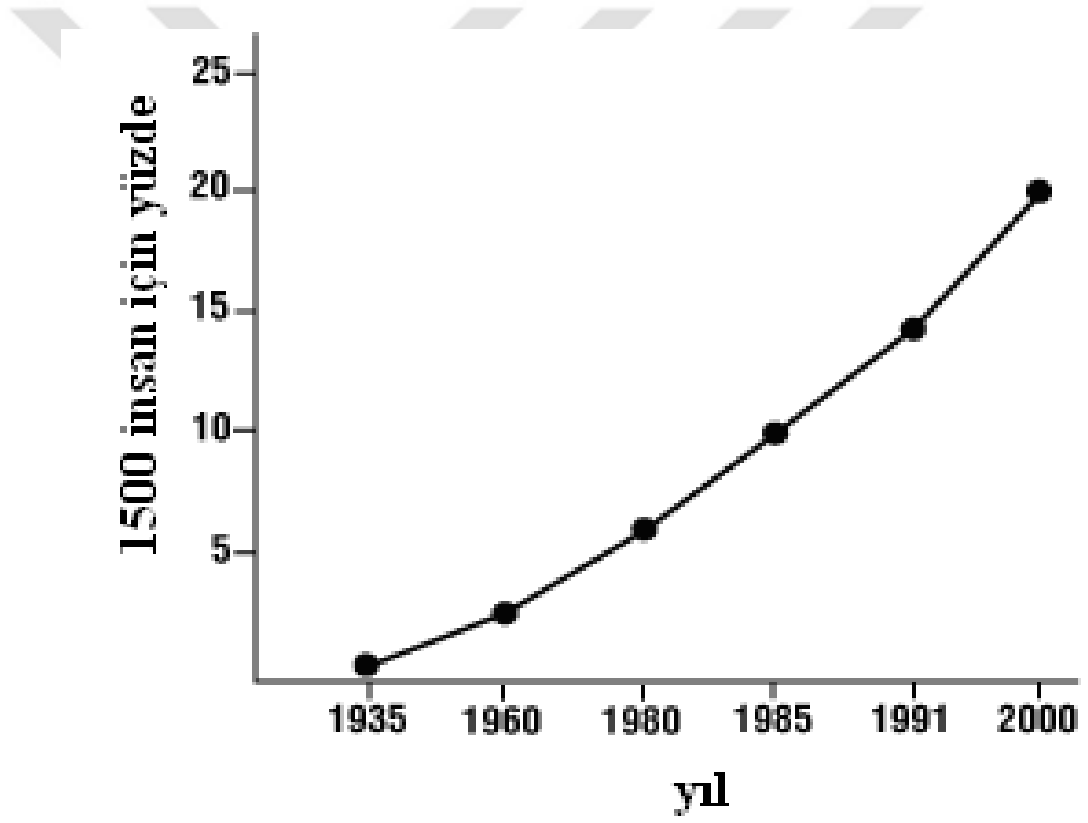
Melanoma insidansı yaşla artar. Melanoma dışı deri kanserleri genel olarak yaşla bağlantılıdır ve ileri yaşlarda görülür. Melanoma hastalığında da yaşa bağlı olarak artma olmasına rağmen, nispeten genç sayılabilecek 20-45 yaşlarında pik yapar (Çizelge 1.1). Konjenital nevuslardan kaynaklanan melanoma çocuklarda sık

iken, lentigo malign melanoma yaşlılarda sıktır. Lentigo malign melanoma 65 yaş, yüzeysel yayılan melanoma 30-50 yaş (ortalama 37), nodüler melanoma orta yaş, akrallentijinöz tip 65 yaşlarda görölmektedir. Avustralya ve Amerika'da 1960-1970'ten sonra doğanlarda yapılan yaş grubu analizlerinde insidans hızında duraklama, hatta belirli bir azalma görölmüştür. Bazıları bunu halk sağlığı koruma çalışmalarının erken etkisine bağlamıştır. Diğer birçok ölkede yükseliş devam etmektedir. Tüm dünyada beyaz ırkta yaşa göre standardize edilmiş melanoma insidensinde bir artış vardır (Özçelik ve Akyol 2007, Kizilbey ve AKDESTE 2013).

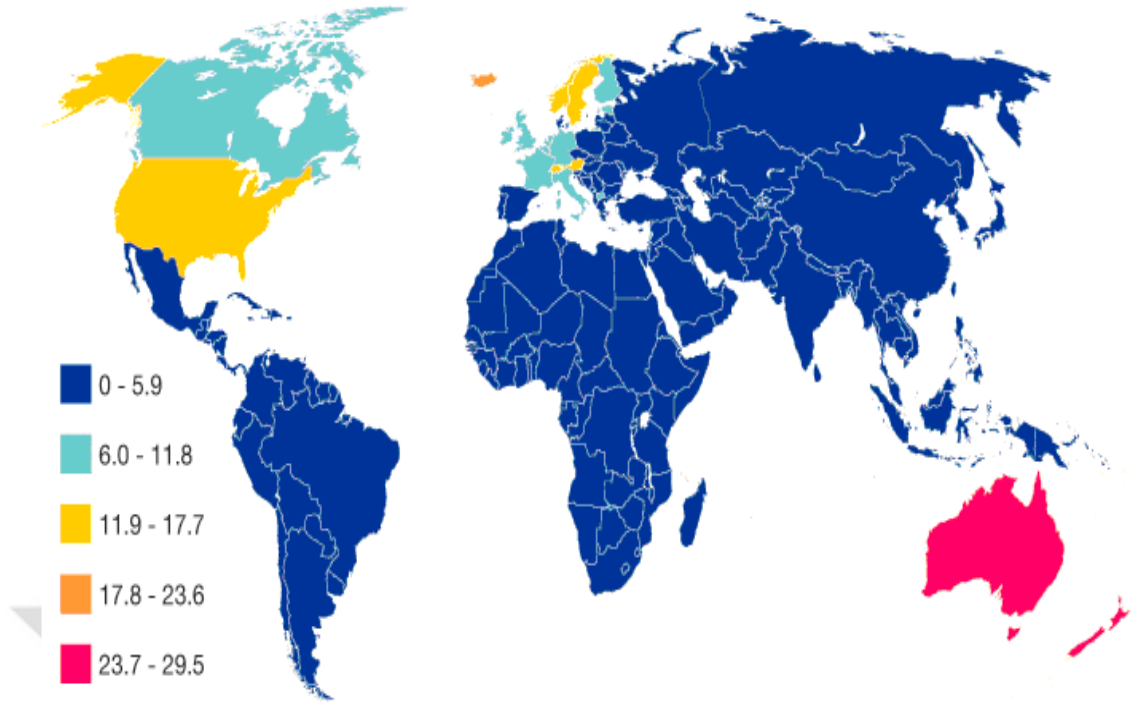


Çizelge 1.1. Melanoma insidensinin yaş ve cinsiyet dağılımı (Kizilbey ve AKDESTE 2013).

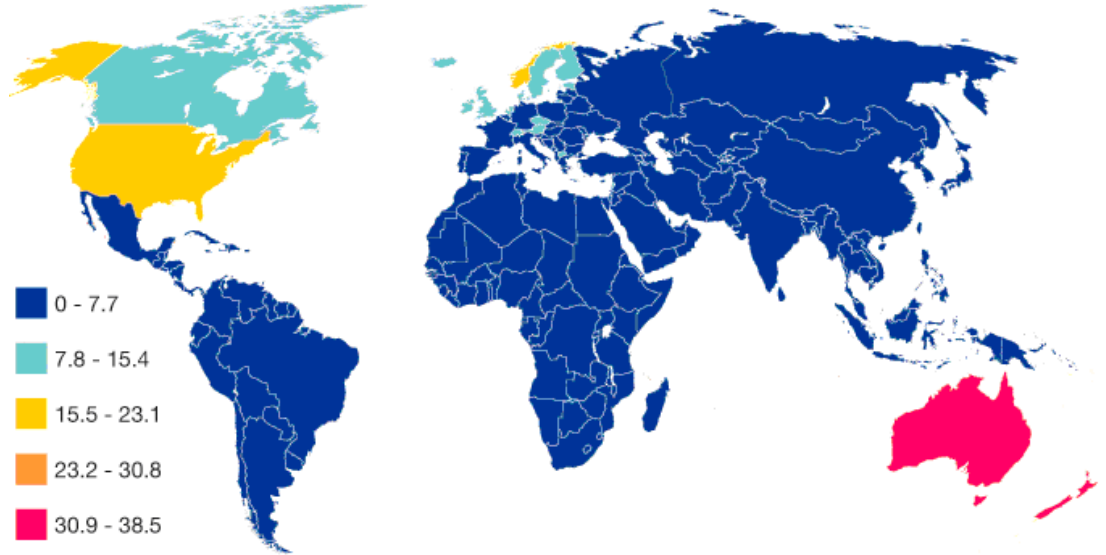
Yaş grupları	İnsidens/100.000	
	Erkek	Kadın
15-39	5	10
50-59	15	20
70-79	35	25
80+	50	35



Şekil 1.6. Melanoma hastalığının gelişiminin yıllara göre dağılımı (Kizilbey ve AKDESTE 2013).



Şekil 1.7. Melanoma kanseri olan kadın hastalar için yaşa göre hastalıktan etkilenen hasta sayısı (ASR: Age standardized incidence rate)/100.000 kişi (Kızılbey ve AKDESTE 2013).



Şekil 1.8. Melanoma kanseri olan erkek hastalar için yaşa göre hastalıktan etkilenen hasta sayısı (ASR: Age standardized incidence rate)/100.000 kişi (Kızılbey ve AKDESTE 2013).

1.2.5. Malign Melanomanın Klinik Özellikleri

Malign melanoma geleneksel olarak klinik ve patolojik özelliklerine bağlı olarak 4 alt tipe; yüzeysel yayılan malign melanom, nodüler malign melanom, lentigo malign melanom ve akral lentiginöz malign melanom ayrılmıştır (Duman 2014).

Yüzeysel yayılan malign melanom, açık tenli bireylerde en sık görülen malign melanoma tipidir, tüm malign melanomaların %70 'ini oluşturur. Sıklıkla 30-50 yaş arasında görülmektedir. En sık intermitan güneş gören bölgelerde, erkeklerde gövdede ve kadınlarda bacaklarda yerleşmektedir. Yüzeysel yayılan malign melanom, de novo ortaya çıkabileceği gibi nevüs üzerinden de gelişebilir. Nevüsle ilişkili malign melanomların çoğu bu tiptedir (Duman 2014). Yüzeysel yayılan malign melanomda tipik klinik öykü 1-5 yıl içinde yavaş yavaş değişiklik gösteren kahverengi-siyah lezyon varlığı ile karakterize edilmiştir. İlk önce asimetrik, renk çeşitliliği ve sınır düzensizliği olan makül veya yama şeklinde başlar, daha sonra lezyon üzerinde papül veya nodül gelişimi görülür. Lezyonların yaklaşık 2/3 'ünde gri, hipodepigmente alanlar olarak görülen regresyon alanları izlenir (Şekil 1.9) (Duman 2014).



Şekil 1.9. Yüzeysel yayılım gösteren melanoma. Düzensiz kenarlı, çok tonlu kahverengi, gri, pembe ve asimetrik bir lezyon göstermektedir (Rajpar ve Marsden 2009).

Nodüler malign melanom, açık tenli bireylerde ikinci sıklıkta görülen malign melanoma alt tipidir, tüm malign melanomların %15-30'unu oluşturur. Sıklıkla altıncı dekatta, gövde, baş-boyun bölgelerinde ortaya çıkar. Erkeklerde kadınlardan

daha sıktır. Genellikle mavi-siyah, bazen pembe-kırmızı ülsere olabilen nodüller şeklinde hızlı bir şekilde ortaya çıkar (Şekil 1.10) (Duman 2014).



Şekil 1.10. Nodüler melanoma. Ülsere olabilen ve hemorajik siyah bir nodüle sahip olması ile tanınır. Bu tür melanomların prognozu kötüdür (Rajpar ve Marsden 2009).

Lentigo malign melanom, tüm kutanöz malign melanomların %15'inden azını oluşturmaktadır. Genellikle daha ileri yaşlarda, yedinci dekada, kronik sürekli UV maruziyetinin olduğu yüz özellikle de burun ve yanaklarda ortaya çıkar. Yavaş büyüyen, asimetrik, renk çeşitliliği gösteren düzensiz sınırlı kahve-siyah renkli yama şeklinde başlar. Lentigo maligna adı verilen in-situ fazdan invazyon gelişimi sonucu ortaya çıkar (Şekil 1.11) (Duman 2014).



Şekil 1.11. Lentigo malign melanom. Kalınlaşmış siyah alan (melanom), eski ve düzensiz kahverengi bir makülün mediyal kısmından (lentigo maligna) gelişmiştir (Rajpar ve Marsden 2009).

Akral lentijinöz malign melanom, kutanöz malign melanomların %5-10'unu oluşturur. İnsidansı etnik farklılıklardan en çok etkilenen, siyah ırkta (%70) ve Asyalılarda (%45) en sık görülen malign melanom alt tipidir. UV maruziyeti ile ilişkisi yoktur. Sıklıkla avuç içinde, ayak tabanında ve tırnakta kahverengi-siyah düzensiz lezyonlar şeklinde ortaya çıkar (Şekil 1.12) (Duman 2014).



Şekil 1.12. Akral melanoma. Genellikle düzensiz pigmentli ve kenarlı ülsere sahiptir (Rajpar ve Marsden 2009).

Bu klasik alt tiplerin dışında malign melanomların klinikopatolojik varyantları arasında amelanotik, nevoid, hayvan tipi, dezmoplastik/nörotropik malign melanom, çocukluk çağı malign melanom, persistan rabdoid, miksoid, metaplastik, adenoid, balon hücreli ve nöroendokrin diferansiyasyon gösteren malign melanoma gibi farklı alt tipler de mevcuttur. Bunların ayrımı daha çok histopatolojik özelliklere göre yapılabilir (McKee ve Calonje 2009, Elder 2014).



Şekil 1.13. Amelanotik nodüler melanoma (Rajpar ve Marsden 2009).

1.2.6. Melanoma ve Genetik ile İlişkisi

MAPK sinyal yolağının düzenlenmemesi, melanomalar da dahil olmak üzere çeşitli neoplazmlar ile ilişkilendirilmiştir. Melanomlardaki MAPK yolağındaki genel değişiklikler BRAF, EGFR, KIT, RAS, MEK ve ERK genlerindeki mutasyonları içerir. Melanoma biyolojisi ve genetiğinin anlaşılması, melanoma tedavisinde MAPK yolağını hedeflemeye yönelik ilgileri uyandırmıştır (Torres-Cabala ve Curry 2016).

MAPK Yolağı ve Melanoma

Ras/Raf/MEK/ERK yolağı olarak da bilinen mitojen aktive protein kinazlar (MAPK) yolağı, ardışık fosforilasyon olayları yoluyla sinyallerin plazma membranından çekirdeğe ileten bir sinyalleme kaskadıdır (Şekil 1.14). MAPK, serin/treonin kinaz ailesinin bir üyesidir ve hücre büyümesi, farklılaşma ve apoptozu düzenler (Pearson ve ark 2001).

Enzimlerin aktivitesi, bir zar reseptörünün aktive olmasıyla başlatılan bir fosforilasyon kaskadı ile düzenlenir. Membran reseptörünün aktivasyonu, ligand bağlanması sonucu protein yapısında meydana gelen yapısal bir değişikliğin sonucudur. Ligand ile uyarılan konformasyonel değişim, zar reseptörünün bir hücre içi adaptör proteini (Shc ve GRB2 gibi) ile etkileşimini artırır. Adaptör protein, sırayla, sinyali ileten bir guanin nükleotid değişim faktörü (SOS) ile etkileşime girer

ve küçük GTP bağlayıcı protein RAS'a sinyali aktarır. Daha sonra, RAS, kaskadtaki ilk hücre içi kinaz olan RAF'ı (MAPKinaz-kinaz-kinaz/MAPKKK) aktive eder. RAF kinazlar, ARAF, BRAF ve CRAF dahil olmak üzere serin/treonin kinazlardan oluşan bir ailenin ürünüdür. Aktive edildiğinde RAF, MEK'i (MAPKinaz-kinaz/MAPKK) fosforiller ve ardından da hücre içi sinyalle düzenlenen kinazı (ERK/MAPK) aktive eder. ERK, hücre çoğalması ve proliferasyonda rol oynayan genlerin ekspresyonunu düzenleyerek, birkaç transkripsiyon faktörünü doğrudan fosforile edebilir (McCubrey ve ark 2007). Bu sinyal yolağının karmaşıklığı, üç RAS (HRAS, NRAS, KRAS), üç RAF (ARAF, BRAF, CRAF), iki MEK (MEK1 ve MEK2) ve iki ERK (ERK1 ve ERK2) izoformunun varlığından ileri gelmektedir (Çizelge 1.2). Bu yolağın çeşitli noktalarındaki değişiklikler, kontrolsüz hücre büyümesine ve çoğalmasına, melanoma da dahil olmak üzere çeşitli kanserlerin gelişimine katkıda bulunabilir.

Çizelge 1.2. MAPK yolundaki temel proteinlerin kromozomal konumu ve molekül ağırlığı (MW) (Torres-Cabala ve Curry 2016).

	Kromozom	MW (Da)
EGFR (ERB1)	7p12	134,277
KIT (c-Kit)	4q11-q12	109,865
NRAS	1p13.2	21,229
HRAS	11p15.5	21,298
BRAF	7q34	84,437
MEK1 (MAP2K1)	15q22.1-q22.23	43,439
MEK2 (MAP2K2)	19p13.3	44,424
ERK1 (MAPK3)	16p11.2	43,136
ERK2 (MAPK1)	22q11.21	41,390

Melanomada Yaygın MAPK Değişiklikleri

MAPK yolağında meydana gelen çeşitli değişiklikler çeşitli kanserlerle ilişkilendirilmiştir (Dhillon ve ark 2007). *NRAS* ve *BRAF* 'taki aktive edici mutasyonlar sırasıyla melanomların %15-30 ve %60-70 'inde görülür (Gray-Schopfer ve ark 2005) (Çizelge 1.2). Bu değişikliklerin melanom gelişimi içi yetersiz olduğu öngörülse de, bir takım iyi huylu nevüslerin de *BRAF* ve *NRAS* genlerinde mutasyonlar taşıdığı düşünülmektedir. Melanomanın ilerlemesi için gerekli olan *BRAF* ve *NRAS* 'daki aktive edici mutasyonların yanı sıra ilave genetik değişiklikler de tam olarak anlaşılamamıştır (Torres-Cabala ve Curry 2016).

Çizelge 1.3. Melanomalarda bulunan MAPK yolağındaki yaygın mutasyonlar (Torres-Cabala ve Curry 2016).

Gen	Ekzon	DNA baz değişiklikleri	Aminoasit değişimi	Tahmini sıklık
<i>KIT</i>	11	c.1727T>C	L576P	25
	11	c.1676T>C	V559A	20
	13	c.1924A>G	K642E	20
<i>NRAS</i>	2	c.182A>G	Q61R	35
	2	c.181C>A	Q61K	34
<i>BRAF</i>	15	c.1799T>A	V600E	80
	15	c.1798_1799delGTinsAA	V600K	5
<i>MEK1</i>	3	c.370C>T	P124S	-
	3	c.607G>A	E203K	-
<i>MEK2</i>	4	c.461C>T	S154F	-
	6	c.622G>A	E207L	-

NRAS genindeki somatik mutasyonlar tüm malign melanomların ~%13-25'inde görülmektedir (van't Veer ve ark 1989, Ball ve ark 1994, Curtin ve ark 2005). Çoğu vakada, bu mutasyonlar 12. , 13. veya 61. kodonlarda meydana gelen bir amino asit değişikliğinden kaynaklanır. Bu mutasyonlar sonucunda, *NRAS* sinyal yolları dolaylı olarak etkilenir.

EGFR

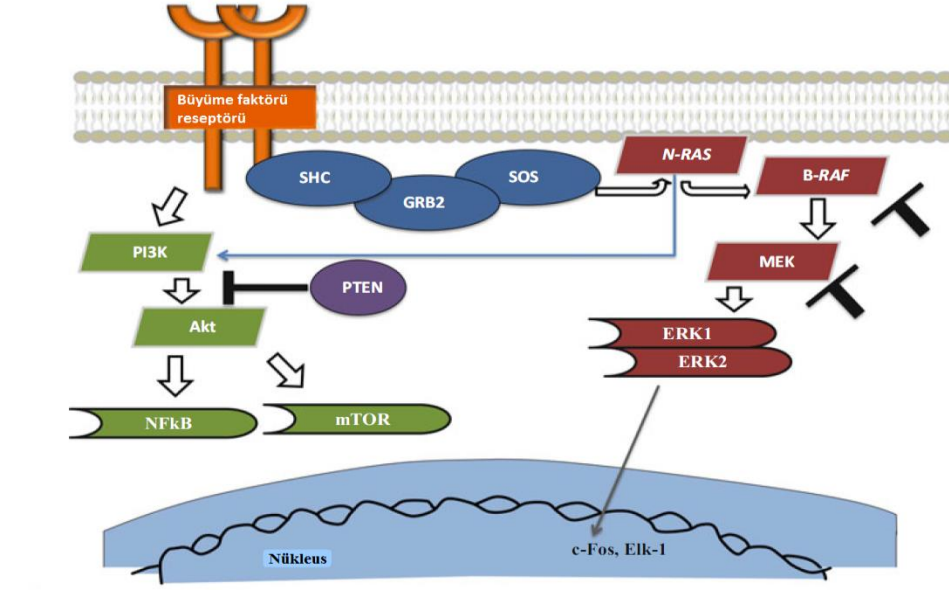
Kromozom 7p12 'de bulunan epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), tirozin kinaz reseptör ailesinin 134 kDa ağırlığındaki protein üyesidir. EGFR 'nin aktivasyonu, MAPK yolağının ve hücre bölünmesinin uyarılmasına yol açar. EGFR disregülasyonunun çeşitli kanserlere katkıda bulunduğu gösterilmiştir ve çeşitli maligniteler için potansiyel bir terapötik hedef olarak çalışılmıştır (Ciardiello ve Tortora 2008). EGFR 'nin melanoma hücrelerinde düşük ila orta seviyelerde eksprese edildiği düşünülmektedir (Ivanov ve Hei 2005). Birkaç çalışmada melanomadaki EGFR mutasyonlarına bakılmıştır ve EGFR 'de meydana gelen değişikliklerin melanomaya yaptığı katkı ortaya koyuldukça, terapötik bir hedef olarak potansiyel yararlılığına ilişkin kanıtlar daha da güçlenmektedir (Rákossy ve ark 2007, Boone ve ark 2011).

KIT

KIT geni, kromozom 4q12 bölgesinde lokalizedir, 145 kDa ağırlığında bir protein olan ve hücre zarı ile ilişkili reseptör tirozin kinazı kodlar. *KIT* mutasyonları, melanomlar da dahil olmak üzere çeşitli kanser vakalarında bildirilmiştir. *KIT* mutasyonları, akrall ve mukozal melanomalarda, aralıklı güneşe maruz kalmış bölgelerde meydana gelen melanomlardan daha sık ortaya çıkmaktadır. Kronik güneş hasarı olan ve olmayan 102 primer melanoma hastası esas alınarak yapılan bir çalışmada, kronik güneş hasarına sahip ciltlerde, mukozanın %39'unda, akrallın %36'sında ve melanomların %28 'inde *KIT* mutasyonları saptanmıştır. Fakat kronik güneş hasarı olmayan ciltlerde meydana gelen melanomlarda mutasyon saptanamamıştır (Curtin ve ark 2006). Bu çalışmada bulunan en yaygın *KIT* mutasyonları, her ikisi de gastrointestinal stromal hücre tümörlerinde (GIST) bildirilen K642E ve L576P 'dir (Heinrich ve ark 2003). Akrall lentiginöz melanomada (ALM) bildirilen *KIT* mutasyon sıklığı %10-15 arasında değişmektedir (Zebary ve ark 2013).

Dika ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, tırnaktaki melanomların %20'sinin, *KIT* geninde P551L (ekzon 11), V560D (ekzon 11) veya D816N (ekzon 17) 'yi içeren mutasyonlara rastlanmıştır. Aksine, sinonazal mukozal melanomların yalnızca %4'ünde *KIT* mutasyonu görülmüştür (Zebary ve ark 2013). Akrall lentiginöz, mukozal ve tırnak melanomasındaki *KIT* mutasyonlarının çoğunun, ekzon 11'de ortaya çıktığı ve mutasyonların ekzon 13 ve 17 'de daha az sıklıkla meydana geldiği rapor edilmiştir (Dika ve ark 2013, Zebary ve ark 2013, Zebary ve ark 2013). Aksine, 24 işsi hücreli melanoma esas alınarak yapılan bir çalışmada, hiçbir *KIT* mutasyonuna rastlanamamıştır (Kim ve ark 2012).

KIT genindeki mutasyonlar hem MAPK hem de PI3K yollarını aktive etme potansiyeline sahiptir. Aksine, BRAF gibi sinyalleşme kaskadında aşağı yönde bir proteini etkileyen mutasyonların, PI3K yolağını aktive etmesi daha az olasıdır (Şekil 1.14)

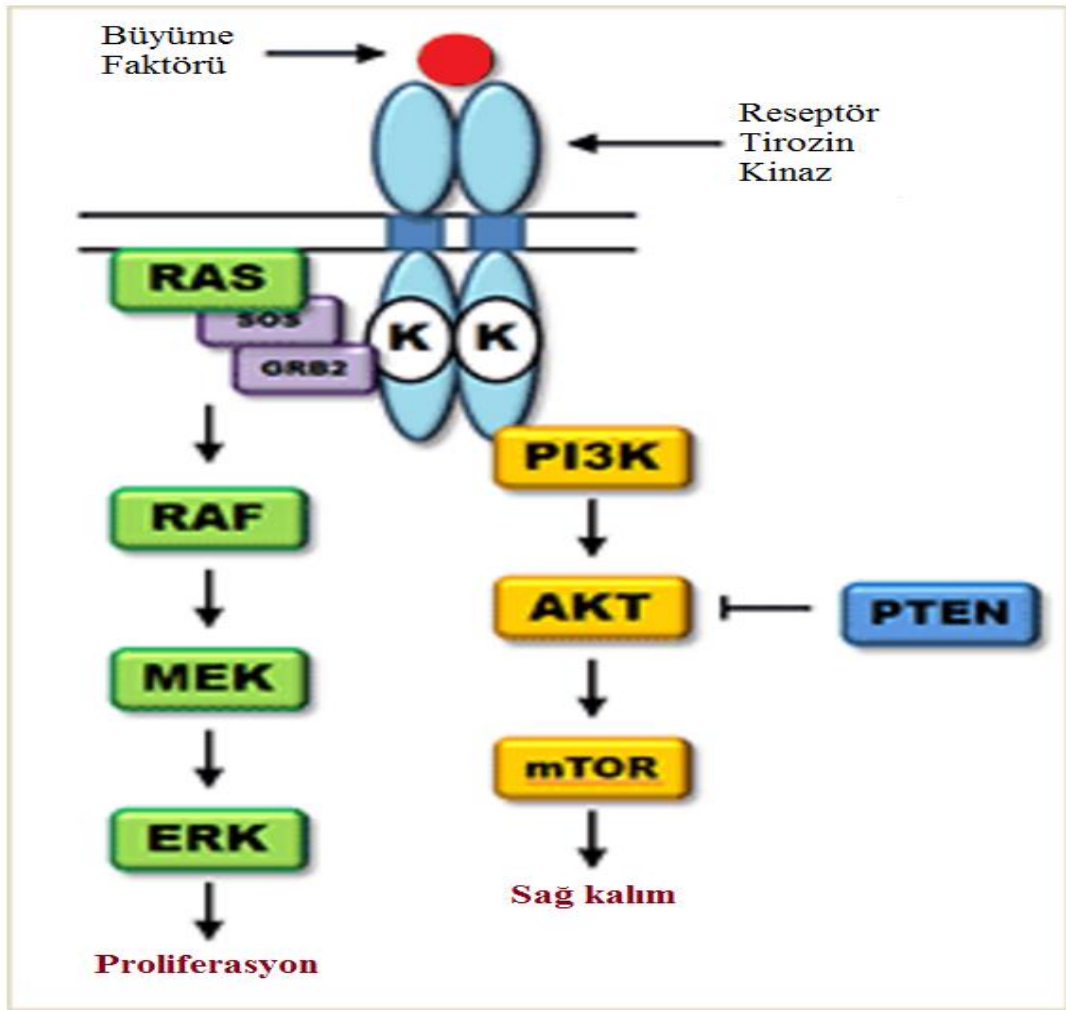


Şekil 1.14. MAPK ve PI3K yollarının diyagramı (Torres-Cabala ve Curry 2016).

NRAS

Üç farklı insan RAS geni tanımlanmıştır: *KRAS* (Kirsten sıçan sarkom virüsünden onkogen ile homologdur), *HRAS* (Harvey sıçan sarkom virüsünden onkogen ile homologdur ve *NRAS* (bir insan nöroblastomasından izole edilmiştir). Farklı RAS genleri oldukça homologtur, ancak işlevsel açıdan farklılık gösterirler. Gereklik dereceleri ise halen tartışma konusu olmaya devam etmektedir (Pylayeva-Gupta ve ark 2011).

RAS proteinleri, inaktif guanozin difosfat (GDP) bağlanmış ve aktif guanozin trifosfat (GTP) bağlanan formlar arasında döngü oluşturan küçük GTPazlardır. Ayrıca RAS proteinleri, büyüme faktörü reseptör sinyalleşmesinin akış aşağısındaki merkezi araçlardır ve bu nedenle hücre proliferasyonu, hayatta kalma ve farklılaşma için kritik önem taşırlar. RAS, hücre sağ kalımına katılan PI3K-AKT-mTOR yolağı ve hücre proliferasyonunda rol oynayan RAS-RAF-MEK-ERK yolağı da dahil olmak üzere birçok efektörü aktive edebilir (Şekil 1.15)



Şekil 1.15. RAS sinyal yollarının basitleştirilmiş şeması. Reseptör tirozin kinazlara bağlanan büyüme faktörü RAS aktivasyonuna neden olur. Şema içindeki K harfi, tirozin kinaz domainini belirtir.

RAS, birçok kanser patogeneğinde rol oynamaktadır. RAS genindeki mutasyonların aktive edilmesi, büyüme faktörü sinyalizasyonunun yokluğunda dahi, RAS GTPaz'ın yapısal aktivasyonu ile sonuçlanır. Sonuç olarak, RAS hücre içinde sürekli bir proliferasyon sinyalidir. Spesifik RAS genleri, farklı malignitelerde tekrara tekrar mutasyona uğrar. NRAS mutasyonları melanoma, hepatoselüler karsinoma, miyeloid lösemi ve tiroid karsinomasında özellikle yaygındır (Schubbert ve ark 2007, Karnoub ve Weinberg 2008).

RAS ailesinin üyeleri birçok tümörde mutasyona uğramıştır. Mutasyona uğramış RAS genleri en çok ekzokrin pankreasta, kolon karsinomalarında ve foliküler-farklılaşmamış tiroid karsinom tümörlerinde görülür (Bos 1989). NRAS, 1p13.2 kromozomunda bulunan 21 kDa 'luk bir proteindir. Ayrıca NRAS, HRAS ve

KRAS 'ı da içeren küçük GTPaz protein ailesinin bir üyesidir. Bunlar, GTP 'yi GDP 'ye hidroliz etme özelliğine sahip olan GTP bağlayıcı proteinlerdir. RAS proteini, GTP üzerine bağlandığında aktif hale gelir; GTP 'nin GDP 'ye hidrolizini inaktif konformasyona dönüştürerek teşvik eder. RAS 'daki mutasyonlar tipik olarak proteinin inaktif konformasyona geçme kabiliyetine müdahale ederek, aşırı RAS sinyalizasyonuna neden olur. RAS proteinleri çeşitli yolları aktive eder ve RAF aktivasyonu yoluyla MAPK yolağının pozitif regülatörleri olarak görev yaparlar (Torres-Cabala ve Curry 2016).

Birçok çalışma, melanomalarda NRAS mutasyonlarının varlığını bildirmiştir (Davies ve ark 2002, Dika ve ark 2013, Zebary ve ark 2013). Melanom alt türleri arasında yüzde oranı değişse de, tüm melanomların yaklaşık %15-20 'sinde NRAS 'da bir mutasyon olduğu düşünülmektedir (Fedorenko ve ark 2013). NRAS mutasyonları, edinilen nevüslerde düşük bir frekansta görülmekle birlikte konjenital nevüslerde (~%80) yaygın olarak görülmektedir. Aksine BRAF mutasyonları, konjenital nevüslerde nadir görülür ya da bulunmaz (Bauer ve ark 2007). NRAS mutasyonlarının güneşe maruz kalmış bölgelerde daha sık meydana geldiği bildirilmiştir (Torres-Cabala ve Curry 2016).

