

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**PANKREATİK GENLERİN CRISPR YÖNTEMİ İLE AKTİVASYONU
ESNASINDA FARKLI dCas9-AKTİVATÖR KOMPLEKSLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Adem KABA

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

KASIM 2020

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**PANKREATİK GENLERİN CRISPR YÖNTEMİ İLE AKTİVASYONU
ESNASINDA FARKLI dCas9-AKTİVATÖR KOMPLEKSLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Adem KABA

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

KASIM 2020

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PANKREATİK GENLERİN CRISPR YÖNTEMİ İLE AKTİVASYONU
ESNASINDA FARKLI dCas9-AKTİVATÖR KOMPLEKSLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Adem KABA

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Bu tez Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FYL-
2020-4878 nolu proje ile desteklenmiştir.**

KASIM 2020

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PANKREATİK GENLERİN CRISPR YÖNTEMİ İLE AKTİVASYONU
ESNASINDA FARKLI dCas9-AKTİVATÖR KOMPLEKSLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI

Adem KABA
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS

Bu tez 20/11/2020 tarihinde jüri tarafından oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

JÜRİ: Doç. Dr. Mehmet Fatih CENGİZ (Danışman)
Doç. Dr. Hasan MEYDAN
Dr. Öğr. Üyesi Ercan Selçuk ÜNLÜ



ÖZET

PANKREATİK GENLERİN CRISPR YÖNTEMİ İLE AKTİVASYONU ESNASINDA FARKLI dCas9-AKTİVATÖR KOMPLEKSLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Adem KABA

Yüksek Lisans, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mehmet Fatih CENGİZ

2. Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ersin AKINCI

Kasım 2020; 70 sayfa

Diyabet (*Diabetes mellitus*) insülin hormonunun olmaması ya da etkisindeki yetersizlik sonucu oluşan, hiperglisemi ile karakterize edilen, metabolik bir hastalıktır. İnsülin bağımlı tip 1 ve insülin bağımsız tip 2 diyabet olmak üzere iki çeşittir. Her iki diyabet çeşidinde de sonuçta insülin üreten pankreatik β hücreleri hasar gördüğü için insülin yetmezliği görülmektedir. Günümüz tedavi yöntemlerine alternatif olarak farklı hücre tiplerinden β hücresi üretilmesi ve üretilen bu hücrelerin kişiye transplantasyonu sonucunda diyabet hastalığının kalıcı bir şekilde tedavi edilmesi planlanmaktadır. β hücresi olmayan hücrelerin insülin üreten hücrelere yeniden programlanması diyabetin tedavisi için potansiyel olarak yeni rejeneratif yaklaşımlar sunmaktadır. Bu kapsamda *Pdx1* geniyle beraber *Ngn3* ve *MafA* genlerinin β hücresinin oluşturulmasında ve farklılaşmasında esas transkripsiyon faktörleri olduğu gösterilmiştir.

Son yıllarda gen düzenlemede kullanılmaya başlanılan CRISPR/Cas sistemiyle beraber bir genin aktivasyonunun arttırılması/azaltılması ya da genin susturulması çok daha kolay hale gelmiştir. Bir genin aktivasyonunu arttırmak için dCas9 proteini ve aktivatör domain yapıları kullanılmaktadır. VP64, VPR ve p300 bu aktivatör domainlerden en sık kullanılanlarıdır. Ancak bu aktivatörlerin aktivasyon verimleri her bir gen için farklılık göstermektedir. Aktivatörlerin yönlendirildikleri promotor bölgesinin transkripsiyon başlama noktasına uzaklığı da aktivasyon verimini etkileyen diğer bir parametredir ve yine her bir gen için farklılık göstermektedir. Bu tez çalışmasında amaç CRISPR/dCas9 aktivasyon sisteminde *Pdx1* ve *Ngn3* genlerinin aktivasyonu için en ideal gRNA promotor bölgelerinin ve aktivatör domaininin (VP64, VPR ve p300) belirlenmesidir. Sonrasında en ideal gRNA ve aktivatör domain kombinasyonu ile endogenik genlerin aktivasyonu yoluyla β hücresi programlamaktır. Yapılan çalışmalar sonucunda *Pdx1* ve *Ngn3* geninin aktivasyonu için hedeflenmesi gereken promotor bölgeleri belirlenmiştir. Ayrıca her iki gen için aktivasyonu en çok arttıran aktivatör domainin VPR olduğu belirlenmiştir. Endogenik genlerin CRISPR-dCas9 ile aktivasyonu sonucu yoluyla insülin üretebilen β hücre benzeri hücrelerin oluştuğu görülmüştür.

ANAHTAR KELİMELER: β hücre programlaması, CRISPR/dCas9, Diyabet, Gen düzenleme, İnsülin, *Ngn3*, p300, *Pdx1*, VP64, VPR

JÜRİ: Doç. Dr. Mehmet Fatih CENGİZ

Doç. Dr. Hasan MEYDAN

Dr. Öğr. Üyesi Ercan Selçuk ÜNLÜ

ABSTRACT

COMPARISON OF DIFFERENT dCas9-ACTIVATOR COMPLEXES DURING ACTIVATION OF THE PANCREATIC GENES BY CRISPR METHOD

Adem KABA

MSc Thesis in The Department of Agricultural Biotechnology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mehmet Fatih CENGİZ

2nd Supervisor: Asst. Prof. Dr Ersin AKINCI

November 2020; 70 pages

Diabetes mellitus is a metabolic disease characterized by the absence of insulin hormone or inadequate effect, characterized by hyperglycemia. There are two types of insulin-dependent type 1 and insulin-independent type 2 diabetes. In both diabetes, insulin deficiency is seen as the pancreatic beta cells that produce insulin are damaged. As an alternative to today's treatment methods, it is planned to produce β cells from different cell types and to permanently treat diabetes disease as a result of the transplantation of these cells to the person. Reprogramming non- β cells to insulin-producing cells offer potentially new regenerative approaches for the treatment of diabetes. *Ngn3* and *MafA* genes, along with the *Pdx1* gene, have been shown to be essential transcription factors in beta cell formation and differentiation.

With the CRISPR/Cas system, which has been used in gene regulation in recent years, it has become much easier to increase/decrease the activation of a gene or to silence the gene. To increase activation of a gene, dCas9 protein and activator domain structures are used. VP64, VPR and p300 are the most frequently used activator domains. However, the activation efficiencies of these activators differ for each gene. The distance of the promoter region from which the activators are directed to the transcription start point is another parameter that affects the activation efficiency and again differs for each gene. The aim of this thesis is to determine the most ideal gRNA promoter regions and the most ideal activator domain (VP64, VPR and P300) for activation of *Pdx1* and *Ngn3* genes in the CRISPR/dCas9 activation system. Then the most ideal gRNA and activator domain combination is to program the β cell through the activation of endogenic genes. As a result of the studies, the promoter regions to be targeted for the activation of the *Pdx1* and *Ngn3* gene were determined. In addition, it was determined that the activator domain that increases activation most for both genes is VPR. It has been observed that β cell-like cells that can produce insulin are formed through the activation of endogenic genes with CRISPR-dCas9.

KEYWORDS: β Cell Reprogramming, CRISPR dCas9, Diabetes, Gene editing, Insulin, *Ngn3*, p300, *Pdx1*, VP64, VPR

COMMITTEE: Assoc. Prof. Dr. Mehmet Fatih CENGİZ

Assoc. Prof. Dr. Hasan MEYDAN

Asst. Prof. Dr. Ercan Selçuk ÜNLÜ

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında CRISPR/dCas9 teknolojisi ile pankreatik genlerin aktivasyonu ele alınmıştır. Bu çalışmadan elde edilen verilerin bundan sonraki çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

Tez çalışmam boyunca bilgi ve deneyimi ile maddi ve manevi her konuda bana destek olan, araştırmacı kimliği kazanmamı sağlayan ve her zaman daha iyisini yapabileceğimi gösteren danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ersin AKINCI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum. Aynı zamanda Ersin Hoca'nın yokluğunda bana kattığı bilgi, deneyim ve her türlü yardımı için danışman hocam Sayın Doç. Dr. Mehmet Fatih CENGİZ'e teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitimim ve öğretimim boyunca bana inanan, güvenen ve laboratuvar imkanlarını benden esirgemeyen bütün bölüm hocalarıma da teşekkür ederim.

Tez çalışmamda bana yardımcı olan, teorik ve pratik bilgilerini benimle paylaşan, her zaman yanımda olan, maddi ve manevi her türlü desteği sağlayan ve aynı laboratuvarı paylaştığım başta Fatma AKÇAKALE olmak üzere, Pelin ÜNAL, Gamze BADAĞUL, Mehmet YILDIZ, Fadime DEMİREL, Merve ILGIN BÜYÜKSINDIR'a ayrıca arkadaşlarım Fatma Nur DEMİR, Emirhan CİHAN ve Muhammed BÜYÜKSINDIR'a sonsuz teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde bana koşulsuz destek olan, her zaman hayallerimin peşinden koşmama yardım eden, kendilerinden ödün vererek her türlü fedakarlığı yapan ve bugünlere gelmemi sağlayan canım annem Fatma KABA ve babam Ahmet KABA'ya, sevgili kardeşlerim Fatih KABA, Yavuz KABA, Ayşe AKÇAIİR, Feyza ÇIRGILOĞLU, Fatmanur KOCAMAN, geleceğin mimarı Ebubekir KABA'ya, yengelerime, enişterime ve yeğenlerime çok ama çok teşekkür ederim. Biliyorum ki bundan sonraki akademik hayatımdaki başarılarımın arkasında da yine KABA ailesi olacaktır.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ.....	v
AKADEMİK BEYAN.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
1. 1. Diyabet.....	1
1. 1. 1. Tip 1 diyabet.....	1
1. 1. 2. Tip 2 diyabet.....	1
1. 2. Pankreas.....	2
1. 2. 1. İnsülin.....	3
1. 2. 2. β hücre gelişimi ve olgunlaşması.....	4
1. 3. <i>Pdx1</i> , <i>Ngn3</i> ve <i>MafA</i> 'nın Biyolojik Özellikleri.....	6
1. 3. 1. <i>Pdx1</i>	6
1. 3. 2. <i>Ngn3</i>	7
1. 3. 3. <i>MafA</i>	7
1. 4. <i>Pdx1</i> , <i>Ngn3</i> ve <i>MafA</i> Arasındaki Etkileşim.....	8
1. 5. CRISPR/dCas9 Aktivasyon Sistemi.....	9
1. 5. 1. VP64.....	12
1. 5. 2. VPR.....	13
1. 5. 3. p300.....	13
2. KAYNAK TARAMASI.....	16
3. MATERYAL VE METOT.....	18
3. 1. Kullanılan Materyaller.....	18
3. 2. Deneylede Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	19
3. 3. kPZR için Kullanılan Primerler.....	21
3. 4. İmmünofloresan Boyama için Kullanılan Antikorlar ve Dilüsyon Oranları.....	21
3. 5. DNA ve RNA Örneklerinin Miktar Tayininin Yapılması.....	21
3. 6. Kompotent Hücre Hazırlanması.....	22

3. 7. <i>Pdx1</i> ve <i>Ngn3</i> Genleri için gRNA Primerlerinin Tasarlanması	22
3. 7. 1. pSPgRNA plazmitinin kesim işlemi.....	23
3. 7. 2. pSPgRNA plazmitinin jelden izolasyonu	23
3. 7. 3. <i>Pdx1</i> ve <i>Ngn3</i> gRNA primerlerin birleştirilmesi	23
3. 7. 4. <i>Pdx1</i> ve <i>Ngn3</i> gRNA primerlerinin pSPgRNA plazmitine ligasyonu.....	24
3. 7. 5. Bakteri transformasyonu.....	24
3. 7. 6. Plazmit izolasyonu.....	24
3. 8. HEK293 Hücre Kültürü.....	24
3. 8. 1. HEK293 hücrelerine transfeksiyon.....	25
3. 8. 2. RNA izolasyonu.....	25
3. 8. 3. DNaz uygulaması ve cDNA üretimi.....	26
3. 9. Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (kPZR).....	26
3. 10. İmmünofloresan Boyama	26
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	28
4. 1. <i>Pdx1</i> Geni için İdeal gRNA'ların Belirlenmesi	29
4. 1. 1. Seçilen gRNA plazmitlerin dCas9-VP64 plazmiti ile transfeksiyonu.....	29
4. 1. 2. Seçilen gRNA plazmitlerin dCas9- VPR plazmiti ile transfeksiyonu	30
4. 1. 3. Seçilen gRNA plazmitlerin dCas9-p300 plazmiti ile transfeksiyonu.....	31
4. 1. 4. <i>Pdx1</i> için belirlenen en iyi 4 gRNA'nın birlikte transfeksiyonu ve <i>Pdx1</i> gen aktivasyon düzeyi.....	32
4. 2. <i>Ngn3</i> Geni için İdeal gRNA'ların Belirlenmesi	34
4. 2. 1. Seçilen gRNA plazmitlerin dCas9-VP64 plazmiti ile transfeksiyonu.....	34
4. 2. 2. Seçilen gRNA plazmitlerin dCas9- VPR plazmiti ile transfeksiyonu	35
4. 2. 3. Seçilen gRNA plazmitlerin dCas9-p300 plazmiti ile transfeksiyonu.....	36
4. 2. 4. <i>Ngn3</i> için belirlenen en iyi 4 gRNA'nın birlikte transfeksiyonu ve <i>Ngn3</i> gen aktivasyon düzeyi.....	37
4. 3. <i>Pdx1</i> ve <i>Ngn3</i> için Belirlenen 8 gRNA'nın Birlikte Transfeksiyonu ve Önemli β Hücre Genlerin Aktivasyon Düzeyleri	39
4. 4. Gen Aktivasyonu Sonucu Proteinlerin Belirlenmesi.....	41
5. SONUÇLAR.....	42
6. KAYNAKLAR	44
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum "Pankreatik Genlerin CRISPR Yöntemi ile Aktivasyonu Esnasında Farklı dCas9-Aktivatör Komplekslerinin Karşılaştırılması" adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

20/11/2020

Adem KABA



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

μL	: mikrolitre
bp	: baz çifti
dk	: dakika
\square	: delta
g	: gram
kb	: kilobaz
M	: molar
mg	: miligram
mL	: mililitre
mM	: milimolar
ng	: nanogram
nm	: nanometre
$^{\circ}\text{C}$: santigrat
rpm	: dakikadaki devir sayısı
sn	: saniye
V	: volt
α	: alfa
β	: beta
ε	: epsilon

Kısaltmalar

DM : *Diabetes mellitus*

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA : Deoksiribo Nükleik Asit

EDTA : Etilendiamin Tetra Asetik Asit

FBS : Fetal Bovin Serum

HEK : Human Embriyonic Kidney

kPZR : Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

LB : Luria-Bertani

NEB : New England Biolabs

OD : Optik Dansite

PBS : Phosphate Buffered Saline

PZR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RNA : Ribo Nükleik Asit

SOC : Super Optimal Broth

TAD : Transkripsiyonel Aktivasyon Domaini

TAE : Tris-Asetik Asit-EDTA

TBN : Transkripsiyon Başlama Noktası

TF : Transkripsiyon Faktörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Pankreasın anatomik yapısı	2
Şekil 1.2. Pankreastaki Langerhans adacığı ve pankreatik hücrelerin genel görünümü...	3
Şekil 1.3. Pankreatik β hücrelerinde insülinin sentezi ve olgunlaşması	4
Şekil 1.4. Pankreatik hücrelerin gelişim aşamaları ve gelişiminde rol alan genler	6
Şekil 1.5. Önemli pankreatik genlerden <i>Pdx1</i> , <i>Ngn3</i> ve <i>MafA</i> 'nın embriyonik dönemde ve sonrasındaki ekspresyon seviyeleri.....	8
Şekil 1.6. CRISPR/Cas bağışıklığının üç aşaması.....	10
Şekil 1.7. dCas9 proteininin fonksiyonel domainleri ve mutasyona uğratılan noktalar.....	11
Şekil 1.8. CRISPR/dCas9 sistemiyle gen aktivasyonunun arttırılması ya da azaltılması	11
Şekil 1.9. CRISPR/Cas gen düzenleme sistemlerinde kullanılan efektör örnekleri	12
Şekil 1.10. dCas9-VP64 aktivatörünün yapısı	12
Şekil 1.11. dCas9-VPR aktivatörünün yapısı	13
Şekil 1.12. p300 histon proteinlerini asetilleyerek aktivasyonu arttırması.....	13
Şekil 1.13. Memelilerde N-terminal histon kuyruğu asetilasyonlarına genel bakış	14
Şekil 4.1. dCas9-VP64_GFP plazmiti verilmiş HEK293 hücrelerinin 24 saat inkübasyon sonundaki mikroskop görüntüsü.....	28
Şekil 4.2. <i>Pdx1</i> geni için belirlenen 10 gRNA'nın dCas9-VP64 plazmitiyle yapılan aktivasyon sonuçları.....	29
Şekil 4.3. <i>Pdx1</i> geni için belirlenen 10 gRNA'nın dCas9-VPR plazmitiyle yapılan aktivasyon sonuçları.....	30
Şekil 4.4. <i>Pdx1</i> geni için belirlenen 10 gRNA'nın dCas9-p300 plazmitiyle yapılan aktivasyon sonuçları.....	31
Şekil 4.5. <i>Pdx1</i> geninin aktivasyonu için belirlenen en ideal 4 gRNA'nın aynı anda hücrelere dCas9-aktivatör plazmitleriyle lipofeksiyonu sonucu elde edilen <i>Pdx1</i> ipgeninin aktivasyon sonuçları.....	32

Şekil 4.6. <i>Pdx1</i> için belirlenen gRNA'ların <i>Pdx1</i> promotoruna bağlandıkları bölgeler.....	33
Şekil 4.7. <i>Pdx1</i> geninin promotor bölgesindeki önemli gen motifleri ve seçilen 4 gRNA'nın bağlandığı düzenleyici bölgeler	33
Şekil 4.8. <i>Ngn3</i> geni için belirlenen 8 gRNA'nın dCas9-VP64 plazmitiyle yapılan aktivasyon sonucu	34
Şekil 4.9. <i>Ngn3</i> geni için belirlenen 8 gRNA'nın dCas9-VPR plazmitiyle yapılan aktivasyon sonuçları.....	35
Şekil 4.10. <i>Ngn3</i> geni için belirlenen 8 gRNA'nın dCas9-p300 plazmitiyle yapılan aktivasyon sonucu	36
Şekil 4.11. <i>Ngn3</i> geninin aktivasyonu için belirlenen en ideal 4 gRNA'nın aynı anda hücrelere dCas9-aktivatör plazmitleriyle lipofeksiyonu sonucu elde edilen <i>Ngn3</i> geninin aktivasyon sonuçları	37
Şekil 4.12. <i>Ngn3</i> için belirlenen gRNA'ların <i>Ngn3</i> promotorüne bağlanma bölgeleri ..	38
Şekil 4.13. <i>Ngn3</i> geninin promotor bölgesindeki önemli gen motifleri ve seçilen 4 gRNA'nın bağlandığı düzenleyici bölgeler	38
Şekil 4.14. Önemli pankreatik genlerden <i>Pdx1</i> , <i>Ngn3</i> , <i>MafA</i> ve <i>Ins</i> genlerinin aktivasyon sonuçları.....	40
Şekil 4.15. Önemli pankreatik genlerden <i>Nkx2.2</i> , <i>Nkx6.2</i> , <i>Pax4</i> , <i>Glut2</i> ve <i>Kir6.2</i> genlerinin aktivasyon sonuçları	40
Şekil 4.16. <i>Pdx1</i> geninin belirlenen 4 gRNA ve dCas9-VPR plazmiti ile aktivasyonu sonucu Anti-Pdx1 (yeşil) ve DAPI (mavi) immün boyama sonucu	41
Şekil 4.17. <i>Ngn3</i> geninin belirlenen 4 gRNA ve dCas9-VPR plazmiti ile aktivasyonu sonucu Anti-Ngn3 (yeşil) ve DAPI (mavi) immün boyama sonucu	41

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Kullanılan materyaller ve katalog numaraları	18
Çizelge 3.3. kPZR için kullanılan endogen primer dizileri	21
Çizelge 3.4. İmmünofloresan boyamada kullanılan antikorlar ve dilüsyon oranları.....	21
Çizelge 3.5. <i>Pdx1</i> geni için tasarlanan gRNA'lar	22
Çizelge 3.6. <i>Ngn3</i> geni için tasarlanan gRNA'lar.....	23

1. GİRİŞ

1.1. Diyabet

Diabetes mellitus (DM), insülin hormonunda ya da etkisindeki yetersizlik sonucu oluşan, hiperglisemi ile karakterize edilen metabolik bir hastalıktır. İnsülin bağımlı tip 1 (T1D) ve insülin bağımsız tip 2 diyabet (T2D) olmak üzere iki tiptir. T1D, pankreastaki beta (β) hücrelerinin immün sistem tarafından tahrip edildiği ve böylece ekzojen insülin tedavisine ömür boyu bağımlı olunmasına neden olan otoimmün bir hastalıktır (van Belle vd. 2011). Kişilerin insülin tedavisine ömür boyu bağımlı olması hipoglisemik olaylara, enjeksiyon bölgesi komplikasyonlarına, insülin direncine ve alerjiye yol açabilmektedir. Ayrıca bu yöntemle bazı hastaların kan şekeri seviyesini kontrol etmekte zorlandığı da bilinmektedir. Adacık hücre transplantasyonu glisemik kontrolün sağlanmasına ve ciddi hipoglisemik olaylardan korunmaya yardımcı olan umut verici deneysel tedavi seçeneği olarak ortaya çıkmıştır. Ancak donör kaynaklarının yetersizliği, transplant reddi ve yaşam boyu immün sistem baskılanması nedeniyle bu deneysel tedavi yönteminin uygulanması sınırlı kalmıştır (Zhu vd. 2017). T2D’de ise pankreas β hücreleri insülin üretmektedir. Fakat üretilen bu insülin hormonuna hedef hücreler düzgün bir şekilde cevap verememektedir ve kandaki glikozu alıp işleyememektedir. Sonuç olarak β hücreleri yüksek düzeyde insülin üretmeye zorlandıkları için hasar görmekte ve insülin yetmezliği görülmektedir. Her iki diyabette de sonuçta β hücreleri hasar gördüğü için insülin yetmezliği görülmektedir (Bluestone vd. 2010). Günümüz tedavi yöntemlerine alternatif olarak farklı hücre tiplerinden β hücresi üretilmesi ve üretilen bu hücrelerin kişiye transplantasyonu sonucunda diyabet hastalığının kalıcı bir şekilde tedavi edilmesi planlanmaktadır (İtkin-Ansari ve Levine 2004). Çağımızın en önemli metabolik hastalığı olan DM tıp literatüründe T1D ve T2D olmak üzere iki ana grupta sınıflandırılmaktadır.

1.1.1. Tip 1 diyabet

T1D’de insülin salgılayan pankreatik β hücreleri otoimmün bir atak sonucu yok olmaktadır. β hücrelerinin, dolayısıyla insülin hormonunun ortadan kalkması, glikozun hedef hücrelerce (karaciğer, kas ve adipoz doku hücreleri gibi) alınıp işlenmesini engellemektedir ve kandaki glikoz miktarı aşırı derecede yükselmektedir. T1D’de β hücrelerinin kaybı hastalığın hemen başında otoimmün bir atak sonucu meydana gelmektedir (Bluestone vd. 2010).

1.1.2. Tip 2 diyabet

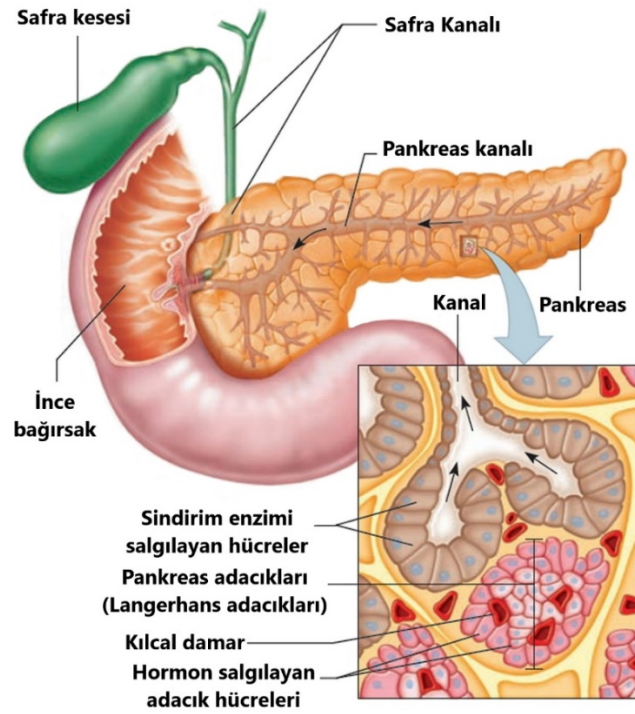
T2D’de β hücreleri halen mevcuttur ve insülin üretmektedir. Ancak hedef hücreleri (kas, yağ ve karaciğer hücreleri) bir şekilde insülin hormonuna düzgün bir şekilde cevap verememekte ve kandaki glikozu alıp işleyememektedir. T2D’de β hücrelerinin kaybı, β hücrelerinin hedef hücreleri insülin ile uyarabilme çabası nedeniyle aşırı insülin üretmeye başlaması ve bunun sonucunda da apoptoza girmesiyle hastalığın ilerleyen evrelerinde gerçekleşmektedir (Bluestone vd. 2010).

