



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



**KÜÇÜK HÜCRELİ DİŞİ AKCİĞER
KANSERİNDE CİSPLATİN DİRENCİ
GELİŞİMİNDE ROL OYNAYAN GENETİK
FAKTÖRLERİN CRISPR-CAS9 TABANLI TÜM
GENOM TARAMA SİSTEMİYLE
BELİRLENMESİ**

Doktora Tezi

Hale GÜLER KARA

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

İZMİR
2021

T.C.
Ege Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERİNDE CİSPLATİN
DİRENCİ GELİŞİMİNDE ROL OYNAYAN GENETİK
FAKTÖRLERİN CRISPR-CAS9 TABANLI TÜM GENOM TARAMA
SİSTEMİYLE BELİRLENMESİ**

Doktora Tezi

Hale GÜLER KARA

Danışman
Doç. Dr. Buket KOSOVA

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

İZMİR
2021

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

Adı-Soyadı

İmza

Başkan: Doç. Dr. Buket KOSOVA

.....

(Danışman)

Üye : Doç. Dr. Vildan BOZOK ÇETİNTAŞ

.....

Üye : Prof. Dr. Caner KABASAKAL

.....

Üye : Prof. Dr. Cumhur GÜNDÜZ

.....

Üye : Prof. Dr. Fuat DİLMEÇ

.....

Üye : Prof. Dr. M. Emin ERDAL

.....

Doktora tezinin kabul edildiği tarih 24/09/2021

ÖNSÖZ

Doktora eğitimime başladığım günden itibaren kanser tedavisinde kullanılabilecek etkin tedavi seçenekleri ararken, farklı kanser türlerinde gelişen ilaç direncinin tedaviyi olumsuz etkilediğini bu nedenle yeni terapötik hedeflere ihtiyaç duyulduğunu farkettim. Bundan yola çıkarak akciğer kanserinde genom çapında CRISPR tarama çalışması yaparak cisplatin direç gelişiminde etkili yeni terapötik hedefler belirlemeye çalıştım.

Çalışmalarım esnasında karşılaştığım her sorunun aslında bir tecrübe olduğunu, emek vermeden ilerlenemeyeceğini, bilimsel gelişimin hiçbir zaman bitmeyeceğini gördüm. Bu yüzden bilim ışığını hiç söndürmeden kanser tedavisinde yeni seçenekler aramaya devam edeceğimi bildirmek isterim...

İzmir, 2021

Hale GÜLER KARA

ÖZET

Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanserinde Cisplatin Direnci Gelişiminde Rol Oynayan Genetik Faktörlerin CRISPR-CAS9 Tabanlı Tüm Genom Tarama Sistemiyle Belirlenmesi

Yüksek metastatik etkisi ile tanımlanan akciğer kanseri, en sık teşhis edilen kanser türüdür. Maligniteyi kontrol etmek için kullanılan başlıca tedavi yöntemi kemoterapidir. Kemoterapötikler arasında yer alan cisplatin, akciğer kanseri dahil birçok kanser türünün tedavisinde kullanılan platin bazlı bir ajandır. Küçük hücreli dışı akciğer kanserinin (KHDAK) standart tedavisinde kullanılan cisplatine karşı olguların ~%60'ının zamanla direnç geliştirdikleri bilinmektedir. Bu yüzden cisplatin direnç mekanizmasının aydınlatılması ve yeni moleküler hedeflerin belirlenmesi gerekmektedir. Bu tez çalışmasında genom çapında CRISPR-Cas9 -tabanlı genetik tarama yöntemiyle cisplatine duyarlı ve dirençli KHDAK hücre serisi Calu-1'in bağımlı olduğu bileşenlerin belirlenmesi ve bu bileşenlerin kanser tedavisinde kullanılabilirliklerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmada, CRISPR-Cas9 -tabanlı genetik tarama için 19,114 insan genini hedefleyen ve toplam 76,441 guide RNA'dan (*gRNA*) oluşan lentiviral 'Brunello kütüphanesi' kullanıldı. Calu-1 hücreleri 'doz arttırımı' metoduyla cisplatine karşı 6.3-kat dirençli hale getirildikten sonra cisplatine duyarlı ve dirençli Calu-1 hücreleri kütüphane ile transfekte edildi. Transfeksiyondan sonra gruplar arasındaki *gRNA* dağılımının belirlenmesi için yeni nesil dizi analizi (NGS) ile ampikon sekanslama yaptırıldı. NGS sonuçları biyoinformatik analizlerden geçirilerek her hücre grubunda artan ve azalan *gRNA*'lar belirlenerek bu *gRNA*'ların hedefledikleri genler listelendi. Aday genler, dirençli hücrede cisplatin duyarlılığını artırmak için azalan *gRNA*'ların hedefledikleri genler arasından seçildi. Azalan genlerin hücre döngüsü, protein veya lipid metabolizması, vezikül, protein veya iyon transportu, DNA tamiri, mRNA splicing, gen ekspresyonu, RNA işlenmesi, epigenetik, apoptoz, protein modifikasyonu gibi önemli biyolojik yollarda rol oynadıkları belirlendi. Dirençli Calu-1 hücrelerinde gen skoruna ve akciğer kanserindeki yüksek ekspresyon seviyesine göre aday gen olarak *GPR89A* seçildi. Bu aday gen dirençli Calu-1 hücrelerinde knock-out edildikten sonra hücre canlılığı, sitotoksitesi, apoptoz, hücre döngüsü, koloni oluşumu,

migrasyon gibi önemli hücresel fonksiyonlar ile *ATF4* gen ekspresyonu üzerine olan etkileri fonksiyonel testlerle belirlendi.

Yapılan fonksiyonel analizler sonucunda *GPR89A* knock-out dirençli Calu-1 hücrelerinin cisplatin duyarlılığının arttığı, cisplatin tedavisi sonrası apoptozunun indüklendiği, hücre döngüsünün S evre arresti sonucu mitotik katastrofa neden olduğu, koloni oluşumunu ve migrasyonunu engellediği belirlendi.

Bu çalışma ile cisplatin dirençli KHDAK hücrelerinde ilk kez genom çapında tarama yapılarak *GPR89A* geninin direnç gelişiminden sorumlu bir faktör olduğu ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: KHDAK, CRISPR-Cas9, cisplatin direnci, genetik tarama, *GPR89A*

ABSTRACT

Determination of Genetic Factors Role in the Development of Cisplatin Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer by CRISPR-CAS9 Based Whole Genome Screening System

Lung cancer, which is defined by its high metastatic effect, is the most frequently diagnosed cancer type. The main treatment method used to control malignancy is chemotherapy. Cisplatin, which is among the chemotherapeutics, is a platinum-based agent used in the treatment of many types of cancer, including lung cancer. It is known that ~60% of cases develop resistance to cisplatin, which is used in the standard treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC). Therefore, it is necessary to elucidate the mechanism of cisplatin resistance and to identify new molecular targets. In this thesis, it was aimed to determine the dependent components of the cisplatin-sensitive and resistant NSCLC cell line Calu-1 with a genome-wide CRISPR-Cas9-based genetic screening method and to investigate the usability of these components in cancer therapy.

The study used a lentiviral “Brunello library” consisting of a total of 76,441 guide RNAs (*gRNAs*) targeting 19,114 human genes for CRISPR-Cas9-based genetic screening. After the Calu-1 cells were rendered 6.3-fold resistant to cisplatin by ‘dose escalation’ method, cisplatin-sensitive and resistant Calu-1 cells were transfected with the library. After transfection, deep sequencing was performed with NGS to determine the distribution of *gRNA* between cell groups. NGS results were analyzed by bioinformatics, increasing and decreasing *gRNAs* in each cell group were determined and the genes targeted by these *gRNAs* were listed. Candidate genes were selected from among the genes targeted by declining *gRNAs* to increase cisplatin sensitivity in resistant cells. Decreased genes were determined to play a role in important biological pathways such as cell cycle, protein or lipid metabolism, vesicle, protein or ion transport, DNA repair, mRNA splicing, gene expression, RNA processing, epigenetics, apoptosis, and protein modification. In resistant Calu-1 cells, *GPR89A* was selected as the candidate gene based on gene score and high expression level in lung cancer. After this candidate gene was knocked out in resistant Calu-1 cells, its effects on important cellular functions such as cell viability, cytotoxicity, apoptosis, cell cycle, colony formation, migration and ATF4 gene expression were determined by functional tests.

As a result of functional analysis, it could be determined that cisplatin sensitivity of *GPR89A* knockout resistant Calu-1 cells was increased, apoptosis was induced after cisplatin treatment, mitotic catastrophe as a result of S-stage arrest of the cell cycle was caused, and colony formation and migration was prevented. In conclusion, with this study, genetic factors responsible for the development of cisplatin resistance in lung cancer were determined for the first time, and it was determined that the *GPR89A* gene was the dependent component responsible for cisplatin resistance in NSCLC cells.

Key words: NSCLC, CRISPR-Cas9, cisplatin resistance, genetic screening, *GPR89A*

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	1
ÖZET.....	I
ABSTRACT	III
TABLO DİZİNİ.....	X
ŞEKİL DİZİNİ	XI
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Akciğer kanseri.....	3
2.1.1. Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi.....	3
2.1.2. Akciğer Kanseri Etiyolojisi.....	3
2.1.3. Akciğer Kanserinin Histolojik Sınıflandırılması	3
2.1.3.1. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Karsinomu.....	3
2.1.3.1.1. Adenokarsinoma.....	4
2.1.3.1.2. Skuamöz Hücreli Karsinoma	4
2.1.3.1.3. Büyük Hücreli Karsinoma.....	4
2.1.3.2. Küçük Hücreli Akciğer Karsinomu	4
2.1.4. Akciğer Kanserinde Kullanılan Tedavi Yöntemleri.....	5
2.2. Cisplatin	5
2.2.1. Cisplatinin Antikanser Aktivitesi	6
2.2.2. Cisplatin Direnç Mekanizması	7
2.2.2.1. Hücresel İlaç Birikiminin Azalması	7
2.2.2.2. Sitozolik Cisplatin Detoksifikasyonu.....	8
2.2.2.3. Artan DNA Hasarı Onarımı.....	8
2.2.2.3.1. Nükleotid Eksizyon Onarım (NER) Sistemi	8
2.2.2.3.2. Homolog Rekombinasyon Onarım Sistemi	8
2.2.2.3.3. Mismatch Onarım (MMR) Sistemi.....	9

2.2.2.3.4. Translezyon DNA Sentezi	9
2.3. CRISPR-Cas Sistemi	9
2.3.1. CRISPR-Cas Sisteminin Yapısı.....	10
2.3.2. CRISPR-Cas Sisteminin Sınıflandırılması	11
2.3.3. Genom Düzenlemede Kullanılan Tip II CRISPR-Cas9 Sistemi.....	11
2.3.4. CRISPR-Cas9 TARAMA ÇALIŞMALARI.....	13
2.3.4.1. CRISPR-Cas9 Taramalarında Kullanılan Anahtar Faktörler....	13
2.3.4.1.1. Tarama çalışmalarında Kullanılan Cas9 Varyantları	13
2.3.4.1.2. Kütüphane Seçimi	13
2.3.4.1.3. Transfeksiyon şekli.....	13
2.3.4.1.4. Hücre sayısı	14
2.3.4.1.6. Array ya da Pool Tarama	14
2.3.4.1.7. Hücre Canlılığına Dayalı Negatif ve Pozitif Seçilim.....	14
2.3.4.2. İlaç Direnç Mekanizmaları için CRISPR Tarama Çalışmaları...	14
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	15
3.1. Gereç	15
3.1.1. Kimyasallar ve sarf malzemeler	15
3.1.2. Ekipmanlar	16
3.2. Yöntemler	17
3.2.1. Etken maddelerin hazırlanması	17
3.2.2. Hücre Kültürü.....	17
3.2.2.1. Hücre Hatlarının Bakımı, Pasajlanması ve Dondurulması	17
3.2.2.2. Hücre Canlılık Testi.....	18
3.2.2.3. Hücrelerde Mikoplazma Varlığının Değerlendirilmesi.....	18
3.2.3. Cisplatin Dirençli Calu-1 Hücre Hatlarının Oluşturulması	19
3.2.3.1. CR-Calu-1 Hücrelerinin Direnç Karakterizasyonunun Yapılması	19

3.2.4. Proliferasyon Analizi	20
3.2.5. Sitotoksosite Analizi.....	20
3.2.6. Genom Çapında CRISPR Tarama Çalışmaları.....	21
3.2.6.1. Brunello Kütüphanesi.....	21
3.2.6.2. LentiGuide Puro ve LentiCas9 Blast Vektör Sisteminin Özellikleri	21
3.2.6.3. Luria-Bertani (LB) -Ampisilin Agar Platelerin ve LB Sıvı Medyumun hazırlanması.....	22
3.2.6.4. Brunello Kütüphanesinin Transformasyonu.....	22
3.2.6.5. Brunello Kütüphanesinin İzolasyonu	23
3.2.6.6. Lentivirüs Paketleme Plazmitlerinin İzolasyonu	24
3.2.6.7. Lentivirüs Üretiminin Gerçekleştirilmesi.....	25
3.2.6.8. Hücrelerde Etkili Blastocidin Dozunun Belirlenmesi.....	25
3.2.6.9. LentiCas9 Blast Lentivirüs Titresinin Belirlenmesi ve Hücrelere Transdüksiyonu.....	26
3.2.6.10. Hücrelerde Cas9 İfadesinin Gösterilmesi	26
3.2.6.11. Hücrelerde Cas9 Fonksiyonelliğinin Değerlendirilmesi	30
3.2.6.12. Cas9 Eksprese Eden Hücrelerde Etkili Puromisin Dozunun Belirlenmesi	34
3.2.6.13. Cas9 Eksprese Eden Hücrelerde Doubling (İkilenme) Zamanının Hesaplanması.....	34
3.2.6.14. LentiGuide Puro Lentivirüs Titresinin Belirlenmesi.....	35
3.2.6.15. LentiGuide Puro Lentivirüsünün Hücrelere Transdüksiyonu ve Taramanın Gerçekleştirilmesi	35
3.2.6.16. Her Bir Hücre Grubu için Kütüphanenin Oluşturulması ve Sekanslanması	37
3.2.6.17. NGS Sonuçlarının Biyoinformatik Analizi	41
3.2.7. Validasyon Çalışmaları	41
3.2.7.1. Aday Genin Seçilmesi ve Klonlanması	41

3.2.7.2. Klonlamanın Doğrulanması için Koloni PCR ve Sanger Dizileme	43
3.2.7.3. Klonlanlanmış Plazmidin Lentivirüslere Paketlenmesi ve Hücrelere Transdüksiyonu.....	45
3.2.7.4. <i>GPR89A</i> Geninin Knock-out Edilmesinin Ardından Yapılan Sitotoksosite Analizi.....	45
3.2.7.5. Apoptoz Analizi	46
3.2.7.5.1. Anneksin V Yöntemi	46
3.2.7.5.2. DNA Fragmentasyon Analizi	47
3.2.7.5.3. Kesilmiş (Cleaved) Kaspaz 9 Protein Seviyesinin Belirlenmesi	49
3.2.7.6. Hücre Döngüsü Analizi.....	50
3.2.7.7. Klonojenik Analiz	51
3.2.7.8. Wound Healing (Yara İyileşmesi) Analizi	52
3.2.7.9. <i>ATF4</i> Gen Ekspresyon Analizi.....	52
4. BULGULAR.....	55
4.1. Hücrelerde Mikoplazma Kontaminasyon Analizi.....	55
4.2. Direnç Karakterizasyon Analizi.....	55
4.3. Proliferasyon Deney Analizi	56
4.4. Calu-1 ve CR-Cal-1 Hücre Serilerinde Cisplatin IC ₅₀ Dozlarının Belirlenmesi.....	57
4.5. Hücrelerde Etkili Blastocidin Doz Analizi	58
4.6. LentiCas9 Blast Lentivirüs Titre Analizi	59
4.7. Hücrelerde Cas9 Protein Ekspresyon Analizi	60
4.8. Hücrelerde Cas9 Fonksiyonelliğini Değerlendiren Analizleri	61
4.9. Cas9 Eksprese Olan Hücrelerde Etkili Puromisin Doz Analizi	63
4.10. Hücrelerde İkilene Zamanı Analizi	63

4.11. Brunello Kütüphanesini Taşıyan Lentiguidе Puro Lentivirüs Titre Analizi.....	64
4.12. Tarama Çalışmalarında gRNA Amlifikasyon Miktar Analizi.....	65
4.13. Cisplatin Direncinden Sorumlu Aday Gen Analizleri	66
4.14. Validasyon için Seçilen <i>GPR89A</i> gRNA'sının LentiCRISPR V2 Plazmidine Klonlamasının Doğrulama Analizleri.....	70
4.15. <i>GPR89A</i> Knockout Calu-1 ve CR-Calu-1 Hücre Serilerinde Cisplatin IC ₅₀ Dozlarının Belirlenmesi.....	71
4.16. Cisplatin'in <i>GPR89A</i> Knockout CR-Calu-1 Hücre Serilerinde Apoptoz Üzerine Etkileri.....	74
4.16.1. Anneksin V yöntemi ile apoptoz analiz bulguları.....	74
4.16.2. TUNEL yöntemi ile apoptoz analiz bulguları	76
4.16.3. Kesilmiş (Cleaved) Kaspaz 9 Protein Seviyesinin Miktar Analizi ...	78
4.17. Cisplatin'in <i>GPR89A</i> Knock-out CR-Calu-1 Hücre Serilerinde Hücre Döngüsü Üzerine Etkileri	79
4.18. Cisplatin'in <i>GPR89A</i> Knock-out CR-Calu-1 Hücre Serilerinde Koloni Oluşumu Üzerine Etkisi.....	81
4.19. Cisplatin'in <i>GPR89A</i> Knock-out CR-Calu-1 Hücre Serilerinde Migrasyon Üzerine Etkisi	84
4.20. Cisplatin'in <i>GPR89A</i> Knock-out CR-Calu-1 Hücre Serilerinde ATF4 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi	86
5. TARTIŞMA	87
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	93
7. KAYNAKLAR	94
TEŞEKKÜR	103
ÖZGEÇMİŞ.....	1

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: Bradford deneyinde kullanılan standart dilüsyonları.....	28
Tablo 2: Western blot analizi için jel reaksiyon karışımı.....	28
Tablo 3: Western blot analizi için örneklerin hazırlanmasında kullanılan bileşenler ve miktarları	29
Tablo 4: <i>Renilla</i> ve <i>EGFR</i> gRNA dizileri	31
Tablo 5: Plazmid kesimi ve defosforilasyonu için gerekli reaksiyon karışımı	31
Tablo 6: gRNA çiftlerinin fosforile ve annealing reaksiyon karışımı.....	32
Tablo 7: Plazmid ile gRNA ligasyon karışımı	33
Tablo 8: P5 Forward Primerleri	38
Tablo 9: Etiketleme İçin Kullanılan P7 Reverse Primerleri.....	39
Tablo 10: gRNA amplifikasyonu için reaksiyon karışımı	40
Tablo 11: gRNA amplifikasyonu için termal döngü koşulları.....	41
Tablo 12: Seçilen aday gen ve dizileri	42
Tablo 13: Koloni PCR reaksiyon karışımı	44
Tablo 14: Koloni PCR termal döngü koşulları.....	44
Tablo 15: TUNEL Boyama Solüsyonu Reaksiyon Karışımı	48
Tablo 16: cDNA Sentezi Reaksiyon Karışımı	53
Tablo 17: cDNA sentezi termal döngü koşulları.....	53
Tablo 18: Çalışılan gen primer dizileri	53
Tablo 19: qRT-PCR Reaksiyon Karışımı	54
Tablo 20: qRT-PCR termal döngü koşulları	54
Tablo 21: Calu-1 ve CR-Cal-1 hücre gruplarında belirlenen protein miktarları.....	60
Tablo 22: <i>Renilla</i> ve <i>EFGR</i> lentivirüsleriyle enfekte Calu-1 ve CR-Cal-1 hücre gruplarında belirlenen protein miktarları	61
Tablo 23: Duyarlı ve dirençli hücre gruplarındaki QC analiz sonuçları	66
Tablo 24: Tarama çalışması yapılan 14 örneğin NGS sonuçları.....	67
Tablo 25: Duyarlı ve dirençli hücre gruplarındaki azalan ve artan gen sayıları	67
Tablo 26: Aday genlerin rol oynadığı biyolojik yollar.....	69
Tablo 27: CR-Cal-1, <i>Renilla</i> ve GPR89A knock-out hücrelerde belirlenen protein miktarları	78

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: Cisplatinin 3 boyutlu yapısı	6
Şekil 2: Cisplatinin DNA üzerindeki çapraz bağlanma kompleksleri	6
Şekil 3: Cisplatin direnç mekanizmaları.....	7
Şekil 4: Prokaryotlarda CRISPR-Cas sistemiyle kazanılmış bağışıklık oluşum süreci	10
Şekil 5: CRISPR lokus yapısı	11
Şekil 6: CRISPR/Cas sisteminin sınıflandırılması	11
Şekil 7: CRISPR-Cas9 sisteminin biyolojik mekanizması.....	12
Şekil 8: Calu-1 hücre hattının mikroskop görüntüsü.....	17
Şekil 9: Dirençli CR-Cal-1 hücre serisinin oluşturulması	19
Şekil 10: LentiCas9 Blast ve LentiGuide Puro lentiviral vektörleri.....	22
Şekil 11: CRISPR tarama çalışması iş akışı	36
Şekil 12: cBioPortal veritabanında yer alan verilere göre seçilen aday gendeki genetik değişiklikler	42
Şekil 13: Hücrelerdeki mikoplazma analiz görüntüleri	55
Şekil 14: Hücrelerin direnç karakterizasyon analizi.....	56
Şekil 15: Calu-1 ve CR-Cal-1 hücreleri için hücre konsantrasyon grafiği.....	57
Şekil 16: Cisplatin uygulaması sonrası Calu-1 hücre serisi için 24., 48. ve 72. saat hücre canlılığı grafiği	57
Şekil 17: Cisplatin uygulaması sonrası CR-Cal-1 hücre serisi 24., 48. ve 72. saat hücre canlılığı grafiği	58
Şekil 18: Hücreleri öldüren en düşük blastocidin doz grafiği	59
Şekil 19: LentiCas9 Blast lentivirüs miktarına göre transdüksiyon yüzdeleri	59
Şekil 20: FLAG etiketli Cas9 protein ekspresyon değişiminin western blot analizi .	60
Şekil 21: EGFR protein ekspresyon değişiminin western blot analizi	62
Şekil 22: Cas9 eksprese Calu-1 ve CR-Cal-1 hücrelerinde EGFR protein ekspresyon kat değişim grafiği	62
Şekil 23: Cas9 eksprese eden hücreleri öldüren en düşük puromisin doz analiz grafiği.....	63
Şekil 24: Cas9 eksprese hücrelerin ikilenme zamanı analiz grafiği	64
Şekil 25: LentiGuide Puro lentivirüs miktarına göre transdüksiyon yüzdeleri	64
Şekil 26: gRNA amplifikasyonu ve etiketleme sonrası jel görüntüsü.....	65

Şekil 27: Duyarlı ve dirençli hücre gruplarında azalan genler arasından belirlenen ve ortak olan aday gen sayıları.....	68
Şekil 28: <i>GPR89A</i> gRNA'sının LentiCRISPR V2 plazmidine klonlanmasının ardından oluşan koloni görüntüleri	70
Şekil 29: Koloni PCR ve Sanger Sekanslama Sonuçları	70
Şekil 30: Cisplatin uygulaması sonrası <i>GPR89A</i> knockout, Renilla transfekte ve CR Calu-1 hücre serisi 24. saat hücre canlılığı grafiği.....	71
Şekil 31: Cisplatin uygulaması sonrası <i>GPR89A</i> knock-out, Renilla transfekte ve CR-Calu-1 hücre serisi 48. saat hücre canlılığı grafiği	72
Şekil 32: Cisplatin uygulaması sonrası <i>GPR89A</i> knock-out, Renilla transfekte ve Calu-1 hücre serisi 24. saat hücre canlılığı grafiği.....	73
Şekil 33: Cisplatin uygulaması sonrası <i>GPR89A</i> knock-out, Renilla transfekte ve Calu-1 hücre serisi 48. saat hücre canlılığı grafiği.....	74
Şekil 34: Anneksin V yöntemine göre CR-Calu-1, Renilla, <i>GPR89A</i> knock-out ve cisplatin uygulanmış knock-out hücre serileri üzerindeki apoptotik etkileri gösteren akım sitometri görüntüleri.....	75
Şekil 35: CR-Calu-1, Renilla, <i>GPR89A</i> knock-out ve cisplatin uygulanmış knock-out hücre serilerinde Anneksin V yöntemine göre apoptotik etkilerini gösteren apoptotik kat değişim grafiği.....	76
Şekil 36: TUNEL yöntemine göre CR-Calu-1, Renilla, <i>GPR89A</i> knock-out ve cisplatin uygulanmış knock-out hücre serileri üzerindeki apoptotik etkilerini gösteren akım sitometri görüntüleri.....	77
Şekil 37: CR-Calu-1, Renilla, <i>GPR89A</i> knock-out ve cisplatin uygulanmış knock-out hücre serilerinde TUNEL yöntemine göre apoptotik etkilerini gösteren DNA fragmentasyon değişim grafiği.....	78
Şekil 38: Hücrelerdeki kesilmiş Kaspaz 9 protein ekspresyon değişiminin western blot analizi	79
Şekil 39: CR-Calu-1, Renilla, <i>GPR89A</i> knock-out ve cisplatin uygulanmış knock-out hücre serilerinde hücre döngüsü üzerine etkilerini gösteren akım sitometri görüntüleri	80
Şekil 40: CR-Calu-1, Renilla, <i>GPR89A</i> knock-out ve cisplatinin <i>GPR89A</i> knock-out hücre serilerinde etkilediği hücre döngüsü evre yüzdeleri.....	81
Şekil 41: CR Calu-1, Renilla, <i>GPR89A</i> knock-out ve cisplatin doz gruplarında koloni oluşumu.....	83

Şekil 42: GPR89A knock-out hücre serisine cisplatin uygulaması ile oluşan koloni sağkalım fraksiyon grafiği	84
Şekil 43: CR-Cal-1, Renilla, <i>GPR89A</i> knock-out ve cisplatin uygulanmış hücrelerde ışık mikroskobu migrasyon görüntüleri	85
Şekil 44: CR-Cal-1, Renilla enfekte ve <i>GPR89A</i> knock-out ve cisplatin uygulanmış hücrelerde migrasyon oranları.....	86



KISALTMALAR

<i>ATF4</i>	: Aktifleşen Transkripsiyon Faktörü 4 (Activating Transcription Factor 4)
Cas	: CRISPR-ilişkili protein (CRISPR-associated protein)
CRISPR	: Düzenli aralıklarla bölünmüş kısa palindromik tekrar kümeleri, (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)
CRISPRko	: CRISPR knock-out
crRNA	: CRISPR RNA
DMSO	: Dimetil Sülfoksit (Dimethyl sulfoxide)
DNA	: Deoksiribonükleik asit (Deoxyribonucleic acid)
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (Epidermal Growth Factor Receptor)
FBS	: Fetal Bovin Serum (Fetal Bovine Serum)
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration)
Globocan	: Global Kanser Gözlemevi (Global Cancer Observatory)
GPR89A	: G Protein-Birleştirilmiş Reseptör 89A (G Protein-Coupled Receptor 89A)
HR	: Homolog rekombinasyon (Homologous Recombination)
IAP	: Apoptoz inhibitör protein (Inhibitor of Apoptosis Protein)
KGA	: Kanser Genom Atlası (Cancer Genome Atlas)
KHAK	: Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (Small Cell Lung Cancer)
KHDAK	: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (Non-Small Cell Lung Cancer)
LB	: Luria-Bertani sıvı medyum
MOI	: Enfeksiyon çeşitliliği, virüs titresi (Multiplicity of infection)
NGS	: Yeni nesil Dizileme (Next Generation Sequencing)

NHEJ	: Homolog olmayan uç birleştirme (Non-homologous end joining)
PAM	: Protospacer Bitişik Motifi (Protospacer Adjacent Motif)
PEI	: Polyethylenimine
QC	: Kalite kontrol (Quality control)
<i>g</i> RNA	: rehber RNA (<i>guide</i> RNA)
tracrRNA	: Trans aktive edici crRNA (Trans-activating crRNA)



1. GİRİŞ

Akciğer kanseri dünya çapında önemli bir sağlık sorunu olup teşhisten sonraki 5 yıllık sağ kalım oranı meme, kolon veya prostat kanseri için belirlenen sağ kalım oranlarından düşüktür. Küçük hücreli ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri olmak üzere iki ana alt tipi bulunan akciğer kanserinin %85'ini KHDAK grubu oluşturmaktadır. Patogenezlerinde farklı genetik faktörler ve çevresel kanserojenlere maruziyet rol oynamaktadır. Genetik faktörler arasında onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar, translokasyonlar ve promotör bölgelerindeki hipermetilasyon gibi değişiklikler yer almaktadır. Ancak, mutant olmayan ve kanser hücrelerine çoğalma, immun sistemden korunma ve direnç gibi avantajlı özellikler kazandıran genetik faktörler de karsinogenezde rol oynayabilmektedir. Kanserli hücrelerin bu faktörlere normal hücrelere oranla daha bağımlı oldukları düşünülmektedir. Bağımlı bileşenlerin etkinliğinin azaltılması için en sık kullanılan tedavi şekli kemoterapidir. Cisplatin en yaygın kullanılan kemoterapötik ajan olup DNA üzerindeki pürin bazlarıyla etkileşime girerek DNA lezyonlarının oluşmasına ve sonunda apoptoz ile sonlanan bazı sinyal yollarının aktivasyonuna yol açmaktadır. Oldukça etkili olmasına rağmen, tedavi sırasında gelişen ilaç direnci cisplatinin etkinliğini sınırlamaktadır. Birçok kanser hücresi başlangıçta cisplatin tedavisine duyarlı olsa da zamanla daha etkili DNA hasarı onarımı, glutatyon ve metalotiyoninlerle ilaç inaktivasyonu ve hücre zarında bulunan çeşitli taşıma sistemleriyle ilacın hücre dışına atılması yoluyla direnç geliştirmektedir. Cisplatin direncini aşmak kanser tedavisinin kritik bir hedefini oluşturmaktadır. Bununla birlikte, onlarca yıllık yoğun çabaya rağmen, cisplatin direncinde rol oynayan genler ve biyolojik süreçler hala büyük ölçüde bilinmemektedir. Bu yüzden cisplatin direncinin moleküler mekanizmasının aydınlatılabilmesi için yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesi gerekmektedir.

Son zamanlarda genom düzenlemede kullanılan CRISPR-Cas9 sistemi ile direnç mekanizmasının aydınlatılabilmesi için spesifik ya da genom çapı tarama çalışmaları yapılarak dirençli hücrelerin bağımlı olduğu genetik faktörler belirlenebilmektedir. Farklı kanser türlerinde yapılan çalışmalar o kanser türlerinde önemli olan cisplatin direnciyle ilgili mekanizmaları ortaya çıkarmıştır. Akciğer kanserinde cisplatin direnciyle ilişkili genom düzeyinde gerçekleştirilen bir CRISPR-Cas9 tarama çalışması henüz bulunmamaktadır. Bu çalışma ile genom çapında CRISPR-Cas9

taraması gerçekleştirilerek akciğer kanser hücrelerinin bağımlı olduğu, cisplatin direncinden sorumlu genetik bileşenler belirlenmiştir. Doğrulama çalışmalarında bir bağımlı bileşenin knock-out edildiği dirençli hücrelerde ilgili genlerin cisplatin duyarlılılığına, apoptoz, hücre döngüsü, koloni oluşumu, migrasyon gibi önemli biyolojik yollara ve *ATF4* ekspresyon seviyesine etkisi değerlendirilmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Akciğer kanseri

2.1.1. Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi

Hızlı ilerlemesi ve metastatik etkisi ile tanınan akciğer kanseri, en sık teşhis edilen kanser türü olup kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedeni olarak kabul edilmektedir (Sung ve ark. 2021; Wadowska ve ark. 2017). Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) 2020 Global Kanser Gözlemevi (Global Cancer Observatory, Globocan) verilerine göre yeni tanı konmuş bütün kanserlerin % 11.7'sini ve tüm ölümlerin %18'ini akciğer kanseri oluşturmaktadır. 2020 yılında 1,435,943 erkek ve 770,728 kadın vaka olmak üzere 2,2 milyon yeni akciğer kanseri tanısı konmuştur ve akciğer kanseri 1,8 milyon kişinin ölümüne neden olmuştur (Sung ve ark. 2021).

2.1.2. Akciğer Kanseri Etiyolojisi

Akciğer kanseri çevresel ve genetik risk faktörlerinin etkisiyle ortaya çıkan heterojen bir hastalıktır. Sigara kullanımı, tüm akciğer kanseri tanılarının %80-90'ını oluşturan ana risk faktörü olmasına rağmen pasif içicilik, yaş, cinsiyet, ırk ve etnik köken, diyet, alkol, obezite, iyonlaştırıcı radyasyona maruziyet, akciğer hastalıkları, enfeksiyon, çevresel hava kirliliği, asbestos, arsenik, radon, berilyum, nikel, silika gibi mesleki kanserojenlere maruziyet ve genetik faktörler akciğer kanseri gelişiminde rol oynamaktadır (Dela Cruz ve ark., Matthay 2011; Malhotra ve ark. 2016; Schabath ve Cote 2019). Genetik faktörler arasında en yaygın *EGFR*, *KRAS*, *ALK*, *MET*, *HER2*, *ROS1*, *BRAF*, *RET*, *NTRK1*, *PIK3CA*, *MEK1* genlerindeki mutasyonlar ile 15q25, 5p15 ve 6p21 kromozom bölgelerindeki polimorfizmler yer almaktadır (Hirsch ve ark. 2017; Malhotra ve ark. 2016).

2.1.3. Akciğer Kanserin Histolojik Sınıflandırılması

Akciğer kanseri tümörleri, vakaların %85'ini oluşturan küçük hücreli dışı (KHDAK) ve vakaların %15'ini oluşturan küçük hücreli akciğer karsinomu olmak üzere iki geniş histolojik kategoriye ayrılmaktadır (Nasser, Gorenberg ve Agbarya 2020).

2.1.3.1. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Karsinomu

DSÖ'nün yeni tanımlanan moleküler profillere ve akciğer kanserinde hedeflenebilir genetik değişikliklere dayalı olarak 2015 yılında güncellemeler yaptığı

sınıflandırmaya göre KHDAK yaygın olarak adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır (Inamura 2017; Zheng 2016). Yaygın olmayan alt tipleri arasında ise adenoskuamöz karsinom ve sarkomatoid karsinom yer almaktadır (Suster ve Mino-Kenudson 2020).

2.1.3.1.1. Adenokarsinoma

Adenokarsinomlar, en yaygın KHDAK tipi olup akciğer kanserlerinin ~%40'ını oluşturmaktadır. Akciğer adenokarsinomu, daha küçük hava yolu epitelinde bulunan mukus ve diğer maddeleri salgılayan alveolar hücrelerden kaynaklanan ve glandüler farklılaşma gösteren malign bir epitelyal neoplazmadır (Duma ve ark., Molina 2019; Zappa ve Mousa 2016; Zheng 2016). Yapılan çalışmalar ile adenokarsinom ve skuamöz hücreli karsinomların sırasıyla megabaz (Mb) başına 3.5 ve 3.9 oranlarıyla en yüksek protein değiştiren mutasyon oranına sahip tümörlerden biri oldukları belirlenmiştir (Wadowska ve ark. 2020).

2.1.3.1.2. Skuamöz Hücreli Karsinoma

Akciğer kanserlerinin %25 ila %30'unu oluşturan skuamöz hücreli karsinomlar, keratinizasyon ve/veya hücreler arası köprüler gösteren malign bir epitelyal tümör olarak tanımlanmaktadır (Takamochi ve ark. 2016). KGA tarafından belirlenen skuamöz hücreli karsinomların moleküler profiline bakıldığında tümör başına ortalama 360 ekzonik mutasyon, 165 genomik yeniden düzenlenme ve 323 kopya sayısı değişikliği olan gen bölgeleri belirlenmiştir (Inamura 2017).

2.1.3.1.3. Büyük Hücreli Karsinoma

Tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %5 ila %10'unu oluşturan büyük hücreli karsinomlar, herhangi bir belirgin morfolojik veya immünohistokimyasal farklılaşmaya sahip olmayan nöroendokrin tümör olarak tanımlanmaktadır (Osmani ve ark. 2018). Bu tümörler tipik olarak kötü diferansiyeli olup bol sitoplazmalı ve büyük nükleoluslu pleomorfik büyük hücrelerden oluşmaktadır (Duma, Santana-Davila ve Molina 2019).

2.1.3.2. Küçük Hücreli Akciğer Karsinomu

Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) hızlı büyüme, erken metastatik yayılma, yüksek invazivlik gösterme ve tedaviye ilk yanıt verme ile karakterize yüksek dereceli bir nöroendokrin tümör olarak tanımlanmaktadır (Kalemkerian, 2016; Chen 2016).

