



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



FARE SPERMATOGONYAL KÖK HÜCRELERİNDE CRISPR/CAS9 İLE HEDEFLİ GENOM DÜZENLEME

Süheyla YEŞİLBOSTAN

**GENETİK ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. Bengi ÇINAR KUL

**ANKARA
2020**

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	x
Çizelgeler	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Spermatogonyal Kök Hücre	3
1.1.1. Testis Gelişimi ve Histolojisi	5
1.1.2. Spermatogenez	8
1.1.3. Spermatogonyal Kök Hücre İzolasyonu ve Kültürü	10
1.2. İnfertilite ile İlgili Tek Gen Defektleri	14
1.2.1. Testis Expressed Gene (Tex15)	16
1.3. Genom Düzenleme ve Kullanılan Metodlar	17
1.3.1. Çinko Parmak Nükleazlar (ZFN)	20
1.3.2. Transkripsiyon Aktivatör Benzeri Etkileyici Nükleazlar (TALEN)	22
1.3.3. CRISPR-Cas 9 Sistemi	24
1.3.3.1. TipII CRISPR-Cas9 Sistemleri ile Genom Düzenleme	31
1.3.3.2. CRISPR-Cas Sisteminin Etkinliğini Etkileyen Faktörler	33
1.3.3.3. Genom Düzenlemenin Ötesinde CRISPR Sistemi	44
2. GEREÇ VE YÖNTEM	47
2.1. Hücre Kültürü Çalışmaları	47
2.1.1. Subkültür Prosedürü	48
2.1.2. Dondurma Prosedürü	49
2.2. Antibiyotik Dozaj Optimizasyonu	50
2.3. Transformasyon	52
2.3.1. Plazmid Purifikasyon	56
2.3.2. Restriksiyon Enzimi ile Plazmid Doğrulama Testi	57
2.4. Transfeksiyon	57
2.5. CRISPR Aracılı Transfeksiyon Deneylerinin Doğrulanması	60
2.5.1. Hücreden DNA İzolasyonu	60
2.5.2. PCR Amplifikasyonu	61
2.5.3. Mutasyon Enzim Kesim Ürünlerinin Analizi	63
2.5.4. DNA Dizi Analizi	63
2.5.5. Hücrelerden Monoklon Hattı Oluşturulması	66
2.5.6. Knockout Başarısının Belirlenmesi	67
3. BULGULAR	68
3.1. Spermatogonyal Kök Hücre Kültürü Bulguları	68
3.2. Antibiyotik Doz Ayarlama Deneyi Bulguları	70
3.3. Transformasyon Bulguları	77

3.4. Transfeksiyon Deneylerine Ait Bulgular	80
3.5. Transfeksiyon Deneylerinin Doğrulanmasına Ait Bulgular	82
3.6. Monoklon Oluşturulmasına Ait Bulgular	91
3.7. Knock out Başarısının Belirlenmesine Ait Bulgular	94
4. TARTIŞMA	105
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	116
ÖZET	118
SUMMARY	119
KAYNAKLAR	120
ÖZGEÇMİŞ	137



ÖNSÖZ

Bilim insanlarının bir organizmadaki herhangi bir genomu düzenlemelerini sağlayan CRISPR teknolojisi, insanlık tarihinde icat edilen en güçlü genetik düzenleme aracı olarak düşünülebilir. Keşfinden bu yana birçok organizmada kusurlu genleri düzenlemek, hayvan modelleri oluşturmak, bakteri ve virüs enfeksiyonlarını kontrol etmek, genotip ve hücresel davranışlar arasındaki nedensel ilişkiyi ortaya koymakta yüksek verimlilikle kullanılmıştır. Genom düzenleme çalışmalarında, küçük vücut bütünlüğü, düşük bakım maliyeti, kısa üreme döngüsü ve kısa ömür nedeniyle kemirgen modelleri sıklıkla tercih edilmiştir. Spermatogonyal kök hücrelerinde (SKH) ilk olarak fare ve sıçan araştırmalarında kullanılan nükleaz aracılı genom düzenleme kavramı büyük çiftlik hayvanlarının SKH'lerinde nükleaz aracılı genom düzenleme için platform sağlamıştır. CRISPR-Cas9 sisteminin memeli genomunu düzenlemek için ilk uygulaması 2013 yılında bildirilmiştir (Cong ve ark., 2013). Spermatogonyal gelişim sürecinin birçok parakrin moleküler faktörün kontrolünde olması ve karmaşıklığı nedeniyle SKH genom düzenleme açısından uygulamanın zor olduğu bir hücre hattıdır. Bu çalışmada SKH hattında, fonksiyon kaybı infertilite ile ilişkilendirilmiş olan Testis-expressed 15 (Tex15) geninde CRISPR-Cas9 tekniği ile lipit aracılı transfeksiyon uygulaması yapılmış ve SKH'lerin diğer hücreler gibi kimyasal transfeksiyona dirençli olmadığı ortaya konulmuştur. Çalışmada kullanılan optimizasyon yöntemleri ile laboratuvarımızda hücre kültürü ve genom düzenleme çalışmalarına zemin hazırlanmıştır.

Doktora eğitimim boyunca benden bilgilerini ve hoşgörülerini esirgemeyen değerli hocalarım,

Prof.Dr. Okan ERTUĞRUL'a, tez danışman hocam Doç.Dr. Bengi ÇINAR KUL'a, jüri üyesi hocam Doç.Dr. Özge ÖZMEN'e, Dr. Öğretim Üyesi Nuket BİLGİN'e bana kattıkları her yeni bilgi için ayrı ayrı teşekkür ederim. Sizlerden çok şey öğrendim.

Tezimin her aşamasında bilgisini, hoşgörüsünü ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Doç.Dr. Bengi ÇINAR KUL'a, hücre kültürü çalışmalarındaki desteklerinden

dolayı Prof.Dr. Oğuz KUL’a, Dr. Öğretim Üyesi Ferda TOPAL ÇELİKKAN’a, ve Dr Öğretim Üyesi Nazlı ÇİL’e, ayrıca tez çalışmalarım sırasında bana laboratuvarlarını açarak destek olan Doç.Dr. Begüm YURDAKÖK DİKMEN ve Doç. Dr. Kaan MÜŞTAK hocalarıma ve sadece bu tez çalışmasında değil yıllardır hem bilimsel hem de yaşamsal öğretilerinden dolayı sevgili jüri üyesi hocam Doç.Dr. Sinan ÖZKAVUKCU’ya, teşekkür ederim. Jüri üyesi Prof.Dr. Bilal AKYÜZ ve Doç.Dr. Korhan ARSLAN hocalarıma da katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarım sırasında karşılaştığım zorlukları aşmada tecrübesi ve desteğiyle hep yanımda olan sevgili arkadaşlarım Arş.gör Mustafa Yenal AKKURT’a, Özge Şebnem ÇILDIR’a, en umutsuz olduğum anlarda motive edici güzel sözleriyle beni destekleyen Genetik Anabilim Dalı doktora öğrencilerine, Farmakoloji Anabilim Dalı doktora öğrencileri Recep UYAR ve Yağmur TURGUT’a, Mikrobiyoloji Anabilimdalı Dalı doktora öğrencisi Akın ÜNAL’a çok teşekkür ederim.

Çalışmam için gerekli ekipmanları hiçbir karşılık beklemeksizin sağlayarak tezime büyük katkısı olan TEK SERVİS şirketi yöneticileri ve Halil TAŞKIRAN’a teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince sabır göstererek, bana destek olan, sevgili BABA’ma, Anneme, Eşime, Kardeşime, evini bırakıp çocuklarımla ilgilenmek için şehir değiştiren Halama ve Enişteme, canım Tuğba Yelkovan’a ve sevgili Emine Arslan PAULİ’ye sonsuz teşekkür ederim

SİMGELER VE KISALTMALAR

A	Adenin Nükleotit
ABI	Applied Biosystems
ABM	Applied Biological Materials
ATCC	American Type Culture Collection
Adv	Adenoviral vektör
AVV	Adeno ilişkili viral vektör
bp	Baz Çifti
bFGF	Bazik fibroblast büyüme faktör
B2M	β 2-mikroglobulin
C°	Santigrad Derece(Centigrade)
C	Sitozin nükleotit
Cm²	Santimetrekare
Cas	CRISPR İlişkili Protein
CO₂	Karbondioksit
CCP	Hücreye nüfuz eden peptit
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductor receptor
CRISPR-Cas9	Düzenli Aralıkla Bölünmüş Kısa Palindromik Tekrar Kümeleri –Cas9
CRISPR-EZ	CRISPR Ribonükleoprotein Electroporasyon zigot
CRISPRa	CRISPR aktivasyon
CRISPRi	CRISPR interferans
cr RNA	CRISPR RNA
dCas9	Deaktive Cas9
DHH	Desert hedge hog
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSB	Çift zincir kırığı
dpc	Çiftleşme sonrası gün
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EGF	Epidermal büyüme faktörü
EKH	Embriyonik kök hücre
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FBS	Fetal Sığır Serumumu
FGF9	Fibroblast büyüme faktör 9
G	Guanin Nükleotit
GDNF	Gliya-kökenli nörotrofik faktör
GFRA1	GDNF-ailisi reseptör α -1
gRNA	Kılavuz RNA (Guide Ribonükleik asit)
HDR	Homoloji odaklı onarım
ICE	Inference of CRISPR Edits
Kb	Kilobaz çifti
KO	Knock out
LB	Luria-Bertani besiyeri

LIF	Lösemi inhibitör faktör
LV	Lentiviral vektör
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
mL	Mililitre
µM	Mikromolar
maGSCs	Multipotent erişkin germ hattı kök hücre
MIF	Müller-inhibe edici faktör
MMEJ	Mikrohomoloji aracılı son birleştirme
MTT	Metiltiazol difenil tetrazolyum
mRNA	Messenger RNA
ng	Nanogram
nM	Nanometre
NHEJ	Homolog olmayan uç birleştirme
NLS	Nükleer lokalizasyon sinyali
O₂	Oksijen
PAM	Protospacer adjacent motif
PBS	Posphate buffered saline
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PEI	Polietilenimin
PLL	Poli-L-lizin
RAG1	Rekombinasyon aktive edici gen 1
RNA	Ribonükleik asit
RNP	Ribonükleoprotein
RPM	Revolution per minute
SCOS	Sertoli cell only syndrome
sgRNA	Tek kılavuz RNA
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SKH	Spermatogonyal kök hücre
sn	Saniye
SRY	Y kromozomu üzerindeki cinsiyet belirleyici bölge
ssRNA	Tek zincirli RNA
T	Timin Nükleotit
TALEN	Transkripsiyon aktivatörü benzeri efektör nükleaz
TDF	Testis belirleyici faktör
Tex 15	Testis expressed 15 gene
THY-1	Thymus cell antigen 1, theta
tracrRNA	Trans Aktive Edici CRISPR RNA
w/v	Hacimde ağırlıkça yüzde
ZFN	Çinko parmak nükleaz

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	SKH'lerin kendini yenileme ve farklanmasını gösteren şematik diyagram	4
Şekil 1.2.	Testis ve seminifer epitel yapısı	7
Şekil 1.3.	İnsan spermatogonyal kök hücreleri ve spermatogenez.	9
Şekil 1.4.	Farede spermatogenez ve spermiogenezin aşamaları	10
Şekil 1.5.	DNA tamir mekanizmaları	18
Şekil 1.6.	Nükleaz temelli genom düzenleme	19
Şekil 1.7.	Genom düzenleme araçları	19
Şekil 1.8.	Çinko parmak proteini	21
Şekil 1.9.	Çift zincir DNA kesiği oluşumu	22
Şekil 1.10.	CRISPR lokusu	27
Şekil 1.11.	Sınıf 1 CRISPR-Cas sistemlerinin sınıflandırması ve izole edildikleri bakteriler	28
Şekil 1.12.	CRISPR-Cas 9 bileşenleri	32
Şekil 1.13.	PAM dizisi	34
Şekil 1.14.	CRISPR-Cas9 bileşenleri taşıma araçları	38
Şekil 2.1.	İkiye katlanma zamanını hesaplamada kullanılan denklem	49
Şekil 2.2.	Sitotoksosite hesaplama denklemi	51
Şekil 2.3.	All-in-One vektör set	52
Şekil 2.4.	<i>Tex15</i> geni 1 nolu ekzonda hedeflenen dizilerinin konumu	54
Şekil 2.5.	6 kuyucuklu plakta transfeksiyon uygulanan grupların yerleşimini gösteren şema	58
Şekil 2.6.	96 kuyucuklu plakta birinci ve ikinci dilüsyon serisi ile monoklon düşürme	66
Şekil 3.1.	Hücre hattı 1.gün flask tabanını kaplayan spermatogonyal kök hücreler.	68
Şekil 3.2.	Hücre hattı 7.gün flask tabanını kaplayan spermatogonyal kök hücreler	68
Şekil 3.3.	Spermatogonyal kök hücrelerin sitolojik değerlendirmesi	69

Şekil 3.4.	Makler kamara hücre sayım örneklemesi	69
Şekil 3.5.	96 kuyucuklu plak MTT testi sonrası renk değişimi	70
Şekil 3.6.	Altı kuyucuklu plakta MTT test sonrası renk değişimi	71
Şekil 3.7.	5µg/ml dozundan başlanıp azaltılarak uygulanan puromisinin 24 saatlik ve 48 saatlik MTT verileri	71
Şekil 3.8.	2µg/ ml dozundan başlanıp azaltılarak uygulanan puromisinin 24 saatlik ve 48 saatlik MTT verileri	72
Şekil 3.9.	24 saat ve 48 saatlik puromisin uygulamasında sitotoksosite ortalamalarını gösteren grafik	73
Şekil 3.10.	Kontrol hücre grubu.	73
Şekil 3.11.	1 µg/ml puromisinin 48 saat zaman diliminde etkisi.	74
Şekil 3.12.	1.25 µg/ml puromisinin 48 saat zaman diliminde etkisi.	74
Şekil 3.13.	1.5 µg/ml puromisinin 48 saat zaman diliminde etkisi.	75
Şekil 3.14.	1.8 µg/ml puromisinin 48 saat zaman diliminde etkisi.	75
Şekil 3.15.	2 µg/ml puromisinin 48 saat zaman diliminde etkisi.	76
Şekil 3.16.	2,5 µg/ml puromisinin 48 saat zaman diliminde etkisi.	76
Şekil 3.17.	Transformasyon kontrol plak görüntüsü	77
Şekil 3.18.	1,5 dakika transformasyon sonrası zayıf bakteri üremesi	78
Şekil 3.19.	1.5 dakika ısı şoku ile yapılan transformasyon enzim kesim bantları	79
Şekil 3.20.	Hedef 1, Hedef 2, Hedef 3, scrambled ve negatif kontrol plazmidlerini içine alan DH5 alfa suşu görüntüsü	79
Şekil 3.21.	2 dakika ısı şoku ile yapılan transformasyon sonrası Mutasyon enzim kesim analizi DNA enzim kesim bantları	80
Şekil 3.22.	1:3.5 oranında DNAfectin ile 8 saat transfeksiyon yapılan hücreler	81
Şekil 3.23.	1:3.5 oranında DNAfectin ile transfeksiyon yapılan hücrelere 2µg/ml puromisinin 48 saat uygulanması sonrası puromisine direnç gösteren hücreler.	81
Şekil 3.24.	Puromisin uygulaması sonrası 12. günde hücre çoğalması	82
Şekil 3.25.	Her bir hedef bölge için gradient PCR sonuçlarına ait %1'lik agaroz jel görüntüsü	83
Şekil 3.26.	Optimum sıcaklık olarak belirlenen 60°C bağlanma sıcaklığı uygulanan PCR ürünlerine ait %1'lik agaroz jel görüntüsü	83

Şekil 3.27.	1:10 oranında DNA-DNAfectin ile transfeksiyon sonrası reannealing PCR ürünlerinin Detection enzim kesimi sonrası %1'lik agaroz jel görüntüsü.	85
Şekil 3.28.	1:7.5 DNA-DNAfectin oranı ile transfeksiyon sonrası reannealing PCR ürünlerinin Detection enzim kesimi sonrası %1'lik agaroz jel görüntüsü.	85
Şekil 3.29.	Yabancı tip hücreden elde edilen DNA'larda <i>Tex15</i> geni 1. ekzondaki Hedef 1, 2 ve 3. bölgelere ait DNA dizi analizi sonuçları..	86
Şekil 3.30.	DNAfectin ile transfeksiyon sonrası <i>Tex15</i> geni 1. ekzondaki Hedef 1 bölgesi dizi analizi sonuçları.	87
Şekil 3.31.	1:3.5 oranında DNA:DNAfectin ile transfeksiyon 1. ve 2.grup PCR ürünlerine ait %1'lik agaroz jel görüntüsü	88
Şekil 3.32.	Hedef 1 bölgesi için farklı hücre yoğunlukları içeren 1 ve 2. grup hücre serilerinde 7µl DNAfectin ile transfeksiyon sonrası DNA dizi analizi sonuçları	89
Şekil 3.33.	1:2.5 (5 µl) ve 1:1 (2 µl) Hedef 1 PCR ürünlerine ait %1'lik agaroz jel görüntüsü.	90
Şekil 3.34.	1:2.5(5µl) oranında hedef 1 bölgesi transfeksiyon dizi analizi sonuçları.	90
Şekil 3.35.	1:1 (2µl) oranında Hedef 1 bölgesi transfeksiyon dizi analizi sonuçları.	91
Şekil 3.36.	Dilüsyon yöntemiyle monoklon hücre düşürülmesi	92
Şekil 3.37.	Monoklon hücre hattının 15. Günü.	92
Şekil 3.38.	Monoklon hattı Hedef 1 PCR ürünlerine ait %1'lik agaroz jel görüntüsü.	93
Şekil 3.39.	Monoklon hücre hattı hedef transfeksiyon dizi analizi sonuçları.	94
Şekil 3.40.	7µl (A) ve 10µl (B) Hedef 1 bölgesi DNA dizi analiz sonuçlarının ICE algoritması ile değerlendirilmesi	95
Şekil 3.41.	7µl (A) ve 10µl (B) DNAfectin ile Hedef 1 bölgesi transfeksiyonu sonrası DNA dizi analizi sekansları göreceli dağılımları ve olası indel pozisyonları	96

Şekil 3.42.	7µl (A) ve 10µl (B) DNAfectin ile Hedef 1 bölgesi transfeksiyonu sonrası DNA dizi analiz sonuçlarında ICE algoritması tarafından belirlenen indellerin yaygınlığı.	97
Şekil 3.43.	7µl 1.grup (A) ve 7µl 2.grup (B) hedef 1 bölgesi DNA dizi analiz sonuçlarının ICE algoritması ile değerlendirilmesi.	98
Şekil 3.44.	7µl 1.grup (A) ve 7µl 2.grup (B) hedef 1 bölgesi DNA dizi analiz sonuçlarının ICE algoritması tarafından belirlenen indellerin yaygınlığı.	99
Şekil 3.45.	7µl 1.grup (A) ve 7µl 2.grup (B) hedef 1 bölgesi DNA dizi analizi sekansları göreceli dağılımları ve olası indel pozisyonları.	100
Şekil 3.46.	7µl DNAfectin monoklon hücre hattı hedef 1 bölgesi DNA dizi analiz sonuçlarının ICE algoritması ile değerlendirilmesi.	101
Şekil 3.47.	7µl DNAfectin monoklon hücre hattı hedef 1 bölgesi DNA dizi analiz sonuçlarında ICE algoritması tarafından belirlenen indellerin yaygınlığı.	102
Şekil 3.48.	7µl DNAfectin monoklon hücre hattı hedef 1 bölgesi DNA dizi analiz sonuçlarının ICE algoritması ile değerlendirilmesi	103
Şekil 3.49.	ICE algoritmasında değerlendirilen tüm transfeksiyon yüzdelerinin karşılaştırılması	104

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1.	Cas nükleazların farklı tür ve alt tiplerinden PAM dizileri	32
Çizelge 1.2.	CRISPR taşıma sistemlerinin karşılaştırılması	44
Çizelge 2.1.	96 kuyucuklu plakta uygulanan antibiyotik dozları	51
Çizelge 2.2.	<i>Tex15</i> geni 1 nolu ekzondan seçilen hedef bölgeler	53
Çizelge 2.3.	Transfeksiyonda kullanılacak DNA konsantrasyonu ve DNAfectin miktarlarının optimizasyonunda kullanılan oranlar ve uygulama dozları DNA(μ g):DNAfectin(μ l) oranları	58
Çizelge 2.4.	PCR amplikasyonu için bileşen miktarları	61
Çizelge 2.5.	Hedef bölgelere özgü primer dizileri ve özellikleri	61
Çizelge 2.6.	PCR amplifikasyon döngü ayarları	62
Çizelge 2.7.	Mutasyon enzim kesim testi bileşen oranları	62
Çizelge 2.8.	PCR re-annealing döngü ayarları	62
Çizelge 2.9.	Sekans PCR döngü ayarları	65
Çizelge 3.1.	Spermatogonyal Hücre Hattı Konflüens süreleri	70
Çizelge 3.2.	24 saat ve 48 saatlik puromisin uygulamasında sitotoksosite ortalamaları	72
Çizelge 3.3.	Transfekte hücre MTT test bulguları	77
Çizelge 3.4.	1.5 dakika ısı şoku ile transformasyon sonrası Plazmid DNA saflık kontrolleri ve miktar sonuçları	78
Çizelge 3.5.	Transformasyon sonrası Plazmid DNA saflık kontrolleri ve miktar sonuçları	80
Çizelge 3.6.	Farklı DNA:DNAfectin oranlarında yapılan transfeksiyon deneyleri sonrasında elde edilen DNA saflık ve miktar sonuçları	82
Çizelge 3.7.	Hedef 1 bölgesi için 1:3.5 (7 μ l) oranında DNAfectin ile farklı yoğunluklarda hücre serileri kullanılarak elde edilen 1. ve 2. grup transfeksiyon sonrası hücre DNA saflık kontrolleri ve miktar sonuçları.	88

Çizelge 3.8.	1:2.5 (5 µl) ve 1:1 (2 µl) DNA:DNAfectin oranları ile Transfeksiyon sonrası hücre DNA saflık kontrolleri ve miktar sonuçları	90
Çizelge 3.9.	Flow sitometri 100 µl'deki hücre sayım sonuçları	91
Çizelge 3.10.	Monoklon hücre hattına ait DNA saflık ve miktar kontrolü	93



1. GİRİŞ

Son yıllarda biyoteknoloji alanında gerçekleşen çığır açıcı gelişmelerle gen hedeflemenin ve hatta kişiselleştirilmiş tedavi uygulamalarının önü açılmıştır. Bu gelişmelerden birisi de genomda istenilen diziyi özgün olarak kesen nükleazların kullanıldığı, gen hedeflemeye yönelik yaklaşımlardır. Düzenli Aralıkla Bölünmüş Kısa Palindromik Tekrar Kümeleri (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, CRISPR) ve CRISPR ilişkili protein-9 (CRISPR associated protein 9, Cas9) gibi sekansa özgü endonükleaz kullanan “CRISPR-Cas9” metodu yeni genom modifikasyon yöntemlerinden birisidir. CRISPR-Cas9 çeşitli hücre tipleri ve organizmalarda biyolojik süreçlerin incelenmesi için, baz ekleme, baz çıkarma ve baz değişimlerine olanak verdiğinden, hedeflenmiş genomik mutasyonların üretilmesinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Çinko parmak nükleaz (Zinc Finger Nükleaz, ZFN) ve Transkripsiyon Aktivatörü Benzeri Efektör Nükleaz (TALEN) gibi önceki genom düzenleme araçlarının aksine, CRISPR-Cas9 düzenleme sistemi protein tasarımına dayanmamaktadır. CRISPR sistemi ilgilenilen geni hedeflemek için tasarlanmış bir endonükleaz ve tasarlanmış tek bir kılavuz RNA (single guide RNA, sgRNA) gerektirmektedir. DNA üzerinde kesim yapılabilmesi için hedef DNA sekansının PAM olarak adlandırılan “NGG” dizisinin bulunduğu bölgeye bitişik olması gereklidir. Bir sgRNA tarafından yönlendirilen Cas9, hedef bölgeye yerleşerek çift sarmallı kırık oluşturur. Hücre, oluşan bu kırığı DNA tamir mekanizmalarından homolog rekombinasyonu (homolog recombination, HR) ya da homolog olmayan uçların birleşmesini (Non-homologous end joining, NHEJ) kullanarak tamir eder. Kullanılan tamir mekanizmasına bağlı olarak genomda farklı modifikasyonlar meydana gelir. CRISPR-Cas9 aracılı genom düzenleme kılavuz RNA tasarımının kolaylığı, nispeten düşük uygulama maliyeti olması, birden fazla genin aynı anda ve sistematik bir şekilde düzenlenebilir olmasıyla, genom düzenleme araştırmaları için son yıllarda daha fazla tercih edilmektedir.

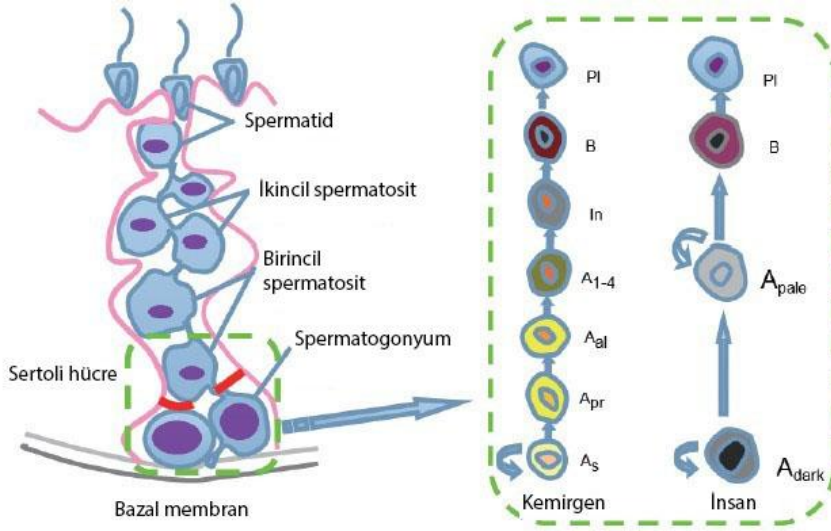
Mevcut literatürde CRISPR-Cas9'un spermatogonyal kök hücrelere (SKH) uygulanmaları, spermatogenez ve spermatogenetik başarısızlığın genetik mekanizmasının ortaya çıkarılmasında etkili birer yöntem olabileceği bildirilmiştir (Chapman ve ark., 2015; Wang ve ark., 2017). Ancak bu konuda çok az çalışma bulunmaktadır. Spermatogeneizde rol alan genetik mekanizmalar hala tam olarak bilinmemekte her geçen gün infertilite ilişkili yeni genler tanımlanmaktadır. Örneğin, Testis-expressed 15 (*Tex15*), kromozomal sinaps ve mayotik rekombinasyon için gerekli bir protein olarak tanımlanmıştır. *Tex15* genindeki fonksiyon kaybı erkeklerde erken mayotik arreste neden olurken, dişilerde bu etki görülmemiş ve bu gende meydana gelen mutasyonlar infertilite ile ilişkilendirilmiştir (Yang ve ark., 2008).

Bu araştırmada spermatogeneizde etkili olan *Tex15* geninin spermatogonyal hücrelerde CRISPR-Cas9 sistemi kullanılarak susturulması amaçlanmıştır. Böylece, *Tex 15* mutasyonu ilişkili erkek infertilite modeli CRISPR-Cas9 yöntemi kullanılarak in vitro şartlarda taklit edilmeye çalışılacaktır. CRISPR-Cas9 yöntemiyle spermatogonyal kök hücrelerde bu genin susturulması metodolojisinin uygulanmasıyla, ileride farklı türlerde farklı mutasyonların benzer şekilde oluşturulması ya da mutasyonların geri döndürülmesi mümkün olabilecektir.

1.1. Spermatogonyal Kök Hücre

Kök hücreler, işlevsel olarak farklılaşmamış, kendini yenileme, farklı hücrelere farklılaşma yetkinliği (potensi) ve klon oluşturma yeteneğine (klonalite) sahip hücrelerdir. Bu özellikler embriyonik kök hücreler (EKH), fetal ve bazı yetişkin kök hücrelerinde görülse de organizmada sınırlı sayıda kendini yenileme yeteneğine sahip olmayan ancak farklılaşabilen hücreler de bulunmaktadır. Erkeklerde spermatozoonların öncüsü olan spermatogoniumları oluşturacak primordiyal germ hücreleri pluripotent özelliktedir (Can, 2008).

Spermatogonyal kök hücreler (SKH), testisdeki erişkin kök hücre popülasyonudur. Bu hücreler, kendini yenileme ve spermatozoonun öncül hücrelerine farklılaşma yeteneğine sahiptirler (Şekil 1.1) ve spermatogenezin esasını oluştururlar. Postnatal dönemde ortaya çıkan bu hücreler hayat boyu devamlılığını sürdürmektedir (Can, 2014). SKH'lerin öncülleri olan primordiyal germ hücreleri, yolk kesesi endoderminden farklılaşarak insanlarda embriyonal dönemin 6. haftasında, farelerde ise çiftleşme sonrası 12. günde (day post coitum, dpc) gonadal kabartılara yerleşirler. Doğumdan önce mitozla çoğalarak gonosit adını alan bu primordiyal germ hücreleri, doğumdan sonra ise yaşamlarını SKH olarak sürdürür. Gonositlerin SKH'lere dönüşümü erkek farelerde postnatal 0 – 6 günler arasında gerçekleşir ve bu hücreler ilk biyolojik aktivitelerine yaklaşık postnatal 3.- 4 günler arasında başlamaktadırlar. İnsan ve diğer primatlarda bu süreç yıllarla ifade edilmektedir (Can, 2014; Chen ve ark., 2015; Dym ve ark., 2009).



Şekil 1.1. SKH'lerin kendini yenileme ve farklılaşmasını gösteren şematik diyagram: Adark(A_d) spermatogonyumların mitotik bölünmesiyle başlar. A_d spermatogonyumların bölünmesiyle sitoplazmik köprüler aracılığı ile birbiriyle bağlantılı A_{pale} spermatogonyumlar ve bu hücrelerin mitotik bölünmeleri ile de tip B spermatogonyumlar meydana gelir.(Chen ve ark., 2015).

Yetişkin testiste SKH'lerin yenilenmesi ve farklılaşması, spermatogenez ve fertilitenin sürdürülmesini düzenler (Dadoue, 2007). SKH'lerin yenilenme ve farklılaşmaları ise gen ekspresyonları ile intrinsik ve “niş” adı verilen mikro çevreden gelen sinyaller ile ekstrinsik olarak kontrol edilir (Can, 2014). Seminifer epitelin bazal kompartmanı SKH'ler için özelleşmiş bir mikro çevre olup SKH nişi adını alır. Memeli testisinde Sertoli hücreleri, Leydig hücreleri ve peritübüler miyoid hücreler SKH nişinin bileşenlerini oluşturur. Sertoli hücresi germ hücrelerinin beslenmesi, fiziksel destek ve spermatogenezle ilgili sinyallerin iletiminin yanı sıra gliya-kökenli nörotrofik faktörü (GDNF), epidermal büyüme faktörü (EGF) ve bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF) salgılayarak in vitro SKH yenilenmesinde rol oynar. Leydig hücresi testosteron üretimi ile spermatogenezin sürdürülmesini uyarırken, peritübüler miyoid hücreler ile birlikte kan dolaşımıyla gelen maddelerin spermatogonik hücrelere geçişinin kontrolünü sağlar. Doğru fonksiyon gösteren bir niş ortamı olmadan spermatozoon ve dolayısıyla fertilizasyon sağlanamamaktadır. Tüm bu mekanizmalar, SKH'lerin hayatta kalmaları ve fonksiyonlarını devam ettirebilmeleri açısından kritik rol oynamaktadır (Can, 2014; Dadoue, 2007; De Rooij, 2009; Kostereva ve Hofmann, 2008; Oatley ve ark., 2011).

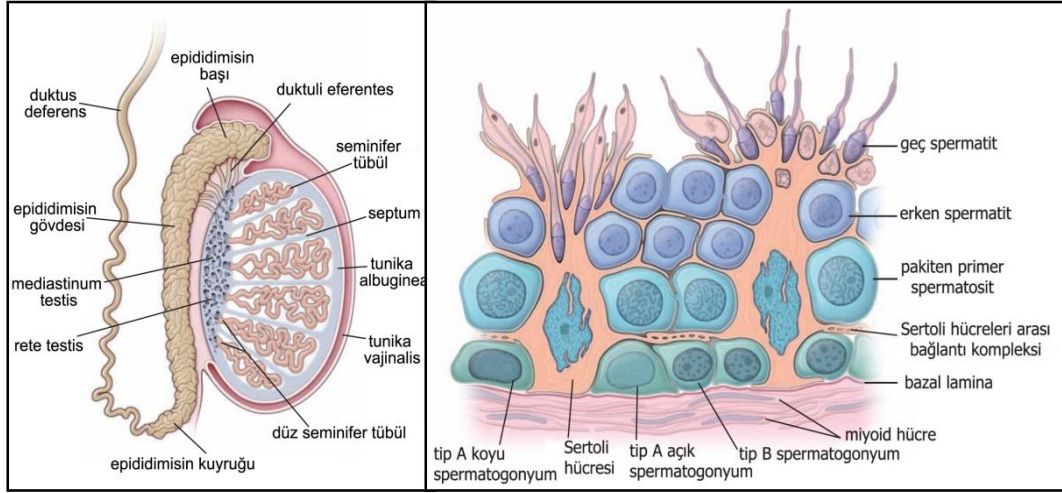
1.1.1. Testis Gelişimi ve Histolojisi

Genital sistemi oluşturan gonadlar, primitif cinsiyet bezleri, genital kanallar ve dış genital organlar farklılaşmamış bir dönemden geçtikten sonra erkek veya dişi yönüne doğru gelişirler. İnsanlarda embriyonel dönemin 7. haftasına kadar geçen farklılaşma dönemi sonunda, gonadlar erkek veya dişi yapısal özelliklerini kazanırlar (Sadler, 2011). Y kromozomunun kısa kolu üzerinde bulunan cinsiyet belirleyici bölge (Sex-Determining region on Y chromosome, SRY geni), cinsiyetin erkek yönünde devam etmesini sağlayan, Testis belirleyici faktör (Testis Determining Factor, TDF) proteinini sentezler (Dudek, 2014; Sadler, 2011). SRY'nin varlığı, SRY-boxcontaining gene 9 (SOX9) ekspresyonunu başlatır ve SOX9 ekspresyonuyla birlikte Fibroblast Growth Factor 9 (FGF9) ve prostoglandin D2 gibi diğer faktörlerin ekspresyonları uyarılır. Bu faktörlerin birlikte “ileri besleme döngülerine (feed-forward loops)” gitmesiyle Sertoli hücrelerinin farklılaşması uyarılır (O'Shaughnessy ve Fowler, 2011). Sertoli hücreleri sölomik epitelyumdaki öncüllerinden meydana gelir. Gelişmekte olan gonadlara göç ederek primordiyal germ hücrelerinin aralarına yerleşir. Bu süreçte mezonefrik endotelyal hücreler de gelişmekte olan gonadlarda primitif cinsiyet kordonlarını oluşturmak üzere, Sertoli hücreleri ve primordiyal germ hücrelerinin oluşturdukları hücre kümelerine yakın konuma göç ederler (Cool ve ark., 2008). İnsanlarda gelişimin 7-8. haftalarında, farelerde 12,5 dpc'de primitif cinsiyet kordonları gelişir. Kordonlar arasındaki intersitisyel alandaki mezenkimal-benzeri kök hücrelerden Leydig hücreleri farklılaşmaya başlar (O'Shaughnessy ve ark., 2009; Ostrer ve ark., 2007). Fötal Leydig hücrelerinin farklılaşması, Sertoli hücreleri tarafından sentezlenen Desert Hedge Hog (DHH) ile düzenlenir. İnsanlarda gelişimin 8. haftasında, farelerde yaklaşık olarak 13 dpc'de peritübüler miyoid hücrelerinin gelişmesiyle birlikte temel yapısını kazanan testis, fötüsün maskülenizasyonu (erkeksileşmesi) için gerekli hormon sentezinin hızlı bir şekilde başlatarak genital kanal ve dış genital organların gelişiminde rol oynar (O'Shaughnessy ve Fowler, 2011).

Farklılaşmamış dönemi geride bırakan embriyonda SRY geninin eksprese ettiği TDF'nin etkisiyle primitif cinsiyet kordonları proliferasyona devam ederek

medullanın derinliklerine doğru ilerleyerek testis (meduller) kordonlarını oluştururlar. Testis Organının hilusuna doğru ağ şeklindeki hücre dizilerine dönüşen kordonlar, ilerleyen dönemde rete testisi meydana getirirler. Gelişimin ileri evrelerinde testis kordonları, kalın fibröz bağ dokusu yapısındaki tunika albuginea ile yüzey epitelinden ayrılırlar (Dudek, 2014; Sadler, 2011). İlerleyen dönemlerde at nalı şeklini alan testis kordonlarının açık uçları rete testisle devam eder. Testis kordonları bu dönemde primordiyal germ hücreleri ve Müller-İnhibe edici Faktör (Mullerian inhibiting factor, MIF) salgılayan Sertoli hücrelerinden meydana gelir. Bu aşamadan puberteye kadar birbirlerine bağlı kordonlar şeklinde düzenlenen testis kordonlarının lümenleri puberteyle birlikte açılır. Bu yapılar seminifer tübüllere dönüşürler. Kanalize olan seminifer tübüller, duktuli eferentese açılan rete testis tübülleriyle birleşirler. Böylece rete testis ile daha sonra duktus deferense dönüşecek mezonefrik kanalı birbirine bağlarlar (Sadler, 2011).

Erkek üreme sistemi, birincil cinsiyet organı olan ve hem ekzokrin hem de endokrin işlevleri bulunan bir çift testis ile genital boşaltım kanalları, aksesuar cinsiyet bezleri ve penisten oluşmaktadır. Testisler skrotumun içinde, vücut boşluğunun dışında asılı durumda yer almaktadır. Her bir testis fibro elastik bağ dokusundan oluşmuş tunika albuginea adı verilen kalın bir kapsülle çevrilidir. Testisin arka kenarında kapsülün kalın bir katlanma şeklinde içe doğru katlanmasıyla oluşan mediastinumdan ışınal olarak uzanan septumlar ile her bir testis yaklaşık 250 lobüle bölünür. Her bir lobülde, 1-4 kıvrıntılı seminifer tübül (tübüli seminiferi kontorti) ve Leydig hücrelerini içeren bağ dokusu yapısındaki stroma bulunur (Şekil 1.2) (Gartner, 2014; Ross, 2006).



Şekil 1.2. Testis ve seminifer epitel yapısı (Gartner, 2014; Ross, 2006)

Her bir seminifer tübül 30-50 cm uzunluğunda ve 150-250 μ m çapındadır. Seminifer tübüller, 3-5 tabaka miyoid hücre ve kollajen fibrillerden oluşan tunika (lamina) propria (peritübüler doku) tarafından çevrelenmiş Sertoli hücreleri ve spermatogenik hücreleri içeren seminifer epitelden oluşur (Ross ve Pawlina, 2006). Seminifer epitel, bazal membran ile lümen arasına yerleşmiş 4-8 kat spermatogenik hücreler ile bu hücreler arasında bulunan, spermatogenez ve spermiyogenezin farklı evrelerindeki germ hücrelerine desteklik sağlayan Sertoli hücrelerinden oluşur (Gartner, 2014; Ross, 2006).

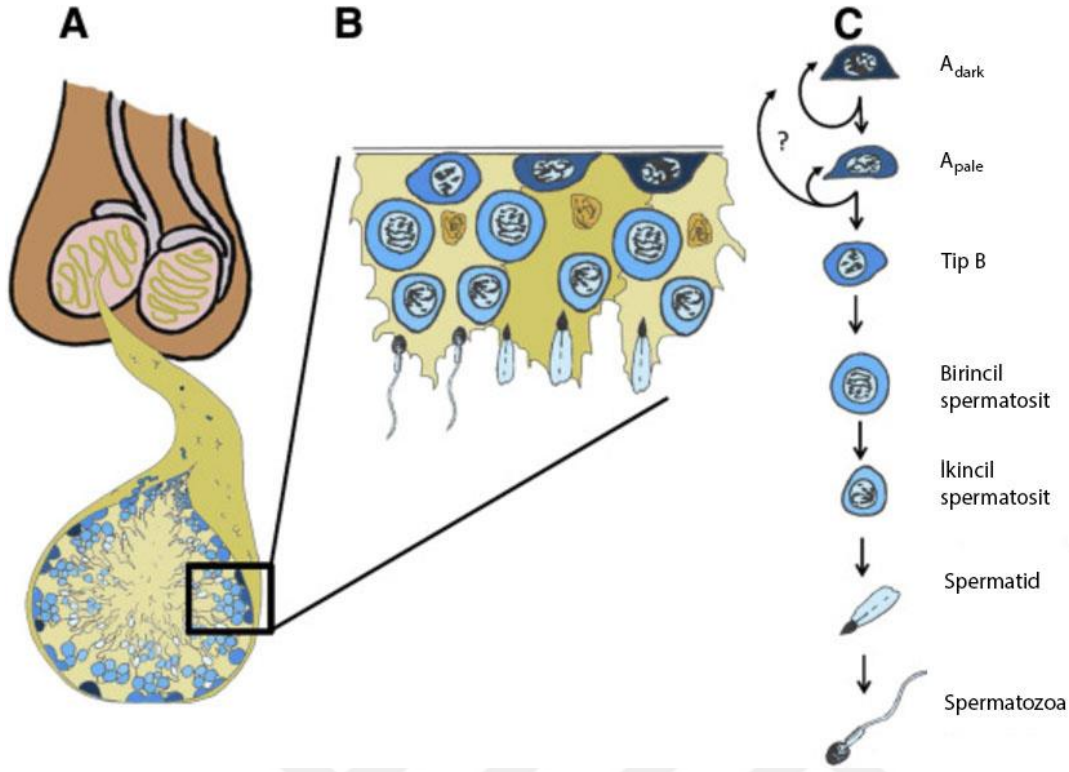
Spermatogenik hücreler, testisin erken gelişim evresinde yolk kesesinden köken alarak gonadal kabartılarda kolonize olan primordiyal germ hücrelerinden gelişirler. Düzenli olarak spermatogenezis ile çoğalıp olgun sperme farklılaşırlar. Fötal dönemde primordiyal germ hücreleri, erkekte doğum sonrasındaki sessiz döneme girmeden önce kısa bir süre için mitozla çoğalarak prospermatogonyum (gonosit) adını alır. Bu hücreler puberteye kadar inaktif kalır. Doğumdan sonra mitozla çoğalmayı durduran primitif germ hücreleri yaşamlarını spermatogonyal kök hücreler (SKH) olarak sürdürür (Can, 2014). Spermatogonyal Kök Hücreler, pubertede bölünerek iki farklı hücre oluşturur. Bir hücre spermatogenik döngüyü başlatırken diğer hücre kök hücre olarak kalır. Spermatogonyum, spermatosit ve spermatidler bölünme ve farklılaşma evrelerini birbirinin ardından tamamlar. Spermatogenik hücreler komşu Sertoli hücrelerinin arasında belirgin olmayan

tabakalar halinde gelişim sergilerler. Spermatogonyum olarak adlandırılan bu olgunlaşmamış hücreler bazal laminanın üzerinde uzanırlar. Spermatid olarak adlandırılan en olgun hücreler ise Sertoli hücresinin apikal bölgesine tutunarak tübül lümeninin sınırını oluştururlar. Spermatogenik hücreler spermiyasyona kadar sitoplazmik köprüler aracılığıyla birbirlerine bağlı kalırlar, bu hücreler kümeler halinde ve senkronize bir şekilde bölünür ve farklılaşırlar(Gartner, 2014; Ross, 2006)

1.1.2. Spermatogenez

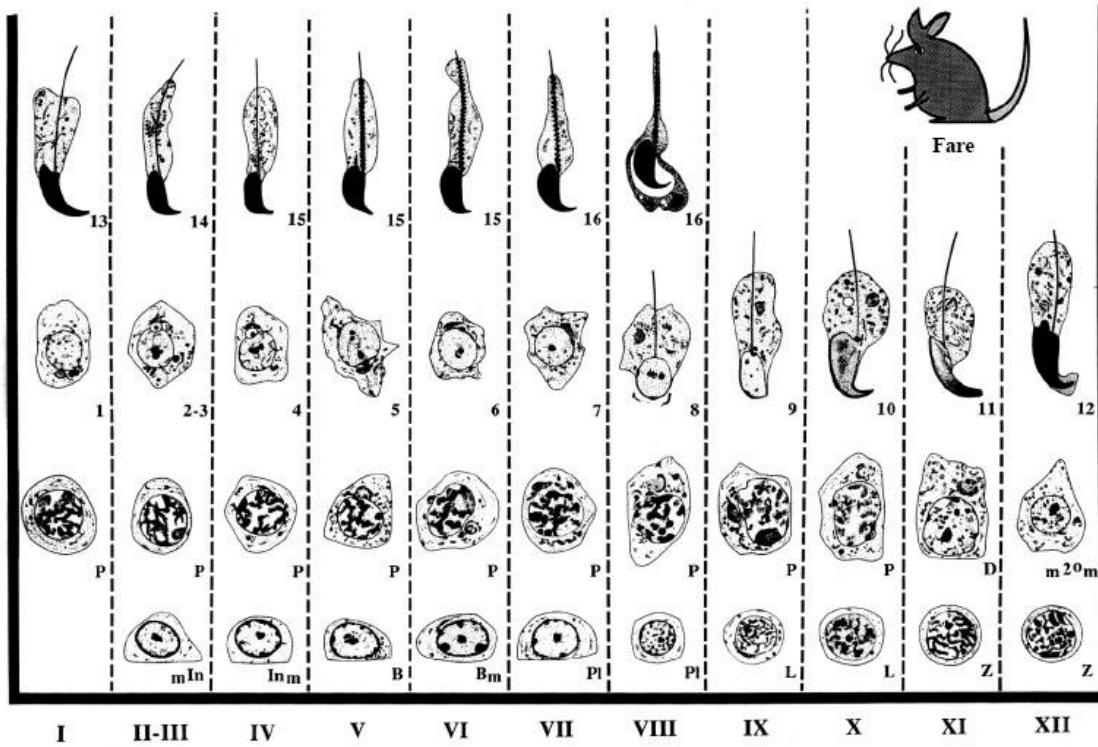
Spermatogonyumların spermatozoonlara dönüşme süreci spermatogenez olarak adlandırılır ve bu süreç üç aşamada meydana gelir: spermatogonyal faz (spermatositogenez), spermatosit fazı (mayoz) ve spermatid fazı (spermiyogenez). Spermatogenez aşamasındaki süreçler türler arasında farklılıklar göstermektedir.

İnsan testisinde, fetal hayatta inaktif durumda olan spermatogonyal öncül hücreler puberteyle birlikte mitotik bölünmelerle sayılarını arttırmaktadırlar. Spermatogenez, bazal membranda yerleşim gösteren ve spermatogenik hücrelerin kök hücre rezervini gören tip A dark (A_d) spermatogonyumların mitotik bölünmesiyle başlar. A_d spermatogonyumların bölünmesiyle sitoplazmik köprüler aracılığı ile birbirleriyle bağlantı A pale (A_p) spermatogonyumlar ve bu hücrelerin mitotik bölünmeleri ile de B spermatogonyumlar meydana gelir. B spermatogonyumların mitotik bölünmeleriyle spermatositogenez aşaması tamamlanır ve primer spermatositler oluşur. Spermatosit fazında primer spermatositlerin birinci mayotik bölünmeleri ile sekonder spermatositler oluşur. Bu hücrelerin ikinci mayotik bölünmeleri sonucunda haploid sayıda kromozom içeren spermatidler meydana gelir. Son aşama olan spermiyogenezde ise spermatidler akrozom oluşumu, çekirdeğin kondanase olması, boyun, orta parça ve kuyruk oluşumu ve fazla sitoplazmanın atılması sonrasında olgun spermatozoonlara farklılaşırlar (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. İnsan spermatogonyal kök hücreleri ve spermatogenez. (A) Spermatogenez, testisin seminifer tübüllerinin içinde meydana gelir. (B) Seminifer tübülün taban zarının kesilmesi. (B ve C) Seminifer epitelyumun bazal membranı farklılaşmamış (Adark ve Apale) spermatogonia ve farklılaştırıcı tip B spermatogoniayı içerir. B tipi spermatogonia mayoz bölünen ve bazal membrandan göç eden primer spermatositlere yol açar. Sonraki mayotik bölünmeler ve spermiogenez, seminifer tübüllerin lümenine salınan ikincil spermatositlere, spermatitlere ve terminal olarak farklılaşmış spermatozoa'ya neden olur (Gassei ve Orwig, 2016).

Kemirgenlerde seminifer tübül bazal membranında yerleşik tek hücreler olan SKH'ler A single (A_s) spermatogonyum olarak adlandırılır ve düzenli olarak mitotik bölünme geçirirler. Bu hücreler bölünerek hem kendini yenileme ve kök hücre havuzunun sürdürülmesini sağlar hem de farklılaşma yoluna girerek A paired (A_{pr}) spermatogonyumları üretirler. A_{pr} spermatogonyumların sonradan mitotik bölünme ile klonal olarak genişlemesiyle, sitoplazmik köprüler aracılığı ile birbirleriyle bağlantılı 4, 8, 16 ve 32 A aligned (A_{al}) spermatogonyumlar oluşur. A_{al} spermatogonyumlar bölünme olmaksızın A1 spermatogonyumlara farklılaşarak ardışık bölünmeler ile A2, A3, A4, Intermediate ve B spermatogonyumlara farklılaşırlar. B spermatogonyumlar son bir mitotik bölünme ile primer spermatositleri meydana getirirler (Şekil 1.4) (Ahmed ve de Rooij, 2009; Jan ve ark., 2012).