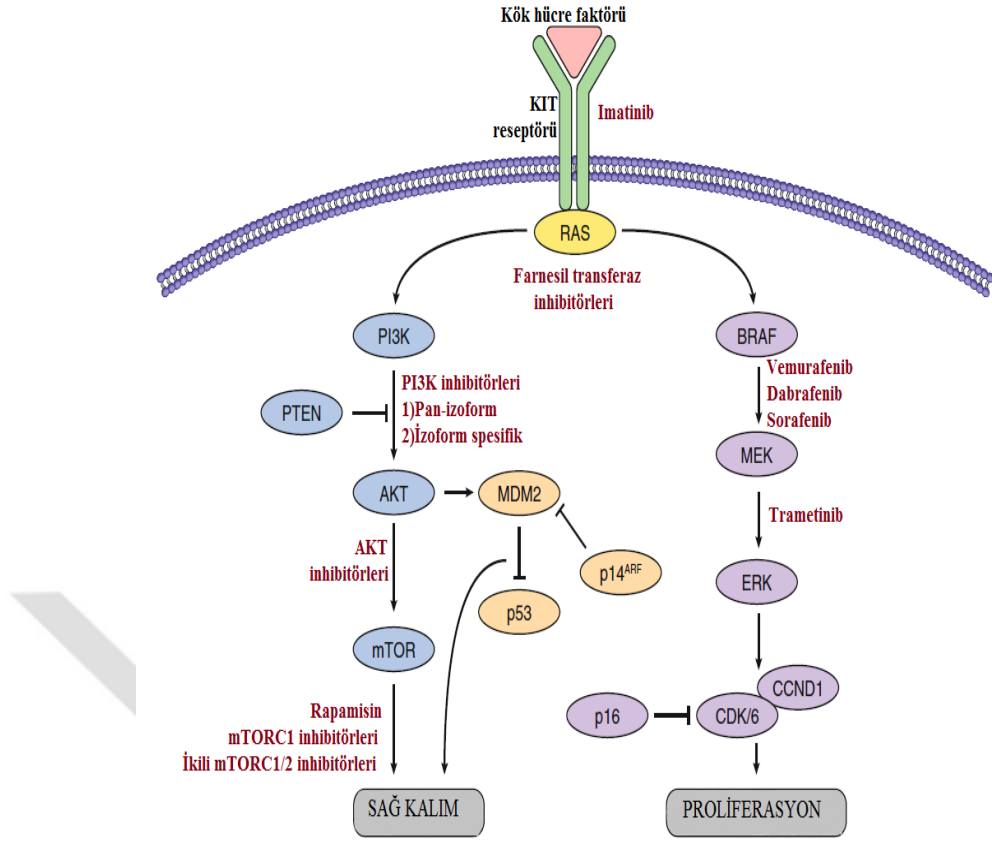
RAS proteinleri ayrıca PI3K/Akt yolağını aktive etme yeteneğine sahiptir (Russo ve ark 2009). Posch ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, hem MEK/ERK hem de PI3K/mTor yollarının, NRAS mutasyonları barındıran melanoma örneklerinin yaklaşık yarısında aktif olduğu gösterilmiştir (Posch ve ark 2013). Buna ek olarak, MEK ve PI3K yolağı inhibitörlerinin bir kombinasyonu, tek başına bir MEK inhibitörüne kıyasla, melanoma hücrelerinin büyümesini engellemiştir. Melanomada artmış fosfo-Akt ekspresyonu, tümör progresyonu ve daha kısa sağkalım ile ilişkilendirilmiştir (Dhawan ve ark 2002).

Melanomda BRAF ve NRAS mutasyonlarının karşılıklı olarak özel olaylar olduğu görülmektedir (Curtin ve ark 2005, Lewis ve ark 2005). Bu, MAPK yolağı herhangi bir mutasyonla yapısal olarak aktif hale geldiğinde, melanoma progresyonunun MAPK yolunun dışındaki diğer proteinlerdeki değişikliklere bağlı olduğunu düşündürmektedir (Torres-Cabala ve Curry 2016).

Melanomada PI3K-AKT Yolağı

Melanomun moleküler patogeneğinde çok sayıda sinyal yolağı vardır. En belirgin yolaklar ise RAS-RAF-MEK-ERK yolağı ve PI3K-AKT yolağıdır. BRAF/MEK'in hedeflenen inhibisyonu, *BRAF* V600 mutasyonu bulunan hastalarda iyileşmeye yol açarken, bu durumda terapötik direnç çoğu zaman nihai bir sonuçtur. PI3K-AKT yolağı, melanoma hastalarında BRAF/MEK inhibitör direncinde belirgin bir rol oynamaktadır ve kombinasyon tedavisi için kritik bir hedef olabilir (Torres-Cabala ve Curry 2016).

Melanoma, patogeneğinde kritik olan çeşitli sinyal yolakların aydınlatıldığı bir kanserdir. Melanomun hala geniş çapta bilinmeyen patolojik mekanizmaları bulunmasına rağmen, ortak moleküler yolaklardaki birden fazla genetik değişikliğin melanom patogeneğine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Palmieri ve ark 2009). Hücrel büyüme, çoğalma ve sağkalımı teşvik eden en yaygın yolaklar arasında, sinyal bileşenlerini terapötik ajanlar için cazip hedefler haline getiren RAS-RAF-MEK-ERK yolağı ve PI3K-AKT yolakları bulunmaktadır (Şekil 1.16) (Hocker ve ark 2008). Melanomda *BRAF*- ve *NRAS*- aktive edici mutasyonların yüksek frekansı, melanom patogeneğinde RAS-RAF-MEK-ERK yolağının rolünü kuvvetle desteklese de (Davies ve ark 2002, Hocker ve Tsao 2007), çok sayıda kanıtlanmış hatta, bu yolağın aktivasyonunun tek başına bu hastalığın patojenik oluşumunda eksik olduğunu göstermiştir (Pollock ve ark 2003, Patton ve ark 2005). PI3K-AKT yolağı normal hücrel fizyolojinin önemli bir düzenleyicisidir ve birçok kanser türünde yüksek frekans ile aktive olduğu gözlemlenmiştir (Vivanco ve Sawyers 2002, Yuan ve Cantley 2008). *PIK3CA* ve *AKT*'de nadir görülen mutasyonlar ile birlikte PTEN fonksiyon kaybının, özellikle melanomda PI3K-AKT yolağını aktive ettiği gösterilmiştir (Zhou ve ark 2000, Curtin ve ark 2006, Mirmohammadsadeh ve ark 2006, Omholt ve ark 2006, Davies ve ark 2008, Aguisa-Touré ve Li 2012). Dahası, çok sayıda kanıt çifti, PI3K-AKT yolağının BRAF-/MEK- inhibitör direncinde önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir (Gopal ve ark 2010, Villanueva ve ark 2010, Paraiso ve ark 2011, Shi ve ark 2011, Xing ve ark 2011, Straussman ve ark 2012, Wilson ve ark 2012, Abel ve ark 2013, Fattore ve ark 2013, Nathanson ve ark 2013, Trunzer ve ark 2013, Shi ve ark 2014, Van Allen ve ark 2014)

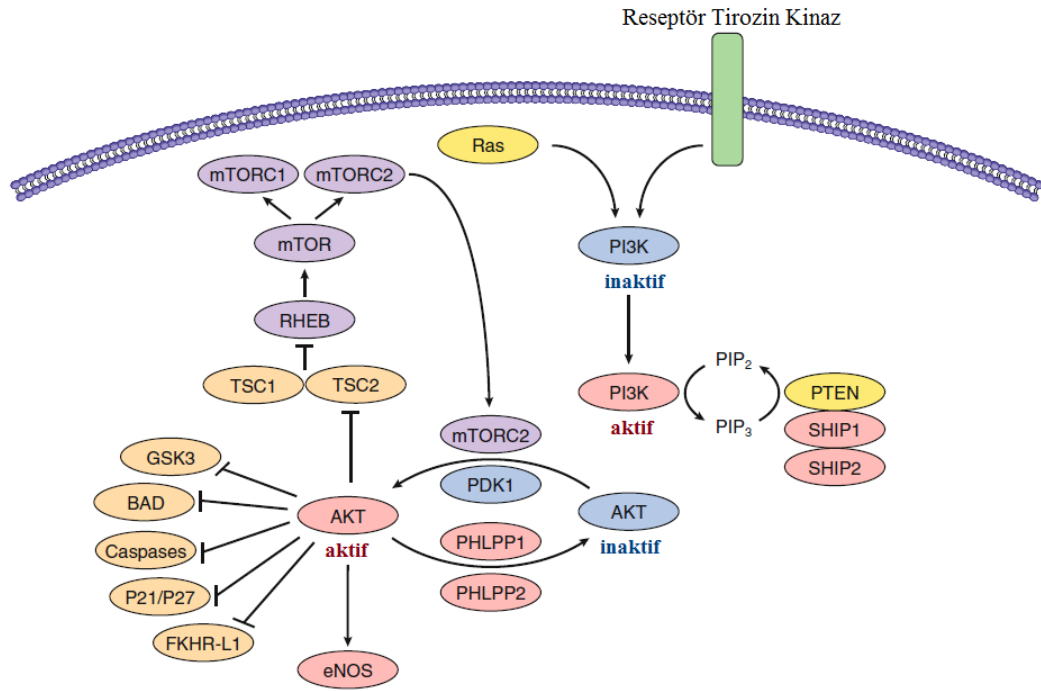


Şekil 1.16. Melanomada yaygın sinyal yolları. PI3K-AKT yolağı öncelikli olarak hücre sağ kalımının düzenlenmesinde rol oynar, buna karşılık RAS-RAF-MEK-ERK yolağı da hücresel proliferasyonu düzenler. Potansiyel terapötik hedefler, RAS-RAF-MEK-ERK ve PI3K-AKT yollarının yanı sıra reseptör tirozin kinazların bileşenlerini içerir (Burada KIT reseptörü olarak prototip edilmiştir) (Torres-Cabala ve Curry 2016).

PI3K-AKT Yolağının Hücresel Fizyolojide Normal Fonksiyonu

PI3K-AKT sinyal yolağı, normal fizyolojik koşullar altında birçok hücre tipi tarafından geniş ölçüde kullanılmaktadır ve hücresel bağlama dayanarak, hücresel çoğalmayı, hayatta kalmayı, büyümeyi, protein sentezini, metabolizmayı ve hareketliliği düzenlemekte önemlidir (Cantley 2002, Yap ve ark 2008). Yolağın ana düzenleyici proteini olan PI3K, her birinin birden fazla izoformu (PIK3CA, PIK3CB, PIK3CD,vb) olan düzenleyici alt birim (PIK3R, p85) ve katalitik alt birimden (PIK3C, p110) oluşan bir lipit kinazdır (Davies 2012). PIK3CB, yolağın aktivasyonu ile özellikle *PTEN* fonksiyon kaybı olan hastalarda, PIK3C'nin diğer izoformlara göre, hücre sinyalleme, büyüme ve hayatta kalma ile daha fazla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Jia ve ark 2008, Wee ve ark 2008). PI3K, reseptör tirozin kinazlar ve

aktive edilmiş RAS proteinleri tarafından aktive edilebilir (Şekil 1.17). Bu aktivasyon sonucunda fosfatidilinositoller (PIPs), 3'hidroksil bölgelerinde PI3K ile fosforile edilir, fosfatidilinositol difosfat (PIP2) ve fosfatidilinositol trifosfat (PIP3) üretir. Ortaya çıkan PIP3, PH-domain içeren AKT'yi, sırasıyla mTORC2 kompleksi ve PDK1 tarafından Ser473 ve Thr308 kalıntılarında fosforilasyon için, hücre membranına dahil edilmek üzere yüksek afiniteli bir bağlanma ligandı olarak görev yapmaktadır (Yap ve ark 2008, Davies ve Gershenwald 2011). Aktifleştirilmiş AKT, hücre büyümesi, sağkalım ve hücre döngüsü girişini etkileyen fosforilasyon ile protein hedeflerinin çoğunun aktivitesini inhibe eder (Cantley 2002). FKHR-L1'in aktif AKT ile fosforilasyonu, faktörün 14-3-3 protein ailesi ile bağlanmasını hızlandırır, böylece sitozolik alıkoyma gerçekleştirilir ve apoptozdan sorumlu Fas ligandı genlerinin transkripsiyonu önlenir. AKT benzer şekilde BAD'ı 14-3-3 proteinleri ile fosforilasyon yoluyla birleştirerek BAD proteininin Bcl-2 ve Bcl-XL'e bağlanmasını engeller, bu da apoptozu inhibe eder ve hücre sağ kalımını artırır (Brunet ve ark 2001). Yapısal olarak aktif protein kinaz GSK3, aktive edilmiş AKT tarafından fosforilasyon ile engellenir, sonuç olarak siklin D1'in kendi inhibitör fosforilasyonu önlenerek hücresel çoğalma teşvik edilir (Cantley 2002, Yap ve ark 2008). AKT ayrıca, hücre sağ kalımı, büyüme ve metabolizmanın bir düzenleyicisi olan mTOR'un aktivasyonunu kolaylaştıran TSC2'yi fosforilatlar ve inhibe eder (Sarbasov ve ark 2005, Yecies ve Manning 2011). AKT'nin yeniden iyileştirilmesi ile PIP3, Rac ve ARF6 için GDP-GTP değişim faktörleri gibi diğer PH-domaini içeren proteinleri iyileştirme ve aktive etme yeteneğini gösterir. AKT ve PIP3'ün her ikisi de yönlendirilmiş hücre hareketliliği için aktin sitoskeletonunun yeniden modellenmesine katılır (Cantley 2002). Ayrıca Tec ailesinin protein kinazları da PIP3 tarafından aktive edilir. Bu durum, sitozolik kalsiyum konsantrasyonlarının düzenlenmesi ve gen ekspresyonundaki değişiklikler ile sonuçlanır (Cantley 2002).



Şekil 1.17. Ana aktive ediciler, düzenleyiciler ve efektörler de dahil olmak üzere PI3K-AKT sinyal yolağına genel bakış (Torres-Cabala ve Curry 2016).

Melanomada PI3K-AKT Yolağıının Aktivasyonu

PI3K-AKT yolağıının melanomada aktive edildiğı çeşitli mekanizmalar mevcuttur. Bu mekanizmalardan biri *PTEN*'in işlev kaybını içerir. *PTEN*, PI3K-AKT yolağıının önemli bir düzenleyici fosfatazıdır ve bu yolak üzerinde PIP3'ün defosforilasyonu yoluyla yolağıın aktivitesini düşürür. *PTEN*'in ekspresyonu ve fonksiyonu bozulursa, PI3K-AKT yolağı aktive olur (Torres-Cabala ve Curry 2016). *PTEN* genindeki yanlış anlamlı mutasyonlar, çerçeve kayması mutasyonları ve/veya delesyonlar, *PTEN*'in fonksiyon kaybı ve aynı zamanda protein ürününün yetersizliği ve işlevsel olmayan fosfataz aktivitesi ile sonuçlanır (Aguissa-Touré ve Li 2012). Mutasyonların ve delesyonların yanı sıra, epigenetik mekanizmalar nedeniyle de *PTEN*'in fonksiyon kaybedebileceğine dair de kanıtlar vardır (örneğin, mikroRNA'lar, promotor metilasyonu gibi) (Zhou ve ark 2000, Mirmohammadsadeh ve ark 2006). P-REX2a gibi antagonize edici değişim proteinleri ile *PTEN* etkileşimlerinin fosfataz aktivitesinin inhibisyonu yoluyla, *PTEN* işlevselliğinin epigenetik olarak etkilendiğı gösterilmiştir (Fine ve ark 2009). *PTEN* işlev kaybının, çoklu tümör tiplerinde AKT'nin artmış aktivitesi ile korelasyon

gösterdiği ve metastatik melanom vakalarında yüksek düzeyde fosforile olmuş AKT'nin de spesifik olarak varlığı rapor edilmiştir (Davies ve ark 2009).

Melanomlardaki PTEN'in genetik değişiklikleri, NRAS mutasyonlarının da aktive edilmesiyle dolaylı olarak PI3K-AKT yolağını etkiler. Bununla birlikte, muhtemelen PI3K-AKT ve RAS-RAF-MEK-ERK yolaklarının harekete geçirilmesinin tamamlayıcı niteliklerinden dolayı PTEN işlevinin kaybedilmesi ve BRAF mutasyonlarının aktive edilmesi arasında kuvvetli bir ilişki vardır (Tsao ve ark 2004, Goel ve ark 2006). İlginç bir şekilde, genetik olarak tasarlanmış fare modellerini içeren prelinik çalışmalar, PTEN'in kaybının hem BRAF-mutant hem de NRAS-mutant melanomların invazivliğini ve metastatik potansiyelini arttırdığını göstermiştir, ancak bu ikili kombinasyon insan melanomunda seyrek görülür (Dankort ve ark 2009, Nogueira ve ark 2010). Dankort ve ark. yaptığı bir çalışmada, melanositlerde BRAF V600E mutasyonunun indüksiyonunun sadece melanositik hiperplaziye neden olduğunu belirtmişlerdir (Dankort ve ark 2009). Bununla birlikte, PTEN kaybının eşzamanlı indüksiyonu ile hem RAS-RAF-MEK-ERK hem de PI3K-AKT yolaklarının birlikte harekete geçirilmesi, invaziv/metastatik melanoma ile sonuçlanmıştır. Benzer şekilde, Nogueira ve ark. RAS mutasyonu olan farelerde PTEN işlev kaybının melanom invazyon ve göçünü arttırdığını bulmuşlardır (Nogueira ve ark 2010). Böylece PTEN fonksiyon kaybı, özellikle melanomda invazivlik ve metastatik potansiyelde bir artış ile ilişkilendirilmiştir (Torres-Cabala ve Curry 2016).

Her ne kadar PTEN'in kaybı daha sık çalışılan mekanizmalardan biri olsa da PI3K-AKT yolağının aktivasyonu da melanomaya katkı sağlamaktadır. NRAS'daki nokta mutasyonlarının aktive edilmesi melanomların %20'sinde ortaya çıkar ve PI3K-AKT yolağı da dahil olmak üzere yapısal NRAS aracılı sinyalleşme çoklu yolakların aktivasyonu ile sonuçlanır (Hocker ve Tsao 2007). PI3K'nın katalitik altbirimini kodlayan PIK3CA genindeki spesifik nokta mutasyonları melanomlarda %3-5 prevalansla oldukça nadir görülür (Curtin ve ark 2006, Omholt ve ark 2006, Hodis ve ark 2012). AKT1 VE AKT3'teki nokta mutasyonları da oldukça nadirdir ve sırasıyla yaklaşık %1 ve %1,5 oranında melanomlarda gözlemlendiği saptanmıştır (Davies ve ark 2008, Davies 2012). NRAS'a benzer şekilde, reseptör tirozin kinazların (KIT, EGFR, HER2/neu gibi) aktive edici mutasyonları ve amplifikasyonları, PI3K-AKT ve ERK yolakları da dahil olmak üzere birçok farklı

aşağı akış yolağının aktivasyonu ile sonuçlanır. *KIT* genine özgü mutasyonların ve amplifikasyonların kutanöz melanomlara karşı (yaklaşık %1) mukozal (%20-30) ve akral (%10-15) tipte melanomları içerdiği gösterilmiştir (Woodman ve Davies 2010). Melanomların yaklaşık %19'unda ERBB4'ün somatik mutasyonları tespit edilmiş olup, yanlış anlamli mutasyonları artmış kinaz aktivitesiyle sonuçlanmıştır, ancak bu mutasyonların anlamlılığı belirsizdir ve halen tartışılmaktadır (Prickett ve ark 2009). Sonuç olarak, melanomda PI3K-AKT yolağının aktivasyonu, PTEN, NRAS, PIK3CA, AKT ve reseptör tirozin kinazları içeren çeşitli genetik ve epigenetik mekanizmalar yoluyla düzenlenmektedir.

Sonuç olarak cilt kanserlerinin genetik ile yakından ilişkili olduğu birçok yolak analizi ile doğrulanmıştır. Bazı prelinik ve klinik çalışmalarda cilt kanseri ilaçlarının etkinliği doğrulansa da, bazı cilt kanseri türlerinde özellikle de malign melanomalarda ilaç tedavisi yetersiz kalabilmektedir. Bu yüzden genetik temelli araştırmalar gün geçtikçe önem kazanmaktadır. Son yıllarda ise güçlü genom düzenleme tekniklerinden biri olan CRISPR/Cas9 teknolojisi, etkili bir mutasyon tamir tekniği olarak karşımıza çıkmaktadır.

1.3.CRISPR/Cas9 Teknolojisi

1.3.1.CRISPR Genom Düzenleme Devrimi

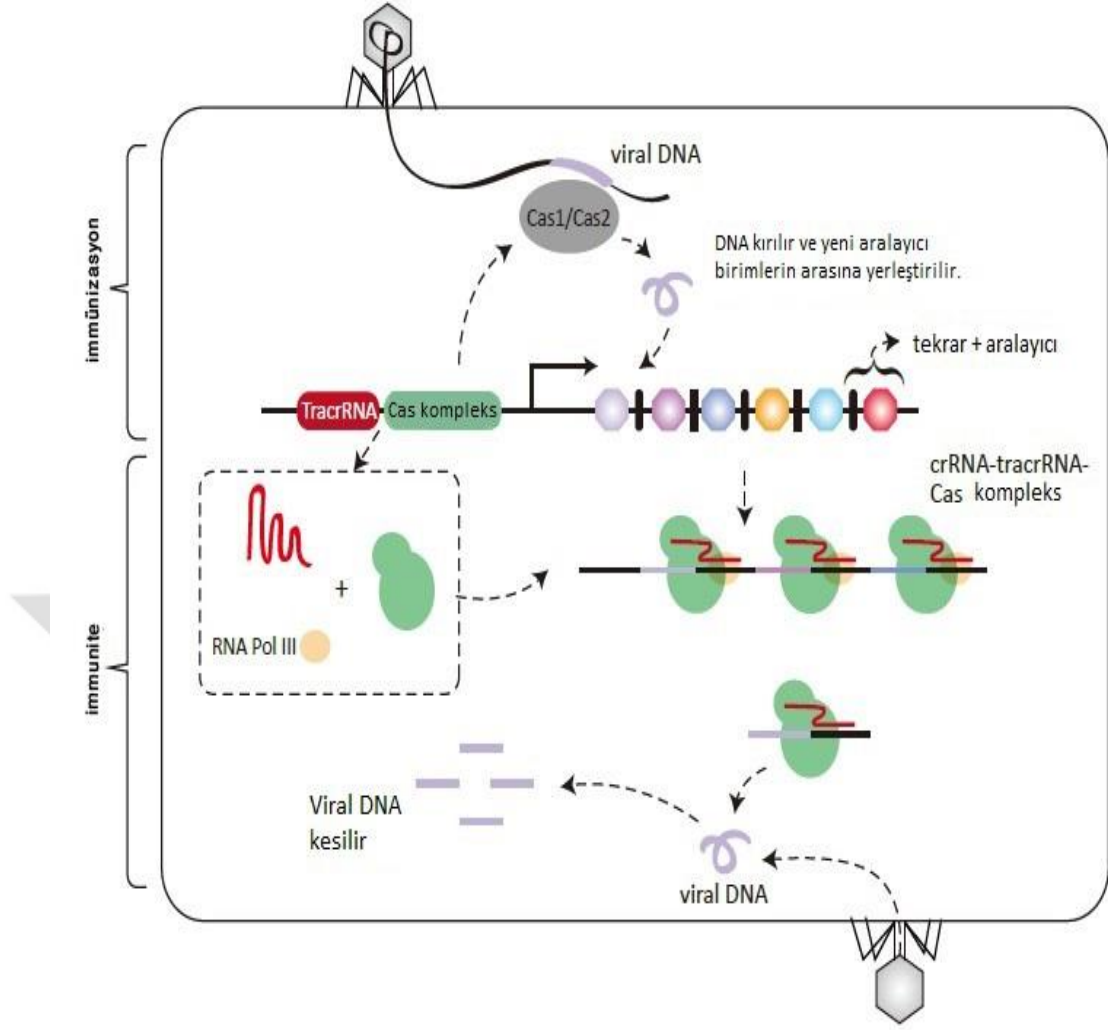
1970'lerde rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesi, biyoloji ve tıp için yeni bir dönemin başlangıcı olmuştur. İlk defa moleküler biyologların DNA moleküllerini manipüle edebilmesiyle mümkün genler çalışılmaya başlanmış ve bu sayede tıp ve biyoteknoloji gibi alanlarda önemli gelişmeler kat edilmiştir. Genom mühendislik teknolojilerindeki son gelişmeler biyolojik araştırmalarda yeni bir devrime yol açmıştır. Çünkü genom düzenleme canlı hücrelerin bile genomunda hedef bölgelerin değiştirilmesini mümkün kılmıştır (Hsu ve ark 2014).

Bakterilerin Bağışıklık Sisteminde CRISPR Keşfi

Geçtiğimiz 10 yıl boyunca, enfeksiyonu önlemek için yeni bir bakteri bağışıklık sistemi keşfedilmiştir. Bu bağışıklık sistemi yabancı DNA 'nın bakteri genomuna girmesini engeller ve aynı zamanda hedef DNA 'yı imha edebilmeyi sağlar (Horvath ve Barrangou 2010).

Bu sistem ilk defa 1987 yılında gün ışığına çıkarılmıştır. Nakata ve arkadaşları *iap* enzimi ile çalışmalar yaparken, *iap* geninin aşağı bölgesinde ilginç bir şekilde tekrar eden ve tekrar etmeyen dizilere rastlamışlardır (Ishino ve ark 1987). Bundan sadece 5 yıl sonra bu tekrar dizileri artık CRISPR (düzenli kümelenmiş aralayıcı kısa palindromik tekrar dizileri) olarak anılmaya başlanmıştı fakat işlevleri bilinmiyordu. 2005 yılında Mojica ve arkadaşları bu dizilerin ya da "aralayıcıların" aslında bakteriyofaj DNA 'sında olduğunu ortaya koydu (Mojica ve ark 2005). Kısaca bu keşiften sonra Bolotin ve ark, CRISPR yapılarının yakınında DNA tarafından endonükleaz kodlayan *Cas* genlerinin varlığını gözledi (Bolotin ve ark 2005). Bu durum CRISPR/Cas 'ın birincil işlevinin yabancı DNA'nın degradesyonu olabileceği ihtimalini düşündürdü. Yabancı bir DNA için bu sistemin özgülüğü, bundan başka genom içinde korunan motiflerin keşfi ile birkaç yıl sonra aydınlatılmıştır. Hemen yukarı bölgedeki "protospacer'lar" ya da yabancı DNA 'daki hedef diziler korunmuştur ve bunlar protospacer ilişkili motif (PAM) olarak adlandırılırlar. Bu motifler *Cas* endonükleazların tercih ettiği hedeflerdir (Deveau ve ark 2008, Horvath ve ark 2008) ve sistem bununla kendi DNA 'sı ve yabancı DNA arasında ayrımı sağlar (Mali ve ark 2013). 2000'li yılların sonuna gelindiğinde ise tüm bu çalışmaların ışığında CRISPR 'ın önemi daha da artmıştır.

2010 yılına kadar, bakterilerde üç CRISPR sistemi tespit edilmiştir: Tip I, II ve III. Tip II CRISPR sistemi basit ve uygulanabilirliği diğerlerine göre daha kolay olduğundan, memeli hücrelerinde genom düzenleme için en çok tercih edilen sistem olarak karşımıza çıkmaktadır (Sapranauskas ve ark 2011) (Şekil 1.1). CRISPR 'a dayalı bağışıklık iki temel aşamadan oluşmaktadır: bağışıklık kazanma ve bağışıklık. Bağışıklık kazanma aşamasında *Cas* proteinleri (*Cas1/Cas2*) bir kompleks oluşturur ve yabancı, viral DNA 'yı keser (Jiang ve ark 2015). Bu yabancı DNA daha sonra tekrarlayan aralayıcı birim olarak bakteriyel CRISPR lokuslarına dahil edilir. Yeniden enfeksiyonu takiben bağışıklık aşamasında, tekrarlayan aralayıcı birimler CRISPR RNA (pre-crRNA) oluşturmak için transkripsiyon gerçekleştirir. *Cas9* endonükleaz ve trans-aktive edici crRNA (tracrRNA, crRNA klavuzluğu için *Cas9*'a yardım eder) ilgili bölgeye bağlandıktan sonra crRNA bağlanır. Olgun crRNA-*Cas9*-tracrRNA kompleksi oluştuğundan sonra, RNA polimeraz tarafından parçalanır. Bu crRNA-*Cas9*-tracrRNA kompleksi yabancı hedef DNA 'nın tanınip yok edilmesi için gereklidir.

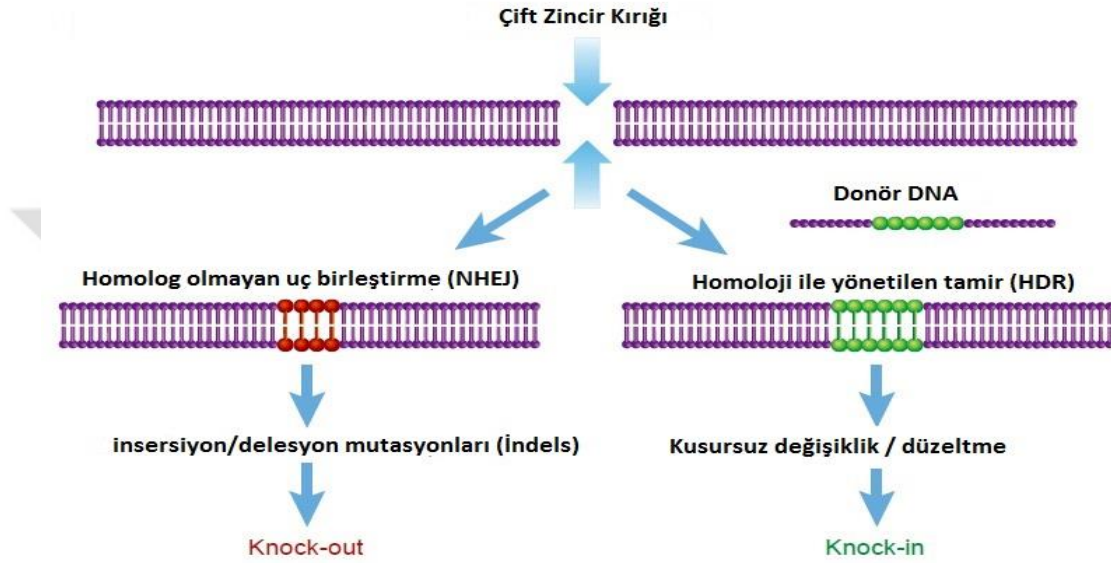


Şekil 1.18. Bakterilerde CRISPR- aracılı immünitinin mekanizması

Genom Düzenleme Teknolojisinin Evrimi

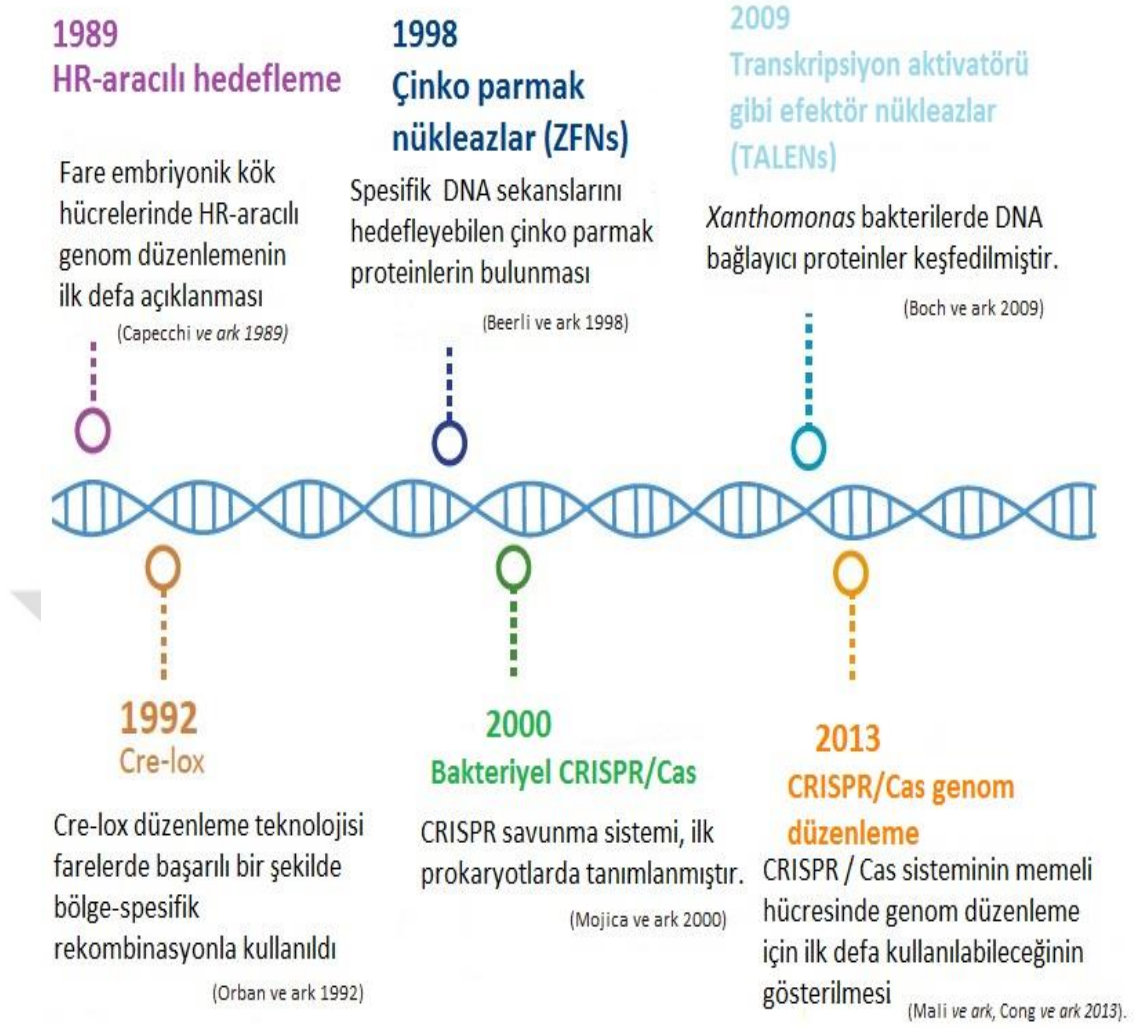
2000 'lerin başında "genom düzenleme" kavramı ortaya çıktıktan sonra, çalışmalar transgenez ile sınırlı kaldı. Genom düzenleme kavramı 1980 'lerin sonlarında başladı: 1989 yılında, homolog rekombinasyon (HR) yoluyla, fare embriyonik kök hücrelerinde belli hedef genler üzerinde knock-out ve knock-in çalışmaları yapılmıştır (Capecchi 1989) (Şekil 1.2). HR 'nin memeli hücrelerinde oldukça seyrek görülmesinden ötürü, rekombinasyon frekansı düşüktür (her 3×10^4 hücrede 1) ; ancak bu çalışma hedef genlerin belli şekillerde değiştirilebileceğini göstermiştir. Bazı hayvan hastalık modellerinde bu durum yetersiz kalınca, karmaşık ve daha verimli genom düzenleme araçlarına ihtiyaç duyulmuştur. Cre-lox teknolojisi, 1990 'ların başında en etkili gen düzenleme araçlarından biri haline gelmiştir çünkü bilim insanları hem zamansal hem de mekânsal olarak gen

ekspresyonunu kontrol etmeyi amaçlamışlardır (Orban ve ark 1992, Utomo ve ark 1999). Cre lox, loxP denilen 34 bazlık bir lokusu tanıyan ve bölgeye spesifik bir endonükleaz olan Cre enzimini kullanır (Sauer 1998). Bu bölgelerde rekombinasyon istenilen genlerin knock-out edilmesini sağlar ve bu durum özellikle transgenik farelerin gelişimi için yararlı olmuştur. HR 'u kontrol etmek daha kolay olsa da, Cre-lox sistemi loxP bölgeleri arasında genetik mesafe arttıkça etkinliğini yitirmiştir (Zhang ve Quan 2000).