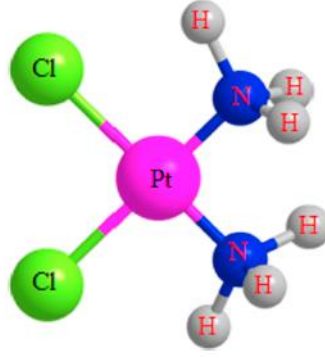
KHAK hürelerinin %90'ı TTF-1 gibi nöroendokrin belirtecini eksprese etmekte ve bu da histopatolojik tanıda kullanılmaktadır. Sitokeratinler gibi epitelyal belirteçler ise birçok KHAK tümöründe görülmekte ve onların lenfomalardan ve diğer küçük yuvarlak tümörlerden ayırt edilmesini sağlamaktadır (Meerbeeck ve ark., 2011).

2.1.4. Akciğer Kanserinde Kullanılan Tedavi Yöntemleri

AK, erken evrelerinde kolayca yayılım göstermesinin yanı sıra, çok farklı anatomi ve fizyolojiye sahip çok çeşitli organlara da metastaz yapmaktadır. İleri evrelerde AK tanısı konan hastalarda çoklu metastazların olması tedaviyi son derece zorlaştırmaktadır. Bu yüzden sürekli farklı tedavi seçenekleri arayışına gidilmektedir (Zhu ve ark. 2020). Hastanın durumuna bağlı olarak evre, histoloji, genetik değişiklikler göz önüne alındığında tedavi seçenekleri arasında genellikle cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, immünoterapi, tek başına veya kombine moleküler hedefli tedaviler yer almaktadır (Alexander, Kim ve Cheng 2020). Kanser tedavisinde en sık kullanılan tedavi şekli kemoterapidir. Geleneksel kemoterapi ajanları öncelikle DNA, RNA veya protein sentezine müdahale ederek veya önceden oluşturulmuş molekülün işlevini değiştirerek neoplastik hücre ölümüne neden olmaktadır. Başta oldukça etkili olmasına rağmen zamanla kullanılan ilaca karşı gelişen ilaç direnci kemoterapötiklerin etkisini sınırlamaktadır (Amjad ve ark., 2020).

2.2. Cisplatin

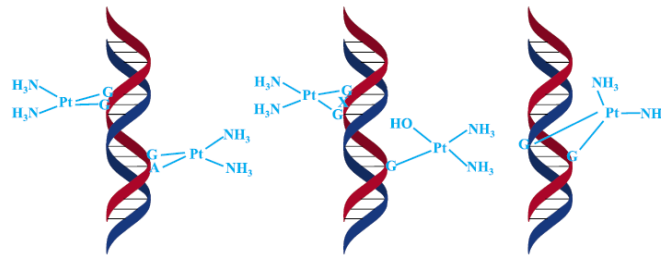
Cisplatin testis, yumurtalık, baş ve boyun, mesane, akciğer, rahim ağzı kanseri, melanom, lenfomalar gibi çeşitli solid kanserlerin tedavisi için en yaygın olarak kullanılan ilk metal bazlı kemoterapötiklerden biridir (Ghosh 2019). 1978 yılında FDA tarafından testis ve over kanseri olan hastaların tedavisi için kullanımının onaylanmasından bu yana cisplatin solid tümörlerin tedavisinde kullanılan en etkili antikanser ilaçlarından biri olmaya devam etmektedir (Basu ve Krishnamurthy 2010; Ghosh 2019). Cis konfigürasyonunda iki amid ve iki klorürün bir platin atomuna bağlanmasıyla oluşan cisplatin antikanser aktivite göstermektedir (Basu ve Krishnamurthy 2010; Rocha ve ark. 2018) (Şekil 1).



Şekil 1: Cisplatinin 3 boyutlu yapısı (Ghost, 2019)

2.2.1. Cisplatinin Antikanser Aktivitesi

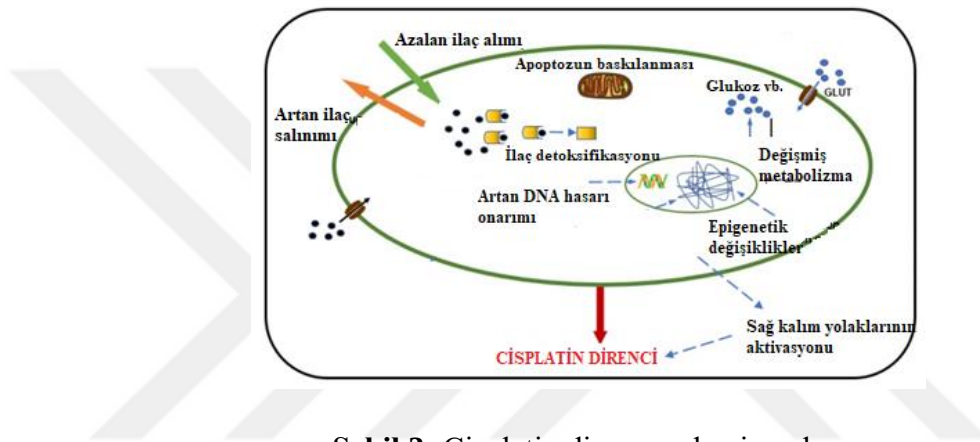
Cisplatinin hücre içerisine alınması pasif difüzyonla birlikte yüksek afiniteli bakır taşıyıcı 1 (Ctr1), Ctr2 ve hücresel bakır (Cu) taşıyıcı sistemleri aracılığıyla gerçekleşmektedir (Chen ve ark., 2015). Cisplatin hücre içerisine girdiğinde aktive olmakta ve sitoplazmada cisplatin üzerindeki klorür atomları su molekülleri tarafından yer değiştirmektedir. Bu hidrolize ürün, proteinler üzerindeki sülfidril grupları ve nükleik asitler üzerindeki nitrojen donör atomları dahil olmak üzere herhangi bir nükleofil ile reaksiyona girebilen güçlü bir elektrofıl gibi davranmaktadır (Dasari ve Tchounwou 2014). Cisplatin çeşitli biyomoleküllere bağlanabilmesine rağmen, anti kanser aktivite gösterebilmesi için başlıca biyolojik hedefi DNA'dır. Cisplatinin platin atomu, DNA-DNA zincirler arası ve zincir içi çapraz bağlar oluşturmak için DNA'daki pürin kalıntıların özellikle guanin bazının imidazol halkasında yer alan N7 bölgeleriyle etkileşime girmektedir (Şekil 2). DNA ve cisplatin arasındaki bu çapraz bağlar, DNA dubleksini bükerek replikasyon ve transkripsiyonun bozulmasına yol açmakta ve hücre döngüsünün durmasına neden olarak apoptozu indüklemektedir (Baik, Friesner ve Lippard 2003; Dasari ve Tchounwou 2014; Dos Santos ve ark. 2012).



Şekil 2: Cisplatinin DNA üzerindeki çapraz bağlanma kompleksleri (L. Qi ve ark., 2019)

2.2.2. Cisplatin Direnç Mekanizması

Kanser tedavisi sırasında gelişen içsel veya edinilmiş ilaç direnci oldukça etkili olan cisplatinin terapötik etkinliğini sınırlamaktadır (Makovec 2019). Kolorektal, akciğer ve prostat kanserli hastalarda içsel, over kanserli hastalarda ise cisplatin kemoterapisini takiben kazanılmış ilaç direnci gelişmektedir (Köberle ve ark. 2010). Kanser hücreleri hücre içi cisplatin birikiminin azalmasına neden olan ilaç taşınmasındaki değişikliklere, ilaç detoksifikasyon sistemine, artan DNA hasarı onarımına ve apoptotik hücre ölüm yollarındaki değişikliklere bağlı olarak direnç kazanmaktadır (Huang ve ark. 2017) (Şekil 3).



Şekil 3: Cisplatin direnç mekanizmaları

2.2.2.1. Hücresel İlaç Birikiminin Azalması

Hücresel cisplatin birikimindeki azalma, ilacın hücre içine alınmasındaki azalmaya ya da hücre dışına atılmasının artmasına bağlıdır (Amable 2016). Cisplatinin azaltılmış alımı ve artan atılımı, cisplatin direnci sergileyen hücrelerin karakteristik özellikleri arasında yer almaktadır (Tchounwou ve ark., 2021). Cisplatin hücre içerisine pasif difüzyon ve transmembran taşıyıcı proteinler ile alınmaktadır (Hall ve ark. 2008). Cisplatinin hücre içerisine alınmasında, türler arasında evrimsel olarak korunmuş ve başlıca Cu taşıyıcı protein olan Ctr1 rol oynamaktadır (Galluzzi ve ark. 2012). *Ctr1* gen delesyonunun ve düşük ekspresyon seviyesinin hücre içerisine cisplatin alınımını azaltarak direnç gelişimine neden olduğu bildirilmiştir. Hücre direnç kazandıkça *Ctr1* miktarının azaldığı görülmüştür (Ishida ve ark. 2002; Zisowsky ve ark. 2007). Cisplatinin hücre dışına eksportu ATP kullanan P tipi ATPaz taşıyıcı ailesine ait olan ATP7A ve ATP7B tarafından gerçekleştirilmektedir. Kanser hücrelerinde bu genlerin

ekspresyon seviyesindeki değişikliklerin direnç gelişiminde etkili olduğu belirlenmiştir (Yang ve ark. 2015).

2.2.2.2. Sitozolik Cisplatin Detoksifikasyonu

Cisplatin, glutatyon (GSH) ve metallothionein (MT) gibi tiyollere ve tiyol içeren proteinler dahil olmak üzere bir dizi nükleofilik bileşiğe karşı oldukça reaktif özellik taşımaktadır (De Luca ve ark. 2019; Rabik ve Dolan 2007). Kanseri hücrelerinde antioksidan görevine sahip olan GSH'nin cisplatin direnci kazandırdığı öne sürülmektedir. GSH, memeli hücrelerinde çoklu ilaç direnç proteini 2 (MRP2) aracılığıyla cisplatinin hücre dışına atılımını kolaylaştırmada kofaktör rol oynayarak direnç gelişimine neden olmaktadır (Amable 2016; H. H. W. Chen ve Kuo 2010). Glutatyon-S-transferazlar (GST'ler), GSH'nin cisplatine konjugasyonunu katalize etmekte ve oluşan platin-glutatyon konjugatları ilacın çözünürlüğünü artırarak detoksifiye etmektedir (Amable 2016). Bu şekilde sitozolde inaktif olan cisplatin DNA ile etkileşime girmeden MRP2 tarafından hücre dışına atılmaktadır (Amable 2016; Tchounwou ve ark. 2021).

2.2.2.3. Artan DNA Hasarı Onarımı

2.2.2.3.1. Nükleotid Eksizyon Onarım (NER) Sistemi

Cisplatinin ilk biyolojik hedefi genomik DNA olduğu için hücreler oluşan platin-DNA eklentilerini onarmak için gelişmiş DNA tamir sistemine ihtiyaç duymaktadır. Zincir içi DNA eklentilerinin oluşumu, cisplatinin neden olduğu DNA hasarının çoğunluğunu oluşturmaktadır. Çoğunlukla konformasyonel değişikliğe neden olan DNA eklentilerinin onarımı Nükleotid Eksizyon Onarım (NER) sistemi ile gerçekleşmektedir (Chen ve Chang 2019; Rocha ve ark. 2018). Oluşan zincir içi çapraz bağ NER mekanizması tarafından tanınarak onarılmaktadır. NER yolağındaki ERCC1-XPF dimeri DNA platin eklentilerinin olduğu lezyonlu bölgeyi tanıyarak eklentilerin çıkarılması için onarım mekanizmasını aktive etmektedir (Aldossary 2019).

2.2.2.3.2. Homolog Rekombinasyon Onarım Sistemi

Cisplatin tarafından oluşturulan DNA eklentileri en ölümcül DNA hasarı lezyonu olan çift zincir kırıkları da oluşturabilmektedir (Rocha ve ark. 2018). Homolog rekombinasyon sistemi, bu çift zincir kırıklarının onarımından sorumlu ana hücresel

mekanizma olup, cisplatin eklentileri bu mekanizmayla hücre döngüsünün S fazında tanınarak onarılmaktadır (Bouwman ve Jonkers 2012; Tchounwou ve ark., 2021). Bu sistemin esas bileşeni olan *BRCA1* ve *BRCA2* gen varyasyonlarının cisplatin direnç gelişimine neden olduğu bildirilmektedir (Chen ve Chang 2019).

2.2.2.3.3. Mismatch Onarım (MMR) Sistemi

Genellikle replikasyonlar sırasında tek iplikli DNA hatalarının düzeltilmesine katılan MMR sistemi genomda oluşan platin-DNA eklentilerini de tanıyabilmektedir. Dirençli kanser hücrelerinde cisplatin maruziyetinin ardından MMR kompleksini oluşturan *MLH1*, *MSH2* ve *PMS2* genlerindeki ekspresyon kaybı bu onarım yolağının da direnç gelişiminde rol oynadığını göstermektedir (Brown ve ark., 1997; Galluzzi ve ark., 2014; Martin, Hamilton, ve Schilder 2008; Strathdee ve ark., 1999).

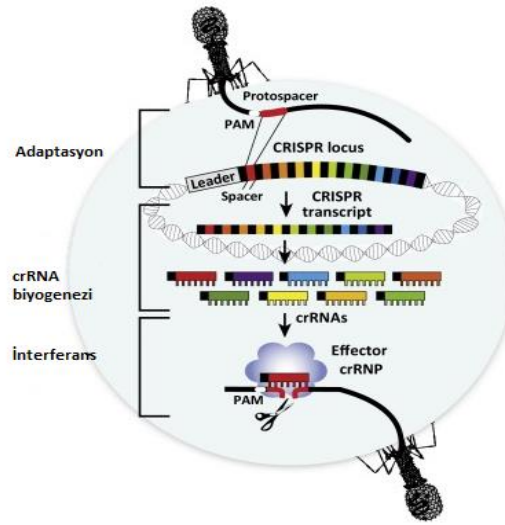
2.2.2.3.4. Translezyon DNA Sentezi

Cisplatin kaynaklı zincir içi eklentiler, DNA replikasyon mekanizmasına müdahale ederek replikatif DNA polimerazları durduran büyük lezyonlardır. Replikasyonun uzun süre durması replikasyon çatalının çökmesine ve sonuç olarak hücre ölümüne neden olabilmektedir. Bunu engellemek için translezyon DNA polimerazları ile büyük lezyonlar baypass edilerek replikasyonun devamı sağlanmaktadır (Rocha ve ark. 2018). Replikatif baypass olarak da isimlendirilen bu mekanizmada her biri farklı substrat spesifikliğine sahip pol η (POLH), pol ι (POLI), pol κ (POLK), REV1 ve pol ζ (REV3 ve REV7) polimerazları işlev görmektedir. Cisplatin için, POLH ve REV3–REV7 heterodimerinin cisplatin-GG eklentilerinin baypass edilmesinde rol oynadığına dair kanıtlar bulunmaktadır (Köberle ve ark. 2010).

2.3. CRISPR-Cas Sistemi

CRISPR-Cas, prokaryotlarda düzenli aralıklarla bölünmüş kısa palindromik tekrar kümeleri (CRISPR) ve CRISPR-ilişkili protein (Cas), virüslere ve diğer mobil genetik öğelere karşı RNA aracılığıyla sekansa özgü kazanılmış bağışıklık sistemi olarak tanımlanmaktadır (Terns, 2018; Tyagi ve ark., 2020). Bu sistem ilk kez *E. coli*'de Apoptoz İnhibitör Proteinin (IAP) gen dizisi çalışılırken keşfedilmiştir (Ishino ve ark. 1987). Prokaryotlarda CRISPR-Cas bağışıklık yanıtı adaptasyon, ekspresyon ve interferans olmak üzere 3 aşamadan oluşmaktadır (Barrangou ve Horvath 2017). Adaptasyon aşamasında istilacı nükleik asitin bir parçası olan aralayıcı dizi seçilerek

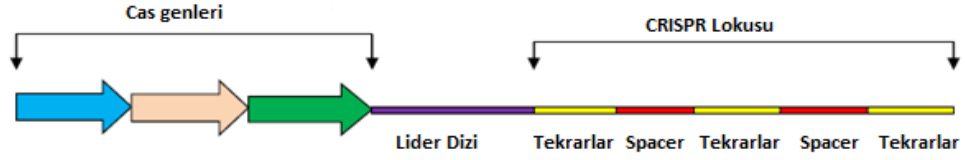
CRISPR lokusuna aktarılmakta ve bu şekilde immünolojik bir bellek oluşturulmaktadır. Yeni aralayıcı dizinin seçilmesinde bu diziye komşu olan 2-5 nt uzunluğunda Protospacer Bitişik Motif (Protospacer Adjacent Motif, PAM) sekansı belirteç olarak işlev görmektedir (Tyagi ve ark. 2020, Amitai & Sorek, 2016; Hille & Charpentier, 2016; Karlo, 2016; Heler& Maraffını, 2014). Bağışıklığı etkinleştirmek için gerekli olan ekspresyon aşamasında, Cas proteinleri eksprese edilmektedir. Daha sonra istilacılara özgü yeni eklenmiş aralayıcı dizileri içeren CRISPR lokusu transkribe edilerek uzun öncül CRISPR RNA (crRNA) sentezlenmektedir. Öncül-crRNA, farklı Cas proteinleri tarafından işlenerek olgun crRNA'ya çevrilmektedir. Bağışıklık kazanımının son aşaması olan interferans aşamasında, olgun crRNA'lar rehber olarak kullanılarak tek ya da çeşitli Cas protein kompleksleriyle hedef genom ile Watson-Crick eşleşmesi yaparak hedefin degradasyonu sağlanmaktadır. (Barman, Deb ve Chakraborty 2020; Bozok Çetintaş, Kotmakçı ve Tezcanlı Kaymaz 2017; Hille ve Charpentier 2016; Wang, La Russa ve Qi 2016) (Şekil 4).



Şekil 4: Prokaryotlarda CRISPR-Cas sistemiyle kazanılmış bağışıklık oluşum süreci (Terns ve Terns, 2014)

2.3.1. CRISPR-Cas Sisteminin Yapısı

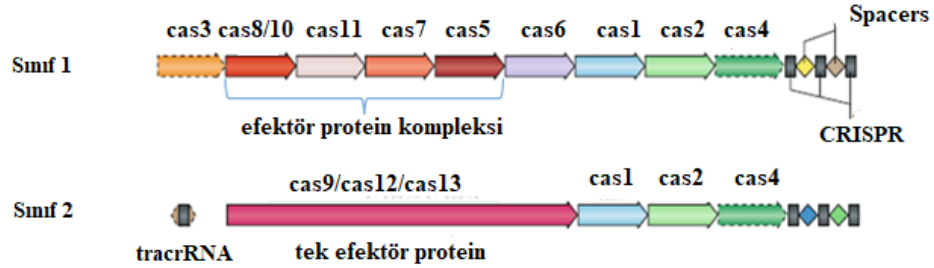
CRISPR-Cas sistemi CRISPR ilişkili Cas genleri ile CRISPR lokusundan oluşmaktadır. CRISPR lokusları, arkea genomlarının ~%84'ünde ve bakteriyel genomların %45'inde yer almaktadır (Rath ve ark. 2015). CRISPR lokusu palindromik tekrar sekansları, aralayıcı diziler ve lider sekansından oluşmaktadır (Karimian ve ark. 2019) (Şekil 5).



Şekil 5: CRISPR lokus yapısı (Barman ve ark., 2020)

2.3.2. CRISPR-Cas Sisteminin Sınıflandırılması

CRISPR-Cas sistemlerinin sınıflandırılması, esas olarak Cas protein bileşimi farklılıklarına, CRISPR-Cas lokuslarının genomik organizasyonuna ve efektör modülleri arasındaki dizi farklılığına göre yapılmaktadır. Buna göre CRISPR-Cas sistemleri 2015 yılında 5 tip ve 16 alt tip olarak sınıflandırılmıştır. Daha sonraki yıllarda yapılan yeni sınıflandırmaya göre bu sistem 2 sınıf, 6 tip ve 33 alt tipe ayrılmıştır (Makarova ve ark. 2020). Sınıf 1 CRISPR-Cas sistemi tip I, III ve IV'den oluşurken sınıf 2 CRISPR-Cas sistemi tip II, V ve VI'dan oluşmaktadır (McGinn & Marraffini, 2019) (Şekil 6).

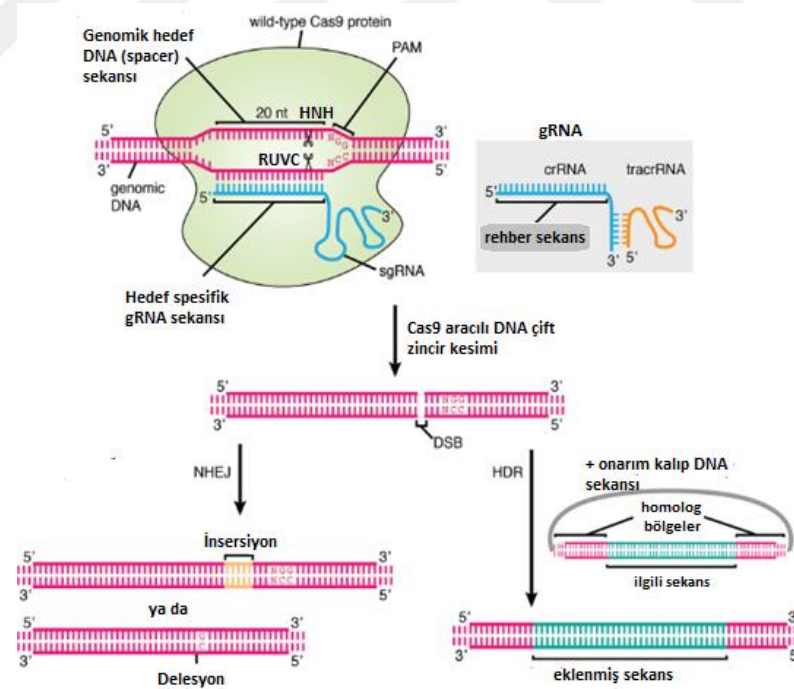


Şekil 6: CRISPR/Cas sisteminin sınıflandırılması (Makarova ve ark., 2020)

2.3.3. Genom Düzenlemede Kullanılan Tip II CRISPR-Cas9 Sistemi

Prokaryotik bir savunma sisteminden türetilen CRISPR-Cas9 sistemi esnek, kullanışlı, çok yönlü ve uyarlanabilir olması gibi güçlü özelliklerinden dolayı hedefe özgü olacak şekilde değiştirilerek gen düzenleme aracı olarak kullanılmaya başlanmıştır (Barman, Deb ve Chakraborty 2020; Jiang ve Doudna 2017; Liu, Saber ve Haisma 2019; Saber ve ark., 2020). Trans-aktif edici CRISPR RNA (tra-crRNA)'nın 5' ucu crRNA'nın 3' ucuyla hibridize edilerek oluşturulan kimerik rehber RNA (gRNA), Cas9'u hedef bölgeye yönlendirmektedir (Barman, Deb ve Chakraborty 2020; Jiang ve Doudna 2017). CRISPR-Cas9 sistemi hedef bölgeye komplementer olan gRNA ile hedef bölgeyi PAM sekansından tanıyarak kesen Cas9 proteininden oluşmaktadır (M. Chen

ve ark. 2019). Genellikle genom düzenlemede kullanılan *Streptococcus pyogenes* Cas9 (SpCas9) proteini için hedef bölgeyi belirleyen PAM motifi 5'-NGG-3' dizisidir (Kantor ve McClements 2020). SpCas9 proteini, tanıma lobu REC ve endonükleaz lobu NUC olmak üzere çift loblu bir yapıya sahiptir. REC lobu RECI, RECII ve Bridge Helix (BH) domaininden oluşurken; NUC lobu PI, HNH ve RuvC domainlerinden oluşmaktadır (Gupta ve ark. 2019). RECI lobu, gRNA bağlanmasından sorumluyken arjinince zengin BH alanı hedef DNA'ya bağlanılmasının ardından bölünme aktivitesinin başlatılmasında rol oynamaktadır. RECII lobunun rolü henüz bilinmemektedir. NUC lobunda yer alan PI alanı, PAM bölgesine bağlanmada rol oynamaktadır (Gupta ve ark. 2019; Leonova ve Gainetdinov 2020). Endonükleaz aktiviteye sahip olan Cas9, PAM dizisinin 3 baz yukarısından gRNA'nın komplementer olduğu diziyi, NUC lobunu oluşturan HNH domaini ile komplementer olmayan diziyi ise RuvC domaini ile keserek çift zincir kırıklarına neden olmaktadır (Jiang & Doudna, 2017). Oluşan çift zincir kırıkları homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) ya da homolog rekombinasyon (HR) yolu ile onarılmaktadır (Khadempur ve ark. 2019) (Şekil 7).



Şekil 7: CRISPR-Cas9 sisteminin biyolojik mekanizması

Son zamanlarda CRISPR-Cas9 teknolojisi genetik ve epigenetik düzenlemenin yanı sıra genlerin fonksiyonel taramasında, teşhis ve gen tedavisi için *in vitro* ya da *in vivo*

modellerin oluşturulmasında, füzyon proteinlerini kullanarak yapılan transkripsiyon çalışmalarında, genomun floresans görüntülemesinde, antimikrobiyal ve antiviral uygulamalarda kullanılmaktadır (Gupta ve ark. 2019; Xie ve ark. 2018).

2.3.4. CRISPR-Cas9 TARAMA ÇALIŞMALARI

İnsan genomu 20,000'den fazla protein kodlayan gen içermektedir. Bu genlerin işlevsel bozuklukları birçok hastalığın temelini oluşturmaktadır. Son zamanlarda çok sayıda aday genin aynı anda değerlendirildiği ve ilgili fenotip gelişiminden sorumlu genlerin belirlendiği genetik tarama çalışmaları yapılmaya başlanmıştır (Otten ve Sun 2020). CRISPR-Cas9 sisteminin uyarlanabilir olması özelliğinden dolayı bu sistem de tarama çalışmalarında kullanılmaktadır (Todor ve ark. 2021). Genellikle memeli hücrelerinde CRISPR-Cas9 tarama sistemi gen ekspresyonunun düzenlenmesinde kullanılmaktadır (Luo 2016).

2.3.4.1. CRISPR-Cas9 Taramalarında Kullanılan Anahtar Faktörler

2.3.4.1.1. Tarama çalışmalarında Kullanılan Cas9 Varyantları

CRISPR tarama çalışmaları gen aktivasyonu, gen susturulması, gen sessizleştirilmesi, baz ve prime düzenlemeleri (editing) için kullanılmaktadır. İstenilen gen ifadesine göre farklı, işlevsel ya da işlevsel olmayan Cas9'lar ile aktivatör veya inhibitör proteinler kullanılmaktadır (Lin ve ark. 2020).

2.3.4.1.2. Kütüphane Seçimi

Bir CRISPR tarama çalışmasının ilk adımı aktivasyon, inhibisyon, gen çıkarma gibi yapılacak gen değişikliğinin belirlenmesinin ardından çalışılacak gen setinin belirlenmesidir. *gRNA* kütüphanesinin büyüklüğü, çalışılacak aday genlerin sayısı ve her gen başına kullanılacak *gRNA* sayısı ile belirlenmektedir (Otten ve Sun 2020). Belirlenen *gRNA* kütüphanesine pozitif ve negatif kontrol *gRNA*'ları da dahil edilmelidir (Iyer ve ark. 2020).

2.3.4.1.3. Transfeksiyon şekli

Kütüphanenin hücrelere tansfeksiyonundan önce bu kütüphanenin bir taşıyıcı vektöre paketlenmesi gerekmektedir. Taşıyıcı sistemler arasında lentivirüs, adeno ilişkili virüs, plazmid vektörleri ve sentetik oligonükleotidler yer almaktadır (Agrotis ve Ketteler

2015). CRISPR-Cas9 transfeksiyonu için en yaygın viral vektörler kullanılmaktadır (Luther ve ark. 2018).

2.3.4.1.4. Hücre sayısı

Yanlış pozitif sonuçların elimine edilebilmesi için hücelere aktarılan kütüphanedeki her bir *gRNA*'nın ekspresyon sayısı önceden belirlenmelidir. Tarama popülasyonundaki hücrelerde her bir *gRNA*'nın 500 - 1000× temsil edilebilmesi için başlangıç hücre sayısının önemli olduğu belirtilmektedir (Najm ve ark. 2018).

2.3.4.1.6. Array ya da Pool Tarama

CRISPR tarama çalışmalarında kütüphaneyi oluşturan *gRNA*'lar array (dizili) ya da pool (havuzlanmış) şeklinde sentezlenmektedir. Array formatında 96- ya da 384-kuyulu plakalar kullanılarak her kuyuda bir geni ya da bir genomik lokusu hedefleyen CRISPR reaktifi bulunmaktadır (Agrotis ve Ketteler 2015). Havuzlanmış taramaları array taramadan ayıran özellik, *gRNA*'ları tek tek ayrı kültür kuyularına koymak yerine, bunların tek bir tüpte toplanmasıdır (Datlinger ve ark. 2017; Esposito ve ark. 2019).

2.3.4.1.7. Hücre Canlılığına Dayalı Negatif ve Pozitif Seçim

Bir CRISPR tarama çalışmasının son adımı yeni nesil dizileme sonuç verilerinin analizi sonrasında taranan popülasyonda negatif ve pozitif seçim yapmaktır. Pozitif bir seçim taramasında ilaç, toksin, patojen gibi hücrelerin seçilme olasılığının düşük olacağı bir etkene maruziyet şeklinde güçlü bir seçici uygulanmaktadır. Negatif seçimde tükenen *gRNA*'lar değerlendirilirken, pozitif seçimde zenginleşen *gRNA*'lar değerlendirilmektedir (Sharma ve Petsalaki 2018).

2.3.4.2. İlaç Direnç Mekanizmaları için CRISPR Tarama Çalışmaları

İlaç direnci ile kontrol edilemeyen hücre büyümesi kanserin ölümcül olmasının nedeni olarak kabul edilmektedir. Gelişen ilaç direncinin üstesinden gelebilmek için CRISPR tarama çalışmaları yapılmaktadır (Kurata ve ark. 2018). Bu taramalar hücreleri aynı tedaviye duyarlı hale getiren yeni hedeflerin belirlenmesine ek olarak, kemoterapi sırasında ilaç direncinin ortaya çıkmasının arkasındaki biyolojik temeli ortaya çıkarmak için de uygulanmaktadır. Ayrıca ilaç taramaları bir bileşiğin etki mekanizmasını ve moleküler hedefini belirlemek için de yapılabilmektedir. (Adelmann ve ark. 2019; Yu ve Yusa 2019).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kimyasallar ve sarf malzemeler

Çalışmada kullanılan kimyasal ve sarf malzemeler;

- Puromisin (Invivogen)
- Ampisilin (Sigma)
- Blasticidin (Invivogen)
- Cisplatin
- Yeast extract (Merck)
- Tripton (Applichem)
- Sodyum Klorür (Merck)
- Fetal Bovin Serum (Biological Industries)
- Hücre ortamı; DMEM (Biological Industries)
- L-Glutamin (Biological Industries)
- Penisilin/Streptomisin (Biological Industries)
- Dimetil Sülfoksit (DMSO)
- Beta-aktin Antikoru (Cell Signalling)
- EGFR Antikoru (Cell Signalling)
- Anti-Flag Antikoru (Sigma)
- PEI (Polysciences)
- Polibren (Sigma)
- Recovery medium (Lucigen)
- LB Broth with agar (Sigma)
- 25 cm², 75 cm², 150 cm² ve 300 cm² hücre flaskları (Corning)
- 6- ve 96-kuyucuklu plaklar
- 150 mm hücre petri kutuları
- 15 ve 50 ml Falcon tüpleri, kriyotüpler
- 1-10, 20-200, 100-1000 µl steril pipet uçları
- 1.5, 0.5 ve 0.2 ml polistren Eppendorf tüpleri

3.1.2. Ekipmanlar

Çalışmada kullanılan ekipmanlar;

- Thermal cyclers (SensoQuest)
- Laminar Air Flow (ESCO)
- Inverted Mikroskop (Olympus CKX41)
- Işık Mikroskobu (Olympus CH30)
- Floresans Mikroskobu (Olympus BX51)
- Termomikser (Euroclone T-shaker)
- Hassas Terazı (Sartorius GD 603)
- Mikrosantrifüj (Eppendorf)
- Vorteks (BioSan combi spin)
- Yatay Karıştırıcı (Labnet)
- pH metre (WTW)
- Santrifüj (Thermo Fisher Scientific SL8)
- Nanodrop Spektrofotometre ND1000 (Thermo Fisher Scientific)
- Accuri C6 Akım Sitometri (Becton Dickinson)
- CO₂'li İnkübatör (Thermo Fisher Scientific)
- Multiskan FC Mikroplak Okuyucu (Thermo Fisher Scientific)
- Buzdolabı (Bosch), Otoklav (Aesculap)
- Elektroforez Güç Kaynağı (Thermo EC250-90)
- Jel elektroforez tankı (Owl™ EasyCast™ B1)
- UV Transsilluminatör (Vilber)
- Infrared Görüntüleme Sistemi (LI-COR Biosciences)
- Jel görüntüleme sistemi (Vilber Lourmat)
- Trans-Blot® SD Semi-Dry transfer sistemi (Bio-rad)
- Gene Pulser Xcell Electroporator (Bio-rad), Etüv (Heraeus)
- -86°C Dondurucu (Revco).

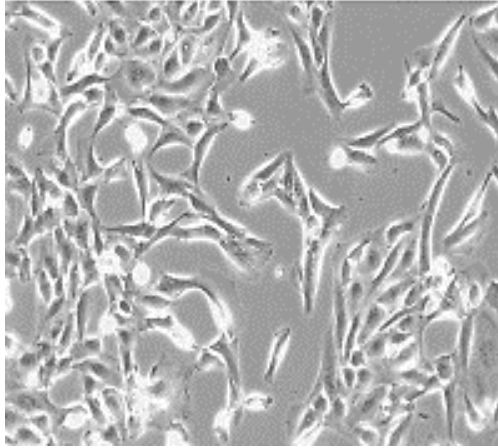
3.2. Yöntemler

3.2.1. Etken maddelerin hazırlanması

Çalışmada ticari olarak temin edilen cisplatin, ampisilin, blasticidin ve puromisin etken maddeleri kullanıldı. Liyofilize gelen 5 gr ampisilin 50 ml steril saf suda çözünerek stok konsantrasyonu 100 mg/ml olacak şekilde hazırlandı ve porsiyonlanarak -20°C’de saklandı. Kullanılabilir formda gelen cisplatin karanlıkta ve oda sıcaklığında, blasticidin ve puromisin ise -20°C’de saklandı. Ara konsantrasyonlar çalışma esnasında uygun medyumlar ile dilüe edilerek taze olarak hazırlandı.

3.2.2. Hücre Kültürü

Çalışmada tüm genomu hedefleyen CRISPR-Cas9 tabanlı genetik bir tarama gerçekleştirilerek cisplatin direncinden sorumlu genetik bileşenleri tanımlamak için Calu-1 ile lentivirüs üretimi ve paketlenmesi için HEK293T hücre hatları kullanıldı. İnsan akciğer epitelinden elde edilmiş ve evre III squamöz hücreli karsinom olan Calu-1, *p53* (homozigot delesyon), *KRAS* (G12C) ve *FHIT* gen mutasyonları ile karakterize bir hücre hattıdır (Şekil 8).



Şekil 8: Calu-1 hücre hattının mikroskop görüntüsü

3.2.2.1. Hücre Hatlarının Bakımı, Pasajlanması ve Dondurulması

In vitro olarak gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmalarında, hücrelerin yaşamaları, büyümeleri ve çoğalmaları için gerekli maddeler ile %10 FBS, %1 L-glutamin ve %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM (Biological Industries, BI) ortamı kullanıldı. Hücreler DMEM içerisinde %95 nem ve %5 CO₂ bulunduran 37°C’ deki etüvde yeterli

sayıya ulaşana kadar inkübe edildi. Hücrelerin proliferasyonu, pasajları ve rutin takip işlemleri inverted mikroskop ile düzenli olarak kontrol edildi. Hücreler %80 - 90 yoğunluğa ulaşana kadar çoğaltıldı. Hücrelerin pasajlaması sırasında, ortam aspire edilerek hücreler $1 \times$ steril PBS ile yıkandı ve Trypsin EDTA ile yüzeyden kaldırıldı. Yeni kültürler için 1×10^6 canlı hücre ile başlayacak şekilde yeniden ekim yapılarak hücrelere 48 saatte bir pasajlama yapıldı. Hücreler %5 DMSO içeren FBS ile kriyoprezervasyon yapılarak -86°C 'de stoklandı.

