



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***PLAGL2*'NİN CRISPR/Cas9 YÖNTEMİYLE
SUSTURULDUĞU HaCaT KERATİNOSİT
HÜCRE HATTININ KARAKTERİZASYONU**

Ümit UZUN

DOKTORA TEZİ

Doç. Dr. Tuba DİNÇER

TRABZON-2024

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak yapıldığını ve yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

01.08.2024
Ümit UZUN

İthaf

*Doktora tezimi, benim bu günlere gelmem için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan,
bana daima inanan, destek ve cesaret veren, her zaman yanımda olan çok değerli Ailem'e
ithaf ediyorum*



TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamın gerçekleştirilmesinde engin bilgi ve tecrübesini benden esirgemeyen, her türlü sıkıntıda bana destek olan, beni dinleyen ve yol gösteren, bana güvendiğini hissettiren ve akademik anlamda gelişmem için çeşitli projelerde çalışma imkânı sunan, beraber çalışmaktan son derece keyif aldığım benim gözümde tam bir Mentor olan değerli hocam Doç. Dr. Tuba DİNÇER'e teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Doktoraya başladığım ilk günden itibaren aynı çatı altında olduğumuz için bile kendimi şanslı hissettiğim, her ihtiyacım olduğunda engin bilgi ve tecrübesini paylaşmayı asla benden esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Ersan KALAY'a sonsuz teşekkür ederim. Doktora eğitimim sürecinde bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım Tıbbi Biyoloji Anabilim dalı öğretim üyeleri hocalarım Prof. Dr. Figen CELEP EYÜBOĞLU'na, Dr. Öğr. Üyesi Bayram TORAMAN'a ve Dr. Öğr. Üyesi Gökhan YILDIZ'a teşekkür ederim. Doktora tez çalışmamın ilerlemesinde katkılarını esirgemeyen Prof. Dr. Ahmet ALVER'e ayrıca teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca her kararında desteklerini hep arkamda hissettiren, sahip olduğum her şeyi borçlu olduğum, iyiyi, doğruyu, saygıyı ve sevgiyi öğreten, şefkatini hiçbir koşulda esirgemeyen, emeklerini asla ödeyemeyeceğim her şeyden kıymetli değerli annem ve babam Nilgün-Haydar UZUN'a, abim Deniz UZUN'a en içten ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

En zor ve stresli zamanlarımda desteklerini hissettiren, birlikte çalışmaktan keyif aldığım ve hiçbir zaman yardımlarını benden esirgemeyen çok değerli bölüm arkadaşlarıma, ayrıca KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne teşekkür ederim.

Bu araştırmanın bir kısmını, Doç. Dr. Tuba DİNÇER tarafından yürütülen 118Z124 No'lu 1001 projesiyle destekleyen TÜBİTAK'a ve TDK-2021-9752 kodlu BAP06 lisansüstü tez projesiyle diğer kısmını destekleyen Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Doktora eğitimim boyunca bana maddi olarak destek sağlayan Yüksek Öğretim Kurumu'na (YÖK, 100/2000 Doktora Bursu), ve TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı'na (BİDEB, 2211/A Yurt içi Lisansüstü Burs Programı, Doktora Bursu) teşekkür ederim.

Ümit UZUN

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇ KAPAK SAYFASI

ONAY

BEYAN

İthaf

TEŞEKKÜR

İÇİNDEKİLER

vi

TABLolar DİZİNİ

xi

ŞEKİLLER DİZİNİ

xii

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

xvi

ÖZET

xxi

ABSTRACT

xxii

1. GİRİŞ ve AMAÇ

1

2. GENEL BİLGİLER

3

2.1. Deri

3

2.2. Epidermis ve Keratinosit Farklılaşması

3

2.3. Epidermal Homeostazi

7

2.4. Ektodermal Gelişim Bozuklukları: Bartsocas Papas Sendromu

9

2.5. RIPK4 ve Keratinosit Farklılaşmasındaki Rolü

10

2.6. Pleomorfik Adenom Gen (PLAG) Ailesi

15

2.7. PLAGL2 ve Hücrel Fonksiyonları

17

2.7.1. PLAGL2'nin Kanserdeki Rolü

19

2.7.2. Normal Koşullarda PLAGL2'nin Rolü

20

2.7.3. Hücre Sinyal Yolakları ve PLAGL2

21

2.7.3.1. PLAGL2 ve Wnt/ β -katenin Sinyal Yolağındaki Rolü

21

2.8. Gen Düzenleme Sistemi: CRISPR/Cas9

24

3. GEREÇ ve YÖNTEM

29

3.1. Gereç

29

3.1.1. Kimyasallar

29

3.1.2. DNA ve Protein Markırlar

31

3.1.3. Antikorlar

31

3.1.3.1. Primer Antikorlar	31
3.1.3.2. Sekonder Antikorlar ve Konjuge Boyalar	31
3.1.4. Besiyeri ve Antibiyotikler	31
3.1.5. Enzim Kitleri	31
3.1.6. Diğer Kitler	32
3.1.7. Diğer Sarf Malzemeler	32
3.1.8. Kullanılan Cihazlar	33
3.1.9. Bakteri Suşları	34
3.1.9.1. DH5α Genotipi	34
3.1.10. Kullanılan Vektörler	34
3.1.11. Kullanılan Hücre Hatları	35
3.1.12. Çözeltiler, Tampon ve Besiyerleri	35
3.1.12.1. Bakteri Kültürü İçin Kullanılan Besiyerleri	35
3.1.12.2. Memeli Hücre Kültüründe Kullanılan Solüsyonlar	36
3.1.12.3. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler	39
3.1.12.4. Beta-galaktozidaz Analiz Solüsyonları	39
3.1.12.5. SDS-PAGE Çözeltileri	40
3.1.12.6. İmmünoblot Solüsyonları	41
3.1.12.7. İmmünofloresanda Kullanılan Çözeltiler	42
3.2. Yöntem	43
3.2.1. Bakteri Kültürü Teknikleri	43
3.2.1.1. Kompetan Hücre Hazırlama	43
3.2.1.2. <i>E.Coli</i> DH5α Suşuna Plazmid Transformasyonu	43
3.2.1.3. Bakteriden Plazmid İzolasyonu	44
3.2.2. Hücre Kültürü Teknikleri	45
3.2.2.1. Dondurulmuş Hücrelerin Çözülmesi	45
3.2.2.2. Hücrelerin Pasajlanması	46
3.2.2.3. Hücrelerin Dondurulması	46
3.2.2.4. Memeli Hücrelerinin Geçici Transfekte Edilmesine Yönelik Çalışmalar	47
3.2.3. Protein Analiz Yöntemlerine Dayalı Teknikler	49
3.2.3.1. Örneklerden Protein İzolasyonu	49
3.2.3.2. BCA Kiti Kullanılarak Protein Miktarı Tayini	49
3.2.3.3. İmmünoblot Yöntemi	50

3.2.4. DNA Temelli Teknikler	53
3.2.4.1. CRISPR/Cas9n Sisteminin Hazırlanması	53
3.2.4.2. CRISPR/Cas9n Sisteminin Uygulanması	59
3.2.4.3. Uygulanan CRISPR/Cas9n Sisteminin INDEL Analizleri (On-Target)	60
3.2.4.4. Tasarlanan sgRNA'ların Olası Hedef Dışı Genler Üzerindeki Etkilerinin Analizleri (Off-Target)	63
3.2.5. RNA Temelli Teknikler	64
3.2.5.1. Knock-out Klonlarda <i>PLAGL2</i> ve <i>İnvolukrin</i> İfadesinin Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR) Yöntemi ile mRNA Düzeyinde Belirlenmesi	64
3.2.6. Hücre Karakterizasyon Çalışmaları	67
3.2.6.1. Hücre Morfolojisinin İncelenmesi	67
3.2.6.2. Hücrelerin İkiye Bölünme Zamanının (Doubling Time) Belirlenmesi	70
3.2.6.3. Hücre Döngüsü Analizlerinin Yapılması	71
3.2.6.4. Hücre Ölümü Analizlerinin Yapılması	72
3.2.6.5. Hücre Hareketi Analizlerinin Yapılması	73
3.2.6.6. Hücre Sinyal Yolağı Analizi: Wnt/ β -katenin Sinyal Yolağı	75
3.2.7. İstatistiksel Analizler	77
4. BULGULAR	78
4.1. CRISPR/Cas9n Sisteminin Hazırlanması, Uygulanması ve Analiz Edilmesi	78
4.1.1. Rehber RNA (sgRNA) Tasarlanması	78
4.1.2. PX462 Vektörünün Hazırlanması	79
4.1.3. sgRNA'lerden Oligo Oluşturulması	80
4.1.4. Hazırlanan Oligoların PX462 Vektörüne Klonlanması	81
4.1.5. Seleksiyon için Antibiyotik Dozunun Belirlenmesi	82
4.1.6. <i>PLAGL2</i> 'ye Ait sgRNA'ları İçeren PX462 Vektörünün HaCaT Hücrelerine Transfeksiyonu ve Monoklonal Hücre Seçimi	83
4.1.7. CRISPR/Cas9n Sisteminin Uygulandığı Klonların INDEL Analizlerinin Gerçekleştirilmesi (On-Target)	84
4.1.8. CRISPR/Cas9n Sistemi İçin Tasarlanan sgRNA'ların Seçilen Klonlarda Hedef Dışı Analizlerinin Gerçekleştirilmesi (Off-Target)	90
4.2. Seçilen Klonlarda <i>PLAGL2</i> Ekspresyonundaki Değişimin Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR) Yöntemi ile İncelenmesi	94

4.3. <i>PLAGL2</i> 'nin HaCaT Klonlarında Knock-out Edildiğinin İmmüno blot ile Doğrulanması	96
4.3.1. Hücrelerden Protein Lizatı Eldesi ve Protein Miktarı Tayini	96
4.3.2. SDS-PAGE Elektroföresi ve İmmüno blot Analizi	97
4.4. <i>PLAGL2</i> Knock-out HaCaT Hücrelerinin Morfolojisinin İncelenmesi	98
4.4.1. Işık Mikroskobu Altında <i>PLAGL2</i> Knock-out Hücrelerinin Morfolojisinin İncelenmesi	98
4.4.2. Konfokal Mikroskobu ile <i>PLAGL2</i> Knock-out Hücrelerinin Morfolojisinin İncelenmesi	99
4.4.3. Akış Sitometrisi ile <i>PLAGL2</i> Knock-out Hücrelerinin Morfolojisinin İncelenmesi	100
4.5. <i>PLAGL2</i> Knock-out HaCaT Hücrelerinin İkilene Zamanının Analizi	100
4.6. <i>PLAGL2</i> Knock-out HaCaT Hücrelerinin Hücre Döngüsü Analizi	101
4.7. <i>PLAGL2</i> Knock-out HaCaT Hücrelerinin Hücre Ölümü Analizi	102
4.8. <i>PLAGL2</i> Knock-out HaCaT Hücrelerde <i>İnvolukrin</i> Ekspresyonu Analizi	104
4.9. <i>PLAGL2</i> Knock-out HaCaT Hücrelerinin Hücre Hareketi Analizlerinin Yapılması	104
4.9.1. Yara İyileşmesi Analizleri (Wound-Healing)	104
4.9.2. Transwell Migrasyon Analizleri	106
4.10. <i>PLAGL2</i> Knock-out HaCaT Hücrelerinin Koloni Oluşturma Analizinin Yapılması	107
4.11. <i>PLAGL2</i> Knock-out HaCaT Hücrelerinin Filopodia Formasyon Analizinin Yapılması	108
4.12. <i>PLAGL2</i> Knock-out HaCaT Hücrelerinin Wnt/ β -katenin Sinyal Yolu Analizi	109
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	112
6. KAYNAKLAR	123
EKLER	149
EK 1. <i>İnvolukrin</i> mRNA ekspresyonunda kullanılan primerlerin gen üzerinde konumlandırılması ve standart eğrisi	150
EK 2. <i>PLAGL2</i> Knock-out Hücrelerinin Büyüklüğünün β -aktin antikoru ile İmmüno floresan Yöntemiyle İncelenmesi	151

EK 3. *PLAGL2* Knock-out Hücrelerinin Filopodia Formasyonunun Falloidin ajanı ile İmmünofloresan Yöntemiyle İncelenmesi

152

ÖZGEÇMİŞ

153



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa
Tablo 1. PLAGL2 tarafından ekspresyonu aktive edilen genler	18
Tablo 2. PLAGL2'nin etkileşim ortaklarının dahil olduğu süreçler	19
Tablo 3. PLAGL2'nin fazladan ifadesiyle ilişkilendirilen kanser tipleri	19
Tablo 4. Kullanılan dolu, boş ve raportör vektörlere ait bilgiler	35
Tablo 5. Transfeksiyon çalışmalarında kullanılan lipozom bazlı ajanlar ve önerilen ajan/DNA miktarları	47
Tablo 6. BSA standardı kullanılarak seri dilüsyon hazırlanması	50
Tablo 7. %7.5'lik ayırma ve %5'lik yükleme jeli içeriği	51
Tablo 8. İmmunblotlama koşulları	53
Tablo 9. BbsI enzimi kesim reaksiyon koşulları	55
Tablo 10. sgRNA'ların fosforillenme ve oligomerizasyonu için hazırlanan reaksiyon	56
Tablo 11. Oligomerlerin PX462 vektörüne klonlama reaksiyon koşulları	57
Tablo 12. Kullanılan tüm primerlerin listesi	57
Tablo 13. PX462 vektörünün Sanger dizileme reaksiyon içeriği ve koşulları	58
Tablo 14. Taq Polimeraz PCR içeriği ve reaksiyon koşulları	61
Tablo 15. CloneJET PCR klonlama kiti küt uç reaksiyon koşulları	62
Tablo 16. WizScript cDNA sentez kiti içeriği ve reaksiyon koşulları	65
Tablo 17. SSoAdvanced qPCR SYBR Green kit içeriği ve reaksiyon koşulları	66
Tablo 18. İmmünofloresan koşulları	69
Tablo 19. Phalloidin ajanı ile yapılan immünofloresan koşulları	69
Tablo 20. Cycle Test Plus hücre döngüsü analizi kit içeriği	71
Tablo 21. Wnt/ β -katenin sinyal yolağı analizi için uygulanan kondisyonlar, içerik ve vektör miktarları	76
Tablo 22. Benchling biyoinformatik aracı kullanılarak <i>PLAGL2</i> hedef lokasyonunda elde edilen sgRNA dizileri ve skorları	78
Tablo 23. <i>PLAGL2</i> için tasarlanan komplementer sgRNA'ların ve scramble'ın ileri-geri oligoları	79
Tablo 24. <i>PLAGL2</i> için CRISPR/Cas9n uygulaması sonucunda seçilen klonlara ait varyasyonların alel bazlı analiz sonuçları	86

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 1.	Epidermisin yenilenmesi sırasında asimetrik kök hücre bölünmesi	4
Şekil 2.	Epidermisi oluşturan katmanlar ve hücre içeriği	5
Şekil 3.	Keratinosit farklılaşması boyunca meydana gelen değişimler	7
Şekil 4.	RIPK4 üzerindeki varyasyonlar ve ilişkilendirildiği semptomların şematik gösterimi	10
Şekil 5.	Mayada ve HEK293 hücrelerinde RIPK4-PLAGL2 etkileşiminin şematik olarak gösterilmesi	14
Şekil 6.	<i>PLAGL2</i> ailesi	16
Şekil 7.	<i>PLAGL2</i> proteininin yapısı ve PTM'ler	17
Şekil 8.	<i>PLAGL2</i> 'nin aday etkileşim ortakları	18
Şekil 9.	Wnt/ β -katenin sinyal yolağı	22
Şekil 10.	Bakteri sisteminde CRISPR tabanlı bağışıklık	25
Şekil 11.	Cas9 endonükleazlar	26
Şekil 12.	Çift zincir kırığı oluşturan CRISPR/Cas9 sistemi	27
Şekil 13.	Karşılıklı tek zincir kırığı oluşturan CRISPR/Cas9n sistemi	28
Şekil 14.	PX462 vektörüne ait genom haritası ve sgRNA'ların klonlanacağı <i>BbsI</i> (<i>BpiI</i>) bölgesi	54
Şekil 15.	<i>PLAGL2</i> ekzon 3 üzerindeki CRISPR/Cas9n hedef bölgesi	79
Şekil 16.	Kesimi yapılmış olan PX462 ve oligolar	80
Şekil 17.	Oligoların klonlandığı PX462'nin, <i>BbsI</i> ile kesilmeyen (C1) klonlarına ait Sanger dizileme sonuçları	82
Şekil 18.	<i>PLAGL2</i> hedef Cas9n kesim bölgesinde meydana gelen heterozigot değişimin Sanger dizileme yöntemiyle gösterilmesi	85
Şekil 19.	C1'de <i>PLAGL2</i> 'nin CRISPR/Cas9n yöntemiyle knock-out edilmesinin DNA ve RNA düzeyinde şematik olarak gösterilmesi	87
Şekil 20.	C1'de <i>PLAGL2</i> 'nin CRISPR/Cas9n yöntemiyle knock-out edilmesinin protein düzeyinde şematik olarak gösterilmesi	88
Şekil 21.	C48'de <i>PLAGL2</i> 'nin CRISPR/Cas9n yöntemiyle knock-out edilmesinin DNA ve RNA düzeyinde şematik olarak gösterilmesi	89

Şekil 22.	C48’de <i>PLAGL2</i> ’nin CRISPR/Cas9n yöntemiyle knock-out edilmesinin protein düzeyinde şematik olarak gösterilmesi	90
Şekil 23.	Tasarlanan sgRNA 1 ve 2’nin hedef dışında gitme ihtimali olan genlerin listesi	91
Şekil 24.	Hedef dışı analizler için seçilen dizilerin genler üzerindeki lokasyonu ve tasarlanan primerler	92
Şekil 25.	qRT-PCR’da kullanılacak olan primerlerin gen üzerinde konumlandırılması	95
Şekil 26.	<i>PLAGL2</i> ve <i>GAPDH</i> standart eğrileri	95
Şekil 27.	CRISPR/Cas9n uygulaması sonrası seçilen C1 ve C48 klonlarında <i>PLAGL2</i> mRNA seviyesi	96
Şekil 28.	<i>PLAGL2</i> knock-out hücrelerinin büyüklük ve granülitelerinin akış sitometrisi ile analizi	100
Şekil 29.	<i>PLAGL2</i> knock-out hücrelerinin hücre proliferasyon (ikiye katlanma) analizleri	101
Şekil 30.	<i>PLAGL2</i> knock-out hücrelerinin hücre döngüsü analizleri	101
Şekil 31.	<i>PLAGL2</i> knock-out hücrelerde hücre döngüsü fazlarının istatistiksel analizi	102
Şekil 32.	<i>PLAGL2</i> knock-out hücrelerde hücre ölümü (apoptoz) analizi	103
Şekil 33.	<i>PLAGL2</i> knock-out hücrelerde hücre ölümünün istatistiksel analizi	103
Şekil 34.	<i>PLAGL2</i> knock-out hücrelerde <i>Învolukrin</i> mRNA seviyesi	104
Şekil 35.	<i>PLAGL2</i> knock-out hücrelerinin <i>in vitro</i> yara kapanma analizleri	106
Şekil 36.	<i>PLAGL2</i> knock-out hücrelerde transfeksiyon verim analizleri	110
Şekil 37.	<i>PLAGL2</i> knock-out hücrelerde Wnt/ β -katenin sinyal yolağı analizi	110
Şekil 38.	Grafiksel özet	122

RESİMLER DİZİNİ

Resim No	Sayfa
Resim 1. <i>p63^{-/-}</i> farenin fenotipi	8
Resim 2. <i>RIPK4</i> homozigot varyasyona sahip BPS hastalarının klinik karakterizasyonu	9
Resim 3. <i>RIPK4^{-/-}</i> farenin fenotipi	11
Resim 4. <i>RIPK4^{+/-}</i> ve <i>RIPK4^{-/-}</i> fare deri karşılaştırmaları	12
Resim 5. <i>RIPK4^{-/-}</i> farelerin deri gelişiminde E-kaderin ve Keratin 17 proteinlerinin yerleşimi	13
Resim 6. PX462 vektörünün <i>BbsI</i> enzimiyle kesiminin %0.6'lık agaroz jelde görüntülenmesi	80
Resim 7. Oligo 1 ve 2'yi içeren PX462'nin DH5 α hücrelerine transformasyonundan sonra oluşan koloniler	81
Resim 8. <i>BbsI</i> enzimi ile kesilen klonların analizi	81
Resim 9. HaCaT hücrelerinde uygun Puromisin dozunun belirlenmesi	83
Resim 10. CRISPR/Cas9n uygulama sonrası monoklonal hücre seçilimi	84
Resim 11. Hedef bölgenin PCR ile analizi	84
Resim 12. Heterozigotluk gösteren klonlarda alellerinin koloni PCR ile analizi	85
Resim 13. <i>PLAGL2</i> knock-out klonlarda hedef dışı analizler için seçilen <i>RP11-274J2</i> ve <i>TREML2</i> genlerinin hedef bölgelerinin PCR ile çoğaltılması ve INDEL analizleri	93
Resim 14. <i>PLAGL2</i> knock-out C1 ve C48 klonlarından RNA izolasyonu	94
Resim 15. <i>PLAGL2</i> knock-out klonlarda <i>PLAGL2</i> 'nin immünoiblot ile analizi	97
Resim 16. <i>PLAGL2</i> knock-out ve kontrol hücrelerinin ışık mikroskobu altındaki görünümü	98
Resim 17. <i>PLAGL2</i> knock-out hücrelerde Beta-aktin ile hücre iskeleti organizasyonunun analizi	99
Resim 18. <i>PLAGL2</i> knock-out hücrelerinin <i>in vitro</i> yara iyileşmesi ile hücre göç hızının analizi	105
Resim 19. <i>PLAGL2</i> knock-out hücrelerinin açlık durumunda ve normal koşullarda 24 ve 48 saatlik transwell migrasyonu	107
Resim 20. <i>PLAGL2</i> knock-out hücrelerde koloni formasyon analizleri	108

Resim 21. <i>PLAGL2</i> knock-out hücrelerde falloidin ile filopodia organizasyonunun gösterilmesi	109
Resim 22. <i>PLAGL2</i> knock-out HaCaT ve HEK293 hücrelerinde WNT sinyal yolağı analizi	111



KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

A20	Tümör nekroz faktörü alfa kaynaklı protein 3
Aa	Amino asit
ADP	Adenozin difosfat
AEC	Ankiloblefaron-ectodermal defects-cleft lip/palate
APS	Amonyum persülfat
ASCL2	Achaete-Scute Family BHLH Transcription Factor 2
BAP	Bilimsel araştırma projeleri koordinasyon birimi
BNIP3	BCL2 interacting protein 3
bp	Baz çifti
BSA	Bovine serum albumin
Cas9	CRISPR ilişkili protein 9
Cas9n	CRISPR ilişkili protein 9 nikaz
CHAND	Curly hair, ankyloblepharon, nail dysplasia syndrome
Ct	Cycle threshold
cDNA	Komplementer DNA
cIAP 1	Apoptoz protein-1'in hücrel inhibitörü 1
cIAP 2	Apoptoz protein-1'in hücrel inhibitörü 2
crRNA	CRISPR RNA
CRISPR	Düzenli aralıklarla bölünmüş palindromik tekrar kümeleri
DEPC	Diethyl pyrocarbonate
dk	Dakika
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DNA	Deoksiriboz nükleik asit
DVL2	Segment polarite proteini dağılık homolog 2
DVL3	Segment polarite proteini dağılık homolog 3
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
FBS	Fetal bovin serum
FL	Full length-tam uzunlukta
g	Gram

GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
HaCaT	İnsan keratinosit hücre hattı
HEK293	İnsan embriyonik böbrek hücre hattı
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazineetansulfonik asit
H&E	Hematoksilen-Eozin
IF	İmmünfloresan
IGF2	Insulin Like Growth Factor 2
IKKα	Nükleer faktör kappa- β kinaz inhibitörü alfa
IKKβ	Nükleer faktör kappa- β kinaz inhibitörü beta
IL1	İnterlökin 1
IL6	İnterlökin 6
INDEL	İnseriyon Delesyon
IP	İmmünopresipitasyon
IRF6	İnterferon düzenleyici faktör 6
KANK2	KN Motif And Ankyrin Repeat Domains 2
kb	Kilobaz
kDA	Kilodalton
KRT1	Keratin 1
KRT6	Keratin 6
KRT14	Keratin 14
L	Litre
M	Molar
Ma	Moleküler ağırlık
MAD2L2	Mitotic Arrest Deficient 2 Like 2
MAPK1	Mitogen-Activated Protein Kinase 1
MEKK 2	Mitojenle aktive edilmiş protein kinaz kinaz 2
MEKK 3	Mitojenle aktive edilmiş protein kinaz kinaz 3
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
MPL	Thrombopoietin receptor
mRNA	Mesajcı RNA
mTOR	Rapamisinin memeli hedefi

MYCN	MYCN Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor
N	Normalite
nm	Nanometre
ng	Nanogram
NHEJ	Non-homologous end joining
NFC2	Neutrophil Cytosolic Factor 2
NFκβ	Nüklear faktör kappa β
Ntd	Nükleotid
NTRK3	Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase 3
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PAM	Protospacer adjacent motif
PAX9	Paired Box 9
PBS	Fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisi
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PI3K	Fosfoinositid-3 Kinaz
PKCδ	Protein kinaz C delta
PKCβ	Protein kinaz C beta
PKN1	Protein Kinase N1
PKP1	Plakophilin 1
PLAG1	Pleiomorfik adenom gen 1
PLAGL1	Pleiomorfik adenom gen benzeri 1
PLAGL2	Pleiomorfik adenom gen benzeri 2
pmol	Pikomol
Pol.	Polimeraz
Pr	Primer
PVDF	Polyvinylidene difluoride
P/S	Penicillin-Streptomycin
qRT-PCR	Kantitatif Real Time PCR
RASSF5	Ras Association Domain Family Member 5
RIPK4	Reseptörle etkileşen Serin Treonin Kinaz 4
RPM	Revolutions per minute
RNA	Ribonükleik asid

s	Saniye
SCFβ-TrCP	E3 ubiquitin ligaz kompleksi
Ser/thr	Serine/threonine
SDS	Sodyum dodesil sülfat
sgRNA	Rehber RNA
SP-C	Surfactant protein C
STAT3	Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon 3 aktivatörü
TEMED	Tetrametiletildiamin
TBS	Tris tamponlanmış tuz çözeltisi
TBST	Tris tamponlanmış tuz çözeltisi-Tween 20
TGFβ	Transforme edici büyüme faktörü β
TNF	Tümör nekroz faktörü
TNTE	Tris sodyum triton EDTA
tracrRNA	Trans-activating crRNA
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu
UV	Ultraviyole
WNT	Wingless-Type MMTV Integration Site Family
Wnt6	Wnt Family Member 6
Wt	Wild (yabanıl) tip

Simgeler

α	Alfa
$\pm$	Artı-eksi
β	Beta
Δ	Delta
γ	Gama
g	Gravity
κ	Kappa
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre
cm^2	Santimetre kare
$^{\circ}C$	Santigrad derece
∞	Sonsuz

U	Ünite
&	Ve
~	Yaklaşık
%	Yüzde

Formüller

C_2H_2	Cys ₂ His ₂ -like fold group (Zinc Finger)
CO_2	Karbondioksit
ddH ₂ O	Ultra saflıkta su
H ₂ O	Su
MgCl ₂	Magnezyum klorür
Na ₂ CO ₃	Sodyum karbonat

ÖZET

***PLAGL2*'nin CRISPR/Cas9 Yöntemiyle Susturulduğu HaCaT Keratinosit Hücre Hattının Karakterizasyonu**

Dış çevreye karşı koruyucu bir bariyer görevi gören çok katmanlı epidermisin ana hücresi keratinositlerdir. Epidermin oluşumu ve yenilenmesi p63 transkripsiyon faktörü tarafından koordine edilen keratinosit farklılaşmasıyla gerçekleşir. Keratinosit farklılaşmasında önemli bir rolü olan RIPK4'ün işleyiş mekanizmasına yönelik çalışmalarımızda, insan keratinosit cDNA kütüphanesi RIPK4'ün yem olarak kullanıldığı büyük ölçek maya-ikili hibrit yöntemiyle taranmış ve RIPK4'ün, bir transkripsiyon faktörü olan *PLAGL2* ile etkileştiği bulunmuştur. Bu etkileşim hem küçük ölçek maya-ikili hibritle tekrar mayada hem de farklı protein-protein etkileşim yöntemleriyle insan hücre hatlarında doğrulanmıştır. *PLAGL2*'nin RIPK4 ile etkileşimi ve RIPK4'e benzer şekilde, ekspresyonunun p63 tarafından düzenlenmesi, RIPK4 gibi *PLAGL2*'nin de keratinositlerde bir rolü olduğu hipotezini ortaya çıkarmıştır. Bugüne değin yapılan çalışmalar daha ziyade *PLAGL2*'nin karsinogezdeki rolünü tanımlamaya yönelik olmuştur. Literatürde *PLAGL2*'nin keratinositlerdeki rolünü gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Bu bağlamda tez çalışmamızla amaçlanan *PLAGL2*'nin keratinositlerdeki temel hücresel fonksiyonlar üzerinde bir rolü olup olmadığını araştırmaktır. Bu amaca yönelik ilk aşamada *PLAGL2*'nin ekspresyonu, HaCaT keratinosit hücre hattında CRISPR/Cas9n sistemiyle susturuldu. Sonrasında, oluşturulan *PLAGL2* knock-out hücreler morfoloji, büyüme hızı, hücre döngüsü, hücre hareketi ve hücre ölümü gibi temel hücresel fonksiyonlar açısından incelendi. Ayrıca bu hücrelerde, *PLAGL2* tarafından düzenlendiği farklı hücrelerde gösterilmiş olan Wnt/ β -katenin sinyal yolağı iletimi de araştırıldı. Sonuç olarak, *PLAGL2*'nin susturulması keratinositlerde hücre döngüsü üzerinde herhangi bir değişime neden olmazken, hücre ölümü ve hareketinde belirgin bir artışa neden olduğu görüldü. Hücreler morfolojik olarak incelendiğinde hücre büyüklüğünün ve hücre hareketiyle ilişkili filopod yapılarının arttığı görüldü. Bunlara ilaveten, Wnt/ β -katenin sinyal yolağı etkinliği *PLAGL2* knock-out hücrelerde kontrole kıyasla azalma gösterdi. Sonuçlarımız, *PLAGL2*'nin deri gelişiminde bir rolünün olabileceğine dair ipuçları vermektedir.