Şekil 1.19. Hedeflenmiş genom düzenleme ile DNA tamiri

Memeli hücrelerinde HR ile gen entegrasyonu nadir sonuçlandığından, genomda çift zincir kırıkları (DSB) önemli ölçüde rekombinasyonu artırabilir (Chouluka ve ark 1995). DSB sonucunda, HDR ya da hata eğilimli homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) oluşumu gerçekleşir. Alternatif olarak, eğer verici DNA dizileri mevcutsa, çift zincir kırıkları knock-in ile sonuçlandırılan HDR ile tamir edilir (Bibikova ve ark 2002). Tüm bu stratejiler, ökaryot genomunu değiştirmek için yeni ve daha etkili yaklaşımların olduğunu göstermiştir.

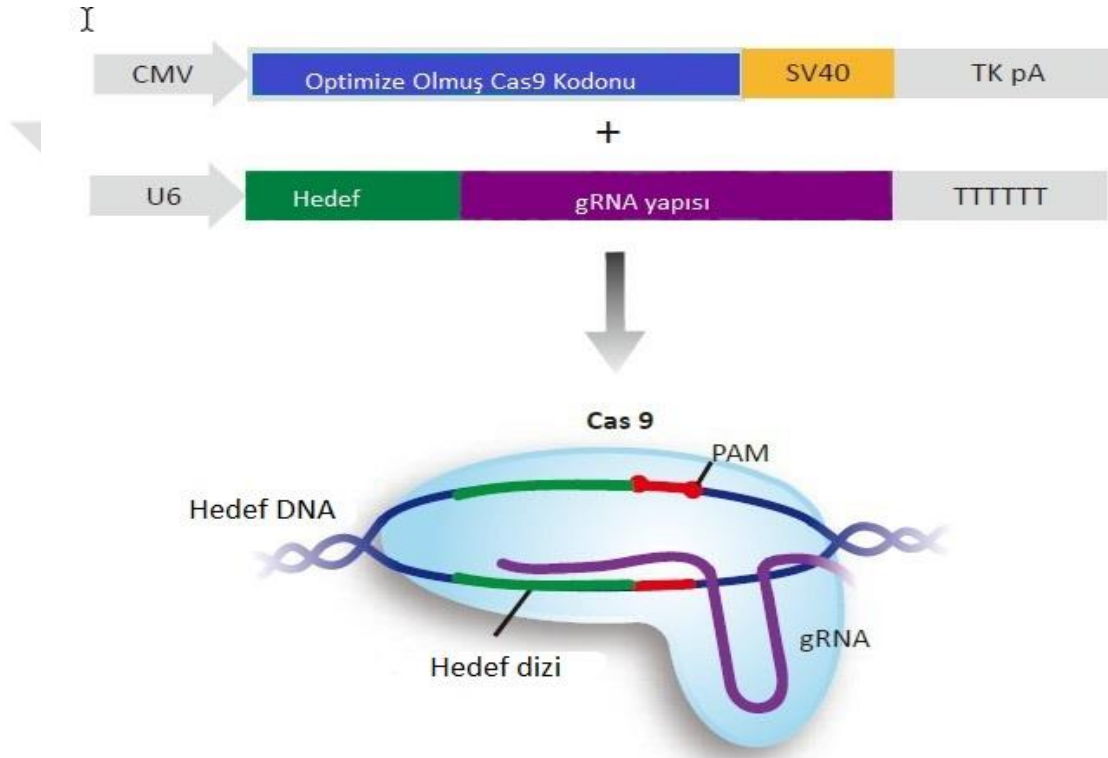


Şekil 1.20. Genom düzenleme alanındaki gelişmeler

CRISPR 'dan ziyade, çift zincir kırıkları aracılı tamir sistemi kullanılarak daha etkili genom düzenleme teknikleri de vardır : çinko parmak domainleri (ZF) (Beerli ve ark 1998) ve transkripsiyon aktivatörü gibi efektörler (TALENs) (Boch ve ark 2009, Moscou ve Bogdanove 2009). Bu sistemlerin ikisi de, DNA bağlayıcı proteinler ve nükleaz aktivitesini kullanarak, bölgeye spesifik çift zincir kırıkları oluşturabilirler. Bu etkili yöntemlerin ikisi de protein mühendisliği kapsamında geniş uzmanlık gerektirmiş ve çoğu laboratuvarında kullanımının zor olması araştırmacıları sıkıntıya düşürmüştür (Perez-Pinera ve ark 2013).

2013 yılında, CRISPR/Cas9 genom düzenleme aracı olarak kullanılmaya başlanmıştır. *S.thermophilus* ve *S.pyogenes* (SpCas) 'de tip II CRISPR 'ın gözlenmesi bu olgunun, memeli genom düzenlemesi için kullanılabileceği fikrini doğurdu (Cong

ve ark 2013, Mali ve ark 2013). Diğer memeli hücrelerinde de bu sistemi uyarlamak için, iki ayrı vektör sistemi optimize edilmiştir (Mali ve ark 2013). Sistemin iki temel bileşeni Cas9 endonükleaz ve crRNA-tracrRNA kompleksidir, bu kompleks birlikte ifade edildiğinde hedef DNA sekansı üzerinde etkilidir. Bileşenlerden crRNA ve tracrRNA kimerik bir formda kılavuz RNA (gRNA) oluştururlar ve hedef genler için Cas9 da sisteme dahil olur (Jinek ve ark 2012). Bu bileşenlerin daha sonra transfeksiyon veya lentiviral transdüksiyon ile memeli hücrelerine verilmesi mümkündür.



Şekil 1.21. Memeli hücrelerinde genom düzenleme için CRISPR / Cas sistemi

CRISPR Genom Düzenleme Aracının Avantajları

CRISPR 'ın birçok laboratuvarında kolayca denenebilir olması ve memeli hücreleri için uyarlanabilmesi genom düzenlemede devrim yaratmıştır. CRISPR/Cas9 'un aksine ZF ve TALE nükleazlar hedef alınan her gen için protein mühendisliği gerektirir. Hâlbuki CRISPR sistemi sadece birkaç basit DNA bileşenini gerektirir: gRNA, Cas9 ve eğer ilgili bölgeye knock-in yapılacaksa HR için donör DNA dizileri. Buna ek olarak CRISPR sistemi kullanılarak birden fazla gen aynı anda düzenlenebilir.

Çizelge 1.4. TALENs, ZFNs ve CRISPR / Cas arasındaki önemli farklar

	TALEN (transkripsiyon aktivatör benzeri effektör nükleazlar)	ZFN (çinko parmak nükleazlar)	CRISPR/Cas
Hedef	Protein: DNA	Protein: DNA	(gRNA-Cas9): DNA
Yapı	DNA bağlayıcı domainleri içeren proteinler spesifik DNA dizilerini tanır.	$\beta\beta\alpha$ konfigürasyonunda olan çinko parmak DNA bağlama motifleri, DNA'daki 3 bazlık α -sarmal segmentleri tanır.	20 nt 'lik crRNA ile kaynaşmış tracrRNA ve Cas9, DNA dizilerindeki spesifik bazları tanır.
Dizayn	Zor: -Her gen dizisi için özel bir proteine ihtiyaç vardır. -Uygulama verimi ve etkinlik düşüktür.		Kolay: -gRNA ve Cas9 vektör sistemi hepsi bir arada bulunur. -Çok sayıda gen düzenleme mümkündür.

(Beerli ve ark 1998, Boch ve ark 2009, Moscou ve Bogdanove 2009, Cong ve ark 2013, Gaj ve ark 2013, Mali ve ark 2013, Perez-Pinera ve ark 2013, Jiang ve ark 2015)

CRISPR Genom Düzenleme Özgünlüğünün Geliştirilmesi

Birkaç sistematik çalışma deneysel olarak gRNA verimliliğini ve özgüllüğünü yöneten kuralları belirlemek için gerçekleştirilmiştir. Bir çalışmada 6 fare ve 3 insan geni üzerinde (toplamda 1841 sgRNA kullanılarak) tüm olası hedeflenebilir bölgelere bakılmış, antikor boyama ve akış sitometri kullanılarak analiz edilmiştir. Sonuçlar gen düzenlemenin ve sgRNA 'nın geliştirilmesi için bir model olarak kullanılmıştır (Doench ve ark 2014). Artık günümüzde birçok gRNA dizayn aracı vardır örneğin; <http://www.broadinstitute.org/rnai/public/analysis->

tools/sgRNA-design adresi üzerinden istediğiniz hedef gen bölgesi için en uygun skorlu gRNA 'yı seçebilirsiniz.

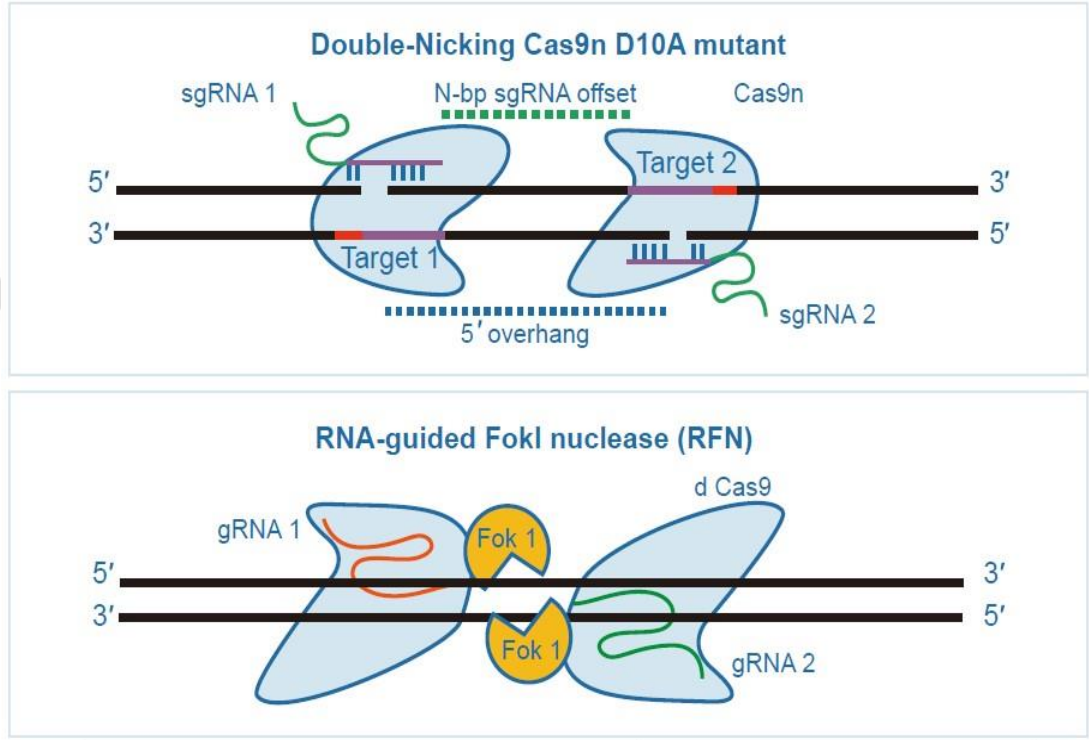
Daha yakın tarihli bir çalışmada, ~1400 genomik lokus için farklı insan hücre tiplerinde, iki farklı Cas9 (*S. Pyogenes* ve *S. Thermophilus*) ve PAM dizileri kullanılarak gerçekleştirildi; bu çalışmada sadece nükleotid dizileri değil, aynı zamanda epigenetik olarak da gRNA verimliliği değerlendirildi (Chari ve ark 2015). Bu sonuçlar güçlü ve interaktif bir araç olarak düzenlendi ve <http://crispr.med.harvard.edu/sgRNAScorer> adresi üzerinden erişime açık hale getirildi.

20 nükleotit uzunluğundaki gRNA dizisi genom boyunda nadir olarak birden fazla bölgeyle %100 homoloji gösterebilir. sgRNA-Cas9 kompleksleri hedef içinde yanlış eşleşmeleri tolere edebilir. Cas9, rehberi ile bir uyumsuzluk halinde olsa bile genom boyunca birçok farklı yere bağlanabilir fakat enzim sadece rehberi ile uyumlu olduğu bölgelerde çift zincir kırıkları yaratır (Kuscu ve ark 2014). Yine gRNA üzerinde 5 ya da daha fazla eşleşmeyen bölge olduğunda da çift zincir kırıklarına rastlanmıştır (Tsai ve ark 2015). Bu nedenle, modifiye CRISPR/Cas9 sistemlerinin spesivitesini artırmaya yönelik çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır.

gRNA/Cas9 'un hedef bölgeye özgüllüğünü artırmanın bir diğer yolu da yakın hedef bölgeler için bir çift gRNA dizayn etmektir. Feng Zhang ve Keith Joung 'un laboratuvarlarında bu stratejiyi geliştirilmeye dair çalışmalar yapılmıştır. Zhang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda, RuvC 'nin katalitik domaininde aspartattan alenine kadar (D10A), Cas9n 'un çift zincir kırıkları yerine tek zincir kırıkları meydana getirdiğini gözlemlemişlerdir. Yakın mesafedeki iki lokus nikaz mutant Cas9 (Cas9n) ile hedeflenebilir fakat Cas9n etkili bir şekilde çentik (nick) yerine tek zincir DNA kırıklarına sebep olur. Uygun şekilde gRNA çiftleri Cas9n 'e rehberlik eder, aynı zamanda hedef lokusta çift zincir kırıkları oluşmasına yardım eder. Bu yüzden hedef bölgeyi tanıma özgüllüğünü artırır. Her gRNA hedef dışı bölgelere de bağlanma eğiliminde olabilir, ancak genom boyunca Cas9n bu yerlerde sadece tek zincir kırıklarına neden olur. Tek zincir kırıkları tercihen NHEJ yerine indel mutasyon sıklığını azaltan HDR ile onarılır.

Başka bir strateji ise spesifiteyi artırmak için gRNA üzerine odaklanmıştır. 20 nükleotitlik bölgeler başlangıçta kullanılmasına rağmen, yanlış eşleşmeler 3' uçta sıklıkla tolere edilmektedir. Joung 'un laboratuvarındaki araştırmacılar 17 veya 18

nükleotidlik gRNA 'ları tamamlayıcılık yönünden yeterli bulmuş ve hedef bölgeleri NHEJ veya HDR vasıtasıyla yapılan tamir sonrasında mutajenik etkileri azalttığını gözlemlemişlerdir (Fu ve ark 2014). Bu kesilmiş gRNA 'lar (tru-gRNA), WT SpCas9 ya da RNA-FokI nükleaz ile farklı kombinasyonlarda kullanılabilir (Wyvekens ve ark 2015).

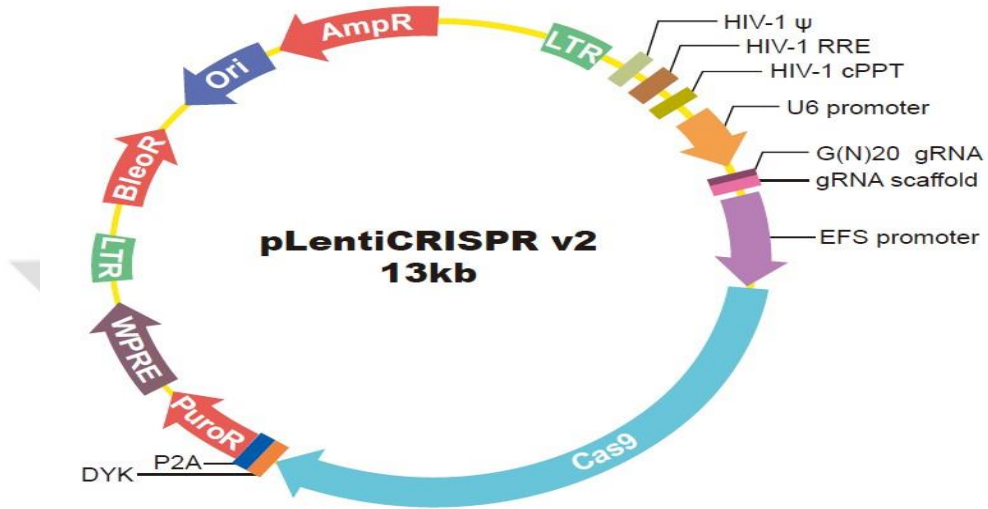


Şekil 1.22. Nikaz ya da RFN aracılığıyla spesivitenin artırılması

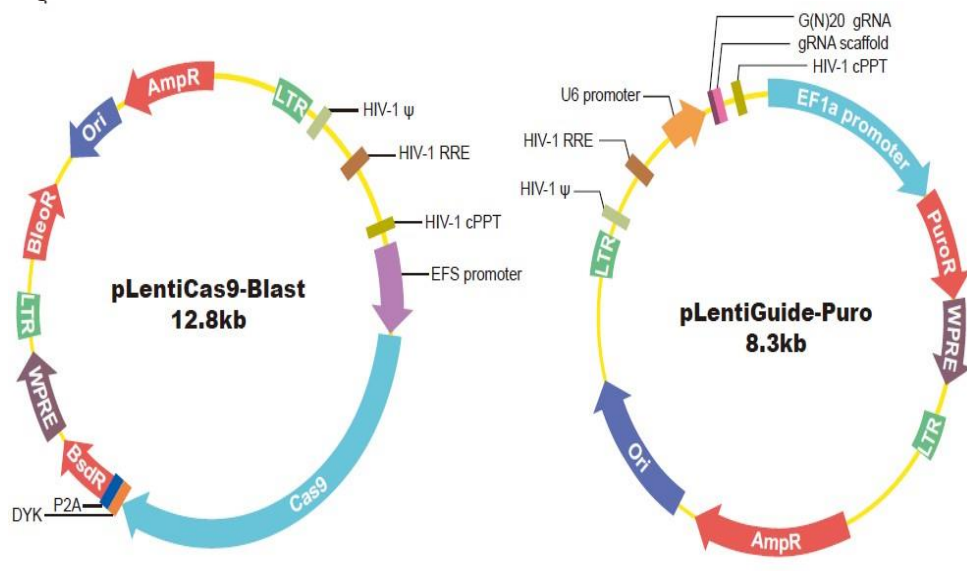
Cas9 'un genomda hedef dışı bölgelere bağlanmasının konsantrasyonla bağımlı olduğu gözlenmiştir (Wu ve ark 2014). Saflaştırılan Cas9 proteinini, bir ribonükleoprotein (RNP) oluşturulması için *in vitro* olarak gRNA ile kompleks oluşturabilir ve kromozomal DNA parçalara ayrıldıktan hemen sonra hücreler hızlıca bozulabilir, hedef dışı etkiler azaltılabilir. RNP 'ler etkin insan fibroblast ve pluripotent kök hücreleri gibi zor transfekte edilen hücrelere verilebilir. Bir başka avantajlı durum ise, RNP 'lerin aktarılmasında plazmid transfeksiyonu ile hücreler daha az stresli hale getirilebilir (Kim ve ark 2014).

gRNA & Cas9 Teslim Verimliliğinin Artırılması

Biyomedikal araştırmalar için en yaygın kullanılan model sistemlerden bazıları, primer memeli hücre kültürleri ya da zor transfekte olan hücre hatlarıdır; lipofeksiyon veya elektroporasyon yoluyla transfeksiyon verimi oldukça düşebilir. Lentiviral vektörleri bu hücre tipleri için tercih edilmektedir (Şekil 1.6).



Şekil 1.23. LentiCRISPRv2 bir arada vektör sistemi, hücre hatlarında kararlı Cas9 ekspresyonu oluşturmadan herhangi bir hücre tipinde CRISPR ile gen düzenlemeyi sağlar.



Şekil 1.24. İkili vektör sistemi, pLentiCas9-Blast ve takiben pLentiGuide-Puro 'nun ardışık transdüksiyonu gerçekleştirildiğinde, LentiCRISPRv2 'ye göre 10 kat daha yüksek verim gösterdiği tespit edilmiştir.

CRISPR/Cas9 sisteminin bileşenleri *in vivo* ortamda, modifiye edilmiş viral vektörler ya da herhangi bir sayıda viral olmayan ilaç teslim sistemleri kullanılarak aktarılabilir. Modifiye edilmiş rekombinant adeno-bağlantılı virüsü (rAAV) parçacıkları, *in vivo* gen sağlanması için tercih edilen bir araçtır fakat SpCas9 gen büyüklüğü >4 kb olduğu için AAV vektörlerinin tipik olarak taşıyabileceği yük sınırını aşmaktadır. Bu duruma bugüne kadar geliştirilen çözümler şunlardır:

- Cas9 ifade eden transgenik hayvan hatları oluşturmak için, yapısal ya da uyarılabilir bir şekilde, deney zamanında sadece gRNA 'lar ve gerekli indükleyiciler aktarılabilir (Platt ve ark 2014).
- Bölünmüş inteinler kullanılarak, bölünmüş Cas9 sistemi geliştirilebilir (Truong ve ark 2015).
- Diğer türlerden daha küçük olan, Cas9 ortologları kullanılabilir örneğin; *Staphylococcus aureus* (SaCas9) gibi tek bir AAV vektörü içine tek bir gRNA ekspresyon kaseti ile paketlenilecek kadar küçüktür (Ran ve ark 2015).

CRISPR Genom Düzenleme Tekniğinin Uygulanabilirliğini Genişletme

CRISPR genom düzenleme tekniğine ait başlangıçta uygulanan protokoller bazen hedef bölge için sınırlayıcı olmuştur. SpCas9 enziminin işlevini yerine getirebilmesi için, ~ 20 nükleotitik kısım sonunda PAM dizilerinin "NGG" varlığına ihtiyaç duyar. gRNA ekspresyonu tipik olarak U6 insan pol III promotorü tarafından guanin (G) nükleotitinden transkripsiyonla başlatılır ve devam ettirilir. Bu nedenle, U6 desteği ile sürdürülecek SpCas9 bağımlı gRNA 'lar, ilgili gen bölgesinde GN19NGG modeline ihtiyaç duyar.

CRISPR aracılı genom düzenlemenin olanaklarını genişletmek için bir başka strateji de, farklı promotorlar kullanarak gRNA ekspresyonunu başlatmaktır. H1 promotorü A veya G 'den transkripsiyonu başlatabilir, bu nedenle H1 bağımlı gRNA 'lar AN19NGG ya da insan genomunun %15 'ini oluşturan GN19NGG modellerini kullanarak hedef bölgeye ulaşabilir. gRNA ekspresyon kasetindeki bu küçük

değişiklik sayesinde ökaryotlardaki ve özellikle de insanlardaki hedeflenebilir bölge sayısı iki katına çıkartılmıştır.

Bir başka strateji de, SpCas9 için NGG yerine farklı PAM dizilerini kullanmaktır. Bu yaklaşım alternatif PAM dizilerini tanıyan yeni Cas mutantlarını protein mühendisliğinden faydalanarak oluşturmaktır (Kleinstiver ve ark 2015). Yapısal bilgilerin kullanıldığı bu özenli süreçte araştırmacılar, alternatif PAM 'ların tanıyabileceği birkaç mutant Cas9 enzimi geliştirmişlerdir. Yalnız NGG PAM dizileri %50 'den fazla bölgede hedeflemeye izin verirken, yeni oluşturulmuş Cas9 nükleazlar NGA ve NGCG içeren PAM dizilerinden tanıma yaparlar. Buna ek olarak, yeni tasarlanmış Cas9 'ların wt SpCas9 'a kıyasla hedef dışı bölgelerde aktivitesinin düşük olduğunu gösteren veriler de vardır.

Cas9 Ekspresyonunun Düzenlenmesi

Sadece belirli zamanlarda veya belirli dokularda Cas9 'u aktif hale getirebilmek için, çeşitli araştırma grupları tarafından uyarılabilir ya da koşullu CRISPR / Cas9 sistemleri tasarlanmıştır. Örneğin genom düzenlemenin mekânsal ve zamansal kontrolü photoinducible dimerizasyon domaini ile birleştirilebilen photo-activatable Cas9 (paCas9) kullanılarak gerçekleştirilebilir. Mavi ışığa tabi tutulduğunda paCas9 dimerleşir ve aktive olur, aktif uyaran mevcut olduğu sürece NHEJ ve HDR aracılığıyla hedeflenen genom dizileri düzenlenebilir (Kleinstiver ve ark 2015).

Dokuya spesifik genom düzenleme kapsamında, Cas9 sentezlenmesini başlatmak için dokuya-özü promotorlar kullanılabilir. Birçok fare soyunda dokuya özü özel promotorların kontrolü altında, Cre rekombinazın kararlı bir şekilde ekspresyonu geliştirilmiştir. gRNA aktarımı sırasında doku spesifik genom düzenlemeyi etkinleştirmek için CRE güdümlü Cas9 kaseti bulunduran farelerde bu ekspresyon kolayca gerçekleştirilebilir (Platt ve ark 2014). Kalıtsal dokuya spesifik Cas9 ekspresyonu fareler dışında, zebra balıkları (Ablain ve ark 2015, Yin ve ark 2015), *Ciona intestinalis* (Stolfi ve ark 2014), ve *Drosophila* (Xue ve ark 2014) da dahil birçok türden sağlanmıştır. Doku spesifik promotorların *in vivo* aktarımdan sonra AAV 'ler ile enfekte edilerek, Cas9 aktivitesi sınırlandırılabilir (Cheng ve ark 2014).

1.3.2. Uygulama İçine CRISPR Yerleştirme: İş Akışları ve Vaka Çalışmaları

CRISPR gen düzenleme tekniği kullanılarak, modifiye klonal hücre hatları gRNA tasarım aşamasından başlayarak 2-3 hafta içinde elde edilebilir. Transgenik hayvan suşları tek bir nesil olarak değerlendirilebilir ve klinik açıdan önemli hayvan modellerinde hastalık, *in vivo* somatik mutasyon ile oluşturulabilir.

gRNA Dizaynı ve Ekspresyon Yapılarının Oluşturulması

CRISPR / Cas9-aracılı gen düzenleme gerçekleştirmek için ilk önce kullanılacak olan nükleaz (WT SpCas9, Cas9D10A ile eşleştirilmiş-nikaz gibi) seçilmelidir. gRNA dizilerine veritabanlarından uygun nükleazlar da seçilebilir.

Gen dizisi analizi

İlgili bölgenin konak canlı hücre hattında ya da hayvan modellerinde dizi analizi yapılması önerilir. Ayrıca NCBI refseq üzerinden de doğru eşleşmeler kontrol edilebilir.

Knock-out çift zincir kırıkları için gRNA dizaynı

Zıt yönlerde başlangıçtaki ekzonlara dizayn edilmiş gRNA 'lar düzgün ekspresyona zarar verirken, proteinlerin ekspresyon şansını da azaltmış olurlar. Alternatif olarak, fonksiyonel bölgeyi hedefleyen bir kayıpla da mutasyon oluşturulabilir.

Eşleştirilmiş nickase kılavuzları tasarımı

Cas9n ile kullanım için gRNA, 5' uçlarından 0-20 nükleotit boyunca hedef bölgeye göre dizayn edilmelidir ve PAM dizileri arasında her iki iplik değerlendirildiğinde 40-60 nükleotitlik mesafe bulunmalıdır.

Knock-in için gerekli yapıların dizaynı

Homolog rekombinasyonda WT Cas9, Cas9 'dan daha etkilidir ; hedef dışı aktivite riskini azaltabilmek adına eşleştirilmiş nickase stratejisi kullanılabilir fakat, Cas9 nikaz 'ın tercih edildiği durumlarda HDR etkinliği hücre tipine oldukça bağlıdır (Ran ve ark 2013). Genomda spesifik bir değişiklik yapıldığında, mesela

bir nokta mutasyonuna bağlı olarak protein ürünü değiştiğinde, Cas9 ile bu bölgede çift zincir kırıkları oluşturulabilir fakat, HDR için kullanılabilir bir donör şablona ihtiyaç vardır. HDR şablonları plazmidler ya da tek zincirli oligo nükleotitler (ssODN) halinde verilebilir. Başarılı HDR 'lerin tespit edilmesi ve knock-in etkinliğinin ölçülmesine yardımcı olmak için, donör şablonları genellikle donör ve wild tip diziler arasındaki farklılıkları ortaya koyacak şekilde tasarlanmalıdır. Başarılı HDR 'den sonra donör şablonları ve genomik DNA 'nın bölünmesini engellemek için, donör şablonları PAM dizisindeki mutasyonlarla dizayn edilmelidir.

gRNA ve Cas9 Yapılarını Oluşturma

Kılavuz RNA tasarlandıktan sonra, sentez için seçilen vektörün içine klonlanması gerekir. Seçilen plazmid vektörü, aktarım metoduna ve konakçıya uygun olmalıdır. (Çizelge 1.5)

Çizelge 1.5. gRNA & Cas9 için farklı konakçılarda aktarım metotları

Konakçı	Aktarım Metodu
Memeli Hücreleri	✓ DNA plazmidlerinin lipofeksiyon-bazlı transfeksiyonu ✓ DNA plazmidlerinin ya da RNP 'nin elektroporasyonu ✓ DNA plazmidlerinin lentiviral transdüksiyonu
Mikrobiyal Organizmalar	✓ Uyumlu hücrelere plazmidlerin transformasyonu
Bitkiler	✓ Agrobacterium aracılığıyla sgRNA ve Cas9 vektörlerinin transformasyonu
Fare: Kalıtsal mutasyonlar	✓ Embriyolar içine direkt enjeksiyon ✓ Zigotlara elektroporasyon
Fare: Yetişkin somatik dokuda mutasyonlar	✓ İlgili dokuya AAV 'nin direkt enjeksiyonu
Maya	✓ Galaktoz ile başlatılan Cas9 ve plazmidlerin elektroporasyonu

(Zhou ve ark 2000, Cong ve ark 2013, DiCarlo ve ark 2013, Mali ve ark 2013, Cheng ve ark 2014, Guo ve ark 2014, Maddalo ve ark 2014, Shalem ve ark 2014, Jiang ve ark 2015, Pyne ve ark 2015, Qin ve ark 2015, Schumann ve ark 2015, Wang ve ark 2015)

Hedef Hücrelere CRISPR Reaktiflerinin Aktarılması

Hassas genom düzenleme tekniği olan CRISPR/Cas9 teknolojisinin birçok hücre hattında, *C. elegans* (Friedland ve ark 2013, Waaijers ve ark 2013), *Xenopus tropicalis* (Guo ve ark 2014), bitkiler (Jiang ve ark 2015), ve hatta maymunlarda (Niu ve ark 2014) bile başarılı olduğuna dair kanıtlar vardır. Hedef organizmada

temel bileşenler benzer olsa bile aktarım metodu yaygın olarak değişir ve konakçı için en uygun vektörün seçilmesi kritik bir öneme sahiptir.

***In vitro* genom düzenleme**

Kolay transfekte olan hücre hatları için, gRNA ve Cas9 kodlayan plazmidler lipofeksiyon yoluyla, yüksek verimlilikle, aktarılabilir. CRISPR plazmidleri, tipik olarak bir antibiyotik direnç kazandıran genler gibi, FACS için seçilmiş markırları floresan proteinleri içerir. Zor transfekte edilen hücre hatları veya birincil hücreler için, lentiviral vektörler tercih edilir. gRNA, Cas9 nükleaz kodlayan ve çok değişik özellikler ile tek bir birimden oluşmuş plazmid aracılığıyla ya da ayrı bir plazmidle zaten Cas9 eksprese eden hücrelere aktarılabilir. Alternatif olarak ise, gRNA, bir PCR tarafından oluşturulan U6-sgRNA ekspresyon kasetlerinin ekspresyonu yoluyla aktarılabilir. Bölünme etkinliği, gRNA plazmidten eksprese olurken tipik olarak daha düşüktür; bununla birlikte, PCR ile üretilen kasetlerden eksprese edilen gRNA'ların etkinlik ve özgüllük bakımından karşılaştırılarak en uygun olanının bulunması, pSpCas9 içine klonlanmadan önce tespit edilebilir (Ran ve ark 2013).