Şekil 1.4. Farede spermatogenez ve spermiogenezin aşamaları: Romen rakamları tarafından belirtilen dikey sütunlar hücre ilişkilendirme aşamalarını gösterir. Arapça rakamlar spermiogenezin adımlarını göstermektedir. Sembollerle gösterilen hücre gelişiminin spesifik fazları şunlardır: mitozda tip A spermatogonia (m^m), ara faz spermatogonia ($1n_m$), tip B spermatogonia (B), mitozda tip B spermatogonia (B_m), preleptoten spermatosit (PI), leptoten spermatosit (L), zigoten spermatosit (Z), pakiten mayozda spermatosit (P), diptoten spermatosit (D) ve sekonder spermatosit (m^{2m}) (Guan, 2009)

1.1.3. Spermatogonyal Kök Hücre İzolasyonu ve Kültürü

Spermatogenezin yaşam boyu sürmesi, erişkin testisinde total testis hücrelerinin %0,03'ünü oluşturan, kendini yenileme ve spermatozoonların üretiminden sorumlu olan SKH'lerin biyolojik yeterliliğine bağlıdır (Aponte ve ark., 2005). SKH'ler gibi germ hücrelerinin manipülasyonu, germ hattının devam etmesinde rol oynayan mekanizmaların anlaşılması, germ hattı modifikasyonu ya da tedavi için kullanılabilecek yeni teknikler geliştirilmesi için fırsatlar sunmaktadır. Fakat SKH'lerin oldukça az sayıda bulunmaları ve kesin olarak tanımlanamaması nedeniyle bu hücrelerin biyolojisi ve erkek germ hattının düzenlenmesi gibi konuların anlaşılması oldukça uzun bir sürece yayılmıştır (Kubota ve Brinster, 2018).

SKH'lerin tıptaki potansiyel klinik kullanımlarından biri germ hattı gen terapileridir. Spermatogenezdeki başarısızlığın düzeltilmesi ve hatta doğuştan gelen hataların neden olduğu ölümcül veya hayatı tehdit eden hastalıkların önlenmesi için, SKH'leri kullanan germ hattı gen terapisi umut verici ve uygulanabilir bir yaklaşım olarak görülmektedir. Bu yeni terapötik yaklaşımların takip edilmesi ve SKH'lerin fonksiyonel spermatozoonlara farklılaştırılmasında kullanılabilecek yeni tekniklerin geliştirilmesi için SKH'lerin in vitro kültürü ön koşuldur (Kubota ve Brinster, 2018; Kubota ve Brinster, 2006; Takashima ve Shinohara, 2018; de Rooij, 2017).

SKH'ler ile gerçekleştirilen ilk çalışmalarda, kültür koşulları altında germ hücreleri ve Sertoli hücreleri arasındaki hücresel bağlantılar tanımlanabilmiş (Smith ve ark., 1992), fakat seminifer tübüldeki doğal ortamından uzaklaştırıldıktan sonra SKH'lerin canlılığının sürdürülebilirliği uzun süre belirlenememiştir (Kierszenbaum, 1994). Spermatogonyal transplantasyon tekniğinin, 1994 yılında geliştirilmesiyle birlikte herhangi bir hücre popülasyonunun kök hücre potansiyelinin değerlendirilebileceği fonksiyonel bir analiz sağlanmıştır. Nagano ve ark. (1998), yayınladıkları çalışmalarında, ilk defa fare SKH'lerinin kültür ortamında uzun süreli yaşayabilirliğini ve in vitro ortamda sayılarının arttırılabileceğini göstermişlerdir. Nagano ve ark. (1998), β -galaktosidaz eksprese eden transgenik neonatal ve yetişkin farelerden elde ettikleri fraksiyone olmayan testiküler hücreleri, %10 Fetal Bovine Serum (FBS) içeren ve fare EKH'lerinin kültüründe rutin olarak kullanılan, SIM Mouse embryo-derived thioguanine and ouabain resistant (STO) besleyici hücreler üzerinde yaklaşık dört ay kültüre etmişlerdir. SKH'lerin kültürdeki devamlılığını test etmek ve kültüre edilen hücrelerin kök hücre aktivitelerini görmek için neonatal testislerden elde edilen kültüre hücreleri alıcı testislere transplante etmişlerdir. Bunun sonucunda alıcı testislerde donör-kaynaklı spermatojenik koloniler bulunduğunu ve SKH'lerin kültürde en az dört ay yaşayabildiğini göstermişlerdir (Nagano ve ark., 1998; Kubota ve Brinster, 2018).

Meng ve ark. (2000), farklılaşmamış fare spermatogonyumlarının düşük Glial hücre çizgisinden türetilmiş nötrofik faktör (GDNF) konsantrasyonlarında

farklanmayı tercih ederken, yüksek GDNF konsantrasyonlarında kendini yenileme sürecine gittiklerini göstermişlerdir. Bu çalışmayla birlikte GDNF'nin, doz bağımlı olarak, spermatogonyal proliferasyon ve farklılaşmasını kontrol ettiği ortaya çıkmıştır (Meng ve ark., 2000).

Kanatsu ve ark. (2003), yaptıkları çalışmada neonatal fare testisinden izole edilen SKH öncülleri (gonositler), GDNF, EGF, Basit Fibroblast Büyüme Faktörü (bFGF) ve Lösemi İnhibitör Faktör (LIF) varlığında beş aylık bir zaman aralığında proliferasyonun sürdürüldüğü izlenmiştir. Uzun süreli proliferasyon gösteren bu hücreler daha sonra doğuştan infertil olan alıcı farelerin seminifer tübüllerine transplante edildiklerinde bu farelerde infertilitenin ortadan kalktığı görülmüştür. Bu çalışmayla birlikte, uzun süreli SKH kültürünün spermatogenez çalışmalarında yararlı olacağı ve yeni teknolojilerin geliştirilmesinde önemli etkileri olacağı öne sürülmüştür (Kanatsu-Shinohara ve ark., 2003).

SKH'lerin kendini yenilemeleri için gerekli ekstrinsik faktörlerin araştırılmasının amacı, SKH'ler için uzun süreli kültür koşulları oluşturmanın yanı sıra SKH'lerin yeterliliğinin anlaşılmasına çalışılmasıdır. SKH'lerin proliferasyonunu destekleyici ekzojen çözünebilir faktörlerin tanımlanması için serum-bağımsız (serum-free) kültür sistemi ve transplantasyon deneyi kullanılmıştır. Yavru fare testislerinden elde edilen testis hücrelerinden Thymus cell antigen 1, theta antikoru (anti-THY-1) ile SKH'ler seçilip STO besleyiciler üzerinde serum-bağımsız bir ortamda kültüre edilmişlerdir. DBA/2J suşu farelerinden elde edilen SKH'ler GDNF varlığında yoğun paketlenmiş kümeler oluşturup çoğalmayı sürdürürken diğer fare suşlarından elde edilen SKH'lerin çoğalmasının desteklenmesi için çözünebilir GDNF-ailesi reseptör α -1(GFRA1) ve bFGF eklenmiştir. GDNF ile uyarılmış hücre sinyalleşmesi, SKH'lerin kendini yenilemesinde önemli rol oynamıştır. Kültüre edilen SKH'lerin sayısı 5-6 günde iki katına ulaşmış ve kümelenme oluşturan hücrelerde SKH belirteci olan Oct-4'ün kuvvetli eksprese olduğu izlenmiştir. Bu koşullar altında proliferasyonu 6 aydan uzun süren SKH'ler alıcı infertil testislere transplante edildiğinde, spermatogenez sürecinin başladığı ve bu hayvanların fertilitelerini kazandıkları gösterilmiştir (Kubota ve ark., 2004). SKH'lerin in vitro

proliferasiyonuna izin veren ekzojen faktörlerin tanımlanması, SKH biyolojisinin incelenmesi için temel oluşturmuş ve yeni teknolojilerle germ hattı modifikasyonlarına olanak sağlamıştır.

Yapılan bir çalışmada erişkin fare testisinden genetik seleksiyon kullanılarak %27 başarı oranıyla SKH'ler izole edilmiştir. İzole edilen bu hücreler uygun kültür koşullarında EKH özellikleri göstermiş, üç embriyonik germ yaprağından köken alan yapılara kendiliğinden farklılaşmış ve immün-yetersiz farelerde teratom oluşumu sergilemişlerdir. Multipotent erişkin germ hattı kök hücreleri (multipotent adult germline stem cells, maGSCs) olarak adlandırılan bu hücreler erken blastokistlere enjekte edildiğinde, çeşitli organların gelişimine katkı sağladıkları görülmüştür (Guan ve ark., 2006). Ko ve ark. (2009), erişkin testisinden elde ettikleri unipotent germinal kök hücre (GKH)'lerinin uygun kültür koşulları altında pluripotent kök hücrelere yeniden programlanabileceğini raporlamışlardır. Bu çalışmalarla birlikte insan testiküler biyopsilerinden elde edilebilecek bu hücrelerin yeniden programlanmalarının, insan EKH'leriyle ilişkili etik ve immünolojik problemler olmaksızın hücre-bazlı terapilere olanak sağlayacağı düşünülmüştür.

Bu güne kadar SKH kültür metodolojileriyle ilgili çalışmalar, standart koşullara dayanmaktadır:

- Kimyasal içeriği net bir şekilde tanımlanmış veya kompleks StemPro-temelli serum-bağımsız kültür ortamı,
- GDNF, FGF2 içeren büyüme faktörü kokteyli ve lipid veya serbest yağ asidi karışımı içeren temel kültür ortamı ilavesi,
- Mitotik olarak inaktif olan somatik besleyici hücreler (fare embriyonik fibroblastı, veya testiküler somatik hücreler) ile ko-kültür,
- %5 CO₂ ve %21 O₂ basıncı.

Fare SKH kültürleri, insanlar da dahil olmak üzere çeşitli memeli SKH'lerine uygulanabilecek koşulları optimize etmek için uygun bir platform olmuştur. Fare

SKH kültürleri uzun süredir gerçekleştirilse de uygulanan geleneksel koşulların, uzun-süreli kültürler sırasında, rejeneratif bütünlük üzerindeki etkileri hala tam olarak anlaşılamamıştır (Helsel ve ark., 2017; Kubota ve Brinster, 2008).

Farelerde başlayan SKH kültür çalışmaları, takip eden dönemde sıçan, tavşan, köpek, domuz, sığır gibi hayvanlarda da gerçekleştirilmiştir. Tüm bu hayvanlarda gerçekleştirilen çalışmalar, insan SKH çalışmalarına basamak oluşturmuştur (Kubota ve Brinster, 2018).

1.2. İnfertilite ile İlgili Tek Gen Defektleri

Embriyogenizin başlarında, germ hücresi haline gelen hücreler hareketli spermilere dönüşmek için mayoz ve yoğun bir morfolojik değişim geçirirler. Bu benzersiz özellikleri elde etmek için ekstra genler ve ilave düzenleyici mekanizmalar gereklidir (Lin ve Matzuk, 2014). Mevcut bilgilere göre spermatogenez süreci 1500-2000 gen tarafından düzenlenmektedir (Razavi ve ark., 2017). Memelilerde erkek üreme problemlerinin nedenleri arasında bu genlerdeki yıkıcı mutasyonlar da gösterilmektedir (Lin ve Matzuk, 2014).

İnsanlarda erkek kısırlığının en sık görülen nedenleri varikozel (%37-40), endokrin bozuklukları (>%20), genital kanal enfeksiyonu (%8-35), testis defektleri (%9), genetik problemler (%15-30), antisperm antikorları (%8-19) ve idiyopatik erkek kısırlığıdır (%15-25). Bu konuda çok sayıda araştırma olmasına rağmen, spermatogenezin çok etkenli ve karmaşık bir süreç olması nedeniyle birçok kısırlık vakasının nedeni hala bilinmemektedir (Razavi ve ark., 2017).

Erkek menisinde sperme rastlanmama durumu olan azoospermi vakalarının %21-29'unun nedeni genetik faktörlerle ilişkilidir. Azoosperminin genetik temeli, tekli ve çoklu gen hastalıkları ve epigenetik değişiklikler gibi sayısız nedenleri içerir. Kistik fibrozis gen mutasyonları, Y kromozom mikro delesyonları ve testis

fonksiyonlarını bozan kromozom anomalileri erkek kısırlığında büyük rol oynayan genetik faktörlerdir (Razavi ve ark., 2017).

Y kromozomunun kısa kolu testis gelişiminden, uzun kolu ise spermatogenezin başlangıcından ve sürdürülmesinden sorumlu olan genleri barındırır (Gatta ve ark., 2010). Y kromozomunun uzun kolundaki mikrolelesyonların spermatogenezini engellediği ortaya konulunca bu bölge azoospermi faktör bölgesi (AZF) olarak tanımlanmıştır. Y kromozomunun uzun kolu (Yq) üzerinde AZFa, AZFb, AZFc olarak adlandırılan üç bölgede görülen mikrolelesyonların infertiliteye neden olduğu bildirilmiştir (Colaco ve Modi, 2018). En sık karşılaşılan Y kromozom mikrolelesyonu AZFc bölgesinde görülür ve hipospermatogeneze yol açmaktadır (Gatta ve ark., 2010). AZFc delesyonlarının Sertoli hücre sendromu (Sertoli cell only syndrome, SCOS) ile spermatogenezde duraklamaya neden olduğu bildirilmiştir. Bu bölgede spermatogenezde gerekli proteinleri kodlayan farklı gen aileleri yer almaktadır (Song ve ark., 2016).

Ravazi ve ark. (2017), insanlarda ve farelerde infertilite türlerini karşılaştırdıkları bir çalışmada, ifadesi artan ya da azalan birçok gen analiz etmiş ve erkek kısırlığı ile ilişkili moleküler mekanizmaları araştırmışlardır. İnsan ve fare kısırlığında gen ifadesi artmış olan genler listesinde *Etv5* ve *Pou3f1* knock-downları en yüksek benzerliği göstermiştir. Ayrıca gen ifadesi azalmış olan genler listesinde, teratozoospermi ve infertil fare mutantları arasında Mayotik duraklama (MArrest) ve oligozoospermi arasındaki benzerlik dikkat çekmiştir (Razavi ve ark., 2017).

Sık rastlanılan bu mutasyonların yanı sıra, her geçen gün yeni ve farklı gen mutasyonlarına bağlı infertilite olguları literatürde yer bulmaktadır. Son yıllarda ele alınan knock-out (KO) fare modelinde insan fenotipine benzeyen diğer bir gen ise Testis expressed gene-15 (*Tex15*) genidir. Farelerde bu genin bozulması insanlardakine benzer olarak erkeklerde testis boyutunda küçülme ve ilk spermatogenez evresinde mayotik duraklamaya neden olur (Yang ve ark., 2008).

1.2.1. Testis Expressed Gene (Tex15)

Farelerde 8. kromozom üzerinde bulunan Testis-expressed 15 (*Tex15*) geni 15 kb büyüklüğündedir. Dört ekzona ve 3 introna sahiptir. Farelerde testis ve overde ifade edilen bu gen 2785 aminoasit'ten oluşan bir proteini kodlar (Yang ve ark., 2008; Wang ve ark., 2001). Farelerde Spermatogenez boyunca *Tex15* ekspresyonu dinamikdir, transkriptleri spermatogoniyumda, erken spermatositlerde ve post mayotik germ hücrelerinde bol miktarda bulunmakta, pakiten spermatositlerinde ise aşağı yönde regüle edilmektedir (Wang ve ark., 2005).

Spermatogonyal kök hücrelerde (SKH) spermatogenezis aşamasında kromozomal sinapsis ve mayotik rekombinasyon için *Tex15* geninin önemli bir rolü olduğu bildirilmiştir (Yang ve ark., 2008). *Tex15* genindeki fonksiyon kaybını incelemek için yapılan bir çalışmada *Tex15* - / - fareleri üretildiğinde, erkeklerin steril olduğu ve testis büyüklüğünde önemli ölçüde azalma olduğu gözlemlenmiştir (Wang ve ark., 2018). Yetişkin *Tex15* - / - testislerinde seminifer tübüllerde, erken mayotik durdurmayı gösteren tam pakiten spermatosit ve post mayotik germ hücrelerinin eksikliği, *Tex15* yokluğunun erken mayotik arreste neden olduğunu, fakat dişilerde bu etkinin görülmediğini göstermiştir. Spesifik olarak *Tex15* yoksun spermatositlerin, kromozomal sinapsiste başarısızlık gösterdiği anlaşılmıştır (Yang ve ark., 2008). Yine bu çalışmada *Tex15* geninin, DNA tamir proteinlerinin çift zincir kırık (DSB) bölgelerine yerleştirilmesini düzenlediği ve bu nedenle yokluğunun mayotik rekombinasyonda başarısızlığa neden olduğu ileri sürülmüştür. *Tex15* geninde tekli nükleotid polimorfizmleri, farklı etnik kökenlerdeki erkeklerde infertilite açısından incelenmiş; rs323344, rs323345, rs323346 ve rs323347 varyasyonlarının şiddetli oligozoospermi ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Plaseski ve ark., 2012; Ruan ve ark., 2012). Singh ve Chimenti (2015), mayozda etkili dört gen için SIFT skoru yardımıyla potansiyel zararlı varyasyonları belirlemiş ve CRISPR-Cas9 ile fare embriyosunda *Tex15* geni rs147871035 varyasyonunu uyarılmışlar, ama bu varyasyonu taşıyan yavrularda infertilite görülmediğini bildirmişlerdir. Ancak, insanlarda *Tex15* geninin ilk ekzonunda erken translasyonel sonlanmaya neden olan bir mutasyonun infertilite ile ilişkili olduğu ve bu

mutasyonun ailedeki spermatogenetik kusura sebep olarak, zamanla sperm sayısında azalmaya neden olduğu ortaya konulmuştur (Okutman ve ark., 2015).

1.3. Genom Düzenleme ve Kullanılan Metodlar

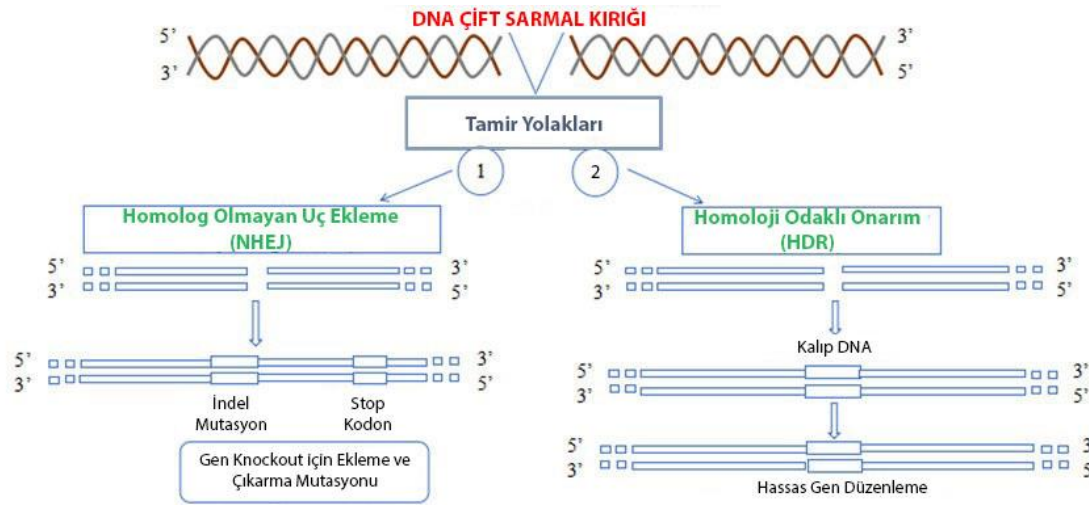
Genom düzenlenmesi, istenilen DNA dizi değişikliğinin yapılacağı bölgeye yakın genomda çift sarmallı kırık oluşturulması ile başlar (Jasin ve Haber, 2016). Programlanabilir nükleazlar hücre kültürlerinde, tüm hayvanlarda ve bitkilerde hedeflenmiş genetik modifikasyonları mümkün kılar. Bu enzimlerin araştırma, tıp ve biyoteknolojideki önemi, genomda bölgeye özgü DNA bölünmesini indüklemeye kabiliyetinden kaynaklanır. Endojen mekanizmalar yoluyla çift kırılmaların onarımı yüksek hassasiyetli genom düzenlenmesine izin verir (Kim ve Kim, 2014).

Hücre bölünmesi ve farklılaşması sırasında oluşması muhtemel DNA çift sarmal kırılmaları (DSB), genom stabilitesini korumak için hücre tarafından tam anlamıyla onarılmalıdır (McVey ve Lee, 2008). Eğer düzgün bir şekilde tamir edilmezse, meydana gelen DSB'ler genomik değişime veya hücre ölümüne yol açabilmektedir (Jasin ve Haber, 2016). Çift sarmal kırılmaları Homolog Olmayan Uçuca Ekleme (NHEJ) ve Homoloji Odaklı Onarım (HDR) olmak üzere farklı iki yol ile etkili bir şekilde onarılmaktadır (Fernandez ve ark., 2017). (Şekil 1.5). Son zamanlarda, mikrohomojoloji aracılı son birleştirme (MMEJ) olarak adlandırılan üçüncü, daha az karakteristik bir onarım mekanizmasının kullanıldığı belirlenmiştir (McVey ve Lee, 2008). MMEJ, NHEJ'den farklı olarak kırılmış uçları onarmak için DNA kırığının yakınındaki kısa homoloji dizilerini kullanır (Khoverdian ve ark., 2017). Her zaman silme ile sonuçlanan bu onarım mekanizmasının onkojenik kromozom düzenlemelerine katkıda bulunduğu bildirilmiştir (McVey ve Lee, 2008).

Fareler ve insanlar gibi çok hücreli ökaryotlarda daha yaygın DSB onarım yolu olan NHEJ, iki kırık ucu uyumlu hale getirmek için modifiye edilmesini ve ardından yeniden birleştirilmesini içerir (İsken ve Maquat., 2007). NHEJ çok hücreli ökaryotlarda kullanıldığında DNA kopmasının her bir ucundaki birkaç nükleotit,

çoğu durumda silinir. Bu nedenle, genetik bilgiyi koruma açısından kusurlu bir süreçtir (Lieber ve ark., 2003). İstenilen genomik lokusta küçük eklemelere veya silmelere neden olan bu mekanizma, okuma çerçevesini değiştirerek hedef genleri bozabilir, bu da mRNA bozulmasına veya işlevsel olmayan proteinlerin üretilmesine neden olabilmektedir (Isken ve Maquat, 2007).

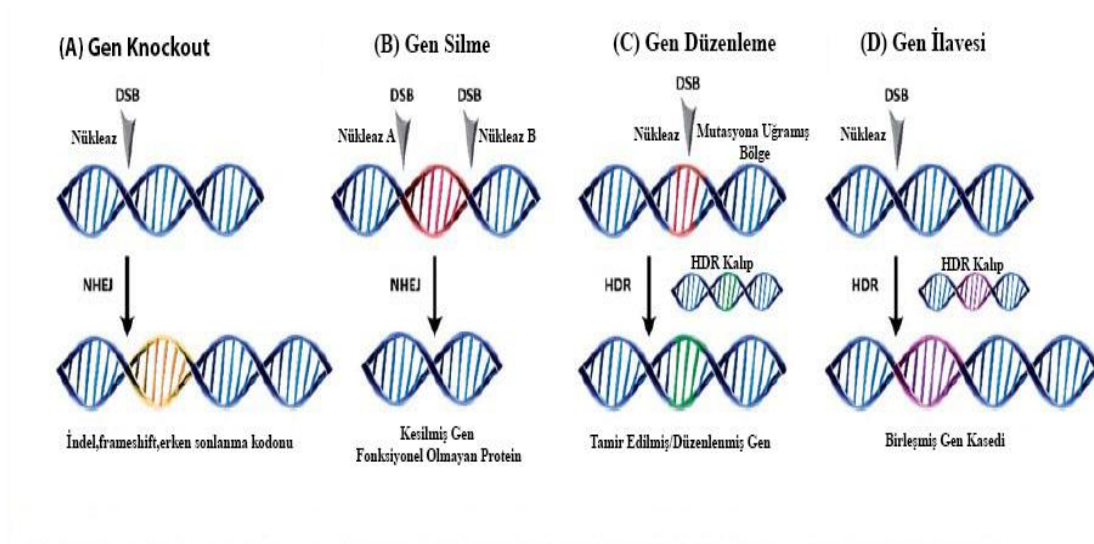
Homoloji odaklı onarım (HDR), DSB'lere homolog olan bir dizi içeren eksojen olarak verilen kalıp DNA'yı gerektirir. Spesifik mutasyonlar için istenilen düzenlemeleri içeren yapay rehber DNA'lar tarafından çift zincir kırıklarının onarımı sonucu knock-in oluşumu sağlanır (Paix ve ark., 2017). Kalıp DNA'daki farklı sekans, genomik sekansların kesin modifikasyonunu mümkün kılan endojen lokusa dahil edilebilir. Bu nedenle, HDR bazlı gen düzenleme hastalığa neden olan mutasyonları onarmak veya öngörülebilir ifade modellerini indüklemek için spesifik lokuslarda sekanslarda knock-in uygulamaları için kullanılabilir (Yin ve ark., 2014).



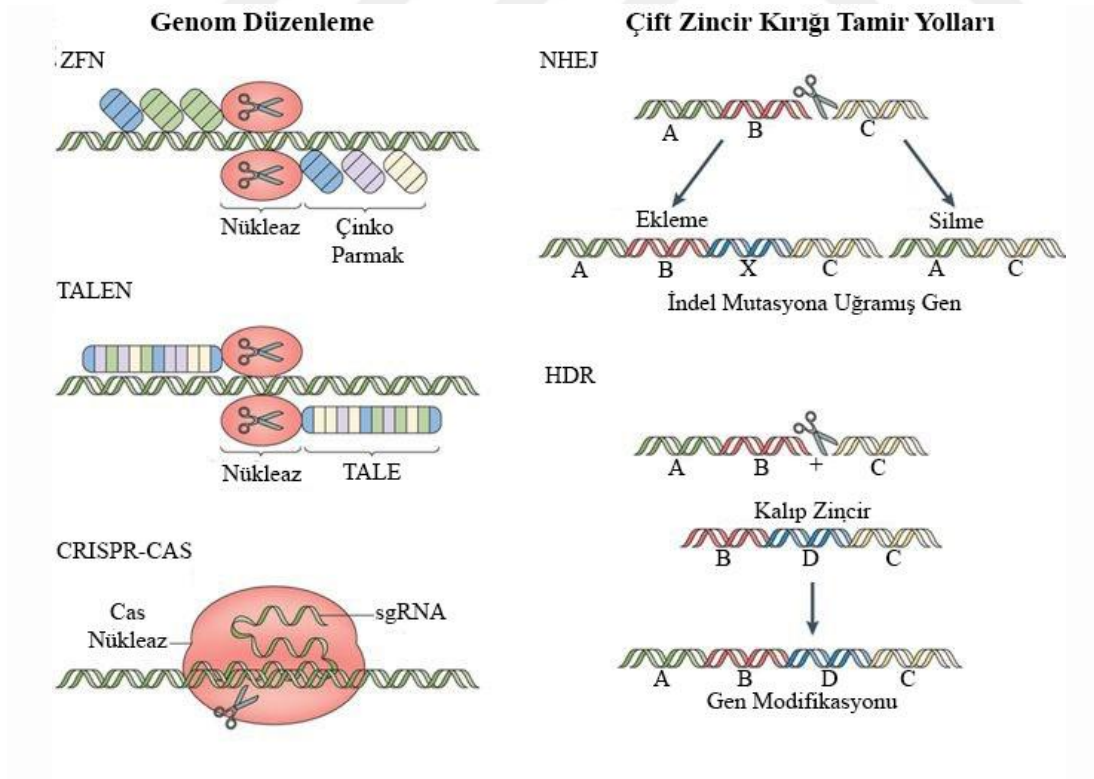
Şekil 1.5. DNA tamir mekanizmaları (Khan ve ark., 2016).

Hücre tarafından kullanılan onarım yoluna bağlı olarak gen düzenlemede istenilen ekleme, silme ve gen işlevini bozma olayları gerçekleştirilebilir (Şekil 1.6). Meganükleazlar, çinko parmak nükleazlar (ZFN), transkripsiyon aktivatör benzeri efektör nükleazlar (TALEN) ve kümeleşmiş düzenli aralıklarla kesişen kısa palindromik tekrarlar (CRISPR) genom düzenlemede bölgeye özgü nükleazları

kullanan tekniklerdir (Şekil 1.7) (Fernandez ve ark., 2017). Meganükleaz, ZFN'ler ve TALEN'ler kesilecek DNA dizilimini tanımak için protein-DNA etkileşimini kullanır (Yin ve ark., 2017).



Şekil 1.6. Nükleaz temelli genom düzenleme(Lino ve ark., 2018)



Şekil 1.7. Genom düzenleme araçları: Çinko-parmak nükleaz (ZFN), transkripsiyon aktivatörü benzeri efektör (TALE) nükleaz (TALEN) ve CRISPR-Cas sistemleri, DNA'da

çift iplikli kopmalar (DSB'ler) meydana getirebilir. İki: homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) veya homoloji odaklı onarım (HDR) mekanizmalarından biri, DSB'yi genom düzenlemesi elde etmek için onarır. NHEJ, hedef geni, yerleştirme veya silme yoluyla bozarken HDR, hedef genomik bölgede genomik dizilerin yerleştirme, silme veya değiştirme işlemlerini yapmak için donör DNA kalıbı kullanır (Yin ve ark., 2017).

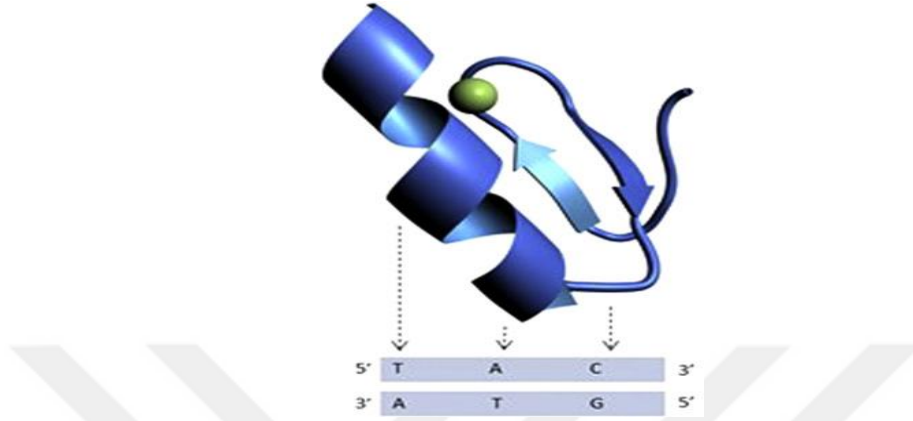
İlk genom düzenleme stratejilerinin oluşturulmasına yönelik adım, maya mitokondrisinde endonükleaz olan I-SceI maya nükleazının kullanılmasıdır. Keşfedilmesinden 10 yıl sonra, I-SceI meganükleazın, memeli kromozomlarında homolog rekombinasyonu desteklemek için kullanılabileceği gösterilmiştir (Choulika ve ark., 1995). Bu çalışmayı takiben fare embriyonik kök hücrelerinde yeni bir gen hedefleme stratejisi geliştirmek için I-SceI ekspresyonunu izleyen bir I-SceI maya meganükleazı kullanılmış ve çok daha düşük bir homoloji uzunluğuna rağmen, gen hedefleme frekansında 100 kat verimlilik elde etmişlerdir (Cohen-Tannoudji ve ark., 1998).

Memeli genomlarının düzenlenmesinde ilk olarak maya meganükleazları (Choulika ve ark., 1995; Cohen-Tannoudji ve ark., 1998) kullanılmış olsa da transgenik hayvanların nasıl üretilbileceği konusundaki önemli metodolojik değişim 2009 yılında gerçekleşmiştir. Bir grup araştırmacı dünyanın ilk knock-out faresini üretmek için çinko parmak nükleazlarını (ZFN) kullanmışlardır (Geurts ve ark., 2009). Genel olarak, meganükleazlar ve ZFN'lerin sahaya özgü DNA kırılmalarını indüklemeye nispeten düşük başarı oranları ve etkinlikleri olduğu bildirilmiştir. Buna karşılık, TALEN ve CRISPR sistemi memeli hücrelerinde >1000'lik mutasyon frekanslarını indüklemek için %80-90 oranında başarı oranına sahiptir (Lin ve ark., 2014; Kim ve ark., 2013; Yin ve ark., 2017). Bu bölümün alt başlıklarında ZFN ve TALEN teknolojilerinden kısaca bahsedilecek; CRISPR-Cas9 tekniği ayrıntılı olarak incelenecektir.

1.3.1. Çinko Parmak Nükleazlar (ZFN)

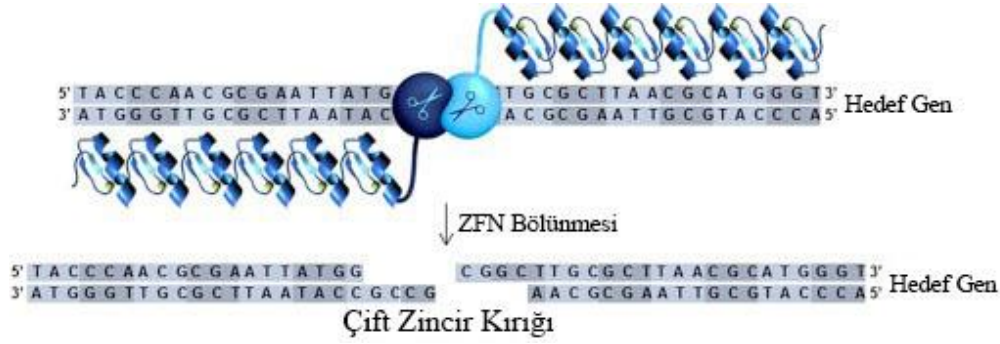
Bu metodolojik yaklaşım, DNA bakteriyel restriksiyon enzimi FokI endonükleazının katalitik alanına kaynaşık çinko parmak proteinlerinden oluşan DNA bağlanma alanının kullanılmasına dayanmaktadır (Ando ve Meyer, 2017). Bağlanma

bölgesi, her biri yaklaşık olarak üç DNA baz çifti tanıyan tandem bir Cys2-His2 parmak dizisi içerir (Şekil 1.9). Her Cys2-His2 çinko parmağı, bir çinko iyonunun koordinasyonu yoluyla $\beta\beta\alpha$ yapısıyla katlanmıştır ve yaklaşık 30 aminoasitten oluşur.



Şekil 1.8. Çinko parmak proteini: Bir çinko atomuna bağlı 30 aminoasitten oluşur ve her parmak üç nükleotidi tanır.(Ando ve Meyer, 2017)

İstenilen çift sarmallı DNA kesiminin gerçekleşmesi için, FokI endonükleaz alanının, dimerizasyonu (makas görevi) gereklidir (Şekil 1.9). Dimer oluşumuna izin vermek için iki çinko-parmak FokI hibrit proteinin üretilmesi ve aynı anda kodlanması gerekir; iki ZFN'nin, FokI dimerizasyonunu mümkün kılması hedeflenen DNA'ya doğru oryantasyon ve aralıkta bağlanmasını gerektirir. Bir monomer, sol ZF DNA-bağlanma modülü tarafından verilen çift iplikli DNA'nın ileri sarmalına bağlanırken, ikinci monomer, sağ ZF DNA-bağlanma modülü tarafından sağlanan ters sarmal dizisine bağlanarak dimer oluşturur. Böylece hedef bölge olarak seçilen iki bağlanma bölgesi arasındaki boşluk dizisinde FokI tarafından çift iplik kırığı oluşturulur (Eid ve Mahfouz, 2016). İki heterodimerik ZFN'nin bağlanma zorunluluğu, uzun ve potansiyel olarak benzersiz tanıma bölgelerinin spesifik hedeflenmesi ile sonuçlanır. Bu zorunlu heterodimer FokI alanları potansiyel homodimer bölgelerinde hedef dışı bölünmeyi önler, böylece ZFN özgüllüğünü daha da artırır (Ando and Meyer, 2017). ZFN ile indüklenen sahaya özgü çift sarmallı kırıklar (DSB), homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) veya homoloji odaklı onarım (HDR) yoluyla onarılır (Ando ve Meyer, 2017).



Şekil 1.9. Çift zincir DNA kesiği oluşumu: Çift zincir DNA kesiği oluşumu için, FokI dimerizasyonunu gerekir. Bunu sağlamak için iki çinko parmak nükleazının doğru oryantasyon ve aralıkta bağlanması gerekmektedir.

Çinko parmak nükleazların (ZFN) genom düzenleme amacıyla kullanıldığı çalışmaların ilki, knockout sıçan elde edilmesinin raporlandığı çalışmadır (Geurts ve ark., 2009). Sonrasında transgenik memeliler oluşturmak için ZFN kullanılması laboratuvarlar arasında hızlıca yayılmış ve kısa bir süre sonra ZFN'nin fareler (Carbery ve ark., 2010) sığır (Liu ve ark., 2013; Wei ve ark., 2015) ve domuzlardaki (Kwon ve ark., 2013; Hauschild ve ark., 2011) genom düzenleme çalışmalarında başarılı bir şekilde kullanıldığı gösterilmiştir. ZFN'nin besi hayvancılığı uygulamalarındaki en iyi örneklerinden biri sığırlar da genom düzenlenmesi sonucu mastitis direncinin artması olmuştur (Liu ve ark., 2014).

Bu sistemin kullanımının önündeki engellerden bir tanesi, kullanıcı tarafından tanımlanmış herhangi bir diziye bağlanabilen ZF dizilerinin oluşturulmasını gerektirmesidir. Gerek tasarımının pahalı ve zahmetli oluşu gerekse hedef dışı etkiler nedeniyle ZFN'nin genom düzenleme çalışmalarındaki kullanımı ve etkisi nispeten kısıtlanmıştır (Fernandez ve ark., 2017).

1.3.2. Transkripsiyon Aktivatör Benzeri Efektör Nükleazlar (TALEN)

Transkripsiyon Aktivatör Benzeri Efektör Nükleazlar (TALEN), DNA bağlanması için bir transkripsiyon aktivatörü benzeri efektörden (TALE) ve bir FokI nükleazından oluşur (Joung ve Sander, 2013). Hem ZFN hem de TALEN her ikisi de

restriksiyon enzimi FokI'den farklı DNA bağlama domainlerinin aynı endonükleaz domain ile birleştirilmesinden oluşmuş kimerik proteinlerdir (Fernandez ve ark., 2017). Tale proteini DNA bağlama bölgesini bir DNA bölünme alanına birleştirerek endonükleaz aktivitesine sahip olacak şekilde modifiye edilebilir. Bu kompleksler TALEN'ler (transkripsiyon aktivatörü benzeri efektör nükleazlar) olarak adlandırılır (Smith ve ark., 2017).

TALE proteinleri 33 ila 35 amino asit tekrarından oluşur. 12. ve 13. pozisyonlarındaki iki amino asit aşırı değişkendir ve hedef DNA sekansı ile baz eşleşmesini sağlar. Bu şekilde spesifik DNA sekanslarını tanıma yeteneğine sahip olurlar. Farklı Tale proteinleri farklı DNA bağlama özelliklerine sahiptir. Her bir TALE tekrarı, bitişik bir DNA sekansındaki tek bir baz çiftini tanıır, bazı belirleyen ise değişken tekrarlardır (Boch, 2011). DNA'nın istenilen bölgesinde kesim yapmak için alt ve üst DNA ipliğine bağlanan TALEN'in dimerize olması gerekmektedir. Karşılıklı DNA ipliğine bağlanan TALEN'ler bu şekilde nükleaz aktivitesi gerçekleştirir ve FokI endonükleazları hedef bölgede çift iplik kesikleri oluşturur (Reyon ve ark., 2012). Oluşturulan bu kesik NHEJ ya da HDR tamir mekanizması kullanılarak onarılır ve bu şekilde istenilen gen düzenlemesi sağlanır.

Genom düzenleme çalışmalarında, TALEN ilk olarak knockout sıçanlar üretmek üzere kullanılmış (Tesson ve ark., 2011), daha sonra farelerde de genom düzenlemesi için kullanılmaya başlanmış ve birçok yeni knockout modelleri oluşturulmuştur (Fernandez ve ark., 2017).

TALEN aynı zamanda genomları düzenlenmiş besi hayvan türlerinin üretilmesinde de uygulanmıştır. Bunlar arasında domuz (Xin ve ark., 2013), keçi (Cui ve ark., 2015), koyun ve inek (Proudfoot ve ark., 2015) yer almaktadır. TALEN'lerin tarımsal uygulamaları arasında genomları düzenlenerek genetik olarak boynuzları olmayan (Tan ve ark., 2013), tüberküloza direnci arttırılmış (Wu ve ark., 2015a) sığır hattı üretimi yer almaktadır. TALEN, insan indüklenmiş pluripotent kök hücreler de X kromozomuna bağlı kombine immün yetmezliği (SCID-X1)'ne neden olan mutasyonların düzeltilmesinin dahil olduğu birkaç tane pre-klinik strateji

açısından da başarılı bir şekilde araştırılmış ve aynı zamanda kistik fibroz gibi hastalıkların gen terapisi uygulamalarında kullanılmıştır (Biffi, 2015; Ramalingam ve ark., 2014).

Hedef DNA sekansına uygun özel TALEN yapımı için tip II restriksiyon enzimlerinin DNA fragmanlarıyla bir araya getirilmesine dayanan, en popüler TALEN montaj platformlarından biri olan Golden Gate klonlama yöntemi hızlı ve ucuz bir protokoldür (Cermak ve ark., 2015; Sakuma ve Yamamoto, 2016). Ancak elde edilen TALEN'in sadece istenen DNA sekansını hedef alması ve kesmesi her zaman mümkün olmadığından genom düzenlemede hedef dışı mutasyonların olabileceği ve her yeni üretilen TALEN'in in-vitro ve in-vivo olarak doğrulanması gerekliliği rapor edilmiştir (Seruggia ve Montoliu, 2014). Bununla birlikte, TALEN'lerin in-vivo olarak transfeksiyonu, büyük boyutlarından (tek bir TALEN için yaklaşık 3 kb) ve TALEN dizilerinin tekrarlayan doğasından dolayı zordur (Hockemeyer ve ark., 2011; Li ve ark., 2011).

1.3.3. CRISPR-Cas 9 Sistemi

CRISPR-Cas 9 sistemi, hedef genetik modifikasyonları indüklemek için ZFN'ler ve TALEN'lere alternatif olarak ortaya çıkmış ve son yıllarda memeli hücrelerinde etkili ve en popüler yöntem haline gelmiştir. DNA bağlayıcı proteinlere dayalı önceki stratejilerin aksine, CRISPR-Cas9 sistemi sadece rehber RNA'sını değiştirerek istenilen bölgeyi hedeflemek için kolayca programlanabilir. Özellikle CRISPR-RNA (crRNA) ve trans-activating crRNA (tracrRNA)'nın tek kılavuz RNA'da (single guide RNA, sgRNA) birleştirilmesi sistemin genetik araç olarak kullanımının yolunu açmıştır (Jinek ve ark., 2012). Cas9 proteini gen düzenleme araçları için önemli bir özellik olan çift sarmal DNA'da tek bir kırılmaya neden olur. Metod; ökaryot hücrelerdeki NHEJ ve HDR şeklindeki DNA onarım yollarını genetik değişiklik yapmak için kullanır.

CRISPR sistemi ilk 1987 yılında aydınlatılmıştır. Ishino ve ark. (1987), *Escherichia coli* bakterisinde alkalın fosfataz izozim dönüşümünden sorumlu olan *iap* genini incelerken, *iap* geninde tekrar eden ve etmeyen dizileri keşfetmişlerdir (Ishino ve ark., 1987). 2000 yılında farklı 20 türde tekrar dizilerinin varlığının tespiti (Mojica ve ark., 2000), diziler üzerine yapılan çalışmaları arttırmıştır. 2002 yılında bu tekrar dizilerinin işlevleri tamamen bilinmemesine karşın Jansen ve ekibi bu dizileri Düzenli Aralıkla Bölünmüş Kısa Palindromik Tekrar Kümeleri (CRISPR), CRISPR lokusuna bitişik gen setini ise CRISPR ilişkili genler (Cas) olarak adlandırmıştır (Jansen ve ark., 2002). 2005 yılında üç farklı araştırma ekibi birbirlerinden bağımsız olarak tekrar etmeyen CRISPR aralayıcılarının bakteriyofajdan köken aldığını bildirmesi üzerine prokaryotlardaki bu dizilerin virüslerin neden olduğu enfeksiyona karşı geliştirilen nükleik asit tabanlı bağışıklık sistemi olabileceği hipotezi ortaya çıkmıştır (Mojica ve ark., 2005; Bolotin ve ark., 2005; Pourcel ve ark., 2005). CRISPR lokusundaki aralık dizilerin bakteriyofaj genomunda ve plasmidlerde sıklıkla aynı olduğunun rapor etmesiyle CRISPR lokusların bakteri ve arkeaları virüslerin sebep olduğu enfeksiyona karşı korunmak için tasarlanmış bağışıklık sisteminin bir parçası olduğu görüşünü desteklemiştir (Wilkinson ve Wiedenheft, 2014). Bu hipotezin ilk deneysel kanıtı 2007 yılında yayınlanmıştır (Barrangou ve ark., 2007).

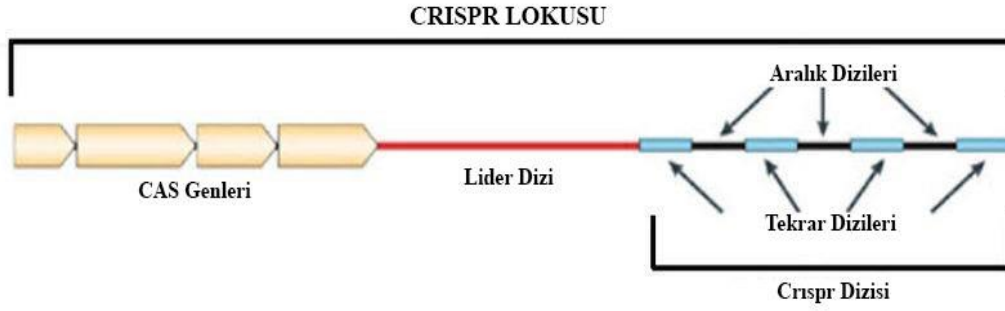
Sapranauskas ve ark.(2011), *Streptococcus thermophilus* CRISPR-Cas sisteminin *Escherichia coli*'ye transfer edilebileceğini ve plazmid transformasyonuna ve faj enfeksiyonuna karşı heterolog koruma sağlayabildiğini göstermişlerdir. Ayrıca, Cas 9'un CRISPR ile kodlanmış girişim için gerekli tek Cas proteini olduğunu tespit etmişlerdir (Sapranauskas ve ark., 2011).

2012 yılında Charpentier ve Doudna tarafından yürütülen bir çalışma kapsamında, sistem *Streptococcus pyogenes*'te denenmiş ve crRNA ile tracrRNA'nın birleştirilmesi ile Watson-Crick baz eşleşmesi yoluyla spesifik genomik bölgelere karşı Cas9 nükleazını aktif hale getiren tek bir rehber RNA (single guide, sgRNA) üretilmiştir. (Jinek ve ark., 2012).

CRISPR-Cas sisteminin bir gen düzenleme aracı olarak kullanılması, *Streptococcus thermophilus* (StCas) ve *Streptococcus pyogenes* 'den (SpCas9) gelen Tip II CRISPR sistemlerinin, memeli genomlarını düzenlemek için tasarlanabileceğinin gözlemlendiği 2013 yılında başlamıştır (Cong ve ark., 2013). Yapay rehber RNA aracılığı ile spesifik hedeflerde DNA kesimi yapılabildiğinin bulunmasıyla genom düzenlemede yeni bir döneme girilmiştir.

CRISPR-Cas sisteminin adım adım ilerleyen keşfi sonucunda CRISPR lokusunu şu şekilde tanımlanmıştır:

Her bir CRISPR lokusu, kısa tekrar dizilerinden ve yabancı genetik materyalden köken alan, ancak tekrar etmeyen aralayıcı (spacer) adı verilen dizilerden oluşur (Nishimasu ve ark., 2014). Bir CRISPR lokusunda yer alan aralayıcı diziler oldukça farklılık göstermektedir. Bu dizilerinin sayısı birkaç taneden birkaç yüze kadar büyük değişkenlik gösterir. Tekrar dizileri 21-48 baz çifti arasında iken, aralık dizileri 26-72 baz çifti arasındadır. CRISPR lokusları ile ilgili diğer bir özellik de transkripsiyon yönünün belirlenmesini sağlayan CRISPR lokusunun yukarı akış bölgesinde yer alan lider (guide) olarak adlandırılan korunmuş bir dizinin varlığıdır. CRISPR aktivitesi için genellikle CRISPR dizilerine bitişik bulunan, CRISPR ilişkili genlerin (CRISPR associated genes, *Cas*) varlığına ihtiyaç vardır (Şekil 1.10) (Rath ve ark., 2015). *Cas* genlerinin kodladığı Cas proteinlerinin birçoğunun nükleaz, helikaz ve nükleik asit bağlanma bölgelerini taşıdığı ve bu sayede DNA dizilerini açıp kesebildikleri bilinmektedir (Sapranaukas ve ark., 2011).

