

**T.C.
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**CRISPR-CAS9 GEN DÜZENLEME İLE GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ
MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNİN ÜRETİMİ VE
KARAKTERİZASYONU**

ESRA SEVDE EKİCİ

KÖK HÜCRE VE DOKU MÜHENDİSLİĞİ

**DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ ÖZGÜR TATAROĞLU**

İSTANBUL-2022

**T.C.
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**CRISPR-CAS9 GEN DÜZENLEME İLE GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ
MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNİN ÜRETİMİ VE
KARAKTERİZASYONU**

ESRA SEVDE EKİCİ

**DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ ÖZGÜR TATAROĞLU**

KÖK HÜCRE VE DOKU MÜHENDİSLİĞİ

Bu çalışma, İstinye Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 2020/B15

İSTANBUL-2022

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum, “CRISPR-Cas9 gen düzenleme ile genetiği değiştirilmiş mezenkimal kök hücrelerinin üretimi ve karakterizasyonu” adlı çalışmanın, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Esra Sevde EKİCİ

İTHAF

Bu tezi varlık sebeplerim annem ve babama ithaf ediyorum..



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca tez çalışmamın planlanması ve yürütülmesinde, bilgileri ve tecrübesiyle beni yönlendiren bu alanda gelişmemi sağlayan tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Özgür TATAROĞLU'na; tezimle ilgili olan tüm bilimsel katkıları ve yardımlarından dolayı değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Ayca Zeynep İLTER'e,

Sunduğu imkanlar, verdiği destekler ve bizlerle paylaştığı deneyimleri için, saygıdeğer rektörümüz ve bölüm başkanımız Prof. Dr. Erdal KARAÖZ'e,

Tez döneminde benimle aynı süreci yaşayan, deneyimlerimizi her fırsatta paylaştığımız, beni her zaman dinleyen, zor dönemlerimde beni motive ederek kendimi bana şanslı hissettiren başarılı arkadaşım Zehra ARMAĞAN'a; beni hiç yalnız bırakmayan, her daim yanımda ilgisi ve desteğini eksik etmeyen sevgili arkadaşım Meral Büşra BAŞER'e,

AR-GE'de tanıştığım ve hayatımın bundan sonraki dönemlerinde de görmekten mutluluk duyacağım, deneylerim boyunca yardım ve desteklerini esirgemeyen arkadaşlarım Remzi Okan AKAR, Burcu UĞURLU, Hatice YAZICI, Kaan ADACAN, Berk Alp EMİR ve ISUGE & ISUKOK ailesine,

Hayatımın her döneminde beni destekleyip güvenen, sevgilerini ve emeklerini esirgemeyen, ailem demekten mutluluk duyduğum; annem Asuman EKİCİ, babam Kamil EKİCİ, abim Murat EKİCİ, kardeşlerim Elifnaz ve Büşra EKİCİ'ye, varlığı ve verdiği huzur için kedim Sütlaç'a,

En içten sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstinye üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 2020/B15

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYANI	İ
İTHAF.....	İİ
TEŞEKKÜR.....	İİİ
İÇİNDEKİLER	İV
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	Vİİİ
SİMGE VE KISALTIMA LİSTESİ.....	Xİİ
ÖZET	XV
ABSTRACT.....	XVİ
GİRİŞ	1
1. GENEL BİLGİLER	3
1.1. Kök Hücreler.....	3
1.2. Mezenkimal Kök Hücre	5
1.2.1. Rejeneratif Tıpta Mezenkimal Kök Hücreler.....	7
1.3. Mezenkimal Kök Hücre Belirteçleri	8
1.3.1. Yüzey Belirteçleri	8
1.3.2. Pluripotensi Genleri	11
1.3.3. Farklılaşma Belirteçleri.....	13
1.4. Hücrelerde Genetik Manipülasyon ve Gen Düzenleme.....	16
1.4.1. CRISPR-CAS9 ile Genlerin Susturulması	17
1.4.2. Gen Aktarımı ile Yabancı Genlerin Ekspresyonun Sağlanması	19
1.4.3. CRISPR ve diğer Gen Aktarım Metodları	19
1.5. Yeşil Floresan Protein.....	23
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	24
2.1. Materyal	24
2.1.1. Kimyasal Maddeler	24
2.1.2. Sarf Malzemeler	25
2.1.3. Cihazlar	26
2.2. Metotlar.....	27
2.2.1. Hücre Kültürü Besiyerinin Hazırlanması.....	27

2.2.2. Hücrelerin Pasajlanması.....	27
2.2.3. Hemositometri ile Hücre Sayımı.....	28
2.2.4. Hücrelerin Stoklanması.....	28
2.2.5. sgRNA Dizaynı.....	28
2.2.6. sgRNA'ların Lentiviral Vektöre Klonlanması.....	29
2.2.7. Kompetent Hücre Yapımı.....	30
2.2.8. E.coli Transformasyonu ve Koloni PZR.....	31
2.2.9. Plazmit İzolasyonu.....	33
2.2.10. GFP o/e Lentiviral Ekspresyon Plazmiti.....	34
2.2.11. Plazmitlerin Sekans ile Validasyonu:.....	35
2.2.12. Lentivirüs Üretimi.....	35
2.2.13. Virüs Miktar Analizi.....	36
2.2.14. Viral Transdüksiyon.....	38
2.2.15. Antibiyotik Seçilimi.....	38
2.2.16. Deney Grupları.....	39
2.2.17. Akım Sitometrisi ile GFP Analizi.....	39
2.2.18. RNA İzolasyonu.....	40
2.2.19. cDNA Sentezi.....	41
2.2.20. qPZR.....	42
2.2.21. İstatistiksel Analiz.....	43
3. BULGULAR.....	44
3.1.1. ATCC Kaynaklı Yabancıl Tıp MKH Hücre Hattının Morfolojik Validasyonu.....	44
3.1.2. ATCC kaynaklı Yabancıl Tıp MKH Hücre Hattında Kök Hücre Markor Gen İfadelerinin qPZR Yöntemi ile Karakterizasyonu.....	45
3.1.3. GFP o/e Plazmitlerinin İzolasyonu ve Validasyonu.....	48
3.1.4. GFP k/o sgRNA Plazmitlerinin Klonlanması, İzolasyonu ve Validasyonu.....	49
3.1.5. Lentivirüs Üretimi için DNA:PEI Oranının Belirlenmesi ve Hücre Canlılık Testleri.....	52
3.1.6. Virüs Miktar Analiz Sonuçları.....	53
3.1.7. Akım Sitometrisi ile GFP Ekspresyonunun Doğrulanması.....	54
3.1.8. Floresan Mikroskopi ile GFP Overekspresyonunun HEK Hücrelerinde Doğrulanması.....	54
3.1.9. WJ-MKH Hücrelerinde GFP o/e Lentivirüs Transdüksiyonu.....	56

3.1.10. WJ-MKH+GFP Hücrelerinde GFP k/o Lentivirüs Transdüksiyonu ile GFP Geninin Susturulması.....	57
4. TARTIŞMA.....	73
5. SONUÇ.....	77
KAYNAKÇA.....	78
İNTİHAL RAPORU.....	87



TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2.1: Tasarlanan sgRNA sekansları	28
Tablo 2.2: Lentiviral plazmite sgRNA klonlama reaksiyonu	30
Tablo 2.3: Koloni PZR reaksiyon bileşenleri	31
Tablo 2.4: Koloni PZR reaksiyon koşulları	32
Tablo 2.5: Virüs miktar analizi reaksiyon bileşenleri.....	37
Tablo 2.6: qRT-PZR Programı	37
Tablo 2.7: cDNA sentezi reaksiyon bileşenleri	41
Tablo 2.8: cDNA sentezi reaksiyon koşulları	41
Tablo 2.9: Oluşturulan MKH hücre hatlarınının karakterizasyonu için kullanılan genler	42
Tablo 2.10: qPZR döngü aşamaları	43
Tablo 3.1: Üretilen lentivirüslerin qRT-PZR sonucunda hesaplanan titer miktarı.....	53
Tablo 3.2: Oluşturulan hücre hatlarından izole edilen RNA'ların nanodrop ölçüm değerleri	58

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1: Kök hücrelerin gelişim süresince geçirdiği farklılaşma potansiyellerini göstermektedir.	4
Şekil 1.2: Kök hücre kaynağı olan Wharton Jölesi dahil insan göbek kordonu diyagramı, (Cryocord, 2021).....	6
Şekil 1.3: LDHA geninin genomik lokasyonu.....	8
Şekil 1.4: CD44 geninin genomik lokasyonu	9
Şekil 1.5: CD106 geninin genomik lokasyonu	9
Şekil 1.6: CD54 geninin genomik lokasyonu	10
Şekil 1.7: CD90 geninin genomik lokasyonu	10
Şekil 1.8: HLA-DR geninin genomik lokasyonu.....	11
Şekil 1.9: Oct-4 geninin genomik lokasyonu.....	11
Şekil 1.10: Sox-2 geninin genomik lokasyonu	12
Şekil 1.11: ZFP42 geninin genomik lokasyonu.....	12
Şekil 1.12: TERT geninin genomik lokasyonu.....	13
Şekil 1.13: Runx2 geninin genomik lokasyonu	13
Şekil 1.14: PPAR γ geninin genomik lokasyonu	14
Şekil 1.15: Vimentin geninin genomik lokasyonu	15
Şekil 1.16: NHEJ ve HDR gen düzenleme yöntemlerinin karşılaştırılması	18
Şekil 1.17: Gen aktarım stratejilerinin karşılaştırılması (Chandrasekaran ve ark., 2018)	22
Şekil 1.18: GFP proteininin 3-boyutlu moleküler yapısı.....	23
Şekil 2.1: GFP k/o plazmit haritası	29
Şekil 2.2: Kompetent hücrelerin buyume sırasındaki OD600 değeri grafiği.....	31
Şekil 2.3: GFP o/e plazmit haritası	34
Şekil 2.4: Virüs üretim aşamalarının şematik gösterimi	36
Şekil 3.1: WJ-MKH'lerinin farklı objektiflerdeki morfolojik bulguları.....	44
Şekil 3.2: Yabancı tip WJ-MKH'lerin mezenkimal yüzey belirteçleri kullanılarak qPZR ile karakterizasyonu yapıldı. CD90 mRNA seviyeleri, LDHA ekspresyon seviyelerine göre normalize edildi. İstatistiksel olarak bir fark görülmedi $p>0.05$	45

Şekil 3.3: Yabanıl tip WJ-MKH'lerin mezenkimal yüzey belirteçleri kullanılarak qPZR ile karakterizasyonu yapıldı. CD44 mRNA seviyeleri, LDHA ekspresyon seviyelerine göre normalize edildi. İstatistiksel olarak bir fark görülmedi $p>0.05$	46
Şekil 3.4: Yabanıl tip WJ-MKH'lerin mezenkimal yüzey belirteçleri kullanılarak qPZR ile karakterizasyonu yapıldı. CD106 mRNA seviyeleri, LDHA ekspresyon seviyelerine göre normalize edildi. İstatistiksel olarak bir fark görülmedi $p>0.05$	46
Şekil 3.5: Yabanıl tip WJ-MKH'lerin mezenkimal yüzey belirteçleri kullanılarak qPZR ile karakterizasyonu yapıldı. CD54 mRNA seviyeleri, LDHA ekspresyon seviyelerine göre normalize edildi. İstatistiksel olarak bir fark görülmedi $p>0.05$	47
Şekil 3.6: Yabanıl tip WJ-MKH'lerin mezenkimal yüzey belirteçleri kullanılarak qPZR ile karakterizasyonu yapıldı. HLA-DR mRNA seviyeleri, LDHA ekspresyon seviyelerine göre normalize edildi. İstatistiksel olarak bir fark görülmedi $p>0.05$	47
Şekil 3.7: GFP o/e plazmitlerinin transformasyonu sonrası oluşan koloniler	48
Şekil 3.8: GFP o/e plazmitlerinin izolasyonu sonrası agaroz jel görüntüsü	48
Şekil 3.9: GFP o/e plazmitlerinin izolasyonu sonrası DNA saflık ölçüm değerleri	49
Şekil 3.10: GFP k/o sgRNA sekanslarının GFP geni üzerindeki konumu	49
Şekil 3.11: GFP k/o sgRNA'lerin (Ran ve ark., 2013) metoduyla klonlanması sonucunda oluşan koloniler. Sol üst örnek negatif kontrol, diğer örnekler ise GFP genine karşı tasarlanmış sgRNA klonlanan örnekler.....	50
Şekil 3.12: GFP k/o sgRNA plazmitlerinin koloni PZR agaroz jel görüntüsü	50
Şekil 3.13: İzole edilen plazmit DNA'larının agaroz jel görüntüsü (1: GFP o/e kontrol plazmiti, 2: GFP o/e plazmiti, 3: GFP k/o scrambled plazmiti, 4: GFP k/o plazmiti)....	51
Şekil 3.14: Plazmit DNA: PEI oranının hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin WST-1 testi ile ölçülmesi	52
Şekil 3.15: qRT-PZR reaksiyonu çoğalma eğrisi A: Örnek içermeyen kontrol (NTC), B: Std-1, C: Std-2, D: GFP o/e, E: GFP o/e kontrol, F: GFP k/o, G: GFP k/o kontrol	53
Şekil 3.16: WJ-MKH hücrelerinin lentiviral transdüksiyonu sonrası GFP ekspresyonunun akım sitometrisi ile belirlenmesi.....	54
Şekil 3.17: HEK hücrelerinde GFP o/e lentivirüslerinin artan MOI oranlarında kullanılması ve elde edilen GFP sinyalinin floresan mikrokobi ile değerlendirilmesi...	55
Şekil 3.18: GFP overeksprese WJ-MKH hücrelerinin floresan mikroskopu görüntüleri (GFP ışınması ex; 488nm- em; 509 nm), ölçek çubukları 100 μ m.	56

Şekil 3.19: GFP k/o nakavt lentivirüsleri verilen WJ-MKH+GFP o/e hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüleri (GFP ışınması ex; 488nm- em; 509 nm), ölçek çubukları 100 µm.	57
Şekil 3.20: Genetiği değiştirilen WJ-MKH'lerin qPZR ile karakterizasyonu değerlendirildi. CD90 mRNA seviyeleri, LDHA ekspresyon seviyelerine göre normalizasyonu yapıldı. İstatistiksel olarak bir fark görülmedi $p>0.05$	59
Şekil 3.21: Genetiği değiştirilen WJ-MKH'lerin qPZR ile karakterizasyonu değerlendirildi. CD44 mRNA seviyeleri, LDHA ekspresyon seviyelerine göre normalizasyonu yapıldı. İstatistiksel olarak bir fark görülmedi $p>0.05$	60
Şekil 3.22: Genetiği değiştirilen WJ-MKH'lerin qPZR ile karakterizasyonu değerlendirildi. CD106 mRNA seviyeleri, LDHA ekspresyon seviyelerine göre normalizasyonu yapıldı. İstatistiksel olarak bir fark görülmedi $p>0.05$	61
Şekil 3.23: Genetiği değiştirilen WJ-MKH'lerin qPZR ile karakterizasyonu değerlendirildi. CD54 mRNA seviyeleri, LDHA ekspresyon seviyelerine göre normalizasyonu yapıldı. İstatistiksel olarak bir fark görülmedi $p>0.05$	62
Şekil 3.24: Genetiği değiştirilen WJ-MKH'lerin qPZR ile karakterizasyonu değerlendirildi. HLA-DR mRNA seviyeleri, LDHA ekspresyon seviyelerine göre normalizasyonu yapıldı. İstatistiksel olarak bir fark görülmedi $p>0.05$	63
Şekil 3.25: Genetiği değiştirilen WJ-MKH'lerin qPZR ile karakterizasyonu değerlendirildi. SOX2 mRNA seviyeleri, LDHA ekspresyon seviyelerine göre normalizasyonu yapıldı. İstatistiksel olarak bir fark görülmedi $p>0.05$	64
Şekil 3.26: Genetiği değiştirilen WJ-MKH'lerin qPZR ile karakterizasyonu değerlendirildi. POU5J1 mRNA seviyeleri, LDHA ekspresyon seviyelerine göre normalizasyonu yapıldı. İstatistiksel olarak bir fark görülmedi $p>0.05$	65
Şekil 3.27: Genetiği değiştirilen WJ-MKH'lerin qPZR ile karakterizasyonu değerlendirildi. ZFP42 mRNA seviyeleri, LDHA ekspresyon seviyelerine göre normalizasyonu yapıldı. İstatistiksel olarak bir fark görülmedi $p>0.05$	66
Şekil 3.28: Genetiği değiştirilen WJ-MKH'lerin qPZR ile karakterizasyonu değerlendirildi. TERT mRNA seviyeleri, LDHA ekspresyon seviyelerine göre normalizasyonu yapıldı. İstatistiksel olarak bir fark görülmedi $p>0.05$	67
Şekil 3.29: Genetiği değiştirilen WJ-MKH'lerin qPZR ile karakterizasyonu değerlendirildi. RUNX2 mRNA seviyeleri, LDHA ekspresyon seviyelerine göre normalizasyonu yapıldı. İstatistiksel olarak bir fark görülmedi $p>0.05$	68

Şekil 3.30: Genetiği değiştirilen WJ-MKH'lerin qPZR ile karakterizasyonu değerlendirildi. Nestin mRNA seviyeleri, LDHA ekspresyon seviyelerine göre normalizasyonu yapıldı. İstatistiksel olarak bir fark görülmedi $p>0.05$	69
Şekil 3.31: Genetiği değiştirilen WJ-MKH'lerin qPZR ile karakterizasyonu değerlendirildi. JAG1 mRNA seviyeleri, LDHA ekspresyon seviyelerine göre normalizasyonu yapıldı. İstatistiksel olarak bir fark görülmedi $p>0.05$	70
Şekil 3.32: Genetiği değiştirilen WJ-MKH'lerin qPZR ile karakterizasyonu değerlendirildi. PPAR γ mRNA seviyeleri, LDHA ekspresyon seviyelerine göre normalizasyonu yapıldı. İstatistiksel olarak bir fark görülmedi $p>0.05$	71
Şekil 3.33: Genetiği değiştirilen WJ-MKH'lerin qPZR ile karakterizasyonu değerlendirildi. Vimentin mRNA seviyeleri, LDHA ekspresyon seviyelerine göre normalizasyonu yapıldı. İstatistiksel olarak bir fark görülmedi $p>0.05$	72

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

AAV	: Adeno ile ilişkili virüs
Allo-MKH	: Allojenik mezenkimal kök hücre
ATCC	: American Type Cell Collection
BMP2	: Kemik morfogenetik proteini 2
Cas9	: CRISPR ile ilişkili protein 9
CD	: Cluster of differentiation
CD105	: Endoglin, SH2, TGFb-RIII
CD44	: CD44 molekülü (Hint kan grubu)
CD45	: Lenfosit ortak antijeni
CD90	: Thy-1
cDNA	: Komplementer DNA
CMV	: Sitomegalovirüs
CO₂	: Karbondioksit
CRISPR	: Düzenli aralıklarla kümelenmiş kısa palindromik tekrarlar
DEAE	: Diethylaminoethyl
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DSB	: Çift iplik kırığı
EF1α	: Translasyon uzama faktörü 1 α
ESC	: Embriyonik kök hücre
FACS	: Floresan aktive hücre sıralıyıcı
FITC	: Floresan izotiyosiyanat
FSS	: Fetal sığır serumu
GFP	: Yeşil floresan protein
GPI	: Glikosilfosfatidilinositol
GVHD	: Graft versus host hastalığı
HDR	: Homolojiye yönelimli onarım

ICAM1	: Hücreler arası yapışma molekülü 1
EİHK	: Embriyo iç hücre kitlesi
UPKH	: Uyarılmış pluripotent kök hücre
ISCT	: Uluslararası hücresel tedavi derneği
k/o	: Nakavt
LB	: Lizojen broth
LDHA	: Laktat dehidrojenaz A
LV	: Lentivirüs
MegN	: Meganükleaz
MHC	: Majör histo-uyumluluk kompleksi
MKH	: Mezenkimal kök hücre
MOI	: Multiplicity of Infection
Nes	: Nestin
NHEJ	: Homolog olmayan uç birleştirme
o/e	: Overekspres
Oct-4	: Oktamer bağlayıcı transkripsiyon faktörü 4
Oto-MKH	: Otolog mezenkimal kök hücre
P	: Pasaj
PAM	: Protospacer bitişik motif
PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PEI	: Polyethylenimine
pH	: Hidrojen değeri
POU5F1	: POU sınıf 5 homeobox 1
PPARγ	: Peroksizom proliferator-aktive edici gamma
PZT	: Polimeraz zincirleme tepkimesi
qRT-PZR	: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
RFP	: Kırmızı floresan protein
RNA	: Ribonükleik asit
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
RUNX2	: RunX ailesi transkripsiyon faktörü 2

sgRNA	: Rehber RNA
Sox-2	: Sex determining region Y-box 2
TAE	: Tris- Asetik asit- EDTA
TALEN	: Transkripsiyon aktivatör benzeri efektör nükleaz
TERT	: Telomeraz ters tranferaz
THY1	: THY-1 hücre yüzeyi antijeni
VCAM1	: Vasküler hücre yapışma molekülü 1
VIM	: Vimentin
WJ	: Wharton Jölesi
WST-1	: Suda çözünür tetrazolyum tuzu-1
YFP	: Sarı floresan protein
ZFN	: Çinko parmak nükleaz
ZFP42	: ZFP42 çinko parmak proteini

ÖZET

Ekici, ES. (2021). CRISPR-Cas9 gen düzenleme ile genetiği değiştirilmiş mezenkimal kök hücrelerinin üretimi ve karakterizasyonu. İstinye Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücre ve Doku Mühendisliği. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul, TÜRKİYE

Mezenkimal kök hücreler (MKH) bölünerek kendini yenileme ve daha özelleşmiş hücrelere dönüşebilme kapasitesine sahip multipotent hücrelerdir. Wharton Jölesi (WJ) MKH bakımından zengin jölemsi bir bağ dokusu içerdiğinden WJ-MKH'ler rejeneratif tıp ve hücre tedavide en çok kullanılan kök hücre türlerinden biridir. Ancak gen terapisi ile hastalıkların tedavisinde MKH kullanımı sınırlıdır. Bunun nedeni, genetiği değiştirilmiş MKH'ların yapımının zorluğundan kaynaklanmaktadır. Bu tez çalışması kapsamında; MKH tedavilerini bu alanda daha da iyileştirmek için CRISPR-Cas9 tekniği ile birden fazla kere genetiği değiştirilmiş MKH'lerin oluşturulması ve bu hücrelerin gen ifade seviyelerinin kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PZR) ile karşılaştırılması ve validasyonu amaçlanmıştır. Bu yöntem örneği olarak, ilk aşamada yeşil floresan proteinini (GFP) overekprese eden viral vektör transdüksiyonu ile GFP gen ifadesi sağlanan MKH'lerde, daha sonra ikinci bir lentivirüs transdüksiyonu ile GFP gen ifadesi nakavt edilmiştir. Floresan mikroskopu ile hücrelerin gerçek zamanlı takibi ve görüntülenmesi ile hücreler valide edilerek, MKH'lerde iki farklı transdüksiyon ile genetik modifikasyon taşıyan sağlıklı hücre hatları oluşturulmuştur. Bu hücre hatlarının kök hücre markerlerinin karakterizasyonunda yabancı tip MKH ile iki kez transdüksiyon yapılmış MKH'lerin ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir fark görülmemiştir. Bu çalışmanın sonucunda geliştirdiğimiz ve sunduğumuz optimizasyonlar ve yöntemler sayesinde ileride gen terapi alanında MKH'lerin kullanımına olanak sağlanacaktır.

Anahtar Kelimeler: Mezenkimal kök hücre, Gen düzenleme, CRISPR-CAS9, Gen Terapi

Bu çalışma, İstinye Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 2020/ B15

ABSTRACT

EKİCİ, ES. (2021). Generation and characterization of genetically modified mesenchymal stem cells by CRISPR-Cas9 gene editing. Istinye University, Institute of Health Sciences, Stem Cell and Tissue Engineering. Master Thesis. Istanbul, Turkey

Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent cells that have the ability to divide and proliferate into specialized cell types. Wharton's Jelly (WJ) contains a connective tissue that rich in MSCs. Although WJ-MSCs are one of the most widely used stem cell types in regenerative medicine and cellular therapy, their use in the treatment of diseases in gene therapy applications is limited. This is due to the difficulty of generating and producing genetically modified MSCs. Within the scope of this thesis; we aimed to create MSCs that harbor multiple genetic manipulations using CRISPR-Cas9 and other gene expression methods and compared and validated their stem cell marker gene expression levels using quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). At proof-of-concept, we first overexpressed green fluorescent protein (GFP) using lentiviral vector transduction to induce GFP gene expression and then knocked-out GFP protein expression using CRISPR-CAS9 lentiviral transduction against GFP gene. We measured stem cell specific gene expression markers in these cell lines using real-time pcr and performed further validation via imaging of the cells with fluorescence microscopy. We found no significant difference in stem cell marker expression or the health of cells between wild-type MSCs and genetically modified MSCs even after dual transduction. We hope that in the future, the optimizations and methods we have developed and presented here will enable further studies and use of genetically enhanced MSCs, especially in gene therapy applications

Key Words: Mesenchymal stem cell, Gene editing, CRISPR-CAS9, Gene therapy

This work was supported by Istinye University Scientific Research Projects Unit. Project No. 2020/B15

GİRİŞ

Rejeneratif tıpta kullanılan kök hücrelerin bir çok türü ve kaynağı bulunmakla birlikte uygun hücre tipinin seçilmesi olumlu klinik etkiler için önemlidir. MKH'ler yüksek çoğalma kapasitesi, kendini yenileme özellikleri, güçlü immünespresif ve rejeneratif etkileri nedeniyle hücresel terapi kaynağı olarak tercih edilmektedir.

İnsan göbek kordonu, fetüse besin yönünden zengin, oksijenli kan taşıyan bir ven ve kanı uzaklaştıran iki arter içerir. Aynı zamanda kan damarlarını çevreleyen ve koruyan jelatinli bir bağ doku olan Wharton Jölesi (WJ)'ne sahiptir. WJ kaynaklı MKH'lerin üç germ katmanına farklılaşma yetenekleri, immünmodülasyon özellikleri, klinikte ağrısız toplama prosedürleri, etik problem oluşturmamaları, doku onarımını teşvik etmeleri gibi özellikleri nedeniyle rejeneratif tıpta kullanımı öne çıkmaktadır (Karaöz ve ark., 2017; Taghizadeh ve ark., 2011).

MKH'lerin klinik uygulamalarında sağlıklı donörlerden elde edilen allojenik MKH'ler (allo MKH) laboratuvar ortamlarında izole edilerek hastalara nakledilmektedir. Bu hücreler vücuda girdikten sonra hasarlı dokulara göç ederek salgıladıkları sitokinler ve hormonlar ile hasarlı dokunun onarımını tetikler. Bu nedenle allo MKH'ler kök hücre temelli araştırmaları ve birçok hastalığın rejeneratif tedavisinde kullanılmaktadır (Elahi ve ark., 2020; Karaoz ve ark., 2019).

Geleceğin kök hücre tedavilerinde genetik manipülasyonlara ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak bu yöntemlerin gelişmesi ile hedeflenebilir, kontrol edilebilir ve rejeneratif kapasitesi arttırılmış kök hücrelerin oluşturulması sağlanabilir. Fakat genetik manipülasyonu son derece zor olan bu hücrelerde bunun sağlanması için yeni teknik ve yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir.

Kök hücrelerde gen manipülasyonu, genetiği değiştirilmiş organizmaların üretilmesi, gelişim çalışmaları ve hastalık modellemesi için özellikle ilgi çekicidir (K. Y. Chen & Knoepfler, 2016). Son yirmi yılda, genlerin düzenlenmesine veya transkripsiyon sonrası modifikasyonlar yoluyla gen ifadelerinin değiştirmesine olanak sağlayan çok sayıda moleküler teknik kullanımıştır. Bunların arasında, CRISPR teknolojisi basitliği, özgünlüğü ve terapötik yaklaşımlarda kullanımı nedeniyle tıbbın farklı alanlarında giderek daha önemli hale gelmiştir. CRISPR-Cas9 aracılı gen

düzenlemede kullanılan lentiviral vektörler, genetik kargoyu hedef hücrenin kromozomuna entegre etme yeteneğine sahip dağıtım araçlarıdır (Khan, 2019). Bu yöntem ile gen ifadesinin susturulması (nakavt), artırılması (overekspresyon) veya modüle edilmesi mümkündür ve bu çalışmada MKH'lerin genetik manipülasyonu için tercih edilmiştir. Çalışmamızda, yeşil floresan protein (GFP) genini overekspres (GFP o/e) ya da nakavt (GFP k/o) edecek iki ayrı CRISPR vektörü tasarlanarak klonlanmış ve bu vektörler kullanılarak MKH'lerde GFP geninin genetik manipülasyonuna izin verecek lentivirüsler ve kontrol virüsleri üretilmiştir. Daha sonraki aşamada, bu virüsler ile yabancı tip WJ-MKH'lerde viral transdüksiyon yöntemi kullanılarak GFP o/e ve GFP k/o hücre hatları oluşturulmuştur. GFP deneylerin takibini kolaylaştıran floresan bazlı bir belirteçtir ve hücreler floresan mikroskopi, optik görüntüleme ve akım sitometrisinde doğrudan incelenebilir ve bu nedenle tercih edilmiştir (Z. Yang ve ark., 2014).

Geleceğin yenileyici tıp çalışmalarında kullanılacak MKH'lerin birden fazla genetik manipülasyon içereceği ön görülmektedir. Bu yüzden, çalışmamızda ilk viral transdüksiyon sonrası elde edilen WJ-MKH+GFP o/e hücrelerine, GFP k/o vektör bazlı lentivirüsler ile ikinci kez transdüksiyon yapılmış ve antibiyotik seçilimi sonrası birden fazla genetik manipülasyon içeren MKH'ler elde edilmiştir. Daha sonra oluşturulan hücre hatlarından RNA izolasyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirilerek, kök hücre belirteçlerinin karakterizasyonu qPZR yöntemi ile doğrulanmıştır. Kök hücrelerin genetik modifikasyonlar sonrası klinikte uygulanabilmesi için bu karakterizasyon standartlarına uyması önemlidir. Yapılan qPZR analizlerinde, genetiği değiştirilen MKH'lerin yabancı tip MKH'lerle karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiş ve yaptığımız genetik modifikasyonlara rağmen hücrelerin kök hücre özelliklerini kaybetmedikleri sonucuna varılmıştır.

Bu tez çalışmasında; standart kök hücrelerden farklı olarak, genetiği değiştirilmiş kök hücrelerin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Gen düzenleme ve kök hücreleri bir araya getiren disiplinlerarası bu yaklaşım, ileride rejeneratif tıp ve gen terapi alanlarında önemli bir avantaj sağlayacaktır.