T1D’nin hemen başında, T2D’nin ise ilerleyen evrelerinde karşımıza çıkan β hücresi ve dolayısıyla insülin hormonunun kaybı diyabet hastalığının temel nedeni olduğu için, diyabet hastaları insülin hormonunu dışarıdan devamlı olarak almalı ya da

insülin sağlayan yeni bir kaynak vücut içinde oluşturulmalıdır (Itkin-Ansari ve Levine 2004). Öte yandan düzgün bir glikoz homeostazisi için vücudun ihtiyaç duyduğu insülin miktarı kandaki glikoz miktarına bağlıdır ve bu miktar diyet ve fiziksel aktiviteye bağlı olarak sürekli değişkenlik göstermektedir. Bu nedenle kandaki glikoz miktarının devamlı ve doğru takibi de önem arz etmektedir.

1.2. Pankreas

Pankreas, hem ekzokrin bezlerinden (sindirim enzimlerini bağırsak lümenine salgılayan) hem de hormonları doğrudan kan akışına salgılayan Langerhans adacıkları olarak adlandırılan endokrin bezlerinden oluşan karmaşık bir organdır (Şekil 1.1). Sadece 10 cm uzunluğunda ve yaklaşık 100 gram ağırlığında olmasına rağmen, pankreas günde yaklaşık 1500 mL pankreas sıvısı salgılayabilmektedir (Cade ve Hanison 2017). Normal insan pankreasında, her biri on ila binlerce hücreden oluşan toplamda 1-2 milyon adacık bulunmaktadır. Adacıklar şekil olarak ovaldir ve pankreas kuyruğunda daha fazla olmasına rağmen pankreas boyunca dağılmıştır. Langerhans adacıklarında α (alfa), β , δ (delta), PP (pankreatik polipeptid) ve ϵ (epsilon) hücreleri olmak üzere 5 ana salgı hücresi bulunmaktadır (Cade ve Hanison 2017).

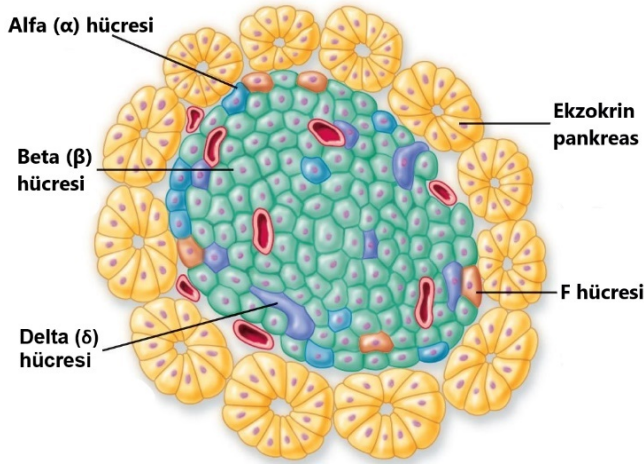


Şekil 1.1. Pankreasın anatomik yapısı (Anonymous 1)

Pankreastaki α hücreleri esas olarak glukagon salgılamakta ve adacık hücrelerinin yaklaşık %35'ini oluşturmaktadır. Pankreatik β hücreleri sayıca fazladır ve adacık hücrelerinin yaklaşık %55'ini oluşturmaktadır. β hücreleri insülin ve adacık amiloid polipeptidi (IAPP) olarak da bilinen amilin üretmektedir. Pankreatik δ hücreleri somatostatin salgılamakta ve adacık hücreleri içerisinde sayıca %10'dan az bulunmaktadır. Pankreatik polipeptit salgılayan pankreas PP hücreleri %5'ten azdır.

Pankreatik ϵ hücreleri grelin üretir ve adacık hücrelerinin ise %1'inden daha azını oluşturmaktadır (Cade ve Hanison 2017).

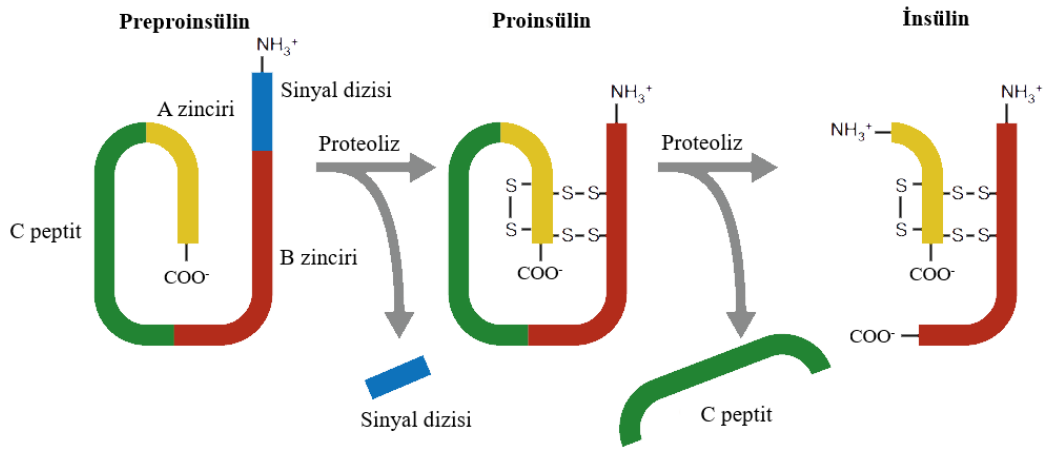
Adacık hücrelerinin merkezinde β hücreleri bulunurken periferde daha yakın konumda ise α ve δ hücreleri bulunmaktadır. Bu sayede kan adacık merkezine girip çevreye doğru ilerlerken salgılanan hormonal ürünleri taşıyarak hücreler arasında humoral iletişim kurulmasını sağlamaktadır (Şekil 1.2). Bu mekanizma β hücreleri tarafından salgılanan insülinin hücrelerin salgıları üzerinde etki yaratmasına izin vermektedir (Cade ve Hanison 2017). Pankreasın salgıladığı en önemli hormonlardan biri insülin dir ve kan şekerini düzenlemektedir.



Şekil 1.2. Pankreastaki Langerhans adacığı ve pankreatik hücrelerin genel görünümü (Anonymous 2)

1.2.1. İnsülin

İnsülin, kan şekeri seviyelerini kritik olarak düzenleyen ve sadece Langerhans'ın pankreatik adacıklarındaki β hücreleri tarafından üretilen bir polipeptit hormondur. (Ohneda vd. 2000; Melloul vd. 2002). Bu hormon glikoz metabolizmasının yanı sıra lipit ve protein metabolizmasını da düzenlemektedir (Cade ve Hanison 2017). İnsülin, 11. kromozomun kısa kolundaki tek bir gen tarafından kodlanır. Kandaki glikoz β hücre reseptörüne bağlanmakta ve glikoza maruz kalan β hücrelerinden yanıt olarak insülin sentezlenmekte ve salgılanmaktadır. Glikoz ilk olarak pankreatik β hücrelerinde preproinsülin adı verilen prohormon proteini olarak sentezlenmektedir. Daha sonra insülin ve C-peptit oluşturmak üzere proteazlar tarafından kesilir. Oluşan insülinde iki disülfid bağıyla bağlanan iki polipeptit zinciri bulunmaktadır (Cade ve Hanison 2017) (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. Pankreatik β hücrelerinde insülinin sentezi ve olgunlaşması (Cade & Hanison, 2017)

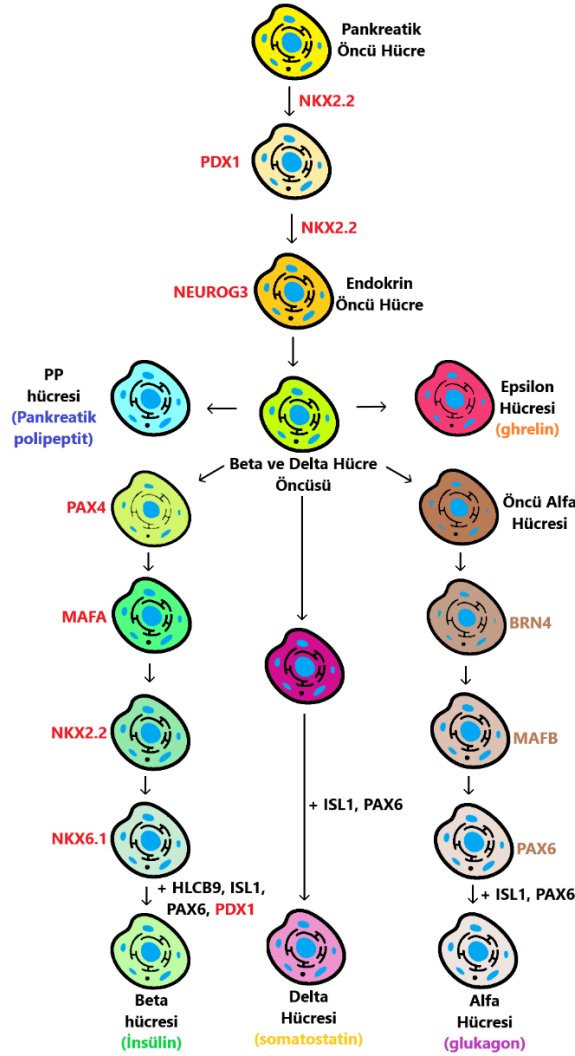
İnsülinin kana salınması için salgı granüllerine paketlenmesi gerekmektedir. İnsülinin yarılanma ömrü 4 dakikadır, karaciğer ve böbrekler tarafından hızla metabolize edilmektedir. Buna karşılık, C-peptit 30 dakikalık bir yarı ömre sahiptir ve böbrekler tarafından değişmeden atılmaktadır. Bu durum C-peptit'i endojen insülin salınımının yararlı bir biyobelirteci yapmaktadır. İnsülin β hücrelerinden uyarılmış ve uyarılmamış salgı olmak üzere iki mekanizma ile salınmaktadır. Uyarılmamış veya bazal salınım her 6-8 dakikada bir gerçekleşmektedir. Uyarılmış salgı, birkaç uyarana cevap olarak meydana gelmektedir ve ana uyarıcı hücre dışı glikozdur. Galaktoz, mannoz, asetilkolin ve bazı amino asitler (özellikle arjinin ve lösin) gibi diğer uyarıcılar da salgılamayı uyarıcı olarak işlev görebilmektedir (Cade ve Hanison 2017). İnsülinin yeterli miktarda salgılanması için glikoza duyarlı sağlıklı bir β hücresine ihtiyaç duyulmaktadır. Glikoza duyarlı bir β hücresinin oluşmasında birçok transkripsiyon faktörüne ihtiyaç duyulmaktadır.

1.2.2. β hücre gelişimi ve olgunlaşması

Transkripsiyon faktörleri gen ekspresyonunun düzenlenmesinde kritik rol oynamaktadır. Seçilen transkripsiyon faktörlerinin ektopik ekspresyonu, somatik hücrelerin kaderini değiştirip hücreleri farklı hücre tiplerine farklılaştırabilmektedir. Bu sürece hücresel yeniden programlama denir. β hücresi olmayan hücrelerin insülin üreten hücrelere yeniden programlanması T1D tedavisi için potansiyel olarak yeni rejeneratif yaklaşımlar sunmaktadır (Zhu vd. 2017). *Pdx1* (Pancreas/duodenum homeobox protein 1), *Foxa2* (Forkhead box A2) ve *Sox17* (Sex determining region Y-box 17) dahil olmak üzere erken pankreatik progenitor oluşumunda rol oynayan birkaç transkripsiyon faktörü bulunmaktadır. *Ngn3* (Neurogenin 3) ve *Neurod1* (Neurogenic differentiation 1) gibi bazı transkripsiyon faktörleri endokrin hücre spesifikasyonu ve farklılaşması için kritik öneme sahiptir. β hücresinin geç olgunlaşmasının *MafA* (V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A), *MafB* (V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B), *Pax6* (paired box gene 6) ve östrojene bağlı reseptör gama gibi faktörlerle düzenlendiği gösterilmiştir (Conrad vd. 2014; Yoshihara vd. 2016). Bu transkripsiyon faktörleri arasında *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA*

en kapsamlı araştırılanlardandır (Akinci vd. 2012; Banga vd. 2012). Pankreatik ekzokrin hücrelerinden (Lemper vd. 2015), hepatositlerden (Yang vd. 2017), bağırsak hücrelerinden (Lee vd. 2017), safra kesesi hücrelerinden (Galivo vd. 2017) ve kök hücrelerden (Raikwar ve Zavazava 2009) insülin pozitif hücrelerin farklılaşabildiği bildirilmiştir.

Literatürde β hücre gelişimi ve olgunlaşmasındaki önemli genler bildirilmiş olup bu genlerden *Ins* geni, insülin geninin ekspresyonunu sağlamaktadır (Kuroda vd. 2009). *MafA*; insülin gen ekspresyonunu, insülin biyosentezini, insülin salınımını ve glikoz metabolizmasının düzenlenmesini gerçekleştirmektedir. Aynı zamanda β hücresi fonksiyonlarında görev alan diğer genleri de düzenlemektedir (Aramata vd. 2007). *Nkx2.2*, insülin üreten β hücrelerinde eksprese edilir ve β hücre gelişimi için çok önemlidir (Prado vd. 2004). *Nkx6.2*, pankreas oluşumunda ve gelişiminde rol oynamaktadır (Pedersen vd. 2005). *Pax4*, β hücrelerinin farklılaşmasında ve gelişmesinde önemli bir görev almaktadır. Glukagon, insülin ve somatostatin promotorlarında ortak bir elemente bağlanan transkripsiyonel baskılayıcıdır (Plengvidhya vd. 2007). *Glut2* (*Slc2a2* olarak da bilinir), pankreastaki β hücrelerinin glikozu alması ile insülinin salınımında görev almaktadır. *Kir6.2*, ATP bağımlı potasyum duyarlı integral zar proteindir. Kan şekeriindeki dalgalanmalara göre hücre içerisindeki iyon dengesini ayarlamaktadır (Antcliff vd. 2005) (Şekil 1.4). Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada transkripsiyon faktörlerinin pankreas gelişimindeki etkileri araştırılmıştır. *Pdx1* geniyle beraber *Ngn3* ve *MafA* genlerinin β hücresi oluşumunda ve farklılaşmasında esas transkripsiyon faktörleri olduğu gösterilmiştir (Zhou vd. 2008). Bu genlerin β hücre farklılaşması için birbirleriyle olan etkileşimleri çok önemlidir ve yapılan çalışmalarla desteklenmiştir (Gradwohl vd. 2000; Akinci vd. 2012; Akinci vd. 2013; Zhu vd. 2017).



Şekil 1.4. Pankreatik hücrelerin gelişim aşamaları ve gelişiminde rol alan genler (Collombat vd. 2006)

1.3. *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA*'nın Biyolojik Özellikleri

1.3.1. *Pdx1*

İnsülin düzenleyici faktör 1 olarak da bilinen *Pdx1*, bir homeodomain transkripsiyon faktörüdür. *Pdx1* ekspresyonu farelerde 8.5 erken embriyonik dönemde (E8.5) gözlenmektedir (Miki vd. 2012). İnsanlarda ise dördüncü gebelik haftasında görülmektedir (Jennings vd. 2013). *Pdx1* pankreasın erken embriyonik gelişimi için gereklidir. 5 yaşındaki bir kız çocuğunda *Pdx1* genindeki tek nükleotit silinmesinden dolayı pankreas yokluğunun gözlemlendiği bildirilmiştir (Stoffers vd. 1997). *Pdx1* ayrıca pankreas hücrelerinin farklılaşması için de gereklidir. Olgun β hücrelerinde *Pdx1* geninin tükenmesi ve azalması, glikoz intoleransına neden olmaktadır, bu da *Pdx1*'in β hücre fonksiyonu için kritik role sahip olduğunu göstermektedir (Holland vd. 2002). *Pdx1*'in erken embriyonik dönemde pankreas oluşumunda, farklı endokrin hücrelerinin

tanımlanmasında ve β hücre fonksiyonunun olgunlaşmasında kritik rolleri vardır (Zhu vd. 2017). Önceki çalışmalar *Pdx1*'in transkripsiyonel koaktivatör p300 ile etkileşime girdiğini ve insülin promotörünü sinerjik olarak aktive ettiğini göstermiştir (Qiu vd. 1998; Mosley vd. 2004; Stanojevic vd. 2004).

1.3.2. *Ngn3*

Ngn3, merkezi sinir sistemi ve embriyonik pankreas gelişiminde rol oynayan temel helix-loop-helix transkripsiyon faktörü ailesinin bir üyesidir. Fare pankreasının embriyonik gelişim sırasında *Ngn3* ekspresyonu ilk önce E9'da dorsal pankreas epitelinde gözlenir, E9.5 ile E15.5 arasında artar sonra yeni doğan pankreasında çok düşük bir seviyeye düşmektedir (Apelqvist vd. 1999). İnsan pankreas gelişiminde, ekspresyon 8. haftadan itibaren görülmekte ve yaklaşık 11. haftada doruğa ulaşmaktadır (Jennings vd. 2013). *Ngn3* pankreas endokrin hücreleri için kritik öneme sahip proendokrin geni olarak kabul edilmektedir (Gradwohl vd. 2000). Fare embriyosundaki pankreas öncü hücrelerinde *Ngn3* geninin zorla ekspresyonu, *Pdx1* promotörünün kontrolü altında, başta α hücreleri olmak üzere endokrin hücre farklılaşmasına neden olmakta ve ekzokrin gelişimini bloke etmektedir. Bunun aksine *Ngn3* geninden yoksun olan (yetersiz ekspresyona sahip) farelerde dört adacık hücre tipi (α , β , \square , PP hücreleri) ve endokrin öncü hücreleri üretilememekte ve yeni doğan fareler diyabetten ölmektedir (Gradwohl vd. 2000). Şaşırtıcı bir şekilde *Ngn3* +/- heterozigot adacık hücrelerindeki *Pdx1*, *Nkx6.1*, *Glut2*, *MafA* ve *MafB* ekspresyonu *Ngn3* +/+ adacık hücrelerinden önemli bir fark göstermemektedir (Wang vd. 2010). *Ngn3*'ün β hücresi gelişimi ve işlevi için büyük önem taşıdığı açıktır. Bialelik mutasyona uğramış hastalarda kalıcı diyabet görülmektedir fakat heterozigot ebeveynler diyabetik olmadığından *Ngn3* gereksiniminin eşik seviyesi düşüktür (Zhu vd. 2017).

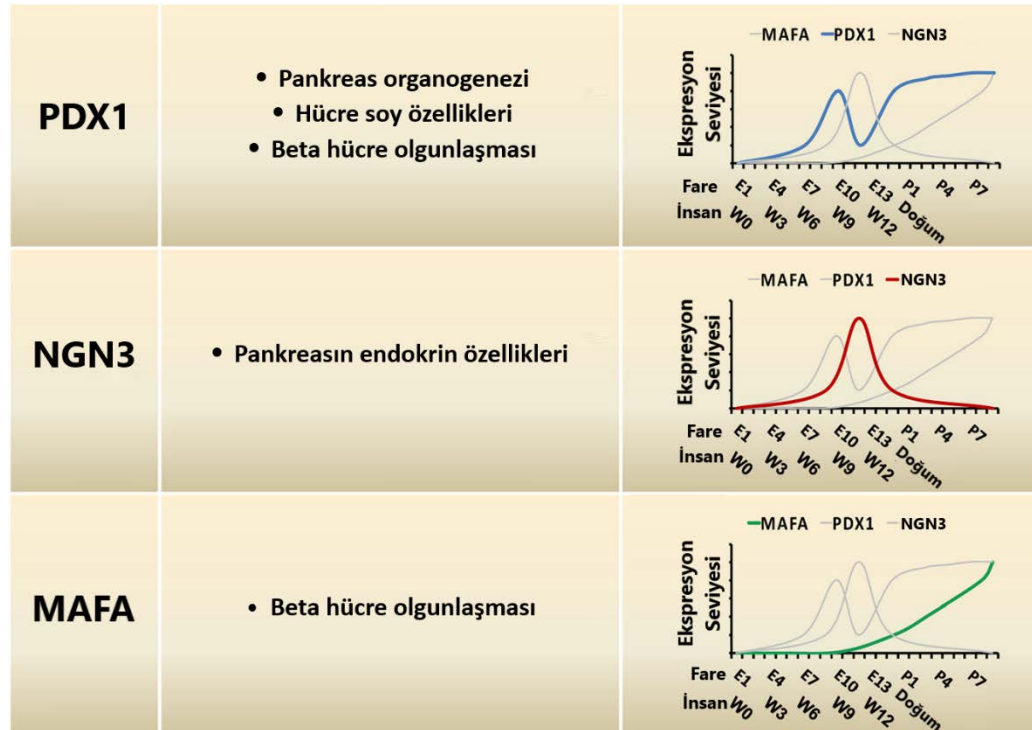
1.3.3. *MafA*

MafA, RIPE3b1 olarak da bilinen temel lösün fermuar MAF ailesinin bir üyesidir. Korunmuş bir insülin arttırıcı eleman RIPE3b1/C1-C2'ye spesifik olarak bağlanan ve insülin gen ekspresyonunu aktive eden bir transkripsiyon faktörü olarak tanımlanmaktadır. Farelerde insülin üreten hücreler ve sadece yetişkin pankreastaki β hücrelerinde eksprese edilmektedir (Matsuoka vd. 2004). İnsan embriyosunda 21. haftaya kadar neredeyse hiç *MafA* saptanmamakta, ekspresyon doğumdan sonra yavaş yavaş artmaktadır (Jeon vd. 2009) (Şekil 1.5). *MafA* ekspresyonunun glikoz ile uyarılan insülin ekspresyonu, β hücrelerinin olgunlaşması ve adacık hücrelerinin anormal yapısı ile ilişkili olduğu fareler üzerinde yapılan çalışmayla desteklenmiştir (Zhang vd. 2005). Bunun aksine adenoviral vektörler ile *MafA* aşırı eksprese edilirse, P2 neonatal adacıklarda glikoz cevabı elde edilebilmektedir (Aguayo-Mazzucato vd. 2011). T2D teşhisi konulan insanlar da glikoz ile uyarılan insülin salınımının bozulmasının *MafA* ekspresyon seviyesinin değişmesi ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir (Guo vd. 2013). Bunlara ek olarak *MafA*'nın fonksiyonel polimorfizmlerinin NOD (Non-obese diabetic) fare modelinde ve hastalarda T1D ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Noso vd. 2010; Noso vd. 2013). Rejeneratif yaklaşımlar için *MafA* ekspresyonunun indüksiyonu pluripotent kök hücrelerden fonksiyonel ve olgun β hücrelerin rejenere edilmesi içinde önemlidir. İnsan embriyonik kök hücrelerinde (hESCs) *MafA*'nın indüksiyonunun glikoz ile uyarılan insülin salınımının iyileştirilmesinde yararlı olduğu gösterilmiştir (Rezania vd. 2014). *Pdx1* pozitif pankreatik progenitörler veya *Ngn3* pozitif pankreatik endokrin

progenitörlerdeki *MafA*'nın normal gelişimsel ekspresyonu dışında, dışarıdan ekspresyonu β hücre farklılaşması için zararlıdır. Zamanlama ve *MafA*'nın uygun ekspresyon seviyesinin doğru β hücresi olgunlaşması için çok önemli olduğu vurgulanmıştır (Zhu vd. 2017).

1.4. *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* Arasındaki Etkileşim

β hücre gelişimi ve olgunlaşmasındaki bağımsız rollerine ek olarak *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* pankreatik gelişim sürecinde karşılıklı olarak etkileşime girmektedir (Şekil 1.5). İnsan β hücrelerinin sınırlı bulunabilirliği nedeniyle, üç transkripsiyon faktörünün arasındaki etkileşim kemirgen modellerinde daha iyi anlaşılmıştır. *Pdx1*, *Ngn3*'ün ekspresyonunu düzenlemektedir (Oliver-Krasinski vd. 2009). *Ngn3* transkript seviyesi ve *Ngn3* geninin ekspresyonunu düzenleyen diğer transkripsiyon faktörlerinin (*Sox9*, *Hnf6*, *Hnf1b*, *Foxa2*) ekspresyon seviyesi *Pdx1* geni mutasyona uğramış farelerde azalmaktadır. Bu durum *Pdx1*'in *Ngn3*'ü sadece pankreatik progenitör hücre oluşumundaki rolüyle değil doğrudan etkilediğini göstermektedir. *Pdx1* ayrıca *MafA*'nın ekspresyonunu da düzenlemektedir. *Pdx1* knock-out farelerdeki *MafA* gen ekspresyonunun yabani tip farelere kıyasla azaldığı gözlenmiştir (Sachdeva vd. 2009). hESC'lerde *Ngn3* geninin bozulması, *Pdx1* pozitif hücreleri marjinal olarak azalması *Ngn3* geninin *Pdx1* üzerinde minimal etkisi olduğuna işaret etmektedir. (Zhu vd. 2016). *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* arasındaki fonksiyonel etkileşimde diğer β hücresi faktörlerinde rol oynamaktadır. Örneğin *Pdx1* doğrudan *Neurod1* ile etkileşime girmekte ve insülin geninin enhansı üzerinde transkripsiyonel bir aktivasyon kompleksi oluşturmaktadır (Glick vd. 2000).



Şekil 1.5. Önemli pankreatik genlerden *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA*'nın embriyonik dönemde ve sonrasındaki ekspresyon seviyeleri (Zhu vd. 2017)

Çalışmalar üç transkripsiyon faktörünün (*Pdx1*, *Ngn3*, *MafA*) kombinasyonlarının aşırı ekspresyonunun çeşitli β olmayan hücre tiplerini insülin üreten hücrelere yeniden programlayabildiğini göstermiştir (Zhou vd. 2008; Akinci vd. 2012; Zhu vd. 2017). Son zamanlarda hücre farklılaştırma ve genom düzenlemede endojenik genlerin ekspresyonunun CRISPR/dCas9 sistemiyle yapılabileceği gösterilmiştir (D. Balboa vd. 2015; Chavez vd. 2015). CRISPR/Cas9 β hücre fonksiyonu mekanizmalarını incelemek için benzeri görülmemiş deneysel yaklaşımlar sunmaktadır. Transkripsiyonel düzenleme ve insan hücre hatlarındaki genomu düzenlemek için de kullanılabilir (Diego Balboa vd. 2019).

