



T.C
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KOŞULLU MUTAGENEZ TEKNİĞİ İLE TRANSGENİK
AXOLOTL GELİŞTİRİLMESİNE YÖNELİK VEKTÖRLERİN
TASARLANMASI VE İN VİVO İNCELENMESİ**

DAMLA YAY

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Dr. Öğretim Üyesi SVEN P.
VİLAİN

İSTANBUL – 2022

TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi
Programın Seviyesi: Yüksek Lisans (X) Doktora ()
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyoloji ve Genetik
Tez Sahibi : Damla YAY
Tez Başlığı : Koşullu Mutagenез Tekniği ile Transgenik Axolotl
Geliştirilmesine Yönelik Vektörlerin Tasarlanması ve İn Vivo
İncelenmesi
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Güney Yerleşkesi
Sınav Tarihi : 26.07.2022

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve nitelik yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

<u>Danışman</u>	<u>Kurumu</u>	<u>İmza</u>
Dr.Öğr.Üyesi Sven Pierre L. VILAIN	İstanbul Medipol Üniversitesi	
<u>Sınav Jüri Üyeleri</u>		
Prof.Dr. Gürkan ÖZTÜRK	İstanbul Medipol Üniversitesi	
Dr.Öğr.Üyesi Emrah EROĞLU	Sabancı Üniversitesi	

Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../ tarih ve/..... - sayılı kararı ile şekil yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof.Dr. Neslin EMEKLİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdür V.

ETİK İLKE VE KURULLARA UYGUNLUK BEYANI

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içerisinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Damla YAY



TEŞEKKÜR

İstanbul Medipol Üniversitesi Sağlık Bilimleri ve Teknolojileri Araştırma Merkezi (SABİTA)'inde yapılan bu tez çalışması için oldukça gelişmiş olanakları bizlere sağlayan ve tez sürecimdeki desteklerinden ötürü SABİTA müdürü Prof. Dr. Gürkan Öztürk'e,

Kendisiyle çalışmaktan sonsuz keyif aldığım, gerçek bilimi öğrendiğim, her koşulda yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen danışman hocam Dr. Sven Vilain'e,

Tez çalışmam boyunca bana deneyimleriyle ve dostluklarıyla yardımcı olan canım arkadaşlarım Zeynep Aladađ ve Sadık Bay'a,

Başladığım ilk günden beri her koşulda yanımda olan, hiçbir desteğini esirgemeyen dostum Berna Yıldırım'a,

Hayatımın her anında olduğu gibi tez sürecim boyunca da beni asla yalnız bırakmayan yol arkadaşım Efe Yıldırım'a,

Bu dünyadaki en değerli varlığım, annem Nalan Semerci'ye sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI FORMU	i
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI	2
TEŞEKKÜR	3
İÇİNDEKİLER	4
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
TABLO LİSTESİ	ix
1.ÖZET.....	10
2.ABSTRACT	11
3.GİRİŞ VE AMAÇ	12
4.GENEL BİLGİLER	15
4.1.Rejenerasyon	15
4.2. Rejenerasyon Mekanizmaları.....	15
4.2.1. Epimorfoz (Epimorphosis).....	15
4.2.2. Morfalaksiz (Morphallaxis)	16
4.2.3. Kompansatuar (Compensatory) Rejenerasyon.....	16
4.3. Aksolotl (Ambystoma Mexicanum).....	16
4.4. Aksolotlda Uzun Rejenerasyonu.....	17
4.5. Koşullu Mutageniz	18
4.6. Crispr/Cas9 Sistemi.....	19
4.7. Crispr/Cas9 Aracılı Koşullu Mutageniz	21
4.8 Doku Spesifik Promotor-Enhansörler.....	22
4.8.1. Keratin.....	22
4.8.2. Isı şoku elemanları (Heat shock element, HSE).....	23
4.8.3.Iroquois (Iro-Irx)	24
4.8.4 Eyeless (Ey)	26

4.9. Transfeksiyon Yöntemleri.....	27
4.9.1. Biyolojik (viral) Transfeksiyon.....	28
4.9.2. Kimyasal Vektörlerle Transfeksiyon.....	28
4.9.3. Fiziksel Yolla Transfeksiyon	29
4.9.3.1. Elektroporasyon	29
5.MATERYAL ve METOD	31
5.1.gBlok'ların Tasarlanması	31
5.2. gBlok ile çalışma.....	32
5.3. gBlok'ların Klonlanması.....	34
5.3.1 gBlok Sekansların Klonlanması için Gerekli Restriksiyon Reaksiyonları.....	35
5.3.2. gBlok'ların Klonlanması için Hifi birleştirme reaksiyonları ...	36
5.3.3 Transformasyon.....	39
5.3.4. Koloni PZR	39
5.4. β -aktin Promotörünün Klonlanması.....	40
5.4.1. Restriksiyon Reaksiyonları	40
5.4.2. Ligasyon Reaksiyonları.....	41
5.4.3. Transformasyon.....	43
5.4.4. Koloni PZR	43
5.5. Am_U6 - Hs_U6 promotörü ile GFP gRNA'nın tasarlanması ve klonlanması	44
5.6. Vektörlerin İn-Vitro/Vivo İncelenmesi.....	46
5.6.1.PEI transkfeksiyonu	46
5.6.2.Elektroporasyon	47
5.7.Malzeme Listesi	50
6. BULGULAR	51
6.1.Klonlanan Pazmitlerin Doğrulanması	51

6.2 Plazmitlerin İn Vivo/Vitro olarak Mikroskopik İncelemeleri.....	55
6.3 GFP gRNA'nın İn Vivo/Vitro olarak Mikroskopik İncelemeleri.....	58
7. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	59
8. KAYNAKLAR	65
9. EKLER.....	71
10.ETİK KURUL ONAYI.....	73
11.ÖZGEÇMİŞ.....	74



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 4.3.1: Aksolotl gelişim evreleri: 3 haftalık yavru aksolotl, 3 aylık yavru, 5 aylık geç yavru	10
Şekil 4.4.1: Aksolotlda kesilmiş uzuv gelişim basamakları.	11
Şekil 4.6.1: CRISPR Cas9 aracının gerekli elemanları ve kullanılan temel tamir mekanizmaları.....	14
Şekil 4.8.1.1: X. Leavis FGK (fin and gill keratin) (yüzgeç ve solungaç keratini) promotörüne yakın bölgenin genomik dizisi.....	16
Şekil 4.8.3.1: Sırasıyla xenopus (x), zebta balığı (z) ve farenin (m) Irx geninin ultra korunmuş bölgelerinden UCRB1 dizilerinin hizalaması	19
Şekil 4.9.1: İki farklı transfeksiyon yönteminin şematik gösterimi.....	21
Şekil 5.1.1: İnsan HSE konsensüs dizisinin pozisyonel matriksi.	23
Şekil 5.2.1: gBlokların sırasıyla, A) Eyless, B) HSE, C) AmUCRB1 (Irx), D) Keratin, şematik gösterimleri.	26
Şekil 5.3.1: Orijinal PX458 Plazmidi: siyah renkli olan kısımlar sırasıyla U6 promotörünü ve CMV enhansırını göstermektedir	28
Şekil 5.3.2.1: Hifi DNA birleştirme reaksiyonunun mekanizmaların şematik gösterimi.....	30
Şekil 5.5.1: Farklı U6 promotörlerinin, insan Hs_U6, aksolotl Am_U6 kıyaslanması ve benzer domainleri.	38
Şekil 5.5.2: Am_U6 GFP gRNA ve mCheery gBlok'ların şematik gösterimi.....	39
Şekil 5.6.2.1: Plazmitlerin aksolotl kol derisinde elektroporasyon yoluyla testi.....	41

Şekil 6.1.1.: Sırasıyla, A) HSE YBTATA, B) KER YBTATA, C) IRX YBTATA, D) EY YBTATA E) mCheery, F) Hs_U6 GFP gRNA, G) Am_U6 GFP gRNA insertlerinin.....	46
Şekil 6.1.2: Beta aktin protomotörünün klonlanmasının koloni PZR ile doğrulanmasının jel görüntüleri. a) Keratin YBTATA, HSE YBTATA ve Ey YBTATA gbloklarının klonlanmış olduğu PX458 plazimitinden.	47
Şekil 6.2.1: Doku spesifik enhansırların YBTATA promotörü ile birlikte in-vitro ve in-vivo incelemeleri.....	48
Şekil 6.2.2: Doku spesifik enhansırların beta aktin promotörü ile birlikte in-vitro ve in-vivo incelemeleri.	49
Şekil 6.2.3: Orijinal PX458 plazmitinin aksolotla elektroporasyonundan 4 gün sonraki.....	50
Şekil 6.2.4: HSE YBTATA plazmitinin HEK-293T hücrelerine verildikten.....	50
Şekil 6.3.1: Sırasıyla insan U6 ve aksolotl U6 promotörleri altındaki GFP gRNA'nın mCheery filtresi altında hücre ve aksolotl derisindeki görüntüleri.....	51

TABLO LİSTESİ

Tablo 5.3.1.1.: Restriksiyon reaksiyonunun içeriği.	29
Tablo 5.3.2.2: Her bir gBlok sekansı için Hifi reaksiyonların içeriği.....	30
Tablo 5.5.1.: KER, EYE, HSE, IRX gBlokların klonlanması sonucunu doğru koloninin tespiti için gerekli.....	32
Tablo 5.6.1.1: YBTATA promotörünün yerine Beta aktin promotörünün klonlanması için gerekli kesim reaksiyonlarının içeriği.....	34
Tablo 5.6.2.1: Beta aktin promotörünün klonlanması için gerekli ligasyon reaksiyonlarının içeriği.....	35
Tablo 5.6.4.1.: Beta aktin promotorunun klonlanması sonucunu doğru koloninin tespiti için gerekli a) primerler.	36
Tablo 5.6.1.1: Transfeksiyon içeriği.	40
Tablo 5.6.2.2: Aksolotl derisinde optimize edilen elektroporasyon protokolleri. Protokoller por ve transfer darbesi olarak.....	42

1. ÖZET

KOŞULLU MUTAGENEZ TEKNİĞİ İLE TRANSGENİK AXOLOTL GELİŞTİRİLMESİNE YÖNELİK VEKTÖRLERİN TASARLANMASI VE İN-VIVO İNCELENMESİ

Fiziksel travma, yaşlanma ve çeşitli hastalıklar, hücrelerde, dokularda ve hatta organlarda kalıcı hasarlara sebep olabilmekte ve insanların yaşam kalitesini düşürebilmektedir. Yaralı dokuları veya organları normal işlevlerini yeniden kazanacak şekilde eski haline getirmek, bu kısıtlamaları hafifletecek ve yaşam kalitesini arttıracaktır. Ne yazık ki, çoğu memeli dokusunun yenilenme potansiyeli sınırlıdır ve/veya yoktur. Ancak, semenderler kalp, omurilik, belirli beyin bölgeleri ve tüm uzuvları gibi karmaşık biyolojik yapıları hem yapı hem de işlev olarak yeniden oluşturabilmektedirler. Ayrıca, semenderler, tüm tetrapodların arasında en yüksek rejenerasyon yeteneğine sahip canlılardır. Bu nedenle, semender *Ambystoma Mexicanum*'da (aksolotl) yenilenmeyi sağlayan mekanizmaları incelemek, bu doğal süreç hakkında fikir edinmemize yardımcı olacaktır. Bu genleri rejenerasyon sırasında incelemek için doku ve/veya zamana özgü koşullu mutasyonların üretilmesi önem arz etmektedir. Zira mevcut metodolojiler, dokuya özgü fonksiyon kaybı mutantların üretilmesine izin vermemektedir. Bu tez çalışmasındaki temel amacımız, aksolotlda tek jenerasyon içerisinde koşullu mutasyonlar üretmemizi sağlayacak metodolojiler geliştirmektir. Bu amaç doğrultusunda gen hedefleme teknolojilerinden CRISPR/Cas9 aracılı doku spesifik ve zamansal kontrollü vektörler özel promotör-enhansör dizileri altında klonlanmıştır. Üretilen bu vektörlerin in vitro ve in vivo fonksiyonallitesi ve ekspresyon seviyeleri ileri mikroskopi teknikleri aracılığıyla görüntülenmiştir. Tasarlanan vektörlerin doku ve zamansal hedeflemesinin başarılı olması durumunda aksolotl rejenerasyon mekanizmalarında rol alan genler için kullanılabilir bir sistem geliştirilmiş olacak ve bu sayede rejenerasyon temelli birçok hastalığın anlaşılması ve mevcut terapötik manipülasyonların geliştirmesine yardımcı olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Aksolotl, CRISPR/Cas9, doku spesifik enhansörler, koşullu mutagenez, rejenerasyon

Bu tez çalışmasının yer aldığı proje Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 120C104 numaralı proje ile desteklenmiştir.

2. ABSTRACT

DESIGNING AND IN VIVO INVESTIGATION OF VECTORS FOR THE DEVELOPMENT OF TRANSGENIC AXOLOTL BY CONDITIONAL MUTAGENESIS TECHNIQUE

Physical trauma, aging, and some diseases can cause permanent damage from tissues to entire organs. Such situations decrease the quality of human life. Restoring injured tissues and organs to their normal function will alleviate these limitations. Unfortunately, most mammalian tissues lack functional regenerative capacity. While mammalian tissues have limited self-regeneration, salamanders can reconstruct complex biological structures like the heart, spinal cord, certain brain regions, and entire limbs in both structure and function. In addition, salamanders have the highest regeneration ability among all tetrapods such as axolotl. Unraveling the mechanisms underlying the regeneration process requires functional study of the genes involved. Studying these genes during regeneration often requires the creation of tissue and/or time-specific mutants. Current methodologies do not allow us to generate tissue-specific loss-of-function mutants, and therefore, new methods are needed. Our main goal is to develop a methodology that will enable us to generate conditional mutations in a single generation axolotl. For this purpose, one of the gene targeting technologies, CRISPR Cas9, and particular promotor-enhancers, were used to develop tissue specific and temporally controlled targeting. These unique promotor-enhancers were cloned into vectors before being tested in vitro and in vivo. Afterwards, expression results were demonstrated by advanced microscopy. If the vectors that allow tissue specific and temporal targeting in axolotls are successful, we can use this system to target genes that are involved in regeneration and study their specific functions in certain tissues and/or at a defined time during regeneration. A better understanding of the tissue specific function of certain genes should allow to understand and improve current therapeutic manipulations of many regeneration-based diseases.

Keywords: Axolotl, CRISPR/Cas9, conditional mutagenesis techniques, tissue specific enhancers, regeneration

This project is supported by The Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) with the project number: 120C104.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Kayıp veya hasar görmüş dokulara yenilenebilme, yani rejenerasyon özelliğinin kazandırılması, organ yetmezliği, uzuv kayıpları veya üçüncü derece yanıklar gibi bedensel fonksiyon kaybı yaşayan kişilere büyük ölçüde fayda sağlayacaktır. Ayrıca rejeneratif tıptaki gelişmeler, alzaymır, parkinson, kanser ve osteoporoz gibi yaşlanmaya bağlı olarak ortaya çıkan hastalıkların da hafifletilmesine yardımcı olacaktır [1]. Bu sebeple rejenerasyon mekanizmalarını daha derin bir şekilde anlamak, insanlarda meydana gelen yaralanmaların ve dejeneratif hastalıkların tedavi edilmesi için bir araç olacaktır [2].

Semenderler yüksek derecede rejeneratif kapasiteye sahip olan canlılardır ve yetişkin hale geldiklerinde bile kaybedilen uzuvlarını yerine koyabilmektedirler. Bu bağlamda, bir Meksika semenderi olan *Ambystoma Mexicanum* (aksolotl) organ ve uzuv yenilenme mekanizmalarını incelemek için önemli bir model organizma olarak karşımıza çıkmaktadır [3]. Aksolotllar tüm uzuvlarını, kalp, beyin ve akciğerler gibi iç organları da dahil olmak üzere yara izi bırakmadan yenileyebilmektedirler. Aksolotllarda geliştirilecek olan rejenerasyon ve yaşlanma modeli çalışmaları, insanlarda da görülen benzer fizyolojik durumların anlaşılmasına adına önem arz etmektedir [4].

Rejenerasyonu kontrol eden biyolojik süreçlerin anlaşılması, bu süreçte rol alan genlerin karakterizasyonunu gerektirmektedir. Bu açıdan bakıldığında, hedeflenen genlerin fizyolojik işleyişinin anlaşılması elzemdir. Bir genin fonksiyonunu anlamamanın en iyi yollarından biri ise onu bloke etmektir. Bu işlem için DNA dizileri hedef alınmakta ve mutasyonlar (null mutations) oluşturulmaktadır. Buna rağmen, tüm organizmayı etkileyen fonksiyon kaybı mutasyonları, rejenerasyon sırasında gen fonksiyonunun anlaşılmasını kısıtlayabilmektedir. Çoğu gen, bir organizmanın yaşamı boyunca farklı anlarda görev aldığından, işlevlerini tamamiyle bloke etmek rejenerasyon dışında daha birçok süreci de etkileyebilmektedir. Üstelik, bu mutasyonlar istenilen aşamalarda gelişse bile, global (tüm organizmayı kapsayan) mutasyonlar, hücre otonomuna karşı hücre otonom olmayan mutasyonları değerlendirmeye izin vermez. Hücre dışı otonom mutasyonlar, bir hücredeki

mutasyonların diğeryabancı tip hücreleri etkilediğinde ortaya çıkar. Tüm hücreler mutant olduğunda bu analiz gerçekleştirilemez. Bir genin işlevini istenilen herhangi bir dokuda ve herhangi bir zamanda incelemek için yersel-zamansal mutasyonlar oluşturmak, yani koşullu mutagenenez yöntemleri geliştirilmelidir.

Genomik DNA'yı oldukça verimli bir şekilde hedeflememize ve mutant organizmalar üretmemize izin veren yöntemler mevcuttur ve bu yöntemlerin başında ise günümüzde oldukça popüler olan CRISPR/Cas9 sistemi gelmektedir. Bu yöntem bir klavuz RNA (guide RNA, gRNA) aracılı spesifik hedefleme yoluyla genomda ilgili geni bulmakta ve Cas9 proteini aracılığıyla da çift zincirli kırılmalar yaratarak gen düzenlemesini mümkün kılmaktadır [5]. Bu sistemi daha da geliştirmek, doku ve zamansal kontrolü sağlayabilmek için ardışık iki hedefleme planlanmaktadır. Bunun için genoma entegre olacak ve gRNA'yı tüm hayvanda, Cas9 cDNA'yı (komplementer DNA) ise doku veya zamansal kontrollü olarak eksprese edecek bir transgen dizayn edilmiştir. İlk hedeflemede genoma entegre edilecek bu vektördeki (plazmit DNA) dur kodu ile, daha önce aksolotlda hedeflenebilirliği gösterilmiş *tirozin* (*tyr*) geninin ilk allelinin inaktivasyonu sonucu heterogizot aksolotl oluşacaktır. İkinci hedeflemeyle ise diğeryallelin doku spesifik inaktivasyonu sağlanacaktır. Bu ikinci hedefleme esnasında genoma entegre olmuş transgen dokuya özgü ve zamansal kontrolü sağlayacak promotör-enhansır (gen ekspresyonunu başlatan ve regüle eden özel DNA bölgeleri) altında bir Cas9 eksprese edecektir. Bu sayede sadece eksprese olacak bu spesifik Cas9'a sahip olan dokularda ikinci hedefleme gerçekleşebilecektir. Yeşil floresan proteini (GFP, green fluorescence protein) içeren transgen sayesinde hedefleme olayları takip edilebilecektir. *Tirozin* (*tyr*) geninin homozigot mutasyonu sonucu albino aksolotl (derideki melanin eksikliğinden kaynaklı) oluştuğu daha önce gösterilmiştir [6]. Ardışık iki hedefleme yöntemi ile zigota (tek hücre aşamasında) enjeksiyon sonrasında tek jenerasyonda spesifik dokulara özgü ve zamansal kontrollü albino kısımlara sahip aksolotllar oluşturulması hedeflenmektedir. Bu kapsamda yapılan tezin amacı ise doku ve zamansal kısıtlı hedeflemeyi sağlayacak vektörlerin tasarlanması, *tyr* gRNA'nın çalışırılığının kontrol edilmesi adına alternatif GFP gRNA'nın tasarlanması ve bunların in vitro ve in vivo incelenmesidir.

Tasarlanan plazmitlerin dokuya özgü bir şekilde veya zamansal kontrolü sağlayacak biçimde özel promotör-enhensır bölgeleri altında eksprese olan Cas9 proteinine sahip olmaları gerekmektedir. Zamansal ifade için yapay bir ısı şoku enhensırı test edilecektir. Isı şoku proteinleri ısı şoku elemanlarını (heat shock elements, HSE) içerir [7]. Birden fazla HSE içeren bir enhensırın, hem HELA hücrelerinde hem de medaka balıklarında ısı kaynaklı transkripsiyonel aktivasyona uğradığı yapılan daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir [7]. Doku spesifik hedeflemede ise deriye özgü ekspresyon için daha önce *Xenopusta* (bir kurbağa türü) gösterilen minimal Keratin enhensırı seçilmiştir [8]. Alternatif olarak ise daha önce *Drosophila* ve farede çalıştığı gösterilen ve göze özgü olduğu bilinen 200 nükleotit uzunluğundaki Eye enhensırı seçilmiştir [9]. Diğer bir enhensır ise, nöronal gelişimde, pronefröz dallanmada, kalp ve göz gibi bölgelerde özellikle erken gelişim safhasında oldukça etkin olan Iroquois gen enhensırı olarak belirlenmiş ve enhensır aktivitesinin *Xenopus* ve Zebra balığında bulunduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [10]. Seçilen bu enhensırların daha önce benzer ve farklı türde organizmalarda çalıştığı gösterildiği için aksolotlda da çalışacağı düşünülmektedir.

Bu tezin yukarıda belirtilen temel amacı doğrultusunda tasarlanacak olan vektörlerin ve gRNA'nın öncelikle uygun bir plazmite koşullu mutagenezi sağlayacak enhensır ve promotörler ile birlikte klonlanması ve ardından HEK293T hücrelerine transfeksiyonu ile in vitro incelemelerinin yapılması amaçlanmıştır. Daha sonra ise geliştirilen vektörlerin aksolotl derisine elektroporasyon yöntemi ile transfeksiyonun gerçekleştirilmesi ve bu sayede in vivo incelemelerinin de yapılması hedeflenmiştir. Gerçekleştirilecek tüm in vitro ve in vivo ekspresyon analizleri için ileri mikroskopi tekniklerinin kullanılması planlanmaktadır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Rejenerasyon

Rejenerasyon, türler arasında büyük farklılıklar göstermekle birlikte organizmaların hasarlı veya kayıp dokularını yerine koyması olarak tanımlanmaktadır [2]. Teleost balıkları ve aksolotl gibi memeli olmayan birçok omurgalı yüksek rejeneratif kapasiteye sahiptir ve tüm uzuvlarını, kalbin geniş bir bölümünü, kesilmiş bir omiriliği ve daha birçok dokularını yenileyebilmektedir [11]. Omurgasız hayvanlardan hidra ve planaryalar ise küçük vücut parçalarından tüm organizmayı yeniden üretebilecek kadar etkili rejenerasyon özelliğine sahiptirler [11]. İnsanların da dahil olduğu memeli türlerinde ise, karaciğer, bağırsak epiteli, deri ve kan gibi bazı dokular yaşam boyu yenilenme potansiyeline sahiptir ancak, memelilerde görülen rejenerasyon kapasitesi oldukça sınırlıdır [12] [1]. Örnek vermek gerekirse, karaciğer rejenerasyonunda, kaybedilen/ampüte edilen doku kısmı tamamiyle büyümediğinden, büyüyen doku telafi edici hiperplazi (compensatory hyperplasia) olarak tanımlanmaktadır [13]. Kas rejenerasyonu ise satellite hücreleri aracılığıyla memelilerde gözlenen doku rejenerasyonunun bir başka örneği olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu tip rejenerasyon, hasarlı kas liflerinin onarılmasında çok etkilidir ancak eksiz edilmiş tüm kasların yenilenmesini sağlamaması ile sınırlıdır [14].