Anahtar Sözcükler: CRISPR/Cas9n, Epidermal gelişim, Gen susturma, HaCaT, *PLAGL2*

ABSTRACT

Characterization of the HaCaT Keratinocyte Cell Line in which *PLAGL2* is Silenced by the CRISPR/Cas9 Method

Keratinocytes are the main cell of the multilayered epidermis, which acts as a protective barrier against the external environment. The p63 transcription factor coordinates keratinocyte differentiation, which results in the formation and regeneration of the epidermis. RIPK4 is a protein which has an important role in keratinocyte differentiation. In our previous studies in order to identify the mechanism of RIPK4 function in this process, we screened human keratinocyte cDNA library using RIPK4 as a bait with large scale yeast-two hybrid method and found transcription factor PLAGL2 as a RIPK4 interacting partner. This interaction has been confirmed both in yeast with a small-scale yeast-two hybrid assay and in human cell lines with different protein-protein interaction methods. Interaction between RIPK4 and PLAGL2 and transcriptional regulation of PLAGL2 by p63 similar to RIPK4, revealed the hypothesis that PLAGL2, like RIPK4, has a role in keratinocytes. The studies so far have mainly focused on defining the role of PLAGL2 in carcinogenesis. There is no study in the literature showing the role of PLAGL2 in keratinocytes. In this context, our thesis aims to investigate whether PLAGL2 has a role in basic cellular functions in keratinocytes. For this purpose as a first step, *PLAGL2* expression was silenced in the HaCaT keratinocyte cell line by using CRISPR/Cas9n gene editing system. Afterwards, *PLAGL2* knock-out cells were analyzed in terms of basic cellular functions including morphology, growth rate, cell cycle, migration and cell death. We also investigated the WNT/ β -catenin signaling pathway in these cells, which has been demonstrated to be controlled by PLAGL2 in different cell types. In conclusion, silencing of *PLAGL2* did not cause any change in the cell cycle in keratinocytes, but increased cell death and cell migration significantly. Morphological examination of knock-out cells revealed increased cell size and cell migration associated filopod structures. In addition, WNT/ β -catenin signaling pathway activity was down-regulated in *PLAGL2* knock-out cells compared to control. Our results provide clues that PLAGL2 may have a role in skin development.

Keywords: CRISPR/Cas9n, Epidermal development, Gene knock-out, HaCaT, PLAGL2

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Derinin en dış tabakasını oluşturan ve çok katmanlı yassı epitel bir doku olan epidermis, dış çevreye karşı koruyucu bir bariyer görevi görür. Bu bariyerin devamlılığı için epidermisin sürekli olarak yenilenmesi gerekir. Epidermisin oluşumu ve yenilenmesi bazal katmanda bulunan keratinosit kök hücreleriyle sağlanır. Bu kök hücreler, bir alt katman olan dermisten gelen sinyaller doğrultusunda bölünür. Bölünen yavru kök hücreler arasından bazal katmandan ayrılıp yukarı doğru hareket edenler yolculukları esnasında farklılaşarak derinin farklı katmanlarını oluşturur (1). Epidermal ya da keratinosit farklılaşması birçok farklı genin, epidermisin farklı katmanlarında, doğru zamanda ve miktarda ifade edilmesiyle düzenlenen karmaşık bir süreçtir. Keratinositlerin çoğalması, farklılaşması ve ölümü arasında “epidermal homeostazis” olarak adlandırılan hassas bir denge vardır (2, 3). Epidermal homeostazisin bozulması anomalilere ve hastalıklara neden olur (4). Bu nedenle, epidermal homeostazis sürecinde düzenleyici rolü olan proteinlerin fonksiyonlarının araştırılması, derinin de içinde bulunduğu epidermal kaynaklı gelişimsel ve patolojik hastalıkların moleküler mekanizmasının aydınlatılması, sonrasında bu hastalıklara karşı tanı ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine sağlayacağı katkıdan ötürü oldukça önemlidir.

Hikayemizin başlangıcı niteliğinde olan Anabilim dalımızdaki ilk çalışma, şiddetli ektodermal gelişim bozukluğuyla karakterize otozomal resesif bir hastalık olan Bartsocas Papas Sendromu (BPS) ile (OMIM-263650), keratinosit farklılaşmasında rolü bilinen reseptör etkileşimli serin/treonin protein kinaz 4’ün (RIPK4) ilişkilendirilmesine yönelik olmuştur. Söz konusu çalışmada, genetik haritalama analiziyle RIPK4 proteinin kinaz domainindeki BPS’e neden olan patojenik varyasyonlar belirlenmiş ve bu varyasyonların proteinin kinaz aktivitesini olumsuz etkilediği gösterilmiştir (5).

Epidermal farklılaşma ve homeostazis sürecinde kritik bir rolü olduğu sonrasında da farklı çalışmalarla gösterilen RIPK4’ün epidermal farklılaşmadaki rolünün mekanizmasının anlaşılmasına yönelik anabilim dalımız bünyesinde tez danışmanım Doç. Dr. Tuba DİNÇER’in yürüttüğü Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinasyon Birimi tarafından desteklenen 9749 No’lu bir proje kapsamında (KTÜ BAP 9749), RIPK4 proteinin kinaz domaini yem olarak kullanılarak insan keratinosit cDNA kütüphanesinin tarandığı büyük ölçekli maya ikili-hibrit çalışması gerçekleştirilmiş, epidermisin bazal tabaka markörü olan KRT14 ve bir transkripsiyon faktörü olan PLAGL2’nin de arasında bulunduğu 16 adet farklı proteinin RIPK4’le etkileştiği ön verisine ulaşılmıştır. Maya ikili-hibrit taramasından elde edilen etkileşim verilerini doğrulamak amacıyla bölümümüzde

gerçekleşen yüksek lisans ve doktora tez çalışmaları kapsamında RIPK4-KRT14 (6) ve RIPK4-PLAGL2 (7) etkileşimleri memeli hücrelerinde detaylı olarak analiz edilmiş ve doğrulanmıştır. KRT14'ün RIPK4'le etkileşiminin detaylı olarak araştırıldığı doktora tez çalışması yayına dönüştürülmüştür (8). Doğrulan RIPK4-PLAGL2 etkileşimini fonksiyonel olarak anlamlandırmak adına, ilk etapta literatürde daha evvel deri gelişimi ve farklılaşmasıyla hiçbir şekilde bağlantısı gösterilmemiş olan PLAGL2'nin epidermal farklılaşmasındaki rolünün araştırılmasına yönelik adım atılmış ve bu kapsamda Doç. Dr. Tuba DİNÇER'in yürütücülüğünde 118Z124 No'lu "*PLAGL2'nin Epidermal Farklılaşmadaki Rolü*" başlıklı TÜBİTAK 1001 projesi gerçekleştirilmiştir. Söz konusu proje kapsamında hem *RIPK4* hem de *PLAGL2*'nin yok edildiği ve fazladan üretildiği keratinosit hücrelerinde, epidermal farklılaşma sürecinde gen ekspresyonu analiz edilmiştir. Tez çalışmamız, bahse konu TÜBİTAK projesinin üçüncü iş paketi olan *PLAGL2* ekspresyonunun CRISPR/Cas9n ile susturulmasına yönelik kısmını içermekle birlikte çalışmamızda ilave olarak PLAGL2'nin knock-out edildiği hücrelerin hücre morfolojisi ve fonksiyonları açısından analiz edilmesi yer almaktadır.

Bu bağlamda tez çalışmamızla amaçlanan daha evvel keratinositlerde fonksiyonu araştırılmamış PLAGL2 transkripsiyon faktörünün keratinosit hücrelerinde (HaCaT) susturulmasının hücre üzerindeki etkilerini analiz etmektir. Bu amaca yönelik hedeflerimiz ise *PLAGL2*'nin CRISPR/Cas9n tekniğiyle kalıcı olarak susturulması ve oluşan *PLAGL2* knock-out keratinosit hücre hattının hücre morfolojisi, bölünme hızı, hücre döngüsü, hücre ölümü, hücre hareketi ve hücre sinyali açısından incelenerek araştırılmasıdır. Çalışmamız sonucunda elde edilen bulgular PLAGL2'nin keratinosit hücre hattındaki fonksiyonu üzerine önemli ipuçları vererek PLAGL2'nin epidermal farklılaşma ve homeostazisi üzerindeki rolüne ışık tutacaktır.

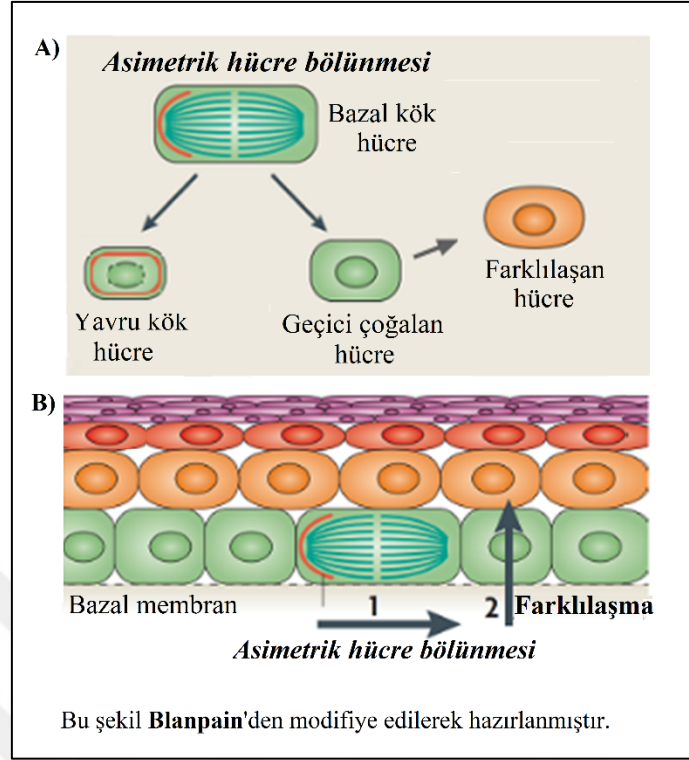
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Deri

Dış çevreye karşı koruyucu bir bariyer oluşturarak patojenlere, mekanik ve kimyasal travmalara, UV ışığına karşı koruma sağlayan, vücudun su ve ısı dengelerini düzenleyen, deri, insan vücudunun en büyük organıdır (9). Mezodermden köken alan dermis ve hipodermis, ektodermden köken alan epidermisden oluşur. Derinin en alt katmanı dermisin altında bulunan hipodermistir. Hipodermis, yoğun bir yağ katmanının yanı sıra dermise de uzanan kıl folikülleri, duyu nöronları ve kan damarları içerir. Epidermisle subkutan adiposit tabaka arasında yerleşik dermis, derinin en kalın tabakasıdır. Dermis; elastin ve kolajen fiberlerini, fibroblastları, kıl foliküllerini, yağ bezlerini, kan damarlarını, bağışıklık sisteminin fagositik hücrelerini ve dokunma, sıcak-soğuk ve ağrı gibi spesifik uyarılara cevap veren duyu nöronlarını bünyesinde bulundurur. Bu sayede dermis deriye elastiklik kazandırır, vücudun ısını kontrol eder, deriyi nemli tutar, dıştan gelen uyarıların algılanmasını ve patojenlere karşı korunmayı sağlar. Derinin, koruyucu fiziksel bariyer özelliği alttan yukarı doğru sıralanan bazal, spinoz, granüler ve korneosit tabakalardan oluşan çok katmanlı epidermisle sağlanır. Epidermis aynı zamanda derinin yenilenmesi ve cilt renginin oluşmasından da sorumludur (9-12).

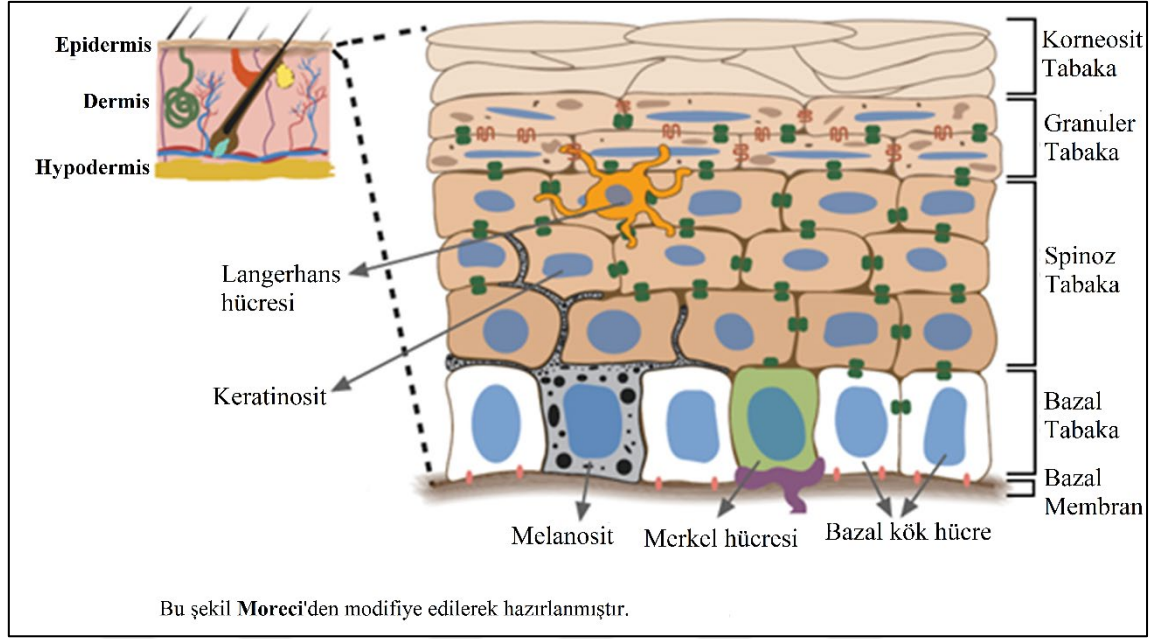
2.2. Epidermis ve Keratinosit Farklılaşması

Yassı epitel hücrelerin oluşturduğu çok katmanlı yapıya sahip olan epidermis memeli derisinin en dış yüzeyini oluşturmaktadır. Epidermis, vücudun sıvı kaybını önlemesinin yanı sıra, dışarıdan gelen her türlü çevresel stres ve patojene karşı koruyucu bir bariyer görevi görür (9). Derideki bariyerin embriyogenez sırasında düzgün bir şekilde oluşturulması ve homeostazisi sırasında korunması sağkalım için çok önemlidir. Epidermis, dış etkenlere maruz kalıp yıprandığı için sürekli olarak kendini yenilemesi gerekir. Epidermisin kendini yenilemesi, en alt bazal katmanda bulunan keratinosit kök hücrelerinin çoğalması ve farklılaşması ile mümkündür. Dermis katmanından gelen sinyallere cevap veren bu kök hücreler, asimetric hücre bölünmesine uğrayarak yavru kök hücrelere ve sınırlı bölünme kapasitesine sahip geçici çoğalan hücrelere dönüşür (Şekil 1A). Yavru kök hücreler bazal membrandaki kök hücre havuzunu oluştururken, geçici çoğalan hücreler bazal membranda birkaç hücre bölünmesi daha geçirerek hücre döngüsünden ayrılır ve yukarıya doğru hareket ederek farklılaşmaya başlarlar (Şekil 1B) (13).



Şekil 1. Epidermin yenilenmesi sırasında asimetrik kök hücre bölünmesi. **A)** Bölünme sonrasında oluşan hücre tipleri. **B)** Bölünme ve farklılaşma yönü (Blanpain'den, 13).

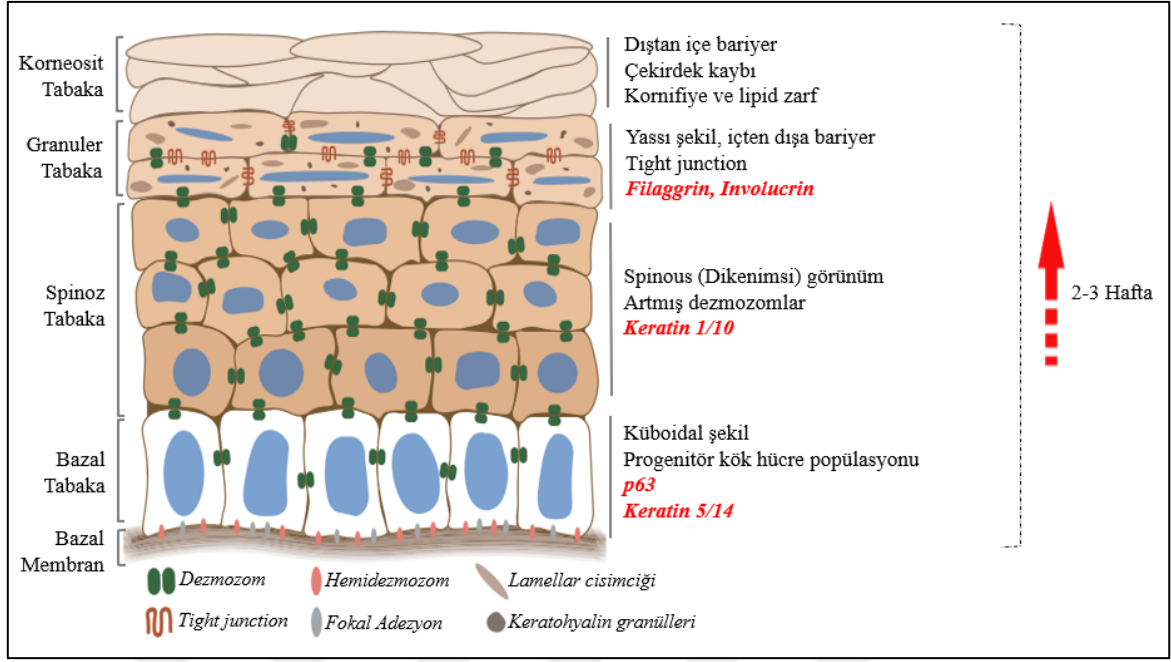
Epiderminin %90'ı keratinositlerden oluşurken bu katmanda ayrıca epidermise özel melanositler, Langerhans hücreleri ve Merkel hücreleri de bulunur (14). Bazal katmanda yerleşik melanosit hücreleri melanin pigmenti üreterek cildi ultraviyole ışınlarının zararlarından korur ve derinin renk tonunu belirler (15). Dermisten gelen sinir uçlarıyla etkileşen Merkel hücreleri dokunma duyusundan sorumludur. Langerhans hücreleri makrofajların epidermiste yerleşik tipleridir ve patojenleri yok etme ve kazanılmış bağışıklık sistemini aktifleştirmekten sorumludur (Şekil 2) (12).



Şekil 2. Epidermisi oluşturan katmanlar ve hücre içeriği (Moreci'den,12)

Epiderminin en altında bulunan ve bölünme özelliğiyle öne çıkan keratinosit öncül hücrelerinin oluşturduğu bazal katmanı aşağıdan yukarı doğru sırasıyla spinoz tabaka, granüler tabaka ve farklılaşmasını tamamlamış, çekirdeği olmayan ölü korneosit tabaka izler. Bazal tabakanın üzerindeki bu katmanların tamamı supra-bazal katman olarak da ifade edilir. Bu katmanlardaki hücreler farklı morfolojik özelliklere ve biyokimyasal içeriklere sahiptir. Bazal tabakadaki kök hücreler birbirlerine dezmozom ve adherens bağlantılarıyla, bazal membrana ise hemidezmozom ve fokal adezyon bağlantılarıyla tutunurlar. Bu bağlantılarla hücreler sütun biçimde tek sıra halinde bazal membrana dizilirler (13). Dezmozomlar, Desmoglein 3 aracılığıyla hücre içi keratinleri birbirine bağlayarak mekanik bütünlüğü sağlarken, adherens bağlantılar E-kaderin-katenin etkileşimleri aracılığıyla kavşak noktalarını aktin hücre iskeletine bağlayarak hücre-hücre bağlantılarını oluşturur. Hücre-hücre dışı matriks bağlantılarından sorumlu hemidezmozomlar integrin $\alpha 6\text{-}\beta 4$ aracılığıyla sitoplazmadaki keratinleri hücre dışı matrikse bağlarken, fokal adezyonlar integrin $\beta 1$ aracılığıyla hücre içi aktin iskeletini hücre dışı matrikse bağlar. Özellikle integrin aracılığıyla hücreye hücre dışı matriks üzerinden iletilen sinyaller, bazal kök hücrelerin proliferatif aktivitesinin sürdürülmesi ve polaritelerinin oluşturulması için gereklidir (12). Bazal laminaya yerleşik hücreler, keratin 5 ve 14'ü ifade ederler. Farklılaşma başladığında bazal hücreler integrin temelli adezyonlarını ve proliferatif özelliklerini kaybederek spinoz katmana geçiş yapar. Spinoz katmanda keratin 5 ve 14 ekspresyonu azalmaya başlarken,

diğer bir keratin çifti olan keratin 1 ve 10 ekspresyonu artar. Ayrıca artan hücre-hücre bağlantılarından dolayı spinoz katmandaki keratinosit hücreleri yassı ve geniş bir görünüm alır. Spinoz katmanın üst kısımlarındaki keratinositler involukrin ve transglutaminaz enzimini eksprese etmeye başlar. İnvolukrin ve transglutaminaz keratinosit farklılaşmasının sonraki aşamalarında epidermisin en üst katmanında sıvı geçirmez bariyer görevi gören korneosit hücre zarının oluşumuna katkı sağlar. Spinoz katmanda, daha önceden oluşmuş olan dezmozomal hücre-hücre bağlantıları epidermal bariyer oluşumunda son derece önemli olan sıkı bağlantılar ile desteklenir. Sıkı bağlantılar hücrelerin daha yassı bir yapı oluşturmasını sağlarken hücrelere içten dışa bariyer fonksiyonu kazandırarak sıvı kaybının önlenmesini sağlar. Spinoz tabakanın üstündeki granüler tabakadaki keratinosit hücrelerde bu tabakaya ismini veren filagrince zengin keratohyalin granülleri ve çift katmanlı lipid içeren lamellar granüller bulunur. Bu katmanda hücreler glutamin ve lizince zengin lorikrin ve involukrin proteinlerini üretirler. Farklılaşmanın son aşaması keratinositlerin çekirdeğini kaybetmesi ve içerdiği çapraz protein ve lipid bağlantılarıyla bariyer özelliği artmış kornifikasyon denilen ölü korneositlere dönüşme sürecidir (16). Korneositlere özgü bu ölüm, granüler katmanla korneositler arasında üretilen deriye özgü bir kaspaz olan kaspaz 14'ün aktivasyonu ile tetiklenir. Kalsiyumun hücre içine akışıyla aktive olan transglutaminazlar lorikrin ve involukrin proteinlerinin glutamin ve lizin kalıntılarından çapraz bağlar oluşturulmasını sağlar. Çapraz bağlantılar kuran bu proteinler korneosit katmana özgü plazma zarının sitoplazmik kısmına yerleşerek korneosit zarının oluşmasına katkıda bulunurlar (17). Bu esnada keratohyalin granüllerinden salgılanan filagrin, keratin filamanlarına bağlanarak agregatlar oluşturur ve korneodezmosomların yapılanmasını sağlayarak korneositleri birbirine bağlar. Ayrıca, filagrin korneosit zarının %80'nini oluşturan lorikrine çapraz bağlanarak korneosit zarının stabilize olmasına katkıda bulunur. Farklılaşmanın son aşamasında lamellar granüllerdeki lipidler korneositlerin dışına salınarak tuğla etrafındaki harç gibi korneositleri sarar, böylece son katmanın bariyer özelliği sağlanır. Ölü korneositlerin dökülmesiyle alttan farklılaşarak gelen yeni keratinositlere yer açılır. Bazal tabakadaki keratinositlerin korneositlere farklılaşma süresi iki-üç hafta kadar sürer (Şekil 3) (16).



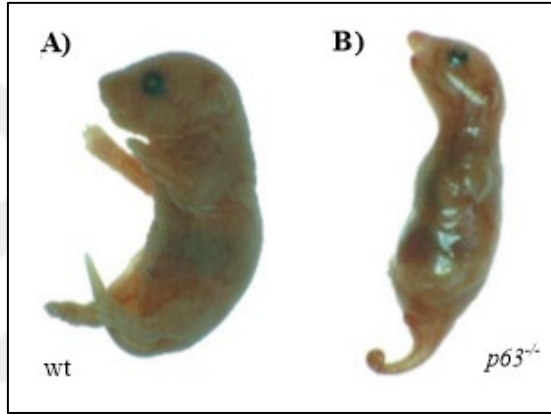
Şekil 3. Keratinosit farklılaşması boyunca meydana gelen değişimler (Moreci'den,12)

2.3. Epidermal Homeostazi

Epidermal farklılaşma ya da keratinosit farklılaşma süreci farklı genlerin farklı kombinasyonla, farklı katmanlarda ifade edilmesini ve düzenlenmesini gerektiren karmaşık bir süreçtir. Epidermin yenilenmesi esnasında keratinositlerin çoğalması, farklılaşmaları ve ölümü arasında “epidermal homeostasis” olarak bilinen hassas bir denge vardır. Homeostazinin bozulması ciddi deri ve epidermal gelişim bozukluklarına bağlı konjenital anomalilerle sonuçlanır (4, 13).

Epidermal homeostazi; WNT, TGF- β /Smad, NOTCH, NF- κ β , Hedgehog ve PI3K/mTOR sinyal yolları gibi gelişimde önemli olan çeşitli yollar tarafından düzenlenir (18-24). Epidermal homeostaziye düzenleyen sinyal yolları tümör baskılayıcı p53 ailesinin bir üyesi olan epidermal farklılaşmanın temel düzenleyicisi transkripsiyon faktör p63 (TP63) üzerinde kesirirler (25-27). p63, gelişim boyunca epidermal farklılaşma programını koordine ettiği gibi olgun epidermiste bazal katmanda sınırlı kalarak öncül kök hücrelerin hücre-yüzey adezyon bağlantılarını düzenler, onları apoptozdan korur ve devamlılıklarını sağlar (Şekil 3) (28-31). Epitelyal kök hücrelerin kök hücre devamlılığının sağlanmasında p63'ün WNT/ β -katenin, NOTCH ve Hedgehog sinyal yollarını düzenleyerek süreci kontrol ettiği gösterilmiştir (32).

Epidermal farklılaşmayı düzenleyen transkripsiyon faktör p63'ün birbirinden farklı kırılma (splicing) formları vardır. Bunlardan ilki trans-aktivasyon domainine sahip olan TAp63 formudur. Diğerleri ise kırılma sonrası alternatif trans-aktivasyon domaini oluşabileceği gösterilen $\Delta Np63\alpha$, β , γ formlarıdır. Bu formlardan $\Delta Np63\alpha$ izoformu epidermal gelişimin erken aşamasında ekspres olan ve olgun epidermisin proliferatif özelliğe sahip bazal tabakasında bulunan baskın p63 formudur (33, 34). p63'ün knock-out edildiği transgenik farelerin, kafa ve yüzlerinde meydana gelen anormalliklerin yanı sıra epidermisin neredeyse oluşmadığı, kolların gelişmediği ve şiddetli gelişimsel kusurları olan farelerin doğumu takiben öldüğü gösterilmiştir (Resim 1) (35).



Resim 1. $p63^{-/-}$ farenin fenotipi. **A)** $p63$ yabanıl tip. **B)** $p63^{-/-}$ mutant fare (Mills'den, 35)

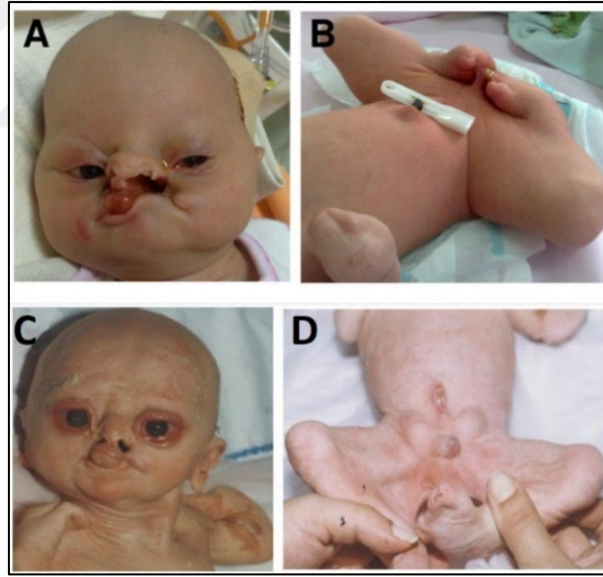
Homeostatik dengede kritik rolü olan p63'ün üzerinde meydana gelen varyasyonlar nedeniyle, insanlarda da epitel ilişkili yapıların şiddetle etkilendiği ektodermal displazi, yarık dudak/damak anomalileri ve el, ayak malformasyonlarına neden olduğu farklı klinik vakalar bildirilmiştir (36-41).

Epidermal farklılaşma sürecini koordine eden p63'ün etkileşimde bulunduğu ağın tanımlanması amacıyla p63 tarafından kontrol edilen hedef genler ve düzenleyici elementler belirlenerek tüm genomda p63'ün bağlandığı konsensüs DNA dizileri ve bu dizilere sahip genler araştırılmıştır (42). p63'ün gen düzenleyici elemanlarına bağlandığı gösterilen genler arasında ciddi epidermal gelişim bozukluklarıyla karakterize Bartsocas Papas Sendromuyla (OMIM: 263650) ilişkilendirilen *RIPK4* geni de bulunmaktadır. p63'ün *RIPK4*'ün promotörüne bağlanarak ekspresyonunu aktive ettiği *in-vivo* koşullarda da gösterilmiştir (43).

2.4. Ektodermal Gelişim Bozuklukları: Bartsocas Papas Sendromu

Klinik ve genetik açıdan heterojen olan pterygium sendromları (PS), popliteal pterygium (dirsek ve dizlerde ağsı yapı) ve ektodermal yapısal anomalilerle karakterize nadir görülen konjenital bozukluklardır. Bu sendromların arasında en iyi bilineni otozomal dominant olan Popliteal Pterygium Sendromudur (PPS) (44). PS'nin otozomal dominant formu olan PPS'den daha şiddetli fenotip gösteren otozomal resesif ölümcül Bartsocas-Papas sendromu (BPS), PS'nin yanı sıra ağızda telsi bantlar, yapışık göz kapağı, yarık damak/dudak ve oral boşlukta darlık, el/ayak parmakları arasında perde, kol/bacak anomalileri, kaş, kirpik ve tırnak eksikliği ile karakterize edilmiştir. BPS vakalarının çoğu ya doğum öncesi dönemde ya da yenidoğan döneminde ölmektedir (45-54).

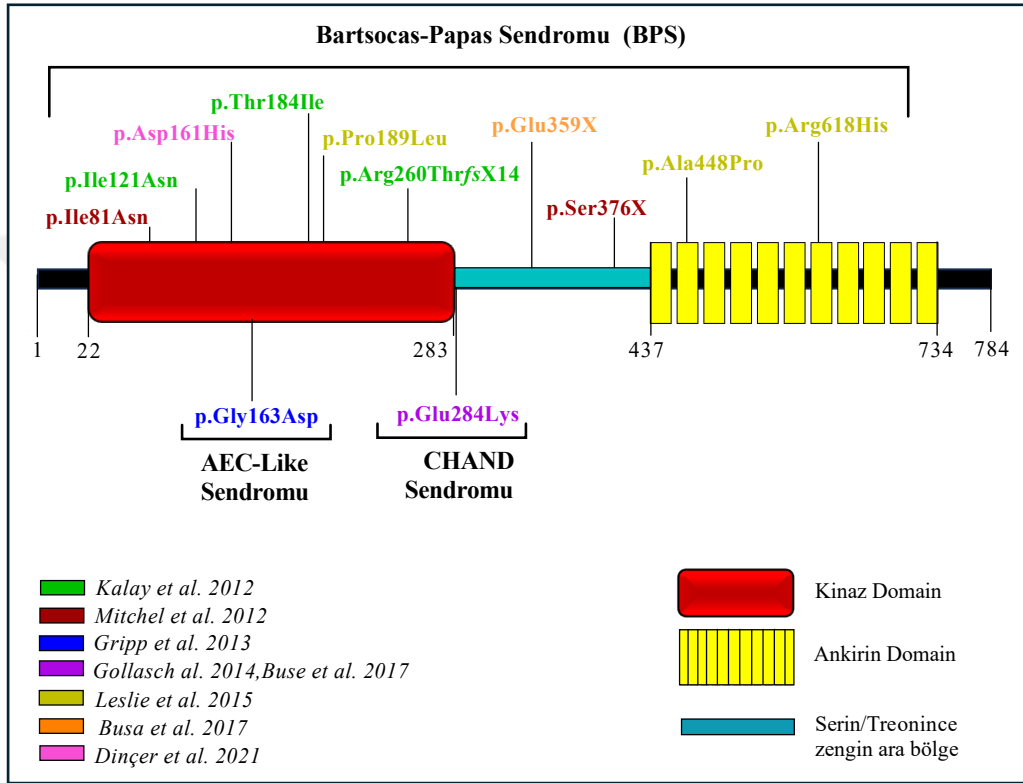
2010 yılında Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalımız bünyesinde Bartsocas Papas sendromuna sahip ailelerde yapılan genetik haritalama analizleri sonucunda *RIPK4* Bartsocas Papas sendromuyla ilişkilendirilmiştir (Resim 2) (5).