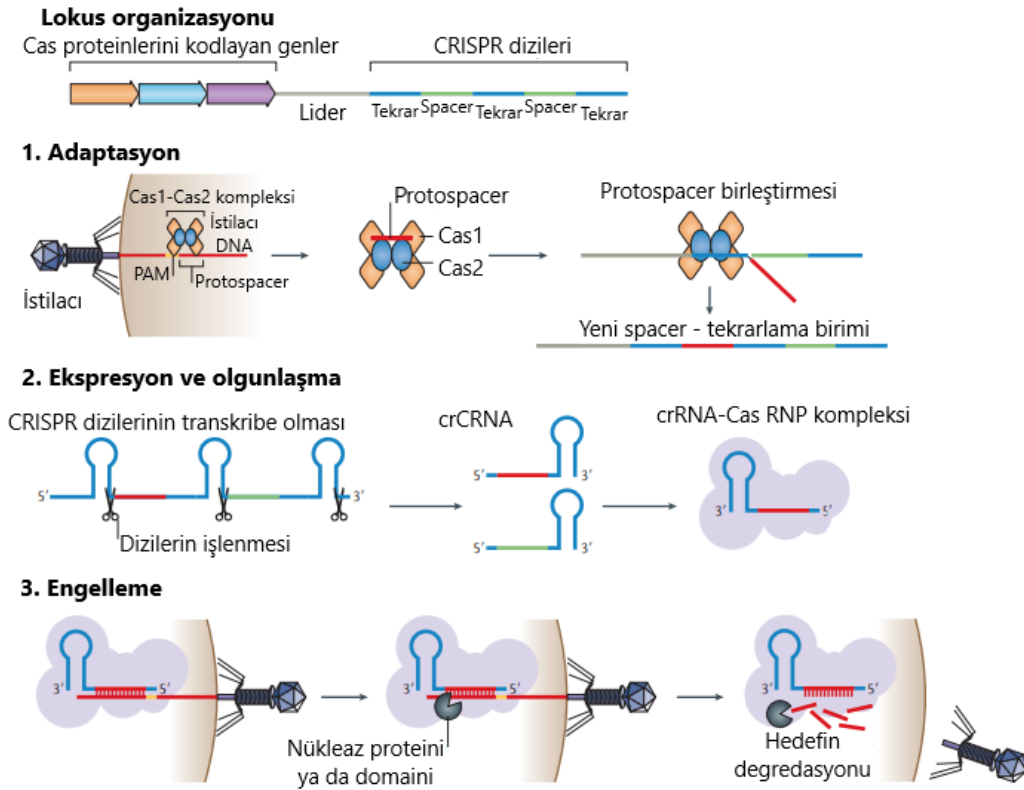
1.5. CRISPR/dCas9 Aktivasyon Sistemi

Sentetik transkripsiyon faktörleri; memeli sistemlerindeki birçok tıbbi ve bilimsel uygulamalarda gen ekspresyonunu kontrol etmek, doku rejenerasyonunu uyarmak (Rebar vd. 2002), genetik kusurları telafi etmek (Gräslund vd. 2005), susturulmuş tümör baskılayıcıları aktive etmek (Beltran vd. 2007), kök hücre farklılaşmasını kontrol etmek (Bartsevich vd. 2003; Bultmann vd. 2012), genetik taramalar yapmak (Blancafort vd. 2003; Park vd. 2003) ve sentetik genleri oluşturmak (Li vd. 2012; Lohmueller vd. 2012) için tasarlanmıştır. Bu transkripsiyon faktörleri endojen genlerin enhansır veya promotorlarını hedeflemek için (Beerli vd. 2000) ya da transgenleri regüle etmek (Garg vd. 2012) için kullanılmıştır. Bugüne kadar transkripsiyon faktörlerini hedeflemede kullanılan gen mühendisliğindeki ortak stratejiler çinko parmak nükleazlar (Beerli vd. 2000; Beerli ve Barbas 2002) ve transkripsiyon aktivatör-benzeri efektör nükleazlardır (Miller vd. 2011). Her ne kadar bu yöntemler birçok uygulama için yaygın olarak başarılı olsa da bu yöntemleri kullanarak yeni DNA bağlanma özelliğine sahip proteinleri üretmek için gerekli olan protokoller zahmetlidir ve uzmanlık gerektirmektedir (Perez-Pinera vd. 2013).

Bakteri ve arkealar, istilacı virüslere ve yabancı plazmitlere karşı RNA tabanlı düzenli aralıklarla kümelenmiş kısa palindromik tekrarlar (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR))/CRISPR ilişkili (CRISPR-associated (Cas)) olarak adlandırılan bir savunma sistemi geliştirmişlerdir (Jinek vd. 2013). Son zamanlarda *Streptococcus pyogenes*'in CRISPR sisteminin genom mühendisliği için insan hücrelerinde çalıştığı gösterilmiştir (Cho vd. 2013; Cong vd. 2013; Mali vd. 2013). Bu tip II CRISPR sisteminde Cas9 proteini kısa RNA'lar tarafından hedef bölgeye yönlendirilmektedir. Cas9 proteini endonükleaz olarak işlev görmekte ve bağlandığı DNA bölgesinde her iki zincirde kesik oluşturmaktadır. Bu sistemde Cas9 hedef DNA bölgesine kodlama yapmayan iki CRISPR RNA (crRNA) tarafından yönlendirilmektedir (Jinek vd. 2012). Bunlar trans aktive edici crRNA (tracrRNA) ve öncül crRNA (pre-crRNA)'lardır. Sentetik olarak yapılandırılmış CRISPR/Cas sisteminde bu iki kısa RNA tek bir kimerik kılavuz RNA (single guide RNA/sgRNA) olarak birleştirilmiştir (Jinek vd. 2012).

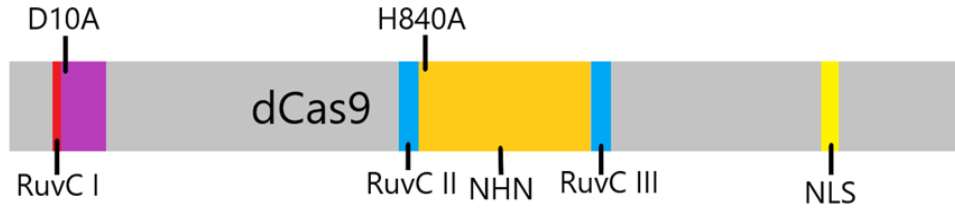
Bu savunma sistemi yabancı nükleik asitlerin sekansını spesifik olarak tespit eden ve susturan küçük RNA'lar üzerine kurulmuştur. CRISPR/Cas sistemi, operonlardan kontrol edilen *cas* genlerinden ve aynı tekrarlarla serpiştirilmiş genomu tanıyacak sekanslardan oluşan CRISPR dizilerinden oluşmaktadır (Terns ve Terns 2011; Wiedenheft vd. 2012). CRISPR/Cas aracılı savunma sistemi üç aşamada

gerçekleşmektedir (Şekil 1.6). İlk aşamada, virüs veya plazmitten gelen nükleik asitten alınan protoaralıklar CRISPR bölgesine eklenmektedir. Protoaralıkların seçimi istila eden organizmanın genomlarında bulunan protoaralık bitişik motifler (protospacer adjacent motif-PAM) konak organizma tarafından spesifik olarak tanınmaktadır (Jiang ve Doudna 2015). PAM sekansı 3-5 nükleotit dizisinden oluşan korunmuş dizilerdir (Barrangou ve Marraffini 2014). PAM sekansına sahip yabancı DNA, tekrarlayan gen dizileriyle beraber CRISPR bölgesine yerleştirilmektedir. İkinci aşamada, CRISPR bölgesine yerleştirilen dizi, öncü CRISPR RNA (pre-crRNA)'ya transkribe edilmektedir. Daha sonra, Cas enzimleri tarafından istila eden viral veya plazmid DNA'larını tanıyan ve eşleşebilen kısa crRNA'lara dönüştürülmektedir. crRNA, istilacı DNA'yı Watson-Crick baz eşleşmesine göre tanımaktadır (Deltcheva vd. 2011; Wiedenheft vd. 2011). Üçüncü aşamada crRNA'lar ile kompleks halinde işlev gören Cas proteinleri tarafından tanınan yabancı dizi parçalanmakta ve susturulmaktadır (Brouns vd. 2008).



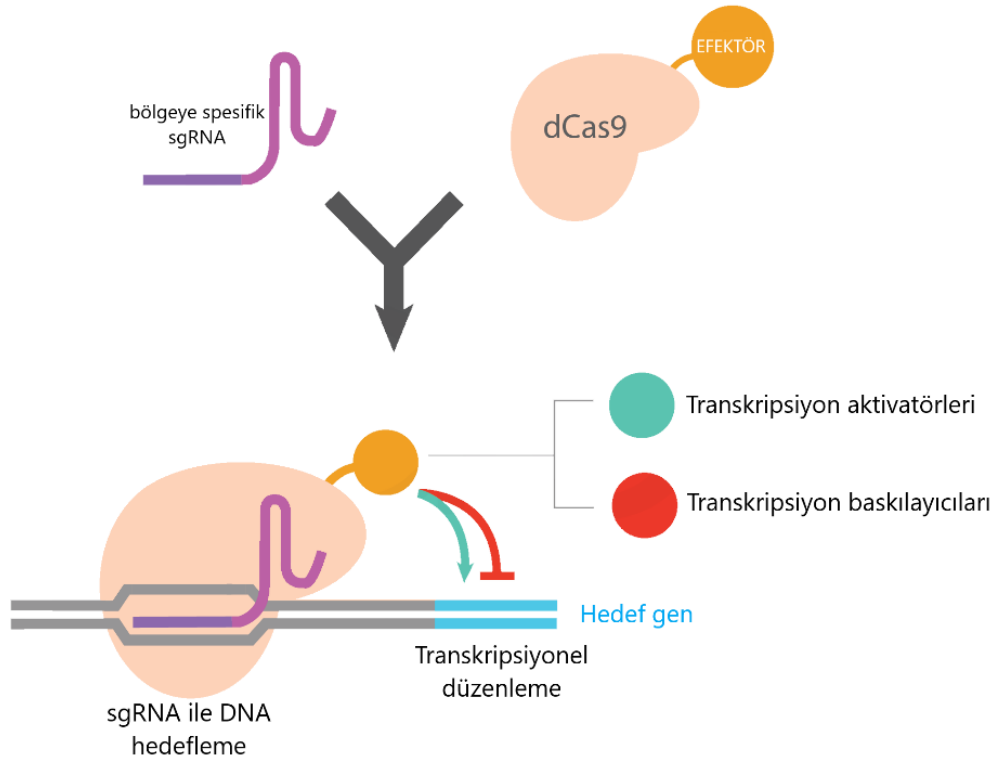
Şekil 1.6. CRISPR/Cas bağışıklığının üç aşaması (Amitai ve Sorek 2016)

Gen regülasyonu amacıyla kullanılan CRISPR/Cas9 sistemindeki Cas9 proteininin katalitik bölgesinin 10. amino asiti olan aspartik asit ve 840. amino asiti olan histidin, alanin amino asidine tek nükleotit mutasyonuyla dönüştürülmüştür (Şekil 1.7). Böylece Cas9 enziminin kesim özelliği inaktive edilmiştir ve etkisizleştirilmiş Cas9 (deactivated Cas9-dCas9) elde edilmiştir. dCas9 proteini endonükleaz aktivitesi göstermemekte ancak hedef DNA'ya bağlanma özelliğini korumaktadır (Gilbert vd. 2013; Qi vd. 2013).



Şekil 1.7. dCas9 proteininin fonksiyonel domainleri (RuvC I, RuvC II, RuvC III, NHN) ve mutasyona uğratılan noktalar (D10A ve H840A)

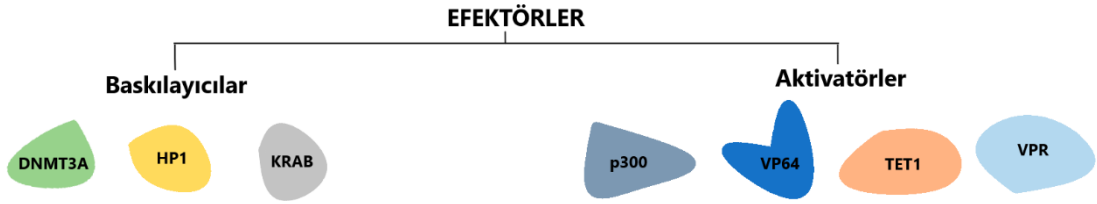
dCas9 proteininin oluşturulmasıyla CRISPR sistemi gen ekspresyon seviyelerinin düzenlenmesi için kullanılabilir hale gelmiştir. dCas9 proteinine eklenen efektör proteinlerle hedeflenen genler aktive edilebilir veya susturulabilir (Şekil 1.8). dCas9 bakteri, maya ve insan hücrelerinde gen ekspresyonunu susturmak (Gilbert vd. 2013; Qi vd. 2013) ve gen ekspresyonunu arttırmak için kullanılmıştır (Perez-Pinera vd. 2013; Chavez vd. 2015).



Şekil 1.8. CRISPR/dCas9 sistemiyle gen aktivasyonunun artırılması ya da azaltılması (Anonymous 3)

Gen aktivasyonu yapılan çalışmalarda kullanılan strateji; dCas9 proteini, aktivatör domain ve gRNA kombinasyonları ile hedef genlerin promotor ya da enhansır bölgelerini hedeflemektir. Yapılan çalışmalarda yaygın olarak VP64 (VP16x4), VP160 (VP16x10), VP192 (VP16x12), p65 AD (aktivasyon domaini), VPR (VP64-Rta-p65), TET1 CD (ten-eleven translocation 1 catalytic domain) ve p300 transaktivatör domainleri kullanılmıştır (Chiarella vd. 2020). Gen baskılama çalışmalarında kullanılan

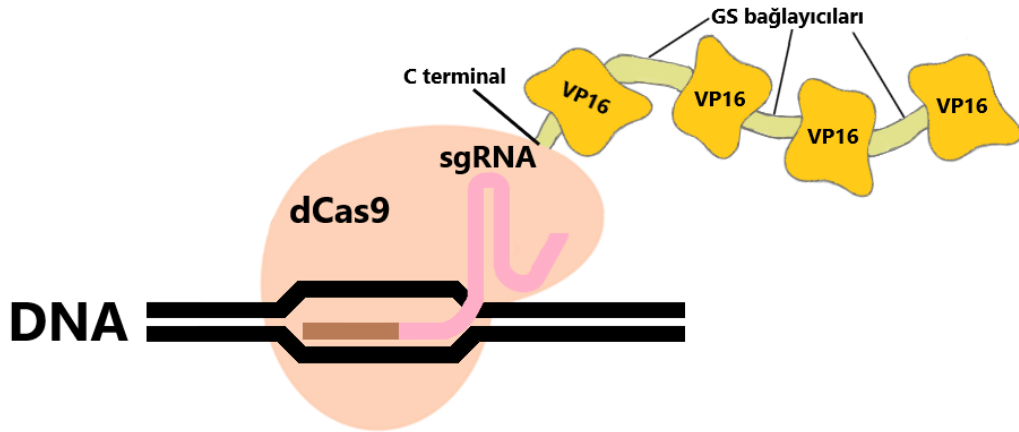
baskılayıcılara ise DNMT3A (DNA metiltransferaz 3A), KRAB (Krüppel associated box) ve HP1 (Heterochromatin-1) örnek verilebilir (Chiarella vd. 2020) (Şekil 1.9).



Şekil 1.9. CRISPR/Cas gen düzenleme sistemlerinde kullanılan efektör örnekleri

1.5.1. VP64

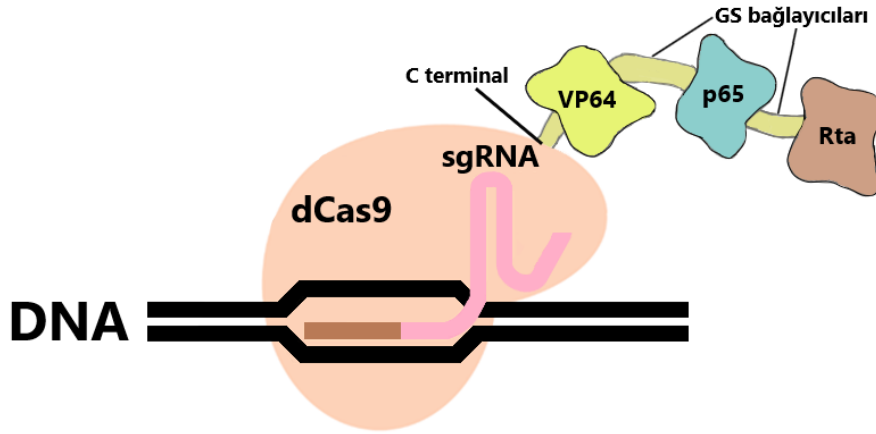
VP64, glisin-serin (GS) bağlayıcılarıyla bağlanmış dört adet VP16 (*Herpes simplex* Viral Protein 16) kopyasından oluşan transkripsiyonel bir aktivatördür. Bir genin promotörüne yakın bağlanabilen başka bir proteinle kaynaştığında, VP64 güçlü bir transkripsiyon aktivatörü olarak görev almaktadır (Seipel vd. 1992). VP16 efektör domaini modülerdir ve diğer DNA bağlayıcı proteinlere kaynaştığında aktivitesini korumaktadır (Seipel vd. 1992; Beerli vd. 1998). VP64, CRISPR sistemiyle yapılan gen aktivasyon çalışmalarında dCas9'un C terminaline eklenerek kullanılmıştır (Chiarella vd. 2020) (Şekil 1.10). VP64, 1998'den bu yana gen aktivasyonu amacıyla birçok grup tarafından özel sentetik transkripsiyon faktörleri oluşturmak için kullanılmıştır (Perez-Pinera vd. 2013; Chiarella vd. 2020).



Şekil 1.10. dCas9-VP64 aktivatörünün yapısı

1.5.2. VPR

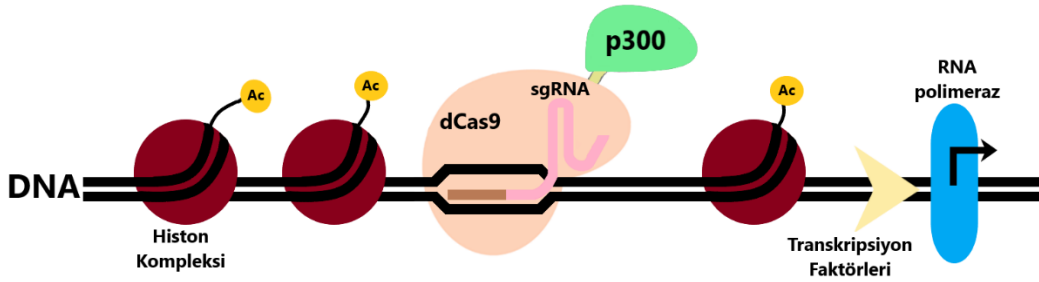
VPR; VP64, p65 ve Rta üçlü domaininden oluşan bir aktivatördür. dCas9'un C terminaline GS bağlayıcılarıyla VP64, p65 ve Rta'nın eklenmesiyle oluşturulmuştur (Chavez vd. 2015) (Şekil 1.11). p65, Nükleer Faktör NF- κ -B p65 alt birim aktivasyon domainidir ve transkripsiyonel aktivatördür (Ruben vd. 1992). Rta, Epstein-Barr virüsü R transaktivatörüdür (Hardwick vd. 1992). Üç farklı aktivatör eklenerek aynı geni hedefleyen çok güçlü bir aktivatör elde edilmiş ve bu aktivatör kompleksinin *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster* ve *Mus musculus*'da çalıştığı gösterilmiştir (Chavez vd. 2015).



Şekil 1.11. dCas9-VPR aktivatörünün yapısı

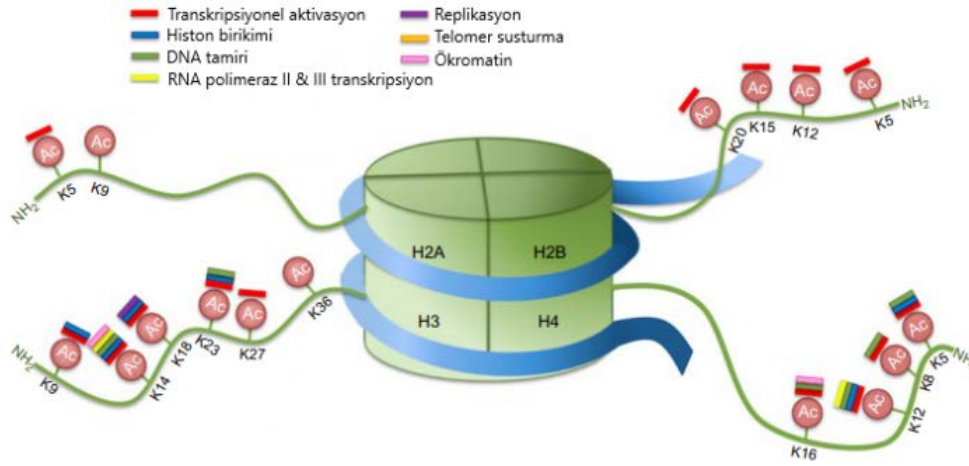
1.5.3. p300

p300, hücre tipine özgü ve sinyale bağlı bir şekilde çok sayıda genin ekspresyonunu kontrol eden histon asetiltransferaz (HAT) proteinlerinden biridir. p300 histon 3'ün 27. lizini asetilleyerek histon proteinlerinin DNA'ya daha gevşek bağlanmasını ve kromatinin yeniden modellenmesi yoluyla genlerin transkripsiyonunun düzenlenmesini sağlamaktadır (Zhang vd. 2014) (Şekil 1.12). p300 proteini, transkripsiyon faktörlerine bağlanarak transkripsiyonu aktive etme işlevini yerine getirmektedir. p300'ün hücre çoğalması, apoptoz ve embriyogenezde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Goodman ve Smolik 2000; Das vd. 2009; He vd. 2011).



Şekil 1.12. p300 histon proteinlerini asetilleyerek aktivasyonu artırması

Memelilerdeki N-terminal histon kuyruğu asetilasyonları farklı hücrel mekanizmaların gerçekleşmesinde rol oynamaktadır (Şekil 1.13). Transkripsiyonel aktivasyonu sağlayan epigenetik efektörlerden p300 histon kuyruklarından H2A'nın 5. lizinini, H2B'nin 5., 12., 15., ve 20. lizinlerini, H3'ün 18. ve 23. lizinini, H4'ün 5., 8., ve 12. lizinini asetillemektedir (Lee ve Grand 2019).



Şekil 1.13. Memelilerde N-terminal histon kuyruğu asetilasyonlarına genel bakış (Lee ve Grant 2019)

Yetişkin somatik hücrelerin terapötik hücre tiplerine yeniden programlanması diyabet gibi dejeneratif hastalıklar için yeni hücre tabanlı bir yaklaşımdır. Son zamanlarda transkripsiyon faktörü aracılı yeniden programlama veya trans-farklılaşma yaklaşımları, β benzeri hücreleri ve β dışı hücrelerdeki kaynaklardan insülin üreten hücreleri *in vitro* ve *in vivo* olarak rejenere etmek için kullanılmıştır. Çalışmalar üç transkripsiyon faktörünün (Pdx1, Ngn3, MafA) kombinasyonlarının aşırı ekspresyonunun çeşitli β olmayan hücre tiplerin insülin üreten hücrelere yeniden programlayabildiğini göstermiştir (Zhou vd. 2008; Akinci vd. 2012; Zhu vd. 2017).

Ekzogenik genlerin ekspresyonu ile β hücre programlanması esnasında yaşanan en büyük sorun söz konusu genlerin endogenik versiyonlarının yeterince aktive edilememesidir. Bu durumda ekzogenik genlerin etkisi ortadan kalktığında programlama işleminin tamamlanması engellenir. β hücreleri programlama verimi nitel ve nicel açıdan düşük olan ve yüksek klinik öneme sahip bir hücre grubudur. Gerek transkripsiyon faktörlerinin (Ferber vd. 2000; Zhou vd. 2008) gerekse küçük moleküller (Kunisada vd. 2012) kullanılarak β hücresi benzeri hücrelerin oluşturulduğu çalışmalar literatürde mevcuttur. Ancak hücre programlaması suretiyle β hücresi benzeri hücrelerin oluşturulduğu bu çalışmalar incelendiğinde karşılaşılan ortak problemler şu şekildedir:

- i) Az sayıda β hücresi benzeri hücre oluşumu (Akinci vd. 2013),
- ii) Karışık endokrin hücre tiplerinin (β , α , \square , vb.) ya da polihormonal bir hücre tipinin oluşumu (nitel verim eksikliği) ve glikoza duyarsız insülin pozitif hücre oluşumu (Kelly vd. 2011; Kunisada vd. 2012; Schulz vd. 2012)

iii) Gerçek ya da yetişkin bir β hücresi fenotipi oluşmaması (nitel verim eksikliği) (Nostro vd. 2011).