4.2. Rejenerasyon Mekanizmaları

Doku rejenerasyonunun bilinen mekanizması, yaraların üzerinde morfogenez başlatması bakımından embriyonik gelişimin belirli özellikleriyle aynıdır [2]. Embriyogenez sırasında kritik olan ve tipik olarak proliferatif, göç edebilen veya morfogenetik işlevleri yürüten gen aktivasyonları, rejenerasyon boyunca da süren baskın bir durumdur [2]. Bu bağlamda, üç temel rejenerasyon yolu bulunmaktadır ve bunlar aşağıda özetlenmiştir.

4.2.1. Epimorfoz (Epimorphosis)

Epimorfoz (epi- üzeri, morf -form), amputasyon güdüğünün ucunda bulunan bir proliferatif hücre kütleli olarak adlandırılan blastema dokusunun oluştuğu

rejenerasyon yöntemi olarak tanımlanmaktadır. Yaralı uzuvun yeni yapılandırılması, olgun uzuvdan tamamen farklılaşan hücrelerin hücre döngüsüne geri döndüğü ve yenilenme sürecinde farklılaşarak farklı hücre tipleri oluşturulduğu bir süreci kapsamaktadır [15].

4.2.2. Morfalaksiz (Morphallaxis)

Morfalaksiz (morf-form, alaksiz-değişim), çoğalma olmadan yeniden şekillenmeyi içermektedir. Hücre bölünmesinin olmaması, morfalaksizi tanımlamak için yeterli bir kriter olarak görülmemektedir [15]. Mevcut dokuların yeniden modellenmesi yoluyla gerçekleşmekte ve çok az miktarda yeni büyüme görülmektedir. Bu tür rejenerasyona, hidralarda görülen yenilenme örnek olarak verilebilmektedir [16].

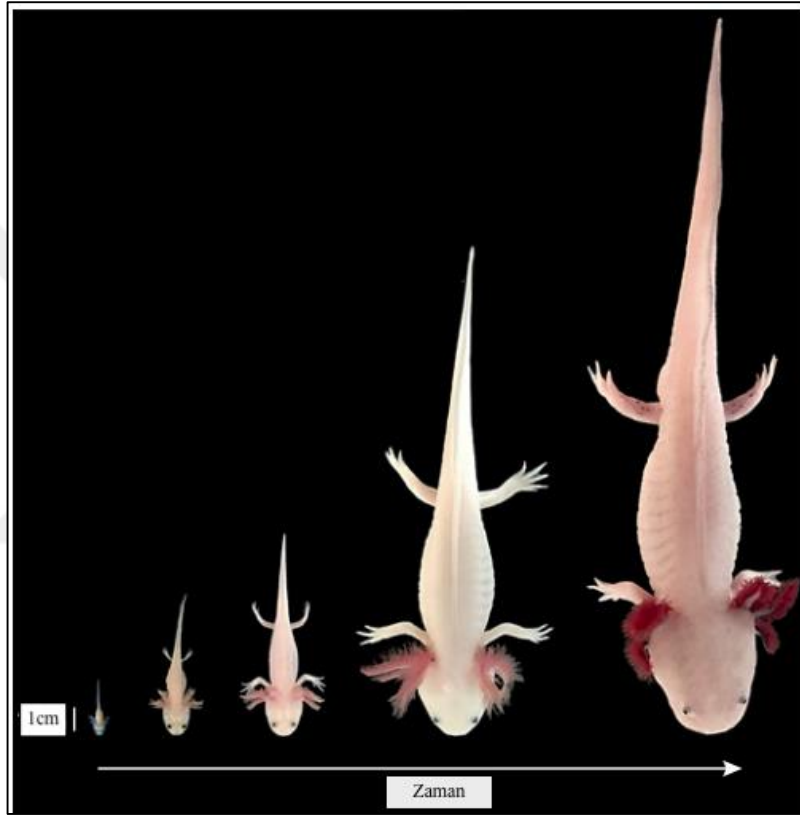
4.2.3. Kompansatuar (Compensatory) Rejenerasyon

Üçüncü tip rejenerasyon, bir ara tiptir ve telafi edici rejenerasyon olarak kabul görmektedir. Burada hücreler bölünmektedir ancak aynı zamanda farklılaşmış karakter özelliklerini ve işlevlerini korumaktadırlar. Böylece farklılaşmamış doku kütlesi oluşturmazlar ve kendilerine benzer hücreler üretirler [16]. Burada ölü hücrelerin uzaklaştırılması, progenitor hücrelerin çoğalması ve dokuların fonksiyonel restorasyonu ile hasar gören dokuların tamiri gerçekleştirilir [15]. Kompansatuar yenilenme, memeli karaciğeri, derisi ve kemiğinde görülmektedir [16].

4.3. Aksolotl (*Ambystoma Mexicanum*)

Ambystoma cinsi, Güney Kanada'dan Orta Meksika'ya kadar uzanan 32 yakın ilişkili türü içermektedir. 16 Meksikalı *Ambystoma* türü arasında en çok araştırılan Aksolotl (*Ambystoma Mexicanum*) isimli türdür [17]. Aksolotl tek seferde çok miktarda yumurta bırakması (300-500 embriyo/çiftleşme), ex vivo embriyonik gelişimi, muazzam doku rejenerasyon yetenekleri nedeniyle hayvan gelişimi ve doku rejenerasyon çalışmaları için mükemmel bir model olarak görülmektedir [18]. Embriyogenez yaklaşık 2 hafta sürdüğü aksolotlın yaşam döngüsü, insanlara göre daha hızlı gelişmektedir. Bu süre sonunda larvalar yumurtalarından çıkıp serbestçe yüzebilmektedir. Uzuvarları şekillenip, akciğerleri gelişinceye kadar gelişimleri aylarca devam etmektedir. Döllenenmeden yaklaşık 1 yıl sonra, hayvanlar solungaçların

tutulması, suda yaşam gibi larva özelliklerini muhafaza etmelerine rağmen cinsel olarak erişkin hale gelmektedirler [4]. Gelişim evreleri ve genel görünüşleri şekil 4.3.1’de verilmiştir. Neoteni ya da paedomorfoz olarak bilinen bu fenomen, üreme yeteneğine sahip yetişkin canlının larva morfolojisini koruma yeteneği olarak da bilinmektedir [19]. Başkalaşım (metamorfoz), kurbağalarda rejenerasyonu kısıtlayan bir adım olarak görülmektedir ve aksolotl, cinsinin diğer üyelerinin yaptığı gibi karasal semender hale gelmek için başkalaşım (metamorfoz) geçirmemektedir [20].

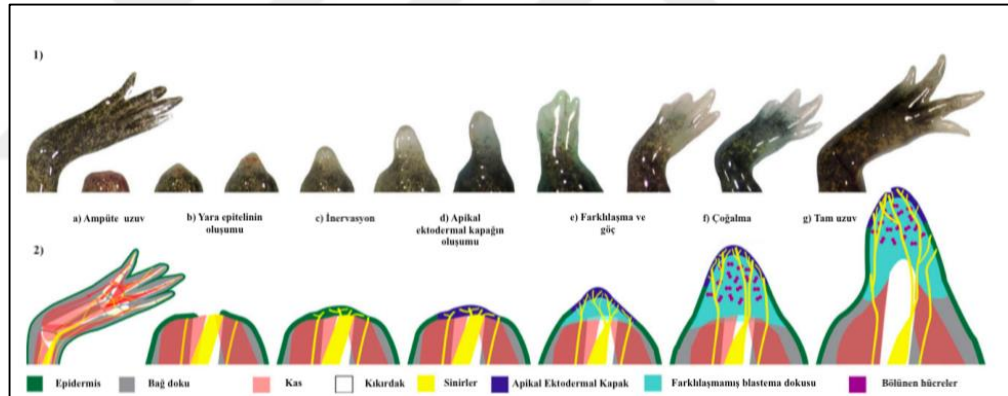


Şekil 4.3.1: Aksolotl gelişim evreleri sırasıyla: 3 haftalık yavru aksolotl, 3 aylık yavru, 5 aylık geç yavru ve cinsel olgunluk seviyesinde 1 ve 3 yaşında bir yetişkin aksolotlın canlı görüntüleri.

4.4. Aksolotlda Uzun Rejenerasyonu

Aksolotlda uzun rejenerasyonu en çok çalışılan rejenerasyon modellerinden biridir. Aksolotl uzuv amputasyonundan sonra 6 ila 12 saat içinde, epidermal hücreler, yara yüzeyini örtmek için göç etmekte ve yara epidermisini oluşturmaktadırlar. Bu tek katmanlı yapı uzvun yenilenmesi için oldukça gereklidir ve çoğalarak apikal ektodermal başlığı oluşturur. Bu yapı sayesinde, memelilerdeki gibi yara izi oluşumu gözlenmez. Ayrıca, dermis, epidermisle birlikte hareket

etmemekte ve ampütasyon bölgesini örtmemektedir. Uzuvarları inerve eden sinirler, ampütasyon düzleminin proksimalinde kısa sürede içerisinde dejenerasyona uğramaktadır [21]. Sonraki dört gün boyunca ise, gelişen kapağın altındaki hücreler farklılaşma geçirmektedir; kemik hücreleri, fibroblastlar, kıkırdak hücreleri, miyositler ve sinir hücreleri farklılaşmış özelliklerini yitirip birbirinden ayrılmaktadırlar. Farklılaşmış dokularda eksprese edilen genler (kas hücrelerinde eksprese olan MRF4 ve MYF5 gibi) aşağı regüle (down regulation) edilirken, embriyonik uzuvun çoğalan ilerleme bölgesi mezenşimi ile ilişkili, MSX1, gibi genlerin ekspresyonunda dramatik artış görülmektedir [16]. Gündüğün kesik kenarında yapılandırılan bölgede apikal ektodermal başlığın hemen altında çoğalan, ayırt edilemeyen farklılaşmamış hücre kümesi oluşmaktadır. Bu farklılaşmamış hücre kümesi rejenerasyon blastemi olarak adlandırılmaktadır. Bu hücreler çoğalıp farklılaşarak yeni uzuv yapılarını oluştururlar [16]. Bu mekanizmaların gelişim süreçleri şekil 4.4.1’de gösterilmiştir.



Şekil 4.4.1. Aksolotlda kesilmiş uzuv gelişim basamakları. (1) Solda sağlam bir uzuvun ampütasyonu sonrası sırasıyla sağa doğru 1, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 21, 25 ve 31 gün sonrası blastema gelişiminin canlı görüntüleri. (2) Blastema gelişimi sırasındaki önemli olaylar, dokuların (epidermis, bağ dokusu, kıkırdak, kas ve sinirler) farklı renk gösterimleriyle betimlenmiştir.

4.5. Koşullu Mutagenез

Rejenerasyon sürecinin altında yatan mekanizmaların çözülmesi, sürece dahil olan genlerin işlevlerinin anlaşılması ile mümkün olabileceğine inanılmaktadır. Bu genleri rejenerasyon sırasında incelemek, genellikle doku ve/veya zamana (yersel/zamansal) özgü yani koşullu mutasyona sahip hayvanların oluşturulmasını

gerektirmektedir. Koşullu bir genetik modifikasyon, tetrasiklin transaktivatörü (tTA) veya Cre rekombinaz gibi proteinlerin aktivitesi ile spesifik bir koşul altında gen ekspresyonunu değiştiren veya silmeler yaparak genleri inaktive eden bir yöntemdir. Bahsedilen koşul, belirli bir hücre, doku veya organizma popülasyonuna özel ve belirli bir zaman noktasında oluşturulabilmekte, böylece modifikasyon mekansal veya zamansal olarak kısıtlanmış olmaktadır [22]. Koşullu gen inaktivasyonu, genlerin fizyolojik fonksiyonlarını belirlemek için gerekli görülmektedir [23].

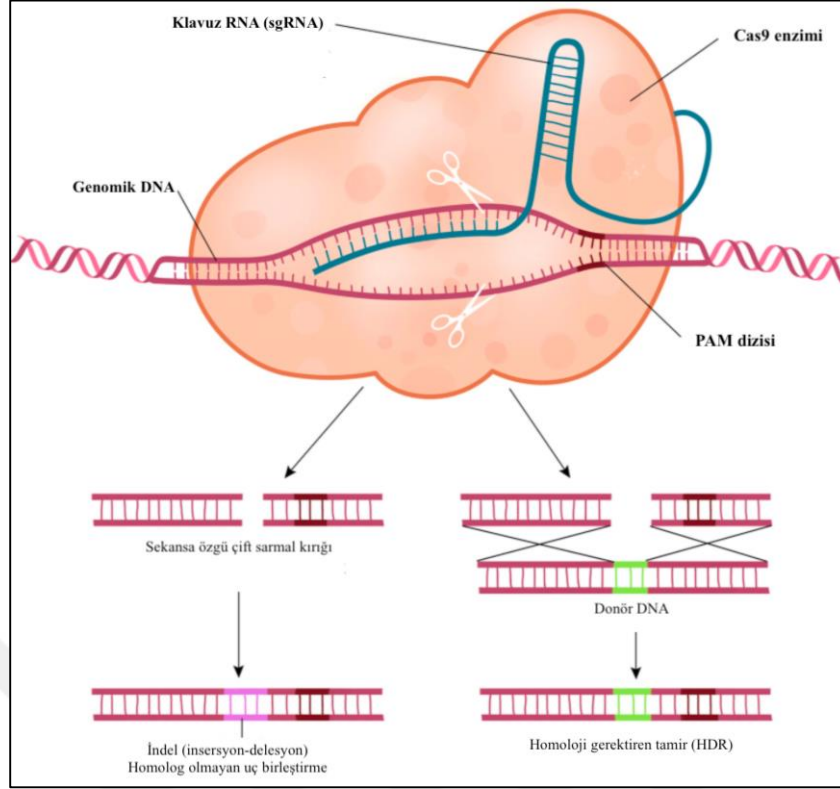
Koşullu dokuya özgü mutantların üretilmesinin en önemli nedenlerinden bir tanesi organizmanın bütününde meydana gelen mutasyonunun neden olduğu olası zararlı etkileri atlama ve bir genin dokuya özgü işlevlerini incelemeye izin vermesidir. Tam (organizmal) fonksiyon kaybı mutasyonları, rejenerasyon sırasında spesifik bir gen fonksiyonunun çalışmasını engelleyebilmektedir. Çoğu gen, bir organizmanın yaşamı boyunca farklı anlarda farklı işleve sahip olduğundan, işlevlerini bloke etmek, rejenerasyon dışında daha fazla biyolojik süreci etkileyebilmektedir. Dokuya özgü mutantların üretilmesinin bir diğer önemi ise, mutantların istenilen aşamaya gelişmeleri sağlansa dahi, global mutasyonlar, hücre otonomuna karşı hücre otonom olmayan kusurların değerlendirilmesine izin vermemektedir. Hücre dışı otonom kusurlar (non-cell autonomous defects), bir hücredeki mutasyon yabancıl tip (wild type) hücreleri etkilediğinde ortaya çıkmaktadır. Dolayısıyla, tüm hücreler mutant olduğunda bu analiz gerçekleştirilememektedir. Yani, mutant organizmalarda tüm hücreler mutant olduğundan, hangi mutant hücrenin mutant fenotipe neden olduğundan emin olunamamaktadır.

4.6. Crispr/Cas9 Sistemi

Kümelenmiş düzenli aralıklı kısa palindromik tekrarlar (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR'lar) ve CRISPR ilişkili protein, Cas9, doğada faj- plazmit enfeksiyonlarına karşı bir bakteriyel savunma mekanizmasıdır. Bu mekanizma yeniden tasarlanıp RNA güdümlü DNA hedefleme sistemi olmakta ve genom düzenleme, transkripsiyonel bozulma, epigenetik modülasyon ve genom görüntüleme aracı olarak kullanılmaktadır [24]. Araştırmacılar, bu programlanabilir

endonükleaz teknolojisi ile bir deneyde birden fazla genomik lokusu aynı anda hedefleyebilmekte ve böylece daha büyük gen kümelerini veya mutasyonları içeren patolojik süreçleri anlamlandırabilmektedirler [25]. Bu sistem, fare, zebra balığı ve bazı kurbağa türleri gibi çok sayıda organizmada genom düzenleme aracı olarak kullanılmıştır. Ayrıca Crispr/Cas9 sistemi ile tipik olarak organizmanın tamamını kapsayacak biçimde genom düzenlemesi yapılmaktadır [23].

Ambystoma mexicanum genomundaki genleri de etkili bir şekilde hedeflemek için kullanılan CRISPR/Cas9, sekansa özgü bir “kılavuz RNA” (guide RNA, gRNA) ve Cas9 nükleazından oluşan bir ribonükleoprotein kompleksi içermektedir. Kılavuz RNA genellikle, Cas9 tarafından tanınan dizilerin yanısıra hedeflenecek genomun sekansına özel tasarlanmış tamamlayıcı olan yaklaşık 20 nükleotit dizisinden oluşmaktadır. Cas9 ise, hedef sekans tanındıktan sonra, aşağı akışta bulunan proto-aralayıcı bitişik motifin (proto-spacer adjacent motif, PAM) (N20NGG) tanınması ile DNA'nın çift zincirinin kesilmesini sağlamaktadır [26]. Dolayısıyla, bu yolla oluşturulan çift sarmal kırıkları hücre tarafından şekil 4.6.1'de gösterildiği gibi çeşitli tamir mekanizmaları ile onarılmaktadır. Hataya meyilli, homolog olmayan uç birleştirme (nonhomologous end joining) veya mikroholoji aracılı uç birleştirme ile çift zincir kırık onarımı, küçük indeller (insersyon, delesyon) ile sonuçlanabilmektedir. Ek olarak, homolojiye bağlı onarım yolu (homology directed repair, HDR) ile de eksojen DNA molekülü (transgen), kırık bölgesine entegre edilebilmektedir [25]. Bunun için sentetik bir onarım şablon DNA (template DNA) gereklidir ve böylece istenen herhangi baz çifti değişikliği sağlanabilir [27]. Entegre edilecek olan sekansın genomdaki yerleşeceği ve eksprese olacağı yer tahmin edilemediği için doku spesifikliği sağlayacak promotörlerin (gen transkripsiyonu başlatan DNA bölgesi) kullanılması oldukça önemli hale gelmektedir [28].



Şekil 4.6.1.: CRISPR Cas9 aracının gerekli elemanları ve kullanılan temel tamir mekanizmaları. Cas9 ile yapılan çift zincir kırıkları indel mutasyonlarına yol açan homolog olmayan uç birleştirme mekanizması tarafından veya istenen dizi değişikliklerinin eklenmesini sağlayan sentetik bir donör DNA şablonu kullanılarak HDR tarafından onarılır.

4.7. Crispr/Cas9 Aracılı Koşullu Mutagenез

Omurgalılarda rejenerasyon gibi karmaşık biyolojik olaylarda yer alan genleri taramak için, yersel ve zamansal kontrollü CRISPR aracılı gen hedefleme yöntemleri önemli araçlar olarak görülmektedir [29]. CRISPR mutagenезinin koşullu kontrolünü sağlamak için, CRISPR sisteminin en az bir bileşeninin ifadesinin zamansal ve/veya mekansal olarak modifiye edilmesi gerekmektedir. Transkripsiyonun (gen ifadesinin) düzenlenmesi, genel olarak çeşitli transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgelerini içeren enhansır-promotör DNA dizileri tarafından gerçekleştirilmektedir. Enhansırlar, genlerin promotörlerine göre konumlarından, mesafelerinden veya yönelimlerinden bağımsız olarak da transkripsiyonun aktivasyonunu sağlayabilirler [30]. Dokuya özgü ve zamansal kısıtlı Cas9 ekspresyonu için çeşitli dokuya özgü promotör-enhansırlar, geçici kontrolü sağlayan ısı şoku indüksiyonu veya tetrasiklin bazlı yöntemler ile farklı sistemlerin kombinasyonu da benzer şekilde kullanılabilir [23]. Son yapılan bir çalışmada, zebra balıklarında somatik

dokularda gen inaktivasyonu için basit ve ölçeklenebilir bir CRISPR tabanlı vektör sistemi rapor edilmiştir [31].

Bu metodolojileri daha da geliştirmek için iki ardışık CRISPR/Cas9 aracılı hedefleme olayı gerekmektedir. İlk hedefleme, embriyonik CRISPR/Cas9 enjeksiyonu ile bir transgenin entegre edilmesiyle, ilgili genin bozulmasına dayanmaktadır. Bu ilk hedefleme heterozigot mutanat hayvan oluşturacaktır. İkinci gen hedefleme olayı, ilgili gene karşı gRNA ve dokuya özel bir promotör-enhansır dizisine sahip Cas9 cDNA'yı içeren transgen aracılığıyla sağlayacaktır. Bu transgenik yapı, ilgili genin diğer yapanıl tip allelini hedefleyecektir. Sonuçta, aynı genin iki alleli hedeflenmiş olacağından homozigot mutant doku oluşmuş olacaktır.