3.2.2.2. Hücre Canlılık Testi

Kültüre edilen hücrelerin sayılarının ve canlılıklarının kontrolü için tripan mavisi boyası (BI) kullanıldı. Kontrol edilecek olan hücreler 1:1 oranında tripan mavisi boyası ile karıştırılarak uygun miktarda karışım Neubauer lamına aktarıldı ve ışık mikroskopunda sayıldı. Membran bütünlüğü bozularak boyayı içine alan ve mavi renkte görünen hücreler ölü, almayanlar canlı kabul edilerek mililitredeki hücre sayısı belirlendi. Canlı hücre sayısı toplam hücre sayısına oranlanarak hücrelerin canlılık yüzdesi hesaplandı. Deneylerde canlılığı %95 ve üzerinde olan hücreler kullanıldı.

3.2.2.3. Hücrelerde Mikoplazma Varlığının Değerlendirilmesi

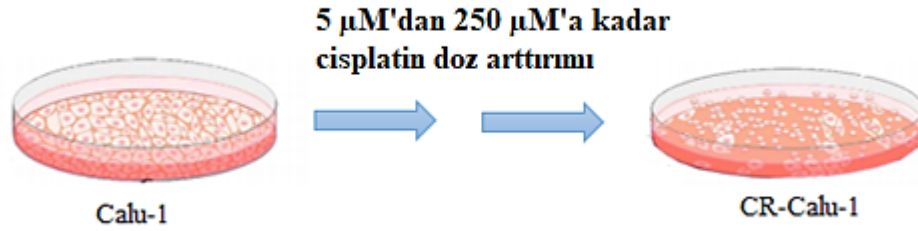
Mikoplazma kontaminasyonu hücre kültürü çalışmalarında tekrar tekrar ortaya çıkan çok yaygın bir problemdir. Mikoplazma hücrelerin fizyolojisini ve metabolizmasını bozarak araştırmaların verimliliğini ve sonucunu olumsuz yönde etkilemektedir. Bu yüzden deneylere başlamadan önce hücreler mikoplazma varlığı açısından test edildi.

Mikoplazma deney protokolü

1. 10 mm petri kutusuna steril bir lamel yerleştirildi. 1×10^5 hücre lamel üzerine ekilerek 24 saat inkübe edildi.
2. İnkübasyonun ardından lamel soğuk PBS ile yıkandı.
3. Yıkamadan sonra 1 ml metanol eklenerek 10 dk inkübe edildi.
4. 500 μl PBS içerisine 3 μl Hoechst boyası eklenerek vorteks edildi. Boya solüsyonundan 100 μl lamel üzerine eklenerek 5 dk inkübe edildi. İnkübasyonun ardından boya aspire edilerek hücreler 1 ml PBS ile yıkandı.
5. Gliserol 1:2 oranında PBS ile dilüe edildi. 20 μl dilüe gliserol lam üzerine yayılarak lamel kapatıldı ve floresans mikroskopta görüntülendi.

3.2.3. Cisplatin Dirençli Calu-1 Hücre Hatlarının Oluşturulması

Calu-1 hücreleri ‘doz artırımı’ metodu ile artan ilaç konsantrasyonlarına sürekli maruz bırakılarak dirençli hale getirildi. Direnç gelişimine 5 μM cisplatin konsantrasyonu ile başlandı. Calu-1 hücreleri 5 μM cisplatine 24 saat maruz bırakıldı. Ardından ilaçlı ortam aspire edilerek hücreler iki kez $1\times$ PBS ile yıkandı. Hücreler normal ortam eklenerek %90 yoğunluğa ulaşana kadar çoğaltılmaya devam edildi. Bir sonraki doz artırımında hücrelerin tamamının ölme ihtimaline karşı hücrelerin bir kısmı donduruldu. Diğer kısmına 1.5-kat doz uygulaması yapıldı. Bu şekilde altı ay devam eden direnç kazandırma sürecinde son doz olarak Calu-1 hücrelerine 250 μM cisplatin uygulandı. Oluşturulan dirençli hücreler CR-Cal-1 olarak isimlendirildi (Şekil 9).



Şekil 9: Dirençli CR-Cal-1 hücre serisinin oluşturulması

3.2.3.1. CR-Cal-1 Hücrelerinin Direnç Karakterizasyonunun Yapılması

CR-Cal-1 hücre serisinin direnci koloni oluşturma kabiliyetine göre değerlendirildi. Koloni oluşum analizi, tek bir hücrenin en az 50 hücrelik koloniler halinde büyüme kabiliyetine dayanan bir *in vitro* hücre sağ kalım analizidir (Franken ve ark. 2006). Cisplatinin, oluşturulan dirençli hücreler üzerindeki uzun vadeli etkisini belirlemek için koloni oluşumu deneyi yapıldı. Calu-1 ve CR-Cal-1 hücreleri her kuyuda 1×10^3 hücre olacak şekilde 6-kuyucuklu plaklara ekildi. Ertesi gün hücrelere 48 saat boyunca 10-25-50-100-200-400 μM cisplatin dozları uygulandı. Daha sonra hücreler iki kez PBS ile yıkanarak uzun süre iyileşmeye bırakıldı. Hücrelerin ortamı her 2-3 günde bir değiştirildi. 14. gün hücreler soğuk metanolle fikse edilerek toluidin mavisi ile boyandı. Her bir doz uygulamasında oluşan koloni sayısı analiz edildi.

3.2.4. Proliferasyon Analizi

Sitotoksisite deneylerine başlamadan önce, deney süresince yani 4-5 gün canlı kalabilecek hücre sayısını belirlemek için hücre proliferasyon deneyi yapıldı. Proliferasyon ve sitotoksisite analizlerinde hücre canlılığının belirlenmesi için XTT (Bio Ind. /BI) kullanıldı. Bir tetrazolyum tuzu olan XTT yönteminde; metabolik olarak aktif canlı hücreler sarı olan tetrazolyum tuzlarını suda çözünür turuncu formazan boyasına dönüştürmektedir. Oluşan formazan ürünleri, absorbans bazlı bir spektrofotometre ile ölçülmektedir.

1:2 dilüsyon yapılarak 1×10^6 – 781 hücre/ml yoğunluklarda hazırlanan Calu-1 ve CR Calu-1 hücreleri üç tekrarlı ve 100µl/kuyu olacak şekilde 96-kuyulu plakaya aktarıldı. Hücreler 96 saat inkübe edildikten sonra her kuyucuğa 50 µl XTT solüsyonu eklendi. Bir saat arayla olacak şekilde 4 kez formazan boya oluşumunun kalitatif değeri Multiskan FC (Thermo) mikropalak okuyucusu kullanılarak 450 ve 620 nm'de fotometrik olarak ölçüldü.

3.2.5. Sitotoksisite Analizi

Cisplatinin Calu-1 ve CR-Calü-1 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini ve hücrelerin %50'sini (IC₅₀) öldüren sitotoksik inhibitör konsantrasyonlarını belirlemek amacıyla sitotoksisite analizi yapıldı.

Sitotoksisite deney protokolü:

1. Calu-1 ve CR-Calü-1 hücre serileri proliferasyon deneyi ile belirlenen sayıda 100µl/kuyu olacak şekilde 96-kuyucuklu plaklara ekildi ve 24 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından ortam çekildi.
2. Üç tekrarlı olacak şekilde cisplatinin Calu-1 hücre serisi için 80 µM, 40 µM, 30 µM, 20 µM, 10 µM, 5 µM, 2.5 µM konsantrasyonları, CR-Calü-1 hücre serisi için 400 µM, 300 µM, 200 µM, 150 µM, 100 µM, 50 µM, 25 µM konsantrasyonları her kuyucukta son hacim 100 µl olacak şekilde hücreler üzerine eklendi.
3. Cisplatin uygulanmayan hücreler kontrol grubu olarak değerlendirildi.
4. Hücrelerin cisplatin ile 24, 48 ve 72 saatlerdeki inkübasyonlarının ardından her kuyucuğa 50 µl XTT solüsyonu eklendi. Bir saat arayla olacak şekilde 4 kez formazan boya oluşumunun kalitatif değeri Multiskan FC mikropalak okuyucusu kullanılarak 450 ve 620 nm'de fotometrik olarak ölçüldü.

5. Cisplatinin hücreler üzerindeki IC₅₀ sitotoksik dozunu hesaplamak için Graphpad Prism 8.0.2 (GrapPad Software, Inc) analiz programı kullanıldı.

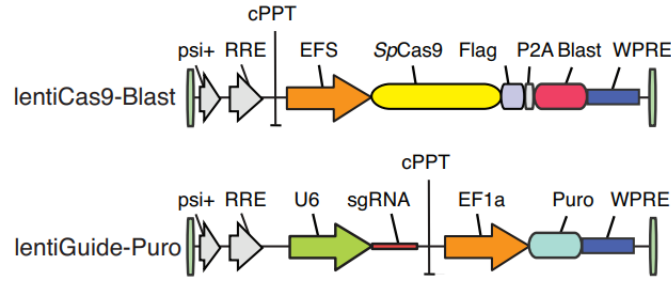
3.2.6. Genom Çapında CRISPR Tarama Çalışmaları

3.2.6.1. Brunello Kütüphanesi

“Brunello kütüphanesi” 19,114 geni hedefleyen ve her bir gen için 4× olmak üzere toplam 76,441 *gRNA* ile herhangi bir geni hedeflemeyen 1,000 kontrol *gRNA*’dan oluşmaktadır. Doench ve ark.’ları bu kütüphaneyi tasarlamak için GenCODE, Havana ve Ensembl veritabanlarını ortak kullanarak protein kodlayan transkriptleri hedeflemişlerdir. GenCODE tarafından belirlenen kriterlere göre her gen için bir transkript, her transkript için genin protein kodlama bölgesinin %5-65’ini hedef alan en iyi sıradaki *gRNA* seçilmiştir. Daha sonra, transkript başına bir sonraki seçilen *gRNA*, önceden seçilmiş *gRNA*’lardan protein kodlama açısından en az %5 uzaklıktaki bir alanı hedeflemektedir. Bu şekilde her gen için dört *gRNA* belirlenmiştir (Doench ve ark. 2016). Daha sonra bu kütüphane LentiCRISPR V2 veya lentiGuide Puro vektörüne klonlanarak Addgene şirketine lisanslanmıştır (Addgene, LentiGuide Puro). Çalışmada kullanılan Brunello kütüphanesi LentiGuide Puro vektörüne (Addgene #73178) klonlanmış şekilde Addgene’den satın alınmıştır.

3.2.6.2. LentiGuide Puro ve LentiCas9 Blast Vektör Sisteminin Özellikleri

Bu çalışmada hücrelerde Cas9 ekspresyonu sağlayan LentiCas9 Blast ile sadece klonlanmış *gRNA*’nın ekspresyonunu gerçekleştiren LentiGuide Puro lentiviral vektörleri kullanıldı. LentiCas9 Blast lentiviral plazmidi 12,859 bp uzunluğunda olup *EFS* promotöründen SpCas9, Flag ve blasticidin direnç geni eksprese olmaktadır. LentiGuide Puro lentiviral plazmidi 10,183 bp uzunluğunda olup iki promotör bölgesi taşımaktadır. *U6* promotöründen özelleştirilebilir *gRNA* ve *EF-1a* promotöründen puromisin direnç geni eksprese olmaktadır (Şekil 10).



Şekil 10: LentiCas9 Blast ve LentiGuide Puro lentiviral vektörleri (Sanjana ve ark.,2014)

3.2.6.3. Luria-Bertani (LB) -Ampisilin Agar Platelerin ve LB Sıvı Medyumun hazırlanması

Brunello kütüphanesinin transformasyonundan önce bakterinin çoğaldığı LB ampisilin içeren agar plateler ile bakteri izolasyonunda kullanılan LB sıvı medyum hazırlandı. 35 gr LB Broth agar (Sigma#L2897) 1 litre steril saf su içerisinde ve 50°C ısı çalkalayıcısında 10 dakika çözdürülerek 15 psi (1,05 kg/cm²)’de 20 dk otoklavlandı. Otoklavdan sonra 50°C su banyosunda soğutuldu. İçerisine 1 µg/ml olacak şekilde ampisilin eklenerek Nunc TM Square BioAssay ve 100 mm plaklara döküldü. Agar soğuduktan sonra kapak kısmı parafilmle ve 4°C’de ters çevrilerek saklandı. LB sıvı medyum için 1 litre steril saf su içerisine 5 gr maya ekstraktı, 10 gr tripton, 10 gr NaCl çözdürülerek 15 psi’de 20 dk otoklavlandı. Otoklavın ardından soğutularak 4°C’de saklandı.

3.2.6.4. Brunello Kütüphanesinin Transformasyonu

Addgene’den LentiGuide Puro lentiviral plasmide klonlanmış halde gelen Brunello Kütüphanesi Endura elektrokompnent hücrelere (Lucigen#60242) elektroporasyonla transforme edildi. 25 µl endura elektrokompnent hücrelerine 100 ng kütüphaneyi taşıyan plazmid eklenerek iyice karıştırıldı. Ardından soğuk 0,1 cm elektroporasyon kuvetine aktararak Gene Pulser Xcell elektroporasyon cihazında (Bio-rad) 1,800V, 10µF ve 600 Ω’da transformasyon gerçekleştirildi. Elektroporasyon sonrası kuvet içerisinden bakteri 2 ml recovery medyum ile toplanarak eppendorf tüplerine akarıldı. Bu elektroporasyon 4 kez tekrarlandı. Recovery medyum içerisine toplanan bakteriler 37°C ve 250× rpm’de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından bakteriler ampisilin içeren 2 adet bioassay petri plaklara yayılarak koloni oluşumu için 37°C’de 16 saat inkübe edildi.

3.2.6.5. Brunello Kütüphanesinin İzolasyonu

16 saat inkübasyonun ardından kütüphaneyi taşıyan bakteri kolonilerinden plazmid DNA izolasyonu Hispeed Plasmid Maxi Kit (Qiagen) ile gerçekleştirildi.

Hispeed Plasmid Maxi Kit Protokolü

1. Öncelikle bioassay agar plaklardan koloniler soğuk LB sıvı medyum ile 3 kez yıkama yapılarak toplandı ve 4°C, 6,000 × g'de 15 dk santrifüj edildi.
2. Süpernatant atılarak bakteriyel pelet üzerine 10 ml Buffer P1 eklenerek pelet iyice homojenize edildi.
3. Daha sonra 10 ml Buffer P2 eklenip 6 kez ters çevrilerek karıştırıldı ve oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi.
4. 10 ml önceden soğutulmuş Buffer P3 eklenip 6 kez ters çevrilerek karıştırıldı.
5. QIAfilter kartuş çıkış ucuna kapak takıldı. QIAfilter kartuş 50 ml Falcon tüpü üzerine yerleştirildi. Bakteriyel lizat QIAfilter kartuş haznesine dökülüp oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi.
6. İnkübasyon sırasında HiSpeed Tip içerisine 10 ml Buffer QBT eklenerek filtreden tamamen geçmesi beklendi.
7. QIAfilter kartuş çıkış ucundan kapak çıkartıldı. Piston QIAfilter kartuş içerisine yerleştirildi ve hücre lizatı önceden ısıtılmış HiSpeed Tip içine filtre edildi.
8. Lizat girdikten sonra, HiSpeed Tip 60 ml Buffer QC ile yıkandı.
9. Yıkamadan 15 ml Buffer QF ile DNA elüe edildi.
10. DNA üzerine 10.5 ml izopropanol eklenerek 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sırasında, piston 30 ml'lik bir enjektörden çıkarıldı ve enjektör ucuna QIAprecipitator Modülü yerleştirildi. Elüat-izopropanol karışımı enjektör içerisine döküldü. Piston tekrar takılarak karışım QIAprecipitator modülü içerisinden geçirildi.
11. QIAprecipitator enjektörden çıkarılıp piston geri çekildi. QIAprecipitator tekrar takılıp enjektöre 2 ml %70 etanol eklendi. Piston tekrar yerleştirilerek QIAprecipitator'den etanol geçirildi.
12. QIAprecipitator enjektörden çıkarılıp piston geri çekildi. QIAprecipitator tekrar takılıp piston yerleştirildi. QIAprecipitator içinden kuvvetli bir şekilde hava

bastırılarak membran kurutuldu. Bu adım birkaç kez tekrarlandı. QIAprecipitator çıkış ucu emici kağıtla kurutuldu.

13. Yeni bir 5 ml'lik enjektörden piston çıkarıldı. QIAprecipitator takılıp çıkış ucu 1.5 ml'lik bir toplama tüpünün üzerine sabitlendi. 5 ml enjektöre 1 ml Buffer TE eklenip piston tekrar takıldı. Sabit basınç kullanılarak DNA toplama tüpüne ayrıldı.

14. QIAprecipitator 5 ml enjektörden çıkarılıp piston geri çekildi. QIAprecipitator 5 ml enjektöre tekrar takılıp toplanan DNA tekrar 5 ml enjektör içerisine alındı. Piston takılarak DNA ikinci kez elüe edildi.

15. İzole edilen DNA'nın miktarı ve saflığı NanoDrop spektrofotometre ND1000 (Thermo Fisher Scientific) cihazında ölçüldü.

3.2.6.6. Lentivirüs Paketleme Plazmitlerinin İzolasyonu

Lentivirüs üretimi sırasında kullanılacak olan pMD2.G (Addgene #12259) ve psPAX2 (Addgene #12260) paketleme plazmidleri Addgene'den satın alındı. psPAX2 plazmidi *gag*, *pol*, *rev* ve *tat* genlerini eksprese ederken pMD2.G plazmidi VSV-G zarf protein genini eksprese etmektedir. Her iki plazmid de ampicilin direnç geni taşımaktadır. Bakteriye transformasyonu yapılmış şekilde gelen bu plazmidler ampicilin içeren LB agar plakelere yayılarak 37°C'de 16 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından oluşan kolonilerden 1 koloni seçilerek LB sıvı medyumda çoğaltıldı. Plazmid DNA izolasyonu MN Nucleospin Plasmid Mini Kit ile gerçekleştirildi.

MN Nucleospin Plasmid Mini Kit Protokolü

1. LB medyum içerisinde çoğalan bakteri kültürü 11,000 × g'de 1 dk santrifüj edildi.
2. Supernatant atılarak bakteri peleti üzerine 250 µl Buffer A1 eklenerek vorteks yapıldı.
3. 250 µl Buffer A2 eklendi ve renk tamamen mavi olana kadar 6-8 kez alt üst edilerek ve oda sıcaklığında 5 dk inkübasyona bırakıldı.
4. 300 µl Buffer A3 eklendi ve renk beyazlaşana kadar 6-8 kez alt üst edilerek 11,000 × g'de 10 dk santrifüj edildi.
5. Supernatant NucleoSpin® Plasmid kolona aktararak 11,000 × g'de 1 dk santrifüj edildi.

6. Kolon üzerine önceden 50°C’de ısıtılmış 500 µl Buffer AW eklenerek 11,000 × g’de 1 dk santrifüj edildi.
7. Kolondan tamamen etanolün uzaklaşması için kolon tekrar 11,000 × g’de 3 dk santrifüj edildi.
8. Kolondaki filtrenin merkezine önceden 70°C’de ısıtılmış 30 µl Buffer AE eklendi ve kolon tekrar 70°C’de 2 dk inkübe edildi.
9. İnkübasyonun ardından kolon 11,000 × g’de 3 dk santrifüj edildi.
10. İzole edilen DNA konsantrasyonu NanoDrop spektrofotometre ND1000 cihazında ölçüldü.

3.2.6.7. Lentivirüs Üretiminin Gerçekleştirilmesi

LentiCas9 Blast ve LentiGuide Puro vektörlerinin üretimi HEK293T hücrelerinde gerçekleştirildi. Öncelikle HEK293T hücreleri her kuyuda 7×10^5 olacak şekilde 6-kuyucuklu plaklara ekildi. Ertesi gün %80 yoğunluğa ulaşan hücreler LentiCas9 Blast veya LentiGuide Puro / psPAX2 / pMD2.G plazmidleri ile sırasıyla 4:2:1 oranlarında transfekte edildi. Transfeksiyon ajanı olarak polyethylenimine (PEI) (#23966, Polysciences Inc) kullanıldı. Transfeksiyondan 48 saat sonra lentivirüslerin içinde bulunduğu hücre ortamı toplandı ve 0.45 µM’lik SFCA filtreden geçirilerek saflaştırıldı. Toplanan virüsler eşit hacimlere bölünerek -86°C’de saklandı.

3.2.6.8. Hücrelerde Etkili Blasticidin Dozunun Belirlenmesi

Hücrelerde Cas9 ekspresyonunu gerçekleştirecek olan LentiCas9 Blast lentivirüsü blasticidin direnç geni taşımaktadır. Bu nedenle lentivirüs transdüksiyonu sonrasında enfekte hücrelerin seçilimi blasticidinle yapıldı. Lentiviral transdüksiyon öncesi hücreleri öldüren en düşük blasticidin dozu belirlendi. Bunun için 6-kuyucuklu plaklara her kuyuda 3×10^5 Calu-1 ve 4×10^5 CR-Cal-1 hücreleri olacak şekilde ekim yapıldı. Ertesi gün hücrelere 5 µg, 10 µg, 20 µg, 30 µg, 40 µg olacak şekilde blasticidin konsantrasyonları uygulandı. Bir kuyudaki hücrelere blasticidin verilmeyerek bunlar kontrol grubu olarak değerlendirildi. Dokuz günlük blasticidin uygulanmasının ardından hücrelerin ortamı aspire edildi. Hücreler 2 kez PBS ile yıkandı. Daha sonra hücreler soğuk metanol ile 5 dk fikse edilerek toluidin mavisi ile boyandı. Kalan kolonilere göre hücreleri öldüren en düşük blasticidin dozu belirlendi.

3.2.6.9. LentiCas9 Blast Lentivirüs Titresinin Belirlenmesi ve Hücrelere Transdüksiyonu

Tarama çalışmalarında hücreleri transdükte edecek lentivirüs miktarı önemlidir. Genellikle havuzlanmış kütüphane kullanılarak knockout yapılan çalışmalarda her bir hücrenin bir *gRNA* alabilmesi için lentiviral transdüksiyonun %30 (*multiplicity of infection*; MOI=0.3) gibi düşük enfeksiyon verimliliğinde yapılması gerektiği bildirilmiştir. Virüs titresi olan MOI'nin belirlenmesi için altı kuyucuklu plaklara her kuyuda 3×10^5 Calu-1 ve 4×10^5 CR-Cal-1 hücreleri olacak şekilde ekim yapıldı. Ertesi gün hücrelerin üzerine transfeksiyon etkinliğini arttıracak olan polibren ile birlikte 1/16, 1/32, 1/64 ve 1/128 oranlarında LentiCas9 Blast lentivirüs konsantrasyonları eklendi. 48 saatlik inkübasyonun ardından besiyerleri çekilen hücreler PBS ile yıkandı ve önceden belirlenen blasticidin dozları verilerek, dokuz gün boyunca Cas9 eksprese eden hücrelerin seçilimi gerçekleştirildi. Bir kuyudaki hücrelere lentivirüs ve blasticidin uygulaması yapılmadı ve bu hücreler kontrol grubu olarak değerlendirildi. Dokuz günün sonunda tüm hücreler tripsinle kaldırılarak hücre sayımı yapıldı. Kontrol grubuna göre MOI=0.3'ü veren virüs miktarı LentiCas9 Blast lentivirüs titresi olarak belirlendi.

2×10^6 Calu-1 ve CR-Cal-1 hücreleri T-150 flakslara ekildi. Ertesi gün ortam çekilerek hücreler PBS ile yıkandı. Hücrelere polibrenli yeni ortam içerisinde belirlenen virus titresi transfekte edildi. Transfeksiyondan 48 saat sonra ortam çekilerek hücreler iki kez PBS ile yıkandı. Hücrelere daha önce belirlenen blasticidin dozu verilerek Cas9 enzimini eksprese eden hücrelerin seçilimi için dokuz gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından hücrelerin ortamı aspire edilerek hücreler PBS ile yıkandı. Daha sonra hücreler normal ortamla 14 gün çoğalmaya bırakıldı.

3.2.6.10. Hücrelerde Cas9 İfadesinin Gösterilmesi

Cas9 ekspresyonunun gösterilmesi için LentiCas9 Blast lentivirüsüyle transfekte edilen ve Cas9 eksprese eden Calu-1 ve CR-Cal-1 hücreleri ile transfekte olmamış normal Calu-1 ve CR-Cal-1 hücrelerinden protein izolasyonu gerçekleştirilerek Western Blot analizi yapıldı.

Protein İzolasyonu

1. 2×10^6 Calu-1 ve CR-Cal-1 hücrelerinden protein izolasyonu gerçekleştirildi. Öncelikle hücreler tripsin EDTA solüsyonu ile kaldırıldı. Hücrelere PBS eklenerek santrifüj tüplerine alındı ve $1,200 \times \text{rpm}$ 'de 5 dk santrifüj edildi.
2. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra ikinci yıkama için hücrelere tekrar PBS eklenerek santrifüj işlemi tekrarlandı.
3. Daha sonra pellet üzerine 100 μl m-lizis buffer eklenip 4°C 'de 15 dk karıştırıcıda inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 15 dk $20,000 \times g$ 'de santrifüj edildi.
4. Protein olan süpernatant kriyotüplere alınarak -86°C 'de saklandı.

Bradford protein miktar tayini

Protein tayini Bradford metodu ile gerçekleştirildi. Bovin serum albumin (BSA) standartları 1.25, 2.5, 5, 10, 15, 20 ve 25 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarına seyreltildi (Tablo 1). Örnekler ise buz üzerinde 1:200 oranında dilüe edildi. 50 μl standart ve örnekler 3 tekrarlı olacak şekilde 96-kuyucuklu plakaya pipetlendi ve üzerlerine 50 μl Bradford solüsyonu ilave edildi. Alüminyum folyo ile kapatılarak 4°C 'de ve karıştırıcıda 5 dk inkübe edildi. Multiskan FC (Thermo) mikropalak okuyucusunda standart konsantrasyonları ve dilüsyon faktörleri girildikten sonra plate 595 nm dalga boyunda ölçüldü ve elde edilen standart eğriye göre protein konsantrasyonları belirlendi.

Tablo 1: Bradford deneyinde kullanılan standart dilüsyonları

Protein standart				
Tüp no	Stok konsantrasyon (mg/ml)	Stoktan Alınacak Gerekli hacim (µl)	Dilüent hacmi (µl)	Son konsantrasyon (µg/ml)
1	2	4	316	25
2	2	4	396	20
3	1.5	4	396	15
4	1	4	396	10
5	0.5	4	396	5
6	0.25	4	396	2.5
7	0.125	4	396	1.25
8 (Blank)	-	-	-	-

Western Blot Analizi

1. Öncelikle ayırıcı ve paketleyici jel Tablo 2'ye göre hazırlanarak 4°C'de saklandı.

Tablo 2: Western blot analizi için jel reaksiyon karışımı

Ayırıcı Jel (%10)		Paketleyici Jel (%5)	
Akrilamid-bisakrilamid (%30)	1,700 µl	Akrilamid-bisakrilamid (%30)	170 µl
1.5 M Tris (pH 8.8)	1,350 µl	1.0 M Tris (pH 6.8)	130 µl
dH ₂ O	1,900 µl	dH ₂ O	680 µl
TEMED	2 µl	TEMED	1 µl
%10 SDS	50 µl	%10 SDS	10 µl
%10 APS	50 µl	%10 APS	10 µl

2. İndirgeyici (reducing), LDS solüsyonu ve protein örnekleri buz üzerine alındı. 1.5 ml'lik Eppendorf tüplerine Tablo 3' de verilen miktarlarda pipetleme yapılarak örnekler hazırlandı.

Tablo 3: Western blot analizi için örneklerin hazırlanmasında kullanılan bileşenler ve miktarları

İçerik	Miktar
LDS Buffer	7.5 µl
Reducing Buffer	3 µl
Örnek	5 µg/ml
dH ₂ O	30 µl'ye tamamlayan miktar

3. Hazırlanan örnekler 70°C' de 10 dk inkübe edildi. Bu sürede jelin yürütülmesi için gerekli olan Running buffer solüsyonu için 475 ml distile su üzerine 25 ml running buffer eklenip jel tankına döküldü.

4. Protein ladder (5 µl) ve örnekler (30 µl) jele yüklendikten sonra tankın kapağı kapatılarak 200 volt'ta 1 saat yürütüldü.

5. Yürütme tamamlandıktan sonra içinde distile su bulunan temiz kap içerisinde jel kasedi açıldı. Transfer Trans-Blot SD Semi Dry Transfer cell (Bio-rad) cihazında gerçekleştirildi.

6. Jel transfer buffer içerisinde 10 dk bekletildi. Önce cihaza transfer buffer ile ıslatılmış sünger yerleştirildi. Üzerine ıslatılmış filtre kâğıdı konuldu. Filtre kâğıdının üzerine metanolle ıslatılan PVDF membran yerleştirildi. Membran üzerine jel konuldu. Jel üzerine transfer buffer ile ıslatılmış filtre kâğıdı ve sünger yerleştirildi. Cihazın kapağı kapatılarak 25 volt'ta 20 dk transfer işlemi gerçekleştirildi.

7. PVDF membran proteinlerin büyüklüklerine göre uygun yerlerden kesilerek 5 ml Bloklama tamponu içeren plastik petri kaplarına alındı. Bloklama tamponu olarak %3 yağsız süt tozu içeren 5 ml TBS kullanıldı.

8. Oda sıcaklığında çalkalayıcıda 45 dk bekletilerek bloklama işlemi tamamlandı.

9. Bloklama tamponu döküldükten sonra 5 dk süreyle 3 defa yıkama işlemi yapıldı. Yıkama tamponu 150 ml distile su ve 10 ml yıkama solüsyonu kullanılarak hazırlandı.

10. LentiCas9 Blast lentivirüsü FLAG etiketli Cas9 geni taşıdığı için Cas9 ifadesinin gösterilmesinde anti-FLAG (Sigma, F1804) antikoru, kontrol için ise β-Aktin (Cell Signaling, 4970) birincil antikorları kullanıldı. PVDF membran 1 gece birincil antikor

solüsyonu ile karıştırıcıda inkübe edildi. Birincil antikor solüsyonu 5 ml bloklayıcı tamponu ve 5 µl antikor (1/1000 dilüsyon) kullanılarak hazırlandı.

11. Ertesi gün birincil antikor solüsyonu dökülerek yıkama solüsyonuyla yıkama işlemi 5 dk süreyle 3 defa tekrarlandı.

12. PVDF membran 45 dakika ikincil antikor solüsyonu (Alkalen Fosfataz konjuge) ile karıştırıcıda inkübe edildi.

13. Yıkama işlemi 5 dk süreyle 3 defa tekrarlandı. Daha sonra membran 2 dk süreyle 2 defa distile su ile yıkandı.

14. Distile su döküldükten sonra β -Aktin içeren membran üzerine 5 ml kromojen, FLAG proteini içeren membrana 2 ml kemilüminesans substratı eklendi. β -Aktin içeren membran renk oluşumu için 1 saat beklenildi. FLAG proteini içeren membran karanlıkta 5 dk inkübe edilerek LI-COR kemilüminesans cihazında görüntülendi.

15. β -Aktin membranı filtre kağıdına alınarak kurutuldu ve jel görüntüleme cihazında beyaz ışıkta fotoğrafı çekildi.

16. İmage.J programı kullanılarak bant yoğunluklarının analizi yapıldı.

3.2.6.11. Hücrelerde Cas9 Fonksiyonelliğinin Değerlendirilmesi

Fonksiyonel Cas9 ilgili gRNA spesifik genin protein seviyesinde azalmaya neden olmaktadır. Üretilen Cas9 eksprese hücrelerdeki Cas9'un fonksiyonelliğinin değerlendirilmesinde EGFR proteini için Western Blot analizi yapıldı.

EGFR gRNA'larının LentiGuide Puro Plazmidine Klonlanması

Bu analiz için öncelikle Tablo 4'de verilen ve genomda herhangi bir bölgeyi hedeflemeyen *Renilla* gRNA ile *EGFR* genini hedefleyen gRNA dizileri LentiGuide Puro plazmidine klonlandı. Plazmide yapışkan uçlar oluşturmak için forward ve reverse primer uçlarına kısa diziler eklendi.

Tablo 4: *Renilla* ve *EGFR* gRNA dizileri

gRNA dizileri	
<i>EGFR</i> Forward	CACCgTCCTCCAGAGCCCGACTCGC
<i>EGFR</i> Reverse	AAACGCGAGTCGGGCTCTGGAGGAc
<i>Renilla</i> Forward	CACCgGTAGCGCGGTGTATTATAACC
<i>Renilla</i> Reverse	AAACGGTATAATACACCGCGCTACc

1. Klonlama için öncelikle LentiGuide Puro plazmidini Tablo 5’de verilen miktarlara göre 37°C’de 30 dk *BsmBI* ile kesilerek defosforile edildi.

Tablo 5: Plazmid kesimi ve defosforilasyonu için gerekli reaksiyon karışımı

Miktar	
LentiGuide-Puro	5 µg
FastDigest BsmBI (Fermentas)	3 µl
FastAP (Fermentas)	3 µl
10X FastDigest Buffer	6 µl
100 mM DTT	0.6 µl
ddH₂O	60 µl ye tamamlayan miktar

2. Kesilmiş olan plazmid %0.8 lik agaroz jele yüklenerek 100 volt’ta 45 dk yürütüldü.
3. 8,298 bp büyüklüğündeki kesilmiş plazmid jelden alınarak Nucleospin gel and PCR Clean Up kit ile izolasyonu yapıldı.

Nucleospin Gel and PCR Clean Up Kit Protokolü

- i. Kesilen band steril 1.5’luk Eppendorf tüpüne konularak tartıldı. Ürün miktarının 2 katı kadar Buffer NT1 eklenerek 50°C’de 10 dk inkübe edildi. Tüp inkübasyon süresince 3 dakikada bir vorteks edildi.
- ii. İyice çözünmüş olan PCR ürünü Clean-up kolonuna aktararak 11,000 × g’de 40 sn santrifüj edildi. Kolonun altındaki tüp içeriği dökülerek kolon tüpe geri yerleştirildi.

- iii. Kolona 700 μ l Buffer NT3 eklenerek $11,000 \times g$ 'de santrifüj edildi. Kolonun altındaki tüp içeriği dökülerek kolon tüpe geri yerleştirildi. Bu yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı.
 - iv. Yıkamaların ardından kolondan etanolün tamamen uzaklaştırılması için kapağı açık bir şekilde $11,000 \times g$ 'de 5 dk santrifüj edildi.
 - v. Kolon daha sonra yeni bir toplama tüpüne aktarılarak 70°C 'de 5 dk inkübe edildi. Kolonun merkezine 30 μ l Buffer NE eklenerek tekrar 70°C 'de 5 dk inkübe edildi.
 - vi. İnkübasyonun ardından kolon $14,000 \times \text{rpm}$ 'de 3 dk santrifüj edilerek DNA izolasyonu gerçekleştirildi.
 - vii. İzole edilen kesilmiş plazmid DNA miktarı NanoDrop spektrofotometre ND1000 cihazında ölçüldü.
4. Her bir *Renilla* ve *EGFR* gRNA çifti Tablo 6'da verilen miktarlara göre fosforile edilerek annealing yapıldı. Bu işlem 37°C 'de 30 dk, 95°C 'de 5 dk ve ardından 25°C 'ye dakikada 5°C düşen termal döngülerde gerçekleştirildi.

Tablo 6: gRNA çiftlerinin fosforile ve annealing reaksiyon karışımı

	Miktar
gRNA-F (100 μM)	1 μl
gRNA-R (100 μM)	1 μl
10X T4 Ligation Buffer (NEB)	1 μl
ddH₂O	6.5 μl
T4 PNK (NEB)	0.5 μl

5. Annealing ve fosforile olan gRNA çifti kesilmiş plazmide ligasyon reaksiyonuyla klonlandı. Öncelikle gRNA'lar 1/20 oranında dilue edildi. Tablo 7'de verilen miktarlara göre reaksiyon karışımı hazırlandı. Bu karışım oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi.

Tablo 7: Plazmid ile gRNA ligasyon karışımı

İçerik	Miktar
BsmBI ile kesilmiş plazmid	50 ng
Dilue edilmiş oligo gRNA dupleksi	2 µl
10X T4 Ligation Buffer	1 µl
T4 Ligase	0.5 µl
ddH₂O	10 µl tamamlayan miktar

6. İnkübasyonun ardından ligasyon ürünü isoprapanol ile saflaştırıldı. Saflaştırılan ürün 25 µl Endura elektrokompnent hücrelere elektropore edildi. Elektroporasyondan sonra recovery mediumla toplanan hücreler 37°C ve 250× rpm’de 1 saat inkübe edildi.
7. İnkübasyonun ardından ampisilin içeren LB agar petri kutularına yayılarak 37°C’de 16 saat inkübe edildi.
8. Daha sonra plazmidi taşıyan tek bir koloni seçilerek 10 ml LB medyum içerisine alınarak 37°C’de 16 saat inkübe edildi.
9. Ertesi gün plazmid DNA izolasyonu MN Nucleospin plasmid mini kit ile gerçekleştirildi.
10. İzole edilen plazmid DNA’lar, psPAX2 ve pMD2.G plazmidleri ve transfeksiyon ajanı PEI ile birlikte HEK293T hücrelerine verilerek lentivirüslere paketlemesi yapıldı. *Renilla* ve *EGFR* gRNA dizilerini taşıyan lentivirüsler 48 saat sonra toplanarak -86°C’de saklandı.
11. 2×10^6 Cas9 eksprese Calu-1 ve CR-Cal-1 hücreleri 4 adet T-150’lik flaska ekildi. Her bir hücre serisi *Renilla* ve *EGFR* gRNA’larını taşıyan lentivirüsler ile transdükte edildi. Lentivirüslerin transfeksiyonunun ardından gRNA’ları taşıyan hücrelerin seçilimi için önceden belirlenen puromisin dozu 3 gün hücrelere uygulandı. Ardından normal ortamla çoğaltılmaya devam edildi.