Hücre programlanması denemelerinde verime etki eden tanımlanmış ve tanımlanmamış birçok faktör mevcuttur. Örneğin hangi transkripsiyon faktörlerinin hangi kombinasyonlarda ve miktarlarda kullanılacağı, bu transkripsiyon faktörlerinin hangi vektörler (adenoviral, retroviral, DNA temelli, epizomal vektörler, sentetik mRNA, rekombinant protein vs.) ile hücelere aktarılacağı, programlanacak hücre hattının hangi embriyonik tabakadan (endoderm, ekzoderm, mezoderm) köken aldığı ve hangi hücre tipinden (yetişkin hücre, embriyonik hücre, kök hücre, progenitor hücre gibi) farklılaşma yapılacağı gibi parametreler programlamanın başarısını önemli ölçüde etkilemektedir. β hücreleri ile bugüne kadar yapılan çalışmalarda *Pdx1*'in β hücresi benzeri hücrelerin oluşturulması için gerekli olduğu gösterilmiştir (Zhou vd. 2008; Akinci vd. 2012; Akinci vd. 2013). Ancak bu çalışmaların hiçbirinde tam anlamıyla gerçek bir β hücresi fenotipi oluşturulamamıştır. Gerçek bir hücre programlanması esnasında alıcı hücelere aktarılan ekzogenik genlerin, hedef genlerinin yanı sıra endogenik genleri de aktive etmeleri beklenmektedir. Diğer bir deyişle hücelere dışarıdan verilen ekzogenik *Pdx1* geninin endogenik *Pdx1* genini aktive etmesi beklenmektedir. Bu sayede, vektör ile aktarılan ekzogenik genler hücelerden uzaklaştırılsa bile aktive olan aynı genlerin endogenik versiyonları hedef genlerini aktive ederek hücre programlanması için gerekli olan moleküler mekanizmaları çalıştırabilmektedir. Önceki çalışmaların birçoğunda bu endogenik genlerin bazılarının ya da tamamının aktive olmadığı görülmüştür (Akinci vd. 2012; Rezania vd. 2014). β hücresi programlanması çalışmalarındaki nitel ve nicel verimin düşük olmasının en önemli nedenlerinden biri de endogenik genlerin tam anlamıyla aktive edilememesidir. Bu nedenle bu tez çalışmasında önemli endogenik pankreatik genler olan *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* genlerinin endogenik versiyonları CRISPR/dCas9 sistemiyle aktive edilmesi hedeflenmiştir. Bu bağlamda *Pdx1* ve *Ngn3* genlerinin aktivasyonunu en yüksek düzeyde sağlayacak gRNA'ların tespit edilmesi amaçlanmıştır. Aynı zamanda dCas9 proteinine bağlanan VP64, VPR ve p300 gibi farklı efektör proteinlerinin verimleri de yine bu tez çalışmasında karşılaştırılmıştır.

2. KAYNAK TARAMASI

Tip 1, tip 2 ve tip 3 olmak üzere üç ana tip CRISPR/Cas sistemi bulunmaktadır. Bu sistemlerden tip 1 ve tip 3 sisteminin bazı özellikleri benzerlik göstermektedir. Özel Cas endonükleazları pre-crRNA'yı işlemekte ve olgunlaştırmaktadır. Olgunlaşan her crRNA büyük çoklu Cas protein komplekslerine bağlanmakta ve olgun crRNA'nın bağlandığı yabancı nükleik asitleri kesmektedir. Tip 2 CRISPR/Cas sistemindeki tracrRNA, crRNA ve Cas9 kompleksi istilacı DNA'yı tanımakta, parçalamakta ve böylece istilacı DNA susturulmaktadır (Deltcheva vd. 2011; Gottesman 2011; Makarova vd. 2011). Tip 2 CRISPR/Cas sistemi diğer sistemlere göre daha basittir ve daha az eleman içermektedir. Aynı zamanda mekanizması daha iyi anlaşılmıştır ve bu nedenlerle yapılan gen mühendisliği çalışmalarında daha çok bu sistem tercih edilmektedir.

Jinek ve arkadaşları *S. pyogenes* tip 2 CRISPR/Cas sisteminin genom düzenlemede kullanılabileceğini göstermiştir. Yapılan çalışmada crRNA ve tracrRNA'yı birleştirerek sgRNA oluşturulmuştur. Yapay olarak oluşturulan sgRNA ile özel genomik bölgeler hedeflenmiştir. Yine aynı çalışmada Cas9 proteini mutasyona uğratarak endonükleaz aktivitesini kaybetse de hedef DNA ya bağlanabildiği görülmüştür (Jinek vd. 2012).

dCas9 ve gRNA kullanılarak bakteri, maya ve insan hücrelerinde gen ekspresyonunun susturulduğu gösterilmiştir (Gilbert vd. 2013; Qi vd. 2013). CRISPR/dCas9 sisteminin gen ekspresyonunun regülasyonu için potansiyel bir yöntem olduğu tespit edilmiştir.

Perez ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada dCas9 proteinine bir aktivatör domain ekleyerek endojen insan gen promotorlarını hedeflemişler ve başarılı bir şekilde gen aktivasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada dCas9 proteininin C terminaline VP64 aktivatör domaini eklenmiştir. Bu sistemle *Ascl1*, *Nanog* ve *Myod1* genlerinin aktivasyonunun sağlandığı gösterilmiştir (Perez-Pinera vd. 2013). Yapılan diğer çalışmalarda endojen insan gen promotorlarını hedefleyen sentetik transkripsiyon faktörlerinin kombinasyonları ile gen ekspresyonunun sinerjistik ve güçlü bir şekilde gerçekleştirebileceği gösterilmiştir (Gilbert vd. 2013; Perez-Pinera vd. 2013; Qi vd. 2013).

Tanenbaum ve arkadaşları dCas9-SunTag adını verdikleri yöntemlerinde antikorp peptid ilişkisini CRISPR sistemine uygulayarak daha güçlü bir aktivatör sistemi oluşturmuşlardır. Bu sistemde dCas9 proteinine bağlanan tekrarlayan peptid bölgelerine antikorlar yardımıyla yine çoklu VP64 efektörleri eklenmiştir. Biyoloji ve biyomühendislik alanında SunTag sisteminin kullanılması tek moleküllerin görüntülenmesi ve endojen genlerin aktivasyonu konusunda geniş kullanım alanı sunmaktadır (Tanenbaum vd. 2014).

Chavez ve ekibi, dCas9 proteininin C terminaline VPR aktivatör domaini ekleyerek yeni üçlü bir transkripsiyonel regülatör oluşturmuştur. dCas9-VPR sistemi kullanılarak kodlama yapan ve kodlama yapmayan endojen genlerin aktive edilmesi, birkaç genin aynı anda hedeflenmesi ve insan kaynaklı pluripotent kök hücrelerin nöronal farklılaşması gösterilmiştir (Chavez vd. 2015).

Lin ve ekibi *in vivo* ortamda dCas9-VPR ile hedef genlerin aktive edilebileceğini ve *Drosophila*'da baskın fenotiplere neden olabileceğini göstererek, çok hücreli bir hayvanda dCas9 aktivasyonunu ilk kez göstermiştir. Bu çalışmayla dCas9-VPR kullanılarak transkripsiyonel aktivasyonun geniş çapta uygulanabileceğini gösterilmiştir (Lin vd. 2015).

Hilton ve ekibi dCas9-p300 ve dCas-VPR aktivatörlerini kullanarak *Illrn*, *Myod* ve *Oct4* genlerinin aktivasyon düzeylerini karşılaştırmıştır. p300 domaininin de DNA bağlanma proteinlerine eklenebileceği ve asetilasyonun gen aktivasyonunu düzenlemek için kullanılabilirliği gösterilmiştir (Hilton vd. 2015).

Zetsche ve ekibi dCas9 proteinini iki parçaya ayırmıştır ve bu sisteme bölünmüş Cas9 (split-Cas9) sistemi adını vermiştir. Bu sistemde Cas9 iki parçaya ayrılarak C terminaline FK506 bağlanma proteini 12 (FKBP) domainini, N terminaline ise FKBP rapamisin bağlanma (FRB) domaini eklenmiştir. Daha sonrasında FKBP'ye iki tane çekirdek lokalizasyon dizisi ve FRB'ye bir tane çekirdekten çıkarma dizisi eklenmiştir. Rapamisin varlığında Cas9 parçaları birleşip hücre çekirdeğine giderek DNA hedeflemesi yapılmıştır. Bu sisteme dCas9-VP64 aktivatörünü ekleyerek *Ascl1* ve *Neurog2* genlerinin aktivasyonu sağlanmıştır. Bölünmüş Cas9 sistemiyle CRISPR aktivatör sistemi rapamisin bağlayıcı dimerizasyon domainleriyle kimyasal olarak indüklenebilir hale getirilmiştir (Zetsche vd. 2015).

Balboa ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada dCas9-VP192 aktivatör sistemini kullanarak HEK293 ve F72 insan fibroblast hücrelerinde endodermal ve pankreatik ana transkripsiyon faktörlerinden *Foxa2*, *Sox17*, *Gata4*, *Pdx1* ve *Nkx6.1*'in proksimal promotorlarını hedefleyerek söz konusu genlerin aktivasyonunu gerçekleştirmişlerdir (Balboa vd. 2015).

Guo ve ekibi dCas9-VPR aktivasyon sistemini doksisisiklin ile uyarılabilir hale getirmiştir. dCas9-VPR ve çoklu gRNA'lar kullanarak endogenik *Nanog* geninin promotor bölgesini hedeflemiş ve *Nanog* geninin aktivasyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirmiştir. Doksisisiklin ile sistemin hassas şekilde ve geri dönüşümlü olarak kontrol edilebileceği gösterilmiştir (Guo vd. 2017).

Savell ve ekibi yapmış oldukları çalışmada CRISPR/dCas9-VPR aktivasyon sistemi ile hem *in vitro* hem de *in vivo* sistemde nöronlarda hedef genlerin güçlü ve spesifik aktivasyonunu sağladıklarını bildirmiştir (Savell vd. 2019). Bu çalışma nöron hücrelerinde gen ekspresyon seviyelerini kontrol etmemiz açısından ilerlemeler sağlayıp, nöronal genlerin düzenlenmesini amaçlayan çalışmalarda CRISPR/dCas9 sisteminin model sistem olmasını sağlayacaktır.

3. MATERYAL VE METOT

TritonX-100	Fisher BioReagents, USA	BP151-500
-------------	-------------------------	-----------

3.1. Kullanılan Materyaller

Tez çalışmasında kullanılan materyallere ait marka ve katalog numaraları Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan materyaller ve katalog numaraları

Materyal	Marka	Katalog Numarası
HEK293 cell line	Thermo Fisher Scientific, USA	510036
DMEM, High Glucose	Capricorn, Germany	DMEM-HA
Antibiotic-Antimycotic	Biowest, France	L0010-020
Fetal Bovine Serum	Biological Industries, Israel	04-007-1A
MEM Non-essential amino acids	Gibco, USA	11140-050
Dulbecco’s PBS (1X)	Cegrogen, Germany	H0500-560
Agar Bacteriological	Thermo Fisher Scientifics, USA	LP0011
Yeast Extract	VWR Life Science Amresco, USA	VWRVJ850-500G
Tryptone	VWR Life Science Amresco, USA	VWRVJ859-500G
Ampicillin	Sigma Aldrich, USA	A5354
Opti-MEM	Gibco, Australia	31985-62
Lipofectamine 2000	Thermo Fisher Scientific, USA	12604-21
Sodium Chloride	Sigma Aldrich, USA	31434
Trizma Base	Sigma Aldrich, USA	T1503
Acetic acid	Merck Millipore, USA	109088
EDTA Disodium Salt Dihydrate	Merck Millipore, USA	108418
Dietil Pirokarbonat (DEPC)	Gold Biotechnology, USA	1609-47-8
Formalin solution	Sigma Aldrich, USA	HT501128-4L
BbsI	New England Biolabs, USA	R0539S
T4 DNA Ligase	Thermo Fisher Scientific, USA	EL0011
DNase I, RNase-free	Thermo Fisher Scientific, USA	EN0525
iScript cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad Laboratories, USA	1708891
iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix	Bio-Rad Laboratories, USA	172-5121
TRIzol Reagent	Invitrogen, USA	15596026
GeneJet Plazmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific, USA	K0503
GeneJet Gel Extraction Kit	Thermo Fisher Scientific, USA	K0691
GeneJet PCR Purification Kit	Thermo Fisher Scientific, USA	K0701
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, USA	SM0311
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, USA	SM0241
DNA Lader	New England Biolabs, USA	N32325
Hoechst 33342 Solution	Thermo Fisher Scientific, USA	62249
DH5α Competent Cells	Invitrogen, USA	18265-017
Agarose	BIOMAX, USA	124543PR
EtBr	Thermo Fisher Scientific, USA	17896
SOC medium	New England Biolabs, USA	B9020S
Gliserol	Sigma Aldrich, USA	15524-1L-R
Dimetil sülfoksit (DMSO)	ChemCruz, USA	Sc-202581A
Bovin Serum Albümin (BSA)	GenDEPOT, USA	A0100-010
Goat Anti-Mouse IgG, DyLight 488	Thermo Scientific, USA	35502

Rb poliklonal anti-Pdx1	Abcam, England	Ab47267
Rb poliklonal anti-Ngn3	Abcam, England	Ab38548
Goat Anti-Rabbit IgG, DyLight 488	Thermo Scientific, USA	35552
Tween 20	Sigma Aldrich, USA	P9416
pSPgRNA plazmit	Addgene, USA	47108
dCas9-VPR plazmit	Addgene, USA	63798
dCas9-p300 core plazmit	Addgene, USA	61357
dCas9-VP64 plazmit	Addgene, USA	47107
dCas9-VP64-GFP plazmit	Addgene, USA	61422
NaCl	Fisher BioReagents, USA	BP358-1
CaCl ₂	Merck Millipore, USA	102378
0.22 µm'lik filtre	Isolab, Germany	I.094.03.008.100
T-75 kültür kabı	Corning, USA	430720U

Çizelge 3.1'in devamı

3.2. Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

- **50X Tris-Asetat-EDTA (TAE) tamponu:**

242 g Tris 800 mL ddH₂O (double-distilled H₂O) içinde çözündürülmüştür. Çeker ocak içerisinde 57.1 mL asetik asit ilave edilmiştir. Karışıma 4.65 g EDTA eklenip çözündürülmüştür. Son hacim ddH₂O ile 1 litreye tamamlanmıştır.

- **1X TAE tamponu:**

50X TAE tamponundan 20 mL alınmış ve ddH₂O ile 1 litreye tamamlanmıştır.

- **1 M Tris-HCl:**

121.1 g Tris 800 mL ddH₂O içinde çözündürülmüştür. HCl ile pH 7.4'e ayarlanmış ve ddH₂O ile 1 litreye tamamlanmıştır.

- **50 mM CaCl₂ /10 mM Tris (pH:7.4):**

5.55 g CaCl₂ 750 mL ddH₂O içinde çözündürülmüştür. 10 mL 1M Tris-HCl (pH:7.4) eklenmiş ve ddH₂O ile 1 litreye tamamlanmıştır.

- **%1'lik agaroz jel**

1 g agaroz 100 mL 1X TAE tamponu içinde mikrodalga fırında ısıtılarak çözündürülmüştür. Çözeltiye 2 µL EtBr eklenmiştir. Jel dökme tepsisine dökülmüştür.

- **Antibiyotik (Ampisilin):**

1 g ampisilin 7 mL ddH₂O içinde çözündürülmüş ve ddH₂O ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. 0.22 µm'lik filtreden geçirilmiş ve birer mililitre bölünerek -20°C'de muhafaza edilmiştir.

- **2X hücre dondurma ortamı:**

2 mL DMSO 8 mL hücre kültür besisi ortamına eklenmiştir. Karışım 0.22 µm'lik filtreden geçirilmiş ve -20°C'de muhafaza edilmiştir.

- **LB-Broth:**

2.5 g NaCl, 2.5 g tripton ve 1.25 g maya özütü 150 mL ddH₂O içinde çözündürülmüştür. Son hacim ddH₂O ile 250 mL'ye tamamlanmıştır. 121°C'de 30 dakika otoklavlanmıştır. 4°C'de muhafaza edilmiştir. Antibiyotikli ortam kullanılacaksa; daha önceden hazırlanan antibiyotik çözeltisinden 250 µL alınarak 250 mL LB besiyerine eklenmiştir.

- **LB-Agar:**

2.5 g NaCl, 2.5 g tripton, 3.75 g agar ve 1.25 g maya özütü 150 mL ddH₂O içinde çözündürülmüştür. Son hacim ddH₂O ile 250 mL'ye tamamlanmıştır. 121°C'de 30 dakika otoklavlanmıştır. Çözeltinin sıcaklığı yaklaşık 50°C'ye düştüğünde steril kabin içerisinde petri kaplarına dökülmüştür. Polimerleşme tamamlandığında, daha sonra kullanılmak üzere parafinle hava almayacak şekilde sıkıca kapatılıp 4°C'de muhafaza edilmiştir. Antibiyotikli ortam kullanılacaksa; çözeltinin sıcaklığı yaklaşık 50°C'ye geldiğinde steril kabin içerisinde daha önceden hazırlanan antibiyotik çözeltisinden 250 µL alınarak 250 mL LB besiyerine eklenmiş ve petri kaplarına dökülmüştür.

- **RNaz içermeyen ddH₂O:**

1 mL DEPC 1 litre ddH₂O suya eklenmiş ve bir gece manyetik karıştırıcıda çözündürülmüş sonra otoklavlanmıştır.

- **%0,1'lik PBS-Tween-20 çözeltisi:**

100 µL Tween-20 75 mL PBS içerisinde çözündürülmüştür. Çözelti PBS ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. 4°C'de muhafaza edilmiştir.

- **%1'lik Bovine Serum Albumin (BSA) çözeltisi:**

100 µL Tween 20 ve 1 g BSA 75 mL PBS içerisinde çözündürülmüştür. Çözelti PBS ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. 4°C'de muhafaza edilmiştir.

- **%5'lik BSA çözeltisi:**

100 µL Tween 20 ve 5 g BSA 75 mL PBS içerisinde çözündürülmüştür. Çözelti PBS ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. 4°C'de muhafaza edilmiştir.

- **%0.2'lik PBS-TritonX-100 çözeltisi:**

200 µl TritonX-100 75 mL PBS içerisinde çözündürülmüştür. Çözelti PBS ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. 4°C'de muhafaza edilmiştir.

- **Birincil antikor (İmmünohistokimyasal boyama) (1:100):**

Birincil antikordan 1 μ L alınmış ve 100 μ L %1'lik BSA çözeltisi içerisinde çözündürülmüştür.

- **İkincil antikor (İmmünohistokimyasal boyama) (1:400):**

İkincil antikordan 4 μ L alınmış ve 400 μ L %1'lik BSA çözeltisi içerisinde çözündürülmüştür.

- **Hoechst (İmmünohistokimyasal boyama) (1:400):**

Hoechst stok solüsyonundan (1 mg/mL) 1 μ L alınmış, 400 μ L %1'lik BSA çözeltisi içerisinde çözündürülmüştür.

3.3. kPZR için Kullanılan Primerler

Pdx1 ve *Ngn3* gen aktivasyonu sonucu endojenik genlerin ekspresyonunun belirlenmesinde kullanılan kPZR primer dizileri Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. kPZR için kullanılan endojen primer dizileri

Gen	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Ürün
<i>hIns</i>	GCAGCCTTTGTGAACCAACAC	CCCCGCACACTAGGTAGAGA	67 bp
<i>hMafA</i>	TTGTACAGGTCCCGCTCTTT	AGCGAGAAGTGCCAACCTCC	83 bp
<i>hPdx1</i>	GGAACCTCCTTCTCCAGCTCTA	CCTTTCCCATGGATGAAGTC	145 bp
<i>hNgn3</i>	AGTTGGCACTGAGCAAGC	AGTGCCGAGTTGAGGTTG	88 bp
<i>hNkx2.2</i>	CGAGGGCCTTCAGTACTCC	GGGACTTGGAGCTTGAGT	72 bp
<i>hNkx6.2</i>	TTCCGTTTTCCCGCTTTGG	ATGCGCAGAGGGACTTTGG	103 bp
<i>hPax4</i>	ACCCACCTAAAGCCTGTCT	AGGCAAAGCAGTCCTGAGTC	83 bp
<i>hGlut2</i>	TACATTGCGGACTTCTGTGG	AGACTTTCCTTTGGTTTCTGG	108 bp
<i>hKir6.2</i>	TGTGTCACCAGCATCCACTC	CACTTGGACCTCAATGGAGAA	60 bp
<i>hGapdh</i>	AGGGCTGCTTTTAACTCTGGT	CCCCTTGATTTTGGAGGGA	152 bp

3.4. İmmünofloresan Boyama için Kullanılan Antikorlar ve Dilüsyon Oranları

Çizelge 3.3. İmmünofloresan boyamada kullanılan antikorlar ve dilüsyon oranları

Antikor	Marka	Katalog Numarası	Dilüsyon
Rb poliklonal anti-Pdx1	Abcam, England	ab47267	1: 2000
Rb poliklonal anti-Ngn3	Abcam, England	ab38548	1: 200
Goat Anti-Rabbit IgG, DyLight 488	Thermo Scientific, USA	35552	1:400

3.5. DNA ve RNA Örneklerinin Miktar Tayininin Yapılması

İzole edilen DNA ve RNA örneklerinin miktar ve saflık ölçümleri BioDrop μ Lite Spektrofotometre cihazı (Biochrom US, Holliston, MA) kullanılarak yapılmıştır. Ölçüm almadan önce cihaz 1 μ L ddH₂O ile temizlenmiştir. DNA ya da RNA örneğinin çözülmesi çözeltiden 1 μ L alınarak ölçüm değeri sıfırlanmıştır. DNA ya da RNA

örneğinden 1 µL alınarak 230, 260 ve 280 nm'deki absorbands değerlerinin ölçümü yapılmıştır.

3.6. Kompotent Hücre Hazırlanması

Önceden -80°C'de saklanan DH5α *E.coli* bakterilerinden 40 µL alınmış ve 40 mL LB broth besiyeri içine eklenmiş, 37°C 200 rpm çalkalamalı inkübatörde gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Çoğalan bakterilerden 1 mL alınarak 200 mL LB-broth besiyerine ekilmiştir. 4 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Bakterilerin 600 nm'deki optik dansitesi 0,4 noktasına gelince buz üzerine alınmış ve 10 dakika soğutulmuştur. 50 mL'lik tüplere bölünüp, 4°C'de 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılıp, tüplere 25 mL 50 mM CaCl₂/10 mM Tris (pH:7.4) eklenmiştir. Daha sonra 4°C'de 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılıp, pelet üzerine 9 mL 50 mM CaCl₂/10 mM Tris (pH:7.4) ve 1 mL %100 gliserol eklenip homojenize edilmiştir. 100 µL olacak şekilde bölünüp -80°C'de muhafaza edilmiştir.

3.7. *Pdx1* ve *Ngn3* Genleri için gRNA Primerlerinin Tasarlanması

İnsan *Pdx1* geninin aktivasyonunu sağlamak için 10 farklı gRNA, CRISPR-ERA (<http://crispr-era.stanford.edu/>) online programı kullanılarak seçilmiştir. gRNA seçiminde genin transkripsiyon başlama noktasına (TBN) uzaklığı en fazla -250 bp olan gRNA'lar seçilmiştir. *Pdx1* geni için tasarlanan gRNA'lar Çizelge 3. 4'de yer almaktadır.

Çizelge 3.4. *Pdx1* geni için tasarlanan gRNA'lar (pSPgRNA plazmiti BbsI enzimi ile kesilince oluşan yapışkan uçlara tamamlayıcı olması için gRNA dizilerine kırmızı renkte BbsI kesim bölgeleri eklenmiştir)

gRNA		Dizi (5'-3')	Zincir konumu	TBN'na uzaklık
1	Forward	5' CACCGGAACGGGCAGCTGGCGGTGC 3'	-	-240
	Reverse	5' AAACGCACCGCCAGCTGCCCGTTCC 3'		
2	Forward	5' CACCGGCGAGCACCTGCTTTTGTTT 3'	-	-183
	Reverse	5' AAACGAACAAAAGCAGGTGCTCGCC 3'		
3	Forward	5' CACCGGGCTGGCCGCACTAAGAGGC 3'	-	-148
	Reverse	5' AAACGCCTCTTAGTGCGGCCAGCCC 3'		
4	Forward	5' CACCGGCTCGCTTTGACAGCTCCGC 3'	-	-22
	Reverse	5' AAACGCGGAGCTGTCAAAGCGAGCC 3'		
5	Forward	5' CACCGATTTTCTCTCAGCTGAGT 3'	-	-205
	Reverse	5' AAACACTCAGCTGAGAGAGAAAATC 3'		
6	Forward	5' CACCGCTGGCGGTGCTCCCCAAAAT 3'	+	-250
	Reverse	5' AAACATTTTGGGGAGCACCGCCAGC 3'		
7	Forward	5' CACCGGCCGCGGGGCGGTGATTGGCC 3'	+	-127
	Reverse	5' AAACGGCCAATCACGGCCCCCGGCC 3'		
8	Forward	5' CACCGAGGCTCCGCGGGGCCCCACG 3'	+	-100
	Reverse	5' AAACCGTGGGGCCCCGCGGAGCCTC 3'		
9	Forward	5' CACCGGCGGGGCCGCGCCGCACCA 3'	-	-79
	Reverse	5' AAACGGTGGCGGGCGGCCCGGCC 3'		
10	Forward	5' CACCGAACCCACAGCCAGCGCGGAC 3'	+	-57
	Reverse	5' AAACGTCCGCGCTGGCTGTGGGTTT 3'		

İnsan *Ngn3* geninin aktivasyonunu sağlamak için 8 farklı gRNA CRISPR-ERA (<http://crispr-era.stanford.edu/>) online programı kullanılarak seçilmiştir. gRNA seçiminde genin TBN uzaklığı en fazla -250 bp olan gRNA'lar seçilmiştir. *Ngn3* geni için tasarlanan gRNA'lar Çizelge 3. 5'de yer almaktadır.