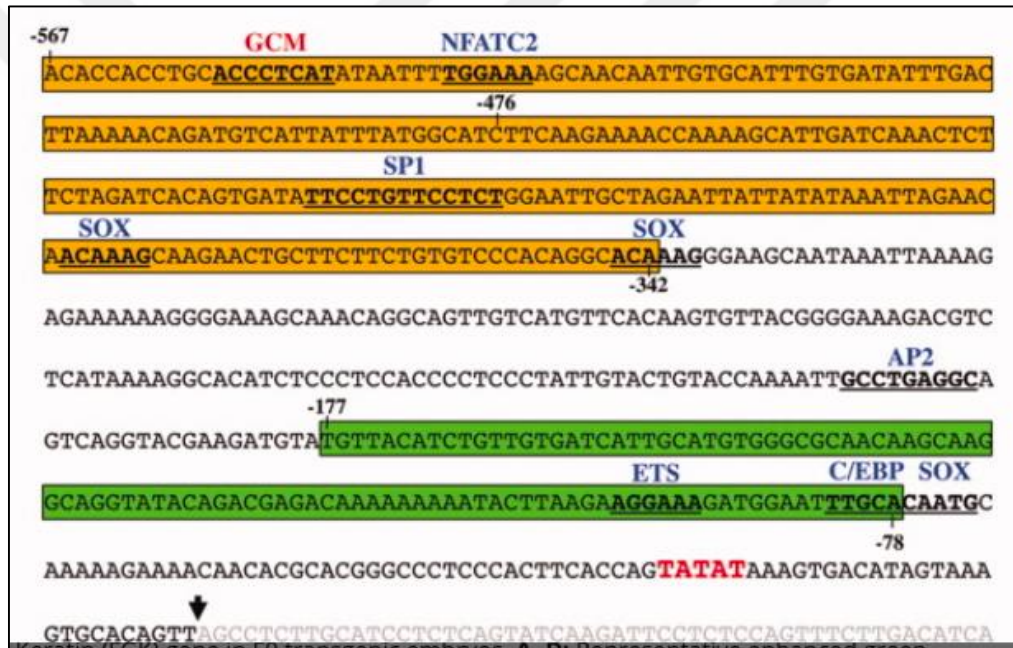
Aksolotl üzerinde yapılan bir çalışma, *tirozin (tyrosin, tyr)* homozigot mutasyonlarının albino aksolotllar oluşturduğunu göstermiştir [6]. Bu albino fenotip, derideki melanin eksikliğinden kaynaklanmaktadır. Ek olarak, *tyr* geni önceden embriyonik enjeksiyon ile hedeflenmiş ve bu sayede lokusun CRISPR/Cas9 yöntemi ile çift zincir kırığı oluşturularak mutagenез için uygunluğu gösterilmiştir [28]. İlk adımda tek hücre seviyesindeki embriyolar hedeflenmiş ve genomu transgenik yapı entegre edilmiştir. Entegre edilen yapı bir deriye özgü Keratin enhansırı kontrolünde, aksolotl derisinde *tyr* gRNA ve Cas9 cDNA ekspresyonu sağlamıştır [8].

4.8 Doku Spesifik Promotor-Enhansırlar

4.8.1. Keratin

Ara filament gen ailesine ait olan keratin, omurgalıların epitel hücrelerinde hücre iskeletini oluşturan bir genidir. Tip I ve II olmak üzere sınıflandırılan keratinler, izoelektrik noktası ve moleküler ağırlığı gibi biyokimyasal özelliklerine göre ayrılmaktadırlar [32]. Hücre tipine özgü olarak ekspresyon seviyesi sıkı bir şekilde düzenlenen *keratin* genleri, organogenez, patogenez, hücre farklılaşması ve transformasyonunda rol almaktadır [33]. Bu sebeple, çeşitli teknikler kullanılarak, *keratin* genlerinin transkripsiyonel regülasyonunun, organogenez, patogenez sırasındaki epitel farklılaşması ve transformasyonunun altında yatan moleküler mekanizmaları ile ilişkisini aydınlatmak için detaylı çalışmalar yapılmıştır.

Xenopus laevis olarak adlandırılan sucul kurbağa cinsinde, yenilenen kuyruk dokusunda birkaç *keratin* geninin güçlü bir şekilde indüklendiği, diğer bir keratin geninin ise uzuv blastemide inaktive edildiği gösterilmiştir. Yine, X. laevis'te yüzgeç ve solungaç rejenerasyonu sırasında yara epitelinde indüklenen yeni bir tip I *keratin* geninin varlığı saptanmıştır [34]. *Keratin I* geninin transkripsiyonel regülasyonunu in vivo incelemek için keratinin 4.2 kb (kilobaz) yukarı akışına (upstream) şekil 4.8.1.1 'deki enhansır (yükseltici) bölgesine floresan işaretleyici konulmuş ve bir transgenik hat oluşturulmuştur. İşaretletici ekspresyonu sayesinde, gelişmekte olan solungaçta oldukça yüksek keratin ekspresyonu tespit edilmiştir [35].



Şekil 4.8.1.1: X. Leavis FGK (fin and gill keratin) (yüzgeç ve solungaç keratini) promotörüne yakın bölgenin genomik dizisi. Yukarı akış dizisi ve TATA kutusu sırasıyla siyah ve kırmızı olarak gösterilmektedir. Siyah ok, transkripsiyon başlangıç bölgesini göstermektedir. Kalın alt çizgiler, varsayılan transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerini göstermektedir [35].

4.8.2. Isı Şoku Elemanları (Heat shock element, HSE)

Isı şoku tepkisi stresli bir ortamda hayatta kalmak için birçok farklı ökaryot canlı arasında korunmuş bir yanıttır [36]. Isı şoku faktörleri, yukarı akışında bulunan düzenleyici ısı şoku elemanı (HSE) olarak adlandırılan elemanlar aracılığıyla

işlevlerini gerçekleştirmektedirler. DNA'ya bağlı ısı şoku faktörleri, her bir DNA bağlanma alanında çift sarmalın geniş oluğundaki (major groove) ısı şoku elemanlarına bağlanmaktadır [37].

Isı şoku gen promotörlerindeki ısı şoku elemanları yüksek oranda korunmuş pentamerik nGAAn dizisinin ters çevrilmiş tekrarlarını (inverted repeats) içermektedir [38]. Isı şoku genlerinin proksimal promotör bölgelerinde bulunabilen ısı şoku eleman tipi, en az üç ters çevrilmiş bitişik tekrardan nTTCnnGAAnnTTCn oluşmaktadır [38]. Isı şoku faktörü hedef genlerinin promotörleri ayrıca birden fazla ısı şoku elemanı içerebildiğinden fazla sayıda ısı şoku faktörünün aynı anda bağlanmasına olanak sağlamaktadır [39].

Gen ekspresyonlarının doku spesifik kontrolünün yanısıra, zamansal kontrolü embriyonik gelişim sırasında gen fonksiyonlarını kontrol eden anahtar unsurlardan biri olarak bilinmektedir. Isı şoku proteinlerinin promotörleri, endojen faktörler tarafından indüklenmekte ve sistemi tek bir ektopik DNA yapısı haline getirmektedir. Böylece, ısı şoku proteinlerin promotörleri, indüklenebilir gen ifade değişimini sağlayan basit tek bileşenli bir sistem oluşturmaktadırlar [7]. Memelilerde vücut sıcaklığının sıkı kontrolü nedeniyle bu sistemin in vivo uygulamaları oldukça zordur. Ancak, böcekler, kurbağalar ve balıklar gibi diğer sistemlerde yüksek sıcaklıklarda ısı şoku tepkisinin indüklenmesi mümkün görülmektedir [40-42]. Isı şoku elemanlarının indüklenebilir gen ifade değişimi daha önce Medaka balıklarında ve HELA hücrelerinde gösterilmiştir [7].

4.8.3. Iroquois (Iro-Irx)

Homeoprotein gen ailesini kodlayan *Iroquois* (*Irx-Iro*) genleri nametodlardan insanlara kadar birçok canlıda bulunmaktadır. *Irx* genleri, TALE (three amino acid loop extention) (üç amino asit döngüsü uzantısı) sınıfının yüksek oranda korunmuş homeodomainine ek olarak, *Irx* proteinleri Iro kutusu olarak adlandırılan 13 amino asitlik bir bölgede sahiptirler [43]. Çeşitli gelişimsel sürece dahil olan *Irx* genlerinin, böcek duyu organları ve kanat damarları gibi desen öğelerinin gelişimine kadar birçok görevi üstlendiği bilinmektedir [10]. *Xenopus* *Irx* genlerinin (*Xiro1*, 2, ve 3) ise erken nörolasyon esnasında omurgalı pronöral genlerinin düzenlenmesine

katkı sağladığı görülmüştür [44]. Daha yakın bir zamanda yapılan bir çalışmada, *Xiro* genlerinin gastrulaston sırasında nöronal bölgeleri belirlemek için gerekli olduğu saptanmıştır [45].

Fare ve insanlarda *IrxA* grubu *Irx1*, *Irx2*, ve *Irx4* ve *IrxB* grubu *Irx3*, *Irx5* ve *Irx6* genleri bulunmaktadır, toplamda 6 gen ve iki genomik kümeden oluşmaktadır [46]. Memeli olmayan omurgalılarda, *Xenopus* ve civciv gibi, beş adet *Irx* geninin tanımı yapılmıştır [47]. Zebra balığı ve *xenopusta* *IrxB* sınıfı genlerinin sinir dokularında, pronefroz dallanmada, kalp ve göz otik veziküllerinde ekspresyonu bildirilmiştir [10].

IrxB sınıfı içerisinde, iki adet korunmuş kodlama yapmayan bölge bulunmaktadır. Ultra korunmuş kodlamayan bölgeler (ultra conserved regions, UCR) grubuna ait bu kısımlar 200 baz çiftinden daha uzundur ve insanlarda ve kemirgenlerde %100 özdeştir [48]. İki UCR bölgesi (UCRB1 ve UCRB2) aralarında son derece korunmuştur ve bunlar, nispeten benzer genomik bölgelerde yer alan *IrxA* kompleksindeki diğer iki ultra korunmuş (UCRA1 ve UCRA2) sekansla yüksek benzerliğe sahiptirler. *Xenopusta* incelenen farklı omurgalıların UCRB1 aktivitesi hem zebra balığının ve *Xenopus* UCRB1'in gözde ve pronefrozda benzer ifadesi, ek olarak fare UCRB1'in yalnızca gözde ifade olduğunu göstermiştir, şekil 4.8.3.1' de bu farklı organizmalardaki yüksek derecedeki sekans benzerlikleri gösterilmiştir[49].

```

XUCRB1 TTATTCTCAGCCATTACAACAGGCAGAGAAATGG-ATGAACCCATTTGCGCTAATGCAT 59
zUCRB1 TTTGCGGGGCTGCTCCGGTGGGTGCCGAAATGG-ATGAACCCATTTCCCTTAATGCAG 59
mUCRB1 CTTTCTCCCAAGGCTCAGAGTCCCCAGAGCGGTGCGGGGTGGCTATCCTCAGCTTC 60
* * * * *
XUCRB1 ACATGAATGTT-----ACACCAAGTTCACCCCATGG----- 89
zUCRB1 ACACGAGCCCTGCATACACACACATGCACACACCCCTCCTCCCCCTCAGCGCCCTGTC 119
mUCRB1 TTGAGAGGCTGC-----TGCGTACGCTCCCCCCCCCCCAG----- 97
* * * * *
XUCRB1 --TAAGGTTAGAGGTTAATGAAATGCTCATTCTACTGAGCCATATTGTTTTGTTTCCTG 147
zUCRB1 TCTGAGGTTACAGGTTAATGACATGCTCATTTCGCCAGCCAT-TTGTTTTGTTTCCTG 178
mUCRB1 -CTGGGTTACAGGTTAATGAAACGCTCGTTTTCTCAGTCAT-TTGTTTTGTTTCCTG 155
* * * * *
XUCRB1 CAAAGTTCGATAAGTAGCTAACCAACCAAGCTTGTAAATACAATCTTACAGAAACCGG 207
zUCRB1 CAAAGTTCGATAAGTAGCTAACCAACCAAGCTTGTAAATACAATCTTACAGAAACCGGC 238
mUCRB1 CAAAGTTCGATAAGTAGCTAACCAACCAAGCTTGTAAATACAATCTTACAGAAACCGGG 215
*****
XUCRB1 CAGATCTGTATATAAATCTCACCATCCAATTACAAGATGTAATAATTTGCACTCAAGCT 267
zUCRB1 CCGATCTGTATATAAATCTCACCATCCAATTACAAGATGTAATAATTTGCACTCAAGCT 298
mUCRB1 CCGATCTGTATATAAATCTCACCATCCAATTACAAGATGTAATAATTTGCACTCAAGCT 275
* * * * *
XUCRB1 GGTAAAGAGGCTTAATACGCGAGCATTGATAATCCCTACTGGATGCTGCCTTGATCAGA 327
zUCRB1 GGTAAAGAGGCTTAATACTGCAGCATGTGATAATCCCTCTGGATGCTGGCTTGATCAGA 358
mUCRB1 GGTAAAGAGGCTTAATACTGCAGCATGTGATAATCCCTCTGGATGCTGGCTTGATCAGA 335
*****
XUCRB1 TGTGG-CITTTGTAATTAGACTGGCAGAAAATCATTATTTTCATGTTCAAATAGAAAATGA 386
zUCRB1 TGTGG-CITTTGTAATTAGACTGGCAGAAAATCATTATTTTCATGTTCAAATAGAAAATGA 417
mUCRB1 TGTGGCTTTGTAATTAGACTGGCAGAAAATCATTATTTTCATGTTCAAATAGAAAATGA 395
*****
XUCRB1 GGTGGTGGGAAGTTAATTTCTCTACGCTCTGTGAAGCGTAGACAAGAATTTAATGATT 446
zUCRB1 GGTGGTGGGAAGTTAATTTCTCTACGCTCTGTGAAGCGTAGACAAGAATTTAATGATT 477
mUCRB1 GGTGGTGGGAAGTTAATTTCTCTACGCTCTGTGAAGCGTAGACAAGAATTTAATGATT 455
*****
XUCRB1 AATTAC-AATTGTAAGCTCTTTGTCATGAGACTTAAATTGAGCTGAGATTTTTTTTTCACA 505
zUCRB1 AATTACAGTTGTAAGCTCTTTGTCATGAGACTTAAATTGAGCTGAGATTTTTTTTTCACA 536
mUCRB1 AATTAC-AATTGTAAGCTCTTTGTCATGAGACTTAAATTGAGCTGAGATTTTTTTTTCCT 514
*****
XUCRB1 CTGTGTCATGTTAGTAA 522
zUCRB1 CACTACCATTTTGGAG 553
mUCRB1 TTTCTCTCTCCCT 531
* *

```

Şekil 4.8.3.1: Sırasıyla Xenopus (X), zebta balığı (z) ve farenin (m) Irx geninin ultra korunmuş bölgelerinden UCRB1 dizilerinin hizalaması. Yıldız işaretleri ortak bazları ifade etmektedir. [50]

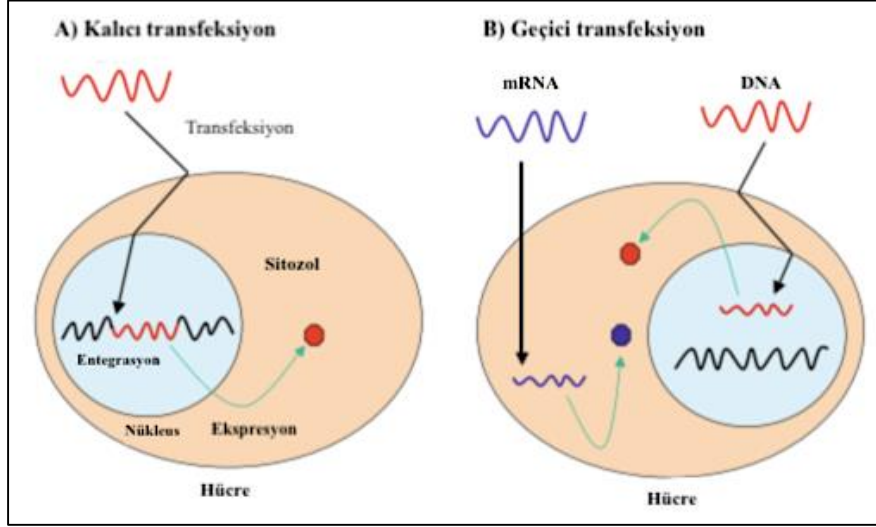
4.8.4 Eyeless (Ey)

Hayvan filumunda göz gelişiminin genetik seviyesinde, yüksek düzeyde işlev gören ve kilit düzenleyiciler olarak da bilinen genler, omurgalılardaki *Pax-6* ve onun *Drosophila melanogaster* homoloğu *Eyeless* (*ey*) geni olarak bilinmektedir [51]. *Ey* geni, birçok küçük görme birimini içeren bileşik gözün (compound eye) spesifikasyonunda önemli bir işleve sahiptir [52]. Embriyonik gelişim sırasında, *ey* geninin ifade edildiği bölgeler; gözün hayali disklerinin primordiası, optic loblar ve ayrıca beynin ve ventral sinir kordonunun diğer ayrı bölgelerleri olarak gösterilmiştir

[51]. *Ey* geninde bulunan bir intronik bölgede, embriyoların göz diski primordiyalarında ve larva gelişiminin üçüncü evresindeki göz hayali disklerinde genin göze özgü ekspresyonunu düzenleyen bir enhansır (yükseltici) sekans varlığı tanımlanmıştır. Bu enhansırın işlevi için 212 baz çifti uzunluğunda bir enhansır elementinin gerekli ve yeterli olduğu gösterilmiştir [53]. Yapılan bir çalışma, *Drosophila eyless* geninin bir enhansır bölgesinin, fare *Pax6* geninde promotör bölgelerinin yukarı akışına yerleştirilmesi sonucu endojen *Pax6* ekspresyon özelliklerini doğru bir şekilde gösteren transgenik farelerde de göze ve merkezi sinir sistemine özgü ekspresyon gösterdiğini ortaya koymuştur. Elde edilen bulgular, *Pax6* fonksiyonunun korunmasının yanısıra, yukarı akış düzenlenmesinin de türler arası korunduğunu göstermiştir [9].

4.9. Transfeksiyon Yöntemleri

Transfeksiyon prosedürleri, genetiği değiştirilmiş hücreler üretmek için yabancı nükleik asitlerin hücreye girmesini sağlamaktadır. Bu yöntemler, gen fonksiyonu, regülasyonu ve protein fonksiyonlarının incelenmesi için etkili bir analitik sistem görevi görmektedir. Hücreye veya dokuya verilen genetik materyaller (DNA ve RNA'lar), materyalin doğasına bağlı olarak şekil 4.9.1'de sembolize edildiği üzere kalıcı veya geçici olarak hücreye entegre olurlar [54]. Kalıcı transfeksiyon, genellikle seçim için marker gene sahip olup konakçı genoma entegre olan transgenlerdir ve konakçı hücreler çoğaldıktan sonra bile ekspresyon gösterebilmektedirler. Kararlı olarak transfekte edilmiş genlerin aksine, geçici transfeksiyonda genler genoma entegre olmaz ve sınırlı bir süre eksprese edilirler [55]. Bu yolla transfekte edilmiş genetik materyaller, çevresel faktörler ve hücre bölünmesi gibi sebeplerle kaybolabilir. Bu nedenle deneyin amacına bağlı olarak kalıcı veya geçici transfeksiyon yöntemi seçilmektedir [56]. Transfeksiyon yöntemleri, biyolojik (viral), kimyasal ve fiziksel olmak üzere üç genel sınıfa ayrılmaktadır.



Şekil 4.9.1: İki farklı transfeksiyon yönteminin şematik gösterimi. (A) Kalıcı transfeksiyon, yabancı DNA genomu entegre olur. Kırmızı dalga, yabancı DNA'yı temsil etmektedir. Siyah dalga, hücrenin DNA'sını göstermektedir. (B) Geçici transfeksiyon, yabancı DNA hücreye aktarılır fakat hücrenin DNA'sına entegre olmaz. Mor dalga, yabancı mRNA'yı temsil etmektedir ve sitozolde translasyona uğrar. Altıgenler, eksprese olmuş proteinleri göstermektedir [55].

4.9.1. Biyolojik (viral) Transfeksiyon

Tipik olarak plazmit DNA'yı konakçı hücreye aktaracak, güvenli kabul edilen bir virüs yardımı ile yapılan transfeksiyon yöntemidir. Yaygın olarak, adenovirüsler, adeno-ilişkili virüsler (AAV), retrovirüsler ve lentivirüsler kullanılmaktadır [57].

4.9.2. Kimyasal Vektörlerle Transfeksiyon

Kargo molekülünü hedef hücelere aktarmak için lipid veziküllerinin, polimer bazlı kimyasal vektörlerin kullanıldığı bir transfeksiyon yöntemidir [58]. Bu yöntemde genel olarak katyonik polimerler, katyonik lipitler veya katyonik amino asitler kullanılmaktadır [55]. Polimerlerden en yaygın olanlarından biri, polietilenimid (PEI) [59]. Polietilenimin, transfekte edilecek DNA'yı (negatif yüklü) anyonik hücre yüzeylerine bağlayan pozitif yüklü parçacıklar haline getirmektedir. Oluşan PEI:DNA kompleksi hücreler tarafından endositozla alınmaktadır ve dolayısıyla hedef DNA sitoplazmaya salınmaktadır [60]. Bu yöntemin, CHO-S ve HEK 293 GnTi gibi süspansiyon hücre hatları için uygunluğu gösterilmiştir [59].

4.9.3. Fiziksel Yolla Transfeksiyon

Çeşitli fiziksel araçlar yardımıyla nükleik asitleri iletmek için kullanılan en yeni yöntemlerden biri fiziksel transfeksiyondur [55]. Fiziksel transfeksiyonda, elektriksel, termal ve mekanik kuvvetlerden gelen enerji yardımı ile transfeksiyon gerçekleştirilmektedir. Uygulanan kuvvetler ile hücre zarına zarar verilerek kargonun hücreye yayılması sağlanmaktadır [61]. Mikro enjeksiyon, biyolistik partikül vericisi, elektroporasyon ve lazer bazlı transfeksiyon araçları sıklıkla kullanılan yöntemlerden bazılarıdır [55].

4.9.3.1. Elektroporasyon

Bu teknik elektrik alan yardımıyla, yüklü nükleik asitleri ve/veya diğer molekülleri hücreye aktarmak için kullanılmaktadır [62]. Elektroporasyon mekanizması kesin olarak bilinmemekle birlikte, temel iki süreci içermektedir. Deney aşamasında elektroporasyon, elektrotlar arasına biyolojik bir örnek (hücre süspansiyonu veya doku parçası) yerleştirilerek ve elektrik darbeleri vurularak uygulanmaktadır. İlk olarak güçlü bir elektrik alan uygulanır ve hidrofobik hücre zarında geçici tersinir gözeneklerin oluşumu indüklenir. Bu işlem gözenek darbesi (poring pulse) olarak adlandırılmaktadır [63]. Ardından ikinci türdeki elektrik darbeleriyle, DNA veya RNA gibi yüklü moleküllerin elektroforez yoluyla hücreye girişi sağlanır. Bu da transfer darbesi olarak bilinmektedir [64].

Etkili bir elektroporasyon deneyi için darbe parametrelerinin; darbe genliği, süresi, sayısı dikkatlice ayarlanmaktadır. Darbe parametrelerinin seçimi uygulamaya, hücre tipine, boyutuna, hücrelerin oryantasyonuna, yoğunluğuna ve verilecek olan moleküle bağlı olarak değişmektedir [63]. Bazı uygulamalar geri döndürülebilir (uygulama sonrası membran porlarının hızlıca eski haline döndüğü) bazıları ise geri döndürülemez elektroporasyon gerektirmektedir [65].