Resim 2. *RIPK4* homozigot varyasyona sahip BPS hastalarının klinik karakterizasyonu. **A-B)** Popliteal pterygium fenotipi sergileyen birinci aileye ait hasta birey. **C-D)** Popliteal pterygium fenotipi sergileyen ikinci aileye ait hasta birey (Kalay'dan, 5)

RIPK4 üzerinde dördü bölümümüzde olmak üzere toplam 12 farklı varyasyon ektodermal gelişim anomalileriyle karakterize sendromlar ile ilişkilendirilmiştir (55). *RIPK4* proteinin kinaz domaini üzerinde altı, linker bölgesinde bir ve ankirin domaini üzerinde bir adet olmak üzere toplamda on varyasyon BPS ile ilişkilendirilmiştir (5, 43, 44, 55). Bunlara

ilaveten, RIPK4'ün kinaz domaininde bulunan iki adet patojenik varyasyon AEC (OMIM: 106260) ve CHAND (OMIM: 214350) sendromları ile ilişkilendirilmiştir. CHAND ve AEC sendromları BPS'ye göre oldukça hafif seyrederken yapışık göz kapağı, dişlerle ilgili anomaliler ve malformasyonlar, saç oluşumunda yetersizlikler (seyrek/kırılğan/oluşmama) gibi ektodermal displazi grubu fenotiplere neden olur (Şekil 4) (56-58).



Şekil 4. RIPK4 üzerindeki varyasyonlar ve ilişkilendirildiği semptomların şematik gösterimi (Dinçer'den, 55)

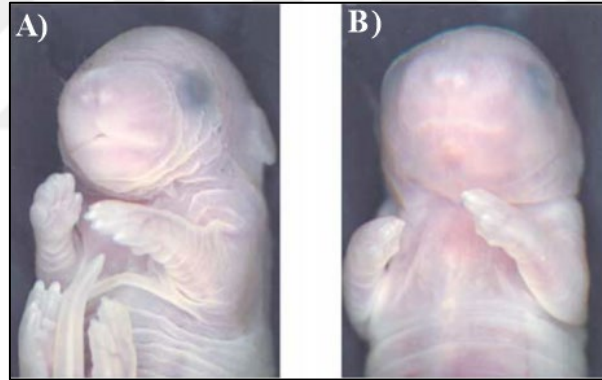
2.5. RIPK4 ve Keratinosit Farklılaşmasındaki Rolü

Epidermal farklılaşmanın ana regülatörü p63'ün hedefi olan RIPK4, ilk kez 2000 yılında Protein kinaz C delta'nın yem olarak kullanıldığı bir maya ikili-hibrit çalışması sonucunda tanımlanmış ve bu etkileşimden dolayı PKC delta-interacting protein kinaz (DIK) olarak adlandırılmıştır (59). Maya ikili-hibrit taramasının yapıldığı başka bir çalışmada DIK'in farklı bir PKC izoformu olan PKC β ile etkileştiği gösterilmiş ve bu etkileşime bağlı olarak PKK-iliskili kinaz olarak isimlendirilmiştir (60). Hemen takibinde *Meylan ve ark.* 2002 yılında yaptıkları bir çalışma ile bu proteinin reseptörle etkileşen protein kinaz (RIP)

ailesi üyelerinden biri olduğu gösterilmiş ve RIP4 olarak adlandırılmıştır (61). Bundan sonraki birçok çalışmada RIPK4 olarak ifade edilmiştir.

RIPK4, 87 kDa moleküler ağırlığında ve 784 amino asitten oluşan bir proteindir. Amino (N-term) ucunda ser/thr kinaz domaini bulunurken karboksil ucunda (C-term) 11 adet ankirin tekrarı bulunur. Bu bölgeler arasında ise ser/thr kalıntıları bakımından zengin bir ara bölgeye (linker) sahiptir (Şekil 4) (62).

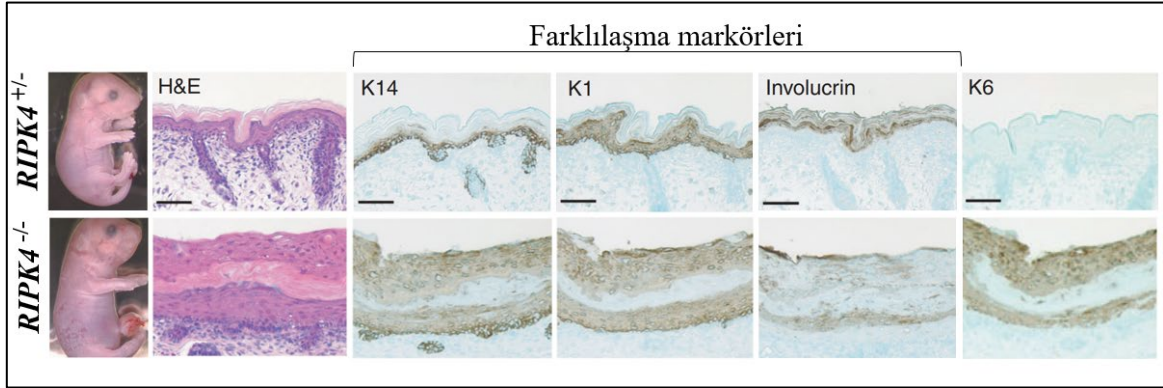
RIPK4'ün *in-vivo* fonksiyonunu belirlemeye yönelik yapılan bir çalışmada *RIPK4* knock-out farelerde (*RIPK4*^{-/-}) BPS fenotipine benzer özellikler görülmüştür. Bu farelerde şiddetli deri kusurlarının olduğu, yabanıl tip farelerle kıyaslandığında derilerin kıvrımsı yapılarının oldukça azaldığı, kuyruğun kısaldığı ve arka bacakların vücutla birleştiği, burun, ağız, özofagus, anüs gibi vücut deliklerinin oluşmadığı gözlenmiştir. Oluşamayan oral boşluklardan dolayı *RIPK4*^{-/-} farelerin nefes alamayıp doğum sonrası kısa bir süre içinde öldükleri rapor edilmiştir (Resim 3) (63, 64).



Resim 3. *RIPK4*^{-/-} farenin fenotipi. **A)** *RIPK4* yabanıl tip. **B)** *RIPK4*^{-/-} mutant fare (Holland'dan, 63)

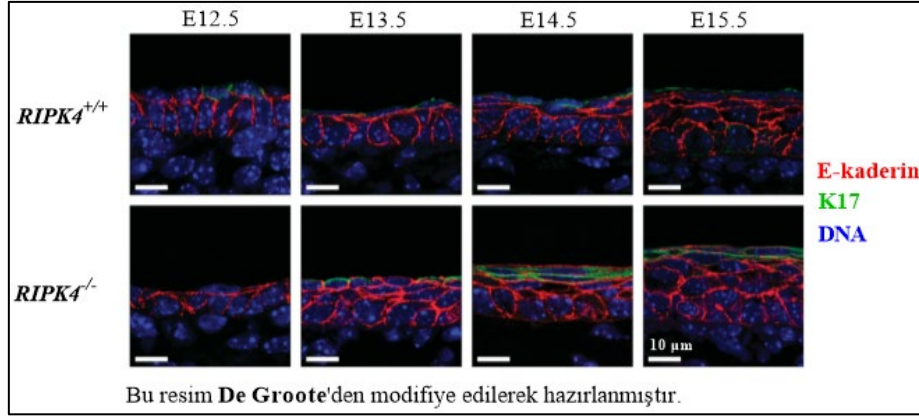
RIPK4'ün özellikle deri gelişimindeki rolünün araştırıldığı farklı çalışmalarda, *RIPK4*^{-/-} farelerin derisinde keratinosit farklılaşmasının gerçekleşmediği, alt katmanlara ait farklılaşma belirteci KRT14'ün üst katmanlarda daha fazla ifade edildiği, spinoz tabakada ifade edilen K1 proteinin tüm katmanlarda ifade edildiği, granüler tabaka markörü olan involukrin'in (IVL) beklenenden daha alt katmanlarda görüldüğü, normalde hiç ifade edilmeyen K6 proteinin ifadesinin katmanlar arasında dağıldığı, bunlardan ötürü spinüler ve granüler katmanların kalınlaştığı, çok katlı yassı keratinize epitel tabakasındaki korneositlerin çekirdeklerini tutmaya devam ederek parakeratotik olarak adlandırılan

fenotipe neden olduğu gösterilmiştir. Bu durum keratinositlerin aşırı proliferasyonundan ziyade keratinosit farklılaşma mekanizmasındaki bozukluklar ile açıklanmıştır (Resim 4) (65, 66).



Resim 4. *RIPK4*^{+/+} ve *RIPK4*^{-/-} fare deri karşılaştırmaları (Rountree'den, 64)

Ayrıca, RIPK4'ün özellikle keratinosit farklılaşma üzerindeki etkisini detaylı olarak incelemek amacıyla RIPK4'ün sadece keratinositlerde susturulduğu kondisyonel RIPK4 knock-out fareler (*RIPK4*^{EKO}) oluşturulmuştur. Bu farelerin derisinde yapılan detaylı analizler sonucunda granüler tabakada yer alan ve koruyucu bariyer görevi için gerekli olan hücre-hücre sıkı bağlantıların ve korneositlere özgül lipid yapılanmasının bozulduğu bundan dolayı derinin içten-dışa bariyer özeliğinin kaybolduğu gösterilmiştir (66). Ayrıca, RIPK4 knock-out farelerde, embriyogenez sırasında gelişmekte olan epidermisin üzerini alttan gelen keratinositler farklılaşıp korneositlere dönüşene kadar geçici olarak kaplayan ince tabakalı peridermin kaybolmadığı, supra-bazal katmanda bulunan hücrelerde, hücre-hücre yan (lateral) bağlantılarda bulunan E-kaderin proteininin bu konumdan ayrılıp hücre yüzeyine (apikal) yerleştiği gösterilmiştir (Resim 5). *RIPK4*^{-/-} farelerin deri hücrelerinde görülen anormal E-kaderin yerleşiminin epitel füzyona neden olarak fare ve insanda RIPK4 eksikliğinde meydana gelen, vücut boşluklarının yapışması ve pterygium oluşumuyla ilişkilendirilmiştir (65, 66).



Resim 5. *RIPK4*^{-/-} farelerin deri gelişiminde E-kaderin ve Keratin 17 proteinlerinin yerleşimi. Kırmızı: E-kaderin, hücre-hücre bağlantısı markörü. Yeşil: Keratin 17, periderm markörü (De Groote'den, 65)

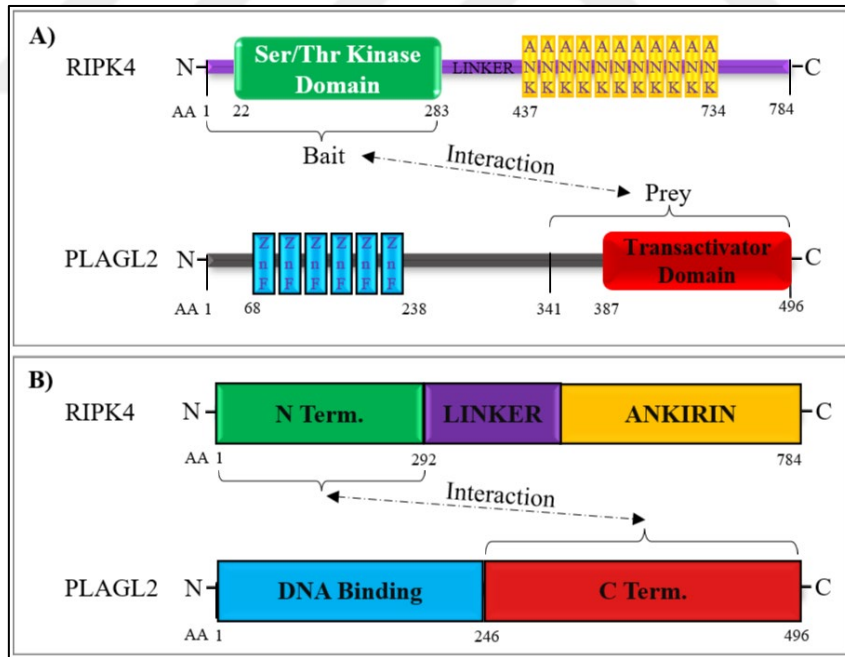
RIPK4'ün fonksiyonunu tanımlamak üzere etkileşimde olduğu diğer proteinler araştırılmıştır. Bugüne değin yapılan çalışmalarda RIPK4'ün KRT14 (8), IRF6 (67), DVL2 (68), PKC δ ve β (60), PKP1 (69), IL-6 (70), IKK α /IKK β (71), MEKK2 ve 3 (72), STAT3 (73), A20 (74), SCF β -TrCP (75) ve cIAP1/2 (76) proteinleri ile etkileştiği gösterilmiştir.

Gelişim biyolojisinde farklı sinyal yolları oldukça hassas bir düzenleme ile organizmanın gelişimini kontrol eder. RIPK4'ün etkileşim partnerlerinden KRT14 ve IRF6'nın epidermal farklılaşmanın düzenlenmesinde rol aldığı gösterilmiştir (8, 67). RIPK4'ün A20 ve DVL2 proteinleri ile etkileşime girerek epidermal farklılaşma ve homeostazdaki rolü bilinen Wnt/ β -katenin sinyal yolağını sırasıyla negatif ve pozitif olarak etkilemesi, bu yolaktaki düzenleyici rolüne işaret etmektedir (68, 74). Dahası RIPK4'ün PKC- β , MEKK2/3, cIAP1/2, IKK α /IKK β ve TRAF proteinleriyle etkileşime girerek, NF- κ B yolağını aktive ettiği gösterilmiştir (61, 68, 71, 76, 77). RIPK4, PKP1 ile etkileşerek MAPK yolağını baskılamaktadır (69). RIPK4'ün kendisiyle etkileşime girerek kinaz domaini aracılığıyla kendisini fosforilleştiği gösterilmiştir (61, 75). Fosforillenmiş RIPK4'ün ubiquitin ligaz olarak bilinen SCF β ^{TrCP} ile etkileşimde bulunması, keratinosit hücre hareketi ve iskeletin düzenlenmesi ile ilişkilendirilmiştir (75). Yara iyileşme sürecinde TNF, IL-1 ve TGF β gibi sitokinler RIPK4'ün ifadesini baskılamaktadır (61). Bununla birlikte, RIPK4'ün TGF- β sinyal yolağını baskıladığı grubumuz tarafından gösterilmiştir (78).

RIPK4'ün etkileşimde bulunduğu diğer proteinlerin belirlenmesi ve epidermal farklılaşmadaki rolünün moleküler seviyede anlaşılmasına katkı sağlamak adına Anabilim Dalımız öğretim üyesi Doç. Dr. Tuba DİNÇER tarafından RIPK4'ün kinaz domaininin yem

olarak kullanıldığı büyük ölçekli maya ikili-hibrit yaklaşımı ile insan keratinosit kütüphanesi taranmış ve 16 adet farklı proteinin RIPK4 ile etkileştiği bulunmuştur (yayınlanmamış veri).

Maya ikili-hibrit sonucunda RIPK4'le en iyi etkileşim skorunu bir çinko parmak transkripsiyon faktörü olan Pleomorfik Adenom Gen Benzeri 2 (PLAGL2) vermiştir. İlk kez bölümümüzde maya ikili-hibrit yöntemiyle gösterilen RIPK4-PLAGL2 etkileşimi (Şekil 5A) (yayınlanmamış veri), bölümümüzde gerçekleştirilen bir yüksek lisans tezi kapsamında insan embriyonik böbrek hücresi olan HEK293 hücre hattında ve insan keratinosit hücre hattı olan HaCaT'larda farklı protein etkileşim yaklaşımlarından olan immünopresipitasyon ve immünofloresan yöntemleriyle araştırılmış ve iki proteinin fazladan üretildikleri HEK293 hücrelerinde ve endojen olarak bulundukları keratinositlerde özgül olarak etkileştikleri doğrulanmıştır (Şekil 5B). İlave olarak RIPK4'ün PLAGL2 ile kinaz domaini üzerinden etkileştiği ve kinaz aktivitesinin etkileşim için önemli olduğu bulunmuştur (7). Bu bulgular, PLAGL2'nin de RIPK4 gibi epidermal farklılaşmada rolü olabileceğini ve aralarındaki etkileşimin sürecin düzenlemesinde önemli olabileceğine işaret etmektedir.



Şekil 5. Mayada ve HEK293 hücrelerinde RIPK4-PLAGL2 etkileşiminin şematik olarak gösterilmesi. **A)** Büyük ölçekli maya ikili-hibrit taraması sonucunda elde edilen etkileşimin şeması. ANK: Ankirin domain, ZnF: Çinko parmak domaini. (RIPK4'ün 1-283. amino asitleri arasındaki kinaz domaini içeren bölgeyle, PLAGL2'nin 341-496. amino asitleri arasındaki trans-aktivatör domainini içeren bölgesi etkileşmiştir). **B)** HEK293 hücrelerinde immünopresipitasyon sonucu bulunan etkileşimin şeması (RIPK4'ün kinaz domainini içeren N-terminal bölgesiyle, PLAGL2'nin C-terminal bölgesi etkileşmiştir).

2.6. Pleomorfik Adenom Gen (PLAG) Ailesi

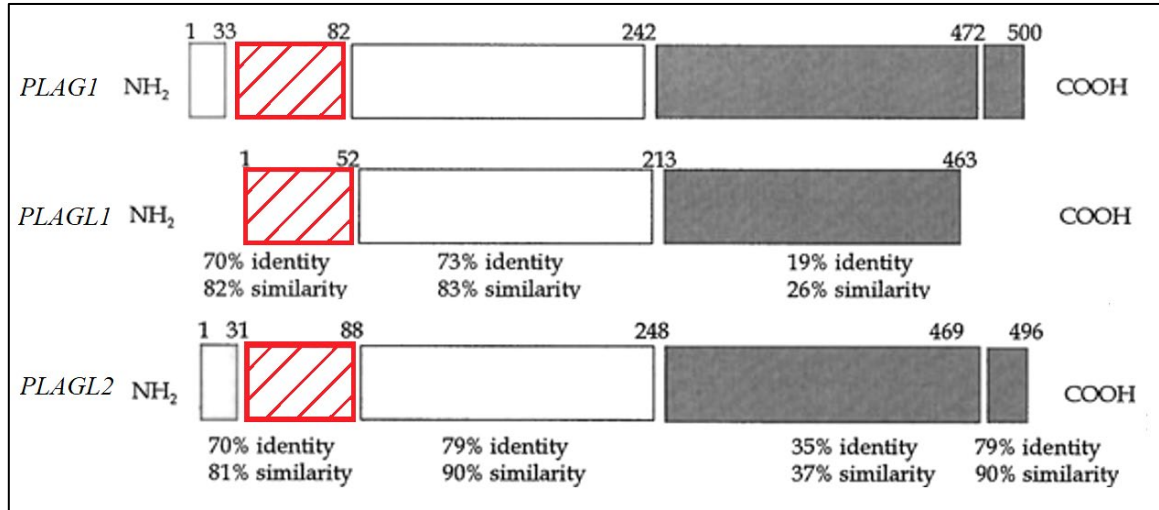
Ökaryotik canlılarda, transkripsiyon aşaması çeşitli elemanlar tarafından düzenlenir. Bu düzenleme iki şekilde gerçekleşir. Birincisi trans-etkili olarak isimlendirilen transkripsiyon faktörleri ile gerçekleştirilirken, diğeri cis-etkili olarak tanımlanan DNA üzerindeki; promotör, enhancer (arttırıcı), silencer (susturucu) gibi düzenleyici bölgeler arasındaki etkileşim ile sağlanır. Bu etkileşim aktivatörler, represörler (baskılayıcılar) ve transkripsiyon faktörleri gibi çeşitli regülatör proteinler aracılığıyla olur (79).

Ökaryotik genlerin transkripsiyonunun düzenlenmesinde görev alan proteinler grup halinde çalışarak ilgili genin doğru hücrede, doğru zamanda, ihtiyaç duyulan miktarda ifade edilmesini sağlarlar (80). Ökaryotlarda gen ifadesinin düzenlenmesi için dış çevreden gelen sinyaller doğrultusunda RNA polimeraz, regülatör proteinler (transkripsiyon faktörleri) aracılığıyla hedef gen promotörüne, DNA bağlanma bölgeleri üzerinden bağlanarak transkripsiyonu gerçekleştirir (81). Transkripsiyon faktörleri, DNA bağlanma bölgesinden farklı olarak transkripsiyonu aktive veya inhibe eden bölgeler de içerirler ve buna bağlı olarak transkripsiyon aktivatör veya baskılayıcı olarak adlandırılırlar (82). DNA bağlanma bölgelerini heliks-dönüş-heliks, bazik lösin fermuar ve çinko parmak gibi farklı domainler oluştururken, transkripsiyonu aktive eden bölgeleri 30 ile 100 amino asitlik izolösine, proline, glutamine zengin ve asidik motif kısımlardan oluşur. Transkripsiyonu inhibe eden bölgeler ise genellikle protein-protein etkileşimlerinin meydana geldiği bölgelerdir. Transkripsiyonu aktive ve inhibe eden bölgelerde bulunan amino asitler, diğeri protein ya da transkripsiyon faktörleriyle veya doğrudan doğruya RNA polimeraz ile etkileşerek transkripsiyonu aktive veya inaktive edebilirler (83, 84).

Pleomorfik adenom (PLAG) ailesi, adını tükürük bezi tümörlerinin en yaygın türü ve benign bir epitelyal tümör olan pleomorfik adenomdan almıştır (85). Adenomlar salgı bezi kökenli benign tümörlerdir (86). İçerik olarak hem epitel hem de salgı bezlerinin içinde bulunan bağ doku kökenli miyoepitelyal hücrelerden oluştuklarından dolayı pleomorfik (mixed) olarak adlandırılırlar (87). PLAG ailesi üyelerinden PLAG1, ilk defa tükürük bezlerinde tanımlanmıştır. Normalde aktif olmayan *PLAG1* promotörü, t(3;8)(p21;q12) translokasyonu sonucunda oluşan homolog olmayan parça değişimi ile güçlü bir *CTNNB1* (β -katenin) promotörü tarafından kontrol edilmeye başlanır ve bu durum tümör hücrelerinde *PLAG1*'in aşırı ifadesine yol açar (88). PLAG1'in karsinogeneizde aşırı ifadesi bir onkogen olarak rol oynadığına işaret ederken normal koşullarda da PLAG1'in, insülin benzeri büyüme

faktörü 2 (*IGF2*)’nin de içinde bulunduğu bir dizi büyüme faktörünün ekspresyonunu düzenleyerek hücre çoğalmasını teşvik ettiği bilinmektedir (89). İlave olarak, *Hensen ve ark.* tarafından *PLAG1*’in knock-out edildiği farelerde büyüme geriliği ve doğurganlığın azaldığı gösterilmiştir (90).

PLAG ailesi üyelerinin keşfi için yapılan bir çalışmada *PLAG1* ile yüksek sekans homolojisi gösteren ve N-terminalinde (amine-terminal) C_2H_2 çinko parmak motifleri kodlayan iki yeni cDNA izole edilip karakterize edilmiştir. Karakterizasyon sonucunda proteinlerin farklı kısımları arasında özdeşlik/benzerlik oranları belirlenmiş ve *PLAG1*’de çinko parmak C_2H_2 motiflerini kodlayan diziyle *PLAGL1* ve *PLAGL2*’nin aynı bölge için %70 oranında özdeş (identity), yaklaşık %80 oranında da benzerlik (similarity) olduğu tespit edilmiştir (Şekil 6) (88). Bundan ötürü *PLAG* ailesi yeni üyelerine pleomorfik adenom gen benzeri 1 (*PLAGL1*), pleomorfik adenom gen benzeri 2 (*PLAGL2*) adı verilmiş ve çinko parmak transkripsiyon faktörleri ailesine dahil edilmiştir. *PLAG1* ve *PLAGL2*’nin transkripsiyon aktivasyon kapasiteleri proteinlerin C-terminal (carboxyl-terminal) bölgeleriyle ilişkilendirilmiştir (88). Sonraki yıllarda *PLAG* transkripsiyon faktörlerinin hedef promotör bölgesinde bağlandığı konsensus dizisi GRGGC_(N)6_RGGK olarak tanımlanmıştır (91).

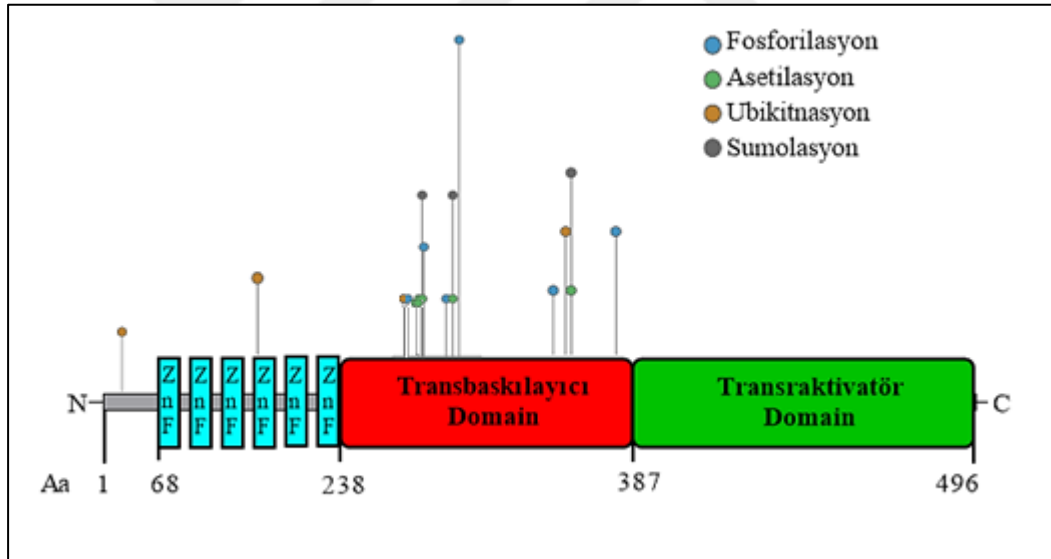


Şekil 6. *PLAGL2* ailesi. Tüm üyelerdeki çinko parmak motif bölgesi kırmızıyla belirtilmiştir. (Kas'dan, 88)

PLAG ailesinin bir diğer üyesi olan *PLAGL1*’in ise, tümör baskılayıcı olarak görev aldığı öne sürülmüştür (92-94).

2.7. PLAGL2 ve Hücresel Fonksiyonları

PLAG gen ailesinin son üyesi olan *PLAGL2* geni genomun 20q11.21 lokasyonunda bulunur. Bu genin kodladığı PLAGL2 proteini, N-terminalinde altı adet tekrarlayan C₂H₂ çinko parmak DNA bağlanma domaini, C-terminalinde trans-aktivasyon domaini ve bu iki domain arasında trans-baskılayıcı domaini bulunan, 496 amino asitten oluşan, 54 kDa ağırlığında bir transkripsiyon faktörüdür. PLAGL2'nin post-translasyonel modifikasyonunun (PTM) asetilasyon ve sumolasyon aracılığıyla düzenlendiği, trans-baskılayıcı veya transaktivatör bölgesinin aktivasyonu için PTM'lerin gerekli olduğu bildirilmiştir (95). Ayrıca bu PTM'lere ilave olarak, proteinler üzerindeki PTM'lerin gösterildiği Phosphosite veri tabanında PLAGL2'ye ait toplamda 17 adet PTM ön verisi bulunmaktadır (96). Bunlardan 15 tanesi PLAGL2'nin transbaskılayıcı domaini üzerinde, bir tanesi çinko parmak domaini üzerinde ve bir tanesi ise proteinin başlangıcında yer almaktadır (Şekil 7).



Şekil 7. PLAGL2 proteininin yapısı ve PTM'ler. Turkuaz: altı adet çinko parmak motifi (ZnF), kırmızı: transbaskılayıcı bölge, yeşil: transaktivatör bölgeyi temsil etmektedir. (Phosphosite, 96)

PLAGL2 neredeyse tüm yetişkin insan dokularında ifade edilir ve çoğunlukla hücre çekirdeğinde olmakla beraber sitoplazmada da lokalize olur (97, 98).

Bugüne değin, PLAGL2 tarafından ekspresyonu aktive edilen genler Tablo 1'de gösterilmiştir.

PLAGL2'nin aday etkileşim ortaklarından bazıları WNT sinyal yolağı ve hücre iskeleti oluşumunda görevli elemanlarken, çoğunluğu hücre proliferasyonunda rol aldığı bilinen proteinlerdir (Tablo 2). Bir proteinin fonksiyonunun anlaşılmasında etkileşim ortaklarının belirlenmesi o proteinin fonksiyonu hakkında ipuçları vermektedir (80). Bu bağlamda, PLAGL2'nin etkileşimde olduğu proteinlerin dahil olduğu süreçler PLAGL2'nin de ilgili süreçlerde fonksiyonu olabileceğine işaret eder.

Tablo 2. PLAGL2'nin etkileşim ortaklarının dahil olduğu süreçler

Proteinler	Biyolojik Süreç
DVL3	WNT sinyal yolağı bileşeni
KANK2	Hücre iskeleti oluşumunda
MAPK1	MAP kinaz yolağı bileşeni
MAD2L2	Hücre proliferasyonu
PAX9	Hücre proliferasyonu ve apoptoz
PKN1	Ser/thr protein kinaz reseptörü
NTRK3	Nörotrofik tirozin kinaz reseptörü

2.7.1. PLAGL2'nin Kanserdeki Rolü

Yapılan çalışmalarda PLAGL2'nin çeşitli kanser türlerinde ifade düzeyinin arttığı gösterilmiştir (Tablo 3).

Tablo 3. PLAGL2'nin fazladan ifadesiyle ilişkilendirilen kanser tipleri

Hastalık Tipi	Referans
Hepatoselüler karsinom	(109-112)
Yumurtalık kanseri	(113, 114)
Kolorektal kanser	(106, 115-119)
Mide kanseri	(120, 121)
Nöroblastom	(100, 107)
Multipl miyelom	(122)
Tiroid kanseri	(123)
Meme kanseri	(124, 125)
Akciğer adenokarsinomu	(126-128)
Glioma	(129)
Prostat kanseri	(130)
Akut miyeloid lösemi	(104)
Mesane kanseri	(131)

PLAGL2'nin normal şartlardaki fonksiyonundan ziyade, daha çok karsinogenezdeki rolü üzerine çalışmalar yapılmıştır. PLAGL2'nin karsinogenezde, apoptozu engelleyerek hücre çoğalmasını arttırdığı, Wnt/ β -katenin sinyal yolağı üzerinden epitel-mezenşimal geçişini indüklediği ve bu sayede hücre göçünü arttırarak kanser hücrelerine metastatik ve klonojenik özellik kazandırdığı gösterilmiştir (106, 115, 118, 129, 131, 132). Kanser-PLAGL2 bağlantısını destekler biçimde, akciğer kanseri hücrelerinde PLAGL2 ekspresyonunun arttırılmasıyla akciğer kanseri kök hücrelerinin kök hücre devamlılığını sürdürdüğü gösterilmiştir (127).