Çizelge 3.5. *Ngn3* geni için tasarlanan gRNA'lar (pSPgRNA plazmiti BbsI enzimi ile kesilince oluşan yapışkan uçlara tamamlayıcı olması için gRNA dizilerine kırmızı renkte BbsI kesim bölgeleri eklenmiştir)

gRNA		Dizi (5'-3')	Zincir konumu	TBN'na uzaklık
1	Forward	5' CACCGGGCCTGACCAGAGCCACACG 3'	+	-239
	Reverse	5' AAACCGTGTGGCTCTGGTCAGGCC 3'		
2	Forward	5' CACCGGCTAGGAGCAAAGCCGTCTG 3'	+	-263
	Reverse	5' AAACAGACGGCTTTGCTCCTAGCC 3'		
3	Forward	5' CACCGAGAGTTGCTGGGACCCAGCC 3'	-	-182
	Reverse	5' AAACGGCTGGGTCCCAGCAACTCTC 3'		
4	Forward	5' CACCGGGCGCGGGCAGCAGCCGGGC 3'	+	-27
	Reverse	5' AAACGCCCGGCTGCTGCCCGCGCC 3'		
5	Forward	5' CACCGGGGCAGGCACGCTCCTGGCC 3'	+	-11
	Reverse	5' AAACGGCCAGGAGCGTGCCTGCC 3'		
6	Forward	5' CACCGGGGCCCGGCGCTGATTGGC 3'	+	-51
	Reverse	5' AAACGCCAATCAGCGCCGGGCC 3'		
7	Forward	5' CACCGGTGCCCTGCGGGGAGGAGC 3'	+	-93
	Reverse	5' AAACGCTCCTCCCCGCAGGGCACC 3'		
8	Forward	5' CACCGGCGCTCCCCTCCCCGACCC 3'	+	-137
	Reverse	5' AAACGGGTCGGGGGAGGGGAGCGCC 3'		

3.7.1. pSPgRNA plazmitinin kesim işlemi

gRNA'ların aktarılacağı pSPgRNA plazmiti BbsI enzimi ile kesilmiştir. 1 µg pSPgRNA plazmitinden, 2 µL 10X NEB 2.1 buffer, 1.5 µL BbsI enziminden eppendorf tüpe koyulmuş ve son hacim ddH₂O ile 20 µL ye tamamlanmıştır. Daha sonra örnekler 37°C'de 2 saat, 80°C'de 20 dakika olacak şekilde inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 3 µL örnek %0.8'lik agaroz jele yüklenerek kesim işleminin gerçekleştiği doğrulanmış ve kesilmiş plazmitin jelden izolasyonu yapılmıştır.

3.7.2. pSPgRNA plazmitinin jelden izolasyonu

Kesilmiş pSPgRNA plazmit örneğinin yüklendiği jel Benchtop Variable Transilluminator (UVP, England) görüntüleme cihazında görüntülenmiştir. Kesilmiş olan plazmiti içeren bantlar jelden bisturiyle kesilip çıkarılmıştır. GeneJet Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, USA) ile üretici firmanın talimatları uygulanarak plazmit jelden izole edilmiştir. -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.7.3. *Pdx1* ve *Ngn3* gRNA primerlerin birleştirilmesi

Primerlerin birleştirilmesinde Zhang lab protokolü uygulanmıştır (S. Konermann, Zhang lab. SAM target sgRNA cloning protocol 2014). Sipariş edilen primerler 100 µM forward primer ve 1 µL 100 µM reverse primer olacak şekilde

hazırlamıştır. 1 µL 10X T4 Buffer, 0.5 µL T4 PNK enzimi ve hazırlanan 100µM primerlerden 1'er µL eppendorf tüpe koyulmuştur. Son hacim ddH₂O ile 10 µL'ye tamamlanmıştır. 37°C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra sıcaklık 95°C'ye yükseltilmiştir. Sıcaklığı dakikada 5°C düşürerek, 95°C'den son sıcaklık 25°C olacak şekilde sıcaklık gradiyenti yapılmıştır. Primerler birleştirildikten sonra pSPgRNA plazmitine ligasyon yapılmıştır.

3.7.4. *Pdx1* ve *Ngn3* gRNA primerlerinin pSPgRNA plazmitine ligasyonu

Birleştirilen gRNA primerleri 1:100 seyreltilmiştir. 1 µL (10µM) seyreltilen birleştirilmiş primerden, 1 µL BbsI ile kesilmiş pSPgRNA plazmitinden, 1 µL 10X T4 DNA ligaz tamponundan, 1 µL T4 DNA ligaz enziminden eppendorf tüpe koyulmuş ve ddH₂O ile son hacim 10 µL ye tamamlanmıştır. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra DH5α bakterilerine transformasyon yapılmıştır.

3.7.5. Bakteri transformasyonu

-80°C'den alınan DH5α bakterileri buz üzerinde çözündürülmüştür. 10 µL ligasyon plazmiti 150 µL DH5α içine koyulmuştur. Pipetaj yapılmış ve 30 dakika buz üzerinde inkübe edilmiştir. 42°C su banyosunda 40-45 saniye bekletilmiş sonra 2 dakika buz üzerinde inkübe edilmiştir. Üzerine 125 µL SOC medium eklenmiştir. 60 dakika 37°C 220 rpm'de inkübe edilmiştir. pSPgRNA plazmiti ampisiline dirençli olduğundan LB Agar (Amp⁺) üzerine yayma işlemiyle ekilmiştir. 37°C'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyondan sonra üreme olan petri kaplarından bakterilerin tek koloni şeklinde seçimi yapılmış ve LB Broth (Amp⁺)'a ekim yapılmıştır. 37°C'de 220 rpm'de inkübe edilmiştir. OD değeri 0.4 olduğu zaman stok olarak saklamak için 300 µL bakteri örneği, 300 µL %50'lik gliserol eklenmiş ve -80°C'ye kaldırılmıştır. Örnekten kalan solüsyondan plazmit izolasyonu yapılmıştır.

3.7.6. Plazmit izolasyonu

Plazmit izolasyonu GeneJet Plazmid Miniprep Kit'i (Thermo Scientific) ile üretici firmanın talimatları uygulanarak gerçekleştirilmiştir. İzole edilen plazmitler -20°C'de muhafaza edilmiştir. İzole edilen plazmit DNA örneklerinin miktar ve saflık ölçümleri BioDrop µLite Spektrofotometre (Biochrom, MA) cihazında yapılmıştır. Daha sonra plazmitler M13 Forward primeri (5' GTA AAA CGA CGG CCA GT 3') ile tek yönlü Sanger sekans analizi yapılması için BM LAB firmasına gönderilmiştir.

3.8. HEK293 Hücre Kültürü

Thermo Fisher Scientific firmasından satın alınan insan embriyonik böbrek hücreleri (HEK293) sıvı azotta (-196°C) muhafaza edilmiştir. Sıvı azottan çıkartılan hücreler 37°C'deki su banyosunda eritilmiştir. Tüp %70'lik etil alkolle sterilize edilmiş ve steril kabine içerisine alınmıştır. 1 mL'lik mikropipetle hücreler tüpün içerisinden alınmış ve 15 mL'lik santrifüj tüpünün içerisine koyulmuştur. 37°C ve %5 CO₂'li ortamda ısıtılmış, L-glutaminli yüksek glukozlu DMEM, 10% FBS, 1X NEAA ve 1X antibiyotik-antimikotik (anti-anti) içeren hücre kültür ortamından 1 mL alınmış ve

damlalar halinde 15 mL tüpün içerisindeki hücrelerin üzerine bırakılmıştır. Her bir damlada tp yavaşa çalkalanmıştır. Tüpün içerisine son hacim 12 mL olacak şekilde hücre besin ortamı eklenmiştir. 1200 rpm'de 37°C'de 5 dakika santrifüj yapılmıştır. Hücre peletine dokunmadan süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır. Hücre peleti 12 mL besin ortamı içerisinde çözülmüş ve T-75 kültür kabına aktarılmıştır. Hücre yoğunluğu %80 oluncaya kadar iki günde bir, 10 mL PBS ile hücreler yıkandıktan sonra hücrelerin besin ortamı değiştirilmiştir.

Deney aşamasına geçildiğinde hücreler 12 kuyucuklu hücre kültür kaplarına pasajlanmıştır. Pasaj sırasında T-75 kültür ortamında bulunan hücrelerin besin ortamları serolojik pipetle alınmıştır. 10 mL PBS ile yıkanmıştır. 3 mL tripsin enzimi eklenmiş ve 5 dakika 37°C ve %5 CO₂'li ortamda inkübe edilmiştir. Mikroskop altında hücrelerin kültür kabından ayrıldıkları görüldükten sonra 10 mL kültür ortamı eklenmiş ve hücre karışımı serolojik pipet yardımıyla 15 mL tüpe koyulmuştur. 5 dakika 37°C 1200 rpm'de santrifüj edilmiştir. Hücre peletine dokunmadan süpernatant kısmı uzaklaştırılmış ve pelet hücre besin ortamıyla zndrlmştir. Her kuyusunda 25×10³ hücre olacak şekilde 12 kuyucuklu kültür kaplarına hücre ekimi yapılmıştır.

Geri kalan hücreler alınarak üzerine eşit hacimde 2X dondurma ortamı eklenmiş ve öncelikle -80°C'de bir gece bekletilmiştir. Hücreler uzun süreli saklamak amacıyla sıvı azota (-196°C) kaldırılmıştır.

3.8.1. HEK293 hücrelerine transfeksiyon

HEK293 hücreleri 25×10³ hücre/kuyucuk olacak şekilde 12 kuyucuklu plakaya ekilmiştir. Hücreler ekim işleminden 24 saat sonra antibiyotiksiz hücre kültür ortamına alınmıştır. Lipofectamine 2000 kullanılarak *Ngn3* ve *Pdx1* gRNA plazmitleri; dCas9-VPR, dCas9-p300 veya dCas9-VP64 plazmitleriyle transfekte edilmiştir.

İzole edilip, saflık ve miktar analizi yapılan pSPgRNA plazmitinden 1 µL (20 ng/ µL) ve dCas9-VPR, dCas9-p300 ve dCas9-VP64 plazmitinden 1 µL (200 ng/ µL) alınarak, Opti-MEM (pH: 7.6) ile 50 µL'ye tamamlanmış ve pipetaj yapılmıştır. 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.

Ayrı bir eppendorfta her bir örnek için 1 µL Lipofectamine 2000 ve 49 µL Opti-MEM (pH: 7.6) birleştirilip pipetaj yapılmış ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İki ayrı karışım birleştirilerek 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra karışım HEK293 hücrelerinin kültür ortamlarına eklenmiştir. Transfeksiyondan 24 saat sonra hücre kültür ortamı değiştirilmiştir. Transfeksiyondan 48 saat sonra TRIZol ile RNA izolasyonu yapılmıştır.

3.8.2. RNA izolasyonu

Transfeksiyondan 48 saat sonra RNA izolasyonu TRIZol Reagent ile üretici firmanın talimatları uygulanarak yapılmıştır. RNA rnekleri -80°C'de muhafaza edilmiştir. İzole edilen RNA rneklerinin miktar ve saflık ölçümleri yapılmıştır.

3.8.3. DNaz uygulaması ve cDNA üretimi

İzole edilen RNA örneklerine DNaz I enzim uygulaması yapılmıştır. RNA örneğinden 500 ng olacak şekilde alınıp üzerine 1 µL 10X tampon, 1 µL DNaz I enzimi eklenmiş ve son hacim ddH₂O ile 10 µL ye tamamlanmıştır. 37°C'de 60 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra örnek üzerine 1 µL EDTA (50 mM) eklenmiştir. 65°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir.

DNaz uygulaması yapılan RNA örneklerinden (500 ng) iScript cDNA sentez kiti kullanılarak, üretici firmanın önerdiği protokolle cDNA sentezi yapılmıştır. Ardından kPZR yapılarak *Pdx1*, *Ngn3*, *Ins*, *MafA*, *Nkx2.2*, *Nkx6.2*, *Pax4*, *Glut2* ve *Kir6.2* genlerinin ekspresyonun miktarındaki değişimler incelenmiştir.

3.9. Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (kPZR)

cDNA örnekleri kantitatif PZR yapılarak Light Cycler 96 system (Roche, Basel, Switzerland) cihazında analiz edilmiştir. kPZR karışımı: 5 µL iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix karışımı, 0.2 µL Forward, 0.2 µL reverse primer (Çizelge 3.2.), 1 µL DNA (~200 ng) ve 3.6 µL ddH₂O olacak şekilde hazırlanmıştır. İki tekrar halinde hazırlanan örneklerin kPZR'leri, 95°C 10 dakika başlangıç denatürasyonu, 95°C 15s denatürasyon, 60°C de 60s bağlanma ve uzama, olacak şekilde 45 döngü olarak yapılmıştır. Karşılaştırmalı ölçüm $-\log_2$ (Relative expression to GAPDH) ile hesaplanmıştır. *Pdx1*, *Ngn3*, *Ins*, *MafA*, *Nkx2.2*, *Nkx6.2*, *Pax4*, *Glut2* ve *Kir6* genleri *Gapdh* ekspresyonuyla normalize edilmiştir.

3.10. İmmünofloresan Boyama

Plazmitlerin hücelere lipofeksiyonundan 48 saat sonra hücre kültür ortamı uzaklaştırılmıştır. Hücreler 1X PBS ile 3 defa yıkanmıştır. Hücrelerin üzerine 1 mL formalin (%10) eklenmiş ve 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra formalin uzaklaştırılmıştır ve 1X PBS ile 5 dakikalık inkübasyonlarla 3 defa yıkanmıştır. Yıkamadan sonra hücrelerin üzerine 1 mL %0.2 PBS-TritonX-100 (v/v) eklenmiş ve 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra hücreler 1 mL %0.1 PBS-Tween 20 (v/v) ile 5 dakikalık inkübasyonlarla 3 defa yıkanmıştır. Yıkamadan sonra hücrelerin üzerine 1 mL %5 PBS-Tween 20-BSA (w/v) eklenmiş ve 2 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra hücreler 1 mL %0.1 PBS-Tween 20 (v/v) ile 5 dakikalık inkübasyonlarla 3 defa yıkanmıştır. Birincil antikorlar %1 PBS-Tween 20-BSA çözeltisi içinde PDX1 için 1:2000 ve NGN3 için 1:200 oranlarında hazırlanmış ve her bir kuyucuğa 300 µL olacak şekilde hücrelerin üzerine eklenmiştir. Gece boyu 4°C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra hücreler 1 mL %0.1 PBS-Tween 20 (v/v) ile 5 dakikalık inkübasyonlarla 3 defa yıkanarak birincil antikorlar uzaklaştırılmıştır. %1 PBS-Tween 20-BSA çözeltisi içinde 1:400 oranında (PDX1 ve NGN3 için Goat Anti-Rabbit IgG) sekonder antikor hazırlanmış ve her bir kuyucuğa 300 µL olacak şekilde hücrelerin üzerine eklenmiştir. 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra hücreler 1 mL %0.1 PBS-Tween 20 (v/v) ile 5 dakikalık inkübasyonlarla 3 defa yıkanarak ikincil antikor uzaklaştırılmıştır. %1 PBS-Tween 20-BSA çözeltisi içinde 1:400 oranında hazırlanan Hoechst boyası her bir kuyucuğa 300 µL olacak şekilde hücrelerin üzerine eklenmiş ve 20 dakika oda

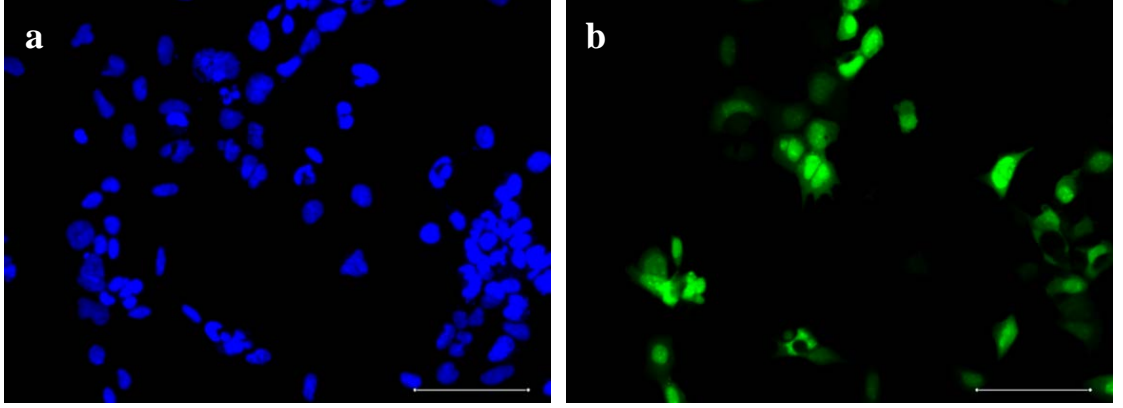
sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra hücreler 1X PBS ile 3 defa yıkanmıştır. Hücreler üzerine 1 mL 1X PBS eklenmiş ve floresan mikroskopta görüntülenmiştir. (Kullanılan birincil ve ikincil antikorların listesi Çizelge 3. 3.'de gösterilmiştir.)

3.11. İstatiksel Analiz

Çalışmamızda elde ettiğimiz verilerin istatistiksel analiz değerlendirmesi için GraphPad Prism 7.0 programı kullanılmıştır. Bulgular istatistiksel olarak değerlendirilirken Student's t-testi yapılmıştır. Sonuçlar %95'lik güven aralığında ve anlamlılık $p < 0.05$ seviyesinde değerlendirilmiştir. Verilerin ortalaması \pm SEM olarak gösterilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

gRNA plazmitlerinin, dCas9-VPR, dCas9-p300 veya dCas9-VP64 plazmitleriyle hücelere lipofeksiyonundan sonra hücelere başarılı bir şekilde aktarıldığını göstermek ve transfeksiyon verimini hesaplamak için hücelere dCas9-VP64-GFP plazmitiyle de muamele edilmiş ve transfeksiyonun başarısı floresan mikroskopunda görüntülenmiştir (Şekil 4.1). Transfeksiyon başarısı GFP pozitif hücelere sayılarak %50 başarıyla gerçekleştiği tespit edilmiştir.

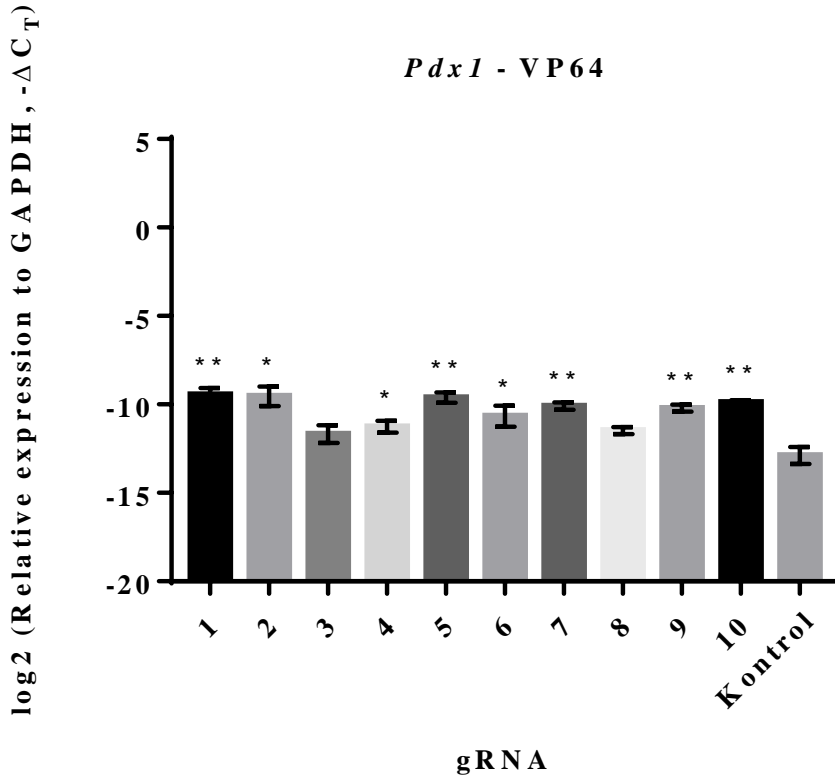


Şekil 4.1. dCas9-VP64_GFP plazmiti verilmiş HEK293 hücelere 24 saat inkübasyon sonundaki mikroskop görüntüsü; dCas9-VP64-GFP plazmitiyle transfeksiyon yapılmış hücelere **a)** DAPI boyaması; **b)** GFP ekspresyonu (Cetvel 100 µm'dir)

4.1. *Pdx1* Geni için İdeal gRNA'ların Belirlenmesi

4.1.1. Seçilen gRNA plazmitlerin dCas9-VP64 plazmiti ile transfeksiyonu

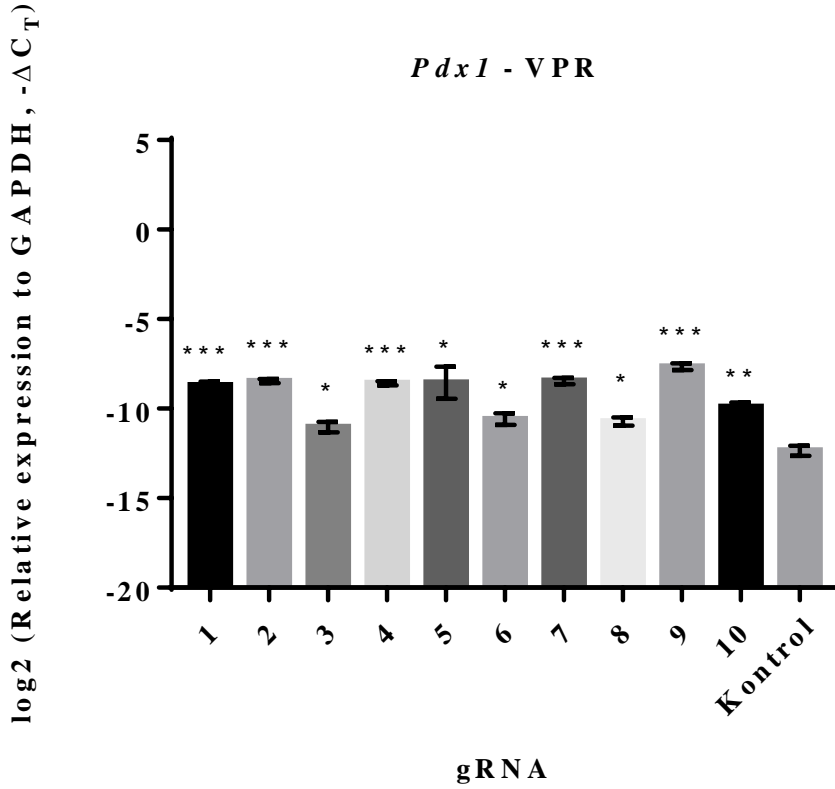
Pdx1 geni için belirlenen 10 gRNA ilk aşamada dCas9-VP64 plazmitiyle hücrelere tek tek olacak şekilde transfekte edilmiştir. Her bir gRNA bölgesinin gen ekspresyonuna olan etkileri gerçek zamanlı kantitatif-PZR ile belirlenmiştir. Şekil 4.2'de *Pdx1* geni için belirlenen 10 hedef bölgenin ilgili gRNA'lar ve dCas9-VP64 plazmitiyle hedeflenmesi durumunda, *Pdx1* geninin kontrol grubuna göre ne kadar aktive edildiği gösterilmiştir.



Şekil 4.2. *Pdx1* geni için belirlenen 10 gRNA'nın dCas9-VP64 plazmitiyle yapılan aktivasyon sonuçları (**p<0.005, *p< 0.05, n=3)

4.1.2. Seçilen gRNA plazmitlerin dCas9- VPR plazmiti ile transfeksiyonu

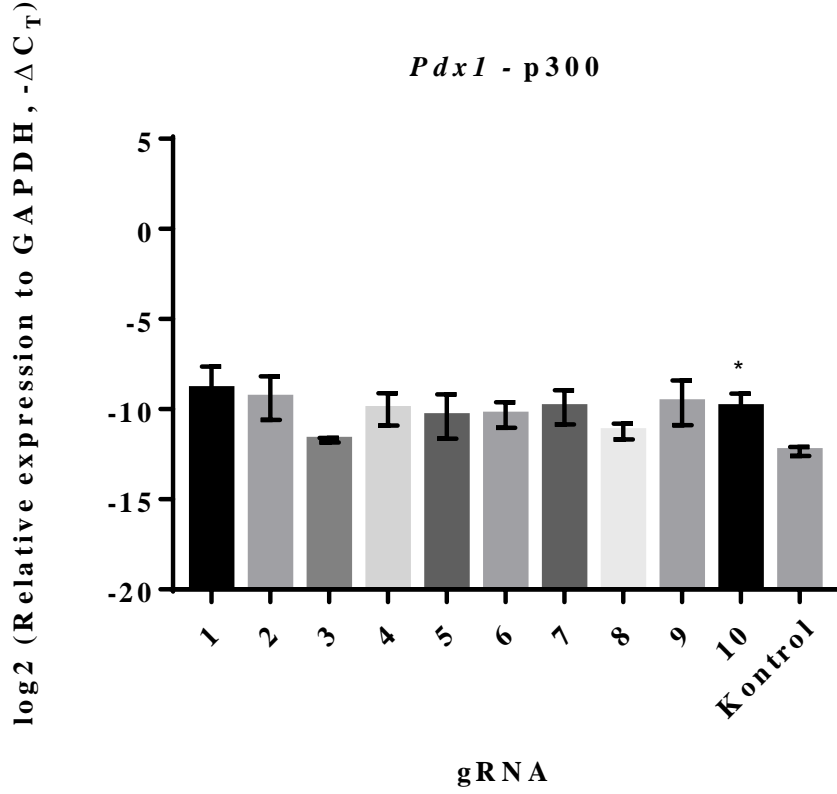
Pdx1 geni için belirlenen 10 gRNA ilk aşamada dCas9-VPR plazmitiyle hücrelere tek tek olacak şekilde transfekte edilmiştir. Her bir gRNA bölgesinin gen ekspresyonuna olan etkileri gerçek zamanlı kantitatif-PZR ile belirlenmiştir. Şekil 4.3'de *Pdx1* geni için belirlenen 10 hedef bölgenin ilgili gRNA'lar ve dCas9-VPR plazmitiyle hedeflenmesi durumunda, *Pdx1* geninin kontrol grubuna göre ne kadar aktive edildiği gösterilmiştir.