EGFR Protein Ekspresyon Seviyeleri için Western Blot Analizi

1. *Renilla* ve *EGFR* gRNA'ları taşıyan lentivirüsler ile enfekte ve enfekte olmayan 2×10^6 Calu-1 ve CR-Cal-1 hücrelerinden protein izolasyonu yapıldı.
2. Protein tayini Bradford metodu ile gerçekleştirildi. Her bir örnek için daha önceden hazırlanan jele 45 µg yüklenerek yürütme yapıldı.
3. Membrana transfer işleminden sonra membran uygun yerlerden kesilerek blokama ve yıkama yapılarak birincil antikor (anti-EGFR antibody ve anti-beta actin) ile 1 gece inkübe edildi.
4. Ertesi gün yıkamalar yapıldıktan sonra ikincil antikor inkübasyonunun ardından membran kromojenik boya kullanılarak görüntülendi.

3.2.6.12. Cas9 Eksprese Eden Hücrelerde Etkili Puromisin Dozunun Belirlenmesi

LentiGuide Puro lentivirüsü puromisin direnç geni taşıdığı için transfeksiyon sonrası gRNA eksprese eden hücrelerin seçilimi puromisinle yapıldı. Tarama çalışmasına başlamadan önce Cas9 ifade eden hücreleri öldüren en düşük puromisin dozu belirlendi. Bunun için 3×10^5 Calu-1 ve 4×10^5 CR-Cal-1 hücreleri altı kuyucuklu plaklara ekildi. Ertesi gün hücrelere 0.5 µg, 1 µg, 2 µg, 3 µg, 4 µg konsantrasyonlarda olacak şekilde puromisin uygulandı. Bir kuyudaki hücrelere puromisin verilmeyerek bunlar kontrol grubu olarak değerlendirildi. Üç günlük puromisin uygulanmasının ardından hücrelerin ortamı aspire edildi. Hücreler 2 kez PBS ile yıkandı. Daha sonra hücreler soğuk metanol ile 5 dk fiks edilerek toluidin mavisi ile boyandı. Oluşan koloni sayılarına göre Cas9 ifade eden hücreleri öldüren en düşük puromisin dozu belirlendi.

3.2.6.13. Cas9 Eksprese Eden Hücrelerde Doubling (İkilenme) Zamanının Hesaplanması

CRISPR tarama çalışmaları esnasında Cas9 eksprese eden Calu-1 ve CR-Cal-1 hücrelerinin ikilenme zamanını bilmek pasajlama süresini belirlemek için önemlidir. Bunun için her bir hücre serisinden her flaksta 3×10^5 hücre olacak şekilde 4 adet T-25'lik flaska hücre ekimi yapıldı. Her bir hücre serisi için bu flaskalarda çoğalan hücreler 24. 28. 72. ve 96. saatte tripsinle kaldırılarak sayıldı. İkilenme zamanı aşağıdaki formül kullanılarak yapıldı.

$$\text{İkilenme zamanı} = \frac{\text{Süre} \times \log(2)}{\log(\text{son hücre konsantrasyonu}) - \log(\text{başlangıç konsantrasyonu})}$$

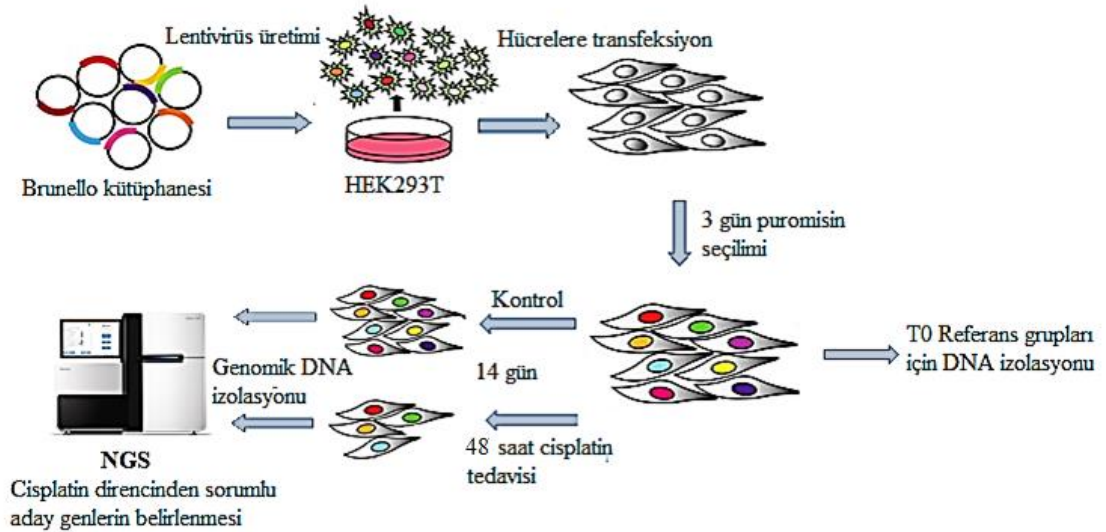
3.2.6.14. LentiGuide Puro Lentivirüs Titresinin Belirlenmesi

3×10^5 Cas9 ifade eden Calu-1, 4×10^5 Cas9 eksprese CR-Cal-1 hücreleri altı kuyucuklu plaklara ekildi. Ertesi gün hücrelere polibren ile birlikte daha önceden üretilen lentiGuide Puro lentivirüsleri 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 konsantrasyonlarında verildi. Hücreler 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından hücrelerin ortamları aspire edildi. Hücreler iki kez PBS ile yıkandı. Önceden belirlenen puromisin dozları hücrelere verilerek üç gün boyunca gRNA eksprese eden hücrelerin seçilimi gerçekleştirildi. Bir kuyudaki hücrelere lentivirüs ve puromisin uygulaması yapılmadı ve bu hücreler kontrol grubu olarak değerlendirildi. Üçüncü günün sonunda tüm hücreler tripsinle kaldırılarak hücre sayımı yapıldı. Lentivirüs titresinin doğruluğunun kontrolü için transdüksiyon verimliliğinin %30'unu sağlayan virüs miktarları tekrar 100 mm plaklarda bulunan hücrelere transfekte edildi. 48 saat inkübasyonun ardından tekrar 3 gün puromisin seçilimi yapıldı. Üçüncü günün sonunda hücreler tekrar sayılarak kontrol grubuna göre MOI=0.3'ü veren virüs miktarı LentiGuide Puro lentivirüs titresini olarak belirlendi.

3.2.6.15. LentiGuide Puro Lentivirüsünün Hücrelere Transdüksiyonu ve Taramanın Gerçekleştirilmesi

76,441 gRNA içeren Brunello kütüphanesindeki her bir gRNA'nın 1000x temsil edilmesi için 255×10^6 hücre ile tarama çalışmasına başlandı. Her bir plakada 3×10^6 Cas9 eksprese Calu-1 ve CR-Cal-1 hücreleri olacak şekilde ve her bir hücre serisi için 85 adet 150 mm plaklara ekim yapıldı. Ertesi gün ortam çekilerek hücreler PBS ile yıkandı. Hücrelere yeni ortam içerisinde daha önce belirlenen virus titresini ve transfeksiyon etkinliğini arttıracak polibren verildi. Transfeksiyondan 48 saat sonra ortam çekilerek hücreler iki kez PBS ile yıkandı. Hücrelere daha önce belirlenen puromisin dozu verilerek üç gün boyunca sadece gRNA eksprese eden hücrelerin seçilimi yapıldı. Üç gün sonunda iki hücre serisindeki toplam hücre sayısı belirlendi. Her bir hücre serisinden 8×10^7 hücre daha sonra genomik DNA izolasyonu yapılmak

üzere dondurularak -86°C’de saklandı ve bu hücreler Calu-1 T0 ve CR-Calu-1 T0 olarak adlandırıldı. Bu gruplar referans gRNA dağılımını belirlemek için kullanıldı. Tarama çalışmasına her hücre serisi cisplatin tedavisi yapılacak ve yapılmayacak şekilde iki gruba ayrılarak devam edildi. Her bir grup üç tekrarlı olarak çalışıldı. Her bir grup için 8×10^7 hücre ile devam edildi. Daha önceden belirlenen ikilenme zamanlarında pasaj yapılarak aynı sayıda hücreyle devam edildi. Geri kalan hücreler dondurularak saklandı. Cisplatin uygulaması yapılmayan tüm gruplar 14 gün normal ortamlarında çoğaltılmaya devam edildi. Transfeksiyondan 7 gün sonra ilaç uygulaması yapılacak gruplara hücrelerin %20’sini öldüren cisplatin dozu verilerek hücreler 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından hücrelerin ortamları çekildi. Hücreler 2 kez PBS ile yıkandı ve 14 gün normal ortamla çoğaltılmaya bırakıldı. 14. gün tüm hücre grupları için ve T0 olarak dondurulan 8×10^7 hücreden genomik DNA izolasyonu yapıldı (Şekil 11).



Şekil 11: CRISPR tarama çalışması iş akışı

İzolasyon NucleoSpin Blood XL (MN) kit protokolüne göre yapıldı.

NucleoSpin Blood XL Kit Protokolü

1. Hücreler 20 ml PBS ile yıkanarak 1,200 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüjden sonra süpernatant atılarak pelet üzerine 10 ml PBS eklenerek iyice karıştırıldı.
2. 50 ml'lik bir tüpe 500 µl Proteinaz K konuldu ve üzerine 10 ml PBS içerisindeki hücre karışımı eklendi.
3. Hücrelere 10 ml Tampon BQ1 eklenerek 10 saniye kuvvetli bir şekilde vortekslendi ve 56°C'de 20 dk inkübe edildi.
4. İnkübasyondan alınan lizatlar soğumaya bırakıldı ve ardından 10 ml %96-100 etanol eklendi. Tüp 10 kez ters çevrilerek karıştırıldı.
5. Toplama tüpüne yerleştirilmiş bir NucleoSpin® Kan XL kolonuna 15 ml lizat yüklenerek 4,000 x g'de 35 dk santrifüj edildi.
6. Santrifüjden sonra kolon yeni bir tüpe alındı ve lizatın geri kalan kısmı kolona yüklenerek tekrar santrifüj edildi.
7. Santrifüjden sonra kolon yeni bir tüpe alındı ve kolona 7.5 ml Tampon BQ2 eklenerek 4,000 x g'de 2 dk santrifüj edildi.
8. İkinci yıkama için kolona 7.5 ml Buffer BQ2 eklenerek kolon 4,000 x g'de 10 dk santrifüj edildi.
9. Kolon yeni bir 50 ml toplama tüpüne yerleştirildi ve 70°C'de önceden ısıtılmış 750 µl Buffer BE doğrudan kolonun merkezine uygulandı. Oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilerek 4,000 x g'de 5 dk santrifüj edildi.
10. İzole edilen DNA'ların miktarı ve saflığı NanoDrop spektrofotometre ND1000 cihazında ölçüldü.

3.2.6.16. Her Bir Hücre Grubu için Kütüphanenin Oluşturulması ve Sekanslanması

Lentivirüslerle transdüksiyon sonrası viral genom hücre genomuna entegre olmaktadır. Bundan dolayı her hücrede hem Cas9 hem de gRNA ekspresyonu gerçekleşmektedir. Her lentivirüs tek gRNA taşıdığı için her hücrede sadece bir gen knock-out olmaktadır. Cisplatin uygulaması yapılan ve yapılmayan hücre gruplarındaki gRNA dağılımının belirlenmesi için izole edilen DNA'lar indeks primerler ile etiketlenerek her bir hücre grubu için kütüphane oluşturuldu. Her bir

örnek farklı P7 indeks primerleriyle etiketlendi. Kütüphane içerisindeki *gRNA*'ların amplifikasyonu için forward ve reverse primerler kullanıldı. Forward primer P5 bağlanma bölgesi, reverse primer P7 bağlanma bölgesi ile sekanslama sırasında okunan indeks bölgesi içermektedir (Tablo 8).

Tablo 8: P5 Forward Primerleri

Forward Primerler	Primer Dizileri
P5 0 nt stagger	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCT ACACGACGCTCTTCCGATCTTTGTGGAAAGGACGAAAC ACCG
P5 1 nt stagger	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCT ACACGACGCTCTTCCGATCTCTTGTGGAAAGGACGAAA CACCG
P5 2 nt stagger	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCT ACACGACGCTCTTCCGATCTGCTTGTGGAAAGGACGAA ACACCG
P5 3 nt stagger	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCT ACACGACGCTCTTCCGATCTAGCTTGTGGAAAGGACGA AACACCG
P5 4 nt stagger	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCT ACACGACGCTCTTCCGATCTCAACTTGTGGAAAGGACG AAACACCG
P5 6 nt stagger	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCT ACACGACGCTCTTCCGATCTTGACCTTGTGGAAAGGA CGAAACACCG
P5 7 nt stagger	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCT ACACGACGCTCTTCCGATCTACGCAACTTGTGGAAAGG ACGAAACACCG
P5 8 nt stagger	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCT ACACGACGCTCTTCCGATCTGAAGACCCTTGTGGAAAG GACGAAACACCG

Sekanslama sırasında okuma hatalarını minimize etmek için sekiz farklı P5 primeri birleştirilerek tek bir primer oluşturuldu. 14 örneğin P5 ve P7 primerleri ile ampliyeye ve etiketleme yapılması sonucunda 14 farklı kütüphane oluşturuldu. Her bir kütüphane

farklı P7 indeks primerleriyle etiketlendi (Tablo 9). Farklı indekslerin kullanımı sekanslamada örneklerin birbirinden ayrılmasını sağlamaktadır.

Tablo 9: Etiketleme İçin Kullanılan P7 Reverse Primerleri

Kütüphane Adı	P7 İNDEKS PRİMER DİZİLERİ
Calu-T0	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCGGTTCAATGACTGGAGT TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCTACTATTCTTTCCCCTGCA CTGT
Calu-UT1	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGCTGGATTGACTGGAGT TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCTACTATTCTTTCCCCTGCA CTGT
Calu-UT2	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTAACTCGGTGACTGGAG TTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCTACTATTCTTTCCCCTGC ACTGT
Calu-UT3	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTAAACAGTTGTGACTGGAG TTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCTACTATTCTTTCCCCTGC ACTGT
Calu-CIS1	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATATACTCAAGTGACTGGAG TTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCTACTATTCTTTCCCCTGC ACTGT
Calu-CIS2	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGCTGAGAAAGTGACTGGA GTTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCTACTATTCTTTCCCCTG CACTGT
Calu-CIS3	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATATTGGAGGTGACTGGA GTTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCTACTATTCTTTCCCCTG CACTGT
CR-T0	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTATGTCTTGTGACTGGAG TTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCTACTATTCTTTCCCCTGC ACTGT
CR-UT1	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATATACTCGGTGACTGGAG TTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCTACTATTCTTTCCCCTGC ACTGT
CR-UT2	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTAGTCTAAGTGACTGGAG TTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCTACTATTCTTTCCCCTGC ACTGT

CR-UT3	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCGGTGACCGTGACTGGAG TTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCTACTATTCTTTCCCTGC ACTGT
CR-CIS1	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTACAGAGGGTGACTGGA GTTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCTACTATTCTTTCCCTGC CACTGT
CR-CIS2	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATATTGTCAAGTGACTGGAG TTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCTACTATTCTTTCCCTGC ACTGT
CR-CIS3	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATATTGGATTGTGACTGGAG TTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCTACTATTCTTTCCCTGC ACTGT

(CR: CR-Cal-1 hücresi, T0: puromisin seçilimi sonrası toplanan hücre DNA'sı, UT: cisplatin uygulanmayan hücre DNA'ları, CIS: cisplatin uygulanmış hücre DNA'ları, kırmızı: indeks diziler)

PCR reaksiyonu için fazla sayıda hücre ve genomik DNA kullanılarak kütüphanenin çeşitliliği sağlanmıştır. Her bir hücre grubundaki gRNA amplifikasyonu için Tablo 10'da verilen miktarlara göre reaksiyon karışımı hazırlandı.

Tablo 10: gRNA amplifikasyonu için reaksiyon karışımı

	Miktar
5X Q5 Reaction Buffer	200 µl
10 mM dNTPs	20 µl
10 µM Forward Primer	50 µl
10 µM Reverse Primer	50 µl
DNA	50 µg
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	10
5X Q5 High GC Enhancer	200
Nuclease-free H ₂ O	1,000 µl'ye tamamla

Hazırlanan reaksiyon karışımları Tablo 11’de verilen termal döngülerde amplifiye edildi.

Tablo 11: *gRNA* amplifikasyonu için termal döngü koşulları

Sıcaklık	Süre	Siklus sayısı
98°C	30 sn	1
98°C	10 sn	28
53°C	30 sn	
72°C	30 sn	
72°C	2 dk	1

PCR sonrası elde edilen ürünün tamamı %2’lik agaroz jele yüklenerek 100 volt’ta 1 saat yürütüldü. Jel UV transillüminatörde (Vilber Lourmat) görüntülendi ve doğru bantlar kesilerek sadece indeks ile etiketlenmiş DNA Nucleospin gel and PCR Clean Up Kit ile saflaştırıldı. Her bir örnek Illumina- HiSeq X cihazında Amplikon yeni nesil dizileme analizi (NGS) yaptırılmak için MacroGen şirketine gönderildi. Gönderilen her bir örnek önce kalite kontrol (*quality control*, QC) analizinden geçirildi. Daha sonra tüm örnekler pool edilerek sekanslama yaptırıldı.

3.2.6.17. NGS Sonuçlarının Biyoinformatik Analizi

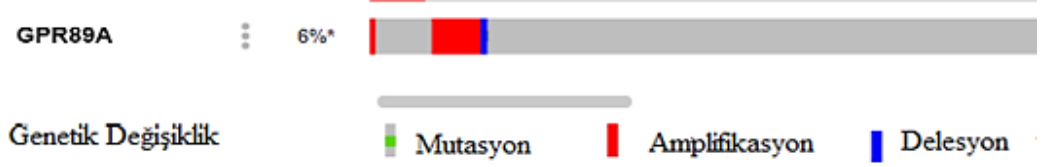
NGS sonucunda elde edilen FASTQ dosyaları MAGeCK biyoinformatik programı kullanılarak analiz edildi. Her bir örnekteki *gRNA* sayıları belirlendikten sonra T0 gruplarına göre normalizasyon yapıldı. Bunun sonucunda azalan ve artan *gRNA* skorları belirlendi.

3.2.7. Validasyon Çalışmaları

3.2.7.1. Aday Genin Seçilmesi ve Klonlanması

NGS sonucunda elde edilen okumalara göre her bir *gRNA*’nın skoru belirlenerek hücrelerdeki azalan ve artan *gRNA*’lar belirlendi. Azalan *gRNA*’lar arasından bir aday gen belirlendi. Aday genin <https://www.cbioportal.org/> veri tabanından akciğer kanserindeki ekspresyon seviyesine bakıldı. Validasyonu yapılacak aday gen olarak

Brunello kütüphanesindeki en yüksek skor seviyesine ve akciğer kanserindeki yüksek ekspresyon seviyesine göre Golgi pH düzenleyici A (*GPR89A*) geni seçildi (Şekil 12).



Şekil 12: cBioPortal veritabanında yer alan verilere göre seçilen aday gendeki genetik değişiklikler

Bu genlerin Brunello kütüphanesindeki *gRNA*'sı forward dizi olarak seçildi. Seçilen *gRNA* dizisine göre reverse dizileri sentez ettirildi. Her iki dizinin ucuna plazmide klonlanması için ek diziler eklendi (Tablo 12).

Tablo 12: Seçilen aday gen ve dizileri

ADAY GEN	DİZİLER
<i>GPR89A-F</i>	CACCgCGGAGAACAATGTTCCAGAA
<i>GPR89A-R</i>	AAACTTCTGGAACATTGTTCTCCGc

Aday Gene ait *gRNA*'nın LentiCRISPR V2 Plamidine Klonlanması

Validasyon çalışmalarında hem Cas9 hem de *gRNA* eksprese eden LentiCRISPR V2 plazmidi kullanıldı. Bu plazmid 14,783 bp uzunluğunda olup puromisin direnç geni taşımaktadır.

1. Klonlama için öncelikle LentiCRISPR V2 plazmidi Tablo 5'de verilen miktarlara göre 37°C'de 30 dk *BsmBI* ile kesilerek defosforile edildi.
2. Kesilmiş olan plazmid %0.8 lik agaroz jele yüklenerek 100 volt'ta 45 dk yürütüldü.

3. 12.9 kb büyüklüğündeki kesilmiş plazmid jelden kesilerek Nucleospin gel and PCR Clean Up Kit ile izolasyonu yapıldı.

4. *GPR89A* genine ait *gRNA* çifti Tablo 6’da verilen miktarlara göre fosforile edilerek annealing yapıldı. Bu işlem 37°C’de 30 dk, 95°C’de 5 dk ve ardından 25°C’ye dakikada 5°C düşen termal döngülerde gerçekleştirildi

5. Annealing ve fosforile olan *gRNA* çifti kesilmiş plazmide ligasyon reaksiyonu ile klonlandı. Öncelikle *gRNA*’lar 1/20 oranında dilue edildi. Tablo 7’de verilen miktarlara göre reaksiyon karışımı hazırlandı. Bu karışım oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi.

6. İnkübasyonun ardından ligasyon ürünü isoprapanol ile saflaştırıldı. Saflaştırılan ürün 25 µl Endura elektrokompnent hücrelere elektropore edildi. Elektroporasyonun ardından recovery medyumla toplanan hücreler 37°C ve 250 × rpm’de 1 saat inkübe edildi.

7. İnkübasyonun ardından ampisilin içeren LB agar petri kutularına yayılarak 37°C’de 16 saat inkübe edildi.

3.2.7.2. Klonlamanın Doğrulanması için Koloni PCR ve Sanger Dizileme

GPR89A genine ait *gRNA*’nın plazmide klonlanmasının doğruluğu için ilk olarak koloni PCR yapıldı. Koloni PCR ile doğrulanan klonlamada *gRNA* dizilerinin doğruluğunun teyit edilmesi için ise Sanger sekanslama yaptırıldı.

Koloni PCR protokolü

1. *GPR89A* genine ait *gRNA*’nın klonlanmasının ve bakteriye transformasyonunun ardından oluşan kolonilerden alınan 3 koloni için PCR yapıldı. Koloni PCR reaksiyon Karışımı Tablo 13’e göre hazırlandı.

Tablo 13: Koloni PCR reaksiyon karışımı

İçerik	Miktar
10X Taq Buffer	2 µl
15 mM MgCl ₂	1.2 µl
10 mM dNTPs	0.4 µl
hU6 forward primer (10 µM)	0.8 µl
gRNA reverse primer (10 µM)	0.8 µl
Taq polymerase (5 U/µl)	0.1 µl
Template	1 koloni
Nuclease-free H ₂ O	14.7 µl

2. Hazırlanan reaksiyon karışımı Tablo 14’de verilen termal döngülerde amplifiye edildi.

Tablo 14: Koloni PCR termal döngü koşulları

Sıcaklık	Süre	Siklus sayısı
95°C	5 dk	1
95°C	30 sn	28
60°C	30 sn	
72°C	1 dk	
72°C	5 dk	1

3. PCR reaksiyon ürünü %2’lik agaroz jele yüklenerek 100 volt’ta 1 saat yürütüldü. Daha sonra jel, jel görüntüleme sisteminde görüntülendi.

Sanger Sekanslama

Klonlanmış plazmidlerde gRNA dizisinin doğruluğunu belirlemek için Sanger dizileme yapıldı. GPR89A genine ait gRNA için bir bakteri kolonisi seçilerek MN Nucleospin plazmid Kit ile izole edildi. Sekanslama İstanbul Genetik Grubu tarafından

hU6 primeri ile (GAGGGCCTATTTCCCATGATTCC) gerçekleştirildi. Sekanslama sonuçları 'Chromas' yazılımı ile analiz edildi

3.2.7.3. Klonlanlanmış Plazmidin Lentivirüslere Paketlenmesi ve Hücrelere Transdüksiyonu

1. *GPR89A* genine ait *gRNA* klonlanmış plazmidi taşıyan kolonilerden tek bir koloni seçilerek 10 ml LB medyum içerisine alınarak 37°C'de 16 saat inkübe edildi.
2. İnkübasyonun ardından plazmid DNA izolasyonu MN Nucleospin plasmid mini kit ile yapıldı.
3. PEI transfeksiyon ajanı kullanılarak izole edilen plazmid DNA'lar, psPAX2 ve pMD2.G plazmidleriyle beraber HEK293T hücrelerine verilerek lentivirüslere paketlenmesi yapıldı. *gRNA* dizilerini taşıyan lentivirüsler 48 saat sonra toplanarak -86°C'de saklandı.
4. 1.2×10^6 Calu-1 ve CR-Cal-1 hücreleri 100 mm plaklara ekildi. Her bir hücre serisi LentiGPR89A lentivirüsü ile transdükte edildi. Lentivirüslerin transfeksiyonunun ardından *gRNA*'ları taşıyan hücrelerin seçilimi için önceden belirlenen puromisin dozu 3 gün hücrelere uygulandı. Ardından hücreler normal ortamla çoğaltıldı.

3.2.7.4. GPR89A Geninin Knock-out Edilmesinin Ardından Yapılan Sitotoksosite Analizi

Calu-1 ve CR-Cal-1 hücrelerinde *GPR89A* gen knock-out edilmesinin cisplatin duyarlılığı üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla sitotoksosite analizi yapıldı. Aynı zamanda *Renilla* enfekte ve hiç enfekte olmamış Calu-1 ve CR-Cal-1 hücreleri için de sitotoksosite deneyi kuruldu.

Sitotoksosite deney protokolü:

1. Transdüksiyondan 7 gün sonra Calu-1 ve CR-Cal-1 hücre serileri proliferasyon deneyi ile belirlenen sayıda 100 µl/kuyu olacak şekilde 96-kuyucuklu plaklara ekildi ve 24 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından ortam çekildi.
2. Üç tekrarlı olacak şekilde cisplatinin Calu-1 hücre serisi için 80 µM, 40 µM, 30 µM, 20 µM, 10 µM, 5 µM, 2.5 µM konsantrasyonları, CR-Cal-1 hücre serisi için 400 µM, 320 µM, 160 µM, 80 µM, 40 µM, 20 µM, 5 µM konsantrasyonları her kuyucukta son hacim 100 µl olacak şekilde hücreler üzerine eklendi.
3. Cisplatin uygulanmayan hücreler kontrol grubu olarak değerlendirildi.

4. Hücrelerin cisplatin ile 24. ve 48. saatlerdeki inkübasyonlarının ardından her kuyucuğa 50 µl XTT solüsyonu eklendi. Bir saat arayla olacak şekilde 4 kez formazan boya oluşumunun kalitatif değeri Multiskan FC (Thermo) mikropalak okuyucusu kullanılarak 450 ve 620 nm'de fotometrik olarak ölçüldü.

5. Cisplatinin knock-out olan hücreler üzerinde etkili IC₅₀ sitotoksik dozunu hesaplamak için Graphpad Prism 8.0.2 (GrapPad Software, Inc) analiz programı kullanıldı.

3.2.7.5. Apoptoz Analizi

Cisplatinin *Renilla* enfekte, *GPR89A* knock-out olan ve olmayan CR-Calu-1 hücrelerinde apoptotik etkisinin belirlenmesi amacıyla apoptoz analizi yapıldı. Sadece knock-out edilen genin etkisini belirlemek için cisplatin uygulanmayan hücrelerden ve cisplatinin farklı konsatrasyonlarına 48 saat boyunca maruz bırakılan knock-out hücrelerden üç farklı yöntem kullanılarak apoptoz analizleri gerçekleştirildi. Lentivirüs transdüksiyonun hücrelerdeki apoptotik etkisinin belirlenmesi için *Renilla* enfekte hücreler negatif kontrol grubu olarak değerlendirildi.

3.2.7.5.1. Anneksin V Yöntemi

Apoptozun ilk belirtilerinden biri plazma membranında meydana gelen değişikliklerdir. Bu değişiklikler arasında membranın iç yüzünde bulunan fosfatidilserinin dış yüzeye transloke olmasıdır. Anneksin-V fosfatidilserine yüksek spesifite ile bağlanan 35 kDa' luk bir proteindir. Analizde membranın dış yüzeyinde fosfatidilserin varlığını belirlemek için FITC (floresan izotiyosiyanat) fluorokromu ile konjuge edilen Anneksin V (FITC- Anneksin V) ve hücreleri membran bütünlüğüne göre ayırmak için kırmızı renkli vital bir boya olan propidyum iyodür (PI) kullanıldı. Bu şekilde hücrenin erken apoptoz, geç apoptoz ya da nekroz olduğu belirlendi. FITC- Anneksin V ve PI negatif olan hücreler canlı, FITC- Anneksin V pozitif PI negatif olan hücreler erken apoptotik hücre, FITC- Anneksin V ve PI pozitif olan hücreler geç apoptotik hücre, FITC- Anneksin V negatif PI pozitif olan hücreler ise nekrotik hücre olarak değerlendirildi. Knockout edilen genin ve knockout edilmiş hücrede cisplatinin apoptotik etkisi BD Pharmingen FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit protokolüne göre yapıldı.

Annexin V Deney Protokolü

1. Transdüksiyondan 14 gün sonra *GPR89A* knock-out CR-Cal-1, *Renilla* enfekte ve CR Calu-1 hücre serisi için 6-kuyulu plakada 1.8×10^5 /kuyu hücre ekilerek 24 saat inkübasyona bırakıldı.
2. İnkübasyonun ardından knock-out hücreler cisplatinin 50, 60, 75 ve 100 μ M konsantrasyonlarına, CR-Cal-1 hücresi ise 100 μ M cisplatin dozuna 48 saat boyunca maruz bırakıldı. Ayrıca ilaç uygulaması yapılmayan CR-Cal-1 ve *Renilla* enfekte hücreler kontrol grubu olarak değerlendirildi. Bir grup hücreye knock-out edilen genin apoptotik etkisini belirlemek için cisplatin uygulaması yapılmadı.
3. Hücreler tripsinizasyon işlemi ile kaldırılarak iki kez soğuk PBS ile $100 \times g$ 'de 5 dk santrifüj edilerek yıkandı.
4. 1×10^5 hücre 100 μ l $1 \times$ Binding Buffer ile süspanse edilerek 5 μ l FITC Annexin V ve 5 μ l PI eklendi.
5. Hücreler hafifçe karıştırılarak karanlıkta ve oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi.
6. Her bir tüpe 400 μ l $1 \times$ Binding Buffer eklenerek BD Accuri C6 Cflow v1.0.264.15 yazılımında analiz edildi.

3.2.7.5.2. DNA Fragmentasyon Analizi

Memeli hücrelerinde internükleozomal DNA fragmentasyonu apoptozun en ayırt edici özelliğidir. Apoptozun geç evrelerinde oluşan DNA fragmentasyonunu tespit etmek için en sık TUNEL analiz yöntemi kullanılır. TUNEL tabanlı bu analizde parçalanmış DNA'nın serbest 3'-hidroksil uçlarında florescein-12-dUTP'nin birleşmesini katalize etmek için terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) kullanılmaktadır. Floresan etiketli DNA daha sonra floresan mikroskobu veya akım sitometrisi ile analiz edilmektedir. TUNEL analizi için ApoDIRECT In Situ DNA Fragmentation Assay Kit kullanıldı

TUNEL Analizi Deney Protokolü:

1. Transdüksiyondan 14 gün sonra *Renilla*, *GPR89A* knock-out CR-Cal-1 ve enfekte olmamış CR-Cal-1 hücre serisi için 6-kuyulu plakada 1.8×10^5 /kuyu hücre ekilerek 24 saat inkübasyona bırakıldı.

2. İnkübasyonun ardından hücreler cisplatinin 50, 60, 80 ve 100 μM konsatrasyonlarına 48 saat boyunca maruz bırakıldı. *Renilla* enfekte ve CR-Calu-1 hücreleri kontrol grubu olarak değerlendirildi. Bir grup hücreye knockout edilen genin apoptotik etkisini belirlemek için cisplatin uygulaması yapılmadı.
3. Hücreler tripsinizasyon işlemi ile kaldırılarak iki kez soğuk PBS ile $300 \times g$ 'de 5 dk santrifüj edilerek yıkandı.
4. Hücreler %1 paraformaldehit içeren 5 ml PBS içine alınarak buzda 15 dk fiksede edildi.
5. Fiksasyonun ardından hücreler $300 \times g$ 'de 5 dk santrifüj edilerek süpernatant atıldı.
6. Hücreler iki kez 5 ml PBS ile yıkandı.
7. Yıkamanın ardından hücre peleti üzerine 0.5 ml PBS eklenerek hücreler suspanse edildi.
8. Hücrelere 5 ml soğuk %70 etanol eklenerek buz içerisinde 30 dk inkübe edildi.
9. İnkübasyonun ardından $300 \times g$ 'de 5 dk santrifüj edilerek etanol aspire edildi.
10. Her hücreye 1 ml Wash Buffer eklenerek $300 \times g$ 'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı. Bu yıkama adımı iki kez tekrarlandı.
11. Boyama (staining) solüsyonu Tablo 15'de belirtilen şekilde hazırlanarak hücrelere eklendi ve hücreler 37°C ' de 60 dk inkübe edildi.

Tablo 15: TUNEL Boyama Solüsyonu Reaksiyon Karışımı

Boyama Solüsyonu	
TdT Reaction Buffer	10 μl
TdT Enzyme	0.75 μl
FITC-dUTP	8 μl
dH₂O	32.25l

12. İnkübasyonun ardından hücrelere 1 ml Rinse Buffer eklenerek 300 x g'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant aspire edildi. Bu işlem iki kez tekrarlandı.

13. Hücreler BD Accuri C6 Cflow v1.0.264.15 yazılımıyla analiz edildi.

3.2.7.5.3. Kesilmiş (Cleaved) Kaspaz 9 Protein Seviyesinin Belirlenmesi

Kaspaz-9 sistein aspartik asit proteaz (kaspaz) ailesinin önemli bir üyesi olup apoptotik yolak aktifleştince kesilerek işlevsel hale gelmektedir. Kesilmiş kaspaz-9, apoptoza yol açan kaspaz kaskadını başlatmak için kaspaz-3 ve kaspaz-7 dahil olmak üzere diğer kaspaz üyelerini aktive ederek hücrenin ölümüne neden olmaktadır. Cisplatinin *Renilla*, *GPR89A* knockout CR-Calu-1 ve enfekte olmamış CR-Calu-1 *GPR89A* knockout olan CR-Calu-1 hücrelerinde kesilmiş kaspaz 9 protein seviyesi üzerine olan etkisinin belirlenmesi amacıyla Western Blot analizi yapıldı.

Kesilmiş Kaspaz 9 Western Blot Analiz Protokolü

1. CR-Calu-1, *Renilla* enfekte, *GPR89A* knock-out hücre serisi için T25 cm² hücre flaskına 6×10^5 hücre ekilerek 24 saat inkübasyona bırakıldı.
2. İnkübasyonun ardından *GPR89A* knock-out hücreler 100 µM cisplatin dozuna 48 saat boyunca maruz bırakıldı. İlaç verilmeyen CR-Calu-1 ve *Renilla* enfekte ve knock-out hücreler kontrol grubu olarak değerlendirildi.
3. Hücreler 48 saat sonra tripsinizasyon işlemi ile kaldırılarak iki kez soğuk PBS ile $1,200 \times \text{rpm}$ 'de 5 dk santrifüj edilerek yıkandı. Daha sonra hücrelerden protein izolasyonu yapıldı.
4. Protein tayini Bradford metodu ile gerçekleştirildi. Her bir örnek için daha önceden hazırlanan jele 45 µg yüklenerek yürütme yapıldı.
5. Membrana transfer işleminden sonra membran uygun yerlerden kesilerek bloklama ve yıkama yapılarak birincil antikor (anti-Cleaved Caspase 9 antibody ve anti-beta actin) ile 1 gece inkübe edildi.
6. Ertesi gün yıkamalar yapıldıktan sonra ikincil antikor inkübasyonun ardından membran kromojenik boya kullanılarak görüntülendi.