1.3.3. CRISPR Genom Düzenleme Tekniğinde Güçlü Yeni Bulgular

Nöroloji

Müsküler distrofi için yeni bir rat modeli ile yeni bir tedavi hedeflenmiştir. Musküler Distrofi, kalp kası etkilediği zaman ölümcül olan, distrofin proteininin kaybı ile ilişkili bir durumdur. Uygun hayvan modellerinin eksikliği terapötik keşifleri zorunlu kılmıştır. Ancak, Nakamura ve arkadaşları tarafından yapılan 2014 yılındaki son çalışmada, CRISPR/Cas knock-out ratlarda distrofin geni (DMD) amaçlanmıştır (Nakamura ve ark 2014).

Kanser biyolojisi

Yeni tümör baskılayıcı genler ve beyin tümörleri için yeni hayvan modellerinde CRISPR/Cas tanımlanmıştır. Tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonların genelde kanseri ilerletir dolayısıyla, transformasyonlar için hayvan modelleri geliştirmek uzun zaman almıştır. Bu sorunu çözmek için, Zuckermann ve arkadaşları 2015 yılında, somatik Hedgehog (Shh) sinyal yolağında genlerin fonksiyon kaybı mutasyonlarını indüklemek için CRISPR/Cas kullanmışlardır.

Önceki çalışmalarda araştırmacılar, SHH yolağının beyindeki nöral sinir hücrelerinin proliferasyonunu düzenlediğini ve aksi durumlarda malign beyin tümörlerine yol açtığını tespit etmişlerdir. Tüm bu sonuçlar şunu gösterdi: CRISPR /Cas tekniği ile başarıyla, beyin hücrelerinin proliferasyonunu değiştiren ve fonksiyon kaybına neden olan mutasyonlar için ilgili beyin tümör modelleri geliştirilebilir.

Aşılar/viroloji

CRISPR/Cas tekniği ile T hücre mühendisliği HIV için yeni bir terapötik strateji geliştirmeyi hedeflemiştir. Başarılı bir şekilde T hücre düzenlemesi geçmişte zorlu olduysa da, Schumann ve arkadaşları 2015 yılında CRISPR/Cas aracılığıyla CXCR4 genini knock-out etmeyi başarmış ve bu durumun HIV hücrelerini enfekte etmek için kullanılabilecek yardımcı reseptör olabileceğini rapor etmişlerdir. Bu teknolojiyi kullanarak, araştırmacılar CD4+ T hücrelerinin yaklaşık %40 'ında gRNA ribonükleazların başarıyla genom düzenlemeye imkân sağladığını belirtmişlerdir.

Bitki biyolojisi

CRISPR/Cas tekniği pirinçlerde de başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Hedeflenen mutagenез bitkilerde gelişmekte olan birçok işlevden sorumludur. Ancak mutasyon frekansları türler arasında aktarım açısından oldukça farklılık göstermektedir. Birçok gRNA ve Cas kullanılarak etkinliği bitkilerde kanıtlanmıştır (Mikami ve ark 2015). Bu çalışmada MMCas9 ve FFCas9 vektörlerinin pirinç için en yüksek verimli vektörler olduğu gösterilmiştir.

İmmünoloji

Burun bölgesinde bulunan solunum hava yollarındaki epitel hücrelerinde, *MUC18* geni yeni bir pro-inflamatuar işlevi ortaya koymaktadır. Birincil hücre hatlarında genom düzenleme ile kalıcı bir değişiklik oluşturulabilir; bununla birlikte CRISPR/Cas tekniği ile *MUC18* geninde knock-out gerçekleştirildiğinde, bu genin tümörün metastazında ne kadar rolü olduğu da ortaya koyulmuştur. Bu çalışmada, viral ve bakteriyel uyaranlara maruz kaldıktan sonra, *MUC18* geninin solunum yolu epitelinde bir pro-inflamatuar bir rolünün olduğu kanıtlanmıştır (Chu ve ark 2015).

1.3.4.CRISPR 'ın Geleceği

CRISPR/Cas 'un memeli hücreleri, mikroplar ve hayvan modellerinde kullanımı, kolaylığı ve geniş bir alanda uygulanabilirliği, genom düzenlemede bir devrim yaratmıştır. CRISPR, gen fonksiyonlarını anlayıp analiz etmekle kalmamış aynı zamanda, tıbbi endüstri için de yeni bir reform olmuştur. Erişilebilir genom düzenleme teknikleri ile kalıtsal bozukluklar ya da hastalıklardan sorumlu genetik mutasyonlar düzeltiler ve aynı zamanda büyük ölçekli üretimle yeni ilaçların taranması da sağlanabilir (Doudna ve Charpentier 2014). Buna ek olarak, CRISPR/Cas sistemi ile kodlama yapan ve yapmayan bölgelerde aktivasyon ya da baskılama gerçekleştirilebilir.

CRISPR sistemi memeli ve mikrobiyal gen düzenlemede uygulanmıştır, fakat hala geliştirilmeye ihtiyacı vardır. Cas9 'un DNA 'ya bağlanma mekanizması gibi, daha etkin Cas9-gRNA yapıları tasarlanabilir (Sternberg ve Doudna 2015). Bazı memeli hücre tipleri için Cas9 'un aktarımı hala engel oluşturmaktadır. Daha küçük Cas9 varyantlarının tasarımı ile hücrelere aktarılması ve kullanımının genişletilmesi gerçekleştirilebilir.

Bu gelişmelerin ışığında ne olursa olsun, CRISPR/Cas sisteminin biyolojik bilimlerde önemli roller oynadığı açıktır. CRISPR/Cas gen düzenleme teknolojisinin, en kolay ve en heyecan verici genom düzenleme tekniği olmasının yanı sıra, gelecek nesil bilim insanlarının çalışmaları için de güçlü bir başlangıç olacağına dair hiçbir şüphe yoktur.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Hücre Kültürü

Bir cilt kanseri hastasından köken almış tümör hücrelerinden oluşan, wildtype B-Raf ve mutant N-Ras'ları (Q61K) eksprese eden bir melanom hücre hattı olan SK-MEL-30 Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ; Almanya) 'den temin edilmiştir. Dondurulmuş hücreler önce 37°C de su banyosunda çözüldükten sonra 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılarak çöktürülmüştür. Ardından hücre pelleti steril 1X Phosphate-buffered saline (PBS; Sigma-Aldrich, ABD) ile bir kez yıkamış ve tekrar aynı santrifüj koşullarında çöktürülmüştür. SK-MEL-30 hücreleri %10 fetal bovine serum (FBS; Sigma-Aldrich, ABD), %1 L-glutamin ve %1 antibiyotikli (Penicilin/Streptomisin 1:1; Gibco Thermo Fisher Scientific, ABD) Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM; Sigma-Aldrich, ABD) kültür vasatında, T25 kültür flasklarında 37°C'de %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakılarak steril koşullarda kültüre edilmiştir.

Tutunan ve sağlıklı çoğalan hücrelerin kültür ortamı 2-3 günde bir 1 X PBS ile yıkandıktan sonra taze kültür vasatı ile değiştirilmiştir. Hücreler T25 kültür flaskında %90-%95 'lik yüzey alanını doldurduktan sonra 5 veya 10 ml steril 1 X PBS ile yıkanmıştır. Ardından %0,25 2 ml Trypsin-Etilendiamin tetra asetik asit (Trypsin-EDTA; Sigma-Aldrich, ABD) ile muamele edilmiştir. Flask 5 dakika 37°C'de inkübe edildikten sonra invert mikroskop ile hücrelerin kaldırılması incelenmiştir. Tripsin enziminin inaktivasyonu için en az iki kat hacimde (4ml) kültür medyumunu flaska eklenmiştir ve hücre solüsyonu 15 ml'lik falkon tüplere aktarılmıştır. Sonra hücre solüsyonu 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılarak çöktürülmüştür. Hücre pelleti 1 ml kültür medyumunu içinde çözündürülüp bir hücre süspansiyonu elde edilmiştir.

2.1.1. Hücre Sayımı

Oluşturulan hücre süspansiyonundan 100 µl alınıp 1,5 ml'lik ependorf tüpe aktarılmıştır ve üzerine dilüsyon faktörü 2 olmak üzere 100 µl %0,4 trypan blue stain (Gibco Thermo Fisher Scientific, ABD) boya solüsyonu eklenmiştir. Nazikçe pipetaj yapıldıktan sonra boyanmış hücre süspansiyonu 5 dakika oda ısısında inkübe edilmiştir. Daha sonra Thoma lamına 20 µl boyanmış hücre süspansiyonundan

yüklenmiş ve canlı hücreler invert mikroskop altında sayılmıştır. Toplam, canlı ve ölü hücre sayısı aşağıdaki formül uygulanarak hesaplanmıştır:

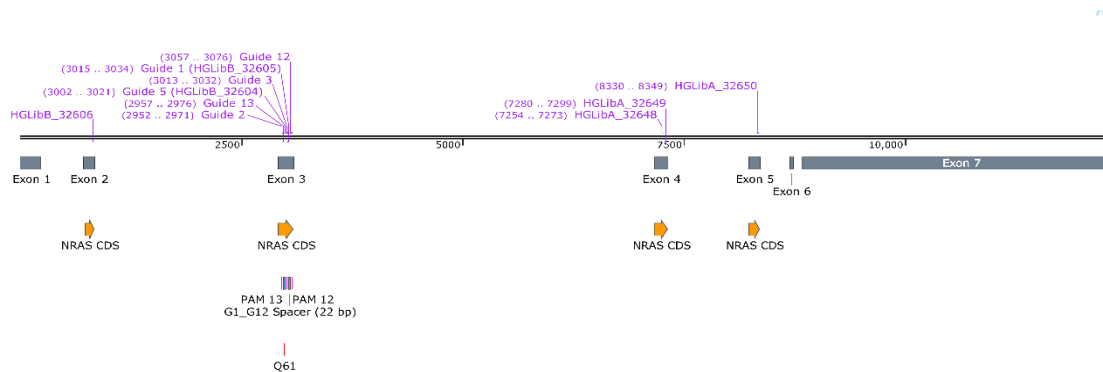
$$1 \text{ ml'de hücre sayısı} = \text{sayılan bölgelerin ortalama sayısı} \times \text{dilüsyon faktörü} \times 10^4$$

2.1.2. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması

%10 Dimetil sülfoksit (DMSO; Sigma-Aldrich, ABD) ve %90 taze kültür vasatı (%20 FBS, %1 L-glutamin, %1 Penicilin/Streptomisin, DMEM) karıştırılarak dondurma medyumunu elde edilmiştir. Mililitrede 10^6 ya da 10^7 hücre olacak şekilde hücre pelleti dondurma medyumunu ile karıştırılmıştır ve cryotüplere dağıtılmıştır. Daha sonra bu cryotüpler önce $+4^\circ\text{C}$ 'de, sonra -20°C 'de bekletilerek soğuk ortama adapte edilmiştir ve -80°C 'de saklanmıştır.

2.2. CRISPR Dizayn

CRISPR/Cas9 genom düzenleme metodu kullanılarak SK-MEL-30 hücre hattında NRAS Q61K mutasyonu hedef alınmıştır. Bunun için öncelikle NRAS geni NCBI (National Center for Biotechnology Information) veritabanından çekilip (NM_002524), ekzonların genin hangi bölgesinde yer aldığı ve Q61K mutasyon bölgesinin lokalizasyonu tespit edilmiştir.



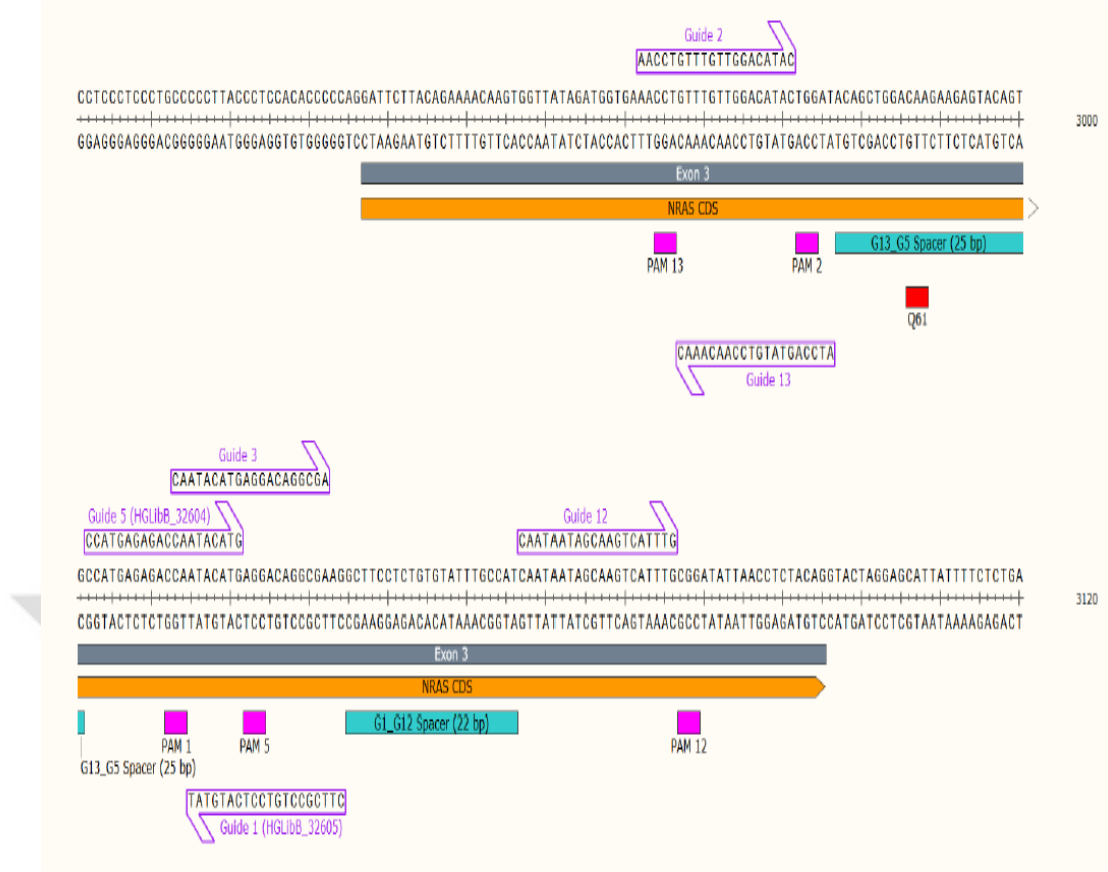
Şekil 2.1. NRAS geni ekzon bölgeleri ve Q61K mutasyonu lokalizasyonu

2.2.1. gRNA Dizaynı

NCBI veritabanı üzerinden yapılan analizlerde Q61K mutasyonunun ekzon3'te yer aldığı ve herhangi bir intronik bölge ile komşu olmadığı gözlemlenmiştir. GeCKO sgRNA kütüphanesine bakarak ilgili mutasyonu içeren *NRAS* ekzon3 sekans dizisine göre gRNA dizaynı yapılmıştır. Bu gRNA'ların sekans üzerinde hangi bölgelere tekabül ettiğine bakılmıştır. PAM sekans (NGG) varlığı kontrol edilmiştir. LentiCRISPR v2 sistemi kullanılarak knockout için, off-target etkinliğinin en az olduğu aşağıdaki Çizelgede yer alan gRNA çiftlerine karar verilmiştir. Klonlama için gRNA sekanslarının 5' ve 3' bölgelerine restriksiyon enzim kesim bölgeleri eklenmiştir.

Çizelge 2.1. LentiCRISPR v2 sistemi için dizayn edilen gRNA çiftleri.

<i>NRAS_g1_Forward</i>	caccgCTTCGCCTGTCCTCATGTAT
<i>NRAS_g1_Reverse</i>	aaacATACATGAGGACAGGCGAAGc
<i>NRAS_g2_Forward</i>	caccgAACCTGTTTGTGGACATAC
<i>NRAS_g2_Reverse</i>	aaacGTATGTCCAACAAACAGGTTc
<i>NRAS_g3_Forward</i>	caccgCAATACATGAGGACAGGCGA
<i>NRAS_g3_Reverse</i>	aaacTCGCCTGTCCTCATGTATTGc



Şekil 2.2. Dizayn edilen gRNA çiftleri ve PAM dizilerine göre konumları.

FokI endonükleaz enzimi kullanılarak gerçekleştirilecek knockout için, off-target etkinliğinin en az olduğu aşağıdaki Çizelgede yer alan gRNA çiftlerine karar verilmiştir. Klonlama için gRNA sekanslarının 5' ve 3' bölgelerine yine restriksiyon enzim kesim bölgeleri eklenmiştir.

Çizelge 2.2. FokI endonükleaz sistemi için dizayn edilen gRNA çiftleri.

Middle_Forward	AGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAAGGCTAGTCCGTT ATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCGTTCA CTGCCGTATA
Middle_Reverse	TGCCTATACGGCAGTGAACGCACCGACTCGGTGCCAC TTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTAACTT GCTATTCT
Left_NRAS_g13_ Forward	gcagATCCAGTATGTCCAACAAACgttttag
Left_NRAS_g13_ Reverse	agctctaaacGTTTGTGGACATACTGGAT
Right_NRAS_g5_ Forward	ggcagCCATGAGAGACCAATACATG
Right_NRAS_g5_ Reverse	aaacCATGTATTGGTCTCTCATGGc
Left_NRAS_g1_ Forward	gcagCTTCGCCTGTCCTCATGTATgttttag
Left_NRAS_g1_ Reverse	agctctaaacATACATGAGGACAGGCGAAG
Right_NRAS_g12_ Forward	ggcagCAATAATAGCAAGTCATTTG
Right_NRAS_g12_ Reverse	aaacCAAATGACTTGCTATTATTGc

2.2.2. Uzun Donör Dizilerin Dizaynı

Mutasyon içeren bölgede knockout işlemi yukarıda dizayn edilen gRNA çiftleri sayesinde gerçekleştirilmiştir. Ardından bu mutasyonun düzeltilmiş haliyle dizayn edilen donör dizi, kırık olan bölgeye homoloji ile yönlendirilen tamir sistemi (HDR) yardımıyla entegre olmuştur. Donör dizi dizayn edilirken, nokta mutasyonuna neden olan baz, NCBI’da yer alan orijinal sekans bilgisindeki baz ile değiştirilmiş ve diziye hücre içinde Cas9 endonükleaz enziminden korumak için sessiz (sinonim) mutasyonlar donör diziye yerleştirilmiştir.

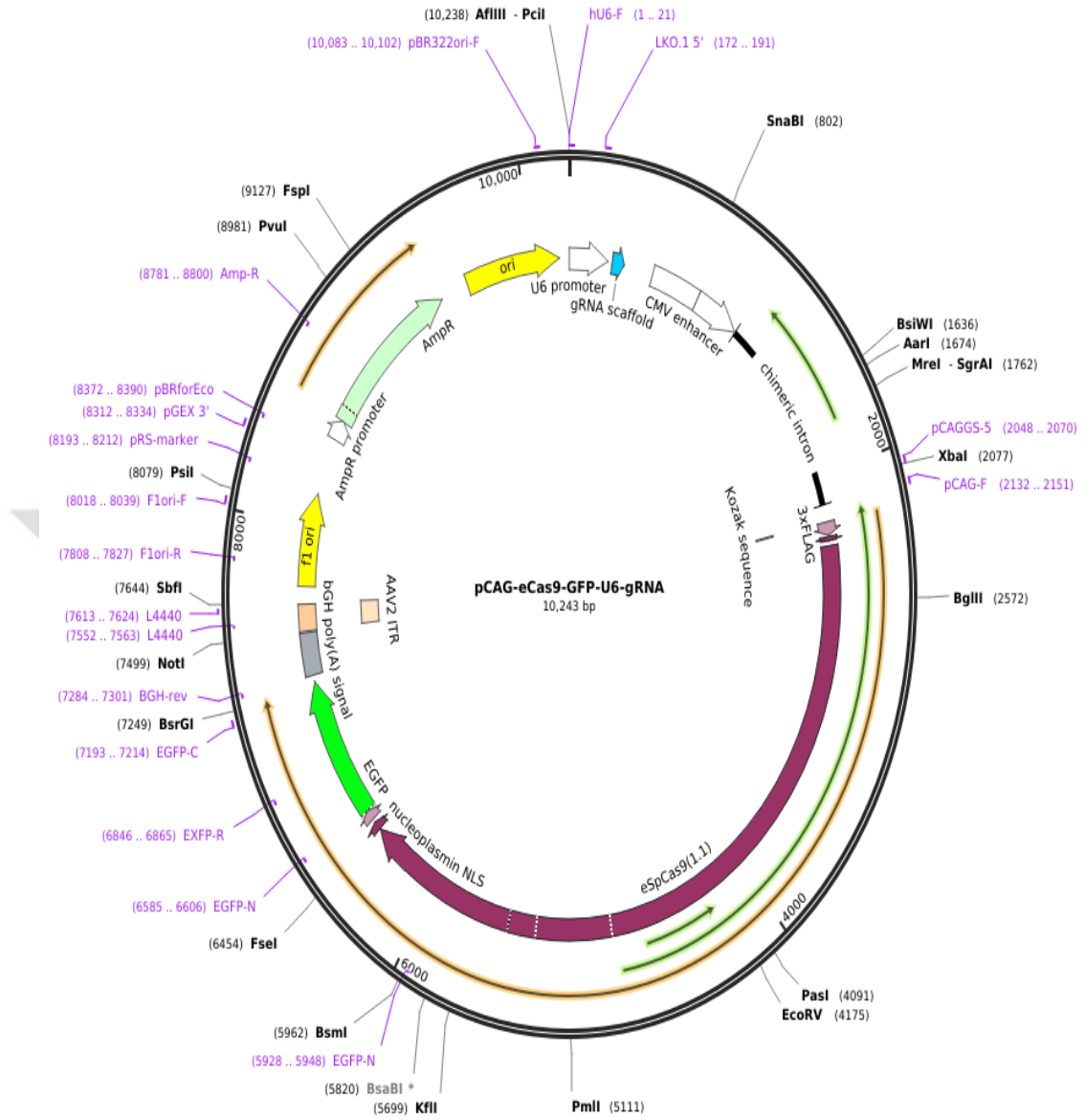
Çizelge 2.3. NRAS Q61K mutasyonunu HDR yardımıyla düzeltmeye yönelik dizayn edilen donör diziler.

ssODN(NRAS_Q61)_g2/g13g5	TGCTCCTAGTACCTGTAGAGGTTAATATCAGCAAATGACTT GCTATTATTGATGGCAAATACACAGAGGAAGCCTTCGCCT GTCCTCATGTATTGATCTCTCATGGCACTGTACTCTTCTTGT CCAGCTG
ssODN(NRAS_Q61)_g2/g13g5	TGCTCCTAGTACCTGTAGAGGTTAATATCAGCAAATGACTT GCTATTATTGATGGCAAATACACAGAGGAAGCCTTCGCCT GTCCTCATGTATTGATCTCTCATGGCACTGTACTCTTCTTGT CCAGCTG

2.2.3. Plazmid vektör seçimi

CRISPR knockout sistemi için klasik LentiCRISPR ya da PX330 plazmid vektörü yerine LentiCRISPR v2 Addgene plazmid #52961, FokI endonükleaz sistemi için pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA Addgene plazmid #79145 ve pSH-Csy4-T2A-SpRFN-P2A-GFP-multi-gRNA #085756 kullanılmıştır.

53



Şekil 2.4. pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid vektörü

2.3. gRNA'ların İlgili Plazmidlere Transformasyonu ve Klonlama

Addgene'den temin edilen plazmidler uygun kompetent bakteri hücrelerine (StbI3 ve DH5alpha) ısı-şok transformasyon metodu kullanılarak aktarılmıştır.

LB Medyum hazırlamak için 10g Tripton (Sigma-Aldrich, ABD®), 5g yeast extract ve 10g NaCl (Sigma-Aldrich, ABD) bir erlen içerisinde karıştırılmış ve üzerine 950 ml otoklavlanmış distile su eklenmiştir. Medyumun pH'ı 1N NaOH kullanılarak 7,0'a ayarlanmış ve toplam hacim 1 litreye tamamlanmıştır. 20 dakika

15 psi otoklava tabi tutulduktan sonra, medyum yaklaşık 55 °C'ye soğutulmuş ve sonrasında 50 µg/ml Ampisilin (Sigma-Aldrich, ABD) antibiyotik eklenmiştir. +4 °C'de saklanmıştır.

LB-Agar Plate Hazırlama

LB medyum hazırlanmadan önce 15g/L agar (Sigma-Aldrich, ABD) eklenmiştir. Ardından agar içeren medyum 20 dakika 15 psi otoklava tabi tutulduktan sonra, medyum yaklaşık 55 °C'ye soğutulmuş ve sonrasında 50 µg/ml Ampisilin (Sigma-Aldrich, ABD) antibiyotik eklenmiştir. Medyum soğumadan hemen beç alevi yanında ve steril biyogüvenlik kabininde petri kaplarına dökülmüştür. Medyum donunca petri kaplarının kapakları kapatılmış, parafilmlemlenmiş ve ters çevrilerek +4 °C'de karanlık ortamda saklanmıştır.

Plazmidlerin Kompetent Bakteri Hücrelerine Isı-Şok Metodu ile Transformasyonu

Ticari olarak elde edilen kompetent (plazmid içermeyen) bakteri hücreleri StbI3 (*E.coli*) ve DH5alpha (*E.coli*) -80 °C'lik derin dondurucudan buz içerisine alınmıştır. Önceden buz içerisine yerleştirilmiş 1,5 ml'lik ependorf tüplere, 50 µl kompetent hücreler steril bir şekilde aktarılmıştır. 2 µl transformasyona hazırlanan plazmid steril olarak bakteri hücresinin üzerine eklenmiş ve tüpün dip kısmındaki hücrelere küçük küçük vurularak karıştırılmıştır. Bu aşamada vorteks yapılmamalıdır. Karışım içeren tüpler 5 dk buz içerisinde tutulup, önceden 42 °C'ye ayarlanmış ısı bloğu veya su banyosuna koyulmuş ve burada 30 saniye bekletilmiştir. Bu aşamada tüplerin asla çalkalanmamasına ve sarsılmamasına dikkat edilmiştir. Süre sonunda 42 °C'den alınan tüpler hızlı bir şekilde tekrar 2-3 dk buz içerisine bekletilmiştir. Tüplerin içerisine 150-250 µl antibiyotik içermeyen oda ısısındaki LB medyumunu ilave edilmiştir. Bu aşamada 1-2 saat beklenmiştir.

Transforme Kompetent Bakteri Hücrelerinin Ekilmesi

Önceden hazırlanan vektörün taşıdığı dirençli antibiyotik (Ampisilin) genine göre LB- agar plate hazırlanmıştır. Üzerine steril olarak yayma şeklinde ekim yapılmıştır. Klonlanan plazmiti yapısına alan *E.coli* bakterilerinin çoğalması için

karışım 37 °C’lik etüve alınmış ve yaklaşık 12-14 saat inkübe edilmiştir. İkinci gün koloni oluşumu gözlenmiştir.

Mini Kültür Kurulması

Steril biyogüvenlik kabininde beck alevinin yanında hazırlanan LB medyum 50ml ’lik falkonlara alındıktan sonra, birkaç tane koloni öze yardımıyla alınıp medyum içerisine bırakılmıştır. Ardından 16-24 saat 37 °C’lik çalkalamalı etüvde bekletilmiştir.

2.3.2. Plazmidlerin İzolasyonu

Plazmidlerin izolasyonu nucleospin plasmid miniprep kit (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Nanodrop cihazında (ACTGene Inc, ABD) plazmidlerin konsantrasyon ve A_{260}/A_{280} oranları ölçülmüştür.

2.3.3. Plazmidlerin Restriksiyon Endonükleaz Enzimi ile Kesimi

CRISPR defosforilize plazmidleri 5µg uygun restriksiyon endonükleaz enzimi ile (BbsI ve Esp3I, Thermo Fisher Scientific®) 37 °C’de 30 dakika boyunca kesilmiştir. Bunun için ependorf test tüpüne aşağıdaki reaktifler eklenmiş ve uygun reaksiyon koşulları sağlanmıştır. Çalışmamızda insert dizinin plazmid vektör içerisine yerleşmeden, vektör dizinin tekrar kapanmaması için defosforilasyon ve fosforilasyon tekniği kullanılmıştır.

5 µg Plazmid DNA

3 µl BbsI ya da Esp3I

3 µl FastAP

6 µl 10 X Fast Digest Buffer

X µl ddH₂O

60 µl toplam

2.3.4. Plazmidlerin Jelden Saflaştırılması

Tris Asetik Asit EDTA (TAE) Tampon Hazırlanması

Tris asetik asit EDTA tamponu 50 X TAE stok tamponu olacak şekilde aşağıdaki materyaller karıştırılarak elde edilmiştir.

242 g Tris base

57,1 ml glasiyel asetik asit

37,2 g Na₂EDTA.2H₂O

Otoklavlanmış ddH₂O ile üzeri 1 litreye tamamlanmıştır. pH 8.0 ile 8.5 arasında olacak şekilde ayarlanmıştır.

Agaroz Jel Hazırlama ve Jele Örneklerin Yüklenmesi

Stok olarak hazırlanan 50 X TAE tamponu 1X olacak şekilde seyreltilmiştir. 0,7'lik agaroz jel hazırlamak için 0,7g agaroz (Sigma-Aldrich, ABD) tartılarak bir erlene alınmış ve üzerine 100 ml 1 X TAE tamponu eklenmiştir. Erlen mikrodalga fırında 2-3 dakika boyunca kaynatıldıktan sonra biraz soğutulmuş ve üzerine etidyum bromür () eklenmiştir. Hafifçe kabarcık yapmadan çalkalanan sıvı agaroz jel kasetine dökülmüş ve uygun boyuttaki tarak dikkatlice yerleştirilmiştir. 15-20 dakika beklendikten sonra donmuş olan jel, içi belli bir seviyeye kadar 1 X TAE tampon ile dolu olan elektroforez tankına alınmıştır ve tarak çıkarılmıştır.

Kuyulara 2 µl 6 X loading dye (Sigma-Aldrich, ABD) ve 5 µl kesilmiş plazmid DNA'sı iyice pipetaj yapıldıktan sonra yüklenmiştir. Güç kaynağından 120V akım verilerek DNA örnekleri jel üzerinde yaklaşık yarım saat yürütülmüştür.

Plazmidlerin Jelden Alınması ve Saflaştırılması

DNA örnekleri yaklaşık jelin 2/3'üne gelene kadar yürütüldükten sonra, UV Transmillitör () yardımıyla bantlar gözlemlenmiştir. Uygun bantlar bisturi yardımıyla kesilerek bir ependorf tüpe alınmış ve tartılmıştır. Tartılan DNA örnekleri nucleospin gel and PCR clean-up kit (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG) kullanılarak saflaştırılmıştır.

2.3.5. Fosforilasyon ve gRNA Dizilerinin Ortama Eklenmesi

Restriksiyon enzimle kesilerek linearize edilen plazmide gRNA'ların eklenmesi için aşağıdaki reaksiyon koşulları oluşturulmuştur.

2 µl gRNA

1 µl 10 X T4 ligation buffer (Thermo Fisher Scientific®)

6,5 µl ddH₂O

0,5 µl T4 Polinucleotide Kinaz (PNK; Thermo Fisher Scientific®)

10 µl toplam hacim

Fosforilasyon ve annealing aşamalarının gerçekleşmesi için PCR tüpleri thermocycler PCR cihazına yerleştirilmiştir ve aşağıdaki parametreler takip edilmiştir.

37 °C 30 dakika

95 °C 5 dakika

25 °C ∞ (her dakikada 5 °C inerek 25 °C'ye gelecek şekilde ayarlama yapılmıştır.)

2.3.6. Ligasyon

Ligasyon için aşağıdaki koşullar sağlanmış ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir. Ligasyon aşamısı insert dizinin vektöre yapıştırılması aşaması olduğu için mümkün olduğunca hızlı davranılmış ve Quick ligasyon enzimleri tercih edilmiştir.

X µl Plasmid DNA

1 µl gRNA (1:200 oranında seyreltilmiştir)

5 µl 2X Quick ligase buffer ()

X µl ddH₂O

10 µl subtoplam

1 µl ddH₂O Quick Ligase

11 µl toplam

2.3.7. Oluşturulan Plazmid Yapılarının Transformasyonu

Ticari olarak elde edilen kompetent (plazmid içermeyen) bakteri hücrelerine StbI3 (*E.coli*) ve DH5alpha (*E.coli*), gRNA içeren plazmidler yukarıda anlatıldığı gibi ısı-şok transformasyon yöntemi kullanılarak aktarılmıştır. Son aşamada yine tüplerin içerisine 150-250 µl antibiyotik içermeyen oda ısısındaki LB medyumunu ilave edilmiştir. Bu aşamada 1-2 saat beklenmiştir.

2.3.8. Transforme Kompetent Bakteri Hücrelerinin Çoğaltılması

Önceden hazırlanan vektörün taşıdığı dirençli antibiyotik (Ampisilin) genine göre LB- agar plate hazırlanmıştır. Üzerine steril olarak yayma şeklinde ekim yapılmıştır. Klonlanan plazmiti yapısına alan *E.coli* bakterilerinin çoğalması için karışım 37 °C’lik etüve alınmış ve yaklaşık 12-14 saat inkübe edilmiştir. İkinci gün koloni oluşumu gözlenmiştir.