Şekil 4.3. *Pdx1* geni için belirlenen 10 gRNA'nın dCas9-VPR plazmitiyle yapılan aktivasyon sonuçları (***) $p < 0.0005$, (**) $p < 0.005$, (*) $p < 0.05$, $n=3$)

4.1.3. Seçilen gRNA plazmitlerin dCas9-p300 plazmiti ile transfeksiyonu

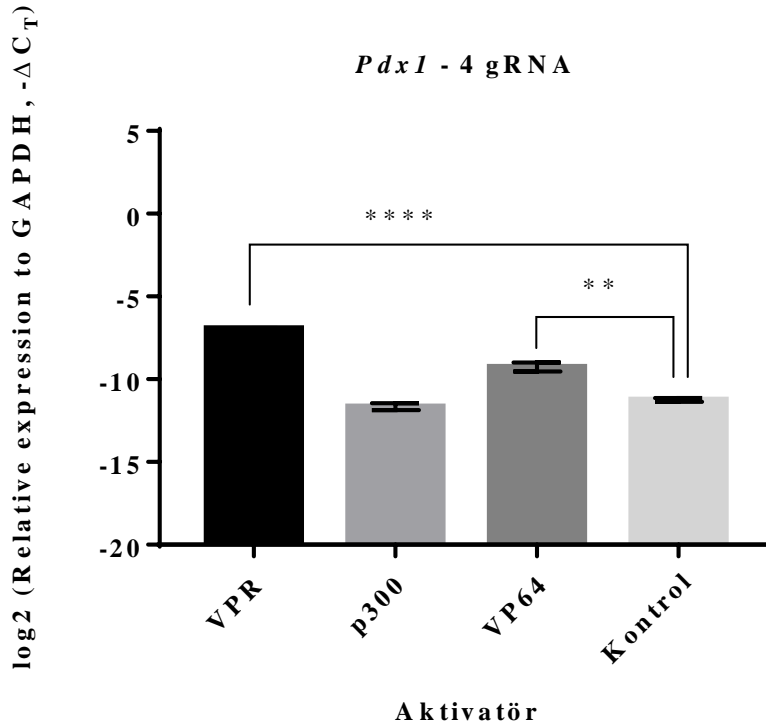
Pdx1 geni için belirlenen 10 gRNA ilk aşamada dCas9-p300 plazmitiyle hücrelere tek tek olacak şekilde transfekte edilmiştir. Her bir gRNA bölgesinin gen ekspresyonuna olan etkileri gerçek zamanlı kantitatif-PZR ile belirlenmiştir. Şekil 4.4'de *Pdx1* geni için belirlenen 10 hedef bölgenin ilgili gRNA'lar ve dCas9-p300 plazmitiyle hedeflenmesi durumunda, *Pdx1* geninin kontrol grubuna göre ne kadar aktive edildiği gösterilmiştir.



Şekil 4.4. *Pdx1* geni için belirlenen 10 gRNA'nın dCas9-p300 plazmitiyle yapılan aktivasyon sonuçları (*p<0.05, n=3)

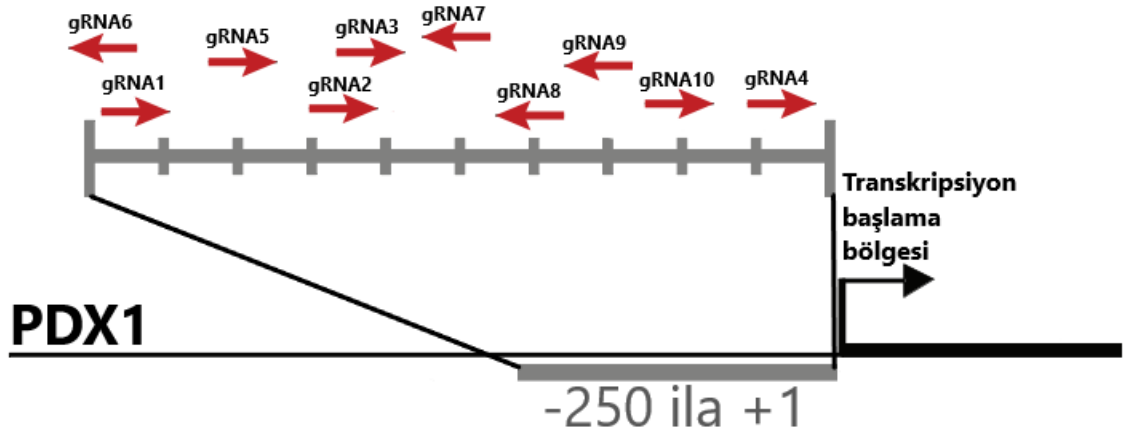
4.1.4. *Pdx1* için belirlenen en iyi 4 gRNA'nın birlikte transfeksiyonu ve *Pdx1* gen aktivasyon düzeyi

10 gRNA'dan *Pdx1* geninin aktivasyonu için istatistiksel olarak anlamlı en ideal gRNA'lar gRNA1, gRNA2, gRNA7 ve gRNA9 olarak belirlenmiştir. Bu gRNA'ların gRNA optimizasyon ve tasarlama çalışmalarında belirlenen parametrelere de uygunluk gösterdiği görülmüştür (Graf vd. 2019; Wang vd. 2019). *Pdx1* geninin aktivasyonu için belirlenen en ideal 4 gRNA'nın dCas9-aktivatör kompleksleriyle yapılan aktivasyon çalışmalarında kontrol grubuna kıyasla en iyi aktivasyonu VPR aktivatörünün sağladığı görülmüştür (Şekil 4.5).



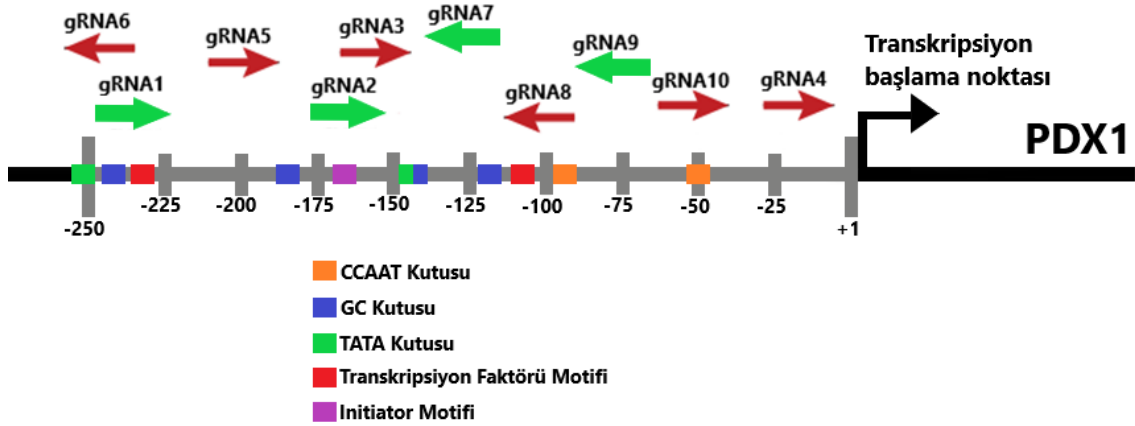
Şekil 4.5. *Pdx1* geninin aktivasyonu için belirlenen en ideal 4 gRNA'nın aynı anda hücrelere dCas9-aktivatör plazmitleriyle lipofeksiyonu sonucu elde edilen *Pdx1* geninin aktivasyon sonuçları (****p<0.0001, **p<0.005, n=3)

Çoklu gRNA'lar kullanılarak hedef gen olan *Pdx1* geninin CRISPR/dCas9 sistemi ile aktivasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu gRNA'ların transkripsiyon başlama bölgesine olan uzaklığı Çizelge 3.4'te gösterilmiştir. Aynı zamanda *Pdx1* geni için seçilen 10 gRNA'nın -250 ila +1 baz çifti aralığında hangi aralığa denk geldiği Şekil 4.6'da gösterilmiştir.



Şekil 4.6. *Pdx1* için belirlenen gRNA'ların *Pdx1* promotoruna bağlandıkları bölgeler

İdeal gRNA'lar belirlendikten sonra bu gRNA'ların bağlandığı bölgede gen aktivitesini düzenleyici bölgelerin olup olmadığı incelenmiştir. Yapılan analizler sonucunda gRNA1'in; transkripsiyon faktörü motifi, TATA kutusu ve GC kutusu bulunan bölgeye bağlandığı, gRNA2'nin; initiator motifi ve GC kutusu bulunan bölgeye bağlandığı, gRNA7'nin; GC kutusu olan bölgeye bağlandığı belirlenmiştir. gRNA9'un bağlandığı yerde herhangi bir motif ve bölgenin olmadığı görülmüştür (Anonymous 4 ; Anonymous 5) (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. *Pdx1* geninin promotor bölgesindeki önemli gen motifleri ve seçilen 4 gRNA'nın bağlandığı düzenleyici bölgeler

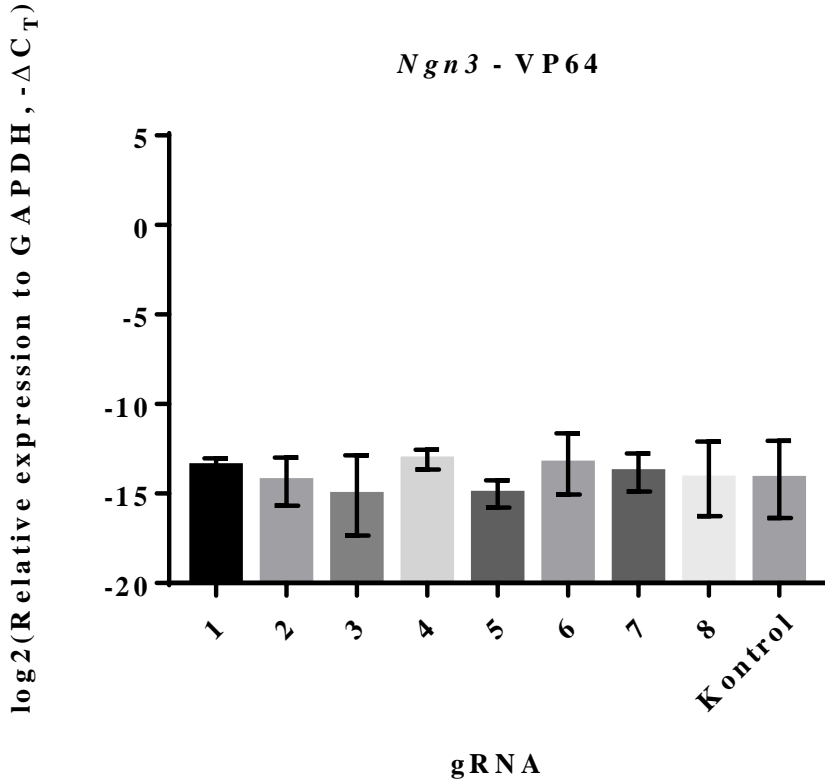
Pdx1 geni için ilk olarak belirlenen 10 gRNA'nın tek başlarına hedef geni ne kadar aktive ettiğine bakılmıştır. En iyi aktivasyonu gösteren ve istatistiksel olarak anlamlı 4 gRNA seçilmiş ve birlikte HEK293 hücrelerine transfekte edilmiştir. Kullanılan aktivatörlerden en iyi aktivasyon sırasıyla VPR, VP64 ve p300'de görülmüştür. VPR aktivatöründe görülen aktivasyon yapılan diğer aktivatör karşılaştırma çalışmaları ile benzer bulgular göstermiştir (Chavez vd. 2015; Chavez vd. 2016). *Pdx1* geninin aktivasyonu için belirlenen en iyi gRNA'ların transkripsiyon

başlama bölgesine uzaklıkları gRNA1 -240 bp, gRNA2 -183 bp, gRNA7 -127 bp ve gRNA9 -79 bp'dir. Bu gRNA'lardan gRNA1 ve gRNA2 pozitif zincire, gRNA7 ve gRNA9 negatif zincire bağlanmaktadır. gRNA'ların hangi zincire bağlandığı ve bu gRNA'ların bağlandıkları bölgedeki gen motifleri de gen aktivasyonunu etkileyebilir. *Pdx1* geninin proksimal promotorundaki metilasyon bölgeleri incelenmiştir (Yang vd. 2012) ve p300 aktivatörüyle hedeflenen bölgelerde gRNA7 ve gRNA9'un bu metilasyon yerlerine bağlandığı görülmüştür. Fakat bu istatistiksel olarak anlamlı bir aktivasyon sağlamamıştır. *Pdx1* geninin optimum aktivasyonu için belirlediğimiz 4 promotor bölgesi kullanılabilir.

4.2. *Ngn3* Geni için İdeal gRNA'ların Belirlenmesi

4.2.1. Seçilen gRNA plazmitlerin dCas9-VP64 plazmiti ile transfeksiyonu

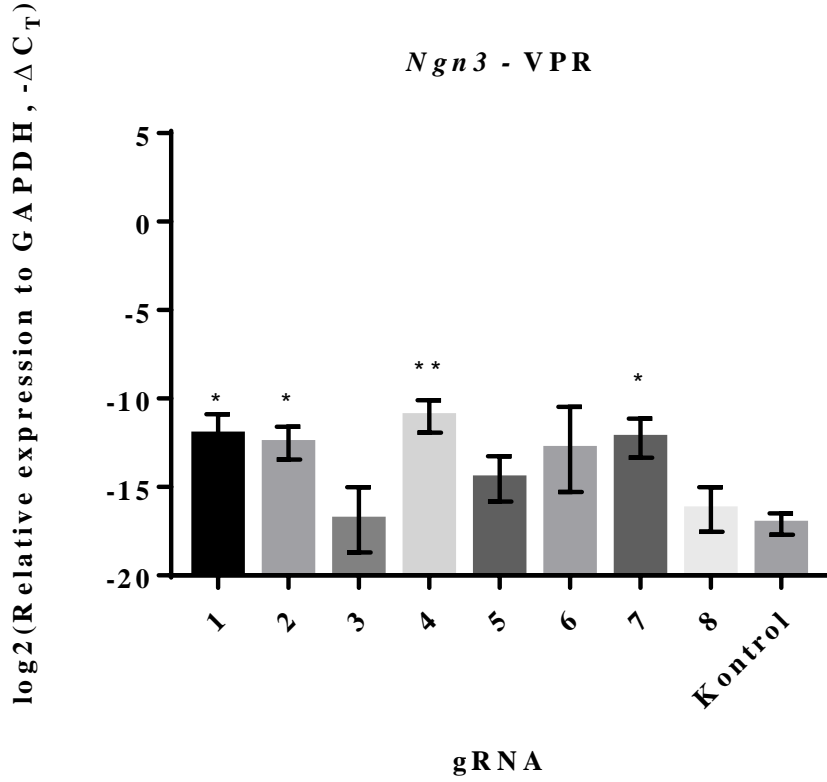
Ngn3 geni için belirlenen 8 gRNA ilk aşamada dCas9-VP64 plazmitiyle hücrelere tek tek olacak şekilde transfekte edilmiştir. Her bir gRNA bölgesinin gen ekspresyonuna olan etkileri gerçek zamanlı kantitatif-PZR ile belirlenmiştir. Şekil 4.8'de *Ngn3* geni için belirlenen 8 hedef bölgenin ilgili gRNA'lar ve dCas9-VP64 plazmitiyle hedeflenmesi durumunda, *Ngn3* geninin kontrol grubuna göre ne kadar aktive edildiği gösterilmiştir.



Şekil 4.8. *Ngn3* geni için belirlenen 8 gRNA'nın dCas9-VP64 plazmitiyle yapılan aktivasyon sonucu (n=3)

4.2.2. Seçilen gRNA plazmitlerin dCas9- VPR plazmiti ile transfeksiyonu

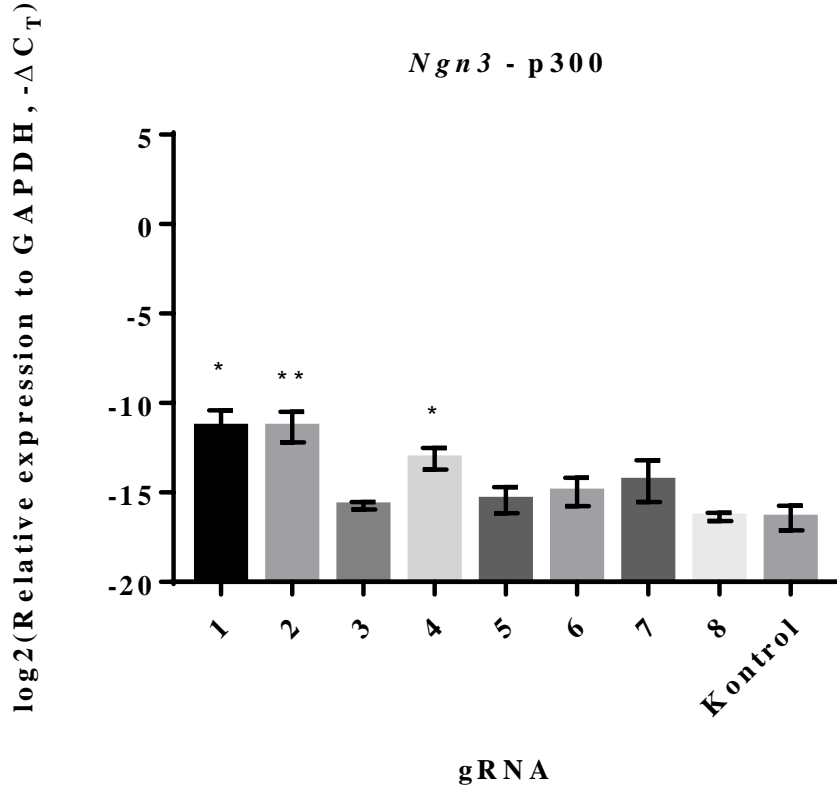
Ngn3 geni için belirlenen 8 gRNA ilk aşamada dCas9-VPR plazmitiyle hücrelere tek tek olacak şekilde transfekte edilmiştir. Her bir gRNA bölgesinin gen ekspresyonuna olan etkileri gerçek zamanlı kantitatif-PZR ile belirlenmiştir. Şekil 4.9'de *Ngn3* geni için belirlenen 8 hedef bölgenin ilgili gRNA'lar ve dCas9-VPR plazmitiyle hedeflenmesi durumunda, *Ngn3* geninin kontrol grubuna göre ne kadar aktive edildiği gösterilmiştir.



Şekil 4.9. *Ngn3* geni için belirlenen 8 gRNA'nın dCas9-VPR plazmitiyle yapılan aktivasyon sonuçları (**p<0.005, *p<0.05, n=3)

4.2.3. Seçilen gRNA plazmitlerin dCas9-p300 plazmiti ile transfeksiyonu

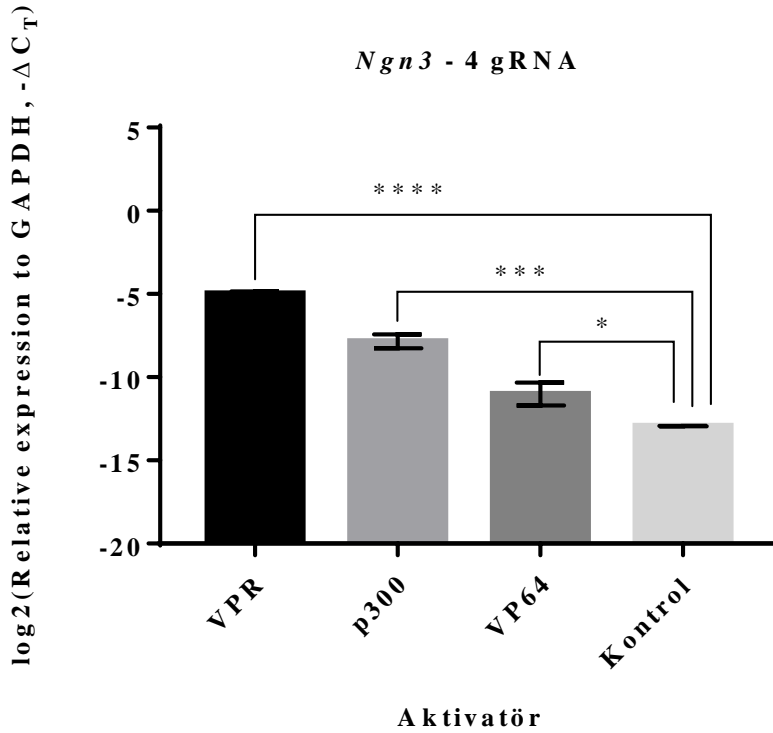
Ngn3 geni için belirlenen 8 gRNA ilk aşamada dCas9-p300 plazmitiyle hücrelere tek tek olacak şekilde transfekte edilmiştir. Her bir gRNA bölgesinin gen ekspresyonuna olan etkileri gerçek zamanlı kantitatif-PZR ile belirlenmiştir. Şekil 4.10'da *Ngn3* geni için belirlenen 8 hedef bölgenin ilgili gRNA'lar ve dCas9-p300 plazmitiyle hedeflenmesi durumunda, *Ngn3* geninin kontrol grubuna göre ne kadar aktive edildiği gösterilmiştir.



Şekil 4.10. *Ngn3* geni için belirlenen 8 gRNA'nın dCas9-p300 plazmitiyle yapılan aktivasyon sonucu (**p<0.005, *p<0.05, n=3)

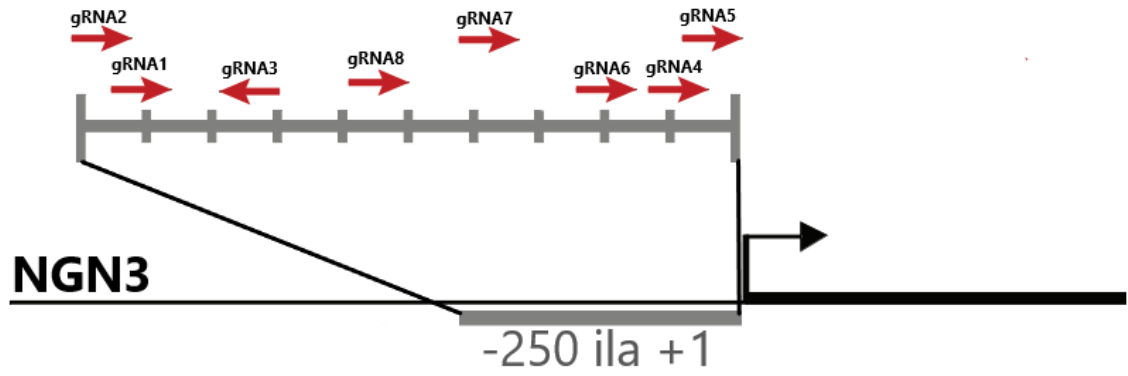
4.2.4. *Ngn3* için belirlenen en iyi 4 gRNA'nın birlikte transfeksiyonu ve *Ngn3* gen aktivasyon düzeyi

8 gRNA'dan *Ngn3* geninin aktivasyonu için en ideal gRNA'lar gRNA1, gRNA2, gRNA4 ve gRNA7 olarak belirlenmiştir. Bu gRNA'ların gRNA optimizasyon ve tasarlama çalışmalarında belirlenen parametrelere de uygunluk gösterdiği görülmüştür (Graf vd. 2019; Wang vd. 2019). *Ngn3* geninin aktivasyonu için belirlenen en ideal 4 gRNA aynı anda hücrelere dCas9-aktivatör plazmitleriyle transfekte edilerek *Ngn3* geninin aktivasyonu incelenmiştir. Yapılan deneyde kontrol grubuna kıyasla en iyi aktivasyonu VPR aktivatörünün sağladığı görülmüştür (Şekil 4.11).



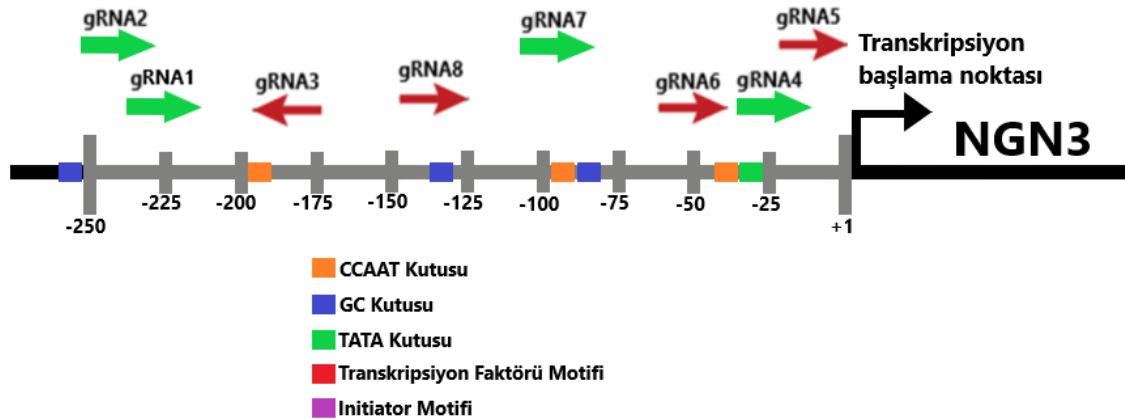
Şekil 4.11. *Ngn3* geninin aktivasyonu için belirlenen en ideal 4 gRNA'nın aynı anda hücrelere dCas9-aktivatör plazmitleriyle lipofeksiyonu sonucu elde edilen *Ngn3* geninin aktivasyon sonuçları (**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.0005$, * $p < 0.05$, $n=3$)

Çoklu gRNA'lar kullanılarak hedef gen olan *Ngn3* geninin CRISPR/dCas9 sistemi ile aktivasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu gRNA'ların transkripsiyon başlama bölgesine olan uzaklığı Çizelge 3.5'te yer almaktadır. Aynı zamanda *Ngn3* geni için seçilen 8 gRNA'nın -250 ila +1 baz çifti aralığında hangi aralığa denk geldiği Şekil 4.12'de gösterilmiştir.