Elektroporasyonun, plazmit DNA yapılarını omuriliğe hızla aktarabilen değerli bir yöntem olduğu daha önceden gösterilmiştir. Küçük şeffaf aksolotllarda rejenerasyon esnasında yapılan bir çalışmada, GFP (green fluorescence protein, yeşil floresan proteini) eksprese eden plazmitlerin tek veya bir grup omurilik hücre grubuna elektroporasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu sayede hedef hücrelerin tanımı ve takibi yapılmıştır. Bunun için yüksek voltaja sahip uzun darbelerden oluşan

kombinasyonlar kullanılmış ve aksotl omurilik elektroporasyonu için detaylı bir protokol yayınlanmıştır. Bu sayede minimum doku hasarı ve oldukça verimli bir transfeksiyon sağlanılarak omurilik rejenerasyonunun moleküler analizine izin verilmiştir [66].

Yapılan bir diğer çalışmada ise Cas9-klavuz RNA (gRNA) kompleksi aksotl omuriliğinde SOX2 pozitif kök hücrelerin lümenine enjekte edilmiş ve ardından elektropore edilerek SOX2 gen nakavtı sağlanmıştır. Bu sayede gen inaktivasyonuna karşılık gelen fonksiyonel fenotipler oluşturulmuştur. Yine aynı çalışmada, Cas9/GFP-gRNA kompleksi elektropore edilen GFP pozitif hayvanın uzunda, satellit hücrelerde, kemikte, dermal mezenşimde ve deri hücrelerinde GFP ifadesinin yok olduğu gösterilmiştir. Bu etkin transfeksiyon yöntemiyle aksotl rejenerasyonu sırasında hızlı genetik taramalar mümkün kılınmış ve diğer omurgalı sistemler içinde uygulanabilirliği gösterilmiştir [29].

5. MATERYAL ve METOD

5.1. gBlok'ların Tasarlanması

Keratin enhansırının gBlok olarak tasarlanması için yukarıda şekil 4.8.1.1'de Xenopusta çalıştığı gösterilen yüzgeç promotörünün yukarı akış dizisinin tamamı kullanılmıştır. Bu Keratin enhansır dizisinin aksotl genomunda korunup korunmadığı kontrol edilmiş fakat dizileme (blast) sonucunda herhangi bir isabet (hit) bulunmamıştır. Bu sebeple direkt olarak Xenopus sekansın kendisi alınmıştır. Bu bölge izotermal birleştime yöntemlerin biri olan Hifi birleştirme ile klonlanacağından dolayı, klonlamada kullanmış olduğumuz plazmit PX458 ile homoloji sağlaması açısından, gBlok'un her iki ucuna da yaklaşık 20-30 bp arası uzantılar eklenmiştir. Bu dizi, birleştirilecek olan parçanın 5'-terminal dizisine homologdur. Örtüşme dizisinin uzunluğu, dizilerin GC içeriğine bağlıdır. Bu uzantılar Hifi birleştirme reaksiyonu sırasında 5' ekzonükleaz tarafından kesileceği için önemlidir. Enhansırın 3' ucuna uzantıyı eklemeyen önce yapay YBTATA promotörü eklenmiştir.

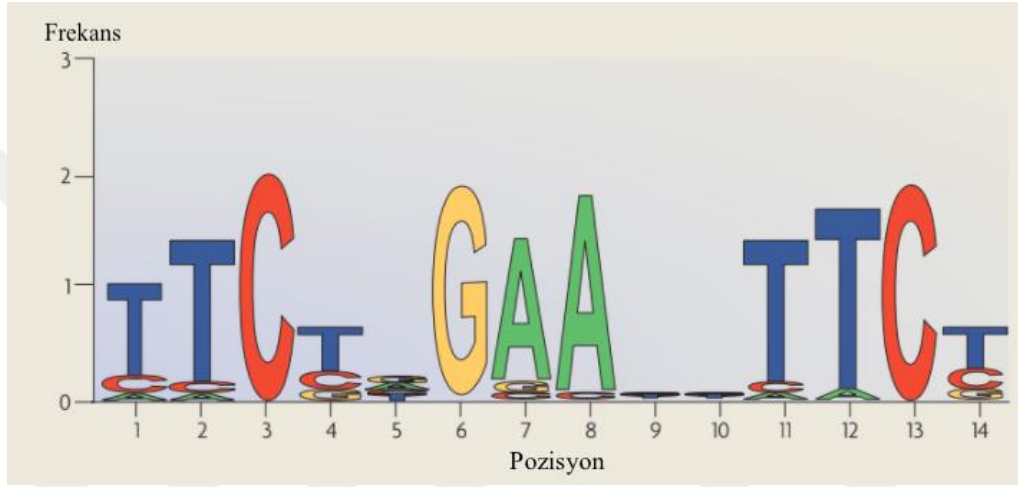
HSE enhansır gBlok sekansının dizaynı için, ısı şoku proteinlerinin promotör bölgelerindeki yüksek oranda korunmuş ısı şoku elemanlarının (HSE) yapısı olan bitişik ters çevrilmiş (inverted repeats) tekrarlar kullanılmıştır. Şekil 5.1.1'deki pozisyonel maktriksteki harflerin büyüklüğü yüksek oranda korunmuşluğu ifade etmektedir. Nispeten küçük harfler, yani az korunmuş nükleotitler, yerine diğer herhangi bir nükleotit tercih edilmiştir. TTC dizi ve GAA dizi aralarındaki nükleotitler de yine korunmuşluğu yüksek olmadığı için rastgele seçilmiştir. Klonlamayı sağlamak adına Keratindeki homoloji uzantılarının aynısı bu yapıya da eklenmiştir. Aynı şekilde yapay YBTATA promotörü de 3' ucuna eklenmiştir.

IRX enhansırının dizaynı için, Xenopus'un IRX kodlama yapmayan bölgelerinden biri olan UCRB1, Axotl-Omics sitesi aracılığıyla aksotl genomuna karşı dizilenmiş ve elde edilen sekans ile devam edilmiştir. Diğer gBloklarda olduğu gibi YBTATA promotörü ve aynı homoloji kolları sekansa dahil edilmiştir.

200 nükleotit uzunluğundaki Eye enhansır sekansı ise Drosophila'dan alınmıştır. Bu sekans aynı zamanda farelerde çalıştığından, aksotl'da da çalışacağı

varsayılmıştır. Diğer gBloklerde olduğu gibi homoloji uzantıları ve YBTATA promotörü dahil edilip dizayn tamamlanmıştır.

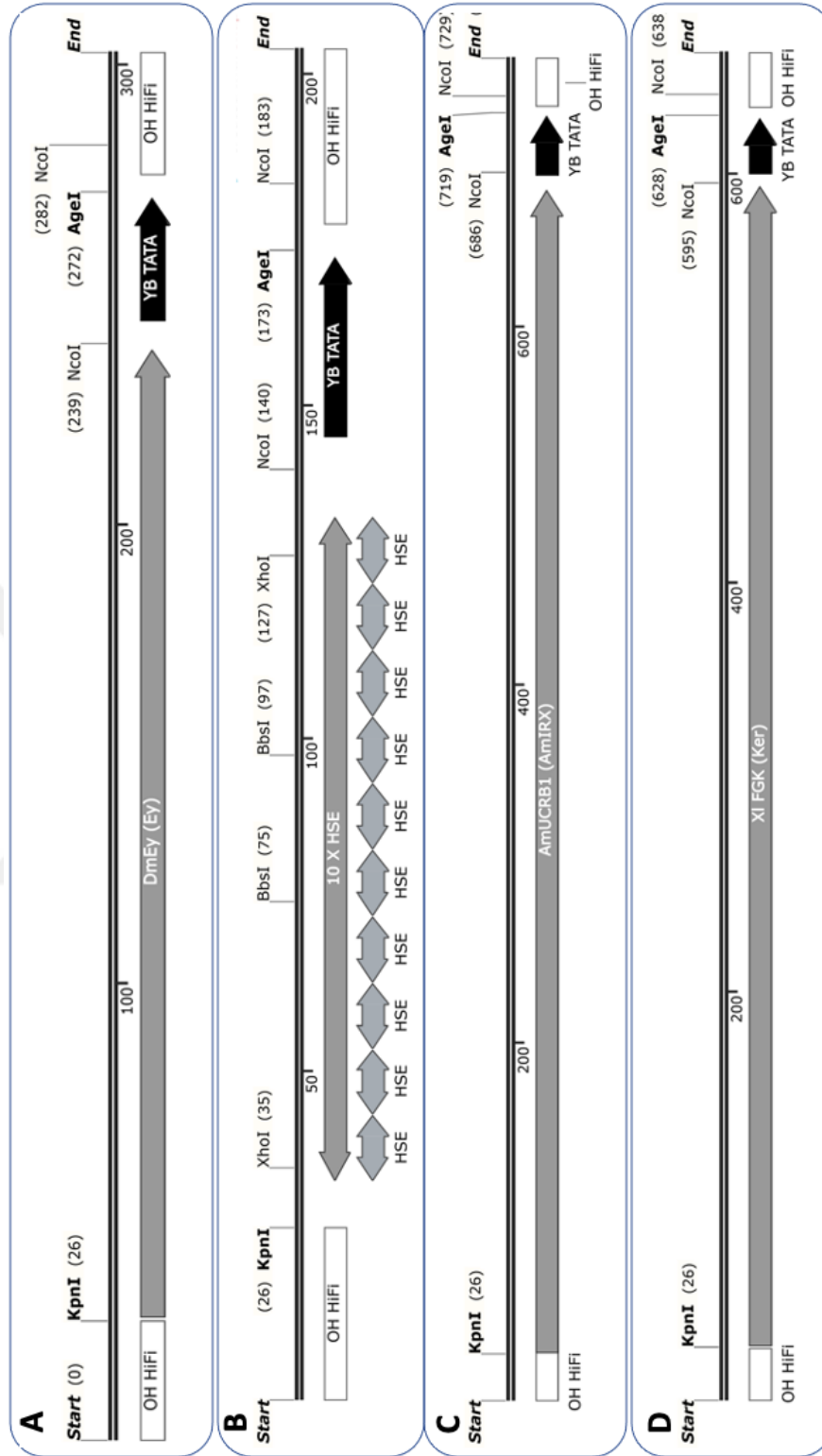
Literatürden elde edilen verilerle in siliko olarak tasarlanmış sekanslar, IDT'den (Integrated DNA Technologies), çift sarmallı doğrusal gen fragmanı (veya gBlok) olarak sipariş edilmiştir. Bu sayede enhansırlar Hifi düzeneği ile ilgili plazmite kolayca klonlanabilmiştir.



Şekil 5.1.1. İnsan HSE konsensüs dizisinin pozisyonel matriksi. Büyük harfler yüksek oranda korunmuşluğu sembolize etmektedir [36] .

5.2. gBlok İle Çalışma

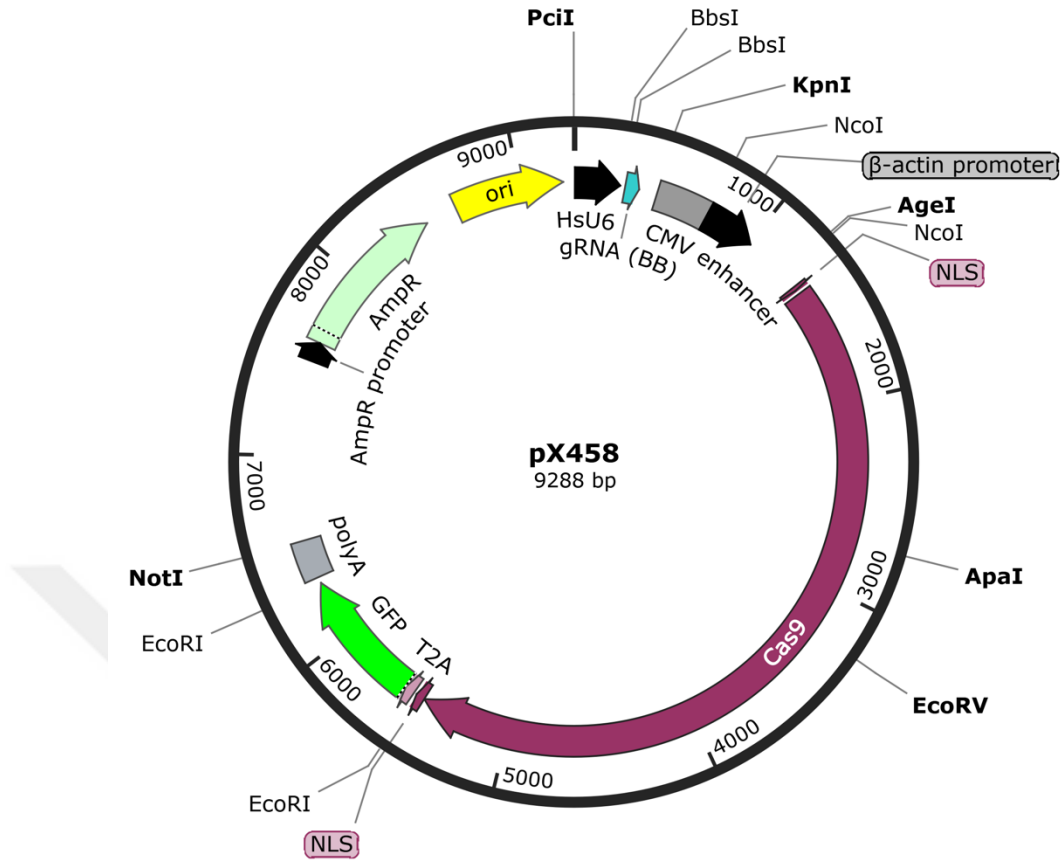
g-Bloklar genellikle 125- 3000 bp uzunluğundan oluşan çift zincirli DNA fragmantlarıdır. Aşağıdaki şekilde IDT firmasından sipariş verilen gBlok sekanslarının şematik gösterimleri isimleriyle birlikte belirtilmiştir (şekil 5.2.1). g-Blok tüpleri öncelikle hızlıca sentrifüjlenmiş ve içlerine son konsantrasyonları 10 ng/ul olacak şekilde nükleaz içermeyen su konulmuştur. Sonra kısaca vortekslenmiş ve 50 °C'de 15-20 dakika inkübe edilmiştir. Ardından son konsantrasyon değeri Nanodrop cihazı ile kontrol edilerek -20 °C'de saklanmıştır.



Şekil 5.2.1: gBlokların sırasıyla, A) Eyless, B) HSE, C) AmUCRB1 (Irx), D) Keratin, şematik gösterimleri. Açık gri bölgeler enhansır dizilerini, başta ve sondaki beyaz barlar homoloji uzantılarını (HO: homology arm), siyah ok YBTATA promotörünü ifade etmektedir.

5.3. gBlok'ların Klonlanması

Klonlama işlemi için SABİTA biriminde bulunan pX458 (pSPCas9(BB)-2A-GFP addgene #48138) plazmiti (vektör/ bakteriyal bileşen) kullanılmıştır (Şekil 5.3.1). YB-TATA promotörü içeren KER, IRX, HSE, EY enhancerları yukarıda belirtildiği şekilde dizayn edilip “g-block” DNA sekansı şeklinde sipariş verilerek temin edilmiştir. β -aktin ana (core) promotörünün sızıntılı (leaky) ekspresyonla sonuçlanabilmesi durumunda, küçük yapay promotör YB-TATA'nın test edilebilmesi için gBlok sekanslarına dahil edilmiştir [67]. YBTATA promotörünün insan hücrelerinde çok düşük bazal ekspresyon ve yüksek indüklenmiş ekspresyon gösterdiği bilinmektedir [68]. YB-TATA promotörünün çok küçük olması sebebi ile de gBlok'lara dahil etmek uygun bulunmuştur. Klonlama sonrası vektörlerin doğruluğunu test etmek için ise uygun primerler ve klonlama için gerekli kesim enzimleri temin edilmiştir. Belirtilen pX458 plazmitinde bir U6 promotörü arkasında gRNA ve CMV enhansır arkasında Cas9 bulunmaktadır. Öncelikle YBTATA promotörü içeren spesifik enhansır sekanları, X458 plazmitindeki CMV enhansır kısmı AgeI, KpnI enzimleri ile kesilip, kesilen bölgeye klonlanmıştır. Sonrasında KER YBTATA, EY YBTATA, HSE YBTATA ve IRX YBTATA olarak adlandırılan PX458 plazmitlerinden YBTATA promotörü NcoI enzimi kullanılarak kesilip yerine β -aktin promotörü klonlanmıştır. β -aktin promotörünü elde etmek için ise PX458 enzimi NcoI enzimi ile kesilmiş ve jelde yürütülen kesim reaksiyonundan küçük bant (β -aktin dizisini içeren kısım olduğu için) izole edilmiştir. Elde edilen promotör her bir plazmitte YBTATA yerine konulmuştur. gRNA ekspresyonunun test edilmesi ve uygun promotörü bulmak için insan U6 ve aksolotl U6 promotörleri denenmiş, dizayn edilen GFP gRNA'nın mikroskop altında test edilebilmesi için de mCherry sekansı altına klonlanmıştır.



Şekil 5.3.1: Orijinal PX458 plazmiti: Siyah renkli olan kısımlar sırasıyla U6 promötörünü ve CMV enhansırını göstermektedir. Mor renkli kısım Cas9 sekansını ifade etmektedir. Sonrasında T2A bağlayıcı sekansı ve yeşil renkle belirtilen GFP sekansı bulunmaktadır. Ek olarak plazmit üzerinde replikasyonu başlatan ORİ bölgesin sarı, pozitif-negatif seçilimi sağlayan ampisilin geni açık yeşil renkle sembolize edilmektedir.

5.3.1 gBlok Sekansların Klonlanması için Gerekli Restriksiyon

Reaksiyonları

Aşağıdaki tablo 5.3.1.1’de belirtilen kimyasallar ve plazmit DNA ependorf tüplerde buz içerisinde karıştırılmış ve yine belirtilen koşullarda reaksiyon inkübasyonu sağlanmıştır. Bu reaksiyon her bir promotor-enhansır klonlaması için benzer şekilde gerçekleştirilmiştir. Entegre edilecek insert DNA bloklarına kesim uygulanmamıştır çünkü Hifi reaksiyonu aşamasında gerekli uçlar oluşturulacaktır. Plazmit ve insertin homolojisi dizayn sırasında eklediğimiz uçlar sayesinde sağlanacaktır. Kesilen plazmit vektör %1’lik agaroz jelde 45 dakika 100 volt ile yürütülmüş ve kesim sonucu jelde oluşan bantlardan üstteki DNA parçası bistüri yardımıyla jelden alınıp jel purifikasyon kiti ile purifiye edilmiştir. Bu seçilen bant

CMV enhansır dışında tüm bölgeleri içeren kısım olması sebebi ile seçilmiştir. Amaç kesilen enhansır yerine dizayn edilen enhansırları koymaktır. Elde edilen kesik plazmitin konsantrasyonu Nanodrop cihazı ile tayin edilmiştir ve reaksiyon hesaplamalarında kullanılmıştır.

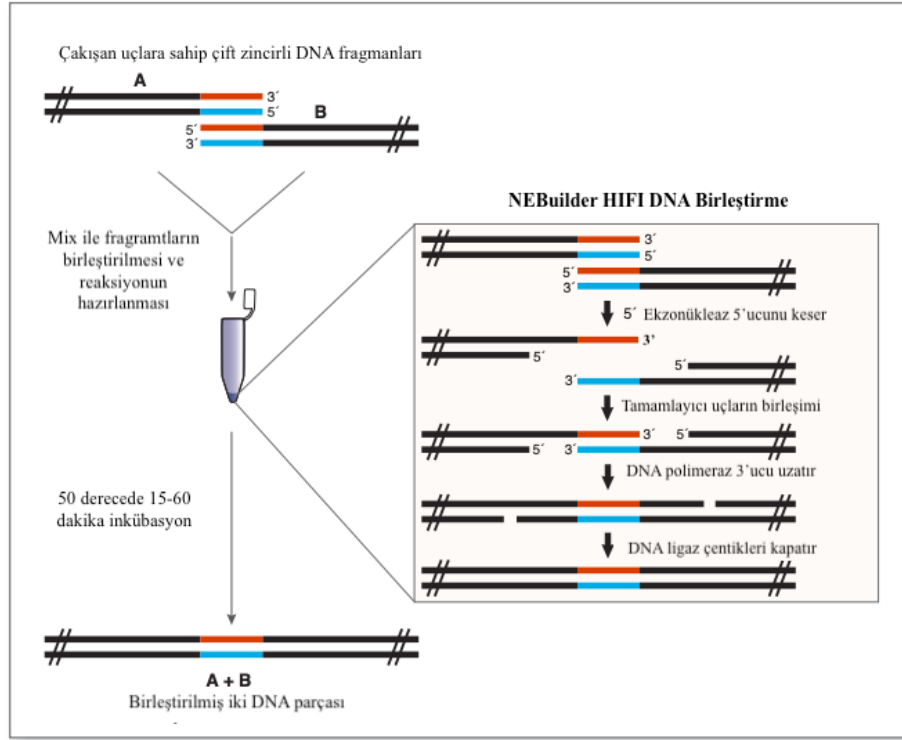
Tablo 5.3.1.1.: Restriksiyon reaksiyonunun içeriği.

<i>Plazmid vektör (PX458)</i>	<i>1000 ng</i>
<i>KpnI-NEB</i>	<i>1 ul</i>
<i>AgeI-NEB</i>	<i>1ul</i>
<i>NEBuffer r1.1</i>	<i>5 ul</i>
<i>Nukleaz içermeyen su</i>	<i>50 ul ye tamamlayacak şekilde</i>
<i>Total hacim</i>	<i>50 ul</i>
<i>Reaksiyon koşulları</i>	<i>1 saat 37 °C ve 65 °C 20 dakika</i>

5.3.2. gBlok'ların Klonlanması için Hifi birleştirme Reaksiyonları

Hifi DNA birleştirme kit düzeneği, çoklu DNA dizilerinin birleştirilmesi için kullanılan izotermal ve tek reaksiyonlu bir yöntemdir. Ana karışım 3 farklı türde enzim içermektedir. Birincisi, DNA'nın 5' ucundan geriye doğru nükleotitleri kaldırarak, tek iplikli 3' DNA sarkıntılarını oluşturan T5 ekzonükleazlardır. Bu sayede tamamlayıcı DNA parçaları birbirlerine yapışabilir. Tamamlanmış DNA fragmanlarındaki eksik nükleotitleri doldurmak için DNA polimeraz ve beraberinde Taq DNA ligaz, DNA fragmanlarının kovalent olarak birleşimini sağlayarak tüm çentikleri giderir [69]. Bu reaksiyonun nasıl yürüdüğü şekil 5.3.2.1'de gösterilmiştir.

Kesilen ve konsantrasyonu belirlenen plazmit ve gBlok insert DNA'lar 1:3 oranında Hifi mix ile aşağıda 5.3.2.2'de verilen hesaplamalara göre buzda birleştirilmiştir. Vektör DNA 50 ng olacak şekilde (önerilen miktar) reaksiyona konulmuştur. Kullanılması gereken insert miktarı ise vektör-insert hesaplama aracı ile, vektörün ve insertlerin uzunlukları ve yoğunlukları baz alınarak hesaplanmıştır. Reaksiyon tüpü hızlıca buzdan 50 °C'lik ısı bloğuna transfer edilmiş ve 1 saat inkübe edilmiştir.