2.3.9. Mini Kültür Kurulması

Steril biyogüvenlik kabininde beck alevinin yanında hazırlanan LB medyum 50ml ’lik falkonlara alındıktan sonra, birkaç tane koloni öze yardımıyla alınıp medyum içerisine bırakılmıştır. Ardından 16-24 saat 37 °C’lik çalkalamalı etüvde inkübe edilmiştir.

2.3.10. Plazmidlerin İzolasyonu

Plazmidlerin izolasyonu nucleospin plasmid miniprep kit (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Nanodrop cihazında (ACTGene Inc, ABD) plazmidlerin konsantrasyon ve A_{260}/A_{280} oranları ölçülmüştür.

2.4. Transfeksiyon

2.4.1. Plazmid DNA Örneklerin Konsantrasyonlarının Ayarlanması

Plazmidler izole edildikten sonra ölçülen konsantrasyon değerleri dikkate alınarak 6’lı well için, 2µg plazmid DNA: 2 µg uzun donör dizi olacak şekilde 1:1 oranda ayarlamalar yapılmıştır. Her bir sistem 2 ayrı tüpte kurgulanarak, transfeksiyona hazır hale getirilmiştir.

2.4.2. Elektroporasyon

Plazmidlerin SK-MEL-30 cilt kanseri hücrelerine transfekte edilmesi için elektroporasyon tekniği kullanılmıştır. 0,2 cm'lik elektroporasyon kuvvetlerine (BIORAD, ABD) önce en az 2×10^6 hücre süspansiyonu ardından da plazmid:donör dizi karışımı eklenmiştir. Elektroporasyon cihazında (BIORAD, ABD), 250 V elektrik akımı, 20 ms, 1 vuruşta uygulanmıştır.

2.5. Transfekte Kanser Hücrelerinin Kültüre Edilmesi

Transfeksiyonu gerçekleştirilen SK-MEL-30 kanser hücreleri yaklaşık 1 ml DMEM taze kültür vasatı (%10 FBS, %1 L-glutamin, %1 penisilin/streptomisin) ile karıştırıldıktan sonra, 6'lı well'lere ekilmiştir. İnkübasyon için 1 gece %5 CO₂ 'li etüvde 37 °C'de kültüre edilmiştir.

2.6. Flow (Akış) Sitometri ile GFP+ Hücrelerin Alınması

Kültüre edilen hücreler tripsinize edilerek kaldırıldıktan sonra ve 1500 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Hücre pelleti 300 µl 1X HBSS içerisinde çözülmüştür. Hücreler yukarıda bahsedildiği gibi trypan blue ile boyanarak Thoma lamında sayıldıktan sonra, hücre süspansiyonundaki toplam hücre sayısı yaklaşık olarak hesaplanmıştır. Hücre süspansiyonu FACS (Fluorescence-activated cell sorting) tüplerine (BD Pharmingen, ABD) alındıktan sonra, 250 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Hücre pelleti 200 µl %2 FBS/HBSS içerisinde çözülmüştür. Bu hazırlık işleminin ardından hücreler FACS cihazı (FACS Aria III – BD Pharmingen, ABD) ile FITC kanalından okunarak GFP+ hücreler içinde taze kültür vasatı bulunan FACS tüpüne ayıklanmıştır. GFP+ hücreler elde edildikten sonra, yaklaşık 5ml taze kültür vasatı ile süspanse edilerek 6'lı well'lere ekilmiştir.

2.7. Hücrelerin Kaldırılması

CRISPR/Cas9 tekniği uygulanan GFP+ hücreler yaklaşık %90-%95 oranında çoğaldıktan sonra, 2 veya 3 ml steril 1 X PBS ile yıkanmıştır. Ardından %0,25 2 ml Trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich, ABD) ile muamele edilmiştir. Flask 5 dakika 37°C'de inkübe edildikten sonra invert mikroskop ile hücrelerin kaldırılması incelenmiştir. Tripsin enziminin inaktivasyonu için en az iki kat hacimde (4ml) kültür medyumunu flaska eklenmiştir ve hücre solüsyonu 15 ml'lik falkon tüplere aktarılmıştır. Sonra hücre solüsyonu 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılarak,

hücreler çöktürülmüştür. Hücre pelleti 1 ml kültür medyumunda içinde çözündürülüp bir hücre süspansiyonu elde edilmiştir.

2.8. Hücre Sayımı

Oluşturulan hücre süspansiyonundan 100 µl alınıp 1,5 ml'lik ependorf tüpe aktarılmıştır ve üzerine dilüsyon faktörü 2 olmak üzere 100 µl %0,4 trypan blue stain (Gibco Thermo Fisher Scientific, ABD) boya solüsyonu eklenmiştir. Nazıkçe pipetaj yapıldıktan sonra boyanmış hücre süspansiyonu 5 dakika oda ısısında inkübe edilmiştir. Daha sonra Thoma lamına 20 µl boyanmış hücre süspansiyonundan yüklenmiş ve canlı hücreler invert mikroskop altında sayılmıştır. Toplam, canlı ve ölü hücre sayısı aşağıdaki formül uygulanarak hesaplanmıştır.

$$1 \text{ ml'de hücre sayısı} = \text{sayılan bölgelerin ortalama sayısı} \times \text{dilüsyon faktörü} \times 10^4$$

2.9. DNA İzolasyonu

Hücrelerin sayım işleminden sonra, hücre süspansiyonu 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek hücreler tekrar çöktürülmüştür. Çöken hücre pelleti için Blood & Cell Culture DNA Mini Kit (QIAGEN, Almanya) kullanılarak, hücrelerden DNA izolasyonu yapılmıştır. Daha sonra Nanodrop cihazında (ACTGene Inc, ABD) konsantrasyon ve A_{260}/A_{280} oranları ölçülmüştür.

2.10. Real-Time PCR

Real-time PCR ile yapılan analizler için Easy NRAS kit (Diatach Pharmacogenetics, İtalya) ve GoTaq® qPCR Master Mix (Promega Corporation, Avustralya) kullanılmıştır.

2.10.1. Real-Time PCR Tekniği ile Mutasyonun Saptanması

İzole edilen DNA'lar reaksiyon ortamında 10 ng olacak şekilde bir tüpte seyreltikten sonra, striplere dağıtılmıştır. Easy NRAS kit (Diatach Pharmacogenetics, İtalya) kullanılarak, izole edilen DNA'dan aşağıdaki şartlar çerçevesinde PCR reaksiyonu kurulmuştur.

Easy NRAS kit paneli ikili floresan boya-pob mantığı ile dizayn edilmiş bir kit olduğundan, FAM ve HEX floresan problemlerin cihaz tarafından algılanabilmesi için ikili floresan okuma yapılmıştır.

Çizelge 2.4. Easy NRAS kit için optimize termal profillem.

Termal Profil	
Hold	95°C’de 2 dakika
40 döngü	95°C’de 10 sn 58°C’de 60 sn (Green ve Yellow okutma yapılmıştır.)

Her bir örnek, kitin içeriğinde mevcut olan 8 farklı mutasyona özgü karışım ile amplifiye edilmiştir. Pozitif kontrol olarak kitin kendi internal kontrolü, negatif kontrol olarak distile su kullanılmıştır. Ayrıca kıyaslama yapmak için CRISPR/Cas9 uygulanmamış hücre hatlarında da DNA izole edilerek deney şartları kontrollü hale getirilmiştir.

Çizelge 2.5. Easy NRAS paneli kullanılarak saptanabilecek mutasyonlar.

Kit numaralandırması	Mutasyon
1	NRAS G12x-G13x mix
2	NRAS A59x-Q61H mix
3	NRAS Q61K mix
4	NRAS Q61R mix
5	NRAS Q61L mix
6	NRAS K117x mix
7	NRAS A146x mix
8	NRAS A146x mix

Amplifikasyon için her bir stripte aşağıdaki ürün miktarları baz alınarak reaksiyon ortamı hazırlanmıştır. Tüm ürünler reaksiyon ortamına eklenmeden önce nazikçe vortekslenmiş ve kısaca spin-santrifüj edilmiştir. Tüm hazırlıklar

tamamlandıktan sonra amplifikasyon Rotor-Gene Q sürüm 1.7.87 (QIAGEN, Almanya) cihazında gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2.6. Reaksiyon ortamında her bir stripteki ürün miktarları.

Amplifikasyon	1 reaksiyon için (µl)
Taq Premix 920	10 µl
Distile su	4 µl
NRAS G12x-G13x mix ya da NRAS A59x-Q61H mix ya da NRAS Q61K mix ya da NRAS Q61R mix ya da NRAS Q61L mix ya da NRAS K117x mix ya da NRAS A146x mix ya da NRAS A146x mix	1 µl
Toplam hacim	15 µl

2.10.2. End-point Mutasyon Analizi

İzole edilen DNA'lar reaksiyon ortamında 10 ng olacak şekilde bir tüpte seyreltikten sonra, Axygen® 96 Well Polypropylene PCR mikrotabakalara (Corning, ABD) dağıtılmıştır. Easy NRAS kit (Diatech Pharmacogenetics, İtalya) kullanılarak, izole edilen DNA'dan aşağıdaki şartlar çerçevesinde PCR reaksiyonu kurulmuştur. İkili FAM ve HEX floresan problemleri ile saptama sağlanacağından, LightCycler® 480 Instrument (Roche, İsviçre) cihazı üzerinde aşağıdaki şartlar oluşturulurken “dual color” seçeneği çalışmaya dahil edilmiştir.

Çizelge 2.7. Easy NRAS kit için optimize termal profillem.

Termal Profil	
Hold	95°C'de 2 dakika
45 döngü	95°C'de 10 sn 58°C'de 60 sn (FAM ve HEX okutma yapılmıştır.)

2.10.3. Melting Curve Analizi

İzole edilen DNA'lar reaksiyon ortamında 10 ng olacak şekilde bir tüpte seyreltikten sonra, Axygen® 96 Well Polypropylene PCR mikrotabakalara (Corning, ABD) dağıtılmıştır. GoTaq® qPCR Master Mix (Promega Corporation, Avustralya) kullanılarak, izole edilen DNA'dan aşağıdaki şartlar çerçevesinde PCR reaksiyonu kurulmuştur.

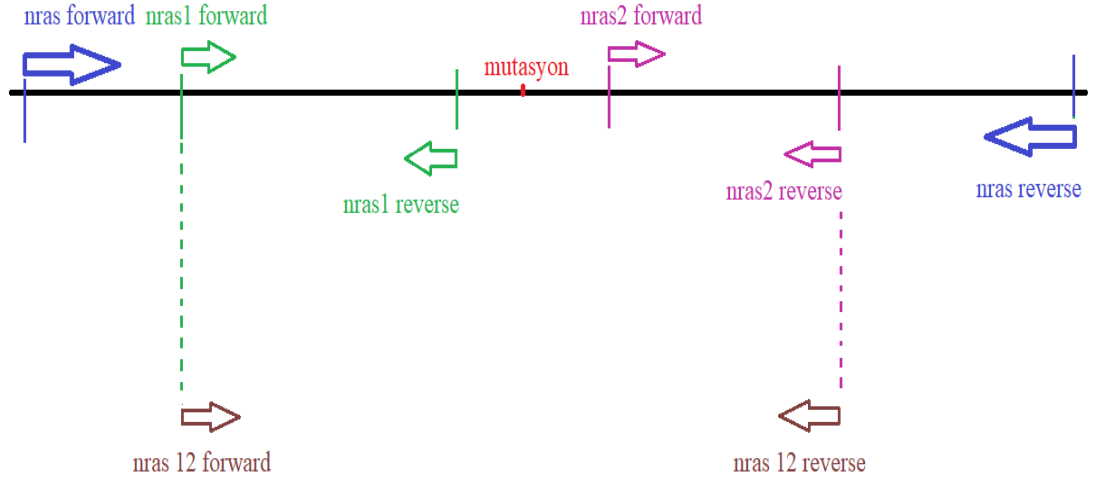
Çizelge 2.8. Melting curve analizi için optimize edilmiş reaksiyon koşulları

Basamaklar	Termal şartlar	Döngü sayısı
Pre-inkübasyon	95°C'de 2 dk	1 döngü
Amplifikasyon	95 °C'de 10 sn	60 döngü
	56 °C'de 30 sn	
	72 °C'de 1 dk	
Melting curve	95 °C'de 5 sn	1 döngü
	60 °C'de 1 dk	
	95 °C'de ∞	
Soğutma	40 °C'de 30 sn	1 döngü
	4 °C'de ∞	

Her bir örnek, 3 farklı primer çifti ile amplifiye edilmiştir. Dizayn edilen bu primer çiftleri aşağıda belirtilmiştir. Ayrıca çalışmamızda nested PCR metoduna benzer bir yaklaşım geliştirilerek yakın primer çiftlerinin forward ve reverse dizileri de bir primer çiftiymiş gibi kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak *GAPDH* housekeeping geni kullanılırken, negatif kontrol olarak yalnızca DNA içermeyen PCR reaksiyon ortamı kullanılmıştır. Ayrıca kıyaslama yapmak için CRISPR/Cas9 uygulanmamış hücre hatlarından izole edilen DNA örnekleri de çalışmaya dahil edilmiştir.

Çizelge 2.9. Kullanılan primerlerin listesi

Bölge/İsim	Primer Dizileri
NRAS	Forward: 5'-ATGACTGAGTACAAACTGGTGGT-3'
	Reverse: 5'-CATGTATTGGTCTCTCATGGCAC-3'
NRAS1	Forward: 5'-AGCATTGCATTCCCTGTGGTTTT-3'
	Reverse: 5'-TCTGTAAGAATCCTGGGGGTGT-3'
NRAS2	Forward: 5'-CCAATACATGAGGACAGGCGAA-3'
	Reverse: 5'-TCTTCCCTAGTGTGGTAACC-3'
NRAS12 (nested)	Forward: 5'-AGCATTGCATTCCCTGTGGTTTT-3'
	Reverse: 5'-TCTTCCCTAGTGTGGTAACC-3'
GAPDH	Forward: 5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3'
	Reverse: 5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'



Şekil 2.6. Primerlerin NRAS Q61K mutasyonuna göre lokalizasyonunun şematik gösterimi.

```

GTGAGGCCGATATTAATCCGGTGTGTTTGGCGTTCTCTAGTCACCTTTAAGAACCAGTGAAGGTCACACT
AGGGTTTTTCATTTCCATTGATTATAGAAAGCTTTAAAGTACTGTAGATGTGGCTCGCCAATTAACCCCTGA
TTACTGGTTTCCACAGGTTCTTGCTGGTGTGAAATGACTGACTACAACTGGTGGTGGTGGAGCAGGT
GGTGTGGGAAAGCGCACTGACAAATCCAGCTAATCCAGAACCACCTTTGTAGATGAATATGATCCACCA
TAGAGGTGAGGCCAGTGGTAGCCCGCTGACCTGATCCTGTCTCTCACTTGTCCGGATCATCTTTACCCAT
ATTCTGTATTAAAGGAATAGAGGAGAGAAAGTAAAGGTTATTTGGGTATACATTGAGTTATGCAATA
AGCTTAACGTGTTTATAGAGAACAGTTCATTTTATTAGCTGCTGAAGTTTCTAAACCTGTCCAGTTTT
TAACAGTTCTGTAACTATTGCAAACTCAGTGTGAGTTTCATTCATGAGTTTCTTCATATATAACAGCTC
TATTACATGAGAAACACAGGCCATAGTAGCGAGACTGTCTGATTGTATGGGAGATAATAGGATGGAGATA
AAGGATTCAGAGATGAGTGTCTTCAATATTTATTTATTAGCTAGTTGAAGCAGCTGAGACCCAGATGATT
GGAGTAGCAAGAACTTGAGATTTTATGCTTTATGCTAGGATTTTGGTCCCTGTTTGCAGTTTATTTAG
TTGTGTGATATTGAGCAACTGAATCTCTCCCAACCTCATTTTCTCATGTTTAAATTACCATAACTTG
TCCTGCCTACCCACAGGGGATGTTTATGGAAGTTAAATAATATATTTAAGTTATTTATGAATGGTAAAGC
ACTATGTAATAGTACTTAGGGATTCTATTGTTATTATGAGAGTTTCATGGTACAGATTGTCTTCAGTAAGT
GGCACCTAAGGCTCTTTAAATAAAGGGTTTTGGCCGACACGGTGGCTCACGCCCTGTAATCCAGCACTTT
GGGAGGCTGAGGCAGGCCGATCACAGGTCAGGAGTTCAAGACCCAGCCTGATCAACATGGTGAACCCCG
TCTCTACTAAAAATACAAAATTAGCTGGGTGTGGTGGCAGGCACCTGTAATCCAGCTACTCAGGAGGC
TGAGGCAGGAGAAATCGCTTGAACCCAGAGGCAGAGGGTGCAGTGAGCCGAGATCACACCACAGACCTCCAG
CCTGGGCACAGAGCGAGACTTCGTCTCAAAAAATAAATAAATAGATAAATAAATAAAGGGTTTTGTAAT
TTTGTTCAGTTTGAATAATGCTAACTTTAGAGATTATTTTAAATCAACACCTGGCCTCCCTACCATCTGGC
TACTCGTGTTAATTGATGAAACTAACTCTAATGTAGCCACTATAAAAAATTGGTTGCTAACCCCTTGGC
AAAAATCTTTTATTTAGCTTAACAGCTTTAATATTTTACATGAAATGTTAATATTTTAAATTAATATTT
TAAATGTTTGAATTTATTGAGCAATTACATAAGTAAATAACATAAATTTTATGCTACAGCCAGTGCT
TTTTGCGTTTCTATATAGTCATGTAGCTACCAACCCAGATAACAGTATAGAGCACTTCCAGTACTCCAGAG
AGTTCTCCAGTGTGATGACATTAATAACAGTAAAGTCCCTGTTGCCATAAAACCAAAATGAAGATAT
TTTTATATGATCTATGCAATGTTTGTCTTCTGAGAAATTAACATAACTATACTTGTGGAACCTTT
AAGAAATTTGATTACAGGAATATTTCCCAAAGGTACATCTGTGATGATAAAAAAACCTTCTCTGAAACA
AAGGATTTGTATATTTAGTCATAAACACAAATGATGTATATAGGGCCAGGTTATAATTGGTGGAGGTAT
GTTTAGATTCTTTAAGTAAATAAACAGCACAAATAAACAGTCCAGTTTCATAGCTTAGTGAAATACAC
TGGGTACTTAATCTGTAGCCTCCTGGCTGCAGTAGAGTTGTCAATTTGAGTTACTGTGTTTCTTAATCTT
TTCCAGGAACACAGTGACCATATTTCTTTCTGCAAGGCATATAGAATTTGGTGGGTTTTCTTTTATGTAG
GGTGATATTGGATACTTTTTGTTTGTGATTATATATTAGCAATTTGAGGGACAAACAGATAGGCAGAAA
TGGGCTTGAATGATTAGATGCTTATTTAACCTTGGCAATAGCATTTGCCATTCCCTGTGGTTTTTAATAAAA
ATTGAACCTTCCCTCCCTGCCCTTACCCTCCACACCCCGAGGATTTTACAGAAACAAAGTGGTT
ATAGATGGTGAAACCTGTTTGTGACATACTGGATACAGCTGGAAAGAAAGAGTACAAGTCCATGAGAG
AAGAAATTTAGGACAGGCGAGGCTTCCCTCTGTGTTTGTGATTTTGCATCAATAATAGCAAGTCATTTGCGGA
TATTAACCTCTACAGGTACTAGGAGCATTATTTCTCTGAAAGGATGATCTTTGTGTTCTGAATCTTTAT
GGGGAATGAAGGTTACCACTAGGGAAGTAGAGCTTTTAAATTATGGGAAGAGTTGGTTTTAGGTTGT
TTGACATTGAGAATCTAGGTAATTACTGAAAGTTAACTGGAATTTATTTTACATAATATACTGTTAC

```

Şekil 2.7. Primerlerin NRAS Q61K mutasyonuna göre lokalizasyonunun sekans üzerinde gösterimi. Kırmızı primer çifti nras, sarı primer çifti nras1, yeşil primer çifti nras2 primerlerini göstermektedir. Koyu yeşil bölge kırmızı nras ve yeşil nras2 primerlerinin çakıştığı bölgedir. Kırmızı nükleotit mutasyonlu bölgeyi göstermektedir.

Reaksiyon ortamındaki ürün miktar dağılımı ise aşağıda gösterildiği gibi optimize edilmiştir:

5 µl SYBRGreen GoTaq Master Mix

0,2 µl Forward+Reverse primer karışımı (50 pmol olacak şekilde seyreltilmiştir.)

2,8 µl Nukleaz içermeyen su

2 µl DNA (10 ng olacak şekilde seyreltilmiştir.)

10 µl toplam hacim

2.10.4. Panel ve SYBR Green Kullanılarak Real-time PCR Analizi

Çizelge 2.6.'da belirtilen tüm bölgeler için reaksiyon ortamına her bir stripteki kit ürünleri dikkate alınarak reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Bu karışımın üzerine her bir strip için 6 µl SYBR Green GoTaq Master Mix eklenmiştir. Çizelge 2.8'de Melting curve analizi için optimize edilmiş reaksiyon koşulları dikkate alınarak Real-time PCR kurulmuştur.

Çalışmamızda CRISPR metodunun *NRAS* geni üzerinde herhangi başka bir indel ya da kırık oluşturup oluşturmadığını test etmek amacıyla, her bir bölge için yeniden real-time PCR kurulmuştur. Bu basamakta yüksek ayrışan melting curve analizi (HRM; High Resolution Melting Curve) yapabilmek ve yüksek doğrulukta güvenilir sonuçların elde edilmesi amaçlandığından, Çizelge 2.8.'de optimize edilen reaksiyon koşulları dikkate alınmıştır.

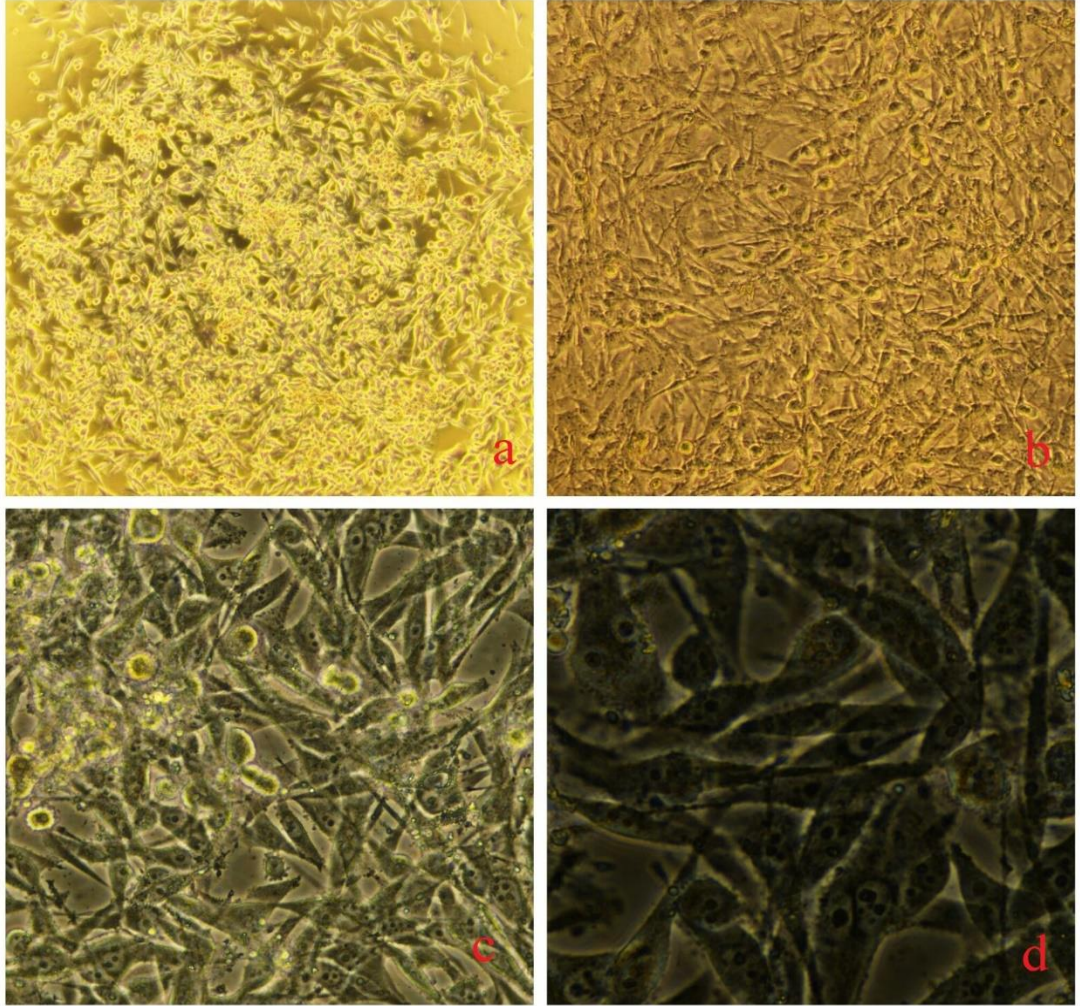
Çizelge 2.10. Panel ve SYBR Green kullanılarak yapılan real-time PCR için ürün miktarları.

Amplifikasyon	1 reaksiyon için (µl)
Taq Premix 920	6 µl
Distile su	2 µl
NRAS G12x-G13x mix ya da NRAS A59x-Q61H mix ya da NRAS Q61K mix ya da NRAS Q61R mix ya da NRAS Q61L mix ya da NRAS K117x mix ya da NRAS A146x mix ya da NRAS A146x mix	1 µl
SYBR Green GoTaq Master Mix	6 µl
Toplam hacim	15 µl

3. BULGULAR

3.1. Hücre Kültürü

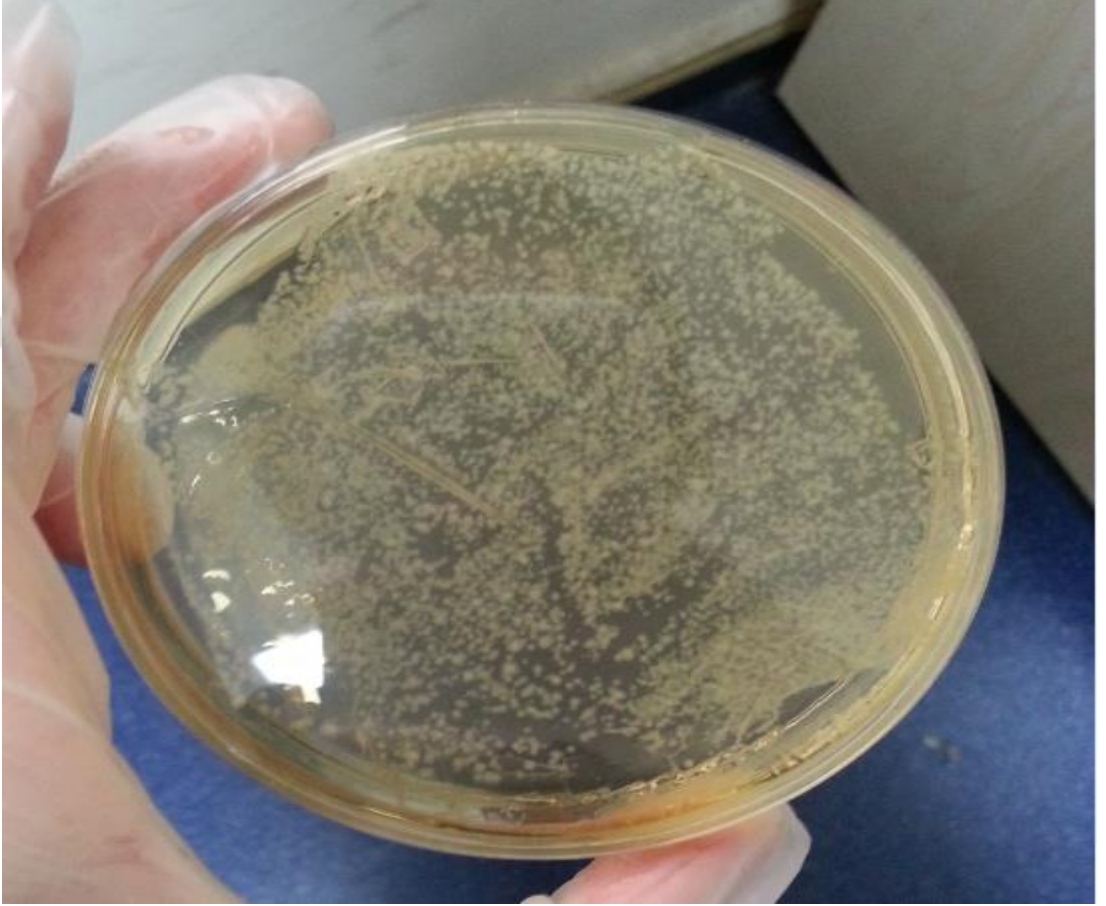
SK-MEL-30 hücre hattı DSMZ 'de tanımlandığı gibi kültüre edilmiştir ve hücrelerin mitotik indeksleri dikkate alınarak optimizasyonları gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda kullanılan SK-MEL-30 cilt kanseri hücreleri %10 FBS, %1 L-glutamin, %1 Penisilin/Streptomisin, DMEM içeren kültür vasatında, 37°C'de %5 CO₂'li etüvde kültüre edilmiştir.



Şekil 3.1. SK-MEL-30 hücre hattı invert mikroskop görüntüleri. a) 4X objektifle SK-MEL-30 hücreleri b) 10X objektifle SK-MEL-30 hücreleri c) 20 X objektifle SK-MEL-30 hücreleri d) 40X objektifle SK-MEL-30 hücreleri.

3.2. Klonlama

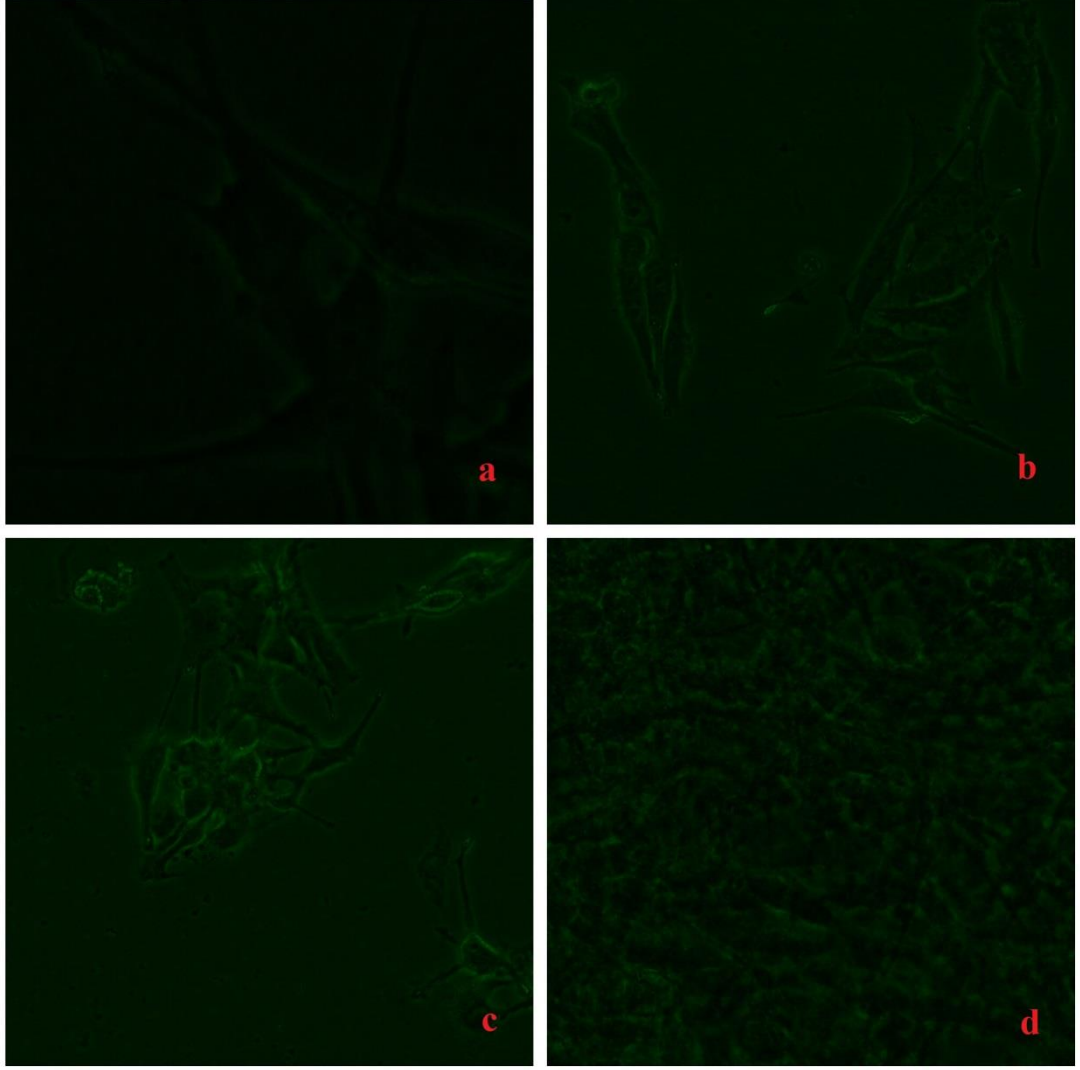
Addgene'den temin edilen plazmidler uygun kompetent bakteri hücrelerine (StbI3 ve DH5alpha) ısı-şok transformasyon metodu kullanılarak aktarıldıktan sonra, bakteriler LB agar plate üzerine ekilerek, 37 °C'lik etüvde 1 gece inkübe edilmiştir.