PLAGL2'nin hücre fonksiyonunun araştırıldığı, over ve meme kanseri hücre hatlarında PLAGL2'nin RhoA ve Rac1 gibi küçük guanazin trifosfatazların (GTPase) aktivitelerinin düzenleyerek aktin sitoskeletonun organizasyonu aracılığıyla hücre migrasyonunda rol aldığı gösterilmiştir (133). Ayrıca, son yıllarda yapılan çalışmalar karsinogenezle ilişkilendirilen PLAGL2 ekspresyonunun sıklıkla protein kodlamayan küçük mikroRNA'lar (miRNA) ve uzun RNA'lar (lncRNA) tarafından düzenlendiğini göstermektedir (109, 113, 116, 122, 123, 125, 126, 134, 135).

2.7.2. Normal Koşullarda PLAGL2'nin Rolü

Fizyolojik koşullarda PLAGL2'nin fonksiyonunun araştırılmasına yönelik yapılan çalışmalarda hücre tipine ve koşullarına bağlı olarak, PLAGL2'nin apoptozu düzenleyerek tümör-süpresör olarak görev aldığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Bir çalışmada Balb/c3T3 fibroblast hücrelerinde PLAGL2'nin pro-apoptotik faktör *NIP-3*'ün ekspresyonunu arttırarak apoptozu indüklediği gösterilmiştir (100). *Yang ve ark.* tarafından akciğer epitelyal hücrelerinde endoplazmik retikulum stres tetikleyici SP-C proteini üzerinden PLAGL2'nin apoptozu indüklediği rapor edilmiştir (136). İnsan çekirdek pulposus hücrelerinde (HNPC) artan apoptozun neden olduğu intervertebral disk dejenerasyonunun anlaşılmasına yönelik bir çalışmada PLAGL2'nin proapoptotik faktörler RASSF5, NIP-3 ve p73'ün ekspresyonunu arttırarak apoptozu tetiklediği gösterilmiştir (99). Sonuç olarak, PLAGL2 pro-apoptotik genlerin ekspresyonunu sağlayarak apoptozu indüklemektedir.

İlave olarak, PLAGL2'nin bağırsaklardan lipit emiliminde (137), inflamatuvar yanıtın düzenlenmesinde (138), nöronal kök hücre devamlılığının sağlanmasında (139, 140) rol aldığına dair kanıtlar bulunmaktadır.

2.7.3. Hücre Sinyal Yolakları ve PLAGL2

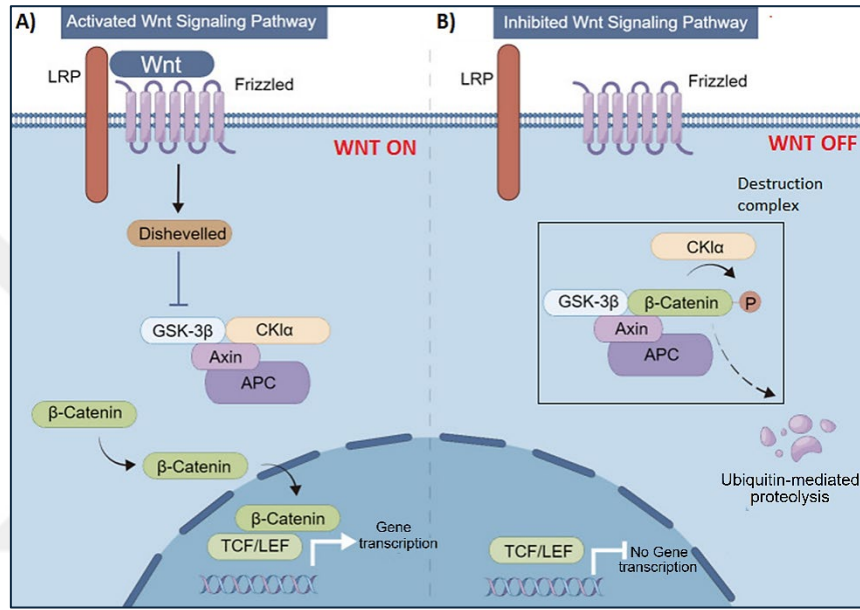
Yapılan bazı çalışmalarda PLAGL2'nin EGFR/PI3K/AKT, Hippo ve Wnt/ β -katenin sinyal yolağı olmak üzere çeşitli sinyal yolaklarında rol aldığı gösterilmiştir (110, 120, 141). Bu yolaklardan en çok Wnt/ β -katenin sinyal yolağında PLAGL2'nin fonksiyonu üzerine çalışmalar yapılmıştır.

2.7.3.1. PLAGL2 ve Wnt/ β -katenin Sinyal Yolağındaki Rolü

Wnt/ β -katenin sinyal yolağı, embriyonik gelişim sırasında hücre çoğalmasını, kök hücre farklılaşmasını, hücre göçünü, polaritesini, nöral oluşum ve organogenezi düzenleyen kısacası hücre kaderini belirlemede görev alan evrimsel olarak korunmuş bir yolaktır (142-144). Sinyal yolağını aktive eden Wnt ligandları otokrin/parakrin etkili glikoproteinlerdir (145). Yolak temel olarak hücre dışı sinyal molekülleri olan Wnt proteinleri, transmembran yüzey reseptörü olan Frizzled (FZD) ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) reseptör-ilişkili membran proteinlerinden oluşmaktadır. Hücre içinde ise Disheveled (Dsh), glikojen sentaz kinaz-3 β (GSK-3 β), Axin, Adenomatöz Polipozis Coli (APC), kazein kinaz 1 α (CK1 α) ve transkripsiyonel regülatör β -Kateni'ni içeren büyük bir kompleks tarafından düzenlenir (146). Wnt/ β -katenin sinyal yolağının en önemli bileşeni olan β -katenin'in hücre-hücre adherens bağlantılarında, sentrozomda ve bir transkripsiyon regülatör olarak görev yaptığı bilinmektedir. Hücrede yeni sentezlenen β -katenin, zar-hücre iskeleti yapısına dahil olarak E-kaderin ile adherens bağlantılarını oluşturur. Yeri geldiğinde β -katenin, protein kinazların aktivitesi veya E-kaderin'in baskılanmasıyla adherens bağlantılarından serbest bırakılır. Serbest kalan β -katenin bir sonraki yıkıma hazırlanmak için APC ile işaretlenir veya yıkım kompleksi aracılığıyla fosforillenerek tamamen yıkılır. İşaretleme sitoplazmadaki β -katenin kararlılığının sağlanması açısından oldukça kritiktir. Wnt yolağı aktif olduğunda yıkım kompleksinin aktivitesi engellenir ve sitoplazmik β -katenin seviyesi artar böylece çekirdeğe giden β -katenin transkripsiyonel regülatör olarak davranır (147). Sentrozomlarda ise β -kateninin sentrozom çekirdeğinin oluşması ve sentrozomların ayrılmasına önemli ölçüde katkıda bulunduğu gösterilmiştir (148).

Wnt ligandı yokluğunda sinyal yolağı aktif değilken (OFF); APC ve GSK-3 β kinaz sitoplazmada kompleks şeklinde bulunur ve bu komplekste yer alan aktif GSK-3 β , β -katenin'i fosforiller ve fosforillenen β -katenin ubiquitinlenerek proteazomlarda yıkılır. Bu kompleksin Axin aracılı oluşması (APC/Axin/GSK-3 β /CK1 α) β -katenin fosforillenmesini artırır. β -katenin parçalanması sonucunda Wnt hedef genlerinin transkripsiyonu

gerçekleşmez (Şekil 9B). Wnt varlığında, sinyal yolağı aktifken (ON); Wnt ligandının FZD reseptörüne bağlanması Dishevelled'in LRP ko-reseptörü aracılı β -katenin'in GSK-3 β tarafından fosforillenmesini engeler ve yıkım kompleksi dağılır. Fosforillenmeyen β -katenin parçalanmaz ve sitoplazmada birikir. Biriken β -Katenin çekirdeğe geçerek T-hücre faktörü/lenfoid arttırıcı faktör (TCF/LEF) kompleksini hedef gen düzenleyicilerine yönlendirerek transkripsiyonu aktifleştirir (Şekil 9A) (149, 150).



Şekil 9. Wnt/ β -katenin sinyal yolağı. **A)** Yolağın inaktif durumu. **B)** Yolağın Wnt ligandıyla aktivasyonu (He'den, 149)

Nöral kök hücrelerin kaderinin belirlenmesinde Wnt/ β -katenin sinyalinin hücre farklılaşmasını engelleyerek, kök hücrelerin kök hücre olarak kalması ve çoğalması için gerekli olduğu bildirilmiştir (151). *Hongwu ve ark.* yaptıkları bir çalışmada PLAGL2'nin, glioma başlatıcı hücre (GIC) ve nöral kök hücre (NSC) farklılaşmasını güçlü bir şekilde baskıladığı, kök hücrelerin farklılaşmaya zorlansa bile PLAGL2'yi fazladan üreten hücrelerin kendi kendini yenileme (proliferatif) kapasitelerinin arttığı gösterilmiştir (129). Bahse konu çalışmada yapılan transkriptom sonucunda en çok artış gösteren genlerin hücre döngüsü, G1/S kontrol noktası ve Wnt/ β -katenin sinyal yolağı bileşenlerin ait olduğu belirlenmiş, PLAGL2 ekspresyonunun artmasıyla artan proliferatif özellik Wnt/ β -katenin sinyal yolağı bileşenlerinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir. Bu durum, PLAGL2'nin Wnt/ β -katenin sinyal yolağı aracılığıyla farklılaşmayı engelleyerek kök hücre devamlılığını sağladığı şeklinde açıklanmıştır (129).

Bağırsak epitel kök hücrelerini içeren organoidlerin kullanıldığı farklı bir çalışmada ise *PLAGL2*'nin fare bağırsak kök hücre devamlılığını destekleyerek koloni oluşumunu arttırdığı gösterilmiştir. Söz konusu çalışmada yapılan RNA dizileme sonucunda *PLAGL2*'nin ekspresyonundaki artışın Wnt/ β -katenin sinyal yolağı bileşenlerinden *Lgr5* ve WNT ligandlarının (*Wnt3*, *Wnt9b*, *Wnt4*, *Wnt10a* ve *Wnt5a*) artışıyla korele olduğu bulunmuştur. İlave olarak, aynı çalışmada *PLAGL2*'nin WNT sinyalinden bağımsız intestinal kript kök hücre markörü *ASCL2*'nin ekspresyonunu indükleyerek kök hücre çoğalmasını ve hayatta kalmasını desteklediği gösterilmiştir (105, 152).

Normal şartlardaki kök hücre çalışmaları dışında *PLAGL2*, kanserde çoğunlukla da kolon kanseri hücrelerinde Wnt/ β -katenin sinyal yolağı ile ilişkilendirilmiştir (118, 153). *Nanpeng ve ark.* yaptıkları bir çalışmada *PLAGL2*'nin kolon kanseri hücre hatlarında, HCT116 ve SW480, Wnt/ β -katenin sinyal yolağı ligandı olan *Wnt6* geninin promotörüne bağlanarak ekspresyonunu artırdığı ve bu şekilde yolağı aktive ettiği gösterilmiştir (106). Başka bir çalışmada ise *PLAGL2*'nin lenfoma hücrelerinde ekspresyonunun azaltılmasının *AXIN2* ve *APC* ekspresyonunu artırdığı, β -katenin ekspresyonunu azaltarak Wnt/ β -katenin yolağını baskıladığı gösterilmiştir (154).

Bugüne değin *PLAGL2*'nin keratinosit hücrelerindeki fonksiyonuna yönelik bir çalışma literatürde yer almamaktadır. Sadece, keratinosit farklılaşmasında aktif olarak yer alan genlerin analiz edildiği yüksek çıktılı bir çalışmanın destekleyici verileri arasında *PLAGL2* de yer almaktadır. Söz konusu çalışmada, insan primer keratinosit hücrelerinin farklılaşması esnasında RNA polimeraz II'nin bağlandığı aktif gen bölgeleri kromatin immünopresipitasyon dizileme (ChIP-seq) ile analiz edilmiştir ve *PLAGL2*'nin de aralarında bulunduğu 7.223 gen belirlenmiştir. Bahse konu yayında, RNA Pol II'nin *PLAGL2*'ye özgü gen düzenleyici bölgelere bağlanma seviyesinin farklılaşmamış bazal keratinosit hücrelerde (0. gün) yüksek iken epidermal farklılaşma sırasında kademeli (2, 4 ve 7. günler) olarak azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca, bu yayında *PLAGL2*'nin intron 1'i üzerindeki düzenleyici bölgesinde, epidermal farklılaşma sürecinin kilit transkripsiyon regülatörü olan p63'ün bağlanma dizisinin olduğu ve bölgenin epigenetik olarak aktif olduğu *in silico* olarak gösterilmiştir (155). Keratinosit farklılaşmasındaki rolleri iyi bilinen *RIPK4*, *IRF6*, *KRT14* ve *KRT10* genlerinin yanı sıra *PLAGL2*'nin de p63 tarafından düzenleniyor olması *PLAGL2*'nin keratinosit farklılaşmasında rol aldığına dair önemli ipuçları vermektedir.

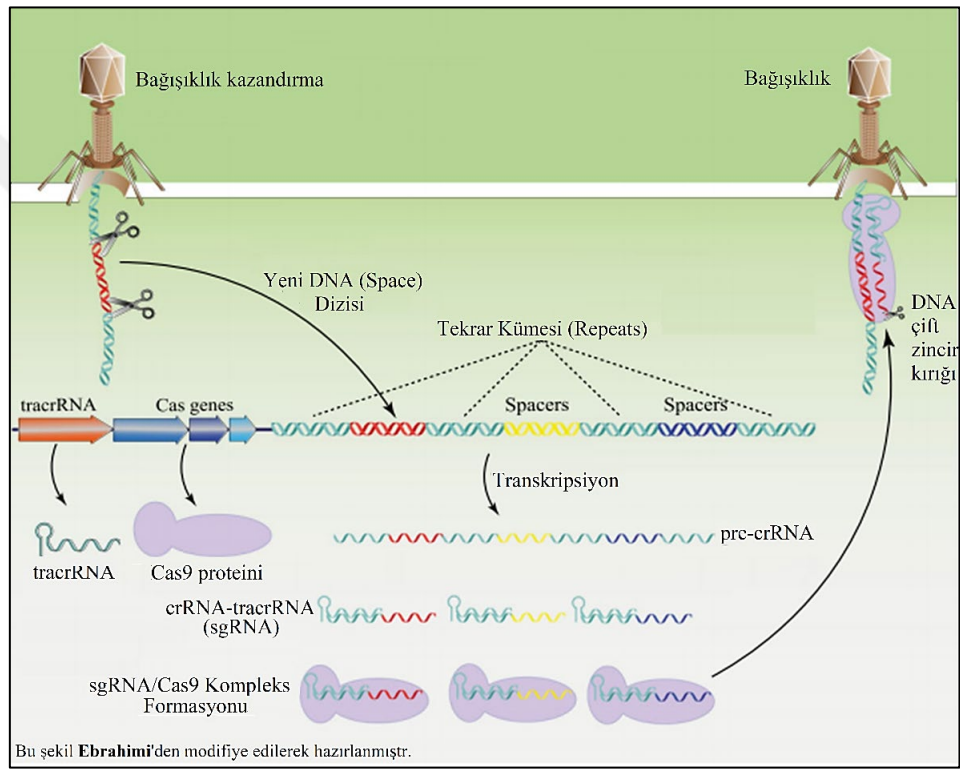
Özetle, RIPK4 ve PLAGL2'nin ayrı ayrı farklı hücre ve koşullarda Wnt/ β -katenin sinyal yolağında yer alması, hücre iskeletini ve hareketini, hücre ölümünü, hücre proliferasyonunu düzenlemesi ve en önemlisi anabilim dalımızda gösterilen RIPK4'ün, PLAGL2 ile arasındaki etkileşim ön-verisi, ayrıca RIPK4 gibi PLAGL2'nin de keratinosit farklılaşması esnasında farklılaşmanın ana regülatörü p63 tarafından düzenlenmesi bir transkripsiyon faktörü olan PLAGL2'nin keratinosit-ilişkili hücre fonksiyonlarında düzenleyici bir rolü olabileceğine işaret etmektedir. Bir proteinin fonksiyonunu analiz etmeye yönelik çalışmalarda temel yaklaşım ilgilenilen proteinin hücrede ekspresyonunu susturarak o proteinin hücresel süreçlerdeki rolünü araştırmaya dayalıdır. Dolayısıyla tez çalışması kapsamında; CRISPR/Cas9n sistemi ile *PLAGL2*'nin susturulduğu HaCaT keratinosit hücre hattının karakterizasyonunu yaparak PLAGL2'nin fonksiyonunu anlamaya yönelik verilere ulaşılması amaçlanmıştır. Bu amaca yönelik hedeflerimiz ise *PLAGL2*'nin CRISPR/Cas9n tekniğiyle kalıcı olarak susturulması ve oluşan *PLAGL2* knock-out keratinosit hücre hattının hücre morfolojisi, hücre proliferasyonu, hücre döngüsü, hücre ölümü, hücre hareketi ve hücre sinyali açısından incelenerek karakterize edilmesidir.

2.8. Gen Düzenleme Sistemi: CRISPR/Cas9

Bir proteinin fonksiyonunu analiz etmeye yönelik yapılan çalışmalarda temel yaklaşım hedef proteini hücrede gerek fazladan eksprese ettirerek gerekse ifadesini durdurarak veya baskılayarak hücrede gerçekleşen değişiklikleri araştırmaya dayalıdır. Gen ekspresyonunun durdurulmasına yönelik güncel yaklaşımlardan biri CRISPR/Cas9 stratejisidir. CRISPR/Cas9 sistemi arkeler ve bakterilerde keşfedilmiş olup bu organizmaların virüslere karşı oluşturdukları kazanılmış bağışıklık sistemine dayalıdır (156).

İlk olarak 1987 yılında *Escherichia coli* K12'de tekrar dizileri olarak keşfedilen bu sistem, sonraki yıllarda yapılan çalışmalarla kümelenmiş düzenli tekrarlar (Short Regularly Spaced Repeats) olarak adlandırılmıştır (157, 158). Daha sonraki bakteri ve arkelerde yapılan genom çalışmalarıyla bu tekrarlı dizi ailesine “düzenli aralıklarla yerleşmiş kısa palindromik tekrar kümesi” (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats; CRISPR) adı verilmiştir (159). Yabancı viral DNA'ya karşı prokaryotların sahip olduğu hafızaya dayalı bir immun sistem olarak düşünülen CRISPR sistemi test edilmiş ve virüse ait spacer'ların (DNA) CRISPR bölgesine dahil olduğu ve bu sayede bakterinin bir sonraki enfekte oluşunda virüse karşı bağışıklık kazandığı kanıtlanmıştır. Bu sistemde, önceden

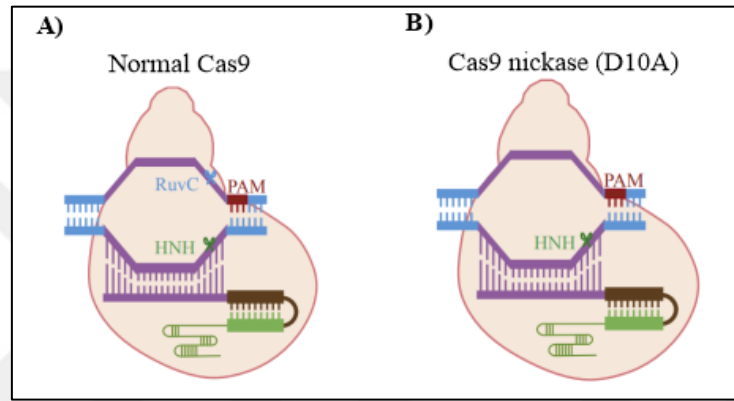
CRISPR bölgesine eklenen virüse ait DNA (Spacer), bakterinin aynı virüs tarafından tekrar enfekte edilmesi durumunda bu bölgeden transkripsiyona uğrayarak öncül pre-crRNA'ya dönüşür, ardından kırılabilir ve tracrRNA (Trans-activating crRNA) ile birleşir. crRNA-tracrRNA ikilisi (sgRNA: Rehber RNA), Cas9 proteiniyle kompleks oluşturarak Cas9'u sgRNA aracılığıyla tekrar enfekte eden virüsün DNA'sına yönlendirir. Virüs DNA'sına yönlendirilen Cas9, DNA'da çift zincir kırıkları oluşturarak bağışıklık kazandırılmış olur (Şekil 10) (158, 160, 161).



Şekil 10. Bakteri sisteminde CRISPR tabanlı bağışıklık (Ebrahimi'den, 161)

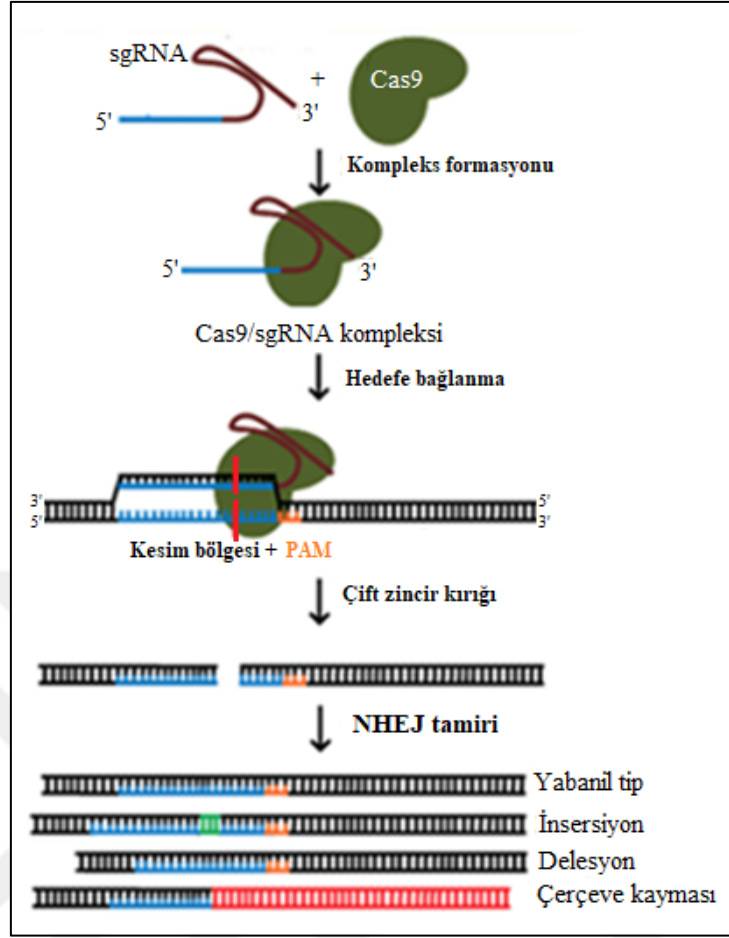
2012 yılında Jeniffer Doudna ve Emmanuelle Charpentier CRISPR sisteminin moleküler mekanizmasını detaylı olarak aydınlatmış ve ilk kez insan hücrelerinde *in vitro* CRISPR sistemi kullanarak gen düzenlemesi (editing) yapmıştır (162). Bu sistemde Cas9, rehber RNA'lar (sgRNA) aracılığıyla PAM (Patojene ait korunmuş dizi) Cas9 tanıma dizisi (NGG) bulunan hedef DNA'ya yönlendirilerek PAM dizisinin üç-dört nükleotid yukarısından keserek çift sarmal kırıkları oluşturmaktadır. PAM dizisi Cas9 Endonükleaz'ın izole edildiği bakteri türüne göre değişiklik gösterebilmektedir. NGG dizisi, *Staphylococcus Pyogenes* türünden izole edilen Cas9 endonükleaza aittir. Farklı bakteri türlerinden elde edilen Cas9 varyantlarına ait farklı alternatif PAM dizileri de mevcuttur (163).

Cas9 endonükleaz, katalitik aktiviteye sahip HNH ve Ruv C olmak üzere iki farklı domainden oluşmaktadır. HNH domaini, DNA ile eşlenen sgRNA'nın bulunduğu zinciri, Ruv C domaini ise karşı komplementer DNA zincirini aynı yerden kesmektedir (Şekil 11A). Cas9 endonükleazlar'ın domainleri modifiye edilmesiyle farklı işlevlere sahip Cas9 varyantları oluşturulmuştur. Bu varyantlardan biri de Cas9n (nickase)'dir. Bu varyantta Ruv C domaini üzerinde mutasyon oluşturularak (D10A) RuvC'nin katalitik (kesim) aktivitesi engellenmiş ve yalnızca HNH'nin kesim aktivitesi bırakılmıştır. Bundan ötürü Cas9'un aksine Cas9n DNA'yı sgRNA'nın bağlandığı tek iplikten kesmektedir (Şekil 11B) (164).



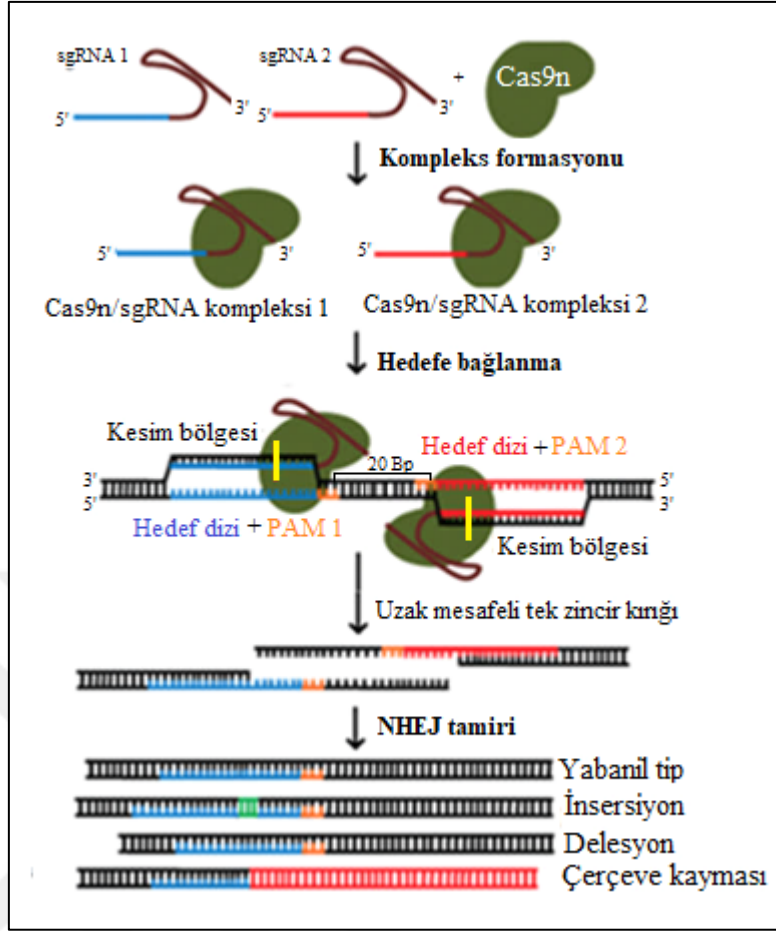
Şekil 11. Cas9 endonükleazlar. **A)** Normal Cas9. **B)** Cas9'un varyantı olan Cas9n (Mei'den, 164)

Bakterideki CRISPR/Cas9 sistemi, memeli hücrelerinde gen düzenleme (editing) yaklaşımı olarak sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Yapılan bu çalışmaların üzerine Jeniffer Doudna ve Emmanuelle Charpentier 2020 yılında Nobel Kimya ödülüne layık görülmüşlerdir (165). Aydınlattıkları bu yaklaşımın çıkış noktası, düzenleme yapılması istenilen hedef bölgeye rehber RNA (sgRNA) aracılığıyla Cas9'un taşınması ve DNA'nın kesilmesiyle oluşan çift zincir kırıklarının homolog olmayan uç birleşmesi (NHEJ) yoluyla tamir edilmesine dayalıdır (166). NHEJ esnasında oluşabilecek nükleotid insersiyon ya da delesyonlar (INDEL) protein kodlayan ekzonlarda çerçeve kayması mutasyonlarıyla prematür durdurma kodonlarına neden olacağından istenilen genin knock-out edilmesini sağlayarak protein oluşumunu engeller (Şekil 12) (167, 168).



Şekil 12. Çift zincir kırığı oluşturan CRISPR/Cas9 sistemi. Cas9 kesim bölgeleri kırmızı çizgiyle gösterilmiştir (AddGene, 168)

Normal Cas9 sisteminde gen düzenleme yapılabilmesi için tek sgRNA kullanırken Cas9'un modifikasyonu ile oluşturulan Cas9n sistemi kullanılacağı zaman DNA'nın her iki sarmalında da tek kırık oluşturmak için DNA'nın birbirine yakın bölgesine ve aralarındaki mesafe maksimum 20 baz çifti olacak şekilde zıt yönlü olarak yerleşen iki farklı sgRNA'ların tasarlanması ve hedef konağa verilmesi gerekmektedir (Şekil 13). Cas9n için en optimal sgRNA'ları yazılım programları kullanarak belirlemek mümkündür. Cas9n'in kullanılmasının Cas9'a karşı avantajı iki farklı sgRNA kullanıldığından hedef dışı genlerin (Off-target) Cas9 endonükleaz'dan etkilenme olasılığını azaltmaktadır (169).