1. GENEL BİLGİLER

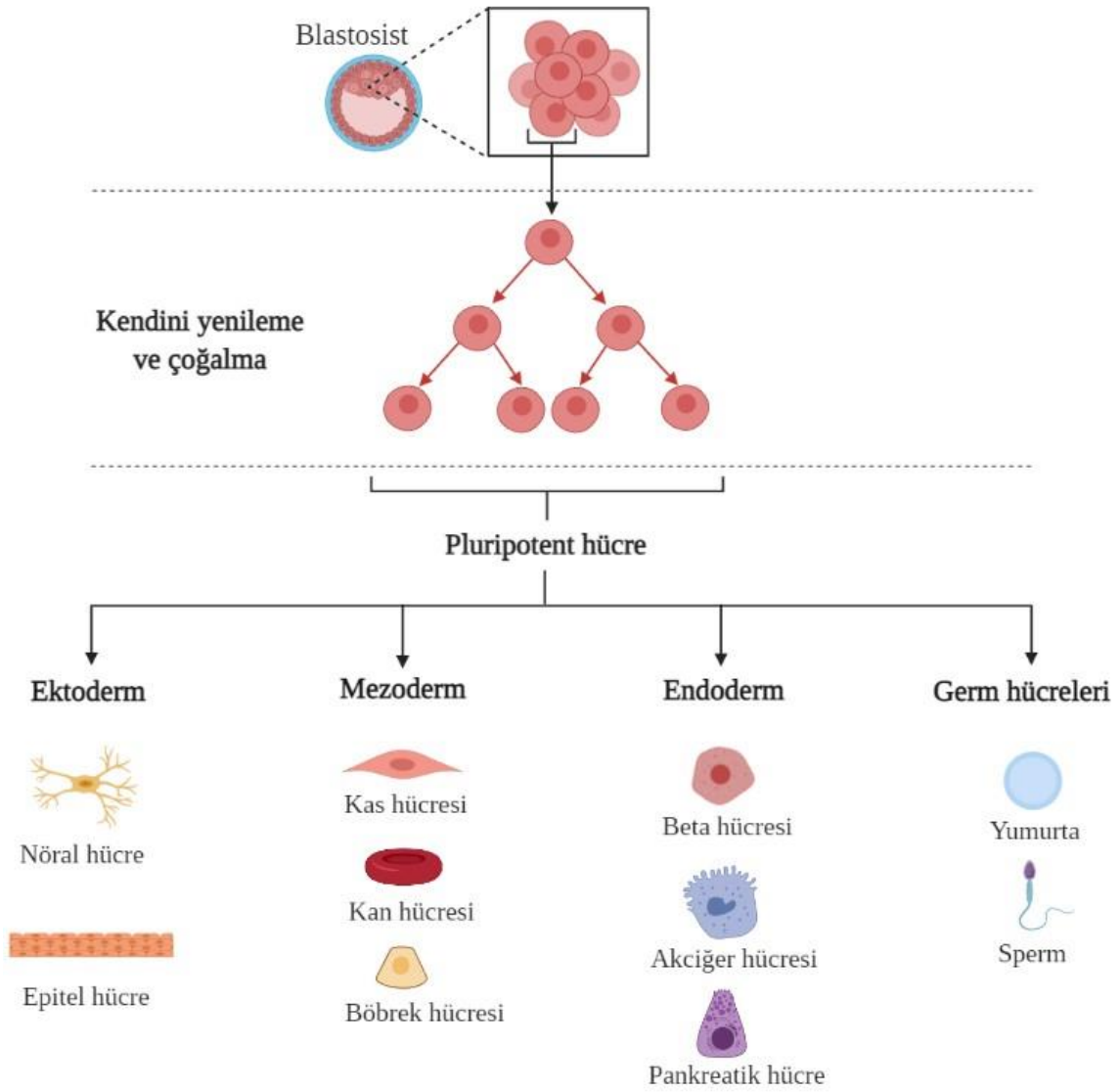
1.1. Kök Hücreler

Farklılaşma potansiyellerine göre kök hücreler:

Kök hücreler, kendi kendini yenileme yeteneğine sahip, birçok farklı hücre tipine farklılaşma potansiyeline sahip hücrelerdir. (Kolios & Moodley, 2013). En yüksek farklılaşma kapasitesine sahip olan totipotent hücreler, tüm organizma hücrelerini oluşturan üç germ tabakasına (endoderm, mezoderm, ektoderm) ve plasentaya dönüşebilen kök hücrelerdir (Rossant, 2001). Spermin yumurtayı döllemesinden sonra oluşan zigot totipotent bir hücredir. Totipotent durum, zigottan erken embriyonik blastomer evresine kadar korunur.

Plasenta oluşuktan yaklaşık dört gün sonra blastosistin iç hücre kütlesi pluripotent hale gelir ve erişkin vücudundaki tüm hücre tiplerine farklılaşabilme özelliğine sahiptir. Embriyonik kök hücreler (EKH) ve uyarılmış pluripotent kök hücreler (Induced pluripotent stem cell, UPKH) pluripotent hücre kaynaklarıdır. İlk kez Yamanaka ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada transkripsiyon faktörleri; Oct3/4, Sox2, Klf4 ve c-Myc'i kullanarak retrovirüs aracılı transfeksiyonu ile IPSC hücre hatları oluşturmuştur. UPKH hücreleri morfoloji, çoğalma, gen ekspresyonu, telomeraz aktivitesi açısından insan EKH ile benzerdir (Takahashi ve ark., 2007).

Multipotent kök hücreler, pluripotent kök hücreler kadar farklılaşma kapasiteleri olmayan farklı hücre soylarına dönüşebilen hücrelerdir. Hematopoietik kök hücrelerin kan hücrelerine dönüşebilmesi buna örnek gösterilebilir. Oligopotent kök hücreler ise sadece sınırlı ve birbirine yakın hücre tiplerine dönüşme kapasitesi olan hücrelerdir. Unipotent kök hücre, tek bir hücre tipine farklılaşma kapasiteleri olan hücrelerdir ve doku tamirinde de rol oynarlar (Kolios & Moodley, 2013)(Zakrzewski ve ark., 2019).



Şekil 1.1: Kök hücrelerin gelişim süresince geçirdiği farklılaşma potansiyellerini göstermektedir.

Elde edildikleri kaynaklara göre kök hücreler:

Kök hücreler embriyonik ve embriyonik olmayan hücreler olarak iki gruba ayrılır. EKH'ler blastokistlerin iç hücre kütesinden türetilir ve üç germ tabakasının tümüne farklılaşabilen pluripotent hücrelerdir (Rossant, 2001). Yapılan çalışmalarda teratoma oluşumu ve etik problemler nedeniyle yetişkin kök hücrelere göre dezavantajlı olduğundan klinikte EKH kullanımını kısıtlamıştır (Volarevic ve ark., 2018).

Embriyonik olmayan yetişkin kök hücreler grubunda ise yetişkin vücudunda beyin, kemik iliği gibi dokulardaki henüz farklılaşmamış , yetişkin veya MKH'lar bulunur. Bu hücrelerin organizmadaki işlevi hücrelerin rejenerasyonunu, büyümesini, yenilemesini ve tamirini sağlamaktır. Ancak yetişkin kök hücrelerin farklılaşma yetenekleri ve bölünebilme potansiyelleri sınırlıdır. Kan, adipoz doku, kemik iliği, amniyon sıvısı, kas doku, plesenta, deri, diş pulpası ve göbek kordonu yetişkin kök hücre kaynağı olarak kullanılabilir. Bu hücreler köken aldıkları dokuların hücrelerine ya da buldukları bölgede yeterli ve uygun miktarda uyarıcı faktör var ise ektodermal, endodermal, mezodermal soylara farklılaşabilirler (Wegmeyer ve ark., 2013).

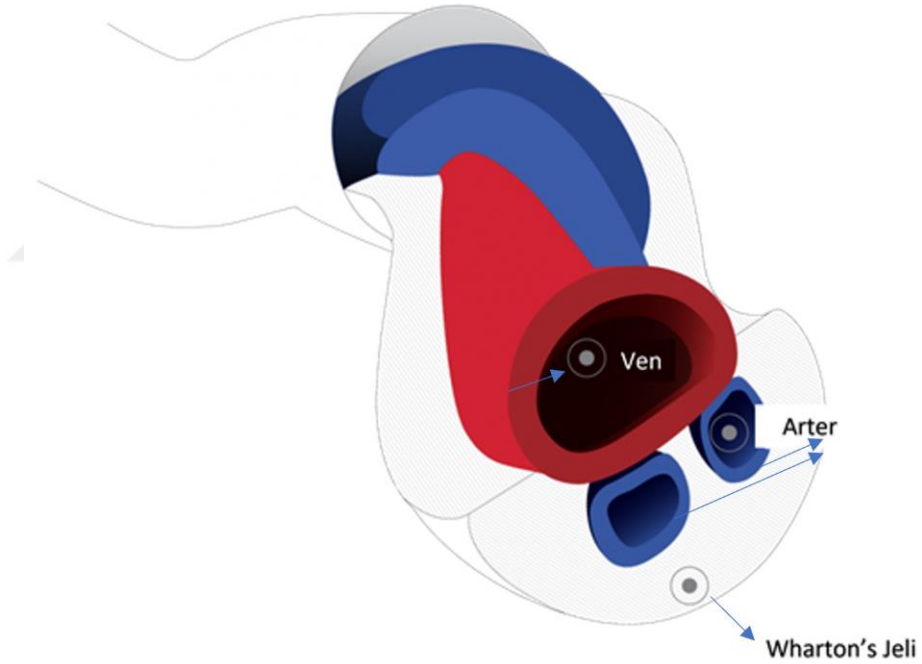
1.2. Mezenkimal Kök Hücre

MKH'ler *in vivo* ve *in vitro* uygun koşullarda farklı mezodermal hücre tiplerine (osteosit, kondrosit, adiposit, kas hücresi vb.) farklılaşabilen ve yüksek çoğalma kapasitesine sahip multipotent erişkin stromal hücrelerdir. Kemik iliği üzerinde 1960'larda yapılan çalışmalarda fibroblast benzeri morfolojideki bu hücreler ilk olarak "stromal kök hücreler" olarak adlandırılmıştır (Friedenstein ve ark., 1966; Owen & Friedenstein, 2007). Caplan ve arkadaşları 1991 yılında kendini yenileyebilen bu hücrelere "mezenkimal kök hücreler" adını vermiştir (Caplan, 1991). 2000'li yılların başında ise "mezenkimal stromal hücreler" de kullanılmaya başlanmıştır (Ugurlu & Karaoz, 2020).

MKH'lerin popülasyona ve izole edilen kaynağa göre karakterizasyon yöntemlerindeki farklı yaklaşımları engellemek için Uluslararası Hücresel Terapi Derneği (ISCT) 2006 yılında minimum üç ana kriter belirlemiştir:

- I MKH hücre kültürü koşullarında kültür kabına yapışmalıdır (adherent).
- II CD105, CD73 ve CD90 genlerinin ekspresyonlarını ifade etmeli, CD45, D14, CD19, CD34, CD45 ve CD79a'yı ise ifade etmemelidir.
- III Osteojenik, adipojenik ve kondrojenik hücre soylarına farklılaşabilmelidir (Dominici ve ark., 2006).

MKH'ler; kemik iliği, Wharton jölesi, periferik kan, göbek kordonu, yağ doku, adet kanı gibi birçok başka kaynaktan elde edilebilir. Wharton jölesi göbek kordonunun amniyotik epitel ile göbek damarları arasında yer alan ve iki arter bir ven ile çevrili müköz bağ yapısında bir dokudur. Wharton jölesi, burada bulunan damarların bükülmesinin baskılanması ile fetüsün beslenmesini ve oksijen alışverişini sağlar. (Ranjbaran ve ark., 2017).



Şekil 1.2: Kök hücre kaynağı olan Wharton Jölesi dahil insan göbek kordonu diyagramı, (Cryocord, 2021)

MKH'ler buna ek olarak buldukları dokularda sitokinleri serbest bırakarak inflamasyonu sınırlandırmak, büyüme faktörlerini ifade ederek iyileşmeye yardımcı olmak, immüno-modülatör proteinler salgılayarak konakçı immün yanıtını değiştirmek, endojen onarım hücrelerinden gelen tepkilerin artırılması rol oynar. (Phinney & Pittenger, 2017).

1.2.1. Rejeneratif Tıpta Mezenkimal Kök Hücreler

MKH'ler otoimmün, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Ullah ve ark., 2015). Bu hücrelerin tedavi edici potansiyeli, hücre soylarına farklılaşma kapasiteleri, hücrelerin hayatta kalması ve proliferasyonu için salgıladıkları faktörler, bağışıklık sistemine etkileri ve "hedef arama" mekanizmaları özelliklerinden kaynaklanır (Squillaro ve ark., 2016). MKH'lerin hedef arama mekanizması, hasarlı dokudan gelen sinyal molekülleri ve MKH reseptörlerinin doğru kombinasyonu sonucu hasarlı dokuya ulaşması ile gerçekleşir.

MKH'lerin farklılaşma potansiyelleri, doku onarımını teşvik etmeleri ve immünsüpresyon gibi biyolojik fonksiyonları rejeneratif tıp için ideal bir çözüm gibi görünse de, bu konuda hala aşılması gereken birçok engel ve dezavantaj vardır. Hücre bazlı tedavilerde kullanılan MKH'ler otolog; hastanın kendisinden alınıp üretilen ve hastaya geri verilmesi ya da allojenik; sağlıklı bir donörden alınarak hastaya nakil edilmesi şeklinde olur (Galipeau & Sensébé, 2018). Otolog MKH'lerin (oto-MKH) kullanımında hastadan yeterince hücre elde edilememesi, yaşlı donörlerden izole edilen hücrelerin çoğalma, farklılaşma, rejenerasyon kapasitelerinin azalmış olması, sistemik hastalığı olan donörlerden elde edilen hücrelerin aktivitesinin düşüklüğü ve otolog MKH'lerin üretiminin uzun zaman alması başlıca kısıtlamalar arasındadır (Turinetti ve ark., 2016).

Allojenik MKH'ler (allo-MKH) zaman, maliyet ve hücre kalitesi açısından oto-MKH'lere alternatiftir. Bazı çalışmalar, allo-MKH'lerin terapötik etkileri hakkında farklı sonuçlar elde etse de, allo-MKH'ler, immünosüpresif ve doku onarım terapisinde hala umut verici bir seçenektir (Zhang ve ark., 2015). Özellikle allo-MKH'lerin, prelinik ve klinik çalışmalarda allojenik kemik iliği nakillerinden sonraki en büyük sorun olan Graft Versus Host (GVHH) hastalığını hafifletebileceği bilinmektedir (Bozkurt ve ark., 2019).

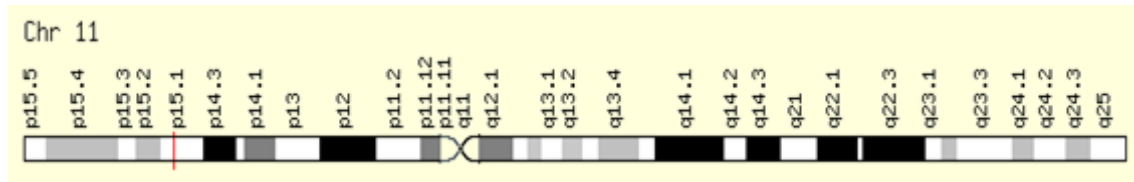
MKH'ler ile ilgili clinicaltrials.gov verilerine göre dünya genelinde sonuçlanmış bir çok klinik deneme mevcuttur. COVID-19, sinir sistemi hasarları, solunum sistemi, kardiyovasküler, otoimmün, kas-iskelet sistemi gibi bir çok hastalığın tedavisinde kullanılmıştır (Irmak ve ark., 2020; Karagöz ve ark., 2016).

MKH'ler sistemik ve topikal olmak üzere iki şekilde uygulanabilir. Uygulama yolları, MKH'lerin hastanın vücuduna girdikten sonra ilk karşılaştıkları mikro ortamları belirler ve hücrelerin farklılaşmalarını, immünojenitelerini ve hayatta kalmalarını etkiler. Uygulama yöntemine bağlı olarak hücre ve hasta arasındaki mekanizma net olmamakla birlikte, hastalık modellerine uygun uygulama yolları araştırılmaktadır (Nemeth, 2014).

1.3. Mezenkimal Kök Hücre Belirteçleri

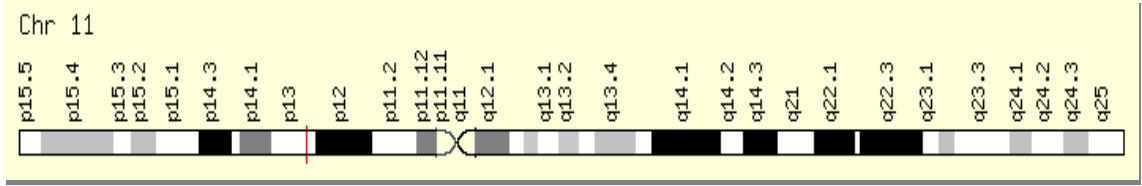
1.3.1. Yüzeysel Belirteçleri

LDHA: Hücre yaşamı için gerekli, bütün çekirdekli hücrelerde bulunan ve bir çok dokuda kararlı şekilde eksprese edilen referans genlerdendir ve qPZR yönteminde mRNA ekspresyonlarının normalizasyonu için kullanılır (Ragni ve ark., 2013). Laktat dehidrogenaz (LDHA), hemen hemen tüm vücut dokularında bulunan anaerobik metabolik yolun önemli bir enzimidir. LDHA ayrıca normal bir metabolik süreç olan doku döngüsünün spesifik olmayan bir belirteçidir. LDHA, NADH kullanarak piruvatın laktata geri dönüşümlü dönüşümünü katalize eden H transfer (oksidoredüktaz) enzimlerinden biridir. Temel olarak enzim, oksijen olmadığında veya sınırlı miktarda olduğunda glikozun anaerobik metabolizmasında yer alır (Farhana & Lappin, 2021).



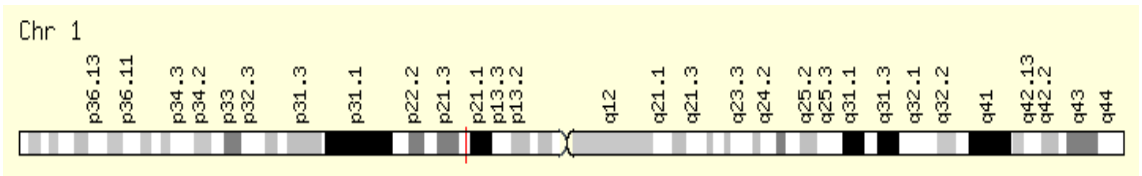
Şekil 1.3: LDHA geninin genomik lokasyonu

CD44: Hücre-hücre etkileşimleri, hücre yapışması ve hücre göçünü etkileyen hücre yüzey glikoproteinidir. İltihaplanma, anjiyogenez, kemik metabolizması ve yara iyileşmesi dahil olmak üzere göç eden hücreleri içeren çeşitli biyolojik süreçlerle ilişkili, yaygın olarak eksprese edilen bir yapışma reseptörüdür. Temel ligandı olan hyalüronik asiti (HA) yüksek miktarda içerir ve bu sayede göbek kordonuna en yüksek HA içeren doku olma özelliğini kazandırır.



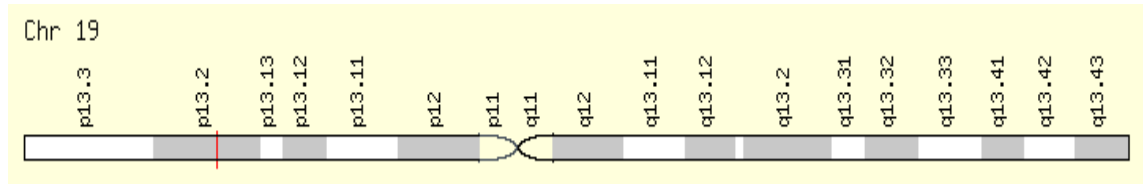
Şekil 1.4: CD44 geninin genomik lokasyonu

CD106 (Vcam1): Hücre yapışması ve hücre-hücre etkileşimlerinde rol alan bir yapışma molekülüdür. Tip I membran proteini olan CD106, lökosit-endotel hücre yapışmasına ve sinyal transdüksiyonuna aracılık ederek MKH immünosupresyon etkilerinde kritik rol oynar. Ayrıca CD106, kardiyak mikrovasküler endotelyuma yapışma yoluyla MKH'lerin kalbe yönlendirilmesini düzenler ve böylece kardiyak yaralanma onarımına yardımcı olur. (Z. X. Yang ve ark., 2013).



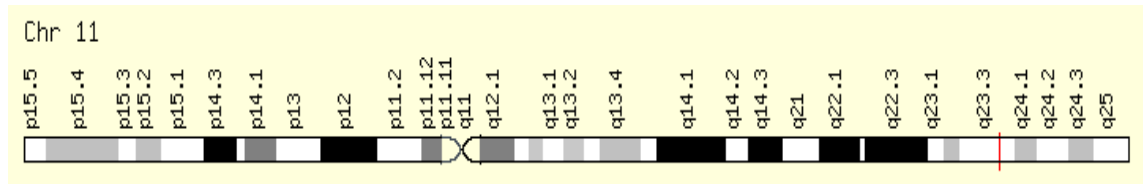
Şekil 1.5: CD106 geninin genomik lokasyonu

CD54 (Icam1): Hücre-hücre etkileşimlerinin stabilize edilmesinde önem taşır. Endotelial hücrelerde ve bağışıklık sisteminin hücrelerinde eksprese edilen bir hücre yüzeyi glikoproteinini kodlar. MKH aracılı immünosupresyonda adezyon moleküllerinin kritik bir rolü vardır (T. Chen ve ark., 2021). CD106 ve CD54'ün fazla ekspresyonu MKH'lerin immünosupresyon kapasitesini arttırdığı bilinmektedir. CD106 ve CD54'ün aracılık ettiği hücre-hücre yapışması, T hücresi aktivasyonu ve iltihaplanma bölgesine lökosit alımı sağlarlar ve bu nedenle etkili bağışıklık tepkilerinin uyarılmasında önemlidirler (Z. X. Yang ve ark., 2013).



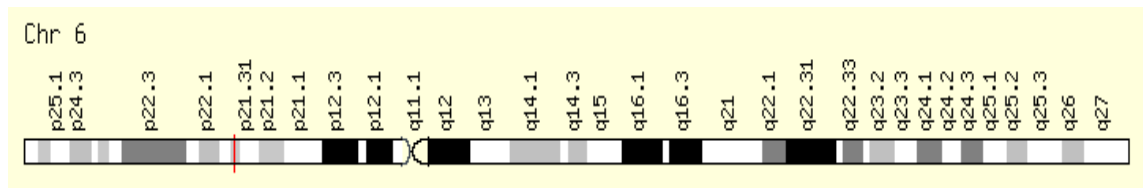
Şekil 1.6: CD54 geninin genomik lokasyonu

CD90 (Thy1): CD90, osteoprogenitör hücrelerle bağlantılı bir 25-37 kDa glikosilfosfatidilinositol (GPI) bağlı zar proteinidir. Hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerine katılırlar. MKH karakterizasyonu için pozitif bir belirteç olarak yaygın olarak kullanılır. Çok sayıda hücre tipinde ancak özellikle sinir ve bağışıklık hücrelerinde hücre yapışması ve hücre iletişimde rol oynar (Wiesmann ve ark., 2006).



Şekil 1.7: CD90 geninin genomik lokasyonu

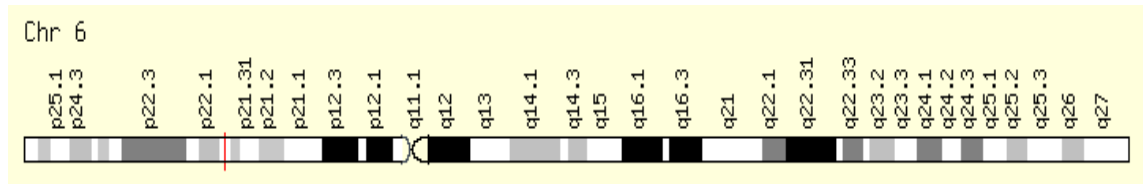
HLA-DR: HLA sistemi, birçok hayvanda bulunan büyük doku uyumluluk kompleksinin (MHC) insan versiyonu olarak da bilinir. İmmün tanımda yabancı antijenlerle vücudun kendi antijenlerinden ayırt etme görevi T hücre aracılı immün yanıtının yönünü belirleyen antijen sunucu hücrelerin yüzeyinde bulunan bu moleküllere düşmektedir. MHC I (HLA- A, B, C) moleküllerinin görevi virüsler, intrasitoplazmik antijenleri CD8+ sitotoksik T hücrelerine sunmaktır. MHC II molekülleri ise endositozla alınan bakterileri CD4+ yardımcı T hücrelerine sunarlar. MKH'ler MHC sınıf I moleküllerini düşük seviyede ifade ederler, MHC sınıf II moleküllerini ifade etmezler.



Şekil 1.8: HLA-DR geninin genomik lokasyonu

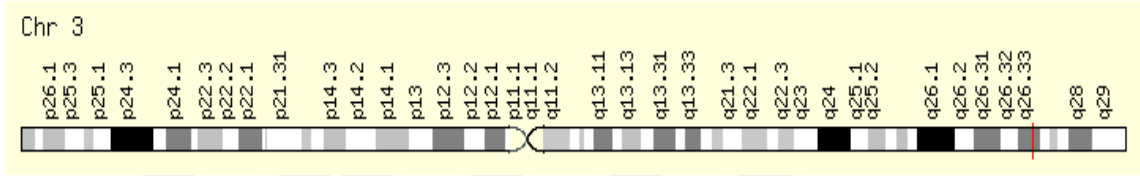
1.3.2. Pluripotensi Genleri

Oct-4 (POU5F1): İnsanda 6. kromozomda yer olan Oct-4 geni, DNA'da bulunan ATGCAAT dizisine bağlanarak diğer genlerin ekspresyonunu düzenler. Bu düzenleme ile birlikte erken embriyolarda pluripotensinin ve kök hücrelerin kendi kendini yenileme süreçlerinde rol oynar. Embriyo iç hücre kitlesi (EİHK) oluşumu için gerekli olan Oct-4, oogenez ve preimplantasyon gelişimi boyunca eksprese edilir, blastosist aşamasında EİHK ile sınırlı hale gelir. Daha sonra gelişen germ hücreleriyle sınırlı kalmadan önce erken epiblast boyunca eksprese edilir. Bu nedenle, pluripotentliğe sahip hücrelerin düzenlenmesini ve hedeflerini anlamak için kilit bir belirteçdir (Musiał-Wysocka ve ark., 2019).



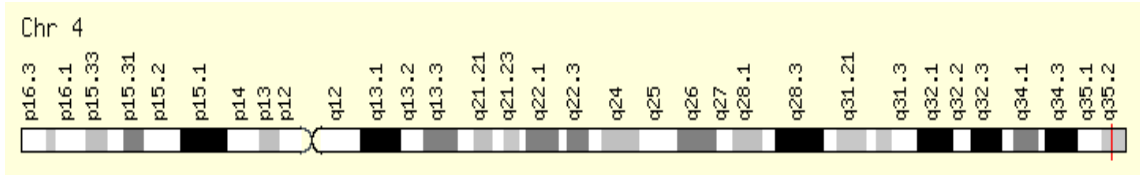
Şekil 1.9: Oct-4 geninin genomik lokasyonu

Sox-2: SoxB1 transkripsiyon faktörü ailesinin bir üyesi olan Sox2, pluripotent kök hücrelerde önemli bir transkripsiyonel düzenleyicidir. Sox2 gelişmekte olan bir embriyonun iç hücre kütesinin pluripotent hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilir . Oct4 ve Nanog geni ile birlikte embriyonik kök hücrelerde gen ekspresyonunu kontrol ederek pluripotensinin korunmasında rol oynamaktadır (Takahashi ve ark., 2007). Sox2 ekspresyonunun düzensizliği çok sayıda kanser türü ile ilişkilidir. Sox2'nin çoğalma, göç etme, istila etme ve metastaz yapma kapasitesi gibi kanser hücresi özelliklerini olumlu yönde etkilediği gösterilmiştir (Novak ve ark., 2020).



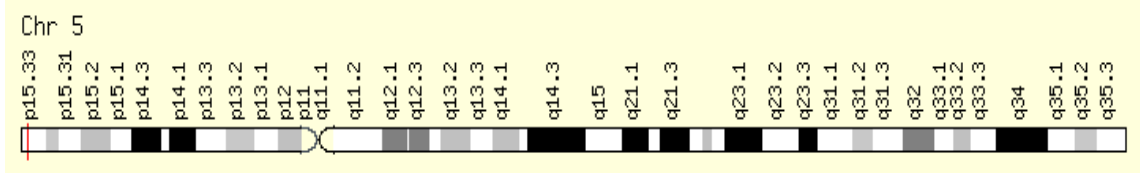
Şekil 1.10: Sox-2 geninin genomik lokasyonu

Zfp42 (Rex1): Farklılaşmamış kök hücrelerde bulunur ve bu gen tarafından kodlanan 310 aminoasit uzunluğundaki Rex1 proteini bilinen bir pluripotensi belirteçidir. Pluripotensi belirteci olmasının yanı sıra Oct-4'ün hedef geni olup pluripotensinin sürdürülebilirliği içinde gereklidir (Scotland ve ark., 2009). Ayrıca kemik iliği, kas ve beyinden izole edilen birkaç multipotent yetişkin progenitör hücrede Rex-1 ekspresyonu olduğunda gösterilmiştir (Jiang ve ark., 2002).



Şekil 1.11: ZFP42 geninin genomik lokasyonu

TERT: 5.kromozomun kısa kolunda bulunan TERT geninin kodladığı telomeraz, enzim aktivitesi ile kromozom ucuna TTAGGG'nin ekleyerek telomer uçlarını koruyan bir ribonükleoprotein polimerazdır. TERT geninin aşırı aktif olması telomer uzunluğunu koruyabilir. Gamet öncüsü hücrelerde, embriyonik kök hücrelerde ve malign hücrelerde telomeraz enzim etkinliği yüksektir. Ayrıca kök hücrelerin kendini yenileme özelliklerinden sorumludurlar (Flores & Blasco, 2010).

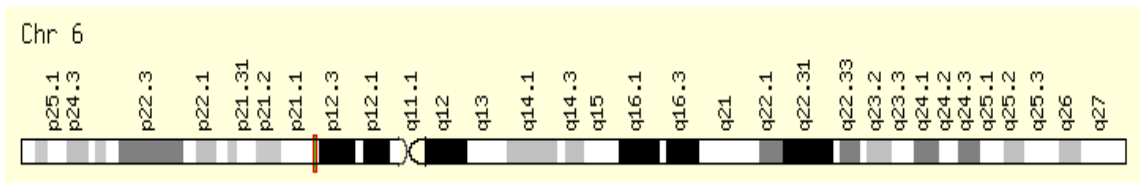


Şekil 1.12: TERT geninin genomik lokasyonu

1.3.3. Farklılaşma Belirteçleri

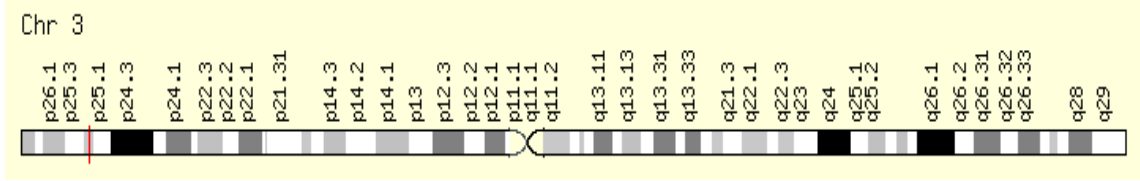
MKH'lerin farklılaşma kapasitesi hem içsel hücre koşullarına hem de ait oldukları mikro çevreye bağlıdır. Bu nedenle, farklı doku kaynaklarından gelen MKH'ler arasında farklılaşma oranlarında farklılıklar gözlemlenebilir.

Runx2: Osteojenik farklılaşmada etkili progenitör bir belirteçdir. MKH'leri osteoblast öncesi farklılaşmaya yönlendirir ve adipojenik ve kondrojenik farklılaşmayı engeller. Runx2 geninin mutasyonu ve eksikliği, anormal kemik gelişimi ve büyümesine önemli ölçüde neden olabilir. Runx2 susturma veya aşırı ifade de osteogenezi etkileyebilir (Xu ve ark., 2015). Runx2'nin ifadesi, Wnt, BMP ve Notch sinyal yolları gibi birçok sinyal yolu tarafından düzenlenir (Almalki & Agrawal, 2016).



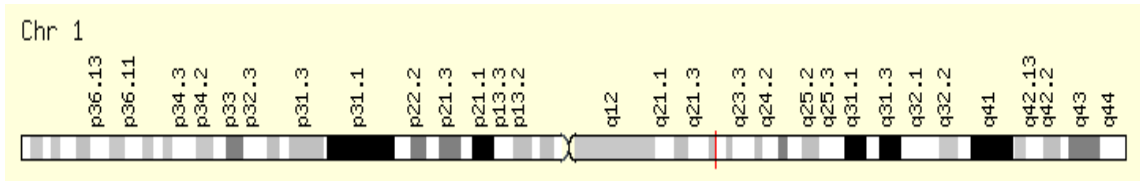
Şekil 1.13: Runx2 geninin genomik lokasyonu

PPAR γ : PPAR γ nukleer hormon reseptörü gen süper ailesine ait ligandla aktive olan bir transkripsiyon faktörüdür. Bu nukleer reseptör lipid ve glikoz homeostazında yer alan genlerin ifadesini kontrol ederek adipogenezin ana düzenleyicisi olarak kabul edilir (Yu ve ark., 2012). PPAR γ 'nin ifade ve farklılaşması, tip 2 diyabet, obezite, ateroskleroz, kanser ve lipodistrofik sendromlar gibi hastalıklarlada ilişkilendirilip farklı çalışmalar yapılmıştır (Rosen & Spiegelman, 2001).