3.2.7.6. Hücre Döngüsü Analizi

Cisplatinin *Renilla*, *GPR89A* knock-out ve enfekte olmamış CR-Cal-1 hücrelerinde hücre döngüsü üzerine olan etkisinin belirlenmesi amacıyla hücre döngüsü analizi yapıldı. Hücrelerdeki DNA miktarının ölçümü esasına dayanan bu analizde 2n, 2-4n, 4n miktarına göre G0/G1, S, G2/M evrelerindeki hücre sayısı ve yüzdeleri belirlenmektedir. Hücre döngüsü analizi için BD Cycletest Plus DNA Reagent Kit (Becton Dickinson) kullanıldı. Bu yöntemde, öncelikle hücre membranı non-iyonik deterjan ile liziz edilmekte, hücre sitoskeleti ve nükleer proteinleri tripsin ile uzaklaştırıldıktan sonra RNA, Ribonükleaz A ile degrade edilmektedir. Nükleustaki DNA, PI ile boyanarak 488 nm ve 585/40 bandpass emisyon filtresi ile PI okuması Accuri 6 akım sitometri cihazında belirlendi.

Sadece knock-out edilen genin etkisini belirlemek için cisplatin uygulanmayan hücrelerden ve cisplatinin farklı konsantrasyonlarına 48 saat boyunca maruz bırakılan knockout hücrelerden hücre döngüsü analizi gerçekleştirildi. Lentivirüs transdüksiyonun hücrelerdeki hücre döngüsü üzerine etkisinin belirlenmesi için *Renilla* enfekte hücreler negatif kontrol grubu olarak değerlendirildi.

Hücre Döngüsü Analizi Deney Protokolü:

1. CR-Cal-1, *Renilla* enfekte, *GPR89A* knock-out hücre serisi için 6-kuyulu plakada 1.8×10^5 /kuyu hücre ekilerek 24 saat inkübasyona bırakıldı.
2. İnkübasyonun ardından hücreler cisplatine 50, 60, 75 ve 100 μ M konsantrasyonlarına, CR-Cal-1 hücresi ise 100 μ M cisplatin dozuna 48 saat boyunca maruz bırakıldı. İlaç verilmeyen CR-Cal-1 ve *Renilla* enfekte hücreler kontrol grubu olarak değerlendirildi. Bir grup hücreye knock-out edilen genin hücre döngüsü üzerine olan etkisini belirlemek için cisplatin uygulaması yapılmadı.
3. Hücreler tripsinizasyon işlemi ile kaldırılarak iki kez soğuk PBS ile $100 \times g$ 'de 5 dk santrifüj edilerek yıkandı.
4. Hücreler 1 ml tampon solüsyonunda süspanse edilerek $300 \times g$ 'de 5 dk santrifüj edildi. Bu işlem 2 kez tekrarlandı.
5. Santrifüjden sonra süpernatant tamamıyla uzaklaştırılarak, hücrelerin üzerine 250 μ l Solution A (tripsin tamponu) eklenerek süspanse edildi ve 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.

6. İnkübasyondan sonra hücreler üzerine 200 µl Solution B (tripsin inhibitörü ve RNaz tamponu) eklenerek tekrar 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
7. Hücreler üzerine 200 µl soğuk Solution C (PI boyama solüsyonu) eklenerek buz üzerinde 10 dk inkübasyona bırakıldı.
8. Akım sitometrisi cihazında PI okutması yapılarak sonuçlar BD Accuri C6 Cflow v1.0.264.15 yazılımıyla değerlendirildi.

3.2.7.7. Klonojenik Analiz

Cisplatinin *GPR89A* knock-out olan hücrelerinde koloni oluşturma özellikleri üzerine olan etkisinin belirlenmesi amacıyla klonojenik analiz yapıldı.

Koloni Oluşum Deney Protokolü

1. CR-Calu-1, *Renilla* enfekte, *GPR89A* knock-out olmuş hücreler 6-kuyulu plakaya 1×10^3 /kuyu hücre olacak şekilde ekilerek 24 saat inkübasyona bırakıldı.
2. Her bir hücre serisi cisplatine 1, 2.5, 5, 10, 20, 30, 40, 50 µM dozları 48 saat maruz bırakıldı. İlaç uygulaması yapılmayan knock-out, *Renilla* enfekte ve CR-Calu-1 hücreleri kontrol grubu olarak değerlendirildi.
3. 48 saat sonra hücrelerin ortamı aspire edilerek hücreler iki kez PBS ile yıkandı.
4. Hücreler koloni oluşumu için 14 gün normal ortamla çoğaltıldı.
5. Inverted mikroskopta koloni oluşumları takip edildi.
6. Kontrol gruplarında yeterli koloni oluşumu gözleendiğinde plaklar soğuk metanol ile fiks edilerek toluidin mavisiyle boyandı.
7. Oda ısısında boya uzaklaştırılarak plaklar distile su ile yıkandı.
8. Oluşan koloniler stereomikroskopta sayılarak kaplama verimliliği ve survi fraksiyonu aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplandı.

$$\text{Kaplama verimliliği (KV)} = \frac{\text{Oluşan koloni sayısı}}{\text{Ekilen hücre sayısı}} \times 100$$

$$\text{Survı fraksiyonu (SF)} = \frac{\text{Muamele sonrası KV}}{\text{Kontrol KV}} \times 100$$

3.2.7.8. Wound Healing (Yara İyileşmesi) Analizi

Cisplatinin *GPR89A* knock-out olmuş CR-Cal-1 hücrelerinde hücre migrasyonu üzerine etkisini belirlemek için yara iyileşmesi analizi yapıldı.

Yara İyileşmesi Analiz Protokolü

1. CR-Cal-1, *Renilla* enfekte, *GPR89A* knock-out olmuş hücreler 6-kuyulu plakaya 2×10^5 /kuyu hücre ekilerek 24 saat inkübasyona bırakıldı.
2. İnkübasyonun ardından hücrelerin ortamı aspire edildi. Hücrelerin bulundukları her bir kuyu pipet ucu yardımıyla çizilerek hücreler arası yara oluşturuldu.
3. Hücreler iki kez PBS ile yıkandı.
4. Hücreler cisplatine 25, 50, 75, 100 μ M konsantrasyonlarına maruz bırakıldı. İlaç uygulanmayan knock-out hücreler, *Renilla* enfekte hücreler ve CR-Cal-1 hücreleri kontrol grubu olarak değerlendirildi.
5. Tüm hücrelerin 0., 24., 48. ve 72. saat görüntüleri alınıp TStrach v.2 yazılımı kullanılarak hücrelerin migrasyon yeteneği rölatif açık alan ile ölçüldü ve başlangıç zamanına göre normalize edilerek belirlendi.

3.2.7.9. ATF4 Gen Ekspresyon Analizi

Cisplatinin *GPR89A* knock-out ve enfekte olmamış CR-Cal-1 hücrelerinde *ATF4* gen ekspresyonu üzerine olan etkisinin belirlenmesi amacıyla ekspresyon analizi yapıldı.

RNA izolasyonu, RNA miktarlarının ölçümü ve kalite kontrolü:

1. CR-Cal-1, *GPR89A* knock-out olmuş hücreler T25 cm^2 hücre flaskına 5×10^5 hücre olacak şekilde ekilerek 24 saat inkübasyona bırakıldı.
2. *GPR89A* knock-out olmuş hücre 100 μ M cisplatin dozu ile 48 saat inkübasyona bırakıldı. İlaç uygulaması yapılmayan knock-out ve CR-Cal-1 hücreleri kontrol grubu olarak değerlendirildi.
3. 48 saat sonra hücrelerin ortamı aspire edilerek hücreler iki kez PBS ile yıkandı.
4. RNA izolasyonu “MagNA Pure Compact Instrument Cihazında (Roche)” cihazında gerçekleştirildi.

5. İzole edilen RNA örneklerinin konsantrasyon ve saflıkları 260/280 ve 230/260 nm dalga boylarında absorbanlarının ölçümleriyle belirlendi. Ölçümler NanoDrop spektrofotometre ND1000 (Thermo Fisher Scientific) cihazında yapıldı.

Komplementer DNA (cDNA) sentezi ve Kantitatif RT-PCR (qRT PCR)

1. Elde edilen RNA örneklerinden cDNA sentezi “iScript™cDNA Synthesis Kit” ile yapıldı. cDNA sentezi için reaksiyon karışımı Tablo 16’ya göre hazırlandı.

Tablo 16: cDNA Sentezi Reaksiyon Karışımı

İçerik	Miktar
5x iScript Reaction Mix	4 µl
iScript Reverse Transcriptase	1 µl
RNA	500 ng
dH ₂ O	20 µl’ tamamlayan miktar

2. Hazırlanan cDNA reaksiyon karışımı Tablo 17’de verilen termal döngülerde amplifiye edildi.

Tablo 17: cDNA sentezi termal döngü koşulları

Sıcaklık	Süre	Siklus sayısı
25°C	5 dk	1
42°C	30 dk	1
85°C	5 dk	1

3. CR Calu-1, *GPR89A* cisplatin uygulanmış ve uygulanmamış knock-out hücre hatlarında *ATF4* gen ekspresyon seviyesindeki değişim LightCycler 480 gerçek zamanlı PCR sistemiyle (Roche) değerlendirildi. Normalizasyon için *ACTB* ve *RPLP0* gen ekspresyonları kullanıldı.

Tablo 18: Çalışılan gen primer dizileri

Gen	Forward Primer Dizisi	Reverse Primer Dizisi
<i>ATF4</i>	TCTCCAGCGACAAGGCTAA	CCAATCTGTCCCGGAGAA
<i>ACTB</i>	AGAGCTACGAGCTGCCTGAC	CGTGGATGCCACAGGACT
<i>RPLP0</i>	GTTGCTGGCCAATAAGGTG	GGGCTGGCACAGTGACTT

qRT-PCR Yöntem Protokolü:

1. Liyofilize primerler 250 µl RNaz-free su ile sulandırılarak 10 µM konsantrasyonunda ana stok elde edildi.
2. Tablo 19'a göre qRT-PCR Reaksiyon karışımı hazırlandı.

Tablo 19: qRT-PCR Reaksiyon Karışımı

İçerik	Miktar
iQ Syber Green Supermix	10 µl
Forward, reverse primer (10 µM)	1 µl
cDNA	0,4 µl
dH ₂ O	20 µl' tamamlayan miktar

3. Hazırlanan reaksiyon karışımı aşağıda verilen verilen termal döngülerde amplifiye edildi.

Tablo 20: qRT-PCR termal döngü koşulları

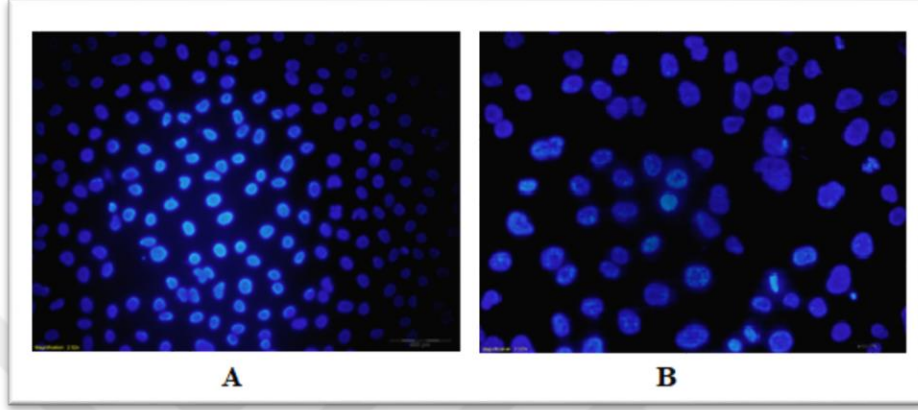
Sıcaklık	Süre	Siklus sayısı
95°C	5 dk	1
95°C	10 sn	40
60°C	15 sn	
72°C	30 sn	

4. *ATF4* gen ekspresyonu cisplatin uygulanmayan kontrol gruplarına göre delta-delta C_t ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) yöntemi ile rölatif kantitasyon olarak hesaplandı. Gen ekspresyonları *ACTB* ve *RPLP0* gen ekspresyonlarına göre normalize edilip cisplatin uygulanmayan kontrol grubuna göre ± 2 kat gen ekspresyon değişimleri anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Hücrelerde Mikoplazma Kontaminasyon Analizi

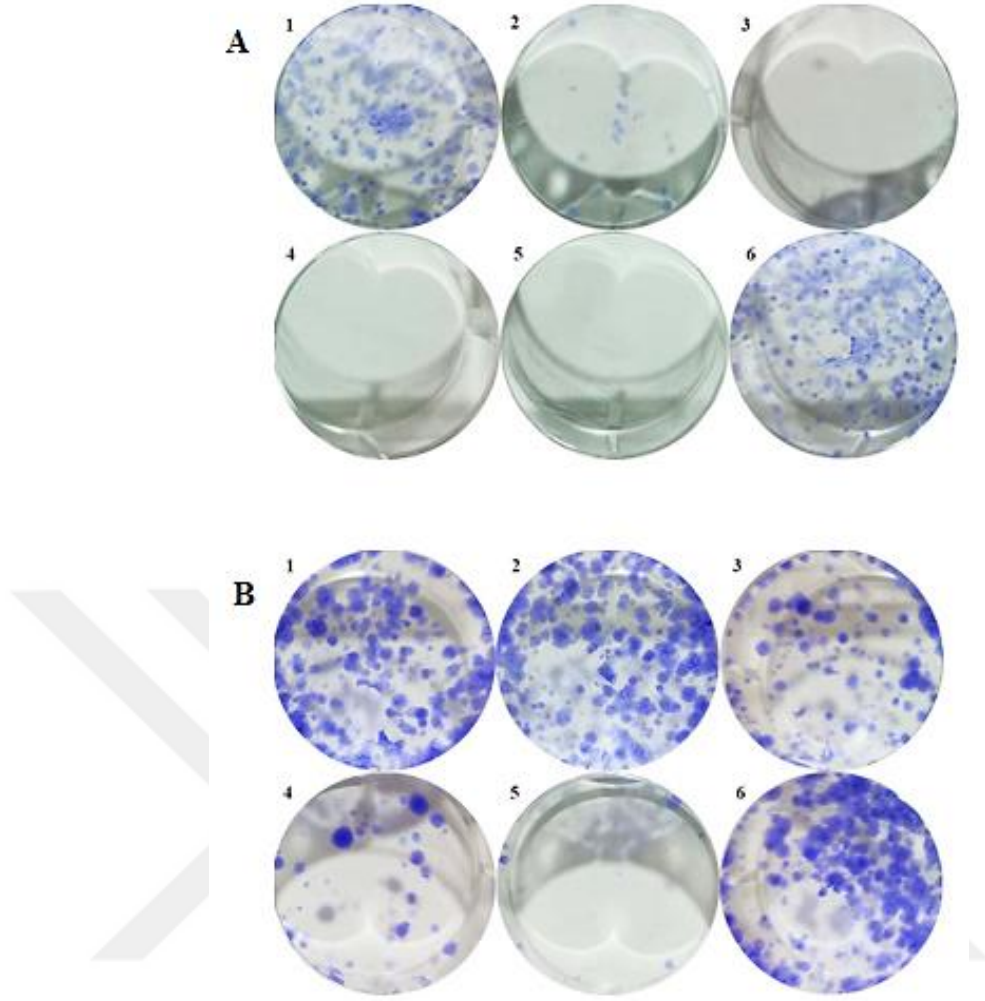
Analizlere başlamadan önce hücrelerde mikoplazma varlığının değerlendirilmesi için yapılan mikoplazma kontaminasyon deneyleri sonucunda Calu-1 ve CR-Cal-1 hücrelerinde mikoplazma görülmedi (Şekil 13).



Şekil 13: Hücrelerdeki mikoplazma analiz görüntüleri (A: Calu-1, B: CR-Cal-1)

4.2. Direnç Karakterizasyon Analizi

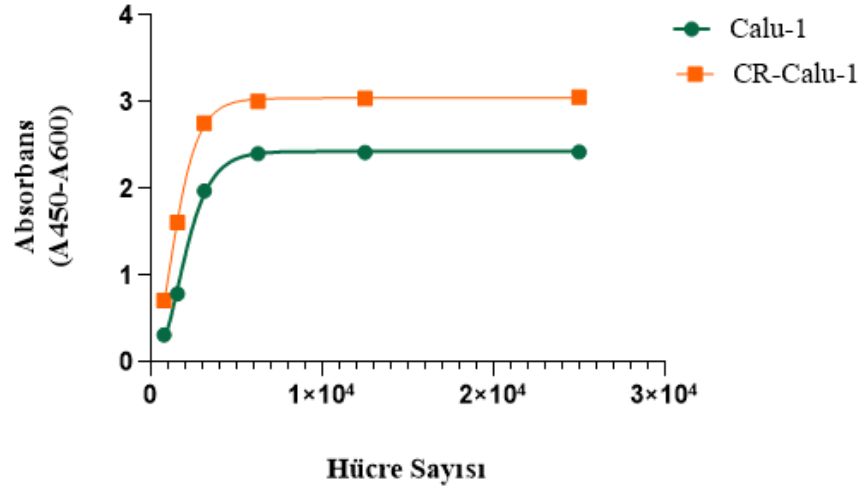
Calu-1 hücrelerinin artan cisplatin konsantrasyonlarına maruz bırakılmasıyla oluşturulan dirençli CR-Cal-1 hücrelerinin direnç karakterizasyon analizi sonucunda, bu hücrelerin 400 μ M cisplatin konsantrasyonuna bile dirençli olduğu ve az da olsa koloni oluşumunun devam ettiği belirlendi. Duyarlı Calu-1 hücrelerinin ise 50 μ M cisplatin konsantrasyonunda koloni oluşumunun çok azaldığı ve sonraki artan dozlarda hiç koloni oluşturmadığı gözlemlendi (Şekil 14).



Şekil 14: Hücrelerin direnç karakterizasyon analizi (A: Calu-1 hücresi, B: CR-Calul-1 hücresi, 1: 10 μ M cisplatin, 2: 50 μ M, 3: 100 μ M, 4: 200 μ M, 5: 400 μ M, 6: kontrol)

4.3. Proliferasyon Deney Analizi

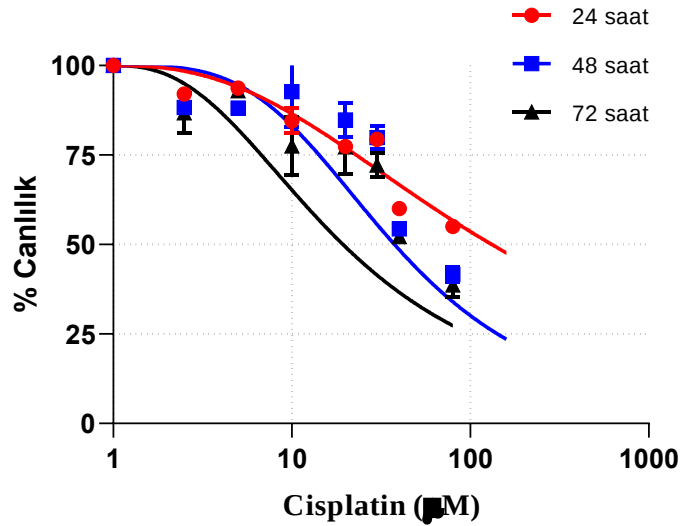
Deney süresince canlı kalabilecek hücre sayısını belirlemek için yapılan proliferasyon deney analizi sonucunda Calu-1 hücreleri için optimum hücre konsantrasyonu 5×10^4 hücre/ml, CR-Calul-1 hücreleri için 6×10^4 hücre/ml olarak belirlendi (Şekil 15).



Şekil 15: Calu-1 ve CR-Calul-1 hücreleri için hücre konsantrasyon grafiğı

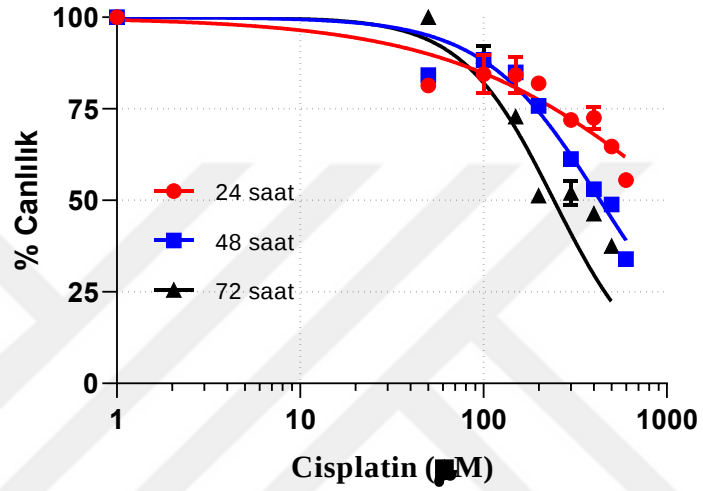
4.4. Calu-1 ve CR-Calul-1 Hücre Serilerinde Cisplatin IC₅₀ Dozlarının Belirlenmesi

Calu-1 hücre serisine 24, 48 ve 72 saat süreyle 2.5-80 μ M dozlarında cisplatin uygulamasının ardından cisplatinin Calu-1 hücre serisi üzerindeki 24. saat IC₅₀ dozu 83.49 μ M, 48. saat IC₅₀ dozu 69.66 μ M ve 72. saat IC₅₀ dozu 54.35 μ M olarak belirlendi (Şekil 16).



Şekil 16: Cisplatin uygulaması sonrası Calu-1 hücre serisi için 24., 48. ve 72. saat hücre canlılığı grafiğı

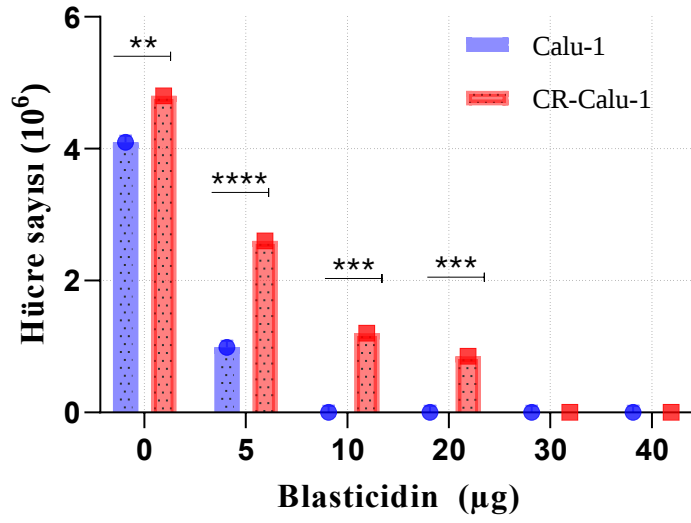
CR-Cal-1 hücre serisine 24, 48 ve 72 saat süreyle 25-400 μM dozlarında cisplatin uygulamasının ardından cisplatinin CR-Cal-1 hücre serisi üzerindeki 24. saat IC_{50} dozu 821.4 μM , 48. saat IC_{50} dozu 478.8 μM ve 72. saat IC_{50} dozu 347.1 μM olarak belirlendi (Şekil 17). Böylece, Calu-1 ve CR Calu-1 hücreleri arasında 24. saat IC_{50} dozlarına göre cisplatin direnç farkının 9.8-kat, 48. saat IC_{50} dozlarına göre 6.9-kat ve 72. saat IC_{50} dozlarına göre 6.3-kat olduğu görüldü.



Şekil 17: Cisplatin uygulaması sonrası CR-Cal-1 hücre serisi 24., 48. ve 72. saat hücre canlılığı grafiği

4.5. Hücrelerde Etkili Blastocidin Doz Analizi

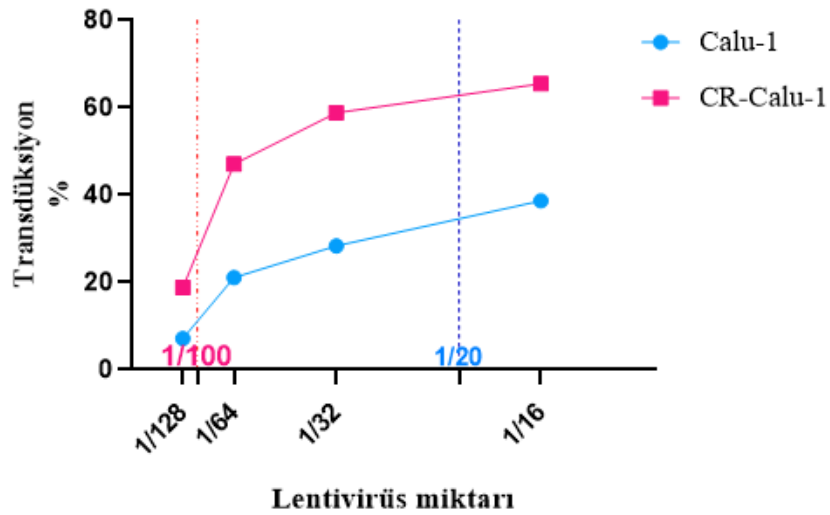
Calu-1 ve CR-Cal-1 hücrelerinin LentiCas9 Blast lentivirüsüyle taransfekte edilmesinin ardından Cas9 eksprese eden hücrelerin seçilimi blastocidin ile yapıldı. Enfeksiyondan önce hücrelere dokuz gün boyunca 5-40 μg blastocidin uygulandı. Normal hücreleri öldüren en düşük blastocidin dozu Calu-1 hücreleri için 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, CR-Cal-1 hücreleri için 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ olarak belirlendi (Şekil 18).



Şekil 18: Hücreleri öldüren en düşük blasticidin doz grafiği

4.6. LentiCas9 Blast Lentivirüs Titre Analizi

Hücrelerde Cas9 ekspresyonunu sağlamak amacıyla transfekte edecek LentiCas9 Blast lentivirüs miktarının belirlenmesi için lentivirüs titre analizi yapıldı. Kontrol grubuna göre transdüksiyon verimliliğinin %30'unu (MOI=0.3) sağlayan virüs miktarları Calu-1 hücreleri için 1/20, CR-Cal-1 hücreleri için 1/100 olarak belirlendi (Şekil 19).



Şekil 19: LentiCas9 Blast lentivirüs miktarına göre transdüksiyon yüzdeleri

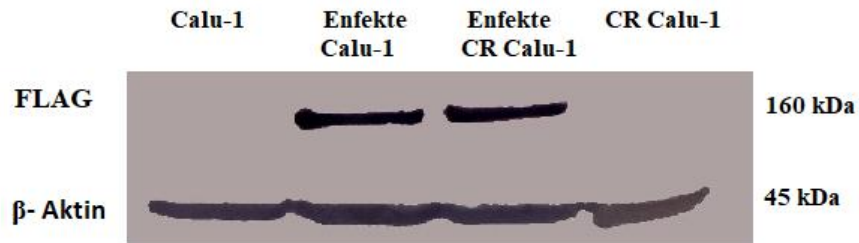
4.7. Hücrelerde Cas9 Protein Ekspresyon Analizi

Hücrelerin LentiCas9 Blast lentivirüsüyle transfeksiyonunun ardından Cas9 ekspresyonunun gösterilmesi için enfekte edilen ve edilmeyen Calu-1 ve CR-Cal-1 hücrelerinden izole edilen proteinler ile western blot analizi yapıldı. Proteinlerin konsantrasyonları BSA standartları ve Bradford solüsyonu kullanılarak belirlendi (Tablo 21).

Tablo 21: Calu-1 ve CR-Cal-1 hücre gruplarında belirlenen protein miktarları

Hücre Serileri	Protein konsantrasyonu (µg/ml)
LentiCas9 Blast Lentivirüsü ile enfekte edilen Calu-1	7,867
Enfekte edilmeyen Calu-1	7,736
LentiCas9 Blast Lentivirüsle enfekte edilen CR-Cal-1	8,076
Enfekte edilmeyen CR-Cal-1	3,957

LentiCas9 Blast lentivirüs plasmidinde lokalize olan FLAG etiketli Cas9 protein seviyelerinin belirlendiği western blot membran görüntüsü Şekil 20’de verildi. Enfekte olmayan hücreler ile karşılaştırıldığında LentiCas9 blast ile transfekte edilen Calu-1 ve CR-Cal-1 hücrelerinde Cas9 protein ekspresyonunun gerçekleştiği belirlendi.



Şekil 20: FLAG etiketli Cas9 protein ekspresyon değişiminin western blot analizi

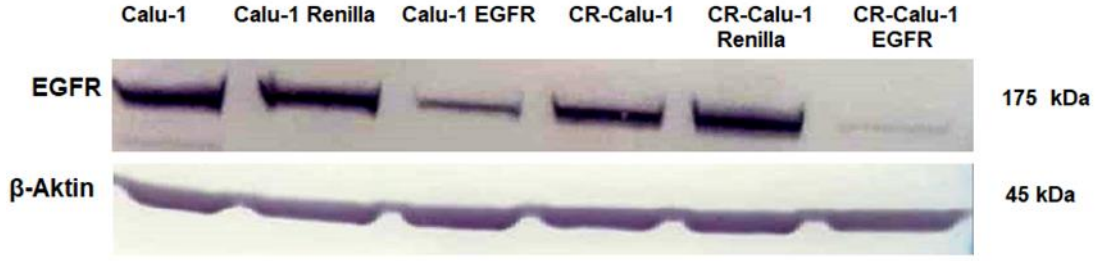
4.8. Hücrelerde Cas9 Fonksiyonelliğini Değerlendirme Analizleri

Calu-1 ve CR-Cal-1 hücrelerinde Cas9 ekspresyonunun gerçekleştirilmesinin ardından fonksiyonelliğini değerlendirmek için EGFR proteini analiz edildi. Calu-1 ve CR-Cal-1 hücrelerinin *Renilla* ve *EGFR* gRNA taşıyan lentivirüslerle transfeke edilmesinin ardından puromisin seçilimi yapıldı. Seçilimden on gün sonra hücrelerden western blot analizi için protein izolasyonu yapıldı. Ayrıca, Cas9 eksprese Calu-1 ve CR-Cal-1 hücrelerinden de protein izolasyonu yapılarak EGFR protein ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldı. Proteinlerin konsantrasyonları BSA standartları ve Bradford solüsyonu kullanılarak belirlendi (Tablo 22).

Tablo 22: Renilla ve EFGR lentivirüsleriyle enfekte Calu-1 ve CR-Cal-1 hücre gruplarında belirlenen protein miktarları

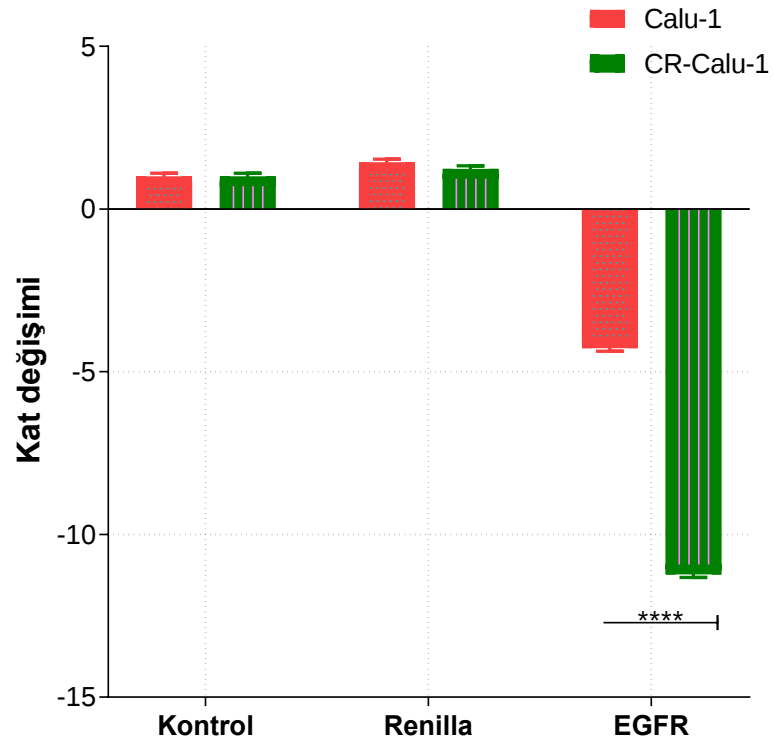
Hücre Serileri	Protein konsantrasyonu (mg/ml)
Renilla lentivirüs ile transfeke edilen Calu-1	2,823
EGFR lentivirüs ile transfeke edilen Calu-1	4,033
Renilla lentivirüs ile transfeke edilen CR-Cal-1	5,220
EGFR lentivirüsü ile transfeke edilen CR-Cal-1	7,530
Cas9 Eksprese eden Calu-1	7,867
Cas9 Eksprese eden CR-Cal-1	8,076

EGFR protein seviyelerinin belirlendiği western blot membran görüntüsü Şekil 21’de verildi.



Şekil 21: EGFR protein ekspresyon değişiminin western blot analizi

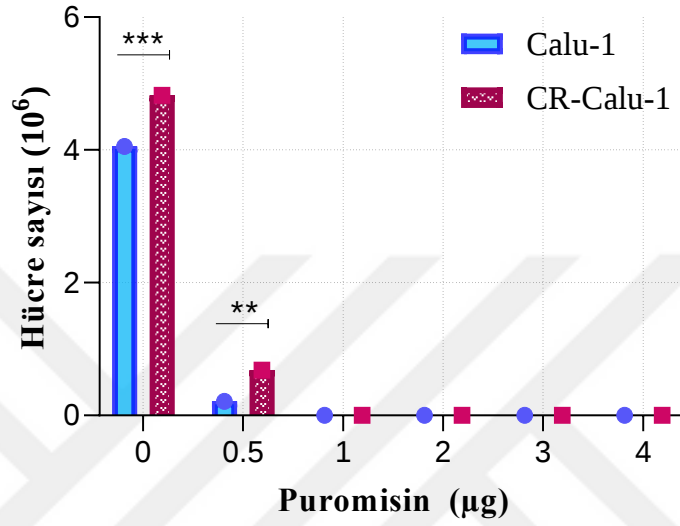
EGFR lentivirüsleriyle enfekte olan Calu-1 hücrelerinde EGFR ekspresyon seviyesinin *Renilla* ile enfekte edilen ve edilmeyen hücrelere göre 4.27-kat, CR-Cal-1 hücrelerinde 11.22-kat azaldığı belirlendi (Şekil 22). Bu azalış hücrelerde Cas9 proteinin fonksiyonel olduğunu göstermektedir.



Şekil 22: Cas9 eksprese Calu-1 ve CR-Cal-1 hücrelerinde EGFR protein ekspresyon kat değişim grafiği

4.9. Cas9 Eksprese Olan Hücrelerde Etkili Puromisin Doz Analizi

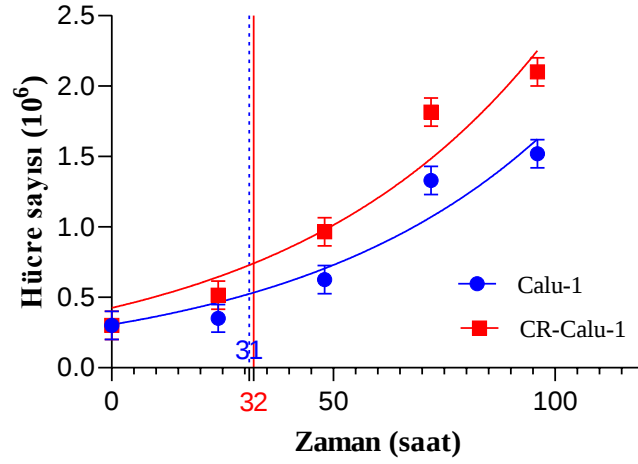
Cas9 eksprese olan Calu-1 ve CR-Calu-1 hücrelerinin Brunello kütüphanesini taşıyan lentivirüsle transfeksiyonu öncesinde hücreleri öldüren en düşük puromisin dozu belirlendi. *gRNA* eksprese eden hücrelerin seçilimi için gerekli en düşük puromisin dozu Calu-1 ve CR-Calu-1 hücreleri için 1 µg/ml olarak belirlendi (Şekil 23).



Şekil 23: Cas9 eksprese eden hücreleri öldüren en düşük puromisin doz analiz grafiği

4.10. Hücrelerde İkilenme Zamanı Analizi

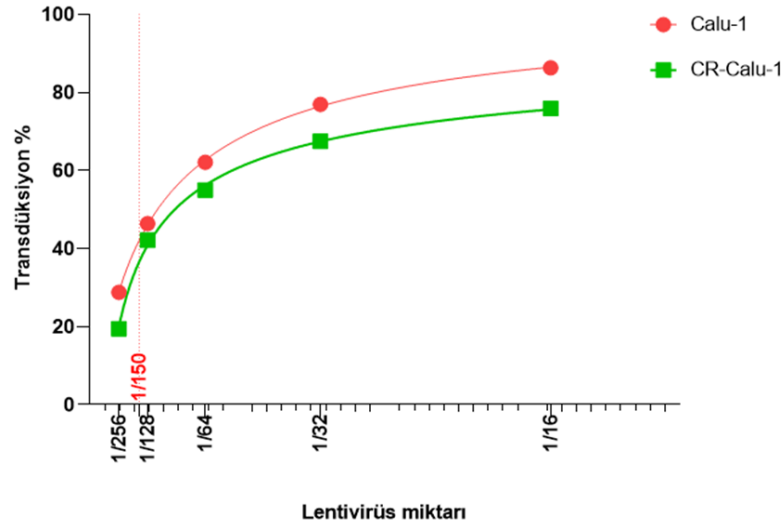
Brunello kütüphanesini taşıyan lentivirüslerle tarama çalışmasına başlamadan önce hücrelerin ikilenme zamanı belirlendi. İkilenme zamanı Cas9 eksprese olan Calu-1 hücreleri için 31 saat, Cas9 eksprese olan CR-Calu-1 hücreleri için 32 saat olarak belirlendi (Şekil 24). Buna göre tarama çalışmasında 72 saatte bir pasaj yapılmasına karar verildi.