Şekil 3.2. Klonlanan transforme bakteri hücrelerinin 1 gece bekletildikten sonraki görüntüsü.

3.3. GFP+ Hücrelerin Floresan Mikroskopta Gözlemlenmesi

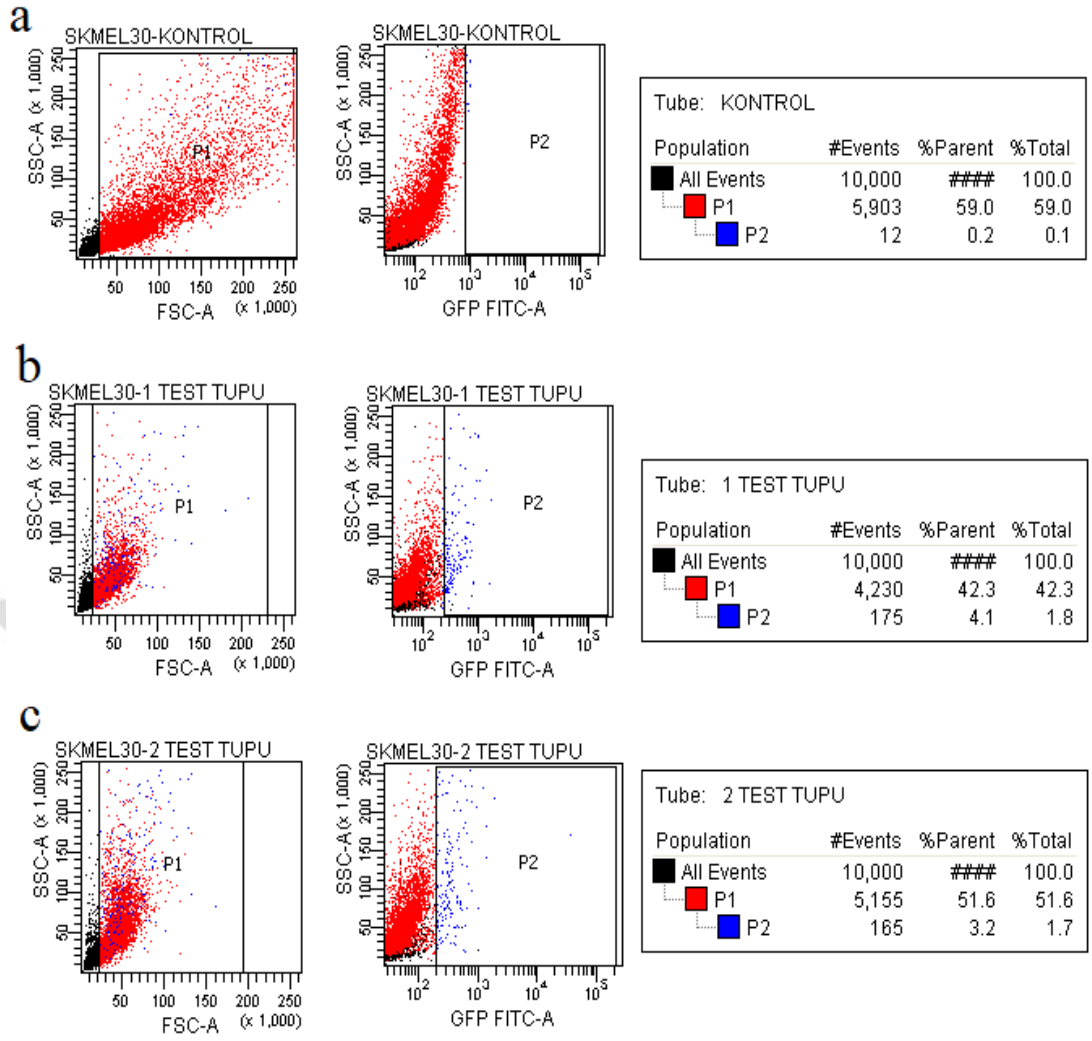
Plazmid vektörler GFP floresan geni taşıdığı için, SK-MEL-30 hücrelerine elektroporasyon ile aktarıldıktan sonra, bu plazmid üzerindeki genler eksprese olmuştur. Dolayısıyla floresan mikroskopta 475-525 nm dalga boyunda elektroporasyon işleminin başarılı olduğu sağlıklı hücreler GFP+ sinyal vermişlerdir.



Şekil 3.3. GFP+ hücrelerin floresan mikroskoptaki görüntüsü. a) Kontrol grubu CRISPR uygulanmamış SK-MEL-30 hücreleri. b) SK-MEL-30 hücrelerinin elektroporasyondan sonra kültür ortamına alındıktan 3 gün sonraki görüntüsü. c) SK-MEL-30 hücrelerinin elektroporasyondan sonra kültür ortamına alındıktan 5 gün sonraki görüntüsü. d) SK-MEL-30 hücrelerinin elektroporasyondan sonra kültür ortamına alındıktan 16 gün sonraki görüntüsü.

3.4. Akış Sitometri ile GFP+ Hücrelerin Eldesi

FACS cihazı (FACS Aria III – BD Pharmingen, ABD) ile FITC kanalından okunarak GFP+ hücreler, GFP+ sinyal vermeyen hücrelerden ayıklanmıştır. Test tüplerinin birincisinde % 4,1 oranında, ikincisinde ise % 3,2 oranında GFP+ sinyal veren hücre tespit edilmiştir.



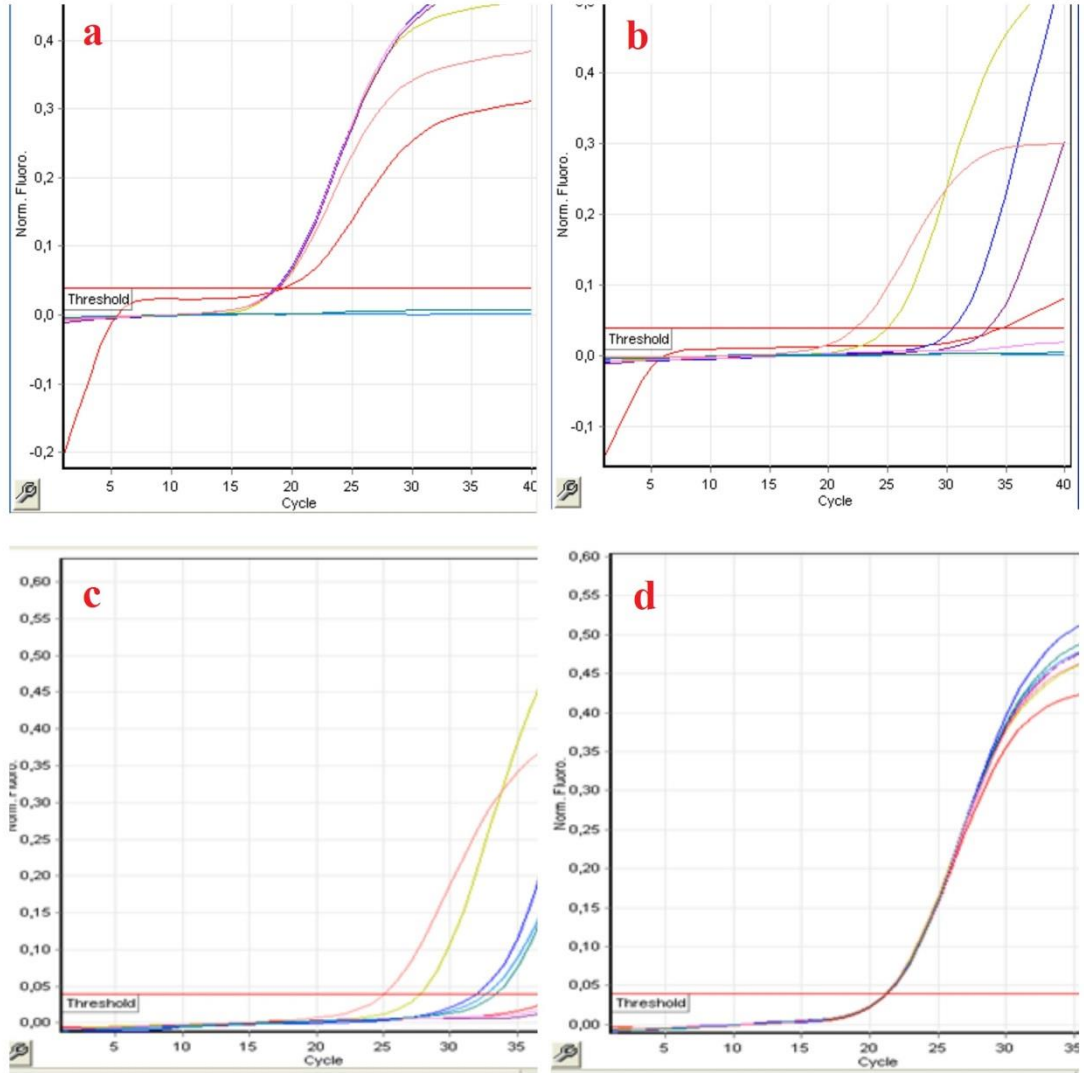
Şekil 3.4. Akış sitometri ile hücrelerin granülite ve FITC kanalı okuma sonucu grafiksel gösterimi. a) Kontrol grubu plazmid transfekte edilmemiş hücreler. b) Plazmid aktarılmış GFP+ ışına veren 1.grup hücreler c) Plazmid aktarılmış GFP+ ışına veren 2.grup hücreler.

3.5. Real-time PCR

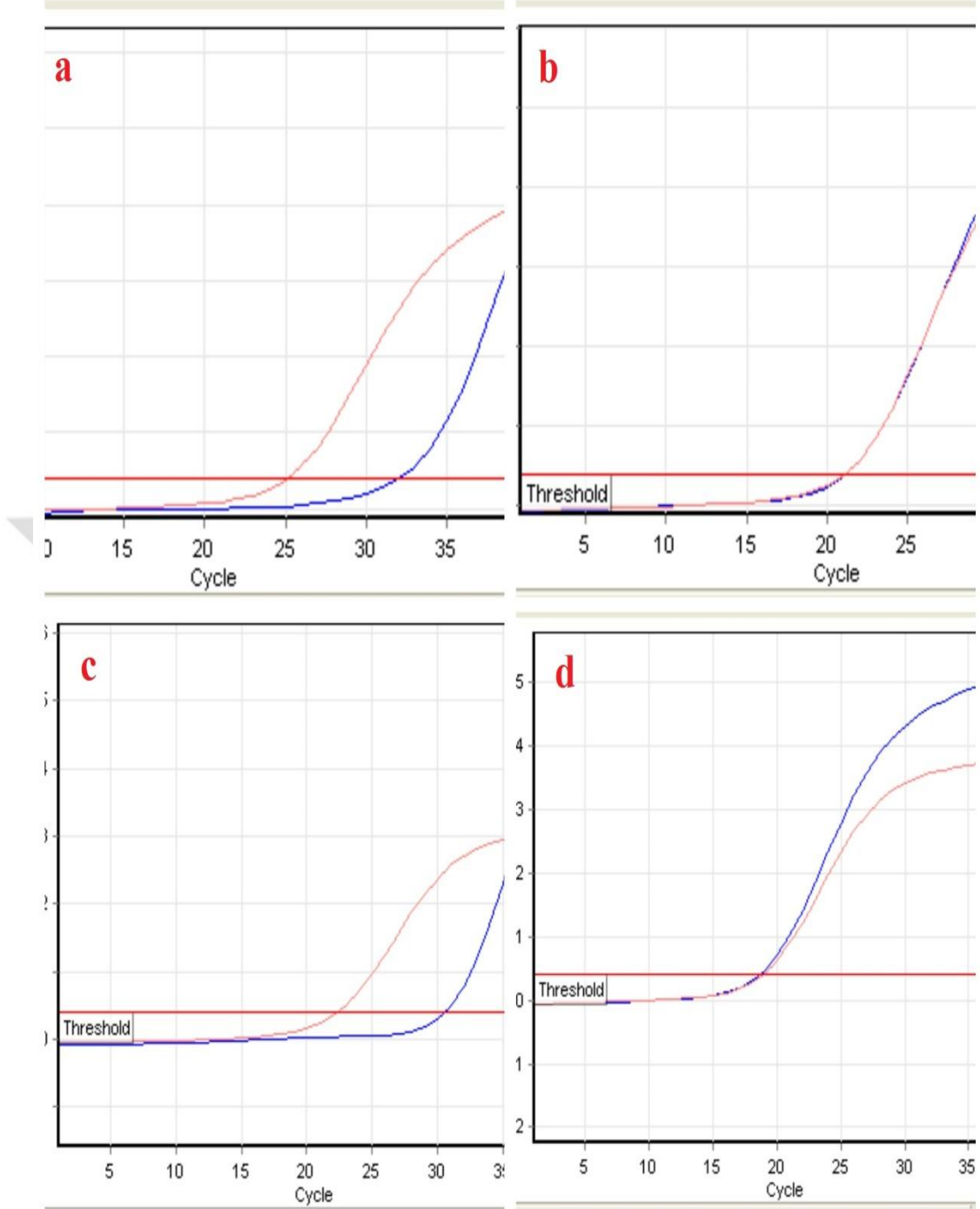
GFP+ hücreler flow sitometri ile ayrıldıktan sonra tekrar kültüre edilmiştir. Hücreler yüzey alanını %90 ya da %95 oranında doldurduktan sonra tyrpsin-EDTA ile kaldırılmış ve DNA izolasyonu yapılmıştır. Ardından NRAS Easy panel kit ve dizayn edilen primerler kullanılarak real-time PCR yapılmıştır.

3.5.1. Real-Time PCR Tekniği ile Mutasyonun Saptanması

Easy NRAS kit kullanılarak Rotor-gene Q cihazında gerçekleştirilen reaksiyon sonucu şekil 3.5 'de belirtilen sonuçlar elde edilmiştir. Tüm değerlendirmeler Rotor-Gene Q Series Software 2.0.2 programı kullanılarak yapılmıştır. Threshold değerı 0,04 olarak alınmıştır.



şekil 3.5. Panelde yer alan tüm mutasyon bölgeleri için ikili real-time PCR sonucu. a) HEX prob kontrol grubu kantitatif real-time PCR sonucu. b) FAM prob kontrol grubu kantitatif real-time PCR sonucu. c) FAM prob CRISPR uygulanmış kantitatif real-time PCR sonucu. d) HEX prob CRISPR uygulanmış kantitatif real-time PCR sonucu.



Şekil 3.6. İnternal kontrol grubu ve bölge 3 (NRAS-Q61K) real-time PCR sonuçlarının kıyaslanması. a) FAM prob CRISPR uygulanmış kantitatif real-time PCR sonucu. b) HEX prob CRISPR uygulanmış kantitatif real-time PCR sonucu. c) FAM prob kontrol grubu kantitatif real-time PCR sonucu. d) HEX prob kontrol grubu kantitatif real-time PCR sonucu.

Çizelge 3.1. Panelde yer alan tüm mutasyon bölgeleri için Ct değerleri.

	FAM		HEX	
Prob/Bölge	CRISPR	Kontrol	CRISPR	Kontrol
1	33,55	32,75	21,36	19,45
2	27,80	25,04	21,16	18,88
3	32,02	30,62	21,22	18,65
4	34,25	33,62	21,22	18,81
5	28,32	26,18	21,27	18,69
6	32,72	30,14	21,22	18,52
7	33,45	31,25	21,30	18,63
8	25,11	22,34	21,18	18,89

Panelde yer alan tüm mutasyon bölgeleri için CRISPR uygulanmış ve uygulanmamış kontrol grubu arasındaki Ct değeri farklılıkları hesaplandığında, 3 numaralı Q61K mutasyonu içeren bölgede bazı değişikliklerin gerçekleştiği anlaşılmıştır.

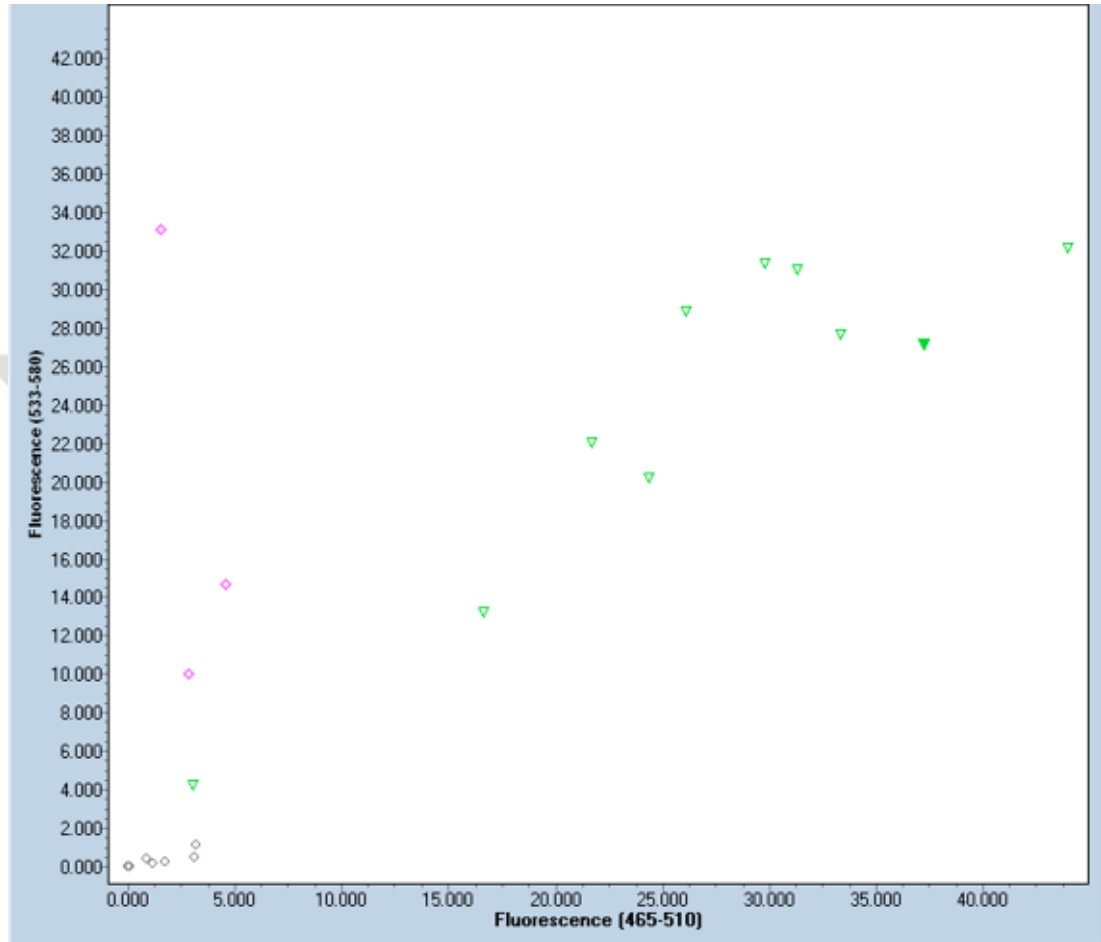
Çizelge 3.2. Tüm mutasyon bölgeleri için Δ Ct değerleri.

	FAM				HEX		
Prob/Bölge	CRISPR	Kontrol	Δ Ct	Prob/Bölge	CRISPR	Kontrol	Δ Ct
1	33,55	32,75	0,8	1	21,36	19,45	1,91
2	27,8	25,04	2,76	2	21,16	18,88	2,28
3	32,02	30,62	1,4	3	21,22	18,65	2,57
4	34,25	33,62	0,63	4	21,22	18,81	2,41
5	28,32	26,18	2,14	5	21,27	18,69	2,58
6	32,72	30,14	2,58	6	21,22	18,52	2,7
7	33,45	31,25	2,2	7	21,3	18,63	2,67
8	25,11	22,34	2,77	8	21,18	18,89	2,29

Değişikliklerin normal allelde mi yoksa mutant allelde mi gerçekleştiğini anlamak için panelde yer alan tüm bölgeler için end-point mutasyon analizi yapılmıştır.

3.5.2. End-point Mutasyon Analizi

Easy NRAS kit (Diatech Pharmacogenetics, İtalya) kullanılarak, ikili FAM ve HEX floresan problemleri ile paneldeki tüm bölgelerin taranması LightCycler® 480 Instrument (Roche, İsviçre) cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

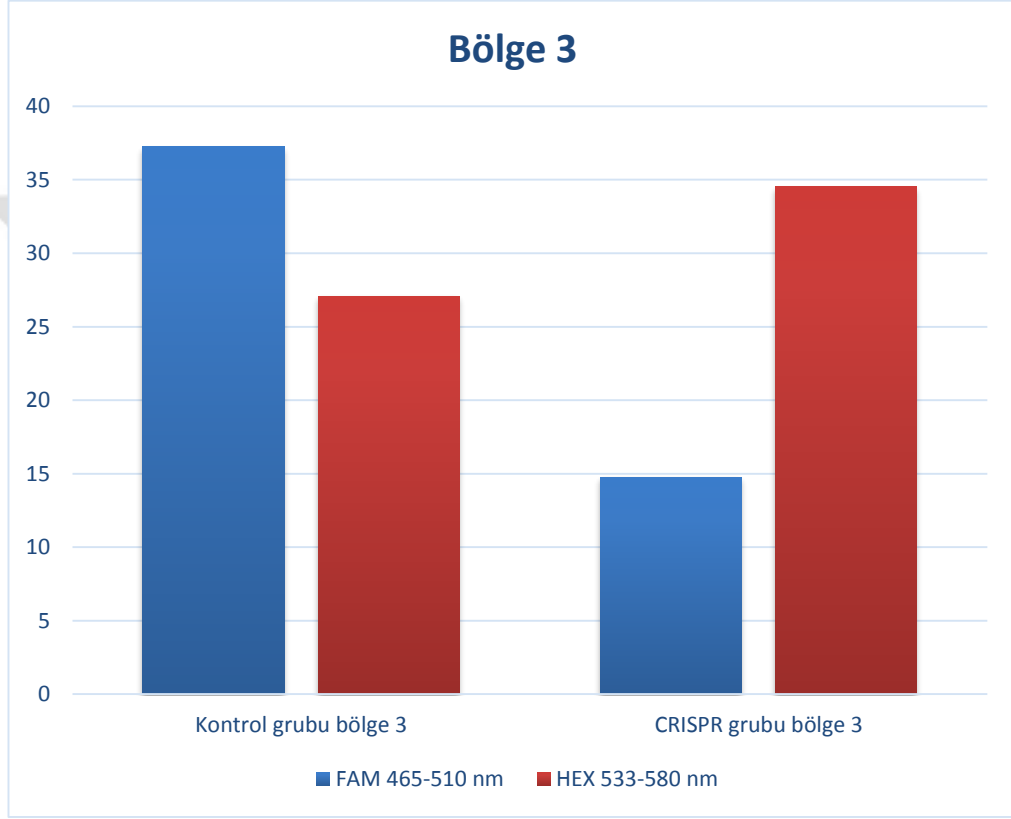


Şekil 3.7. End-point mutasyon analizi sonucu dağılım grafiği. Panel içinde yer alan tüm bölgeler için analiz yapılmıştır. Tüm bölgeler için kontrol grupları ve CRISPR uygulanmış gruplar karşılaştırılmıştır. Yatay eksen 465-510 nm dalga boyunda ışığa veren FAM floresan ışımalarını gösterirken, dikey eksen 533-580 nm dalga boyunda ışığa veren HEX floresan ışımalarını göstermektedir.

CRISPR için hedef alınan Q61K bölgesi için panelde 3 numaralı bölge dikkate alınarak aşağıdaki çizelge oluşturulmuştur. Kontrol grubu Q61K mutasyonunu içerdiğinden, mutant allel frekansını gösteren FAM ışımada HEX'e göre daha yüksek bir skor elde edilmiştir. CRISPR içeren grupta ise tam tersi olacak şekilde, normal allel frekansını gösteren HEX ışımada, FAM'a göre daha yüksek bir skor elde edilmiştir.

Çizelge 3.3. FAM ve HEX floresan boyalarının bölge 3 için verdiği skorlar.

	FAM 465-510 nm	HEX 533-580 nm
Kontrol grubu bölge 3	37,23	27,09
CRISPR grubu bölge 3	14,77	34,51

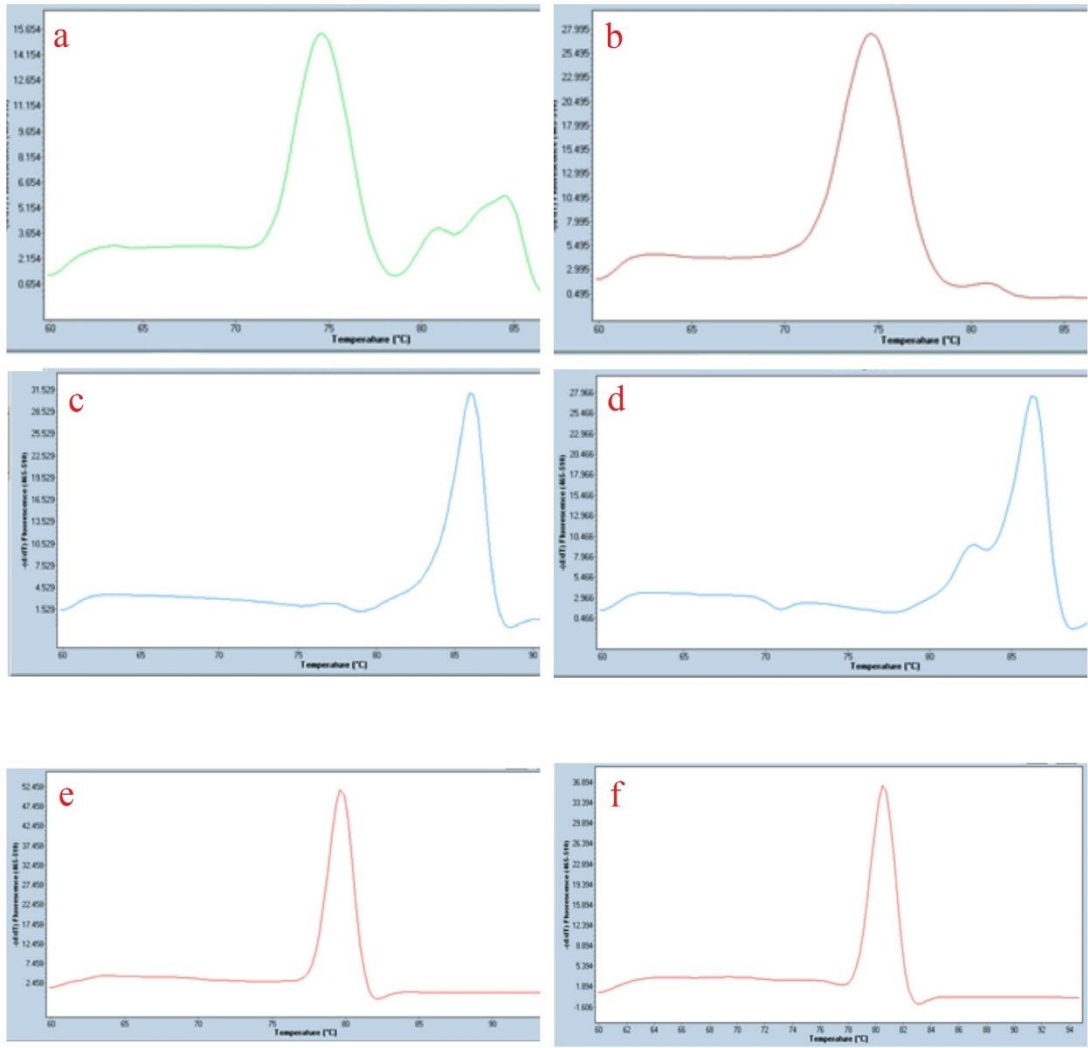


Şekil 3.8. Bölge 3 için yapılan end-point analizi grafiksel gösterimi. CRISPR uygulanmış grupta normal allel floresan skorunun arttığı, mutant allel frekansının da azaldığı bu gösterimde açıkça görülmektedir.

3.5.3. Melting Curve Analizi

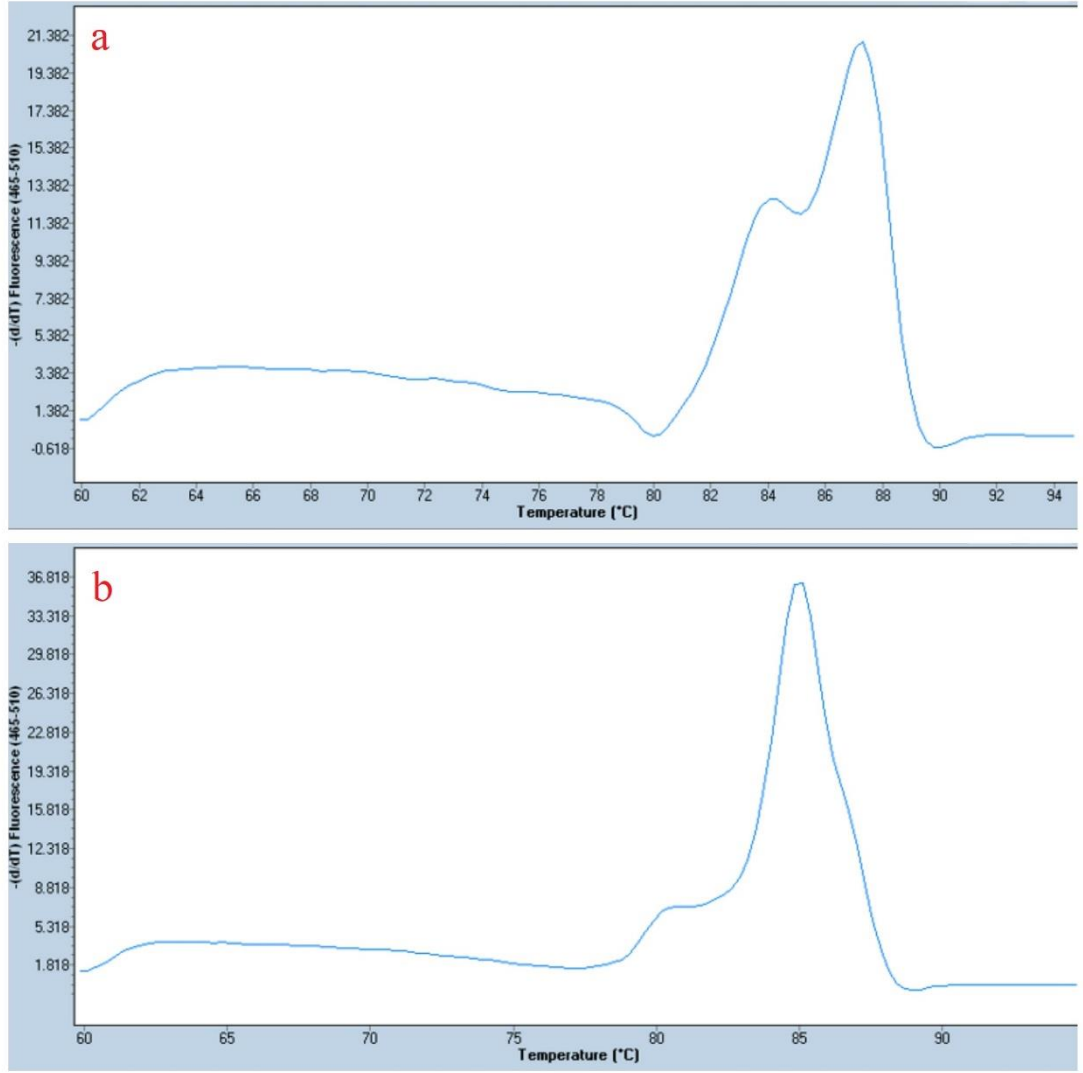
Dizayn edilen primer çiftleri kullanılarak LightCycler® 480 Instrument (Roche, İsviçre) cihazı ile real-time PCR reaksiyonu kurulmuştur. Daha sonra reaksiyon koşullarına melting curve basamakları da kurulduğu için, melting curve analizleri yapılmıştır.

Bölgeler ayrı ayrı incelendiğinde, nras ve nras1 bölgelerinde CRISPR uygulanmış ve uygulanmamış grup arasında önemli farklılıkların olduğu tespit edilmiştir. Fakat nras2 bölgesinde CRISPR uygulanmış ve uygulanmamış grup arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. CRISPR uygulanmış gruplarda, özellikle de hedef mutasyonu kapsayan nras bölgesinde, heterozigot piklerin birinde dalgalanmanın azaldığı ve mutasyonun düzeltilerek daha kararlı bir melting curve eğrisinin elde edildiği açıkça görülmüştür. Tüm reaksiyonlar en az üç kez kurulmuş ve üçünde de yakın sonuçlar elde edilmiştir.



Şekil 3.9. Melting curve analizi sonucu elde edilen pikler. a) NRAS bölgesi kontrol grubu melting curve analizi. b) NRAS bölgesi CRISPR uygulanmış grubun melting curve analizi. c) NRAS1 bölgesi kontrol grubu melting curve analizi. d) NRAS1 bölgesi CRISPR uygulanmış grubun melting curve analizi. e) NRAS2 bölgesi kontrol grubu melting curve analizi. f) NRAS2 bölgesi CRISPR uygulanmış grubun melting curve analizi.