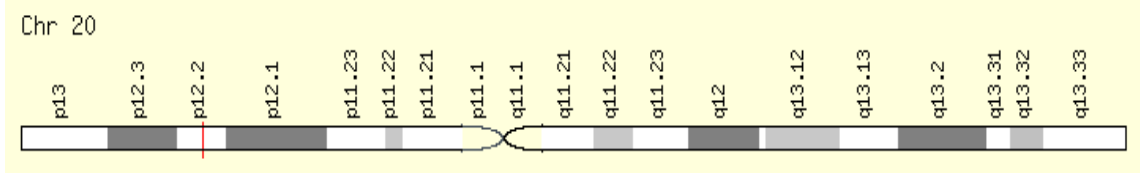
Şekil 1.14: PPAR γ geninin genomik lokasyonu

Nestin: Merkezi sinir sistemi, periferik sinir sistemi, miyojenik ve diğer dokulardaki gelişimin erken aşamalarında bölünen hücrelerde eksprese edilen bir ara filament proteinidir. Nöral kök hücreler için bir protein belirteçidir (Hoffman, 2007). Embriyogenez sırasında göç eden ve çoğalan hücrelerde ifade edilirken, yetişkin dokularda nestin esas olarak rejenerasyon alanlarıyla sınırlıdır (Wislet-Gendebien ve ark., 2005).



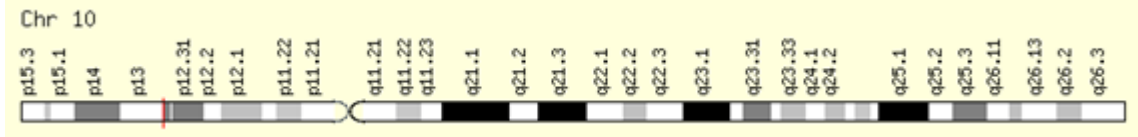
Şekil 1.17: Nestin geninin genomik lokasyonu

Jag1: MKH'lerde aktif olan Notch reseptörünün bağlandığı beş ligand'dan biridir. Notch-JAG1 sinyal aktivasyonu MKH'lerde kardiyomiyosit farklılaşmasına neden olur. Jag1 gen mutasyonları alagille sendromu, kanser ve konjenital kalp hastalıkları ile ilişkilidir (H. Li ve ark., 2006).



Şekil 1.18: Jag1 geninin genomik lokasyonu

Vimentin: Vimentin geni tip III ara filament proteinini kodlar. Ara filamentler, mikrotübüller ve aktin mikrofilamentleri ile birlikte hücre iskeletini oluşturur. Vimentin kararlı olmayan, değişken bir yapıya sahiptir ve mikrotübüller arasında sıkı ilişkiler vardır. Kodlanmış protein, hücre şeklini ve sitoplazmanın bütünlüğünü korumaktan ve hücre iskeleti etkileşimlerini stabilize etmekten sorumludur (Pattabiraman ve ark., 2020).



Şekil 1.15: Vimentin geninin genomik lokasyonu

1.4. Hücrelerde Genetik Manipülasyon ve Gen Düzenleme

Hücrelerin genetik yapısını değiştirmek için hücre genomunda değişikliklerin yapılması gereklidir. Bunun günümüzde birçok farklı metod bulunmaktadır ve kullanım alanları, özellikleri ve uygulamadaki kolaylıkları farklılık göstermektedir. Bu metodların ana fikri genomda oluşturulan kırıklar ve bu kırıkların tamirinin araştırmacının istediği şekilde yönlendirilmesidir.

Çift zincirli kırılmalarının (DSB) doğru ve verimli tamiri genom stabilitesi için oldukça önemlidir. Onarılmayan DSB'ler kromozom kaybına veya hücre ölümüne, yanlış onarılan DSB'ler ise mutasyonlara ve yeniden düzenlemelere sebep olarak kansere yol açabilir (Dudáš & Chovanec, 2004). Ökaryotik hücrelerde, DSB'lerin onarımı serbest uçların homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) veya tek ya da çift zincir kırıklarını kalıp olarak kullanan DNA tamir mekanizması homolojiye yönelimli onarım (HDR) olarak iki yolla gerçekleşebilir (Yip, 2020). NHEJ ve HDR yolları arasındaki bu seçim hücre döngüsü aşamasına bağlıdır. NHEJ tüm hücre döngüsünün fazlarında, HDR sadece S ve G2/M fazlarında aktiftir (Mao ve ark., 2008). NHEJ onarım mekanizması sınırlı homoloji kullandığı için nokta mutasyonları veya lezyon bölgesinde ekleme-silme yapabilir. Hataya açık bir süreç olduğundan genellikle genetik nakavtlar için uygun değildir.

Bu mekanizmalara ek olarak hücrenin genomunda gerçekleştirilecek manipülasyonu yapacak enzim ve/veya diğer faktörlerin de göz önünde bulundurulması gerekir. Gen düzenleme teknolojilerinde meganükleazlar (MegN), çinko parmak nükleazları (ZFN), transkripsiyon aktivatör benzeri efektör nükleazlar (TALEN) ve düzenli aralıklarla kümelenmiş kısa palindromik tekrarlar (CRISPR) / CRISPR ile ilişkili protein 9 (Cas9) (CRISPR-Cas9) olmak üzere dört temel yöntem vardır.

Prensip olarak TALEN, ZFN ve MegN yöntemleri benzerdir çünkü protein-DNA etkileşimleri yoluyla spesifik DNA dizilerini tanırlar (Khalil, 2020). ZFN'ler FokI endonükleazıyla spesifik gen lokusuna bağlanacak şekilde tasarlanır. DNA'daki spesifik bölgeyi tanıyan ZFN'ler çift zincirli DNA'yı ikiye böler ve HDR başlatılır. Hedefe yönelik ZFN tasarımında ve üretiminde sentez süresinin uzun olması ve her genomik lokusa uygun ZFN çiftlerinin tasarlanması gerektiği için çoğunlukla tercih edilen bir yöntem değildir. TALEN'ler, ZFN'lere alternatif ve daha verimli bir düzenleme

yöntemi olarak ortaya çıkmıştır. Fokl nükleazıyla kaynaştırılan *Xanthomonas spp* bakterisinden izole edilmiş TALE sayesinde, TALEN'lerin DNA'da bağlanacağı diziyi spesifik olarak hedeflenmesi mümkün olmuştur (Joung & Sander, 2013). Ancak bu yöntemde de ZFN'lerde olduğu gibi süreç uzun ve zordur ve kullanımını kısıtlıdır.

CRISPR-Cas9 gen düzenleme yöntemi diğer metodlara alternatif olarak geliştirilmiştir. Bu yöntemin tasarımı, kullanımı ve uygulaması diğer yöntemlere göre çok daha kolay ve avantajlıdır ve bu sayede gen düzenlemeyi birçok araştırmacının kullanımına sunmuştur. Özellikle son zamanlarda CRISPR sistemi yüksek düzenleme verimliliği ve düşük maliyet avantajları ile güçlü bir gen manipülasyon tekniği olarak ortaya çıkmıştır (Doudna & Charpentier, 2014)

1.4.1. CRISPR-CAS9 ile Genlerin Susturulması

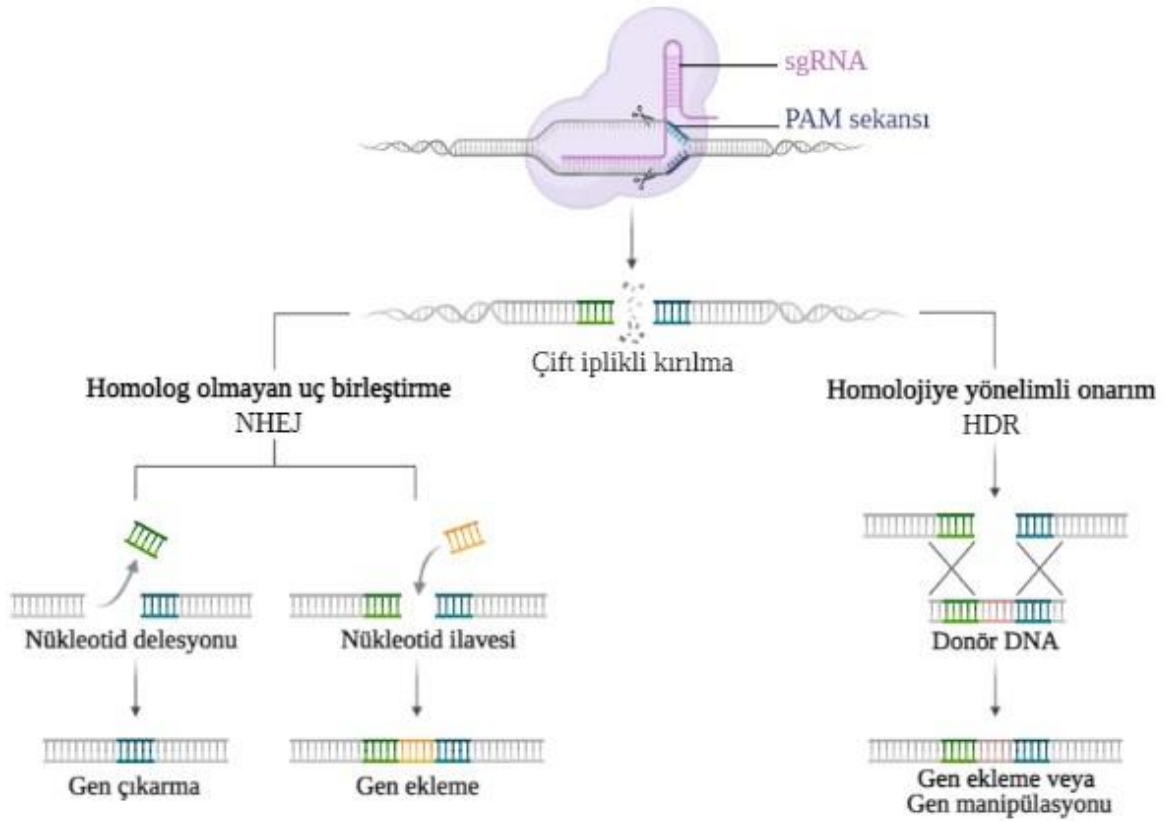
CRISPR *Streptococcus pyogenes* bakterisinin incelenmesiyle ortaya çıkmış ve bu bakterilerin antiviral bağışıklık sistemi olarak tanımlanmıştır. Diğer faktörleri ile birlikte bu sistem bir prokaryotik adaptif bağışıklık sistemidir ve hücreye giren virüslerin genomik materyallerinin parçalanmasında rol alır (Ishino ve ark., 1987).

2016 yılında CRISPR-Cas9 kullanan ilk klinik çalışmada, akciğer kanseri tedavisinde T hücrelerini yeniden aktive etmek için PDL-1 geni nakavt edilmiştir. Bu klinik denemeden sonra genetik bozukluğa bağlı olan hastalıkların tedavisi için potansiyel bir yöntem olmuştur (Cyranoski, 2016).

CRISPR-Cas9 sistemi iki ana bileşene dayanır: bir kılavuz RNA (sgRNA) ve CRISPR ile ilişkili (Cas) nükleazdır. sgRNA hedef sekansı tanıyarak ve Cas9 nükleazın bağlanması için iskele görevi görür. sgRNA 17-20 baz uzunluğunda bir nükleotid dizisidir. Tasarlandıktan sonra sentetik olarak *in vivo* veya *in vitro* olarak oluşturulur. Cas9, sgRNA ile RNA:DNA heterodupleks oluşturur ve bu sekansa bağlı olarak hedeflenen bir endonükleazdır (Gilbert ve ark., 2013).

Cas9 nükleaz, sadece sgRNA sekansı ile hedeflenen DNA dizisine ve bu dizinin yanında yer alan, protospacer bitişik motif (PAM) olarak adlandırılan spesifik bir sekans varlığında bağlanır ve PAM dizisinin yanından 3-5 uzaklıkta kesim yapar. sgRNA ve PAM dizisi olmadığında CAS9 enzimi hedef diziyeye bağlanamadığından kesim işlemi gerçekleşmez (Jinek ve ark., 2014). Her ne kadar insan genomunda çok

miktarda bulunan ve 5'-NGG-3' dizilimine sahip PAM sekansları CAS9 aracılı gerçekleşen nakavt veya modifikasyon için her zaman doğru konumlanmış değilse de, sgRNA tasarımı mümkün olduğunca hedef bölgeye spesifik sekanslar tasarlanması gerekir. Aksi takdirde genomun başka bir yerini sgRNA hedefleyebilir ve bu da “off-target” yani hedef dışı mutasyonlara yol açabilir (Kleinstiver ve ark., 2015).



Şekil 1.16: NHEJ ve HDR gen düzenleme yöntemlerinin karşılaştırılması

CAS9 ve sgRNA ile hedeflenen bölgede DNA’da kırıklar oluştuğundan sonra hücrenin doğal tamir mekanizmaları devreye girer. Ancak, bu tamirler çoğunlukla doğru değildir ve tamir sırasında nükleotid eklenmesine ya da çıkarılmasına yol açar. Bu da genden sentezlenen mRNA’ların ribozomda okunması sırasında “frame-shift” olarak adlandırılan yanlış amino asit zincirlerinin sentezlenmesi ile sonuçlanır. Bu zincirler doğru sıralamaya sahip olmadıkları için fonksiyonel bir protein oluşturulmaz ve genin protein bazında ifadesi susturulmuş olur.

1.4.2. Gen Aktarımı ile Yabancı Genlerin Ekspresyonun Sağlanması

Gen düzenleme metodlarından biri de hücrede normalde olmayan bir genin ya da halihazırda var olan bir genin ekstra kopyasının ifade ettirilmesidir. Bu gibi çalışmalarda istenen genin önce taşıyıcı bir plazmit vektörüne klonlanması ve daha sonra viral olan ya da olmayan yöntemlerle hücrenin içine gönderilmesi gerekir (Hamann ve ark., 2019).

Hedef transgen ekspresyonunu verimli bir şekilde sağlanması genin ekspresyonunu sağlayacak promotör seçiminde bağlıdır. Bu promotörlerin seçimi kullanılacak hücre tipine ve hedeflenen ekspresyon seviyesine göre tercih edilir. Örnek olarak, bu çalışmada MKH hücrelerinde GFP ekspresyonu için kullandığımız yüksek ekspresyon seviyesine sahip sitomegalovirüs (CMV) promotörü bir başka hücre hattında toksik etki gösterebilir. Bu nedenle farklı promotörlerin denenmesi ve en uygun olanın kullanılması önerilir. Ekspresyonu düşük tutulması için transkripsiyon uzama faktörü 1α (EF1 α) veya tavuk bata-aktin (CAG) promotörü tercih edilebilecek diğer promotörlerdendir (Ghaneialvar ve ark., 2019).

1.4.3. CRISPR ve diğer Gen Aktarım Metodları

Verimli bir gen düzenleme için CRISPR-Cas9 ve sgRNA sisteminin ya da ekspresyonu hedeflenen diğer genlerin hücrelere aktarım metodu önemlidir. Gen susturulması çalışmalarında kullanılan CAS9 proteininin moleküler ağırlığı yaklaşık 160 kDa'dır ve sgRNA ile bir RNP kompleksi oluşturduktan sonra, sgRNA'nın uzun fosfat omurgası bu komplekse negatif yük verir. Bu özelliklerin her ikisi de RNP'nin hücre zarını geçmesini zorlaştırır (Sun ve ark., 2015). Dolayısıyla ile CAS9 ve sgRNA'nın hücre içinde üretilmesi ya da geçişi kolaylaştıracak yöntemlerle hücre içine sokulması gerekir. Ayrıca, hücrelerin içine girdikten sonra gen düzenlemesini sağlamak için, hem CAS9 proteini hem de sgRNA hücredeki bozunma süreçlerinde hayatta kalmalıdır. Bu nedenle, CRISPR-Cas9 sistemi için uygun bir dağıtım stratejisi seçmek, verimli ve hassas bir gen düzenlemesi elde etmek için kritik öneme sahiptir (Yip, 2020).

Transfeksiyon yöntemi hücrelerin içerisine istenen genlerin taşıyıcı bir plazmit vektörü içinde taşınması ve geçici olarak eksprese edilmesi için kullanılır. Ancak bu yöntemin verimliliği hedeflenen hücre tipine bağlıdır. En yaygın kullanılan ve transfekte edilmesi en kolay hücreler HEK293, HeLa, A549, Jurkat gibi ölümsüzleştirilmiş hücre tipleridir. Birincil hücreler ve MKH'ler gibi kök hücreler daha hassastır ve genellikle transfeksiyondan sonra daha düşük canlılığa sahiptirler. Ayrıca birincil hücrelerin sınırlı sayıda hücre bölünmesi kapasiteleri olduğundan, CRISPR bileşenlerinin çekirdeğe girmesi için daha az fırsat vardır ve bu hücrelerin tipik olarak transfekte edilmesi zordur ya da verimsizdir.

Transfeksiyon yöntemleri genel olarak viral olmayan (fiziksel ya da kimyasal) ve viral aracılı kategoriler halinde sınıflandırılabilir. Her yöntemin verimlilik, ekipman ve maliyet açısından farklı avantajları ve dezavantajları vardır.

Viral olmayan vektörlerle transfeksiyon:

Bu yöntem liposomal, katyonik polimerler ve elektroporasyon gibi metodlar ile yapılabilir ve viral vektörlerden daha az toksik ve immünojeniktir (Yin ve ark., 2014). Viral olmayan vektörlerle genom düzenlemede temel zorluklar hedeflenen dokuda düşük transfeksiyon verimidir (L. Li ve ark., 2018). Lipofeksiyon, az toksisiteye sahip kolay ve ekonomik bir yöntemdir. Lipozomlar, sulu çözeltilerde oluşan lipit çift katmanlarından oluşan küresel yapılardır ve gen iletimi, lipozomun büyüklüğüne, yapısına ve miktarına bağlıdır (Da Silva ve ark., 2010).

Katyonik polimerler, negatif yüklü nükleik asitleri elektrostatik çekim yoluyla yoğunlaştırır, bozunmadan korur ve genomik düzenleme için taşınmalarını kolaylaştırır. Örneğin Polyethylenimine (PEI), CRISPR bileşenlerinin teslimi için yaygın olarak kullanılan bir katyonik polimerdir. Moleküler ağırlığı, dallı yapısı ve yüksek katyonik yükü transfeksiyon verimini ve toksisiteyi belirleyen unsurlardır (Wightman ve ark., 2001). Gen iletimi için yaygın kullanılan diğer katyonik polimerler diethylaminoethyl (DEAE) ve FuGENE'dir (Tang ve ark., 2020). Katyonik polimerlerin uygulamaları kolaydır, ancak yüksek oranda kullanıldığında toksiktir ve transfeksiyon verimliliği hücre tipine göre değişir.

CAS9 nükleaz enziminin hücrelere verilmesi için mikroenjeksiyon ve elektroporasyon gibi fiziksel yöntemler de vardır ve bu yöntemler *in vivo* ve *in vitro* olarak farklı hücre hatlarına uygulanabilir (Chandrasekaran ve ark., 2018). Popüler bir fiziksel dağıtım yöntemi olan elektroporasyon ile gen düzenleme yönteminde hücreye elektriksel bir akım uygulanarak membran geçirgenliği geçici olarak artırılır ve istenilen makromolekülün hücre içine membranda açılan porlardan difüzyon yoluyla girmesi sağlanır. Elektrik akımı durduğunda membran eski potansiyeline geri döner ve porlar kapanır. Birincil hücreler gibi transfekte edilmesi zor hücre tiplerinde standart transfeksiyon yöntemlerine göre avantajlı olmasına karşın yüksek hücre ölümü elektroporasyonun en büyük dezavantajıdır (Liu ve ark., 2017).

Viral vektörlerle transdüksiyon:

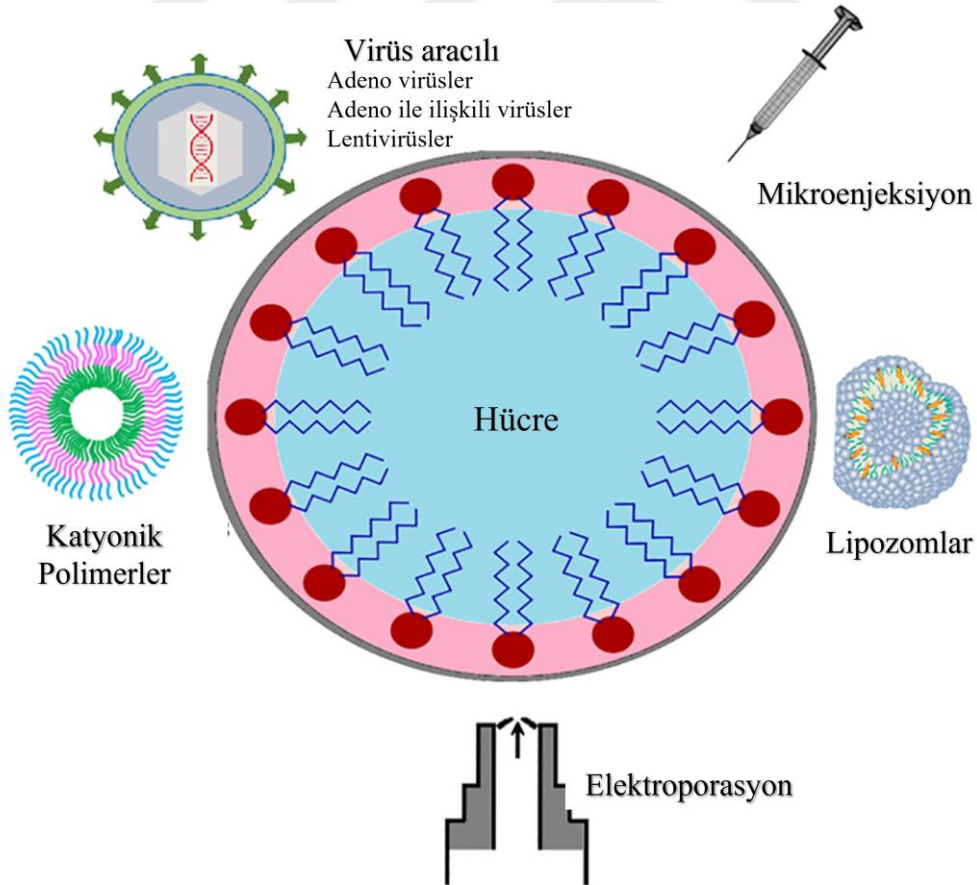
Viral vektörler ile hücrelere gen aktarılmasına transdüksiyon adı verilir. Bu yöntemde lentivirüs (LV), adenovirüs (AV), adeno ile ilişkili virüs (AVV), retrovirüsler ve herpes virüsleri kullanılabilir. LV'ler ve AAV'ler gen terapisi için kullanılan en yaygın viral yöntemlerdir ve genellikle diğer yöntemlere göre daha yüksek oranda hedef hücrede ekspresyon ve genin transkripsiyonunu sağlaması ile sonuçlanır.

Transdüksiyondan sonra AAV genomları hücre bölünmesi ile yavaş yavaş seyreltilen çekirdekte epizomal kalır. Bu nedenle, transgenlerin AAV ile verilmesi, genleri geçici olarak ifade etmek için güvenli bir seçenek sağlar (Daya & Berns, 2008). Ancak AAV'lerin yaklaşık 4.5 kb'lik sınırlı paketleme kapasiteleri sgRNA ve Cas9 sekanslarını tek bir virüse sığdırmayı zorlaştırır. Başka bir dezavantajı ise gen hedeflemedeki düşük verimlilikleridir. AAV vektörleri entegrasyon için gerekli proteinleri sağlamaz ve bu nedenle tüm mekanizma konak faktörlerine bağlıdır (Deyle & Russell, 2009).

LV'ler hem sgRNA hemde cas9 sekanslarını taşıyacak kadar büyüktür ve bu yüzden AVV'lere göre daha avantajlıdır (Escors & Breckpot, 2010). LV'ler retrovirüs ailesinin bir alt tipi olarak sınıflandırılmıştır. Lentivirüsler enfekte oldukları konakçı türüne göre değişiklik gösterebilir, en çok bilinen türü ise insan immün yetmezlik virüsü (HIV)'dir. Lentivirüs genomu temel olarak virüs proteinlerini kodlayan sırasıyla gag, pol ve env genlerine sahiptir: 5'- gag- pol- env-3' (Munis, 2020). T antijeni SV40 orijini

taşıyan vektörler için amplifikasyon kolaylığı sağlamaktadır (Segura ve ark., 2013) ve bu yüzden lentivirüs üretimi için T-antijenine sahip HEK293T hücre hattı tercih edilmektedir.

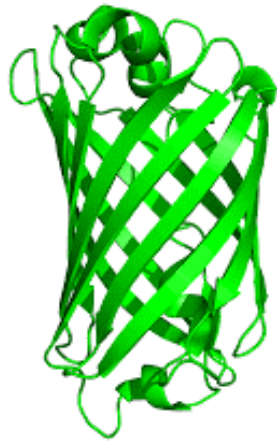
LV'lerin güçlü transdüksiyon özelliği ve hedeflenen hücreyi kalıcı olarak değiştirme yeteneği bu vektörlerin gen tedavisinde kullanımında büyük avantaj sağlamaktadır. LV'ler birincil hücreler ve kök hücreler dahil olmak üzere bilinen bütün hücre hatlarında etkilidir ve *in vivo* olarak da kullanılabilirler (Y. H. Chen ve ark., 2018). Örnek olarak, ilk lentiviral transdüksiyonlu hücresel tedavi, akut lenfoblastik lösemili hastaların tedavisi için 2017'de Amerika Birleşik Devletleri'nde onaylanmıştır (Vairy ve ark., 2018). AAV'lere göre üstün avantajları ve kliniğe uygulamalara uyumluluğu göz önünde bulundurulduğunda LV'ler MKH'ler üzerinde genetik modifikasyon yapmak için de ideal gen düzenleme araçlarıdır ve bu nedenle bu çalışmada tercih edilmiştir.



Şekil 1.17: Gen aktarım stratejilerinin karşılaştırılması (Chandrasekaran ve ark., 2018)

1.5. Yeşil Floresan Protein

GFP, yaklaşık 27 kDa boyutunda 238 amino asitten oluşan floresan bir proteindir. 1962 yılında bir deniz anası türü olan *Aequorea victoria*'dan izole edilmiştir (Bolhassani ve ark., 2011). Hücrelere aktarılan genlere bitişik ya da ayrı olarak olan eksprese ettirilebilen ya da protein aktarım metodları ile doğrudan hücreye verilebilen GFP sayesinde hücreler veya hedef proteinler canlı olarak gözlenebilir ve takip edilebilir. GFP'ye benzer birçok farklı "haberci gen" vardır ve bunlar araştırmalarda hücre içi ve hücre dışı haberci genler olmak üzere iki gruba ayrılır: GFP hücre içi haberci gen olarak yer alır (D'Aiuto ve ark., 2008). Bu tip haberci genler genetik araştırmalarda hedef genin ifade edilip edilmediğini anlamak amacıyla ve protein hedeflemesinin bir belirteci olarak da kullanılarak farklı proteinlerin haritalanmasına olanak sağlar (Kafri ve ark., 1997)(Tsien, 1998). GFP, rekombinant DNA yöntemleri kullanılarak herhangi bir proteinle birleştirilebilir ve hücrede eksprese ettirilerek, antikorla boyamaya gerek olmadan floresan mikroskopisi ve floresan aktive hücre sıralıyıcı (FACS) ile tespit edilebilir. Farklı emisyon spektrumlarında, doğal GFP'den daha uzun dalga boylarında gelişmiş yeşil floresan protein (EGFP), sarı floresan protein (YFP), kırmızı floresan protein (RFP) gibi mutant floresan proteinleri de vardır (Dube ve ark., 2009). Bu tezde GFP kullanım kolaylığı ve canlı hücre görüntülemesine ve gen aktarım metodlarının hızlı ve verimli bir şekilde takip edilebilmesine olanak sağladığı için tercih edilmiştir.



Şekil 1.18: GFP proteininin 3-boyutlu moleküler yapısı

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Kimyasal Maddeler

% 100 alkol, Merck, Kat no: K50690883844

1000 bp DNA ladder, İtron, Kat no: 24074

1000 bp/ 1kb DNA ladder, GeneON, Kat no: 305-105

Agaroz, Peqlab 100g, Lot no: h45120043

cDNA Sentez Kit, Appliedbiosystems, Kat no: 4368814

CellFIX (10X), BD, Kat no: 340181

Dimetil sülfoksit (DMSO), Chem Cruz, Kat no: sc-358801, Lot no: D0519

DMEM, Gibco, Kat no: 41966-029, Lot: 2062233

DMEM/F12, Sigma, Kat no: D6421, Lot: RNBH6005

Fetal sığır serumu (FSS), Diagenovum, Kat no: D154-500ml, Lot: D3575

Fosfat tuz tamponu (PBS), Gibco, Kat no: 14190-094, Lot no: 2062217

GeneJET Plasmid Miniprep Kit, Thermo Scientific, Kat no: K0503, Lot no: 00941185

Glutamax (100X), Gibco, Kat no: 35050-061, Lot no: 205998

LB, Bioshop, Kat no :LBL405.1, Lot no: 9A58609

Lentivirüs Titration Kiti, ABM, Kat no: LV900

MyTaq DNA Polymerase, Meridian, Kat no: BIO-21105, Lot no: PL301-B091560

Penisilin/ Streptomisin Solüsyonu (10.000U/ ml penisilin, 10mg/ml streptomisin), Gibco, Kat no: 15140122

PureLink™ Midiprep Kiti, İnvitrogen, Kat no: K210015, Lot no: 513.07.15.05

RNA İzolasyon Kiti, Direct-zol RNA miniprep, Kat no: R2050, Lot no: ZRC202261

SYBR Green Süpermix, B10 Rad, Kat no:172-5120

SYBR Safe DNA Gel Stain, İnvitrogen, Kat no:S33102, Lot no: 2072358

Thermo 6X DNA loading dye, Kat no:R0611, Lot no:00745605

Tripan mavisi (%0,5), Sigma, Kat no:93595, Lot no:BCBS5990V

TrypLE, Gibco, Kat no:12604-013, Lot no:2053187

V-Taq 2X qPZR master mix, Virostem Biyoteknoloji, Kat no: VT-001

2.1.2. Sarf Malzemeler

0.1 ml PZR tüpü, BIOplastics

0,22 ve 0,45 mikron çapında steril tek kullanımlık filtre, Sartarius-Minisart

0,5 ml, 1,5 ml ve 2 ml'lik santrifüj tüpleri, Isolab

10 cm² petri tabağı, Corning

10µl, 200 µl, 1000µl'lik pipet uçları, Rainin

15 ml ve 50 ml steril santrifüj tüpü, Nest

250 ml cam erlen, Isolab

25cm², 75cm², 175cm² ve 225cm²'lik flask, Sunub

5 ml, 10 ml, 25 ml ve 50 ml'lik serolojik pipet, Isolab

5ml, 10ml, 50ml şırınga, Set

6 kuyulu plate, 24 kuyulu plate, 96 kuyulu plate, Sunub

Filtre sistemi, Corning

Hemasitometri lamı, Neubauer improved, Isolab

Kriyovial, Nest

Otoklavlanabilir cam şişe, Isolab

Tartım kabı, Isolab

2.1.3. Cihazlar

10 µl, 200 µl ve 1000 µl'lik pipet seti, Rainin

-80°C buzdolabı, Panasonic, MDF-U5386S-PE

CO₂ inkübatörü, Nüve

FACS Calibur, BD

Floresans Mikroskopu, Zeiss Axio

Hassas terazi, KERN, ABJ-NM/ ABS-N

Image Quant Las 500, GE

Inverted mikroskop, Nikon, Kat no: TS2-S-SM

Kuru sterilizatör, Panasonic, MOV-212-PE

Laminer hava kabini class II, Thermo Scientific

Manyetik karıştırıcı, Jeiotech

Micro ultrasantrifüj, Hitachi, CS150FNX

Nanodrop One/OneC, Thermo Scientific

Otoklav, Nüve, OT90L

pH Metre, Ohaus

Pipetör, Isolab

Santrifüj, Hitachi, CF16RN

Spin santrifüj, Sprout

StepOne Plus qRT-PZR cihazı , Applied Biosystem

Su banyosu, Nuve, BM 15

Vorteks, Scilogex, MX-S

Yatay elektroforez ünitesi, GE, Kat no: HE33

2.2. Metotlar

2.2.1. Hücre Kültürü Besiyerinin Hazırlanması

American Type Cell Collection (ATCC) kaynaklı WJ-MKH (Lot no: PSC-500-010), HEK293T hücre hatları -80°C'de stoklanarak kullanıldı. Hücrelerin beslenebilmeleri için gerekli glukoz, canlılıklarını sürdürebilmeleri için uygun ozmolariteye ve pH'a, fonksiyonlarını görebilmeleri için gerekli amino asit ve vitaminlere sahip besiyerleri kullanıldı. WJ-MKH hücreleri için DMEM F12 (Sigma) besiyerine (h/h) %10 Fetal Bovine Serum (FSS, Gibco) ve %1 Penisilin/ Streptomisin Solüsyonu (10.000U/ml penisilin, 10mg/ml streptomisin, Gibco) ilave edildi. HEK293T hücreleri için DMEM (Gibco) besiyerine (h/h) %10 FSS (Gibco) ve %1 Penisilin/ Streptomisin Solüsyonu (10.000U/ml penisilin, 10mg/ml streptomisin, Gibco) ilave edildi.