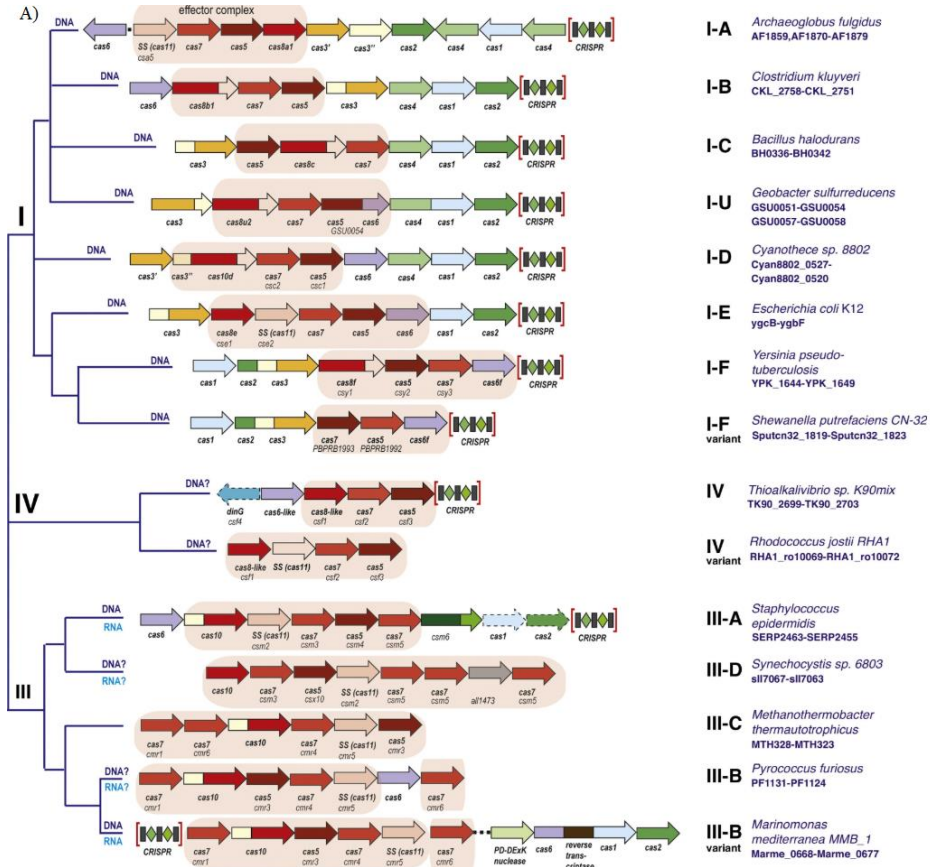


Şekil 1.10. CRISPR lokusu(Sorek ve ark., 2008)

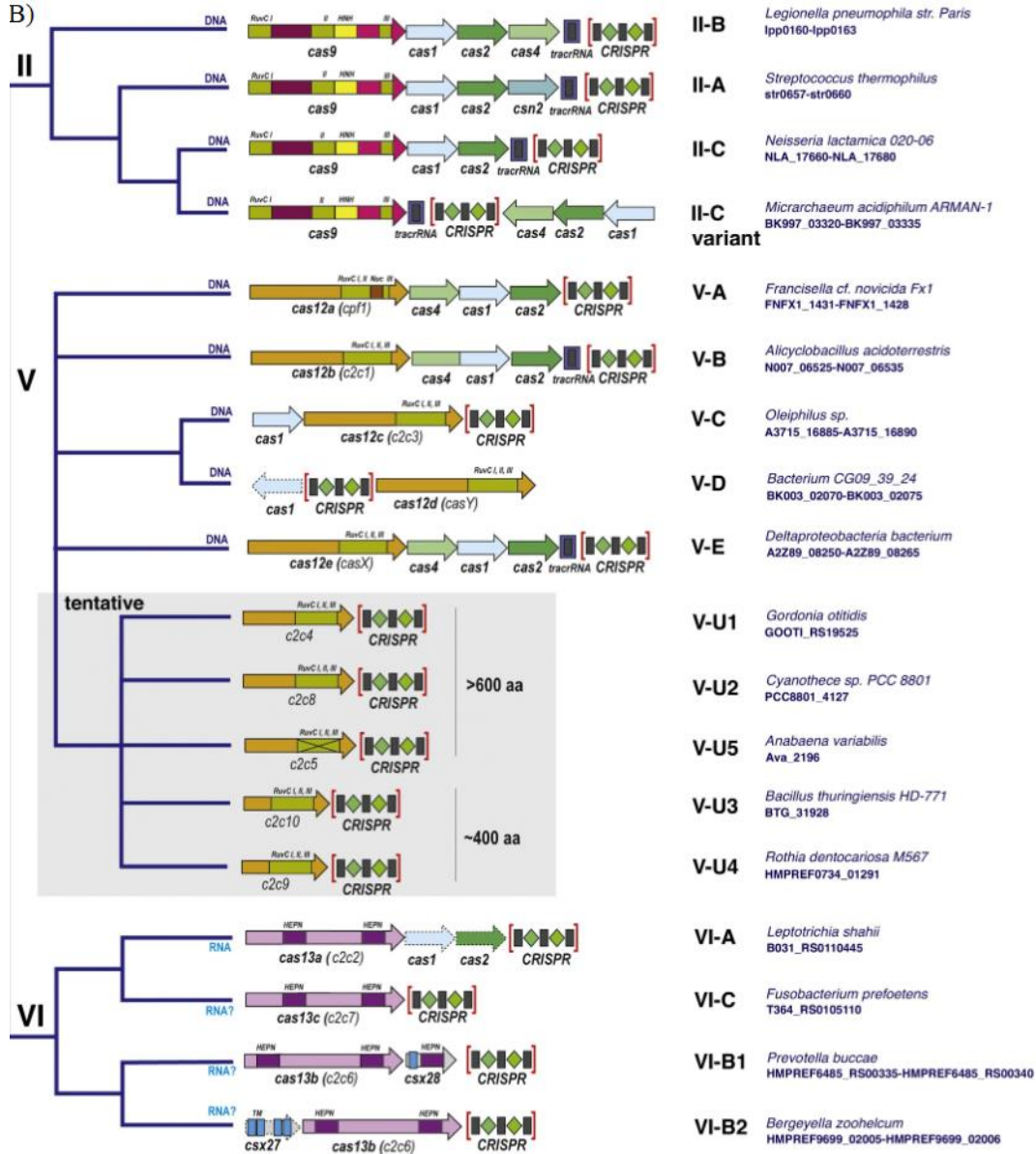
Keşfedilmesinin ardından yapılan ilk çalışmalardan sonraki geçen kısa süre içinde mayadan insana neredeyse tüm yaygın çalışılan ökaryotlarda genom düzenleme için kullanılmıştır (Terns ve Terns, 2014). Cas9 proteininin istem dışı etkileşimleri sonucu oluşabilecek hedef dışı etkiler endişe yaratsa da öngörebilme ve önleme stratejileri geliştirilmektedir (Tsai ve ark., 2015). Çeşitli genom düzenleme sistemleri içinde, CRISPR sistemlerinin üretilmesi nispeten basit, kullanımı kolay ve düşük maliyetli olması diğer yöntemlere göre avantajlı sayılmakla beraber, avantaj ve dezavantajları ortaya koymak için kapsamlı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır (Fu ve ark., 2013; Li ve ark., 2013).

Prokaryotlarda doğal CRISPR sisteminin varlığının kanıtlanmasından sonra araştırmacılar mekanizmasını anlamak üzere çalışmalara yoğunlaşmışlardır. 2010 yılına kadar bakterilerde tip I, II ve tip III olmak üzere üç CRISPR sistemi tespit edilmişse de günümüze kadar yapılan çalışmalarla CRISPR-Cas sistemi, efektör nükleaz genlerinin bileşimine göre fonksiyonel olarak iki sınıfa ayrılır. Sınıf 1 CRISPR sistemi, efektör nükleaz komplekslerinin çoklu alt birimleri ile karakterize edilir ve tip I, III ve IV CRISPR sistemlerini içerir (Şekil 1.11). Sınıf 1'in genom düzenleme aracı olarak rutin uygulamaları, fonksiyonel bir vektörde veya bir ribonükleoprotein protein (RNP) kompleksinin kullanımında sistemin klonlanmasındaki kısıtlamalar nedeniyle sınırlandırılmıştır. Ancak CRISPR sisteminin aydınlatılması aşamasında Tip I–III üzerinde en çok çalışılan gruplardır (Moon ve ark., 2019).

Sınıf 2 CRISPR sistemi, Cas9 gibi tek bir efektör proteinden oluşur ve crRNA öncesi işlem için gerekli faktörlere ve efektör proteini oluşturan alanların çeşitliliğine göre tip II, V ve VI alt sınıflara ayrılır (Moon ve ark., 2019) (Şekil 1.11). Genom düzenleme aracı olarak kullanımı kabul gören Tip II CRISPR sistemine ilerleyen bölümde detaylı olarak yer verilecektir.



Şekil 1.11. Sınıf 1 (A) CRISPR-Cas sistemlerinin sınıflandırması ve izole edildikleri bakteriler (Koonin ve ark., 2017).



Şekil 1.11.(Devam) Sınıf 2 (B) CRISPR-Cas sistemlerinin sınıflandırması ve izole edildikleri bakteriler (Koonin ve ark., 2017).

Cas proteinleri oldukça değişken bir gruptur. Cas 1 ve Cas2 proteinleri tüm CRISPR-Cas sistemlerinde bulunurken, diğer Cas proteinleri sadece belirli tipteki CRISPR-Cas sistemleri ile ilişkilidir (Rath ve ark., 2015).

Tip I CRISPR-Cas sistemleri hedefin parçalanmasından sorumlu hem helikaz hem de DNAaz bölgelerini içeren bir protein olan Cas3'ün varlığı ile tanımlanır (Sinkunas ve ark., 2011). Tip I CRISPR-Cas sistemleri Kaskat benzeri bir kompleksi

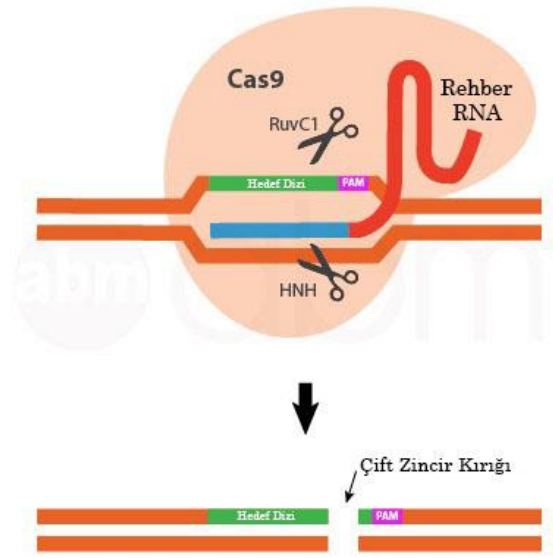
kodlar. Kaskat crRNA'ya bağlanır ve hedefi bulduktan sonra Cas3 proteini devreye girerek yabancı DNA'yı keser (Makarova ve Koonin, 2015).

Tip II CRISPR-Cas sistemi ise diğer sistemlerden farklı olarak sadece crRNA'ya değil aynı zamanda öncül RNA'daki tekrar dizilerine tamamlayıcı tracrRNA'ya ve öncül crRNA ve tracrRNA'nın oluşturduğu hibrit yapıyı tanıyarak bağlanan bir ribonukleaz olan RNaz III'e ve Cas9 proteinine ihtiyaç duyar (Deltcheva ve ark., 2011). Tip II CRISPR-Cas sisteminde hedef DNA'yı tanıyan, ona bağlanan ve kesimini sağlayan tek Cas enziminin Cas9 olduğu bildirilmiştir. Yaklaşık 800-1400 aminoasitten oluşan Cas9 RuvC-benzeri nükleaz (RNase H fold) ve HNH olmak üzere iki nükleaz bölge içerir. Bu iki nükleaz hedef DNA kesimi için gereklidir (Makarova ve Koonin, 2015).

Tip III CRISPR-Cas sistemleri fonksiyonu tam olarak bilinmeyen Cas10 proteinini içerir. Başlangıçta polimeraz olduğu düşünülen Cas10'un yapısında günümüzde The histidine-aspartate (HD) bölgesi, C-terminal bölgesi, palm polimeraz bölgesi ve N-terminal siklaz benzeri bölge olmak üzere 4 farklı bölge tanımlanmıştır (Liu ve ark., 2019). Tüm tip I ve Tip II sistemleri DNA'yı hedef alırken Tip III sistemleri DNA ve/veya RNA'yı hedef alır. DNA veya RNA hedefleri için spesifitelerine bağlı olarak Tip III-A (CSM) ve Tip III-B (CMR) olarak alt sınıflanırlar. Cas proteinlerinin çoğu kaskata benzeyen Csm veya Cmr komplekslerine dönüşür, hedefi tanır ve keser (Rouillon ve ark., 2013). İlk bulgular Csm komplekslerinin DNA'yı (Marraffini ve Sontheimer, 2008) ve Cmr komplekslerinin RNA'yı hedef aldığı yönündedir (Zebec ve ark., 2014) ancak aynı Cmr kompleksi tarafından hem DNA'nın hemde RNA'nın hedef alınması *S.islandicus* 'ta gösterilmiştir (Peng ve ark., 2015).

1.3.3.1. Tip II CRISPR-Cas9 Sistemi ile Genom Düzenleme

Günümüzde, CRISPR-Cas9 teknolojisi kullanılarak yapılan genom düzenleme bir endonükleaz ve kısa bir kılavuz RNA olmak üzere iki bileşene sahiptir (Şekil 1.12). Endonükleaz, *Streptococcus pyogenes* kaynaklı bakteriyel Cas9 nükleaz proteinidir. Cas9 nükleazı, çift sarmallı DNA'yı kesen RuvC ve His-Asn-His (HNH) benzeri nükleaz alanı olarak iki DNA bölünme alanı içerir. HNH, tamamlayıcı cRNA sarmalının bir ipliğini keserken, RuvC bölgesi sarmalın karşıt ipliğini keser (Manghwar ve ark., 2019) gRNA'nın 5' ucundaki son 20 baz çifti, Cas9/gRNA kompleksini PAM dizisinin hemen yukasındaki uygun hedef diziye yönlendirme görevini yapar. PAM tanıma dizisi, türlere ve Cas9 nükleazının türetildiği bakteri türüne bağlı olarak değişir (Çizelge 1.1). *Streptococcus pyogenes* Cas9 için dizi, 5'-NGG'dir (Sander ve Joung, 2014). Çeşitli türlerden farklı PAM dizilerine sahip değişik Cas9 proteinleri karakterize edilmiştir (Ma ve ark., 2014). Farklı PAM dizilerine sahip çeşitli Cas proteinleri aynı anda birkaç tane hedefi modifiye etmek için kullanılabilir. Buradaki en önemli etken hedefe komşu PAM dizisinin gerekliliğidir. (Rath ve ark., 2015). PAM dizisi ve rehber RNA'nın yokluğunda Cas9 hedef diziye bağlanamaz dolayısıyla istenilen bölgedeki kesimi yapamaz (Kleinstiver ve ark., 2015).



Şekil 1.12. CRISPR-Cas 9 bileşenleri (abmgood.com)

CRISPR-Cas9 yönteminde doğal olarak sentezlenen crRNA ve tracrRNA ilk olarak, 2012 yılında Charpentier ve Doudna tarafından *Streptococcus pyogenes*'te yapılan bir çalışma kapsamında birleştirilmiş ve Watson Crick baz eşleşmesi yoluyla spesifik genomik bölgelere karşı Cas9 nükleazını aktif hale getiren tek bir rehber RNA (single guide, sgRNA) üretilmiştir. Bu yapay rehber RNA aracılığı ile spesifik hedeflerde DNA kesimi yapılabildiğinin bulunmasıyla genom düzenlemede yeni bir döneme girilmiştir (Jinek ve ark., 2012).

Çizelge 1.1. Cas nükleazların farklı tür ve alt tiplerinden PAM dizileri(Sander ve Joung, 2014).

Tür	Subtip	PAM Dizisi
<i>S.pyogenes</i>	II	5'-NGG
<i>S.solfataricus</i>	I-A1	5'-CCN
<i>S.solfataricus</i>	I-A2	5'-TCN
<i>H.walsbyi</i>	I-B	5'-TTC
<i>E.coli</i>	I-E	5'-AWG
<i>E.coli</i>	I-F	5'-CC
<i>P.aeruginosa</i>	I-F	5'-CC
<i>S.thermophilus</i>	II-A	5'-NNAGAA
<i>S.agelactiae</i>	II-A	5'-NGG

CRISPR-Cas9 aracılığıyla genom düzenlemede, memeli hücresi, Cas9 nükleazını ve hedef bölgeye özgü tasarlanmış rehber RNA'yı ifade eden vektör ile transfekte edilir. Rehber RNA Cas9 ile kompleks oluşturur ve Cas9'u hedef diziyeye getirir. Cas9 proteini hedef bölgeye bağlandıktan sonra, Cas9 nükleaz, RuvC ve HNH iki nükleaz alanının aktivasyonuna yol açan yapısal değişikliklere uğrar ve bu da gen düzenleme araçları için önemli bir özellik olan çift sarmal DNA'da kırılmaya neden olur. CRISPR-Cas9 genom düzenleme teknolojisi de diğer genom düzenleme araçları gibi genomda değişiklik yapmak için NHEJ ya da HDR DNA onarım mekanizmalarını kullanır (Cooper GM, 2016). Genom düzenlemede knock out oluşturmak için NHEJ, hedef dizide knock in oluşturmak için daha kompleks olan HDR kullanılmaktadır. Hedeflenen genomik bölgeye homolog olan diziyi içeren bir kalıp DNA gönderildiğinde HDR mekanizması ile gönderilen dizi hedef bölgeye entegre olur (Shen ve ark., 2017).

1.3.3.2. CRISPR-Cas Sisteminin Etkinliğini Etkileyen Faktörler

CRISPR gibi güçlü moleküler araçların, etkili ve güvenli klinik uygulamalarda, özellikle in vivo insan gen tedavisinde kullanılacağı durumlarda göz önüne alınması gereken faktörler vardır. Bu faktörler; hedef DNA alan seçimi, hedeflenen genoma spesifik gRNA ve Cas9 özgülüklerinin dikkatle tasarlanması, hedef dışı kesme konularını içermektedir. Ayrıca CRISPR sisteminin in vivo uygulamalar için mevcut olan taşıma araçlarının kullanımı da sorun oluşturabilmektedir (Lino ve ark., 2018). CRISPR-Cas sisteminin etkinliğini etkileyen başlıca faktörler aşağıda özetlenmektedir.

Hedef DNA Alan Seçimi ve gRNA Tasarımı: CRISPR-Cas9 sisteminin en büyük avantajı, herhangi bir DNA sarmalındaki PAM motifini taşıyan 23 bp'lik sekansı hedef alabilme yeteneğidir. Bu bilgi bize hedef bölge seçiminde en önemli ihtiyacın PAM dizisi olduğunu göstermektedir (Ramakrishna ve ark., 2014) (Şekil 1.13). Genom genelinde çok miktarda *S. pyogenes* Cas9'a ait PAM dizisi bulunmasına karşın belirli bir geni hedeflemek için PAM'ın konumunun doğru olmaması gen düzenleme uygulamalarını kısıtlamaktadır. Daha önce belirtildiği gibi

farklı türlerden elde edilen, farklı PAM dizilerine sahip değişik Cas9 proteinlerinin varlığı, hedef dizi seçilimi açısından esneklik sağlamıştır. Bu esneklik spesifitesi değiştirilmiş PAM dizileri ile yeni Cas9 protein varyantlarının tasarımı mümkün kılınmıştır (Kleinstiver ve ark., 2015). *S.pyogenes*'ten izole edilen SpCas9 proteininin VGR, EQR ve VRER varyantlarının sırasıyla 50-NGAN-30, 50-NGAG-30 ve 50-NGCG-30 PAM dizilerine sahip olması bu duruma örnek verilebilir (Lino ve ark., 2018). Hedef alan seçiminde tek ve çoklu baz uyumsuzlukları tolere edilebilse de, PAM dizisine daha uzak olan uyumsuzlukların daha iyi tolere edildiği bir çok yayında bildirilmiştir (Fu ve ark., 2013; Wang ve ark., 2014; Xu ve ark., 2015).



Şekil 1.13. PAM dizisi; CRISPR-Cas9 kullanılarak yapılan başarılı genom düzenlemesi, gRNA dizisine ve PAM dizisine bağlıdır. Genom düzenleme için sadece PAM dizisinin hemen ardından takip eden hedef diziler hedeflenmektedir (abmgood.com).

Bir kimerik gRNA; 5' ucunda bir crRNA türevi bölge ve 3' ucunda bir tracrRNA türevi bölgeden oluşur. Her iki bölgede de çeşitli modifikasyonların varlığı bildirilmiştir (Sander ve Joung, 2014). gRNA'nın özgünlüğü PAM dizisine olan mesafesi ile ilişkilidir. PAM dizisinden uzaklaştıkça hedefe özgünlüğü azalır. gRNA, Cas9 proteinini PAM dizisinin 5'NGG ucuna yakın 20 nükleotitik hedef bölgeye yönlendirmek için tasarlanır. Böylece, bir hedef bölgeye karşılık gelecek şekilde tasarlanmış bir gRNA'nın ilk 20 bazının değiştirilmesi N20-NGG formundaki herhangi bir DNA sekansına indel mutasyonlar ekleyebilir (Hsu ve ark., 2013).

Hedef dizi seçimi ve gRNA'nın rasyonel tasarımının birçok kriteri olduğu, basit bir kural ile yapılamayacağı ve öngörüldüğü kadar kolay olmadığı çok fazla sayıda çalışmaya konu olmuştur (Hsu ve ark., 2013; Pattanayak ve ark., 2013; Doench ve ark., 2014; Moreno-Mateos ve ark., 2015). sgRNA tasarımında stabilite

üzerine yapılan bir çalışmada tasarlanan dizinin guanin bazı bakımından zengin, adenin bazı bakımından zayıf olmasının sgRNA dizisinin stabilitesini arttırdığı gözlenmiştir (Moreno-Mateos ve ark., 2015). Rehber RNA tasarımındaki diğer hassas konu ise transkripsiyon sonlandırıcı olarak çalışan poli-T dizileri içeren bölgenin seçiminden kaçınılmasıdır. Günümüzde gRNA tasarımı kolaylaştıran araç ve yazılım paketleri mevcuttur. Feng Zhang laboratuvarı tarafından geliştirilen CRISPR Tasarım Aracı <http://crispr.mit.edu/> gRNA'yı tasarlamak ve değerlendirmek için en yaygın kullanılan kaynaktır (Ran ve ark., 2013). CRISPR Tasarım Aracı yalnızca tasarım için değil, aynı zamanda hedef dışı bölgeleri çeşitli türlerin genomlarında aramak için de kullanılır. ZiFiT Targeter (<http://zifit.partners.org/ZiFiT/>), Zinc Finger web sitesinde mevcut olup gRNA'ların tasarımında yaygın olarak kullanılmaktadır (Fu ve ark., 2014; Hwang ve ark., 2013). Çevrimiçi ve ücretsiz olarak ulaşılabilen bazı araçlar listelenmiştir.

- E-CRISP(<http://www.e-crisp.org/E-CRISP/>)
- CRISPRdirect (<http://crispr.dbcls.jp/>)
- CRISPR Optimal Target Finder (<http://tools.flycrispr.molbio.wisc.edu/targetFinder/>)
- Cas-OFFinder (<http://www.rgenome.net/cas-offinder/>)
- CHOPCHOP (<https://chopchop.cbu.uib.no/>)

Cas9 Aktivitesi: Gen düzenleme sistemi için yapılan tasarımların bir parçası olan Cas9 seçiminin özgünlüğü, hedef dizi için daha iyi gen düzenlemesi sağlayabilir. Cas9'un hedef diziyi kesebilmesi için, rehber RNA ile hedef dizinin büyük oranda eşleşmesi gereklidir (Lino ve ark., 2018).

Streptococcus pyogenes (SpCas9) birçok farklı hücre tipinde gen düzenlemede kullanılmak üzere modifiye edilmişken, *Staphylococcus aureus* (SaCas9) (Ran ve ark., 2013), *Neisseria meningitidis* (NmCas9) (Hou ve ark., 2013) ve *S.thermophiles*(StCas9) dahil olmak üzere farklı türler için değişik Cas9 proteinleri

de tanımlanmış ve gen düzenlemesi uygulamalarında kullanılmıştır. Her birinin farklı PAM dizisi ve değişken aktivitesi bulunmaktadır (Kleinstiver ve ark., 2015). Ökaryotik hücrelerde gen düzenlemesi için Cas9 proteini çekirdeğe yapışmalıdır. Bu sistemlerde nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) Cas9 proteinine bağlıdır. Cas9 nükleer lokalizasyonunun, başarısını arttırmak için NLS ve Cas9 arasında 32 aminoasit aralayıcı eklenmesi NLS'ye erişimi arttırmıştır (Shen ve ark., 2013). Kimerik RNA'nın konformasyonu Cas9 kompleksinin aktivitesini arttırmaktadır. sgRNA konsantrasyonunun arttırılması Cas9 proteininin aktif ribonükleoprotein kompleksi oluşturmasını sağlayarak hedef kesme aktivitesini arttırdığı gösterilirken (Kim ve ark., 2014), fazla sgRNA'nın hedef dışı etkileri arttırdığı da gösterilmiştir (Fu ve ark., 2013).

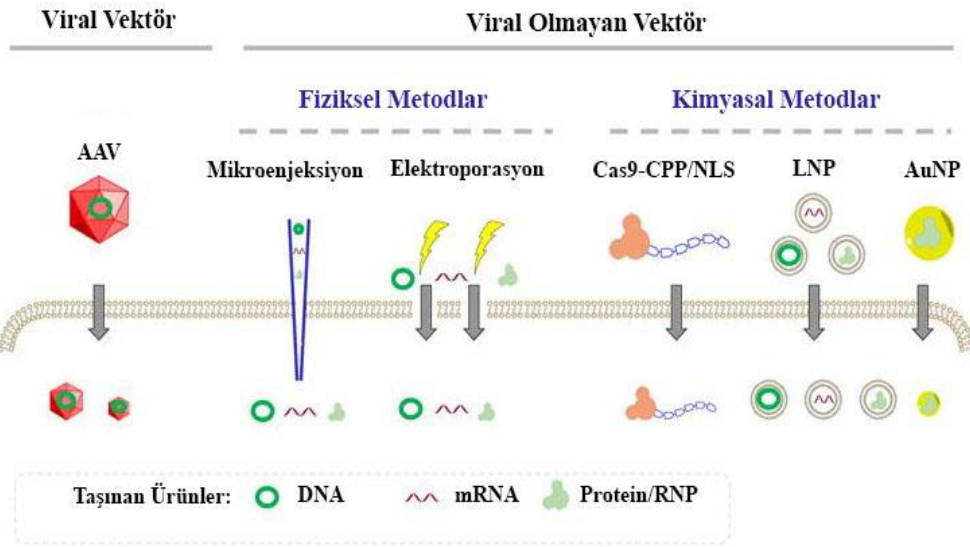
Hedef Dışı Kesme: CRISPR-Cas9 uygulamalarında rehber RNA/Cas9 kompleksinin hedef bölge dışında genomdaki başka bölgelere bağlanması istenmeyen bir durumdur. Hedef bölgenin genomdaki başka bir bölge ile homoloji içermeyecek şekilde seçilmesi, sgRNA tasarımının ve Cas9 spesifitesinin geliştirilmesine ek olarak hedef dışı kesmenin azaltılmasına yönelik çabalar mutant Cas9 sisteminin tasarımı ile sonuçlanmıştır. Cas9 proteini tek başına hedef dışı etkilere neden olmamasına rağmen, mutant Cas9 tekniğinin geliştirilmesi bu etkileri sınırlandırmıştır. Bir mutant sistem, Cas9 proteinini bozduğunda sadece tek bir DNA sarmalında kırıklar oluşur. Sonrasında nickaz CRISPR-Cas9 adlı enzim DNA dizisinin ilerisinde bir Cas9 ile bağlanıp eşleşmek için kullanılır ve diğer Cas9 bağlanması da DNA dizisinin tersine gerçekleşerek hedef bölgeye saldırır. Bağlanma sadece bu konfigürasyonda iken kırık alanların birlikte hareketi sonucu DSB oluşur. Hedef dışı kesme sadece tek sarmal kesigidir ve basit bir DNA ligaz ile onarılabilir. Bu sistemin memeli hücrelerinde kullanılması hedef dışı kesimi 10^3 misli azaltırken, hedefli kesmelerin etkinliğini çok az veya hiç azaltmamıştır (Lino ve ark., 2018).

CRISPR Taşıma Sistemleri: CRISPR-Cas9 kompetentlerinin taşınması için en yaygın olarak kullanılan taşıma sistemi taşınan ürün ve taşıma aracı olarak iki ana kategoriye ayrılır. Crispr-Cas9 sisteminde taşınan ürünler, Cas9-gRNA

komplekslerini kodlayan DNA plazmidi, mRNA molekülü ve rehber RNA ile Cas9 proteini (ribonükleoprotein) kompleksidir (Shui ve ark., 2016).

CRISPR aracılı gen düzenlemesini sağlamak için, hücre çekirdeğinde fonksiyonel bir Cas9-gRNA ribonükleoprotein (RNP) kompleksi olmalıdır. Bu RNP kompleksinin doğrudan verilmesi en basit seçenek gibi görünse de, hücre zarı boyunca büyük bir protein verilmesi son derece zor olabilir. Bu nedenle, hedef hücreye kendi Cas9 proteinini in-situ üretmesi talimatını vermek için genetik materyal sağlamaya odaklanılmıştır. DNA, bir plazmid formunda veya bir viral genomda kodlanmış olarak ya da mRNA şeklinde verilerek, hedef hücrenin içinde Cas9 proteininin ekspresyonuna yol açabilir ve sonuç olarak Cas9 aracılı gen düzenlemesine yol açabilir (Liang ve ark., 2015)

Gen düzenleme sisteminin bileşenlerini taşıyan araçlar; viral vektörler ve non viral vektörler olmak üzere iki genel grup altında sınıflandırılır. Viral taşıma vektörleri, spesifik olarak tasarlanmış adeno ilişkili viral vektörler (AAV), Adenoviral vektörler (Adv) ve lentiviral vektör (LV) taşıyıcılarını içermektedir (Chen ve Gonçalves, 2016). Non viral vektör sistemleri, fiziksel ve kimyasal taşıma metodları olarak ayrılır. En yaygın fiziksel taşıma metodları mikroyenjeksiyon ve elektroporasyon olmasına karşın hidrodinamik taşıma gibi metotlar da kullanılmaktadır. Kimyasal taşıma metodları lipid nanopartikülleri, hücreye penetre olan peptitleri (CCPs), DNA ‘nanoclews’ nanopartikülleri içermektedir (Lino ve ark., 2018; Glass ve ark., 2018). (Şekil 1.14). Viral olmayan vektörler, viral vektörlere karşı bazı avantajlara sahip olsalar da viral vektörler kadar öne çıkmamaktadırlar.



Şekil 1.14 CRISPR-Cas9 bileşenleri taşıma araçları: CRISPR bileşenlerini hücre zarında başarılı bir şekilde iletmek için çeşitli viral ve viral olmayan yöntemler türetilmiştir.

Viral olmayan taşıma sistemleri kimyasal ve fiziksel sistemler olarak ikiye ayrılmaktadır. Kimyasal taşıma metodlarından en sık kullanılanı ise lipid bazlı taşıyıcılardır. Lipid bazlı taşıyıcılar, CRISPR DNA, mRNA veya RNP'ler için popüler ve verimli bir iletim sistemidir. Lipidler, hidrofilik bir gövde ve uzun zincirli hidrofobik bir kuyruk grubundan oluşan amfifilik organik moleküllerdir. Sulu çözeltide, lipidler hidrofobik kuyruklarını çözücüden korumak için kendiliğinden nanopartiküller oluştururlar. Nükleik asitler tipik olarak hücrelerin dışında kararsızdır ve yüksek anyonik yapıları nedeniyle hücre zarından kolayca geçmezler. Nükleik asitleri nükleinazdan korumak ve nispeten hücreye taşımını kolaylaştırmak için katyonik lipozomlar içinde kapsüllenerek verilirler (Yang ve ark., 2014). Katyonik lipidler, sahip oldukları pozitif yüklü yüzey nedeniyle DNA veya mRNA gibi negatif yüklü yüklere sahip bir kompleks oluşturmada özellikle etkilidir. Cas9 RNP'lerde, negatif yüklü gRNA molekülü, katyonik lipidlerde kapsüllenmeyi kolaylaştırır (Glass ve ark., 2018).

En yaygın olarak kullanılan lipid nanoparçacık sistemi, piyasada bulunan lipozom formülasyonudur. Lipozom reaktiflerinin geliştirilmesiyle DNA ve RNA transfeksiyonu temel araştırmalarda rutin bir teknik haline gelmiştir. Reaktiflerin

temel prensibi; DNA'ya bağlanarak DNA'ya net bir pozitif yük vermektir (Zuris ve ark., 2015).

Kullanılan bir başka yaklaşım da Cas proteini, DNA veya RNA'nın polimerik taşıyıcılar içine kapsüllenmesidir. Zitteriyonik amino lipidler, polietilenimin (PEI) ve poli-L-lizin (PLL) kullanılan polimerik vektörlerdir. Tüm bu yaklaşımlarda kullanılan vektörler negatif yüklü hücre zarına güçlü bir şekilde bağlanır ve hücreye endositozu indükler. Lipid kapsülleme gibi, polimerik kapsülleme de yükü in-vivo bozunma yollarından korur (Glass ve ark., 2018).

Hücreye nüfuz eden peptitler (Cell-penetrating peptide, CCP), polikasyonik kısa aminoasit uzantılarıdır. Spesifik CRISPR-Cas9 uygulamalarında, CPP'ler genellikle doğrudan Cas9 proteinine kovalent olarak bağlanır, daha sonra sgRNA ile kompleks hale getirilir ve hücrelere verilir. CPP ile iletimde plazmidsiz ve ek transfeksiyon reaktifsiz bir yöntem sunulmuştur (Ramakrishna ve ark., 2014).

CRISPR bileşenleri altın, silis ve karbon nanotüpler gibi inorganik malzemelerden oluşan nanoparçacıklarla kompleksleme yoluyla da verilebilir. Lipidlerin veya polimer taşıyıcıların aksine, nanoparçacıklar son derece kolloidal olarak stabildir (Rohiwal ve ark., 2020).

CRISPR-Cas9-ribonükleoprotein (Cas9-RNP) iletimi yoluyla genom düzenleme, istenmeyen gen hedeflemesini azalttığından ve gen iletim stratejileri yoluyla oluşabilecek mutajenezi önlediğinden birçok çalışmanın konusu olmuştur. Ancak Cas9-RNP'nin sitozole doğrudan ve etkili bir şekilde verilmesi, ardından çekirdeğe translokasyonu hala bir zorluk olmaya devam etmektedir (Mout ve ark., 2017). Cas9 RNP'nin aktarımında Lipofektamin ve polietilenimin (PEI) en başarılı dağıtım araçlarıdır. Bu dağıtım araçları Cas9 RNP'yi, NHEJ yoluyla nakavt etmek için başarılı iken in-vivo HDR'yi indüklemek için lipid ürünleri veya PEI uygulamasının başarısı kanıtlanmamıştır (Lee ve ark., 2017). Bu nedenle, aynı anda Cas9-RNP ve donör DNA'nın hücrelere birlikte verilmesine dayanan ve HDR'yi in

vivo indükleyebilen altın nanoparçacık adı verilen yüksek verimli bir düzenleme stratejisi geliştirilmiştir (Mout ve ark., 2017; Lee ve ark., 2017)

Viral olmayan taşıma sistemlerinden bir diğeri fiziksel sistemlerdir ve mikroyenjeksiyon, elektroporasyon ve hidrodinamik taşıma olarak üçe ayrılmaktadır. Mikroyenjeksiyon, hücreye CRISPR bileşenlerinin taşınmasında yüksek etkinliğiyle ‘altın standart’ teknik olarak görülmektedir. Bu teknikte Cas9 proteini ile sgRNA tek bir hücreye direkt olarak enjekte edilir (Yang ve ark., 2013). İn vitro ve ex vivo çalışmalar için uygun olan bu metot hücre içine taşınan bileşenlerin moleköl ağırlığında kısıtlama yaratmaz. Bu özelliğı ile viral vektör taşıma sistemlerine üstünlük sağlar. Mikroyenjeksiyon ile CRISPR bileşenlerinin hücre içinde aktarımında pronükleusa DNA enjeksiyonu, pronükleusa RNA enjeksiyonu ve sitoplazmaya RNA enjeksiyonu gibi farklı metotlar denenmiş ve sitoplazmaya RNA enjeksiyonunun, canlı blastosist evre embriyolarının ve üretilen yavruların sayısının fazlalığı açısından en etkili yöntem olduğı bulunmuştur (Horii ve ark., 2014).

Elektroporasyon, hücre popölasyonlarına gen düzenleme araçlarının taşınması için kullanılan en eski fiziksel metotlardan bir tanesidir. Bu teknik, hücrelerin hücre membranlarında nanometre boyutunda geçici gözenekler açmak için elektrik akımını kullanır. Böylece hidrodinamik çapı nanometre olarak ifade edilebilecek kadar küçük komponentler hücre içine girebilir (Gehl, 2003). Elektroporasyon diğey taşıma tekniklerine kıyasla hücre tipine daha az bağımlıdır. Memeli hücreleri belirli voltajlara ve akım uygulama zamanlarına hassasiyet gösterirken bakteri hücrelerinin elektroporasyona daha fazla toleransı vardır (Lino ve ark., 2018).

CRSPR/Cas9 sistemi bileşenlerinin memeli hücrelerinin çekirdeklerine direkt olarak taşınmasını sağlayan özelleştirilmiş elektroporasyon metotları tasarlanmıştır. Nukleofeksiyon olarak adlandırılan bu teknik taşınanların çekirdek içine girmesi için nükleer zarfın parçalanmasına ya da hücrelerin bölünme evresinde olmasına ihtiyaç duymaz. Fare spermatogonyal kök hücrelerinde katarakta neden olan mutasyonların düzeltilmesinde Cas9 ve sgRNA’yı kodlayan DNA plazmidi nükleofeksiyon metodu kullanılarak taşınmıştır (Wu ve ark., 2015b). Ayrıca, in-vivo genom düzenlemede

yüksek verimlilik ile fare zigotlarına Cas9 / sgRNA ribonükleoproteinler vermek için basit ve ekonomik elektroporasyon tabanlı CRISPR Ribonükleoprotein Electroporation Zygotes (CRISPR-EZ) olarak adlandırılan bir strateji geliştirilmiştir. CRISPR-EZ, mikroenjeksiyona kıyasla embriyo canlılığında önemli bir iyileşme ile in-vivo olarak yüksek verimli genom düzenlemesine olanak tanımıştır (Chen ve ark., 2016).

Hidrodinamik taşıma, gen düzenleme bileşenlerini içeren solüsyonun hızlı bir şekilde vucut ağırlığının %8-10'u kadar hacimle hayvanın kan dolaşımına verildiği in-vivo taşıma tekniğidir. Taşımanın temeli yüksek miktarda sıvı uygulanması ile hücrede hidrodinamik basınç artmasına dayanır. Artan basınç etkisiyle hücrelerde geçici olarak geçirgenliğin artması sonucu normal olarak hücre membranını geçemeyecek taşınanların hücre içine girmesi sağlanır (Lino ve ark., 2018). Bu metodun kullanılması karaciğer için oldukça yaygındır ayrıca böbrek, kalp, akciğer hücreleri içinde kullanılır (Guan ve ark., 2016). Başarılı hidrodinamik taşıma uygulamalarına rağmen bu metot, kan basıncının yükselmesi, karaciğer büyümesi ve kardiyak disfonksiyon gibi fizyolojik komplikasyonlara sebep olabileceğinden, transfeksiyon oranı düşük olduğundan ve sadece belirli hücre tiplerinde taşımaya uygun olduğundan çok tercih edilmemektedir (Bonamassa ve ark., 2011).

Evrimsel süreçte virusların hücreye girişi, kendi genetik materyallerinin uzun süre korunması ve konakçı organizmada koruyucu mekanizmaların baskılanması veya modifikasyonu için çeşitli mekanizmalar geliştirmiş olmaları nedeniyle CRISPR-Cas9'un iletimi için çeşitli viral uygulama sistemleri geliştirilmiştir. Bu özellikleri ile viral vektörler, gen düzenleme iletimi için umut verici yöntemlerden biri olmuştur (Lukashev ve Zamyatnin, 2016). Genom düzenlemede; Adeno ilişkili vektörler, Adenovektörler ve Lentiviral vektörler yaygın olarak kullanılmaktadır.

Diğer viral vektörlere kıyasla nispeten düşük immünojenik özellikleri ve yüksek verimleri nedeniyle, adeno ilişkili viral vektörler (AAV) gen terapisi araştırmaları için popüler vektörlerdendir (McClements ve MacLaren, 2017). *Dependovirus* cinsi ve *Parvoviridae* ailesinden olan AAV, ~ 4.7 kilobaz (kb)

uzunluğunda genomları olan, tek zincirli küçük zarfsız DNA virüsleridir. Çoğalmak ve enfeksiyon oluşturmak için adenovirüs ya da herpes virüsüne ihtiyaçları vardır. AAV bazlı vektörler bir genom içine entegre olmadan CRISPR bileşenlerini taşıdığından, genotoksik etkisi yoktur (Wu ve ark., 2010; Lukashev ve Zamyatnin, 2016).

AAV vektörlerinin önemli bir sınırlaması, genellikle <5 kb olarak kabul edilen küçük paketleme kapasiteleridir. Bu sınırlama, daha büyük gen dizisine sahip olan CRISPR- Cas9 sistemlerinin vektör tasarımı zorlaştırır. SpCas9 ve sgRNA'yı iki ayrı AAV parçacığına paketleme gibi alternatif paketleme stratejileri geliştirilmiş ve başarılı sonuçlar bildirmiştir (Swiech ve ark., 2015; Hung ve ark., 2016). Benzer bir yaklaşımda, Cas9 C-terminalinin bir AAV vektörüne paketlenmesi ve Cas9 N-terminalinin ikinci bir AAV vektörüne paketlenmesi bir bölünmüş Cas9 sistemi geliştirilerek AAV partikülleri ile daha büyük Cas9 varyantlarının kullanılması mümkün hale gelmiştir (Chew ve ark., 2016). En sık kullanılan *Streptococcus pyogenes* Cas9'un (SpCas9, ~ 4.2kb) ve sgRNA'sının tek bir vektörde AAV vektörüne paketlenmesi zordur. AAV'nin küçük kapasite engeli, daha küçük Cas9 varyantlarının kullanılmasıyla aşılmaya çalışılmıştır (Yin ve ark., 2016). *S. aureus*'un Cas9 sürümünün kullanıldığı bir çalışmada, Cas9'un bu versiyonu, aynı güçlü kesme kabiliyetini korurken, SpCas9'un kabaca % 70'i kadardır ve boyuttaki azalma AAV parçacığı içinde ~1 kB 'boş alan' bırakır (Ran ve ark., 2015). Bununla birlikte, bugüne kadar tanımlanan daha kısa Cas9 varyantlarının daha uzun PAM sekanslarına ve dolayısıyla hedef dizi seçiminde daha büyük sınırlamalara sahip olduğuna dikkat edilmelidir (Lino ve ark., 2018).

Adenoviral (Adv) ve Lentiviral (LV) vektörler birbirlerinden farklı olsalar da, CRISPR-Cas9 bileşenlerinin taşınması için kullanım şekilleri benzerdir. LV / Adv iletimi ile AAV iletimi arasındaki en büyük fark parçacığın boyutudur; hem LV'ler hem de Adv'ler kabaca 80-100 nm çapındadır. AAV'nin ~20 nm çapıyla karşılaştırıldığında, bu sistemlerde daha büyük dizilerin taşınması mümkündür. Lentiviral vektörler transkripsiyonel olarak aktif genomik bölgelere entegre olduğu

için stabil transfeksiyon oluşturabilirler. Adenoviral vektörlerin ise hücre genomu entegre olma oranı düşüktür (Lino ve ark., 2018).

LV veya AdV iletim sistemlerinin dezavantajları, güçlü bağışıklık tepkileri ortaya çıkarmalarıdır (Wang ve ark., 2015). Viral vektörler her zaman hedeflenen konuma hassas değildir. Bu ekspresyonun ve hedef dışı etkilerin artmasına veya hatta yerleştirmenin önemli bir hücresel protein içinde rastgele meydana gelmesi durumunda hücrede potansiyel hasara yol açabilir. Viral vektörler gen düzenleme için kullanılırken her zaman dikkatli olunması önerilmiştir (Papapetrou ve Schambach, 2016). Yaygın olarak kullanılan CRISPR taşıma sistemlerinin sahip olduğu avantaj ve dezavantajları Çizelge 1.2’de verilmiştir.

Taşınan ürün cinsinden ve taşıma yönteminden bağımsız olarak, bu yaklaşımların her biri hücre zarını geçme engeliyle karşı karşıyadır. Cas9 proteininin büyük bir molekül olması (~ 160 kDa) ve gRNA'nın uzun fosfat omurgasının negatif yüklü olması, hücre zarından hücreye girişi zorlaştırmaktadır. Diğer bir zorluk ise terapötik etkinliğin sağlanması için CRISPR bileşenlerinin uygun dozajının hedefe istenen zaman aralığında verilmesi gerektiğidir. Bu uygulama, istenmeyen hedef dışı gen düzenleme olaylarını önlemek için istenen dokulara spesifik olmalıdır (Glass ve ark., 2018).

Çizelge 1.2. CRISPR taşıma sistemlerinin karşılaştırılması

Taşıma yöntemi	Taşıma aracı	Taşınan ürün	Paketleme kapasitesi	Avantajları	Dezavantajları
Mikroenjeksiyon	iğne	DNA plasmidi; mRNA Protein (RNP)	Cas9 ve sgRNA'nın nM seviyeleri	İlgilenilen hücreye garantili aktarım	zor; sadece in vitro uygulama
Elektroporasyon; nukleofeksiyon	Elektrik akımı	DNA plasmidi; mRNA)	Cas9 ve sgRNA'nın nM seviyeleri	Hücre popülasyonuna dağıtım; iyi bilinen bir teknik oluşu	Genellikle in vitro
Hidrodinamik taşıma	Yüksek basınçlı enjeksiyon	DNA plasmidi; Protein (RNP)	Cas9 ve sgRNA'nın nM seviyeleri	Non-viral; düşük maliyetli	Spesifik değil; Dokularda travmatik
Adeno ilişkili virüs (AVV)	Zarfsız, ssDNA	DNA plasmidi	<5kb nükleik asit	Minimal immünojenite	Düşük kapasite
Adenovirüs	Zarfsız, ssDNA	DNA plasmidi	8kb nükleik asit	Yüksek verimli aktarım	Yüksek immun yanıt; üretim zorluğu
Lentivirüs	Zarflı, RNA	DNA plasmidi	18kb'ye kadar nükleik asit	Kalıcı gen transferi	Yüksek immun yanıt
Lipit nanopartikülleri	Doğal veya sentetik lipidler veya polimerler	mRNA Protein (RNP)	Cas9 ve sgRNA'nın nM seviyeleri	Non-viral; basit manipülasyon, düşük maliyetli	Yükün endozomal bozulması; spesifik hücre tropizmi
Cell-penetrating peptides(CPPs)	Kısa aminoasit dizileri	Protein (RNP)	Cas9 ve sgRNA'nın nM seviyeleri	Non-viral	Değişken nüfuz etme verimliliği

1.3.3.3. Genom Düzenlemenin Ötesinde CRISPR Sistemi

CRISPR sistemlerinin genom düzenleme haricinde, DNA dizisini değiştirmeksizin spesifik DNA bağlama özelliği nedeniyle, nükleik asit hedefleyen optik tanı kitlerinde, hedef gen transkripsiyonunun baskılanması ile CRISPR interferans (CRISPRi) ve hedef gen ifadesinin artırılması ile CRISPR aktivasyonu (CRISPRa) olarak adlandırılan önemli uygulamalarda kullanılabilecekleri

bildirilmiştir (Hajian ve ark., 2019). CRISPRi sistemi için geliştirilen deaktive edilmiş Cas9 enzimi (dCas9) hedef DNA dizisine bağlı kalmaya devam ederek RNA polimerazın ya da transkripsiyon faktörünün bağlanmasına engel olur. Böylece genomu değiştirmeden eş zamanlı olarak gen ifadesinin baskılanabileceği gösterilmiştir (Gilbert ve ark., 2014). dCas9 enziminin katalitik aktivitesini hassas baz düzenlemesi için kullanan Gaudelli ve ark. (2017), RNA adenozin deaminazı dCas9 proteinine bağlayarak hedeflenmiş bir şekilde insan hücrelerindeki AT baz çiftlerini GC baz çiftlerine dönüştürülmesini yaklaşık %50 etkinlikle göstermişlerdir (Gaudelli ve ark., 2017).

Son yıllarda çeşitli çalışmalarla CRISPR sistemlerinin optik temelli tanı amaçlı kullanımına yönelik farklı metotlar ortaya konulmuştur (Gootenberg ve ark., 2017; Li ve ark., 2018; Pardee ve ark., 2016). Pardee ve ark., (2016) Zika virüsünün çeşitli genotipleri arasındaki tek nükleotid çözünürlüğünü bile saptayabilen CRISPR-Cas9 aracılı bir yöntem geliştirmelerinden (Pardee ve ark., 2016) çok kısa bir süre sonra Gootenberg ve ark., (2017) RNA-klavuzlu RNA hedefleyen Cas13a içeren ve Cas13a kompleksinin hedef diziyle hibridizasyonu durumunda ortaya çıkan floresan sinyal aracılığıyla tanı sağlayan SHERLOCK (Specific High Sensitivity Enzymatic Reporter UnLOCKing) metodunu geliştirmişlerdir (Gootenberg ve ark., 2017). DNA'dan RNA çevrimini gerektirmesi gibi bir dezavantajı olan SHERLOCK metoduna alternatif olarak da Li ve ark., (2018) doğrudan DNA hedefleyen Cas12a'yı kullanan HOLMES metodunu yayınlamışlardır (Li ve ark., 2018). Günümüzde Zika, Dang, Japon ensefaliti, lenfositik koriomenenjit, influenza A ve veziküler stomatit gibi RNA virüsleri ile insan papilloma virüsü ve yalancı kuduz gibi DNA virüsleri SHERLOCK (Gootenberg ve ark., 2017), DTECTRE (Chen ve ark., 2018), HOLMES (Li ve ark., 2018) ve CARVER (Freije ve ark., 2019) metodları tarafından tespit edilebilmektedir.

2020 yılının ilk yarısında bir ssRNA virüsünün neden olduğu Corona Virüsü Hastalığı-2019'un (COVID-19) ortaya çıkması ile Metsky ve ark (2020), Cas13- aracılı SHERLOCK teknolojisini ve sentetik SARS-CoV-2 RNA'yı 10 kopya/

mikrolitre yoğunlukta bile pozitif sonuç veren bir metod geliştirmişlerdir (Metsky ve ark., 2020).

CRISPR tabanlı bu metodlar bulaşıcı hastalıklardan RNA ve DNA virüslerini tespit etmenin yanı sıra, dolaşımdaki tümör DNA'sı (ctDNA) gibi tümör kaynaklı nükleotitlerin saptanmasında (Jenkins ve ark., 2017), DNA metilasyon durumunu izlemede (Field ve ark., 2018), tekli nükleotid polimorfizmlerini belirlemede (Savage, 2019) ve microRNA (miRNA) saptamada (Wang ve ark., 2019) kullanılmaktadır.

Bu tez çalışmasında ise *Mus musculus* türüne ait B tipi spermatogonyal hücrelerde spermatogenezde rol oynayan *Tex15* geninin CRISPR-Cas9 sistemi kullanılarak knock out hale getirilmesi amaçlanmıştır. CRISPR-Cas9 yöntemiyle spermatogonyal kök hücrelerde bu genin düzenlenmesini sağlayan deney düzeneğinin optimizasyonu, bundan sonra primer SKH'lerde yapılacak genom düzeyinde düzenlemeleri ve in-vivo transplantasyonu için de önemli bir adım atılmasını sağlamıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada ticari fare spermatogonyal hücre hattı (ATCC CRL:2053) kullanılmıştır. Ticari olarak temin edilen tip B spermatogonyal hücre hattı, çalışma için donmuş vial içerisinde Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Moleküler Genetik Laboratuvarı'na teslim edilmiştir. Hücreler, kullanılıncaya kadar -80 C'de muhafaza edilmiş ve hücre kültürünün yeni seriler şeklinde pasajlanarak sıvı azot içerisinde saklanması ve tüm deneyler boyunca kültür işlemleri Genetik Anabilim Dalı bünyesinde kurulan Hücre Kültürü Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

CRISPR-Cas9 yöntemiyle vektör transfeksiyonu sonrası *Tex15* geninin susturulmasına yönelik çalışmada gen hedefli CRISPR-Cas9 uygulama grubu (**Grup CRISPR-Cas9**), herhangi bir genle homoloji göstermeyen sgRNA klonlanmış vektörü içeren uygulama ile sadece CRISPR-Cas9 kimyasallarının kontrolünü sağlayan grup (**Grup sham**) ve herhangi bir uygulamanın yapılmadığı sadece pasajlanan grup (**Grup Kontrol**) olacak şekilde üç grup oluşturulmuştur. Tip B spermatogonyal kök hücre hattında CRISPR-Cas9 uygulaması sonrası *Tex15* geninde istenilen hedeflemenin olup olmadığı deney grupları ve kontrol grubundan elde edilen hücre serilerinde hücre viabilitesi ve başarının etkinliği Mutasyon enzim kesim analizi, DNA dizi analizi ve in-silico analizler ile ortaya konulmuştur.