Şekil 24: Cas9 eksprese hücrelerin ikilenme zamanı analiz grafiği

4.11. Brunello Kütüphanesini Taşıyan Lentiguide Puro Lentivirüs Titre Analizi

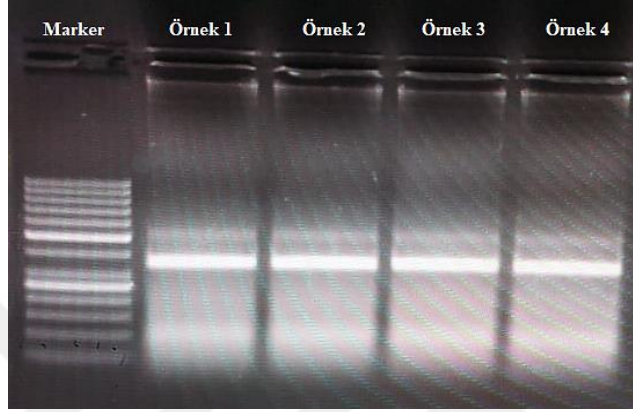
Cas9 eksprese olan hücreleri transdükte edecek uygun virüs miktarının belirlenmesi için MOI analizi yapıldı. Kontrol grubuna göre transdüksiyon verimliliğinin %30'unu (MOI=0.3) sağlayan virüs miktarları Cas9 eksprese Calu-1 ve CR-Cal-1 hücreleri için 1/150 olarak belirlendi (Şekil 25).



Şekil 25: LentiGuide Puro lentivirüs miktarına göre transdüksiyon yüzdeleri

4.12. Tarama Çalışmalarında gRNA Amplifikasyon Miktar Analizi

Tarama çalışmalarının sonunda cisplatin uygulanmış ve uygulanmamış hücre gruplarından DNA izolasyonu yapıldı. Her bir örnek P5 primer ve farklı P7 indeks primerler ile amplifiye edilerek etiketlendi. Amplifiye edilen her bir ürün %2'lik agaroz jelde yürütüldü ve 350 bp olan ürün jelden kesilerek izolasyon yapıldı (Şekil 26).



Şekil 26: gRNA amplifikasyonu ve etiketleme sonrası jel görüntüsü (Marker 100 bp)

Her bir örnek ampikon yeni nesil sekanslaması yaptırılmak üzere MacroGen Laboratuvarı'na gönderildi. MacroGen Laboratuvarı'nda her bir örnek için kalite kontrol (*quality control*, QC) analizi yapıldı. Her bir örneğin QC sonuçlarına göre miktarları Tablo 23'de verildi.

Tablo 23: Duyarlı ve dirençli hücre gruplarındaki QC analiz sonuçları

Kütüphane Adı	Konsantrasyon (ng/μl)	Konsantrasyon (nM)
Calu-T0	18.61	7.52
Calu-UT1	20.26	22.24
Calu-UT2	15.11	49.15
Calu-UT3	16.4	12.12
Calu-CIS1	19.81	27.58
Calu-CIS2	15.02	14.32
Calu-CIS3	12.16	6.48
CR-T0	113.18	8.21
CR-UT1	4.69	13.38
CR-UT2	14.56	12.21
CR-UT3	16.21	16.61
CR-CIS1	28.14	77.74
CR-CIS2	24.23	11.59
CR-CIS3	26.46	12.35

QC verilerine göre her bir örnek NGS yapılmaya uygun olduğu için tüm örnekler pool edilerek Illumina-HiSeq X cihazında sekanslama yaptırıldı. Kütüphanedeki her bir gRNA amplikonunun her bir ucundan 150 bç ve indeks için 8 bç okumalar yapılarak dizileme gerçekleştirildi. Yeni nesil dizileme okuma hatalarını azaltmak için %30 PhiX kontrol DNA kullanıldı.

4.13. Cisplatin Direncinden Sorumlu Aday Gen Analizleri

NGS sonucunda elde edilen toplam okuma sayıları, GC ve AT içerikleri, Q20 ve Q30 yüzdeleri Tablo 24’de verildi. Yüksek Q20 oranı 100’de bir hata payı olarak değerlendirilerek %99 dizileme doğruluğunu, yüksek Q30 oranı ise 1000’de bir hata payı olarak değerlendirilerek %99.9 dizileme doğruluğunu göstermektedir.

Tablo 24: Tarama çalışması yapılan 14 örneğin NGS sonuçları

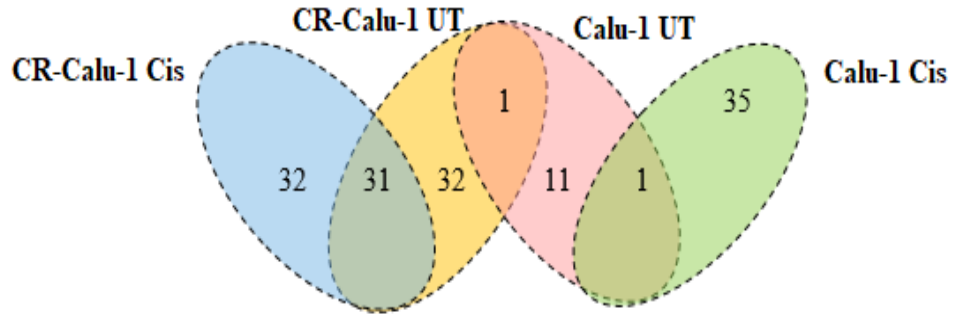
Kütüphane Adı	Toplam okunan bç	Toplam okuma sayısı	GC (%)	AT (%)	Q20 (%)	Q30 (%)
Calu-T0	4,222,383,706	27,962,806	44.18	55.82	92.39	85.05
Calu-UT1	3,733,515,770	24,725,270	43.36	56.64	92.93	85.15
Calu-UT2	3,477,102,066	23,027,166	43.28	56.72	93.42	86.0
Calu-UT3	4,414,023,846	29,231,946	43.96	56.04	92.31	85.02
Calu-CIS1	5,062,389,458	33,525,758	43.34	56.66	93.13	85.56
Calu-CIS2	6,547,226,818	43,359,118	43.51	56.49	92.74	85.0
Calu-CIS3	2,685,111,294	17,782,194	43.5	56.5	93.17	85.76
CR-T0	9,875,504,492	65,400,692	43.38	56.62	92.85	85.0
CR-UT1	18,656,894,694	123,555,594	43.47	56.53	92.84	85.01
CR-UT2	4,204,057,138	27,841,438	45.06	54.94	90.99	85.05
CR-UT3	2,928,288,942	19,392,642	44.34	55.66	92.36	85.02
CR-CIS1	2,424,825,346	16,058,446	44.05	55.95	92.32	85.03
CR-CIS2	3,295,716,034	21,825,934	44.01	55.99	92.25	85.0
CR-CIS3	4,006,957,744	26,536,144	44.07	55.93	92.32	85.05

Elde edilen okumalara göre yapılan biyoinformatik analizlerde her bir *gRNA*'nın skoru belirlenerek hücrelerdeki azalan ve artan *gRNA*'lar belirlendi. Her bir hücre grubu için azalan ve artan gen sayıları Tablo 25'de verildi.

Tablo 25: Duyarlı ve dirençli hücre gruplarındaki azalan ve artan gen sayıları

Hücre grubu	Artan Gen sayısı	Azalan Gen sayısı
Cisplatin uygulanmamış CR-Cal-1 hücre grubu	11	64
Cisplatin uygulanmış CR-Cal-1 hücre grubu	17	63
Cisplatin uygulanmamış Cal-1 hücre grubu	42	13
Cisplatin uygulanmış Cal-1 hücre grubu	39	36

CR-Calı-1 hücresinde cisplatin tedavisi sonrası ilgili genin hedeflediği *gRNA* miktarının azalması bu genin cisplatin direncinden sorumlu olduğu anlamına gelmektedir. Bu yüzden validasyon çalışmaları için azalan genler arasından aday genler belirlendi. Aday genler belirlenirken kat değışimi olan $\log_2 < -2$ ve $p < 0.05$ oranları dikkate alındı. Daha sonra aday gen listesinden esansiyel genler çıkartıldı. Azalan aday genlerin hücre grupları arasında karşılaştırılması yapıldı (Şekil 27).



Şekil 27: Duyarlı ve dirençli hücre gruplarında azalan genler arasından belirlenen ve ortak olan aday gen sayıları (Cis: Cisplatin tedavisi uygulanmış hücre grubu, UT; cisplatin tedavisi uygulanmamış hücre grubu)

Calı-1 ve CR-Calı-1 hücre gruplarında aday genler belirlendikten sonra bu genlerin hangi biyolojik yollarla ilişkili olduğu belirlendi (Tablo 26).

Tablo 26: Aday genlerin rol oynadığı biyolojik yollar

BİYOLOJİK YOLAK	HÜCRE GRUBU			
	CR-Calu-1 Cis	CR-Calu-1 UT	Calu-1 UT	Calu-1 Cis
Hücre Döngüsü	6	2	2	1
Protein veya Lipid Metabolizması	8	13		6
Vezikül, protein, iyon veya diğer maddelerin Transportu	9	6	4	7
DNA Tamiri	4	5	1	1
mRNA Splicing	6	3	1	3
Hücre Hareketi	2	1		
Gen Ekspresyonu	10	10	1	3
RNA İşlenmesi	5	10	2	
Kromatin Organizasyonu veya Epigenetik	5	6		2
Apoptoz	2	1		5
Protein Katlanması veya Modifikasyonu	2	4	1	1
RNA Interferans		1		
İmmün Sistem				3
Anjiogenez				1
MAPK Sinyal Yolağı veya Sinyal İletimi			1	1
Fonksiyonu Bilinmeyen	4	2		2

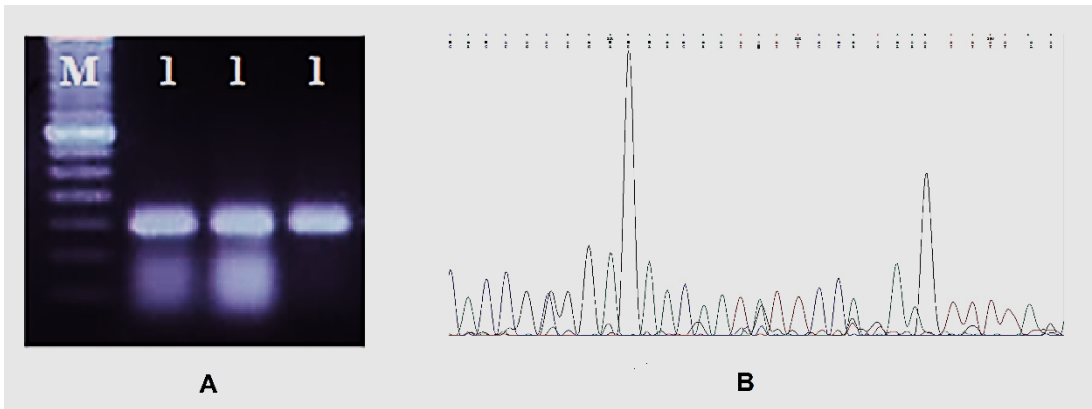
4.14. Validasyon için Seçilen *GPR89A* gRNA'sının LentiCRISPR V2 Plazmidine Klonlamasının Doğrulama Analizleri

GPR89A aday geninin cisplatin direnciyle ilişkili olup olmadığının değerlendirilmesi için validasyon çalışmaları yapıldı. Öncelikle ilgili genin gRNA'sı gen skor seviyelerine göre Brunello kütüphanesinden seçildi. Seçilen gRNA LentiCRISPR V2 plazmidine klonlandı (Şekil 28).



Şekil 28: *GPR89A* gRNA'sının LentiCRISPR V2 plazmidine klonlanmasının ardından oluşan koloni görüntüleri

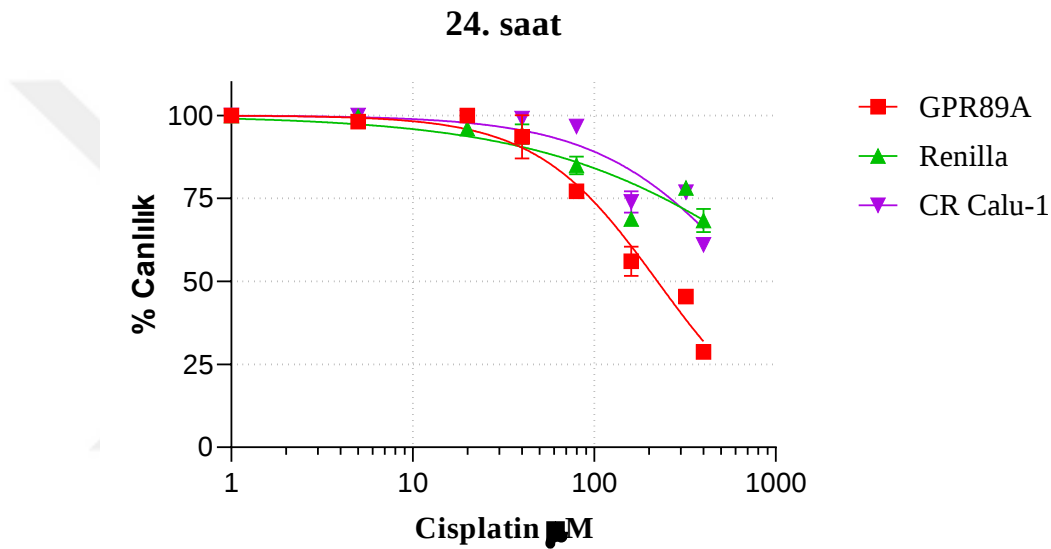
Klonlamanın doğrulanması için hU6 (GAGGGCCTATTTCCCATGATT CC) primeri kullanılarak her bir klonlanmış plakadan 3 koloni alınıp koloni PCR gerçekleştirildi. Koloni PCR sonuçlarına göre gRNA'nın plazmide klonlandığı görüldü. Sanger sonuçlarına göre ise *GPR89A* genine ait gRNA dizisinin doğru bir şekilde klonlandığı dizide klonlama esnasında herhangi bir değişikliğin olmadığı belirlendi (Şekil 29).



Şekil 29: Koloni PCR ve Sanger Sekanslama Sonuçları

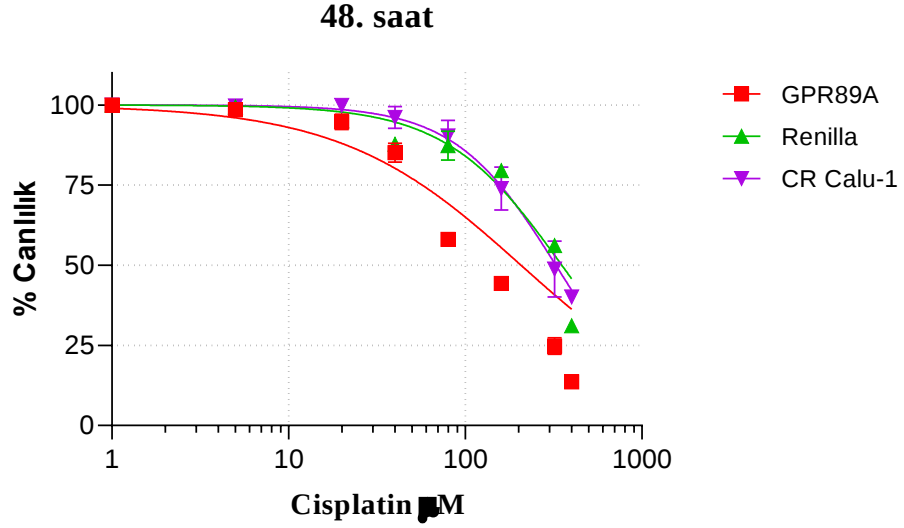
4.15. *GPR89A* Knockout Calu-1 ve CR-Calul-1 Hücreserilerinde Cisplatin IC₅₀ Dozlarının Belirlenmesi

Knock-out edilmiş CR-Calul-1 hücre serilerine 24 saat süreyle 5-400 µM konsantrasyonlarında cisplatin tedavisi uygulanmasının ardından cisplatinin CR-Calul-1 hücre serisi üzerindeki IC₅₀ dozu 750.9 µM, *GPR89A* geni knock-out CR-Calul-1 hücre serisi üzerindeki IC₅₀ dozu 235.7 µM, ve *Renilla* lentivirüsüyle transfekte edilen CR-Calul-1 hücre serisi üzerindeki IC₅₀ dozu 743.5 µM olarak belirlendi. 24. Saat IC₅₀ sonuçlarına göre *GPR89A* geninin knockout edilmesinin CR-Calul-1 hücresine göre cisplatin duyarlılığını 3.2-kat artırdığı belirlendi (Şekil 30).



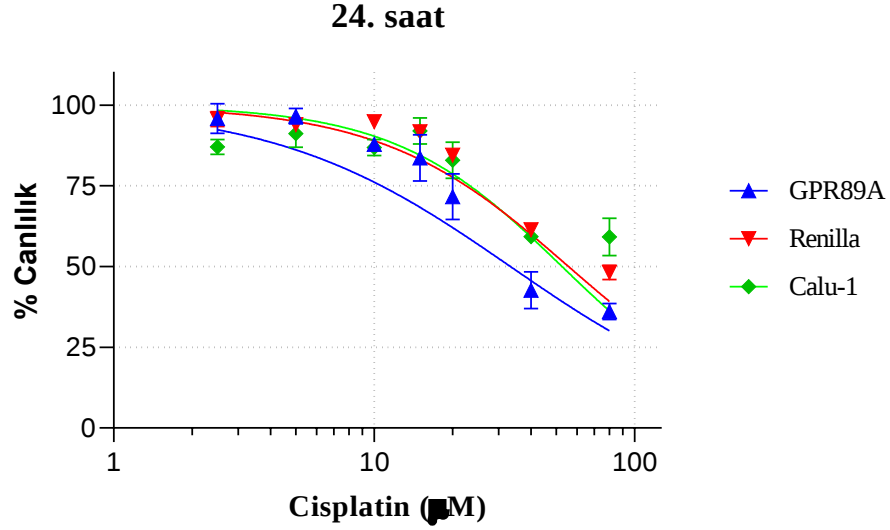
Şekil 30: Cisplatin uygulaması sonrası *GPR89A* knockout, *Renilla* transfekte ve CR Calu-1 hücre serisi 24. saat hücre canlılığı grafiğı

Knock-out edilmiş CR-Calul-1 hücre serilerine 48 saat süreyle 5-400 µM konsantrasyonlarında cisplatin tedavisi uygulanmasının ardından cisplatinin CR-Calul-1 hücre serisi üzerindeki IC₅₀ dozu 364.4 µM, *GPR89A* geni knockout CR-Calul-1 hücre serisi üzerindeki IC₅₀ dozu 123.8 µM ve *Renilla* lentivirüsüyle transfekte edilen CR-Calul-1 hücre serisi üzerindeki IC₅₀ dozu 352 µM olarak belirlendi. 48. Saat IC₅₀ sonuçlarına göre *GPR89A* geninin knock-out edilmesinin CR Calu-1 hücresine göre cisplatin duyarlılığını ~3-kat artırdığı belirlendi (Şekil 31).



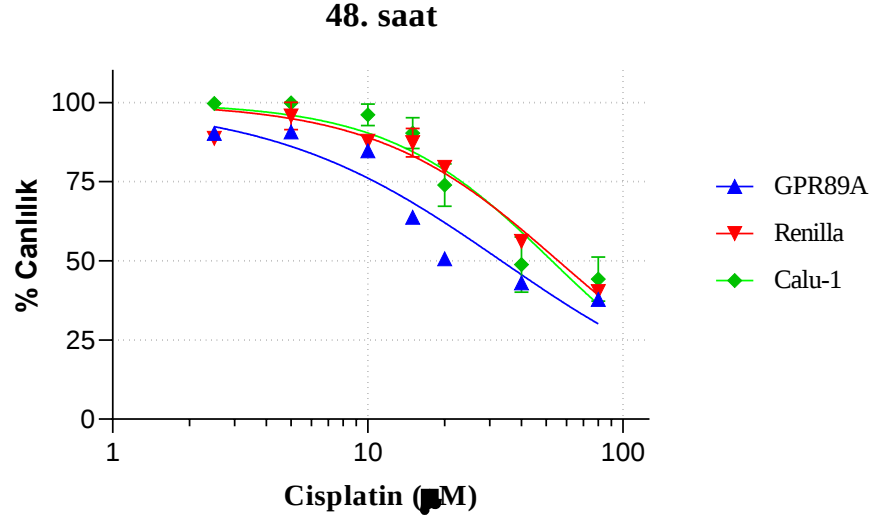
Şekil 31: Cisplatin uygulaması sonrası GPR89A knock-out, Renilla transfeke ve CR-Cal-1 hücre serisi 48. saat hücre canlılığı grafiğı

Aynı genlerin duyarlı Calu-1 hücre serisinde knock-out edilmesinin ardından cisplatin duyarlılığına etkisini belirlemek için yapılan sitotoksisite analizinde, 24 saat süreyle 2.5-80 μM konsantrasyonlarında cisplatin tedavisi uygulanmasının ardından cisplatinin *GPR89A* geni knockout Calu-1 hücre serisi üzerindeki IC_{50} dozu 47.12 μM , *Renilla* lentivirüsüyle transfeke edilen Calu-1 hücre serisi üzerindeki IC_{50} dozu 82.75 μM , Calu-1 hücre serisi üzerindeki IC_{50} dozu 87.78 μM olarak belirlendi. 24. saat IC_{50} sonuçlarına göre *GPR89A* geninin knock-out edilmesinin Calu-1 hücrelerine göre cisplatin 1.8-kat artırdığı belirlendi (Şekil 32).



Şekil 32: Cisplatin uygulaması sonrası GPR89A knock-out, Renilla transfekte ve Calu-1 hücre serisi 24. saat hücre canlılığı grafiği

Knock-out edilmiş Calu-1 hücre serilerine 48 saat süreyle 2.5-80 μM konsantrasyonlarında cisplatin tedavisi uygulanmasının ardından cisplatinin *GPR89A* geni knock-out Calu-1 hücre serisi üzerindeki IC_{50} dozu 31 μM , *Renilla* lentivirüsüyle transfekte edilen Calu-1 hücre serisi üzerindeki IC_{50} dozu 62.04 μM ve Calu-1 hücre serisi üzerindeki IC_{50} dozu 63.06 olarak belirlendi. 48. saat IC_{50} sonuçlarına göre *GPR89A* geninin knock-out edilmesinin Calu-1 hücrelerine göre cisplatin duyarlılığını ~2-kat artırdığı belirlendi (Şekil 33).

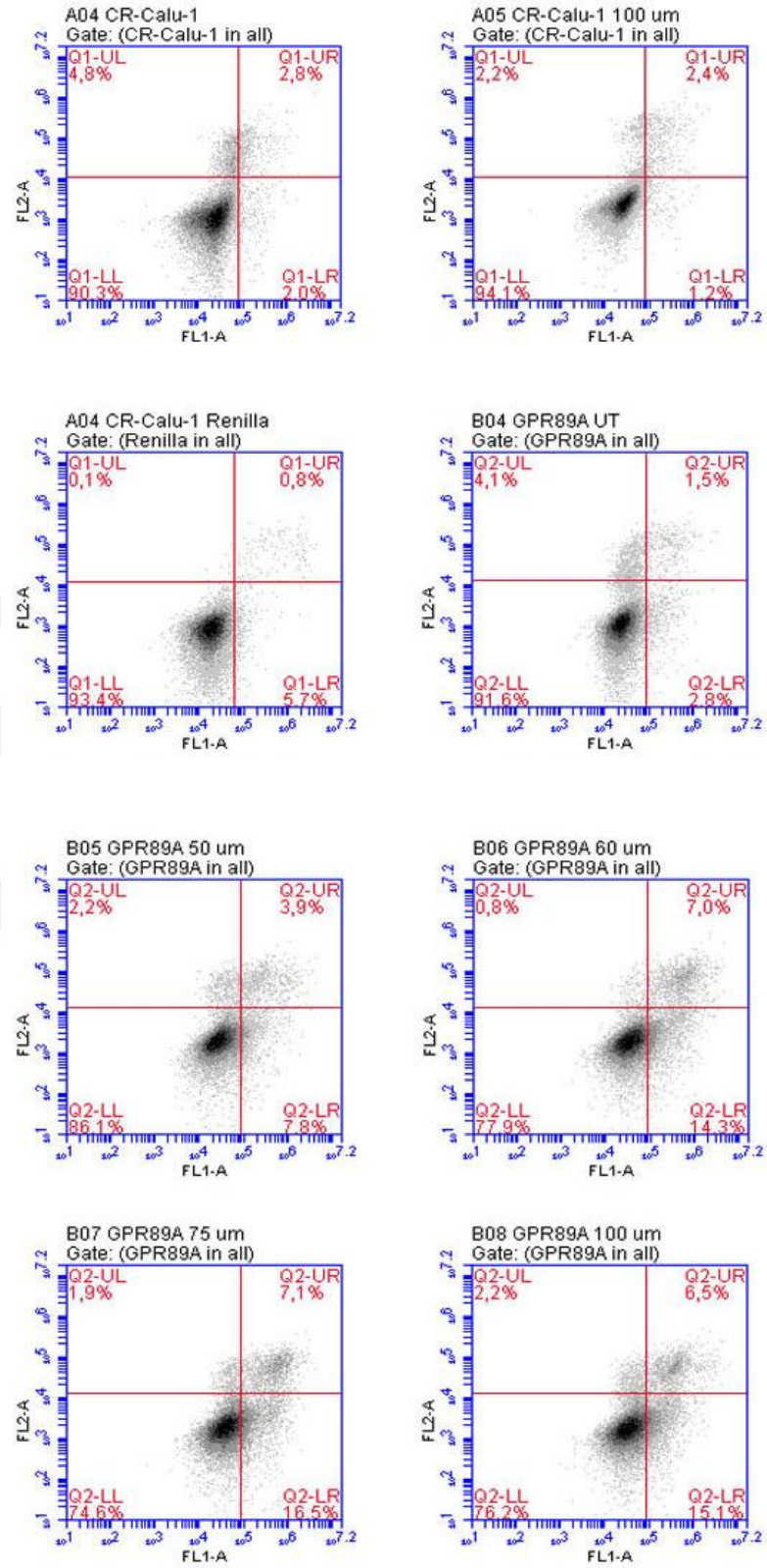


Şekil 33: Cisplatin uygulaması sonrası GPR89A knock-out, Renilla transfekte ve Calu-1 hücre serisi 48. saat hücre canlılığı grafiği

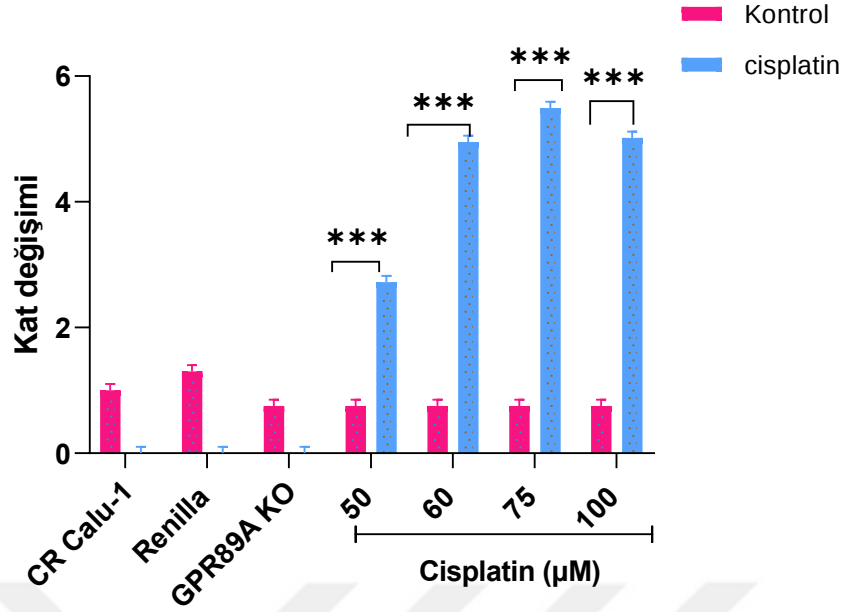
4.16. Cisplatin'in GPR89A Knockout CR-Cal-1 Hücre Serilerinde Apoptoz Üzerine Etkileri

4.16.1. Anneksin V yöntemi ile apoptoz analiz bulguları

GPR89A knock-out hücrede cisplatinin IC₅₀ dozunun 123.8 µM olmasına rağmen daha düşük konsantrasyonlarda uygulanan cisplatinin hücreler üzerindeki apoptotik etkisini belirlemek için Annexin V-FITC analizi yapıldı. GPR89A knock-out hücre serisine cisplatin'in 50, 60, 75 ve 100 µM dozları ile CR Calu-1 hücre serisine 100 µM dozu 48 saat süre ile uygulandı. İlaç verilmeyen CR-Cal-1, Renilla enfekte ve cisplatin uygulanmayan GPR89A knock-out hücreleri kontrol grubu olarak değerlendirildi. GPR89A knock-out hücrenin apoptoz oranı CR Calu-1 hücresiyle karşılaştırıldığında %4.3, Renilla enfekte hücrenin %6.3, 100 µM cisplatin uygulanan CR-Cal-1 hücresinin %3.6 olup apoptoz oranları açısından anlamlı bir farklılık görülmedi ($p>0.05$). Böylece CR-Cal-1 hücresinin 100 µM cisplatine dirençli olduğu belirlendi. 50 µM cisplatin uygulanan hücrenin ilaç uygulanmayan kontrole göre apoptotik hücre oranının 2.72-kat, 60 µM cisplatin uygulanan hücrenin 4.95-kat, 75 µM cisplatin uygulanan hücrenin 5.49-kat, 100 µM cisplatin uygulanan hücrenin 5.02-kat arttığı belirlendi (Şekil 34-35).



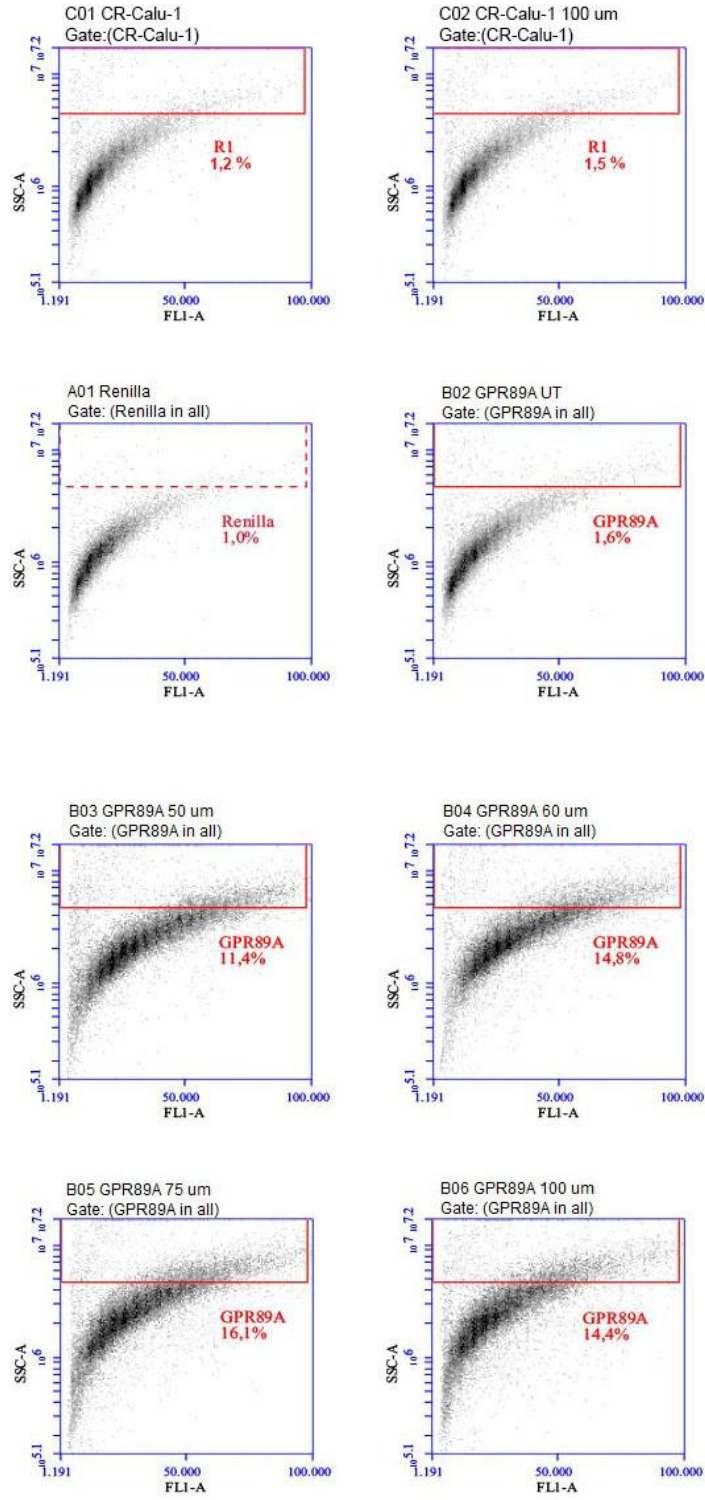
Şekil 34: Anneksin V yöntemine göre CR-Calu-1, Renilla, GPR89A knock-out ve cisplatin uygulanmış knock-out hücre serileri üzerindeki apoptotik etkileri gösteren akım sitometri görüntüleri (LL: canlı hücre yüzde; LR: erken apoptotik hücre; UR: geç apoptotik hücre)



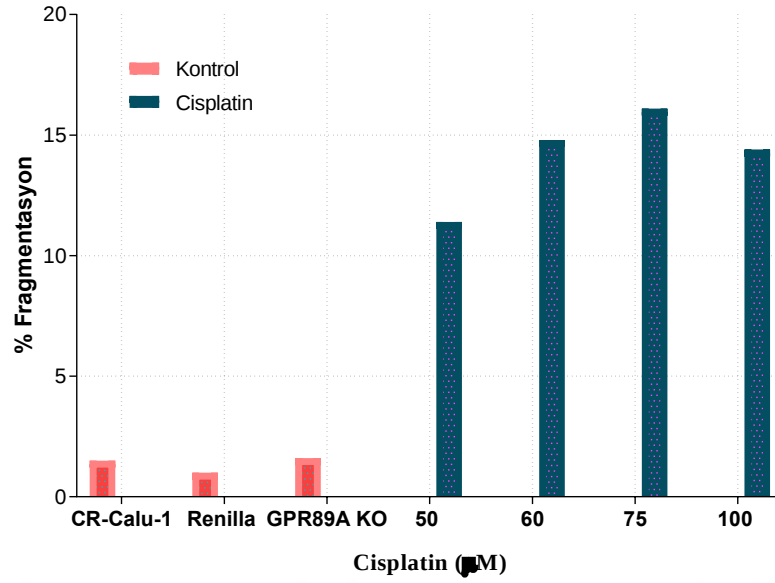
Şekil 35: CR-Calu-1, Renilla, GPR89A knock-out ve cisplatin uygulanmış knock-out hücre serilerinde Anneksin V yöntemine göre apoptotik etkilerini gösteren apoptotik kat değişim grafiği

4.16.2. TUNEL yöntemi ile apoptoz analiz bulguları

GPR89A knock-out hücrelerde cisplatinin IC_{50} dozunun $123.8 \mu M$ olmasına rağmen daha düşük konsantrasyonlarda uygulanan cisplatinin hücreler üzerindeki geç apoptotik belirtisi olan DNA fragmentasyonunu belirlemek için TUNEL analizi yapıldı. Cisplatin'in 50, 60, 75 ve $100 \mu M$ dozları ile CR Calu-1 hücre serisine $100 \mu M$ dozu 48 saat süre ile uygulandı. CR-Calu-1, *Renilla* enfekte ve cisplatin uygulanmayan *GPR89A* knock-out hücreleri kontrol grubu olarak değerlendirildi. Kontrol grupları birbiriyle karşılaştırıldığında *GPR89A* knock-out hücrenin DNA fragmentasyon yüzdesi CR Calu-1 hücresiyle karşılaştırıldığında %1.6, $100 \mu M$ cisplatin uygulanan CR Calu-1 hücresinin %1.5 olup anlamlı bir farklılık görülmedi ($p > 0.05$). Ayrıca $50 \mu M$ cisplatin uygulanan hücrenin ilaç uygulanmayan *GPR89A* knock-out hücreye göre DNA fragmentasyon yüzdesi 11.4 -kat, $60 \mu M$ cisplatin uygulanan hücrenin 14.8-kat, $75 \mu M$ cisplatin uygulanan hücrenin 16.1-kat, $100 \mu M$ cisplatin uygulanan hücrenin 14.4-kat arttığı belirlendi (Şekil 36-37).