2.2.2. Hücrelerin Pasajlanması

Hücre sayısına göre hangi kültür kabına ne kadar sayıda hücre ekileceği karar verildi. Tarih, hücre tipi, pasaj numarası, yapan kişinin adı kültür kabına yazıldı. Kültür kabındaki besiyeri steril serolojik pipet ile çekilerek atık kabına aktarıldı. 1X Dulbecco's Fosfat-Tamponlu Salin (DPBS, Gibco) ile hücrelerin yıkama işlemi gerçekleştirildi. Kültür kabına yapışık olan hücreler tryple enzimi ile tabandan kaldırıldı. Tryple solüsyonunun yüzeyin tamamını kapladığından emin olduktan sonra 37°C'de 3 dakika inkübe edildi. Hücrelerin yüzeyden ayrılmaları ve canlılıkları ters mikroskopta kontrol edildi ve tryple enzimi kadar besiyeri eklenip enzim aktivitesi inhibe edildi. Kültür kabındaki bütün hücreler toplandıktan sonra santrifüj tüpüne aktarıldı, 300g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant aspire edildi, peletin hücre yoğunluğuna göre besiyeri ile sulandırılıp çözünmesi sağlandı. Uygun kültür kaplarına besiyeri ve hücreler eklendi. 37°C %5 CO² inkübatörde inkübe edildi.

2.2.3. Hemositometri ile Hücre Sayımı

Hücreler süspanse haldeyken sayım için 1.5 ml santrifuj tüpü içinde 10 µl hücre ve 10 µl %0,5 tripan mavisi (Sigma) pipetaj yapılarak karıştırıldı. Karışımdan 10 µl alınarak mikroskopta hemositometri üzerinde sayım yapıldı. Mikroskopta tripan mavisi ile hücre membranının zarar görmesi ölçüldü ve ölü hücreler (mavi) ve canlı hücreler (şeffaf) sayıldı. Hücre sayımı= Sayılan Hücre sayısı x Dilüsyon Oranı x 10⁴ formülü ile 1 ml’de bulunan hücre sayısı hesaplandı. Sağlıklı bir hücre kültüründe canlılık oranının en az %95 olmalısı hedeflendi.

2.2.4. Hücrelerin Stoklanması

Kültür kabındaki hücreler yeterli yoğunluğa ulaştığında kültür kabındaki besiyeri uzaklaştırıldı ve 1X DPBS ile yıkama yapıldı. WJ-MKH ve HEK293T hücrelerinin buldukları yüzeyden kalkmaları için tryple enzimi ile 3 dakika inkübe edildi. Tryple enzim aktivitesi inhibasyonu için tryple kadar besiyeri ilave edildi. 300G’de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant aspire edilip, hücreler 1 ml dondurucu medyum (%10 DMSO+ %90 FSS) içinde 1x10⁶ hücre olacak şekilde kryo tüp içerisinde -80°C’de saklandı.

2.2.5. sgRNA Dizaynı

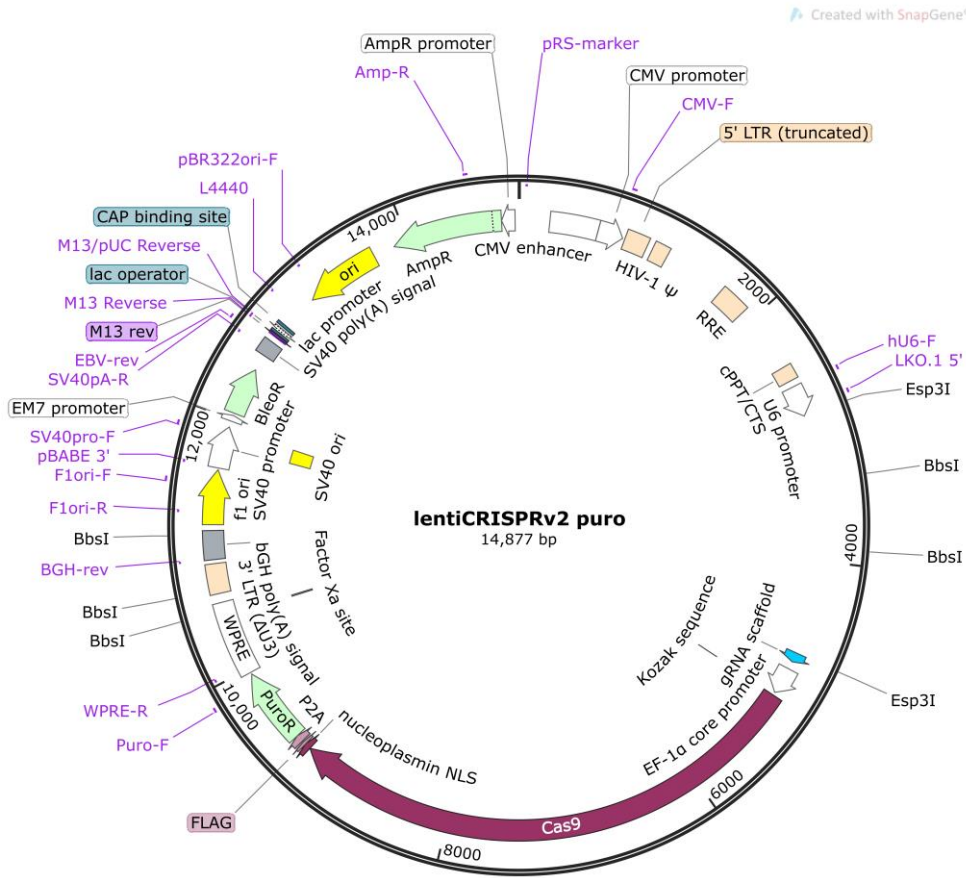
CRISPR gen düzenleme yöntemi ile GFP gen ekspresyon ifadesinin susturulması için öncelikle bu gene karşı 2 ayrı sgRNA dizayn edildi. Bu aşamada kendi geliştirdiğimiz metodlarla dizayn edilen rehber RNA’ların hedef gene spesifitesi Deskgen, E-CRISP ve Crispr Direct bilgisayar programları ile ölçüldü ve validasyonu yapıldı.

Tablo 2.1: Tasarlanan sgRNA sekansları

GFP k/o sgRNA I	GAGCTGGACGGCGACGTAAA(CGG)
GFP k/o sgRNA II	CGCCGGACACGCTGAACTTG(TGG)

2.2.6. sgRNA'ların Lentiviral Vektöre Klonlanması

Tasarlanan sgRNA'lar CRISPR teknolojisinin gereği olan Cas9 enziminin üretilmesi için gerekli olan DNA dizilimi ve sgRNA'ların ve CAS9 enziminin ifadesini sağlayan promotor elementleri ile birlikte lentiCRISPRv2 puro (Plasmid #98290, Addgene) lentiviral vektörüne klonlandı. Klonlama yöntemi olarak bunun için literatürde en çok tercih edilen Ran vd., tarafından 2013 yılında çıkarılan metot referans olarak uygulandı (Ran ve ark., 2013). sgRNA'ların önüne BsmBI (Esp3I) restriksiyon enziminin tanıdığı sekanslar eklenerek ve hizmet alımı ile primer sentezi gerçekleştirildi. Daha sonra, 100µM konsantrasyonundaki rehber RNA oligoları, T4 polinükleotid kinaz kullanılarak fosforlanması için PZR cihazında 37°C'de 30 dakika, 95°C'de 5 dakika ve örnekler dakika başına 5°C düşecek şekilde 25°C'ye indirilerek inkübe edildi. Fosforile edilen ve birleştirilen rehber RNA oligo çiftleri bu metotta belirlendiği oranda sulandırılarak (1:200) lentiviral plazmite T7 ligaz enzimi yardımı ile aktarılmak üzere (tablo 2.2)'deki gibi reaksiyona tabi tutuldu.



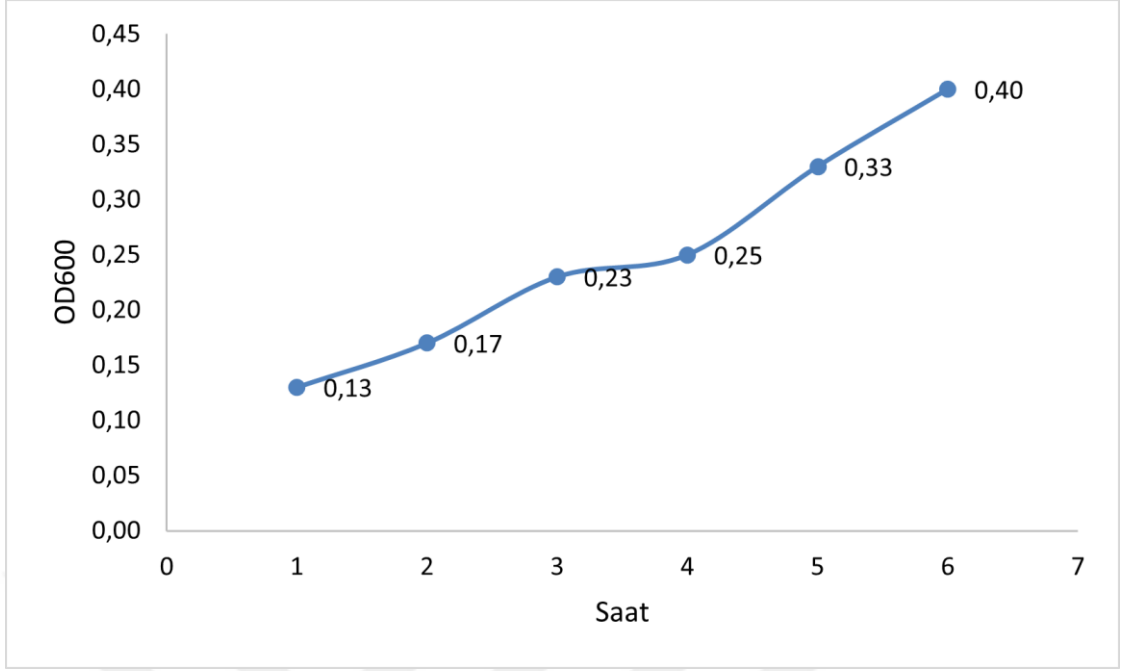
Şekil 2.1: GFP k/o plazmit haritası

Tablo 2.2: Lentiviral plazmite sgRNA klonlama reaksiyonu

Bileşenler	Miktar
CRISPR taşıyıcı vektörü (100ng)	-
Seyreltilmiş oligo çiftleri	2 µl
10X Tango Tampon Çözeltisi	2 µl
10mM Ditiotreitol (DTT)	1 µl
10mM Adenozintrifosfat (ATP)	1 µl
<i>BbsI</i> Enzimi	1 µl
T7 Ligaz enzimi	0,5 µl
ddH ₂ O	20 µl'ye tamamlayacak şekilde
Toplam	20 µl

2.2.7. Kompetent Hücre Yapımı

Virüs üretimi için gerekli plazmitler *Escherichia coli* DH5-alfa suşuna aktarıldı. Transformasyon için Zymo Mix&Go kompetent hücre hazırlama kiti (Mix & Go E. Coli Transformation Kit & Buffer Set, T3001 & T3002) ile hazırlanmış DH5-alfa kompetent hücreleri kullanıldı. Bunu için 100 ml sıvı LB besiyeri içerisinde hücreler çalkalayıcı inkübatörde 190 rpm 37°C'de 16 saat büyütüldü. Yeni bir erlene kabin içerisinde 50 ml Zymobroth ve 500 µl preculture eklendi ve çalkalayıcı inkübatörde 180 rpm 25°C'de inkübe edildi. Kontrol olarak LB medyumunu kullanılarak belirli aralıklarla spektrofotometrede ölçüm alındı. OD600 değeri 0,4 olduğunda 2.000G'de 10 dakika 4°C'de santrifüj edildi. Pelet 3 ml 1X yıkama solüsyonu ile buz içerisinde çözdürüldü. 2.000G'de 10 dakika 4°C'de santrifüj edildi. Dilüsyon solüsyonu ve kompetent solüsyonu (2X) 1:1 dilue edildi. Pelet dilüe edilen buffer içerisinde buzda çözdürüldü ve alikotlanarak -80°C'de saklandı.



Şekil 2.2: Kompetent hücrelerin buyume sırasındaki OD600 değeri grafiği

2.2.8. E.coli Transformasyonu ve Koloni PZR

50 µl kompetent hücre ve 20 ng plazmit 2 dakika buzda bekletildi ve daha sonra hücreler amfisilin (100g/ml) içeren katı agarlara ekildi ve katı agarda 16 saat boyunca 37°C’de bakteriler inkübe edildi. Çoğalan kolonilerden bir kaç seçilerek MyTaq™ DNA Polymerase kiti kullanılarak koloni PZR yapıldı.

Tablo 2.3: Koloni PZR reaksiyon bileşenleri

Bileşenler	Miktar
5x MyTaq Reaction Buffer	10 µl
Koloni	-
Primer mix 20µM	1 µl
MyTaq DNA Polimeraz	1 µl
ddH ₂ O	38 µl
Total	50 µl

Tablo 2.4: Koloni PZR reaksiyon koşulları

Adım	Sıcaklık	Süre	Döngü
Denatürasyon	95°C	1 dakika	1X
Denatürasyon	95°C	15 saniye	35 X
Bağlanma	55°C	15 saniye	
Uzama	72°C	10 saniye	

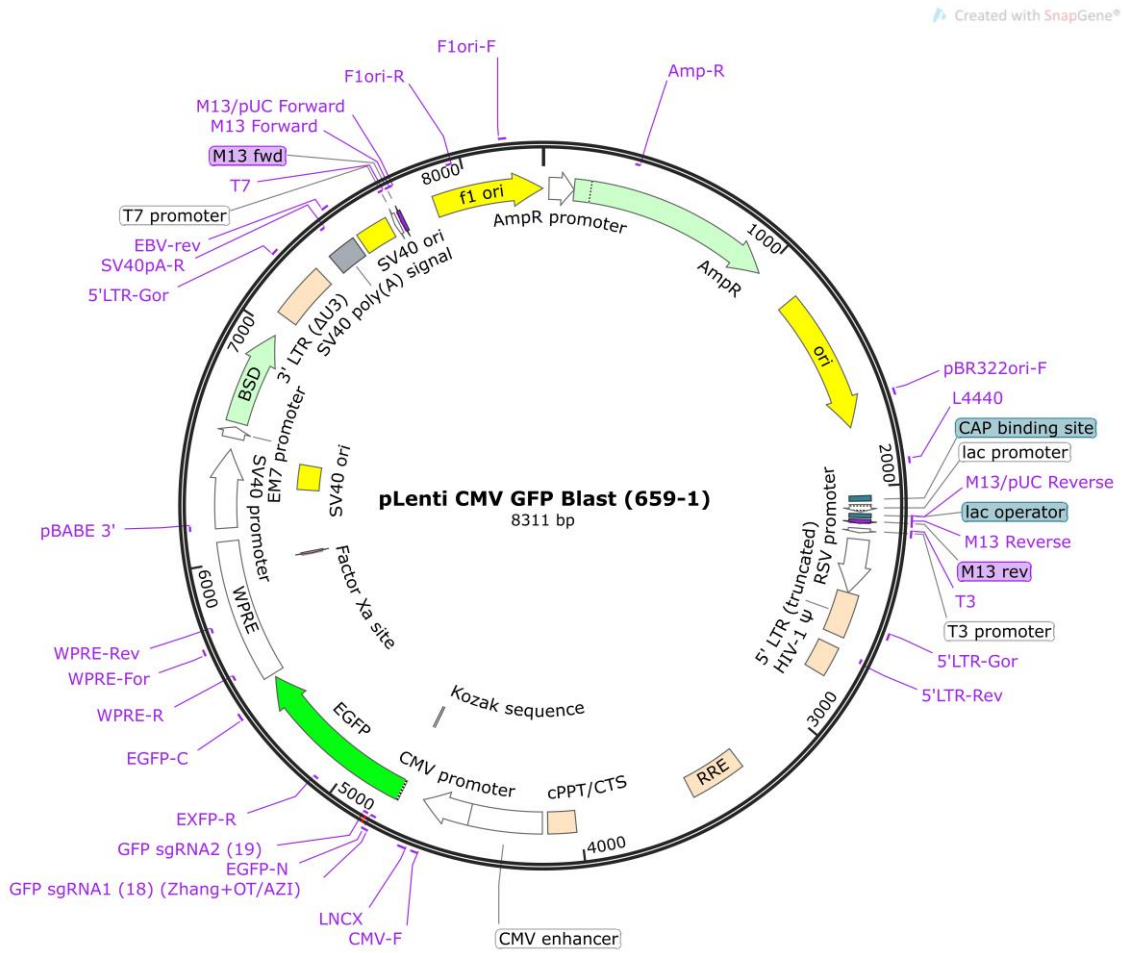
Koloni PZR reaksiyonundan sonra sgRNA'ların plazmite aktarılması agaroz jel elektroforezi sonucu ile kontrol edilerek pozitif koloniler belirlendi. Agaroz jel elektroforezi için 50 ml %0,7'lik jel hazırlandı: toz halde 0,35gr agaroz (Peqlab) tartım kabı kullanılarak hassas terazide tartıldı. Tartılan agaroz ağzı kapaklı cam bir şişeye alındı ve üzerine 50 ml 1X TAE tamponu eklenerek ve mikrodalgada ısıtılarak agarozun şeffaf sıvı bir hale gelene kadar çözünmesi sağlandı. Çözünen agaroz ve 1X SYBR-Safe boya (Invitrogen) karıştırılarak jel kasetine döküldü. Jel içerisinde örneklerin yükleneceği kuyuların oluşması için taraklar jel kasetine yerleştirildi. Düz bir zemin üzerinde jel polimerleşmeye bırakıldı. Polimerleşen jel 1X TAE tamponu ile dolu tanka yerleştirildi. Başta ladder (1000bp, IntronBio) olmak üzere, örnekler 6X Gel Loading Dye (Thermo) yükleme boyası ile karıştırılarak kuyulara yüklendi. Sistem güç kaynağına bağlanarak elektrik akımı ile örneklerin büyüklüklerine göre ayrılması sağlandı. Eklenen SYBR boya sayesinde ışımaya veren jelin görüntüsü GE Image Quant Las 500 cihazı ile alındı.

2.2.9. Plazmit İzolasyonu

PZR reaksiyonu ile pozitif olduğundan emin olunan kolonilerden seçilerek 50 ml sıvı LB besi yerine aktarılıp ve bakterinin eksponansiyel büyüme fazında toplanmak üzere 210 rpm 37°C'de 16 saat boyunca çalkalandı. Hücreler santrifüj yardımıyla çöktürülerek pelet elde edildi ve plazmit izolasyon kiti (GeneJET Plasmid Miniprep Kit, Thermo) kullanılarak plazmit DNA'ları izole edildi. Bunun için büyütülen hücrelerden 2ml santrifüj tüpüne alınarak 10,000g'de 2 dakika santrifüj edilip pelet haline getirildi. Pelet üzerine 250µl resüspanسیون solüsyonu eklenerek vortexlendi ve homojen bir hale gelmesi sağlandı. 250µl lizis solüsyonu eklenip tüp 5-6 kez baş aşağı edilerek yavaşça karıştırıldı. 350µl nötralize edici solüsyon eklenip tüp tekrar 5-6 kez baş aşağı edilerek yavaşça karıştırıldı. Bu aşamada hücre kalıntıları ve kromozomal DNA'yı ortamdan uzaklaştırmak için tüpler maksimum hızda 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kit içerisindeki yeni tüpe aktarıldı. Plazmit DNA'sının kolondaki silika membrana yapışması için maksimum hızda 1 dakika santrifüj edildi. Daha sonra 500µl yıkama solüsyonu eklenerek maksimum hızda 1 dakika santrifüj edildi. Yıkama adımı iki kez yapıldı. Yıkama solüsyonu içerisindeki etanolden arındırmak için kolon bir kezde boş ve maksimum hızda 1 dakika santrifüj edildi. Kolon yeni bir santrifüj tüp üzerine oturtuldu, 50µl elüsyon solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında 2 dakika bekledikten sonra maksimum hızda 2 dakika santrifüj edilerek plazmit DNA'sı izole edildi. İzole edilen plazmit DNA konsantrasyonu NanoDrop (One/OneC Spektrofotometre, Thermo) kullanılarak ölçüldü. Saflığının en az 20 ng/µl konsantrasyonda ve 260/280 absorbansının en az 1,8 olması şartı aranarak valide edildi.

2.2.10. GFP o/e Lentiviral Ekspresyon Plazmiti

GFP overekspresyonu için pLenti-CMV-GFP-Blast(659-1) (Plasmid #17445, Addgene) lentiviral plazmiti kullanıldı. Bu plazmit sgRNA CRISPR plazmitleri ile aynı yöntemler kullanılarak bakterilerde çoğaltıldı ve plazmit DNA'sı elde edildi. GFP geninin ekspresyonu floresan mikroskopi ile, varlığı ise Sanger DNA dizileme yöntemi ile doğrulandı.



Şekil 2.3: GFP o/e plazmit haritası

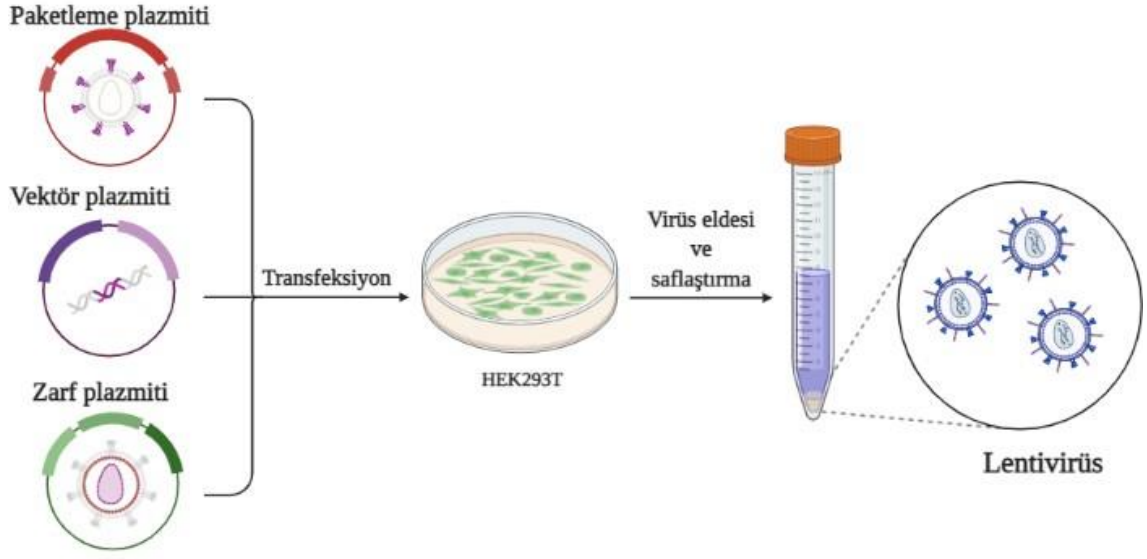
2.2.11. Plazmitlerin Sekans ile Validasyonu:

GFP o/e ve GFP sgRNA CRISPR plazmitlerinde genlerin plazmite 0 hata ile entegrasyonu Sanger DNA dizilimi hizmet alımı yoluyla yapıldı. Sekanslama için plazmitin omurgasında bulunan promotörleri veya geni tanıyan primer kullanıldı. İzolasyonu yapılan plazmit DNA'sı sekanslamaya gönderilerek ilgili sgRNA'nın varlığının doğrulanması sağlandı. Bu işlem için İstinye Üniversitesinde bulunan Genetik tanı merkezindeki sekanslama cihazı kullanılarak yardım alındı. Sekans sonucu SnapGene programı kullanılarak analiz edildi ve genlerin plazmite aktarılması doğrulandı.

2.2.12. Lentivirüs Üretimi

Transfeksiyondan önce, transfeksiyon ajanı olan polietilenimin (PEI) polimerinin hücreler üzerindeki toksik etkisini belirlemek için WST-1 testi yapıldı. 96 kuyulu kültür kabına 25.000 hücre olacak şekilde HEK293T hücresi ekildi. 16 saat sonra DNA oranı sabit tutularak artan PEI: DNA oranları (1, 3, 5, 8, 16) hücreye verildi ve 24 saat sonra WST-1 eklenerek spektrofotometrede ölçüm alındı. Yapılan deney sonucunda virüs yapımı için optimal DNA: PEI oranı belirlendi.

Lentivirüslerin üretilmesi için gereken GFP o/e ve GFP k/o ana plazmitleri, paketlenme ve zarf plazmitleri ile beraber HEK293T hücrelerine PEI transfeksiyon yöntemi ile aktarıldı. T-75 kültür kabında çoğaltılan HEK293T hücreleri, tryple enzimi ile kaldırılarak 300G'de 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen pelet çözülerek 10 cm²'lik hücre kültürü petri tabağına ekildi. 48 saat sonra besiyeri toplanıp santrifüj edilerek virüsler çöktürüldü. Çöktürülen virüsler kryo tüplerde -80°C'de saklandı.



Şekil 2.4: Virüs üretim aşamalarının şematik gösterimi

2.2.13. Virüs Miktar Analizi

Lentivirüs Titration Kit (ABM) ile üretilen lentivirüs miktarı belirlendi. Kit prokolü uygulanarak 2,5 µl viral örnek ve 18 µl virüs liziz tamponu ile 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edilerek viral lizat oluşturuldu. Reaksiyon bileşenleri (tablo2.5)'teki gibi hazırlanarak qPZR reaksiyonu (Applied Biosystems, ThermoScientific) ile gerçekleştirildi.

Tablo 2.5: Virüs miktar analizi reaksiyon bileşenleri

Bileşenler	Viral Lizat	STD1	STD2	NTC
2x qPZR master mix	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl
Viral Lizat	2,5 µl	-	-	-
Standart-1	-	2,5 µl	-	-
Standart-2	-	-	2,5 µl	-
Reaktif karışımı	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Toplam hacim	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl

Tablo 2.6: qRT-PZR Programı

Adım	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Ters Transkripsiyon	42°C	20 dakika	1X
Enzim Aktivasyonu	95°C	10 dakika	1X
Denatürasyon	95°C	15 saniye	30X
Uzatma	60°C	1 dakika	

qPZR sonuçlarına göre kitte belirtilen formül ile hesaplandı:

$$\text{Viral lizat titresi} = 5 \times 107/2^3 \text{ (Ct}_x\text{-Ct}_1\text{) / (Ct}_2\text{-Ct}_1\text{)}$$

Ctx = Bilinmeyen numunenin 3 Ct değerlerinin ortalaması

Ct1 = STD1'in 3 Ct değerlerinin ortalaması

Ct2 = STD2'nin 3 Ct değerlerinin ortalaması

Viral örnek ilk aşamada 1:10 dilue edildiği için çıkan sonuç 10 ile çarpıldı ve miktar (titer) hesaplandı.

2.2.14. Viral Transdüksiyon

ATCC'den temin edilen WJ-MKH hücreleri, DMEM F12 bazal medyumunda (%10 FSS, %1 Penicilin/Steptomisin, %1 Glutamax) besiyeri ile kültürlendi. Transdüksiyon için deney düzenine göre hücreler kaldırılarak uygun kültür tabaklarına ekildi.

GFP o/e hücreleri için: 24 kuyucuklu hücre kültürü tabağına 40.000 hücre/ kuyucuk yoğunluğunda ekildi. Ekilen hücrelere 24 saat sonra hücre başına düşen virüs miktarı (MOI=multiplicity of infection) 20 olacak şekilde, serumsuz besiyeri içerisinde $4,81 \times 10^6$ titrasyon oranında virüs eklendi. HEK293T hücre hattında yapılan artan MOI oranları deney sonucuna göre titrasyon hesaplanmıştır. Transdüksiyondan 24 saat sonra hücrelerin medyumunu uzaklaştırıldı. Hücreler PBS ile yıkandı ve floresan mikroskopunda görüntü alındı.

GFP k/o hücreleri için: Bir önceki aşamada elde edilen GFP ekspres eden hücreleri, yabancı tip WJ-MKH ve WJ-MKH+GFP o/e hücreleri 12 kuyucuklu hücre kültürü tabağına 100.000 hücre/ kuyucuk yoğunluğunda ekildi. Ekilen hücrelere 24 saat sonra hücre başına düşen virüs miktarı (MOI=multiplicity of infection) 2 olacak şekilde, serumsuz besiyeri içerisinde titrasyon oranı $1,33 \times 10^6$ olan GFP k/o CRISPR lentivirüsleri verilerek transdüksiyon işlemi gerçekleştirildi. Transdüksiyondan 24 saat sonra hücrelerin medyumunu uzaklaştırıldı, PBS ile yıkandı ve floresan mikroskopunda görüntü alındı.

2.2.15. Antibiyotik Seçilimi

Transdüksiyondan sonra hedef genleri içeren hücreler için antibiyotik seçilimi yapıldı. Antibiyotik konsantrasyonu ölüm eğrisi analizi ile belirlendi. Yabancı tip hücrelere de antibiyotik verilerek negatif kontrol olarak kullanıldı.

GFP o/e hücreleri için: Transdüksiyondan 48 saat sonra hücrelerin besiyeri, konsantrasyonu 8 µg/ml olacak şekilde blastisidin (blasticidin) antibiyotiği içeren besiyerine eklenerek değiştirildi. Üç gün arayla ve 10 gün boyunca antibiyotik ile seçim yapıldı. Seleksiyondan sonra GFP genini ekspres eden saf hücre popülasyonu oluşturuldu.

GFP k/o hücreleri için: Transdüksiyondan 48 saat sonra hücrelerin besiyeri, konsantrasyonu 1,5 µg/ml olacak şekilde puromisin (puromycin) antibiyotiği içeren besiyerine eklenerek değiştirildi. Üç gün arayla ve 10 gün boyunca antibiyotik ile seçim yapılarak GFP genini eksprese eden saf hücre popülasyonu oluşturuldu.

2.2.16. Deney Grupları

Antibiyotik seçimlerinden sonra oluşturulan saf hücre hatları şu şekilde oluşturuldu:

- WJ-MKH+ GFP o/e
- WJ-MKH+ k/o scrambled kontrol
- WJ-MKH+ GFP k/o
- WJ-MKH+ GFP o/e+ k/o scrambled kontrol
- WJ-MKH+ GFP o/e+ GFP k/o

Oluşturulan scrambled hücre hatları, GFP sgRNA CRISPR ve GFP o/e plazmitlerinin ve gen ekspresyonunun kontrolleri olarak kullanıldı.

2.2.17. Akım Sitometrisi ile GFP Analizi

Kültür kabından kaldırılan hücreler 1.5 ml'lik santrifüj tüpüne alındı ve 300g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı. Hücreleri yıkamak için 1ml soğuk PBS ile tekrar santrifüj edildi. BSA hassas terazide tartıldı ve %1 oranında olacak şekilde PBS içerisinde çözündürüldü. %1 BSA çözeltisi içerisinde izotip kontrol antibody konsantrasyonu 1µg olacak şekilde hazırlandı. Yabancı tip hücre peletine hazırlanan izotip kontrol antikoru eklendi. Tüp alüminyum folyaya sarılarak buz üzerinde hafif yatay biçimde, çalkalayıcıda 45 dakika inkübasyona bırakıldı. İzotip kontrol antikor ile işaretlenen hücrelerin inkübasyonu sonrası yabancı tip ve GFP o/e hücreler 300g'de ve +4°C'de çöktürüldü ve daha sonra PBS ile yıkandı. 10X CellFIX solüsyonu (BD), 1X olacak şekilde PBS ile dilue edildi ve pelet solüsyon içerisinde çözdürülüp süspanse hale getirildi. Hücrelerdeki GFP ekspresyonu, FL1 kanallında (ex; 488nm- em; 509nm) akış sitometrisi (FACS Calibur, BD) ile tespit edildi.