Şekil 5.3.2.1.: Hifi DNA birleştirme reaksiyonunun mekanizmaların şematik gösterimi. A ve B birbirine homolojisi olan iki farklı DNA parçasını sembolize etmektedir. Hifi miksi ile bu DNA'lar tüpte karıştırıldığında gerçekleşen enzimatik reaksiyonlar sağ taraftaki kutuda gösterilmektedir. Sonuçta birbirleriyle bağlanmış tek bir DNA parçası oluşmaktadır.

Tablo 5.3.2.2: Her bir gBlok sekansı için Hifi reaksiyonların içeriği ve hesaplamaları.

IRX Hifi Birleştirme reaksiyonu:	
<i>Vektör</i>	<i>1,69 ul</i>
<i>Insert</i>	<i>2,26 ul</i>
<i>Hifi Buffer MIX</i>	<i>10</i>
<i>ddH₂O</i>	<i>6,05 ul</i>
<i>Total:</i>	<i>20 ul</i>

→ 50 ng = Plazmid konsantrasyon x

Hacim

50 ng = 29,58 ng/ul x **1,69 ul**

→ 22,6 ng = Insert konsantrasyon x

Hacim

22,6 ng = 10 ng/ul x **2,26 ul**

EYE Hifi Birleştirme reaksiyonu:	
Vektor	4 ul
Insert	1,76 ul
Hifi Buffer MIX	10
ddH ₂ O	4,24 ul
Total:	20 ul

→50 ng= Plazmid konsantrasyon x Hacim

$$50 \text{ ng} = 12,5 \text{ ng/ul} \times \mathbf{4 \text{ ul}}$$

→ 17,6 ng= Insert konsantrasyon x Hacim

$$17,6 \text{ ng} = 10 \text{ ng/ul} \times \mathbf{1,76 \text{ ul}}$$

KER Hifi Birleştirme reaksiyonu:	
Vektor	4 ul
Insert	3,36 ul
Hifi Buffer MIX	10
ddH ₂ O	2,64 ul
Total:	20 ul

→50 ng= Plazmid konsantrasyon x Hacim

$$50 \text{ ng} = 12,5 \text{ ng/ul} \times \mathbf{4 \text{ ul}}$$

→ 33,6 ng= Insert konsantrasyon x Hacim

$$33,6 \text{ ng} = 10 \text{ ng/ul} \times \mathbf{3,36 \text{ ul}}$$

HSE Hifi Birleştirme reaksiyonu:	
Vektor	4 ul
Insert	4,82 ul
Hifi Buffer MIX	10
ddH ₂ O	1,18 ul
Total:	20 ul

→50 ng= Plazmid konsantrasyon x Hacim

$$50 \text{ ng} = 12,5 \text{ ng/ul} \times \mathbf{4 \text{ ul}}$$

→ 48,2 ng= Insert konsantrasyon x Hacim

$$48,2 \text{ ng} = 10 \text{ ng/ul} \times \mathbf{4,82 \text{ ul}}$$

5.3.3 Transformasyon

5 tüp kimyasal modifiye edilmiş 50 ul DH5alfa bakterileri hızlıca buza alınmıştır. Eriyen bakterilerin üzerine 2 ul (önerilen miktar) ligasyon ürünlerinden eklenmiş ve yavaşça karıştırılmıştır. Ardından tüm tüpler yarım saat buzda inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında hemen 42 °C'ye ısıtılmış ısı bloğununa 45 saniye boyunca konulmuştur. Isı şoku sağlamak içinde bu adımdan sonra buzda 2 dakika inkübeye bırakılmıştır. Daha sonra tüpler buzdan alınıp içlerine 200 ul oda sıcaklığındaki SOC besiyeri eklenmiş ve 1 saat 37 °C'de karıştırıcılı inkübatöre bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında 1000 rpm de 3 dakika sentrifüj edilmiştir. Oluşan pelete dokunmayacak şekilde tüplerin üzerinden 150 ul süpernatant çekilmiştir ve kalan sıvı ile pelet nazikçe karıştırılmıştır. Tüm örnekler ayrı ayrı amfisislinli plakalara ekilip gece boyu 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucu oluşan plakada büyüyen koloniler belirlenen primerler kullanılarak PZR (polimeraz zincir reaksiyonu) ile kontrol edilmiştir.

5.3.4. Koloni PZR

gBlok DNA'ların vektöre entegre olup olmadığını yada doğru bir oryantasyonla entegre olduğunu kontrol etmek adına vektör ve inserte spesifik primerlerle PZR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Kullanılan primerler, bir tüp PZR reaksiyonunun içeriği ve gerçekleştirildiği koşullar da aşağıdaki tablo 5.5.1'de belirtilmiştir. Taranan kolonilerde beklenen bant uzunluğu jel elektroforez ile görüntülenmiş ve beklenen uzunluğa sahip koloni ile devam edilmiştir. Doğruluğu gösterildikten sonra enhensırı içeren plazmit sekanslamaya gönderilmiştir.

Tablo 5.5.1.: KER, EYE, HSE, IRX gBlokların klonlanması sonucunu doğru koloninin tespiti için gerekli a) primerler, b) PZR içeriği, c) PZR koşulları.

a)

<i>İleri primer 5'-3'</i>	<i>Geri primer 5'-3'</i>
<i>ctagtccgttttagcgctg</i>	<i>tacttctgtcggctgctgg</i>

b)

İleri Primer :	0,3 ul
Geri Primer:	0,3 ul
Taq karışımı:	5 ul
Koloni:	Koloninin yarısı
Nükleaz içermeyen su	4,4 ul
Total hacim:	10 ul

c)

1)	94°C	4 min
2)	94°C	30 sec
3)	59°C	30 sec
4)	72°C	1 min
5)	Go to step 2	(34X)
6)	72 °C	5 min
7)	+4	∞

5.4. β -aktin Promotörünün Klonlanması

5.4.1. Restriksiyon Reaksiyonları

Şekil 5.6.1.1’de belirtilen kimyasallar tüplerde karıştırılmış ve belirtilen şartlarda kesim reaksiyonları yürütülmüştür. Bu reaksiyonlar, yukarıda klonlandığı belirtilen, KER YBTATA içeren PX458, EY YBTATA içeren PX458, IRX YBTATA içeren PX458, HSE YBTATA içeren PX458 ve orijinal PX458 için uygulanmıştır. KER, EY, HSE, IRX kesim reaksiyonlarının 1saat 37 °C ‘lik inkübasyonundan sonra 10 dakika daha 37 °C ‘de Cip olarak adlandırılan bir enzimden oto-ligasyonu önlemek için 2 ul eklenmiş ve inkübasyonu sağlanmıştır. Bu enzim kesik DNA’lardaki 5’ucun defosforliasyonunu sağlamaktadır. Kesilen plazmidler %1’lik agaroz jelde 45 dakika 100 volt ile yürütülmüştür. Jel elektroforez

sonucunda PX458 plazmitinden küçük bant, yani β -aktin promotörünü içeren kısım, diğerlerinden büyük bant yani kesilip atılan YBTATA dışındaki tüm kısımları içeren DNA parçası bistüri yardımıyla alınıp jel purifikasyon kiti ile purifiye edilmiştir. Elde edilen kesik plazmidlerin konsantrasyonu Nanodrop cihazı ile tayin edilmiştir.

Tablo 5.6.1.1: YBTATA promotörünün yerine Beta aktin promotörünün klonlanması için gerekli kesim reaksiyonlarının içeriği.

<i>Plazmidler (KER YBTATA- EY YBTATA- IRX YBTATA-HSE YBTATA- PX458)</i>	<i>1000 ng</i>
<i>NcoI-NEB</i>	<i>2 ul</i>
<i>Cutsmart Buffer</i>	<i>5 ul</i>
<i>Nukleaz içermeyen su</i>	<i>50 ul ye tamamlayacak şekilde</i>
<i>Total hacim</i>	<i>50 ul</i>
<i>Reaksiyon koşulları</i>	<i>1 saat 37 °C- 65 °C 20 dk</i>

5.4.2. Ligasyon Reaksiyonları

PX458 plazmitinden kesilmiş β -aktin ve YBTATA sekansları çıkarılmış KER, EY, IRX, HSE enhesırlarını içeren plasmidler ile 1:3 oranında T4 ligaz enzimi ile enzimatik reaksiyona konulmuştur. Reaksiyonların tamamı buzda gerçekleştirilmiştir. Vektör DNA 50 ng kabul edilmiştir. Konulacak insert (β -aktin) miktarı ise vektör/insert hesaplama aracına göre 9 ng olarak hesaplanmıştır. Kesilmiş insert DNA'lerden 9 ng olacak şekilde hesaplanılmış ve reaksiyona konulmuştur. Reaksiyonun içeriği ve koşulları aşağıda 5.6.2.1'de belirtilmiştir.

Tablo 5.6.2.1.: Beta aktin promötörünün klonlanması için gerekli ligasyon reaksiyonlarının içeriği.

<i>HSE px458 + Beta aktin</i>	
<i>Ligasyon reaksiyonu:</i>	
Plazmit vektör	4,5 ul
Insert Beta Aktin	0,26 ul
T4 Ligasyon Tamponu (10x)	2 ul
T4 Ligasyon enzimi	1ul
Su (nükleaz içermeyen)	12,24 ul
Total	20 ul

→50 ng= Plazmid
konsantrasyon x Hacim (V)
50 ng = 11,11 ng/ul x **4,5 ul**
→ 9 ng= Insert konsantrasyon
x Hacim
9 ng = 34 ng/ul x **0,26 ul**

<i>EY px458 + Beta aktin</i>	
<i>Ligasyon reaksiyonu:</i>	
Plazmit vektör	3,3ul
Insert Beta Aktin	0,26 ul
T4 Ligasyon Tamponu (10x)	2 ul
T4 Ligasyon enzimi	1ul
Su (nükleaz içermeyen)	13,44 ul
Total	20 ul

→50 ng= PX458 kons. x V
50ng = 15ng/ul x **3,3 ul**
→ 9 ng= Insert kons. x V
9 ng = 34 ng/ul x **0,26 ul**

<i>KER px458 + Beta aktin</i>	
<i>Ligasyon reaksiyonu:</i>	
Plazmit vektör	6,25 ul
Insert Beta Aktin	0,26 ul
T4 Ligasyon Tamponu (10x)	2 ul
T4 Ligasyon enzimi	1ul
Su (nükleaz içermeyen)	10,49 ul
Total	20 ul

→50 ng= PX458 kons.xV
50 ng = 8 ng/ul x **6,25 ul**
→ 9 ng= Insert kons. x V
9 ng = 34 ng/ul x **0,26 ul**

IRX px458 + Beta aktin		
Ligasyon reaksiyonu:		
Plazmit vektör	5 ul	→ 50 ng= PX458 kons. x V
Insert Beta Aktin	1,5 ul	50 ng = 10 ng/ul x 5 ul
T4 Ligasyon Tamponu (10x)	2 ul	→ 9 ng= Insert Conc. x V
T4 Ligasyon enzimi	1ul	9 ng = 6 ng/ul x 1,5 ul
Su (nükleaz içermeyen)	10,5 ul	
Total	20 ul	

5.4.3. Transformasyon

Yukarıda 5.3.3’de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

5.4.4. Koloni PZR

Spesifik enhansır sekansları klonlanmış vektörlerden YBTATA promotörü yerine β -aktin promotörünün klonlanıp klonlanmadığını kontrol etmek adına vektör ve inserte spesifik primerlerle PZR reaksiyonu yapmak için kullanılan primerler, PZR reaksiyonunun içeriği ve gerçekleştirildiği koşullar aşağıdaki şekil 5.6.4.1’de belirtilmiştir. Her bir vektör için aynı protokol uygulanmıştır. Taranan kolonilerde beklenen bant uzunluğu jel elektroforez ile gösterilmiş ve beklenen uzunluğa sahip koloni ile devam edilmiştir.

Tablo 5.6.4.1.: Beta aktin promotörünün klonlanması sonucunu doğru koloninin tespiti için gerekli a) primerler, b) PZR içeriği, c) PZR koşulları.

a)

İleri primer 5’- 3’	Geri primer 5’-3’
<i>cgttactcccacaggtgagc</i>	<i>agaagctgtcgtccaccttg</i>

b)

İleri Primer :	0,3 ul
Geri Primer:	0,3 ul
Taq karışımı:	5 ul
Koloni:	Koloninin yarısı
Nükleaz içermeyen su	4,4 ul
Total hacim:	10 ul

c)

1)	94°C	4 min
2)	94°C	30 sec
3)	C	30 sec
4)	72°C	min
5)	Go to step 2	(34X)
6)	72 °C	5 min
7)	+4	∞

5.5. Am_U6 - Hs_U6 promotörü ile GFP gRNA'nın tasarlanması ve klonlanması

Hangi gRNA ekspresyon yönteminin daha iyi olduğunu test etmek için, tirozin gRNA öncesinde, test edilebilirdiği kolay olması açısından GFP transgenik yapısı içeren aksolotl hattında GFP hedeflenmiştir. GFP'yi hedeflemek için daha önce aksolotlda kullanılmış olan bir gRNA dizisi kullanılmıştır. GFP-gRNA hedef bölgesi: 5'- GGCCACAAGTTCAGCGTGTC-3' olarak seçilmiştir [29].

Orijinal PX458 plazmiti Hs_U6 promotörü altında gRNA ekspresyonu sağlamaktadır. Bu gRNA, Hs_U6 ve aksolotl Am_U6 promotörü aracılığıyla bağımsız olarak ifade edilecek şekilde klonlanmıştır ve yapıları tek adımda oluşturulmuş ve sekanslanmıştır. Bu klonlanan plazmit ayrıca bir GFP dizisi

içerdiğinden GFP yapısı mCherry ile değiştirilmiştir ve bu şekilde takibi yapılabilmektedir.

Am_U6 dizisi, insan ncRNA (noncoding RNA, kodlama yapmayan RNA) U6'sını aksotl genomuna karşı dizileyerek (blasting) elde edilmiştir. Bu dizileme çeşitli isabetlerle sonuçlanmıştır. Aksotl U6 promotörleri, insan U6 promotör dizisi ile benzer konsensüs bölgeleri içerdiği görülmüştür. Am_U6'yı oluşturmak için çeşitli aksotl U6 dizilerinden biri seçilmiştir (Şekil 5.5.1). Bu seçim, CRISPR plazmitlerinde kullanılan insan U6 promotör dizisine benzerliğine dayandırılmıştır. Bu klonlanan plazmit ayrıca bir GFP dizisi içerdiğinden GFP yapısı mCherry ile değiştirilmiştir ve bu şekilde takibi yapılabilmektedir.

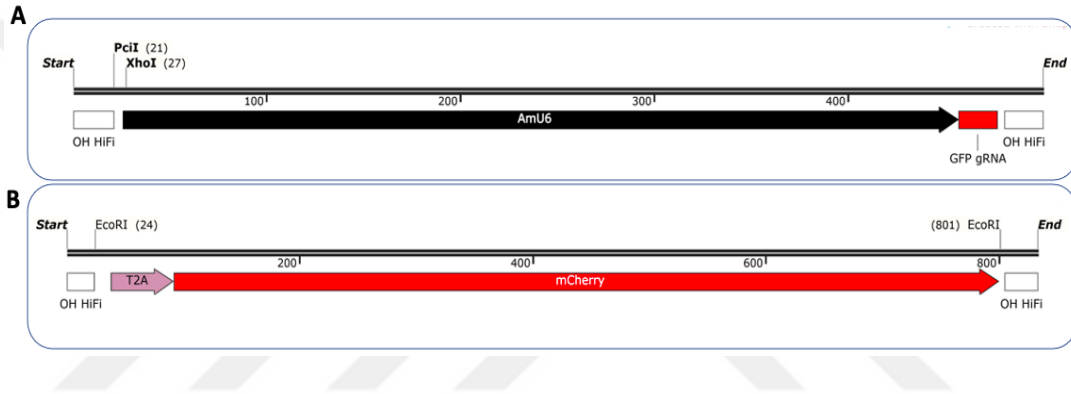
Hs_U6	-241	-214	-66	-23	0	U6
	ATTACCCATAATGCATYGCCG – ATTTGCAT		CT ^C ACCGTG ^{AG} T(GT)RAAR(0-3)TG – TTTATAT			
PX458 Hs_U6	-241	-214	-66	-24	0	gRNA
	ATTCCCATGATTCCITTCATAT – ATTTGCAT		CTTACCGTAACTGAAAGTATTTTC – TTTATAT			
Am_U6	-241	-214	-65	-24	0	U6
	CGGAGCGACACATGACTGAAT – ATTTGCAT		CTCACCTGAGTGAAGGATG – TATAT			

Şekil 5.5.1: Farklı U6 promotörlerinin, insan Hs_U6, aksotl Am_U6 kıyaslanması ve benzer domainleri.

Am_U6 promotörüyle birlikte GFP gRNA molekülü tek bir gBlok sekansı olarak sipariş verilmiştir (şekil 5.5.2 (A)). Ve bu gBlok, PX458 enzimi BbsI ve PciI enzimleri ile kesilen plazmite Hifi reaksiyonu ile yukarıdaki reaksiyonlarda belirtildiği şekilde klonlanmıştır. Hifi reaksiyonundan sonra transformasyon protokolü yine yukarıda belirtildiği biçimde ve koloni PZR şu primerler kullanılarak yapılmıştır: ileri primer: 5'CGCGCTCACGATTTTAGCAA3', geri 5'AGAGTGAAGCAGAACGTGGG 3'. Bu plazmit EcoRI enzimi ile kesilerek GFP molekülü yerine gBlok şeklinde sipariş verilen T2A-mCherry molekülü (şekil 5.5.2. (B)) Hifi birleştirme reaksiyonu ile klonlanmıştır. Bu şekilde Am_U6 GFP gRNA mCherry plazmiti oluşturulmuştur. Klonlamaları doğrulamak için sekanslamaya gönderilmiştir.

Hs_U6 GFP gRNA plazmitini elde etmek içinde EK 2'de belirtilen oligolar PZR cihazında birleştirilmiştir. Herbir oligodan 10 ng/ul olacak şekilde 5'er ul

kullanılmıştır. PZR cihazı 95 °C'den başlayarak giderek azalan sıcaklıklarda (95-85-75...) her bir sıcaklıkta 2 dakika inkübasyon sağlanacak şekilde ayarlanmış ve oligoların birleşmesi sağlanmıştır. Hs_U6 promotörünü içeren PX458 plazmiti BbsI enzimi ile kesilerek Hifi reaksiyonuna tabii tutulmuştur. Hifi reaksiyonundan sonra transformasyon protokolü yukarıda belirtildiği biçimde ve koloni PZR şu primerler kullanılarak yapılmıştır: ileri primer: 5'GAGGGCCTATTTCCCATGATT 3', geri primer 5'GACACGCTGAACTTGTGGCC 3'. Bu klonlanan plazmite ise yine EcoRI kesimi ile mCherry gBlok sekansı klonlanmıştır ve sekanslamaya gönderilmiştir.



Şekil 5.5.2: Am_U6 GFP gRNA ve mCherry gBlok'ların şematik gösterimi. A) Siyah bar Am_U6 promotör dizisini, kırmızı bar ise GFP gRNA dizisini temsil etmektedir. B) Kırmızı bar mCherry dizisini, pembe bar T2A dizisini temsil etmektedir. Beyaz barlar homoloji uzantılarını göstermektedir.

5.6. Vektörlerin İn-Vitro/Vivo İncelenmesi

5.6.1. PEI Transfeksiyonu

HEK-293T hücreleri 35 mm'lik plakalara ekilmiş ve %80 yoğunluğa gelmeleri için 2 gün inkübatörde 37 °C'de bekletilmiştir. Beklenen yoğunluğa ulaştığında önceden optimize edilmiş, PEI kimyasalı metoduyla transfeksiyon işlemi uygulanarak yukarıdaki klonlanan vektörlerin tümünün ekspresiviteyi ayrı ayrı kontrol edilmiştir. Tablo 5.6.1.1'de verilen miktarlarda kimyasallar bir tüpte karıştırılmış ve 10 dk bekletilmiştir. Sonrasında karışımın tamamı hücrelerin üzerine damlatılarak verilmiştir. İnkübatöre kaldırılıp, 2 gün beklenmiştir. İki gün sonunda

LSM800 Konfokal mikroskopu kullanılarak görüntü alınmıştır. Tüm bunlara ek olarak, HSE enhansırını içeren plazmitin transfekte edildiği hücrelerde, ısı şoku indüksiyonunun ekspresyon seviyesini değiştirip değiştirmediğini inceleyebilmek adına, hücreler 2 saat 42 °C’de inkübe edilmiş ve sonrasında tekrar görüntüleme yapılmıştır.

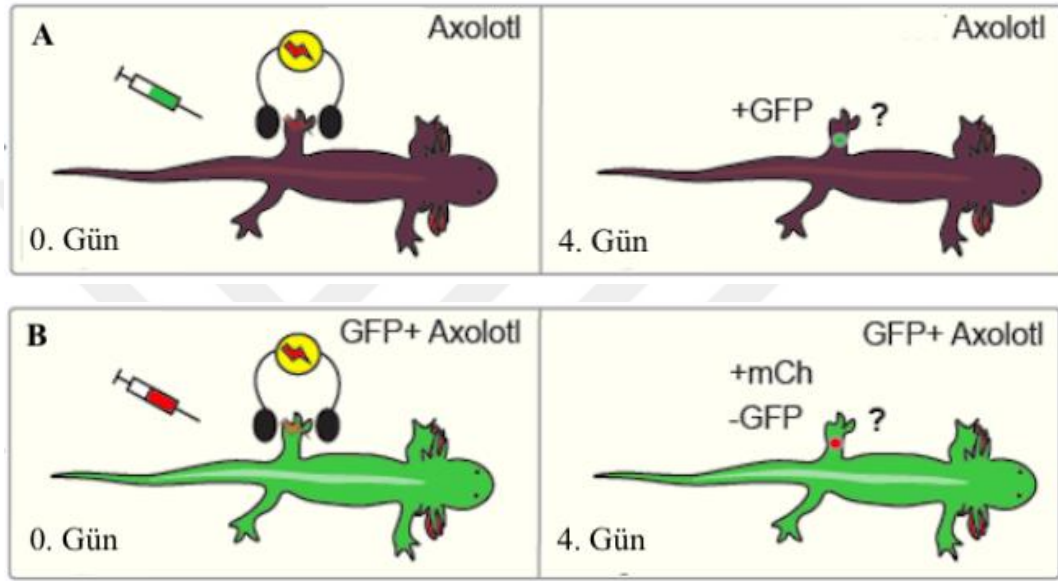
Tablo 5.6.1.1: Transfeksiyon içeriği.