2.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

Çalışmanın ilk aşamasında; ticari olarak temin edilen spermatogonyal hücreler laboratuvara ulaşmalarının ardından aşağıda sunulan prosedüre göre muamele edilmiş ve pasajlama aşamasına geçilmiştir.

1. Hücre hattı için baz medium olarak, Dulbecco'nun modifiye Eagle's mediumu (DMEM) kullanılmıştır. Baz ortama nihai konsantrasyon %10 luk

olacak şekilde Fetal Sığır Serumı (FBS) ve %1 penisilin-streptomisin antibiyotik eklenerek büyüme ortamı hazırlandı.

2. Tip B spermatogonyal kök hücreleri içeren flakon, hücre kültürü laboratuvarında 37 °C su banyosunda hafifçe çalkalanarak çözüldü.
3. Flakon içeriği 9 mL büyüme kültür ortamı içeren bir santrifüj tüpüne aktarılıp, 5 dk boyunca 125 x g'de santrifüj edildi (Hettich Rotina 35 Zentrifugen, Germany). Süpernatant döküldükten sonra, tabanda kalan pellet kısmı kültüre edilmek üzere elde edildi.
4. Hücre pelleti taze ve steril hazırlanan 3 mL büyüme medium ile yeniden süspanse edilerek 25 cm²' lik flask (kültür şişelerine) dağıtıldı.
5. Hücreler kültür için %5 CO₂, 37 °C koşullarındaki inkübatörde inkübe edildi. Hücrelerin üreme takibi yapıp % 90 konflüensiye ulaştığı zaman, tabanı kaplayan hücreler tripsinize edilerek kaldırıldı ve subkültür aşamasına geçildi. Hücrelerin kültür süresince takibi inverted mikroskop ile yapılmıştır (Leica DM IRB Inverted Mikroskop, Japan).

2.1.1. Subkültür Prosedürü

İzlenen deney protokolü aşağıda özetlenmiştir.

1. Pasajlanacak flaklardan önce, kültür mediumu uzaklaştırıldı ve steril, 1X (0,01M) Phosphate Buffered Saline (PBS, Ambresco, kat no: E404) ile yıkandı.
2. Sonrasında; 3.0 mL %0.25 (w / v) Trypsin-0.53 mM EDTA çözeltisi ilave edildikten sonra hücre tabakası tamamen kalkıncaya kadar (genellikle 5 ila 15 dakika içinde) 37 °C'de inkübe edildi ve mikroskop altında hücrelerin başarılı şekilde kaldırıldığı gözlemlendi.

3. Tripsinize edilen ve tabandan kaldırılan hücre tabakası santrifüj tüpüne alınarak oda sıcaklığında 2500 rpm de 3 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atılarak kalan hücre pelleti 1 ml büyüme medium ile tamamlandı. 10µl hücre süspansiyonu makler kamarada sayıldı ve hücre yoğunluğuna göre 25cm² ve 75cm² lik flasklara tekrar pasajlandı.

Tek bir 25 cm² lik flaska ekilen hücrelere ait veriler kullanılarak, kültüre edilen spermatogonyal kök hücrelerin, ikiye katlanma zamanı Denklem 2'ye göre hesaplandı. İlgili denklemde İKZ ikiye katlanma zamanını, HKS hücre kültürü süresini ifade etmektedir.

Denklem 1;

$$İKZ = HKS \times \frac{\log(2)}{\log(\text{son hücre sayısı}) - \log(\text{başlangıç hücre sayısı})}$$

Şekil 2.1. İkiye katlanma zamanını hesaplamada kullanılan denklem

Çalışma süresince, her pasaj sonrası hücre serileri, tekrarlayan pasaj ile oluşacak farklı hücre diferansiasyonlarından korunmak için sıvı azotta donduruldu. Dolayısıyla ilk spermatogonyal kök hücreler, ilk 5 pasaj boyunca çoğaltıldı ve genetik deneylerde, bu ilk 5 pasajda elde edilen hücreler kullanıldı ve ileriki çalışmalarda tekrar kullanılmak üzere sıvı azot içerisinde dondurularak saklandı. Pasajlanan hücrelerde, morfolojik olarak diferansiasyon şekillenmediğinin doğrulanması amacıyla, sitosantrifüjde lam üzerine yapıştırıldıktan sonra metil alkol ile tespit edildi ve 30 dk süreyle toluidin mavisi ile boyandı.

2.1.2. Dondurma Prosedürü

Sayım işleminin ardından hücreler %10'luk yoğunlukta Dimetil sülfoksit (DMSO) ilavesi yapılarak ilk önce -80°C'de 24 saat bekletildi ve son olarak sıvı azot (-196°C) içerisine alınarak donduruldu.

2.2. Antibiyotik Dozaj Optimizasyonu

Transfeksiyonda kullanılan ekspresyon sistemi bir ilaca direnç geni taşıyorsa transfekte edilen hücreleri ayırt edebilmek için kültür ortamına antibiyotik eklenmesi gerekmektedir ve böylece sadece transfekte edilmiş hücreler hayatta kalmaktadır. Transfekte olmayan hücrelerin büyük oranda öldüğü minimum antibiyotik dozunu saptamak için hücrelere farklı konsantrasyonlarda antibiyotik eklenerek “killing curve determination” denilen öldürme eğrisi oluşturulmalıdır.

Bu çalışmada kullanılan transfeksiyon sistemi (All-in-One Lentivektör set, ABM, kat no: K3130705) puromisin antibiyotiğine karşı direnç geni taşımaktadır. Puromisin antibiyotiği (ABM marka, kat no G264) ekleme işlemi sonrası canlılık yüzdesi hesaplamak için Metiltiazol Difenil Tetrazolyum (MTT) testi kullanılmıştır. MTT testi için Shabani ve ark. (2016), protokolü uyarlanarak kullanılmıştır (Shabani ve ark., 2016)

Transfeksiyon uygulamasında kullanılacak puromisin antibiyotiği öldürücü doz ayarı için 96 kuyucuklu plaklarda 5µg/ml den başlanarak her bir doz, bir önceki dozun ½ dilüsyonu olacak şekilde 0.01 µg/ml dozuna kadar ve 2µg/ml den başlayarak 1.8; 1.5; 1.2; 1; 0.8; 0.6; 0.4; 0.2µg/ml dozlarında dilüsyonlar yapılarak optimizasyon deneyleri uygulanmıştır. Hücre yoğunluğunun ve transfeksiyon kimyasalının etkisini gözlemlemek adına deney tekrarları yapılmıştır. İzlenen deney protokolü özetlenmiştir.

1.gün: Subkültürü devam eden hücre hattından 2x96 kuyucuklu plağa 10ml’de 8×10^5 hücre olacak şekilde medium hazırlanarak, 100µl olarak her kuyucuğa pasajlanmıştır.

2.gün: 5µg/mL den başlayarak azalan oranlarda 0.2µg/mL ye kadar puromisin hazırlanarak her bir kuyucuğa antibiyotiğin farklı konsantrasyonlarını eklenmiştir. Pozitif kontrol grupları olarak herhangi bir antibiyotik dozunun uygulanmadığı

kuyucuklar ile %20 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) eklenerek negatif kontrol kuyucukları oluşturulmuştur (Çizelge 2.1). Herbir doz için 2x96 kuyucuklu plakda toplam 6 tekrar yapılmış ve ortalamaları alınmıştır.

3.gün: Antibiyotiğin eklenmesinden 24 ve 48 saat sonra canlılık ölçümü için MTT testi yapılmıştır.

Çizelge 2.1. 96 kuyucuklu plakta uygulanan antibiyotik dozları(K kuyucuk sırasını, + pozitif kontrolü, - negatif kontrolü ifade etmektedir).

K	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	5	2.5	1.25	0.625	0.312	0.156	0.078	0.039	0.019	+	-	-
B	5	2.5	1.25	0.625	0.312	0.156	0.078	0.039	0.019	+	-	-
C	5	2.5	1.25	0.625	0.312	0.156	0.078	0.039	0.019	+	-	-
D	2	1.8	1.5	1.2	1	0.8	0.6	0.4	0.2	+	-	-
E	2	1.8	1.5	1.2	1	0.8	0.6	0.4	0.2	+	-	-
F	2	1.8	1.5	1.2	1	0.8	0.6	0.4	0.2	+	-	-
G	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
H	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

MTT testi için 96 kuyucuklu plağın her kuyucuğuna 25µl MTT kiti eklenmiş ve 4 saat karanlık ortamda inkübe edilmiştir. Süre sonunda Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı laboratuvarında yer alan Spectra Max i3 sitometre cihazı ile 570 nanometre (nm)'de okutulmuştur. MTT testi sonucu proliferasyona uğrayan hücrelerin artan dehidrojenaz enzim aktivitesi ile tetrazolyumu kullanarak formazan (mor) boya ürettiği gözlemlenmiştir. Her konsantrasyon için 3 tekrar ve aynı düzende iki farklı günde uygulanmıştır.

Elde edilen sonuçlar aşağıdaki denklemde kullanılarak sitotoksosite oranı hesaplanmış ve hücrelerin %95 ini öldüren minumum doz belirlenmiştir.

Denklem 2;

$$\text{sitotoksosite oranı} = \left(1 - \frac{(\text{Örnek ortalama} - \text{negatif ortalama})}{(\text{pozitif ortalama} - \text{negatif ortalama})} \right) \times 100$$

Şekil 2.2. Sitotoksosite hesaplama denklemi

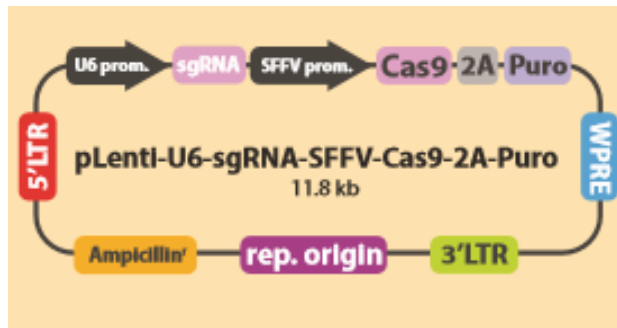
MTT testinin yapıldığı 96 kuyucuklu plaktan elde edilen sonuçlar doğrultusunda antibiyotik etkinliğini etkileyebileceği düşünülen, hücre yoğunluğu ve transfeksiyon kimyasalının etkisini incelemek için bu iki farklı değişken için aşağıdaki deneyler planlanmıştır.

-Antibiyotik etkinliğinin transfeksiyon sırasında hücre yoğunluğuna göre değişebileceği göz önüne alınarak, transfeksiyon işleminin uygulanacağı 6 kuyucuklu plaklarda 1; 1.25; 1.5; 1.8; 2 ve 2.5µg/ml dozları test edilerek doğrulama yapılmıştır.

-Antibiyotik etkinliğinin transfeksiyon kimyasalının uygulandığı hücrelerdeki etkisini gözlemlemek adına, transfeksiyon uygulaması sırasında tekrar MTT testi uygulanmıştır.

2.3. Transformasyon

Bu çalışmada, viral olmayan plazmid aracılı lipozom transfeksiyon uygulaması yapılmıştır. sgRNA hedef dizileri **pLenti-U6-sgRNA-SFFV-Cas9-2A-Puro** vektörü (Şekil 2.3) içine klonlanmış olarak, *Tex15* sgRNA CRISPR-Cas9 All-in-One vektör set (ABM, kat no: K3130705) olarak temin edilmiştir. CRISPR-Cas9 bileşenlerinin kontrolü için tasarlanan sham grup için ise, hedef bölge içermeyen Scrambled lentivektör plazmidleri (ABM,Kat no:K010) kullanılmıştır.



Şekil 2.3. All-in-One vektör set; U6 promotoru sgRNA ekspresyonunu başlatmak için, SFFV promotoru ise Cas9-2A-Puro kasedinin ekspresyonunu başlatmak için kullanılır.

Tex15 sgRNA CRISPR-Cas9 All-in-One vektör set içerisinde üç farklı hedef bölgeyi içeren Hedef 1, Hedef 2 ve Hedef 3 dizileri Çizelge 2.2’de, ekzon üzerinde yerleşimleri ise Şekil 2.4’de verilmiştir.

Çizelge 2.2. *Tex15* geni 1 nolu ekzondan seçilen hedef bölgeler (Transkript ID: ENSMUST00000009772)

sgRNA kodu	Hedeflenen nükleotid konumları ve baz dizilimleri, 3’-5’	
Hedef 1	g939.nt	ACTTGTAGCAACGACTCTCA
Hedef 2	g1329.nt	TGAACTATATCGTGCAGCAT
Hedef 3	g1702.nt	TCGTGTTAAAGATGGTGTGC

841	CACAGTGAAGAACAGGTCCAGAGAGCTCAAATGAGAAGCAATGTCCCAGTTTAAACAGCT	900
281	-H--S--E--E--Q--V--Q--R--A--Q--M--R--S--N--V--P--V--L--T--A-	300
901	CTGAGCAGTGAGTCACGGAAGTCCGATGAATCAGAAAATACTTGTAGCAACGACTCTCAG	960
301	-L--S--S--E--S--R--N--S--D--E--S--E--N--T--C--S--N--D--S--Q-	320
961	GGTCATTTCTCTCAAGAGTCACCATCTTCTGATATAAACAGTATATATAAGGTTGGTCAAC	1020
321	-G--H--F--S--Q--E--S--P--S--S--D--I--N--S--I--Y--K--V--G--H-	340
1021	CAGATGTCTACAGTCTTCCCAGCCCAGAAAGAAAGGAAATCTATGTGAATACATCCAAGAT	1080
341	-Q--M--S--T--V--F--P--A--Q--K--K--G--N--L--C--E--Y--I--Q--D-	360
1081	ACGGGAATGATGAGAGCCTCCATCAGCACAGAAGACAGCACTAAAGATGGAGTAAACCAT	1140
361	-T--G--M--M--R--A--S--I--S--T--E--D--S--T--K--D--G--V--N--H-	380
1141	ACTTGGTGCAAAGAACTGTTCTTAGTAATGAACTGTTAGTAGCCCAATTGATAATTCC	1200
381	-T--W--C--K--E--T--V--L--S--N--E--T--V--S--S--P--I--D--N--S-	400
1201	AATACATTGTACCAGGAACACAAAGAAGGAGGAAATCTTAATTCTTTAAGTGGTAATTGT	1260
401	-N--T--L--Y--Q--E--H--K--E--G--G--N--L--N--S--L--S--G--N--C-	420
1261	GAAAAAATCGGAGTTACTCATAAGTTACAAGTGCCCAAGTTTCCCATATCTTCCACAGGG	1320
421	-E--K--I--G--V--T--H--K--L--Q--V--P--K--F--P--I--S--S--T--G-	440
1321	GATAAAAAATGAAGTATATCGTGCAGCATTTGGAATTAGAGTGTCTCTTACTCCAATATA	1380
441	-D--K--N--E--L--Y--R--A--A--L--E--L--E--C--S--L--T--P--T--I-	460
1381	GAGTGTCTTTTACAAAGTACCCGCAACACTCTTTGGAGCATGAAGATAATACAAATTTT	1440
461	-E--C--L--S--Q--K--Y--P--Q--H--S--L--E--H--E--D--N--T--N--F-	480
1441	GCCATGACTCAAGGGCTAATAGAATTAACAAAGTACAAATAATCAGAAGTTTGGTAAC	1500
481	-A--M--T--Q--G--L--I--E--L--K--T--V--Q--N--N--Q--N--F--G--N-	500
1501	ATTTTGTCTGATGCCTTCCAGGAAGCAAAAGATGTTCCCTGGCCAGTGAAAAGCTCATT	1560
501	-I--L--S--D--A--F--Q--E--A--K--D--V--P--L--A--S--E--K--L--I-	520
1561	GATAGAGTTATTTTCATCAGCTGCCATTGACATCTCTCTTGACAGTTTCAAGTTTCAACATA	1620
521	-D--R--V--I--S--S--A--A--I--D--I--S--L--D--S--S--V--C--N--I-	540
1621	ATTGGAGAATATACATGTGTCCGGAGGGAAATGAAAATGGGGAAGCATCACCATATAAC	1680
541	-I--G--E--Y--T--C--V--R--R--E--N--E--N--G--E--A--S--P--Y--N-	560
1681	TGTCACAAAGAAGAAGCTTCTCGTGTATAAGATGGTGTGCAGGATCACAGCCTATCTTAT	1740
561	-C--H--K--E--E--A--S--R--V--K--D--G--V--Q--D--H--S--L--S--Y-	580

Şekil 2.4. *Tex15* geni 1 nolu ekzonda hedeflenen dizilerinin konumu. Turuncu işaretli bölgeler sırasıyla Hedef 1, Hedef 2 ve Hedef 3 bölgelerini işaret etmektedir. Referans dizi Ensembl genom veritabanında fare genomunun GRCm38.p6 versiyonundan alınmıştır (Yates ve ark., 2020)

Plazmidler bakteri hücrelerinin içine kendiliğinden giremezler. Girebilmeleri için uyarıcı bir etki gereklidir. Kompetan hücre olarak da ifade edilen hücrelere transforme edilebilmeleri için bu hücrelerin kalsiyum klorür ile uyarılması gereklidir. Bu şekilde hücre membranları ilgilenilen geni içeren plazmid vektörü hücre içine

alabilecek şekilde düzenlenir. Bu çalışmada *E.coli* bakterisinin DH5 α (ABM, E003 ProClone) suşuna ait kompetan hücre kullanılmıştır. Soğuk zincir altında temin edilen kompetan hücreler -86°C’de saklanmıştır. İzlenen deney protokolü aşağıda özetlenmiştir.

1. Kompetan hücreler buz üzerinde 15 dakika boyunca eritilmiştir.
2. *Tex15* sgRNA CRISPR-Cas9 All-in-one vektör setin, Hedef 1, 2, 3 ve Scrambled sgRNA’ları içeren her bir vektör için ayrı ayrı 1’er μ l plasmid DNA (10ng/ μ l), 50 μ l kompetan hücre içeren mikrosantrifüj tüplerine eklenmiştir. Bu aşamada pipetaj yapılması hücreleri hasara uğratacağından sadece pipetle karıştırılmıştır.
3. 30 dk buz üzerinde inkübasyon yapılmıştır.
4. 42°C su banyosunda 45 saniyeden 2 dakikaya kadar değişik sürelerde bekletilerek ısı şoku için optimizasyon yapılmıştır.
5. Isı şokunun ardından hücreler hızlıca buz üzerine alınarak 2 dk bekletilmiştir.
6. Her bir tüpe antibiyotik içermeyen 150 μ l steril LB broth besiyeri eklenmiştir.
7. 1 saat 37°C’de 220rpm’de sallamalı inkübatörde (HVD Life Science Shaker-incubator ES-20) inkübe edilmiştir.
8. Antibiyotik direncine hazır olan hücreler ampicilinli LB agara ekilmiş ve birgece inkübasyona bırakılmıştır. Kompetan hücre ve hedef plazmidi içeren hücreler kontrol amaçlı ampicilin içermeyen LB agara ekilmiştir.
9. Bir gün sonra plazmid saflaştırma (miniprep) ve restriksiyon enzim kesimi işlemleri yapılmıştır.

2.3.1. Plazmid Purifikasyon

Çalışmada kullanılan plazmid DNA'sının ampicilin antibiyotiğine dirençli olduğu bilinmektedir. Transforme olmayan hücreler antibiyotik direnci içermediklerinden dolayı antibiyotikli besiyerinde hayatta kalamazlar. İnkübasyon sonrası plate içinde hayatta kalan bakteriler besiyerinde bulunan antibiyotiğe direnç gösteren bakterilerdir. Bu bakterilerde antibiyotik direnci olduğu için plazmid içerdiği kabul edilmektedir.

Plazmid purifikasyon kiti olarak Thermo Scientific GeneJet Plazmid miniprep kit (kat no:K0502) kullanılmıştır. İzlenen deney protokolü aşağıda özetlenmiştir.

1. 10µl ampicilin eklenmiş 10 ml LB broth besiyeri ependorf tüplere 1 ml olacak şekilde dağıtılmıştır. Her bir vektörün ekim yapıldığı LB agardan koloni alınarak ampicilinli LB broth içeren ependorf tüplere konulmuştur.
2. Hedef 1, 2, 3 ve scrambled plazmid DNA için ayrı ayrı oluşturulan ependorf tüpler 37 °C de 300 rpm de 2 saat inkübe edilmiştir.
3. 8000rpm de 2 dk santrifüj sonrası süpernatant atılarak pellet elde edilmiştir.
4. 250µl resüspanسیون solüsyonu her bir ependorfa konulmuş ve pipetaj yapılmıştır.
5. 250µl lizis solüsyonu eklenerek 4 dk beklenmiştir.
6. 350 µl nötralizasyon solüsyonu eklenmiş ve 4-6 kez alt üst edilmiştir.
7. 14000 rpm de 5 dk santrifüj edilmiştir.
8. Hazırlanan spin kolonlara süpernatantlar çekilerek konulmuş ve filtreye bağlanması için tekrar 14000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
9. 500 µl yıkama solusyonu eklenip 14000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Altta kalan sıvı dökülmüştür.

10. 500 µl yıkama solusyonu eklenip 2. kez 14000 rpm’de 1 dk santrifüj edilmiştir. Altta kalan sıvı dökülmüştür.
11. 50 µl önceden 70 °C’ de ısıtılmış elution solusyon eklenerek 14000 rpm’de 2 dk santrifüj edilmiştir.
12. İzolasyon sonrası elde edilen DNA miktarları ve saflık derecesi spektrofotometre (Thermo Fisher, ND 2000 Nano Drop) ile ölçülmüştür.

2.3.2. Restriksiyon Enzimi ile Plazmid Doğrulama Testi

Transformasyonun kontrolü için KpnI (ABM, kat no: E054) restriksiyon enzimi ile kesim yapılmıştır. KpnI enzimi GGTAC[^]C dizisini tanıyarak kesmektedir. **pLenti-U6-sgRNA-SFFV-Cas9-2A-Puro Vector** için 5.5 ve 6.3 kb büyüklüğünde iki bant gözlenmesi beklenmiştir.

5 µl miniprep DNA (300ng), 2 µl 10X restriksiyon enzim solüsyonu, 0.25 µl KpnI ve 17.75 µl ddH₂O olmak üzere toplam 25 µl total hacim içinde hazırlanmış ve 37°C’de 30 dk inkübe edilerek % 1 lik agaroz jelde 100v akım altında 20 dakika yürütülmüştür.

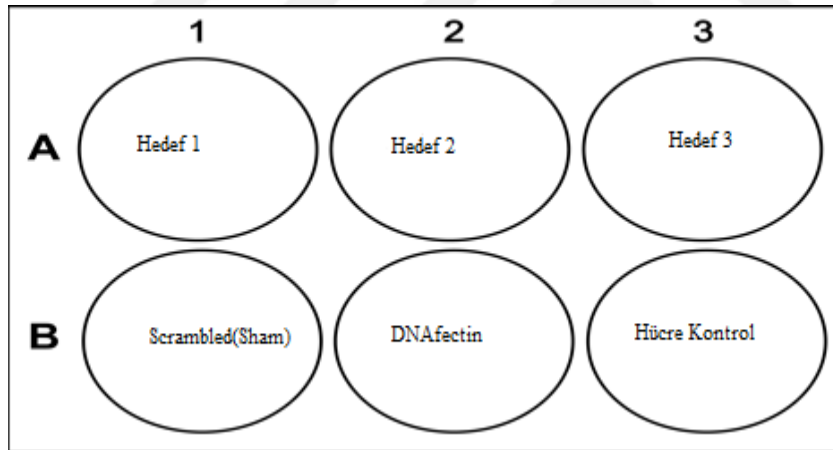
2.4. Transfeksiyon

Maksimum transfeksiyon verimliliği ve düşük sitotoksosite elde etmek için DNA ve DNAfectin[™]2100 (ABM, kat no: G2100) konsantrasyonları ile birlikte hücre yoğunluğu değiştirilerek transfeksiyon koşulları optimize edilmiştir. Uygulanan DNA(µg):DNAfectin(µl) oranları Çizelge 2.3 de verilmiştir. DNAfectin polikasyon ve lipozom formülasyonundan oluşmaktadır.

Çizelge 2.3. Transfeksiyonda kullanılacak DNA konsantrasyonu ve DNAfectin miktarlarının optimizasyonunda kullanılan oranlar ve uygulama dozları DNA(μ g):DNAfectin(μ l) oranları

Uygulanan Oran	1:1	1:2,5	1:3,5	1:5	1:7,5	1:10
Hücreye uygulama Dozu	2:2	2:5	2:7	2:10	2:15	2:20

Tex15 geninin susturulmasına yönelik CRISPR-Cas9 grubu içinde Hedef 1, Hedef 2 ve Hedef 3 olmak üzere üç farklı hedef dizi ile transfeksiyon uygulaması yapılmıştır. Herhangi bir genle homoloji göstermeyen ve benzer vektörü içeren uygulama ile sadece CRISPR-Cas9 kimyasallarının kontrolünü sağlayan grup (Grup sham, scrambled) ve herhangi bir uygulamanın yapılmadığı sadece pasajlanan grup'a (Grup Kontrol) ilaveten DNAfectin'in toksik etkisini gözlemlemek adına sadece DNAfectin'in uygulandığı bir grup olacak şekilde gruplar oluşturulmuştur (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. 6 kuyucuklu plakta transfeksiyon uygulanan grupların yerleşimini gösteren şema

Altı kuyucuklu plağın her bir kuyucuğuna 2.0 ml uygun büyüme medyumunu içinde kuyucuk başına $1-2.5 \times 10^5$ yoğunluğunda hücre ekilmiştir. Hücreler bir CO₂ inkübatöründe 37°C'de % 70 ila % 90 konflüens olana kadar inkübe edilmiştir.

Her bir transfeksiyon örneği için, aşağıdaki karışımlar hazırlanmıştır.

solusyonA: 2.0 µg DNA 100 µl serumsuz, antibiyotiksiz ortamda seyreltilmiştir.

solusyonB: 2-20 µl arası Çizelge 2.2 de verilen oranlarda DNAfectin 100µl serumsuz, antibiyotiksiz ortamda seyreltilmiştir.

Solusyon A ve B yavaşça karıştırılarak DNA-DNAfectin kompleksi oluşturulmuş ve 20 dk oda ısısında inkübe edilmiş ve ardından aşağıdaki protokol izlenmiştir.

1. 800 µl FBS serum ve antibiyotik içermeyen büyüme ortamı vasatı (mediumu) komplekse yavaşça eklenmiştir.
2. Hücrelerin üzerindeki büyüme medyumunu çekilerek yerine 1 ml DNA-DNAfectin kompleksi içeren medyum eklenmiştir.
3. 6-8 saat 37°C de %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilmiştir.
4. Süre sonunda transfeksiyon medyumunu uzaklaştırılarak, üzerine 2 ml büyüme ortamı içeren vasat konularak gece boyunca inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır.
5. 24 saat sonrasında hücreler tripsin ile kaldırılarak sayılmış ve 1:10 oranında dilüsyon yapılmıştır. Hücreler 1-2 gün süre ile takip edilmiştir.
6. Belirlenen oranda antibiyotik dozu eklenerek 48 saat takip edilmiştir.
7. Transfeksiyon başarısız olan hücreler puromisin antibiyotiğine duyarlı olduğu için, sadece puromisin dirençli olan vektörü taşıyan hücreler yaşamaya devam edecektir. Yaşayan hücrelerin transfeksiyon başarılı hücreler olduğu düşünülmüştür.

2.5. CRISPR Aracılı Transfeksiyon Deneylerinin Doğrulanması

Bu çalışmada transfeksiyon başarısını doğrulamak için ABM marka CRISPR Mutasyon enzim kesim Kit (kat no: G932) ve DNA dizi analizi kullanılmıştır. Hücre popülasyonundaki knock-out (KO) allellerinin yüzdesini belirlemek için ise ICE (Synthego) web tabanlı yazılım kullanılarak analiz yapılmıştır. ICE algoritması çalışma prensibi şöyledir: ICE algoritmasına kontrol ab1 dosyası, örnek ab1 dosyası ve rehber dizi yüklenir. Algoritma veri kalitesini kontrol ederek, düzenleme olasılıklarını belirler. Ardından örnekte hangi düzenleme olasılıklarına ait dizilerin mevcut olduğunu belirlemek için bağlanma regresyonu programını çalıştırır. Program daha sonra sonuçların kalitesini ve düzenlenen dizilerin kimliğini çıkarır (Hsiau ve ark., 2018).

2.5.1. Hücreden DNA İzolasyonu

Hücreden DNA izolasyonu için ABM Genomic Detection kit içeriğinde bulunan DNA izolasyon kiti kullanılmıştır. ABM DNA izolasyon kiti için izlenen deney protokolü aşağıda özetlenmiştir.

1. 1:10 oranında dilue edilen hücreler tripsin ile kaldırılıp, hücre sayımı yapılmıştır. 5×10^4 hücre olacak şekilde pellet hazırlanmıştır.
2. Her hücre grubu için 50µl lizis solusyonuna 2µl protein parçalayıcı ilave edilerek karışım hazırlanmıştır.
3. Her grubun hücre pelletine 52µl bu karışımdan eklenerek 68°C de 15 dk, ardından 95°C de 10 dk inkübe edilmiştir.
4. PCR amplikasyonu için gereken miktar alınıp, kalan kısım -20°C de saklanmıştır.
5. İzolasyon sonrası elde edilen DNA miktarları ve saflık derecesi spektrofotometre (Thermo Fisher, ND 2000 Nano Drop) ile ölçülmüştür.

2.5.2. PCR Amplifikasyonu

Her grup için Çizelge 2.4 deki oranlarda PCR bileşenleri hazırlanmış ve 54°C-66°C aralığındaki değişen sıcaklıklarda gradient PCR yapılarak uygun sıcaklık tespit edilmiştir. Hedef 1, Hedef 2 ve Hedef 3 dizilerini içeren bölgelerin PCR ile yükseltgenmesinde kullanılan oligonükleotit dizileri ve bilgileri Çizelge 2.5’de, PCR döngü ayarları Çizelge 2.6’da verilmiştir.

Çizelge 2.4. PCR amplifikasyonu için bileşen miktarları

Bileşen	Pozitif kontrol	Örnek Miktarı(μl)	Negatif kontrol	Final konsantrasyon
Kontrol primer	1μl	-	-	
Hücre lizatı	-	2μl	-	
Primer karışımı	-	1μl	1μl	200nM
2X PCR karışımı	25μl	25μl	25μl	1X
Nükleaz ari H ₂ O	24μl	22μl	24μl	-

Çizelge 2.5. Hedef bölgelere özgü primer dizileri ve özellikleri (F: ileri yönlü oligonükleotit, R: Geri yönlü oligonükleotit)

1.Hedef bölge	Primer dizi	GC%	Tm	nmol
F	5'-GAGATGGGTCCTTTCAGCTC-3'	%55	55.1	33.7
R	5'-GGCTCTCATCATTCCTCGTAT-3'	%50	54.2	36
2.Hedef bölge				
F	5'AGTGATGTTTTGCCATTGGA-3'	%40	52.7	30.6
R	5'-CTGGAAGGCATCAGACAAAA-3'	%50	52.9	31
3.Hedef bölge				
F	5'-CAGCTGCCATTGACATCTCT-3'	%50	55.1	35.1
R	5'-CCCAATCAATCCGAGACTTT-3'	%45	52.5	33.9

Çizelge 2.6. PCR amplifikasyon döngü ayarları

Basamak	Sıcaklık	Zaman	Döngü(ler)
Enzim aktivasyonu	95°C	10dk	1
Denatürasyon	95°C	30sn	
Bağlanma	42-72°C (55°C kontrol için)	30sn	40
Uzama	72°C	3.5kb/dk (1 dk kontrol için)	
Son uzama	72°C	5 dk	1

PCR amplifikasyonunu kontrol için 5µl PCR ürünü %1'lik agaroz jelde 120V elektrik akımı altında 30 dk yürütülmüştür. İstenilen boyutta temiz bir ürün bandı elde edildiğinde genomik bölünme tanımlama testine geçilmiştir. Çizelge 2.7'da verilen oranlarda Mutasyon enzim kesim testi bileşenleri hazırlanmış ve Çizelge 2.8 de verilen döngü ayarları ile yeniden bağlanma PCR'ı (re-annealing) yapılmıştır.

Çizelge 2.7. Mutasyon enzim kesim testi bileşen oranları

Bileşen	Reaksiyon miktarı
PCR ürünü	1-6µl
10X detection buffer	1µl
Nukleaz ari H ₂ O	9.5µl

Çizelge 2.8. PCR re-annealing döngü ayarları

Basamak	Sıcaklık	Zaman	Isı/zaman
1	95°C	5dk	-
2	95-85°C	-	-2°C/sn
3	95°C	-	-0.1°C/sn
4	4°C		-

2.5.3. Mutasyon Enzim Kesim Ürünlerinin Analizi

1. Tüm gruplara 0.5µl detection enzim eklenerek kısaca santrifüj edilmiştir.
2. 37°C de 1 saat inkübe edilmiştir.
3. Örnekler vorteks ve spin yapılmıştır.
4. 2 µl DNA yükleme boyası mavi (Gdansk, kat no: BIO37045) ile beraber her örnekten 10µl alınarak %1-2 agaroz jele yüklenmiştir. Bir kuyucuğa da DNA merdiveni (GeneDireX, 100bp RTU, kat no: DM001-R500) yüklenerek 110V altında 30 dk elektroforez yapılmıştır.
5. Elde edilen jel bir UV transillüminatör aracılığıyla görüntülenmiştir. İki küçük bölünme ürününün varlığı gen düzenlenmesinin gerçekleştiğini gösterir.

2.5.4. DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi için Sanger sekanslama kullanılmıştır. Sanger sekanslama metodu; işaretli dideoksinükleotidlerin PCR ürünlerinin tüm pozisyonlarına denk gelerek zinciri sonlandırma prensibine dayanmaktadır. Zincir sonlanma reaksiyonu sonrasında kapiller elektroforez işlemi ABI prism 310 Genetic Analyzer cihazı ile yapılmıştır. Zincir sonlanma reaksiyonu öncesinde PCR ürünleri, PCR kimyasal atıklarının uzaklaştırılması amacıyla QIAquick purifikasyon kit 250 (Qiagen, kat no:28106) kullanılarak pürifiye edilmiştir. Pürifikasyon sonrası ürünler agaroz jel elektroforezinde yürütülerek, yoğunluk ve parlaklıklarına göre gruplandırılmış ve sekans PCR'ı için ne kadar hacimde pürifiye PCR ürünü kullanılacağına karar verilmiştir.

QIAquick pürifikasyon kiti deney protokolü aşağıdaki gibidir.

1. 20µl PCR ürünü, 100µl PB solüsyonu ile pipetlenerek karıştırılmıştır.

2. 2 ml'lik tüplere filtre içeren kolon yerleştirilerek karışım eklenmiş ve 60 saniye 13.000 rpm'de santrifüj edilerek, kolona bağlanma sağlanmıştır.
3. Kolon üzerine 750µl solüsyon PE eklenerek 60 saniye 13.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Atık biriken tüp atılarak kolon temiz bir 2ml'lik tüpe yerleştirilmiştir.
4. Boş tüp ile 1 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
5. Kolon 1.5 ml'lik temiz tüpe alınarak 30µl elution buffer eklenerek 1 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
6. %2 lik agaroz jelde 100v akım altında 20 dk yürütülerek görüntülenmiştir.

Sekans PCR'ı için yeni oligonükleotitler Primer web version 4.1.0 arayüzü kullanılarak tasarlanmış ve sentezletilmiştir (Untergasser ve ark.,2012). Hedef 2 için SeqF: 5'-CCATCAGCACAGAAGACAGC-3' dizisi, Hedef 3 için ise SeqR: 5'-TGGTGCATGCCTTTGTTCTA-3' dizisi sentezletilmiştir. Hedef 1 için Hedef 2 ye ait forward oligonükleotit daha iyi sonuç verdiğiinden Hedef 1 için ayrıca sentez yapılmamıştır. Jel görüntülemenin ardından sekans PCR'ı için kullanılacak 100mM stok primerler 1/29 oranında sulandırılmıştır. Dideoksi zincir sonlanma reaksiyonunu ifade eden sekans PCR'ını kurmak üzere ticari bir kit olan Big DyeTM Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher) kullanılmıştır. Kit protokolü uyarınca; 2µl ddH₂O, 2µl big dye buffer, 2µl big dye boya, 2µl primer (3,3 µM) ve 2µl purifiye edilmiş PCR ürünü ile Çizelge 2.9'daki sekans PCR'ı kurulmuştur. Sekans PCR'ı işlemleri Bio-Rad C1000 ısı döngü cihazında gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2.9. Sekans PCR döngü ayarları

Denatürasyon	Sıcaklık	Zaman	Döngü
1	96°C	1 dk	
2	96°C	10 sn	
3	50°C	5sn	25
4	60°C	4 dk	
5	4°C	∞	-

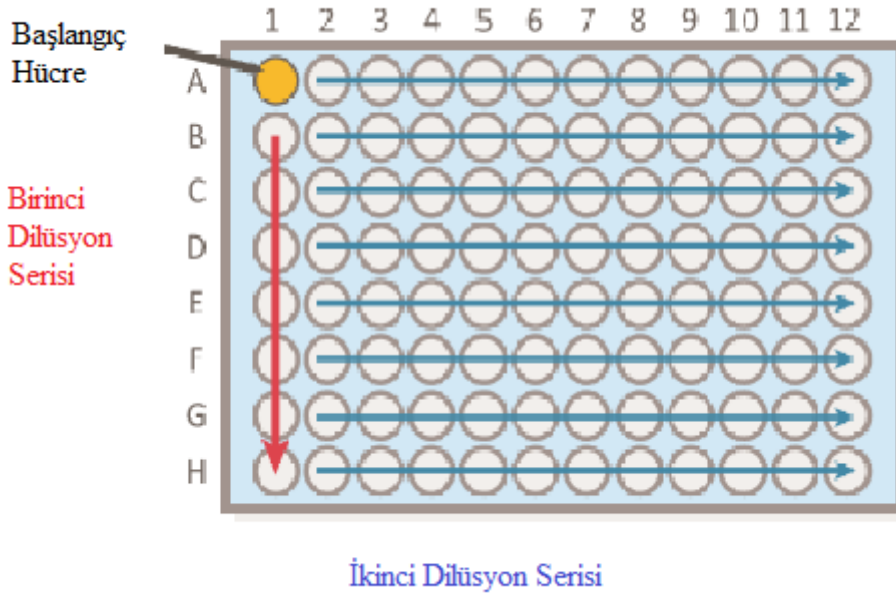
PCR ürünleri ABI sekans cihazına yüklenmeden önce ZYMO DNA sekans temizleme kiti (kat no: D4050) kullanılarak PCR kimyasallarından arındırılmıştır. ZYMO DNA sekans temizleme kiti protokolü aşağıdaki gibidir.

1. 240µl sequencing Binding Buffer 5-20µl sekans reaksiyonu üzerine eklenmiştir.
2. Zymo-spin kolonları toplama tüplerine yerleştirilmiştir.
3. Karışım filtreye değmeden kolonlar üzerine aktarılmıştır.
4. 13.000 rpm’de 30 sn santrifüj edilmiştir. Toplama tüpü atılmıştır.
5. 180 µl sequencing wash buffer kolonun üzerine filtreye değmeden konulmuştur.
6. 13.000 rpm’de 30 sn santrifüj edilmiştir. Toplama tüpü atılmıştır.
7. Filtreler yeni eppendorf tüplere aktarılmıştır.
8. Filtreler kuruduktan sonra üzerine 60 µl ddH₂O eklenmiştir.
9. 13.000 rpm’de 15 sn santrifüj edilmiştir. 60 µl örnek ABI 310 örnek tüplerine aktararak cihaza yüklenmiştir.

2.5.5. Hücrelerden Monoklon Hattı Oluşturulması

Homozigot olmayan düzenlemede, farklı bir sekansa sahip aleller, birden fazla ve üst üste bindirilmiş piklere sahip bir kromatogram oluşturmuştur. Transfeksiyon ön deney sonuçlarında DNA dizi analizi ile elde edilen heterojen hücre topluluğundan dilüsyon yöntemiyle tek hücre elde edilmeye ve bu hücreden elde edilen kolonilerin izolasyonu ve dizi analizi ile homolog mutasyon tespit edilmeye çalışılmıştır.

Transfekte olan hücre grubundan monoklon hücre hattı oluşturabilmek için 96 kuyucuklu plağın A1 kuyucuğuna 4000 hücre içeren miktarda kültür ortamı eklenmiştir. 4000 hücreyi saymak için Beckman Coulter CytoFlex flow sitometri cihazı kullanılmıştır. Her gruptan 100µl alınarak okutulmuş ve orantılama yapılarak 4000 hücrenin kaç µl’de bulunduğu hesaplanmıştır. Şekil 2.6’da gösterildiği üzere 1/2 dilüsyon yapılarak H12 numaralı kuyucukta tek hücre elde edilmeye çalışılmıştır.



Şekil 2.6. 96 kuyucuklu plakta birinci ve ikinci dilüsyon serisi ile monoklon düşürme

2.5.6. Knockout Başarısının Belirlenmesi

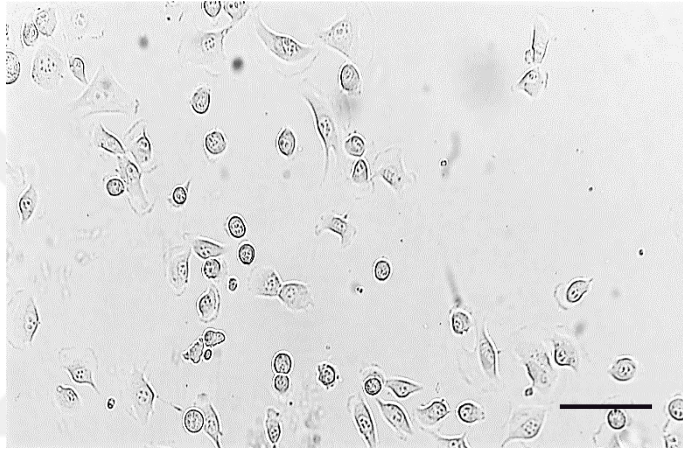
Transfeksiyon uygulamaları sonrasında DNA dizi analizlerinde transfeksiyon olduğu gözlemlenen Hedef 1 bölgesinin hücre popülasyonundaki Knock-out(KO) allellerinin yüzdesini belirlemek için Inference of CRISPR Edits (ICE, Synthego) web tabanlı yazılım kullanılarak analiz yapılmıştır.



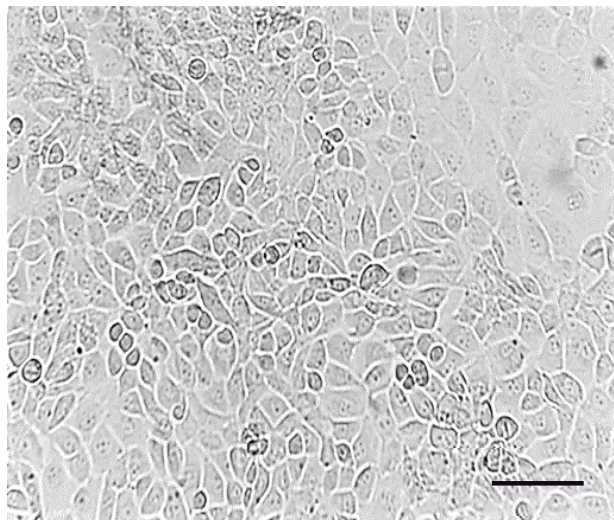
3. BULGULAR

3.1. Spermatogonyal Kök Hücre Kültürü Bulguları

Araştırmada kullanılan, Tip B Spermatogonyal hücrelerin ilk pasajı (P0), 1. ve 7. günlerde çoğalan oval ve fusiform şekilli hücrelere ait fotoğraflar şekil 3.1 ve şekil 3.2’de sunulmuştur.

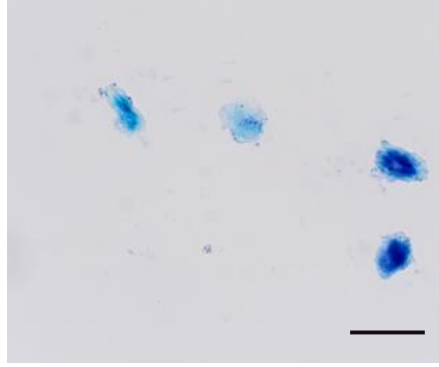


şekil 3.1. Pasaj (0), flask tabanına yapışmış spermatogonyal kök hücreler, Hücre hattı 1.gün. Ölçek  ubuğu: 200  m



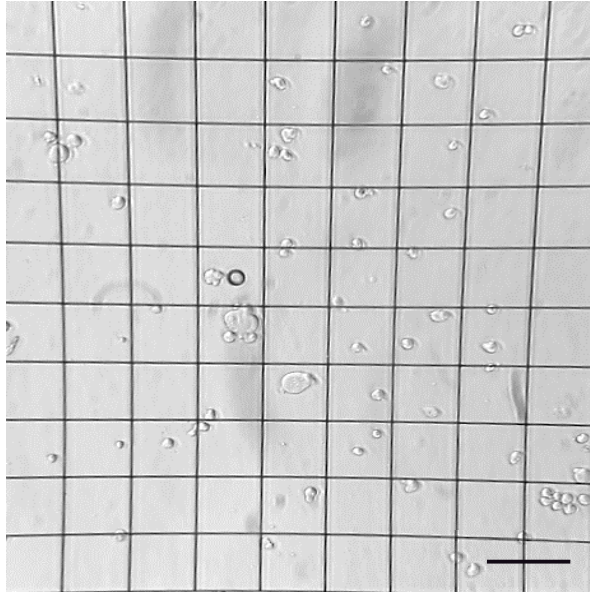
şekil 3.2. Pasaj (0), flask tabanını kaplayan spermatogonyal kök hücreler, Hücre hattı 7.gün. Ölçek  ubuğu: 200  m.

Pasajlanan hücreler toluidin boyaması kullanılarak spermatogonyal kök hücre özellikleri taşıdıkları ve farklılaşma olmadığı saptanmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Sitolojik değerlendirmede, açık mavi renkte boyanan sitoplazma sınırları ile yuvarlak ve oval morfoloji gösteren spermatogonyal hücreler. Spindle hücre morfolojisine rastlanmaması fibroblast diferensiasyonu şekillenmediğini göstermektedir. Toluidin mavisi, Ölçek çubuğu: 120 μ m

Hücre yoğunlukları Makler kamara kullanılarak sayılmıştır. P(1)'a ait makler kamara sayım görüntüsü Şekil 3.4'de, farklı günlere ait konflüens ve 1 ml'de hücre sayıları Çizelge 3.1.'de verilmiştir. Kültüre edilen spermatogonyal kök hücrelerin, ikiye katlanma zamanı 84 saat olarak Denklem 2'ye göre hesaplanmıştır.



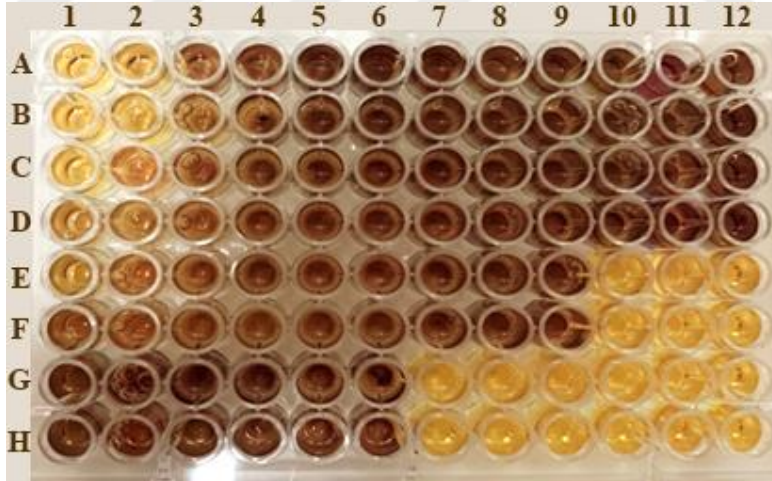
Şekil 3.4. Makler kamara hücre sayım örnekleme. Ölçek çubuğu: 120 μ m.

Çizelge 3.1. Spermatogonyal Hücre Hattı Konflüens süreleri

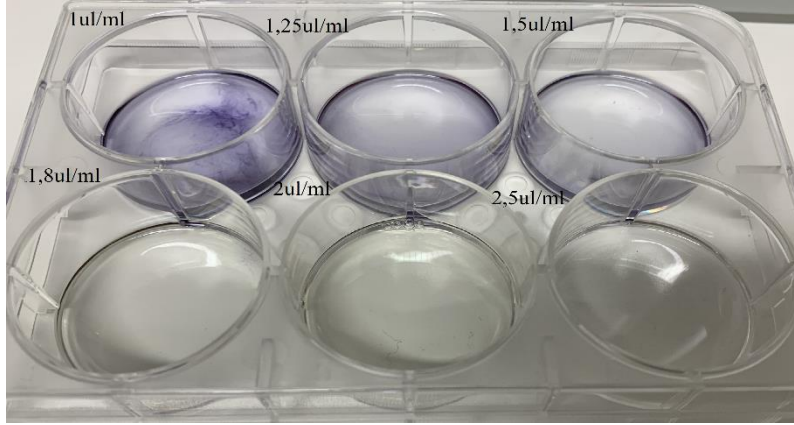
Hücre Kültürü	Gün	Konflüens (%)	Hücre Sayı/ml
P(0)	1	15	5×10^5
P(0)	7	90	2×10^6
P(1)	8	30	5×10^5
P(1)	12	90	1.2×10^6
P(2)	13	30	5×10^5

3.2. Antibiyotik Doz Ayarlama Deneyi Bulguları

Azalan dozlarda puromisin uygulanarak öldürme eğrisi oluşturma amacıyla uygulanan MTT testi sonucu görülen renk değişikliği görseli Şekil 3.5 ve Şekil 3.6’da verilmiştir.