2.2.18. RNA İzolasyonu

Kültür kabından kaldırılan hücreler 1.5 ml'lik santrifüj tüpüne alındı ve 300g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı. Hücrelerin yıkanması için 1ml PBS tekrar santrifüj edildi. Hücre pelet yoğunluğuna göre TRI Reagent Buffer (Direct-zol RNA miniprep, Zymo) yavaşça eklendi. Eklenen TRI Reagent Buffer miktarı kadar %100 ethanol eklenip homojenize olana kadar vortexlendi. Elde edilen karışım kolona aktarıldı ve 16.000g'de 1 dakika santrifüj edilip, alt tüpte biriken süpernatant uzaklaştırıldı. 400µl RNA Wash Buffer eklendi ve 16.000g'de 1 dakika santrifüj edilip, alt tüpte biriken süpernatant uzaklaştırıldı. 5µl DNase I ve 75µl DNA Digestion Buffer başka bir tüpte karıştırılarak column üzerine aktarıldı. Oda sıcaklığında 15 dakika beklendi. 400µl Direct-zol RNA PreWash eklendi ve 16.000g'de 1 dakika santrifüj edilip, alt tüpte biriken süpernatant uzaklaştırıldı. 700µl RNA Wash Buffer eklendi ve 16.000g'de 1 dakika santrifüj edilip, alt tüpte biriken süpernatant uzaklaştırıldı. 50µl DNase/RNase içermeyen su filtreye yakın olacak şekilde eklendi, 1 dakika beklenip 16.000g'de 1 dakika santrifüj edildi. İzole edilen DNA'ların konsantrasyonları ve saflıkları Nanodrop cihazı ile ölçülerek belirlendi. A260/A280 absorbans oranları ölçülerek RNA'lar bir sonraki basamak için -80°C'de saklandı.

2.2.19. cDNA Sentezi

İzole edilen RNA örneklerinden High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kiti (Thermo) kullanılarak, aşağıdaki tabloda gösterilen reaksiyon koşullarında cDNA elde edildi.

Tablo 2.7: cDNA sentezi reaksiyon bileşenleri

Bileşenler	Miktar
10X RT Buffer	2,0 µl
25X dNTP Mix (100 mM)	0,8 µl
10X RT Random Primers	2,0 µl
MultiScribe Reverse Transcriptase	1,0 µl
RNase İnhibitor	-
Nükleaz içermeyen su	4,2 µl
Total hacim	10,0 µl

Tüpler Bio-Rad thermal cycler cihazına yerleştirildi ve (tablo2.8)'deki reaksiyon koşullarına göre ayarlandı. RNA'dan cDNA'ya çevrilen örnekler qRT-PZR analizi için kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

Tablo 2.8: cDNA sentezi reaksiyon koşulları

Ayarlar	Basamak 1	Basamak 2	Basamak 3	Basamak 4
Sıcaklık	25°C	37°C	85°C	4°C
Zaman	10 dakika	120 dakika	5 dakika	∞

2.2.20. qPZR

Genetiği değiştirilen MKH'lerde kök hücre belirteç genlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesi (tablo 2.9)'da belirtilen genlere özgü primerler kullanılarak kantitatif PZR (qPCR) yöntemi ile gereklestirildi. Referans gen olarak LDHA gen ekspresyonu kullanıldı ve bütün gen ekspresyonları buna göre normalize edildi.

Tablo 2.9: Oluşturulan MKH hücre hatlarınının karakterizasyonu için kullanılan genler

MKH Yüzey Belirteçleri	Pluripotensi Belirteçleri	Farklılaşma Belirteçleri
CD90 (THY1)	SOX2	RUNX2
CD44	POU5FJ1 (OCT4)	NESTİN
CD106 (VCAM1)	ZFP42	JAG1
CD54 (ICAM1)	TERT	PPAR γ
HLA-DR		Vimentin

Kantitatif PZR amplifikasyonu için StepOne Plus (Applied Biosystems) qPZR cihazı kullanıldı. Reaksiyon tüpünde PZR karışımı 5 μ l qPZR master mix (5U/ μ l, Virostem Biyoteknoloji, cat no: VT-001), 2 μ l su, 50 ng/ μ l olarak seyreltilen 2 μ l cDNA, konsantrasyonu 2 ug/ml olan 0,5 μ l ileri ve geri primerler (Qiagen) şeklinde, her gen için total reaksiyon hacmi 10 μ l olacak şekilde hazırlandı. Reaksiyonun aşamaları (tablo 2.10)'daki gibi yapıldı. Kantifikasyonu takiben PZR'ın etkinliğini saptamak ve herhangi bir dimer oluşumu olup olmadığını gözlemlemek amacıyla her reaksiyondan sonra erime eğrisi (Melting Curve) analizleri gereklestirildi.

Tablo 2.10: qPZR döngü aşamaları

Pre- inkübasyon		95°C 2 dakika
Kantifikasyon	Denatürasyon	95°C 10 saniye
	Bağlanma	60°C 10 saniye
	Uzama	72°C 15 saniye
X40 döngü		
Erime Eğrisi (Melt curve)	Denatürasyon	95°C 15 saniye
	Bağlanma	60°C 1 dakika
	Uzama	95°C 15 saniye

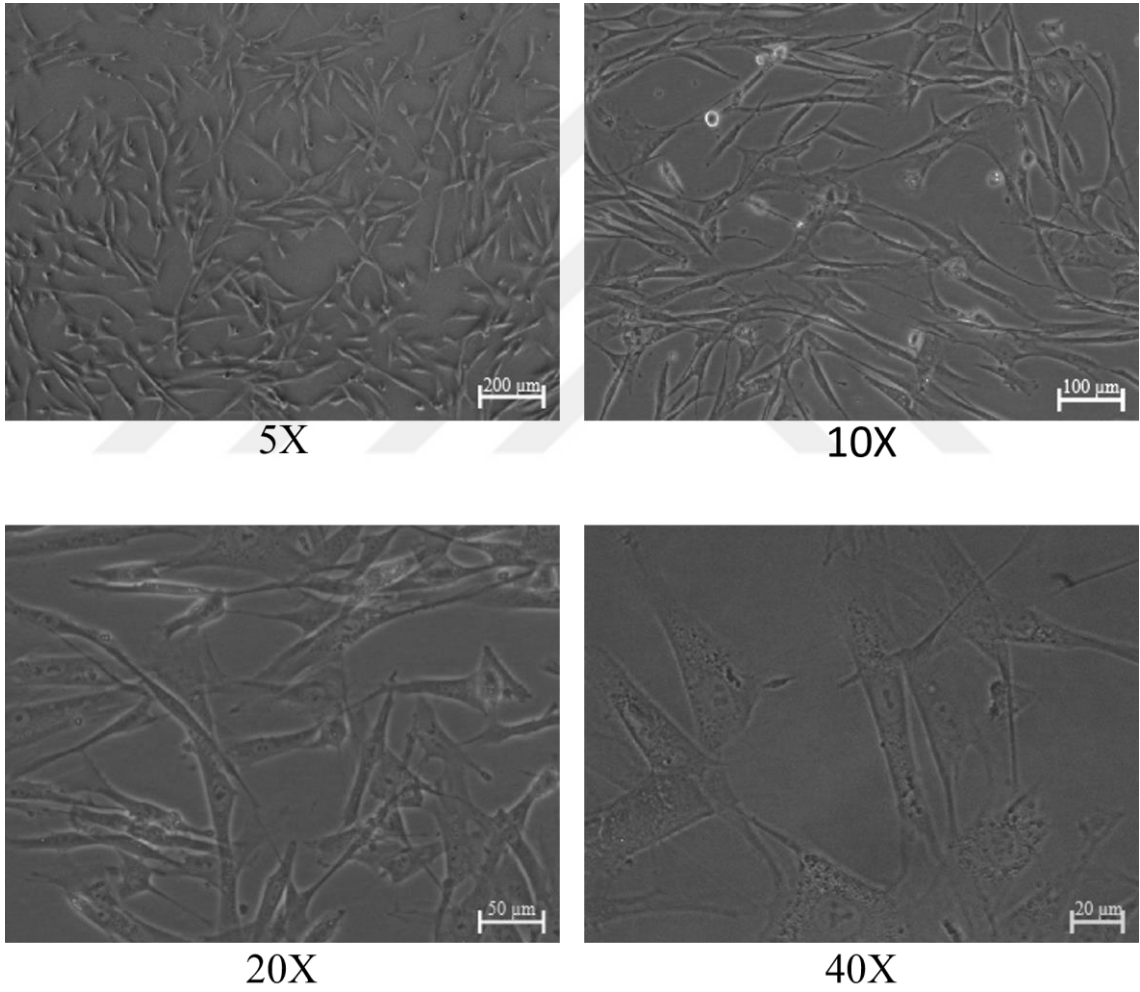
2.2.21. İstatistiksel Analiz

qPZR ile yapılan karakterizasyon deneylerinden elde edilen sonuçlar $2^{-\Delta CT}$ metoduyla GraphPad Prism 9 programı kullanılarak analiz edildi ve two-way ANOVA testiyle istatistiksel analizi gerçekleştirildi. Her gen ekspresyon deneyi 3 tekrarlı ve 3 bağımsız deney olacak şekilde yapıldı. Gen ekspresyon sonuçları referans gen olarak seçilen LDHA genine göre normalize edildi ve istatistiksel olarak Tukey doğrulama yöntemiyle anlamlı değişimler için p değeri <0.05 olarak belirlendi.

3. BULGULAR

3.1.1. ATCC Kaynaklı Yabanıl Tip MKH Hücre Hattının Morfolojik Validasyonu

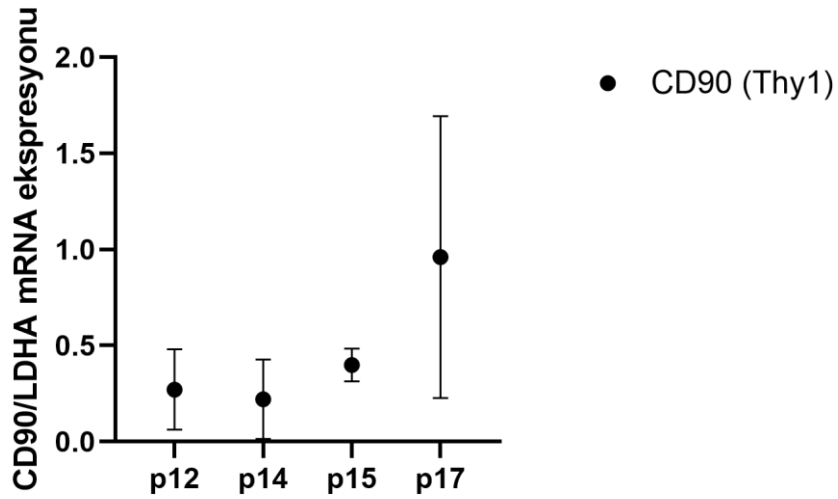
ATCC kaynaklı WJ-MKH'ler tek tabaka halinde, kültür kabına yapışık fibroblast benzeri morfoloji göstermiştir. Hücrelerde genetik modifikasyon yapılmadan önce morfolojik validasyonu yapılmış, zıt faz mikroskobu ile farklı objektiflerde görüntüleri alınmıştır.



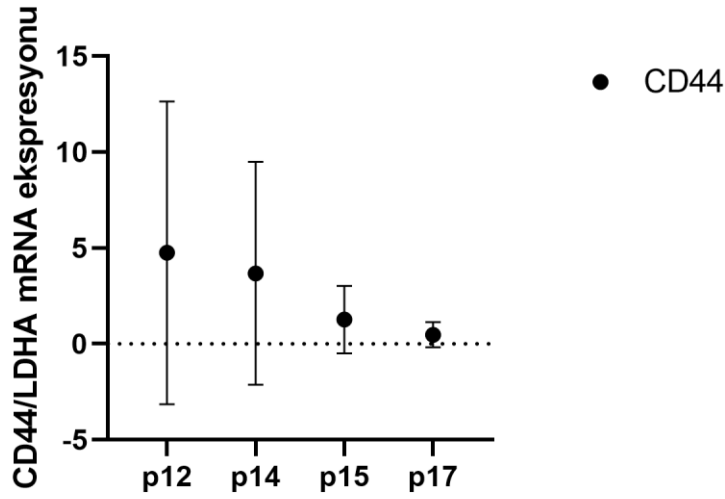
Şekil 3.1: WJ-MKH'lerinin farklı objektiflerdeki morfolojik bulguları

3.1.2. ATCC kaynaklı Yabancı Tıp MKH Hücre Hattında Kök Hücre Markor Gen İfadelerinin qPZR Yöntemi ile Karakterizasyonu

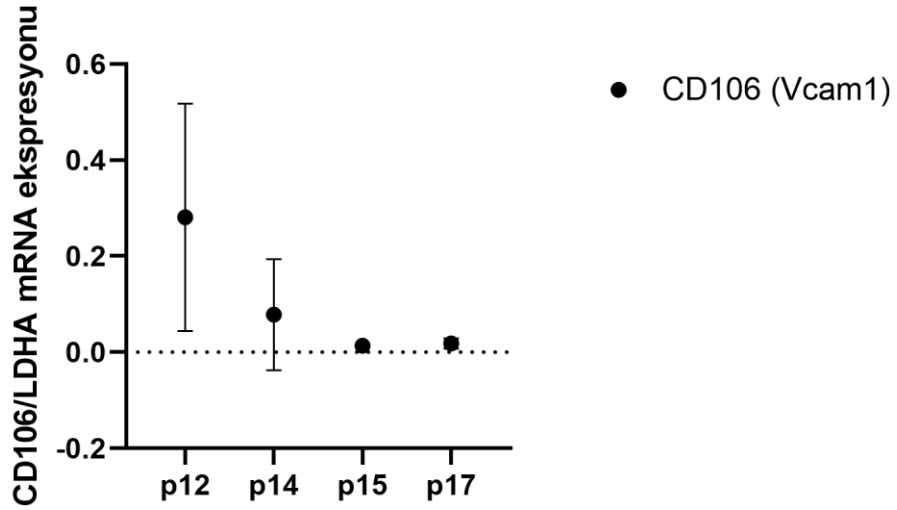
ATCC kaynaklı WJ-MKH'lerin üzerinde genetik değişiklikler yapılmadan önce bilinen MKH yüzey belirteçlerinin ekspresyonu qPCR ile ölçülerek bu hücre hattının karakterizasyonu yapılmıştır. Gen ifadeleri LHDA gen ekspresyonuna oranlanarak, ortalama ekspresyon seviyesi (\pm SEM) belirtilmiştir. İstatistiksel analizler two-way ANOVA yöntemi ile GraphPad programında yapılmış, $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



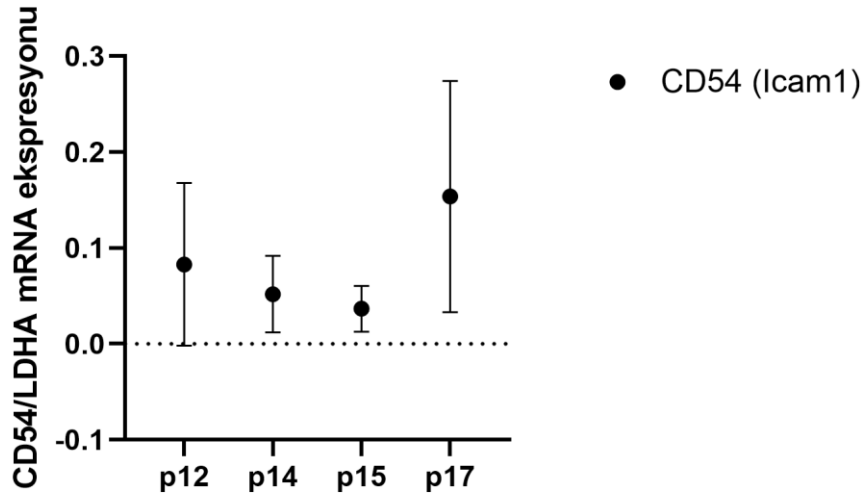
Şekil 3.2: Yabancı tip WJ-MKH'lerin mezenkimal yüzey belirteçleri kullanılarak qPZR ile karakterizasyonu yapıldı. CD90 mRNA seviyeleri, LDHA ekspresyon seviyelerine göre normalize edildi. İstatistiksel olarak bir fark görülmedi $p > 0.05$



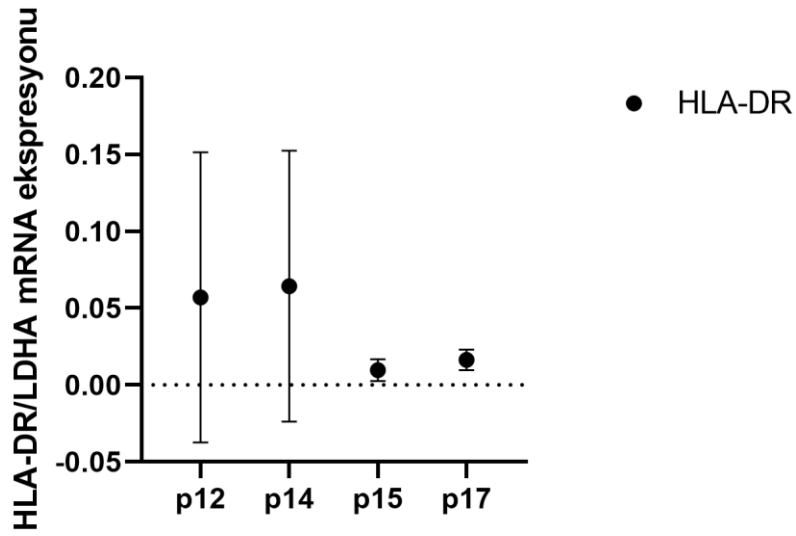
Şekil 3.3: Yabancı tip WJ-MKH'lerin mezenkimal yüzey belirteçleri kullanılarak qPZR ile karakterizasyonu yapıldı. CD44 mRNA seviyeleri, LDHA ekspresyon seviyelerine göre normalize edildi. İstatistiksel olarak bir fark görülmedi $p>0.05$



Şekil 3.4: Yabancı tip WJ-MKH'lerin mezenkimal yüzey belirteçleri kullanılarak qPZR ile karakterizasyonu yapıldı. CD106 mRNA seviyeleri, LDHA ekspresyon seviyelerine göre normalize edildi. İstatistiksel olarak bir fark görülmedi $p>0.05$



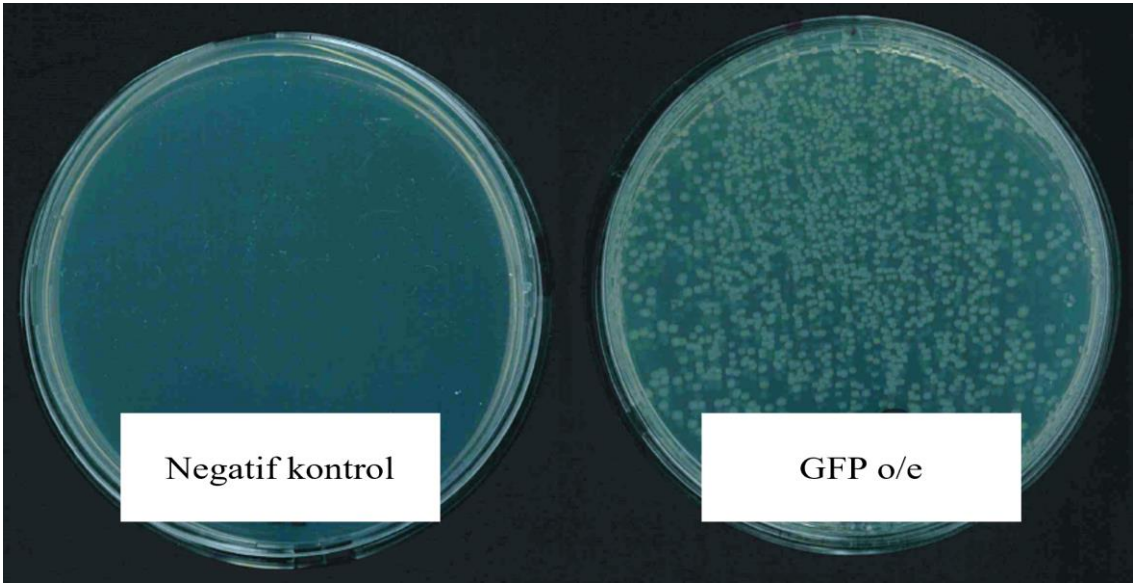
Şekil 3.5: Yabancı tip WJ-MKH'lerin mezenkimal yüzey belirteçleri kullanılarak qPZR ile karakterizasyonu yapıldı. CD54 mRNA seviyeleri, LDHA ekspresyon seviyelerine göre normalize edildi. İstatistiksel olarak bir fark görülmedi $p>0.05$



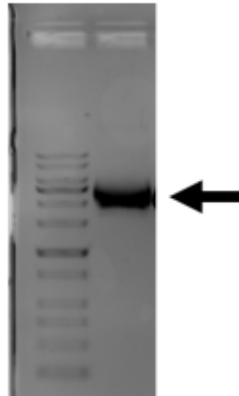
Şekil 3.6: Yabancı tip WJ-MKH'lerin mezenkimal yüzey belirteçleri kullanılarak qPZR ile karakterizasyonu yapıldı. HLA-DR mRNA seviyeleri, LDHA ekspresyon seviyelerine göre normalize edildi. İstatistiksel olarak bir fark görülmedi $p>0.05$

3.1.3. GFP o/e Plazmitlerinin İzolasyonu ve Validasyonu

GFP o/e CRISPR vektörü bakteri hücresine klonlanmıştır. Klonlanan negatif kontrolde koloni gözlemlenmezken, pozitif örnekte koloni gözlenmiştir ve bu kolonilerden bir kaçı seçilip sıvı LB besiyerinde büyütülerek plazmit DNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon sonucu plazmit DNA'sı nanadropta ölçülerek yüksek saflıkta elde edildiği görülmüştür. Plazmit DNA'ları konsantrasyonları 250 ng olacak şekilde %0.7'lik agaroz jelde yürütülerek doğrulukları kontrol edilmiştir.



Şekil 3.7: GFP o/e plazmitlerinin transformasyonu sonrası oluşan koloniler



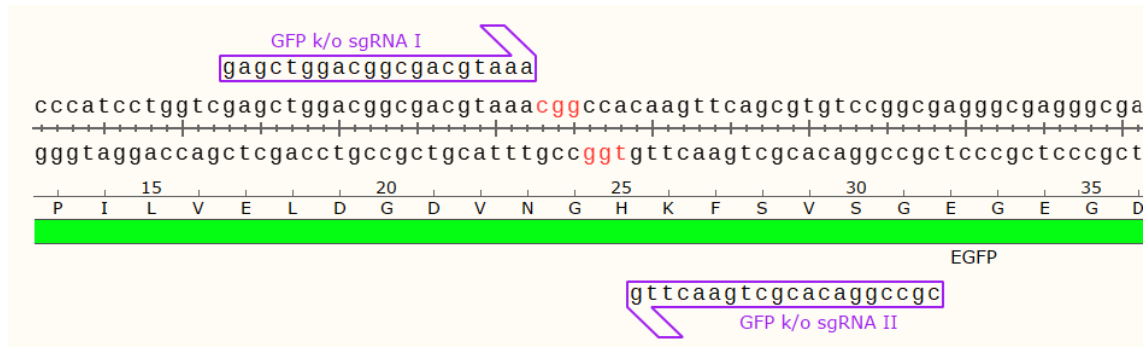
Şekil 3.8: GFP o/e plazmitlerinin izolasyonu sonrası agaroz jel görüntüsü

Örnek adı	Nükleik Asit (ng/uL)	A260/280	A260/230	A260	A280
Blank	0.902	0.765	1.159	0.018	0.024
GFP o/e	412.695	1.856	2.079	8.254	4.447

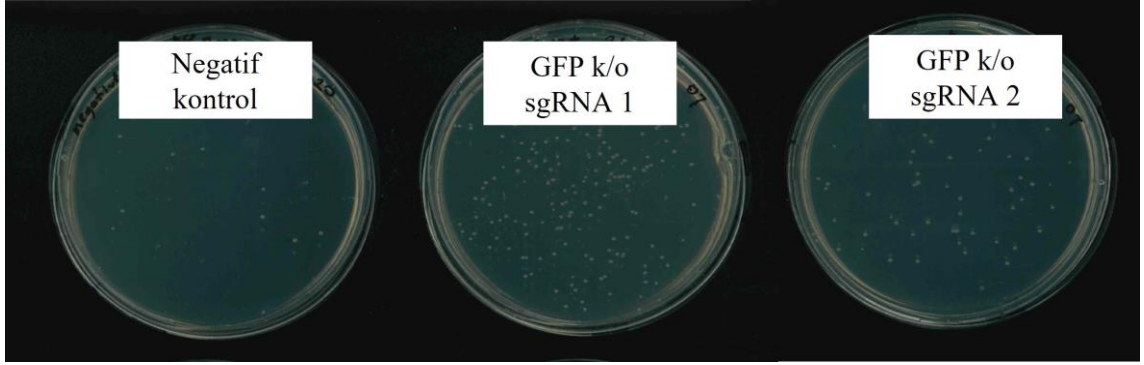
Şekil 3.9: GFP o/e plazmitlerinin izolasyonu sonrası DNA saflık ölçüm değerleri

3.1.4. GFP k/o sgRNA Plazmitlerinin Klonlanması, İzolasyonu ve Validasyonu

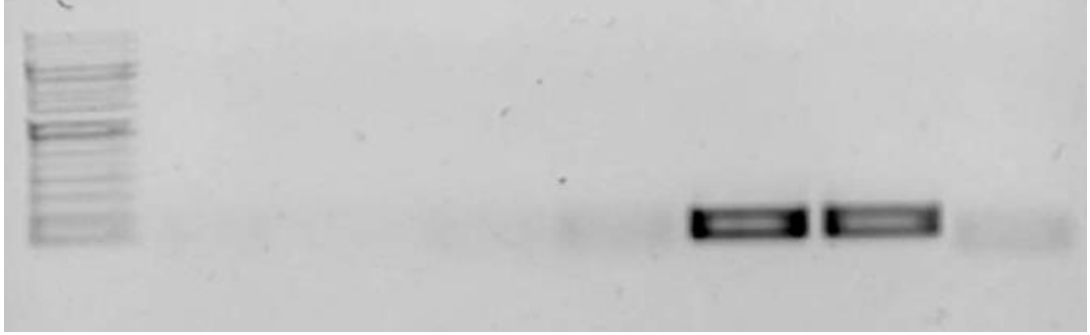
GFP genini nakavt etmek için tasarlanan sgRNA'lar taşıyıcı lentiviral vektörlere klonlanmıştır. Taşıyıcı vektörlerin üzerinde sgRNA'ların ifadesini sağlayan promotor elementleri, CRISPR teknolojisinin gereği olan Cas9 enziminin üretilmesi için gerekli olan DNA dizilimi bulunmaktadır ve vektörlerin bakterilerde çoğaltımı sağlanmıştır. Klonlanan pozitif örneklerde, negatif kontrole göre yaklaşık 40-80 kat daha fazla koloni görülmüştür. Kolonilerden birkaçı seçilerek pozitif klonların belirlenmesi için koloni PZR yapılmıştır. Koloni PZR reaksiyonundan sonra sgRNA'ların plazmite aktarılması agaroz jel elektroforezi sonucu ile kontrol edilmiştir. Pozitif koloniler sıvı LB besiyerinde büyütülerek, plazmit DNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen plazmit DNA'ları agaroz jelde yürütülerek doğrulukları kontrol edilmiştir.



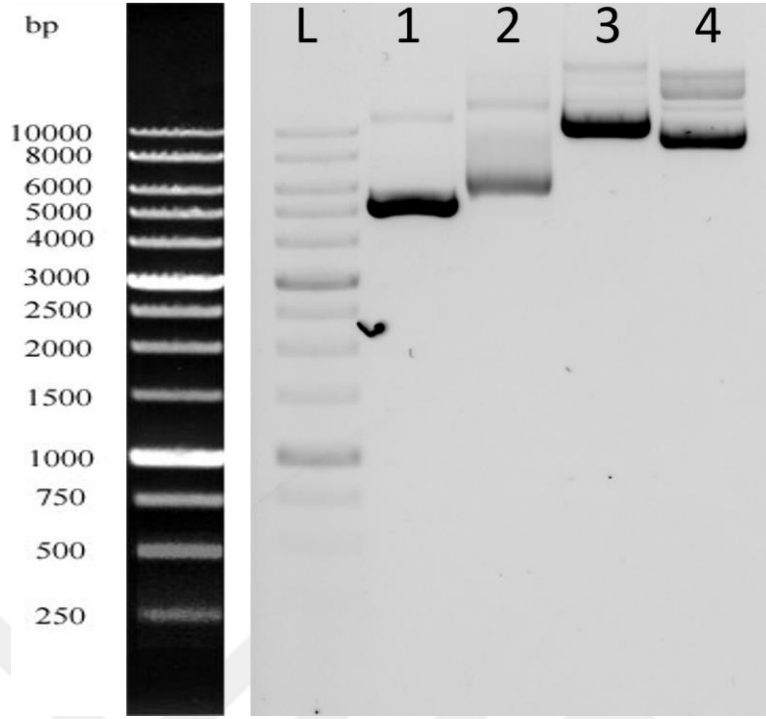
Şekil 3.10: GFP k/o sgRNA sekanslarının GFP geni üzerindeki konumu



Şekil 3.11: GFP k/o sgRNA'lerin (Ran ve ark., 2013) metoduyla klonlanması sonucunda oluşan koloniler. Sol üst örnek negatif kontrol, diğer örnekler ise GFP genine karşı tasarlanmış sgRNA klonlanan örnekler.



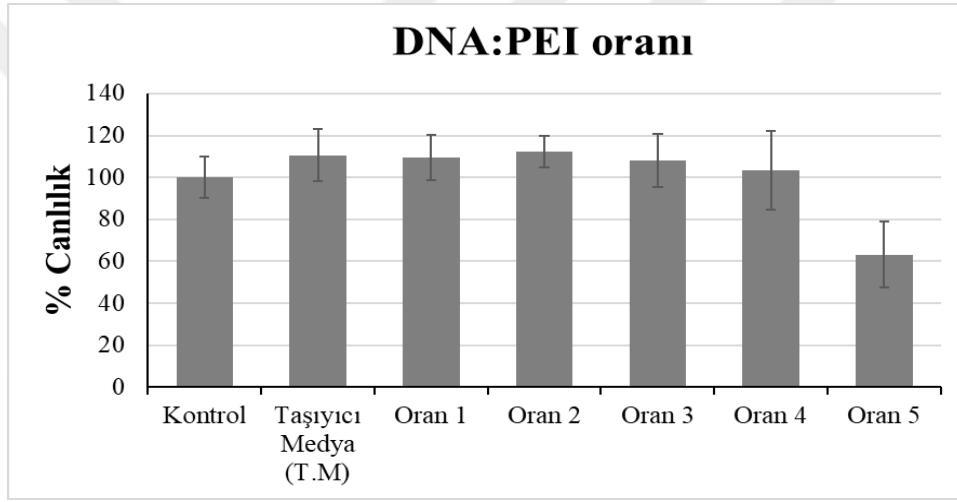
Şekil 3.12: GFP k/o sgRNA plazmitlerinin koloni PZR agaroz jel görüntüsü



Şekil 3.13: İzole edilen plazmit DNA'larının agaroz jel görüntüsü (1: GFP o/e kontrol plazmiti, 2: GFP o/e plazmiti, 3: GFP k/o scrambled plazmiti, 4: GFP k/o plazmiti)

3.1.5. Lentivirüs Üretimi için DNA:PEI Oranının Belirlenmesi ve Hücre Canlılık Testleri

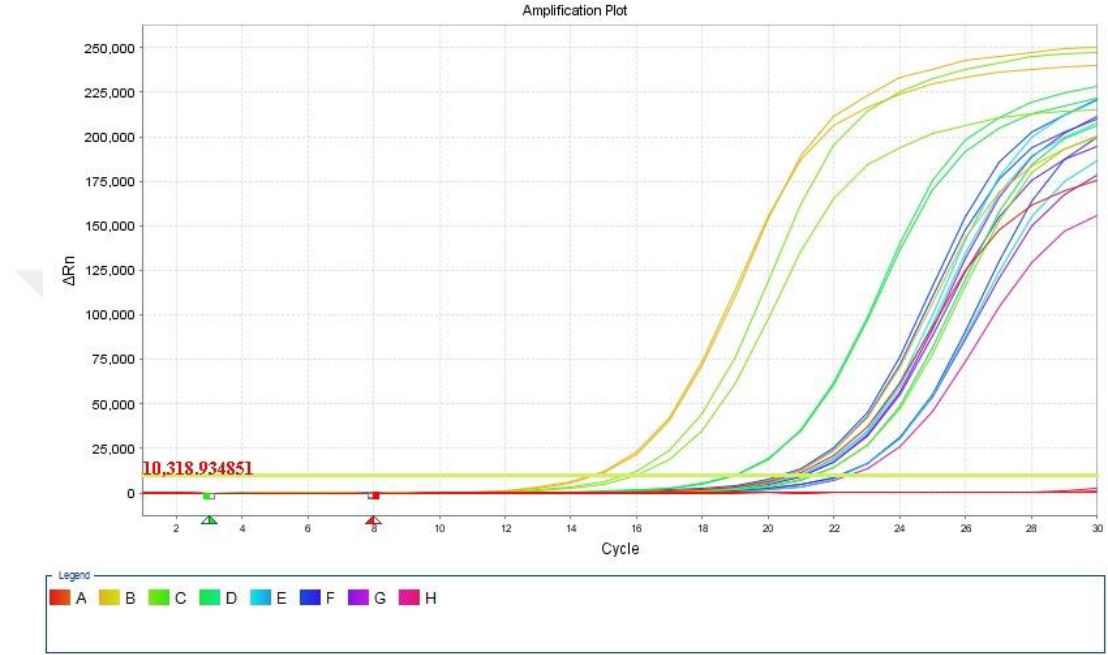
Transfeksiyondan önce, transfeksiyon ajanı olan polietilenimin (PEI) polimerinin hücreler üzerindeki toksik etkisini belirlemek için WST-1 testi yapılmıştır. 96 kuyulu kültür tabağına 25.000 hücre olacak şekilde HEK293T hücresi ekilmiştir. 16 saat sonra DNA oranı sabit tutularak artan PEI oranları hücreye verilmiş ve 24 saat sonra WST-1 eklenerek spektrofotometrede ölçüm alınmıştır. Yapılan deney sonucunda virüs yapımı için hücelere toksik gelmeyecek en uygun DNA: PEI oranı belirlenmiştir.