Q61K mutasyonu için yakın bölgelerden real-time PCR yapmak amacıyla kullanılan NRAS12 primerleri ile analiz yapıldığında, kontrol grubu ve CRISPR uygulanmış grup arasında farklılıkların olduğu gözlemlenmiştir.

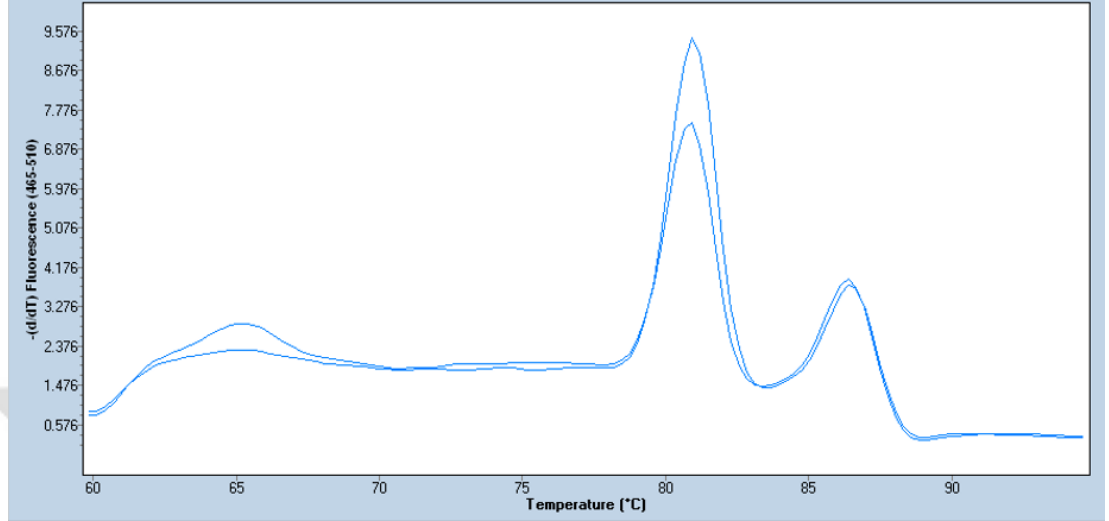


Şekil 3.10. NRAS12 primerleri kullanılarak gerçekleştirilen real-time PCR melting curve analizi sonucu. a) Kontrol grubu melting curve eğrisi. b) CRISPR uygulanmış grupta melting curve eğrisi.

3.5.4. Panel ve SYBR Green Kullanılarak Gerçekleştirilen Real-time PCR Sonucu Melting Curve Analizleri

Panel içerisindeki tüm bölgelere özgü problemler ve Real-time PCR ile gerçekleştirilen analizlerde melting curve analizleri yapılmıştır. Erime eğrileri açısından mutant allel ve normal allel iki farklı pik profili sergilemiştir. Ayrıca erime eğrilerinin yaklaşık olarak çakışır vaziyette konumlanması problemlerin etkinliğini kanıtlar niteliktedir.

Hedeflediğimiz NRAS Q61K bölgesi için dizayn edilen 3 numaralı prob için Şekil 3.10’da gösterildiği gibi kontrol grubu ve CRISPR uygulanmış grup arasında farklılıklar tespit edilmiştir.



Şekil 3.11. Q61K mutasyonu için kullanılan 3 numaralı prob için melting curve eğrisi. Yaklaşık olarak 81 °C’de pik veren birinci kısım mutant alleli ifade ederken, ikinci kısım normal alleli ifade etmektedir. Alt kısımdaki pik CRISPR uygulanmış grubu, üst kısımdaki pik ise kontrol grubunu göstermektedir.

Şekil 3.10’da gösterilen kontrol grubu ve CRISPR uygulanmış grup arasındaki erime eğrilerinin farklılığı analiz edildiğinde, CRISPR uygulanmış grubun mutant pik eğrisinde bir azalış, normal pik eğrisinde de bir artış tespit edilmiştir. Bu durum bazı hücrelerde CRISPR/Cas9 metodunun istenen amaca ulaştığını vurgulamaktadır. Ayrıca bu durum bazı hücrelerde HDR ile tamirin başarılı bir şekilde gerçekleştiğine de işaret etmektedir.

CRISPR/Cas9 metodunun Q61K mutasyon bölgesi için, kanser hücre hattında yaklaşık olarak ne kadar düzeltme yaptığını belirlemek amacıyla floresan yoğunluklarının maksimum olduğu değerler alınarak, Şekil 3.10’da görülen pikler arasındaki farklılıklar değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.4. Pikler arasındaki floresan yoğunlukları.

	Kontrol Grubu	CRISPR Grubu
Pik1 Mutant allel	9,351	7,551
Pik2 Normal allel	3,726	4,176

4. TARTIŞMA

Prokaryotik Tip II CRISPR-Cas9 tekniğı genetik mühendisliğı alanında hızla bir devrim yaratmaktadır. Bu teknoloji çok çeşitli organizmaların genomlarını göreceli olarak kolaylıkla değıştirebilmeyi sağlar. Bu çok yönlü teknolojiyi temel alan deneysel yaklaşımlar kanser genetiğı alanını değıştirme potansiyeline sahiptir (Sánchez-Rivera ve Jacks 2015).

Kanser, onkogenlerde ve tümör baskılayan genlerde çok sayıda genetik ve epigenetik değışikliğe sahip bir hastalıktır (Hanahan ve Weinberg 2000). Bu nedenle, normal hücre ve kanser hücrelerinin genomlarını manipüle etmek için deneysel yaklaşımlar, hastalığın modellenmesinde ve süreçte yer alan birçok genin sistematik olarak incelenmesi için hayati öneme sahiptir. Yıllardır süren araştırmalar ve genom mühendisliğı teknolojilerinin geliştirilmesi; kanserin başlangıcı, progresyonu, ilerlemesi ve terapötik tepkilerinde rol oynayan genlerin rolünü keşfetmek için kültürdeki veya hayvan modellerinin hücrelerindeki genlerin spesifik DNA dizilerinin kesin olarak silinmesini veya değıştirilmesini sağlamıştır.

Mario Capecchi, Oliver Smithies ve arkadaşları tarafından homolog rekombinasyon yoluyla embriyonik kök hücrelerdeki gen hedefleme konusundaki öncü çalışmalar, tümör süpresör genlerinde ve onkogenlerde kesin mutasyonlar barındıran sayısız genetik olarak tasarlanmış fare modelleri üretme olanağı sağlamıştır. Bunun yanı sıra, kanser biyolojisiyle ilişkili genlerde fonksiyon kaybı veya fonksiyon değışikliği kazandırılmış hücre hatları da oluşturulmuştur. Ayrıca buna ek olarak CRISPR/Cas9 teknolojisi kullanılarak birçok kanserle ilişkili gende, koşullara bağılı olan allelleri üretmek için Cre ve filipaz gibi bölge-spesifik rekombinazlarla kombinasyon halinde başarıyla kullanılmıştır (Frese ve Tuveson 2007, Sánchez-Rivera ve Jacks 2015).

Geçtiğimiz yirmi yılda kanser genetiğinin temel dayanağı olmasına rağmen, bu gen modifikasyon yaklaşımları, homolog rekombinasyon ile gen hedeflenmesinin nispeten düşük etkinliğı ve embriyonik kök hücre manipölasyonundaki zorluklardan dolayı sınırlandırılmıştır. Gen hedeflemenin verimliliğini artırmak için kullanılan bir strateji DNA çift zincir kırılmalarını ilgili genomik bölgeye odaklamaktır (Rudin ve ark 1989, Plessis ve ark 1992, Rouet ve ark 1994, Choulika ve ark 1995, Bibikova ve ark 2002, Sánchez-Rivera ve Jacks 2015). Sunulan bu çalışmada, tıpkı diğ

CRISPR/Cas9 çalışmalarında olduğu gibi, çift zincir kırıkları hedef mutasyona pozisyon olarak yakın olacak şekilde yönlendirilmiştir. Bu ift zincir kırıkları, özellikle insersiyon veya delesyon (indel) yol açan, hataya meyilli homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) tarafından hücreSEL DNA onarım yolları ile onarılır. Eksojen donör DNA şablonlarının varlığında, hassas DNA değişikliklerine aracılık edebilen homoloji-yönelimli tamir (HDR) yolu ile onarılır. Bu alışmada HDR ile tamir mekanizması kullanılarak, NRAS geninde Q61K mutasyonunun düzeltilmesi hedeflenmiştir.

Hedefleme için doğru pozisyon ve hedef dış etkilerin azaltılması adına, benchling, genome-engineering, chop-chop gibi birçok gRNA dizayn veritabanı kullanılarak bu çalışmada hedef dış etkiler en aza indirgenmiş ve hedef mutasyona odaklanılmıştır. İlgili veritabanlarında mutasyona özgü bölgelerde, PAM sekanslar (-NGG) referans alınarak, gRNA çiftleri dizayn edilmiştir. Çiftler halinde dizayn edilen gRNA'lar hem çift zincirli plazmidlere kolaylıkla klonlanabilmiş, hem de hedef sekansa bağlanma açısından komplemeriteyi artırmıştır.

CRISPR/Cas9 tekniğinde başarılı olabilmek için kuşkusuz dizayn aşamalarının çok dikkatlice yapılması gerekmektedir. CRISPR tekniği dizayn aşaması çok dikkatlice yapıldığı takdirde, başarıya ulaşmanın nispeten kolay olduğu bir tekniktir. Çünkü, dizayn yapılırken gRNA'ların genomda hedef bölge dışında başka bir bölgeye bağlanması durumunda, istenen sonuçlar elde edilemez. Dolayısıyla dizayn yaparken gRNA'ların istenen hedefin dışına bağlanması (off-target skoru), hedef bölgenin kesimi ve düzeltilmesi açısından önem arz etmektedir. Dizayn yapılırken bunun dışında plazmid seçimi de çok önemlidir. Seçilen plazmidin büyüklüğü, taşıma kapasitesi, antibiyotik direnç geni, restriksiyon enzim kesim bölgeleri dizayn yapılırken dikkat edilmesi gereken konulardır. Bu çalışmada, dizayn yapılırken öncelikle hedef mutasyon bölgesindeki PAM dizilerinin varlığı araştırılmıştır. Ardından yaklaşık 20 nükleotit uzunluğundaki gRNA'lar tam komplementer olacak şekilde dizayn edilerek yüksek etkinlikle bağlanma ilkesine bağlı kalınmıştır. Dizayn edilen gRNA'ların başına ve sonuna ilgili restriksiyon enzim kesim bölgelerinin eklenmesi ile plazmid içerisine gRNA'lar aktarıldıktan sonra, U6 promotor bölgesinden başlayarak transkripsiyon ve translayon aşamalarının gerçekleşmesini beklediğimizden gRNA'lara 5' bölgesinden G

nükleotit eklemesi yapılmıştır. 5' bölgeye bir G nükleotitin eklenmesi nispeten transkripsiyonu kolaylaştırmaktadır (Bauer ve ark 2015).

Bu çalışmada, NRAS, NRAS1 ve NRAS2 şekilde 3 farklı primer çifti dizayn edilmiş ve NRAS12 de nested tarzı bir yaklaşımla mutasyon içeren bölge kapsanmıştır. Şekil 3.8'de c ve d pikleri değerlendirildiğinde, NRAS1 bölgesi için kontrol grubunda kararlı tek bir pik bulunurken, CRISPR uygulanmış grupta bu eğrinin değiştiği ve kısmen heterozigot bir eğrinin oluştuğu gözlenmiştir. Bu durum bazı hücrelerde donör dizinin kesim yapılan bölgeye entegrasyonu ve HDR ile tamirden sonra bir takım indellerin gerçekleştiğini düşündürmektedir. Tam tersi şekilde, donör dizi hedef bölgeye entegre olmadıysa bu hücreler NHEJ ile tamir mekanizması yolunu tercih etmiş olabilir. Çünkü NHEJ ile tamir mekanizmasından sonra indellerin meydana gelme olasılığı yüksektir. DNA çift zincir kırıkları (DSB) tipik olarak homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) veya homoloji ile yönlendirilmiş tamir (HDR) mekanizması ile onarılır. Hataya meyilli NHEJ yolağında, Ku heterodimerler DSB kırık uçlara bağlanır ve ilişkili onarım proteinleri için moleküler bir iskele görevi görür. İndeller, komplementer iplikçiklerin son rezeksiyona uğradığı ve mikrohomojoloji nedeniyle düzensiz onarım yapılacağı zaman ortaya çıkar. Sonuç olarak çerçeve kayması (frameshift) mutasyonları ve gen knockout işlemi gerçekleşebilir. Alternatif olarak, Rad51 proteinleri HDR'ın başlangıç fazı boyunca DSB kırık uçlarını bağlayabilir ve eksojen donör dizi üzerinde homoloji kollarıyla genomik rekombinasyonu yönlendiren bazı yardımcı faktörler de HDR ile tamirde yardımcı olabilir (Hsu ve ark 2014).

Sunulan bu çalışmada, 130 nükleotit uzunluğundaki donör diziler kullanılarak, homoloji kolları uzun tutulmuş ve tamir mekanizması olarak HDR kullanılmıştır. Bu pik eğrilerinin farklılığı indellerden kaynaklanıyor olabilir (Nymark ve ark 2016). Çünkü baz-ekleme çıkarma gibi efektif genom düzenleme teknikleri melting curve eğrilerinde değişik bölgelerde farklı yükseltilerin görülmesine sebep olmaktadır.

Şekil 3.8'de e ve f pikleri değerlendirildiğinde, NRAS2 bölgesinde CRISPR uygulanmış ve uygulanmamış kontrol grubu arasında pik profilleri açısından bir fark olmadığı gözlenmiştir. Bu durum NRAS2 bölgesinin hedef mutasyon içermemesi veya bu bölgede herhangi bir indel oluşmadığı şeklinde yorumlanmıştır.

NRAS genindeki Q61K mutasyonundaki değişimi gözlemlemek amacıyla yakın bölgelerden NRAS12 primerleri kullanılarak real-time PCR analizi yapıldığında, Şekil 3.9'da kontrol grubu ve CRISPR uygulanmış grup arasında farklılıkların olduğu gözlemlenmiştir. Kontrol grubunda mutant pikin floresan yoğunluğu daha yüksekken, CRISPR uygulanmış grupta mutant pikin floresan yoğunluğunda bir azalış tespit edilmiştir. Bu durum bazı hücrelerde başarılı HDR gerçekleştiği şeklinde yorumlanmıştır.

Mutasyona spesifik kit ve SYBR green kullanılarak gerçekleştirilen real-time PCR analizine göre, NRAS geninde olası tüm mutasyon bölgeleri için CRISPR uygulanmış ve uygulanmamış grup karşılaştırılmıştır. Şekil 3.10'da görüldüğü gibi kontrol grubunda mutant allel floresan yoğunluğunun, CRISPR uygulanmış gruba göre daha yüksek olduğu fakat CRISPR uygulandıktan sonra mutant allel yoğunluğunun azaldığı gözlemlenmiştir. Bunun tam tersi şekilde CRISPR uygulandıktan sonra normal allel floresan yoğunluğunun arttığı gözlenmiştir. Mutant allel frekansındaki düşüşle kıyaslandığında normal allel frekansındaki artışın daha az olması, HDR etkinliğine göre donör dizinin hedef sekansa tam olarak entegre olamamasından kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca piklerin Şekil 3.9'da olduğu gibi birleşik bir eğri çizmeden birbirinden ayrı iki eğri çizmesi bazı hücrelerde transheterozigot yapıların olduğunun göstergesi olabilir. Fauser ve arkadaşları tarafından yapılan bir CRISPR çalışmasında da elde edilen transheterozigot piklerin bu çalışmadaki bazı pik profilleri ile benzer olduğu görülmüştür. Bu durum NRAS geninde 2 farklı mutasyona uğramış allelin olabileceğine işaret etmektedir. Bu bölgelerde heteroallel bir kombinasyon meydana gelmiş olabilir, çünkü SK-MEL-30 malign melanom hücre hattı heterojenik tümörden elde edildiğinden, içeriğinde birçok mutasyonu barındırmaktadır. Dolayısıyla bu tarz heterojenik durumlar, zaten beklediğimiz sonuçlar arasındadır.

Şekil 3.10'da görülen floresan yoğunluğu farklılıkları piklerin maksimum olduğu noktalar dikkate alınarak Çizelge 3.4 oluşturulmuştur. Bu çizelgede ve aşağıdaki grafikte de açıkça görüldüğü gibi CRISPR uygulandıktan sonra mutant allel frekansında %60,15 oranında bir düşüş, normal allel frekansında ise %44,69 oranında bir artış meydana gelmiştir (Şekil 4.2). Mutant allel frekansındaki düşüşün

normal allel frekansından yüksek oluşu, yukarıda da belirtildiği gibi donör dizinin hedef bölgeye bazı hücrelerde entegre olamamasından veya donör dizinin hücreSEL nükleazlara maruz kalabilmesinden dolayı olabileceği de düşünülmektedir.

CRISPR/Cas9 gibi genom düzenleme araçları genetik modifikasyonların indüklenmesi açısından, HDR nispeten düşük etkinlikle seyrederken ve NHEJ daha yüksek etkinlikle seyretmektedir. Bu yüzden NHEJ ile tamir mekanizması baskılanırsa, HDR etkinliliği ve verimliliği artırılabilir düşüncesi ile DNA ligaz IV 'ün baskılanması fikri doğmuştur. CRISPR/Cas9 aracılığıyla indüklenen mutajenez için NHEJ anahtar enzimi DNA ligaz IV 'ün baskılanması, memeli hücrelerinin genomunda tam olarak hedef mutasyonun etkilenmesi açısından etkili bir yoldur. Ligaz IV'ün aktivitesi gen susturma, küçük molekül inhibisyonu veya proteolitik bozunum ile engellenebilir, böylece hedef hücrelere en iyi şekilde ulaşılması için çeşitli yaklaşımların uygulanabileceği gösterilmiştir. DNA ligaz IV 'ün yanı sıra KU70 ve KU80 gibi diğer NHEJ tamir mekanizmasının başka anahtar moleküllerine yönelik mekanizmalar geliştirilerek de HDR 'ın etkinliği artırılabilir. KU70 ve ligaz IV'ün baskılanması HDR verimliliğini 4-5 kat artırmaktadır (Chu ve ark 2015). Dolayısıyla sunulan bu çalışmada da, eğer DNA ligaz IV, KU70 ve KU80 gibi moleküllerin varlığı baskılansaydı belki de HDR etkinliği daha fazla olacaktı.

HDR etkinliğinin artırılmasına yönelik bir başka yaklaşım ise, Cas9 ribonükleoprotein kompleksinin hücre döngüsü ile eş zamanlı senkronizasyonunun kurgulanmasıyla başarılabilmektedir. Hücrelerin eş zamanlı olarak S fazına girmesi amfidikolin gibi uyarılar yardımıyla gerçekleştirilebilir. Bu bağlamda hücre kültür ortamına amfidikolin eklenerek, Lin ve arkadaşları tarafından Cas9 ribonükleoprotein kompleksi hücreye donör DNA ile birlikte transfekte edilmiş ve hücrelerin S fazına girmeden transfeksiyonu yapılmıştır (Lin ve ark 2014). Buna ek olarak, Cas9 ribonükleoprotein aracılı düzenlemede, ribonükleoprotein kompleksinin hücre içinde 24 saatte degrade olabileceğinden dolayı RNP kompleksi ile birlikte donör dizinin aynı anda hücreye aktarılması gerektiği vurgulamaktadır (Kim ve ark 2014). Çünkü Cas9 ribonükleoprotein kompleksi ile birlikte donör dizinin varlığı daha hızlı bir genom düzenleme sağlayacak ve hücreSEL nükleazlardan nispeten korunmayı sağlayacaktır. Sunulan bu çalışmada, amfidikolin gibi uyarıların kullanılmamış olması nispeten başarı oranını düşürse de, Cas9 ribonükleoprotein

kompleksinin d6n6r dizi ile eş zamanlı olarak transfekte edilmesi başarı oranını yükseltmiştir.

Son dönemlerde CRISPR/Cas9 genom düzenleme çalışmalarında yaygın olarak kullanılan nocodazole, DNA tam replike edildiğinde ve nükleer membran parçalandığında M fazındaki hücreleri bloke eder. Azalan miktardaki Cas9 ribonükleoproteinlerde nocodazole uygulamasının yüksek HDR etkinliğine yol açtığı görülmüştür. Bu durumun Cas9 ribonükleoproteinlerinin henüz hücre mitoz aşamasında bölünmeden başarılı transfeksiyona olanak sağladığı için olduğu düşünülmektedir. Bir başka ihtimal de, nükleer zarf bozulduğunda Cas9 ribonükleoproteinlerinin DNA'ya daha kolay erişilebildiğinin düşünülmesidir (Lin ve ark 2014). Dolayısıyla CRISPR çalışmamızda, genom düzenleme başarı oranının nispeten düşük olması nükleer zarftan dolayı DNA'ya ulaşamama güçlüğü ve transfeksiyon yapıldığında hücrenin çoktan mitoz evresine girmiş ya da mitoz aşamasını çoktan geçmiş olmasından kaynaklanıyor olabilir.

HDR ve NHEJ gibi tamir mekanizmalarının hücre içerisinde devreye girmesi için başarılı bir transfeksiyon işleminin yapılması şarttır. Sunulan bu çalışmada, Cas9 enziminin yanı sıra eCas9 ve dCas9 gibi modifiye Cas9 enzimlerini içeren 3 farklı plazmid ile eş zamanlı olarak donör dizilerin transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir.. Transfeksiyon işlemi için elektroporasyon kullanılmıştır. Elektroporasyon ile DNA transfeksiyonu, belki de tüm hücre tiplerine uygulanabilen bir tekniktir. Elektroporasyon tekniğı ile yüksek frekanslı kararlı transformantlar üretmek ve yüksek verim almak mümkündür. Elektroporasyonun řu anda çeşitli doku tiplerine in vivo olarak plazmid DNA'yı aktarmada etkili olduğı gösterilmiştir. Elektroporasyon, hücre zarının (iyon kanalları hariç) elektrik akımını içeri geçirmeyen bir kondansat6r gibi davranmasını prensibini kullanır. Zarların yüksek voltajlı bir elektrik alana tabi tutulması, makro moleküllerin ve ATP gibi daha küçük moleküllerin hücrenin içine girmesine veya hücrenin dışına çıkmasına izin verecek kadar büyük geçici porların oluşmasına sebep olur (Potter ve Heller 2010). Başarılı bir gen transferi sağlamak için, düşük kapasitanslı (kısa vuruş süresi) yüksek voltaj veya yüksek kapasitanslı (uzun vuruş süresi) düşük voltaj kullanılabilir (Chu ve ark 1987). Başarılı bir in vitro elektroporasyon için kritik olan iki parametre, verilen elektrik şokunun maksimum voltajı ve akım vuruşunun süresidir (Potter ve Heller 2011). Gerilim ve kapasitans ayarları, her hücre tipi için optimize edilmelidir. Çalışmamızda, Bauer ve arkadaşları

tarafından yapılan bir CRISPR çalışması referans alınarak 250 Volt elektrik akımı, 1 vuruşta uygulanmıştır (Bauer ve ark 2015). Hücrelere zarar vermemek adına akım çok fazla yüksek tutulmamış ve vuruş süresi mümkün mertebe kısa tutulmuştur.

Ayrıca CRISPR ile transfeksiyon işleminden sonra, plazmidlerin ekspresyonuna izin verilmiştir. Ekspresyon ve ardından CRISPR sisteminin hücre içinde aktif olmasından ötürü hücrelerin şekil 3.1'dekinden farklı şekilde çoğaldığı ve morfolojisinde bazı değişikliklerin meydana geldiği gözlemlenmiştir. Kanser hücreleri kontrolsüz bölünme ve çoğalma sergileyen hücrelerdir. CRISPR ile bu mutasyon hücre içerisinde düzeltildikten sonra, hücrenin bölünmesi yavaşlatılarak kısmen kontrol altına alınmıştır. Hücrelerin boyutu da transfeksiyondan sonra gözle görülür şekilde artmıştır ve bu durumun hücrenin hacim/yüzey alanı dengesinin bozulmasından sonra bölünememesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Akış sitometri ile GFP+ hücreler, başarılı transfeksiyon gerçekleştiren hücreler arasında gösterilmiştir ve bu hücreler diğer başarısız hücrelerden ayıklanmıştır. Şekil 3.4 'te de görüldüğü gibi, 10.000 hücre okumada yaklaşık olarak %42.3 - %51.6 arasında canlı hücre tespit edilmiş ve bunların yaklaşık %4.1- %3.2 'si de GFP+ ışına veren başarılı hücreler olarak belirlenmiştir. Transfeksiyon başarısı ise %6,20 ile %9,69 'dur. Zaten elektroporasyon aşamasından sonra GFP+ hücreler floresan mikroskop üzerinde görüntülenmiştir ve akış sitometri ile elde edilen sonuçlar mikroskopta yapılan gözlemler ile uyumludur.

Yapılan real-time PCR sonuçları analiz edildiğinde, ilk önce Çizelge 3.1'de gösterildiği gibi CRISPR uygulanmış grubun kontrol grubuna göre daha büyük Ct değerine ulaştığı görülmüştür. Bu durum *NRAS* geninde bir takım değişikliklerin gerçekleştiği düşüncesine yol açmaktadır. *NRAS* Q61K mutasyonu Bölge 3 için değerlendirdiğimizde, Çizelge 3.2'de yer alan ΔCt sonuçlarına göre, normal diziyi gösteren HEX floresan probunda mutant FAM floresan probundaki değişikliklerden daha fazla bir farklılık meydana geldiği açıkça görülmektedir. Zira Bölge 3 için ΔCt değeri HEX prob için 2,57 iken, FAM prob için 1,4'tür. Bölge 3 ve internal kontrol bölge 8 kıyaslandığında ise, mutant FAM okumasında farklılıkların olduğu ve normal HEX okumasında ise çok bir fark olmadığı görülmüştür. Bu durum, bölge 3'te bazı bölgelerin HDR yoluyla tamir edildiğinin bir kanıtı olarak düşünülmektedir (Çizelge 4.1). Çünkü normal HEX okumada ΔCt değerleri her iki bölge için birbirine

çok yakın bulunmuştur. Bu durum CRISPR/Cas9 tekniği ile mutasyonlu bölgede bazı düzenlemeler yapıldığının açıkça göstergesidir.

Çizelge 4.1. İnternal kontrol bölge 8 ve hedef bölge 3'ün ΔCt değerleri.

	FAM				HEX		
Prob/Bölge	CRISPR	Kontrol	ΔCt	Prob/Bölge	CRISPR	Kontrol	ΔCt
3	32,02	30,62	1,4	3	21,22	18,65	2,57
8	25,11	22,34	2,77	8	21,18	18,89	2,29

Yukarıda bahsedildiği gibi CRISPR uygulanmış hücre grubunda hedef bölgede bir takım düzeltmelerin gerçekleştiği görülmektedir. Fakat bu düzeltmenin normal allelde mi yoksa mutant allelde mi olduğunu anlayabilmek için end-point analizi yapılmıştır. Şekil 3.7 değerlendirildiğinde, kontrol grubu yani CRISPR uygulanmamış grupta mutant allel frekansı daha yüksek bulunurken, CRISPR uygulanmış grupta normal allel frekansının daha yüksek olduğu bulunmuştur. Başlangıçta CRISPR uygulanmamış kontrol grubu olarak adlandırılan hücreler Q61K mutasyonunu içerdiğinden bu hücrelerde mutant allel frekansının yüksek çıkması zaten beklenen bir sonuçtur. CRISPR uygulanmış hücrelerde ise Q61K mutasyonunu düzeltmek amacına ulaştığımızı gösterircesine normal allel frekansı daha yüksek bulunmuştur (Şekil 4.1). Bu durum hedef bölgede başarılı bir HDR ile tamirin gerçekleştiğine işaret ederken, aynı zamanda da SK-MEL-30 hücre hattında Q61K mutasyonunun heterozigot bir mutasyon olduğuna da işaret etmektedir.

Şekil 2.6'da gösterilen bölgeler için dizayn edilen primerlerle kurulan real-time PCR sonuçlarına göre melting curve analizleri yapılmıştır. Her bir bölge için Çizelge 2.9'da gösterilen özel dizayn bölge-spesifik primerler kullanılmıştır. Şekil 3.8'de a ve b pikleri değerlendirildiğinde, NRAS bölgesinde kontrol grubunun heterozigot mutasyon taşıdığı ve CRISPR tekniği uygulandıktan sonra bu bölgede mutant pikteki dalgalanmanın kaybolduğu ve daha kararlı bir eğri sergilediği görülmüştür. NRAS bölgesindeki primerler, real-time PCR işlemi gerçekleştiğinde, Q61K mutasyonunu içeren bölgeyi kapsar nitelikte dizayn edilmiştir. Bu durum, NRAS Q61K mutasyonunun bu bölgede HDR ile tamirin bazı hücrelerde

gerçekleşmiş olduğunun kanıtıdır. Ayrıca normal piki gösteren kısımda, CRISPR tekniği uygulandıktan sonra floresan yoğunluğunda bir artış meydana gelmiştir. Bu da yine donör dizinin CRISPR ile yeniden yapılandırıldığının ve hedef mutasyonun düzeltildiğinin bir göstergesidir. Kontrol grubunda aslında ikiden fazla dalgalanmış pik görülmesinin sebebi hücre hattında zamanla biriken bölgedeki başka mutasyonlar olabilir. CRISPR uygulanmış grupta ise sonradan küçük piklerin görülmesi plazmid sisteminde bulunan eCas9 enziminin birçok bölgeyi kesmiş olmasından kaynaklanıyor olabilir. Çünkü eCas9, klasik Cas9 enzimine göre daha yüksek endonükleaz aktivite gösteren ve spesifik olmayan elektrostatik etkileşimleri azaltmak adına geliştirilmiş modifiye bir endobükleazdır. Bu çalışmada eCas9 enzimi ve dCas9 gibi modifiye enzimler kullanılarak hedef hedef dışına bağlanabilirlik en aza indirgenmiş ve spesifite artırılmıştır. Kullanılan eCas9 enzimi hedef dışı etkileri azaltmış ve hedef üzerinde bölünmüş bölgeleri sağlam tutmuştur. Dolayısıyla eCas9 yüksek spesifite gerektiren genom düzenleme uygulamaları için geniş çapta yararlı olabilir (Slaymaker ve ark 2016, Komor ve ark 2017).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak bu çalışmada CRISPR/Cas9 tekniği kullanılarak, SK-MEL-30 cilt kanseri malign melanom hücre hattında NRAS genindeki patojenik bir mutasyon olan Q61K nokta mutasyonu özellikle transfeksiyonu gerçekleşmiş hücrelerde başarıyla düzeltilmiştir. Bunun için, mutasyonlu bölgeyi hedef alacak şekilde, çeşitli gRNA'lar dizayn edilmiş ve hedef bölge 3 farklı plazmid ve donör dizi ile önce knockout edilip ardından HDR ile tamir edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan plazmidlerden biri klasik SpCas9 nükleaz enzimini, biri dCas9 enzimini, bir diğeri ise eCas9 enzimini eksprese etmektedir. Farklı modifiye Cas9 nükleazların kullanımı, hem çalışmayı zenginleştirmiş hem de knockout işleminin kolaylaştırılmasını sağlamıştır. Ayrıca Cas9 enzimine destek olarak FokI endonükleazların da kullanımı hedef bölgenin kesilmesi için adeta bir raportör görevi görmüştür.

HDR ile tamir mekanizmasının başarılı olabilmesi için 130 nükleotitlik uzun donör diziler dizayn edilmiş ve homoloji kolları uzun tutulmuştur. Dolayısıyla bu sistem etkili tamir işleminin de çift zincir kırıklarını doğru bir şekilde onarması açısından nispeten etkili olmuştur.

Bu çalışmada eCas9 enzimi ve dCas9 gibi modifiye enzimler kullanılarak hedef hedef dışına bağlanabilirlik en aza indirgenmiş ve spesifite artırılmıştır. Kullanılan eCas9 enzimi hedef dışı etkileri azaltmış ve hedef üzerinde bölünmüş bölgeleri dağılmadan bir arada tutmayı başarmıştır. Ayrıca bu çalışmada modifiye Cas9 enzimlerinin nokta mutasyonlarını knockout yapabilmek açısından kullanılabilirliği ve işlevselliği de ispatlanmıştır.

Dizayn edilen sistemin güvenilirliği ve çalışabilirliğini kontrol etmek için, real-time PCR analizleri yapılmıştır. Real-time PCR analizlerinde CRISPR uygulanmış ve uygulanmamış kontrol gruplarının gerek melting curve eğrileri, gerekse ct değeri farklılıkları dikkate alınarak çeşitli değerlendirmeler yapılmıştır. Bunun yanı sıra çalışmada end-point genotipleme tekniği de kullanılarak çıkarımlar güçlendirilmiştir. İleriki çalışmalar için T7E1 surveyor nükleaz assay tekniği kullanılarak veya sekans analizi yapılarak, NRAS genindeki bu düzeltmeler (veya indeller) ispatlanarak zenginleştirilebilir.

Sunulan bu çalışmada, günümüzde etkili genom düzenleme araçlarından biri olarak kabul edilen CRISPR/Cas9 tekniği ile bir nokta mutasyonunun düzeltilebileceği gösterilmiştir. Ayrıca çağımızda genetik bir hastalık olarak kabul edilen kanserin tedavisinde kullanılabileceği de gösterilmiştir. CRISPR/Cas9 tekniğinin gelecekte, bir takım yeniden düzenlemeler ve modifiye Cas9 enzimleriyle birlikte birçok hastalığın tedavisine olanak sağlayarak daha da gelişmesi ve gen terapi ile tedavinin önünü daha çok açması beklenmektedir.