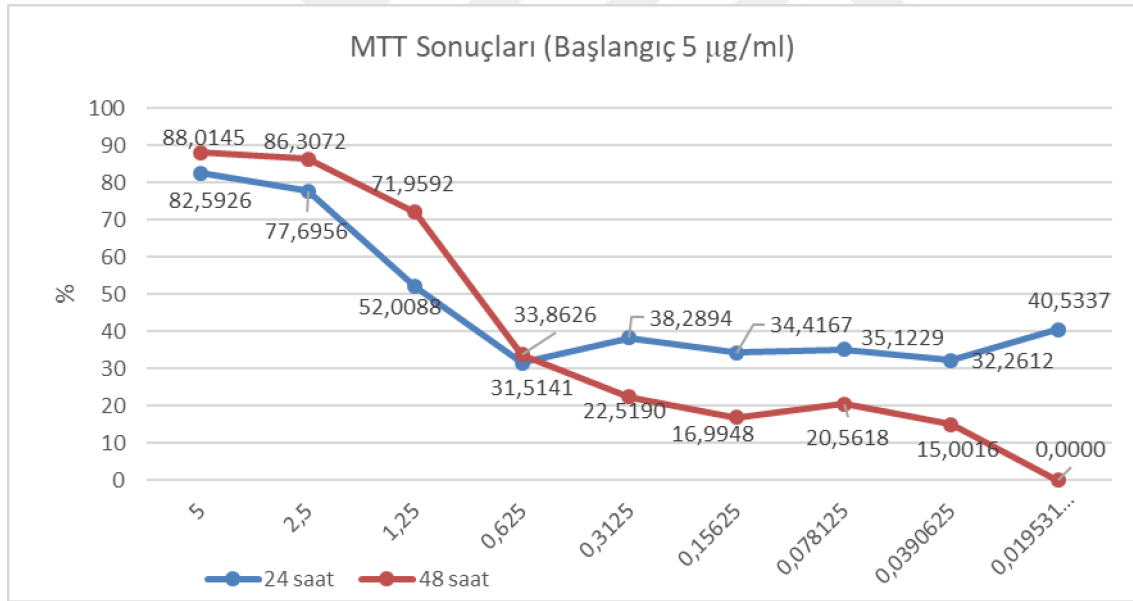


Şekil 3.5. 96 kuyucuklu plak MTT testi sonrası, hücre canlılığı azaldıkça tetrazolyum tuzunun formazona çevrilme oranındaki düşüş sarı renk olarak görülmektedir. A1, B1 ve C1 $5 \mu\text{g/ml}$ puromisin; D1, E1 ve F1 $2 \mu\text{g/ml}$ puromisin uygulamalarının olduğu kuyucuklardır. Diğer sarı alanlar negatif kontrol uygulamalarını göstermektedir.

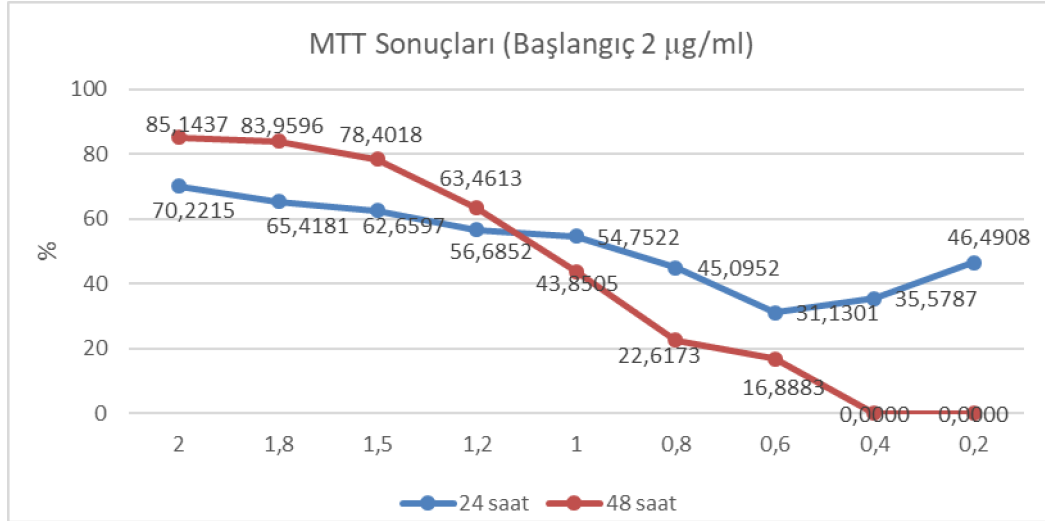


Şekil 3.6. Altı kuyucuklu plakta MTT test sonrası renk değişimi

96 kuyucuklu plaklarda 24 saat ve 48 saat olarak 2 tekrar şeklinde yapılan MTT test bulgularına ait verilerden alınan ortalama değerler hesaplanmış ve oluşturulan grafikler Şekil 3.7 ve Şekil 3.8’de verilmiştir.



Şekil 3.7. 5µg/ml dozundan başlanıp azaltılarak uygulanan puromisinin 24 saatlik ve 48 saatlik MTT verileri: X eksenini uygulanan dozları gösterirken, Y eksenini sitotoksosite yüzde oranlarını göstermektedir.

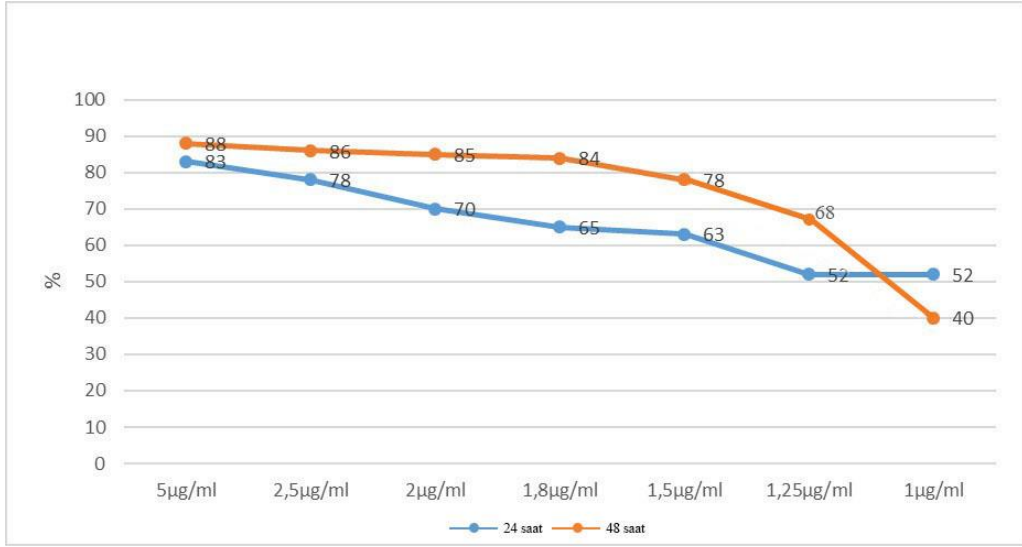


Şekil 3.8. 2µg/ ml dozundan başlanıp azaltılarak uygulanan puromisinin 24 saatlik ve 48 saatlik MTT verileri: X eksenini uygulanan dozları gösterirken, Y eksenini sitotoksosite yüzde oranlarını göstermektedir.

Bulgulara ait verilerden 1µg/ml dozunun altındaki dozlardan alınan sonuçlar istatistiksel olarak anlamsız çıktığından bu sonuçlar değerlendirme dışı tutulmuştur. Sitotoksosite değeri %50 üzeri çıkan dozlar 6 kuyucuklu plaklarda tekrar edilmiştir. Hesaplanan sitotoksosite değerleri Çizelge 3.2’de ve Şekil 3.9’da verilmiştir.

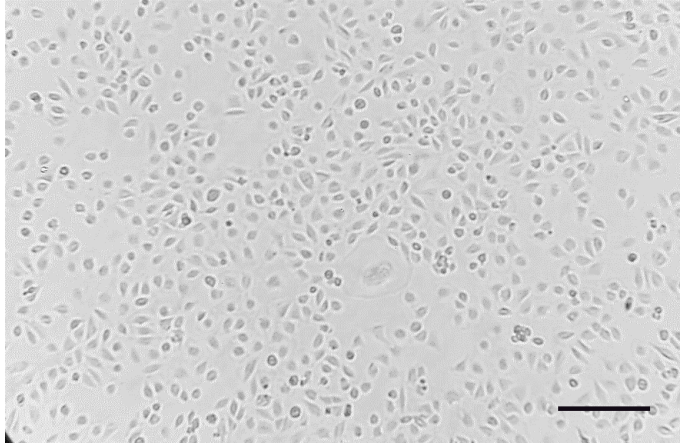
Çizelge 3.2. 24 saat ve 48 saatlik puromisin uygulamasında sitotoksosite ortalamaları

Uygulanan (µg/ml)	doz	Etki süresi 24 saat (%) sitotoksosite	Etki süresi 48 saat (%) sitotoksosite
5		83	88
2.5		78	86
2		70	85
1.8		65	84
1.5		63	78
1.25		52	68
1		50	40

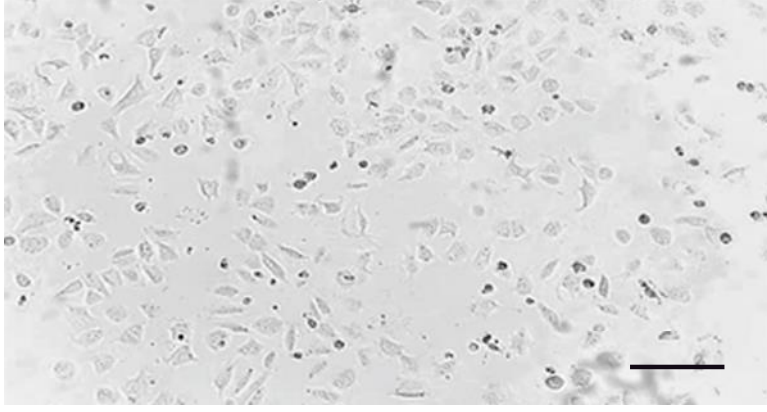


Şekil 3.9. 24 saat ve 48 saatlik puromisin uygulamasında sitotoksosite ortalamalarını gösteren grafik: X eksenini uygulanan dozları gösterirken, Y eksenini sitotoksosite yüzde oranlarını göstermektedir.

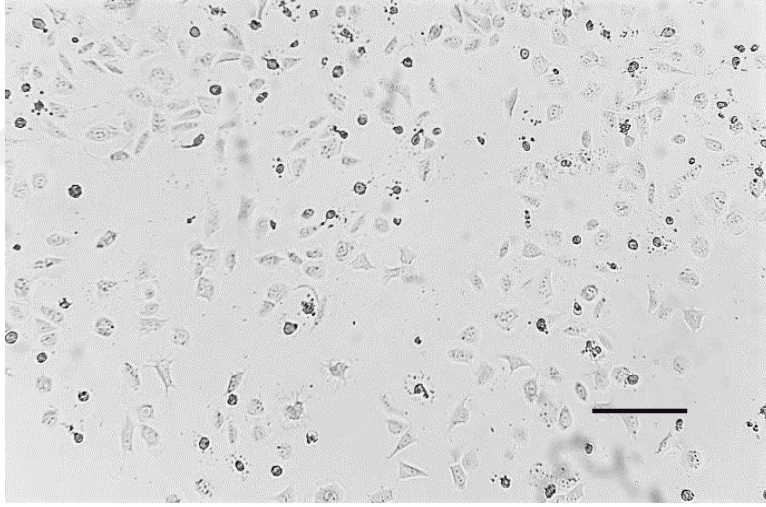
6 kuyucuklu plaklarda seçilen dozlarda puromisinin 48 saat zaman diliminde hücreler üzerine etkisini gösteren görseller Şekil 3.10- 3.16'da verilmiştir.



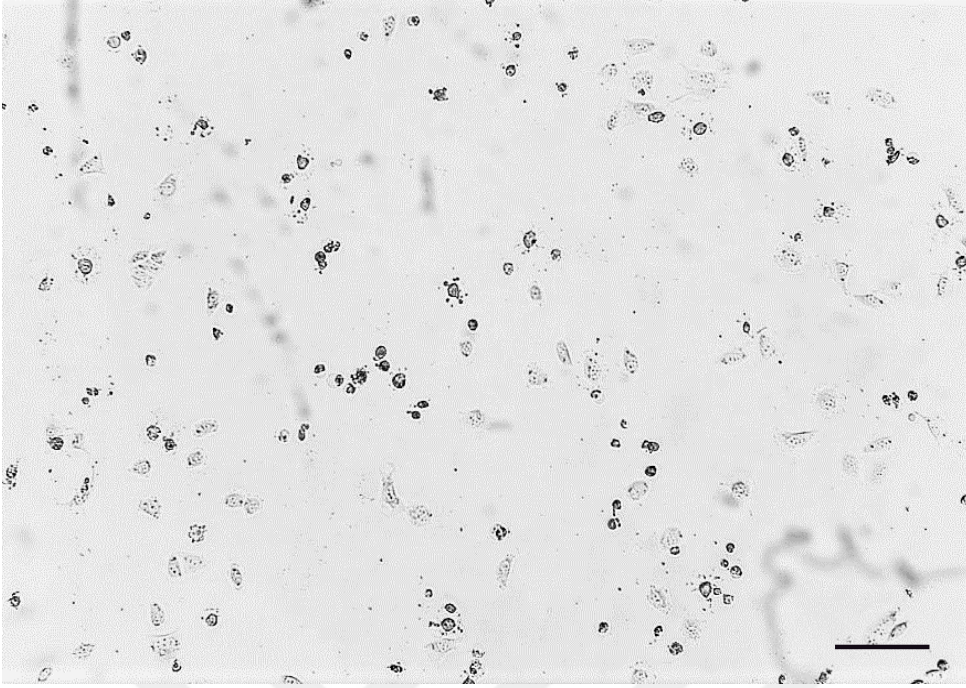
Şekil 3.10. Kontrol hücre grubu. Ölçek çubuğu: 200 µm.



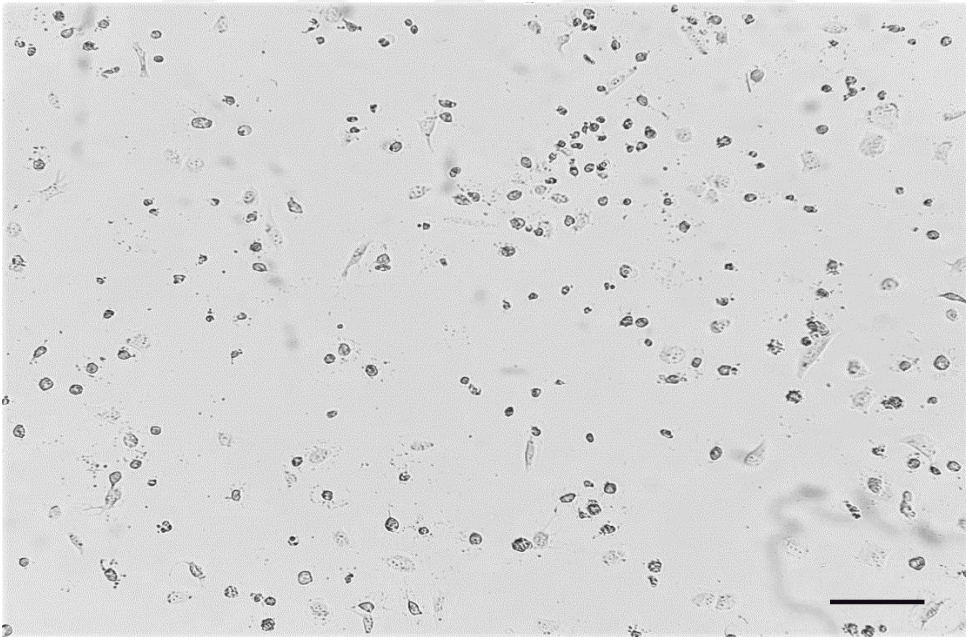
Şekil 3.11. 1 µg/ml puromisinin 48 saat zaman diliminde etkisi. Ölçek çubuğu: 200 µm.



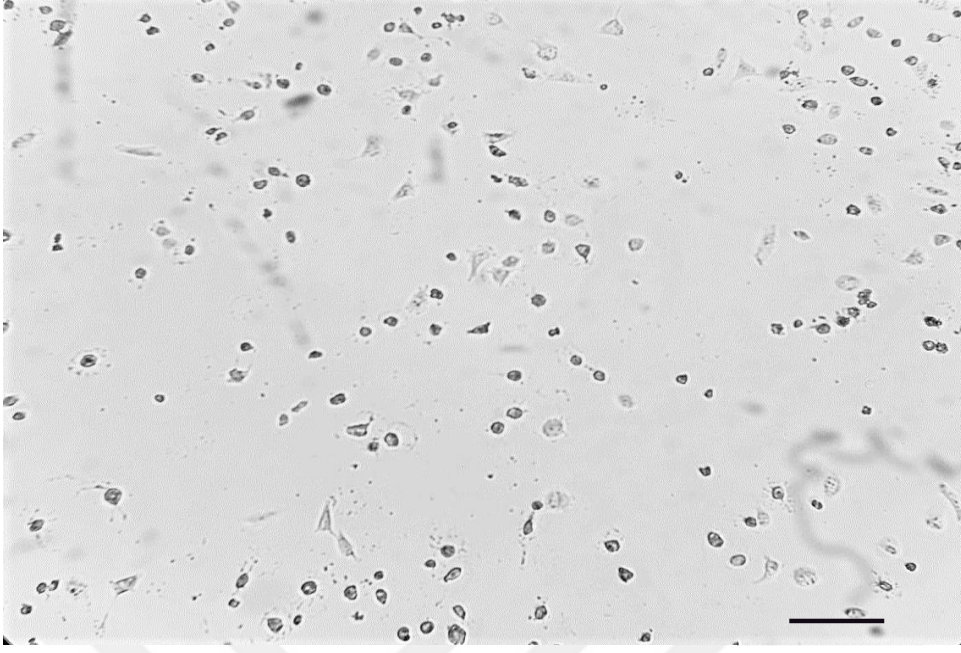
Şekil 3.12. 1.25 µg/ml puromisinin 48 saat zaman diliminde etkisi. Ölçek çubuğu: 200 µm.



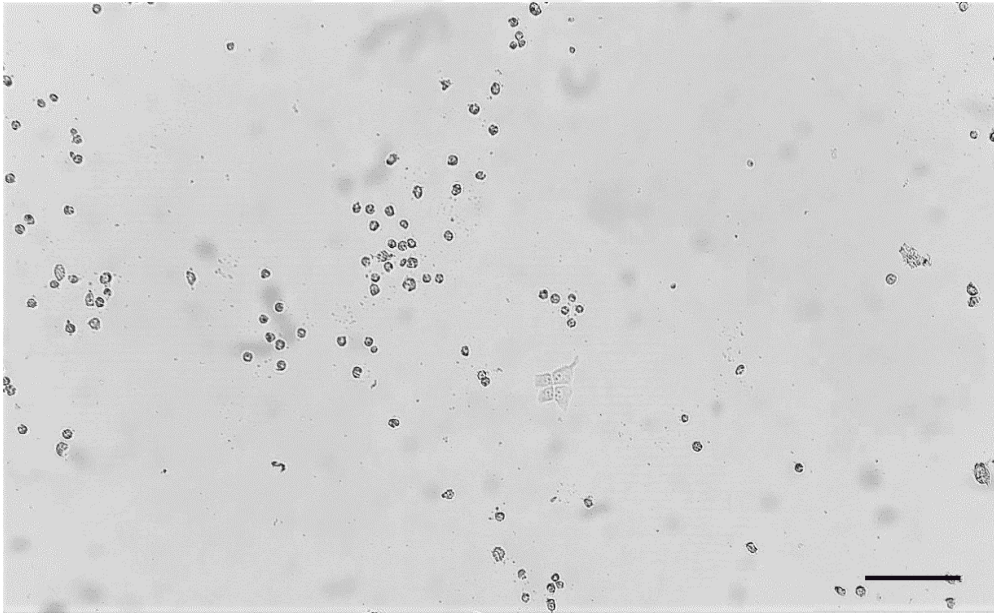
Şekil 3.13. 1.5 µg/ml puromisinin 48 saat zaman diliminde etkisi. Ölçek çubuğu: 200 µm.



Şekil 3.14. 1.8 µg/ml puromisinin 48 saat zaman diliminde etkisi. Ölçek çubuğu: 200 µm.



Şekil 3.15. 2 µg/ml puromisinin 48 saat zaman diliminde etkisi. Ölçek çubuğu: 200 µm.



Şekil 3.16. 2,5 µg/ml puromisinin 48 saat zaman diliminde etkisi. Ölçek çubuğu: 200 µm.

Puromisin antibiyotiğinin toksik etkisi göz önüne alınarak transfeksiyon uygulamalarında 2µg/ml puromisin kullanılmasına karar verilmiştir. Transfeksiyon kimyasalının MTT testi sonuçlarında değişiklik yapıp yapmadığını test etmek üzere transfeksiyon uygulaması sırasında MTT deney grubu oluşturulmuştur. 2µg/ml

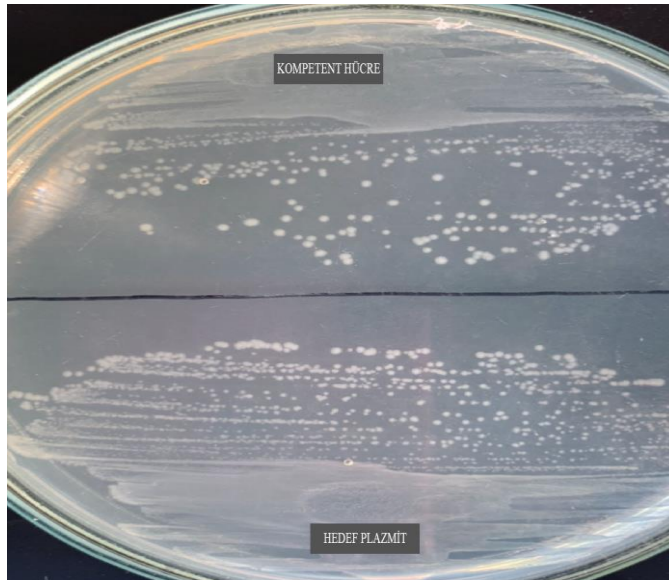
puromisin uygulanan transfekte hücrelerin MTT test bulguları Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. Transfekte hücre MTT Test Bulguları

Uygulama grubu	Sitotoksosite oranı(%)
Hedef 1	94
Hedef 2	91
Hedef 3	94
Sham(Scrambled)	94
DNAfectin grubu	94

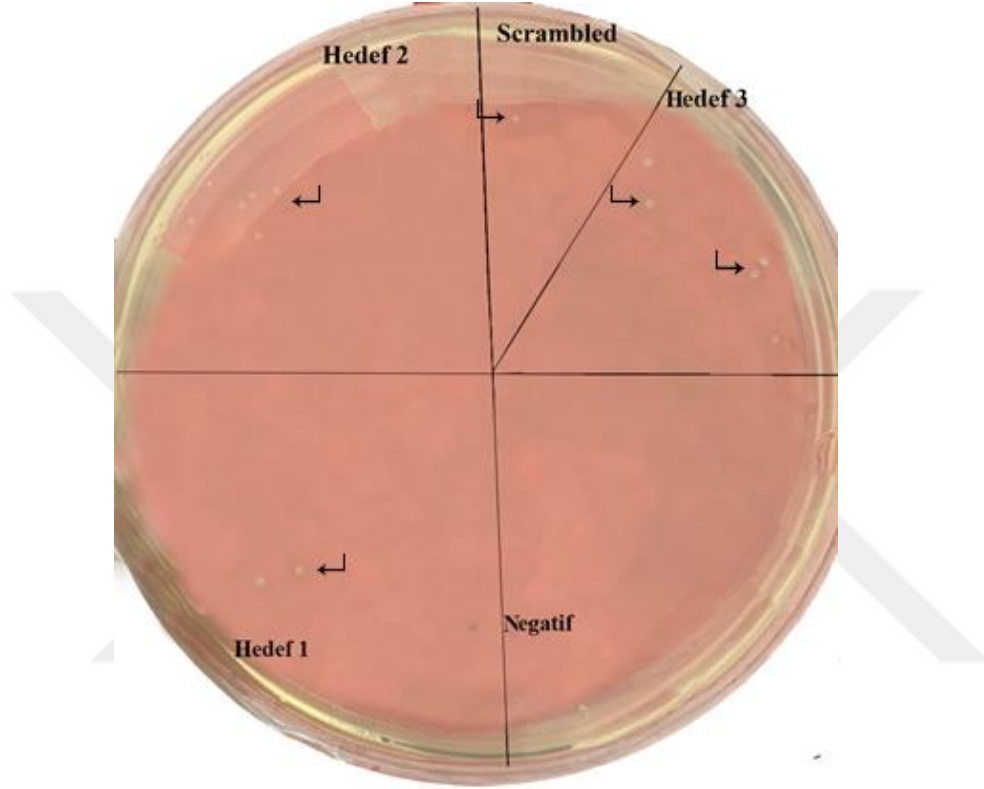
3.3. Transformasyon Bulguları

ABM markasına ait DH5 alfa kompetent hücreleri ile yapılan transformasyon denemelerinde ısı şoku için 45 saniye, 1.5 dakika ve 2 dakika olmak üç farklı süre kullanılmıştır. Kompetent hücre ve hedef plazmidi içeren hücrelerin kontrolü ampisilin içermeyen LB agar ile yapılmış ve üreme görüntüleri Şekil 3.17'de verilmiştir.



Şekil 3.17. Transformasyon kontrol plak görüntüsü; Kompetent hücre ve hedef plazmidi içeren hücrelerin ampisilin içemeyen LB agar görüntüsü

45 saniye ısı şoku uygulanarak yapılan transformasyon işlemi sonrasında ampisilinli agarlarda bakteri üremesi olmamıştır. Bu sonuç transformasyonun başarısız olduğunu göstermiştir. 1.5 dakika ısı şoku uygulanan transformasyon sonrasında ampisilinli agarda görülen zayıf bakteri üremesi Şekil 3.18’de verilmiştir.

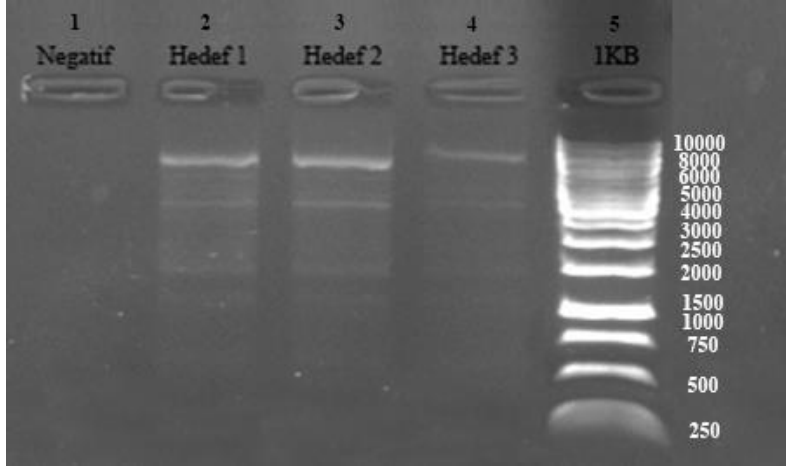


Şekil 3.18. 1,5 dakika transformasyon sonrası zayıf bakteri üremesi

Koloni üremesi elde edildikten sonra plazmid DNA izolasyon işlemi yapılmıştır. Elde edilen DNA yoğunlukları A260/A280 oranları Çizelge 3.4’de sunulmuştur. Ardından enzim kesim işlemi uygulanmıştır (Şekil 3.19).

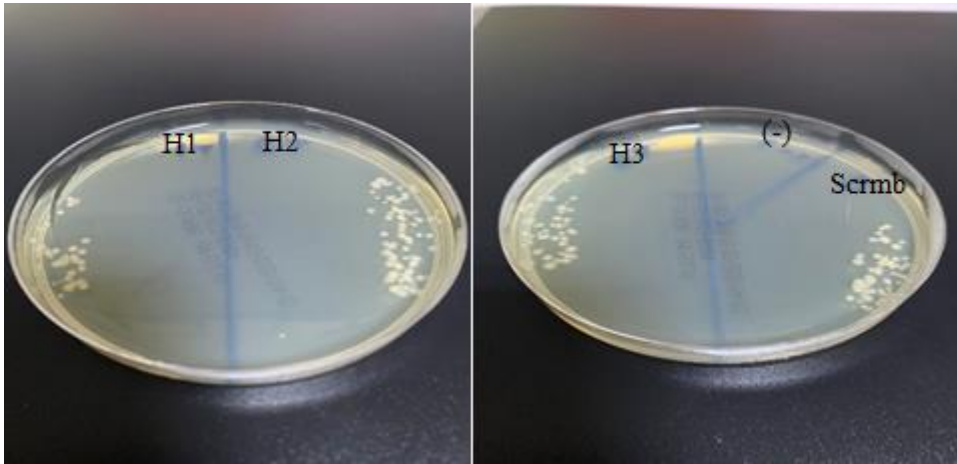
Çizelge 3.4. 1.5 dakika ısı şoku ile transformasyon sonrası Plazmid DNA saflık kontrolleri ve miktar sonuçları

Örnek adı	DNA yoğunlukları (50 µl içinde; ng/µl)	260/280 abs oranı	260/230 abs oranı
Hedef 1	30	1.8	2.1
Hedef 2	35	1.9	2.1
Hedef 3	56	2.0	2.0
Sham(Scrambled)	19	2.1	2.1



Şekil 3.19. 1.5 dakika ısı şoku ile yapılan transformasyon enzim kesim bantları: (1. Kuyucuk Negatif kontrol, 2. Kuyucuk Hedef 1, 3.kuyucuk Hedef2, 4. Kuyucuk Hedef 3 bölgelerine ait kesim bantlarını, 5. Kuyucuk ise 1kb DNA merdivenini (Thermo Scientific, GeneRuler 1 kb DNA ladder, kat no: SM0311) göstermektedir.

2 dakika ısı şoku uygulanarak yapılan Hedef 1, Hedef 2, Hedef 3 ve grup sham (Scrambled) plazmidlerinin DH5 alfa bakterilerine transformasyonu sonrası Ampicilinli agarda bakteri üremesi görülürken, (-) kontrol grubunu oluşturan transformasyon yapılmayan DH5 alfa bakterilerinde üreme gözlemlenmemiştir (Şekil 3.20). Bu nedenle transformasyonda en etkin uygulamanın 2 dakika ısı şoku olduğuna karar verilmiştir.

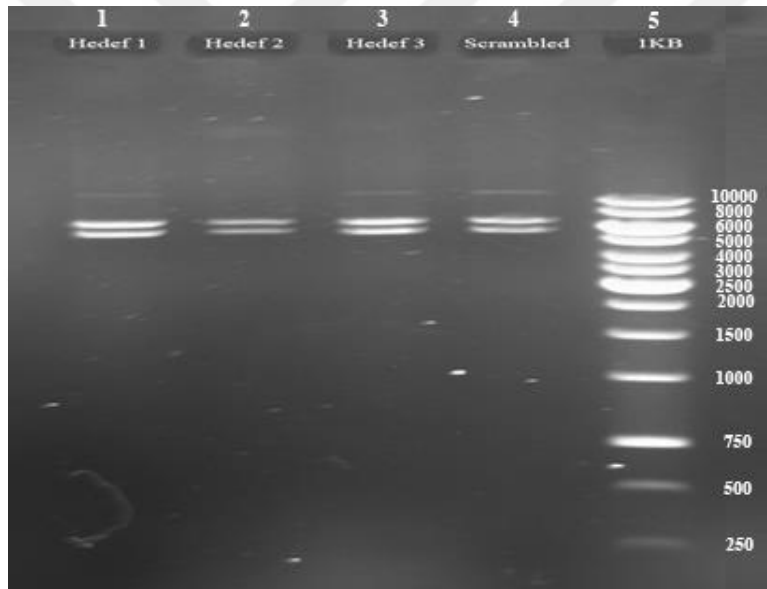


Şekil 3.20. Hedef 1, Hedef 2, Hedef 3, scrambled ve negatif kontrol plazmidlerini içine alan DH5 alfa suşu görüntüsü

Transformasyonun kontrolü için KpnI restriksiyon enzimi ile kesim yapılarak pLenti-U6-sgRNA-SFFV-Cas9-2A-Puro Vector varlığı test edilmiştir. Transformasyon sonrası besi yerlerinden izole edilen plazmid DNA'lara ait yoğunluk ve saflık oranları Çizelge 3.5'de, enzim kesimi sonrası band paternleri ise Şekil 3.21'de verilmiştir.

Çizelge 3.5. Transformasyon sonrası Plazmid DNA saflık kontrolleri ve miktar sonuçları

Örnek adı	DNA yoğunlukları(50µl içinde; ng/µl)	260/280 abs oranı	260/230 abs oranı
Hedef 1	310	1.9	2.2
Hedef 2	311	1.9	2.3
Hedef 3	374	1.9	2.3
Scrambled	254	1.9	2.2

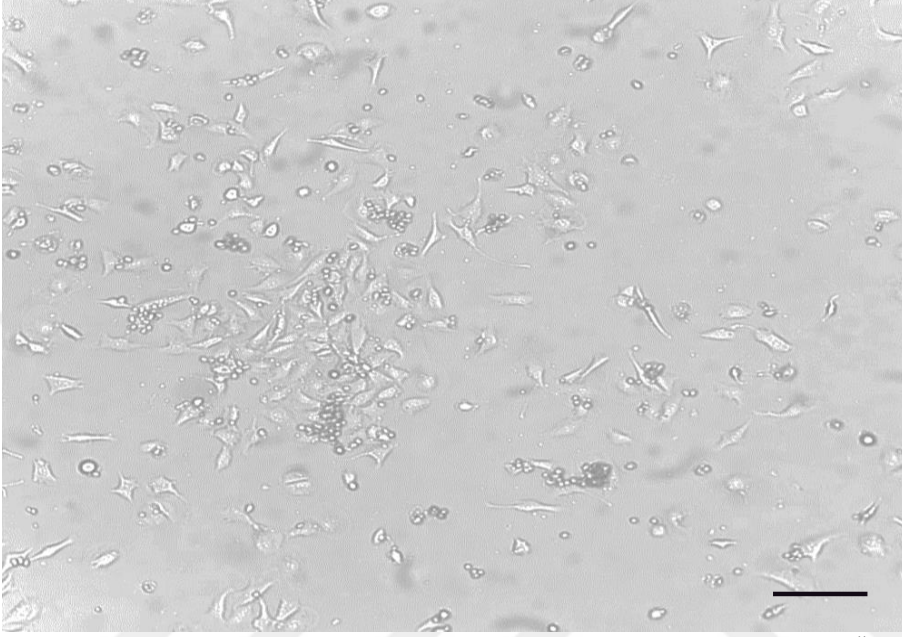


Şekil 3.21. 2 dakika ısı şoku ile yapılan transformasyon sonrası Mutasyon enzim kesim analizi DNA enzim kesim bantları: 1.kuyucuk Hedef 1 bölgesine, 2. kuyucuk Hedef 2 bölgesine, 3. kuyucuk Hedef 3 Bölgesine, 4. kuyucuk Grup Sham (Scrambled) plazmidlerine ait kesim bantlarını ve 5. Kuyucuk ise 1kb DNA merdivenini (Thermo Scientific, GeneRuler 1 kb DNA ladder, kat no: SM0311) göstermektedir

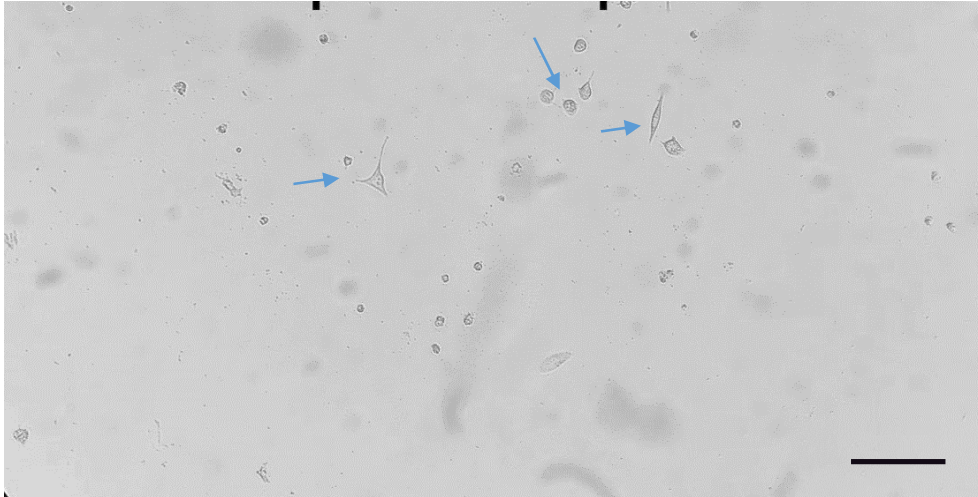
3.4. Transfeksiyon Deneylerine Ait Bulgular

1:1-1:10 oranları arasında belirlenen miktarda DNAfectin ile yapılan transfeksiyon uygulamalarında sadece 1:3,5 -1:5 oranlarında DNAfectin uygulanan Hedef 1

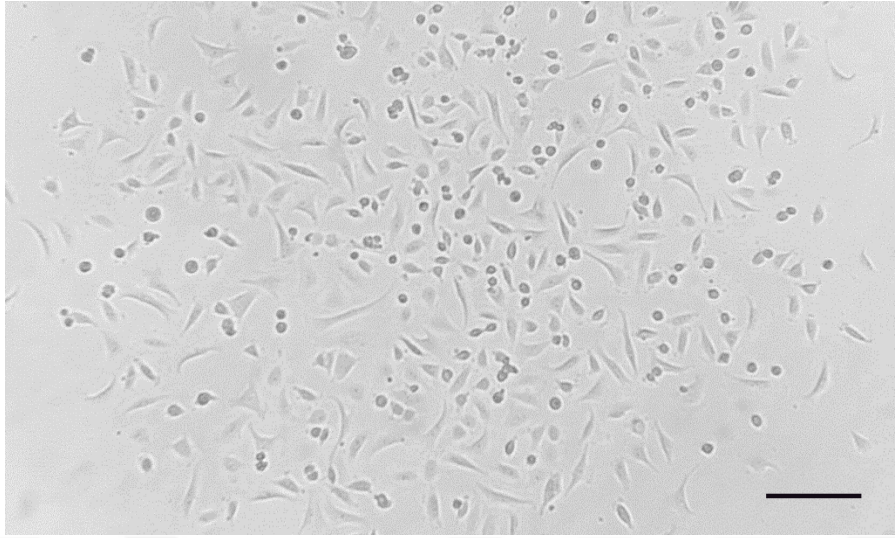
bölgesinde transfeksiyon gerçekleşmiştir. DNA dizi analizi ile heterojen transfeksiyon gerçekleştiği gözlemlenen bu gruplar üzerinde monoklon oluşturma deneyleri yapılmıştır. Bu nedenle sadece Hedef 1 grubuna ait transfeksiyon deney görselleri Şekil 3.22-3.24’de verilmiştir.



Şekil 3.22. 1:3.5 oranında DNAtectin ile 8 saat transfeksiyon yapılan hücreler. Ölçek çubuğu: 200 μm .



Şekil 3.23. 1:3.5 oranında DNAtectin ile transfeksiyon yapılan hücelere 2 $\mu\text{g/ml}$ puromisinin 48 saat uygulanması sonrası puromisine direnç gösteren hücreler. Ölçek çubuğu: 200 μm .



Şekil 3.24. Puromisin uygulaması sonrası 12. günde hücre çoğalması. Ölçek çubuğu: 200 µm.

3.5. Transfeksiyon Deneylerinin Doğrulanmasına Ait Bulgular

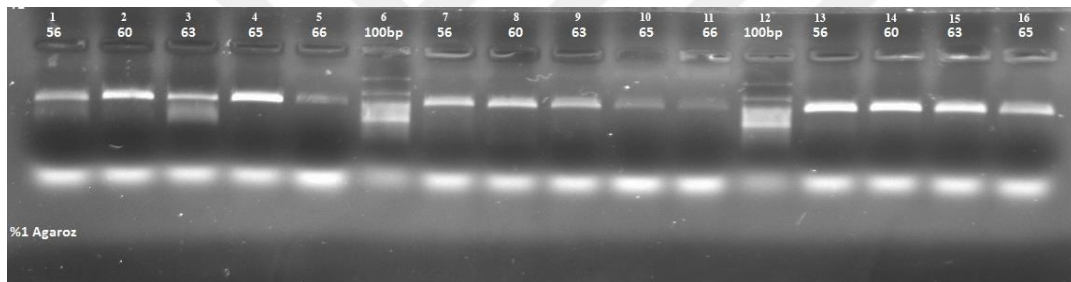
Daha önce belirtilen DNA:DNAfectin oranlarında yapılan transfeksiyon deneyleri sonrasında elde edilen DNA saflık ve miktar sonuçları Çizelge 3.6'da sunulmuştur.

Çizelge 3.6. Farklı DNA:DNAfectin oranlarında yapılan transfeksiyon deneyleri sonrasında elde edilen DNA saflık ve miktar sonuçları

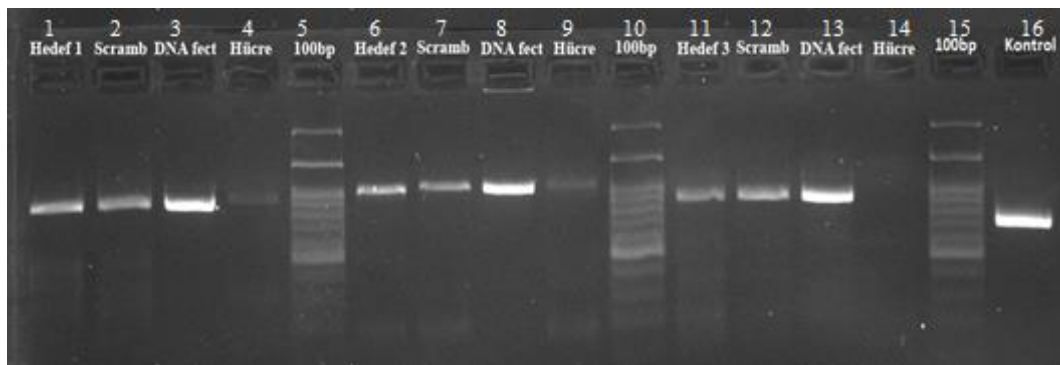
Transfeksiyonda kullanılan DNAfectin oranı	Örnek adı	DNA miktarı ng/µl	260/280 Abs oranları	260/230 Abs oranları
1:10	Hedef 1	226	1.9	2.0
	Hedef 2	196	2.0	2.2
	Hedef 3	251	2.1	2.1
	Scrambled(Grup Sham)	146	2.0	2.1
	DNAfectin	228	1.9	2.0
	Kontrol hücre	883	1.8	2.1
1:7.5	Hedef 1	188	1.8	2.1
	Hedef 2	175	1.9	2.1
	Hedef 3	204	2.0	2.1
	Scrambled(Grup Sham)	127	1.9	2.0

Çizelge 3.6 devamı	DNAfectin	181	2.0	2.0
	Kontrol hücre	139	2.0	2.1
1:5	Hedef 1	260	1.9	2.2
	Hedef 2	181	2.0	2.1
	Hedef 3	195	2.1	2.0
1:3.5	Hedef 1	114	1.9	2.0
	Hedef 2	196	2.0	2.2
	Hedef 3	112	2.2	0.46

Hücre izolasyonunun ardından, 56°C-66°C arasındaki sıcaklıklarda gradient PCR yapılarak her bir hedef bölge için en iyi sonuç veren bağlanma sıcaklığı tespit edilmiştir. Gradient PCR'a ait jel görüntüleme sonuçları Şekil 3.25'de, optimum sıcaklık olarak belirlenen 60°C bağlanma sıcaklığı uygulanan PCR ürünlerine ait agaroz jel görüntüsü Şekil 3.26'da verilmiştir.



Şekil 3.25. Her bir hedef bölge için gradient PCR sonuçlarına ait %1'lik agaroz jel görüntüsü: 1-5. kuyucuklar Hedef 1 bölgesine, 7-11. kuyucuklar Hedef 2, 13-16. kuyucuklar Hedef 3 bölgesine ait PCR ürünlerini, 6 ve 12. Kuyucuklar ise 100bp DNA merdivenini (GeneDireX, 100bp RTU, kat no: DM001-R500) göstermektedir.

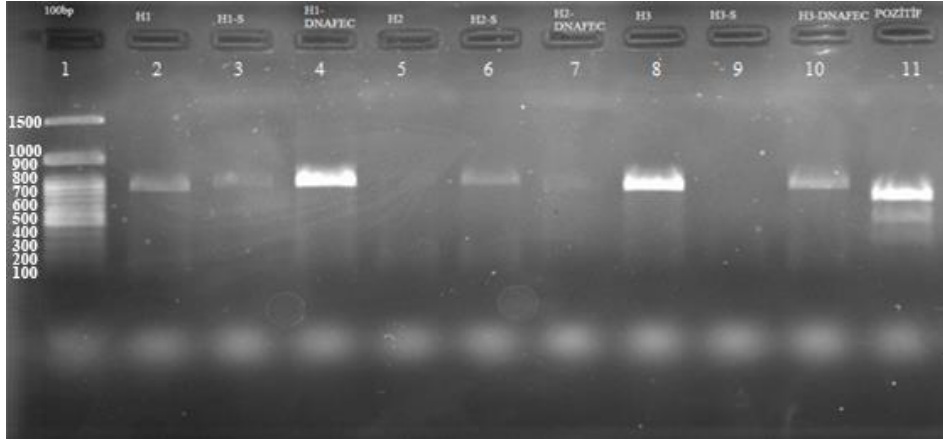


Şekil 3.26. Optimum sıcaklık olarak belirlenen 60°C bağlanma sıcaklığı uygulanan PCR ürünlerine ait %1'lik agaroz jel görüntüsü. 1-4. kuyucuklar Hedef 1 bölgesi, 6-9. kuyucuklar Hedef 2 bölgesi, 11-14. kuyucuklar Hedef 3 bölgesi oligonükleotitleri kullanılarak sırasıyla deney grubu, scrambled (sham) grubu, DNAfectin grubu ve kontrol hücre grubu DNA izolatları ile yapılan PCR ürünlerini, 16. kuyucuk pozitif kontrol PCR ürününü, 5, 10 ve 15.

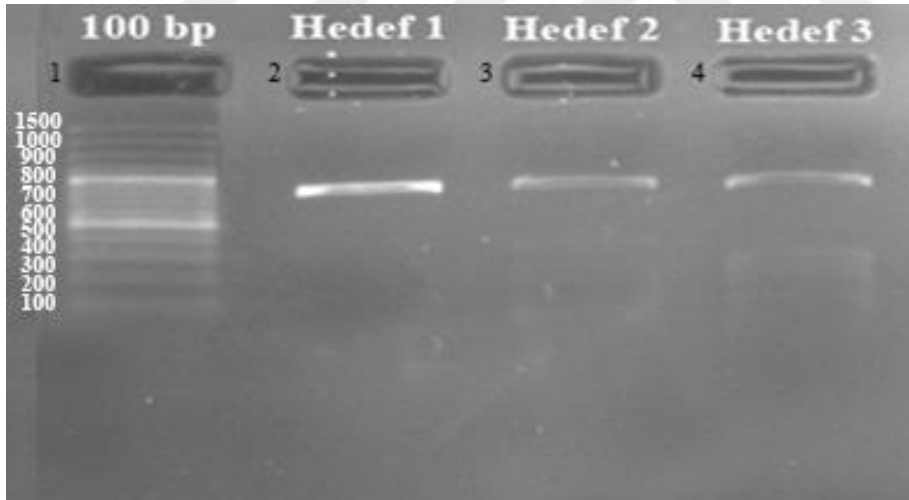
kuyucuklar 100 bp DNA merdivenini (GeneDireX 100bp RTU, DM001-R500) göstermektedir.

Farklı DNA:DNAfectin oranlarında transfeksiyon sonrası elde edilen DNA'lar PCR işleminin ardından Genomik bölünme analizine tabi tutulmuştur. Şekil 3.27'de 1:10 oranında DNAfectin ile transfeksiyon sonrası reannealing PCR ürünlerinin Detection enzim kesimi sonrası %1'lik agaroz jelde görüntüsü verilmektedir. Bu analizde beklenen kesim paternleri firma tarafında kit ile birlikte sağlanan pozitif kontrol örneği hariç, başarılı transfeksiyon gruplarında dahi ya silik olarak elde edilmiş (Şekil 3.28) ya da hiç gözlemlenmemiştir.