Şekil 4.12. *Ngn3* için belirlenen gRNA'ların *Ngn3* promotorüne bağlanma bölgeleri

İdeal gRNA'lar belirlendikten sonra gRNA'ların bağlandığı bölgede gen aktivitesini düzenleyici bölgelerin olup olmadığına bakılmıştır. Yapılan analizler sonucunda gRNA4'ün; TATA kutusu ve CCAAT kutusu içeren bölgeye, gRNA1 ve gRNA2'nin; GC kutusuna çok yakın bölgelere ayrıca gRNA2'nin CCAAT kutusu bölgesine, gRNA7'nin ise GC kutusu bölgesine bağlandığı görülmüştür (Anonymous 6 ; Anonymous 7) (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. *Ngn3* geninin promotor bölgesindeki önemli gen motifleri ve seçilen 4 gRNA'nın bağlandığı düzenleyici bölgeler

Ngn3 geni için yapılan çalışmada ilk olarak belirlenen 8 gRNA'nın tek başlarına hedef geni ne kadar aktive ettiklerine bakılmıştır. En iyi aktivasyonu gösteren ve istatistiksel olarak anlamlı 4 gRNA seçilip ve birlikte HEK293 hücrelerine transfekte edilmiştir. Kullanılan aktivatörlerden en iyi aktivasyon sırasıyla VPR, p300 ve VP64'te görülmüştür. Bu sonucun daha önce yapılan benzer gen aktivasyonu çalışmalarındaki sonuçlarla uyumlu olduğu belirlenmiştir (Chavez vd. 2016). *Ngn3* geninin aktivasyonu için belirlenen en iyi gRNA'ların transkripsiyon başlama bölgesini uzaklıkları gRNA1 -239 bp, gRNA2 -263 bp, gRNA4 -27 bp ve gRNA7 -93 bp'dir. Bu 4 gRNA'nın hepsi pozitif zincire bağlanmaktadır. gRNA'ların hangi zincire bağlandığı ve bu gRNA'ların

bağlandıkları bölgedeki gen motifleride gen aktivasyonunu etkileyebilir. p300'ün güçlü bir şekilde aktivasyon sağlaması *Ngn3* geninin aktivasyonu için epigenetik değişikliklerin önemli olduğunu göstermiştir. *Ngn3* geninin optimum aktivasyonu için belirlediğimiz 4 promotor bölgesi kullanılabilir.

4.3. *Pdx1* ve *Ngn3* için Belirlenen 8 gRNA'nın Birlikte Transfeksiyonu ve Önemli β Hücreleri Genlerin Aktivasyon Düzeyleri

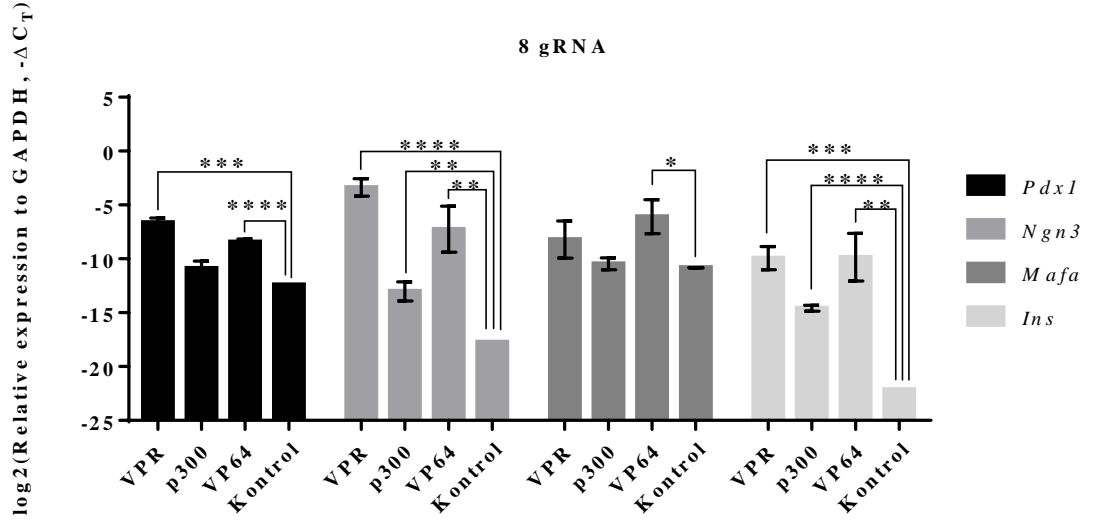
Pdx1 gen aktivasyonu için belirlenen 4 gRNA ve *Ngn3* gen aktivasyonu için belirlenen 4 gRNA dCas9-VPR, dCas9-p300 ve dCas9-VP64 aktivatör kompleksiyle birlikte hücrelere transfekte edilerek önemli β hücreleri genlerinin ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Seçilen bu 8 gRNA'nın birlikte transfekte edilmesi ile birden fazla gRNA'nın gen aktivasyonu için sinerjistik etki gösterdiği görülmüştür.

8 gRNA birlikte kullanıldığında istatistiksel olarak *Pdx1* için VP64 aktivatörünün, *Ngn3* geni için ise VPR aktivatörünün en fazla aktivasyon sağladığı görülmüştür (Şekil 4.14). 8 gRNA ve VP64 aktivatörü ile *Pdx1* ve *Ngn3* genleri aktive edildiğinde *MafA*, *Nkx6.2*, *Pax4*, *Glut2* ve *Kir6.2* genlerinde en yüksek aktivasyon görülmüştür (Şekil 4.15). 8 gRNA ve p300 aktivatörü kullanıldığında ise *Ins* geninde istatistiksel olarak en anlamlı aktivasyon tespit edilmiştir (Şekil 4.14).

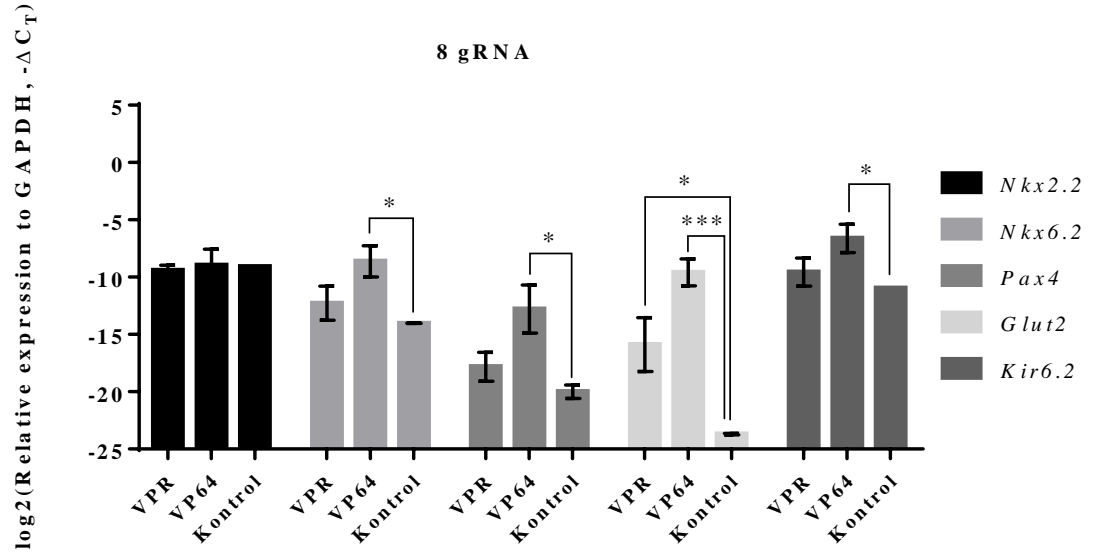
Tek tek *Pdx1* ve *Ngn3* genlerini VPR ile aktive etmeye çalıştığımızda hedeflenen genlerde en yüksek aktivasyon görülmüş fakat bu genlerin aktivasyonu ile aktive olmasını beklediğimiz *MafA*, *Ins*, *Nkx2.2*, *Nkx6.2*, *Pax4* ve *Kir6.2* genlerinde kontrol grubuna kıyasla çok fazla bir aktivasyon görülmemiştir. Bunun aksine *Pdx1* ve *Ngn3* genlerini VP64 ile aktive ettiğimiz zaman kontrol grubuna kıyasla hem *Pdx1* ve *Ngn3* hem de bu genlerin aktivasyonu sonucu aktive olmasını beklediğimiz *MafA*, *Ins*, *Nkx2.2*, *Nkx6.2*, *Pax4*, *Glut2* ve *Kir6.2* genlerinin aktive olduğu görülmüştür. *Pdx1* ve *Ngn3* genlerinin aktivasyonunun önemli β hücreleri endojenik genlerinin aktivasyonunu sağladığı görülmüştür. Endojenik genlerin aktivasyonu için aynı anda birden fazla gRNA kullanarak gRNA'ların sinerjistik etki gösterdiği belirlenmiştir. VPR, VP64 ve p300 aktivatörlerinin hepsinde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede gen aktivasyonu görülmüştür.

Elde edilen sonuçların daha da güvenilir hale gelmesi için yapılacak çalışmalarda CRISPR/dCas9 sistemi tasarlanırken sistemde tüm bileşenler tek bir plazmitte toplanıp pozitif kontrol amacıyla floresan protein eklenmelidir. Buradaki amaç CRISPR ile aktivasyon yaparken sadece transfeksiyon işleminin başarılı olduğu ve gen aktivasyon sisteminin çalıştığı hücreleri seçilebilir hale getirmektir. Transfeksiyon işleminden sonra floresanla aktive edilmiş hücre ayrışması (fluorescence activated cell sorting, FACS) yöntemi ile istenilen hücre topluluğu elde edilebilir. Böylece transfeksiyon işlemlerinden sonra sadece aktivasyon işlemi yapılan hücreler elde edilir ve sadece sistemin çalıştığı hücrelerden RNA izolasyonu yapılır. Bu da gen aktivasyonu açısından daha doğru ve kesin bir sonuç verir (Zhou vd. 2018). Eğer sadece sistemin çalıştığı hücreleri seçmezsek gen aktivasyonu olmayan hücrelerden de RNA gelecektir ve bu da total RNA havuzu içerisinde hedeflediğimiz genlerin RNA'larının oransal olarak azalmasına sebep olacaktır. Hücre farklılaşmasında genlerin ne zaman aktive olması gerektiği önemli olduğundan uyarılabilir CRISPR sistemleri kullanılarak

doğru zamanda sistem açılıp kapatılabilir. Bu sayede hücre programlama etkinliği en üst seviyeye çıkarılabilir.



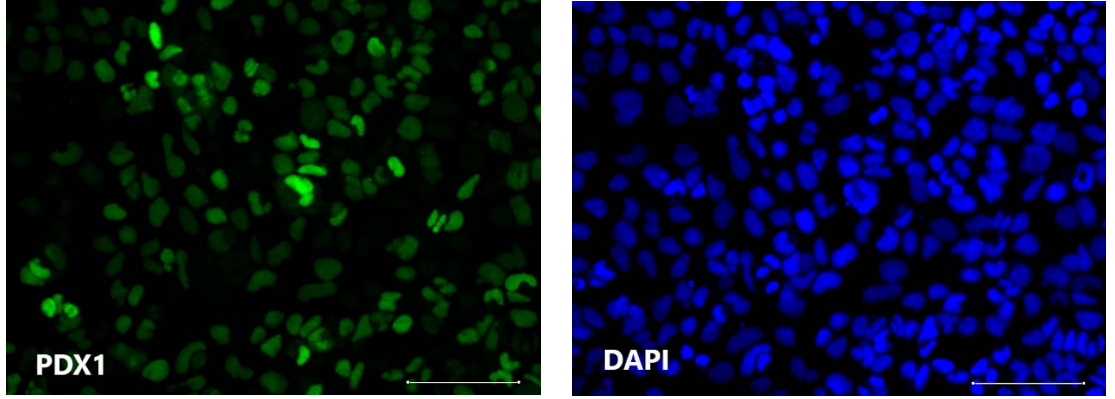
Şekil 4.14. Önemli pankreatik genlerden *Pdx1*, *Ngn3*, *MafA* ve *Ins* genlerinin aktivasyon sonuçları (****p<0.0001, ***p<0.0005, **p<0.005, *p<0.05, n=3)



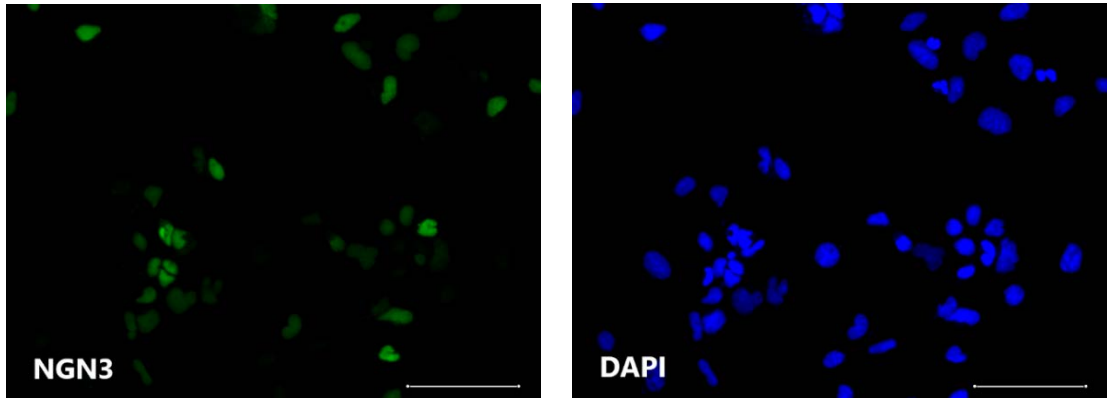
Şekil 4.15. Önemli pankreatik genlerden *Nkx2.2*, *Nkx6.2*, *Pax4*, *Glut2* ve *Kir6.2* genlerinin aktivasyon sonuçları (****p<0.0001, ***p<0.0005, **p<0.005, *p<0.05, n=3)

4.4. Gen Aktivasyonu Sonucu Proteinlerin Belirlenmesi

20 ng gRNA plazmiti ve 200ng dCas9-aktivatör plazmiti verilen HEK293 hücrelerinin Anti-PDX1 ve Anti-NGN3 antikorları ile boyanarak eksprese olan genlerin proteine de çevrildiği gösterilmiştir. CRISPR/dCas9 aktivasyon sistemiyle aktive edilen endogenik *Pdx1* ve *Ngn3* ifadesi gerçekleşmiş ve endogenik proteinlerin çekirdeğe lokalize olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.16 ve Şekil 4.17).



Şekil 4.16. *Pdx1* geninin belirlenen 4 gRNA ve dCas9-VPR plazmiti ile aktivasyonu sonucu Anti-Pdx1 (yeşil) ve DAPI (mavi) immün boyama sonucu (Cetvel 100 µm'dir)



Şekil 4.17. *Ngn3* geninin belirlenen 4 gRNA ve dCas9-VPR plazmiti ile aktivasyonu sonucu Anti-Ngn3 (yeşil) ve DAPI (mavi) immün boyama sonucu (Cetvel 100 µm'dir)

5. SONUÇLAR

Bu çalışmada, CRISPR/dCas9 aktivasyon sistemiyle 3 farklı aktivatör kullanılarak *Pdx1* ve *Ngn3* endogenik genlerinin aktivasyonu gösterilmiştir. kPZR sonuçları incelenerek gen aktivasyonunun istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı değerlendirilmiştir. Yapılan Student t testi analizi sonucu *Pdx1* geni için 10 gRNA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmüş ve istatistiksel olarak anlamlı olan 4 tane gRNA belirlenmiştir. *Pdx1* geninin aktivasyonu için en iyi gRNA'ların gRNA1, gRNA2, gRNA7 ve gRNA9 olduğu görülmüştür. Student t testi analizi sonucu *Ngn3* geni için 8 gRNA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmüş ve istatistiksel olarak anlamlı olan 4 tane gRNA belirlenmiştir. *Ngn3* geninin aktivasyonu için en iyi gRNA'ların gRNA1, gRNA2, gRNA4 ve gRNA7 olduğu görülmüştür. Bu sonuçlarla beraber *Pdx1* ve *Ngn3* genleri için en uygun aktivatör, aktivasyon bölgeleri ve gRNA sekansları belirlenmiştir.

Yapılan aktivasyon deneyleri sonucunda β hücresi fenotipi için hangi aktivatör komplekslerinin en iyi şekilde çalıştığına tespiti yapılmıştır. Aktivatörlerin kıyaslanması açısından en iyi aktivasyon sırasıyla VPR, VP64 ve p300 aktivatöründe görülmüştür. gRNA'lar tek bir gen aktivasyonu için kullanıldığında en iyi aktivasyon VPR ile sağlanmıştır. Fakat *Pdx1* ve *Ngn3* için belirlenen en ideal gRNA'lar toplu olarak uygulandığında β hücresi oluşumu için önemli olan genlerde en fazla aktivasyon VP64 ile görülmüştür. Hücre programlanması denemelerinde programlama verimliliğini etkileyen faktörlerden biri hangi transkripsiyon faktörlerinin hangi kombinasyonlarda ve miktarlarda kullanıldığıdır. Elde edilen sonuçlara göre *Pdx1* ve *Ngn3* genleri hücre programlamasında kullanıldığı durumda genlerin VPR ile aşırı ekspresyonunun programlama etkinliğini düşürebileceği gözlenmiştir. VP64 kullanıldığı durumda ise hem hedeflenen endogenik gen ekspresyonunun artacağı hem de diğer β hücresi genlerinin aktive olacağı görülmüştür. *Pdx1*'in aşırı eksprese olması ilişkili olduğu genler açısından önemlidir. *Pdx1*'in düşük, orta ya da yüksek ekspresyonu hücrelerde farklı sinyallere neden olacağından β hücre programlaması da bundan etkilenebilir. Aynı şekilde *Ngn3* geninin de ekspresyon seviyesi önemlidir ve hücre programlama etkinliğini etkileyebilir. Kullanılan aktivatörlerden p300 doğrudan epigenetik değişiklikler yaparak aktivasyona neden olmaktadır. Bu tez çalışmasında p300'ün yapmış olduğu epigenetik değişikliklerin hücre programlamasını etkilediği görülmüştür. VPR ve VP64 aktivatörleri transkripsiyon başlama kompleksinin birden fazla bileşenini toplamak için iskele görevi görmektedir. Fakat kromatin durumunu enzimatik olarak doğrudan modüle etmemektedirler. Aksine p300 spesifik bölgedeki spesifik epigenetik işaretleri doğrudan değiştirmektedir. Etki mekanizmalarının farklı olması gen aktivasyonunda p300'ün daha az etkili olduğu düşünülmüştür. p300 daha çok enhansır bölgelerinde asetilasyon yaparak gen aktivasyonuna katkıda bulunmaktadır (Raisner vd. 2018). Bu tez çalışmasında proksimal promotör bölgeleri hedeflenmiştir. Enhansır bölgeler hedeflenmediğinden p300'ün çok etki göstermemiş olabileceği düşünülmüştür. Aktivatör etkinliklerinin karşılaştırılması yapıldığında *Pdx1* ve *Ngn3* genlerinin tek başına aktivasyonu yapılmak isteniyorsa dCas9-VPR aktivatör kompleksinin kullanılması gerektiği görülmüştür. *Pdx1* ve *Ngn3* genlerini aktive ederek diğer önemli genlerin aktive edilmesi isteniyorsa dCas9-VP64 aktivatör kompleksinin kullanılması gerektiği belirlenmiştir. Aynı zamanda çoklu gRNA'lar kullanılarak *Pdx1* ve *Ngn3*

genlerinin aktive edilmesiyle PDX1 ve NGN3 proteinlerinde de artış olduğu immün boyama ile gösterilmiştir.

Bu tez çalışmasıyla pankreatik genlerin aktivasyonunu sağlayan en iyi dCas9-aktivatör sistemi tespit edilmiştir. Çoklu genlerin çoklu gRNA'lar ile *in vitro* eş zamanlı transkripsiyonel aktivasyonu gerçekleştirilmiştir. CRISPR/dCas9 aktivasyon sisteminin *in vitro* olarak oldukça verimli olduğu ve hedef genlerin protein seviyelerini başarılı bir şekilde arttırdığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar birlikte ele alındığında diyabet hastalığının tedavisinde ihtiyaç duyulan alternatif β hücresi kaynaklarının oluşturulması için bu tez bir ön çalışma olmuştur. Literatürle kıyaslandığında β hücresi genlerinin CRISPR/dCas9 sistemiyle aktive edilerek β hücresi farklılaşmasının gerçekleştirildiği bir çalışma olmaması çalışmamızın özgünlüğünü göstermektedir. Tez çalışmasında nicel olarak CRISPR/dCas9 sistemi kullanarak insülin eksprese edebilen hücrelerin oluşturulabileceği gösterilmiştir.

Yapılan bu çalışmalara ek olarak dönüştürülen hücrelerin ne kadar çok β hücresine benzedikleri belirlenmelidir. Bunun içinde glikoza duyarlı olup olmadığına, teratom riski taşıyıp taşımadığına ve insülin pozitif hücre karakterini ne kadar süre koruyabildiği incelenmelidir. Daha sonra deney hayvanlarında denemeler yapılarak *in vivo* ortamdaki karakterizasyon çalışmaları yapılmalıdır.

6. KAYNAKLAR

- Aguayo-Mazzucato, C., Koh, A., El Khattabi, I., Li, W. C., Toschi, E., Jermendy, A., Juhl, K., Mao, K., Weir, G. C., Sharma, A. vd. 2011. *Mafa expression enhances glucose-responsive insulin secretion in neonatal rat beta cells. Diabetologia*, 54 (3): 583-593.
- Akinci, E., Banga, A., Greder, L. V., Dutton, J. R., Slack, J. M. 2012. *Reprogramming of pancreatic exocrine cells towards a beta (β) cell character using *pdx1*, *ngn3* and *mafa*. The Biochemical Journal*, 442 (3): 539-550.
- Akinci, E., Banga, A., Tungatt, K., Segal, J., Eberhard, D., Dutton, J. R., Slack, J. M. W. 2013. *Reprogramming of various cell types to a beta-like state by *pdx1*, *ngn3* and *mafa*. PloS one*, 8 (11): e82424-e82424.
- Amitai, G., Sorek, R. 2016. *Crispr-cas adaptation: Insights into the mechanism of action. Nature Reviews Microbiology*, 14 (2): 67-76.
- Anonymous 1. : Pancreatic figure online. Retrieved from <http://encyclopedia.lubopitko-bg.com/>
- Anonymous 2. : Langerhans islet online. Retrieved from http://droualb.faculty.mjc.edu/Course%20Materials/Physiology%20101/Chapter%20Notes/Fall%202007/figure_06_10b_labeled.jpg
- Anonymous 3. : Crispr system online. Retrieved from https://old.abmgood.com/marketing/knowledge_base/CRISPR-Cas9-dCas9-Gene-Regulation.php
- Anonymous 4. : Pdx1 promotor database online. Retrieved from https://epd.epfl.ch/cgi-bin/get_doc?db=hgEpdNew&format=genome&entry=PDX1_1
- Anonymous 5. : Pdx1 gene database online. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3651>
- Anonymous 6. : Ngn3 promoter database. Retrieved from https://epd.epfl.ch/cgi-bin/get_doc?db=hgEpdNew&format=genome&entry=NEUROG3_1
- Anonymous 7. : Ngn3 gene database online. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/50674>
- Antcliff, J., Haider, S., Proks, P., Sansom, M. S. P., Ashcroft, F. M. 2005. *Functional analysis of a structural model of the atp-binding site of the katp channel kir6.2 subunit. The EMBO Journal*, 24 (2): 229-239.
- Apelqvist, A., Li, H., Sommer, L., Beatus, P., Anderson, D. J., Honjo, T., Hrabe de Angelis, M., Lendahl, U., Edlund, H. 1999. *Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. Nature*, 400 (6747): 877-881.
- Aramata, S., Han, S., Kataoka, K. 2007. *Roles and regulation of transcription factor mafa in islet β -cells. Endocrine Journal*, 54 (5): 659-666.
- Balboa, D., Prasad, R. B., Groop, L., Otonkoski, T. 2019. *Genome editing of human pancreatic beta cell models: Problems, possibilities and outlook. Diabetologia*, 62 (8): 1329-1336.