Şekil 13. Karşılıklı tek zincir kırığı oluşturan CRISPR/Cas9n sistemi. Cas9n kesim bölgeleri sarı çizgiyle gösterilmiştir (AddGene, 168)

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kimyasallar

Agar	Merck, 1.016.130.500
Agaroz	Lonza, 50004
Akrilamid (29:1) %40	Bio-Rad, 161-0146
Amonyum persülfat (APS) ((NH ₄) ₂ S ₂ O ₈)	Sigma, A9164
Bacto Tripton	Conda,1612
Beta merkaptotanol	Merck, 8.057440.0250
Bromofenol mavisi	Merck,1.08122.005
Coomassie Brilliant Blue R-250	Sigma, 112553
Deoksinukleotit trifosfat (dNTPs)	Promega, U1420
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Sigma, 41640
Dithiothreitol (DTT) (C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂)	Thermo scientific, R0861
D(+)-Glukoz (C ₆ H ₁₂ O ₆)	Chemcruz, SC-211203A
EDTA disodyum dihidrat (Na ₂ EDTA.2H ₂ O)	AppliChem, A2937.0500
Etidyum bromid (C ₁₂ H ₂₀ N ₃ Br)	Sigma, E-7637
Etil alkol (C ₂ H ₅ OH)	AppliChem, A 8075,1000
Fetal bovine serum (FBS)	Gibco, 10500064
Fenilmetilsülfonil florit (PMSF)	Sigma, 1741932998611
Glasiyel asetik asit (C ₂ H ₄ O ₂)	Merck, 1.00056.2500
Gliserol	Chemcruz, sc29095
Glisin	Chemcruz, sc29096
Goat serum (GS)	Gibco, 16210-064
HEPES (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)	Sigma, H0887
Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)	Sigma, 516813
Hidroklorik asit (HCl)	Merck, 1.00314.2500
İzopropil alkol (C ₃ H ₈ O)	Appllichem, A3928,0500PE
Kalsiyum klorür dihidrat (CaCl ₂ .2H ₂ O)	Merck, 910TA654681
Kristal viyoleto solüsyonu	Sigma, HT90132
Lipofectmax™	ABP Bioscience, FP310
Magnezyum klorür heksahidrat (MgCl ₂ .6H ₂ O)	Merck, 1.05832

Magnezyum sülfat heptahidrat (MgSO ₄)	Merck, 1.058.861.000
Manganez iki klorür tetrahidrat (MnCl ₂ .4H ₂ O)	Sigma, 221279
Matrijel® Basement Membrane Matrix	Corning, 356234
Metil alkol (C ₂ H ₆ O)	Merck, 1.06009.2500
Mitomisin-C (MMC)	Seva, 29805
Orange G	Sigma, O-1625
Oligonükleotit primer	Macrogen
Orto-Nitrofenil-β-Galaktozit (ONPG)	Sigma, N1127
Paraformaldehit (HO(CH ₂ O) _n H)	Sigma, P6148
Piperazin-1,4-bis(2-etansülfonik asit) (PIPES)	Merck, 1.10220.0025
Polietilenimin hidroklorit (PEI)	Polysciences, 24765-1
Ponceau S	Sigma, 78376
Potasyum dihidrojen fosfat (KH ₂ PO ₄)	Merck, 022A470871
Potasyum hidroksit (KOH)	Sigma, 1310-58-3
Potasyum klorür (KCl)	Sigma, P5405
Proteinaz K	Promega, V3021
Sakkaroz (Sükroz)	Merck, 1.07653.1000
Sephadex®G-50	Sigma, S5897-25G
SigmaFast Proteaz inhibitör karışımı (PI)	Sigma, S8830-20TAB
Sodyum fosfat dibazik (NaH ₂ PO ₄)	Sigma, 58282
Sodyum hidrojen fosfat (Na ₂ HPO ₄)	Sigma, 57907
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Merck, 822050
Sodyum florür (NaF)	Sigma, S7920
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck, 1.06462
Sodyum klorür (NaCl)	Merck, 1.01540.0500
Sodyum ortovanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma, S6508
Sodyum pirofaosfat (NaPPi-Na ₄ O ₇ P)	Sigma, P8010
Sodyum karbonat (Na ₂ CO ₃)	Merck, 106392
TEMED	AppliChem, A1148
Tripsin-EDTA	Biological Industries,03-052-1B
Tris-Baz (NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃)	Sigma, T6791
Tris-HCl (NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃ HCl)	Sigma, 93363
Triton X-100	Sigma, 9002-93-1

Tween 20
Yeast Extract

J.T. Baker, 73-74
Merck, VM445253 22

3.1.2. DNA ve Protein Markırlar

100 bp DNA ladder
Gene ruler 1 kb DNA ladder
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards

NEB, N3231L
Thermo Scientific, SM0311
Bio-Rad, 1610374

3.1.3. Antikorlar

3.1.3.1. Primer Antikorlar

Mouse-Anti-β-Actin, monoklonal
Mouse-Anti-FLAG M2, monoklonal
Rabbit-Anti-PLAGL2, poliklonal

Abcam, ab184220
Sigma-Aldrich, F3165-1MG
Abcam, ab121239

3.1.3.2. Sekonder Antikorlar ve Konjuge Boyalar

Anti-Mouse-Alexa Fluor 488
Anti-Mouse-HRP
Anti-Rabbit-Alexa Fluor 488
Anti-Rabbit-HRP
Phalloidin-iFlour 488
ProLong Gold Antifade mounting media (DAPI)

Abcam, ab150117
Bio-Rad, 170-5047
Abcam, ab150061
Bio-Rad, 170-5045
Abcam, ab176753
Thermo scientific, 36935

3.1.4. Besiyeri ve Antibiyotikler

Ampisillin
DMEM (4.5 g/L Glukoz)
Opti-MEM
Penisilin/streptomisin (P/S)
Puromisin

Sigma, A9518-5G
Thermo, 41966029
GIBCO, 31985-062
Thermo, 1514022
Thermo, A1113803

3.1.5. Enzim Kitleri

BbsI (*Bpil*) (10 U/μL)
GoTaq® Flexi DNA polimeraz seti (5 U/μL)
T4 DNA Ligaz (400 U/μL)
T4 Polinükleotid Kinaz (10 U/μL)

Thermo, ER1011
Promega, M8305
BioLabs, M2622S
BioLabs, M0201S

3.1.6. Diğer Kitler

BCA Protein Assay Kit	Thermo, 23227
Brilliant Dye Terminatör v3.1 Cycle Sequencing Kit	NimaGen, BRD3-100
Clarity™ Western ECL Substrat Kit	Bio-Rad, 1705060
ClonJET PCR Cloning Kit	Thermo Fisher, K1231
Cycle Test Plus DNA Reagent Kit	BD Biosciences, 340242
E.Z.N.A.® Endo-free Plasmid DNA Mini Kit	Omegabiotek, D6943-01
E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit	Omegabiotek, D6915-03
Luciferase Assay System Kit	Promega, E1500
Mycoplasma Detection Kit	ABM, G238
Nucleospin Gel and PCR Clean-Up Kit	Macherey-Nagel, 740609.50
NucleoSpin RNA purification Mini Kit	Macherey-Nagel 740955.50
PE-Annexin V apoptosis detection Kit	BD Biosciences, 559763
RapidLyse DNA purification Mini Kit	Macherey-Nagel, 740100.50
SSoAdvanced qPCR SYBR Green Supermix Kit	Bio-Rad, 172-5270
WizScript cDNA Synthesis Kit (High Capacity)	Wizbio, W2211

3.1.7. Diğer Sarf Malzemeler

Cyro-Tüp (2 mL)	Sardest, Almanya
Enjektör (5 ve 10 mL)	Ayset, Türkiye
Falkon tüpler (15 ve 50 mL)	Isolab, Fransa
Filtreli pipet uçları (10, 200, 1000 µL)	Axygene, ABD
İnsülin iğnesi (1 mL)	Berika, Türkiye
Kültür flasksı (25 cm ² T25 ve 75 cm ² T75)	Corning, ABD
Mikrosantrifüj tüpler (1.5 mL)	Eppendorf, Almanya
Nitroselüloz membran (0.45 µm)	Bio-Rad, 1620115
PCR tüpleri (0.1 mL)	Eppendorf, Almanya
Petri kabı (60 ve 100 mm)	Corning, ABD
Pipet uçları (10, 200, 1000 µL)	Axygene, ABD
Serolojik pipetler (5, 10 ve 25 mL)	SPL, Güney Kore
Steril pastör pipeti	Isolab, Fransa
Şırınga ucu filtre (0.2 ve 0.45 µm)	Merck, Almanya
Tabak (6, 12, 24 ve 96 kuyucuklu)	Corning, ABD

Transwell membran insert (8.0 µm)
Whatman kağıdı 3 mm

Corning, ABD
GE-Healthcares, 3030-861

3.1.8. Kullanılan Cihazlar

Accuri C6 Flow Sitometri
Bulaşık makinesi
Buzdolabı (4 °C)
Buz makinesi
ChemiDoc MP Görüntüleme Sistemi
CO₂'li Etüv
Çalkalayıcı inkübatör
Derin dondurucu (-20 °C)
Dikey elektroforez ve immünblot sistemi
Distile su cihazı
Doğru akım güç kaynağı (300 Volt)
Genetik Analizör
Hassas terazi
İnverted mikroskop
Jel görüntüleme sistemi
Light Cycler 480 II
Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop Sistemi
Lüminesans Mikroplate okuyucu
Manyetik karıştırıcı
Merdaneli karıştırıcı
Mikrodalga fırın
Mikrosantrifüj
Mikrosantrifüj
NanoDrop 2000 (mikro hacim spektrofotometre)
Orbital karıştırıcı
Otoklav
Pastör fırını
pH metre
Sıcak su banyosu

Becton Dickinson, ABD
Bosch, Almanya
Bosch, Almanya
Hoshaizaki, Japonya
BIO-RAD, ABD
Heraeus, Almanya
GFL, Almanya
Bosch, Almanya
BIORAD, ABD
GFL, Almanya
BIORAD, ABD
ABI 3130, ABD
AHAUS, ABD
Nikon, Japonya
Gel Logic 2000, Kodak
Roche, ABD
Leica DMI8, Germany
SpectraMax, ABD
IKA, ABD
Stuart, İngiltere
Arçelik MD554, Türkiye
Hettich, Almanya
Thermo IEC, ABD
Thermo, ABD
Nüve SL 350, Türkiye
Tutnauer 3150 ELV, İtalya
Memmert, Almanya
Hanna, Portekiz
Stuart, İngiltere

Sınıf II steril kabinler	Metisafe, Türkiye
Sıvı azot tankı	Thermo Scientific, ABD
Soğutmalı yüksek devirli santrifüj	Eppendorf 5804R, ABD
Sonikatör VCX500	Sonics-Vibracell, ABD
Spektrofotometre (96 well)	Eppendorf, Almanya
Termomikser	Eppendorf, Almanya
Thermal Cycler	Gene Amp 9700, ABD
Thermal Cycler	Techne TC512, İngiltere
Vakum pompası	Isolab, Fransa
Vorteks	IKA, ABD
Yatay elektroforez düzeneği	HU13, İngiltere
Yüksek devirli santrifüj	Eppendorf 5810, Almanya
Zaman ve hız ayarlı rotator	Stuart, İngiltere
-80 °C dondurucu	Thermo Scientific, ABD

3.1.9. Bakteri Suşları

Tüm vektörlerin çoğaltılmasında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı arşivinden temin edilen DH5 α bakteri suşu kullanıldı.

3.1.9.1. DH5 α Genotipi

F-recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1

3.1.10. Kullanılan Vektörler

Genom düzenleme aracı olarak kullandığımız CRISPR/Cas9n sisteminde, gen ifadesini susturmak için pSPCas9n(BB)2A Puro (PX462) V2.0 vektörü kullanıldı. (Addgene, 62987).

CRISPR/Cas9n uygulaması sonrasında hedeflenen genin alellerinde INDEL analizleri için kullanılan JET1.2/blunt klonlama vektörü (Thermo, K1232) CloneJET™ PCR klonlama kitiyle birlikte geldi.

İlave olarak memeli hücrelerinde fazladan protein üretimini sağlamak ve Wnt sinyal yolağı gen aktivasyon analizlerini gerçekleştirmek için kullanılan vektörler ve kullanım amaçları Tablo 4'te gösterilmiştir. Bu vektörler Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı vektör bankasından temin edilmiştir.

Tablo 4. Kullanılan dolu, boş ve raportör vektörlere ait bilgiler

Vektör ismi	N-ucu Etiket	Gen Adı	Kullanım amacı
p3xFLAG-CMV/DEST	FLAG	<i>PLAGL2</i>	Protein üretimi
pcDNA3myc/DEST	MYC	<i>PLAGL2</i>	Protein üretimi
p3xFLAG-CMV/DEST	FLAG	<i>β-KATENİN</i>	Wnt sinyal yolağı pozitif kontrol
p3xFLAG-CMV/DEST	FLAG	(Boş)	Plazmid miktarı eşitleme
pCMV5- (β-Gal, M718)	-	Beta-Galactosidase	Sinyal yolağı için normalizasyon
pGL3 β-katenin (pBar)	-	Luciferase	Wnt sinyal yolağı raportör
pGEM Kontrol	-	-	Plazmid DNA dizileme

3.1.11. Kullanılan Hücre Hatları

Tez çalışmasında kullanılan ölümsüz insan keratinosit hücre hattı HaCaT (Human adult skin keratinocytes propagated under low Ca^{+2} addition and elevated Temperature), Alman Kanser Araştırmaları Merkezi (DKFZ)’den temin edilmiştir. HaCaT hücreleri, primer keratinosit hücre hatları için gerekli olan büyüme faktörlerine ihtiyaç duymadan %10 FBS ve DMEM medyumunda uzun süreli büyütülmeye ve çoğaltılmaya olanak sağlayan, monoklonal bir keratinosit hücre hattı olup keratinositlerin hücresel fonksiyonlarına yönelik çalışmalarda sıklıkla model olarak kullanılmaktadır (170-174).

Çalışmalarımızda geçici protein ekspresyonunda kullanılan Adenovirüs-5’le transforme edilmiş insan embriyonik böbrek hücre hattı olan HEK293 hücreleri Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu (ATCC)’den temin edilmiştir. Her iki hücre için de düzenli aralıklarla mikoplazma testi (ABM) gerçekleştirilmiş ve hücrelerde mikoplazma kontaminasyonu olmadığı doğrulanmıştır.

3.1.12. Çözeltiler, Tampon ve Besiyerleri

3.1.12.1. Bakteri Kültürü İçin Kullanılan Besiyerleri

Luria Bertani (LB) Besiyeri (1 L)

800 mL ddH₂O içerisinde 10 g tripton, 5 g maya özütü ve 10 g NaCl (Ma: 58.44 g/mol) çözüldü. Çözelti pH’sı 1 N NaOH ile 7’ye ayarlandıktan sonra hacimi 1 L’ye tamamlandı ve 121 °C’de 20 dakika otoklavda steril edildikten sonra oda sıcaklığında saklandı.

Luria Bertani Agar (LBA) Besiyeri

200 mL LB sıvı besiyerine 3 g (%1.5) agar eklenerek 121 °C’de 20 dakika otoklavda steril edildi. Otoklavlanan LB agar sıcaklığı 50-55 °C’ye ayarlanan su banyosunda soğutulduktan sonra gerektiği durumlarda besiyerine 100 µg/mL ampisilin ilave edilerek 60 veya 100 mm çapında petri kaplarına dağıtıldı ve 4 °C’de saklandı.

Kompetan Bakteri Oluşturma Transformasyon Tamponu (TB Buffer)

10 mM PIPES (Ma: 302.37 g/mol), 15 mM CaCl₂.2H₂O (Ma:110.98 g/mol), 250 mM KCl (Ma: 74.55 g/mol), bir miktar su üzerine ilave edildikten sonra KOH çözeltisi kullanılarak pH 6.7’ye ayarlandı. pH ayarladıktan sonra son hacimde, konsantrasyonu 55 mM olacak şekilde MnCl₂.4H₂O (Ma: 197.91 g/mol) eklenerek 0.45 µm filtreden geçirildi ve oda sıcaklığında saklandı.

Super Optimal Broth (SOB, 1 L)

800 mL distile su üzerine 20 g Tripton, 5 g yeast extract, 0.5 g NaCl (Ma: 58.44 g/mol) ve 0.186 g KCl (Ma: 74.55 g/mol) eklendi ve pH’ı 3 M NaOH (Ma: 39.997 g/mol) çözeltisiyle 7’ye ayarlandı. Çözeltinin sterilizasyonu için 1.2 atmosfer basınçta, 121 °C’de 20 dakika otoklavlandı. Otoklavlandıktan sonra son hacimde konsantrasyonları 10 mM olacak şekilde MgSO₄.7H₂O (Ma: 246.47 g/mol) ve 10 mM MgCl₂.6H₂O (Ma: 203.31 g/mol) eklendi.

Super Optimal broth with Catabolite repression (SOC)

20 mM Glukoz (Ma: 180.16 g/mol) içeren SOB besiyerinde hazırlandı.

3.1.12.2. Memeli Hücre Kültüründe Kullanılan Solüsyonlar

%10 FBS-DMEM-1X Penisillin/Streptomisin Besiyeri (100 mL)

89 mL yüksek glukoz içeren DMEM besiyerine 10 mL Fetal Bovine serum (FBS) ve 1 mL pen/strep antibiyotik solüsyonu (100 U/mL penisilin-100 U/mL streptomisin) eklenerek hazırlandı ve 4 °C’de saklandı.

%0.2 FBS-DMEM-1X Penisillin/Streptomisin Besiyeri (100 mL)

98.8 mL yüksek glukoz içeren DMEM besiyerine 0.2 mL Fetal Bovine serum (FBS) ve 1 mL penisilin/streptomisin (P/S) solüsyonu (100 U/mL penisilin-100 U/mL streptomisin) eklenerek hazırlandı ve 4 °C’de saklandı.

PBS Stoğu (10X, 1 L)

700 mL ddH₂O üzerine 80.06 g NaCl (Ma: 58.44 g/mol), 1.99 g KCl (Ma: 74.56 g/mol), 14.196 Na₂HPO₄ (Ma: 141.96 g/mol), 2.395 g KH₂PO₄ (Ma: 136.09 g/mol) eklenerek hazırlandı. Çözeltinin pH'sı 1 N HCl kullanılarak 7.4'e ayarlandı. ddH₂O ile çözeltinin son hacmi 1 L'ye tamamlandı ve hazırlanan solüsyon otoklavlanarak oda sıcaklığında saklandı.

PBS Stoğu (1X, 1 L)

900 mL steril ddH₂O üzerine, 100 mL 10X PBS stoğundan ilave edilerek hazırlandı ve oda sıcaklığında saklandı. Hücre kültürü için kullanılacak olan 1X PBS sınıf II steril kabin içerisinde hazırlandı.

Hücre Patlatma Solüsyonları ve Proteaz/Fosfotaz İnhibitörler

5 M NaCl (100 mL)

80 ml ddH₂O içinde 29.22 g NaCl (Ma: 58.44 g/mol) çözüldü ve son hacim ddH₂O ile 100 mL'ye tamamlanarak otoklavlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

10 M NaOH (250 mL)

150 ml ddH₂O içinde 100 g NaOH çözüldü ve son hacim 250 mL'ye tamamlandı.

1 M Tris HCl (200 mL, pH: 7.4)

150 mL ddH₂O içinde 24.22 g Tris baz (Ma: 121.14 g/mol) çözüldü, pH'sı 7.4'e ayarlandıktan sonra hacim ddH₂O ile 200 mL'ye tamamlandı. Solüsyon 121 °C'de 20 dakika otoklavda steril edildikten sonra oda sıcaklığında saklandı.

0.5 M Na₂EDTA (100 mL, pH 8.0)

60 mL ddH₂O üzerine 16.81 g Na₂EDTA (Ma: 336.24 g/mol) eklendi ve 10 M NaOH ile pH 8'e ayarlanarak çözelti hazırlandı. Son çözelti hacmi ddH₂O ile 100 mL'ye tamamlandı ve otoklavlanarak oda sıcaklığında saklandı.

%20 Triton X-100 (10 mL)

8 mL ddH₂O üzerine 2 mL Triton X-100 eklendi ve 37 °C'ye ayarlı su banyosunda bekletilerek homojen hale getirildi ve oda sıcaklığında saklandı.

Proteaz İnhibitör karışımı (PI) (10X, 20 mL)

20 mL ddH₂O içerisinde iki adet EDTA içermeyen SigmaFast Proteaz İnhibitör Kokteyl tableti çözöldü ve 1 mL'lik eppendorflara alikotlanan çözelti -20 °C'de stoklandı.

Sodyum Orthovanadate (NaVan) 200 mM (100X, 100 mL)

80 mL ddH₂O üzerine 3.68 g Na₃VO₄ (Ma: 183.91 g/mol) eklenerek çözöldü ve 1 N HCl ile çözeltinin pH'sı 10'a ayarlandı. HCl kullanımıyla rengi sarıya dönen çözelti, renksiz olana kadar yüksek ısıda, yaklaşık 10 dakika, ısıtıldı. Sonrasında oda sıcaklığına gelene kadar bekletildi. pH tekrar kontrol edildi ve 10'ayarlandı. Hacim ddH₂O ile 100 mL'ye tamamlandı. Sonrasında solüsyon eppendorf tüplere dağıtılarak -20 °C'de muhafaza edildi. Çalışma sırasında çözelti içerisindeki son konsantrasyon 2 mM olacak şekilde 100 kat seyreltildi.

Sodyum Florür (NaF) 1 M (50X, 100 mL)

90 mL ddH₂O içinde 4.2 g NaF (Ma: 41.99 g/mol) çözölerek son hacim 100 mL'ye ayarlandı. Solüsyon eppendorf dağıtılarak -20 °C'de muhafaza edildi. Çalışma sırasında çözelti içerisindeki son konsantrasyon 20 mM olacak şekilde kullanıldı.

Sodyum PyroPhosphate (NaPPi) 50 mM (10X, 100 mL)

Son hacim 100 mL olacak şekilde ddH₂O içinde 2.22 g NaPPi (Ma: 444.06 g/mol) çözölerek hazırlanan solüsyon eppendorf tüplere dağıtılarak -20 °C'de muhafaza edildi. Çalışma sırasında çözelti içerisindeki son konsantrasyon 5 mM olacak şekilde kullanıldı.

PMSF 100 mM (100X, 10 mL)

10 mL Etanol içerisinde 0.174 g PMSF (Ma: 174.19 g/mol) çözöldü. Sonrasında çözelti eppendorf tüplere dağıtılarak -20 °C'de muhafaza edildi. Çalışma sırasında çözelti içerisindeki son konsantrasyon 1 mM olacak şekilde kullanıldı.

TNTE Hücre Patlatma Tamponu (1X, 10 mL)

TNTE hücre patlatma çözeltisi, 50 mM Tris-Cl (pH 7.4), 150 mM NaCl (Ma: 58.44 g/mol), %1 Triton X-100, 1 mM EDTA (pH 8.0), 5 mM NaPPi, EDTA içermeyen-1X Proteaz inhibitör kokteyli (SIGMA), 20 mM NaF, 2 mM NaVan ve 1 mM PMSF olacak şekilde ddH₂O içerisinde hazırlandı.

Transfeksiyon Solüsyonları

2X HEPES

90 mL distile su içerisinde 0.8 g NaCl (Ma: 58.44 g/mol), 0.027 g Na₂HPO₄.2H₂O (Ma: 177.99 g/mol) ve 1.2 g HEPES (Ma: 238.3 g/mol) çözüldü ve pH'sı 0.5 N NaOH ile 7.05'e ayarlanarak son hacmi 100 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan solüsyon çapı 0.2 µm olan steril filtreden süzülerek alikotlandı ve -20 °C'de muhafaza edildi.

2.5 M CaCl₂

100 mL steril çift distile su içerisinde 36.75 g CaCl₂ (Ma: 147.02 g/mol) çözüldü. 0.2 µm filtreden geçirilerek hazırlanan solüsyon falkonlar -20 °C'de muhafaza edildi.

3.1.12.3. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler

Tris-Asetat-EDTA (TAE) Tamponu (50X, 1 L)

700 mL ddH₂O üzerine 242 g Tris baz (Ma: 121.14 g/mol), 57.1 mL %100 glasiyal asetik asit ve pH'sı 8.0 olan 100 mL 0.5 M EDTA çözeltisi eklendikten sonra Tris baz tamamen çözününceye kadar manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Ardından, hazırlanan solüsyonun pH'sı 8.5'e ayarlanarak son hacmi 1000 mL'ye ddH₂O ile tamamlandı. Deney anında kullanılacak olan çalışma solüsyonu 1X olacak şekilde dH₂O ile 50 kat seyreltilti. Hazırlanan stok ve çalışma çözeltileri oda sıcaklığında muhafaza edildi.

Etidyum Bromür Solüsyonu (10 mL)

10 mL steril ddH₂O içerisine toz haldeki etidyum bromürden 0.1 g eklenerek çözüldü. Işığa duyarlı olan etidyum bromür amber şişede ve oda sıcaklığında saklandı.

Orange G DNA Yükleme Tamponu (10X, 50 mL)

20 g süktroz 40 mL steril ddH₂O su içerisinde çözüldü. Ardından üzerine 0.1 g Orange G ilave edilerek hacmi steril ddH₂O ile 50 mL'ye tamamlandı.

3.1.12.4. Beta-galaktozidaz Analiz Solüsyonları

Z tamponu (1 L)

800 mL steril ddH₂O üzerine 4.2 g NaH₂PO₄ (Ma: 119.98 g/mol), 8.52 g Na₂HPO₄ (Ma: 141.96 g/mol), 0.75 g KCl (Ma: 74.55 g/mol) ve 0.246 g MgSO₄.7H₂O (Ma: 246.47 g/mol) eklenerek çözüldü. Sonrasında çözeltinin pH'sı 7'ye ayarlandı ve hacim steril ddH₂O ile 1 L'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında muhafaza edildi.

1 M Na₂CO₃ (250 mL)

200 mL steril ddH₂O üzerine 26.49 g Na₂CO₃ (Ma: 105.99 g/mol) eklenerek çözöldü ve oda sıcaklığında muhafaza edildi.

3.1.12.5. SDS-PAGE Çözeltileri

Tris Glisin Tamponu (10X, 1L)

800 mL steril ddH₂O üzerine 30.3 g Tris baz (Ma: 121.14 g/mol) ve 144 g Glisin (Ma: 75.07 g/mol) eklenerek çözöldü. Sonrasında hacim steril ddH₂O ile 1 L'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında muhafaza edildi.

%10 Sodyum Dodesil Sulfat (SDS) (500 mL)

400 mL steril ddH₂O içerisinde 50 g SDS (Ma: 288.37 g/mol) çözöldü ve hacmi ddH₂O ile 500 mL'ye tamamlandı oda sıcaklığında saklandı.

SDS-PAGE Yürütme Tamponu (1X, 1L)

800 mL steril ddH₂O, 10X Tris-Glisin tamponundan 100 mL ve %10'luk SDS çözeltisinden 10 mL (son konsantrasyon %0.01) eklenerek son hacim steril ddH₂O ile 1 L'ye tamamlandı.

1.5 M Tris-HCl Ayırma Jeli Tamponu (pH 8.8, 200 mL)

36.33 g Tris baz (Ma: 121.14 g/mol) 150 mL steril ddH₂O'da çözölerek pH'sı 8.8'e ayarlandı. Çözeltinin son hacmi steril ddH₂O ile 200 mL'ye tamamlandı ve por çapı 0.2 µm olan steril filtreden süzölerek oda sıcaklığında muhafaza edildi.

0.5 M Tris-HCl Yükleme Jeli Tamponu (pH 6.8, 100 mL)

80 mL steril ddH₂O'da 6.057 g Tris baz (Ma: 121.14 g/mol) çözölerek pH 6.8'e ayarlandı. Ardından toplam hacim steril ddH₂O ile 100 mL'ye tamamlandı ve por çapı 0.2 µm olan steril filtreden süzölerek oda sıcaklığında muhafaza edildi.

1 M Tris-HCl (pH 6.8, 100 mL)

80 mL steril ddH₂O'da 12.114 g Tris base (Ma: 121.14 g/mol) çözölerek pH 6.8'e ayarlandı. Ardından toplam hacim steril ddH₂O ile 100 mL'ye tamamlandı ve por çapı 0.2 µm olan steril filtreden süzölerek oda sıcaklığında muhafaza edildi.

%10 Amonyum Persülfat (APS) (1 mL)

1 mL steril ddH₂O'da 100 mg APS (Ma: 228.18 g/mol) çözüldü ve maksimum yedi güne kadar kullanılmak üzere 4 °C'de muhafaza edildi.

% 40 Akrilamid\Bisakrilamid

% 40 Akrilamid\Bisakrilamid (29:1) solüsyonu kullanıldı (Bio-Rad, 161-0146) ve 4 °C'de muhafaza edildi.

SDS-PAGE Yükleme Tamponu (5X, 10 mL)

5 mL 1 M Tris-HCl (pH: 6.8) üzerine 10 mL Gliserol, 2 mL steril ddH₂O, 2 g SDS ve 0.002 g bromofenol mavisi eklenerek solüsyon 17 mL hacimde hazırlandı. SDS'in tamamının çözünmesi için manyetik karıştırıcıda 24 saat oda sıcaklığında yavaşça karıştırıldı. Hazırlanan çözelti steril ddH₂O 20 mL'ye tamamlanarak 1'er mL olacak şekilde alikotlara bölündü ve -20 °C'de muhafaza edildi. Kullanılmadan önce 60 °C'de 10 dakika ısıtılarak çözüldü ve 1 mL tamponun üzerine 0.5 M olacak şekilde 0.077 g Dithiothreitol (DTT) ilave edildi. DTT eklenen 1 mL'lik alikotlar da -20 °C'de muhafaza edildi.

3.1.12.6. İmmünoblot Solüsyonları

SDS-PAGE Transfer Tamponu (1L)

800 mL ddH₂O üzerine sırasıyla 100 mL 10X Tris-Glisin tamponu ve 100 mL metanol eklenerek hazırlandı.

%20 TWEEN 20 (100 mL)

80 mL ddH₂O'ya 20 mL TWEEN 20 eklendi. Solüsyon homojen hale getirildikten sonra 4 °C'de muhafaza edildi.

TBS Stoğu (10X, 1 L, pH 7.6)

24 g Tris HCl (Ma: 157.60 g/mol), 5.6 g Tris baz (Ma: 121.14 g/mol) ve 88 g NaCl (Ma: 58.44 g/mol) birleştirilerek son hacmi ddH₂O ile 800 mL'e getirildi. Magnetik karıştırıcıyla karıştırılarak kimyasalların çözülmesi sağlandı. Sonrasında 12 N HCl ile solüsyonun pH'sı 7.6'ya ayarlanarak ddH₂O ile son hacim 1 L'ye tamamlandı.

TBS-Tween 20 (TBST) (1X, 500 mL)

445 mL ddH₂O üzerine 10X TBS çözeltisinden 50 mL eklenerek 1X TBS hazırlandı. Sonrasında hazırlanan 1X TBS üzerine son konsantrasyon %0.05 olacak şekilde %20'lik

Tween 20 solüsyonundan 1250 µL eklendi. ddH₂O ile çözeltinin son hacmi 500 mL'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında muhafaza edildi.

Ponceau S Boyası

90 mL ddH₂O üzerine 0.1 g Ponceau S tartılıp koyuldu ve çözünmesi sağlandı. Ardından üzerinde 5 mL asetik asit eklenerek son hacim ddH₂O ile 100 mL'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında muhafaza edildi.

3.1.12.7. İmmünofloresanda Kullanılan Çözeltiler

%4 Paraformaldehit Çözeltisi (PFA)(100 mL, pH 7.2)

80 mL PBS içerisinde 4 g paraformaldehit (Ma: 30.03 g/mol) manyetik karıştırıcı yardımıyla 60 °C'de ısıtılarak çeker ocağın altında karıştırıldı. Çözülmenin tamamen gerçekleşmesi için çözeltiye 100 µL 1 N NaOH eklendi. Çözülme gerçekleştikten sonra 1 N HCl ile pH 7.2'e ayarlandı. Sonrasında son hacim PBS ile 100 mL'e tamamlandı por çapı 0.2 µm olan steril filtreden süzülerek -20 °C'de muhafaza edildi.

İmmünofloresan Bloklama Çözeltisi (%10 Goat Serum, 10 mL)

9 mL PBS içerisine ticari keçi serumundan 1 mL ilave edilerek %10'luk 10 mL keçi serumu bloklama çözeltisi hazırlandı.

İmmünofloresan Permeabilizasyon Çözeltisi (%0.2 Triton X 100, 10 mL)

9.9 mL PBS çözeltisi üzerine daha önceden hazırlanmış olan %20'lik Triton X-100'den 100 µL eklenerek hazırlandı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Bakteri Kültürü Teknikleri

3.2.1.1. Kompetan Hücre Hazırlama

Serbest halde bulunan DNA'yı içine alabilen bakterilere kompetan bakteri adı verilir. Bunun için bakterilerin öncelikle kompetan hale getirilmesi gerekir. Çalışmamızda *E.Coli* suşları Inoue yöntemiyle kompetan hale getirildi (175).