Şekil 3.14: Plazmit DNA: PEI oranının hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin WST-1 testi ile ölçülmesi

3.1.6. Virüs Miktar Analiz Sonuçları

Elde edilen optimal plazmit:transfeksiyon ajan oranı kullanılarak lentivirüsler üretildi. Bu virüslerin miktarları lentivirüs titrasyon kiti içerisindeki standartlar ile karşılaştırılarak hesaplandı ve yüksek miktarda (titer) lentivirüs elde edildiği görüldü.



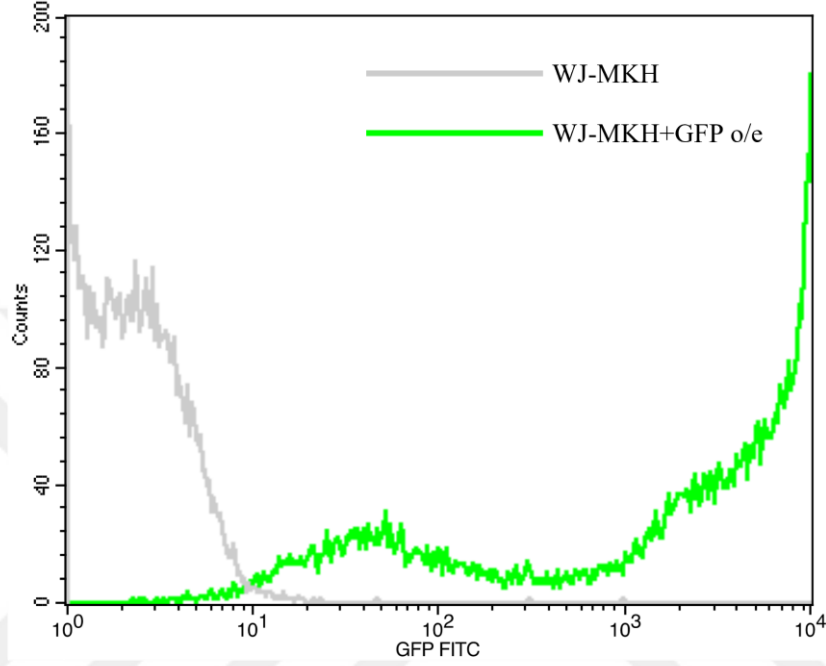
Şekil 3.15: qRT-PZR reaksiyonu çoğalma eğrisi A: Örnek içermeyen kontrol (NTC), B: Std-1, C: Std-2, D: GFP o/e, E: GFP o/e kontrol, F: GFP k/o, G: GFP k/o kontrol

Tablo 3.1: Üretilen lentivirüslerin qRT-PZR sonucunda hesaplanan titer miktarı

Örnekler	Ct 1	Ct 2	Ortalama ct	Hesaplanan virüs miktarı (titer IU/ml)
STD-1	13,06	13,2	13,13	5×10^7
STD-2	15,79	15,59	15,69	$6,25 \times 10^6$
GFP o/e	15,76	16,02	15,89	$4,81 \times 10^6$
GFP o/e scrambled	17,89	17,62	17,75	$1,17 \times 10^6$
GFP k/o	17,77	17,42	17,59	$1,33 \times 10^6$
GFP k/o scrambled	19,38	19,22	19,3	$3,32 \times 10^5$

3.1.7. Akım Sitometrisi ile GFP Ekspresyonunun Doğrulanması

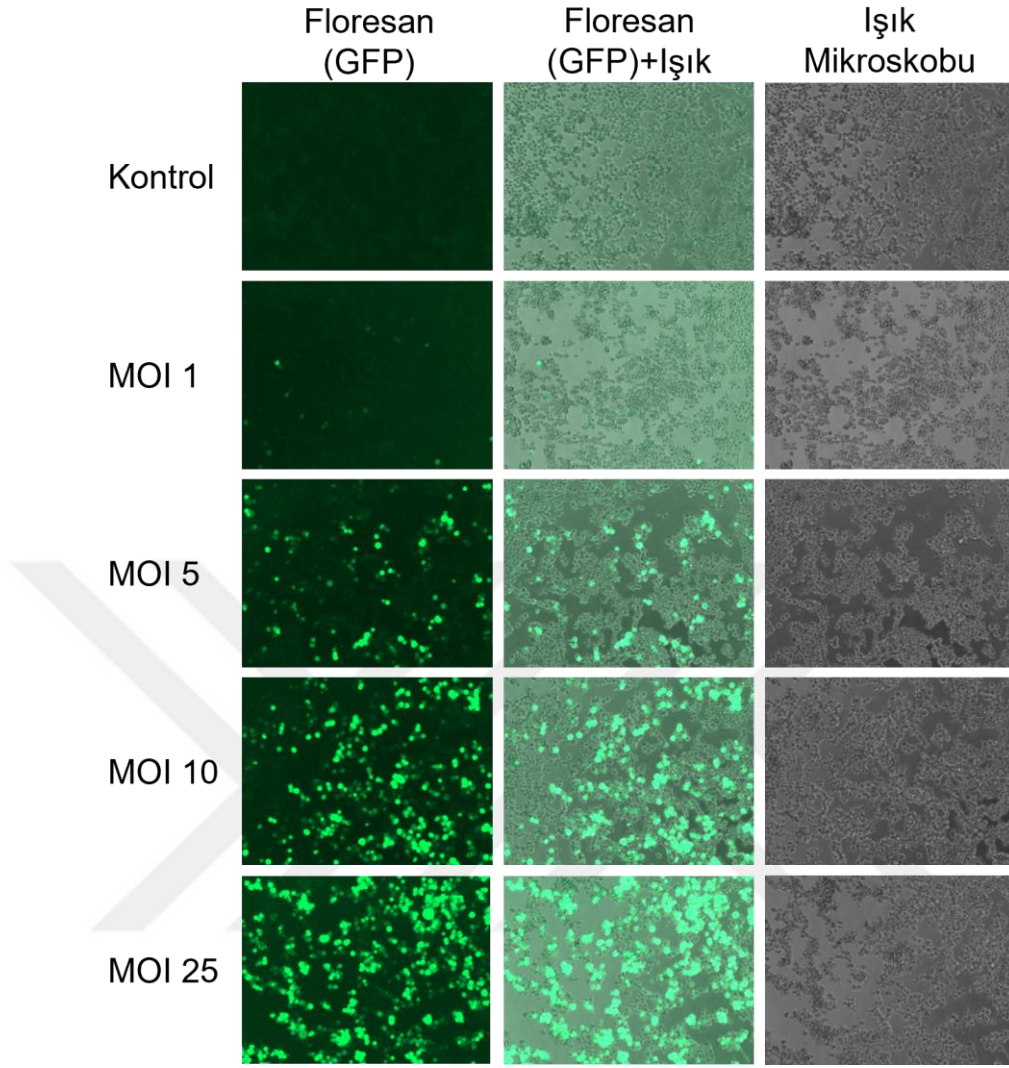
Transdüksiyon sonrası yapılan akım sitometrisi deneyi sonucunda (şekil 3.16) hücrelerin lentiviral parçacıklar ile inkübasyonu sonrası ~%90 ve üzeri GFP ifadesi elde edildiği gözlemlendi.



Şekil 3.16: WJ-MKH hücrelerinin lentiviral transdüksiyonu sonrası GFP ekspresyonunun akım sitometrisi ile belirlenmesi

3.1.8. Floresan Mikroskopi ile GFP Overekspresyonunun HEK Hücrelerinde Doğrulanması

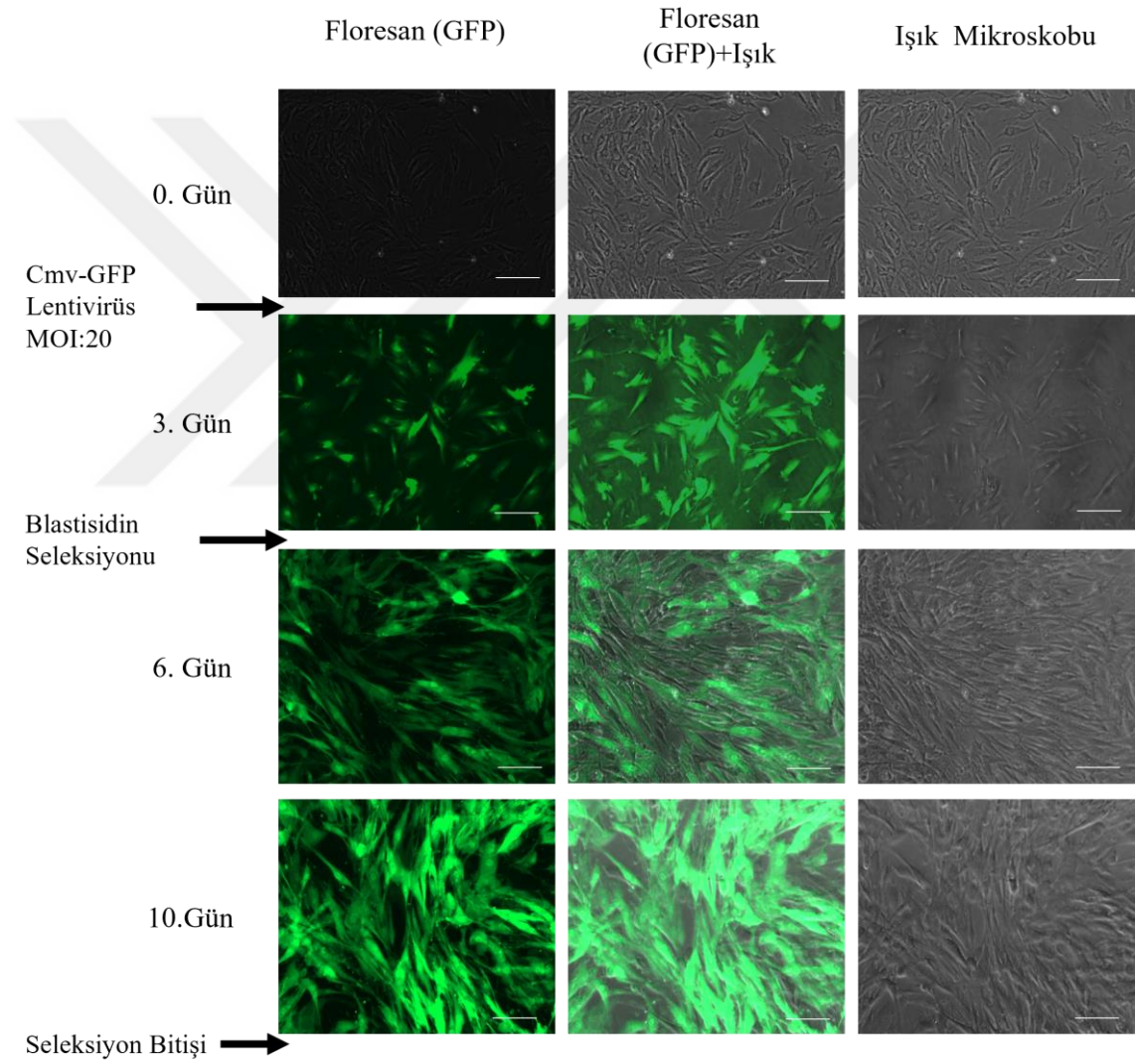
GFP lentivirüslerinin aktivitesi ve ekspresyonunun validasyonu öncelikle HEKT hücreleri kullanılarak artan MOI oranları ölçülmüştür. Hücreler 96 kuyucuklu hücre kültürü tabaklarına 25.000 hücre/kuyucuk yoğunluğunda ekilerek hücre başına düşen virüs miktarı (MOI= multiplicity of infection) 1,5,10,25 olacak şekilde belirlenmiştir. MOI oranına bağlı olarak GFP sinyalinin arttığı gözlemlendi. En yüksek Virüs:Hücre enfeksiyon oranında (MOI:25) hücreler %80 üzeri canlılık göstermiştir. Bu sonuç ürettiğimiz virüslerin hücreler üzerinde toksik bit etkisi olmadığını göstermektedir



Şekil 3.17: HEK hücrelerinde GFP o/e lentivirüslerinin artan MOI oranlarında kullanılması ve elde edilen GFP sinyalinin floresan mikrokobi ile değerlendirilmesi

3.1.9. WJ-MKH Hücrelerinde GFP o/e Lentivirüs Transdüksiyonu

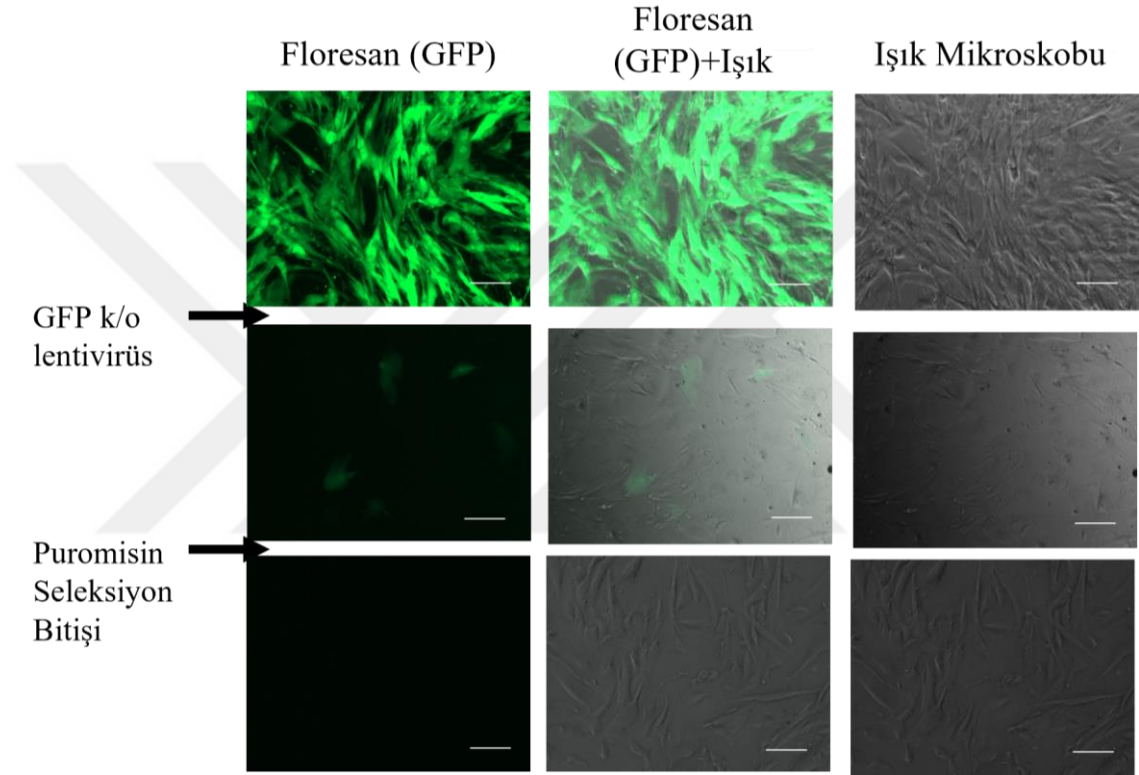
GFP o/e lentivirüsü verilen WJ-MKH hücreleri floresan mikroskopunda (ZEISS Axio) GFP ve Bright EGFP filtreleri ile görüntüledi. 5x lenste hücrelerin netliği ve lokalizasyonu belirlendikten sonra yüksek çözünürlüklü görüntüler 10x lenste alındı. 3.gün sonunda GFP ışması görüldü.



Şekil 3.18: GFP overeksprese WJ-MKH hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüleri (GFP ışması ex; 488nm- em; 509 nm), ölçek çubukları 100 µm.

3.1.10. WJ-MKH+GFP Hücrelerinde GFP k/o Lentivirüs Transdüksiyonu ile GFP Geninin Susturulması

GFP k/o lentivirüsü verilen WJ-MKH+GFP o/e hücreleri floresan mikroskopunda (ZEISS Axio) GFP ve Bright EGFP filtreleri ile görüntülendi. Lentivirüs transdüksiyonu sonrası 10. günden itibaren GFP ışması azaldı ve antibiyotik seçilimi sonrası GFP ışması gözlenmedi.



Şekil 3.19: GFP k/o nakavt lentivirüsleri verilen WJ-MKH+GFP o/e hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüleri (GFP ışması ex; 488nm- em; 509 nm), ölçek çubukları 100 µm.

3.1.11. Kantitatif PZR için Hücrelerden RNA İzolasyonu Sonuçları

Hücre hatlarından elde edilen örneklerden RNA İzolasyon Kiti (Zymo Research) kullanılarak RNA izolasyonu yapıldı ve NanoDrop (Thermo Scientific) cihazı ile saflık oranları belirlendi.

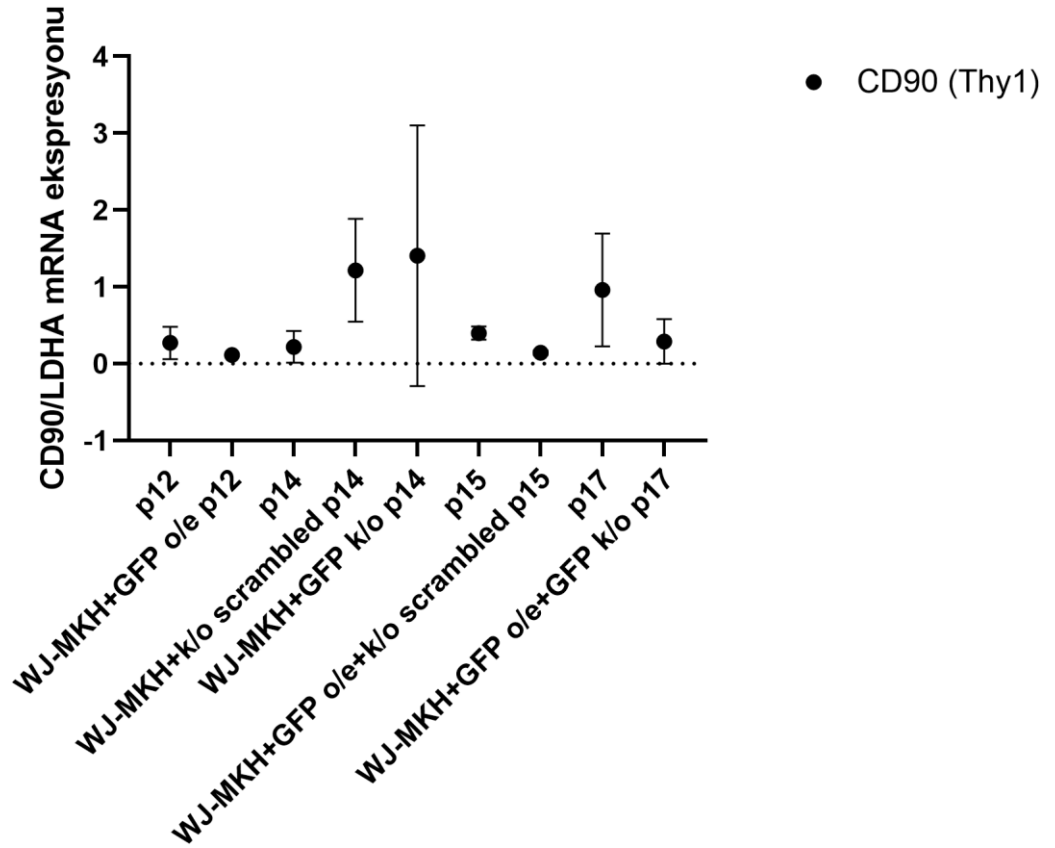
Tablo 3.2: Oluşturulan hücre hatlarından izole edilen RNA'ların nanodrop ölçüm değerleri

HÜCRE	RNA ng/µl	A260/280	A260/230
WJ-MKH P12	38,9	1,94	2,06
WJ-MKH P14	32,8	1,82	1,90
WJ-MKH P15	28,0	1,86	1,82
WJ-MKH P17	147,1	1,96	1,86
WJ-MKH+ GFP o/e p12 Set 1	25,5	2,08	2,05
WJ-MKH+ GFP o/e p12 Set 2	18,0	2,01	2,27
WJ-MKH+ GFP o/e p12 Set 3	33,0	2,01	2,15
WJ-MKH+ GFP scrambled p14 Set 1	130,7	1,97	2,04
WJ-MKH+ GFP scrambled p14 Set 2	135,6	1,99	1,97
WJ-MKH+ GFP scrambled p14 Set 3	108,8	1,98	2,03
WJ-MKH+ GFP k/o p14 Set 1	325,9	1,98	2,07
WJ-MKH+ GFP k/o p14 Set 2	216,7	1,99	2,05
WJ-MKH+ GFP k/o p14 Set 3	164,0	1,97	2,08
WJ-MKH+ GFP o/e+ k/o scrambled p15 Set 1	14,1	2,12	1,81
WJ-MKH+ GFP o/e+ k/o scrambled p15 Set2	7,1	2,03	1,90
WJ-MKH+ GFP o/e+ GFP k/o p17 p15 Set 1	63,5	1,95	2,06
WJ-MKH+ GFP o/e+ GFP k/o p17 Set 2	186,5	1,97	2,13
WJ-MKH+ GFP o/e+ GFP k/o p17 Set 3	21,4	2,03	1,90

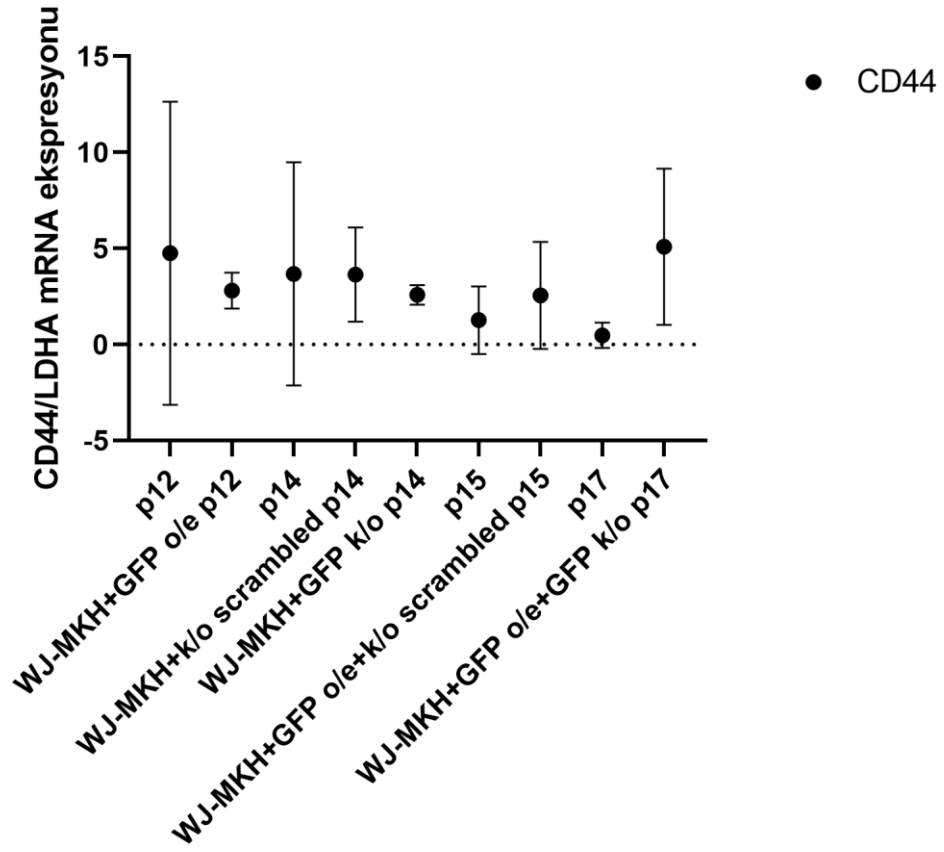
3.1.12. Kantitatif PZR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Genetiği değiştirilen WJ-MKH'lerde qPZR yöntemi ile kök hücre yüzey, pluripotensi ve farklılaşma belirteçlerinin karakterizasyonu yapıldı ve her hücre hattı aynı pasaj sayısındaki yabancı tip hücrelerle karşılaştırıldı.

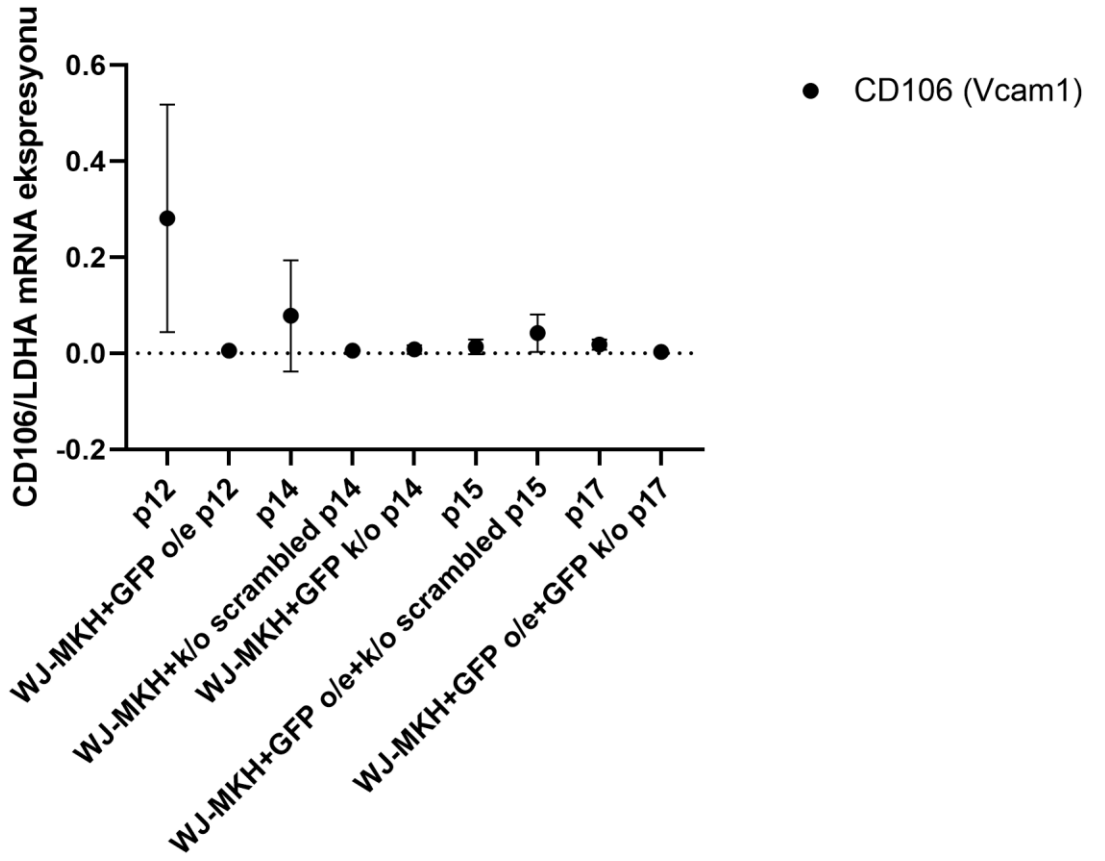
MKH yüzey belirteçleri:



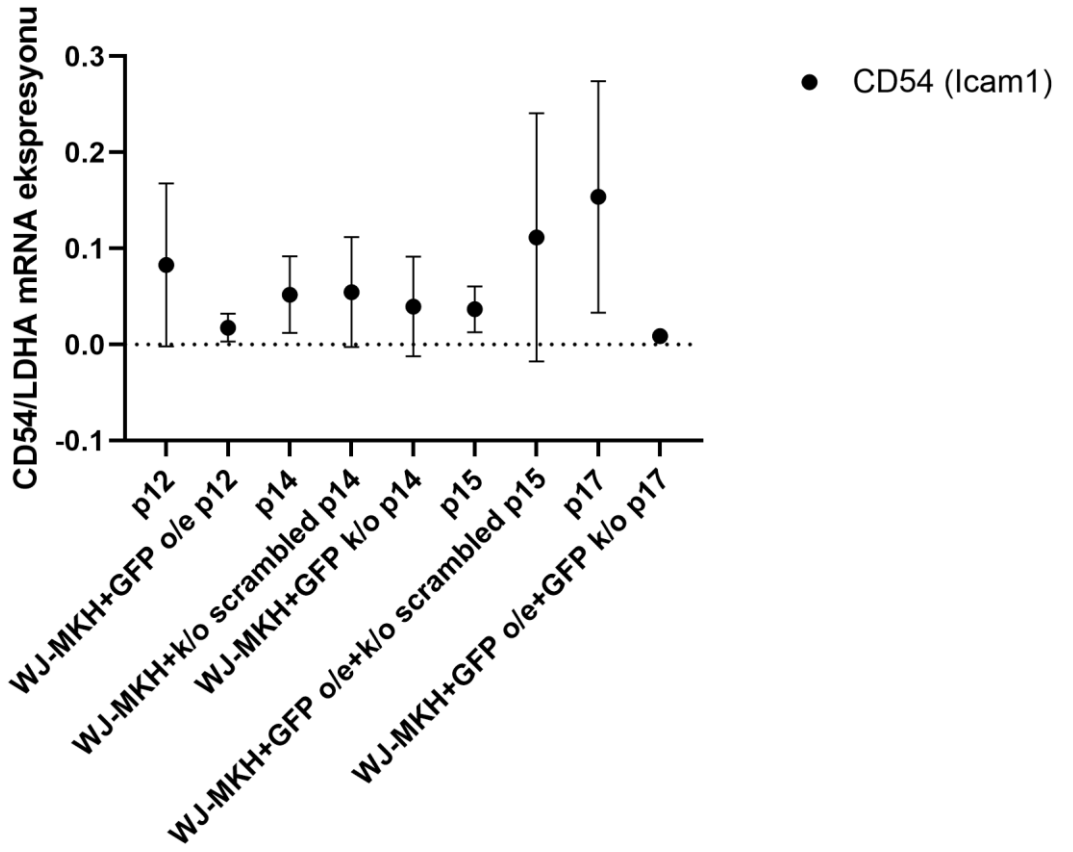
Şekil 3.20: Genetiği değiştirilen WJ-MKH'lerin qPZR ile karakterizasyonu değerlendirildi. CD90 mRNA seviyeleri, LDHA ekspresyon seviyelerine göre normalizasyonu yapıldı. İstatistiksel olarak bir fark görülmedi $p>0.05$