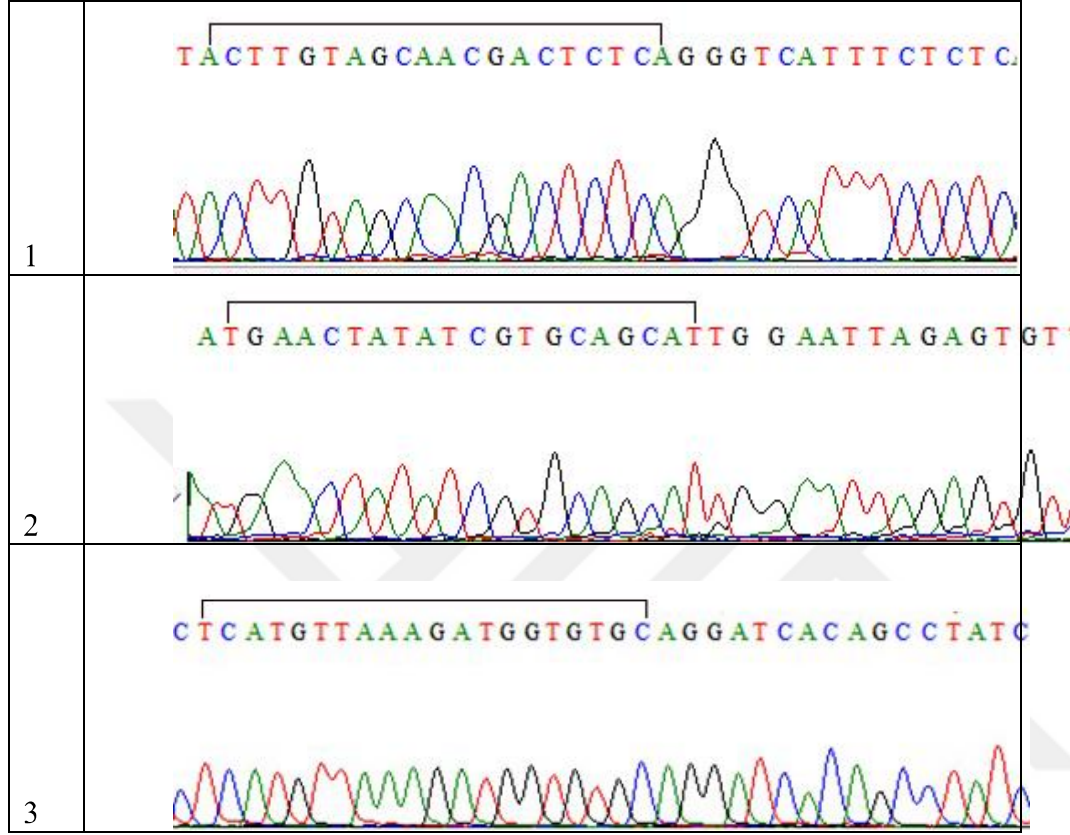
Şekil 3.27. 1:10 oranında DNA-DNAfectin ile transfeksiyon sonrası reannealing PCR ürünlerinin Detection enzim kesimi sonrası %1'lik agaroz jel görüntüsü. 1. kuyucuk 100 bp DNA merdivenini (GeneDireX, 100bp RTU, kat no: DM001-R500), her biri sırasıyla deney, sham ve DNAfectin gruplarını içermek üzere, 2-4. kuyucuklar Hedef 1 bölgesi, 5-7. kuyucuklar Hedef 2 bölgesi ve 8-10. kuyucuklar Hedef 3 bölgesi için enzim kesim bantlarını, 11. kuyucuk pozitif kontrol enzim kesim bandını göstermektedir. 750bp büyüklüğünde olan pozitif kontrolün PCR amplifikasyonu sonrası kesim bantları 500bp ve 250 bp'dir.



Şekil 3.28. 1:7.5 DNA-DNAfectin oranı ile transfeksiyon sonrası reannealing PCR ürünlerinin Detection enzim kesimi sonrası %1'lik agaroz jel görüntüsü. 2.kuyucuk Hedef 1 bölgesine, 3.kuyucuk Hedef 2 bölgesine, 4. kuyucuk Hedef 3 bölgesine ait enzim kesim bantlarını, 1.kuyucuk ise 100bp DNA merdivenini (GeneDireX, 100bp RTU, kat no: DM001-R500) göstermektedir. Beklenen kesim paternleri oldukça silik olarak görülmektedir.

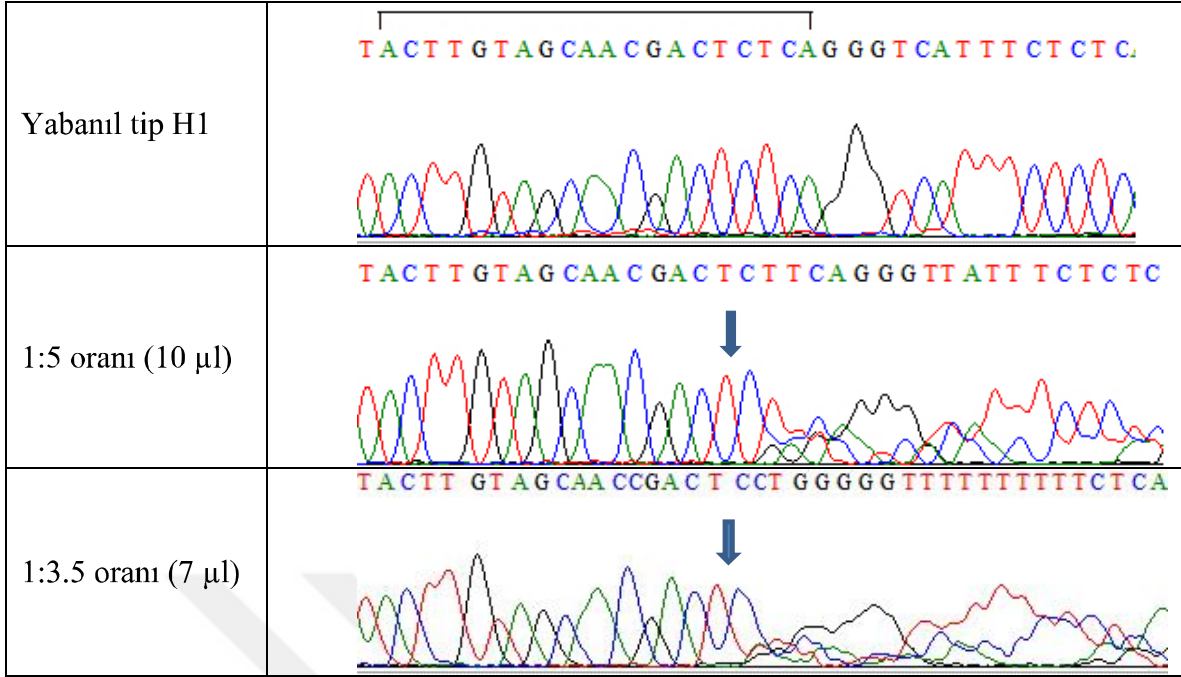
Transfeksiyon başarısının genomik bölünme tanımlama kiti ile güvenilir şekilde tespit edilemeyeceğinin belirlenmesi üzerine tüm gruplardan elde edilen DNA'lar PCR işleminin ardından DNA dizi analizine tabi tutulmuştur. Şekil 3.29'da

kontrol grubundaki yabancı tip hücreden elde edilen DNA’larda Hedef 1, 2 ve 3. bölgelere ait DNA dizi analizi sonuçları verilmiştir.



Şekil 3.29. Yabancı tip hücreden elde edilen DNA’larda *Tex15* geni 1 ekzondaki Hedef 1, 2 ve 3. bölgelere ait DNA dizi analizi sonuçları. Siyah çizgiyle işaretli bölgeler sgRNA’ya ait hedef bölgeleri göstermektedir.

Farklı DNA:DNAfectin oranlarında transfeksiyon sonrası DNA’lardan elde edilen ve mutasyon olduğu belirlenen diziler ise Şekil 3.30’ da verilmiştir. Buna göre Hedef 1 bölgesi için 1:3.5 (7 µl) ve 1:5 (10 µl) DNAfectin oranlarında elde edilen frameshift mutasyonları ile transfeksiyonun başarılı olduğu, Hedef 2 ve Hedef 3 bölgelerinde ise hiçbir DNAfectin oranında transfeksiyonun başarılı olmadığı görülmüştür. Başarılı olmayan DNAfectin oranlarında elde edilen DNA dizi analizleri yabancı tipten farklı bir dizi vermediğinden metin içerisinde paylaşılmaya gerek görülmemiştir.



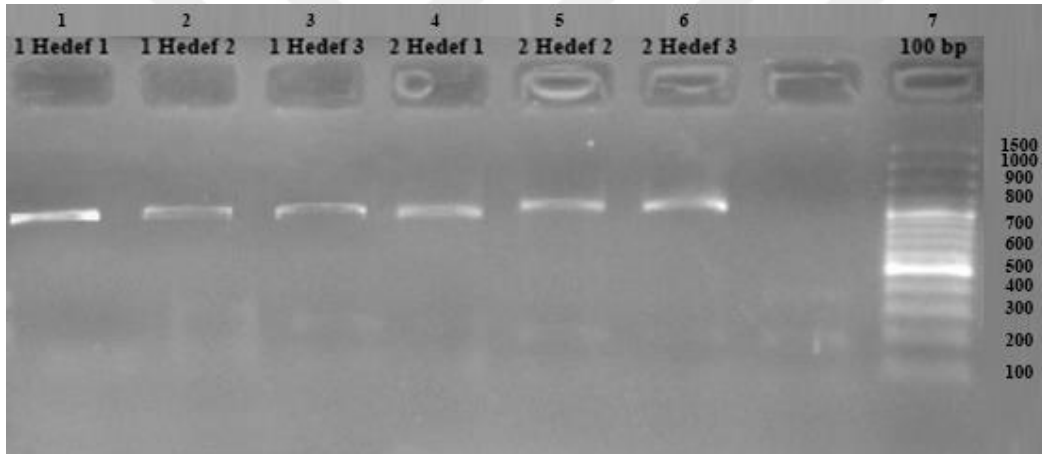
Şekil 3.30. DNAfectin ile transfeksiyon sonrası *Tex15* geni 10. ekzondaki Hedef 1 bölgesi dizi analizi sonuçları. Üst dizi yabanıl tip diziyi, ortadaki dizi 1:5 oranında (10 µl) ve en alttaki dizi de 1:3.5 oranında (7 µl'lik) DNAfectin uygulamasından alınan sonucu, siyah işaretli bölge sgRNA'ya ait hedef bölgesini ve mavi oklar ise hedef dizinin T ve C bazlarından itibaren meydana gelen frameshift mutasyonlarını göstermektedir.

7µl DNAfectin, 2µg plazmid DNA ile yapılan (1:3.5 oranında) transfeksiyon sonuçlarının DNA dizi analizi sonucunda Hedef 1 bölgesinde heterojen hücre grubunda frameshift mutasyon bulgusuna rastlanılmıştır. Bu nedenle bu orandaki DNA:DNAfectin miktarlarında iki farklı hücre yoğunluğunda transfeksiyon tekrar edilerek doğrulama yapılmıştır.

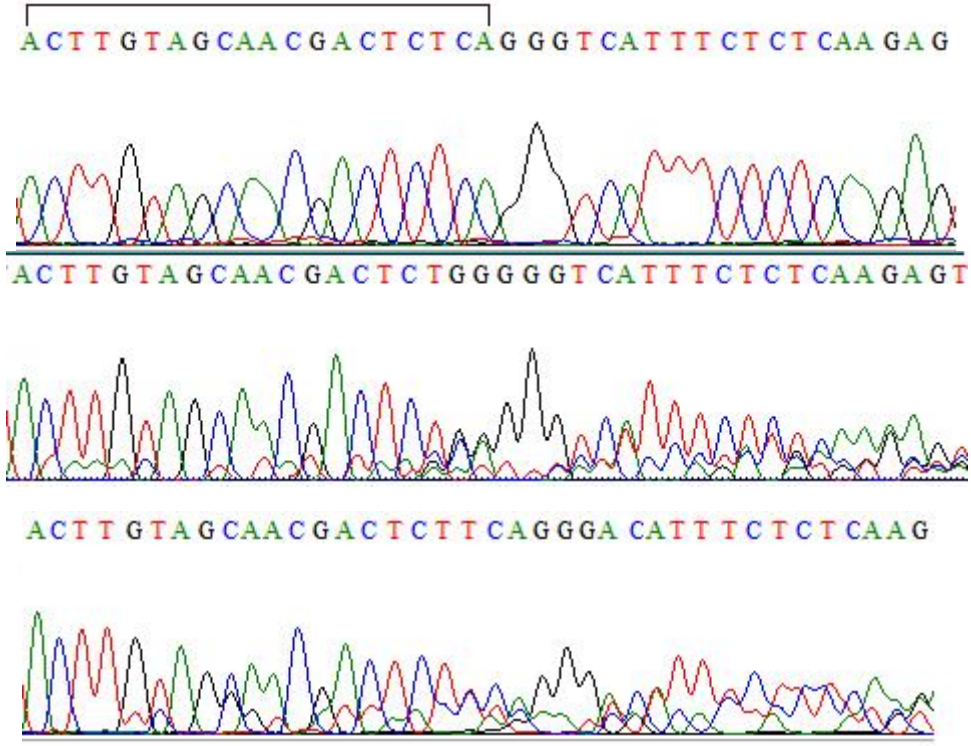
Farklı hücre yoğunluklarında transfeksiyonun etkinliğini test etmek için, P(0) pasaj aşamasında dondurulan hücre çözündürülerek $2,5 \times 10^5$ hücre içeren ve 1×10^5 hücre içeren 2 ayrı grupta transfeksiyon uygulaması tekrarlanmıştır. 1. ve 2. grup hücre kültürlerinden yapılan DNA izolasyon sonuçları Çizelge 3.7'de, PCR ürünlerine ait jel görüntüleme sonuçları Şekil 3.31'de ve DNA dizi analiz sonuçları Şekil 3.32'de verilmiştir.

Çizelge 3.7. Hedef 1 bölgesi için 1:3.5 (7µl) oranında DNAfectin ile farklı yoğunluklarda hücre serileri kullanılarak elde edilen 1. ve 2. grup transfeksiyon sonrası hücre DNA saflık kontrolleri ve miktar sonuçları.

Transfeksiyonda kullanılan hücre yoğunluğu	Örnek adı	DNA miktarı ng/µl	260/280 Abs oranları	260/230 Abs oranları
1. grup	H 1	9	1.8	2.0
	H 2	12.5	1.9	2.2
	H 3	8.4	2.0	2.1
2. grup	H 1	6.5	1.8	2.0
	H 2	5.3	1.9	2.1
	H 3	7.3	2.1	2.2



Şekil 3.31. 1:3.5 oranında DNA:DNAfectin ile transfeksiyon 1. ve 2.grup PCR ürünlerine ait %1'lik agaroz jel görüntüsü. 1-3.kuyucuklar 1. gruba ait Hedef 1, 2 ve 3 PCR ürünlerini, 4-6. kuyucuklar 2. gruba ait Hedef 1, 2 ve 3 PCR ürünlerini, 7. kuyucuk ise 100bp DNA merdiveni (GeneDireX, 100bp RTU, kat no: DM001-R500) göstermektedir.



Şekil 3.32. Hedef 1 bölgesi için farklı hücre yoğunlukları içeren 1 ve 2. grup hücre serilerinde 7µl DNAfectin ile transfeksiyon sonrası DNA dizi analizi sonuçları. Üst dizi yabancı tip hücreyi, ortadaki dizi 1. grubu, en alttaki dizi ise 2. grubu göstermektedir.

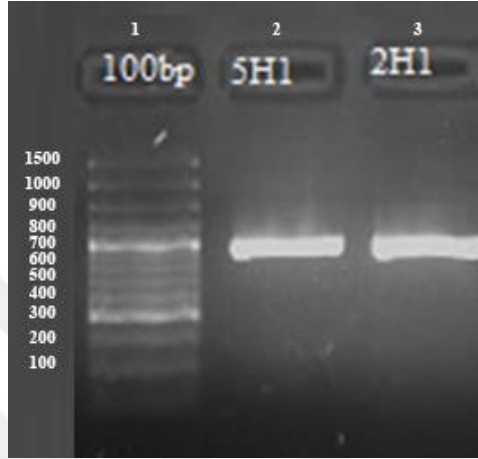
7µl DNAfectin ile transfeksiyon sonrası Hedef 2 ve Hedef 3 bölgelerinde her iki grupta da transfeksiyon gözlenmediği için, DNA dizi analizleri gösterilmemiştir.

Transfeksiyon uygulamalarında sadece Hedef 1 bölgesinde transfeksiyon gerçekleşmesi nedeniyle DNA:DNAfectin oranı 1:2.5 (2µg plazmid DNA, 5µl DNAfectin) ve 1:1 (2µg plazmid DNA, 2µl DNAfectin) denemesi için sadece Hedef 1 bölgesi transfeksiyon uygulaması yapılmıştır. Ancak transfeksiyonun bu oranlarda başarılı olmadığı gözlemlenmiştir.

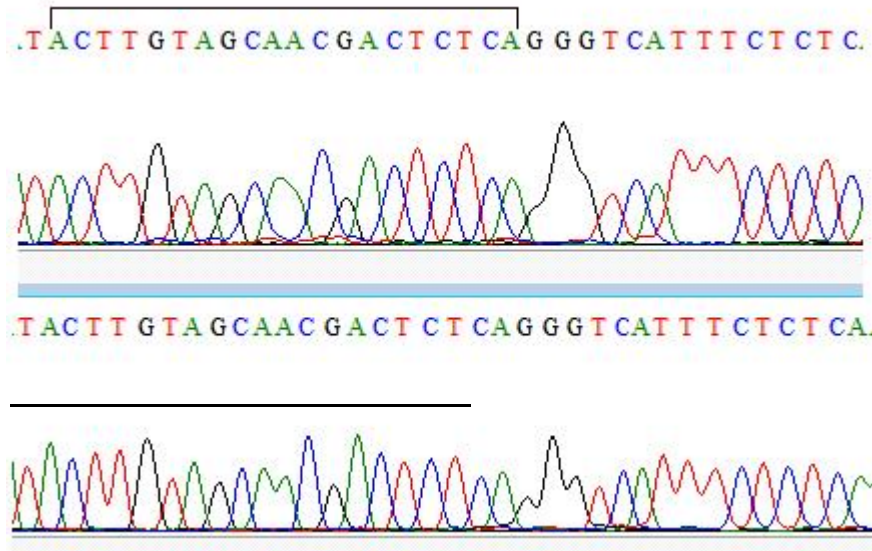
1:2.5 ve 1:1 DNA:DNAfectin oranlarında Hedef 1 bölgesine yapılan transfeksiyon deneyleri sonrasında elde edilen DNA saflık ve miktar sonuçları Çizelge 3.8’de, PCR ürünlerinin jel görüntüleme sonuçları Şekil 3.33’de, DNA dizi analiz sonuçları Şekil 3.34-3.35’te verilmiştir.

Çizelge 3.8. 1:2.5 (5 µl) ve 1:1 (2 µl) DNA:DNAfectin oranları ile Transfeksiyon sonrası hücre DNA saflık kontrolleri ve miktar sonuçları

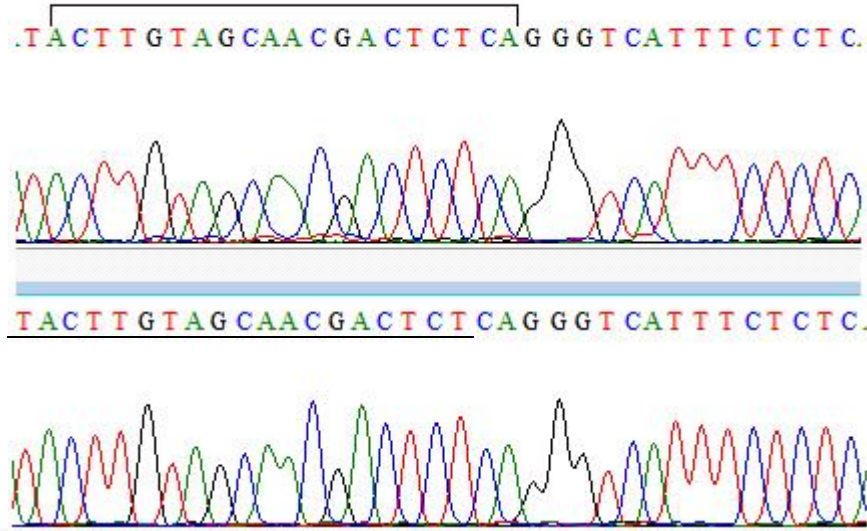
Örnek	DNA yoğunluğu, ng/ µl	260/280	260/230
5 µl Hedef 1	109,2	2,01	2,12
2 µl Hedef 1	91,9	2,03	2,06



Şekil 3.33. 1:2.5 (5 µl) ve 1:1 (2 µl) Hedef 1 PCR ürünlerine ait %1'lik agaroz jel görüntüsü. 1.kuyucuk 100 bp DNA merdivenini (GeneDireX, 100bp RTU, kat no: DM001-R500), 2. kuyucuk 1:2.5 (5µl), 3. kuyucuk 1:1 (2µl) DNA:DNAfectin oranında Hedef 1 bölgesine ait PCR ürünlerini göstermektedir.



Şekil 3.34. 1:2.5(5µl) oranında hedef 1 bölgesi transfeksiyon dizi analizi sonuçları. Üst dizi yabancı tip hücreyi, alt dizi transfeksiyon uygulanmış hücre dizisini göstermektedir. İşaretli bölgeler sgRNA 'ya ait hedef bölgeleri göstermektedir.



Şekil 3.35. 1:1 (2µl) oranında Hedef 1 bölgesi transfeksiyon dizi analizi sonuçları. Üst dizi yabancı tip hücreyi, alt dizi transfeksiyon uygulanmış hücre dizisini göstermektedir. İşaretli bölgeler sgRNA 'ya ait hedef bölgeleri göstermektedir.

3.6. Monoklon Oluşturulmasına Ait Bulgular

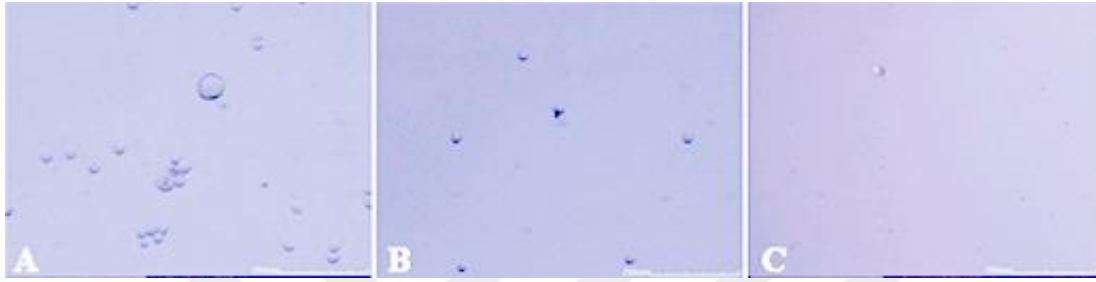
1:5 (10 µl) ile 1:3.5 (7µl) DNA:DNAfectin oranında farklı hücre yoğunlukları kullanılarak Hedef 1 bölgesine transfeksiyon uygulanan 1. ve 2.grup'tan monoklon hücre hattı oluşturabilmek için başlangıç hücre sayısı olan 4000 hücre Flow sitometri ile sayılmıştır. Sayım sonuçları Çizelge 3.9'da verilmiştir.

Çizelge 3.9. Flow sitometri 100 µl'deki hücre sayım sonuçları

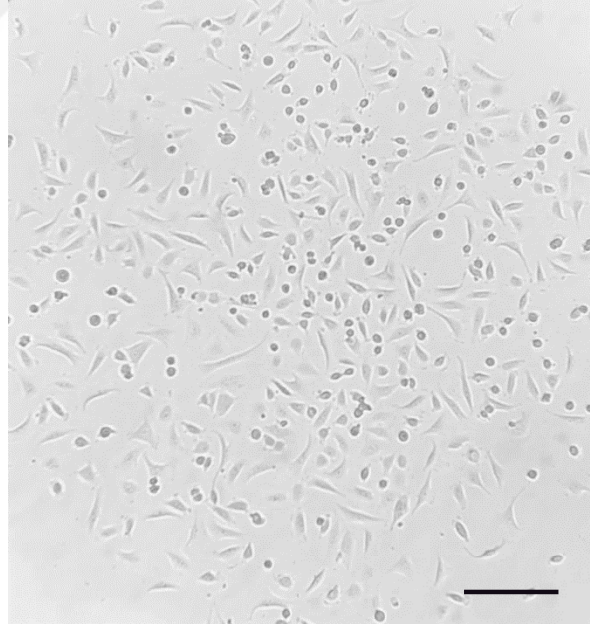
Örnek adı	100µl'deki sayı
10 µl	21000
7 µl -1.grup	21826
7 µl -2.grup	15951

Her gruptan 100µl alınarak okutulmuş ve orantılama yapılarak 4000 hücrenin 1:5 oranı (10 µl) için 18 µl, 1.grup için 18µl'de, 2.grup için 25µl bulunduğu hesaplanmıştır. Her bir grup için ayrı 96 kuyucuklu plağın A1 kuyucuğuna 10 µl için 18 µl, 1.grup için 18µl'de, 2.grup için 25µl hücre içeren kültür ortamı 200 µl'ye tamamlanarak eklenmiştir. Seri dilasyonlar neticesinde tek düşen hücre 15 gün süre

ile takip edilmiş ve çoğalması izlenmiştir. Hücre izolasyonunu takriben PCR yapılmış ve DNA dizi analizi uygulanmıştır. 10 μ l ve 2.grup hücrelerden monoklon düşürme işleminde birçok kez denendiği halde başarılı sonuç elde edilememiştir. Monoklon hücre hattı oluşturma sırasındaki hücre sayısının azalımını gösteren fotoğraflar Şekil 3.36'da; monoklon hücre hattının 15. gününe ait fotoğraf ise Şekil 3.37'da verilmiştir.



Şekil 3.36. Dilüsyon yöntemiyle monoklon hücre düşürülmesi, A:96 kuyucuklu plağın 31 hücre içeren F3 kuyucuğunu, B:8 hücre içeren F5 kuyucuğunu, C ise monoklon hücrenin düştüğü F8 kuyucuğunu göstermektedir. Ölçek çubuğu: 250 μ m.

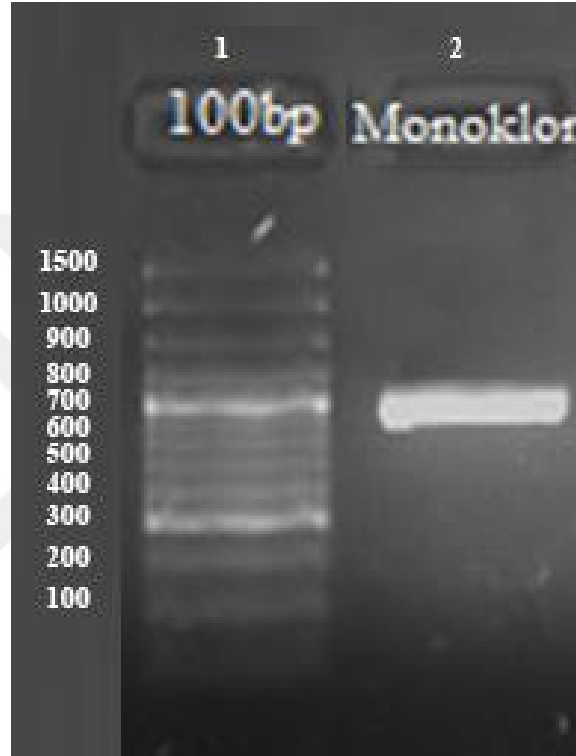


Şekil 3.37. Monoklon hücre hattının 15. Günü. Ölçek çubuğu: 200 μ m.

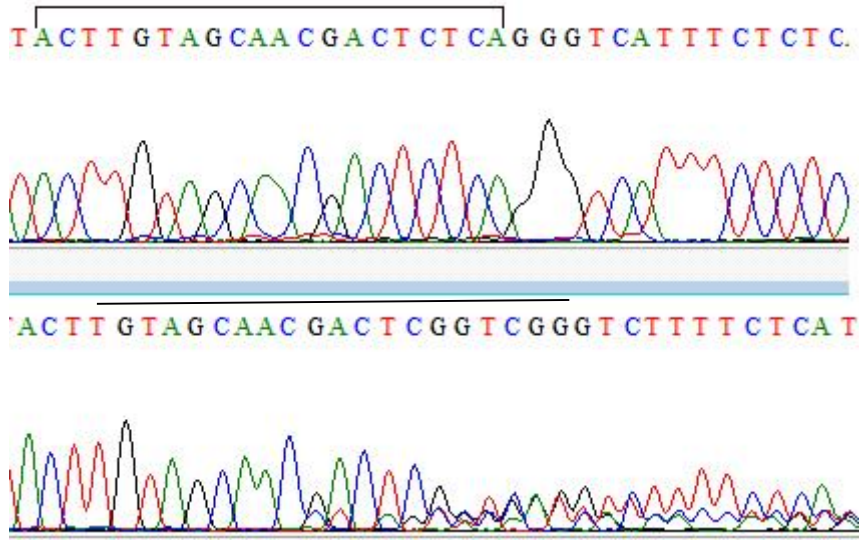
Monoklon hücre hattında mutasyonu belirlenmesi için yine DNA izolasyonu (Çizelge 3.10), *Tex15* geni 1. ekzonu Hedef 1 bölgesi PCR'ı (Şekil 3.38) ve DNA dizi analizi (Şekil 3.39) yapılmıştır.

Çizelge 3.10. Monoklon hücre hattına ait DNA saflık ve miktar kontrolü

Örnek	DNA yoğunluğu ng/μl	260/280	260/230
Monoklon hücre hattı	12.5	2.0	1.9



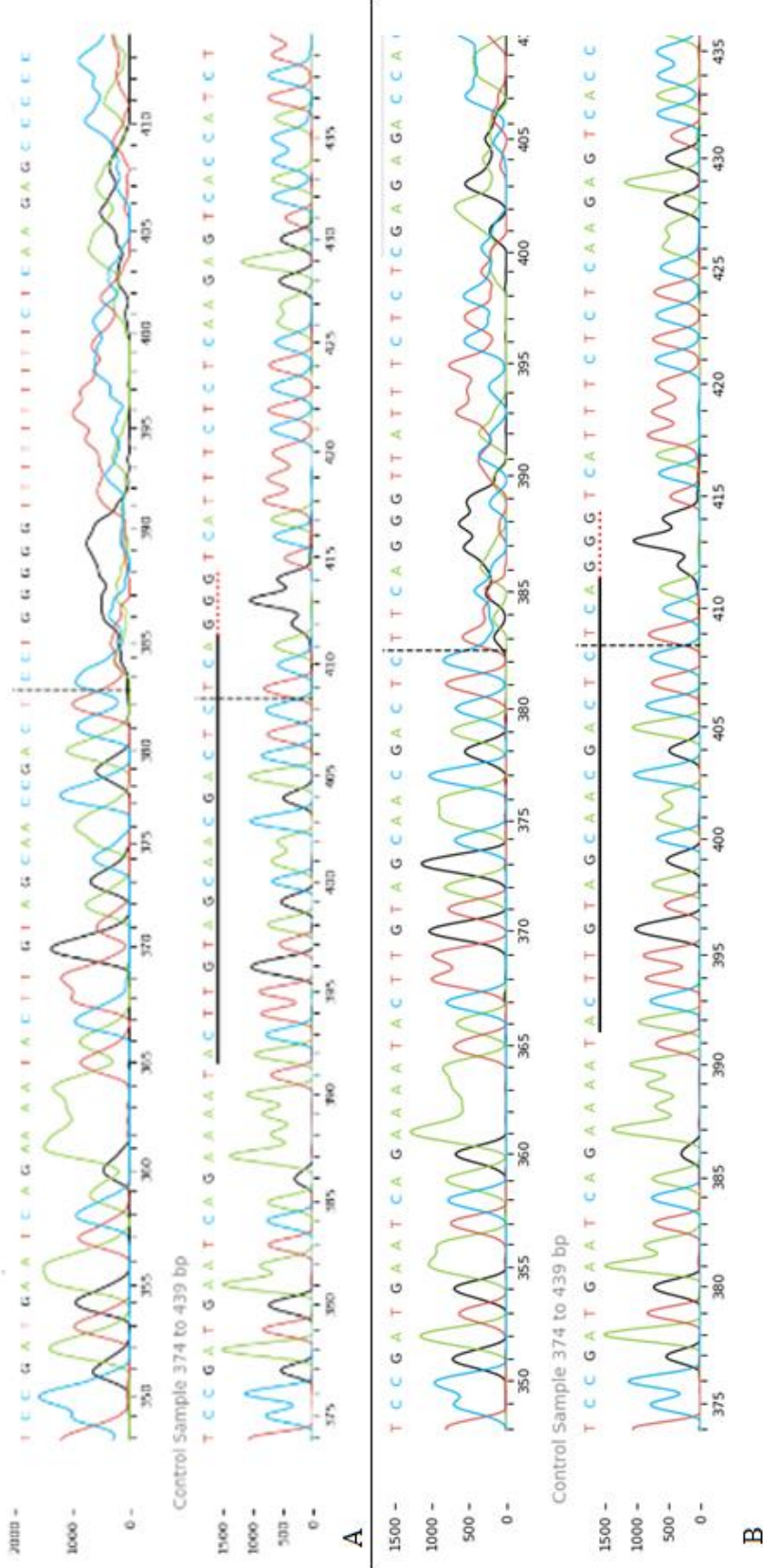
Şekil 3.38. Monoklon hattı Hedef 1 PCR ürünlerine ait %1'lik agaroz jel görüntüsü. 1.kuyucuk 100bp DNA merdivenini (GeneDireX, 100bp RTU, kat no: DM001-R500), 2.kuyucuk monoklon PCR ürün bandını göstermektedir.



Şekil 3.39. Monoklon hücre hattı hedef 1 transfeksiyon dizi analizi sonuçları. Üst dizi yabancı tip hücreyi, alt dizi transfeksiyon uygulanmış hücre dizisini göstermektedir. İşaretli bölgeler sgRNA 'ya ait hedef bölgeleri göstermektedir.

3.7. Knock out Başarısının Belirlenmesine Ait Bulgular

1:5; 1:3,5 DNA:DNAfectin oranlarında uygulanan transfeksiyon deneylerinin DNA dizi analizlerinde transfeksiyon başarılı olmuştur. Hedef 1 bölgesinin hücre popülasyonundaki knock-out (KO) allellerinin yüzdesini belirlemek için kullanılan ICE (Synthego) algoritması analiz sonuçlarına göre; 1:3.5 (7 µl) ve 1:5 (10µl) DNAfectin uygulamada Hedef 1 bölgesi DNA dizi analiz sonuçlarının değerlendirilmesi sırasıyla Şekil 3.40'ta, DNA sekanslarının göreceli dağılımları ve olası indel pozisyonları sırasıyla Şekil 3.41'de, DNA dizi analiz sonuçlarında belirlenen indellerin yaygınlığı ise Şekil 3.42'de verilmiştir. 1:3,5 DNA:DNAfectin oranlarında farklı hücre yoğunlukları kullanılarak Hedef 1 bölgesine transfeksiyon uygulanan 1. ve 2.grup'a ait ICE (Synthego) algoritması analiz sonuçları Şekil 3.43-3.45'te, Monoklon hücre hattı hedef 1 transfeksiyon uygulamasına ait analiz sonuçları Şekil 3.46-3.48'te verilmiştir. ICE algoritmasında değerlendirilen tüm transfeksiyon uygulamalarının yüzdelерinin karşılaştırılması ise Şekil 3.49'da verilmiştir.



Şekil 3.40. 7µl (A) ve 10µl (B) Hedef 1 bölgesi DNA dizi analiz sonuçlarının ICE algoritması ile değerlendirilmesi. Hedef dizi altı çizilerek gösterilmiştir. Kontrol örneğindeki altı kırmızı çiziler PAM dizisini göstermektedir. Dikey kesik çizgiler beklenen kesim bölgesini göstermektedir.

Status

Succeeded

Guide Target

ACTTGTAGCAACGACTCTCA

PAM Sequence

GGG

Indel %

60

Model Fit (R²)

0.6

Knockout-Score

51

POWERED BY PSYNTHEGO

RELATIVE CONTRIBUTION OF EACH SEQUENCE (NORMALIZED)

INDEL CONTRIBUTION ▾ SEQUENCE

+2	14%	CAGAAAATAC	TTGTAGCAACGACTC	NNTCAGGGTCA	TTTCTCTCAAGAGT	CACCATCTTCTGATATAAACAGT
+4	12%	CAGAAAATAC	TTGTAGCAACGACTC	NNNNTCAGGGTCA	TTTCTCTCAAGAGT	CACCATCTTCTGATATAAACAGT
+3	9%	CAGAAAATAC	TTGTAGCAACGACTC	NNNNTCAGGGTCA	TTTCTCTCAAGAGT	CACCATCTTCTGATATAAACAGT
+5	8%	CAGAAAATAC	TTGTAGCAACGACTC	NNNNTCAGGGTCA	TTTCTCTCAAGAGT	CACCATCTTCTGATATAAACAGT

A

Status

Succeeded

Guide Target

ACTTGTAGCAACGACTCTCA

PAM Sequence

GGG

Indel %

98

Model Fit (R²)

0.98

Knockout-Score

98

POWERED BY PSYNTHEGO ICE

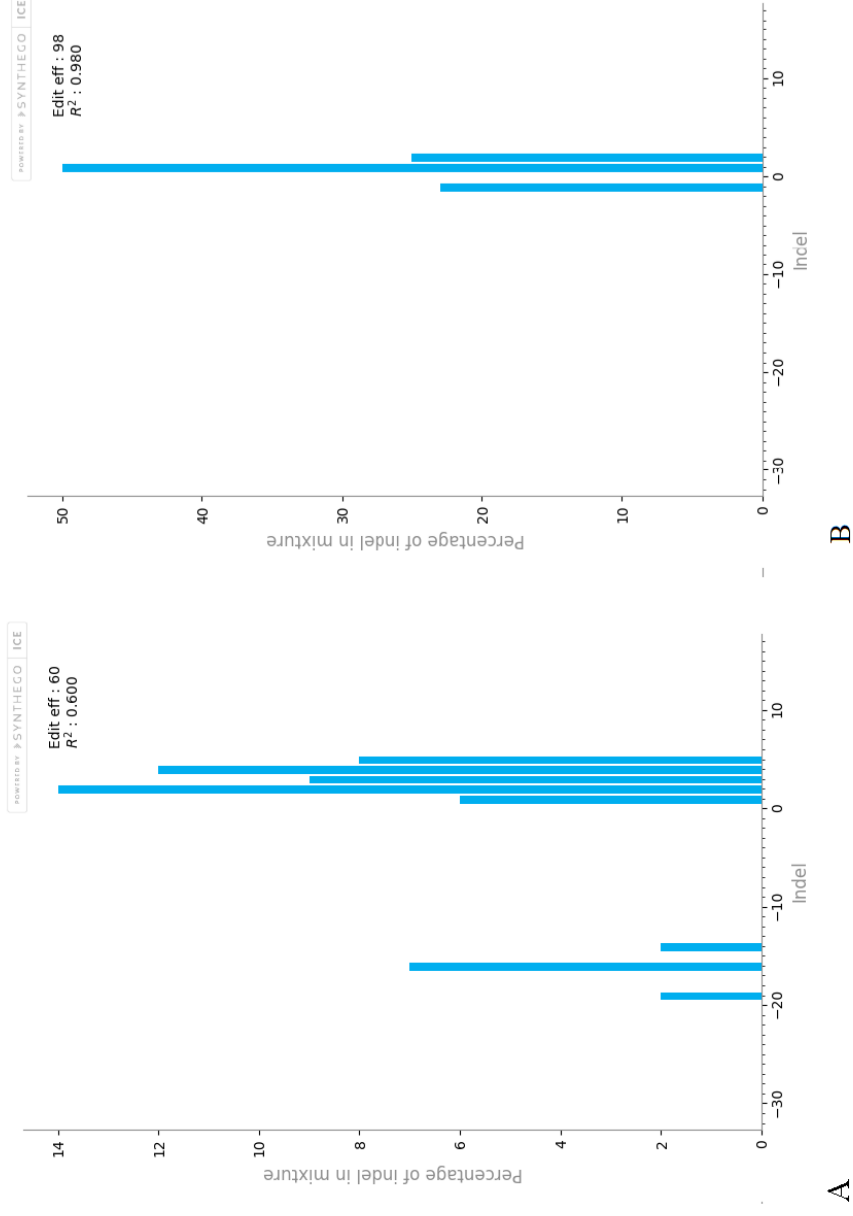
RELATIVE CONTRIBUTION OF EACH SEQUENCE (NORMALIZED)

INDEL CONTRIBUTION ▾ SEQUENCE

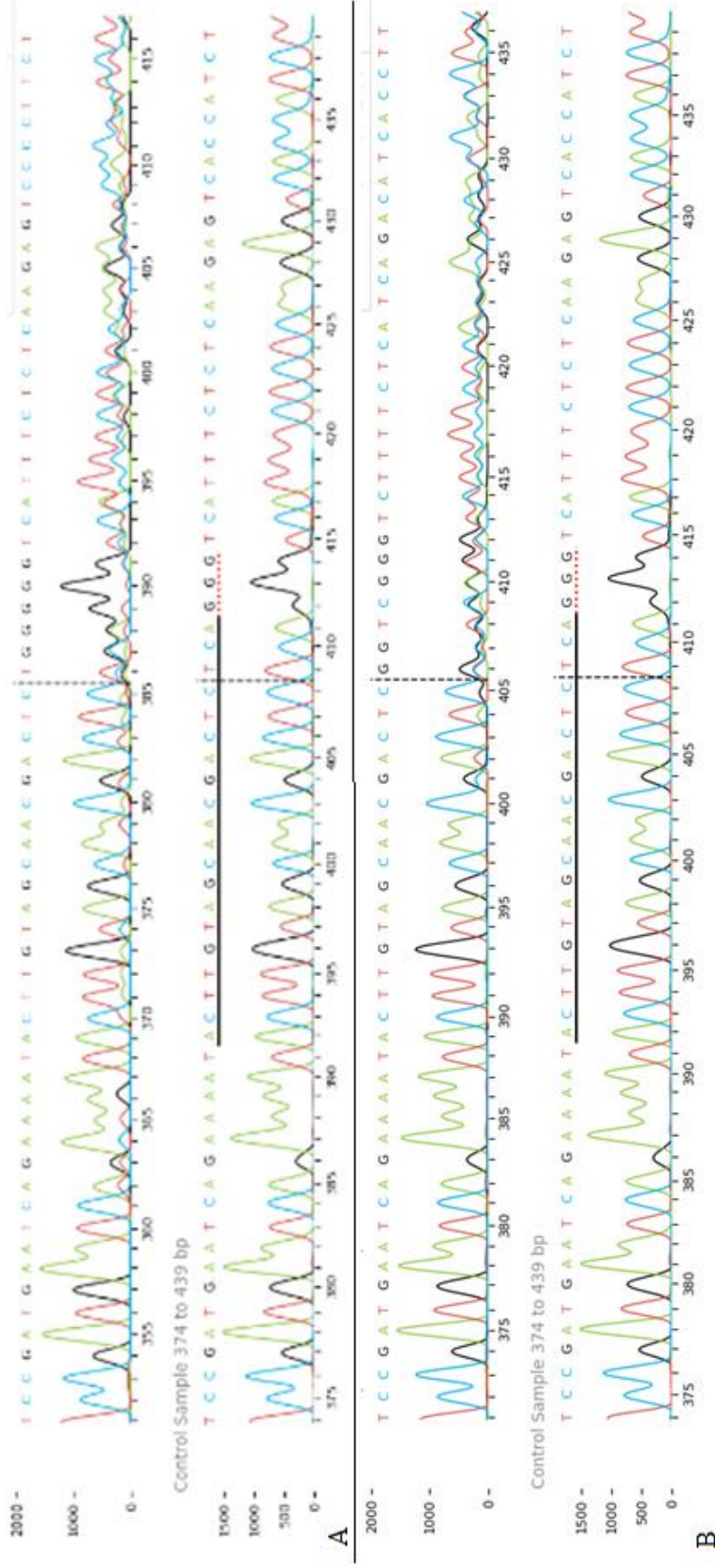
+1	50%	CAGAAAATAC	TTGTAGCAACGACTC	NNTCAGGGTCA	TTTCTCTCAAGAGT	CACCATCTTCTGATATAAACAGTATA
+2	25%	CAGAAAATAC	TTGTAGCAACGACTC	NNNNTCAGGGTCA	TTTCTCTCAAGAGT	CACCATCTTCTGATATAAACAGTATA
-1	23%	CAGAAAATAC	TTGTAGCAACGACTC	NNNNTCAGGGTCA	TTTCTCTCAAGAGT	CACCATCTTCTGATATAAACAGTATA

B

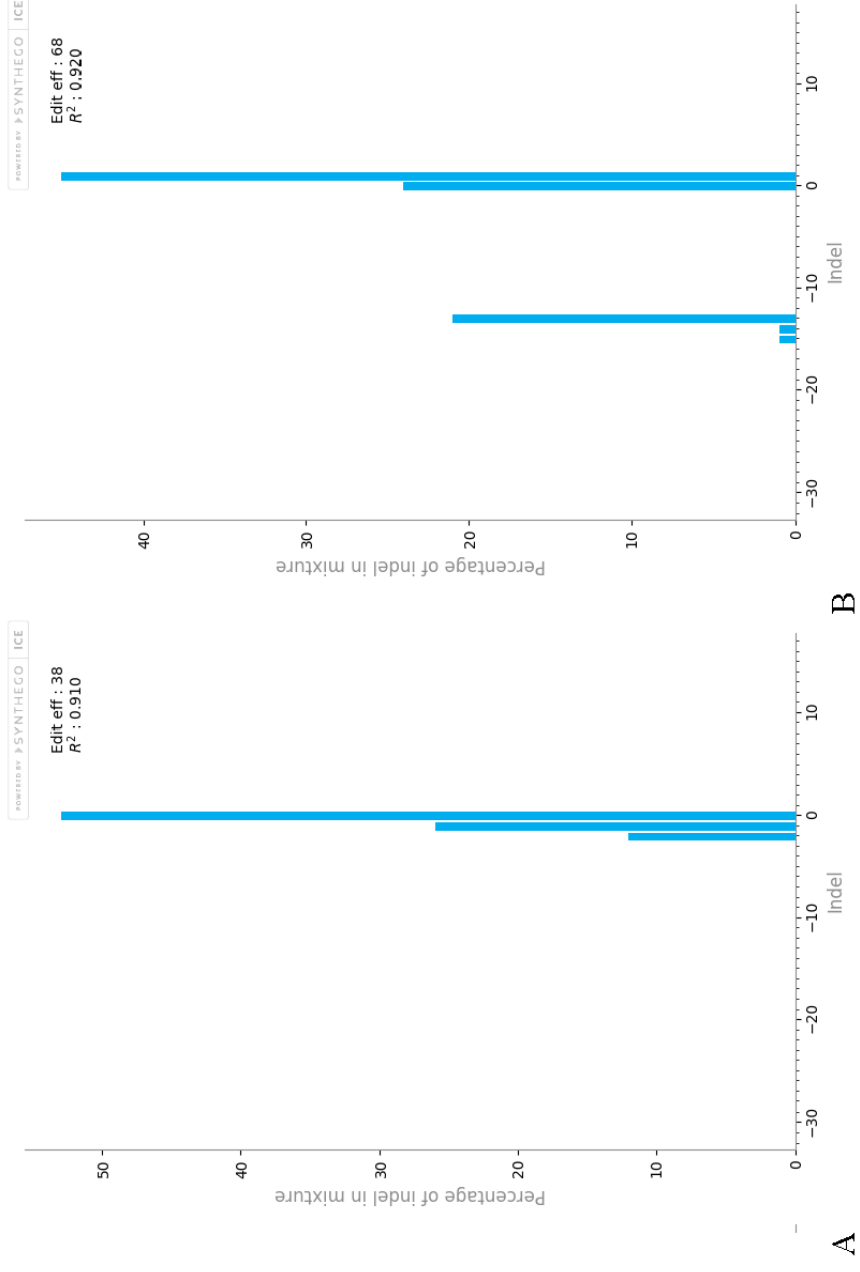
Şekil 3.41. 7µl (A) ve 10µl (B) DNAfectin ile Hedef 1 bölgesi transfeksiyonu sonrası DNA dizi analizi sekansları göreceli dağılımları ve olası indel pozisyonları



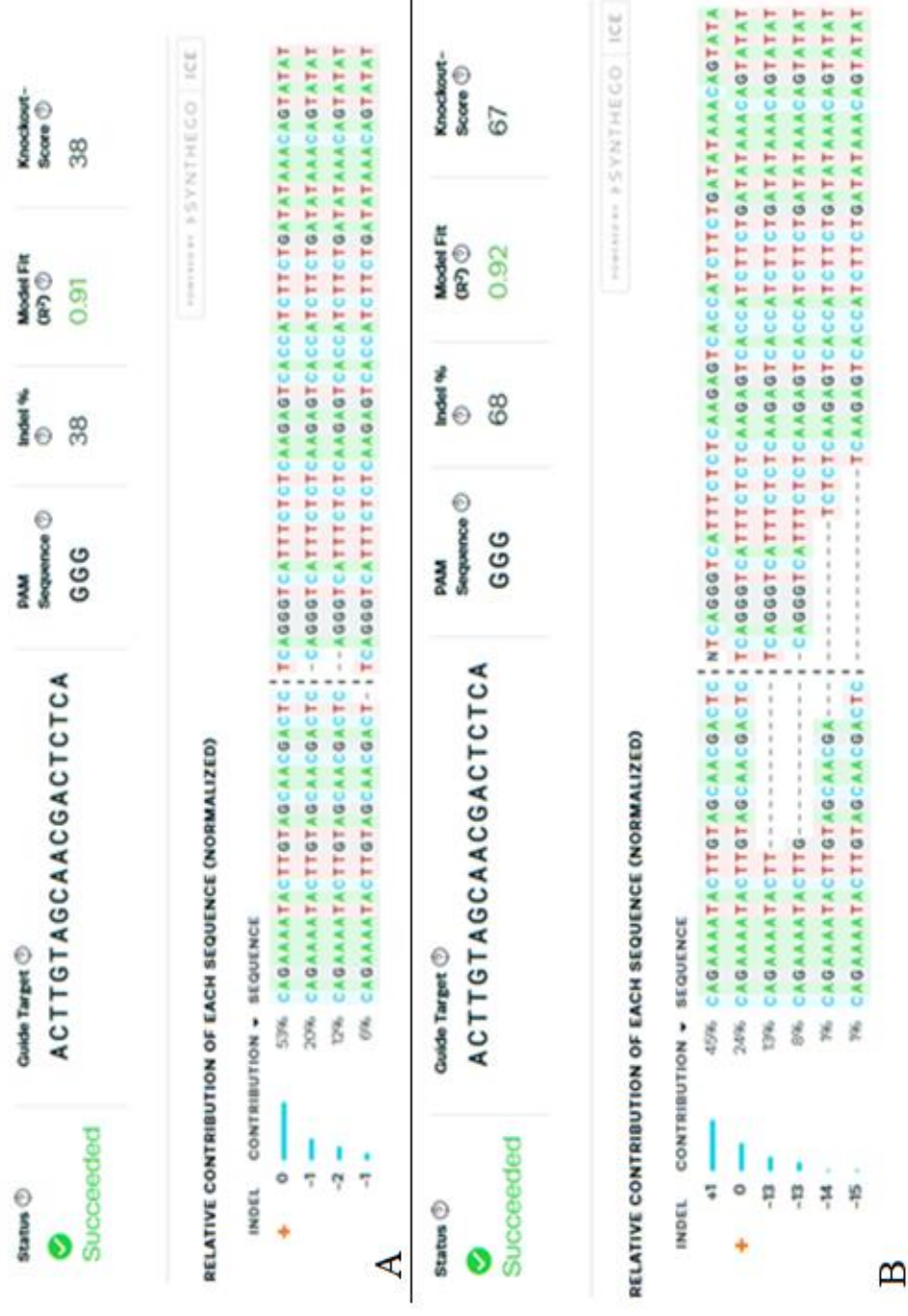
Şekil 3.42. 7µl (A) ve 10µl (B) DNAfectin ile Hedef 1 bölgesi transfeksiyonu sonrası DNA dizi analiz sonuçlarında ICE algoritması tarafından belirlenen indellerin yaygınlığı.