Şekil 36: TUNEL yöntemine göre CR-Calu-1, Renilla, GPR89A knock-out ve cisplatin uygulanmış knock-out hücre serileri üzerindeki apoptotik etkilerini gösteren akım sitometri görüntüleri



Şekil 37: CR-Calu-1, Renilla, GPR89A knock-out ve cisplatin uygulanmış knock-out hücre serilerinde TUNEL yöntemine göre apoptotik etkilerini gösteren DNA fragmentasyon değişim grafiği

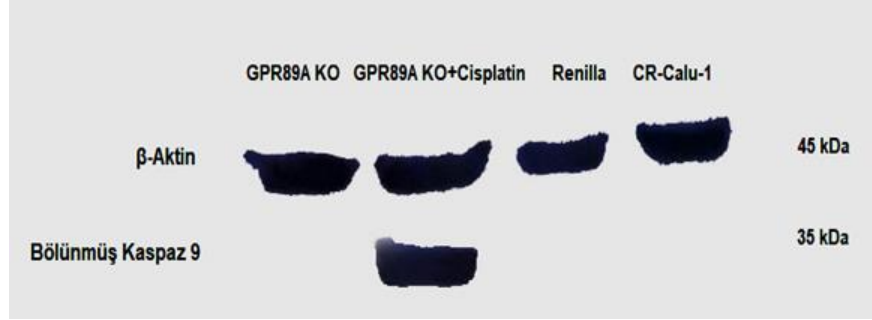
4.16.3. Kesilmiş (Cleaved) Kaspaz 9 Protein Seviyesinin Miktar Analizi

GPR89A knock-out hücrenin 100 μ M (IC_{50}) cisplatin tedavisinden sonra apoptotik sinyal yolağının aktifleştüğünün belirlenebilmesi için kesilmiş Kaspaz 9 protein miktarı belirlendi. CR-Calu-1, *Renilla* enfekte ve cisplatin uygulanmayan *GPR89A* knock-out hücreler kontrol grubu olarak değerlendirildi. Tüm hücre gruplarından izole edilen proteinler ile western blot analizi yapıldı. Proteinlerin konsantrasyonları BSA standartları ve Bradford solüsyonu kullanılarak belirlendi (Tablo 27).

Tablo 27: CR-Calu-1, Renilla ve GPR89A knock-out hücrelerde belirlenen protein miktarları

Hücre Serileri	Protein konsantrasyonu (μ g/ml)
CR-Calu-1	5.153
<i>Renilla</i> lentivirüs ile transfekte edilen Calu-1	3.234
<i>GPR89A</i> knock-out	2.980
<i>GPR89A</i> knockout+100 μ M cisplatin	2.149

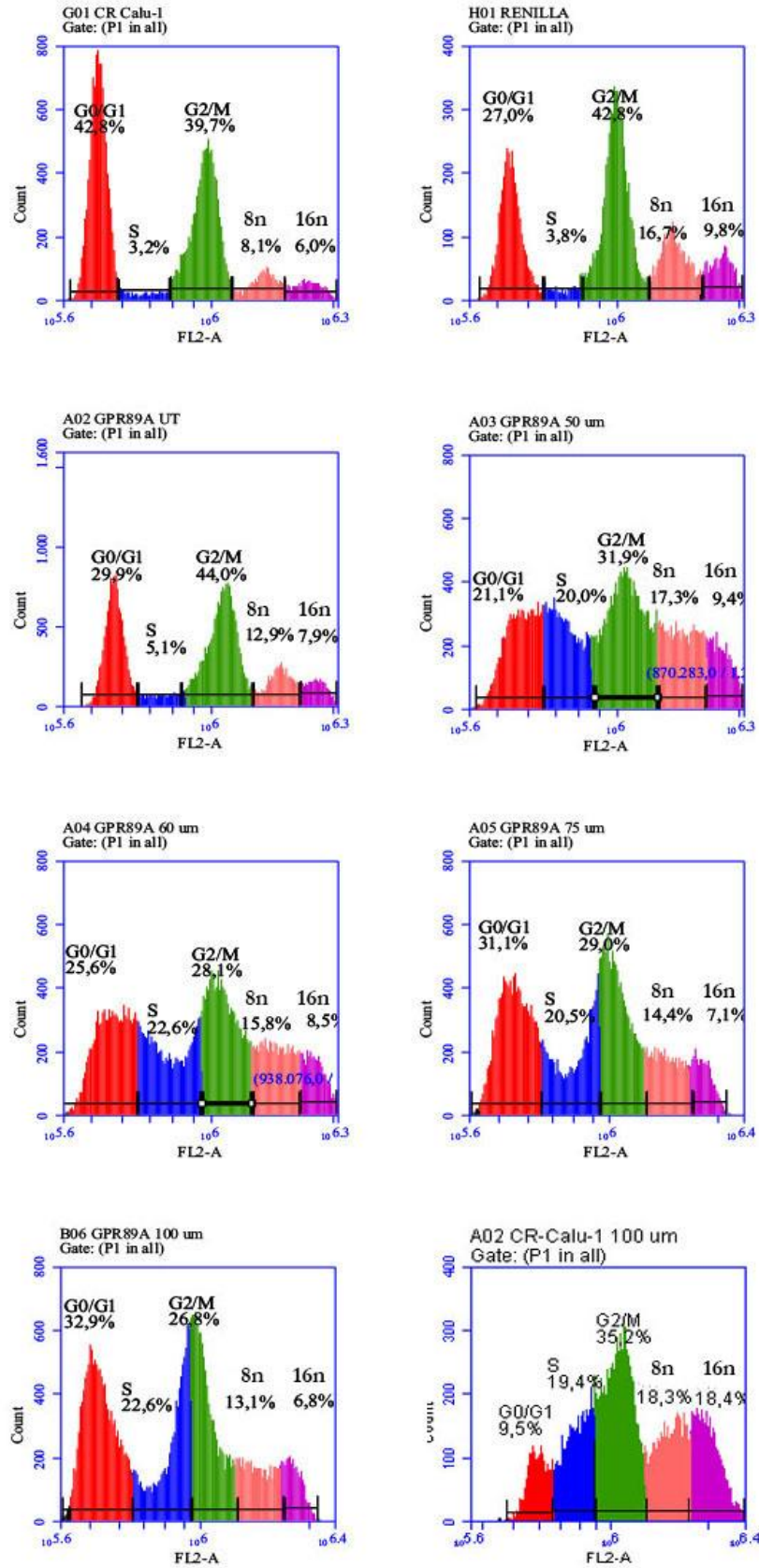
Hücre gruplarında kesilmiş Kaspaz 9 protein seviyesinin belirlendiği Western Blot membran görüntüsü Şekil 38’de verildi. Sadece cisplatin uygulanmış *GPR89A* knock-out hücrede kesilmiş Kaspaz 9 proteinin olması, apoptotik sinyal yolağının aktif olduğunu ve hücrenin apoptoza gittiğini göstermektedir.



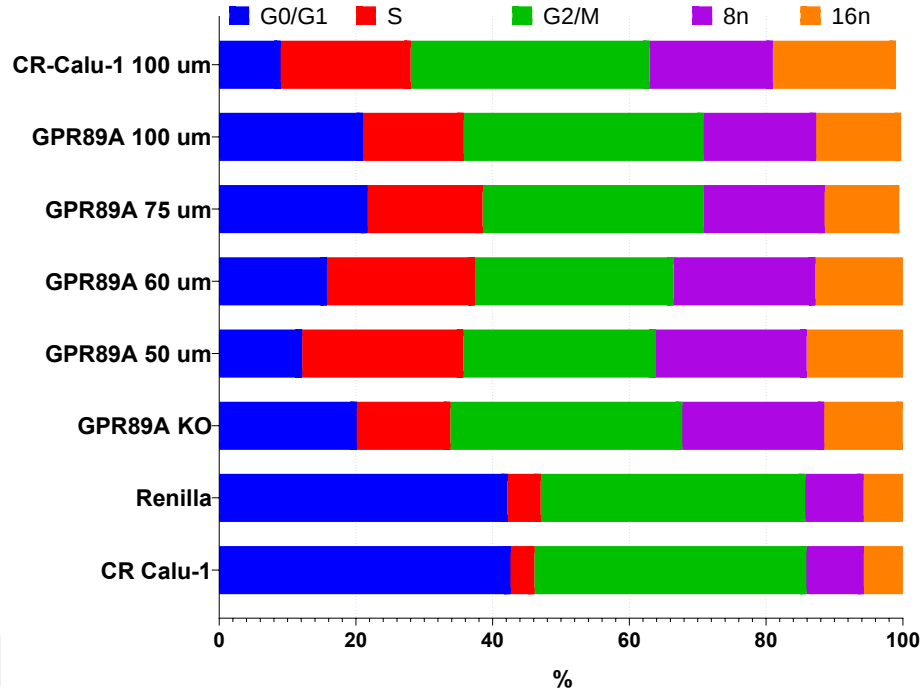
Şekil 38: Hücrelerdeki kesilmiş Kaspaz 9 protein ekspresyon değişiminin western blot analizi

4.17. Cisplatin’in *GPR89A* Knock-out CR-Cal-1 Hücre Serilerinde Hücre Döngüsü Üzerine Etkileri

GPR89A knock-out hücrede cisplatinin IC₅₀ dozunun 123.8 µM olmasına rağmen daha düşük konsantrasyonlarda uygulanan cisplatinin hücre döngüsü üzerindeki etkisini belirlemek için hücre döngüsü analizi yapıldı. *GPR89A* knock-out hücre serisine cisplatinin 50, 60, 75 ve 100 µM dozları CR Calu-1 hücrelerine de 100 µM cisplatin dozu 48 saat süre ile uygulandı. *Renilla* enfekte ve cisplatin uygulanmayan *GPR89A* knockout hücreleri kontrol grubu olarak değerlendirildi. Yapılan hücre döngüsü analizine göre tüm hücre gruplarında poliploidi tespit edildi. CR Calu-1 hücrelerinde %39.7 olan G2/M evresi hücrelerinin *GPR89A* knock-out hücrelerde %44’e yükseldiği belirlendi. Böylece knock-out edilen *GPR89A* geninin G2/M evresinde durdurucu etkisinin olduğu ve poliploidiyi artırdığı görüldü ($p<0.001$). Ayrıca cisplatinin *GPR89A* knock-out hücrede ve 100 µM cisplatin uygulanmış CR Calu-1 hücrelerinde hücre döngüsünü S evresinde durdurarak mitotik katastrofa neden olduğu tespit edildi (Şekil 39-40).



Şekil 39: CR-Cal-1, Renilla, GPR89A knock-out ve cisplatin uygulanmış knock-out hücre serilerinde hücre döngüsü üzerine etkilerini gösteren akım sitometri görüntüleri

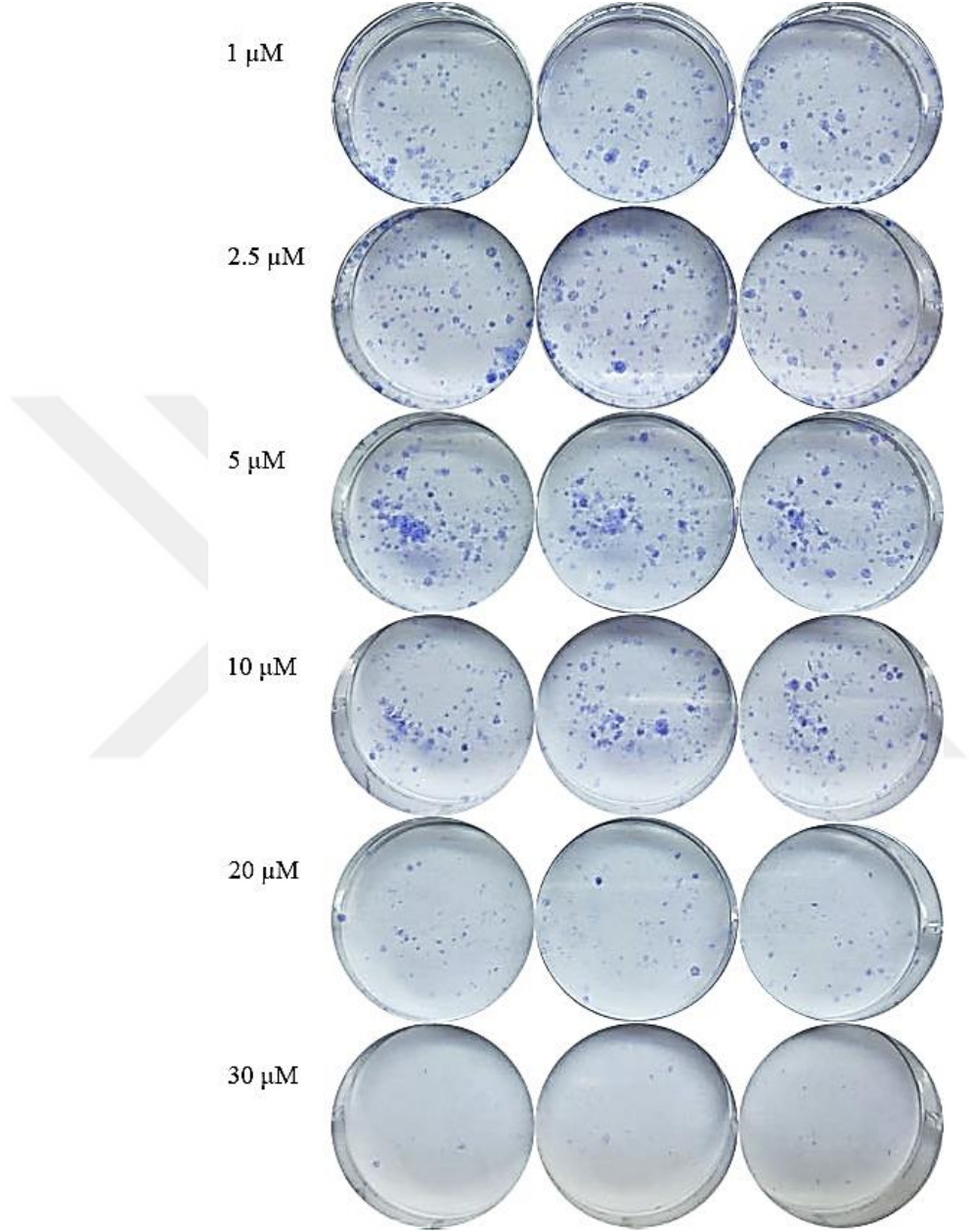


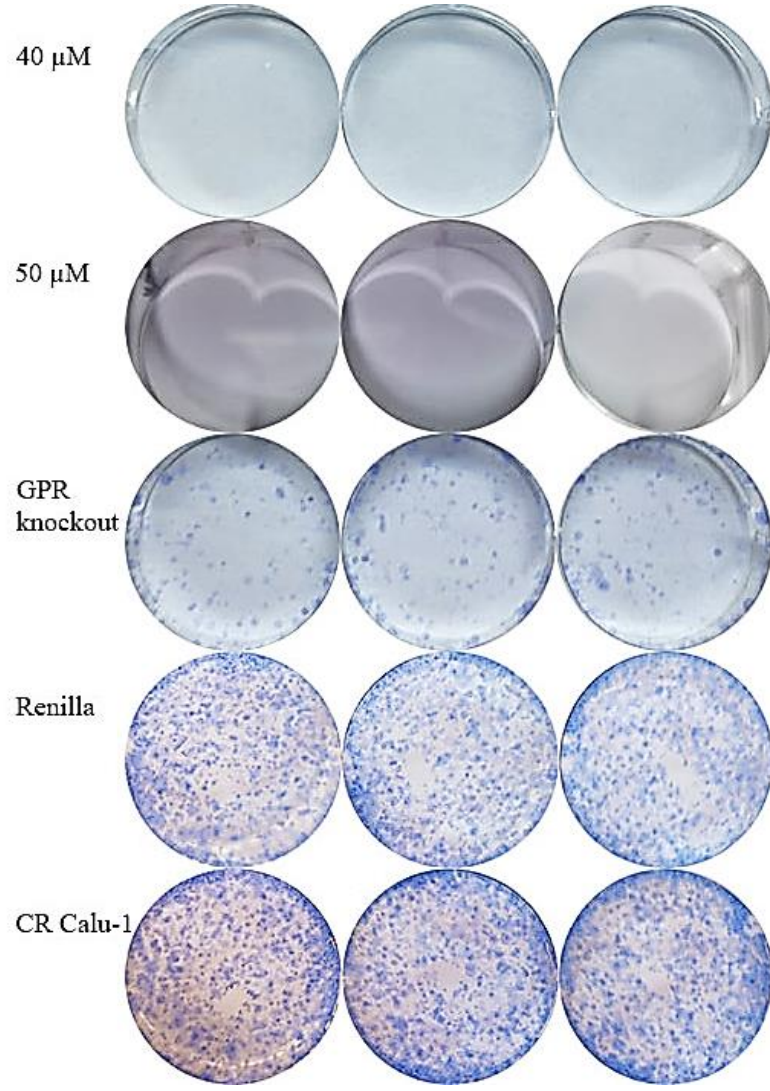
Şekil 40: CR-Calu-1, Renilla, GPR89A knock-out ve cisplatinin GPR89A knock-out hücre serilerinde etkilediği hücre döngüsü evre yüzdeleri

4.18. Cisplatin'in GPR89A Knock-out CR-Calu-1 Hücre Serilerinde Koloni Oluşumu Üzerine Etkisi

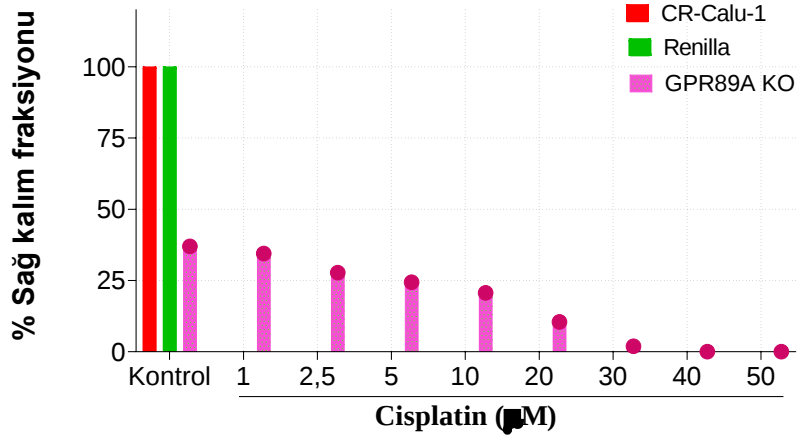
GPR89A knock-out hücrede cisplatin IC₅₀ dozunun 123.8 µM olmasına rağmen daha düşük konsantrasyonlarda uygulanan cisplatinin hücreler üzerindeki koloni oluşumu üzerine etkisini belirlemek için klonojenik analiz yapıldı. GPR89A knock-out hücre serisine cisplatinin 1, 2.5, 5, 10, 20, 30, 40, 50 µM dozları 48 saat süre ile uygulandı. CR Calu-1, Renilla enfekte ve cisplatin uygulanmayan GPR89A knock-out hücreleri kontrol grubu olarak değerlendirildi. GPR89A knock-out hücre serisi için sağkalım fraksiyonu (SF) Renilla enfekte ve CR Calu-1 kontrol hücre grubuna göre anlamlı olarak %37 bulundu ($p < 0,0001$) ve böylece hücrede GPR89A geninin knock-out edilmesinin koloni oluşumunu inhibe ettiği tespit edildi. GPR89A knock-out hücre serisi için 48 saatlik 1 µM cisplatin dozunun uygulaması sonrası sağkalım fraksiyonu, CR Calu-1 kontrol hücre grubuna göre %34.5, 2.5 µM cisplatin dozunun sağkalım fraksiyonu %27.8, 5 µM cisplatin dozunun sağkalım fraksiyonu %24.3 µM, 10 µM cisplatin dozunun sağkalım fraksiyonu %20.6, 20 µM cisplatin dozunun sağkalım fraksiyonu %10.4, 30 µM cisplatin dozunun sağkalım fraksiyonu %1.9, 40 ve 50 µM cisplatin dozunun sağkalım fraksiyonu %0 olduğu bulundu ($p < 0,0001$). Böylece

GPR89A knock-out hücre serisinde 1 μ M ve sonraki artan cisplatin dozlarının koloni oluşumunu inhibe ettiği belirlendi (Şekil 41-42).





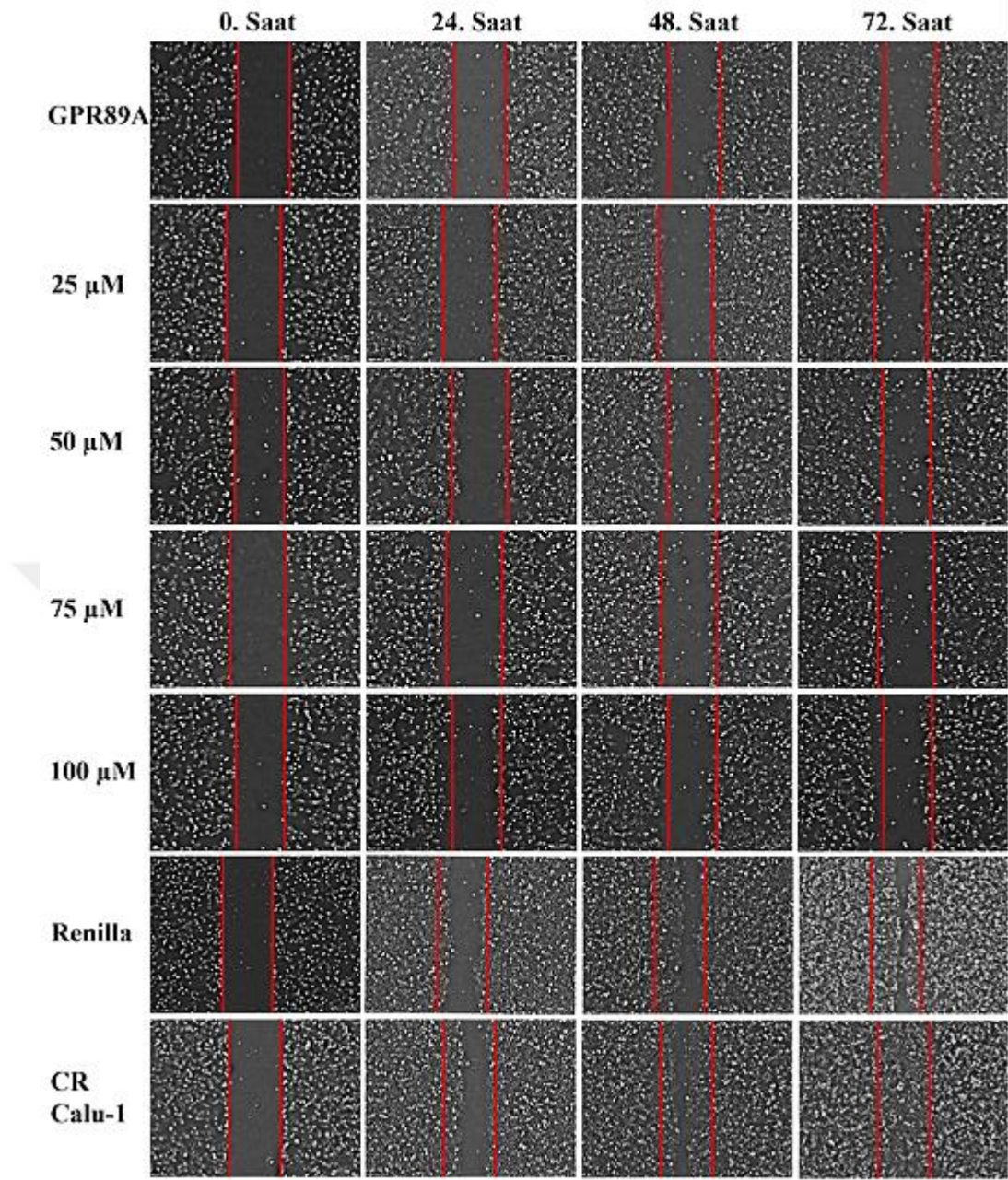
Şekil 41: CR Calu-1, Renilla, GPR89A knock-out ve cisplatin doz gruplarında koloni oluşumu



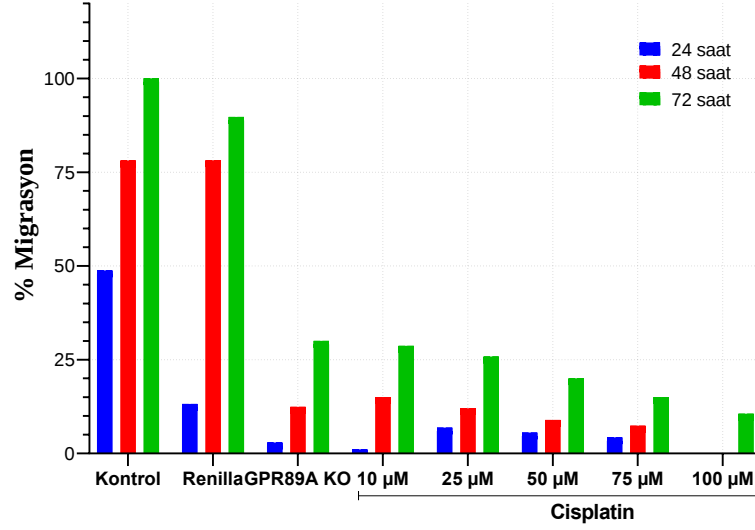
Şekil 42: GPR89A knock-out hücre serisine cisplatin uygulaması ile oluşan koloni sağkalım fraksiyon grafiği

4.19. Cisplatin'in *GPR89A* Knock-out CR-Cal-1 Hücre Serilerinde Migrasyon Üzerine Etkisi

GPR89A knock-out hücrede cisplatinin IC_{50} dozunun $123.8 \mu M$ olmasına rağmen daha düşük konsantrasyonlarda uygulanan cisplatinin migrasyon üzerindeki etkisini belirlemek için yara iyileşmesi analizi yapıldı *GPR89A* knock-out hücre serisine cisplatinin 25, 50, 75 ve $100 \mu M$ dozları uygulandı. CR Calu-1, *Renilla* enfekte ve cisplatin uygulanmayan *GPR89A* knock-out hücreleri kontrol grubu olarak değerlendirildi. CR Calu-1 hücreleri 72. saatte tam kapanmasına rağmen diğer tüm hücrelerde kapanma olmadı. 72. saatte CR Calu-1 hücrelerine göre *Renilla* enfekte hücrelerde migrasyon oranının %90 olduğu ve aralarında anlamlı bir farklılığın olmadığı belirlendi ($p > 0.05$). *GPR89A* knock-out hücrede 72. saat migrasyon oranının %30, 25 μM cisplatin uygulanmış hücrede %25, 50 μM cisplatin uygulanmış hücrede %20, 75 μM cisplatin uygulanmış hücrede %15 ve 100 μM cisplatin uygulanmış hücrede %10 olduğu belirlendi. Böylece cisplatin tedavisi yapılmaksızın *GPR89A* geninin knock-out edilmesinin migrasyonu inhibe ettiği ve cisplatinle birlikte sinerjistik etki gösterdiği belirlendi (Şekil 43-44).



Şekil 43: CR-Calul-1, Renilla, GPR89A knock-out ve cisplatin uygulanmış hücrelerde ışık mikroskobu migrasyon görüntüleri



Şekil 44: CR-Cal-1, Renilla enfekte ve GPR89A knock-out ve cisplatin uygulanmış hücrelerde migrasyon oranları ($p<0.0001$)

4.20. Cisplatin'in *GPR89A* Knock-out CR-Cal-1 Hücre Serilerinde *ATF4* Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi

GPR89A knock-out hücreye 100 µM cisplatin uygulanmasının ardından *ATF4* gen ekspresyon seviyesindeki değişimi belirlemek için ekspresyon analizi yapıldı. *GPR89A* knock-out olmuş hücrenin CR Calu-1 hücresine göre *ATF4* gen ekspresyonunun 1.88 kat, cisplatin uygulanmış knock-out hücrede 6.17 kat ($p<0,0001$) arttığı belirlendi.

5. TARTIŞMA

Akciğer kanseri, insanlar arasında en yaygın hastalıklardan biri olup artan mortalitenin başlıca nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir (Thakur, Singh ve Choudhary 2020). Pulmoner sistemi etkileyen tüm kanser türleri içinde KHDAK, tümörlerin yaklaşık %85'ini oluşturmaktadır (Suster ve Mino-Kenudson 2020). Tedavi seçenekleri arasında en yaygın kullanılan kemoterapidir. Son yıllarda kemoterapi sırasında gelişen ilaç direnci önemli bir sorun haline gelmiştir. Kanser hücreleri doğal olarak ilaca dirençli olabilmekte veya tedavi sırasında kemoterapötiğe karşı direnç geliştirebilmektedirler. Kazanılmış dirençte tümörler yalnızca o tedavi için kullanılan ilaçlara dirençli hale gelmekle kalmayıp, aynı zamanda farklı etki mekanizmalarına sahip diğer ilaçlara karşı da çapraz dirençli hale gelebilmektedirler (Longley ve Johnston 2005).

Cisplatin en yaygın kullanılan platin bazlı kemoterapötik ajanlardan biri olup KHDAK başta olmak üzere birçok farklı kanserin tedavisinde kullanılmaktadır (Çetintaş ve Eroğlu 2013). Cisplatinin DNA üzerindeki pürin bazlarıyla etkileşime girmesi sonucu oluşan DNA lezyonları proliferasyonu engelleyerek apoptozu indüklemektedir (Basu ve Krishnamurthy 2010; Ghosh 2019). Oldukça etkili olmasına rağmen, tedavi sırasında edinilen ilaç direnci cisplatinin etkinliğini sınırlamaktadır. Kanser hücreleri başlangıçta cisplatin tedavisine duyarlı olsalar da zamanla çeşitli mekanizmalar aracılığıyla direnç geliştirebilmektedir (Makovec 2019). Cisplatin direncinden sorumlu genetik faktörler belirlenerek direncin üstesinden gelmek tedavi etkinliğini arttıracaktır. Bu yüzden dirençten sorumlu genetik bileşenlerin belirlenebilmesi için yeni genetik tarama stratejilerinin denenmesi gerekmektedir (Basu ve Krishnamurthy 2010; Dasari ve Tchounwou 2014).

Farklı kanser türlerinde cisplatin direncinden sorumlu bağımlı bileşenlerin belirlenebilmesi için CRISPR tarama çalışmaları yapılmaktadır. Literatürde akciğer kanserinde cisplatin direncinden sorumlu genetik faktörleri belirlemek için yapılan bir CRISPR tarama çalışması henüz bulunmamaktadır. Bu nedenle, yapılan bu tez çalışması KHDAK'da cisplatin direnç mekanizmasının altında yatan ve dirençli hücrenin bağımlı olduğu genetik faktörlerin belirlenmesi için yapılan ilk CRISPR-Cas9 tarama çalışması olacaktır. Çalışmada doz artırımı metoduyla Calu-1 hücresi 6.3-kat cisplatine dirençli hale getirildikten sonra duyarlı ve dirençli Calu-1 hücreleri

19,114 insan genini hedefleyen ve toplam 76,441 *gRNA*'dan oluşan “Brunello kütüphanesi”ni taşıyan lentivirüsle transfekte edildi. Transfeksiyonun ardından tüm grupların genomik DNA'ları izole edilerek, her gruptaki *gRNA* dağılımının belirlenmesi için NGS ile ampikon sekanslama yapıldı. NGS sonuçların biyoinformatik analizleri gerçekleştirilerek her hücre grubunda artan ve azalan *gRNA*'lar belirlendi ve ilgili *gRNA*'ların hedefledikleri genler listelendi. Calu-1 cisplatin tedavisi uygulanmamış grupta artan 42 - azalan 13, Calu-1 cisplatin tedavisi uygulanmış grupta artan 39 - azalan 36, CR-Cal-1 cisplatin tedavisi uygulanmamış grupta artan 11 - azalan 64, CR-Cal-1 cisplatin tedavisi uygulanmış grupta artan 17 - azalan 63 aday gen belirlendi. CR-Cal-1 hücresinde cisplatin tedavisi sonrası ilgili genin hedeflediği *gRNA* miktarının azalması, bu genin cisplatin direncinden sorumlu olduğu anlamına gelmektedir. Bu yüzden aday genler cisplatin dirençli hücrede azalan *gRNA*'ların hedefledikleri genler arasından seçildi. Azalan genlerin hücre döngüsü, protein veya lipid metabolizması, vezikül, protein veya iyon transportu, DNA tamiri, mRNA splicing, gen ekspresyonu, RNA işlenmesi, epigenetik, apoptoz, protein modifikasyonu gibi önemli biyolojik yollarda rol oynadıkları belirlendi. CR-Cal-1 hücrelerinde azalan genler arasından gen skoru ve yüksek ekspresyon seviyesine göre *GPR89A* aday gen seçildi. Bu aday gen dirençli Calu-1 hücrelerinde knock-out edildikten sonra hücre canlılığı, sitotoksosite, apoptoz, hücre döngüsü, koloni oluşumu, migrasyon gibi önemli hücresel işlevler üzerine ve *ATF4* gen ekspresyon seviyesine etkileri fonksiyonel testlerle belirlendi. Yapılan sitotoksosite analizi sonucunda *GPR89A* knock-out CR-Cal-1 hücrelerinde cisplatin duyarlılığının ~3-kat, Calu-1 hücrelerinde ise ~2-kat arttığı tespit edildi. Böylece, *GPR89A* geninin cisplatin direncinde önemli bir rol oynadığı ve knock-out edildiğinde dirençli Calu-1 hücrelerinin cisplatin duyarlılığını geri kazandıkları tespit edildi.

Yapılan apoptoz analizi sonucunda *GPR89A* knock-out hücrede cisplatin tedavisi sonrası DNA fragmentasyonunun ve kesilmiş Kaspaz 9 ekspresyonunun arttığı, buna bağlı apoptozun gerçekleştiği belirlendi. Genomda herhangi bir yeri hedeflemeyen *Renilla* transfeksiyonunun apoptoz üzerine bir etkisinin olmadığı görüldü.

GPR89A knock-out CR-Cal-1 hücrelerinde cisplatin tedavisi sonrasında yapılan hücre döngüsü analizinde *GPR89A* geninin susturulmasının G2/M evresinde durdurucu etkisinin olduğu ve poliploidiyi artırdığı görüldü. Son yapılan çalışmalara göre poliploidi, kanser hücrelerinin stabilitesini bozarak onları savunmasız hale

getirmektedir (Tovar ve ark. 2010). Kanser hücrelerinde poliploidi indüksiyonunun onları genotoksik ajanlara karşı duyarlılığını artırdığı bildirilmiştir (Hau ve ark., 2006). Poliploid kanser hücreleri sürekli çoğalma talepleriyle baş edememekte ve çoğunluğunun cisplatin varlığında yeni bir mitotik döngüye girmeye çalışırken mitotik katastrofu ve hızlı apoptotuzu indüklediği öngörülmektedir. Cisplatin uygulanmış CR-Calu-1 ve *GPR89A* knock-out hücrelerinde hücre dungsünün S evresinde durarak mitotik katastrofa neden olduğu tespit edildi. Mitotik katastrofa neden olan aynı cisplatin konsantrasyonunun CR-Calu-1 hücrelerinde apoptotik etkisi olmadığı için cisplatinin oluşturduğu hücre döngüsü S evre arrestinin DNA tamir mekanizmalarıyla onarıldığı ve bir süre sonra hücrenin yeniden proliferatif özellik kazandığı düşünülmektedir.

CR-Calu-1 hücrelerinde *GPR89A* geninin knock-out edilmesi ve ilgili genin susturulması ile cisplatin kombinasyonu sinerjistik etki oluşturarak koloni oluşumunu ve migrasyonu azalttığı görülmüştür.