- Balboa, D., Weltner, J., Euroola, S., Trokovic, R., Wartiovaara, K., Otonkoski, T. 2015. *Conditionally stabilized dcas9 activator for controlling gene expression in human cell reprogramming and differentiation. Stem Cell Reports*, 5 (3): 448-459.
- Banga, A., Akinci, E., Greder, L. V., Dutton, J. R., Slack, J. M. 2012. *In vivo reprogramming of sox9+ cells in the liver to insulin-secreting ducts. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109 (38): 15336-15341.
- Barrangou, R., Marraffini, L. A. 2014. *Crispr-cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. Molecular Cell*, 54 (2): 234-244.
- Bartsevich, V. V., Miller, J. C., Case, C. C., Pabo, C. O. 2003. *Engineered zinc finger proteins for controlling stem cell fate. Stem Cells*, 21 (6): 632-637.
- Beerli, R. R., Barbas, C. F. 2002. *Engineering polydactyl zinc-finger transcription factors. Nature Biotechnology*, 20 (2): 135-141.
- Beerli, R. R., Dreier, B., Barbas, C. F. 2000. *Positive and negative regulation of endogenous genes by designed transcription factors. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97 (4): 1495.
- Beerli, R. R., Segal, D. J., Dreier, B., Barbas, C. F. 1998. *Toward controlling gene expression at will: Specific regulation of the erbb-2/tyr-2 promoter by using polydactyl zinc finger proteins constructed from modular building blocks. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95 (25): 14628-14633.
- Beltran, A., Parikh, S., Liu, Y., Cuevas, B. D., Johnson, G. L., Futscher, B. W., Blancafort, P. 2007. *Re-activation of a dormant tumor suppressor gene maspin by designed transcription factors. Oncogene*, 26 (19): 2791-2798.
- Blancafort, P., Magnenat, L., Barbas, C. F. 2003. *Scanning the human genome with combinatorial transcription factor libraries. Nature Biotechnology*, 21 (3): 269-274.
- Bluestone, J. A., Herold, K., Eisenbarth, G. 2010. *Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. Nature*, 464 (7293): 1293-1300.
- Brouns, S. J. J., Jore, M. M., Lundgren, M., Westra, E. R., Slijkhuis, R. J. H., Snijders, A. P. L., Dickman, M. J., Makarova, K. S., Koonin, E. V., van der Oost, J. 2008. *Small crisper rnas guide antiviral defense in prokaryotes. Science*, 321 (5891): 960-964.
- Bultmann, S., Morbitzer, R., Schmidt, C. S., Thanisch, K., Spada, F., Elsaesser, J., Lahaye, T., Leonhardt, H. 2012. *Targeted transcriptional activation of silent oct4 pluripotency gene by combining designer tales and inhibition of epigenetic modifiers. Nucleic Acids Research*, 40 (12): 5368-5377.
- Cade, J. E., Hanison, J. 2017. *The pancreas. Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 18 (10): 527-531.
- Chavez, A., Scheiman, J., Vora, S., Pruitt, B. W., Tuttle, M., P R Iyer, E., Lin, S., Kiani, S., Guzman, C. D., Wiegand, D. J. vd. 2015. *Highly efficient cas9-mediated transcriptional programming. Nature Methods*, 12 (4): 326-328.

- Chavez, A., Tuttle, M., Pruitt, B. W., Ewen-Campen, B., Chari, R., Ter-Ovanesyan, D., Haque, S. J., Cecchi, R. J., Kowal, E. J. K., Buchthal, J. vd. 2016. *Comparison of cas9 activators in multiple species. Nature Methods*, 13 (7): 563-567.
- Chiarella, A. M., Lu, D., Hathaway, N. A. 2020. *Epigenetic control of a local chromatin landscape. International Journal of Molecular Sciences*, 21 (3): 943.
- Cho, S. W., Kim, S., Kim, J. M., Kim, J. S. 2013. *Targeted genome engineering in human cells with the cas9 rna-guided endonuclease. Nature Biotechnology*, 31 (3): 230-232.
- Collombat, P., Hecksher-Sørensen, J., Serup, P., Mansouri, A. 2006. *Specifying pancreatic endocrine cell fates. Mechanisms of Development*, 123 (7): 501-512.
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A. vd. 2013. *Multiplex genome engineering using crispr/cas systems. Science*, 339 (6121): 819-823.
- Conrad, E., Stein, R., Hunter, C. S. 2014. *Revealing transcription factors during human pancreatic β cell development. Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 25 (8): 407-414.
- Das, C., Lucia, M. S., Hansen, K. C., Tyler, J. K. 2009. *Cbp/p300-mediated acetylation of histone h3 on lysine 56. Nature*, 459 (7243): 113-117.
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A., Eckert, M. R., Vogel, J., Charpentier, E. 2011. *Crispr rna maturation by trans-encoded small rna and host factor rnae iii. Nature*, 471 (7340): 602-607.
- Ferber, S., Halkin, A., Cohen, H., Ber, I., Einav, Y., Goldberg, I., Barshack, I., Seijffers, R., Kopolovic, J., Kaiser, N. vd. 2000. *Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia. Nature Medicine*, 6 (5): 568-572.
- Galivo, F., Benedetti, E., Wang, Y., Pelz, C., Schug, J., Kaestner, K. H., Grompe, M. 2017. *Reprogramming human gallbladder cells into insulin-producing β -like cells. PloS one*, 12 (8): e0181812-e0181812.
- Garg, A., Lohmueller, J. J., Silver, P. A., Armel, T. Z. 2012. *Engineering synthetic tal effectors with orthogonal target sites. Nucleic Acids Research*, 40 (15): 7584-7595.
- Gilbert, L. A., Larson, M. H., Morsut, L., Liu, Z., Brar, G. A., Torres, S. E., Stern-Ginossar, N., Brandman, O., Whitehead, E. H., Doudna, J. A. vd. 2013. *Crispr-mediated modular rna-guided regulation of transcription in eukaryotes. Cell*, 154 (2): 442-451.
- Glick, E., Leshkowitz, D., Walker, M. D. 2000. *Transcription factor beta2 acts cooperatively with e2a and pdx1 to activate the insulin gene promoter. The Journal of Biological Chemistry*, 275 (3): 2199-2204.
- Goodman, R. H., Smolik, S. 2000. *Cbp/p300 in cell growth, transformation, and development. Genes & Development*, 14 (13): 1553-1577.
- Gottesman, S. 2011. *Dicing defence in bacteria. Nature*, 471 (7340): 588-589.

- Gradwohl, G., Dierich, A., LeMeur, M., Guillemot, F. 2000. *Neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 (4): 1607-1611.
- Graf, R., Li, X., Chu, V. T., Rajewsky, K. 2019. *Sgrna sequence motifs blocking efficient crispr/cas9-mediated gene editing. Cell Reports*, 26 (5): 1098-1103.e1093.
- Gräslund, T., Li, X., Magnenat, L., Popkov, M., Barbas, C. F. 2005. *Exploring strategies for the design of artificial transcription factors: Targeting sites proximal to known regulatory regions for the induction of gamma-globin expression and the treatment of sickle cell disease. Journal of Biological Chemistry*, 280 (5): 3707-3714.
- Guo, J., Ma, D., Huang, R., Ming, J., Ye, M., Kee, K., Xie, Z., Na, J. 2017. *An inducible crispr-on system for controllable gene activation in human pluripotent stem cells. Protein Cell*, 8 (5): 379-393.
- Guo, S., Dai, C., Guo, M., Taylor, B., Harmon, J. S., Sander, M., Robertson, R. P., Powers, A. C., Stein, R. 2013. *Inactivation of specific β cell transcription factors in type 2 diabetes. The Journal of Clinical Investigation*, 123 (8): 3305-3316.
- Hardwick, J. M., Tse, L., Applegren, N., Nicholas, J., Veluona, M. A. 1992. *The epstein-barr virus r transactivator (rta) contains a complex, potent activation domain with properties different from those of vp16. Journal of Virology*, 66 (9): 5500.
- He, H., Yu, F. X., Sun, C., Luo, Y. 2011. *Cbp/p300 and sirt1 are involved in transcriptional regulation of s-phase specific histone genes. PloS one*, 6 (7): e22088-e22088.
- Hilton, I. B., D'Ippolito, A. M., Vockley, C. M., Thakore, P. I., Crawford, G. E., Reddy, T. E., Gersbach, C. A. 2015. *Epigenome editing by a crispr-cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. Nature Biotechnology*, 33 (5): 510-517.
- Holland, A. M., Hale, M. A., Kagami, H., Hammer, R. E., MacDonald, R. J. 2002. *Experimental control of pancreatic development and maintenance. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99 (19): 12236-12241.
- Itkin-Ansari, P., Levine, F. 2004. *Sources of β -cells for human cell-based therapies for diabetes. Cell Biochemistry and Biophysics*, 40 (3): 103-112.
- Jennings, R. E., Berry, A. A., Kirkwood-Wilson, R., Roberts, N. A., Hearn, T., Salisbury, R. J., Blaylock, J., Piper Hanley, K., Hanley, N. A. 2013. *Development of the human pancreas from foregut to endocrine commitment. Diabetes*, 62 (10): 3514-3522.
- Jeon, J., Correa-Medina, M., Ricordi, C., Edlund, H., Diez, J. A. 2009. *Endocrine cell clustering during human pancreas development. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*, 57 (9): 811-824.

- Jiang, F., Doudna, J. A. 2015. *The structural biology of crispr-cas systems. Current Opinion in Structural Biology*, 30: 100-111.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., Charpentier, E. 2012. *A programmable dual-rna-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science*, 337 (6096): 816-821.
- Jinek, M., East, A., Cheng, A., Lin, S., Ma, E., Doudna, J. 2013. *Rna-programmed genome editing in human cells. eLife*, 2: e00471-e00471.
- Kelly, O. G., Chan, M. Y., Martinson, L. A., Kadoya, K., Ostertag, T. M., Ross, K. G., Richardson, M., Carpenter, M. K., D'Amour, K. A., Kroon, E. vd. 2011. *Cell-surface markers for the isolation of pancreatic cell types derived from human embryonic stem cells. Nature Biotechnology*, 29 (8): 750-756.
- Kunisada, Y., Tsubooka-Yamazoe, N., Shoji, M., Hosoya, M. 2012. *Small molecules induce efficient differentiation into insulin-producing cells from human induced pluripotent stem cells. Stem Cell Research*, 8 (2): 274-284.
- Kuroda, A., Rauch, T. A., Todorov, I., Ku, H. T., Al-Abdullah, I. H., Kandeel, F., Mullen, Y., Pfeifer, G. P., Ferreri, K. 2009. *Insulin gene expression is regulated by DNA methylation. PloS one*, 4 (9): e6953-e6953.
- Lee, C. Y., Grant P. A. 2019. Role of histone acetylation and acetyltransferases in gene regulation. In S. D. McCullough D. C. Dolinoy (Eds.), *Toxicoeugenetics-core principles and applications*. Academic Press, USA, pp. 3-30.
- Lee, S. H., Rhee, M., Kim, J. W., Yoon, K. H. 2017. *Generation of insulin-expressing cells in mouse small intestine by *pdx1*, *mafa*, and *beta2/neurod*. Diabetes & Metabolism Journal*, 41 (5): 405-416.
- Lemper, M., Leuckx, G., Heremans, Y., German, M. S., Heimberg, H., Bouwens, L., Baeyens, L. 2015. *Reprogramming of human pancreatic exocrine cells to β -like cells. Cell Death and Differentiation*, 22 (7): 1117-1130.
- Li, Y., Moore, R., Guinn, M., Bleris, L. 2012. *Transcription activator-like effector hybrids for conditional control and rewiring of chromosomal transgene expression. Scientific Reports*, 2 (1): 897.
- Lin, S., Ewen-Campen, B., Ni, X., Housden, B. E., Perrimon, N. 2015. *In vivo transcriptional activation using crispr/cas9 in drosophila. Genetics*, 201 (2): 433-442.
- Lohmueller, J. J., Armel, T. Z., Silver, P. A. 2012. *A tunable zinc finger-based framework for boolean logic computation in mammalian cells. Nucleic Acids Research*, 40 (11): 5180-5187.
- Makarova, K. S., Haft, D. H., Barrangou, R., Brouns, S. J. J., Charpentier, E., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F. J. M., Wolf, Y. I., Yakunin, A. F. vd. 2011. *Evolution and classification of the crispr-cas systems. Nature Reviews Microbiology*, 9 (6): 467-477.
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., Norville, J. E., Church, G. M. 2013. *Rna-guided human genome engineering via cas9. Science*, 339 (6121): 823.

- Matsuoka, T., Artner, I., Henderson, E., Means, A., Sander, M., Stein, R. 2004. *The mafa transcription factor appears to be responsible for tissue-specific expression of insulin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (9): 2930-2933.
- Melloul, D., Marshak, S., Cerasi, E. 2002. *Regulation of insulin gene transcription. Diabetologia*, 45 (3): 309-326.
- Miki, R., Yoshida, T., Murata, K., Oki, S., Kume, K., Kume, S. 2012. *Fate maps of ventral and dorsal pancreatic progenitor cells in early somite stage mouse embryos. Mechanisms of Development*, 128 (11-12): 597-609.
- Miller, J. C., Tan, S., Qiao, G., Barlow, K. A., Wang, J., Xia, D. F., Meng, X., Paschon, D. E., Leung, E., Hinkley, S. J. vd. 2011. *A tale nuclease architecture for efficient genome editing. Nature Biotechnology*, 29 (2): 143-148.
- Mosley, A. L., Corbett, J. A., Ozcan, S. 2004. *Glucose regulation of insulin gene expression requires the recruitment of p300 by the beta-cell-specific transcription factor pdx1. Molecular Endocrinology*, 18 (9): 2279-2290.
- Noso, S., Kataoka, K., Kawabata, Y., Babaya, N., Hiromine, Y., Yamaji, K., Fujisawa, T., Aramata, S., Kudo, T., Takahashi, S. vd. 2010. *Insulin transactivator mafa regulates intrathymic expression of insulin and affects susceptibility to type 1 diabetes. Diabetes*, 59 (10): 2579-2587.
- Noso, S., Kawabata, Y., Babaya, N., Hiromine, Y., Kawasaki, E., Awata, T., Maruyama, T., Babu, S., Oiso, N., Kawada, A. vd. 2013. *Association study of mafa and mafb genes related to organ specific autoimmunity, with susceptibility to type-1 diabetes in japanese and caucasian populations. Journal of Genetic Syndromes & Gene Therapy*, 4 (11): 204.
- Nostro, M. C., Sarangi, F., Ogawa, S., Holtzinger, A., Corneo, B., Li, X., Micallef, S. J., Park, I. H., Basford, C., Wheeler, M. B. vd. 2011. *Stage-specific signaling through tgfb family members and wnt regulates patterning and pancreatic specification of human pluripotent stem cells. Development*, 138 (5): 861-871.
- Ohneda, K., Ee, H., German, M. 2000. *Regulation of insulin gene transcription. Seminars in Cell & Developmental Biology*, 11 (4): 227-233.
- Oliver-Krasinski, J. M., Kasner, M. T., Yang, J., Crutchlow, M. F., Rustgi, A. K., Kaestner, K. H., Stoffers, D. A. 2009. *The diabetes gene pdx1 regulates the transcriptional network of pancreatic endocrine progenitor cells in mice. The Journal of Clinical Investigation*, 119 (7): 1888-1898.
- Park, K. S., Lee, D., Lee, H., Lee, Y., Jang, Y. S., Kim, Y. H., Yang, H. Y., Lee, S., Seol, W., Kim, J. S. 2003. *Phenotypic alteration of eukaryotic cells using randomized libraries of artificial transcription factors. Nature Biotechnology*, 21 (10): 1208-1214.
- Pedersen, J. K., Nelson, S. B., Jorgensen, M. C., Henseleit, K. D., Fujitani, Y., Wright, C. V. E., Sander, M., Serup, P. 2005. *Endodermal expression of nkx6 genes depends differentially on pdx1. Developmental Biology*, 288 (2): 487-501.
- Perez-Pinera, P., Kocak, D. D., Vockley, C. M., Adler, A. F., Kabadi, A. M., Polstein, L. R., Thakore, P. I., Glass, K. A., Ousterout, D. G., Leong, K. W. vd. 2013.

- Rna-guided gene activation by crispr-cas9-based transcription factors. Nature Methods*, 10 (10): 973-976.
- Plengvidhya, N., Kooptiwut, S., Songtawee, N., Doi, A., Furuta, H., Nishi, M., Nanjo, K., Tantibhedhyangkul, W., Boonyasrisawat, W., Yenchitsomanus, P. vd. 2007. *Pax4 mutations in thais with maturity onset diabetes of the young. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92 (7): 2821-2826.
- Prado, C. L., Pugh-Bernard, A. E., Elghazi, L., Sosa-Pineda, B., Sussel, L. 2004. *Ghrelin cells replace insulin-producing beta cells in two mouse models of pancreas development. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (9): 2924-2929.
- Qi, L. S., Larson, M. H., Gilbert, L. A., Doudna, J. A., Weissman, J. S., Arkin, A. P., Lim, W. A. 2013. *Repurposing crispr as an rna-guided platform for sequence-specific control of gene expression. Cell*, 152 (5): 1173-1183.
- Qiu, Y., Sharma, A., Stein, R. 1998. *P300 mediates transcriptional stimulation by the basic helix-loop-helix activators of the insulin gene. Molecular and Cellular Biology*, 18 (5): 2957-2964.
- Raikwar, S. P., Zavazava, N. 2009. *Insulin producing cells derived from embryonic stem cells: Are we there yet? Journal of Cellular Physiology*, 218 (2): 256-263.
- Raisner, R., Kharbanda, S., Jin, L., Jeng, E., Chan, E., Merchant, M., Haverty, P. M., Bainer, R., Cheung, T., Arnott, D. vd. 2018. *Enhancer activity requires cbp/p300 bromodomain-dependent histone h3k27 acetylation. Cell Reports*, 24 (7): 1722-1729.
- Rebar, E. J., Huang, Y., Hickey, R., Nath, A. K., Meoli, D., Nath, S., Chen, B., Xu, L., Liang, Y., Jamieson, A. C. vd. 2002. *Induction of angiogenesis in a mouse model using engineered transcription factors. Nature Medicine*, 8 (12): 1427-1432.
- Rezania, A., Bruin, J. E., Arora, P., Rubin, A., Batushansky, I., Asadi, A., O'Dwyer, S., Quiskamp, N., Mojibian, M., Albrecht, T. vd. 2014. *Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells. Nature Biotechnology*, 32 (11): 1121-1133.
- Ruben, S. M., Narayanan, R., Klement, J. F., Chen, C. H., Rosen, C. A. 1992. *Functional characterization of the nf-kappa b p65 transcriptional activator and an alternatively spliced derivative. Molecular and Cellular Biology*, 12 (2): 444-454.
- Sachdeva, M. M., Claiborn, K. C., Khoo, C., Yang, J., Groff, D. N., Mirmira, R. G., Stoffers, D. A. 2009. *Pdx1 (mody4) regulates pancreatic beta cell susceptibility to er stress. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106 (45): 19090-19095.
- Savell, K. E., Bach, S. V., Zipperly, M. E., Revanna, J. S., Goska, N. A., Tuscher, J. J., Duke, C. G., Sultan, F. A., Burke, J. N., Williams, D. vd. 2019. *A neuron-optimized crispr/dcas9 activation system for robust and specific gene regulation. eNeuro*, 6 (1): ENEURO.0495-0418.2019.

- Schulz, T. C., Young, H. Y., Agulnick, A. D., Babin, M. J., Baetge, E. E., Bang, A. G., Bhoumik, A., Cepa, I., Cesario, R. M., Haakmeester, C. vd. 2012. *A scalable system for production of functional pancreatic progenitors from human embryonic stem cells. PloS one*, 7 (5): e37004-e37004.
- Seipel, K., Georgiev, O., Schaffner, W. 1992. *Different activation domains stimulate transcription from remote ('enhancer') and proximal ('promoter') positions. The EMBO Journal*, 11 (13): 4961-4968.
- Stanojevic, V., Habener, J. F., Thomas, M. K. 2004. *Pancreas duodenum homeobox-1 transcriptional activation requires interactions with p300. Endocrinology*, 145 (6): 2918-2928.
- Stoffers, D. A., Zinkin, N. T., Stanojevic, V., Clarke, W. L., Habener, J. F. 1997. *Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human ipf1 gene coding sequence. Nature Genetics*, 15 (1): 106-110.
- Tanenbaum, M. E., Gilbert, L. A., Qi, L. S., Weissman, J. S., Vale, R. D. 2014. *A protein-tagging system for signal amplification in gene expression and fluorescence imaging. Cell*, 159 (3): 635-646.
- Terns, M. P., Terns, R. M. 2011. *Crispr-based adaptive immune systems. Current Opinion in Microbiology*, 14 (3): 321-327.
- van Belle, T. L., Coppieters, K. T., von Herrath, M. G. 2011. *Type 1 diabetes: Etiology, immunology, and therapeutic strategies. Physiological Reviews*, 91 (1): 79-118.
- Wang, D., Zhang, C., Wang, B., Li, B., Wang, Q., Liu, D., Wang, H., Zhou, Y., Shi, L., Lan, F. vd. 2019. *Optimized crispr guide rna design for two high-fidelity cas9 variants by deep learning. Nature Communications*, 10 (1): 4284.
- Wang, S., Yan, J., Anderson, D. A., Xu, Y., Kanal, M. C., Cao, Z., Wright, C. V. E., Gu, G. 2010. *Neurog3 gene dosage regulates allocation of endocrine and exocrine cell fates in the developing mouse pancreas. Developmental Biology*, 339 (1): 26-37.
- Wiedenheft, B., Sternberg, S. H., Doudna, J. A. 2012. *Rna-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. Nature*, 482 (7385): 331-338.
- Wiedenheft, B., van Duijn, E., Bultema, J. B., Waghmare, S. P., Zhou, K., Barendregt, A., Westphal, W., Heck, A. J. R., Boekema, E. J., Dickman, M. J. vd. 2011. *Rna-guided complex from a bacterial immune system enhances target recognition through seed sequence interactions. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108 (25): 10092-10097.
- Yang, B. T., Dayeh, T. A., Volkov, P. A., Kirkpatrick, C. L., Malmgren, S., Jing, X., Renström, E., Wollheim, C. B., Nitert, M. D., Ling, C. 2012. *Increased DNA methylation and decreased expression of pdx1 in pancreatic islets from patients with type 2 diabetes. Molecular Endocrinology*, 26 (7): 1203-1212.
- Yang, X. F., Ren, L. W., Yang, L., Deng, C. Y., Li, F. R. 2017. *In vivo direct reprogramming of liver cells to insulin producing cells by virus-free overexpression of defined factors. Endocrine Journal*, 64 (3): 291-302.
- Yoshihara, E., Wei, Z., Lin, C. S., Fang, S., Ahmadian, M., Kida, Y., Tseng, T., Dai, Y., Yu, R. T., Liddle, C. vd. 2016. *Erry is required for the metabolic maturation of*

- therapeutically functional glucose-responsive β cells. Cell Metabolism, 23 (4): 622-634.*
- Zetsche, B., Volz, S. E., Zhang, F. 2015. *A split-cas9 architecture for inducible genome editing and transcription modulation. Nature Biotechnology, 33 (2): 139-142.*
- Zhang, C., Moriguchi, T., Kajihara, M., Esaki, R., Harada, A., Shimohata, H., Oishi, H., Hamada, M., Morito, N., Hasegawa, K. vd. 2005. *Mafa is a key regulator of glucose-stimulated insulin secretion. Molecular and Cellular Biology, 25 (12): 4969-4976.*
- Zhang, X., Ouyang, S., Kong, X., Liang, Z., Lu, J., Zhu, K., Zhao, D., Zheng, M., Jiang, H., Liu, X. vd. 2014. *Catalytic mechanism of histone acetyltransferase p300: From the proton transfer to acetylation reaction. The Journal of Physical Chemistry B, 118 (8): 2009-2019.*
- Zhou, H., Liu, J., Zhou, C., Gao, N., Rao, Z., Li, H., Hu, X., Li, C., Yao, X., Shen, X. vd. 2018. *In vivo simultaneous transcriptional activation of multiple genes in the brain using crispr-dcas9-activator transgenic mice. Nature Neuroscience, 21 (3): 440-446.*
- Zhou, Q., Brown, J., Kanarek, A., Rajagopal, J., Melton, D. A. 2008. *In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. Nature, 455 (7213): 627-632.*
- Zhu, Y., Liu, Q., Zhou, Z., Ikeda, Y. 2017. *Pdx1, neurogenin-3, and mafa: Critical transcription regulators for beta cell development and regeneration. Stem Cell Research & Therapy, 8 (1): 240-240.*
- Zhu, Z., Li, Q. V., Lee, K., Rosen, B. P., González, F., Soh, C. L., Huangfu, D. 2016. *Genome editing of lineage determinants in human pluripotent stem cells reveals mechanisms of pancreatic development and diabetes. Cell Stem Cell, 18 (6): 755-768.*

ÖZGEÇMİŞ

Adem KABA

admbdmn7@gmail.com

adem.kaba@siirt.edu.tr



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans 2018-2020	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Antalya
Lisans 2013-2017	Cumhuriyet Üniversitesi Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Sivas

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Araştırma Görevlisi 2020-Devam Ediyor	Siirt Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Siirt
--	--

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler (SCI & SSCI)

1- Cengiz, M.F., Babacan, U., Akinci, E., Tuncer Kesci, S. and **Kaba, A.** (2020), Extraction of phenolic acids from ancient wheat bran samples by ultrasound application. J Chem Technol Biotechnol. doi:10.1002/jctb.6519

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

1- Akinci E., **Kaba A.**, Badakul G., " Optimization of transfection conditions and reagents to improve the transfection efficiency of dCas9-Activator plasmid into human cells". Human Gene Therapy, 2018, vol. 29-12, A72-A72

2- Babacan Ü., Akinci E., Keşçi S., Cengiz M.F., **Kaba A.**, Akar T., "Variations of Ferulic Acid in Traditional Turkish Wheat Species", International 8. Drug Chemistry Conference, ANTALYA, TÜRKİYE, 28 Şubat -1 Mart 2020, pp.OP64-OP64

3- Babacan Ü., Akinci E., **Kaba A.**, Akçakale F., Cengiz M.F., "Cell Viability Effects of Ferulic Acid on Melanoma Cell Line (SK-MEL-30)", International 8. Drug Chemistry Conference, ANTALYA, TÜRKİYE, 27 Şubat -1 Mart 2020, pp.OP65-OP65