İçerik	Miktar
Plazmit	1400 ng
OPTİMEM	56 ul
PEİ	12 ul

5.6.2.Elektroporasyon

Transgenik aksotl geliştirmeye yönelik tasarlanan ve klonlanan vektörlerin, embriyonik enjeksiyondan önce in-vivo test edilmesi gerekmektedir. Denemeler için yabani tip veya beyaz mutant 6-12 aylık hayvanlar seçilmiştir. Belirlenen aksotl %1’lik benzokain içerisinde 20-30 dakika bırakılıp bayıltılmıştır. Plazmitlerin denenmesi için erişilebilirliği kolay olması açısından uzuv derisi hedeflenmiştir. Klonlanan plazmitler, deriye intradermal olarak Hamilton enjektörü yardımıyla verilmiştir. Yaklaşık 500 ng/ul konsantrasyona sahip bir plazmitten 10 ul olacak şekilde enjekte edilmiştir. NepaGene21 isimli elektroporasyon cihazı ve Cuy-650p5 elektrotu kullanılarak, plazmitler elektriksel kuvvetle hedef hücrelere verilmeye çalışılmıştır. Aşağıdaki tablo 5.6.2.2’de deneysel optimizasyon protokolleri verilmiştir. Tabloadaki 2 numaralı protokol, 2-2.5 cm uzunluğundaki aksotllarda omuriliğin merkezi kanalındaki hücrelerde denenmiş ve çalıştığı gösterilmiştir [66]. Bu çalışmadan yola çıkarak protokol 1 ve 3 geliştirilmiştir. 1 numaralı protokol ile sonuç alındığından onunla devam edilmiştir. Bu protokol her bir plazmit için ayrı ayrı uygulanmıştır. Plazmitlerin çalışması durumunda aksotllarda GFP sinyali görülmesi beklenmiştir. Şekil 5.6.2.1’de de görüldüğü gibi GFP gRNA’nın test edileceği plazmitler için GFP pozitif hayvanlar kullanılmıştır. Plazmitin çalışması

halinde, aksolotl genomundaki GFP sinyalinin azalması ve yerini mCherry sinyalinin alması beklenmiştir. Darbeler uygulandıktan sonra, aksolotl kendi suyuna geri bırakılıp uyanması beklenmiştir. 4 gün sonra, plazmitlerin ekspresyonları AxioZoom mikroskobu yardımıyla görüntülenmiştir. HSE enhansır denemesinde tüm bunlara ek olarak, elektroporasyondan 2 gün sonra hayvanın koluna 20 dakika boyunca 24 °C ısı verilmiştir ve bundan 2 gün sonra görüntüleme yapılmıştır.



Şekil 5.6.2.1: Plazmitlerin aksolotl kol derisinde elektroporasyon yoluyla testi. A) Aksolotla verilen ve GFP sekansı bulunan tüm plazmitlerin verildikten 4 gün sonraki beklenen temsili GFP pozitif hücre görüntüsü. B) gRNA ekspresyonunu test etmek için GFP pozitif hayvana verilen gRNA ve mCherry dizilerini içeren plazmitlerin 4 gün sonraki beklenen temsili görüntüsü.

Tablo 5.6.2.2: Aksolotl derisinde optimize edilen elektroporasyon protokolleri. Protokoller por ve transfer darbesi olarak iki türde darbe içermektedir ve her bir darbenin uzunluğu, aralığı, bozunma oranı ve polaritesi verilmiştir.

<i>Por darbesi</i>	Protokol 1	Protokol 2	Protokol 3
Volt (v)	150.0	70.0	100
Darbe uzunluğu(ms)	5.0	5.0	5.0
Darbe aralığı (ms)	10.0	50.0	50.0
Darbe sayısı	3	5	3
Bozunma oranı (%)	0	0	0
Polarite	+	+	+
<i>Transfer darbesi</i>			
Volt (v)	50.0	40.0	50.0
Darbe uzunluğu(ms)	50.0	50.0	50.0
Darbe aralığı (ms)	950.0	999.0	990.0
Darbe sayısı	5	5	3
Bozunma oranı (%)	0	10	0
Polarite	+	+	+

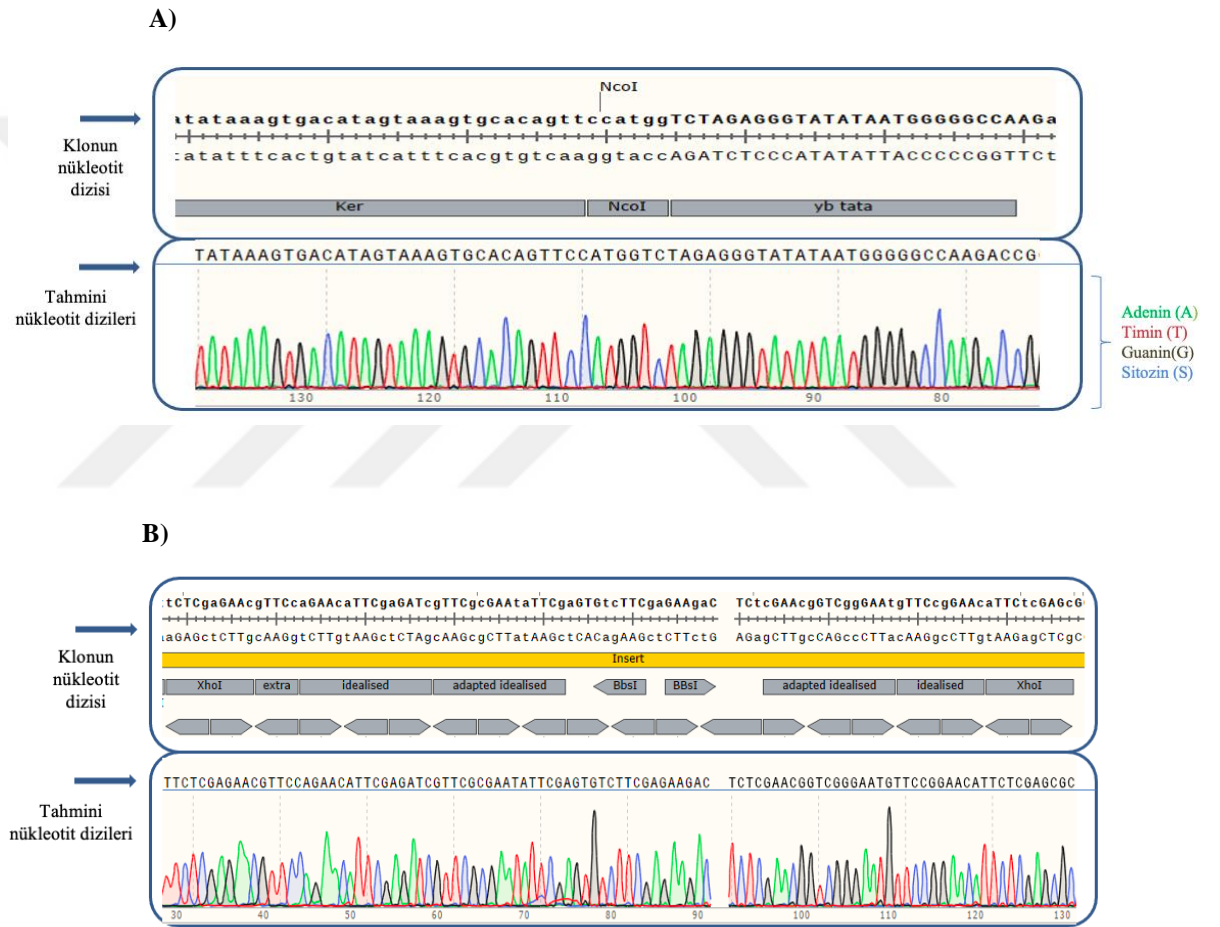
5.7.Malzeme Listesi

Malzeme	Firma-Katalog No
DMEM	Multicell, 319-005-CL
PEİ	Polysciences, 23966
FBS	Sigma-F4135
PBS	Sigma-P4417
One Taq PZR mixi	Biolabs-M0482S
SOC Besi Yeri	İnvitrogen, 15544-034
Mini plazmit izolasyon kiti	Qiagen- 27106
Maxi plazmit izolasyon kiti	Qiagen- 28704
Optimem	Thermofisher,51985034
Agarose	Multicell, D1-LE
LB broth	Biomatik, A8521
Amfisilin	Wisent Bioproducts, 450-110-EL
DNA Ladder	BioLabs, N0550S
Gliserol	Multicell, 800-040-EL
SafeView	Abm, G108
Restriksion enzimleri	Progen
NEBuilder Hifi birleştirme kiti	New England Biolabs
T4 DNA Ligaz	Progen- M0202S
Benzokain	Sigma- 94-09-7
Cip enzimi	New England BioLabs- M0525S
gBlok sekansları	IDT
Primerler	Oligomer
GFP gRNA ileri-geri oligoları	Oligomer-ID 20201109-8
Tris-EDTA	Sigma

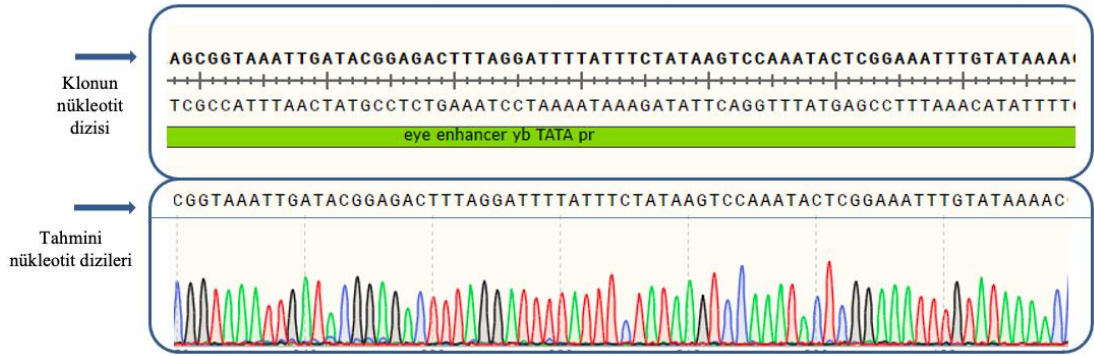
6. BULGULAR

6.1.Klonlanan Pazmitlerin Doğrulanması

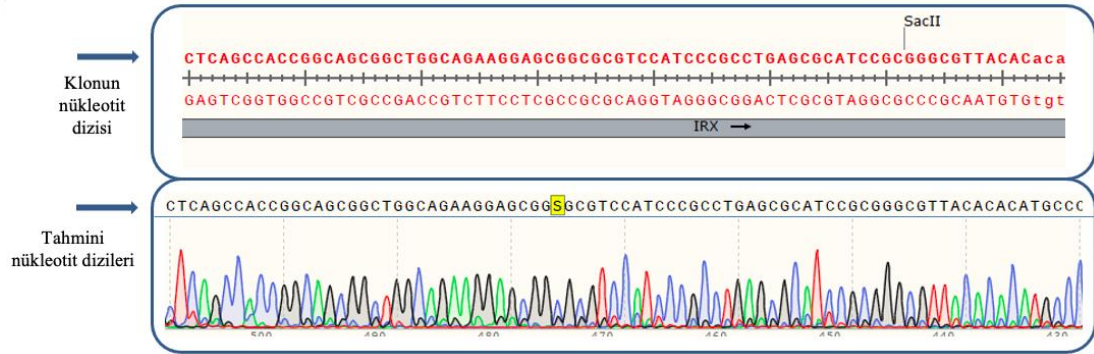
Yukarıda klonlanan plazmitler sanger sekanslama ile doğrulanmıştır. İnsertlerin bazı nükleotit dizimleri ve referans dizileri aşağıda şekil 6.1.1’de verilmiştir. gBlok şeklinde klonlanan insertler sekanslanmış, β -aktin promotörünün eklenmesinden sonraki klonlamalar ise koloni PZR ile doğrulanmıştır. Jel görünleri aşağıda şekil 6.1.2’de gösterilmiştir.



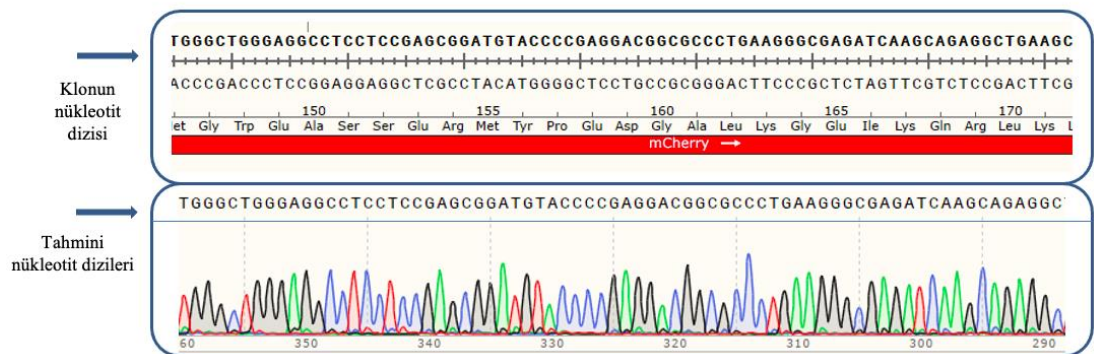
C)

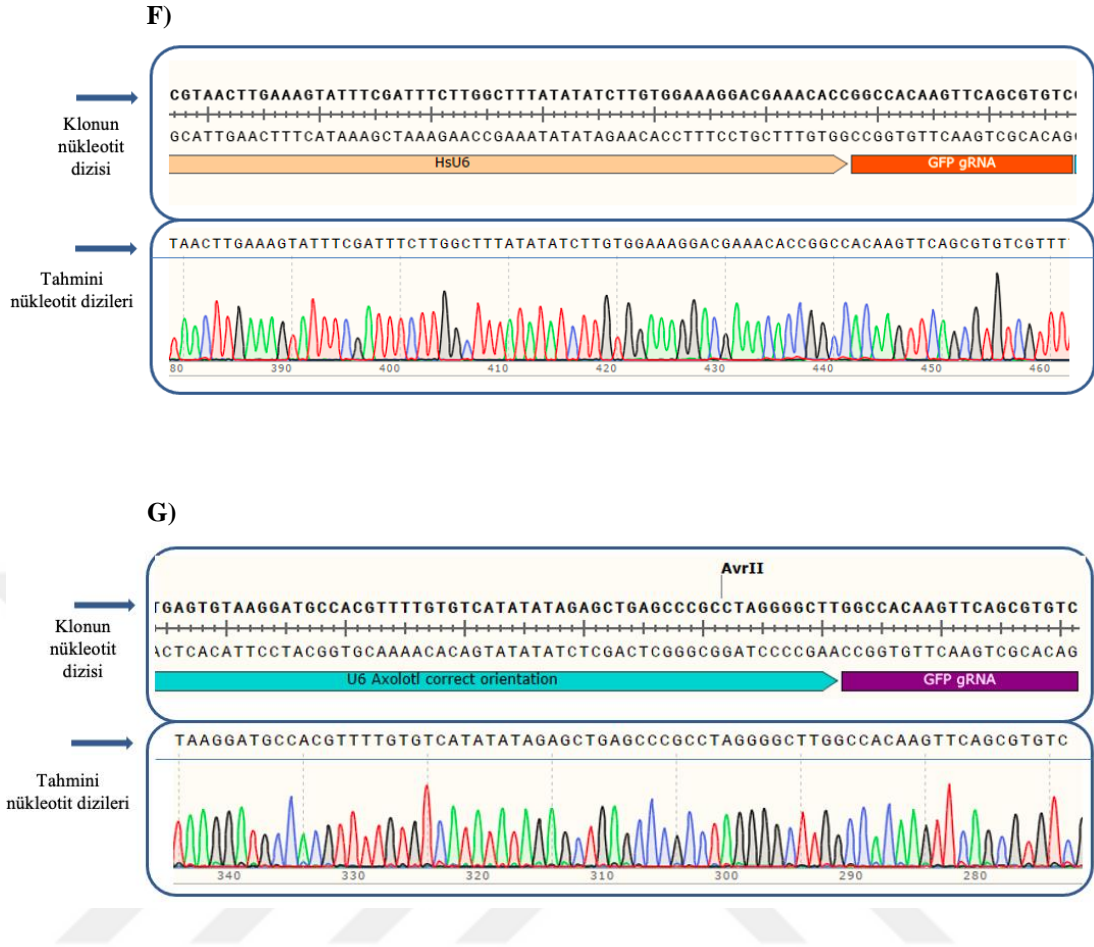


D)



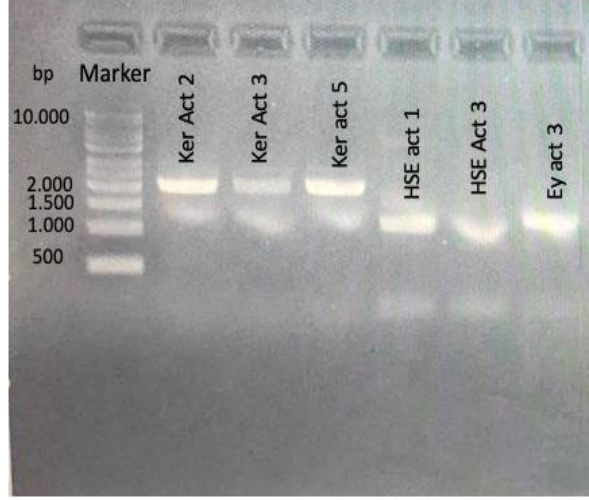
E)



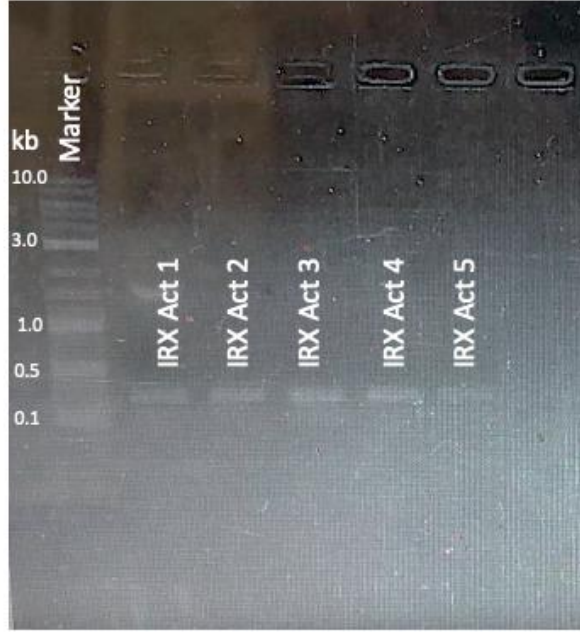


Şekil 6.1.1.: Sırasıyla, A) HSE YBTATA, B) KER YBTATA, C) IRX YBTATA, D) EY YBTATA E) mCheery, F) Hs_U6 GFP gRNA, G) Am_U6 GFP gRNA insertlerinin klonlandıktan sonraki belirli bölgelerinin sekans dizileri. Renkli pikler nükleotitleri sembolize etmektedir. Beklenen dizi aşağı satırda, klonun dizisi de üst satırda yer almaktadır. Renkli barlarda enhansörlerin ve promotörlerin isimleri yer almaktadır

a)



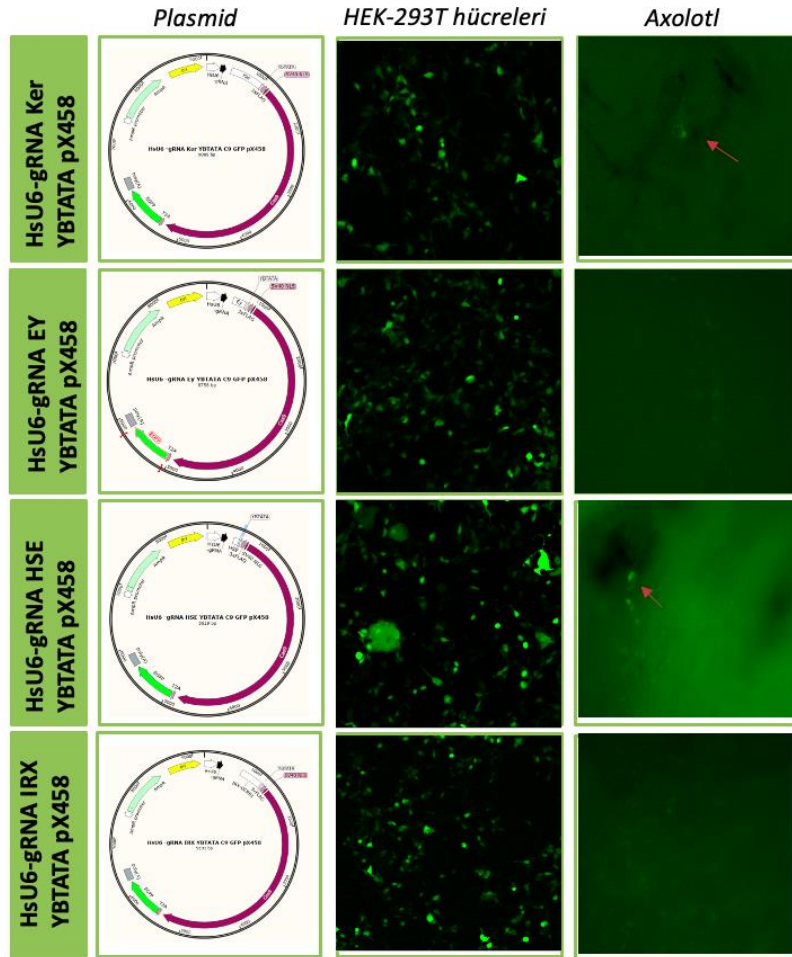
b)



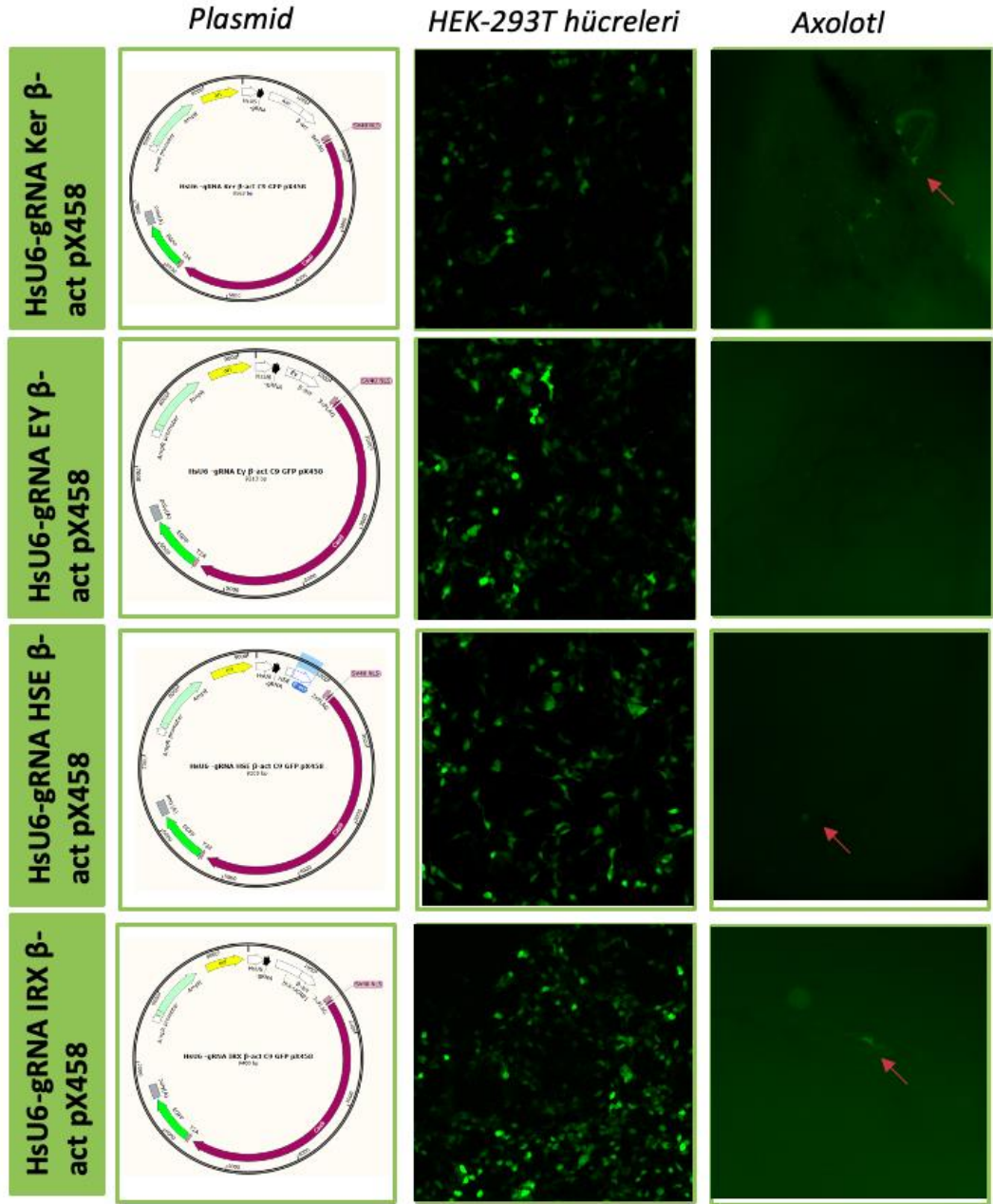
Şekil 6.1.2: β -aktin protomotörünün klonlanmasının koloni PZR ile doğrulanmasının jel görüntüleri. a) Keratin β -aktin, HSE β -aktin ve Ey β -aktin klonlanması sonucu doğru klonların %1'lik jel görüntüsü. b) IRX beta aktinin için 5 farklı klonun doğrulandığı %1'lik jel görüntüsü.