Öncelikle kullanılacak olan bakteri stoğundan antibiyotik içermeyen LB agar besiyerine bakterilerin ekimi yapılarak, 37 °C'ye ayarlanmış inkübatörde tüm gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından katı besiyeri üzerinde büyüyen kolonilerden dikkatli bir şekilde tek bir koloni seçildi. Seçilen koloni önce 5 mL LB agar sıvı besiyerinde resüspend edildi ardından üzerine 35 mL daha sıvı besiyeri eklenerek 37 °C'de tüm gece boyunca inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, önceden hazırlanmış olan 125 mL SOC sıvı besiyerine OD₆₀₀ değeri 0.2 olacak şekilde büyütülmüş olan bakteri kültüründen ilave edilerek sıcaklığı 17 °C'ye ayarlanmış çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Büyüme sıcaklığının 17 °C'de sabit kalması için ortama buz aküleri veya poşet içerisinde buz koyularak sıcaklık inkübasyon boyunca kontrol altında tutuldu. Aralarda inkübe edilen kültürün OD₆₀₀ değeri ölçüldü ve 0.4-0.6 OD₆₀₀ değerine ulaşınca kadar kültür büyütülmeye devam edildi. OD₆₀₀ değeri istenilen aralığa ulaşınca süper kompetan hücre hazırlamak için kültür buz üzerine alınarak 10 dk bekletildi. Ardından, buz üzerindeki bakteriler önceden 4 °C'ye getirilmiş olan soğutmalı santrifüjde 2 500 g'de 10 dk santrifüj edildi ve bakteriler çöktürüldü. Bakteri peleti, soğutulmuş olan 40 mL TB transformasyon solüsyonu içerisinde resüspend edilerek tekrar buz üzerine alındı ve 15-20 dk daha bekletildi. Süre sonunda bakteriler 4 °C'de 2 500 g'de tekrar 10 dk santrifüj edildi. Elde edilen pelet soğuk 9.3 mL TB transformasyon solüsyonunda resüspend edilerek üzerine son hacimde %7 olacak şekilde 700 µL DMSO eklendi ve 10 dk daha buz üzerinde bekletildi. Hazır hale getirilmiş olan hücreler 50, 100, 200 µL olacak şekilde eppendorf tüplere alikotlanarak sıvı nitrojende donduruldu ve ileride kullanılmak üzere -80 °C'ye kaldırıldı.

3.2.1.2. *E.Coli* DH5α Suşuna Plazmid Transformasyonu

İlk olarak süper kompetan DH5α bakteri suşu -80 °C'den alınarak buz üzerinde çözünmeleri için bekletildi. Her örnek için yeni 1.5 ml mikrosantrifüj tüpleri hazırlanıp buz üzerine alındı. Bu tüplerin her birine 50 µl kadar *E. coli* DH5α koyuldu ve üzerlerine 0.1 µg

plazmid ekleyip pipetaj yapıldı. Örnekler buzda 30 dk bekletilirken her 10 dk'da bir (toplamda 2 kere) tüplere parmakla nazıkçe vurulup karışmaları sağlandı. Süre bitiminde örnekler önceden hazırlanmış olan ısı bloğunda 42 °C'de tam 30 saniye bekletilerek ısı şoku yapıldı ve hemen akabinde tekrar buza alındı. Örnekler buz üzerinde 2 dk bekletildi. Ardından örnekler oda sıcaklığına alınıp steril laminar kabinde her örneğe 1 ml LB besiyeri eklendi. Tüm tüplerin kapakları dışarı örnek akmayacak şekilde iyice parafilmle sarılıp çalkalamalı inkübatörün zeminine bantlandı. Zemine tutturulan örnekler 37 °C'de 1 saat boyunca 220 rpm hızda inkübasyona bırakıldı. Sürenin bitiminde bakteriler 10 000 rpm hızda 30 saniye santrifüj edildi ve bakteri peleti 1 mL LB sıvı besiyeriyle yıkandı. Bu yıkama işlemi ikinci kez tekrarlandı. İkinci santrifüjden sonra pelet üzerine 50 µL LB besiyeri eklenerek bakterileri resüspanse edildi ve 100 µg/mL ampisilin içeren LB-Agar petrilere ekildi. Bakterilerin ekildiği petri tabaklar transforme olan bakterilerin koloni oluşturabilmesi için 12 ila 16 saat arasında 37 °C'de inkübe edildi.

3.2.1.3. Bakteriden Plazmid İzolasyonu

Transformasyon işleminden sonra katı agar petride oluşan kolonilerden bir tanesi özeyle seçilerek 100 µg/mL ampisilin içeren 6 mL LB'ye inoküle edildi. Sonrasında 37 °C'de çalkalayıcı inkübatörde 220 rpm'de 14-16 saat arasında inkübasyona bırakıldı. Plazmid izolasyonu öncesinde çoğaltılan bakterilerin 600 nm dalga boyunda OD (optical density) değerinin 2.0-3.0 arasında olmasına özen gösterildi. Bakteri kültüründen plazmid izolasyonu için 4-5 mL alınarak plazmidler izole edildi. Bakteriyal kaynaklı endotoksinler memeli hücrelerine zarar verebileceği göz önüne alındığında, memeli hücrelerine transfeksiyonu yapılacak vektörlerden endotoksinlerin arındırılması gereklidir. Bu amaçla endotoksinleri uzaklaştırmaya uygun Plazmid DNA Mini Kiti (Omegabiotek) ile kit protokolüne uygun olarak aşağıdaki gibi izolasyon yapıldı.

İlk olarak OD₆₀₀ değeri 2.0-3.0 arasında olan bakteri kültüründen 1 mL alındı ve 10 000 g'de 1 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Bu santrifüj işlem beş kez tekrarlandı ve 5 mL toplam kültür hacmi tek eppendorfta pelet olarak toplandı. 250 µL solüsyon I (10 mg/µL RNase) pelet üzerine eklendi ve pelet resüspend edilerek yavaşça süt beyazı rengini alana kadar çözüldü. Sonrasında örnek üzerine 250 µL solüsyon II den eklendi ve temiz lizat görene kadar 5 dakikayı geçmeyecek şekilde tüpler alt üst edildi. Ardından tüp üzerine 125 µL N3 tamponundan (+4 °C'de soğutulmuş) eklendi. Alt-üst edilerek presipitasyon oluşması sağlandı. Oluşan presipitat en yüksek hızda (14 000 g) 10 dk santrifüj edildi. Bu sırada

kullanılacak olan filtreli kolanlar 3 M NaOH ile kalibre edildi. 100 µL 3 M NaOH eklendikten sonra yüksek hızda (14 000 g) 1 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen örnekte üste kalan süpernatant yeni eppendoraf alınırken hacmi ölçüldü. Hacmi ölçülen solüsyona ve aynı hacimde ETR tamponu (1:1 oranında) eklenerek toplam solüsyondan yaklaşık 700 µL alındı ve kalibre edilen filtre kolonlara eklendi. Sonrasında yüksek hızda (14 000 g) 1 dk santrifüj edildi. Tüm solüsyon karışımı kolondan geçirilene kadar bu işlem tekrarlandı. Filtre kolon üzerine 'ETR Wash' tamponundan 500 µL eklenerek 1 dk yüksek hızda (14 000 g) santrifüj edildi ve altta kalan solüsyon atıldı. Sonrasında kolonlara 'DNA Wash' (%70 etanol içerir) solüsyonundan 700 µL eklenerek aynı hızda (14 000 g) 1 dk santrifüj edildi. Bu adım bir kez daha tekrarlandı. İki kez yıkama yapıldıktan sonra kolonlarda alkol kalıntısı kalma ihtimaline karşı tüpler boş bir şekilde yüksek hızda (14 000 g) 3 dk santrifüj edildi. İzolasyonun son aşamasında kitle birlikte gelen 'Elüsyon' tamponundan 40-120 µL arasında eklendi ve yüksek hızda (14 000 g) 1 dk santrifüj edilerek izolasyon tamamlanmış oldu. İzole edilen plazmid örneklerinden 2 µL alındı ve %0.8'lik agaroz jele yüklendi. Yürütme işlemi 1X TAE tamponu içerisinde 60 voltta 1 saat gerçekleştirildi. Kontrol edilen plazmidlerin konsantrasyon ve kaliteleri nanodropta ölçülerek kullanılıncaya kadar -20 °C'ye kaldırıldı.

3.2.2. Hücre Kültürü Teknikleri

Bu proje çalışmasında, tez amacına uygun olarak yetişkin immortal insan keratinosit hücre hattı olan HaCaT hücreleri ve ek transfeksiyon çalışmaları için HEK293 hücreleri kullanıldı. Bu hücre hatları %1 Penisilin ve Streptomisin antibiyotiklerini (P/S) ve %10 FBS eklenmiş yüksek glukozlu DMEM (4.5 g/L Glukoz) besiyerinde kültüre edildi. Kültür işlemi 37 °C'de %5 CO₂ koşullarını sağlayan nemlendirilmiş hücre kültürü inkübatöründe gerçekleştirildi (176).

Kullanmış olduğumuz hücreler mikoplazma PCR testiyle üretici firmanın protokolü dikkate alınarak test edildi. Test sonucunda mikoplazma kontaminasyonu olmadığı tespit edilen hücreler çalışmalarda kullanıldı.

3.2.2.1. Dondurulmuş Hücrelerin Çözülmesi

Hücreleri çözmeden önce ilk olarak %20 FBS ve %1 P/S içeren besiyeri hazırlandı ve buz üzerine koyuldu. Sıvı azot tankı veya -80 °C'den çıkarılan hücreler 37 °C su banyosunda, içinde bir miktar bu parçası kalan kadar hızlı bir şekilde çözüldü. Çözülme işleminin ardından vial alkolle sterilize edilip kabine sokuldu ve buzda bekletilen besiyeri

üzerine hücreler eklenerek 1 200 rpm’de oda sıcaklığında 5 dk santrifüj edildi. Süre sonunda süpernatant atıldı ve aynı işlem tekrar edildi. İkinci kez yıkama yapılarak ortamdaki DMSO kalıntıları tamamen uzaklaştırıldı. Pelet %20 FBS ve %1 P/S içeren DMEM besiyeri içerisinde süspanse edilerek hangi boy flasktan dondurulduğunu dikkate alarak uygun boy flaska ekim yapıldı. Ertesi gün flastaki besiyeri ortamdan uzaklaştırılarak yerine taze hazırlanmış %10 FBS ve %1 P/S içeren besiyeri eklendi.

3.2.2.2. Hücrelerin Pasajlanması

Hücrelerin ekimin yapıldığı flaskın büyüme alanının %90-95’ini dolduran hücreler 1/5 oranında seyreltme işlemi yapılarak her seferinde yeni flaska alındılar. Pasajlama yapılırken ilk olarak flask içerisindeki besiyeri uzaklaştırılarak hücreler 1X PBS ile iki kez yıkandı. Flaskın boyutuna göre (T25 flaska 1 mL ve T75 flaska 3 mL) Tripsin/EDTA (T/E) ilave edilerek 37 °C’de inkübe edildi. Hücre-yüzey bağlantıları kopana kadar hücreler (Yabanıl tip HaCaT için yaklaşık 8-9 dakika, *PLAGL2* knock-out HaCaT hücreler için 12-13 dakika, HEK293 için yaklaşık 3-4 dakika) inkübatörde T/E içerisinde bekletildi. Süre bitiminde ortama enzim aktivitesini durdurmak için %10 FBS içeren besiyeri veya toplam hacimde %10 FBS olacak şekilde sadece FBS eklenerek hücreler steril 15 mL’lik falkon tüplere aktarıldı. Hemen ardından 1 200 rpm’de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırılarak pelet üzerine istenilen miktarda %10 FBS içeren besiyeri koyuldu ve süspanse edildi. Kullanılacak olan flaskın büyüklüğüne göre (T25 için 5 ml ve T75 için 12 ml) hücre besiyeri flaska koyuldu ve 1/5 oranında hücre süspansiyonundan seyreltme yapılarak hücreler flaska aktarıldı.

3.2.2.3. Hücrelerin Dondurulması

Dondurma işleminde kullanılan hücrelerin büyüme ortamı uzaklaştırılarak ilk etapta hücreler 1X PBS ile en az iki defa yıkandı. Ardından PBS atılarak hücrelerin üzerine kullanılan flaskın büyüklüğüne göre yeterli miktarda T/E ilave edildi ve hücrelerin yüzeyle bağlantısı koparıldı. T/E ilavesinden sonra reaksiyonu durdurmak için ortama %10 FBS içeren medyum eklendi. Sonrasında tüm hücre süspansiyonu steril 15 mL’lik falkona alınarak 1 200 rpm’de 5 dk santrifüj edildi. Bu sırada hücrelerin dondurulacağı vidalı dondurma tüplerinin (cryo-vial) üzerine gerekli bilgiler yazıldı ve buza koyuldu. Santrifüj sonrasında falkon içindeki besiyeri uzaklaştırılarak pelet üzerine tekrar %10 FBS içeren besiyeri koyuldu ve santrifüj işlemi tekrarlandı. Falkondaki besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra hücre peleti üzerine antibiyotik içermeyen ve %20 FBS içeren soğuk besiyerinden 900 µL

eklenerek hücreler süspanse edildi ve buzda bekletilmiş olan dondurma tüplerine alındı. Hücreleri içeren dondurma tüpleri buz üzerinde 10 dk bekletildi ve süre sonunda kabin içerisinde hücrelerin üzerine 100 µL DMSO (%10) eklendi. Eklenen DMSO ve hücre süspanسیونun iyice karışması adına kapağı kapatılan dondurma tüpü birkaç kez yavaş bir şekilde alt-üst edilerek karışım sağlandı ve tekrar buza koyularak 10 dk daha buz üzerinde bekletildi. Süre bitiminde tüpler pamukla sarıldı ve -20 °C'ye kaldırılarak 2-3 saat bekletildi. Sonrasında hücreler -80 °C'de 24 saat tutuldu ardından da uzun süreli saklanması için sıvı nitrojen içeren hücre saklama tankına transferi gerçekleştirildi. Yedekleme esnasında kısa süreli kullanılacak olan hücreler -80 °C'de, daha uzun sürede kullanılacak hücreler sıvı nitrojene saklandı.

3.2.2.4. Memeli Hücrelerinin Geçici Transfekte Edilmesine Yönelik Çalışmalar

Bu tez çalışmasında yapılan transfeksiyon yöntemi olarak kalsiyum fosfat ve lipozoma dayalı iki farklı yaklaşım kullanıldı. Lipozom bazlı transfeksiyonda ise Lipofectmax (ABP Bioscience) ve PEI (Polysciences) ajanlarına başvuruldu (Tablo 5).

Tablo 5. Transfeksiyon çalışmalarında kullanılan lipozom bazlı ajanlar ve önerilen ajan/DNA miktarları

Kullanılan ajan adı	Önerilen DNA miktarı (µg)	Ajan miktarı (µL)
Lipofectmax	1	2
PEI	1	3

Kalsiyum Fosfat Yöntemi ile Transfeksiyon

HaCaT hücreleri dışındaki HEK293 hücrelerinin transfeksiyonu için HEPES tamponu içerisinde, DNA'nın kalsiyum fosfatla presipitat oluşturarak endositozla hücre içine alınması temeline dayanan "Kalsiyum Fosfat Transfeksiyon" yöntemine başvuruldu (177).

HEK293 hücreleri 24 kuyucuklu tabaklar için %60-70 konfluent olacak şekilde, P/S olmayan medyuma bir gün öncesinden ekilerek hazırlandı. 500 µL besiyeri için 0.5 µg vektör kullanıldı. Vektör DNA'sı apirojen suyla 10 µL'ye tamamlandı. 2.5 M CaCl₂'den 2.5 µL alınarak, 500 µL besiyerinde çalışma konsantrasyonu 12.5 mM CaCl₂ olacak şekilde, 12.5 µL apirojen su içerisinde seyreltme yapıldı. Final hacim 25 µL olacak şekilde 10 µL DNA-

su karışımına 15 µL CaCl₂-su karışımı eklenerek oda sıcaklığında 5 dk inkübasyona bırakıldı. Süre bitiminde DNA-CaCl₂ karışımının üzerine yavaşça vorteks üzerinde damla damla 25 µL 2X HEPES eklenerek, toplam hacim 50 µL olacak şekilde ayarlandı. Hazırlanan 50 µL'lik DNA-CaCl₂-HEPES karışımı 20 dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra hücrelerin üzerine yavaşça damla damla eklendi ve altı kuyucuklu tabak hafifçe alt üst edilerek hücre kültürü inkübatörüne kaldırıldı. Yaklaşık 6 saat sonra hücrelerin üzerine 10% FBS ve toplam hacimde %1 P/S olacak şekilde antibiyotik içeren taze besiyeri eklendi. Transfeksiyon yaklaşık 24 saat sonra sonlandırıldı.

Lipozom Bazlı Kimyasal Ajanlarla Transfeksiyon

Deneyde kullanılacak HaCaT hücrelerinden 5×10^5 hücre sayılarak içerisinde %10 FBS bulunan DMEM besiyeriyle birlikte 60 mm hücre kültürü tabaklarına ekildi. Ekimi yapılan hücreler 37 °C'de %5 CO₂ koşullarında hücre kültürü inkübatöründe inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün Lipofectmax (ABP Bioscience) kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda transfeksiyon gerçekleştirildi (Tablo 5). Cas9n sistemi kullanılmasından dolayı kırık oluşturacak farklı sgRNA içeren PX462 vektörleri aynı hücreye her birinden 1.75 µg olacak şekilde toplam 3.5 µg DNA ve 7 µL ajan (bir hacim DNA/iki hacim Lipofectmax) kullanılarak gerçekleştirildi. DNA ve ajan ayrı ayrı 500 µL opti-MEM medyumunda hazırlandı, ajan karışımı DNA karışımının üzerine eklenip pipet ile dört-beş kez al-ver yapıldı ve oda sıcaklığında 15 dakika kabin ışığı kapatılarak inkübe edildikten sonra damla damla hücrelerin üzerine eklendi. Transfekte edilen hücreler 37 °C'de %5 CO₂ koşullarını sağlayan nemlendirilmiş inkübatörde kültüre edildi. Transfeksiyondan 12 saat sonra medyum %10 FBS ve antibiyotik içeren medyumla değiştirildi.

Lipozom Bazlı Kimyasal Ajanlarla Ters (Reverse) Transfeksiyon

Yüksek transfeksiyon verimine ihtiyaç duyduğumuz koşullarda süspanse edilen hücrelerin DNA/RNA ile temasını arttırarak transfeksiyon veriminin yükseltilmesini hedefleyen ters transfeksiyon yöntemine başvuruldu (178, 179). Bu yaklaşımda, ilk olarak hücreler süspanse edildi ve 24 kuyucuklu hücre kültürü tabaklarında 2×10^5 hücre olacak şekilde seyreltildi. Bu çalışma esnasında lipozom bazlı kimyasal ajanlardan daha verimli olduğunu gözlemlediğimiz PEI (Polysciences) ajanı kullanılarak transfeksiyon yapıldı. DNA ve ajan karışımları 0.35 µg plazmid DNA ve 1.05 µL PEI ajan olacak şekilde kullanıldı (Tablo 5). DNA ve ajan ayrı ayrı 25 µL opti-MEM medyumunda hazırlandı, ajan karışımı DNA karışımının üzerine eklenip pipet ile dört-beş kez al-ver yapılarak karıştırıldı ve oda

sıcaklığında 15 dakika kabin ışığı kapatılarak inkübe edildi. Sonrasında 24 kuyucuklu tabağın ortasına eklendi. Ardından 2×10^5 hücre içeren, antibiyotik içermeyen 450 μ L %10 FBS-DIMEM besiyeri, 24 kuyucuklu tabakta bulunan ajan ve DNA karışımının üzerine ekledi. Hücreler eklendikten sonra, eklenen hücrelerin 24 kuyucukla tabağın ortasında toplanmasını önlemek için tabağa alttan çok nazik bir şekilde parmak uçlarıyla vurulurken (titreşim hareketi gibi) bu esnada tabak hafif sağ-sol ve aşağı-yukarı hareket ettirildi. Sonrasında hücreler 37 °C’de %5 CO₂ nemlendirilmiş inkübatörde 14-16 saat kültüre edildi. İnkübasyon sonunda hücrelerin üzerinden besiyeri çekilerek antibiyotik içeren taze %10 FBS-DMEM besiyeri ilave edildi sonrasında 8-12 saat daha inkübasyona bırakılarak, transfeksiyondan 24 saat sonra deney analizler için sonlandırıldı.

3.2.3. Protein Analiz Yöntemlerine Dayalı Teknikler

3.2.3.1. Örneklerden Protein İzolasyonu

Protein analizi öncesinde -80 °C’den alınan peletler buz üzerine alınarak, her bir örneğe hücre sayısına bağlı olarak 100-250 μ L arasında TNTE patlatma solüsyonu (lisis tamponu) ilave edildi ve buzda 20 dk çalkalanarak inkübasyona bırakıldı. Oldukça yapışkan yapıya sahip genomik DNA’nın parçalanmasını sağlayarak protein eldesinin verimini artırmak ve proteine yönelik uygulamaları, eşit hacim alınması, jele yüklenmesi gibi kolaylaştırmak için buz içerisinde %50 genlikte (amplitude) üç döngü sonikasyon (5 saniye pulse, 20 saniye bekleme) yapıldı. Sonikasyonun hemen ardında örnekler 4 °C’de 15 000 g’de 15 dk santrifüj edildi ve süpernatantlar temiz eppendorf tüplere alındı. Hücre lizatlarındaki protein konsantrasyonları ilk olarak BCA protein miktarı belirleme kiti (Thermo) kullanılarak belirlendi. Sonrasında örneklerden eşit miktarda protein alındı ve SDS-PAGE jeline yüklendi. PLAGL2 ve housekeeping β -aktin proteinlerini görüntülemek için immüno blot analizleri gerçekleştirildi.

3.2.3.2. BCA Kiti Kullanılarak Protein Miktarı Tayini

Örneklerdeki protein miktarını ölçmek için BCA protein kantitasyon kiti (Thermo) üretici firmanın önerileri doğrultusunda kullanıldı. Bazı durumlarda çok yoğun hücre ($>1 \times 10^6$) kullanılarak lizat elde edilmişse, lizatın bir miktarı ilk olarak 1:5 veya 1:3 oranında lisis tamponu ile seyreltilti. Çok yoğun hücre kullanılmamışsa lizatlar seyreltilmeden direk kullanıldı ve buz üzerine alındı. O sırada, kitle birlikte gelen Bovine Serum albumin (BSA, 2 mg/mL) kullanılarak Tablo 6’da belirtildiği şekliyle seri dilüsyonlar yapıldı.

Tablo 6. BSA standardı kullanılarak seri dilüsyon hazırlanması

Tüp No	Standartlar	Hazırlanışı
1	Blank	Sadece Lizis Tamponu (35 µL)
2	2 mg/mL BSA	70 -
3	1 mg/mL BSA	(Tüp 2)'den 35 µL 35 µL Lizis tamponu
4	0.5 mg/mL BSA	(Tüp 3)'den 35 µL 35 µL Lizis tamponu
5	0.25 mg/mL BSA	(Tüp 4)'den 35 µL 35 µL Lizis tamponu
6	0.125 mg/mL BSA	(Tüp 5)'den 35 µL 35 µL Lizis tamponu

Çalışma solüsyonu kitle birlikte gelen 50 birim reaktif A, 1 birim reaktif B ile karıştırılarak hazırlandı ve berrak yeşil bir solüsyon elde edilene kadar karışım vortekslendi ve karanlıkta bekletildi. Her bir BSA standardı (1-6 tüpler) ve örnekler üç replika olacak şekilde 96 kuyucuklu tabaklara 10 µL yüklendi. Tüm örneklerin üzerine hazırlanmış olan çalışma boyasından 200 µL ilave edildi. Mikroplate üzeri alüminyum folyo ile kapatıldı ve 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler spektrofotometrede (Eppendorf) 562 nm dalga boyunda ölçüldü. Standartlardan elde edilen değerlerle absorbans-konsantrasyon grafiği çizildi. Standard eğri denklemi kullanılarak örneklerin protein konsantrasyonları hesaplandı.

3.2.3.3. İmmünoelot Yöntemi

SDS-PAGE Yapılması

SDS-PAGE Jel Elektroforez CamLarının Hazırlanması

Poliakrilamid jelin dökülmesi için tasarlanmış 1 mm'lik kısa ve uzun camlar ilk önce distile su ile yıkadı, sonrasında %70'lik etanol ile toz parçası kalmayacak şekilde temizlendi. Temizlenen camlar jel standına yerleştirildikten sonra jel dökmeden hemen önce distile su eklenerek stant zemininde herhangi bir sızma olup olmadığı kontrol edildi.

SDS-PAGE Ayırma ve Yükleme Jellerinin Hazırlanması

İlgilenilen proteinin molekül ağırlığına bakılarak SDS-PAGE ayırma jeli içeriğine göre karışım hazırlandı (Tablo 7) ve jel dökülürken 1 mm'lik camlar kullanıldı. Hazırlanan karışım camın üst sınırının 1.5-2 cm altına denk gelecek şekilde döküldü. Ardından dökülen jelin üzerine hem havayla teması önlemek hem de düz bir şekilde polimerize olmasını sağlamak için yaklaşık 1-2 mL soğuk izopropil alkol eklendi. Jelin polimerleşmesi için

yaklaşık 1 saat oda sıcaklığında beklendi. Jel polimerleşince üzerindeki alkol dökülerek, jelin üst kısmı bir iki kez distile su ile yıkandı ve alkol uzaklaştırıldı.

Sonrasında Tablo 7'deki içerikler kullanılarak %5 konsantrasyonda yükleme jeli karışımı hazırlandı (Tablo 7) ve ayırma jelinin üzerine dikkatli bir şekilde döküldü. Kullanım durumuna göre 1 mm 10 veya 15'li taraklar %70'lik etanol ile temizlenerek camlar arasındaki ayırma jeli karışımının içerisine yerleştirildi. Yükleme jelinin polimerizasyonu için yaklaşık 1 saat beklendi. Süre sonunda jeller suyla ıslatılmış kağıt peçeteyle kaplanarak hava almayacak şekilde streç film ile sarıldı ve +4 °C'ye kaldırıldı. Hazırlanan SDS-PAGE jeller en az 1 gün boyunca +4 °C'de bekletildikten sonra kullanıldı.

Tablo 7. %7.5'lik ayırma ve %5'lik yükleme jeli içeriği

İçerik (1X)	%7.5 (1 mm)	%5 (1 mm)
ddH ₂ O	2.73 mL	1.57 mL
Acrylamid karışımı (%40)	0.94 mL	0.25 mL
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	1.25 mL	-
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	-	0.625 mL
%10 SDS	0.05 mL	0.025 mL
%10 APS*	0.05 mL	0.025 mL
TEMED	5 µL	1.5 µL
Toplam	5 mL	2.5 mL

* Taze hazırlanmalıdır.

SDS-PAGE Örneklerin Yüklenmesi ve Yürütülmesi

SDS-PAGE çalışmalarına başlamadan önce nihai konsantrasyon 1X olacak şekilde protein yükleme boyası hücre lizatlarına ilave edilerek (Boya: Lizat; 1:4), önceden 99 °C'ye getirilmiş termal blokta 5 dakika kaynatıldı. Kaynatma işleminin ardından lizatlar oda sıcaklığında 14 000 g'de 30 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sırasında daha önceden hazırlanan poliakrilamid jelin tarakları çıkartılarak jelin kuyuları distile suyla temizlendi ve jel elektroforez yükleme standında yerleştirildi. Sonrasında, yükleme standına ve dikey elektroforez tankına 1X SDS-PAGE yürütme tamponu koyularak, yükleme standı tanka yerleştirildi. Eğer bir jel yürütülecekse, tanka iki jel için gerekli olan seviye çizgisinin yarısına kadar yürütme tamponu eklendi. Örnek yükleme sırasında birinci kuyuya protein markırdan (Bio-Rad) 2-3 µL, jelin kuyu sayısına göre 15 ve 10 taraklı kuyular için sırasıyla 20 ve 40 µL'yi aşmayacak şekilde örnekler jele yüklendi. Jel ilk etapta 75 voltta 15 dakika sonrasında 100 voltta 90-100 dakika yürütüldü.

İmmüno blotlama

Çalışmada, analiz edilecek örnekler SDS-PAGE elektroforezinde yürütüldükten sonra ıslak blotlama yöntemiyle nitroselüloz membrana aktarıldı. Yöntemi uygularken ilk etapta SDS-PAGE elektroforezinde yürütülen jel, yürütme sonrasında elektroforez tankından çıkarıldı ve distile birkaç defa suyla arındırıldı. BioRAD sistemine ait spatula yardımıyla küçük ve büyük cam dikkatli bir şekilde birbirinden ayrıldı. Ayırma yapılırken jelin küçük camda kalmasına özen gösterildi ve jelin yükleme kısmı spatulayla uzaklaştırılarak 5-10 dakika 1X transfer tamponunda dengelendi. Jel boyutuna göre kesilen 0.45 µm nitroselüloz membran da 1X transfer tamponu içerisine alındı ve 5-10 dakika ıslatıldı (PVDF membran ise metanol içinde 1 dakika aktive edildi ve sonrasında 5-10 dakika 1X transfer tamponunda dengelendi). Önceden hazırlanmış ve 4 °C’de bekletilmiş olan soğuk 500 mL 1X transfer tamponundan bir miktar kaba koyuldu. Ardından içerisinde jel boyutundan biraz daha büyük kesilmiş dört adet 3 mm Whatman kağıdı ve elektroforez sistemine ait olan iki adet sünger yatak ıslatıldı. Blotlama aşamasına geçilirken blotlama kasetinin siyah yüzeyine ilk olarak 1X transfer tamponunda ıslatılmış sünger yatak ve yatağın üzerine bir adet ıslatılmış Whatman kağıdı koyuldu. İkinci ıslatılmış olan Whatman kağıdı küçük cam üzerinde bırakılan jelin üzerine tam ortalayacak şekilde yerleştirildi. Whatman kağıdı altta kalacak şekilde ters çevrilerek küçük cam jelden ayrıldı ve Whatman kağıdı üzerine jel geçirilmiş oldu. Sonrasında üzerinde jel bulunan ikinci Whatman kağıdı, kaset üzerinde bulunan birinci ıslatılmış Whatman kağıdının üzerine yerleştirildi. Ardından 1X transfer tamponunda ıslatılmış olan nitroselüloz membran jelin üzerine dikkatli bir şekilde yerleştirildi ve hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Membran yerleştirildikten sonra, membran üzerine iki adet ıslatılmış Whatman kağıdı sırasıyla koyuldu ve her bir Whatman koyulurken ‘roller’ aparatı ile hava kabarcıkları oluşmuşsa giderildi. Son olarak iki Whatman kağıdı üzerine ıslatılmış olan diğer sünger yatak yerleştirilerek blotlama kaseti kapatıldı. Blotlama kaseti transfer tankında siyah renkle belirtilmiş katot, kırmızıyla belirtilmiş anot kısmıyla örtülecek şekilde tank içine alındı. Transfer işlemi 100 voltta 75 dakikada gerçekleştirildi. Aktarım sonrasında membran distile su içerisine alındı. Bir-iki kez yıkandıktan sonra üzerine membranı tam kaplayacak şekilde Poncue S boyası ilave edildi. Membrandaki proteinler görününceye kadar boya bekletildi. Ardından boya, tekrar kabına koyuldu. Protein bantları ortaya çıkınca membranda hava kabarcığı ya da transferden kaynaklı bir sorun olup olmadığı kontrol edildi ve membran harici bir kamera ile fotoğraflandı. Kontrol sonrasında boyalı membranda örneklerin bulunduğu yüzey kurşun

kalemle işaretlenerek %0.05 Tween 20 içeren TBS (1X TBST) tamponuna aktarılarak bir iki kez yıkandı. Yıkanan membran üzerine oda sıcaklığında 1 saat bekletilmek üzere bloklayıcı solüsyonundan yaklaşık 5 mL eklendi ve çalkalayıcıda inkübe edildi. Bir saatin sonunda bloklayıcı solüsyonu uzaklaştırılarak primer antikorlu içeren solüsyon üretici firmanın önerileri doğrultusunda hazırlandı ve membran üzerine eklendi. Belirlenen inkübasyon süresinin ardından membran yıkanarak hazırlanan sekonder antikorlarla oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı. Ardından membran üzerindeki sekonder antikor solüsyonu uzaklaştırılıp çalkalayıcıda beş kez beşer dakika 1X TBST ile yıkandı (Tablo 8). Son aşamada membran, proteinleri görüntülemek üzere HRP substratı içeren Western ECL (Bio-Rad) kitiyle muamele edildi ve ChemiDoc MP görüntüleme sistemiyle (Bio-Rad) görüntülendi.