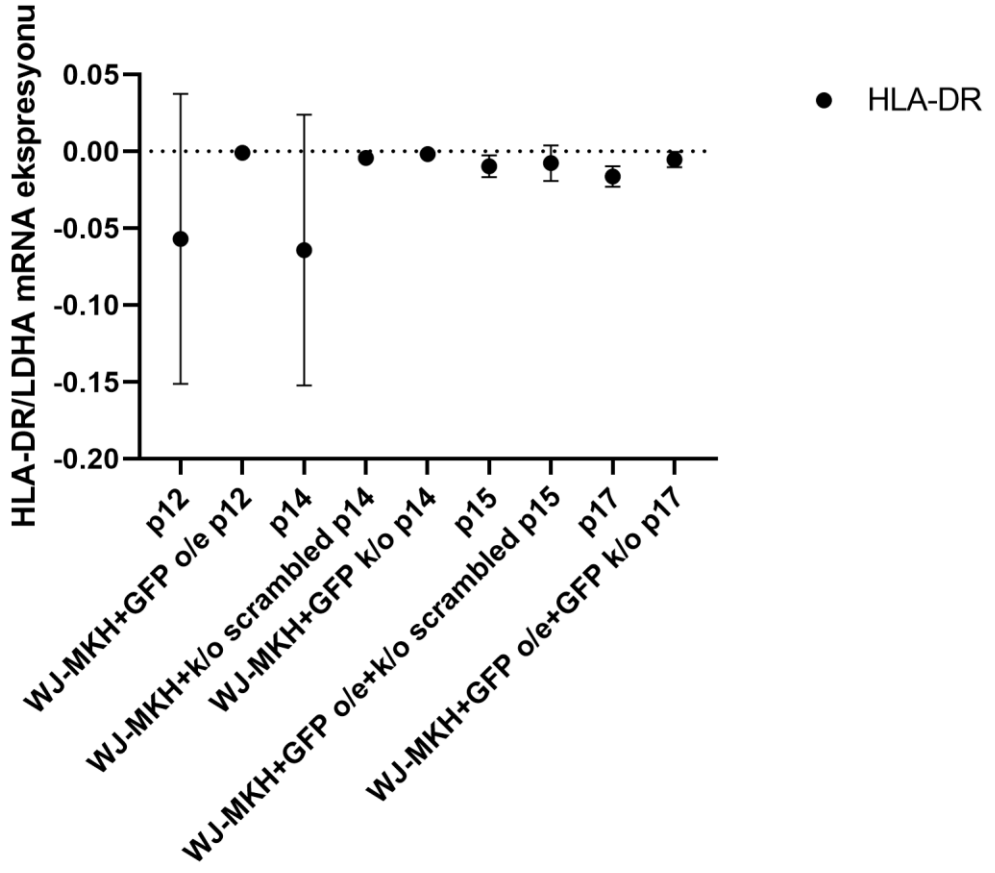
Şekil 3.21: Genetiği değiştirilen WJ-MKH'lerin qPZR ile karakterizasyonu değerlendirildi. CD44 mRNA seviyeleri, LDHA ekspresyon seviyelerine göre normalizasyonu yapıldı. İstatistiksel olarak bir fark görülmedi $p > 0.05$



Şekil 3.22: Genetiği değiştirilen WJ-MKH'lerin qPZR ile karakterizasyonu değerlendirildi. CD106 mRNA seviyeleri, LDHA ekspresyon seviyelerine göre normalizasyonu yapıldı. İstatistiksel olarak bir fark görülmedi $p>0.05$

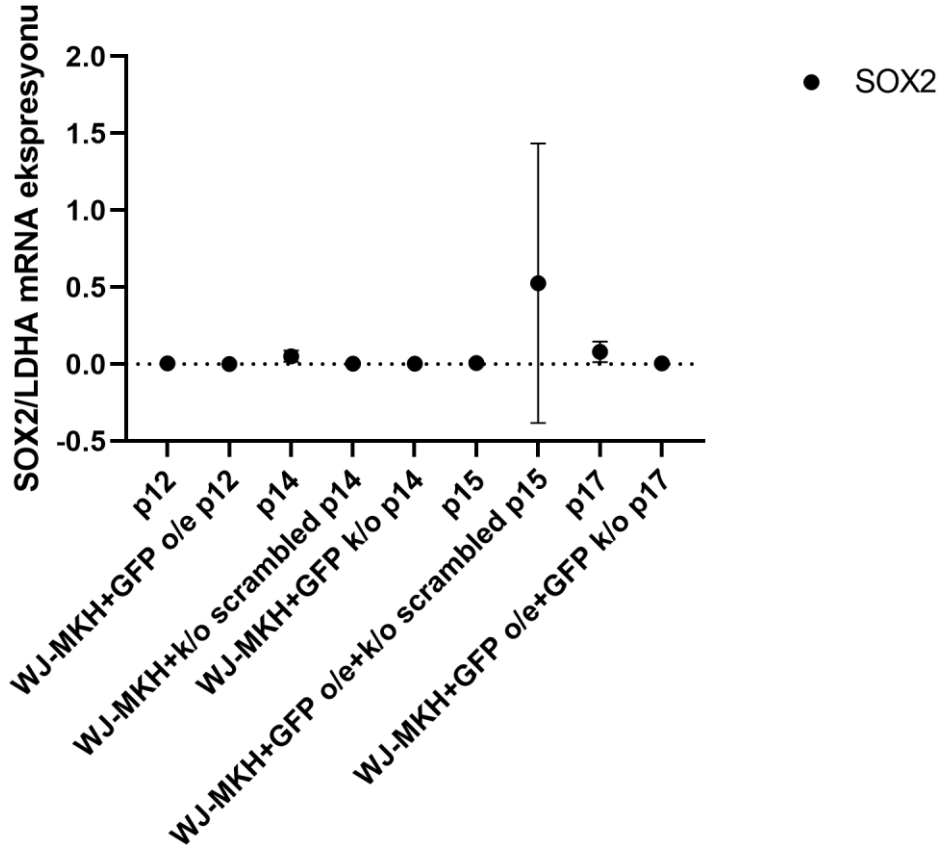


Şekil 3.23: Genetiği değiştirilen WJ-MKH'lerin qPZR ile karakterizasyonu değerlendirildi. CD54 mRNA seviyeleri, LDHA ekspresyon seviyelerine göre normalizasyonu yapıldı. İstatistiksel olarak bir fark görülmedi $p > 0.05$

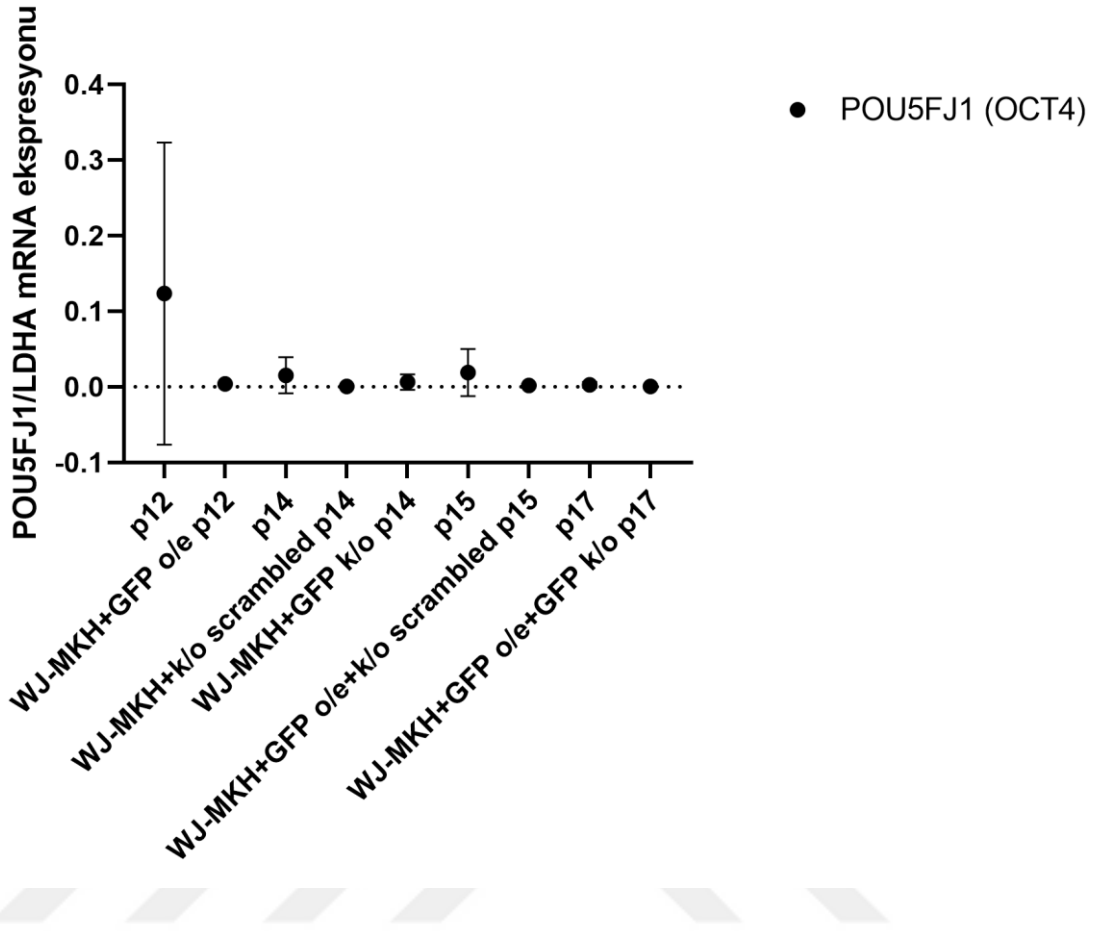


Şekil 3.24: Genetiği değiştirilen WJ-MKH'lerin qPZR ile karakterizasyonu değerlendirildi. HLA-DR mRNA seviyeleri, LDHA ekspresyon seviyelerine göre normalizasyonu yapıldı. İstatistiksel olarak bir fark görülmedi $p>0.05$

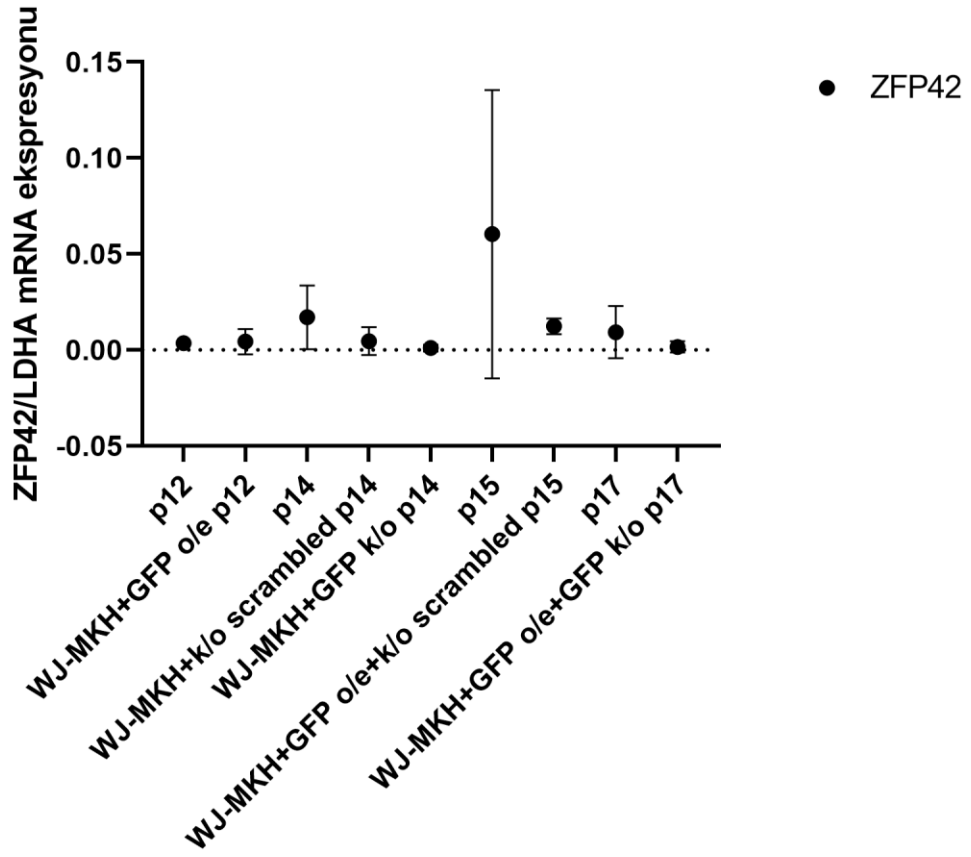
Pluripotensi belirteçleri:



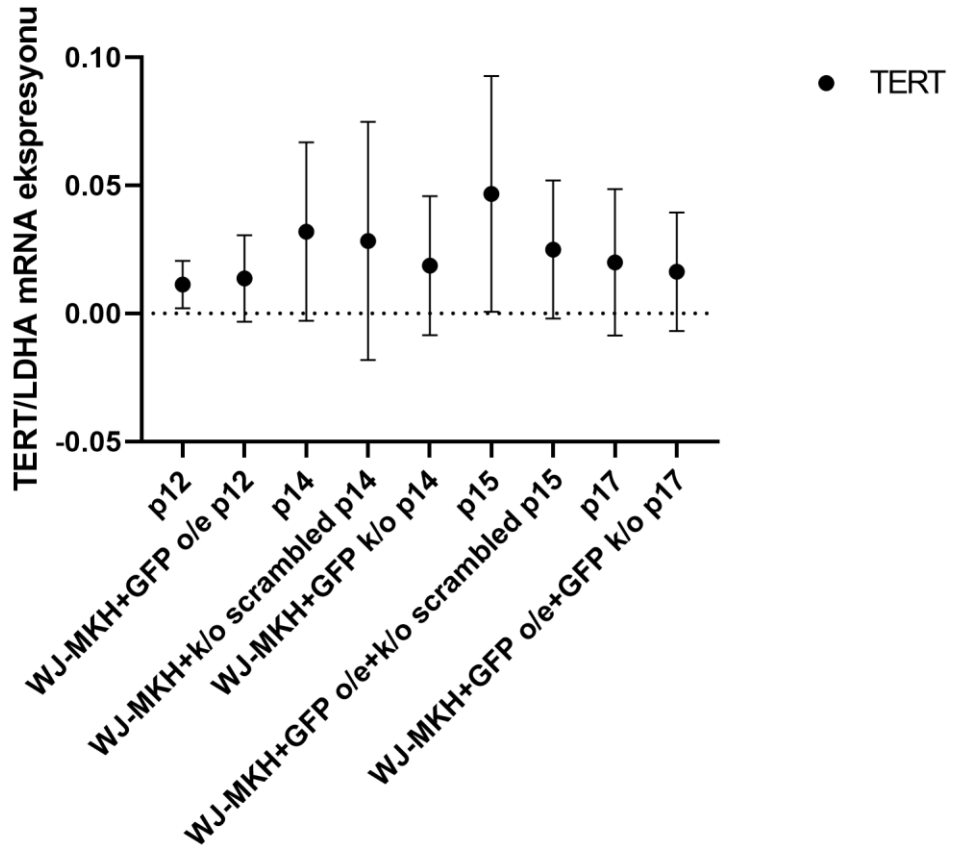
Şekil 3.25: Genetiği değiştirilen WJ-MKH'lerin qPZR ile karakterizasyonu değerlendirildi. SOX2 mRNA seviyeleri, LDHA ekspresyon seviyelerine göre normalizasyonu yapıldı. İstatistiksel olarak bir fark görülmedi $p>0.05$



Şekil 3.26: Genetiği değiştirilen WJ-MKH'lerin qPZR ile karakterizasyonu değerlendirildi. POU5J1 mRNA seviyeleri, LDHA ekspresyon seviyelerine göre normalizasyonu yapıldı. İstatistiksel olarak bir fark görülmedi $p>0.05$

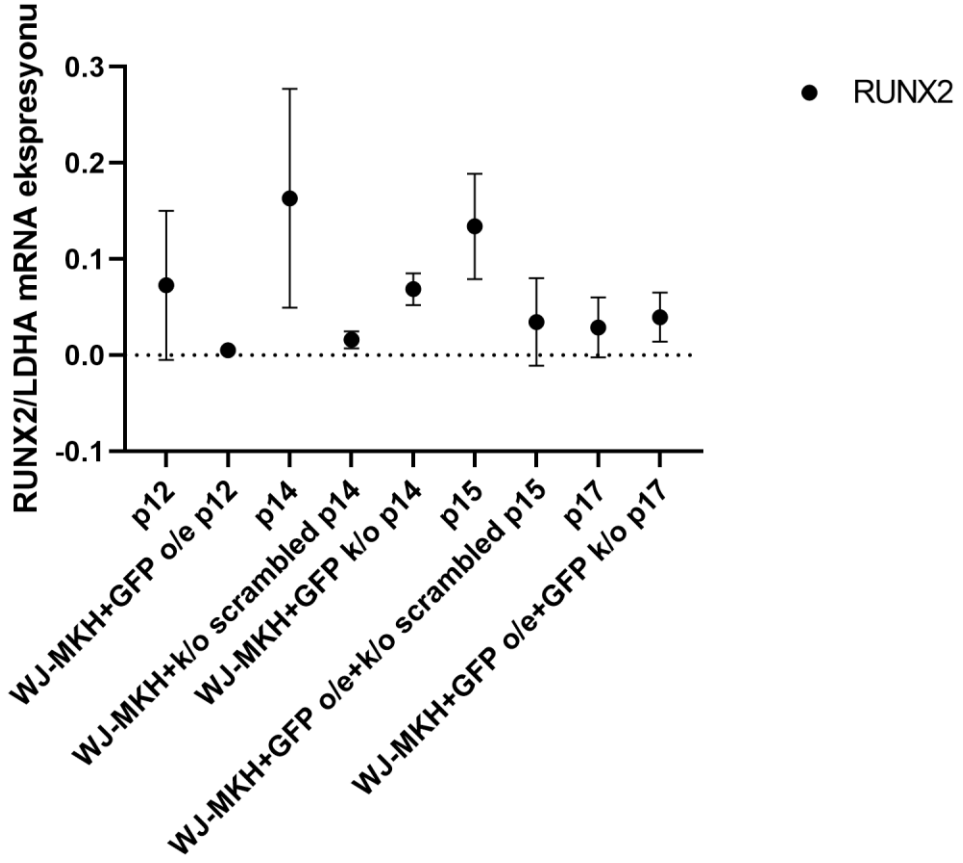


Şekil 3.27: Genetiği değiştirilen WJ-MKH'lerin qPCR ile karakterizasyonu değerlendirildi. ZFP42 mRNA seviyeleri, LDHA ekspresyon seviyelerine göre normalizasyonu yapıldı. İstatistiksel olarak bir fark görülmedi $p > 0.05$

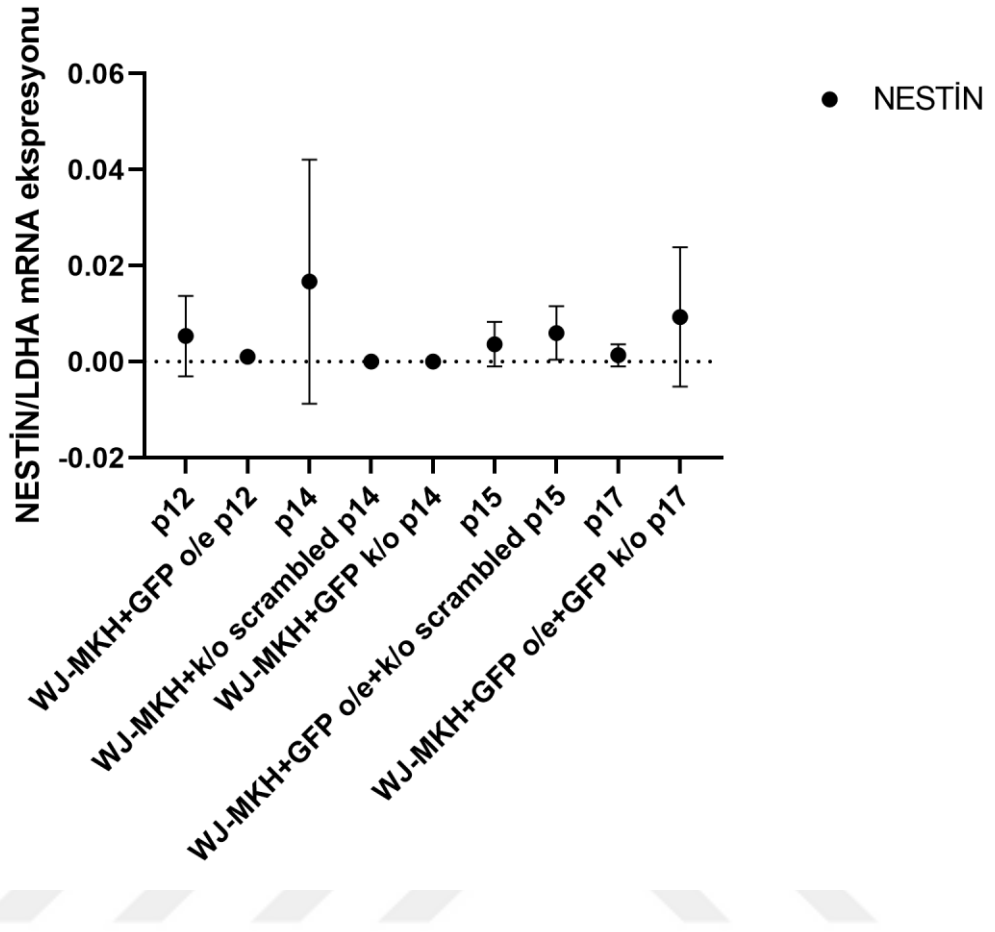


Şekil 3.28: Genetiği değiştirilen WJ-MKH'lerin qPZR ile karakterizasyonu değerlendirildi. TERT mRNA seviyeleri, LDHA ekspresyon seviyelerine göre normalizasyonu yapıldı. İstatistiksel olarak bir fark görülmedi $p>0.05$

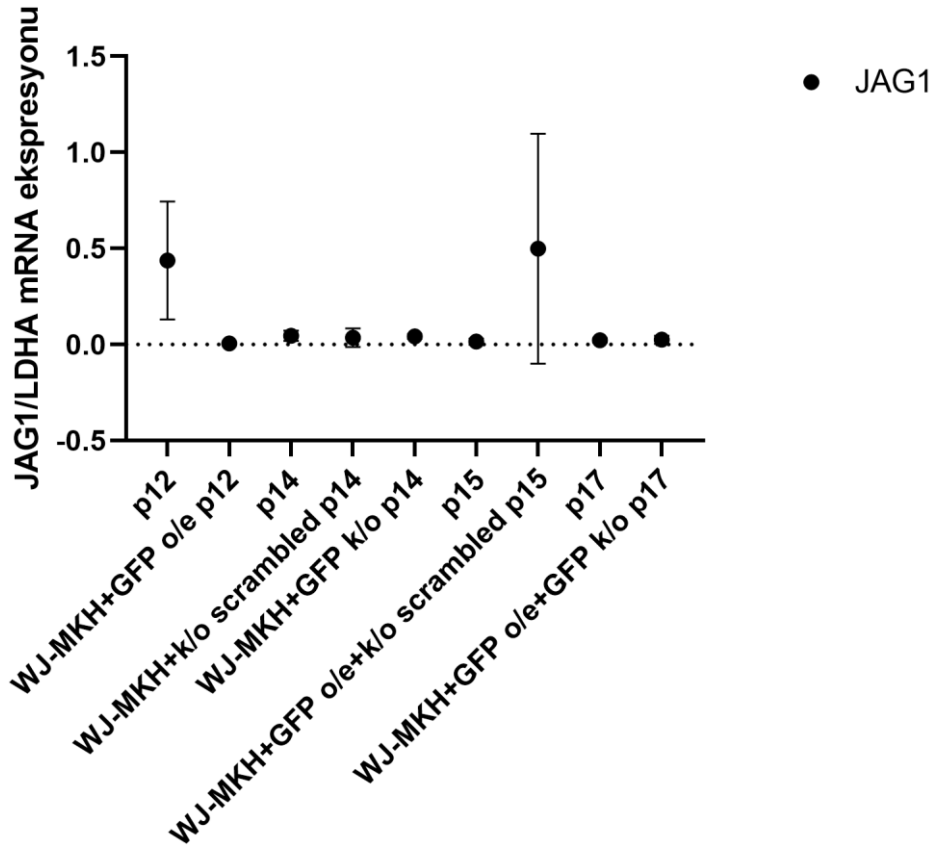
Farklılaşma belirteçleri:



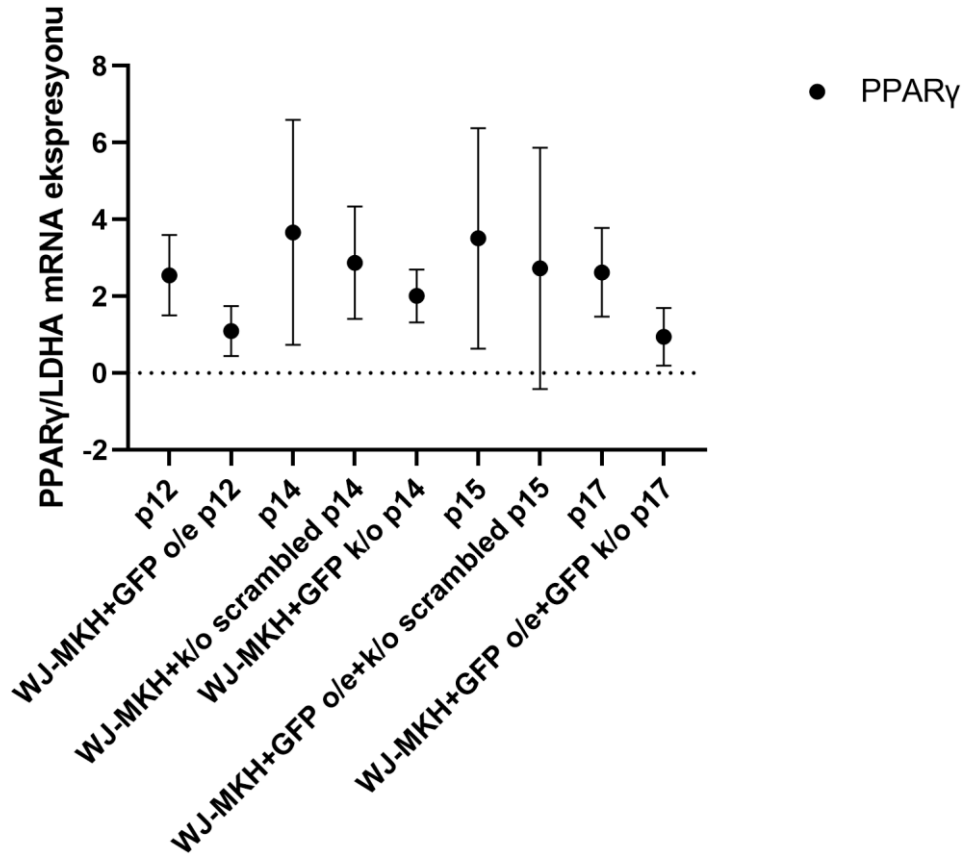
Şekil 3.29: Genetiği değiştirilen WJ-MKH'lerin qPZR ile karakterizasyonu değerlendirildi. RUNX2 mRNA seviyeleri, LDHA ekspresyon seviyelerine göre normalizasyonu yapıldı. İstatistiksel olarak bir fark görülmedi $p>0.05$



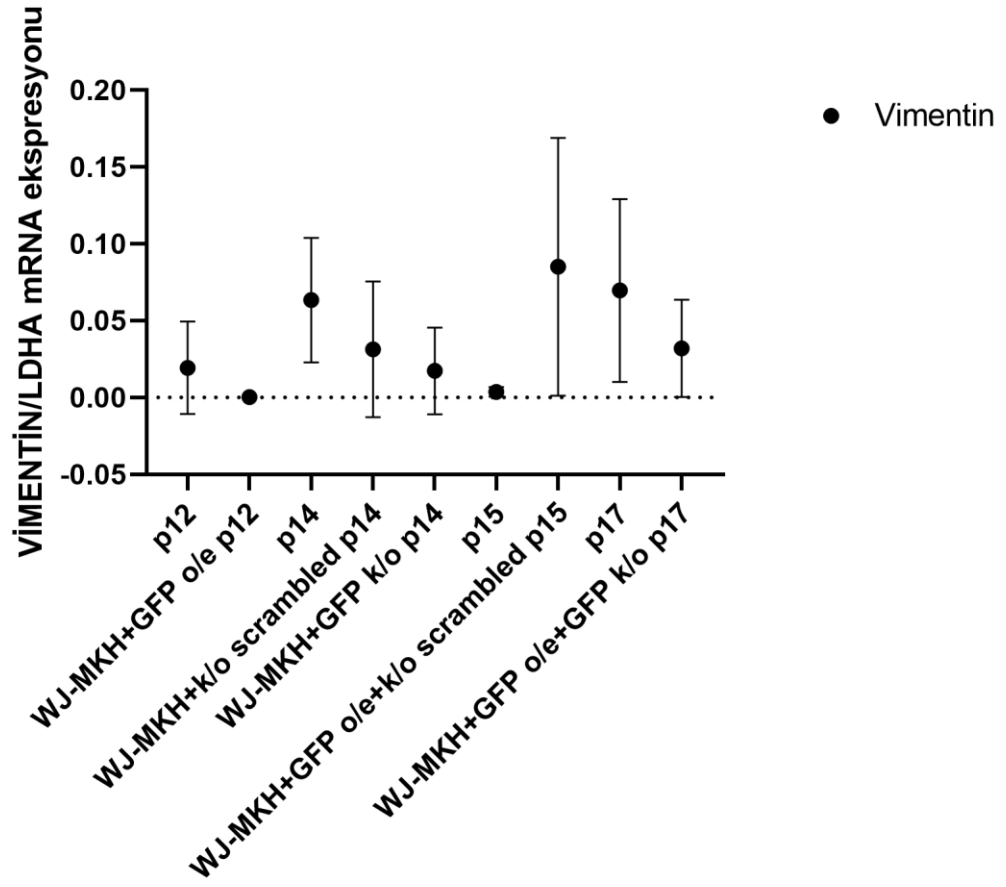
Şekil 3.30: Genetiği değiştirilen WJ-MKH'lerin qPZR ile karakterizasyonu değerlendirildi. Nestin mRNA seviyeleri, LDHA ekspresyon seviyelerine göre normalizasyonu yapıldı. İstatistiksel olarak bir fark görülmedi $p > 0.05$



Şekil 3.31: Genetiği değiştirilen WJ-MKH'lerin qPZR ile karakterizasyonu değerlendirildi. JAG1 mRNA seviyeleri, LDHA ekspresyon seviyelerine göre normalizasyonu yapıldı. İstatistiksel olarak bir fark görülmedi $p>0.05$



Şekil 3.32: Genetiği değiştirilen WJ-MKH'lerin qPZR ile karakterizasyonu değerlendirildi. PPAR γ mRNA seviyeleri, LDHA ekspresyon seviyelerine göre normalizasyonu yapıldı. İstatistiksel olarak bir fark görülmedi $p>0.05$



Şekil 3.33: Genetiği değiştirilen WJ-MKH'lerin qPZR ile karakterizasyonu değerlendirildi. Vimentin mRNA seviyeleri, LDHA ekspresyon seviyelerine göre normalizasyonu yapıldı. İstatistiksel olarak bir fark görülmedi $p>0.05$

4. TARTIŞMA

MKH'ler hızlı büyüme kapasitesine sahip, morfolojik olarak fibroblast hücrelerine benzeyen yüksek rejenerasyon ve tamir kapasitesine sahip hücrelerdir. WJ-MKH'ler in vitro ortamlarda yüksek çoğalma kapasiteleri, yüksek plastisiteyi, düşük immunojeniklikleri ve immunomodülatör özellikleri nedeniyle hücresel tedavilerde tercih edilmektedir. WJ-MKH'ler ayrıca bağışıklık bastırma ve bağışıklıktan kaçınma yeteneğine de sahiptir ve hücresel tedavilerde allojenik olarak kullanılabilir (Kim & Park, 2017).

Yabanıl tip MKH'lerinin bu avantajlarına rağmen tedavi edici uygulamalarını geliştirmek için özellikle genetik manipülasyonları konusunda araştırmaya ihtiyaç vardır. Bunun için CRISPR-Cas sistemi kullanılabilir. Bu teknoloji genlerin spesifik olarak hedeflenmesini ve gen düzeyinde değişiklik yapılabilmesini mümkün kılar (Golchin ve ark., 2019). CRISPR bileşenlerinin hedefe etkin bir şekilde teslimi verimlilik açısından en büyük zorluktur. Hücrelere gen aktarımı için elektroporasyon, polimerler ve lentivirüsler ile transfeksiyon yöntemleri kullanılabilir. Ancak MKH hücreleri kullanıldığında elektroporasyon yönteminde yüksek ölüm oranı, transfeksiyon yönteminde ise verim düşük olduğundan bu çalışmada lentivirüsler (LV) tercih edilmiştir. LV'ler diğer yöntemlere göre tasarım, üretim, kullanım ve verimlilik açısından avantajlıdır ve ileride yapılacak klinik uygulamalarda büyük potansiyele sahiptir.

Bu çalışmada lentiviral transdüksiyon yöntemleri ile MKH hücrelerinde genetik modifikasyonlar yapılmıştır. Buradaki amaç geleceğin kök hücrelerini geliştirmektir. MKH hücrelerinin rejenerasyon kapasitelerinin artırılması, hedeflenebilmesi ve üretiminin kolaylaştırılması için verimli bir gen düzenleme protokolünün geliştirilmesi amacıyla MKH hücrelerinde gen nakavtları (k/o) ve gen overekspresyonu (o/e) yapılarak hücrelerin canlılığı, gen aktarım verimliliği ve son olarak da kök hücre özelliklerini koruyup korumadıkları analiz edilmiştir.