Farklı kanser türlerinde mevcut kanser tedavilerini güçlendirmek için yapılan CRISPR-Cas9 tabanlı genetik taramalar sonucunda bağımlı genler belirlenmiş ve bu genlerin cisplatin direnciyle ilişkili oldukları gösterilmiştir. Malign plevral mezotelyoma kanser hücrelerinde genomdaki tüm kinazları hedefleyen bir CRISPR-Cas9 tarama çalışması sonucunda *WEE1*, *AURKA*, *MPP3*, *MAP3K12*, *DGKD* ve *SPEG* aday genleri belirlenmiştir. Validasyon çalışmaları ile hücre döngüsünde görevli *WEE1* kinaz inhibisyonunun cisplatin direncini kırdığı gösterilmiştir (Xu ve ark. 2020). Mesane kanserinde “GeCKO Kütüphanesi” kullanılarak tüm genomu hedefleyen CRISPR-Cas9 tarama çalışmasının sonucunda *MSH2*, *MLH1*, *FAM89B*, *XPC* ve *PMS2* ilk beş aday gen olarak belirlenmiştir. *MSH2* geninin knock-out edildiği validasyon çalışmalarında hücrelerin cisplatine daha dirençli olduğu ve hücrelerde cisplatine bağlı apoptozun azaldığı gözlenmiştir. Bu da *MSH2* geninin direnç gelişiminde önemli olduğunu göstermektedir (Goodspeed, Jean ve Costello 2019). Over kanserinde “GeCKO kütüphanesi” kullanılarak genom çapında yapılan CRISPR-Cas9 tarama çalışmasının sonucunda validasyonu yapılan *ZNF587B*, *TADA1*, *SEMA4G*, *POTEC* ve *USP17L20* aday genlerinden *ZNF587B* ve *SULF1* kaybının cisplatin direncine neden olduğu belirlenmiştir (Ouyang ve ark. 2019). Melanoma kanserinde genom çapında yapılan CRISPR-Cas9 ve shRNA (*small hairpin RNA*) taraması sonucunda cisplatin direnci ile *ZNRF3*, *NF2* ve *ARIH1* genlerinin ilişkili

olduğu gösterilmiştir (Ko ve Li 2019). CD133⁺ safra yolu kanser hücrelerinde mir1249'un (microRNA1249) CRISPR-Cas9 ile knock-out edilmesinin ardından bu miRNA'nın cisplatin ve gemcitabin direnç gelişiminde etkili olduğu bulunmuştur (Carotenuto ve ark. 2020). Germ hücreli tümör hücrelerinde CRISPR-Cas9 ile *ARID1A* geninin knock-out edilmesinin ardından hücrelerin cisplatine karşı duyarlılığının arttığı belirlenmiştir (Kurz ve ark. 2020). Over kanserinde anti-apoptotik genleri hedefleyen bir CRISPR-Cas9 kütüphanesiyle yapılan taramada *BCL2L1* anti-apoptotik protein kaybı olan hücrelerde cisplatin tedavisi sonrasında apoptozun arttığı belirlenmiştir (Stover ve ark. 2020). Haploid insan hücre serisinde 388 SLC transmembran taşıyıcı genlerini hedefleyen CRISPR-Cas9 kütüphanesiyle yapılan taramada cisplatin direncinde SLC35A2/SLC38A5 transmembran taşıyıcılarının önemli olduğu belirlenmiştir (Girardi ve ark. 2020). Farklı kanser türlerinde yapılan CRISPR-Cas9 tarama çalışmaları ile o kanser türlerinde önemli olan cisplatin direnciyle ilişkili mekanizmalar ortaya çıkarılmış ve her kanser türünde bağımlı genetik faktörlerin değiştiği belirlenmiştir.

Son yıllarda, pH homeostazının tümör progresyonunda önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Kanser hücreleri, hücre büyümesini ve hayatta kalmasını sağlamak için gerekli enerjiyi glikoz alımını arttırarak karşılamaktadır. Glikoliz yoluyla kazanılan enerji aynı zamanda hücrede alkali pH oluşumuna neden olmaktadır. Bu nedenle tümör hücreleri alkalik pH'ı korumak zorundadır. Golgi'nin, bir proton havuzu gibi işlev görerek kanserde bu alkalik sitozolik pH'ın korunmasına katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Kellokumpu 2019; Kellokumpu ve ark., 2002). *GPR89A* (*GPHR*) geni genomda kromozom 1q21.1 bölgesinde lokalizedir. Hücre içerisinde golgi membranında lokalize olan GPR89A, iyon iletkenliği yoluyla golginin pH'ını düzenleyen, plazma zarının ve salgı proteinlerinin translayon sonrası modifikasyonunu kontrol eden voltaj kapılı bir klorür(Cl⁻) kanalı oluşturmaktadır (Maeda ve ark. 2008). *GPR89A*'nın inaktivasyonu ya da ekspresyonunun azalması yeni sentezlenmiş proteinlerin golgiden plazma zarına gecikmeli taşınmasına, proteinlerin bozulmuş glikozilasyonuna ve golgi aygıtının yapısal düzensizliğine neden olmaktadır (Kellokumpu ve Sormunen, 2002, Ferro ve ark., 2018).

Kanser tedavisinde mutasyona uğramış genler terapötik hedef olarak kullanılmaktadır. Ancak, son zamanlarda mutasyona uğramamış genlerin de ilaç hedefi olarak kullanılabileceği bildirilmiştir. Prostat kanserinde mutasyona uğramamış bir gen olan

GPR89A'nın siRNA ile susturulması sonucunda kanser hücrelerinde ölüm oranının arttığı belirlenmiştir. Ayrıca, *GPR89A* siRNA ve docetaxel kombinasyonunun sinerjistik etkisi olduğu bildirilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar mutasyona uğramamış genlerin kanser gelişiminde önemli bir role sahip olduklarını göstermektedir (Ma ve ark., 2018). Bu tez çalışması ile CR-Calu-1 hücrelerinde *GPR89A* susturulmasının cisplatin ile kombinasyonunun sinerjistik etki yaratarak apoptozu artırdığı görülmüştür. Bu nedenle duyarlı ve dirençli kanser hücrelerinde *GPR89A* inhibisyonu ve farklı ilaçlarla kombinasyonunun yeni bir tedavi seçeneği olabileceği düşünülmektedir.

Agresif papiller adenokarsinom hücrelerinde *GPR89A* gen ekspresyon seviyesinin yüksek olduğu bildirilmiştir (Surowy ve ark. 2019). Tan ve ark.'larının yaptıkları çalışmada akciğer kanser hücrelerinde kromozom 1q21-43 amplifikasyonlarının ve bu bölgede lokalize olan *PI4KIIIβ* ve *GPR89A* genlerinin tümör progresyonuyla ve özellikle metastatik süreçlerle ilişkili olduğu bildirilmiştir (Tan ve ark. 2020). Ancak, şimdiye kadar akciğer kanser hücrelerinde *GPR89A* geni için inhibisyon çalışması yapılmamıştır.

Ferro ve ark.'larının yaptıkları bir çalışmada *GPR89A*'nın meme kanserinde ekspresyonunun yüksek olduğu ve bu genin inhibisyonunun hücre proliferasyonunu ve koloni oluşturma yeteneğini bozduğu bildirilmiştir. Aynı zamanda *GPR89A*'nın endoplazmik retikulum (ER) stresi ile oluşan katlanmamış protein yanıtı olarak IRE1/XBP1 yolağını pozitif, *ATF4/CHOP* yolağını negatif yönde regüle ettiği gösterilmiştir (Ferro ve ark., 2018). Bu tez çalışması ile *GPR89A* knock-out edilmesinin cisplatin ile kombinasyonunun *ATF4* ekspresyonunu artırdığı belirlendi. Activating Transcription Factor 4 (*ATF4*), ER ve golgi stres oluşumunun ardından indüklenen PERK yolağında yer alan ve hücrede apoptozu indükleyen bir transkripsiyon faktörüdür (Paul 2021; Rozpedek ve ark. 2016).

Golgi aygıtı sadece proteinlerin taşınması, işlenmesi ve hedeflenmesinde kilit rol oynamakla kalmayıp aynı zamanda olgi stres tepkisi aracılığıyla sinyal gönderen bir stres sensörü olarak da işlev görmektedir (Paul 2021). Golginin ana işlevi olan glikozilasyon mekanizmasındaki bozukluklar golgi stresi oluşumuna neden olmaktadır. Golgi stres yanıtı olarak TFE3, musin, proteoglikan, HSP47, CREB ve PERK yolları aktive olmaktadır. Endoplazmik retikulum stresinden farklı olarak

PERK yolağında BiP/GRP78 şaperonu aktive olmamakta ve bu şekilde golgi stresi, ER stresinden ayrılmaktadır (Hu ve ark. 2019; Paul 2021). Golgi stresör monensin tarafından aktive edilen PERK yolağının indüklenmesi ATF4/CHOP aktivasyonuna neden olmaktadır. ATF4/CHOP yolağı ölüm reseptörleri (DR4, DR5) ekspresyonunu artırarak, anti-apoptotik genleri baskılayarak ve pro-apoptotik gen ekspresyonunu indükleyerek apoptoza neden olmaktadır (Rozpedek ve ark. 2016). Bu tez çalışması ile CR-Calu-1 hücrelerinde *GPR89A* geninin knock-out edilmesinin golgi pH'ını değiştirerek protein modifikasyon ve transportunda bozulmalara sebep olarak golgi stresi oluşumunu indüklediği öngörülmektedir. Dirençli hücrelerde stres oluşumunun yanı sıra cisplatin uygulanmasının PERK/ATF4/CHOP yolağı aracılığıyla apoptozu indüklediği ve buna bağlı cisplatin direncinin kırıldığı düşünülmektedir.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında KHDAC hücrelerinde cisplatin direnci gelişiminden sorumlu genetik faktörleri belirlemek amacıyla ilk kez genom çapında CRISPR-Cas9 temelli bir tarama yapılarak *GPR89A* geninin cisplatin direnci gelişiminden sorumlu olduğu ve bu genin knock-out edilmesi ile cisplatin direncinin kırılabileceği tespit edildi. Cisplatin direncinin üstesinden gelebilmek için bu genin terapötik olarak hedeflenmesinin yeni bir tedavi seçeneceği olabileceği düşünülmektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Kanser tedavisinde gelişen ilaç direnci hastaların yaşam kalitesini etkilemektedir. Direnç meknizmasının altında yatan mekanizmalar ise bilinmemektedir. Farklı kanser türlerinde yapılan CRISPR-Cas9 taramaları ile hücrelerin bağımlı olduğu genetik faktörler belirlenmektedir. Bu faktörler her hücre tipinde değişkenlik göstermektedir. Yapılan bu tez çalışmasında akciğer kanserinde cisplatin direncinden sorumlu bağımlı genetik bileşenler belirlendi. *GPR89A* geninin ilk kez cisplatin direnci gelişimine katkıda bulunduğu ve bu genin knock-out edilmesinin cisplatin direncini kırdığı görüldü. Bu nedenle akciğer kanserinde *GPR89A*'nın terapötik hedef olabileceği düşünülmektedir. *GPR89A* geninin etki mekanizmasının ve cisplatin direnci ile olan ilişkisinin daha iyi anlaşılabilmesi için transkriptom, 3D-hücre kültürü ya da farklı model organizmalarda yapılacak çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

7. KAYNAKLAR

- Addgene, (2021, 5 Haziran). Erişim adresi: (<https://www.addgene.org/pooled-library/broadgpp-human-knockout-brunello/>).
- Adelmann, Charles H., Tim Wang, David M. Sabatini, and Eric S. Lander. 2019. "Genome-Wide CRISPR/Cas9 Screening for Identification of Cancer Genes in Cell Lines." *Methods in Molecular Biology* 1907: 125–36.
- Agrotis, Alexander, and Robin Ketteler. 2015. "A New Age in Functional Genomics Using CRISPR/Cas9 in Arrayed Library Screening." *Frontiers in Genetics* 6(SEP): 1–15.
- Aldossary, Sara A. 2019. "Review on Pharmacology of Cisplatin: Clinical Use, Toxicity and Mechanism of Resistance of Cisplatin." *Biomedical and Pharmacology Journal* 12(1): 7–15.
- Alexander, Mariam, So Yeon Kim, and Haiying Cheng. 2020. "Update 2020: Management of Non-Small Cell Lung Cancer." *Lung* 198(6): 897–907. <https://doi.org/10.1007/s00408-020-00407-5>.
- Amable, Lauren. 2016. "Cisplatin Resistance and Opportunities for Precision Medicine." *Pharmacological Research* 106: 27–36. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.001>.
- Amitai, Gil, and Rotem Sorek. 2016. "CRISPR-Cas Adaptation: Insights into the Mechanism of Action." *Nature Reviews Microbiology* 14(2): 67–76.
- Baik, Mu Hyun, Richard A. Friesner, and Stephen J. Lippard. 2003. "Theoretical Study of Cisplatin Binding to Purine Bases: Why Does Cisplatin Prefer Guanine over Adenine?" *Journal of the American Chemical Society* 125(46): 14082–92.
- Barman, Antara, Bornali Deb, and Supriyo Chakraborty. 2020. "A Glance at Genome Editing with CRISPR–Cas9 Technology." *Current Genetics* 66(3): 447–62. <https://doi.org/10.1007/s00294-019-01040-3>.
- Barrangou, Rodolphe, and Philippe Horvath. 2017. "A Decade of Discovery: CRISPR Functions and Applications." *Nature Microbiology* 2(June): 1–9. <http://dx.doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.92>.
- Basu, Alakananda, and Soumya Krishnamurthy. 2010. "Cellular Responses to Cisplatin-Induced DNA Damage." *Journal of Nucleic Acids* 2010.
- Bouwman, Peter, and Jos Jonkers. 2012. "The Effects of Deregulated DNA Damage Signalling on Cancer Chemotherapy Response and Resistance." *Nature Reviews*

- Cancer* 12(9): 587–98. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3342>.
- Bozok Çetintaş, Vildan, Mustafa Kotmakçı, and Burçin Tezcanlı Kaymaz. 2017. “From the Immune Response to the Genome Design; CRISPR-Cas9 System: Review.” *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences* 37(1): 27–42.
- Brown, Robert et al. 1997. “HMLH1 Expression and Cellular Responses of Ovarian Tumour Cells to Treatment with Cytotoxic Anticancer Agents.” *Oncogene* 15(1): 45–52.
- Carotenuto, Pietro et al. 2020. “Modulation of Biliary Cancer Chemo-Resistance Through MicroRNA-Mediated Rewiring of the Expansion of CD133+ Cells.” *Hepatology* 72(3): 982–96.
- Çetintaş, Vildan Bozok, and Zuhale Eroğlu. 2013. “Cisplatin Direncinde Etkili Moleküler Mekanizmalar.” *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi* 20(2): 72–79.
- Chen, Chen Hao et al. 2018. “Improved Design and Analysis of CRISPR Knockout Screens.” *Bioinformatics* 34(23): 4095–4101.
- Chen, Helen H.W. et al. 2015. “Targeting Drug Transport Mechanisms for Improving Platinum-Based Cancer Chemotherapy.” *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 19(10): 1307–17.
- Chen, Helen H.W., and MacUs Tien Kuo. 2010. “Role of Glutathione in the Regulation of Cisplatin Resistance in Cancer Chemotherapy.” *Metal-Based Drugs* 2010.
- Chen, Minjiang et al. 2019. “CRISPR-Cas9 for Cancer Therapy: Opportunities and Challenges.” *Cancer Letters* 447(December 2018): 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.01.017>.
- Chen, Shang Hung, and Jang Yang Chang. 2019. “New Insights into Mechanisms of Cisplatin Resistance: From Tumor Cell to Microenvironment.” *International Journal of Molecular Sciences* 20(17).
- Dela Cruz, Charles S., Lynn T. Tanoue, and Richard A. Matthay. 2011. “Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, and Prevention.” *Clinics in Chest Medicine* 32(4): 605–44.
- Dasari, Shaloom, and Paul Bernard Tchounwou. 2014. “Cisplatin in Cancer Therapy: Molecular Mechanisms of Action.” *European Journal of Pharmacology* 740: 364–78.
- Datlinger, Paul et al. 2017. “Pooled CRISPR Screening with Single-Cell Transcriptome Readout.” *Nature Methods* 14(3): 297–301.

- Doench, John G. et al. 2016. "Optimized SgRNA Design to Maximize Activity and Minimize Off-Target Effects of CRISPR-Cas9." *Nature Biotechnology* 34(2): 184–91.
- Duma, Narjust, Rafael Santana-Davila, and Julian R. Molina. 2019. "Non–Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment." *Mayo Clinic Proceedings* 94(8): 1623–40.
<https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2019.01.013>.
- Esposito, Roberta et al. 2019. "Hacking the Cancer Genome: Profiling Therapeutically Actionable Long Non-Coding RNAs Using CRISPR-Cas9 Screening." *Cancer Cell* 35(4): 545–57.
- Franken, Nicolaas A.P. et al. 2006. "Clonogenic Assay of Cells in Vitro." *Nature Protocols* 1(5): 2315–19.
- Galluzzi, L. et al. 2012. "Molecular Mechanisms of Cisplatin Resistance." *Oncogene* 31(15): 1869–83.
- . 2014. "Systems Biology of Cisplatin Resistance: Past, Present and Future." *Cell Death and Disease* 5: 1–18.
- Ghosh, Sumit. 2019. "Cisplatin: The First Metal Based Anticancer Drug." *Bioorganic Chemistry* 88(March).
- Girardi, Enrico et al. 2020. "A Widespread Role for SLC Transmembrane Transporters in Resistance to Cytotoxic Drugs." *Nature Chemical Biology* 16(4): 469–78. <http://dx.doi.org/10.1038/s41589-020-0483-3>.
- Goodspeed, A., A. Jean, and J.C. Costello. 2019. "A Whole-Genome CRISPR Screen Identifies a Role of MSH2 in Cisplatin-Mediated Cell Death in Muscle-Invasive Bladder Cancer." *Eur Urol.* 75(2): 242–50.
- Gupta, Darshana et al. 2019. "CRISPR-Cas9 System: A New-Fangled Dawn in Gene Editing." *Life Sciences* 232(July): 116636.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116636>.
- Hall, Matthew D. et al. 2008. "The Role of Cellular Accumulation in Determining Sensitivity to Platinum-Based Chemotherapy." *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 48: 495–535.
- Hille, Frank, and Emmanuelle Charpentier. 2016. "CRISPR-Cas: Biology, Mechanisms and Relevance." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 371(1707).
- Hirsch, Fred R. et al. 2017. "Lung Cancer: Current Therapies and New Targeted

- Treatments.” *The Lancet* 389(10066): 299–311.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30958-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30958-8).
- Huang, Chih Yang et al. 2017. “A Review on the Effects of Current Chemotherapy Drugs and Natural Agents in Treating Non-Small Cell Lung Cancer.” *BioMedicine (France)* 7(4): 12–23.
- Inamura, Kentaro. 2017. “Lung Cancer: Understanding Its Molecular Pathology and the 2015 WHO Classification.” *Frontiers in Oncology* 7(AUG): 1–7.
- Ishida, Seiko, Jaekwon Lee, Dennis J. Thiele, and Ira Herskowitz. 2002. “Uptake of the Anticancer Drug Cisplatin Mediated by the Copper Transporter Ctr1 in Yeast and Mammals.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(22): 14298–302.
- Ishino, Yoshizumi et al. 1987. 169 JOURNAL OF BACTERIOLOGY *Nucleotide Sequence of the Iap Gene, Responsible for Alkaline Phosphatase Isozyme Conversion in Escherichia Coli, and Identification of the Gene Product*.
<http://jb.asm.org/> (May 1, 2021).
- Iyer, Vaishnavi Srinivasan et al. 2020. “Designing Custom CRISPR Libraries for Hypothesis-Driven Drug Target Discovery.” *Computational and Structural Biotechnology Journal* 18: 2237–46. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.08.009>.
- Jiang, Fuguo, and Jennifer A Doudna. 2017. “CRISPR – Cas9 Structures and Mechanisms.” : 505–31.
- Kantor, Ariel, and Michelle E Mcclements. 2020. “CRISPR-Cas9 DNA Base-Editing and Prime-Editing.” : 1–21.
- Karimian, Ansar et al. 2019. “CRISPR/Cas9 Technology as a Potent Molecular Tool for Gene Therapy.” *Journal of Cellular Physiology* 234(8): 12267–77.
- KARLO, J. 2016. “Mechanism of CRISPR – Cas Immunological Memory.” *University of California, UC Berkeley Electronic Theses and Dissertations*.
- Kellokumpu, Sakari. 2019. “Golgi PH, Ion and Redox Homeostasis: How Much Do They Really Matter?” *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 7(JUN): 1–15.
- Kellokumpu, Sakari, Raija Sormunen, and Ilmo Kellokumpu. 2002. “Abnormal Glycosylation and Altered Golgi Structure in Colorectal Cancer: Dependence on Intra-Golgi PH.” *FEBS Letters* 516(1–3): 217–24.
- Khadempar, Saedeh et al. 2019. “CRISPR–Cas9 in Genome Editing: Its Function and Medical Applications.” *Journal of Cellular Physiology* 234(5): 5751–61.

- Ko, Tengyu, and Shisheng Li. 2019. "Genome-Wide Screening Identifies Novel Genes and Biological Processes Implicated in Cisplatin Resistance." *FASEB Journal* 33(6): 7143–54.
- Köberle, Beate, Maja T. Tomicic, Svetlana Usanova, and Bernd Kaina. 2010. "Cisplatin Resistance: Preclinical Findings and Clinical Implications." *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* 1806(2): 172–82. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2010.07.004>.
- Kurata, Morito et al. 2018. "CRISPR/Cas9 Library Screening for Drug Target Discovery." *Journal of Human Genetics* 63(2): 179–86. <http://dx.doi.org/10.1038/s10038-017-0376-9>.
- Kurz, Lukas et al. 2020. "ARID1A Regulates Transcription and the Epigenetic Landscape via POLE and DMAP1 While ARID1A Deficiency or Pharmacological Inhibition Sensitizes Germ Cell Tumor Cells to ATR Inhibition." *Cancers* 12(4): 1–19.
- Leonova, Elena I., and Raul R. Gainetdinov. 2020. "CRISPR/Cas9 Technology in Translational Biomedicine." *Cellular Physiology and Biochemistry* 54(3): 354–70.
- Lin, Xueqiu et al. 2020. "Computational Methods for Analysis of Large-Scale CRISPR Screens." *Annual Review of Biomedical Data Science* 3(1): 137–62.
- Liu, Bin, Ali Saber, and Hidde J. Haisma. 2019. "CRISPR/Cas9: A Powerful Tool for Identification of New Targets for Cancer Treatment." *Drug Discovery Today* 24(4): 955–70. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.02.011>.
- Longley, D. B., and P. G. Johnston. 2005. "Molecular Mechanisms of Drug Resistance." *Journal of Pathology* 205(2): 275–92.
- De Luca, Anastasia et al. 2019. "A Structure-Based Mechanism of Cisplatin Resistance Mediated by Glutathione Transferase P1-1." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116(28): 13943–51.
- Luo, Ji. 2016. "CRISPR/Cas9: From Genome Engineering to Cancer Drug Discovery The CRISPR/Cas9 Endonuclease System." *Trends In Cancer* 2(6): 313–24. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5461962/pdf/nihms793102.pdf>.
- Luther et al. 2018. "Delivery Approaches for CRISPR/Cas9 Therapeutics In Vivo: Advances and Challenges." *Expert Opin Drug Deliv* 15(9): 905–13.
- Maeda, Yusuke et al. 2008. "GPHR Is a Novel Anion Channel Critical for

- Acidification and Functions of the Golgi Apparatus.” *Nature Cell Biology* 10(10): 1135–45.
- Makarova, Kira S. et al. 2020. “Evolutionary Classification of CRISPR–Cas Systems: A Burst of Class 2 and Derived Variants.” *Nature Reviews Microbiology* 18(2): 67–83.
- Makovec, Tomaz. 2019. “Cisplatin and beyond: Molecular Mechanisms of Action and Drug Resistance Development in Cancer Chemotherapy.” *Radiology and Oncology* 53(2): 148–58.
- Malhotra, Jyoti et al. 2016. “Risk Factors for Lung Cancer Worldwide.” *European Respiratory Journal* 48(3): 889–902.
<http://dx.doi.org/10.1183/13993003.00359-2016>.
- Martin, Lainie P., Thomas C. Hamilton, and Russell J. Schilder. 2008. “Platinum Resistance: The Role of DNA Repair Pathways.” *Clinical Cancer Research* 14(5): 1291–95.
- Najm, Fadi J. et al. 2018. “Orthologous CRISPR-Cas9 Enzymes for Combinatorial Genetic Screens.” *Nature Biotechnology* 36(2): 179–89.
<http://dx.doi.org/10.1038/nbt.4048>.
- Nasser, Nicola J., Miguel Gorenberg, and Abed Agbarya. 2020. “First Line Immunotherapy for Non-Small Cell Lung Cancer.” *Pharmaceuticals* 13(11): 1–24.
- Osmani, Lais, Frederic Askin, Edward Gabrielson, and Qing Kay Li. 2018. “Current WHO Guidelines and the Critical Role of Immunohistochemical Markers in the Subclassification of Non-Small Cell Lung Carcinoma (NSCLC): Moving from Targeted Therapy to Immunotherapy.” *Seminars in Cancer Biology* 52(September 2017): 103–9. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.11.019>.
- Otten, Auke B.C., and Bryan K. Sun. 2020. “Research Techniques Made Simple: CRISPR Genetic Screens.” *Journal of Investigative Dermatology* 140(4): 723–728.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2020.01.018>.
- Ouyang, Qianying et al. 2019. “Loss of ZNF587B and SULF1 Contributed to Cisplatin Resistance in Ovarian Cancer Cell Lines Based on Genome-Scale CRISPR/Cas9 Screening.” *American journal of cancer research* 9(5): 988–98.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31218106><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC6556596>.
- Paul, Bindu D. 2021. “Signaling Overlap between the Golgi Stress Response and

- Cysteine Metabolism in Huntington ' s Disease.” : 1–13.
- R. HELER, L.A. MARAFFINI, D. BIKARD. 2014. “Adapting to New Threats: The Generation of Memory by CRISPR- Cas Immune Systems.” *Mol Microbiol.* 93(1): 1–9.
- Rabik, Cara A., and M. Eileen Dolan. 2007. “Molecular Mechanisms of Resistance and Toxicity Associated with Platinating Agents.” *Cancer Treatment Reviews* 33(1): 9–23.
- Rath, Devashish, Lina Amlinger, Archana Rath, and Magnus Lundgren. 2015. “The CRISPR-Cas Immune System: Biology, Mechanisms and Applications.” *Biochimie* 117: 119–28. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2015.03.025>.
- Rocha, Clarissa Ribeiro Reily et al. 2018. “DNA Repair Pathways and Cisplatin Resistance: An Intimate Relationship.” *Clinics* 73(8): 1–10.
- Rozpedek, W. et al. 2016. “The Role of the PERK/EIF2 α /ATF4/CHOP Signaling Pathway in Tumor Progression During Endoplasmic Reticulum Stress.” *Current Molecular Medicine* 16(6): 533–44.
- Saber, Ali, Bin Liu, Pirooz Ebrahimi, and Hidde J. Haisma. 2020. “CRISPR/Cas9 for Overcoming Drug Resistance in Solid Tumors.” *DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences* 28(1): 295–304.
- Sanjana, N.E., O. Shalem, and F. Zhang. 2014. “Improved Vectors and Genome-Wide Libraries for CRISPR Screening.” *Nat Methods* 11(8): 783–784.
- Dos Santos, Neife Aparecida Guinaim, Maria Augusta Carvalho Rodrigues, Nadia Maria Martins, and Antonio Cardozo Dos Santos. 2012. “Cisplatin-Induced Nephrotoxicity and Targets of Nephroprotection: An Update.” *Archives of Toxicology* 86(8): 1233–50.
- Schabath, M. B., and M. L. Cote. 2019. “Cancer Progress and Priorities: Lung Cancer.” *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 28(10): 1563–79.
- Sharma, Sumana, and Evangelia Petsalaki. 2018. “Application of CRISPR-Cas9 Based Genome-Wide Screening Approaches to Study Cellular Signalling Mechanisms.” *International Journal of Molecular Sciences* 19(4).
- Stover, Elizabeth H et al. 2020. “HHS Public Access.” 17(11): 617–32.
- Strathdee, G., M. J. MacKean, M. Illand, and R. Brown. 1999. “A Role for Methylation of the HMLH1 Promoter in Loss of HMLH1 Expression and Drug Resistance in Ovarian Cancer.” *Oncogene* 18(14): 2335–41.
- Sung, Hyuna et al. 2021. “Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of

- Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries.” *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 71(3): 209–49.
- Surowy, H. M. et al. 2019. “Gene Expression Profiling in Aggressive Digital Papillary Adenocarcinoma Sheds Light on the Architecture of a Rare Sweat Gland Carcinoma.” *British Journal of Dermatology* 180(5): 1150–60.
- Suster, David Ilan, and Mari Mino-Kenudson. 2020. “Molecular Pathology of Primary Non-Small Cell Lung Cancer.” *Archives of Medical Research* 51(8): 784–98. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2020.08.004>.
- Takamochi, Kazuya et al. 2016. “Novel Biomarkers That Assist in Accurate Discrimination of Squamous Cell Carcinoma from Adenocarcinoma of the Lung.” *BMC Cancer* 16(1): 1–11. <http://dx.doi.org/10.1186/s12885-016-2792-1>.
- Tan, Xiaochao et al. 2020. “PI4KIII β Is a Therapeutic Target in Chromosome 1q-Amplified Lung Adenocarcinoma.” *Science Translational Medicine* 12(527).
- Tchounwou, P.B. et al. 2021. “Advances in Our Understanding of the Molecular Mechanisms of Action of Cisplatin in Cancer Therapy.” : 13.
- Terns, M. P. 2018. “CRISPR-Based Technologies: Impact of RNA-Targeting Systems.” *Mol Cell*. 72(3): 404–12.
- Thakur, Shailesh Kumar, Dharendra Pratap Singh, and Jaytrilok Choudhary. 2020. “Lung Cancer Identification: A Review on Detection and Classification.” *Cancer and Metastasis Reviews* 39(3): 989–98.
- Todor, Horia, Melanie R. Silvis, Hendrik Osadnik, and Carol A. Gross. 2021. “Bacterial CRISPR Screens for Gene Function.” *Current Opinion in Microbiology* 59: 102–9. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2020.11.005>.
- Tovar, Christian et al. 2010. “Small-Molecule Inducer of Cancer Cell Polyploidy Promotes Apoptosis or Senescence: Implications for Therapy.” *Cell Cycle* 9(16): 3384–95.
- Tyagi, Swati et al. 2020. “CRISPR-Cas9 System: A Genome-Editing Tool with Endless Possibilities.” *Journal of Biotechnology* 319: 36–53. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.05.008>.
- Wadowska, K, I Bil-Lula, L Trembecki, and M.S. Massori. 2017. “Driver Genes in Non-Small Cell Lung Cancer: Characteristics, Detection Methods, and Targeted Therapies.” *Oncotarget* 8(34): 57680–92.
- Wadowska, K, I Bil-Lula, L Trembecki, and M.S. Mosson. 2020. “Title : Genetic Markers in Lung Cancer Diagnosis : A Review.” *International Journal of*

Molecular Sciences Review 21(4569).

- Wang, Haifeng, Marie La Russa, and Lei S. Qi. 2016. "CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond." *Annual Review of Biochemistry* 85(1): 227–64.
<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-biochem-060815-014607>
(May 1, 2021).
- Xie, Nina, Yafang Zhou, Qiying Sun, and Beisha Tang. 2018. "Review Article Novel Epigenetic Techniques Provided by the CRISPR / Cas9 System." 2018.
- Xu, Duo et al. 2020. "CRISPR Screening Identifies WEE1 as a Combination Target for Standard Chemotherapy in Malignant Pleural Mesothelioma." *Molecular Cancer Therapeutics* 19(2): 661–72.
- Yang, Tian, Mingwei Chen, Tianjun Chen, and Asmitananda Thakur. 2015. "Expression of the Copper Transporters HCTR1, ATP7A and ATP7B Is Associated with the Response to Chemotherapy and Survival Time in Patients with Resected Non-Small Cell Lung Cancer." *Oncology Letters* 10(4): 2584–90.
- Yu, Jason S.L., and Kosuke Yusa. 2019. "Genome-Wide CRISPR-Cas9 Screening in Mammalian Cells." *Methods* 164–165(January): 29–35.
<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.04.015>.
- Zappa, Cecilia, and Shaker A. Mousa. 2016. "Non-Small Cell Lung Cancer: Current Treatment and Future Advances." *Translational Lung Cancer Research* 5(3): 288–300.
- Zheng, Min. 2016. "Classification and Pathology of Lung Cancer." *Surgical Oncology Clinics of North America* 25(3): 447–68.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.soc.2016.02.003>.
- Zhu, Tianhao et al. 2020. "Mechanisms and Future of Non-Small Cell Lung Cancer Metastasis." *Frontiers in Oncology* 10(November): 1–16.
- Zisowsky, Jochen et al. 2007. "Relevance of Drug Uptake and Efflux for Cisplatin Sensitivity of Tumor Cells." *Biochemical Pharmacology* 73(2): 298–307.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2006.10.003>.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimime başladığım günden beri maddi ve manevi her türlü desteğini esirgemeyen, her zaman bana güvenen, her sorunu anlayışla karşılayıp bilgi ve birikimleriyle yol gösteren, bir hocadan ziyade aileden biriymişim gibi davranan değerli danışmanım Doç. Dr. Buket KOSOVA'ya,

Tez çalışmam süresince akademik bilgileriyle yol gösteren, karşılaştığım her sorunu dinleyip içtenlikle beni motive eden, her zaman yanımda olup beni cesaretlendiren ve güvenini eksik etmeyen Doç. Dr. Vildan BOZOK ÇETİNTAŞ'a,

Doktora eğitimim süresince her konuda kapısını çaldığım, her sorunumu anlayışla karşılayıp pratik çözümleriyle kendisine hayran olduğum, her zaman desteğini esirgemeyeceğini bildiğim anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Cumhur GÜNDÜZ'e,

Tez çalışmalarımı yakinen takip eden, her konuda desteğini esirgemeyen, tecrübelerini paylaşmaktan çekinmeyen, karşılaştığım her sorunu içtenlikle dinleyip çözüm bulmaya çalışan Doç. Dr. Şerif ŞENTÜRK'e,

Eğitimim boyunca gerek akademik gerek sosyal hayatta bilgi ve deneyimlerini paylaşan anabilim dalımızın değerli öğretim üyeleri Doç. Dr. Nur SELVİ GÜNEL'e, Doç. Dr. Çığır BİRAY AVCI 'ya, Doç. Dr. Zuhale EROĞLU'na, Doç. Dr. Burçin TEZCANLI KAYMAZ'a, Doç. Dr. Aslı TETİK VARDARLI' ya ve Doç. Dr. Sunde YILMAZ SÜSLÜER 'e,

Tez çalışmalarımın her aşamasında benimle birlikte çalışan, her sorunda çözüm bulmaya çalışarak motivasyonumu yükselten, bıraktığım anda yaparız diyerek beni cesaretlendiren, maddi ve manevi her konuda desteğini esirgemeyen ve her zaman yanımda olacağını bildiğim Eda DOĞAN'a,

Her konuda elinden geleni yapacağını bildiğim, çalışmalarım esnasında da desteğini eksik etmeyen ve her zaman yardımcı olmaya çalışan Arş. Gör. Çevik GÜREL'e ve Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine,

Tez çalışmalarımın her aşamasında yol gösterici olan, her zaman bilgi ve birikimlerini paylaşan, her karşılaştığım sorunda farklı çözüm önerileri sunan Ece ÇAKIROĞLU'na,

Akademik hayata başladığım günden beri her konuda desteklerini eksik etmeyen, her sorunumu kendi sorunuymuş gibi ilgilenip çözüm bulmaya çalışan, her anımda yanımda olan kader arkadaşlarım Arş. Gör. Neslihan Pınar ÖZATEŞ'e, Araş. Gör. Bakiye GÖKER BAĞCA'ya ve Arş. Gör. Aycan AŞIK'a,

Doktora eğitimime başladığım günden beri bilgi, destek ve güleryüzünü esirgemeyen, her konuda beni dinleyen ve yanımda olan Arş. Gör. Dr. Duygu AYGÜNEŞ'e,

Tez çalışmalarım esnasında her konuda yardımcı olmaya çalışan Arş. Gör. Mesude ANGIN'a, Bengisu ULUATA DAYANÇ'a, Sude ERİŞ'e, Zafer YILDIRIM'a, Latife Merve OKTAY'a, Ege SEVİNÇ'e,

Hayatıma girdiği günden itibaren her zaman yanımda olarak desteğini esirgemeyen, yoğun tez çalışma dönemlerimde bile sabırlı ve anlayışlı olarak sevgi ve saygısını hiç eksik etmeyen eşim ONUR KARA'ya

Doğduğum günden beri her zaman yanımda olan, benim için en iyiyi isteyen, hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, sonsuz emek harcayan ve buralara gelmemi sağlayan en başta en büyük destekçim annem olmak üzere babama ve kardeşime,

Doğduğu günden beri hayatımın anlamını değiştiren, yeni bir ben yapan, bütün sorunlarımı onunla unuttuğum ve varlığına hep şükrettiğim biricik kızım Miray KARA'ya,

Sonsuz teşekkür ederim...

Son olarak Çalışmamızı TOA-2021-22673 nolu Öncelikli Alan Projesi olarak destekleyen Ege Üniversitesi Rektörlüğü'ne teşekkür ederim.

İzmir, 2021

Hale GÜLER KARA

ÖZGEÇMİŞ

2011 yılında Pamukkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden mezun oldu. 2013 yılında Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalına Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP) kapsamında araştırma görevlisi olarak atandı. 2013 bahar döneminde lisansüstü eğitim için, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı. Yüksek lisans eğitimini tamamlayınca 2015 sonbahar döneminde doktora eğitimi için, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na görevlendirildi.

e-posta: berkayozdemir@ege.edu.tr