6.2 Plazmitlerin İn Vivo/Vitro larak Mikroskopik İncelemeleri

Herbir enhansırın HEK-293T hücrelerinde ve aksolotl derisinde eksprese olup olmadığı sırasıyla LSM800 ve AxioZoom mikroskoplarıyla kaydedilmiştir. Aynı zamanda YBTATA promotörü ve beta aktin promotörleri altındaki ekspresyon durumları da ayrı ayrı görüntülenmiştir ve şekil 6.2.1 ve 6.2.2'deki sonuçlar elde edilmiştir. Keratin YBTATA- β -aktin, HSE YBTATA- β -aktin ve IRX beta aktin plazmitlerinden pozitif sonuç alınmıştır. Deneyler için kullanılan CMV enhansır altında orijinal PX458 plazmitinde aksolotl derisine elektroporasyon sonucu şekil 6.2.3'de gösterilmiştir.

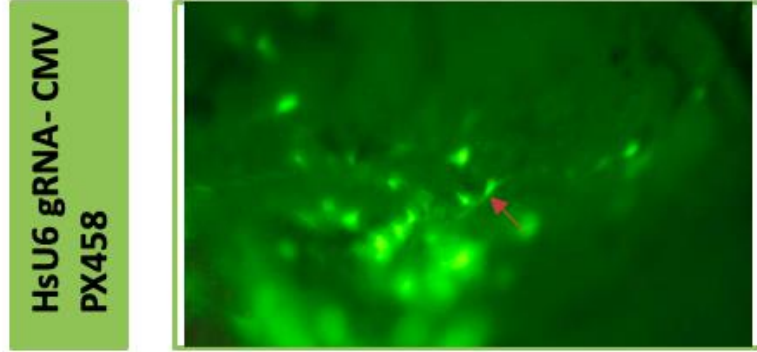


Şekil 6.2.1: Doku spesifik enhansırların YBTATA promotörü ile birlikte in-vitro ve in-vivo incelemeleri. Sırasıyla Keratin, Ey, HSE, Irx enhansırını içeren plazmitlerin GFP filtre altında hücreye transfesiyonu ve aksolotl dersine elektroporasyonu sonrası görüntüleri.



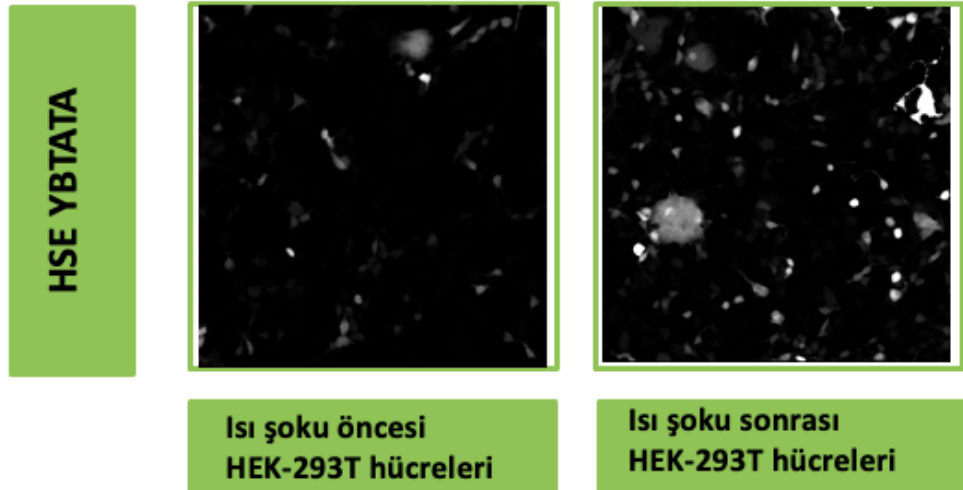
Şekil 6.2.2: Doku spesifik enhansırların β -aktin promotörü ile birlikte in-vitro ve in-vivo incelemeleri. Sırasıyla Keratin, Ey, HSE, Irx enhansırını içeren plazmitlerin GFP filtre altında hücreye transfesiyonu ve beyaz mutant aksolotl dersine elektroporasyonu sonrası görüntüleri.

Axolotl



Şekil 6.2.3: Orijinal PX458 plazmitinin yabancı tip aksolotla elektroporasyonundan 4 gün sonraki görüntüsü.

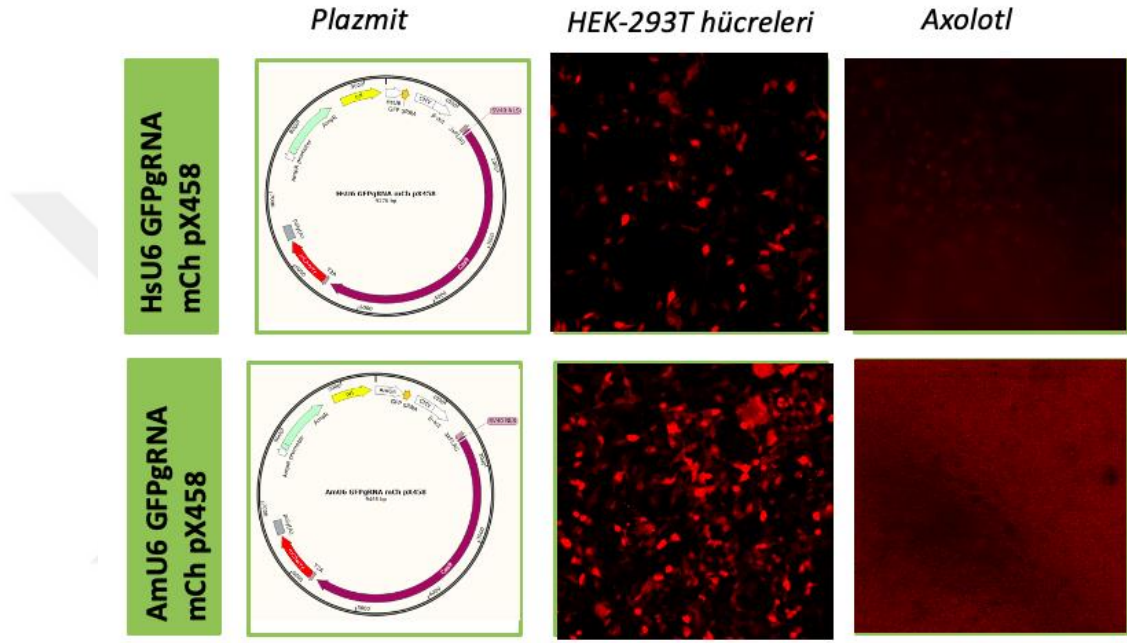
HSE YBTATA plazmiti transfekte edilen hücrelerde ısı şoku verilmeden ve ısı şoku (42 °C) verildikten sonraki ekspresyon seviyelerini kıyaslamak adına öncesi ve sonrası olarak iki görüntüsü alınmış ve şekil 6.2.4'te verilmiştir.



Şekil 6.2.4: HSE YBTATA plazmitinin HEK-293T hücrelerine verildikten hemen sonraki ve ısı şoku uygulandıktan sonraki ekspresyonlarının görüntüleri.

6.3 GFP gRNA'nın İn Vivo/Vitro olarak Mikroskopik İncelemeleri

GFP gRNA'nın aksotl U6 ve insan U6 promotörleri altında çalışırılığını göstermek için hücre kültürü ve GFP pozitif aksotl derisinde görünleri alınmış ve aşağıdaki şekil 6.3.1 elde edilmiştir. Herhangi bir hücrede mCherry sinyali görülmemiş ve GFP sinyalinde azalma tespit edilmemiştir.



Şekil 6.3.1: Sırasıyla insan U6 ve aksotl U6 promotörleri altındaki GFP gRNA'nın mCheery filtresi altında hücre ve aksotl derisindeki görüntüleri.

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Aksolotl organ veya doku rejenerasyonu çalışmaları için oldukça önemli bir model organizmadır. Çünkü insanlarda sınırlı olan bu fonksiyonlar aksolotlda kalp, omurilik, uzuvlar, beynin belirli bir bölümü kapsayacak şekilde gelişmiştir [70]. Bu rejenerasyon mekanizmalarını daha iyi anlayabilmek için süreçte rol alan genlerin fonksiyonlarının anlaşılması gerekmektedir. Global mutasyonlar (tüm organizma mutasyonları), bir genin fonksiyonelliğinin anlaşılması için yeterli olmamakla birlikte, diğer birçok süreçte etkileyebilmektedir. Bu sebeple genin spesifik bir dokuda ve belirli bir zaman aralığında fonksiyonunu öğrenmek çok daha elzemdir.

Çalışmamızda Crispr/Cas9 aracı ile tek bir organizmada iki ardışık hedefleme planmıştır. İlk hedefleme sayesinde, embriyonik enjeksiyon yoluyla ilk allel susturulmuş olacaktır. Devamında da mikro enjeksiyon ile verdiğimiz özel enhansır dizileri ile dizayn edilmiş plazmitler aracılığıyla doku ve zamansal kontrollü ikinci hedefleme sağlanacak ve diğer allel inaktive olacaktır. Bu vektör plazmitler gRNA'yı tüm organizmada eksprese ederken, Cas9 endonükleazını ise dokuya özgü eksprese edecek ve sadece Cas9'un aktif olduğu dokularda mutasyon izlenecektir. Bu tez çalışmasının temel amacı da bu plazmitlerin dizaynını ve test edilmesini kapsamaktadır.

Deride oluşturulacak mutasyonların görülebilirlik kolaylığı sağlayacağından ötürü Keratin enhansırı, buna yedek plan olarak küçük göz enhansırı Eyles, Xenopusta birçok dokuda aktif olan Iroquois enhansırı ve indüklenbilir ekspresyonu sağlayacak HSE enhansırı tercih edilmiştir ve gBlok DNA dizi olarak temin edilmişlerdir. Bu dizileri içerecek olan vektör plazmitin küçük olması etkinliği arttıracığından dolayı sekanslar mümkün olduğunda minimal tutulmaya çalışılmıştır. Her biri Hifi izotermal birleştirme reaksiyonu ile klonlanacağından yaklaşık 20 nükleotitlik homolojiyi sağlayacak uzantılar eklenmiştir. Aynı zamanda vektörlerin bir reportör sinyaline sahip olması, florasan mikroskopu altında takibini

kolaylaştırmaktadır. Bizim çalışmamızda GFP, yeşil floresan proteini hedef hücreyi görüntülemeye kullanacağımız sinyal olarak belirlenmiştir.

Plazmitlerin klonlanması için Hifi birleştirme ve klasik kesim-ligasyon yöntemleri başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Fakat, başta gBloklerden bazılarının klonlanmasında problem çıkmıştır. Bu durumda gBlok dizisinin molekül içi baz eşleşmesi (hairpin) yapılarının oluşmuş olabileceği düşünülerek diziler 70 °C'de 5 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Hedef gBlok dizileri tekrar incelendiğinde molekül içi baz eşleşmesi (hairpin) yapısını oluşturabilecek baz dizilerine sahip olduğu görülmüştür ve bununda klonlama verimini çok düşürdüğü bilinmektedir. Bu sebeple, hairpin yapısının çözülebilmesi için diziler 70 °C'de 5 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Çift sarmal haldeki dizilerin yüksek sıcaklığa maruz bırakıldığında aralarındaki hidrojen bağlarının zayıfladığı ve bu sayede dizilerin açıldığı yapılan daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir [71]. Bu sistem aynı zamanda PZR reaksiyonlarının da temelini oluşturmaktadır. Ancak, gBlok dizileri göreceli olarak daha küçük olduğu ve sarmal yapıda olmadığı için sıcaklık seçimi PZR de olduğu gibi 95°C değil, 70 °C olarak belirlenmiştir. Dizilerin tamamen açılması yerine, yalnızca oluşturduğuna inanılan hairpin yapılarının çözülmesi istendiği için, inkübasyon süresi de 5 dakika olarak seçilmiştir. Bu sayede DNA çözülmesi sağlanmış ve klonlamalara devam devam edilmiştir. Bir diğer durum ise, Keratin gBlok dizisinin son 100 baz çiftlik promotör kısmı eksik olarak (firma kaynaklı hata olarak) elimize ulaşmasıdır. Buna rağmen, HEK-293T hücrelerinde yapılan ilk denemede GFP sinyali gözlenmiştir. Bunun nedeni olarak, Xenopustan alınan yukarı akış dizisinin TATA kutusunu bulunduruyor olması olarak yorumlanmıştır. TATA kutusu sayesinde transkripsiyonu başlatan faktörler bağlanabilmiş ve ekspresyon gözlenmiştir. Keratinin eksik kısmının NcoI enzimi ile klonlanması sonrasında sekanslama sonucunda insertin kesik plazmite (PX458) ters entegre olduğu saptanmıştır. Bu durum iki ucunda NcoI enzimi ile kesilmesi sebebi ile aynı homoloji uçlarını oluşturacağından muhtemel olarak değerlendirilmiştir. Koloni PZR sonucunda insert ters entegre olsa bile aynı uzunlukta bant elde edileceğinden durum fark edilmemiştir. Sekanslama sonucu tespiti sonrasında, doğruluğu bilinen klon tekrar transforme edilmiştir ve Keratin YBTATA klonlaması

bu şekilde tamamlanmıştır. Irx dizisini elde etmek için öncelikle aksotl genomundan PZR ile çoğaltma yoluna gidilmiştir. Fakat aksotl genomu çok geniş olması ve halen sekanslanmamış bölgeler barındırmasından ötürü çoğaltılamayıp diğer enhensırlar gibi gBlok sekansı olarak sipariş verilmiştir. Bir diğer enhensır olan HSE, birbirini tekrar eden pentamerik dizilerden oluşmaktadır ve bizim çalışmamız için bu diziler 10 tekrar şeklinde kullanılmıştır. Fakat indüklenabilirlik (ısı) hassasiyetini arttırmak için tekrar sayısı arttırılabilecek şekilde dizayn edilmiş ve 18 tekrardan oluşan hali de başarıyla klonlanmıştır. Diğer gBlokların da klonlanması aşamasında dikkat edilen bir diğer husus ise kesim sonunda kesilen plazmitin tespiti aşamasında doğru bantı seçerken DNA'ları çok uzun süre UV'ye maruz bırakmamak olmuştur. UV radyasyonu DNA üzerindeki mutasyon oranını arttırıp sekanslama sonuçlarımızı negatif etkileyebileceğinden dolayı bundan kaçınılmıştır.

Sekanslama sonuçlarımızı değerlendirmek gerekirse, şekil 6.1.1, Ker YBTATA, Ey YBTATA, Irx YBTATA ve HSE YBTATA gblokları başarılı bir şekilde klonlanmıştır. Aynı şekilde, enhensır dizilerinin sonuna β -aktin promotörü klonlamaları da şekil 6.1.2, koloni PZR jel görüntülerinde beklenen bant uzunluklarıyla doğrulanmıştır.

Devamında, departmanda bulunan ve ekspresivitesi oldukça yüksek HEK-293T hücreleri katyonik lipit olan PEİ ile transfekte edilerek ve her bir plazmitin in vitro denemesi yapılmıştır. Hücre kültürü denemelerinin aksotl hücre hattında yapılmasının daha uygun olduğu düşünülmesine rağmen elimizde bulunmaması sebebi ile öncü bilgi edinebilmek adına insan hücrelerine verilmiştir. Nitekim sonuçlarda da görüldüğü gibi, şekil 6.2.1 ve 6.2.2, her bir enhensır ve promotör bu hücre hattında yüksek derece ekspresyon göstermiştir.

İn vivo test için ise elektroporasyon yönteminin tercih edilmesinin sebebi çok geniş çapta hücre gurubuna ve plazmit boyut farkı olmaksızın transfeksiyonu sağlamanın yanısıra aksololda da daha önce kullanılmış bir yöntem olmasıdır [29, 64]. Fakat daha önce aksotl uzuv derisinde uygulanan bir elektroporasyon

düzenegi literatürde bulunmamasından dolayı, aksolotlda yapılan bir diğer protokolden yola çıkılarak optimizasyon yapılmıştır ve şekil 5.6.2.2'deki 1. protokol ile pozitif sonuçlar alınmıştır. İlk olarak denen orjinal PX458 plazmiti yabancı tip hayvan derisine verilmiş ve çok fazla arka plan sinyali, otofloresan görülmüştür. Bu sebeple, enhensırların testi için beyaz mutant hayvan seçilmesi şeffaf derisi ve nispeten az otofloresan göstermesi sayesinde deri enjeksiyonunu kolaylaştırmıştır. Ayrıca elektroporasyon cımbızı ile ulaşılabilirliği kolay olmasından dolayı parmaklarının hemen üst bölgesine elektrik darbeleri verilmiştir. Elektroporasyon sonuçlarını değerlendirecek olursak, Ey göze özgü bir enhensır olduğu için hem YBTATA hem de β -aktin promotörü altında beklendiği üzere deride ekspresyon göstermemiştir. Keratin enhensırı verilen aksolotl uzvunda ise her iki promotör altında da pozitif hücre yakalanmıştır. Irx enhensırı için ise yalnızca β -aktin promotörü altında GFP ekspresyonu gösteren hücre seçilebilmiştir. HSE plazmitinde her iki promotörle de ısı şoku sonrası GFP pozitif hücre saptanmıştır. Özellikle hücre çalışmasında ısı şoku verildikten sonra gözle görülür ekspresyon artışı ısı şoku indüksiyonunun çalıştığını göstermiştir. Sinyaller zayıf görünmesine rağmen, çekim esnasında mCherry filtersiyle yapılan kontrolde sinyal görülmemesi ve önce fotoğrafında benzer lokasyonlarda sinyalin olmaması bizi otofloresan şüphesinden uzaklaştırmıştır.

Bu tez çalışmasının yürütüldüğü proje kapsamında tyr gRNA ile tirozin geni hedeflenmekte, tüm deri veya kısmı albino bölgelere sahip aksolotl oluşturulması planlanmaktadır. Fakat bundan önce, GFP pozitif hayvanda daha öncede çalıştığı gösterilen GFP gRNA ile uygun promotörün testinin yapılmasına karar verilmiştir. Orjinal PX458 plazmitinde insan U6 promotörü bulunmakta ve aksolotlda çalışmama ihtimaline karşın aksolotl genomuna karşı dizilenip benzer aksolotl U6 promotörleri bulunmuştur. Elde edilen isabet sekanslardan hangi Am_U6 promotörünün seçileceği veya hangisinin tüm hücrelerde ekspresyon göstereceği veya hangisinin daha güçlü bir ekspresyona sebep olacağı gibi birçok soru işareti akıllara gelmiştir. Aksolotl U6 promotörleri, insan U6 promotör dizisi ile konsensüs bölgeler içerir. Am_U6'yı oluşturmak için çeşitli aksolotl U6 dizilerinden birisi seçilmiştir. Bu seçim, CRISPR plazmitlerinde kullanılan insan U6 promotör dizisine

benzerliğe dayandırılmıştır. Çalışmaması durumunda, alternatif ikinci bir yöntem olarak, gRNA'yı bir mRNA dizisinden ayırmak için kullanılan Ribozimler belirlenmiştir [29]. Bu işlem aynı zamanda polyA kuyruğunu da ortadan kaldırmakta ve mRNA'nın kararsızlığına neden olabilebilmektedir. mRNA bozulmasını önlemek için, ilk ribozimden (18 baz çifti) önce stabilize edici bir RNA dizisi olan ve tripleks olarak adlandırılan dizi eklenmiştir. Bu yöntem aksolotlda daha önce denendiğinde, iki plazmit kullanılmış, bir plazmit Cas9'u ifade ederken diğer plazmit, ribozim dizileriyle çevrili gRNA ile bir floresan işaretleyiciyi ifade etmiştir. Hedeflenen hücrelerde bir floresan işaretleyicinin bulunması gRNA'nın varlığını göstermiştir. Bizim yöntemimizde hedefleme yapımızı (Cas9 ve gRNA) genomda tek bir yapı olarak tanıtmamız gerektiğinden hem Cas9 hem de ribozimin aynı plazmit üzerinde bulunması gerekmektedir. Bu nedenle, ribozim-gRNA dizilerine kaynaşmış Cas9 cDNA'yı ifade edecek bir plazmit oluşturulmuştur. Ribozim aracılı gRNA'nın kendi kendini parçalamasından (self-cleaving) sonra, kalan tripleks Cas9 mRNA'yı korumakta ve Cas9 ifadesini etkinleştirmektedir. Böylece hem Cas9 hem de gRNA, ilgililenen geni hedefleyebilecektir.