Bu gibi optimizasyon ve protokol geliştirme çalışmalarında hücrelerin canlı olarak takip edilebilmesi avantaj sağlamaktadır. Kök hücreleri floresan etiketlemek ve izlemek için yeşil floresan protein (GFP) en çok tercih edilen biyobelirteçlerdendir. Floresan mikroskopu ile görüntüleme hücrelerin kantitatif analizi, deneysel sonuçların

ve hücre kültürü protokollerinin hızlı bir şekilde değerlendirilmesi için GFP kolaylık sağlamaktadır ve bu nedenle çalışmada tercih edilmiştir (Mannam ve ark., 2020).

Bu yaklaşım sadece optimizasyon için değil, ileride hücrelerin *in vivo* ortamlarda takibine de olanak sağlayacak hücresel etikleme için önemlidir. Özellikle hedeflenebilir MKH'ler geliştirildiğinde hayvan deneylerinde rahatlıkla kullanılacak bu yöntemle işaretli MKH'lerin vücut içerisinde dağılımı ve yaşam süresi hesaplanabilir. Her ne kadar boya inkübasyonu ya da geçici transfeksiyon metotları ile GFP veya benzeri araçlarla hücreleri işaretleme yeni bir yöntem olmasa da (Zhitomirsky ve ark., 2018), gen düzenleme konusunda direnç gösteren MKH hücrelerinde lentiviral yöntemlerle bunun bu çalışmada yüksek verimlilikte yapılmış olması ilerideki çalışmalar için de öncü olmaktadır.

Gen düzenleme yönteminde lentivirüsler ile GFP geninin aktarıldığı MKH hücrelerde yüksek miktarda GFP ışınması elde edilmiştir ve verimliliğin yaklaşık %95 ve üzeri olduğu gözlemlenmiştir. Çalışmada kullanılan viral CMV promotörünün özellik bu hücrelerde çok ciddi derece yüksek GFP ekspresyonu sağladığı saptanmıştır. Bu nedenle akım sitometrisi sırasında GFP sinyalinin cihazın limitlerinin üstüne çıktığı görülmüştür. Her ne kadar hücre işaretleme için bu avantajlı olsa da ileride fizyolojik seviyelerde protein ekspresyonunun sağlanması için daha zayıf promotörler tercih edilebilir.

Lentiviral gen düzenleme yönteminin bir başka avantajı da aktarılan genin hücrelerde kalıcı olarak aktif kalmasıdır. Bu MKH gibi yüksek bölünme kapasitesine sahip hücrelerde geçici transfeksiyon yönteminde zamana bağlı olarak karşılaşılan GFP sinyal kaybının önüne geçmektedir. Çalışmamızda GFP transfeksiyonu yapılan MKH'larda pasaj 20'ye kadar stabil ekspresyon seviyesi ve kalıcı hücre içi GFP protein üretimi gözlenmiştir.

Hedef hücre başına bir lentiviral genom kopyasının entegrasyonu (MOI 1) yerine hücre başına çoklu kopyalar da tercih edilebilir. Hücrelerde aktarılan genin birden fazla kopyasının varlığı ekspresyonu verimliliğini artırarak güçlü GFP ifadesi ve yüksek bir floresan sinyali sağlar (van Vollenstee ve ark., 2016). Beklendiği gibi, HEK hücrelerinde artan MOI oranlarında yaptığımız denemelerde transfeksiyon veriminin doza bağlı olarak arttığı gözlemlenmiştir.

Geleceğin süper-MKH'lerinin geliştirilmesi için hücrelerde sadece bir gen manipülasyonu yeterli olmayacaktır. Birçok yolağın manipülasyonu için birden fazla gen düzenleme gereklidir. Her ne kadar LV'ler diğer yöntemlere göre daha fazla genetik materyal taşıma kapasitesine sahip olsalar da, en fazla bir ya da iki genin manipülasyonuna olanak vermektedirler. Bu durum özellikle gen overekspresyonu durumunda daha da kısıtlayıcı olmaktadır.

Çalışmamızda bunun başarılabilmesi için MKH hücrelerinde iki farklı genetik manipülasyon arka arkaya yapılmıştır. Öncelikle GFP geninin lentiviral overekspresyonu sağlanmış, daha sonra GFP'yi hedefleyen sgRNA'ler CRISPR-Cas9 lentivirüsleri ile hücrelerde bu genin nakavt edilmesi ve ifadesinin susturulması sağlanmış ve GFP ışımalarının floresan mikroskopunda tamamen yok olduğu gözlemlenmiştir. Bu, MKH'lerde en az iki farklı lentiviral transdüksiyonun yapılabileceğini ve her iki gen aktarımının da verimli bir şekilde gerçekleştiğini göstermiştir. Çalışmamızda geliştirilen protokol ileride farklı vektörler tasarlanarak genlerin toplu ya da arka arkaya MKH hücrelerinde düzenlenmesine ve hücrel terapiye yönelik genetiği değiştirilmiş MKH'lerin geliştirilmesine öncü olacaktır.

Özellikle birincil hücreler ve MKH'ler gibi hücrelerde gen düzenleme yapılırken dikkat edilmesi gereken en önemli sorun hücrelerin özelliklerini kaybetmemeleridir. MKH'ler gibi rejeneratif tıp alanında klinikte hastalarda kullanılan hücrelerde bu daha da önemlidir. Hücrel tedavilerde başarı oranı doğru hasta seçimi, uygulama yolu ve tedavide kullanılan hücrelerin kalitesine bağlıdır. Hücrelerin kalitesi, izole edilen doku kaynağı, istenilen pasaja getirelen hücrelerin hala tüm kök hücre özelliklerini koruyor olması oldukça gereklidir. Bu nedenle çalışmamızda MKH'lerin genetik yapıları değiştirilmeden öncesinde ve sonrasında kök hücre markör genlerinin ifade seviyeleri RNA izolasyonu ve qPZR yöntemiyle ölçülmüştür.

Farklı hücre hatlarının qPZR sonuçlarının değerlendirilebilmesi için referans genlerle normalizasyon basamağına ihtiyaç duyulur. Hedef genler ve referans genlerin birlikte paralel ölçülmesi normalizasyonda güvenilir bir yöntem olarak kabul edilir. İdeal bir referans gen, farklı deney koşulları ya da hastalık durumunda değişmez ve tüm hücre dokularında eksprese edilir (X. Li ve ark., 2015)(Ragni ve ark., 2013). MKH'lerin kaynağına bağlı olarak referans genlerin ekspresyon seviyeleri değişkenlik gösterebilir. Lentiviral transdüksiyon sonrası WJ kaynaklı MKH'ler için LDHA referans geni WJ-

MKH'lerinin çoğalma ve farklılaşması sırasında ekspresyonu değişken olabileceği gözle alınarak referans gen olarak seçilmiştir.

ISCT'de kabul gören kriterlere göre MKH'ler, yüzey belirteçleri CD90, CD44, CD106 ve CD54'ü pozitif olarak, HLA-DR'yi negatif olarak ifade etmelidir. Karakterizasyon deneylerinde yabancı tip ve genetiği değiştirilmiş MKH hücre hatlarında bu MKH yüzey belirteçleri, pluripotensi belirteçleri ve farklılaşma belirteçlerinin ifadesi ölçülmüş ve istatistiksel olarak bir ya da iki kez gen manipülasyonuna uğramış MKH'lerin kök hücre özelliklerini kaybetmedikleri ve hücrelerin morfolojisinde bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir. Her ne kadar anektodal olarak hücrelerin büyüme hızlarında düşüş ve zorlanma olduğu tespit edilse de, bu çalışmada hücre büyüme hızı konusunda kantitatif bir analiz yapılmamıştır ve ileride bunun da yapılması gereklidir.

Yaptığımız genetik modifikasyonlarda MKH'ların kök hücre belirteçlerinde gen düzenlemeden sonra anlamlı bir fark görülmemiş olması önemlidir. Telomeraz enzimini kodlayan TERT geninin yüksek ifadesi MKH'lerde proliferasyon kapasitesini arttırdığı bilinmektedir (Beckenkamp ve ark., 2020). MKH'lerin klinik uygulamalarından önce telomeraz aktivitesinin yüksek olması beklenir. Yabancı tip ve genetiği değiştirilen MKH'lerde TERT ifadesinin değişmemesi klinik kullanımı için bir avantajdır.

MKH'lerin multipotent hücreler olmaları nedeniyle farklılaşma kapasiteleri yüksektir bu nedenle WJ-MKH'ler farklılaşma çalışmalarında sıkça kullanılır. Örnek olarak kemik oluşumu ve MKH'lerin osteojenik farklılaşması için temel bir düzenleyici olan RUNX2 (Zhao ve ark., 2005), adipogenezin ana düzenleyicisi PPAR γ (Muruganandan ve ark., 2011), nöronal farklılaşma için gerekli nestin (Wong ve ark., 2014) ve kardiyomiyosit farklılaşmasında rol olan JAG1 (Tian ve ark., 2017) genlerinde yabancı tip ve genetiği değiştirilmiş hücreler arasında bu çalışmada bir fark olmadığından genetiği değiştirilmiş MKH'larda farklılaşma uygulamalarında da kullanılabilir.

5. SONUÇ

Gen terapide kullanılan standart MKH'ler yerine, CRISPR-Cas9 teknolojisi ile hücrelerin yeniden düzenlenerek tedaviye daha uygun hale getirilip geliştirilmesi mümkündür. Gen düzenleme yöntemleriyle ilgili araştırma ve klinik denemeler sürekli olarak artmakta ve bu da MKH'lerin karakterizasyon standardizasyonuna ihtiyaç duyulmasına neden olmaktadır. Bu çalışma, MKH'lerin genetik modifikasyonlarla geliştirilmiş güvenilir hücre hatlarının üretimi ve karakterizasyonunu içermektedir.

Çalışmamızda GFP o/e ve GFP k/o vektörleri, üretilen lentivirüsler aracılığıyla WJ-MKH hücrelerine transdüksiyonu yapılmıştır. Oluşturulan WJ-MKH+GFP o/e hücrelerine GFP k/o virüsü ile ikinci bir transdüksiyon yapılmış, antibiyotik seçimlerinin ardından hücre hatları oluşturulmuştur. Transdüksiyonlar sonucu genetiği değiştirilen hücrelerin kök hücre özelliklerini koruyabildiklerini göstermek için qPZR ile karakterizasyon yapılmıştır.

Sonuç olarak, lentivirüs transdüksiyonu ile yabancı tip MKH hücreleri ve genetiği değiştirilen MKH'lerin morfolojileri ve gen ekspresyonları benzerdir. Karakterizasyonu yapılan genetiği değiştirilmiş hücre hatlarının yabancı tip hücrelere kıyasla MKH karakteristiklerinin anlamlı oranda değişmediği ve kök hücre özelliklerini kaybetmedikleri görülmektedir. Ayrıca kullandığımız GFP lentiviral vektörlerin enfekte ettiği hücre hatlarını yabancı tip hücrelerle karşılaştırdığımızda MKH'ler üzerinde hücre canlılığına olumsuz bir etkisinin olmadığı ve güvenilir bir etiketleme yöntemi olduğu gözlemlenmiştir.

Çalışma sonuçlarımızda edinilen bilimsel bilgi ve birikim genetiği değiştirilmiş MKH'lerin ileride gen terapisi ve hücresel tedavilerde daha üstün olacak süper-MKH'lerin kullanılmasına ve bu alanların gelişmesine yardımcı olacaktır.

KAYNAKÇA

- Almalki, S. G., & Agrawal, D. K. (2016). Key Transcription Factors in the Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Differentiation; Research in Biological Diversity*, 92(1–2), 41. <https://doi.org/10.1016/J.DIFF.2016.02.005>
- Bolhassani, A., Taheri, T., Taslimi, Y., Zamanilui, S., Zahedifard, F., Seyed, N., Torkashvand, F., Vaziri, B., & Rafati, S. (2011). Fluorescent Leishmania species: Development of stable GFP expression and its application for in vitro and in vivo studies. *Experimental Parasitology*, 127(3), 637–645. <https://doi.org/10.1016/J.EXPPARA.2010.12.006>
- Bozkurt, C., Karaöz, E., Aksoy, B. A., Aydoğdu, S., & Fışgın, T. (2019). The use of allogeneic mesenchymal stem cells in childhood steroid-resistant acute graft-versus-host disease: A retrospective study of a single-center experience. *Turkish Journal of Hematology*, 36(3), 186–192. <https://doi.org/10.4274/tjh.galenos.2019.2019.0090>
- Caplan, A. I. (1991). Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research*, 9(5), 641–650. <https://doi.org/10.1002/jor.1100090504>
- Chandrasekaran, A. P., Song, M., Kim, K. S., & Ramakrishna, S. (2018). Different Methods of Delivering CRISPR/Cas9 Into Cells. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 159, 157–176. <https://doi.org/10.1016/BS.PMBTS.2018.05.001>
- Chen, K. Y., & Knoepfler, P. S. (2016). To CRISPR and beyond: the evolution of genome editing in stem cells. *Regenerative Medicine*, 11(8), 801. <https://doi.org/10.2217/RME-2016-0107>
- Chen, T., Xu, T., Cheng, M., Fang, H., Shen, X., Tang, Z., & Zhao, J. (2021). Human umbilical cord mesenchymal stem cells regulate CD54 and CD105 in vascular endothelial cells and suppress inflammation in Kawasaki disease. *Experimental Cell Research*, 409(2), 112941. <https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2021.112941>
- Chen, Y. H., Keiser, M. S., & Davidson, B. L. (2018). Viral Vectors for Gene Transfer. *Current Protocols in Mouse Biology*, 8(4), e58. <https://doi.org/10.1002/CPMO.58>
- Cryocord. (2021). *What Are Mesenchymal Stem Cells? | CryoCord.* <https://cryocord.com.my/infants/cordmscs/>

- Cyranoski, D. (2016). First trial of CRISPR in people: Chinese team approved to test gene-edited cells in people with lung cancer. In *Nature* (Vol. 535, Issue 7613, pp. 476–477). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nature.2016.20302>
- D’Aiuto, L., Robison, C. S., Gigante, M., Nwanegbo, E., Shaffer, B., Sukhwani, M., Castro, C. A., & Chaillet, J. R. (2008). Human IL-12 p40 as a reporter gene for high-throughput screening of engineered mouse embryonic stem cells. *BMC Biotechnology* 2008 8:1, 8(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-8-52>
- Da Silva, C. L., Madeira, C., Mendes, R. D., Ribeiro, S. C., Boura, J. S., Aires-Barros, M. R., & Cabral, J. M. S. (2010). Nonviral Gene Delivery to Mesenchymal Stem Cells Using Cationic Liposomes for Gene and Cell Therapy. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/735349>
- Daya, S., & Berns, K. I. (2008). Gene Therapy Using Adeno-Associated Virus Vectors. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(4), 583. <https://doi.org/10.1128/CMR.00008-08>
- Deyle, D. R., & Russell, D. W. (2009). Adeno-associated virus vector integration. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 11(4), 442. <https://doi.org/10.1016/j.cot.2009.06.006>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213), 1258096. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
- Dube, A., Gupta, R., & Singh, N. (2009). Reporter genes facilitating discovery of drugs targeting protozoan parasites. In *Trends in Parasitology* (Vol. 25, Issue 9, pp. 432–439). Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.06.006>
- Dudáš, A., & Chovanec, M. (2004). DNA double-strand break repair by homologous recombination. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 566(2), 131–167. <https://doi.org/10.1016/J.MRREV.2003.07.001>
- Elahi, F. M., Farwell, D. G., Nolta, J. A., & Anderson, J. D. (2020). Preclinical translation of exosomes derived from mesenchymal stem/stromal cells. In *Stem Cells* (Vol. 38, Issue 1, pp. 15–21). Wiley-Blackwell.

- <https://doi.org/10.1002/stem.3061>
- Escors, D., & Breckpot, K. (2010). Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, *58*(2), 107. <https://doi.org/10.1007/S00005-010-0063-4>
- Farhana, A., & Lappin, S. L. (2021). Biochemistry, Lactate Dehydrogenase. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557536/>
- Flores, I., & Blasco, M. A. (2010). The role of telomeres and telomerase in stem cell aging. *FEBS Letters*, *584*(17), 3826–3830. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2010.07.042>
- Friedenstein, A. J., Piatetzky-Shapiro, I. I., & Petrakova, K. V. (1966). Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Development*, *16*(3).
- Galipeau, J., & Sensébé, L. (2018). Mesenchymal Stromal Cells: Clinical Challenges and Therapeutic Opportunities. In *Cell Stem Cell* (Vol. 22, Issue 6, pp. 824–833). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.05.004>
- Ghaneialvar, H., Lotfi, A. S., Arjmand, S., Soltani, L., Kenarkoohi, A., & Zangeneh, M. M. (2019). Comparison of transduction efficiency among various cell types by a lentivector containing CMV promoter. *Comparative Clinical Pathology*, *28*(4), 1077–1085. <https://doi.org/10.1007/S00580-019-02929-8/FIGURES/3>
- Gilbert, L. A., Larson, M. H., Morsut, L., Liu, Z., Brar, G. A., Torres, S. E., Stern-Ginossar, N., Brandman, O., Whitehead, E. H., Doudna, J. A., Lim, W. A., Weissman, J. S., & Qi, L. S. (2013). CRISPR-Mediated Modular RNA-Guided Regulation of Transcription in Eukaryotes. *Cell*, *154*(2), 442. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2013.06.044>
- Hamann, A., Nguyen, A., & Pannier, A. K. (2019). Nucleic acid delivery to mesenchymal stem cells: a review of nonviral methods and applications. *Journal of Biological Engineering*, *13*(1). <https://doi.org/10.1186/S13036-019-0140-0>
- Hoffman, R. M. (2007). The potential of nestin-expressing hair follicle stem cells in regenerative medicine. <Http://Dx.Doi.Org/10.1517/14712598.7.3.289>, *7*(3), 289–291. <https://doi.org/10.1517/14712598.7.3.289>
- Irmak, D. K., Darıcı, H., & Karaöz, E. (2020). Stem Cell Based Therapy Option in COVID-19: Is It Really Promising? *Aging and Disease*, *11*(5), 1174. <https://doi.org/10.14336/AD.2020.0608>
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakamura, A. (1987).

- Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isoenzyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*, 169(12), 5429–5433. <https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987>
- Jiang, Y., Jahagirdar, B. N., Reinhardt, R. L., Schwartz, R. E., Keene, C. D., Ortiz-Gonzalez, X. R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W. C., Lergaespada, D. A., & Verfaillie, C. M. (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002 418:6893, 418(6893), 41–49. <https://doi.org/10.1038/nature00870>
- Jinek, M., Jiang, F., Taylor, D. W., Sternberg, S. H., Kaya, E., Ma, E., Anders, C., Hauer, M., Zhou, K., Lin, S., Kaplan, M., Iavarone, A. T., Charpentier, E., Nogales, E., & Doudna, J. A. (2014). Structures of Cas9 Endonucleases Reveal RNA-Mediated Conformational Activation. *Science (New York, N.Y.)*, 343(6176), 1247997. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1247997>
- Joung, J. K., & Sander, J. D. (2013). TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 14(1), 49. <https://doi.org/10.1038/NRM3486>
- Kafri, T., Blömer, U., Peterson, D. A., Gage, F. H., & Verma, I. M. (1997). Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nature Genetics* 1997 17:3, 17(3), 314–317. <https://doi.org/10.1038/ng1197-314>
- Karagöz, E., Özel, D., Özkan, F., Duran Özel, B., Özer, Ö., & Coşkun, Z. Ü. (2016). Effectiveness of Computed Tomography Guided Percutaneous Radiofrequency Ablation Therapy for Osteoid Osteoma: Initial Results and Review of the Literature. *Polish Journal of Radiology*, 81, 295. <https://doi.org/10.12659/PJR.896475>
- Karaöz, E., Demircan, P. Ç., Erman, G., Güngörürler, E., & Sarıboyacı, A. E. (2017). Comparative Analyses of Immunosuppressive Characteristics of Bone-Marrow, Wharton's Jelly, and Adipose Tissue-Derived Human Mesenchymal Stem Cells. *Turkish Journal of Hematology*, 34(3), 213–225. <https://doi.org/10.4274/TJH.2016.0171>
- Karaoz, E., Sun, E., & Demir, C. S. (2019). Mesenchymal stem cell-derived exosomes do not promote the proliferation of cancer cells in vitro. *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology*, 11(4), 177–189.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31523364>

- Khalil, A. M. (2020). The genome editing revolution: review. In *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* (Vol. 18, Issue 1). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1186/s43141-020-00078-y>
- Khan, S. H. (2019). Genome-Editing Technologies: Concept, Pros, and Cons of Various Genome-Editing Techniques and Bioethical Concerns for Clinical Application. *Molecular Therapy. Nucleic Acids*, 16, 326. <https://doi.org/10.1016/J.OMTN.2019.02.027>
- Kleinstiver, B. P., Prew, M. S., Tsai, S. Q., Topkar, V. V., Nguyen, N. T., Zheng, Z., Gonzales, A. P. W., Li, Z., Peterson, R. T., Yeh, J.-R. J., Aryee, M. J., & Joung, J. K. (2015). Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature* 2015 523:7561, 523(7561), 481–485. <https://doi.org/10.1038/nature14592>
- Kolios, G., & Moodley, Y. (2013). Introduction to Stem Cells and Regenerative Medicine. *Respiration*, 85(1), 3–10. <https://doi.org/10.1159/000345615>
- Li, H., Yu, B., Zhang, Y., Pan, Z., Xu, W., & Li, H. (2006). Jagged1 protein enhances the differentiation of mesenchymal stem cells into cardiomyocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 341(2), 320–325. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2005.12.182>
- Li, L., Hu, S., & Chen, X. (2018). Non-viral delivery systems for CRISPR/Cas9-based genome editing: Challenges and opportunities. In *Biomaterials* (Vol. 171, pp. 207–218). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.04.031>
- Liu, C., Zhang, L., Liu, H., & Cheng, K. (2017). Delivery strategies of the CRISPR-Cas9 gene-editing system for therapeutic applications. In *Journal of Controlled Release* (Vol. 266, pp. 17–26). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.09.012>
- Mao, Z., Bozzella, M., Seluanov, A., & Gorbunova, V. (2008). DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 7(18), 2902. <https://doi.org/10.4161/CC.7.18.6679>
- Munis, A. M. (2020). Gene Therapy Applications of Non-Human Lentiviral Vectors. *Viruses*, 12(10). <https://doi.org/10.3390/V12101106>
- Musiał-Wysocka, A., Kot, M., Sułkowski, M., Badyra, B., & Majka, M. (2019). Molecular and Functional Verification of Wharton's Jelly Mesenchymal Stem

- Cells (WJ-MSCs) Pluripotency. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(8). <https://doi.org/10.3390/IJMS20081807>
- Nemeth, K. (2014). Mesenchymal stem cell therapy for immune-modulation: the donor, the recipient, and the drugs in-between. *Experimental Dermatology*, 23(9), 625–628. <https://doi.org/10.1111/EXD.12459>
- Novak, D., Hüser, L., Elton, J. J., Umansky, V., Altevogt, P., & Utikal, J. (2020). SOX2 in development and cancer biology. *Seminars in Cancer Biology*, 67, 74–82. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCANCER.2019.08.007>
- Owen, M., & Friedenstein, A. J. (2007). Stromal Stem Cells: Marrow-Derived Osteogenic Precursors. In *Ciba Foundation symposium* (Vol. 136, pp. 42–60). Ciba Found Symp. <https://doi.org/10.1002/9780470513637.ch4>
- Pattabiraman, S., Azad, G. K., Amen, T., Brielle, S., Park, J. E., Sze, S. K., Meshorer, E., & Kaganovich, D. (2020). Vimentin protects differentiating stem cells from stress. *Scientific Reports 2020 10:1*, 10(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76076-4>
- Phinney, D. G., & Pittenger, M. F. (2017). Concise Review: MSC-Derived Exosomes for Cell-Free Therapy. *Stem Cells*, 35(4), 851–858. <https://doi.org/10.1002/stem.2575>
- Ragni, E., Viganò, M., Rebullà, P., Giordano, R., & Lazzari, L. (2013). What is beyond a qRT-PCR study on mesenchymal stem cell differentiation properties: how to choose the most reliable housekeeping genes. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 17(1), 168. <https://doi.org/10.1111/J.1582-4934.2012.01660.X>
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, 8(11), 2281–2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>
- Ranjbaran, H., Abediankenari, S., Mohammadi, M., Jafari, N., Khalilian, A., & Rahmani, Z. (2017). *Wharton ' s Jelly Derived-Mesenchymal Stem Cells : Isolation and Characterization*. 8.
- Rosen, E. D., & Spiegelman, B. M. (2001). PPAR γ : a Nuclear Regulator of Metabolism, Differentiation, and Cell Growth *. *Journal of Biological Chemistry*, 276(41), 37731–37734. <https://doi.org/10.1074/JBC.R100034200>
- Rossant, J. (2001). Stem Cells from the Mammalian Blastocyst. *STEM CELLS*, 19(6), 477–482. <https://doi.org/10.1634/STEMCELLS.19-6-477>

- Scotland, K. B., Chen, S., Sylvester, R., & Gudas, L. J. (2009). Analysis of Rex1 (zfp42) function in embryonic stem cell differentiation. *Developmental Dynamics*, 238(8), 1863–1877. <https://doi.org/10.1002/DVDY.22037>
- Segura, M. M., Mangion, M., Gaillet, B., & Garnier, A. (2013). New developments in lentiviral vector design, production and purification. *Http://Dx.Doi.Org/10.1517/14712598.2013.779249*, 13(7), 987–1011. <https://doi.org/10.1517/14712598.2013.779249>
- Squillaro, T., Peluso, G., & Galderisi, U. (2016). Clinical trials with mesenchymal stem cells: An update. In *Cell Transplantation* (Vol. 25, Issue 5, pp. 829–848). Cognizant Communication Corporation. <https://doi.org/10.3727/096368915X689622>
- Sun, W., Ji, W., Hall, J. M., Hu, Q., Wang, C., Beisel, C. L., & Gu, Z. (2015). Efficient Delivery of CRISPR-Cas9 for Genome Editing via Self-Assembled DNA Nanoclews. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 54(41), 12029. <https://doi.org/10.1002/ANIE.201506030>
- Taghizadeh, R. R., Cetrulo, K. J., & Cetrulo, C. L. (2011). Wharton's Jelly stem cells: Future clinical applications. *Placenta*, 32(SUPPL. 4), S311–S315. <https://doi.org/10.1016/J.PLACENTA.2011.06.010>
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, 131(5), 861–872. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2007.11.019/ATTACHMENT/ACC16DB6-8022-4ED1-9B4E-D9ED81E29993/MMC8.MPG>
- Tang, H., Zhao, X., & Jiang, X. (2020). Synthetic multi-layer nanoparticles for CRISPR-Cas9 genome editing. *Advanced Drug Delivery Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.03.001>
- Tsien, R. Y. (1998). The green fluorescent protein. In *Annual Review of Biochemistry* (Vol. 67, pp. 509–544). Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.509>
- Turinetto, V., Vitale, E., & Giachino, C. (2016). Senescence in human mesenchymal stem cells: Functional changes and implications in stem cell-based therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7), 1–18.

- <https://doi.org/10.3390/ijms17071164>
- Ugurlu, B., & Karaoz, E. (2020). Comparison of similar cells: Mesenchymal stromal cells and fibroblasts. In *Acta Histochemica* (Vol. 122, Issue 8, p. 151634). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2020.151634>
- Ullah, I., Subbarao, R. B., & Rho, G. J. (2015). Human mesenchymal stem cells - Current trends and future prospective. In *Bioscience Reports* (Vol. 35, Issue 2, p. 191). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/BSR20150025>
- Vairy, S., Garcia, J. L., Teira, P., & Bittencourt, H. (2018). CTL019 (tisagenlecleucel): CAR-T therapy for relapsed and refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Drug Design, Development and Therapy*, 12, 3885. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S138765>
- Volarevic, V., Markovic, B. S., Gazdic, M., Volarevic, A., Jovicic, N., Arsenijevic, N., Armstrong, L., Djonov, V., Lako, M., & Stojkovic, M. (2018). Ethical and Safety Issues of Stem Cell-Based Therapy. *International Journal of Medical Sciences*, 15(1), 36. <https://doi.org/10.7150/IJMS.21666>
- Wegmeyer, H., Bröske, A. M., Leddin, M., Kuentzer, K., Nisslbeck, A. K., Hupfeld, J., Wiechmann, K., Kuhlen, J., Von Schwerin, C., Stein, C., Knothe, S., Funk, J., Huss, R., & Neubauer, M. (2013). Mesenchymal Stromal Cell Characteristics Vary Depending on Their Origin. *Stem Cells and Development*, 22(19), 2606. <https://doi.org/10.1089/SCD.2013.0016>
- Wiesmann, A., Bühring, H.-J., Mentrup, C., & Wiesmann, H.-P. (2006). Decreased CD90 expression in human mesenchymal stem cells by applying mechanical stimulation. *Head & Face Medicine* 2006 2:1, 2(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/1746-160X-2-8>
- Wightman, L., Kircheis, R., Rössler, V., Garotta, S., Ruzicka, R., Kurs, M., & Wagner, E. (2001). Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo. *The Journal of Gene Medicine*, 3(4), 362–372. <https://doi.org/10.1002/JGM.187>
- Wislet-Gendebien, S., Wautier, F., Leprince, P., & Rogister, B. (2005). Astrocytic and neuronal fate of mesenchymal stem cells expressing nestin. *Brain Research Bulletin*, 68(1–2), 95–102. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESBULL.2005.08.016>
- Xu, J. H., Li, Z. H., Hou, Y. D., & Fang, W. J. (2015). Potential mechanisms underlying

- the Runx2 induced osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells. *American Journal of Translational Research*, 7(12), 2527. [/pmc/articles/PMC4731654/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25271654/)
- Yang, Z., Wang, Y., Li, Y., Liu, Q., Zeng, Q., & Xu, X. (2014). Options for tracking GFP-Labeled transplanted myoblasts using in vivo fluorescence imaging: implications for tracking stem cell fate. *BMC Biotechnology*, 14, 55. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-14-55>
- Yang, Z. X., Han, Z. B., Ji, Y. R., Wang, Y. W., Liang, L., Chi, Y., Yang, S. G., Li, L. N., Luo, W. F., Li, J. P., Da Chen, D., Du, W. J., Cao, X. C., Zhuo, G. S., Wang, T., & Han, Z. C. (2013). CD106 Identifies a Subpopulation of Mesenchymal Stem Cells with Unique Immunomodulatory Properties. *PLoS ONE*, 8(3), 59354. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0059354>
- Yin, H., Kanasty, R. L., Eltoukhy, A. A., Vegas, A. J., Dorkin, J. R., & Anderson, D. G. (2014). Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nature Reviews Genetics* 2014 15:8, 15(8), 541–555. <https://doi.org/10.1038/nrg3763>
- Yip, B. H. (2020a). Recent advances in CRISPR/Cas9 delivery strategies. In *Biomolecules* (Vol. 10, Issue 6). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biom10060839>
- Yip, B. H. (2020b). Recent Advances in CRISPR/Cas9 Delivery Strategies. *Biomolecules*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/BIOM10060839>
- Yu, W. H., Li, F. G., Chen, X. Y., Li, J. T., Wu, Y. H., Huang, L. H., Wang, Z., Li, P., Wang, T., Lahn, B. T., & Xiang, A. P. (2012). PPAR γ suppression inhibits adipogenesis but does not promote osteogenesis of human mesenchymal stem cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44(2), 377–384. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2011.11.013>
- Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M., & Rybak, Z. (2019). Stem cells: Past, present, and future. In *Stem Cell Research and Therapy* (Vol. 10, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1165-5>
- Zhang, J., Huang, X., Wang, H., Liu, X., Zhang, T., Wang, Y., & Hu, D. (2015). The challenges and promises of allogeneic mesenchymal stem cells for use as a cell-based therapy. In *Stem Cell Research and Therapy* (Vol. 6, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0240-9>

İNTİHAL RAPORU

ORJİNALLIK RAPORU

% 12	% 9	% 1	% 7
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	% 6
2	acikerisim.istinye.edu.tr İnternet Kaynağı	% 4
3	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
4	d-nb.info İnternet Kaynağı	<% 1
5	tur.kyhistotechs.com İnternet Kaynağı	<% 1
6	Submitted to Karadeniz Teknik University Öğrenci Ödevi	<% 1
7	Submitted to University of Abertay Dundee Öğrenci Ödevi	<% 1
8	adudspace.adu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
9	acikerisim.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1