Tablo 8. İmmunblotlama koşulları

Jel konsantrasyonu	%7.5
Membran tipi	Nitroselüloz (0.45 µm)
Bloklayıcı	%5 yağsız süt tozu içeren 1X TBST ile oda sıcaklığında 1 saat
Primer antikorlar	Rabbit Anti-PLAGL2 1:7500 Mouse Anti-FLAG 1:5000 Mouse β-aktin 1:5000
Primer antikor inkübasyonu	1X TBST içinde 4 °C’de 12-16 saat
Yıkama	1X TBST ile 5X 5 dakika
Sekonder antikorlar	Goat Anti-Rabbit IgG-HRP Goat Anti-Mouse IgG-HRP
Sekonder antikor inkübasyonu	%2.5 yağsız süt tozu içeren 1X TBST içinde 1:5000 oranında oda sıcaklığında 1 saat
Yıkama	1X TBST ile 5X 5 dakika ardından, 1X TBS ile 1X 3 dakika
Görüntüleme	700 µL Clarity Western ECL Substrate (1:1 oranda Luminol Enhancer+Peroksit, 3 dakika)

3.2.4. DNA Temelli Teknikler

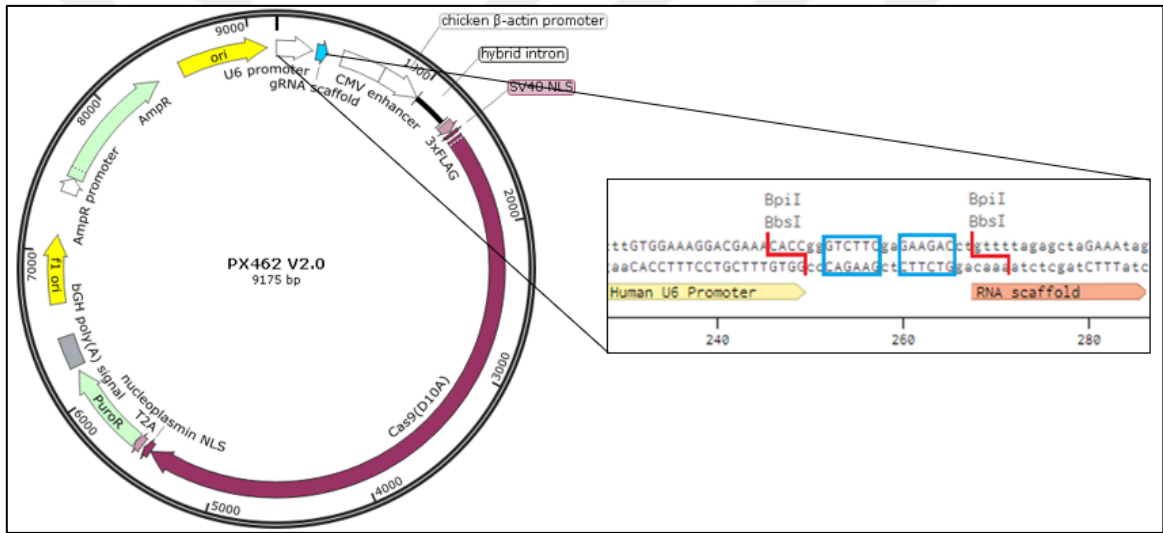
3.2.4.1. CRISPR/Cas9n Sisteminin Hazırlanması

Bu tez çalışmasında PLAGL2’nin ekspresyonunu tamamen engellemek için güncel genom düzenleme araçlarından biri olan CRISPR/Cas9n sistemi kullanıldı. Sistemin hazırlanması ve uygulanması için *Ran* ve *ark.* izlediği yaklaşımlar modifiye edildi. Cas9n

sistemi, sgRNA'nın ve Cas9'un birlikte ifadesini sağlayan pSPCas9n(BB)2A Puro (PX462) V2 vektörü kullanılarak uygulandı. Cas9 sisteminden farklı olarak bu sistemde Cas9'un genomda hedef dışı bölgelere (off-target) yönlendiğinde INDEL oluşturma riskini belirgin derecede azaltan Cas9 nickase [Cas9n; Cas9 (D10A)] yer almaktadır. Bu sistemin uygulanması için birbirine yakın iki farklı sgRNA tasarlanıp aynı konağa verilmesi gerekir (169).

CRISPR/Cas9n Sisteminde Kullanılacak Olan PX462 Vektörüne Ait Bilgiler

CRISPR/Cas9n sisteminde kullanılacak olan rekombinant vektörün pSPCas9n(BB)2A Puro (PX462) genom haritası Şekil 14'te gösterilmiştir (180).



Şekil 14. PX462 vektörüne ait genom haritası ve sgRNA'ların klonlanacağı *BbsI* (*BpiI*) bölgesi. Enzim tanıma bölgesi mavi kutularla kesim bölgesi kırmızı çizgiler ile gösterilmiştir (Addgene, 180).

Rehber RNA (sgRNA) Tasarlanması

CRISPR/Cas9 sisteminin en can alıcı noktası, düzenlenmesi istenilen genin hedef lokusuna yönlendirilmek üzere kullanılan sgRNA'ların seçimidir. sgRNA'ların tasarımı için birçok farklı algoritmanın kullanıldığı web tabanlı programlar bulunmaktadır (181). Bu tez çalışmasında kullanılan sgRNA çiftleri Benchling biyoinformatik aracı kullanılarak araştırıldı (182). Optimum parametre olarak on-target skoru 60'ın üzerinde olan ve off-target skoru da 50'nin üzerinde olan sgRNA'lar seçildi, hedef dışı (off-target) analizler ise CCTOP (183) web arayüzü kullanılarak yapıldı. Çalışmamızda Cas9n ekspres eden CRISPR sistemi kullanılacağından *PLAGL2* genini alt ve üst zincirden 20 bp mesafeden kesen iki farklı

sgRNA belirlendi. Ayrıca, kontrol olarak, genomda hiçbir yeri hedeflemeyen (scramble) ve daha evvel bir çalışmada kontrol olarak kullanıldığı raporlanan sgRNA dizisi kullanıldı (184).

PX462 Vektörünün Linearize Edilmesi

pSPCas9n (BB)2A Puro (PX462) V2 vektörüne sgRNA'ların klonlanması için vektör üzerinde bulunan *Bbs*I restriksiyon enzim kesim bölgesinden kesilerek linearize hale getirildi. 1 µg DNA'yı kesmek için 10 U enzim kullanıldı. Kesim reaksiyonu aşağıdaki koşullara göre 37 °C'de 4 saatte gerçekleştirildi (Tablo 9).

Tablo 9. *Bbs*I enzimi kesim reaksiyon koşulları

Reaksiyon İçeriği	1X
Plazmid DNA (PX462, 100 ng/µL)	25 µL
<i>Bbs</i> I (10 U/µL)	2.5 µL
10X Tampon G	5 µL
Apirojen su	17.5 µL
Toplam	50 µL

PX462 Vektörünün Kesimi Sonrası Temizlenmesi

PX462 vektörünün *Bbs*I ile kesilmesinin ardından kesim ürünleri MN PCR Clean-up kitiyle protokole uygun bir şekilde saflaştırıldı. Saflaştırma yapılırken kesimi yapılmış olan vektör ürünlerine son hacim 100 µL olacak şekilde apirojen su ilavesi yapıldı ve aynı örnek üzerine kit içerisinde gelen NT1 solüsyonundan 200 µL ilave edildi. Ürün ve NT1 solüsyon karışımının tamamı (yaklaşık 300 µL) kitle birlikte gelen kristal kolon içerisine aktarıldı ve 11 000 g'de 30 saniye santrifüj edildi. Ardından altta kalan solüsyon atılarak kolon üzerine tekrar kit içerisindeki diğer bir solüsyon olan NT3'ten 700 µL ilave edilerek santrifüj işlemi tekrarlandı. Santrifüj bittikten sonra kolon membranındaki etanol kalıntısını uzaklaştırmak için kolon boş bir şekilde 11 000 g'de 2 dakika daha santrifüj edildi. Sonrasında kolon steril yeni bir eppendorf tüp üzerine alındı ve membranın tam ortasına kitle birlikte gelen DNA elüsyon tamponundan (NE) 60 µL ilave edilerek tüp ve kolon ikilisi santrifüj cihazına koyuldu. İki-üç dakika cihaz içerisinde oda sıcaklığında bekledikten sonra kolonlar 11 000 g'de 60 saniye santrifüj edildi ve ürünler saflaştırılmış oldu. Ardından

eppendorf tüpteki saflaştırılan ürünler reaksiyon ortamına 10X DNA yükleme tamponu eklenerek %0.6'lık agaroz jele yüklendi ve 1X TAE tamponu kullanılarak 80 voltta 1 saat yürütüldü.

Oligolarının Hazırlanması

Tasarlan sgRNA'ların 5'OH ucu tercihe göre fosforile edilmiş veya edilmemiş halde üretici firmadan sipariş edilebilmektedir. sgRNA tek zincire yönelik tasarlanır (forward, ileri) ancak sipariş edilirken, karşı eşlenik zincire de karşılık gelecek şekilde (reverse, geri) primer sipariş edilir. Bu karşılıklı zincirlerin hidrojen bağı oluşturarak çift zincir hale getirilmesi işlemine oligomerizasyon denir.

İlgili vektöre sgRNA'ların klonlanabilmesi için, sgRNA'ların çift zincir hale getirilmesi için oligomerize edilmesi gerekmektedir. Sipariş ettiğimiz sgRNA'ların 5'OH uçları fosforile olmadığı için oligomerizasyon öncesinde sgRNA'ların 5' OH uçları T4 polinükleotid kinaz (BioLabs) ile fosforile edildi. Fosforilasyon için örnekler ilk etapta 37 °C'de 30 dakika ardından oligomerizasyon için 95 °C'de 5 dakika ve 25 °C'de 5 dakika olacak şekilde PCR makinesi (Techne) kullanılarak inkübe edildi. Fosforilasyon ve oligomerizasyon için gerçekleştirilen reaksiyon içeriği Tablo 10'da belirtilmiştir.

Tablo 10. sgRNA'ların fosforillenme ve oligomerizasyonu için hazırlanan reaksiyon

Reaksiyon İçeriği	1X
İleri oligo (10 pmol/μL)	1 μL
Geri oligo (10 pmol/μL)	1 μL
T4 polinükleotid kinaz (10 U/μL)	1 μL
T4 polinükleotid kinaz tamponu (10X)	1 μL
Apirojen su	6 μL
Toplam	10 μL

Hazırlanan sgRNA Oligolarının PX462 Vektörüne Klonlanması

Oluşturulan oligomerlerin (Oligo 1, 2 ve kontrol) *Bbs*I ile kesilmiş olan PX462'ye klonlanması için T4 DNA Ligaz (BioLabs) enzimi kullanıldı.

Klonlama esnasında reaksiyon üretici firmanın önerileri doğrultusunda aşağıdaki şekilde kuruldu (Tablo 11). Reaksiyon oda sıcaklığında 15 dakika ardından 65 °C’de 10 dakika inkübe edilerek gerçekleştirildi.

Tablo 11. Oligomerlerin PX462 vektörüne klonlama reaksiyon koşulları

Reaksiyon İçeriği	1X
Oligomer	1 µL
<i>Bbs</i> I ile kesilmiş PX462 (100 ng/µL)	1 µL
T4 DNA Ligaz (400 U/µL)	0.5 µL
T4 DNA Ligaz tampon (10X)	1 µL
Apirojen su	6.5 µL
Toplam	10 µL

Sonrasında ligasyon ürünün 5 µL’si *E.coli* DH5α suşuna transforme edildi. Seçilen bakteri kolonilerinden E.Z.N.A. Endo-free® mini prep kit (Omegabiotek) ile izole edilen plazmidlerde sgRNA oligomerlerinin yerleşimi hem *Bbs*I enzim kesimiyle hem de Sanger dizileme yöntemiyle kontrol edildi.

Tüm Çalışmalarda Kullanılan Primerlerin Listesi

Tablo 12. Kullanılan tüm primerlerin listesi

Primer no	Primer dizisi (5’-3’)	Primer adı
Pr. 1055	CTTACCGCACTCAGAGCAG	PLAGL2_403_R
Pr. 1222	GTCCCAGCAACACACACTG	İnvolutrin-F
Pr. 1223	TTGGCTGTTTCATTGTGCTCC	İnvolutrin-R
Pr. 1654	TGCATTGCAAGCCTTTACCA	PLAGL2_Ex3_DNA_check_F
Pr. 1656	CAATGCACCGCACAATGGC	PLAGL2_RTPCR_F
Pr. 1657	AACAATCTCTTCACCGCGCTC	PLAGL2_RTPCR_R
Pr. 1664	CATGTTCGTCATGGGTGTGAAC	GAPDH_HouseKeeping_F
Pr. 1665	GACTGTGGTCATGAGTCCTTCC	GAPDH_HouseKeeping_R
Pr. 1697	GAGGGCCTATTTCCCATGATTCC	U6-Fwd primer
Pr. 1701	CACAACCAGAGCAGAGACCA	PLAGL2_Cas9n_Ex3_p1_RP11-274J2.1_CHECK_F
Pr. 1702	GCTTCTTCTCCTTGGCACTG	PLAGL2_Cas9n_Ex3_p1_RP11-274J2.1_CHECK_R
Pr. 1703	AGATTCCTCGGGACATTGGG	PLAGL2_Cas9n_Ex3_p2_TREML2_CHECK_F
Pr. 1704	GCCTCTCCCAAGACTGAAGT	PLAGL2_Cas9n_Ex3_p2_TREML2_CHECK_R

Yukarıdaki tabloda (Tablo 12) kullanılan primerlerin ana stokları Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı -80 °C stoğunda 100 pmol ve 10 pmol olacak şekilde sırasıyla stok ve çalışma konsantrasyonlarında hazırlanarak saklandı ve deney esnasında, 10 pmol konsantrasyonu olan primer kullanıldı.

sgRNA'ların Yerleştirildiği PX462 Vektörünün Sanger Yöntemiyle Dizilenmesi

Çalışmada kullanılan oligoların klonlandığı vektörler, dizileme reaksiyonlarında referans plazmidi olarak kullandığımız pGEM (Nimagen) plazmidiyle birlikte %0.6'lık agaroz jelde 80 voltta 1X TAE tamponu içerisinde 1 saat yürütüldü. Dizileme reaksiyonunda kullanılacak kalıp plazmid miktarı, pGEM plazmid miktarına göre ayarlandı. Dizileme reaksiyonu, Tablo 12'de belirtilen dizileme primerleri (İleri, Pr. 1697) kullanılarak gerçekleştirildi. Döngüsel dizileme reaksiyonu, Brilliant Dye Terminatör v3.1 Cycle Sequencing kitinin (NimaGen) önerdiği şekilde, Applied Biosystems 9700 Thermocycler cihazında aşağıda belirtilen koşullarda gerçekleştirildi (Tablo 13).

Tablo 13. PX462 vektörünün Sanger dizileme reaksiyon içeriği ve koşulları

Dizileme Reaksiyon İçeriği	1X
Brillant Boyası	0.75 µL
Tampon (5X)	1.625 µL
İleri ya da geri primer (10 pmol/µL)	0.5 µL
Kalıp DNA	- µL
Apirojen su	- µL
Toplam	10 µL

Döngüsel Dizileme Reaksiyon Koşulları	Sıcaklık	Süre
Başlangıç denatürasyonu	96 °C	45 saniye
Denatürasyon	96 °C	10 saniye
Bağlanma	50 °C	5 saniye
Sentez	60 °C	2 dakika
Bekleme	10 °C	∞

Dizileme Reaksiyonu Sonrası Örneklerin Sephadex G50 ile Temizlenmesi

İlk olarak 1 g SephadexG-50 tartılarak 13 ml apirojen suda çözüldü ve minimum 30 dakika +4 °C'de soğutuldu. Silika membran içeren spin kolon tüpler (Macherey Nagel) 2

mL'lik toplama tüpleri içerisine koyuldu. Kristal kolon tüplere yaklaşık 602 µL sephadexG-50 eklendi. Sephadex G50 alınırken ucu makasla kesilmiş pipet ucu kullanıldı. Sonrasında kolonlar 800 g'de 2 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonrası tüp içerisindeki alta kalan sıvı uzaklaştırıldı ve kolon tüpler 1.5 ml'lik etiketlenmiş eppendorf tüplerin içerisine dikkatlice koyuldu. Sanger dizileme reaksiyonu sonucunda oluşan PCR ürünleri kristal kolon içerisindeki SephadexG-50'nin tam ortasına pipet ucunu dolgu maddesine değdirmeden 10 µL ilave edilerek 750 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Ardından alttaki ürünlerin tamamı dizi analizi ABI 3130 genetik analizör cihazının 96 kuyucuklu tabağına yüklenerek dizilendi. Dizileme sonrasında sonuçlar 'Chromas 2.32' programı ile analiz edildi.

3.2.4.2. CRISPR/Cas9n Sisteminin Uygulanması

Seleksiyon için Antibiyotik Dozlarının Belirlenmesi

HaCaT hücrelerinde PX462 vektörünün transfeksiyon sonrasında seçimde kullanacağımız Puromisin'in hücreleri öldüren en düşük dozunun belirlenmesi çalışmaları gerçekleştirdi. Bu amaçla altı kuyucuklu tabağın her kuyusunda yaklaşık 3×10^5 hücre olacak şekilde HaCaT hücreleri ekildi. Ertesi gün, yaklaşık %40-50 doluluk oranında olan hücrelere 0.2, 0.3, 0.4, 0.6 ve 1 µg/mL Puromisin içeren besiyeri verildi. Puromisin hazırlanırken ilk olarak stoktan DIMEM ile 1/10 seyreltildi ve ardından ilgili konsantrasyonlarda hazırlandı. Sonrasında 72 saat boyunca 24 saatte bir Puromisin (Thermo) içeren besiyeri tazelenerek hücreler gözlemlendi ve ışık mikroskopunda Nikon fotoğraf makinesiyle görüntü alındı.

CRISPR/Cas9n Uygulaması Sonrası Monoklonal Hücre Seçimi

HaCaT hücrelerine iki farklı sgRNA'ların yerleştirildiği, PX462 vektörleri lipofectmax (ABP Bioscience) ajanıyla transfekte edildikten 24 saat sonra hücreler tripsinize edilerek yüzeyden kaldırıldı. Süspanse hücreler 1/10, 1/20, 1/40 oranlarında seyreltilerek her dilüsyondan üç adet olmak üzere toplamda dokuz adet 10 cm² lik tabaklara seyreltilerek bölündü. Hücrelerin yüzeye tutunduğundan emin olunduktan sonra, yaklaşık 6-8 saat, uygun dozu önceden belirlenen Puromisin (Thermo) (*Bkz. Alt başlık 4.1.5*) besiyeri ortamına eklenerek seçim başlatıldı. Aynı işlemler kontrol (scramble) sgRNA içeren PX462 vektörünün transfeksiyonu için de yapıldı. Her gün besiyeri ortamı Puromisin içeren taze yeni besiyeri ile değiştirildi. 72 saat sonunda Puromisin içeren besiyeri ortamdan çekildi ve %10 FBS ve %1 P/S içeren besiyeri ortama eklendi. Büyüme ortamı her üç günde bir temiz besiyeri ile değiştirildi ve koloni oluşumu gözlemlendi. Koloni seçiminde antibiyotik etkinliğini doğrulamak için transfekte edilmemiş HaCaT hücreleri kullanıldı. Koloniler

ortaya çıktıktan sonra kontrol sgRNA'ların ekspres edildiği tabaktan ve *PLAGL2*'yi hedefleyen sgRNA'ların transfekte edildiği tabaklardan sarı pipet uçlarının pipete takılan sert kısımlarını keserek elde ettiğimiz sarı halkalar kullanılarak koloniler seçildi. Otoklavda steril edilmiş ve pastör fırınında kurutulmuş halkalar doku kültürü kabini içerisinde kolonilerin etrafına dikkatlice yerleştirildiler. Halkaların içerisine 50 µL Tripsin/EDTA konuldu ve inkübatörde 37 °C'de HaCaT hücrelerin yüzeyden ayrılış süresi dikkate alınarak 9-10 dakika bekletildi. Sonrasında, Tripsin/EDTA'yı inhibe etmek için halka içine 10 µL FBS ilave edildi. Ardından hücreler alındı ve 500 µL 10% FBS ve 1% P/S içeren besi yerini önceden eklediğimiz 24 kuyucuklu tabaklara transfer edildi. İlk olarak 24 kuyucuklu tabaklarda büyütülen klonlar sırasıyla, altı kuyucuklu tabaklara, 25 cm² 'lik flaska ve son olarak 75 cm² flaska alınarak bol miktarda hücre elde edildi. Seçilen klonlar dondurularak -80 °C'de ve sıvı nitrojende saklandı. DNA, RNA ve protein analizleri için yaklaşık 1x10⁶ hücre tüplere dağıtıldı. Hücreler 1X PBS ile iki kez yıkandı ve elde edilen hücre peleti sıvı nitrojende dondurularak -80 °C'ye transfer edildi.

3.2.4.3. Uygulanan CRISPR/Cas9n Sisteminin INDEL Analizleri (On-Target)

Örneklerden DNA İzolasyonu

CRISPR/Cas9n uygulanan HaCaT klonlarından elde edilen hücrelerden, MN RapidLyse kitiyle (Macherey-Nagel) üretici firmanın önerileri dikkate alınarak DNA izolasyonu yapıldı. İzolasyona başlarken -80 °C'ye daha önceden sayılıp kaldırılan yaklaşık 1x10⁶ hücre içeren pelet tüpü çıkarılarak buza alındı ve peletin üzerine kitle birlikte gelen RLY tamponundan 150 µL ilave edildi. Sonrasında pelet ve tampon karışımı kit içerisindeki 2 mL'lik tüpe aktarıldı. Aktarılan karışım 0.2 mm şırıngadan köpürtmeden beş kez geçirildi. Sonrasında karışım üzerine 10 µL proteinaz K enzimi ilave edilerek 56 °C'de maksimum hızda (1 400 rpm) ısı bloğunda çalkalanarak 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüp üzerine kit içerisindeki RLB tamponundan 440 µL ilave edildi ve yavaşça pipetaj yapılarak karıştırıldı. Kitle birlikte gelen DNA RapidLyse kolonu içerisine tüm karışım eklenerek 11 000 g'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüjün ardından yıkama aşamaları için DNA'nın bağlandığı kolon yeni bir tüpe (2 mL) alındı ve üzerine kit içerisindeki RLW tamponundan 500 µL eklenerek 11 000 g'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Altta kalan solüsyon atılarak yıkama işlemi aynen tekrarlandı. İki kez yıkama işlemi yapıldıktan sonra kolon boş bir şekilde santrifüj cihazına yerleştirildi ve 11 000 g'de 2 dakika santrifüj yapıldı. Son aşamaya geçilirken verimi arttırmak adına kolon ve RLE elüsyon tamponu 60 °C etüvde 15

dakika ısıtıldı. Isıtılan filtre kolon 1.5 mL’lik DNaz/RNaz olmayan eppendorf tüpe alınarak filtrenin tam ortasına 60 °C’de ısıtılmış 100 µL RLE tamponundan dikkatli bir şekilde ilave edildi. Dört dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra filtre kolon 11 000 g’de 1 dk santrifüj yapıldı. İzolasyonu yapılan DNA’ların konsantrasyonu ve kalitesi nanodrop (Thermo) cihazıyla ölçüldü ve -20 °C’ye kaldırıldı.

İzole Edilen DNA Örneklerinden Hedef Bölgenin PCR ile Çoğaltılması

Elde edilen genomik DNA’ların konsantrasyonu ve kalitesi nanodrop cihazıyla ölçüldükten sonra *PLAGL2*’nin hedeflenen bölgesi Tablo 12’de belirtilen primerler (İleri, Pr. 1055-Geri, Pr. 1654) ve Taq Polimeraz enzimiyle (Promega) Tablo 14’teki koşullar kullanılarak PCR yöntemiyle çoğaltıldı. Negatif kontrol olarak kalıp DNA yerine su kullanıldı. Amplifikasyon sonrası PCR ürünlerinden %2’lik agaroz jele 2 µL yüklenip 1X TAE tamponu kullanılarak 100 Bp DNA markırıyla (NEB) birlikte 100 voltta 1 saat yürütüldü. Süre sonunda yürütülmüş olan PCR ürünleri kodak jel (Gel Logic) görüntüleme sistemi kullanılarak görüntülendi.

Tablo 14. Taq Polimeraz PCR içeriği ve reaksiyon koşulları

Taq Pol. PCR Reaksiyon İçeriği	1X
PCR mix tamponu (5X)	5 µL
Taq DNA Polimeraz (5 U/µL)	0.1 µL
İleri primer (10 pmol/µL)	0.6 µL
Geri primer (10 pmol/µL)	0.6 µL
dNTP karışımı (10 mM)	0.1 µL
MgCl ₂ (25 mM)	1.5 µL
Kalıp DNA	- µL
Apirojen su	- µL
Toplam	25 µL

Döngüsel Taq Pol. Reaksiyon Koşulları	Sıcaklık	Süre
Başlangıç denatürasyonu	94 °C	6 dakika
Denatürasyon	94 °C	30 saniye
Bağlanma	58 °C	40 saniye
Sentez	72 °C	30 saniye
Son sentez	72 °C	6 dakika
Bekleme	10 °C	∞

CloneJET PCR Klonlama Kiti Kullanarak PCR Ürünlerinin Klonlanması

Monoklonal hücre seçilimin ardından seçilen her bir klondaki *PLAGL2* hedef bölgesi PCR ile çoğaltılıp, elde edilen PCR ürünleri PCR temizleme kiti (Macherey-Nagel) kullanılarak saflaştırıldı ve Sanger dizileme yöntemiyle dizilendi. Dizileme sonrasında hedef bölgede meydana gelen heterozigot veya bileşik heterozigot varyasyonlardan dolayı INDEL analizi yapılamayan örneklerde her iki alelinin analizi için PCR ürünleri pJET1.2/blunt vektörüne (Thermo Fisher) klonlandı. Taq Polimeraz (Promega) enzimi ile çoğaltılan PCR ürünlerinin 3' ucunda dA (Deoksiadenozin) uzantısının oluşmasından dolayı ilk olarak blunt (küt uç) reaksiyonu kurularak 70 °C'de 5 dakika dA uzantısı küt uca dönüştürüldü (Tablo 15).

Tablo 15. CloneJET PCR klonlama kiti küt uç reaksiyon koşulları

Blunt Reaksiyon Karışımı	1X
Reaksiyon tamponu (2X)	5 µL
Saflaştırılmış PCR ürünü (8 ng/µL)	1 µL
DNA Blunting Enzyme	0.5 µL
Apirojen su	2.5 µL
Toplam	9 µL

Sonrasında örnekler hemen buz üzerine alındı ve ligaz reaksiyonu kuruldu. Öncelikle 0.5 µL pJET1.2/blunt vektörü (50 ng/µL) ve 0.5 µL T4 DNA Ligaz (5 U/µL) kullanılarak bir karışım hazırlandı. Bu karışımdan, buz üzerindeki Tablo 15'te belirtilen küt uç reaksiyon karışımının üzerine 1 µL eklendi. Hafif vorteksenerek oda sıcaklığında 10 dakika ligasyona bırakıldı. Süre sonunda 10 µL ligasyon karışımının 5 µL'si 50 µL DH5α hücrelerine transforme edildi ve Ampisilin içeren LB agar petride büyütüldü. Her bir örneğe ait PCR ürünlerini içeren transforme edilmiş DH5α petrilerinden steril kabin (Metisafe) içerisinde dörder koloni seçildi. Koloniler 10 µL apirojen suda çözüldü ve kit içeriğindeki vektöre özel tasarlanmış primerlerle Taq Polimeraz (Promega) ile Tablo 14'te belirtilen koşullar kullanılarak koloni PCR gerçekleştirildi. Koşullarda sadece bağlanma sıcaklığı 60 °C olarak değiştirildi. Ardından, her bir klon için dört koloni-PCR ürününden ikisi seçilerek önce SephadexG-50 boncuklardan geçirildi sonrasında ürünler kantitatif 100 bp DNA markırıla

(NEB) birlikte %2'lik agaroz jelde 1X TAE tamponu içerisinde 40 dakika yürütülerek görüntülendi ve kalıp DNA miktarı belirlendi. Kalıp miktarı belirlenmesinden sonra kitle birlikte gelen vektöre ait ileri primer ile Sanger yöntemiyle dizilendi.

3.2.4.4. Tasarlanan sgRNA'ların Olası Hedef Dışı Genler Üzerindeki Etkilerinin Analizleri (Off-Target)

CRISPR/Cas9n sisteminde her ne kadar hedef dışı etkinliği azaltmak için karşılıklı tek kırık oluşturacak olan sgRNA'lar kullanılsa da *Ran* ve *ark.* yaptıkları bir çalışmada Cas9n sisteminde hedef-dışı (off-target) aktivitenin 50 ile 1 000 kat arasında azaldığı, ancak tamamen engellenmediği gösterilmiştir (177). Bu nedenle elde ettiğimiz klonlarda, on-target dışında ayrıca olası hedef dışı varyasyonlar da analiz edildi.

Seçilen sgRNA'ların hedef dışı analizlerinin yapılması için ilk olarak sgRNA'ları içeren hedef bölge dizisi CCTOP (193) biyoinformatik aracı üzerinde ilgili alana kopyalandı. Ardından kullanılan CRISPR/Cas9n sistemine göre gerekli düzenlemeler yapıp analiz başlatıldı. Analiz sonucunda *PLAGL2* için seçilen sgRNA dizileri analiz sonuçları içerisinde aratılarak bulundu ve web arayüzü tarafından tüm genomda yönlenme ihtimali olan 20 genle birlikte listelendi. Belirlenen bu 20 gen genomdaki yerleşimlerine (ekzonik, intronik, genler arası) ve hedef diziden farklı olan baz sayılarına (mismatch, MM) göre program tarafından sıralandı.