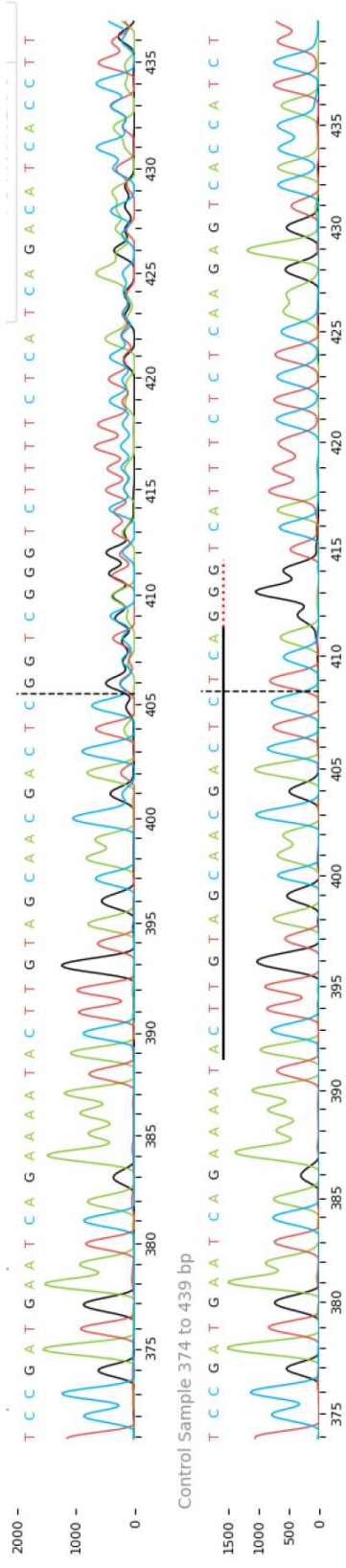
Şekil 3.43. 7µl 1.grup (A) ve 7µl 2.grup (B) hedef 1 bölgesi DNA dizi analiz sonuçlarının ICE algoritması ile değerlendirilmesi. Hedef dizi altı çizilerle gösterilmiştir. Kontrol örneğindeki altı kırmızı çiziler PAM dizisini göstermektedir. Dikey kesik çizgiler beklenen kesim bölgesini göstermektedir.



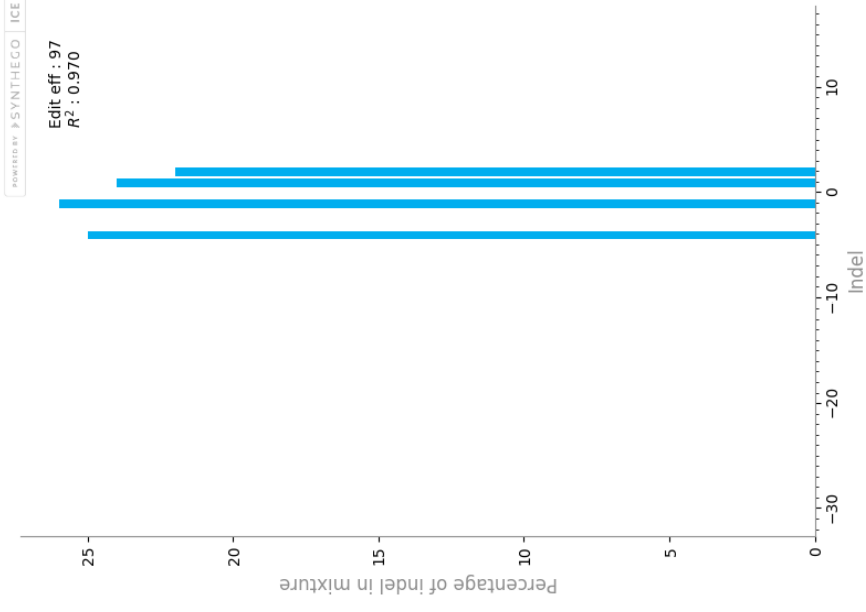
Şekil 3.44. 7µl 1.grup (A) ve 7µl 2.grup (B) hedef 1 bölgesi DNA dizi analiz sonuçlarının ICE algoritması tarafından belirlenen indellerin yaygınlığı.



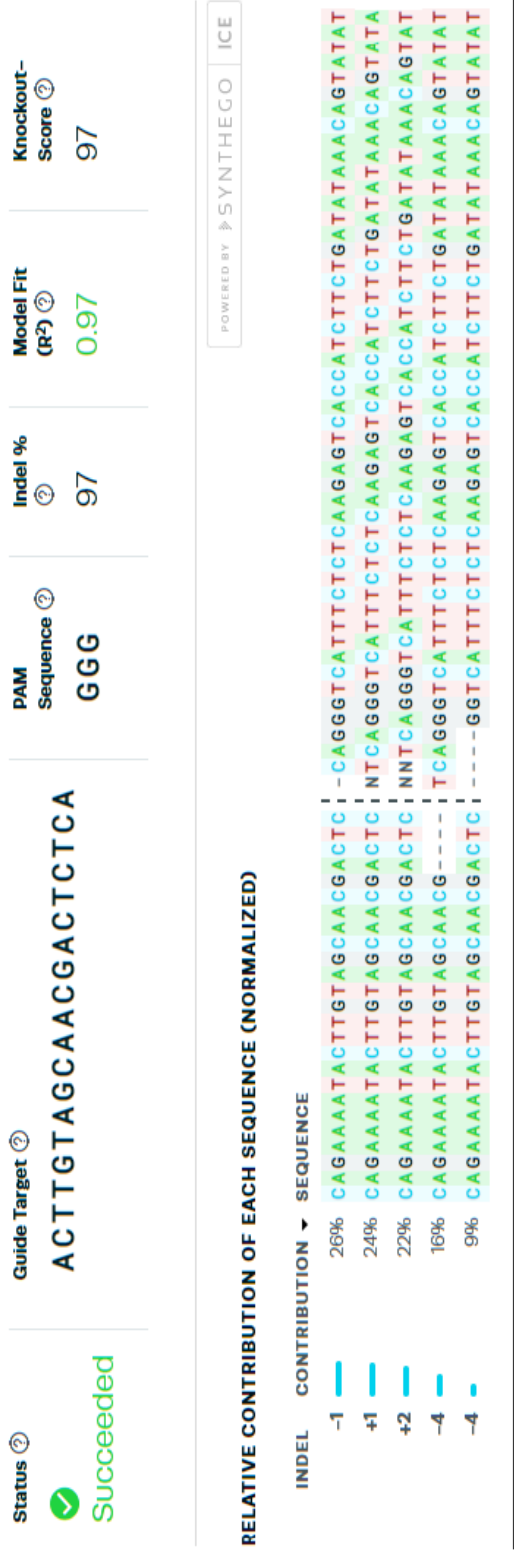
Şekil 3.45. 7µl 1.grup (A) ve 7µl 2.grup (B) hedef 1 bölgesi DNA dizi analizi sekansları göreceli dağılımları ve olası indel pozisyonları.



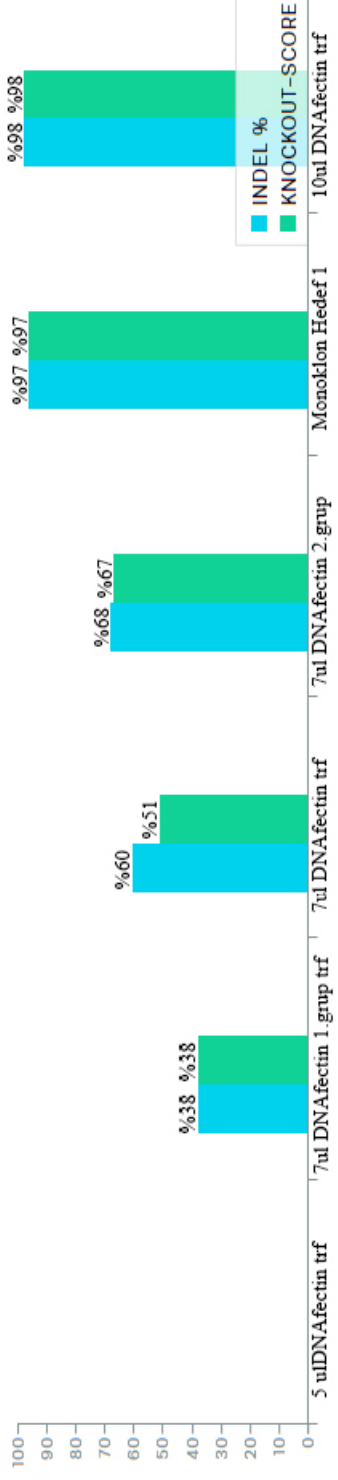
Şekil 3.46. 7µl DNAfectin monoklonon hücre hattı hedef 1 bölgesi DNA dizi analiz sonuçlarının ICE algoritması ile değerlendirilmesi. Hedef dizi altı çizilerek gösterilmiştir. Kontrol örneğindeki altı kırmızı çiziler PAM dizisini göstermektedir. Dikey kesik çizgiler beklenen kesim bölgesini göstermektedir.



Şekil 3.47. 7µl DNAfectin monoklon hücre hattı hedef 1 bölgesi DNA dizi analiz sonuçlarında ICE algoritması tarafından belirlenen indellerin yaygınlığı.



Şekil 3.48. 7µl DNAfectin monoklon hücre hattı hedef 1 bölgesi DNA dizi analiz sonuçlarının ICE algoritması ile değerlendirilmesi



Şekil 3.49. ICE algoritmasında değerlendirilen tüm transfeksiyon yüzdelерinin karşılaştırılması

4. TARTIŞMA

Genom düzenleme araçları, spesifik genleri değiştirmek, gen fonksiyonlarını karakterize etmek, gen terapisini gerçekleştirmek, spesifik genetik mutasyonları düzelterek hastalıkları ortadan kaldırmak, spesifik hastalıkları incelemek için ve model olarak transgenik hayvanları elde etmek için kullanılır. Genom mühendisliğinde devrim yaratan CRISPR-Cas teknolojisinin mekanizması, bilim insanlarının hücrelerdeki ve model organizmalardaki herhangi bir DNA dizisini düzenlemesine olanak verir. Buna karşın CRISPR'ın etkinliği farklı lokuslara ve farklı hücre tiplerine uygulandığında önemli ölçüde değişir.

Kök hücre modelleri genotip ve fenotip arasındaki mekanik bağlantının kurulmasında son derece güçlüdür. Kök hücre araştırmalarında CRISPR'ın en başarılı uygulamalarından biri; kistik fibrozis (CF) hastalarında kültürlenmiş bağırsak kök hücrelerindeki Cystic fibrosis transmembrane conductor receptor (CFTR) mutasyonunu düzeltmektir (Schwank ve ark., 2013). Buna karşın Spermatogonyal kök hücrelerinin başarılı genetik manipülasyonu mevcut gen işleme tekniklerinin düşük verimliliği ve karmaşıklığı nedeniyle sınırlıdır (Wu ve ark., 2015b). SKH'lerin genetik manipülasyonu ve daha sonraki adım olan transplantasyon, istenilen genetik modifikasyonların oluşturulmasına olanak sağlar. SKH'ler kendini yenileyebildiğinden spermatogenez geçirerek genetik bilgiyi bir sonraki kuşağa ileten çok sayıda spermatozoa üretebilirler. Bu nedenle gen modifiye hayvan üretme ve sağlıklı döl oluşturma potansiyeli olan genetik hastalıkların tedavisinde büyük umut vadetmektedirler (Kubota ve Brinster, 2006). Ancak Embriyonik Kök Hücreler (EKH) ile karşılaştırıldığında hücre döngüsünün yavaş, transfeksiyon etkinliğinin düşük ve klonlanmasının zor olması nedeniyle SKH'lerinin genom düzenleme başarı oranı oldukça düşüktür (Kanatsu-Shinohara ve ark., 2005). Spermatogonyal kök hücrelerdeki bu düşük genom düzenleme oranı kök hücrelere özgü genom koruma mekanizmaları ile açıklanmıştır (Fanslow ve ark., 2014). CRISPR'ın keşfi ile birlikte, SKH'lerde CRISPR-Cas9 aracılı gen

düzenlemenin yapılabilirliğini ve mutant sıçanların üretildiğini bildiren çalışmalar sınırlı da olsa vardır (Chapman ve ark., 2015; Wu ve ark., 2015b).

Spermatogonyal kök hücrelerde yapılan CRISPR-Cas9 çalışmalarında, alıcı fare testislerine transplantasyon yapıldığı için fare testislerinden primer hücre kültürü yapılarak SKH izolasyonu yapıldığı görülmektedir (Chapman ve ark., 2015; Wang ve ark., 2017; Wu ve ark., 2015b). Ham testis; Sertoli hücreleri, Leyding hücreleri, SKH'leri, spermatoid ve diğer somatik testis hücreleri gibi spermatogenezde gerekli olan çeşitli büyüme faktörlerini salgılayan birçok hücre tipi içerir. SKH hattı oluşturma çalışmalarında, bu heterojen hücre popülasyonundan somatik hücrelerin uzaklaştırılması gerekmektedir. Spermatogonyal kök hücreler, olgun hayvan testisinde miktar olarak sınırlıdır. Yetişkin fare testisinde üçbin hücre başına sadece bir SKH vardır (Oatley ve Brinster, 2012). Sayı olarak zaten az olan bu hücre grubunun, kültürlenmiş testis hücresi gelişim modeli çalışmasında Sertoli hücre benzeri ve fibroblast benzeri hücrelerin kültür koşullarında sayıları artarken, SKH'lerin sayısının azaldığı bildirilmiştir (Prasetyaningtyas ve ark., 2020). Spermatogenez işlemini in vitro koşullarda gerçekleştirmek için in vivo spermatogenez işlemini taklit edecek bir mikro ortam yaratmak gereklidir; çünkü in vivo mayoz ve spermiyogenez kan testis bariyerinin bulunduğu seminifer tübüllerin mikro ortamında meydana gelir (Deng ve ark., 2017). Bu doktora tezinde alıcı fare testisine transformasyon yapılmayacak olması ve SKH primer kültüründe spermatogonyayı izole etmenin belirtilen sebeplerle zor, zaman alıcı ve ek maliyete neden olması nedeniyle ATCC GC-1 spg (Hofmann ve ark., 1992) ticari fare spermatogonyal tip B hücre hattının kullanımı tercih edilmiştir. Erken spermatogenezin temel moleküler mekanizmasını araştırmada bu hücre hattının model olarak kullanıldığı yayınlar mevcuttur (Li ve ark., 2017; Lin ve ark., 2013; Zhang ve ark., 2013).

Spermatogonyal kök hücrelerinin kültür ortamında ikiye katlanma süresi nispeten yavaştır. Fare SKH'lerinin 3 ila 4 gün arasında iki katına çıkma süresi olduğu bildirilmiştir (Goodyear ve Brinster, 2017; Hamra ve ark., 2005). Spermatogonyal kök hücrelerinin matriks desteğinden bağımsız olarak germ hattı

potansiyelini koruduğunu göstermek için yapılan çalışmada; Spermatogonyal kök hücreleri; süspansiyon halinde, fare embriyonik fibroblast (MEF) üzerinde ve laminin üzerinde üç farklı kültür ortamında büyütülmüş ve süspansiyon halindeki hücrelerin ikiye katlanma zamanı 4.7 gün, MEF'teki hücrelerin 2.7 gün, laminin üzerinde büyüyen hücrelerin ise 5.6 gün olduğu bildirilmiştir. Bu doktora tez çalışmasında ticari SKH hattının kültür koşullarında ikiye katlanma zamanı 3.5 gün olarak bulunmuştur. Bu sonuç kullanılan hücre hattının SV40 büyük T antijeni ile transforme edilmesine bağlanmıştır ve literatür ile uyumludur. Spermatogonyal kök hücrelerin in vitro ortamda 3 aydan daha uzun süre hayatta kalabileceği bildirilmiş olsa da, spermatogonyayı ölümsüzleştirmek için SV40 büyük T antijeni veya telomeraz gibi ajanların kullanılmasıyla uzun süreli proliferasyon bildirilmiştir (Kanatsu-Shinohara ve ark., 2003). Kemirgen hücrelerinin SV40 büyük T antijeni ile transforme edilmesi S- fazını indükleyerek hücrelerin çoğalmasını devam ettirir (Ahuja ve ark., 2005).

Transfeksiyon çalışmalarında, transfekte hücrelerin floresan veya ilaç direnci ile kolayca izlenebilmesi için plazmid yapısına bir seçim markörünün dahil edilmesi etkili bir stratejidir (Shui ve ark., 2016). Bu çalışmada *Pac* genini içeren plazmid kullanılmıştır ve plazmidi alan hücrelerin puromisin antibiyotikğine direnç gösterdiği görülmüştür. Uygulanan puromisin antibiyotikğinin dozu MTT testi ile 2µg/ml olarak belirlenmiştir. Fare EKH'lerinde CRISPR-Cas9 ile aynı anda birden fazla genin hedeflendiği çalışmada transfeksiyondan 1 gün sonra 2µg/ml puromisinin 48 saat süre ile kültüre edildiği bildirilmiştir (Hwang ve ark., 2013). Bu çalışmada EKH hattı üzerinde yapılan çalışmalarla benzer sonuçlar alınmış ve SKH'lerde de transfeksiyon sonrası hücreleri ayırt etmek için 2µg/ml puromisin dozunun 48 saat süre ile uygulanmasının yeterli olduğu gösterilmiştir.

Plazmid DNA'nın mikrobiyal hücrelere transformasyonla verimli bir şekilde sokulması Rekombinant DNA teknolojisinde önemli bir rol oynar. Doğal genetik dönüşüm, hem DNA hem de bakteri membranının negatif yüklerinden kaynaklanan itilmelerden dolayı mümkün değildir (Nagamani ve ark., 2019). Yabancı DNA ve bakteri hücresi arasındaki bu itme iki değerlikli katyonlar (örneğin Ca^{+2}) tarafından

aşılır. İki değerlikli katyonlar hem hücreye hem de DNA'ya bağlanarak negatif yükü tamamen nötralize ederler. Ayrıca, hücre zarında bulunan DNA bağlayıcı proteinler de bu etkililişime yardımcıdırlar (Asif ve ark., 2017). Klonlama için bu çalışmada kullanılan *E.coli* bakterisinin DH5alfa suşu, üç duvarlı bir membrana sahiptir. Dış zar içinde gözenek oluşturan proteinler bulunur ve moleküler bir elek görevi yaparak DNA gibi hidrofilik ve moleköl ağırlığı yüksek olan moleküllerin bakteri içerisine taşınmasını önlerler (Raghava ve ark., 2011). Bu nedenle çalışmamızda CaCl₂ ile muamele edilerek, yabancı DNA'yı alma yeteneği kazandırılmış kompetan haldeki DH5alfa suşu kullanılmıştır.

Verimli genom düzenleme için, hedef RNA dizisinin ve Cas9'un hücrelere başarılı bir şekilde verilmesi esastır. Bu iki bileşenin hücre içine verilmesine plazmid aracılık eder. CRISPR bileşenlerinin plazmide kodlanmasının ardından plazmid DNA'sı kompetan bakteri içerisine standart transformasyon prosedürü kullanılarak verilir ve çoğaltılır. Standart transformasyon prosedürünün ısı şoku basamağı, hücrelerin ısı ile etkileşimiyle hücre membranındaki fosfolipitleri harekete geçirerek hücre mebranını geçişe uygun hale getirir. Froger ve ark. (2007), 42°C'de 45 saniye ısı şokunun *E.coli* bakterisi içine plazmid transformasyonu için başarılı olduğunu bildirmişlerdir (Froger ve Hall, 2007). Ancak tez çalışmasının transformasyon deneylerinde 45 saniye ısı şokunda başarı elde edilememiştir. Bu durum farklı *E.coli* suşlarının, hücre zarlarının kimyasal özelliklerindeki farklılıklar nedeniyle dönüşüm verimliliğinde farklılık gösterebileceği verisi ile açıklanmıştır (Asif ve ark., 2017). Bu nedenle farklı bakteri türleri ve suşları için koşulların optimize edilmesi gerekmektedir. Bu çalışmada standart transformasyon prosedüründe ısı şokuna maruziyet süresinde optimizasyon yapılarak transformasyon başarısı sağlanmıştır. Isı şokunun hücre membran potansiyeline etkisini gösteren bir çalışmada; 42°C'de 1.5 dakika ısı şokuna tabi tutulan hücrenin membran potansiyelinin büyük ölçüde azaldığı akış sitometri yöntemiyle ve spektrofotometrik yöntemlerle gösterilmiştir. Her iki değerlendirme yönteminin sonuçları birbiriyle uyumlu bulunmuştur (Panja ve ark., 2006). Transformasyon prosedüründe ısı şoku ardından hızla buz ile muamele etmek gerekmektedir. Isıtma ve soğutma döngülerinin etkinliğini araştıran Panja ve ark. (2008), ısıtma işleminin lipid kaybına neden olurken sıcaklığın düşürülmesinin

protein kaybına neden olduğunu bildirmişlerdir. Bu döngülerin birlikte lipid ve protein kaybindan dolayı hücre yüzeyindeki gözenekleri büyüüttüğü ve hücre zarını depolarize ettiği gösterilmiştir (Panja ve ark., 2008). Transformasyon deneylerinde 1.5 dakika ve 2 dakika ısı şoku uygulandığında elde edilen transformasyon başarısının Panja ve ark (2008) çalışmaları ile uyumlu olduğu belirlenmiştir.

CRISPR-Cas9 bileşenlerini içeren plazmidi hedef hücrelere ulaştırmak için viral ve viral olmayan yöntemler kullanılmaktadır. Son yıllarda viral vektörlere karşı şiddetli bağışıklık yanıt riski gibi yan etkiler nedeniyle viral olmayan vektörler daha fazla araştırma odağı olmuştur (Chen ve ark., 2020). Literatürde viral olmayan vektörlerin kullanıldığı sınırlı sayıda SKH'lerde CRISPR-Cas9 aracılı gen düzenleme çalışması bulunmaktadır. Spermatogonyal kök hücrelerin aksine fare EKH'lerinde genom düzenleme çalışmalarına literatürde daha sık rastlanmaktadır. Hwang ve ark. (2013), fare EKH'lerine, lipid temelli bir reaktif kullanarak (FuGENE) CRISPR-Cas aracılı gen düzenlemenin, tek adımda beş farklı gende eş zamanlı mutasyon üretilebileceğini göstermişlerdir (Hwang ve ark., 2013). Lipofektamin aracılı diğer bir çalışmada rekombinasyon aktive edici gen (*RAG1*) hedeflenerek, EKH klonlarının yaklaşık %92'sinde *RAG1* mutasyonlarını içeren indellerin olduğu ve knockout fare embriyonik kök hücresi elde edildiği bildirilmiştir (Mehravar ve ark., 2019).

CRISPR-Cas9 gibi hedeflenebilir nükleazların ortaya çıkması, bazı hedeflenmiş genomik mutasyon tipleri için ilk olarak genetik olarak değiştirilmiş embriyonik kök hücrelerin üretilmesinin ön koşulunu ortadan kaldırması ile birlikte CRISPR-Cas bileşenleri doğrudan fare embriyolarına mikroenjeksiyon yöntemi ile verilerek hedeflenmiş genomik manipülasyona sahip fare modelleri başarıyla oluşturulmuştur (Klimke ve ark., 2019; Scott ve Gruzdev, 2019). Spermatogonyal kök hücrelerde transfeksiyon amacıyla çoğunlukla elektroporasyon, transplantasyon için ise mikroenjeksiyon gibi fiziksel aktarım yöntemlerinin kullanıldığı görülmüştür (Chapman ve ark., 2015; Wang ve ark., 2017; Wu ve ark., 2015b). Elektroporasyon uygulamalarında nispeten viral veya sitotoksik kimyasal bileşenler kullanılmamaktadır ve türe özgü olmadığı için çok çeşitli hücre tiplerinde

uygulanabilmektedir. Ancak elektroporasyon koşullarının iyi optimize edilmesi gerekmektedir. Yüksek elektrik alan kuvveti ve ortaya çıkan elektrokimyasal reaksiyonlar hücre mortalitesine sebep olurken düşük voltaj ile verimlilik elde edilemeyebilir (Xu ve ark., 2018). Primer mezankimal kök hücrelerde $\beta 2$ -mikroglobulin (B2M) knockout modeli tüp tabanına ve üst kapağa iki küçük elektrot yerleştirilmiş basınçlı tüp elektroporasyonu şeklinde özgün bir yöntem ile gerçekleştirilmiştir (Xu ve ark., 2018). Yüksek toksisite nedeniyle geleneksel elektroporasyon yöntemi geliştirilerek, nukleofeksiyon adı verilen yeni elektroporasyon metodları üretilmiştir. Li ve ark. (2019), Amara Nukleofector kullanılarak yaptıkları nukleofeksiyon ile, SKH'lerde *Kit*^{wv} bölgesindeki nokta mutasyonlarını, CRISPR-Cas9 aracılı homolojiye yönelik onarım yoluyla düzeltmişlerdir. Wu ve ark. (2015), Amara Nukleofector kullanılarak yaptıkları çalışmada katarakt hastalığına neden olan *Crygc*^{-/-} mutasyonunu fare SKH'lerinde CRISPR/Cas9 ile düzelterek, hedef dışı etkiler olmadan düzeltilmiş geni taşıyan SKH hatları elde etmişlerdir. Bu çalışma CRISPR-Cas9 sisteminin faredeki genetik hastalıkları düzeltmek için SKH'lerde başarılı bir şekilde uygulanabileceğini göstermiştir. Yine aynı çalışma içerisinde CRISPR-Cas9 sisteminin SKH'lerde gen düzenlemede kullanılabilirliğini göstermek için *EGFP* genini bozma girişiminde bulunmuşlardır. *EGFP* genini hedefleyen sgRNA ve Cas9'u tasarladıktan sonra pX330-mCherry plazmidini nukleofeksiyon aracılığıyla hücrelere transfekte etmişlerdir. Mutasyona uğramış *EGFP* transgenlerini taşıyan hücreler Fluorescence-activated cell sorting (FACS) kullanılarak tespit edilmiş ve pasajlanarak zenginleştirilmiştir. Birkaç pasaj kültürlendikten sonra SKH'ler toplanarak busulfan ile tedavi edilen erkek farelerin testislerine nakledilmiştir. Bir buçuk ay sonra SKH'lerin seminifer tübüllerde tekrar kolonize olduğu görülmüştür. SKH'lerden türetilen spermatidler intrasitoplazmik yuvarlak spermatid enjeksiyonu ile yumurtalara enjekte edildiğinde 2 hücreli embriyoların geliştiği gözlemlenmiştir. Bu embriyoların yumurtalıklara nakledilmesinden sonra canlı doğum bildirilmiştir. Yavruların yaklaşık %50'sinde (21/39) *EGFP* geninde NHEJ aracılı indellerin bulunduğu bildirilmiştir. Bu veriler, CRISPR-Cas9 sisteminin nukleofeksiyon aracılığıyla SKH'lerde etkili gen düzenleme için kullanılabileceğini, spermatidlerin alıcı testislere transplantasyonundan sonra gen modifiye edilmiş fare modellerinin

türetilbileceğini göstermektedir (Wu ve ark., 2015b). Fare SKH'lerde nükleofeksiyon ile yapılan başka bir çalışmada Cas9 plazmidlerinin (8-10kb) büyüklüğünün nükleofeksiyon verimliliğini düşürdüğünü ve plazmid kalitesinin nükleofeksiyon verimi ile orantılı olduğunu bildirmişlerdir (Wang ve ark., 2017). Bir diğer özgün elektroporasyon yöntemi, ticari olarak da geliştirilen neon elektroporasyondur. Bu yöntemde kullanılan elektronik pipet ucu, akımı hücrelere eşit olarak dağıttığı için hücre canlılığını önemli ölçüde artırır. Chapman ve ark. (2015), SKH'lerde 1100 volt 20 milisaniyede 2 atım için ayarlanmış neon transfeksiyon sistemi ile *Epstil* mutantları üretmeyi başarmışlardır. Bu tez çalışmasında kimyasal transfeksiyon yöntemi olan lipit temelli (DNAfectin) transfeksiyon yöntemi kullanılmıştır. DNAfectin, polikasyon ve lipozom formülasyonunu içermektedir. Lipit temelli transfeksiyonun mekanizması, transfeksiyon reaktifleri arasında değişiklik gösterse de, temelinde nükleik asitin negatif yüklü fosfat omurgası ile lipitlerin pozitif yüklü kafa grubu arasında etkileşim yoluyla kompleks oluşturmaya dayanır (Steyer ve ark., 2016). Transfeksiyonun etkinliği bu kompleksin endozomdan ne oranda salındığı ile doğru orantılıdır. Katyonik lipozomlar ile transfeksiyon etkinliğinin hücre türüne bağlı olduğu, primer nöronlar, primer endotelial hücreler gibi hücre gruplarının katyonik lipozom gibi transfeksiyon metodlarına dirençli olduğu bildirilmiştir (Kedika ve Patri, 2014). SKH'lerde DNAfectin ile transfeksiyon yapılan bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ancak başarılı gen modifikasyonu sağlanmış olan bu çalışmada SKH'lerin diğer hücreler gibi kimyasal transfeksiyona dirençli olmadığı ortaya konulmuştur. Çalışmamız SKH'lerde DNAfectin kullanılarak yapılan ilk çalışma olma niteliğindedir.

CRISPR aracılı gen düzenlemenin olası sonuçlarını anlamak önemlidir. sgRNA ve Cas9 bir hücre hattına sokulduktan sonra, oluşturulan düzenlemeler aynı olmayacaktır. Bir genin tüm alellerinde veya bir popülasyondaki tüm hücrelerde düzenleme gerçekleşmeyebilir. Örneğin, bir diploid hücrenin tek bir genini hedeflerken dört olası sonuç vardır:

1. Hiçbir düzenleme yapılmaz,
2. Bir alel düzenlenir (heterozigot mutasyon),
3. Her iki alel de düzenlenir, ancak farklı bir sekans taşırlar (biallelik mutasyonu),
4. Her iki alel de düzenlenir ve aynı sekansı taşırlar (homozigot mutasyon).

Yüksek düzenleme verimliliği elde etmek için çoklu gRNA'nın tasarlanması ve test edilmesi gerekir. *S.pyogenes* kaynaklı Cas9'un bir 5'-NGG-3' PAM dizisi gerektirmesi fare genomunda hedef bölge seçimini ve gRNA tasarımını sınırlamaktadır (Wang ve ark., 2013). Bu çalışmada CRISPR-Cas9 ile SKH'lerde üç farklı *Tex15* gen bölgesi hedeflenmiştir. Baz düzenleme sonuçlarının analizi, Mutasyon enzim kesim analizi gibi enzimatik uyumsuzluk yarıklanma testleri, tek koloni sekanslama veya pahalı yeni nesil sekanslama üzerine dayanır. Ancak bu metodlara alternatif olarak floresans tabanlı Sanger sekanslama verilerinden baz düzenleme verimliliğini ölçmek için EditR, TIDER ve ICE gibi bilgisayar programları geliştirmiştir (Xu ve ark., 2019). Çalışmada mutasyon enzim kesim analiz kiti pozitif kontrolde başarılı kesim yapmasına rağmen, transfeksiyonun gerçekleştiği puromisinle doğrulanmış gruplarda anlamlı kesim paternleri vermemiştir. Bu nedenle çalışmada başarılı transfeksiyon elde edilen hücre hatlarındaki genomik düzenlemenin doğrulanmasında, güncel birçok yayında da kullanılan ICE yazılımı kullanılmıştır (OhAinle ve ark., 2018; Osborn ve ark., 2018). Bu analize göre *Tex15* geninin 10. ekzonunda yer alan Hedef 1 bölgesinde çerçeve kayması mutasyonuna sebep olan indellerin varlığı ortaya konulmuştur.

Hedef 2-sgRNA ile yapılan transfeksiyon uygulamalarında başarı elde edilememiştir. Hedef 2-sgRNA ile transfeksiyon sonrası antibiyotiğe direnç gösterip bölünmeyi devam ettiren hücrelerin varlığı, sgRNA ve Cas9'u içeren plazmidin hücre içine girdiğinin kanıtı olarak görülmüştür. Ancak hücre sitoplazmasına girdikten sonra plazmid DNA'sının salınımının olmaması, Cas9'un hedef diziye bağlanamamış olması ya da bağlandığında Cas9 domainleri tarafından kesim gerçekleşmemesi gibi nedenlerle transfeksiyonun başarısız olduğu düşünülmektedir.

Ensembl veri tabanında ENSMUSG000000009628 kodlu *Tex15* genomunda Hedef 3 bölge dizisi TCGTGTTAAAGATGGTGTGC iken çalışmada kullanılan ATCC GC-1 spg (Kod: CRL 2053) hücre hattının Hedef 3 için yapılan dizi analizinde Guanin bazı yerine Adenin bazı olduğu görülmüştür. Rehber RNA ile hedef bölgenin bağlanmasında ilk 12 nükleotiddeki uyumsuzlukların iyi tolere edilmediği bildirilmiştir (Shui ve ark., 2016). Bu veriye dayanarak, Hedef 3 bölgesinde hedef bölge DNA dizisi ile rehber RNA arasındaki PAM dizisine yakın bu uyumsuzluğa bağlı olarak Cas9 endonükleazının kesme işlemini yapamamış olması ile açıklanmıştır.

CRISPR-Cas9 sisteminde uygulancak transfeksiyon kimyasalının dozajı, tedavi edilen hücrelerde düzenleme etkinliğini etkiler. Plazmid konsantrasyonunun artırılması veya DNA formatının aksine mRNA veya RNP formatlarının kullanılması genellikle düzenleme verimliliğini artırır (Kedika ve Patri, 2014). Bu nedenlerden ötürü, daha etkili bir transfeksiyon platformu oluşturmanın yanı sıra, gen düzenlemede daha iyi hassasiyet elde etmek için CRISPR formülasyonunun optimizasyonuna da ihtiyaç duyulmaktadır.

CRISPR-Cas9 sistemi SKH'lerde lipit temelli aktarım ile ilk kez yapılacak olmasından dolayı transfeksiyon işlemi farklı DNA: DNAfectin oranları kullanılarak optimize edilmiş ve 1:3,5 ve 1:5 DNA: DNAfectin oranlarında transfeksiyon başarılı olmuştur. En yüksek transfeksiyon etkinliği (knock-out başarısı) ICE algoritması verilerine göre 1:5 DNA: DNAfectin oranında % 98 olarak bulunmuştur. Optimal lipit:DNA oranının hücre sitoplazmasına girdikten sonra, plazmid DNA'sının salınımını kolaylaştırdığı bilinmektedir (Kedika ve Patri, 2014). Bu çalışmada 1:5 DNA: DNAfectin oranının SKH'ler için en uygun oran olduğu tespit edilmiştir.

Kedika ve ark. (2014), yüksek lipit miktarının oluşan lipit-DNA kompleksinin endozomdan zayıf salınımı nedeniyle transfeksiyon etkinliğini düşürdüğünü göstermişlerdir. Bu çalışmanın transfeksiyon deneylerinde uygulanan

1:7,5 ve 1:10 DNA: DNAfectin oranlarında transfeksiyon başarısızlığının yüksek lipid oranına bağlı olduğu düşünülmüştür.

Düşük lipid oranlarının (1:2.5; 1:1) kullanıldığı transfeksiyon uygulamalarında, transfeksiyonun başarısız olduğu diğer uygulamalara benzer şekilde plazmid aktarımının olduğu ancak optimal lipid:DNA oranının uygun olmamasına bağlı olarak transfeksiyonun gerçekleşmediği düşünülmüştür.

Transfeksiyon uygulamasının başarılı olduğu DNA:DNAfectin oranlarında hedeflenen dizilerde literatür bilgisi ile uyumlu olarak PAM dizisinin 3-4 baz yukarısında indeller olduğu gözlemlenmiştir. 1:5 DNA:DNAfectin oranının uygulandığı transfeksiyon uygulamasında hücre popülasyonunun tüm hücrelerinde indeller oluşmuştur. 1:3,5 DNA:DNAfectin oranının uygulandığı transfeksiyon işlemlerinde hücre onarımına bağlı olarak uygulamalar arasında oluşan indeller bakımından önemli ölçüde değişiklik görülmüştür. Farklı hücre yoğunluğuna sahip iki grup içerisinde düşük hücre sayısına sahip 2.grupta oluşan indel oranı % 68 iken, 1. grupta %38 indel oluşumu gözlenmiştir. 1. grup ile aynı hücre sayısına sahip birbirinin tekrarı olan iki uygulamada oluşan indel yüzdelerinin farklı çıkması, hücre sayısına bağlı indel oluşumunun değiştiği verisini desteklememektedir. Hücre yoğunluğunun transfeksiyon etkinliğini ne ölçüde değiştirdiğine yönelik kapsamlı çalışmalar yapılmalıdır.

Transfeksiyon etkinliği, uygulamanın yapıldığı hücre popülasyonunda hücreler arasında farklılık gösterdiğinden, DNA dizi analizi sonuçları heterojen bir hücre topluluğunu göstermiştir. İlgilenilen genin tamamen düzenlendiğinden ve yabancı tip fenotiplerin hiçbirinin kalmadığından emin olmak için biallelik veya homozigot mutasyon elde edilmelidir. Hedeflenmiş allel için mozaik olmayan mutant kolonilerini oluşturmak amacıyla SKH'lerin monoklonal olarak zenginleştirilmesi hedeflenmiştir. Monoklon hücre hattı oluşumunun teorik olarak hedeflenen alellerin varyasyonunu azaltması beklenmektedir. Ancak SKH kolonileri kültür ortamında poliklonal olduklarından tek hücre düşürme zorluğu ile karşılaşılmıştır. Wu ve ark. (2015), FACS kullanarak tek hücre süspansiyonu elde etmiş ve 480 tek

SKH'den 11 klonal SKH hattı oluşturabilmişlerdir. Sadece 8 klonal hücre hattının her iki alelde mutant hedef gene ait modifikasyonları taşıdığı bildirilmiştir. Çalışmada 20 adet tek SKH'den ancak 1 klonal SKH hattı oluşturulabilmiştir. Oluşturulan monoklonal hücre hattının köken aldığı tek SKH'de bialel mutasyon olduğu ICE programı verilerinde hiç yabancı tip hücrenin bulunmaması ile açıklanmıştır. Elde edilen monoklonal hat sayısı yetersiz olduğundan, allel varyasyonu bertaraf edilememiş, homozigot mutasyon varlığı tespit edilememiştir.

Literatürde, *Tex15* geninde meydana gelen mutasyonların infertiliteye neden olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Okutman ve ark., 2015; Ruan ve ark., 2012; Wang ve ark., 2018). *Tex15* eksik erkek farelerde oluşan DNA çift zincir kırıklarının *Tex15* eksikliğine bağlı olarak onarılmadığı da bilinmektedir (Yang ve ark., 2008). Ancak *Tex15* geni üzerinde genetik manipülasyon yapılan bir çalışma henüz bulunmamakta ve çalışma bu açıdan da ilk olma özelliği taşımaktadır. Bu tez çalışması ile CRISPR-Cas9 aracılı genomik düzenleme ile SKH'lerde *Tex15* geni 10. ekzonunda çerçeve kayması mutasyonu ile knock-out monoklon hücre hattı elde edilebilmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

CRISPR-Cas9 gibi hücreSEL yeniden programlama teknolojilerindeki son gelişmeler önemli hastalıklara neden olan çok sayıda genetik mutasyonun ve hücre sinyâl yollarının aydınlatılmasına olanak sağlamıştır. Gen düzenleme, klinik tedavinin yanı sıra temel araştırmaları da destekleyen çok yönlü bir tekniktir. Klinik olmayan uygulamalar için amaç hedef hücrelerde düzenlenmiş genler oluşturmak iken klinik uygulamalarda tedavi edilen hücrelerde korunması gereken hücre fonksiyonları vardır. Potansiyel hedef dışı CRISPR mutasyonları terapötik uygulamalar için sorun olmaya devam etmektedir.

Spermatogonyal kök hücre'lerinin uzun süreli kültürü ile ilgili literatürde fazla sayıda çalışma olmasına rağmen bu hücrelerin spermatogenezdeki işlevselliği hala güncelliğini korumaktadır. İlerleyen çalışmalar, bu hücrelerin de diğer SKH'ler gibi gen modifikasyonunda kullanılabilmesine olanak sağlayacaktır. Mevcut literatürde spermatogonyal kök hücreler gibi transfekte edilmesi zor olan hücreler için fiziksel transfeksiyon yöntemlerinin sıklıkla kullanıldığı ve kimyasal vektörler gibi geleneksel transfeksiyon yöntemlerinin etkisiz olduğu bildirilmiştir. Sunulan araştırmada kimyasal transfeksiyona bağlı olarak gözlemlenen hücre ölümü literatürle uyumlu bulunsa da SKH'lerde lipid temelli kimyasal transfeksiyon ile transfeksiyon başarısı elde edilmiştir. Halihazırda devam eden çalışmalarımızda literatürde sıklıkla kullanılan elektroporasyon yöntemi ile transfeksiyon SKH'lere uygulanmıştır. Bu çalışmanın sonuçları da yakın gelecekte kimyasal transfeksiyon verileri ile karşılaştırmalı olarak sunulacaktır.

CRISPR-Cas9 sisteminde uygulanan transfeksiyon kimyasalının dozajı, tedavi edilen hücrelerde düzenleme etkinliğini önemli ölçüde etkilemektedir. Bu nedenle daha etkili bir transfeksiyon ve gen düzenlemede yüksek hassasiyet için optimizasyon önemlidir. SKH'lerde ilk defa CRISPR-Cas9 sistemi aracılı gen düzenlemenin lipid temelli yapılmış olması nedeniyle, araştırmada farklı DNA:DNAfectin oranları kullanılarak transfeksiyon işlemi optimize edilmiş ve 1:3,5 ve 1:5 DNA:DNAfectin oranlarında transfeksiyonun başarılı olduğu

belirlenmiştir. Transfeksiyon etkinliğinin bir göstergesi olan knock-out değeri, in-silico analizlere göre 1:5 DNA: DNAfectin oranında % 98 olarak hesaplanmış ve bu nedenle 1:5 DNA: DNAfectin oranının SKH'ler için en uygun oran olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında in vitro ortamda CRISPR-Cas9 yöntemi kullanılarak spermatogonyal kök hücrelerde, yokluğu mayotik rekombinasyonda başarısızlığa neden olarak infertiliteye sebep olduğu bilinen *Tex15* geninde c.959C'den itibaren indeller oluşturulmuştur. Bu indeller ilgili gende çerçeve kayması mutasyonu oluşturarak, prematür protein oluşumuna sebep olmaktadır. İlerleyen çalışmalarda, bu araştırma kapsamında ortaya konulan modifikasyonlar dışında hedef dışı mutasyonların var olup olmadığının tespit edilebilmesi için tüm genom analizlerinin yapılması planlanmaktadır.

İzleyen dönemde araştırma kapsamında elde edilen monoklon *Tex15* geni modifiye SKH'lerin allograft transplantasyonu ile in-vivo etkinliğin değerlendirilmesi, fare testisinden SKH kültürü elde edilerek *Tex15* geninin susturulup otograft transplantasyon ve etkinliğin değerlendirilmesi ve sonrasında in-vivo knock-in çalışmaları ile yeniden ifade edinimi sağlanması planlanan başlıca çalışmalardır. Bu çalışmada, infertilite ilişkili olması nedeniyle hedef gen olarak *Tex15* geni seçilmiş olmakla beraber, SKH'lerde farklı genlerin de hedeflenebilmesine giden yolun önü açılmıştır. CRISPR sistemini anlamak, deneyerek öğrenmek üzere yola çıktığımız bu ilk çalışma bizim için CRISPR'ın kullanma kılavuzu olmuştur.

ÖZET

Fare Spermatogonyal Kök Hücrelerinde CRISPR-Cas9 İle Hedefli Genom Düzenleme

CRISPR-Cas9 rehber DNA endonükleaz teknolojisi, çeşitli hücre tipleri ve organizmalarda biyolojik süreçlerin incelenmesi için, hedeflenmiş genomik mutasyonların üretilmesinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Yapılan çalışmalarda CRISPR/Cas9'un SKH'lere uygulanmaları, spermatogenez ve spermatogenetik başarısızlığın genetik mekanizmasının ortaya çıkarılmasında etkili birer yöntem olduklarını göstermiştir. Testis-expressed 15 (*Tex15*) genindeki fonksiyon kaybı erkeklerde infertilite ile ilişkilendirilmiştir. Sunulan çalışmada, spermatogonyal kök hücre kültür hattında CRISPR-Cas9 yöntemiyle lentiviral plasmid vektörün transfeksiyonu sonrası *Tex15* geninin susturulmasına yönelik deneyler gerçekleştirilmiştir. Çalışmada; *Tex15* geninin 1.ekzonunu 3 farklı bölgeden hedefleyen CRISPR-Cas9 uygulama grubu, CRISPR-Cas9 kimyasallarının kontrolü amacıyla, herhangi bir gene komplementer olmayan sgRNA klonlanmış vektörün aktarıldığı sham grubu ve sadece pasajlama yapılan kontrol grubu olmak üzere üç grup tasarlanmıştır. Deney aşamasında; spermatogonyal kök hücrelere invitro ortamda farklı DNA: DNAfectin oranlarında lipit temelli aktarım ile CRISPR-Cas9 uygulaması gerçekleştirilip, *Tex15* geninde c.959C2den itibaren çerçeve kaymasına neden olan indel mutasyonlar elde edilmiştir. Başarının etkinliği mutasyon bölgesi enzim kesim analizi, DNA dizi analizi ve in-silico analizler ile ortaya konulmuştur. En yüksek transfeksiyon etkinliği in-silico analizde 1:5 DNA:DNAfectin oranı için % 98 olarak hesaplanmış ve bu oranın SKH'ler için en uygun oran olduğu tespit edilmiştir. Sunulan çalışma ile CRISPR/Cas9 uygulamasının SKH'lerde farklı genlerde de yapılabilmesi ve dolayısıyla SKH aracılı genom düzenleme ile transgenik hayvan oluşturma, çiftlik hayvanlarında verimi artırma ve hayvan hastalıklarının tedavisinde kullanıma potansiyeli olan gen/genom düzenleme çalışmaları için literatüre katkı sağlanmıştır.

Anahtar Sözcükler: CRISPR/Cas9, Genom düzenleme, Spermatogonyal kök hücre, Testis-Expressed 15 (*Tex15*),

SUMMARY

Genome Editing in Mouse Spermatogonial Stem Cell Lines Using CRISPR/Cas9

CRISPR-Cas9 guide DNA endonuclease technology has been widely used in the production of targeted genomic mutations for the study of biological processes in various cell types and organisms. In the studies conducted, the application of CRISPR-Cas9 to the SSCs has shown that they are effective methods in revealing the genetic mechanism of spermatogenesis and spermatogenetic failure. Dysfunction in the testis-expressed 15 (*Tex15*) gene has been associated with infertility in men. In the present study, experiments were performed to silence the *Tex15* gene after transfection of the lentiviral plasmid vector in the spermatogonial stem cell culture line by CRISPR-Cas9 method. Study; Three groups are designed as CRISPR-Cas9 application group, targeting the first exon of the *Tex15* gene from 3 different regions, the sham group to which CRISPR-Cas9 chemicals are controlled, and the passaged control group to which only noncomplementary sgRNA cloned vector is transferred. At the experimental stage; CRISPR-Cas9 was applied to spermatogonial stem cells in vitro with lipid-based transfer in different DNA:DNAfectin ratios, and indel mutations causing frame shift in the *Tex15* gene from c.959C were obtained. The effectiveness of success has been demonstrated by mutation site enzyme cut analysis, DNA sequence analysis and in-silico analysis. The highest transfection efficiency was calculated as 98% for the ratio of 1:5 DNA:DNAfectin in in-silico analysis and this ratio was found to be the most suitable rate for SSCs. With the present study, CRISPR-Cas9 has been contributed to the literature for gene / genome editing studies that have the potential to be performed in different genes in SSCs, and thus have the potential to be used in SSC-mediated genome editing, creating transgenic animals, increasing yield in farm animals, and in the treatment of animal diseases.

Keywords: CRISPR/Cas9, Gene editing, Spermatogonial stem cells, *Tex15* gene

KAYNAKLAR

- ABMGOOD (2020). Product-Services Erişim Adresi: [<http://www.abmgood.com>].Erişim Tarihi: 2/3/2020
- AHMED EA, DE ROOIJ DG (2009). Staging of mouse seminiferous tubule cross-sections. *Methods Mol Biol*, **558**: 263-277.
- AHUJA D, SAENZ-ROBLES MT, PIPAS JM (2005). SV40 large T antigen targets multiple cellular pathways to elicit cellular transformation. *Oncogene*, **24**: 7729-7745.
- ANDO D, MEYER K (2017). Gene Editing: Regulatory and Translation to Clinic. *Hematol Oncol Clin North Am*, **31**: 797-808.
- APONTE PM, VAN BRAGT MP, DE ROOIJ DG, VAN PELT AM (2005). Spermatogonial stem cells: characteristics and experimental possibilities. *APMIS*, **113**: 727-742.
- ASIF A, MOHSIN H, TANVIR R, REHMAN Y (2017). Revisiting the Mechanisms Involved in Calcium Chloride Induced Bacterial Transformation. *Front Microbiol*, **8**: 2169.
- BARRANGOU R, FREMAUX C, DEVEAU H, RICHARDS M, BOYAVAL P, MOINEAU S, ROMERO DA, HORVATH P (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, **315**: 1709-1712.
- BIFFI A (2015). Clinical translation of TALENS: Treating SCID-X1 by gene editing in iPSCs. *Cell Stem Cell*, **16**: 348-349.
- BOCH J (2011). TALEs of genome targeting. *Nature Biotechnology*, **29**: 135.
- BOLOTIN A, QUINQUIS B, SOROKIN A, EHRLICH SD (2005). Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, **151**: 2551-2561.
- BONAMASSA B, HAI L, LIU D (2011). Hydrodynamic gene delivery and its applications in pharmaceutical research. *Pharm Res*, **28**: 694-701.
- CAN A (2008). A Concise Review on the Classification and Nomenclature of Stem Cells. *Turk J Haematol*, **25**: 57-59.
- CAN A 2014. *Kök Hücre: Biyolojisi, Türleri ve Tedavide Kullanımları*, Ankara, Akademisyen Tıp Kitapevi."1.Baskı"."s.:577-587"
- Cas-OFFinder(2020). CRISPR RGEN TOOLS. Erişim Adresi: [<http://www.rgenome.net/cas-offinder/>]. Erişim Tarihi: 3/3/2020.
- CARBERRY ID, JI D, HARRINGTON A, BROWN V, WEINSTEIN EJ, LIAW L, CUI X (2010). Targeted genome modification in mice using zinc-finger nucleases. *Genetics*, **186**: 451-459.