. GFP gRNA içeren plazmitin takibinin sağlanabilmesi için plazmitteki GFP dizisi yerine mCherry dizisi konulmuştur ve şekil 6.3.1'deki sonuçlar elde edilmiştir. HEK293-T hücre hattındaki ekspresyon seviyelerine bakıldığında her iki promotör altında da sinyal görülmüştür. Fakat aksolotlda her iki promotör içinde sinyal alınamamıştır. mCherry sinyalinin alınmaması yerleştirilmiş plazmit olmadığı anlamına gelmektedir. Eğer mCherry plazmiti entegre olduysa ve sinyal alınmadıysa bu da otofloresan kaynaklı olabilmekle birlikte, GFP hayvana enjeksiyonun yapıldığı bölgedeki GFP sinyalinin azalması ile kontrol edilebilir. Bu enjeksiyonda, GFP pozitif hayvanlarda GFP'de herhangi bir azalma gözlenmediğinden, plazmitin entegre olmadığı veya yapının işlevsel olmadığı sonucuna varılmaktadır. İnsan U6 promotörü beklendiği üzere, aksolotlda çeşitli transkripsiyonel bağlanma bölgeleri farklılıklarından dolayı çalışmayacağı önceden tahmin edilmektedir. Am_U6 promotörü için de belirlediğimiz kriterler seçtiğimiz dizi yerine diğer dizilerinde değerlendirilmeye alınması gerektiği yorumuna varılmıştır. Buna ek olarak, plazmitin mümkün olduğunda küçük olmasını istediğimizden dolayı diziyi bir

miktar kısaltarak almamız yine bu negatif sonuca neden olmuş olabilmektedir. Bu negatif sonuç düşünülerek bir arka plan olarak seçilen yukarıda bahsedilen Ribozim ile beklediğimiz sonuç alınmış, mCherry sinyali gözlemlenmemesine rağmen, azalan GFP ekspresyonu tespit edilmiş ve GFP gRNA'nın çalışırılığı gösterilmiştir.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlarla, dizaynı yapılan, klonlanan ve in vitro/vivo testi yapılan enhansırlardan ve GFP gRNA plazimitlerinden yola çıkılarak, Ker YBTATA ve Ribozim tyr gRNA kombinasyonu ile ilk embriyonik enjeksiyon denemesine karar verilmiştir. Doku spesifik ve zamansal kontrolü sağlayacak bu sistem ardışık iki hedefleme ile aksolotlda çalışırılığı gösterildikten sonra, rejenerasyonda rol alan genler için de uygulanabilecek hale gelecektir. Bu da bizlere rejenerasyon sürecinin anlaşılması ve teröpatik manipülasyonlara giden yolun aydınlatılmasında yardımcı basamaklardan biri olacaktır.

8. KAYNAKLAR

1. Roy, S. and S. Gatién, *Regeneration in axolotls: a model to aim for!* Experimental gerontology, 2008. **43**(11): p. 968-973.
2. Goldman, J.A. and K.D. Poss, *Gene regulatory programmes of tissue regeneration*. Nature Reviews Genetics, 2020. **21**(9): p. 511-525.
3. McCusker, C. and D.M. Gardiner, *The axolotl model for regeneration and aging research: a mini-review*. Gerontology, 2011. **57**(6): p. 565-571.
4. Vieira, W.A., K.M. Wells, and C.D. McCusker, *Advancements to the axolotl model for regeneration and aging*. Gerontology, 2020. **66**(3): p. 212-222.
5. Ran, F., et al., *Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system*. Nature protocols, 2013. **8**(11): p. 2281-2308.
6. Woodcock, M.R., et al., *Identification of mutant genes and introgressed tiger salamander DNA in the laboratory axolotl, Ambystoma mexicanum*. Scientific reports, 2017. **7**(1): p. 1-10.
7. Bajoghli, B., et al., *An artificial promoter construct for heat-inducible misexpression during fish embryogenesis*. Developmental biology, 2004. **271**(2): p. 416-430.
8. Khattak, S., et al., *Germline transgenic methods for tracking cells and testing gene function during regeneration in the axolotl*. Stem cell reports, 2013. **1**(1): p. 90-103.
9. Xu, P.-X., et al., *Regulation of Pax6 expression is conserved between mice and flies*. Development, 1999. **126**(2): p. 383-395.
10. Gómez-Skarmeta, J.L. and J. Modolell, *Iroquois genes: genomic organization and function in vertebrate neural development*. Current opinion in genetics & development, 2002. **12**(4): p. 403-408.
11. Poss, K.D., *Advances in understanding tissue regenerative capacity and mechanisms in animals*. Nature Reviews Genetics, 2010. **11**(10): p. 710-722.
12. Wells, J.M. and F.M. Watt, *Diverse mechanisms for endogenous regeneration and repair in mammalian organs*. Nature, 2018. **557**(7705): p. 322-328.
13. Michalopoulos, G.K. and M. DeFrances, *Liver regeneration*. Regenerative Medicine I, 2005: p. 101-134.

14. Grefte, S., et al., *Skeletal muscle development and regeneration*. Stem cells and development, 2007. **16**(5): p. 857-868.
15. Santos Jr, A.R., et al., *Mechanisms of cell regeneration—From differentiation to maintenance of cell phenotype*. Cells and Biomaterials in Regenerative Medicine, 2014: p. 37-69.
16. Gilbert, S.F. and M. Barresi, *Developmental biology, ed.* Sunderland (MA): Sinauer, 2000.
17. Caballero-Pérez, J., et al., *Transcriptional landscapes of Axolotl (Ambystoma mexicanum)*. Developmental biology, 2018. **433**(2): p. 227-239.
18. Tilley, L., et al., *The use of transgenics in the laboratory axolotl*. Developmental Dynamics, 2021.
19. Voss, S.R., H.H. Epperlein, and E.M. Tanaka, *Ambystoma mexicanum, the axolotl: a versatile amphibian model for regeneration, development, and evolution studies*. Cold Spring Harbor Protocols, 2009. **2009**(8): p. pdb.em0128.
20. McCusker, C., S.V. Bryant, and D.M. Gardiner, *The axolotl limb blastema: cellular and molecular mechanisms driving blastema formation and limb regeneration in tetrapods*. Regeneration, 2015. **2**(2): p. 54-71.
21. Chernoff, E.A. and D.L. Stocum, *Developmental aspects of spinal cord and limb regeneration*. Development, growth & differentiation, 1995. **37**(2): p. 133-147.
22. Morozov, A., et al., *Using conditional mutagenesis to study the brain*. Biological psychiatry, 2003. **54**(11): p. 1125-1133.
23. Yin, L., L. Maddison, and W. Chen, *Multiplex conditional mutagenesis in zebrafish using the CRISPR/Cas system*, in *Methods in Cell Biology*. 2016, Elsevier. p. 3-17.
24. Cong, L., et al., *Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems*. Science, 2013. **339**(6121): p. 819-823.
25. Jiang, F. and J.A. Doudna, *CRISPR–Cas9 structures and mechanisms*. Annual review of biophysics, 2017. **46**: p. 505-529.

26. Lee, R.T.H., A.S.M. Ng, and P.W. Ingham, *Ribozyme mediated gRNA generation for in vitro and in vivo CRISPR/Cas9 mutagenesis*. PloS one, 2016. **11**(11): p. e0166020.
27. Savić, N. and G. Schwank, *Advances in therapeutic CRISPR/Cas9 genome editing*. Translational Research, 2016. **168**: p. 15-21.
28. Fei, J.-F., et al., *Application and optimization of CRISPR–Cas9-mediated genome engineering in axolotl (Ambystoma mexicanum)*. Nature Protocols, 2018. **13**(12): p. 2908-2943.
29. Fei, J.-F., et al., *Tissue-and time-directed electroporation of CAS9 protein–gRNA complexes in vivo yields efficient multigene knockout for studying gene function in regeneration*. NPJ Regenerative medicine, 2016. **1**(1): p. 1-9.
30. Ong, C.-T. and V.G. Corces, *Enhancer function: new insights into the regulation of tissue-specific gene expression*. Nature Reviews Genetics, 2011. **12**(4): p. 283-293.
31. Ablain, J., et al., *A CRISPR/Cas9 vector system for tissue-specific gene disruption in zebrafish*. Developmental cell, 2015. **32**(6): p. 756-764.
32. Moll, R., et al., *The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells*. Cell, 1982. **31**(1): p. 11-24.
33. Moll, R., M. Divo, and L. Langbein, *The human keratins: biology and pathology*. Histochemistry and cell biology, 2008. **129**(6): p. 705-733.
34. Tazawa, I., K. Shimizu-Nishikawa, and K. Yoshizato, *A novel Xenopus laevis larval keratin gene, xlk2: its gene structure and expression during regeneration and metamorphosis of limb and tail*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression, 2006. **1759**(5): p. 216-224.
35. Suzuki, K.i.T., et al., *Characterization of a novel type I keratin gene and generation of transgenic lines with fluorescent reporter genes driven by its promoter/enhancer in Xenopus laevis*. Developmental Dynamics, 2010. **239**(12): p. 3172-3181.
36. Åkerfelt, M., R.I. Morimoto, and L. Sistonen, *Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan*. Nature reviews Molecular cell biology, 2010. **11**(8): p. 545-555.

37. Wu, C., *Heat shock transcription factors: structure and regulation*. Annual review of cell and developmental biology, 1995. **11**(1): p. 441-469.
38. Pelham, H.R., *A regulatory upstream promoter element in the Drosophila hsp 70 heat-shock gene*. Cell, 1982. **30**(2): p. 517-528.
39. Amin, J., J. Ananthan, and R. Voellmy, *Key features of heat shock regulatory elements*. Molecular and cellular biology, 1988. **8**(9): p. 3761-3769.
40. Xiao, H., O. Perisic, and J.T. Lis, *Cooperative binding of Drosophila heat shock factor to arrays of a conserved 5 bp unit*. Cell, 1991. **64**(3): p. 585-593.
41. Wheeler, G.N., F.S. Hamilton, and S. Hoppler, *Inducible gene expression in transgenic Xenopus embryos*. Current Biology, 2000. **10**(14): p. 849-852.
42. Halloran, M.C., et al., *Laser-induced gene expression in specific cells of transgenic zebrafish*. Development, 2000. **127**(9): p. 1953-1960.
43. Brand, A.H., A.S. Manoukian, and N. Perrimon, *Ectopic expression in Drosophila*. Methods in cell biology, 1994. **44**: p. 635-654.
44. Bürglin, T.R., *Analysis of TALE superclass homeobox genes (MEIS, PBC, KNOX, Iroquois, TGIF) reveals a novel domain conserved between plants and animals*. Nucleic acids research, 1997. **25**(21): p. 4173-4180.
45. Gomez-Skarmeta, J.L., et al., *Xiro, a Xenopus homolog of the Drosophila Iroquois complex genes, controls development at the neural plate*. The EMBO journal, 1998. **17**(1): p. 181-190.
46. Gomez-Skarmeta, J., E. de La Calle-Mustienes, and J. Modolell, *The Wnt-activated Xiro1 gene encodes a repressor that is essential for neural development and downregulates Bmp4*. Development, 2001. **128**(4): p. 551-560.
47. Peters, T., et al., *Organization of mouse Iroquois homeobox genes in two clusters suggests a conserved regulation and function in vertebrate development*. Genome research, 2000. **10**(10): p. 1453-1462.
48. Ogura, K., et al., *Cloning and chromosome mapping of human and chicken Iroquois (IRX) genes*. Cytogenetic and Genome Research, 2001. **92**(3-4): p. 320-325.
49. Bejerano, G., et al., *Ultraconserved elements in the human genome*. Science, 2004. **304**(5675): p. 1321-1325.

50. Feijóo, C.G., et al., *The Irx gene family in zebrafish: genomic structure, evolution and initial characterization of irx5b*. *Development genes and evolution*, 2004. **214**(6): p. 277-284.
51. De La Calle-Mustienes, E., et al., *A functional survey of the enhancer activity of conserved non-coding sequences from vertebrate Iroquois cluster gene deserts*. *Genome research*, 2005. **15**(8): p. 1061-1072.
52. Czerny, T., et al., *twin of eyeless, a second Pax-6 gene of Drosophila, acts upstream of eyeless in the control of eye development*. *Molecular cell*, 1999. **3**(3): p. 297-307.
53. Quiring, R., et al., *Homology of the eyeless gene of Drosophila to the Small eye gene in mice and Aniridia in humans*. *Science*, 1994. **265**(5173): p. 785-789.
54. Halder, G., et al., *Eyeless initiates the expression of both sine oculis and eyes absent during Drosophila compound eye development*. *Development*, 1998. **125**(12): p. 2181-2191.
55. Hauck, B., W.J. Gehring, and U. Walldorf, *Functional analysis of an eye specific enhancer of the eyeless gene in Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999. **96**(2): p. 564-569.
56. Recillas-Targa, F., *Multiple strategies for gene transfer, expression, knockdown, and chromatin influence in mammalian cell lines and transgenic animals*. *Molecular biotechnology*, 2006. **34**(3): p. 337-354.
57. Kim, T.K. and J.H. Eberwine, *Mammalian cell transfection: the present and the future*. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2010. **397**(8): p. 3173-3178.
58. Wurm, F.M., *Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells*. *Nature biotechnology*, 2004. **22**(11): p. 1393-1398.
59. Tong, S., et al., *Engineered materials for in vivo delivery of genome-editing machinery*. *Nature Reviews Materials*, 2019. **4**(11): p. 726-737.
60. Wang, M., Z. Glass, and Q. Xu, *Non-viral delivery of genome-editing nucleases for gene therapy*. *Gene therapy*, 2017. **24**(3): p. 144-150.
61. Longo, P.A., et al., *Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (PEI)*, in *Methods in enzymology*. 2013, Elsevier. p. 227-240.

62. Sonawane, N., F.C. Szoka, and A. Verkman, *Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(45): p. 44826-44831.
63. Fajrial, A.K., et al., *A review of emerging physical transfection methods for CRISPR/Cas9-mediated gene editing*. Theranostics, 2020. **10**(12): p. 5532.
64. Neumann, E., et al., *Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields*. The EMBO journal, 1982. **1**(7): p. 841-845.
65. Pucihar, G., et al., *Equivalent pulse parameters for electroporation*. IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 2011. **58**(11): p. 3279-3288.
66. Mir, L.M., *Electroporation-based gene therapy: recent evolution in the mechanism description and technology developments*. Electroporation Protocols, 2014: p. 3-23.
67. Kandušer, M. and D. Miklavčič, *Electroporation in biological cell and tissue: an overview*. Electrotechnologies for extraction from food plants and biomaterials, 2009: p. 1-37.
68. Albors, A.R. and E.M. Tanaka, *High-efficiency electroporation of the spinal cord in larval axolotl*, in *Salamanders in Regeneration Research*. 2015, Springer. p. 115-125.
69. Hansen, J., et al., *Transplantation of prokaryotic two-component signaling pathways into mammalian cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014. **111**(44): p. 15705-15710.
70. Ede, C., et al., *Quantitative analyses of core promoters enable precise engineering of regulated gene expression in mammalian cells*. ACS synthetic biology, 2016. **5**(5): p. 395-404.
71. Sultan, I., et al., *Formulation of an efficient combinatorial cellulase cocktail by comparative analysis of Gibson assembly and NEBuilder HiFi DNA assembly modus operandi*. Int J Emerging Technol, 2020. **11**: p. 490-495.
72. Joven, A., A. Elewa, and A. Simon, *Model systems for regeneration: salamanders*. Development, 2019. **146**(14): p. dev167700.
73. Blanco, F.J., G. Rivas, and L. Serrano, *A short linear peptide that folds into a native stable β -hairpin in aqueous solution*. Nature structural biology, 1994. **1**(9): p. 584-590.

9. EKLER

EK 1: gBlok ve promotör dizilerinin adı ve sekansları. Altı çizili kısımlar homoloji uzantılarını, koyu gri bölgeler yapay YBTATA promotörünü, açık gri bölgeler enhansır sekanslarını ifade etmektedir.

gBlok adı	Sekans
Keratin YBTATA	5' <u>ctgcagacaaatggctctagaggtaccacaccacctgcacctcatataat</u> tttgaaaagc aacaattgtgcatttggatattgacttaaaaacagatgtcattatttatggcatcttcaagaaaa ccaaaaagcattgatcaaaactcttctagatcacagtgatattcctgttctctggaattgctagaatt attatataaattagaacaacaaagcaagaactgcttcttctgtgtcccacaggcacaagggga agcaataaattaaagagaaaaaaggggaaaagcaaacaggcagttgtcatgttcacaagtg ttacggggaagacgtctcataaaaggeacatctccctccaccctccattgtactgtacca aattgcctgaggcagtcaggaCgaagatgtatgttacatctgttgatcattgcatgtgggcg caacaagcaaggcaggtatacagacgagacaaaaaaaaatactaagaaggaaagatgg aattgcacaatgcaaaaagaaaacaacacgcacgggecctccactcaccagtataaaa gtgacatagtaaagtcacagttccatggTCTAGAGGGTATATAATGGGGGC CAAGaccggtgccaccatggactataaggaccag 3'
Ey YBTATA	5' <u>ctgcagacaaatggctctagaggtacc</u> ATACCCTTTTATTCTATGAGTAAC GGGTATAAGTATATGAACGTATAAGTATGTATGTACATGTATCTA TGTTTTCTGCTGCTCCGATGATTTTCTTTCCAATAAAGCGGTAA ATTGATACGGAGACTTTAGGATTTTATTTCTATAAGTCCAAATAC TCGGAAATTTGTATAAAACCCTTCCATTTTATGCTCGACCTGAG CGACGAGccatggTCTAGAGGGTATATAATGGGGGCCAAGaccggtg ccaccatggactataaggaccag 3'
HSE YBTATA	5' <u>ctgcagacaaatggctctagaggtaccactagtt</u> CTCgaGAAcgTTCcaGAAcaT TCgaGATcgTTCgcGAAaTTCgaGTGtcTTCgaGAAgaCTCtcGAAcgG TCggGAAtgTTCcgGAAcaTTCtcGAGcGCTAGCccatggTCTAGAGG GTATATAATGGGGGCCAAGaccggtgccaccatggactataaggaccag 3'
IRX YBTATA	5' <u>ctgcagacaaatggctctagaggtacc</u> TTGGTCTTAAAGTAACAGATACATT GAGCCCATCCTAGCAGAATAGACGGCTCATTATATCGCTCCC CCTGCCCCCGCCGAGATTACCCGGGTAAATACACGGAGCA GACTGCTTTGCTCAGCCACCGGCAGCGGCTGGCAGAAGGAGC GGCGCGTCCATCCCGCCTGAGCGCATCCGCGGGCGTTACACa caTGCCCCtCCACCCCCACACACGCACAGACACACGGTGGGGG TTACAGGTTAATGAAAACCCCCATCTCGCCCAGCGATTTGTTTT GTTTTCTGCAAAGTTCTGATAAGTAGCTAACCAACGAAGCTTG TAATTACAATCTTACAGAACCCGGCCCGATCTGTATATAAATCTC ACCATCCAATTACAAGATGTAATAATTTTGCCTCAGGCTGGTA ATGAGGTCTAATACTTGTGCATGTGATAATCCCCTCTGGATGGC GGCTTGATCAGATGTTGGCTTTGTAATTAGACTGGCAGAAAATC ATTATTTGATGTTCAAATAGAAAATGAGGTTGGTGGGAAGTTAAT TTCTCTACGCTCTGTGAAGCGTAGACAAGAATTTAATGATTTAAT TACAGTTGTAAGCTCTTTGCATGAGACTTAAATTGAGCTGCGAT TTTCGCTTCTTCTCCGAAGACGccatggTCTAGAGGGTATATAATG GGGGCCAAGaccggtgccaccatggactataaggaccag 3'
YBTATA	5' TCTAGAGGGTATATAATGGGGGCCAAG 3'

EK 2: GFP gRNA ve mCheery gBlok ve GFP gRNA ileri ve geri oligo dizilerinin adı ve sekansları.

<i>gBlok-oligo adı</i>	<i>Sekans</i>
Am_U6 GFP gRNA PciI BbsI	5'ctTTTGctggccttttgcacatgtctegaGGCTCACTCATCCAACATGGCGG GTGGCCTGCTCAGACTCAACACACCAGAGTTCCAATGAATTGCAG CACTGCACTTTATTTCGCCGCGCTCACGATTTTAGCAACTCCTCATG AGCAAACTATATACCATAGACATTGAAGACGGGTACAGTACAGC TAAGCTAGAGCTCCATAACCAGTCCCGGAGCGACACATGACTGAAT ATTTGCATACCCACAGTGCCTTTCGTTTTGAATTAATGATACGACT GTCGTGTACCGATACTTAATCTGTATTCTACCGCACGGCCCCGGG TTGTGAGAGTCTTGAGAATAATGGTGATGGCAGAGTTGAGATAAT CGGGTATGATTCCGTATTGAACTCACCCCTGAGTGTAAGGATGCCA CGTTTTGTGCATATATAGAGCTGAGCCCCGCTAGGGGCTTGGCC ACAAGTTCAGCGTGTcgttttagctagaatatagcaag 3'
mCheery EcorI	5'ccggccaggcaaaaaagaaaaaggaattcggcagtgaggagggcagaggaagtctgtaa catgcggtgacgtcgaggagaatcctggcccaGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATA ACATGGCCATCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGG AGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGG CGAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAG GTGACCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTC CCCTCAGTTCATGTACGGCTCCAAGGCTACGTGAAGCACCCCCG CCGACATCCCCGACTACTTGAAGCTGTCTTCCCCGAGGGCTTCA AGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGCGTGGTGAC CGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCGAGTTCATCTACA AGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCCGACGGCCCCGTA ATGCAGAAGAAAACAATGGGCTGGGAGGCCTCCTCCGAGCGGAT GTACCCCGAGGACGGCGCCCTGAAGGGCGAGATCAAGCAGAGG CTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCTGAGGTCAAGAC CACCTACAAGGCCAAGAAGCCCGTGCAGCTGCCCGGCGCCTACA ACGTCAACATCAAGTTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACTACA CCATCGTGGAACAGTACGAACGCGCCGAGGGCCGCCACTCCACC GGCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAGgaattctaactagctcgctgatca gcctcg 3'
GFP gRNA ileri (forward) oligo	/5'Fos/caccGGCCACAAGTTCAGCGTGTc 3'
GFP gRNA geri (reverse) oligo	/5'Fos/aaacGACACGCTGAACTTGTGGCC 3'

10. ETİK KURUL BELGESİ



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (İmü-Hadyek) Kararı

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
16/08/2021	44		Sven P. Vilain

"Axolotl'da koşullu mutagenез yöntemleri geliştirmek için transgenik yapıların oluşturulması ve optimizasyonu" başlıklı bilimsel araştırma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna "Oybirliği" ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 5 yıl

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ	
Üye	Doç. Dr. Sultan Sibel ERDEM	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Burak ÇAĞLAYAN	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Çağlar BEKER	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Neriman İpek KIRMIZI	
Üye	Uzm.Vet. Hek. Ekrem Musa ÖZDEMİR	
Üye	Cem GÜNEŞ	
Üye	Burak Sefa DERİBAŞ	