6. KAYNAKLAR

- Abel EV, Basile KJ, Kugel CH, Witkiewicz AK, Le K, Amaravadi RK, Karakousis GC, Xu X, Xu W, Schuchter LM, 2013. Melanoma adapts to RAF/MEK inhibitors through FOXD3-mediated upregulation of ERBB3. *The Journal of clinical investigation*, 123, 5, 2155-68.
- Ablain J, Durand EM, Yang S, Zhou Y, Zon LI, 2015. A CRISPR/Cas9 vector system for tissue-specific gene disruption in zebrafish. *Developmental cell*, 32, 6, 756-64.
- Aguissa-Touré A-H, Li G, 2012. Genetic alterations of PTEN in human melanoma. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69, 9, 1475-91.
- Armstrong BK, Krickler A, 2001. The epidemiology of UV induced skin cancer. *Journal of photochemistry and photobiology B: Biology*, 63, 1-3, 8-18.
- Ball NJ, Yohn JJ, Morelli JG, Norris DA, Golitz LE, Hoeffler JP, 1994. Ras mutations in human melanoma: a marker of malignant progression. *Journal of Investigative Dermatology*, 102, 3, 285-90.
- Bauer DE, Canver MC, Orkin SH, 2015. Generation of genomic deletions in mammalian cell lines via CRISPR/Cas9. *Journal of visualized experiments: JoVE*, 95.
- Bauer J, Curtin JA, Pinkel D, Bastian BC, 2007. Congenital melanocytic nevi frequently harbor NRAS mutations but no BRAF mutations. *Journal of Investigative Dermatology*, 127, 1, 179-82.
- Beerli RR, Segal DJ, Dreier B, Barbas CF, 1998. Toward controlling gene expression at will: specific regulation of the erbB-2/HER-2 promoter by using polydactyl zinc finger proteins constructed from modular building blocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 25, 14628-33.
- Bibikova M, Golic M, Golic KG, Carroll D, 2002. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics*, 161, 3, 1169-75.
- Blanchard T, Srivastava PK, Duan F, 2013. Vaccines against advanced melanoma. *Clinics in dermatology*, 31, 2, 179-90.
- Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, Lahaye T, Nickstadt A, Bonas U, 2009. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 326, 5959, 1509-12.
- Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD, 2005. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, 151, 8, 2551-61.
- Boone B, Jacobs K, Ferdinande L, Tailldeman J, Lambert J, Peeters M, Bracke M, Pauwels P, Brochez L, 2011. EGFR in melanoma: clinical significance and potential therapeutic target. *Journal of cutaneous pathology*, 38, 6, 492-502.
- Bos JL, 1989. Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer research*, 49, 17, 4682-9.
- Brunet A, Datta SR, Greenberg ME, 2001. Transcription-dependent and-independent control of neuronal survival by the PI3K–Akt signaling pathway. *Current opinion in neurobiology*, 11, 3, 297-305.
- Cantley LC, 2002. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, 296, 5573, 1655-7.
- Capecchi MR, 1989. Altering the genome by homologous recombination. *Science*, 244, 4910, 1288-92.
- Chari R, Mali P, Moosburner M, Church GM, 2015. Unraveling CRISPR-Cas9 genome engineering parameters via a library-on-library approach. *Nature methods*, 12, 9, 823.
- Cheng R, Peng J, Yan Y, Cao P, Wang J, Qiu C, Tang L, Liu D, Tang L, Jin J, 2014. Efficient gene editing in adult mouse livers via adenoviral delivery of CRISPR/Cas9. *FEBS letters*, 588, 21, 3954-8.

- Choulika A, Perrin A, Dujon B, Nicolas J-F, 1995. Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 15, 4, 1968-73.
- Chu G, Hayakawa H, Berg P, 1987. Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA. *Nucleic acids research*, 15, 3, 1311-26.
- Chu HW, Rios C, Huang C, Wesolowska-Andersen A, Burchard EG, O'Connor BP, Fingerlin TE, Nichols D, Reynolds SD, Seibold MA, 2015. CRISPR-Cas9-mediated gene knockout in primary human airway epithelial cells reveals a proinflammatory role for MUC18. *Gene therapy*, 22, 10, 822.
- Chu VT, Weber T, Wefers B, Wurst W, Sander S, Rajewsky K, Kühn R, 2015. Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nature biotechnology*, 33, 5, 543.
- Ciardiello F, Tortora G, 2008. EGFR antagonists in cancer treatment. *New England Journal of Medicine*, 358, 11, 1160-74.
- Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini L, 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 1231143.
- Curtin JA, Busam K, Pinkel D, Bastian BC, 2006. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *Journal of clinical oncology*, 24, 26, 4340-6.
- Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, Cho K-H, Aiba S, Bröcker E-B, LeBoit PE, 2005. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *New England Journal of Medicine*, 353, 20, 2135-47.
- Curtin JA, Stark MS, Pinkel D, Hayward NK, Bastian BC, 2006. PI3-kinase subunits are infrequent somatic targets in melanoma. *The Journal of investigative dermatology*, 126, 7, 1660.
- Çöl C, 2003. Malign melanom epidemiyolojisi ve birinci basamak sağlık kurumlarının rolü. *Sürekli Tıp Eğitim Dergisi Ağustos 2003*, 12, 298.
- Dankort D, Curley DP, Cartlidge RA, Nelson B, Karnezis AN, Damsky Jr WE, You MJ, DePinho RA, McMahon M, Bosenberg M, 2009. Braf V600E cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. *Nature genetics*, 41, 5, 544.
- Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, 2002. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 417, 6892, 949.
- Davies M, Stemke-Hale K, Tellez C, Calderone T, Deng W, Prieto V, Lazar A, Gershenwald J, Mills G, 2008. A novel AKT3 mutation in melanoma tumours and cell lines. *British journal of cancer*, 99, 8, 1265.
- Davies MA, 2012. The role of the PI3K-AKT pathway in melanoma. *The Cancer Journal*, 18, 2, 142-7.
- Davies MA, Gershenwald JE, 2011. Targeted therapy for melanoma: a primer. *Surgical Oncology Clinics*, 20, 1, 165-80.
- Davies MA, Stemke-Hale K, Lin E, Tellez C, Deng W, Gopal YN, Woodman SE, Calderone TC, Ju Z, Lazar AJ, 2009. Integrated molecular and clinical analysis of AKT activation in metastatic melanoma. *Clinical Cancer Research*, 15, 24, 7538-46.
- Deveau H, Barrangou R, Garneau JE, Labonté J, Fremaux C, Boyaval P, Romero DA, Horvath P, Moineau S, 2008. Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of bacteriology*, 190, 4, 1390-400.
- Dhawan P, Singh AB, Ellis DL, Richmond A, 2002. Constitutive activation of Akt/protein kinase B in melanoma leads to up-regulation of nuclear factor- κ B and tumor progression. *Cancer research*, 62, 24, 7335-42.
- Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W, 2007. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*, 26, 22, 3279.

- DiCarlo JE, Norville JE, Mali P, Rios X, Aach J, Church GM, 2013. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic acids research*, 41, 7, 4336-43.
- Dika E, Altimari A, Patrizi A, Gruppioni E, Fiorentino M, Piraccini B, Misciali C, Barisani A, Fanti P, 2013. KIT, NRAS, and BRAF mutations in nail apparatus melanoma. *Pigment cell & melanoma research*, 26, 5, 758-60.
- Doench JG, Hartenian E, Graham DB, Tothova Z, Hegde M, Smith I, Sullender M, Ebert BL, Xavier RJ, Root DE, 2014. Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation. *Nature biotechnology*, 32, 12, 1262.
- Doudna JA, Charpentier E, 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346, 6213, 1258096.
- Duman N, 2014. Kutanöz Malign Melanom. *Acta Oncologica Turcica*, 47, 3, 52-9.
- Elder DE, 2014. *Lever's histopathology of the skin*, Lippincott Williams & Wilkins, p.
- Fattore L, Marra E, Pisanu ME, Noto A, De Vitis C, Belleudi F, Aurisicchio L, Mancini R, Torrisi MR, Ascierto PA, 2013. Activation of an early feedback survival loop involving phospho-ErbB3 is a general response of melanoma cells to RAF/MEK inhibition and is abrogated by anti-ErbB3 antibodies. *Journal of translational medicine*, 11, 1, 180.
- Fedorenko IV, Gibney GT, Smalley KS, 2013. NRAS mutant melanoma: biological behavior and future strategies for therapeutic management. *Oncogene*, 32, 25, 3009.
- Fine B, Hodakoski C, Koujak S, Su T, Saal LH, Maurer M, Hopkins B, Keniry M, Sulis ML, Mense S, 2009. Activation of the PI3K pathway in cancer through inhibition of PTEN by exchange factor P-REX2a. *Science*, 325, 5945, 1261-5.
- Frese KK, Tuveson DA, 2007. Maximizing mouse cancer models. *Nature Reviews Cancer*, 7, 9, 654.
- Friedland AE, Tzur YB, Esvelt KM, Colaiácovo MP, Church GM, Calarco JA, 2013. Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system. *Nature methods*, 10, 8, 741.
- Fu Y, Reyon D, Joung JK, 2014. Targeted genome editing in human cells using CRISPR/Cas nucleases and truncated guide RNAs. In: *Methods in enzymology*. Eds: Elsevier, p. 21-45.
- Gaj T, Gersbach CA, Barbas III CF, 2013. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in biotechnology*, 31, 7, 397-405.
- Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Abeni D, Boyle P, Melchi CF, 2005. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *European journal of cancer*, 41, 1, 28-44.
- Gariyban L, Fisher DE, 2010. How sunlight causes melanoma. *Current oncology reports*, 12, 5, 319-26.
- Goel VK, Lazar AJ, Warneke CL, Redston MS, Haluska FG, 2006. Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *Journal of Investigative Dermatology*, 126, 1, 154-60.
- Gopal YV, Deng W, Woodman SE, Komurov K, Ram P, Smith PD, Davies MA, 2010. Basal and treatment-induced activation of AKT mediates resistance to cell death by AZD6244 (ARRY-142886) in Braf-mutant human cutaneous melanoma cells. *Cancer research*, 70, 21, 8736-47.
- Gray-Schopfer VC, da Rocha Dias S, Marais R, 2005. The role of B-Raf in melanoma. *Cancer and Metastasis Reviews*, 24, 1, 165-83.
- Green A, Autier P, Boniol M, Boyle P, Doré JF, Gandini S, Newton-Bishop J, Secretan B, Walter SJ, Weinstock MA, 2007. The association of use of sunbeds with cutaneous malignant melanoma and other skin cancers: a systematic review. *International journal of cancer*, 120, 5, 1116-22.
- Guo X, Zhang T, Hu Z, Zhang Y, Shi Z, Wang Q, Cui Y, Wang F, Zhao H, Chen Y, 2014. Efficient RNA/Cas9-mediated genome editing in *Xenopus tropicalis*. *Development*, 141, 3, 707-14.

- Hanahan D, Weinberg RA, 2000. The hallmarks of cancer. *cell*, 100, 1, 57-70.
- Heinrich MC, Corless CL, Demetri GD, Blanke CD, Von Mehren M, Joensuu H, McGreevey LS, Chen C-J, Van den Abbeele AD, Druker BJ, 2003. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *Journal of clinical oncology*, 21, 23, 4342-9.
- Hemminki K, Zhang H, Czene K, 2003. Familial and attributable risks in cutaneous melanoma: effects of proband and age. *Journal of investigative dermatology*, 120, 2, 217-23.
- Hocker T, Tsao H, 2007. Ultraviolet radiation and melanoma: a systematic review and analysis of reported sequence variants. *Human mutation*, 28, 6, 578-88.
- Hocker TL, Singh MK, Tsao H, 2008. Melanoma genetics and therapeutic approaches in the 21st century: moving from the benchside to the bedside. *Journal of Investigative Dermatology*, 128, 11, 2575-95.
- Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, Arold ST, Imielinski M, Theurillat J-P, Nickerson E, Auclair D, Li L, Place C, 2012. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell*, 150, 2, 251-63.
- Horvath P, Barrangou R, 2010. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*, 327, 5962, 167-70.
- Horvath P, Romero DA, Coûté-Monvoisin A-C, Richards M, Deveau H, Moineau S, Boyaval P, Fremaux C, Barrangou R, 2008. Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of bacteriology*, 190, 4, 1401-12.
- Hsu PD, Lander ES, Zhang F, 2014. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 157, 6, 1262-78.
- Ingraffea A, 2013. Melanoma. *Facial plastic surgery clinics of North America*, 21, 1, 33-42.
- Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A, 1987. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of bacteriology*, 169, 12, 5429-33.
- Ivanov VN, Hei TK, 2005. Combined treatment with EGFR inhibitors and arsenite upregulated apoptosis in human EGFR-positive melanomas: a role of suppression of the PI3K-AKT pathway. *Oncogene*, 24, 4, 616.
- Jia S, Liu Z, Zhang S, Liu P, Zhang L, Lee SH, Zhang J, Signoretti S, Loda M, Roberts TM, 2008. Essential roles of PI (3) K-p110 β in cell growth, metabolism and tumorigenesis. *Nature*, 454, 7205, 776.
- Jiang Y, Chen B, Duan C, Sun B, Yang J, Yang S, 2015. Multigene editing in the *Escherichia coli* genome via the CRISPR-Cas9 system. *Applied and environmental microbiology*, 81, 7, 2506-14.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E, 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *science*, 1225829.
- Karnoub AE, Weinberg RA, 2008. Ras oncogenes: split personalities. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9, 7, 517.
- Kim J, Lazar AJ, Davies MA, Homsy J, Papadopoulos NE, Hwu Wj, Bedikian AY, Woodman SE, Patel SP, Hwu P, 2012. BRAF, NRAS and KIT sequencing analysis of spindle cell melanoma. *Journal of cutaneous pathology*, 39, 9, 821-5.
- Kim S, Kim D, Cho SW, Kim J, Kim J-S, 2014. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome research*, 24, 6, 1012-9.
- Kizilbey K, AKDESTE ZM, 2013. MELANOMA CANCER. *Sigma: Journal of Engineering & Natural Sciences/Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi*, 31, 4.
- Kleinstiver BP, Prew MS, Tsai SQ, Topkar VV, Nguyen NT, Zheng Z, Gonzales AP, Li Z, Peterson RT, Yeh J-RJ, 2015. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature*, 523, 7561, 481.

- Komor AC, Badran AH, Liu DR, 2017. CRISPR-based technologies for the manipulation of eukaryotic genomes. *Cell*, 168, 1-2, 20-36.
- Kraemer KH, Levy DD, Parris CN, Gozukara EM, Moriwaki S, Adelberg S, Seidman MM, 1994. Xeroderma pigmentosum and related disorders: examining the linkage between defective DNA repair and cancer. *Journal of Investigative Dermatology*, 103.
- Kuscu C, Arslan S, Singh R, Thorpe J, Adli M, 2014. Genome-wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by the Cas9 endonuclease. *Nature biotechnology*, 32, 7, 677.
- Lee C, Collichio F, Ollila D, Moschos S, 2013. Historical review of melanoma treatment and outcomes. *Clinics in dermatology*, 31, 2, 141-7.
- Lewis TB, Robison JE, Bastien R, Milash B, Boucher K, Samlowski WE, Leachman SA, Dirk Noyes R, Wittwer CT, Perreard L, 2005. Molecular classification of melanoma using real- time quantitative reverse transcriptase- polymerase chain reaction. *Cancer*, 104, 8, 1678-86.
- Lin S, Staahl BT, Alla RK, Doudna JA, 2014. Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. *Elife*, 3.
- Maddalo D, Manchado E, Concepcion CP, Bonetti C, Vidigal JA, Han Y-C, Ogradowski P, Crippa A, Rekhtman N, de Stanchina E, 2014. In vivo engineering of oncogenic chromosomal rearrangements with the CRISPR/Cas9 system. *Nature*, 516, 7531, 423.
- Mali P, Esvelt KM, Church GM, 2013. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nature methods*, 10, 10, 957.
- Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM, 2013. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 339, 6121, 823-6.
- McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, Lehmann B, Terrian DM, Milella M, Tafuri A, 2007. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1773, 8, 1263-84.
- McKee PH, Calonje E, 2009. Diagnostic atlas of melanocytic pathology, Elsevier Health Sciences, p.
- Mikami M, Toki S, Endo M, 2015. Comparison of CRISPR/Cas9 expression constructs for efficient targeted mutagenesis in rice. *Plant molecular biology*, 88, 6, 561-72.
- Mirmohammadsadegh A, Marini A, Nambiar S, Hassan M, Tannapfel A, Ruzicka T, Hengge UR, 2006. Epigenetic silencing of the PTEN gene in melanoma. *Cancer research*, 66, 13, 6546-52.
- Mojica FJ, García-Martínez J, Soria E, 2005. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of molecular evolution*, 60, 2, 174-82.
- Moscou MJ, Bogdanove AJ, 2009. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, 326, 5959, 1501-.
- Nakamura K, Fujii W, Tsuboi M, Tanihata J, Teramoto N, Takeuchi S, Naito K, Yamanouchi K, Nishihara M, 2014. Generation of muscular dystrophy model rats with a CRISPR/Cas system. *Scientific reports*, 4, 5635.
- Nathanson KL, Martin A-M, Wubbenhorst B, Greshock J, Letrero R, D'Andrea K, O'Day S, Infante JR, Falchook GS, Arkenau H-T, 2013. Tumor genetic analyses of patients with metastatic melanoma treated with the BRAF inhibitor dabrafenib (GSK2118436). *Clinical cancer research*, 19, 17, 4868-78.
- Niu Y, Shen B, Cui Y, Chen Y, Wang J, Wang L, Kang Y, Zhao X, Si W, Li W, 2014. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell*, 156, 4, 836-43.
- Nogueira C, Kim K-H, Sung H, Paraiso K, Dannenberg J-H, Bosenberg M, Chin L, Kim M, 2010. Cooperative interactions of PTEN deficiency and RAS activation in melanoma metastasis. *Oncogene*, 29, 47, 6222.

- Nymark M, Sharma AK, Sparstad T, Bones AM, Winge P, 2016. A CRISPR/Cas9 system adapted for gene editing in marine algae. *Scientific reports*, 6, 24951.
- Ocaña-Riola R, Martínez-García C, Serrano S, Buendía-Eisman A, Ruiz-Baena C, Canela-Soler J, 2001. Population-based study of cutaneous malignant melanoma in the Granada province (Spain), 1985–1992. *European journal of epidemiology*, 17, 2, 169-74.
- Omholt K, Kröckel D, Ringborg U, Hansson J, 2006. Mutations of PIK3CA are rare in cutaneous melanoma. *Melanoma research*, 16, 2, 197-200.
- Orban PC, Chui D, Marth JD, 1992. Tissue-and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89, 15, 6861-5.
- Özçelik S, Akyol M, 2007. Melanoma Epidemiyolojisi. *TÜRKDERM-Deri Hastalıkları ve Frengi Arşivi*, 41, Supp: 2, 1-5.
- Palmieri G, Capone M, Ascierto ML, Gentilcore G, Stroncek DF, Casula M, Sini MC, Palla M, Mozzillo N, Ascierto PA, 2009. Main roads to melanoma. *J Transl Med*, 7, 1, 86.
- Paraiso KH, Xiang Y, Rebecca VW, Abel EV, Chen YA, Munko AC, Wood E, Fedorenko IV, Sondak VK, Anderson AR, 2011. PTEN loss confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through the suppression of BIM expression. *Cancer research*, 71, 7, 2750-60.
- Patton EE, Widlund HR, Kutok JL, Kopani KR, Amatruda JF, Murphey RD, Berghmans S, Mayhall EA, Traver D, Fletcher CD, 2005. BRAF mutations are sufficient to promote nevi formation and cooperate with p53 in the genesis of melanoma. *Current Biology*, 15, 3, 249-54.
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu B-e, Karandikar M, Berman K, Cobb MH, 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine reviews*, 22, 2, 153-83.
- Perez-Pinera P, Kocak DD, Vockley CM, Adler AF, Kabadi AM, Polstein LR, Thakore PI, Glass KA, Ousterout DG, Leong KW, 2013. RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9–based transcription factors. *Nature methods*, 10, 10, 973.
- Platt RJ, Chen S, Zhou Y, Yim MJ, Swiech L, Kempton HR, Dahlman JE, Parnas O, Eisenhaure TM, Jovanovic M, 2014. CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. *Cell*, 159, 2, 440-55.
- Plessis A, Perrin A, Haber J, Dujon B, 1992. Site-specific recombination determined by I-SceI, a mitochondrial group I intron-encoded endonuclease expressed in the yeast nucleus. *Genetics*, 130, 3, 451-60.
- Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, Moses TY, Hostetter G, Wagner U, Kakareka J, 2003. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nature genetics*, 33, 1, 19.
- Posch C, Moslehi H, Feeney L, Green GA, Ebaee A, Feichtenschlager V, Chong K, Peng L, Dimon MT, Phillips T, 2013. Combined targeting of MEK and PI3K/mTOR effector pathways is necessary to effectively inhibit NRAS mutant melanoma in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, 10, 4015-20.
- Potter H, Heller R, 2010. Transfection by electroporation. *Current protocols in molecular biology*, 9.3. 1-9.3. 13.
- Potter H, Heller R, 2011. Transfection by electroporation. *Current protocols in neuroscience*, A. 1E. - A. E. 11.
- Prickett TD, Agrawal NS, Wei X, Yates KE, Lin JC, Wunderlich JR, Cronin JC, Cruz P, Rosenberg SA, Samuels Y, 2009. Analysis of the tyrosine kinome in melanoma reveals recurrent mutations in ERBB4. *Nature genetics*, 41, 10, 1127.
- Psaty EL, Scope A, Halpern AC, Marghoob AA, 2010. Defining the patient at high risk for melanoma. *International journal of dermatology*, 49, 4, 362-76.
- Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D, 2011. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nature Reviews Cancer*, 11, 11, 761.

- Pyne ME, Moo-Young M, Chung DA, Chou CP, 2015. Coupling the CRISPR/Cas9 system with lambda red recombineering enables simplified chromosomal gene replacement in *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, 81, 15, 5103-14.
- Qin W, Dion SL, Kutny PM, Zhang Y, Cheng AW, Jillette NL, Malhotra A, Geurts AM, Chen Y-G, Wang H, 2015. Efficient CRISPR/Cas9-mediated genome editing in mice by zygote electroporation of nuclease. *Genetics*, 200, 2, 423-30.
- Rajpar S, Marsden J, 2009. *ABC of skin cancer*, John Wiley & Sons, p.
- Rákossy Z, Vízkeleti L, Ecsedi S, Vokó Z, Bégány Á, Barok M, Krekk Z, Gallai M, Szentirmay Z, Ádány R, 2007. EGFR gene copy number alterations in primary cutaneous malignant melanomas are associated with poor prognosis. *International journal of cancer*, 121, 8, 1729-37.
- Ran FA, Cong L, Yan WX, Scott DA, Gootenberg JS, Kriz AJ, Zetsche B, Shalem O, Wu X, Makarova KS, 2015. In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature*, 520, 7546, 186.
- Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F, 2013. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature protocols*, 8, 11, 2281.
- Rouet P, Smih F, Jasin M, 1994. Expression of a site-specific endonuclease stimulates homologous recombination in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91, 13, 6064-8.
- Rudin N, Sugarman E, Haber JE, 1989. Genetic and physical analysis of double-strand break repair and recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 122, 3, 519-34.
- Russo AE, Torrisi E, Bevelacqua Y, Perrotta R, Libra M, McCubrey JA, Spandidos DA, Stivala F, Malaponte G, 2009. Melanoma: molecular pathogenesis and emerging target therapies. *International journal of oncology*, 34, 6, 1481-9.
- Sánchez-Rivera FJ, Jacks T, 2015. Applications of the CRISPR-Cas9 system in cancer biology. *Nature reviews cancer*, 15, 7, 387.
- Sapranaukas R, Gasiunas G, Fremaux C, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V, 2011. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic acids research*, 39, 21, 9275-82.
- Sarbassov DD, Ali SM, Sabatini DM, 2005. Growing roles for the mTOR pathway. *Current opinion in cell biology*, 17, 6, 596-603.
- Sauer B, 1998. Inducible gene targeting in mice using the Cre/loxsystem. *Methods*, 14, 4, 381-92.
- Schubbert S, Shannon K, Bollag G, 2007. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 7, 4, 295.
- Schumann K, Lin S, Boyer E, Simeonov DR, Subramaniam M, Gate RE, Haliburton GE, Chun JY, Bluestone JA, Doudna JA, 2015. Generation of knock-in primary human T cells using Cas9 ribonucleoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112, 33, 10437-42.
- Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, Shi X, Scott DA, Mikkelsen TS, Heckl D, Ebert BL, Root DE, Doench JG, 2014. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science*, 343, 6166, 84-7.
- Shi H, Hugo W, Kong X, Hong A, Koya RC, Moriceau G, Chodon T, Guo R, Johnson DB, Dahlman KB, 2014. Acquired resistance and clonal evolution in melanoma during BRAF inhibitor therapy. *Cancer discovery*, 4, 1, 80-93.
- Shi H, Kong X, Ribas A, Lo RS, 2011. Combinatorial treatments that overcome PDGFR β -driven resistance of melanoma cells to V600EB-RAF inhibition. *Cancer research*, 71, 15, 5067-74.
- Siskind V, Aitken J, Green A, Martin N, 2002. Sun exposure and interaction with family history in risk of melanoma, Queensland, Australia. *International journal of cancer*, 97, 1, 90-5.
- Slaymaker IM, Gao L, Zetsche B, Scott DA, Yan WX, Zhang F, 2016. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*, 351, 6268, 84-8.

- Stern RS, Nichols KT, Väkevä LH, 1997. Malignant melanoma in patients treated for psoriasis with methoxsalen (psoralen) and ultraviolet A radiation (PUVA). *New England Journal of Medicine*, 336, 15, 1041-5.
- Sternberg SH, Doudna JA, 2015. Expanding the biologist's toolkit with CRISPR-Cas9. *Molecular cell*, 58, 4, 568-74.
- Stolfi A, Gandhi S, Salek F, Christiaen L, 2014. Tissue-specific genome editing in Ciona embryos by CRISPR/Cas9. *Development*, 141, 21, 4115-20.
- Straussman R, Morikawa T, Shee K, Barzily-Rokni M, Qian ZR, Du J, Davis A, Mongare MM, Gould J, Frederick DT, 2012. Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature*, 487, 7408, 500.
- Torres-Cabala CA, Curry JL, 2016. *Genetics of Melanoma*, Springer, p.
- Trunzer K, Pavlick AC, Schuchter L, Gonzalez R, McArthur GA, Hutson TE, Moschos SJ, Flaherty KT, Kim KB, Weber JS, 2013. Pharmacodynamic effects and mechanisms of resistance to vemurafenib in patients with metastatic melanoma. *Journal of clinical oncology*, 31, 14, 1767-74.
- Truong D-JJ, Kühner K, Kühn R, Werfel S, Engelhardt S, Wurst W, Ortiz O, 2015. Development of an intein-mediated split-Cas9 system for gene therapy. *Nucleic acids research*, 43, 13, 6450-8.
- Tsai SQ, Zheng Z, Nguyen NT, Liebers M, Topkar VV, Thapar V, Wyvekens N, Khayter C, Iafrate AJ, Le LP, 2015. GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. *Nature biotechnology*, 33, 2, 187.
- Tsao H, Yang G, Goel V, Wu H, Haluska FG, 2004. Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma. *Journal of Investigative Dermatology*, 122, 2, 337-41.
- Utomo AR, Nikitin AY, Lee W-H, 1999. Temporal, spatial, and cell type-specific control of Cre-mediated DNA recombination in transgenic mice. *Nature biotechnology*, 17, 11, 1091.
- van't Veer LJ, Burgering B, Versteeg R, Boot A, Ruiter D, Osanto S, Schrier P, Bos J, 1989. N-ras mutations in human cutaneous melanoma from sun-exposed body sites. *Molecular and cellular biology*, 9, 7, 3114-6.
- Van Allen EM, Wagle N, Sucker A, Treacy DJ, Johannessen CM, Goetz EM, Place CS, Taylor-Weiner A, Whittaker S, Kryukov GV, 2014. The genetic landscape of clinical resistance to RAF inhibition in metastatic melanoma. *Cancer discovery*, 4, 1, 94-109.
- Vandaele M, Richert B, Van der Endt J, Boyden B, Brochez L, Del Marmol V, De Boulle K, Garmyn M, Laporte M, Maselis T, 2000. Melanoma screening: results of the first one- day campaign in Belgium ('Melanoma Monday'). *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 14, 6, 470-2.
- Villanueva J, Vultur A, Lee JT, Somasundaram R, Fukunaga-Kalabis M, Cipolla AK, Wubbenhorst B, Xu X, Gimotty PA, Kee D, 2010. Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in melanoma can be overcome by cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K. *Cancer cell*, 18, 6, 683-95.
- Vivanco I, Sawyers CL, 2002. The phosphatidylinositol 3-kinase-AKT pathway in human cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2, 7, 489.
- Waijers S, Portegijs V, Kerver J, Lemmens BB, Tijsterman M, van den Heuvel S, Boxem M, 2013. CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 193, 1, 113-156299.
- Wang SQ, Setlow R, Berwick M, Polsky D, Marghoob AA, Kopf AW, Bart RS, 2001. Ultraviolet A and melanoma: a review. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 44, 5, 837-46.
- Wang X, Wang Y, Wu X, Wang J, Wang Y, Qiu Z, Chang T, Huang H, Lin R-J, Yee J-K, 2015. Unbiased detection of off-target cleavage by CRISPR-Cas9 and TALENs using integrase-defective lentiviral vectors. *Nature biotechnology*, 33, 2, 175.

- Wee S, Wiederschain D, Maira S-M, Loo A, Miller C, Stegmeier F, Yao Y-M, Lengauer C, 2008. PTEN-deficient cancers depend on PIK3CB. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 35, 13057-62.
- Wilson TR, Fridlyand J, Yan Y, Penuel E, Burton L, Chan E, Peng J, Lin E, Wang Y, Sosman J, 2012. Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors. *Nature*, 487, 7408, 505.
- Woodman SE, Davies MA, 2010. Targeting KIT in melanoma: a paradigm of molecular medicine and targeted therapeutics. *Biochemical pharmacology*, 80, 5, 568-74.
- Wu X, Scott DA, Kriz AJ, Chiu AC, Hsu PD, Dadon DB, Cheng AW, Trevino AE, Konermann S, Chen S, 2014. Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells. *Nature biotechnology*, 32, 7, 670.
- Wyvekens N, Topkar VV, Khayter C, Joung JK, Tsai SQ, 2015. Dimeric CRISPR RNA-guided FokI-dCas9 nucleases directed by truncated gRNAs for highly specific genome editing. *Human gene therapy*, 26, 7, 425-31.
- Xing F, Persaud Y, Pratilas CA, Taylor BS, Janakiraman M, She Q-B, Cobrinik D, Solit DB, (2011). Loss of the PTEN and RB1 tumor suppressors attenuates RAF-dependence in melanomas, *AACR*.
- Xue Z, Wu M, Wen K, Ren M, Long L, Zhang X, Gao G, 2014. CRISPR/Cas9 mediates efficient conditional mutagenesis in *Drosophila*. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 4, 11, 2167-73.
- Yap TA, Garrett MD, Walton MI, Raynaud F, de Bono JS, Workman P, 2008. Targeting the PI3K-AKT-mTOR pathway: progress, pitfalls, and promises. *Current opinion in pharmacology*, 8, 4, 393-412.
- Yecies JL, Manning BD, 2011. mTOR links oncogenic signaling to tumor cell metabolism. *Journal of molecular medicine*, 89, 3, 221-8.
- Yin L, Maddison LA, Li M, Kara N, LaFave MC, Varshney GK, Burgess SM, Patton JG, Chen W, 2015. Multiplex conditional mutagenesis using transgenic expression of Cas9 and sgRNAs. *Genetics*, 200, 2, 431-41.
- Youl P, Aitken J, Hayward N, Hogg D, Liu L, Lassam N, Martin N, Green A, 2002. Melanoma in adolescents: A case- control study of risk factors in Queensland, Australia. *International journal of cancer*, 98, 1, 92-8.
- Yuan T, Cantley L, 2008. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene*, 27, 41, 5497.
- Zebary A, Jangard M, Omholt K, Ragnarsson-Olding B, Hansson J, 2013. KIT, NRAS and BRAF mutations in sinonasal mucosal melanoma: a study of 56 cases. *British journal of cancer*, 109, 3, 559.
- Zebary A, Omholt K, Vassilaki I, Höiom V, Lindén D, Viberg L, Kanter-Lewensohn L, Johansson CH, Hansson J, 2013. KIT, NRAS, BRAF and PTEN mutations in a sample of Swedish patients with acral lentiginous melanoma. *Journal of dermatological science*, 72, 3, 284-9.
- Zhang ZH, Quan SJ, 2000. Strategies and Applications of the Cre/LoxP System in Transgenic Mice.[J]. *PROGRESS IN BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS*, 3, 002.
- Zhou X-P, Gimm O, Hampel H, Niemann T, Walker MJ, Eng C, 2000. Epigenetic PTEN silencing in malignant melanomas without PTEN mutation. *The American journal of pathology*, 157, 4, 1123-8.