- CERMAK T, STARKER CG, VOYTAS DF (2015). Efficient design and assembly of custom TALENs using the Golden Gate platform. *Methods Mol Biol*, **1239**: 133-159.
- CHAPMAN KM, MEDRANO GA, JAICHANDER P, CHAUDHARY J, WAITS AE, NOBREGA MA, HOTALING JM, OBER C, HAMRA FK (2015). Targeted Germline Modifications in Rats Using CRISPR/Cas9 and Spermatogonial Stem Cells. *Cell Rep*, **10**: 1828-1835.
- CHEN CK, HUANG PK, LAW WC, CHU CH, CHEN NT, LO LW (2020). Biodegradable Polymers for Gene-Delivery Applications. *Int J Nanomedicine*, **15**: 2131-2150.
- CHEN JS, MA E, HARRINGTON LB, DA COSTA M, TIAN X, PALEFSKY JM, DOUDNA JA (2018). CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science*, **360**: 436-439.
- CHEN S, LEE B, LEE AY, MODZELEWSKI AJ, HE L (2016). Highly Efficient Mouse Genome Editing by CRISPR Ribonucleoprotein Electroporation of Zygotes. *J Biol Chem*, **291**: 14457-14467.
- CHEN X, GONÇALVES MA (2016). Engineered Viruses as Genome Editing Devices. *Mol Ther*, **24**: 447-457.
- CHEN Z, LI Z, HE Z (2015). Plasticity of male germline stem cells and their applications in reproductive and regenerative medicine. *Asian J Androl*, **17**: 367-372.
- CHEW WL, TABEBORDBAR M, CHENG JK, MALI P, WU EY, NG AH, ZHU K, WAGERS AJ, CHURCH GM (2016). A multifunctional AAV-CRISPR-Cas9 and its host response. *Nat Methods*, **13**: 868-874.
- CHOULIKA A, PERRIN A, DUJON B, NICOLAS JF (1995). Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **15**: 1968-1973.
- COHEN-TANNOUDJI M, ROBINE S, CHOULIKA A, PINTO D, EL MARJOU F, BABINET C, LOUVARD D, JAISSE F (1998). I-SceI-induced gene replacement at a natural locus in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, **18**: 1444-1448.
- CHOPCHOP (2020). Find Target site. Erişim Adresi:[<https://chopchop.cbu.uib.no/>]. Erişim Tarihi: 5/3/2020.
- COLACO S, MODI D (2018). Genetics of the human Y chromosome and its association with male infertility. *Reprod Biol Endocrinol*, **16**: 14.
- CONG L, RAN FA, COX D, LIN S, BARRETTO R, HABIB N, HSU PD, WU X, JIANG W, MARRAFFINI LA, ZHANG F (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, **339**: 819-823.
- COOL J, CARMONA FD, SZUCSIK JC, CAPEL B (2008). Peritubular myoid cells are not the migrating population required for testis cord formation in the XY gonad. *Sex Dev*, **2**: 128-133.
- COOPER GM HR (2016). Hücre;Moleküler Yaklaşım. *İzmir Tıp Kitabevi* "s.:148".

- CRISPRdirect (2020). Rational design of CRISPR/Cas target. Erişim Adresi: [<http://crispr.dbcls.jp/>]. Erişim Tarihi: 4/3/2020.
- CRISPR Optimal Target Finder (2020). Erişim Adresi: [<http://tools.fl.ycrispr.molbio.wisc.edu/targetFinder/>]. Erişim Tarihi: 4/3/2020.
- CUI C, SONG Y, LIU J, GE H, LI Q, HUANG H, HU L, ZHU H, JIN Y, ZHANG Y (2015). Gene targeting by TALEN-induced homologous recombination in goats directs production of beta-lactoglobulin-free, high-human lactoferrin milk. *Sci Rep*, **5**: 10482.
- DADOUNE JP (2007). New insights into male gametogenesis: what about the spermatogonial stem cell niche? *Folia Histochem Cytobiol*, **45**: 141-147.
- DE ROOIJ DG (2009). The spermatogonial stem cell niche. *Microsc Res Tech*, **72**: 580-585.
- DE ROOIJ DG (2017). The nature and dynamics of spermatogonial stem cells. *Development*, **144**: 3022-3030.
- DELTCHEVA E, CHYLINSKI K, SHARMA CM, GONZALES K, CHAO Y, PIRZADA ZA, ECKERT MR, VOGEL J, CHARPENTIER E (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, **471**: 602-607.
- DENG S, WANG X, WANG Z, CHEN S, WANG Y, HAO X, SUN T, ZHANG Y, LIAN Z, LIU Y (2017). In vitro production of functional haploid sperm cells from male germ cells of Saanen dairy goat. *Theriogenology*, **90**: 120-128.
- DOENCH JG, HARTENIAN E, GRAHAM DB, TOTHOVA Z, HEGDE M, SMITH I, SULLENDER M, EBERT BL, XAVIER RJ, ROOT DE (2014). Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation. *Nat Biotechnol*, **32**: 1262-1267.
- DUDEK RW 2014. *Embryology* Wolters Kluwer. Board Review Series."p.: 184"
- DYM M, KOKKINAKI M, HE Z (2009). Spermatogonial stem cells: mouse and human comparisons. *Birth Defects Res C Embryo Today*, **87**: 27-34.
- EID A, MAHFOUZ MM (2016). Genome editing: the road of CRISPR/Cas9 from bench to clinic. *Exp Mol Med*, **48**: e265.
- E-CRISP (2020) Crisp Design of Crispr Constructs. Erişim Adresi: [<http://www.e-crisp.org/E-CRISP>]. Erişim Tarihi: 5/3/2020.
- ENSEMBL (2020) Fare *Tex15* geni Erişim Adresi: [https://www.ensembl.org/Mus_musculus/Gene/Summary?g=ENSMUSG00000009628;r=8:33516738-33585582]. Erişim Tarihi: 4/3/2020.
- FANSLOW DA, WIRT SE, BARKER JC, CONNELLY JP, PORTEUS MH, DANN CT (2014). Genome editing in mouse spermatogonial stem/progenitor cells using engineered nucleases. *PLoS One*, **9**: e112652.

- FERNANDEZ A, JOSA S, MONTOLIU L (2017). A history of genome editing in mammals. *Mamm Genome*, **28**: 237-246.
- FIELD AE, ROBERTSON NA, WANG T, HAVAS A, IDEKER T, ADAMS PD (2018). DNA Methylation Clocks in Aging: Categories, Causes, and Consequences. *Mol Cell*, **71**: 882-895.
- FREIJE CA, MYHRVOLD C, BOEHM CK, LIN AE, WELCH NL, CARTER A, METSKY HC, LUO CY, ABUDAYYEH OO, GOOTENBERG JS, YOZWIAK NL, ZHANG F, SABETI PC (2019). Programmable Inhibition and Detection of RNA Viruses Using Cas13. *Mol Cell*, **76**: 826-837.e11.
- FROGER A, HALL JE (2007). Transformation of plasmid DNA into E. coli using the heat shock method. *J Vis Exp* **6**: 253.
- FU Y, FODEN JA, KHAYTER C, MAEDER ML, REYON D, JOUNG JK, SANDER JD (2013). High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol*, **31**: 822-826.
- FU Y, SANDER JD, REYON D, CASCIO VM, JOUNG JK (2014). Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat Biotechnol*, **32**: 279-284.
- GARTNER LP, HIATT JL 2014. *Color Atlas and Text of Histology*, Philadelphia, PA, Lippincott Williams & Wilkins."p.:434-450"
- GASSEI K, ORWIG K (2016). Experimental methods to preserve male fertility and treat male factor infertility. *Fertility and sterility*, **105**.
- GAUDELLI NM, KOMOR AC, REES HA, PACKER MS, BADRAN AH, BRYSON DI, LIU DR (2017). Programmable base editing of A*T to G*C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, **551**: 464-471.
- GEHL J (2003). Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiol Scand*, **177**: 437-447.
- GEURTS AM, COST GJ, FREYVERT Y, ZEITLER B, MILLER JC, CHOI VM, JENKINS SS, WOOD A, CUI X, MENG X, VINCENT A, LAM S, MICHALKIEWICZ M, SCHILLING R, FOECKLER J, KALLOWAY S, WEILER H, MENORET S, ANEGON I, DAVIS GD, ZHANG L, REBAR EJ, GREGORY PD, URNOV FD, JACOB HJ, BUELOW R (2009). Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science*, **325**: 433.
- GILBERT LA, HORLBECK MA, ADAMSON B, VILLALTA JE, CHEN Y, WHITEHEAD EH, GUIMARAES C, PANNING B, PLOEGH HL, BASSIK MC, QI LS, KAMPMANN M, WEISSMAN JS (2014). Genome-Scale CRISPR-Mediated Control of Gene Repression and Activation. *Cell*, **159**: 647-661.
- GLASS Z, LEE M, LI Y, XU Q (2018). Engineering the Delivery System for CRISPR-Based Genome Editing. *Trends Biotechnol*, **36**: 173-185.
- GOODYEAR S, BRINSTER R (2017). Culture and Expansion of Primary Undifferentiated Spermatogonial Stem Cells. *Cold Spring Harb Protoc*, **2017**: pdb.prot094193.

- GOOTENBERG JS, ABUDAYYEH OO, LEE JW, ESSLETZBICHLER P, DY AJ, JOUNG J, VERDINE V, DONGHIA N, DARINGER NM, FREIJE CA, MYHRVOLD C, BHATTACHARYYA RP, LIVNY J, REGEV A, KOONIN EV, HUNG DT, SABETI PC, COLLINS JJ, ZHANG F (2017). Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*, **356**: 438-442.
- GUAN J (2009). Mammalian Sperm Flagella And Cilia. Karolinska institutet. Stockholm. "p.:3"
- GUAN K, NAYERNIA K, MAIER LS, WAGNER S, DRESSEL R, LEE JH, NOLTE J, WOLF F, LI M, ENGEL W, HASENFUSS G (2006). Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature*, **440**: 1199-1203.
- GUAN Y, MA Y, LI Q, SUN Z, MA L, WU L, WANG L, ZENG L, SHAO Y, CHEN Y, MA N, LU W, HU K, HAN H, YU Y, HUANG Y, LIU M, LI D (2016). CRISPR/Cas9-mediated somatic correction of a novel coagulator factor IX gene mutation ameliorates hemophilia in mouse. *EMBO Mol Med*, **8**: 477-488.
- HAJIAN R, BALDERSTON S, TRAN T, DEBOER T, ETIENNE J, SANDHU M, WAUFORD NA, CHUNG JY, NOKES J, ATHAIYA M, PAREDES J, PEYTAVER, GOLDSMITH B, MURTHY N, CONBOY IM, ARAN K (2019). Detection of unamplified target genes via CRISPR-Cas9 immobilized on a graphene field-effect transistor. *Nat Biomed Eng*, **3**: 427-437.
- HAMRA FK, CHAPMAN KM, NGUYEN DM, WILLIAMS-STEPHENS AA, HAMMER RE, GARBERS DL (2005). Self renewal, expansion, and transfection of rat spermatogonial stem cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**: 17430-17435.
- HAUSCHILD J, PETERSEN B, SANTIAGO Y, QUEISSER AL, CARNWATH JW, LUCAS-HAHN A, ZHANG L, MENG X, GREGORY PD, SCHWINZER R, COST GJ, NIEMANN H (2011). Efficient generation of a biallelic knockout in pigs using zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**: 12013-12017.
- HELSEL AR, OATLEY MJ, OATLEY JM (2017). Glycolysis-Optimized Conditions Enhance Maintenance of Regenerative Integrity in Mouse Spermatogonial Stem Cells during Long-Term Culture. *Stem Cell Reports*, **8**: 1430-1441.
- HOCKEMEYER D, WANG H, KIANI S, LAI CS, GAO Q, CASSADY JP, COST GJ, ZHANG L, SANTIAGO Y, MILLER JC, ZEITLER B, CHERONE JM, MENG X, HINKLEY SJ, REBAR EJ, GREGORY PD, URNOV FD, JAENISCH R (2011). Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nat Biotechnol*, **29**: 731-734.
- HOFMANN MC, NARISAWA S, HESS RA, MILLAN JL (1992). immortalization of germ cells and somatic testicular cells using the SV40 large T antigen. *Exp Cell Res*, **201**: 417-435.
- HORII T, ARAI Y, YAMAZAKI M, MORITA S, KIMURA M, ITOH M, ABE Y, HATADA I (2014). Validation of microinjection methods for generating knockout mice by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Sci Rep*, **4**: 4513.
- HOU Z, ZHANG Y, PROPSON NE, HOWDEN SE, CHU LF, SONTHEIMER EJ, THOMSON JA (2013). Efficient genome engineering in human pluripotent stem

- cells using Cas9 from *Neisseria meningitidis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**: 15644-9.
- HSIAU T, CONANT D, ROSSI N, MAURES T, WAITE K, YANG J, JOSHI S, KELSO R, HOLDEN K, ENZMANN B, STONER R (2018). Inference of CRISPR Edits from Sanger Trace Data. *bioRxiv*.
- HSU PD, SCOTT DA, WEINSTEIN JA, RAN FA, KONERMANN S, AGARWALA V, LI Y, FINE EJ, WU X, SHALEM O, CRADICK TJ, MARRAFFINI LA, BAO G, ZHANG F (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol*, **31**: 827-832.
- HUNG SS, CHRYSOSTOMOU V, LI F, LIM JK, WANG JH, POWELL JE, TU L, DANISZEWSKI M, LO C, WONG RC, CROWSTON JG, PEBAY A, KING AE, BUI BV, LIU GS, HEWITT AW (2016). AAV-Mediated CRISPR/Cas Gene Editing of Retinal Cells In Vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **57**: 3470-3476.
- HWANG WY, FU Y, REYON D, MAEDER ML, TSAI SQ, SANDER JD, PETERSON RT, YEH JR, JOUNG JK (2013). Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, **31**: 227-229.
- ICE ANALYSIS SYNTHOGO (2020). Erişim Adresi: [<https://ice.synthego.com/#/>]. Erişim Tarihi: 4/4/2020.
- ISHINO Y, SHINAGAWA H, MAKINO K, AMEMURA M, NAKATA A (1987). Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol*, **169**: 5429-5433.
- ISKEN O, MAQUAT LE (2007). Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function. *Genes Dev*, **21**: 1833-1856.
- JAN SZ, HAMER G, REPPING S, DE ROOIJ DG, VAN PELT AM, VORMER TL (2012). Molecular control of rodent spermatogenesis. *Biochim Biophys Acta*, **1822**: 1838-1850.
- JANSEN R, EMBDEN JD, GAASTRA W, SCHOULS LM (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol*, **43**: 1565-1575.
- JASIN M, HABER JE (2016). The democratization of gene editing: Insights from site-specific cleavage and double-strand break repair. *DNA Repair (Amst)*, **44**: 6-16.
- JENKINS S, YANG JC, RAMALINGAM SS, YU K, PATEL S, WESTON S, HODGE R, CANTARINI M, JANNE PA, MITSUDOMI T, GOSS GD (2017). Plasma ctDNA Analysis for Detection of the EGFR T790M Mutation in Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol*, **12**: 1061-1070.
- JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, HAUER M, DOUDNA JA, CHARPENTIER E (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, **337**: 816-821.
- JOUNG JK, SANDER JD (2013). TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **14**: 49-55.

- KANATSU-SHINOHARA M, Ogonuki N, Inoue K, Miki H, Ogura A, Toyokuni S, Shinohara T (2003). Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol Reprod*, **69**: 612-616.
- KANATSU-SHINOHARA M, TOYOKUNI S, SHINOHARA T (2005). Genetic selection of mouse male germline stem cells in vitro: offspring from single stem cells. *Biol Reprod*, **72**: 236-240.
- KEDIKA B, PATRI SV (2014). Benzothiazole head group based cationic lipids: synthesis and application for gene delivery. *Eur J Med Chem*, **74**: 703-716.
- KHAN F, PANDUPUSPITASARI N, CHUN-JIE H, AO Z, JAMAL M, ZOHAIB A, KHAN F, HAKIM M, ZHANG S (2016). CRISPR/Cas9 therapeutics: a cure for cancer and other genetic diseases. *Oncotarget*, **32**.
- KHODAVERDIAN VY, HANSCOM T, YU AM, YU TL, MAK V, BROWN AJ, ROBERTS SA, MCVEY M (2017). Secondary structure forming sequences drive SD-MMEJ repair of DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res*, **45**: 12848-12861.
- KIERSZENBAUM AL (1994). Mammalian spermatogenesis in vivo and in vitro: a partnership of spermatogenic and somatic cell lineages. *Endocr Rev*, **15**: 116-134.
- KIM H, KIM JS (2014). A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nat Rev Genet*, **15**: 321-334.
- KIM S, KIM D, CHO SW, KIM J, KIM JS (2014). Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Res*, **24**: 1012-1019.
- KIM Y, KWEON J, KIM A, CHON JK, YOO JY, KIM HJ, KIM S, LEE C, JEONG E, CHUNG E, KIM D, LEE MS, GO EM, SONG HJ, KIM H, CHO N, BANG D, KIM S, KIM JS (2013). A library of TAL effector nucleases spanning the human genome. *Nat Biotechnol*, **31**: 251-258.
- KLEINSTIVER BP, PREW MS, TSAI SQ, TOPKAR VV, NGUYEN NT, ZHENG Z, GONZALES AP, LI Z, PETERSON RT, YEH JR, ARYEE MJ, JOUNG JK (2015). Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature*, **523**: 481-485.
- KLIMKE A, GUTTLE S, KUBALLA P, JANZEN S, ORTMANN S, FLORA A (2019). Use of CRISPR/Cas9 for the Modification of the Mouse Genome. *Methods Mol Biol*, **1953**: 213-230.
- KO K, TAPIA N, WU G, KIM JB, BRAVO MJ, SASSE P, GLASER T, RUAU D, HAN DW, GREBER B, HAUSDORFER K, SEBASTIANO V, STEHLING M, FLEISCHMANN BK, BRUSTLE O, ZENKE M, SCHOLER HR (2009). Induction of pluripotency in adult unipotent germline stem cells. *Cell Stem Cell*, **5**: 87-96.
- KOONIN EV, MAKAROVA KS, ZHANG F (2017). Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Curr Opin Microbiol*, **37**: 67-78.

- KOSTEREVA N, HOFMANN MC (2008). Regulation of the spermatogonial stem cell niche. *Reprod Domest Anim*, **43 Suppl 2**: 386-392.
- KUBOTA H, AVARBOCK MR, BRINSTER RL (2004). Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**: 16489-16494.
- KUBOTA H, BRINSTER RL (2006). Technology insight: In vitro culture of spermatogonial stem cells and their potential therapeutic uses. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, **2**: 99-108.
- KUBOTA H, BRINSTER RL (2008). Culture of rodent spermatogonial stem cells, male germline stem cells of the postnatal animal. *Methods Cell Biol*, **86**: 59-84.
- KUBOTA H, BRINSTER RL (2018). Spermatogonial stem cells. *Biol Reprod*. **99(1)**: 52-74
- KWON DN, LEE K, KANG MJ, CHOI YJ, PARK C, WHYTE JJ, BROWN AN, KIM JH, SAMUEL M, MAO J, PARK KW, MURPHY CN, PRATHER RS, KIM JH (2013). Production of biallelic CMP-Neu5Ac hydroxylase knock-out pigs. *Sci Rep*, **3**: 1981.
- LEE K, CONBOY M, PARK HM, JIANG F, KIM HJ, DEWITT MA, MACKLEY VA, CHANG K, RAO A, SKINNER C, SHOBHA T, MEHDIPOUR M, LIU H, HUANG WC, LAN F, BRAY NL, LI S, CORN JE, KATAOKA K, DOUDNA JA, CONBOY I, MURTHY N (2017). Nanoparticle delivery of Cas9 ribonucleoprotein and donor DNA in vivo induces homology-directed DNA repair. *Nat Biomed Eng*, **1**: 889-901.
- LI C, ZHU X, CHEN S, CHEN L, ZHAO Y, JIANG Y, GAO S, WANG F, LIU Z, FAN R, SUN L, ZHOU X (2017). Melatonin promotes the proliferation of GC-1 spg cells by inducing metallothionein-2 expression through ERK1/2 signaling pathway activation. *Oncotarget*, **8**: 65627-65641.
- LI D, QIU Z, SHAO Y, CHEN Y, GUAN Y, LIU M, LI Y, GAO N, WANG L, LU X, ZHAO Y, LIU M (2013). Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, **31**: 681-683.
- LI SY, CHENG QX, WANG JM, LI XY, ZHANG ZL, GAO S, CAO RB, ZHAO GP, WANG J (2018). CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection. *Cell Discov*, **4**: 20.
- LI T, HUANG S, ZHAO X, WRIGHT DA, CARPENTER S, SPALDING MH, WEEKS DP, YANG B (2011). Modularly assembled designer TAL effector nucleases for, targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes. *Nucleic Acids Res*, **39**: 6315-6325.
- LIANG X, POTTER J, KUMAR S, ZOU Y, QUINTANILLA R, SRIDHARAN M, CARTE J, CHEN W, ROARK N, RANGANATHAN S, RAVINDER N, CHESNUT JD (2015). Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. *J Biotechnol*, **208**: 44-53.
- LIEBER MR, MA Y, PANNICKE U, SCHWARZ K (2003). Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**: 712-720.

- LIN S, STAAHL BT, ALLA RK, DOUDNA JA (2014). Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. *Elife*, **3**: e04766.
- LIN Y, LIU Z, LIU X, ZHANG Y, RONG Z, LI D (2013). Microarray-based analysis of the gene expression profile in GC-1 spg cells transfected with spermatogenesis associated gene 12. *Int J Mol Med*, **31**: 459-466.
- LIN YN, MATZUK MM (2014). Genetics of male fertility. *Methods Mol Biol*, **1154**: 25-37.
- LINO CA, HARPER JC, CARNEY JP, TIMLIN JA (2018). Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. *Drug Deliv*, **25**: 1234-1257.
- LIU TY, LIU JJ, ADITHAM AJ, NOGALES E, DOUDNA JA (2019). Target preference of Type III-A CRISPR-Cas complexes at the transcription bubble. *Nat Commun*, **10**: 3001.
- LIU X, WANG Y, GUO W, CHANG B, LIU J, GUO Z, QUAN F, ZHANG Y (2013). Zinc-finger nickase-mediated insertion of the lysostaphin gene into the beta-casein locus in cloned cows. *Nat Commun*, **4**: 2565.
- LIU X, WANG Y, TIAN Y, YU Y, GAO M, HU G, SU F, PAN S, LUO Y, GUO Z, QUAN F, ZHANG Y (2014). Generation of mastitis resistance in cows by targeting human lysozyme gene to beta-casein locus using zinc-finger nucleases. *Proc Biol Sci*, **281**: 20133368.
- LUKASHEV AN, ZAMYATNIN AA JR. (2016). Viral Vectors for Gene Therapy: Current State and Clinical Perspectives. *Biochemistry (Mosc)*, **81**: 700-708.
- MA Y, SHEN B, ZHANG X, LU Y, CHEN W, MA J, HUANG X, ZHANG L (2014). Heritable multiplex genetic engineering in rats using CRISPR/Cas9. *PLoS One*, **9**: e89413.
- MAKAROVA KS, KOONIN EV (2015). Annotation and Classification of CRISPR-Cas Systems. *Methods Mol Biol*, **1311**: 47-75.
- MANGHWAR H, LINDSEY K, ZHANG X, JIN S (2019). CRISPR/Cas System: Recent Advances and Future Prospects for Genome Editing. *Trends Plant Sci*, **24**: 1102-1125.
- MARRAFFINI LA, SONTHEIMER EJ (2008). CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science*, **322**: 1843-1845.
- MCCLEMENTS ME, MACLAREN RE (2017). Adeno-associated Virus (AAV) Dual Vector Strategies for Gene Therapy Encoding Large Transgenes. *Yale J Biol Med*, **90**: 611-623.
- MCVEY M, LEE SE (2008). MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. *Trends Genet*, **24**: 529-538.
- MEHRAVAR M, SHIRAZI A, MEHRAZAR MM, NAZARI M, BANAN M, SALIMI M (2019). Efficient Production of Biallelic RAG1 Knockout Mouse Embryonic Stem Cell Using CRISPR/Cas9. *Iran J Biotechnol*, **17**: e2205.

- MENG X, LINDAHL M, HYVONEN ME, PARVINEN M, DE ROOIJ DG, HESS MW, RAATIKAINEN-AHOKAS A, SAINIO K, RAUVALA H, LAKSO M, PICHEL JG, WESTPHAL H, SAARMA M, SARIOLA H (2000). Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science*, **287**: 1489-1493.
- METSKY HC, FREIJE CA, KOSOKO-THORODDSEN T-SF, SABETI PC, MYHRVOLD C (2020). CRISPR-based COVID-19 surveillance using a genomically-comprehensive machine learning approach. *bioRxiv*: 2020.02.26.967026.
- MOJICA FJ, DIEZ-VILLASENOR C, GARCIA-MARTINEZ J, SORIA E (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol*, **60**: 174-182.
- MOJICA FJ, DIEZ-VILLASENOR C, SORIA E, JUEZ G (2000). Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol Microbiol*, **36**: 244-246.
- MOON SB, KIM DY, KO JH, KIM YS (2019). Recent advances in the CRISPR genome editing tool set. *Exp Mol Med*, **51**: 1-11.
- MORENO-MATEOS MA, VEJNAR CE, BEAUDOIN JD, FERNANDEZ JP, MIS EK, KHOKHA MK, GIRALDEZ AJ (2015). CRISPRscan: designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting in vivo. *Nat Methods*, **12**: 982-988.
- MOUT R, RAY M, YESILBAG TONGA G, LEE YW, TAY T, SASAKI K, ROTELLO VM (2017). Direct Cytosolic Delivery of CRISPR/Cas9-Ribonucleoprotein for Efficient Gene Editing. *ACS Nano*, **11**: 2452-2458.
- NAGAMANI G, ALEX S, SONI KB, ANITH KN, VIJI MM, KIRAN AG (2019). A novel approach for increasing transformation efficiency in E. coli DH5alpha cells using silver nanoparticles. *3 Biotech*, **9**: 113.
- NAGANO M, AVARBOCK MR, LEONIDA EB, BRINSTER CJ, BRINSTER RL (1998). Culture of mouse spermatogonial stem cells. *Tissue Cell*, **30**: 389-397.
- NISHIMASU H, RAN FA, HSU PD, KONERMANN S, SHEHATA SI, DOHMAE N, ISHITANI R, ZHANG F, NUREKI O (2014). Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, **156**: 935-949.
- O'SHAUGHNESSY PJ, FOWLER PA (2011). Endocrinology of the mammalian fetal testis. *Reproduction*, **141**: 37-46.
- O'SHAUGHNESSY PJ, MORRIS ID, HUHTANIEMI I, BAKER PJ, ABEL MH (2009). Role of androgen and gonadotrophins in the development and function of the Sertoli cells and Leydig cells: data from mutant and genetically modified mice. *Mol Cell Endocrinol*, **306**: 2-8.
- OATLEY JM, BRINSTER RL (2012). The germline stem cell niche unit in mammalian testes. *Physiol Rev*, **92**: 577-595.
- OATLEY MJ, RACICOT KE, OATLEY JM (2011). Sertoli cells dictate spermatogonial stem cell niches in the mouse testis. *Biol Reprod*, **84**: 639-645.

- OHAINLE M, HELMS L, VERMEIRE J, ROESCH F, HUMES D, BASOM R, DELROW JJ, OVERBAUGH J, EMERMAN M (2018). A virus-packageable CRISPR screen identifies host factors mediating interferon inhibition of HIV. *Elife*, **7**.
- OKUTMAN O, MULLER J, BAERT Y, SERDAROGULLARI M, GULTOMRUK M, PITON A, ROMBAUT C, BENKHALIFA M, TELETIN M, SKORY V, BAKIRCIOGLU E, GOOSSENS E, BAHCECI M, VIVILLE S (2015). Exome sequencing reveals a nonsense mutation in TEX15 causing spermatogenic failure in a Turkish family. *Hum Mol Genet*, **24**: 5581-5588.
- OSBORN MJ, LEES CJ, MCELROY AN, MERKEL SC, EIDE CR, MATHEWS W, FESER CJ, TSCHANN M, MCELMURY RT, WEBBER BR, KIM CJ, BLAZAR BR, TOLAR J (2018). CRISPR/Cas9-Based Cellular Engineering for Targeted Gene Overexpression. *Int J Mol Sci*, **19**(4): 946
- OSTRER H, HUANG HY, MASCH RJ, SHAPIRO E (2007). A cellular study of human testis development. *Sex Dev*, **1**: 286-92.
- PAIX A, FOLKMANN A, GOLDMAN DH, KULAGA H, GRZELAK MJ, RASOLOSON D, PAIDEMARRY S, GREEN R, REED RR, SEYDOUX G (2017). Precision genome editing using synthesis-dependent repair of Cas9-induced DNA breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **114**: E10745-e10754.
- PANJA S, AICH P, JANA B, BASU T (2008). Plasmid DNA binds to the core oligosaccharide domain of LPS molecules of E. coli cell surface in the CaCl₂-mediated transformation process. *Biomacromolecules*, **9**: 2501-2509.
- PANJA S, SAHA S, JANA B, BASU T (2006). Role of membrane potential on artificial transformation of E. coli with plasmid DNA. *J Biotechnol*, **127**: 14-20.
- PAPAPETROU EP, SCHAMBACH A (2016). Gene Insertion Into Genomic Safe Harbors for Human Gene Therapy. *Mol Ther*, **24**: 678-684.
- PARDEE K, GREEN AA, TAKAHASHI MK, BRAFF D, LAMBERT G, LEE JW, FERRANTE T, MA D, DONGHIA N, FAN M, DARINGER NM, BOSCH I, DUDLEY DM, O'CONNOR DH, GEHRKE L, COLLINS JJ (2016). Rapid, Low-Cost Detection of Zika Virus Using Programmable Biomolecular Components. *Cell*, **165**: 1255-1266.
- PATTANAYAK V, LIN S, GUILINGER JP, MA E, DOUDNA JA, LIU DR (2013). High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nat Biotechnol*, **31**: 839-843.
- PENG W, FENG M, FENG X, LIANG YX, SHE Q (2015). An archaeal CRISPR type III-B system exhibiting distinctive RNA targeting features and mediating dual RNA and DNA interference. *Nucleic Acids Res*, **43**: 406-417.
- PLASESKI T, NOVESKI P, POPESKA Z, EFREMOV GD, PLASESKA-KARANFILSKA D (2012). Association study of single-nucleotide polymorphisms in FASLG, JMJDIA, LOC203413, TEX15, BRDT, OR2W3, INSR, and TAS2R38 genes with male infertility. *J Androl*, **33**: 675-683.

- POURCEL C, SALVIGNOL G, VERGNAUD G (2005). CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology*, **151**: 653-663.
- PRASETYANINGTYAS WE, KARJA NWK, AGUNGPRIYONO S, FAHRUDIN M (2020). Characteristics of testicular cell development of 5-day-old mice in culture in vitro. *Anim Sci J*, **91**: e13332.
- PROUDFOOT C, CARLSON DF, HUDDART R, LONG CR, PRYOR JH, KING TJ, LILLICO SG, MILEHAM AJ, MCLAREN DG, WHITELAW CB, FAHRENKRUG SC (2015). Genome edited sheep and cattle. *Transgenic Res*, **24**: 147-153.
- RAGHAVA S, GIORDA KM, ROMANO FB, HEUCK AP, HEBERT DN (2011). The SV40 late protein VP4 is a viroporin that forms pores to disrupt membranes for viral release. *PLoS Pathog*, **7**: e1002116.
- RAMAKRISHNA S, KWAKU DAD AB, BELOOR J, GOPALAPPA R, LEE SK, KIM H (2014). Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA. *Genome Res*, **24**: 1020-1027.
- RAMALINGAM S, ANNALURU N, KANDAVELOU K, CHANDRASEGARAN S (2014). TALEN-mediated generation and genetic correction of disease-specific human induced pluripotent stem cells. *Curr Gene Ther*, **14**: 461-472.
- RAN FA, CONG L, YAN WX, SCOTT DA, GOOTENBERG JS, KRIZ AJ, ZETSCHE B, SHALEM O, WU X, MAKAROVA KS, KOONIN EV, SHARP PA, ZHANG F (2015). In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature*, **520**: 186-191.
- RAN FA, HSU PD, LIN CY, GOOTENBERG JS, KONERMAN S, TREVINO AE, SCOTT DA, INOUE A, MATOBA S, ZHANG Y, ZHANG F (2013). Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, **154**: 1380-1389.
- RATH D, AMLINGER L, RATH A, LUNDGREN M (2015). The CRISPR-Cas immune system: biology, mechanisms and applications. *Biochimie*, **117**: 119-128.
- RAZAVI SM, SABBAGHIAN M, JALILI M, DIVSALAR A, WOLKENHAUER O, SALEHZADEH-YAZDI A (2017). Comprehensive functional enrichment analysis of male infertility. *Sci Rep*, **7**: 15778.
- REYON D, TSAI SQ, KHAYTER C, FODEN JA, SANDER JD, JOUNG JK (2012). FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. *Nat Biotechnol*, **30**: 460-465.
- ROHIWAL SS, DVORAKOVA N, KLIMA J, VASKOVICOVA M, SENIGL F, SLOUF M, PAVLOVA E, STEPANEK P, BABUKA D, BENES H, ELLEDEROVA Z, STIEGER K (2020). Polyethylenimine based magnetic nanoparticles mediated non-viral CRISPR/Cas9 system for genome editing. *Sci Rep*, **10**: 4619.
- ROSS MH, PAWLINA W 2006. *Histology: A Text And Atlas With Correlated Cell and Molecular Biology* Philadelphia,PA, Lippincott Williams & Wilkins."p.:728-751"

- ROUILLON C, ZHOU M, ZHANG J, POLITIS A, BEILSTEN-EDMANDS V, CANNONE G, GRAHAM S, ROBINSON CV, SPAGNOLO L, WHITE MF (2013). Structure of the CRISPR interference complex CSM reveals key similarities with cascade. *Mol Cell*, **52**: 124-134.
- RUAN J, HE XJ, DU WD, CHEN G, ZHOU Y, XU S, ZUO XB, FANG LB, CAO YX, ZHANG XJ (2012). Genetic variants in TEX15 gene conferred susceptibility to spermatogenic failure in the Chinese Han population. *Reprod Sci*, **19**: 1190-1196.
- SADLER TW 2011. *Langman's Medical Embryology*, Lippincott Williams & Wilkins."12th Ed". "p.:10-21"
- SAKUMA T, YAMAMOTO T (2016). Engineering Customized TALENs Using the Platinum Gate TALEN Kit. *Methods Mol Biol*, **1338**: 61-70.
- SANDER JD, JOUNG JK (2014). CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol*, **32**: 347-355.
- SAPRANAUSKAS R, GASIUNAS G, FREMAUX C, BARRANGOU R, HORVATH P, SIKSNYS V (2011). The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, **39**: 9275-9282.
- SAVAGE DF (2019). Cas14: Big Advances from Small CRISPR Proteins. *Biochemistry*, **58**: 1024-1025.
- SCHWANK G, KOO BK, SASSELLI V, DEKKERS JF, HEO I, DEMIRCAN T, SASAKI N, BOYMANS S, CUPPEN E, VAN DER ENT CK, NIEUWENHUIS EE, BEEKMAN JM, CLEVERS H (2013). Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell*, **13**: 653-658.
- SCOTT GJ, GRUZDEV A (2019). Genome Editing in Mouse Embryos with CRISPR/Cas9. *Methods Mol Biol*, **1960**: 23-40.
- SERUGGIA D, MONTOLIU L (2014). The new CRISPR-Cas system: RNA-guided genome engineering to efficiently produce any desired genetic alteration in animals. *Transgenic Res*, **23**: 707-716.
- SHABANI R, ASHTARI K, BEHNAM B, IZADYAR F, ASGARI H, ASGHARI JAFARABADI M, ASHJARI M, ASADI E, KORUJI M (2016). In vitro toxicity assay of cisplatin on mouse acute lymphoblastic leukaemia and spermatogonial stem cells. *Andrologia*, **48**: 584-594.
- SHEN B, ZHANG J, WU H, WANG J, MA K, LI Z, ZHANG X, ZHANG P, HUANG X (2013). Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting. *Cell Res*, **23**: 720-723.
- SHEN S, LOH TJ, SHEN H, ZHENG X, SHEN H (2017). CRISPR as a strong gene editing tool. *BMB Rep*, **50**: 20-24.
- SHUI B, HERNANDEZ MATIAS L, GUO Y, PENG Y (2016). The Rise of CRISPR/Cas for Genome Editing in Stem Cells. *Stem Cells Int*, **2016**: 8140168.

- SINGH P, SCHIMENTI JC (2015). The genetics of human infertility by functional interrogation of SNPs in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **112**: 10431-6.
- SINKUNAS T, GASIUNAS G, FREMAUX C, BARRANGOU R, HORVATH P, SIKSNYS V (2011). Cas3 is a single-stranded DNA nuclease and ATP-dependent helicase in the CRISPR/Cas immune system. *Embo j*, **30**: 1335-1342.
- SMITH AJ, CARTER SP, KENNEDY BN (2017). Genome editing: the breakthrough technology for inherited retinal disease? *Expert Opin Biol Ther*, **17**: 1245-1254.
- SMITH FF, TRES LL, KIERSZENBAUM AL (1992). Expression of testis-specific histone genes during the development of rat spermatogenic cells in vitro. *Dev Dyn*, **193**: 49-57.
- SONG SH, CHIBA K, RAMASAMY R, LAMB DJ (2016). Recent advances in the genetics of testicular failure. *Asian J Androl*, **18**: 350-355.
- SOREK R, KUNIN V, HUGENHOLTZ P (2008). CRISPR — a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nature Reviews Microbiology*, **6**: 181-186.
- STEYER B, CARLSON-STEVERMER J, ANGENENT-MARI N, KHALIL A, HARKNESS T, SAHA K (2016). High content analysis platform for optimization of lipid mediated CRISPR-Cas9 delivery strategies in human cells. *Acta Biomater*, **34**: 143-158.
- SWIECH L, HEIDENREICH M, BANERJEE A, HABIB N, LI Y, TROMBETTA J, SUR M, ZHANG F (2015). In vivo interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol*, **33**: 102-106.
- TAKASHIMA S, SHINOHARA T (2018). Culture and transplantation of spermatogonial stem cells. *Stem Cell Res*, **29**: 46-55.
- TAN W, CARLSON DF, LANCTO CA, GARBE JR, WEBSTER DA, HACKETT PB, FAHRENKRUG SC (2013). Efficient nonmeiotic allele introgression in livestock using custom endonucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**: 16526-16531.
- TERNS RM, TERNS MP (2014). CRISPR-based technologies: prokaryotic defense weapons repurposed. *Trends Genet*, **30**: 111-118.
- TESSON L, USAL C, MENORET S, LEUNG E, NILES BJ, REMY S, SANTIAGO Y, VINCENT AI, MENG X, ZHANG L, GREGORY PD, ANEGON I, COST GJ (2011). Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs. *Nat Biotechnol*, **29**: 695-696.
- TSAI SQ, ZHENG Z, NGUYEN NT, LIEBERS M, TOPKAR VV, THAPAR V, WYVEKENS N, KHAYTER C, IAFRATE AJ, LE LP, ARYEE MJ, JOUNG JK (2015). GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. *Nat Biotechnol*, **33**: 187-197.
- UNTERGASSER A, CUTCUTACHE I, KORESSAAR T, YE J, FAIRCLOTH BC, REMM M, ROZEN SG (2012). Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res*, **40**(15):e115.

- WANG D, MOU H, LI S, LI Y, HOUGH S, TRAN K, LI J, YIN H, ANDERSON DG, SONTHEIMER EJ, WENG Z, GAO G, XUE W (2015). Adenovirus-Mediated Somatic Genome Editing of Pten by CRISPR/Cas9 in Mouse Liver in Spite of Cas9-Specific Immune Responses. *Hum Gene Ther*, **26**: 432-442.
- WANG H, YANG H, SHIVALILA CS, DAWLATY MM, CHENG AW, ZHANG F, JAENISCH R (2013). One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, **153**: 910-918.
- WANG PJ, MCCARREY JR, YANG F, PAGE DC (2001). An abundance of X-linked genes expressed in spermatogonia. *Nat Genet*, **27**: 422-426.
- WANG PJ, PAGE DC, MCCARREY JR (2005). Differential expression of sex-linked and autosomal germ-cell-specific genes during spermatogenesis in the mouse. *Hum Mol Genet*, **14**: 2911-2918.
- WANG T, WEI JJ, SABATINI DM, LANDER ES (2014). Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science*, **343**: 80-84.
- WANG X, JIN HR, CUI YQ, CHEN J, SHA YW, GAO ZL (2018). Case study of a patient with cryptozoospermia associated with a recessive TEX15 nonsense mutation. *Asian J Androl*, **20**: 101-102.
- WANG XW, HU LF, HAO J, LIAO LQ, CHIU YT, SHI M, WANG Y (2019). A microRNA-inducible CRISPR-Cas9 platform serves as a microRNA sensor and cell-type-specific genome regulation tool. *Nat Cell Biol*, **21**: 522-530.
- WANG Y, DING Y, LI J (2017). CRISPR-Cas9-Mediated Gene Editing in Mouse Spermatogonial Stem Cells. *Methods Mol Biol*, **1622**: 293-305.
- WEI J, WAGNER S, LU D, MACLEAN P, CARLSON DF, FAHRENKRUG SC, LAIBLE G (2015). Efficient introgression of allelic variants by embryo-mediated editing of the bovine genome. *Sci Rep*, **5**: 11735.
- WU H, WANG Y, ZHANG Y, YANG M, LV J, LIU J, ZHANG Y (2015a). TALE nickase-mediated SP110 knockin endows cattle with increased resistance to tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **112**: E1530-9.
- WU Y, ZHOU H, FAN X, ZHANG Y, ZHANG M, WANG Y, XIE Z, BAI M, YIN Q, LIANG D, TANG W, LIAO J, ZHOU C, LIU W, ZHU P, GUO H, PAN H, WU C, SHI H, WU L, TANG F, LI J (2015b). Correction of a genetic disease by CRISPR-Cas9-mediated gene editing in mouse spermatogonial stem cells. *Cell Res*, **25**: 67-79.
- WU Z, YANG H, COLOSI P (2010). Effect of genome size on AAV vector packaging. *Mol Ther*, **18**: 80-86.
- XIN J, YANG H, FAN N, ZHAO B, OUYANG Z, LIU Z, ZHAO Y, LI X, SONG J, YANG Y, ZOU Q, YAN Q, ZENG Y, LAI L (2013). Highly efficient generation of GGTA1 biallelic knockout inbred mini-pigs with TALENs. *PLoS One*, **8**: e84250.

- XU H, XIAO T, CHEN CH, LI W, MEYER CA, WU Q, WU D, CONG L, ZHANG F, LIU JS, BROWN M, LIU XS (2015). Sequence determinants of improved CRISPR sgRNA design. *Genome Res*, **25**: 1147-1157.
- XU L, LIU Y, HAN R (2019). BEAT: A Python Program to Quantify Base Editing from Sanger Sequencing. *Crispr j*, **2**: 223-229.
- XU X, GAO D, WANG P, CHEN J, RUAN J, XU J, XIA X (2018). Efficient homology-directed gene editing by CRISPR/Cas9 in human stem and primary cells using tube electroporation. *Sci Rep*, **8**: 11649.
- YANG F, ECKARDT S, LEU NA, MCLAUGHLIN KJ, WANG PJ (2008). Mouse TEX15 is essential for DNA double-strand break repair and chromosomal synapsis during male meiosis. *J Cell Biol*, **180**: 673-679.
- YANG H, WANG H, SHIVALILA CS, CHENG AW, SHI L, JAENISCH R (2013). One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, **154**: 1370-1379.
- YATES AD, ACHUTHAN P, AKANNI W, ALLEN J, ALLEN J, ALVAREZ-JARRETA J, AMODE MR, ARMEAN IM, AZOV AG, BENNETT R, BHAI J, BILLIS K, BODDU S, MARUGÁN JC, CUMMINS C, DAVIDSON C, DODIYA K, FATIMA R, GALL A, GIRON CG, GIL L, GREGO T, HAGGERTY L, HASKELL E, HOURLIER T, IZUOGU OG, JANACEK SH, JUETTEMANN T, KAY M, LAVIDAS I, LE T, LEMOS D, MARTINEZ JG, MAUREL T, MCDOWALL M, MCMAHON A, MOHANAN S, MOORE B, NUHN M, OHEH DN, PARKER A, PARTON A, PATRICIO M, SAKTHIVEL MP, ABDUL SALAM AI, SCHMITT BM, SCHUILENBURG H, SHEPPARD D, SYCHEVA M, SZUBA M, TAYLOR K, THORMANN A, THREADGOLD G, VULLO A, WALTS B, WINTERBOTTOM A, ZADISSA A, CHAKIACHVILI M, FLINT B, FRANKISH A, HUNT SE, G II, KOSTADIMA M, LANGRIDGE N, LOVELAND JE, MARTIN FJ, MORALES J, MUDGE JM, MUFFATO M, PERRY E, RUFFIER M, TREVANION SJ, CUNNINGHAM F, HOWE KL, ZERBINO DR, FLICEK P (2020). Ensembl 2020. *Nucleic Acids Res*, **48**: D682-d688.
- YIN H, KAUFFMAN KJ, ANDERSON DG (2017). Delivery technologies for genome editing. *Nat Rev Drug Discov*, **16**: 387-399.
- YIN H, SONG CQ, DORKIN JR, ZHU LJ, LI Y, WU Q, PARK A, YANG J, SURESH S, BIZHANOVA A, GUPTA A, BOLUKBASI MF, WALSH S, BOGORAD RL, GAO G, WENG Z, DONG Y, KOTELIANSKY V, WOLFE SA, LANGER R, XUE W, ANDERSON DG (2016). Therapeutic genome editing by combined viral and non-viral delivery of CRISPR system components in vivo. *Nat Biotechnol*, **34**: 328-333.
- YIN H, XUE W, CHEN S, BOGORAD RL, BENEDETTI E, GROMPE M, KOTELIANSKY V, SHARP PA, JACKS T, ANDERSON DG (2014). Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat Biotechnol*, **32**: 551-553.
- ZiFiT (2020). Zinc Finger Consortium. Erişim Adresi: [<http://zifit.partners.org/ZiFiT/>]

ZEBEC Z, MANICA A, ZHANG J, WHITE MF, SCHLEPER C (2014). CRISPR-mediated targeted mRNA degradation in the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Nucleic Acids Res*, **42**: 5280-5288.

ZHANG L, TANG J, HAINES CJ, FENG H, LAI L, TENG X, HAN Y (2013). c-kit expression profile and regulatory factors during spermatogonial stem cell differentiation. *BMC Dev Biol*, **13**: 38.



ÖZGEÇMİŞ

I-Bireysel bilgiler

Adı ve soyadı: Süheyla YEŞİLBOSTAN

Doğum yeri ve tarihi: Posof, 14.04.1976

Uyruğu: TC

Medeni durumu: Evli

İletişim adresi ve telefonu: Ankara Üniversitesi

Tıp Fakültesi Cebeci Hastanesi Tüp bebek ünitesi
05332368876

II- Eğitimi

2012-... Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı

Doktora Programı

2002-2004 Ankara Üniversitesi Adli Bilimler Enstitüsü, Adli Biyoloji Yüksek Lisans Programı

1994-1998 Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü
(Lisans)

1990-1993 Kanuni Lisesi, Ankara

1988-1990 Merkez Ortaokulu, Şanlıurfa

1983-1988 Yalçın eski yapan İlkokulu, Ankara

Yabancı dili: İngilizce

III-Ünvanları

Biyolog 1998

Uzman biyolog 2004

IV- Mesleki Deneyimi

2005- Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tedaviye Yardımcı Üreme Sağlığı
Merkezi, EMBRİYOLOG

1999-2005 Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarı, Biyolog

1998-1999 Özel Sevgi Hastanesi Laboratuvar Grubu, Biyolog

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

2008- ...TSRM Üreme Sağlığı ve İnfertilite Derneği

2016-...Klinik Embriyoloji Derneği (KED),

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayınlar

- 1- Cem Atabekoğlu, Murat Sönmezer, Sinan Özkavukçu, Süheyla İşbacı. (2008). Unexpected Pregnancy Despite Extremely Decreased Estradiol Levels During Ovarian Stimulation. Fertil Steril, Doi: 10.1016/J.Fertnstert.2008.04.059
- 2- Cem Atabekoğlu, Aylin Çil, Murat Sönmezer, Sinan Özkavukçu, Süheyla İşbacı, Erdem Karabulut, Hakan Şatıroğlu (2008). Aynı Hastada Uygulanan GnRh Agonist Ve Antagonist Protokollerinin Ivf Sonuçlarına Etkisi (Poster)
3. Cem Atabekoğlu, Batuhan Özmen, Süheyla İşbacı, Ruşen Aytaç, Murat Sönmezer (2010). Coasting Resulting In A Sharp Decline In Serum Estradiol Does Not Compromise Implantation. Fertil Steril, Doi: 10.1016/J.Fertnstert.2010.01.061
4. Cem Atabekoğlu, M.D., Elif Aylin Taskın, M.D., Bülent Berker, M.D., Batuhan Özmen, M.D., Süheyla İşbacı, M.Sc., And Murat Sönmezer, M.D. (2012), Effect Of Hysteroscopic Resection Of Incomplete Uterine Septum On In Vitro Fertilization Outcome. The Journal Of Reproductive. Medicine, Doi: 10.1016/J.Fertnstert.2007.10.018
5. Sinan Özkavukcu, Ebru İbis, Sule Kızıl, Süheyla İşbacı, Kaan Aydos (2014), A Laboratory Modification In Testicular Sperm Preparation Technique Improves Spermatogenic Cell Yield. Asian Journal Andrology, Doi: 10.4103/1008-682x.132468
6. Murat Sönmezer, Sinan Özkavukcu, Yavuz Emre Şükür, Süheyla İşbacı, Ebru İbis (2017), Recovery Of Hormonal Status And Regular Menstrual Pattern In Two Patients Following Re-Implantation Of Cryopreserved-Thawed Ovarian Tissue. Turkish Journal Of Reproductive Medicine And Surgery

7. Süheyla Yeşilbostan, Bengi Çınar Kul (2019), Fare Spermatogonyal Kök Hücrelerde Crispr/Cas9 İle Hedefli Genom Düzenleme. Gevher Nesibe 4.Uluslararası Sağlık Bilimleri Kongresi(Poster Sunumu)