PLAGL2 için tasarlanan sgRNA'ların olası hedef dışı bölgelere denk gelen genler analiz edilirken listelenen hedefler arasında genlerin ekzon bölgesine denk gelenler ve sgRNA ile arasında baz farklılığı bir-dört arası olanlar dikkate alındı. Bu kapsamda seçilen olası hedef-dışı genler seçildikten sonra sgRNA'ların bu genlerde INDEL'lere neden olup olmadığı incelendi. Primer 3 (185) web aracı kullanılarak sgRNA'nın hedefleyebileceği olası bölgeyi içine alacak şekilde ileri ve geri primerler tasarlandı. Tablo 12'de belirtilen primerler (İleri, Pr. 1701-Geri, Pr. 1702 ve İleri, Pr. 1703-Geri, Pr. 1704) ve Taq Polimeraz (Promega) ile Tablo 14'te belirtilen koşullar kullanılarak PCR reaksiyonu kuruldu. Ürünler 100 bp DNA markırla birlikte (NEB) %2'lik agaroz jelde 1X TAE tamponu içerisinde 40 dakika yürütülerek görüntülendi.

Ardından PCR ürünleri PCR-Clean up kiti (Macherey-Nagel) kullanarak temizlendi. Sonrasında SephadexG-50 boncuklardan geçirilerek tekrar %2'lik agaroz jelde 100 bp DNA markırla (NEB) birlikte 40 dakika 100 voltta yürütüldü ve kullanılacak olan kalıp DNA miktarı belirlendi. Aynı ileri primerler kullanılarak (İleri, Pr. 1701 ve İleri, Pr. 1703) Sanger

dizileme reaksiyonu kuruldu. Reaksiyon sonucunda hedef-dışı genlerde meydana gelen INDEL'ler Sanger dizilemeyle analiz edildi.

3.2.5. RNA Temelli Teknikler

3.2.5.1. Knock-out Klonlarda *PLAGL2* ve *İnvolutrin* İfadesinin Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR) Yöntemi ile mRNA Düzeyinde Belirlenmesi

CRISPR/Cas9n uygulanan hücrelerde *PLAGL2* ve ileri farklılaşma markörü olan *İnvolutrin* ekspresyonunu mRNA düzeyinde belirlemek üzere ilk olarak -80 °C'de saklanan hücre peletlerinden RNA izolasyonu yapıldı. İzolasyonun ardından RNA örnekleri cDNA'ya dönüştürüldü. cDNA örnekleri SYBR Green kiti (Bio-Rad) kullanılarak qRT-PCR ile analiz edildi. Reaksiyon sonunda *PLAGL2* ve *İnvolutrin* mRNA seviyesi standart eğri metodu kullanılarak hesaplandı.

Örneklerden RNA İzolasyonu

Örneklerden RNA izolasyonu MN RNA izolasyon kiti (Macherey-Nagel) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda belirtilen şekilde gerçekleştirildi. İlk olarak hücre peleti üzerine 350 µL RA1 tamponu ve 3.5 µL β-merkaptoetanol ilave edildi ve kuvvetlice vortekslendi. Hücrelerin homojenizasyonu için lizat üç kez 0.9 mm uca sahip 5 mL'lik enjektörden, sonrasında 1 mL'lik insülin iğnesinden köpürmemesine dikkat edilerek üç kez geçirildi. Ardından 350 µL lizat filtre edilmek üzere kit içindeki violet ring kolonuna aktarıldı ve 2 mL'lik toplama tüpünde 11 000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında filtre atıldı ve lizat üzerine 350 µL %70 DEPC ile muamele edilmiş suyla hazırlanmış etanol solüsyonu eklendi ve 10 kez pipetle yavaşça al-ver yapıldı. Lizat tekrar kitle birlikte gelen light blue ring kolonuna aktarıldı ve iki-üç kez al-ver yapıldı sonrasında tekrar 11 000 g'de 30 saniye santrifüj edilerek altta kalan solüsyon atıldı. Santrifüj sonunda aynı kolona 350 µL MDB tamponu eklendi ve 11 000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Altta kalan solüsyon tekrar atıldı. Bu sırada 90 µL rDNaz reaksiyon tamponu ve 10 µL sulandırılmış rDNaz birleştirilerek DNaz reaksiyon karışımı hazırlandı. rDNaz vortekslemeye hassas olduğundan hafifçe vurularak karıştırıldı. 100 µL'nin 95 µL'si direk kolondaki membranın ortasına koyuldu ve ısı bloğunda 30 °C'de 17 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kolon üzerine 200 µL RAW2 tamponu ilave edilerek 11 000 g'de 20 saniye santrifüj edildi. Sonrasında kolon 2 mL'lik yeni toplama tüpüne alındı. Aynı kolon üzerine 600 µL RA3 tamponu eklendi 11 000 g'de 30 saniye santrifüj edildi ve toplama tüpündeki solüsyon atıldı. Aynı kolon üzerine tekrar 250 µL RA3 tamponu eklendi 11 000

g'de 2 dakika santrifüj edildi. Kolon kitle birlikte gelen 1.5 mL nükleaz olmayan toplama tüpü üzerine yerleştirildi. Kolon üzerine 60 µL RNazdan arındırılmış kitle birlikte gelen su eklenerek 11 000 g'de 1 dk santrifüj edildi ve RNA elüsyonu gerçekleştirildi. Elüsyonun ardından RNA konsantrasyonu ve kalitesi nanodropta ölçüldü ve %1'lik agaroz jele 2 µL yüklenerek 1X TAE tamponu içerisinde 60 voltta 1 saat yürütülerek görüntülendi.

cDNA Sentezinin Gerçekleştirilmesi

Elde edilen RNA örneklerinden WizScript cDNA sentez kiti (Wizbio) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda aşağıdaki reaksiyon içeriği ve koşullarda cDNA sentezlendi (Tablo 16).

Tablo 16. WizScript cDNA sentez kiti içeriği ve reaksiyon koşulları

cDNA Reaksiyon İçeriği	1X
Reaksiyon tamponu (10X)	2 µL
dNTP karışımı (20X, 2.5 mM)	1 µL
Random Hexamer (50 pM)	2 µL
WizScript RTaz (200 U/µL)	1 µL
RNaz inhibitör (40 U/µL)	0.5 µL
RNaz olmayan su	3.5 µL
Kalıp RNA (50 ng/µL)	10 µL
Toplam	20 µL

RTaz. Reaksiyon Koşulları	
Sıcaklık	Süre
25 °C	10 dakika
37 °C	120 dakika
85 °C	5 dakika
4 °C	Süresiz

qRT-PCR ile *PLAGL2* ve *İnvolukrin* mRNA Ekspresyonunun Belirlenmesi

İzolasyonu yapılmış olan RNA örneklerindeki mRNA'nın cDNA'ya dönüştürülmesinin ardından, *PLAGL2* ve *İnvolukrin* mRNA seviyesi SYBR Green kiti (Bio-Rad) kullanılarak (Tablo 17) belirtilen koşullarda gerçekleştirildi. Reaksiyonda Tablo 12'de belirtilen *PLAGL2* (İleri, Pr. 1656 ve Geri, Pr. 1657), *İnvolukrin* (İleri Pr. 1222 ve Geri Pr.

1223) ve örnekler arası farkı normalizasyon için kullanılacak olan housekeeping *GAPDH* genine ait (İleri, Pr. 1664 ve Geri, Pr. 1665) primerler kullanıldı.

PLAGL2 ve *İnvolutrin* genlerinin ekspresyon analizi için standart eğriye dayalı kantitatif q-PCR metoduna başvuruldu (186). Standart eğri oluşturmak için scramble (kontrol) hücrelerinden elde edilmiş olan cDNA, *PLAGL2*, *İnvolutrin* ve *GAPDH* için standart eğri oluşturmak üzere 50, 25, 12.5, 6.25 ve 3.125 ng/μL olacak şekilde apirojen su ile seyreltildi ve Tablo 17’de ‘reaksiyon içeriği’ dikkate alınarak 96 kuyucuklu tabağa koyuldu. Ayrıca, analizleri yapılacak olan scramble (kontrol) ve *PLAGL2* knock-out klonlardan elde edilen cDNA örnekleri 1/10 seyreltilerek 4 μL farklı kuyucuklara eklendi. *PLAGL2*, *İnvolutrin* ve *GAPDH* primer setleri için Tablo 17’de belirtilen koşullarda ayrı ayrı reaksiyon karışımları hazırlandı ve cDNA içeren kuyucuklara eklendi. 96 kuyucuklu tabak Light Cycler (Roche) cihazına yerleştirilerek ‘döngüsel reaksiyon koşullarında’ gerçek zamanlı PCR (Real-Time PCR) gerçekleştirildi (Tablo 17).

Tablo 17. SSoAdvanced qPCR SYBR Green kit içeriği ve reaksiyon koşulları

SYBR Reaksiyon İçeriği	1X
SSo süper karışım (2X)	5 µL
İleri primer (10 pmol/µL)	0.2 µL
Geri primer (10 pmol/µL)	0.2 µL
Kalıp cDNA (1:10)	4 µL
Apirojen su	0.6 µL
Toplam	10 µL

Döngüsel Reaksiyon Koşulları	Sıcaklık	Süre
Başlangıç denatürasyonu	95 °C	30 saniye
Denatürasyon	95 °C	10 saniye
Bağlanma ve uzama	60 °C	30 saniye
Melting curve	-	-
(Cihazın kendi melting-curve ayarı kullanıldı)		

Reaksiyon bittikten sonra *PLAGL2*, *İnvolutrin* ve *GAPDH* için standart eğriler çizmek üzere, farklı konsantrasyonlardaki standart cDNA’lardan elde edilen Ct değerleri Y eksenine, cDNA miktarlarının logaritmik değerleri de X eksenine yerleştirilerek linear eğri

çizildi. Linear eğrinin formülü, $y=mx+c$ (M: eğim, C: sabit), belirlendi. Scramble (kontrol) ve *PLAGL2* knock-out klonlara ait Ct değerleri *PLAGL2*, *İnvolukrin* ve *GAPDH* için oluşturulan formüle Y değeri olarak eklendi ve örneklerdeki *PLAGL2*, *İnvolukrin* ve *GAPDH* konsantrasyonları belirlendi. Ardından, *PLAGL2* knock-out klonlarda ve kontrol hücrelerdeki *PLAGL2* ve *İnvolukrin* ekspresyon değerleri *GAPDH* ekspresyon değerlerine bölünerek normalize edildi ve *PLAGL2* knock-out klonlardaki *PLAGL2* ve *İnvolukrin* ekspresyonu kontrol hücrelerle kıyaslandı.

3.2.6. Hücre Karakterizasyon Çalışmaları

3.2.6.1. Hücre Morfolojisinin İncelenmesi

Hücre Morfolojisinin Işık Mikroskobu ile İncelenmesi

Altı kuyucuklu tabaklarda uygun büyüme koşullarında büyütülen ve yaklaşık %80-90'lık doluluk oranına ulaşan *PLAGL2* knock-out ve kontrol hücrelerinin, ışık mikroskopunda görüntülenmesi için hücrelerin üzerindeki besiyeri ortamdan çekilerek 1X PBS ile iki kez yıkandı. Yıkamanın ardından tekrar 1X PBS içerisinde Nikon fotoğraf makinesi içeren 'inverted mikroskop' ile hücreler görüntülendi.

Hücre Morfolojisinin İmmüno Floresan ile İncelenmesi

İmmüno Floresan Deneylerinde Kullanılacak Lamellerin Hazırlanması

Çalışmada kullanılacak olan lameller bölümümüzde kullanılan lazer taramalı konfokal mikroskobuna (Leica) özel olarak satın alındı. Lamellerin sterilizasyon aşaması adım adım gerçekleştirildi. İlk olarak lamellerden toz ve partiküllerin uzaklaştırılması için 0.1 N HCl ile lameller 1-1.5 saat çalkalayıcıda yıkandı. Asitle yıkama bittikten sonra lameller bir iki kez dH₂O ile arındırıldı ve ardından 1-1.5 saat dH₂O ile çalkalayıcı kullanılarak yavaş bir şekilde yıkamaya bırakıldı. Son adımda otoklavlanmış dH₂O'dan üç dört kez geçirilen lameller en sonda %70'lik alkol solüsyonu ile temizlenerek Class II Steril kabinde kurutuldu. Kuruyan lamellerin deneyde kullanılırken hücre ekilen yüzeyleri karıştırılmaması için sağ alt köşelerine simetrisi olmayan rakamlar yazıldı ve 2 saat Class II Steril kabin içerisindeki UV kullanılarak sterilize edildi.

İmmüno Floresan Yöntemi

PLAGL2 knock-out ve kontrol hücrelerinin morfolojisini analiz etmek üzere kullandığımız immüno floresan yönteminde β -aktin ile hücre iskeleti, F-aktin ile hücre

hareketinden sorumlu filopodlar incelendi. Hücre içindeki her bir aktinin farklı hücresel fonksiyonları olduğu bilinmekte olup β -aktin yapısal bütünlüğün korunmasında görev alırken (hücre iskeleti ve hücre sınırı) diğer bir izoformu olan F-aktin ise hücre hareketi sırasında monomer olarak bulunan ADP bağlı G-aktinin polimerize olmuş formudur (187-191). Çalışmamızda β -aktin yapısı, β -aktin antikoru, F-aktin yapısıysa Phalloidin (Abcam) konjuge boyası kullanılarak görüntülendi. İmmünofloresan deneyinde kullanacağımız asitle yıkanmış lameller ilk olarak altı kuyucuklu tabaklara yerleştirildi ve üzerlerine istenilen doluluk oranına göre analizi yapılacak hücre süspansiyonundan eklendi. Kuyucuk içerisindeki lamellerin orta kısmında hücrelerin toplanmamasına dikkat edilerek ekimi yapılmış olan hücreler inkübatörde büyümeye bırakıldı. Hücreler ekildikten yaklaşık 24 saat sonra immünofloresan deneyi başlatıldı. İlk olarak kuyulardaki besiyere uzaklaştırılarak hücreler iki kez oda sıcaklığındaki 1X PBS ile yıkandı. -20 °C'ye kaldırılmış %4'lük Paraformaldehit fiksasyon solüsyonu oda sıcaklığında eritilerek kuyular içerisindeki lameller üzerine 1.5 mL eklendi ve 10 dakika boyunca oda sıcaklığında hücreler fiks edildi. Fiksasyonun ardından fiksatif uzaklaştırmak adına lameller beş kez 1X PPS ile 3'er dakika boyunca yıkandı. Hücre membran yapısında porlar oluşturmak için, kuyu içerisindeki lameller üzerine önceden taze hazırlanmış %0.2 Triton X-100 içeren permeabilizasyon solüsyonundan 1.5 mL ilave edilerek 5-6 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Permeabilizasyon bittikten sonra, kuyular üzerine yaklaşık 2-3 mL 1X PPS eklenerek beş kez 3'er dakika boyunca lameller yıkandı ve permeabilizasyon solüsyonu uzaklaştırıldı. Yıkama bittikten sonra lameller üzerindeki PBS atılarak, kuyulara %10 keçi serumu içeren 1.5 mL bloklama solüsyonu eklenerek 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Çalışmada kullanılacak olan primer ve sekonder antikolar Tablo 18'de belirtilen oranda bloklama solüsyonuyla dilüe edildi. Dilüe edilmiş primer antikordan yaklaşık 101 μ L parafilm üzerine damlatıldı. Ardından kuyulardaki lameller pens yardımıyla çok dikkatli bir şekilde alınarak lamellerin hücre bulunan yüzeyleri antikora temas edecek şekilde ters çevrilerek antikor damlatılan parafilm üzerine kapatıldı ve ıslak kağıt mendillerle nemin sağlandığı kapalı bir kutuda inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, bağlanmayan primer antikoru uzaklaştırmak için hücre bulunan yüzeyleri üst tarafta olacak şekilde lameller tekrar kuyulara yerleştirilerek beş kez 2-3 mL 1X PPS ile 3-4 dakika boyunca yıkandı. Yıkama bittikten sonra aynı şekilde sekonder antikolarda primer antikolar gibi hazırlandı ve hücrelere uygulandı. Kullanılan sekonder antikolar florokrom konjuge boya içerdiğinden ötürü, primer antikordan farklı olarak, uygulanan tüm işlemler sırasında altı kuyucuklu tabak alüminyum folyoya sarılarak

örnekler ışıktan korundu. Sonrasında, kapatma solüsyonu olan DAPI ajanından lamın üst kısmına bir damla damlatılarak hücrelerin bulunduğu lamelin yüzeyi kapatma solüsyonuyla temas edecek şekilde üzerine yerleştirildi ve oda sıcaklığında, karanlık bir ortamda tüm gece kapatma solüsyonuyla inkübe edildi. Ardından, hazırlanan preparat kurumanın olmaması için saydam ojeyle etrafı sabitlendi. Oje kuruduktan sonra lazer taramalı konfokal mikroskopunda (Leica DMI8) DAPI boyası için, 405 nm ve Alexa Fluor® 488 floresan boyası için 488 nm lazer kaynağı seçilerek analiz edildi.

Tablo 18. İmmünofloresan koşulları

Fiksasyon	%4 Paraformaldehit oda sıcaklığında 10 dakika
Permeabilizasyon	%0.2 Triton-X-100 (1X PBS içinde) oda sıcaklığında 5 dakika
Bloklama	%10 Goat Serum (1X PBS içinde) oda sıcaklığında 1 saat
Primer antikor	Mouse Anti- β -aktin 1:500
Primer antikor inkübasyonu	Bloklama solüsyonunda hazırlanır. 4 °C’de 16 saat
Yıkama	1X PBS ile beş kez
Sekonder antikor	Goat-Anti-Mouse IgG H&L (AF488) 1:750
Sekonder antikor inkübasyonu	Oda sıcaklığında bloklama solüsyonunda 1 saat
Yıkama	1X PBS ile beş kez
Kapatma Solüsyonu	Antifade Mounting Media DAPI

F-aktin’in floresan görüntülemesi için kullanılan Phalloidin konjuge boyası (Abcam) uygulamasında, normal immünofloresan yöntemindeki primer antikor ilavesinin olduğu basamağa kadarki süreç aynı şekilde uygulandı. Kullanılacak olan phalloidin konjuge boyası Tablo 19’da önerilen dilüsyonda hazırlandı.

Tablo 19. Phalloidin ajanı ile yapılan immünofloresan koşulları

Fiksasyon	%4 Paraformaldehit oda sıcaklığında 10 dakika
Permeabilizasyon	%0.2 Triton-X-100 (1X PBS içinde) oda sıcaklığında 5 dakika
Bloklama	%5 BSA (1X PBS içinde) oda sıcaklığında 1 saat
Konjuge boya	Phalloidin 1:1000
Ajan inkübasyonu	%1 BSA içerisinde oda sıcaklığında 1 saat
Yıkama	1X PBS ile beş kez
Kapatma Solüsyonu	Antifade Mounting Media DAPI

Ajan ile muamele için parafilm üzerine 80-100 μ L hazırlanmış solüsyondan eklendi ve lameller ajan üzerine kapatılarak inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde kuyular beş kez 1X PPS ile 3'er dakika boyunca yıkandı. Sonrasında, kapatma solüsyonu olan DAPI ajanından lamın üst kısmına bir damla damlatılarak hücrelerin bulunduğu lamelin yüzeyi kapatma solüsyonuyla temas edecek şekilde üzerine yerleştirildi ve oda sıcaklığında, karanlık bir ortamda tüm gece kapatma solüsyonuyla inkübe edildi. Ardından, hazırlanan preparat kurumanın olmaması için saydam ojeyle etrafı sabitlendi. Oje kuruduktan sonra lazer taramalı konfokal mikroskopunda (Leica) 488 nm lazer kaynağı seçilerek analiz edildi.

Flow Sitometrisi Cihazı Kullanılarak Hücrelerin Büyüklüğünün Belirlenmesi

Morfolojik analizler kapsamında çalışmada kullanılan hücrelerin büyüklüğünü analiz etmek için, flow sitometrisi cihazına başvuruldu. Bu kapsamda ilk olarak hücreler tripsinize edilerek toplandı ve 1X PBS ile iki kez yıkandı. Sonrasında flow sitometrisi cihazının FSCA (Forward-scatter) ve SSCA (Side-scatter) kanallarında sayıldı. FSCA kanalı (x-ekseni) hücrelerin büyüklüğünü belirlerken, SSCA kanalı (y-ekseni) granül yapısına göre sınıflandırır. Bu çerçevede, hücre popülasyonunun x-ekseninde sağa doğru kayması hücre büyüklüğü artışını gösterirken, y-ekseninde yukarı doğru kayması hücre içi granületenin arttığını belirtir (192-194). *PLAGL2* knock-out ve kontrol örnekleri için toplam 1.5×10^4 hücre sayıldı. Sayım sonunda SSCA-FSCA grafiklerinde hücre popülasyonun yoğun olduğu bölgeler belirlendi ve kontrole göre büyüklüğü ve granületesi değişen hücreler analiz edildi.

3.2.6.2. Hücrelerin İkilenme Zamanının (Doubling Time) Belirlenmesi

Hücrelerin proliferatif özelliklerinin (ikilenme zamanının) belirlenmesi için kültüre edilen *PLAGL2* knock-out ve kontrol hücreleri ilk olarak tripsinize edilerek toplandı ve flow sitometri cihazında hücre sayımı yapıldı. Tüm hücreler için 24, 48, 72 ve 96. saatlerde sayılmak üzere dört adet T75 flaska, her bir flaskta 5×10^5 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Ekimin yapıldığı hücre sayısı sayı (5×10^5) 0. saat değeri olarak kabul edildi. Her 24 saatte bir flasktaki hücreler tripsinize edilerek sayıldı ve bu işleme 96 saate kadar devam edildi. Belirlenen hücre sayıları ve inkübasyon süreleri göz önüne alınarak büyüme eğrileri çizildi ve ikilenme zamanları belirlendi. Hücre ikilenme zamanının hesaplanması için 'cell doubling time calculator' (195) programı kullanıldı.

3.2.6.3. Hücre Döngüsü Analizlerinin Yapılması

Çalışmada kullanılan *PLAGL2* knock-out ve kontrol hücrelerinin hücre döngüsü analizi, içeriği Tablo 20’de belirtilen Cycle Test Plus DNA Reagent kiti (BD Biosciences) kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi. Bu analizde nükleik asitlere bağlanıp floresan ışımaya yapabilen propidyum iyodür (PI) aracılığıyla hücrelerde bulunan DNA içeriği (2n veya 4n) belirlenir. G0/G1 (2n), S (2n~4n) ve G2/M (4n) hücre döngüsü fazlarında farklı dağılım gösteren DNA içeriği, DNA’ya bağlanan PI boyasıyla paralel floresan ışımaya verir. Bu ışımaya sahip hücreler flow sitometrisi cihazında FL2-A kanalından geçerken saptanır ve cihaza ait programla analiz edilerek hücre döngüsü (G0/G1, S ve G2/M) yüzdeleri hesaplanır (196). Tablo 20’de kitede kullanılan solüsyonlar, içerikleri ve kullanım amaçları belirtilmiştir.

Tablo 20. Cycle Test Plus hücre döngüsü analizi kit içeriği

Solüsyonlar	Solüsyon İçeriği	Kullanım amacı
Tampon solüsyonu	Sodyum sitrat, sukroz ve dimetil sülfoksit	Hücre solüsyonlarının toplanması ve dondurulmasında kullanılır.
Solüsyon A	Tripsin	Hücre membranında porlar açarak PI boyasının hücre içine girmesini sağlar.
Solüsyon B	Tripsin inhibitörü ve RNase	Tripsin inhibitörü: Tripsini inhibe eder. RNase: Hücre içindeki RNA’nın parçalanmasını sağlar, böylece PI sadece DNA’ya bağlanır
Solüsyon C	Propidium iodide (PI)	Nükleik asitlere bağlanıp floresan ışımaya yapan kimyasal ajan.

Deneye başlamadan önce kit içerisinde yer alan solüsyon A ve solüsyon B oda sıcaklığına getirildi. Hücre ikilenme zamanı deneyinde 72. saatte sayılmak üzere kaldırılan ve %70-80 yoğunluğa sahip hücreler (*Bkz Alt Başlık: 3.2.6.2*) hücre döngüsü analizlerinde de kullanıldı. Süre sonunda kaldırılıp sayılan hücreler 1X PBS ile iki-üç kez yıkandı. 1 mL süspansiyonda 5×10^5 hücre olacak şekilde ayarlanan hücrelerin üzerine kitle gelen tampon solüsyonundan 2.5 mL eklenerek hücreler süspanse hale getirildi ve 1 200 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işlemi bittikten sonra hücreler üzerindeki süpernatant atıldı. Aynı örnekler üzerine 500 µL tampon solüsyonu ilave edilerek pelet süspanse haline getirildi ve eppendorf tüplere koyularak tekrar 1 200 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj

sonrasında süpernatant tekrar atılarak eppendorf tüplere 125 µL A solüsyonu eklendi ve yavaşça pipetaj yapılarak 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Süre bitiminde A solüsyonu bulunan eppendorf tüpler üzerine 100 µL B solüsyon eklenerek yavaşça pipetaj yapıldı ve tekrar 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Son aşamada A ve B solüsyonu bulunan eppendorf tüplere 100 µL C solüsyonu karanlık ortamda ilave edilerek örnekler buz üzerine alındı ve 10 dakika inkübe edildi. Cycle Test Plus kiti kullanılarak boyanan hücrelerin hücre döngüsü analizleri flow sitometri BD Accuri C6 Plus cihazı kullanılarak gerçekleştirildi ve popülasyon yüzdesi ModFit LT yazılımı ile belirlendi.

3.2.6.4. Hücre Ölümü Analizlerinin Yapılması

Çalışmada hücre ölümü analizlerinin tespitinde apoptoz ve nekrotik hücrelerin belirlenmesini sağlayan “Annexin V/7-AAD (7-amino-aktinomisin D)” kiti (BD Biosciences) kullanıldı. Florokrom işaretli Annexin V, kalsiyuma-bağlı bir şekilde fosfatidilserine bağlanıp ışığa yapabilen hücre içi proteinlerin annexin ailesinin bir üyesidir. Fosfatidilserin normalde sağlıklı hücrelerde plazma membranının sadece hücre iç kısmında bulunur, ancak erken apoptoz sırasında membran asimetrisi kaybolur ve fosfatidilserin membranın dışarı bakan kısmına transfer olur (197). Bundan ötürü apoptotik hücrelerin yüzeyinde bulunan fosfatidilserine bağlanan Annexin V flow sitometri cihazında FL2-A (yeşil floresan) kanalından geçerken ışığa verir. DNA ile etkileşerek floresan ışığa yapabilen 7-AAD ise (198) erken apoptotik hücrelerde membran bütünlüğü bozulmadığı için membranı geçemez ve DNA'ya bağlanamaz. Geç evre apoptotik hücrelerde, membran bütünlüğü bozulduğundan dolayı 7-AAD çekirdeğe geçerek DNA'ya bağlanır ve flow sitometri cihazında FL3-A (kırmızı floresan) kanalından geçerken ışığa verir (199). Tüm bu ışımalar (kırmızı ve yeşil) sahip hücreler tek tek flow sitometri cihazı tarafından saptanarak gruplandırılır. Canlı hücrelerden erken apoptotik hücrelerin ayırımı yapılabilmesi için 7-AAD, geç apoptotik hücrelerden nekrotik hücrelerin ayırımı yapılabilmesi için Annexin V ile hücrelerin boyanması gerekir.

Analizi yapılacak olan *PLAGL2* knock-out ve kontrol hücreleri, altı kuyucuklu tabaklara kontrol hücreleri için her kuyuda yaklaşık 4×10^5 hücre, *PLAGL2* knock-out hücreleri için 5×10^5 olacak şekilde eklenerek normal büyüme ortamında (%10 FBS) 37 °C'de %5 CO₂ içeren etüvde 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda ortamdaki apoptotik hücreleri içeren süpernatantlar toplandı ve sayımı yapılan 5×10^5 hücre süspansiyonun üzerine eklendi. Ardından hücreler çöktürüldü ve pelet soğuk 1X PBS ile iki kez yıkandı.

Yıkamaların ardından hücre kit içeriğinde bulunan 1 mL “1X Annexin binding buffer” ile süspanse edilerek, eppendorf tüplere her bir hücre örneğinden 100 µL alındı. Bu hücre örneklerine 2.5 µL Annexin V ve 2.5 µL 7-AAD floresan konjuge ajanlar ilave edilerek yaklaşık 15 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon süresi tamamlandığında, örnekler 150 µL 1X Anneksin bağlama tamponu ilave edilerek 1 saat içerisinde flow sitometri cihazında analiz edildi.

Analiz sonucunda Annexin V ve 7-AAD negatif hücre popülasyonları sağlıklı olarak nitelendirildi. Annexin V pozitif ve 7-AAD negatif popülasyonlar erken apoptotik hücreleri temsil ederken, Annexin V ve 7-AAD pozitif hücreler geç apoptotik hücreler olarak değerlendirildi (200, 201). Popülasyondaki toplam apoptotik hücre oranı ise erken ve geç apoptotik hücre oranlarının toplanmasıyla elde edildi.

3.2.6.5. Hücre Hareketi Analizlerinin Yapılması

In vitro Yara İyileşme Analizi (Wound-Healing)

Çalışmada kullanılan *PLAGL2* knock-out ve kontrol hücrelerinin hareket özellikleri, *in vitro* yara-iyileşme analizi ile incelendi. Bu analizde, tamamen hücrelerle dolu olan tek katman bir yüzeyde yara benzeri çizik oluşturularak, hücrelerin bu boşluğu kapatma süreleri hesaplanmaktadır. Hücre göçünü ve hücre-hücre etkileşimini analiz etmeyi hedefleyen bir yöntemdir (202).

Çalışmamızda ilk olarak *PLAGL2* knock-out ve kontrol hücreleri altı kuyucuklu hücre kültürü tabaklarına %90-95 konfluent olacak şekilde ekildi. Ekilen hücreler %100 konfluent olunca, yaklaşık 12-16 saat sonra, hücreler steril sarı uç (200 µL) kullanılarak cetvel yardımıyla hem yatay hem de dikey artı şekli oluşturacak şekilde çizildi. Ardından 1X PBS ile iki-üç kez yıkandı. Fotoğraflanacak alanlara işaretler koyuldu ve 0. saat için bu işaretli alanların fotoğrafları optik mikroskoba bağlı (Nikon) dijital kamera kullanılarak çekildi. Sonrasında tekrar hücrelerin üzerine %10 FBS içeren büyüme medyumu ilave edilerek 37 °C’de %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakıldı. 24., 48. ve 72. saatler için de aynı şekilde işaretli alanlardan fotoğraflar alındı. Fotoğraf çekimi sırasında hücre medyumu uzaklaştırılarak ortama 1X PBS ilave edildi. Hücrelerin migrasyonuna bağlı olarak hücrelerle doldurulan boşluğun sınırları Image J görüntü analiz yazılımı kullanılarak çizildi ve hücrelerin göç hızı, kapanmış (iyileşmiş) alan yüzdesi dikkate alınarak belirlendi.

%10 FBS büyüme ortamında hücre hareketi analizi için ilave kondisyon olarak hücreler çizik oluşturmada iki saat öncesinde 10 µg/mL Mitomisin C'ye (MMC) maruz bırakıldı (78). MMC, hücrelerin boşluğu doldurması esnasında hücre bölünmesini dışlamak ve yalnızca hücre göçünün süreçteki etkisini analiz etmek amacıyla kullanıldı. Mitomisin C anti-tümör aktivitesine sahip kemoterapik bir ajan olup DNA bazları arasında çapraz bağ oluşturarak replikasyonu engeller ve etkisini hücre bölünmesini durdurarak gösterir (203, 204).

Transwell Migrasyon Analizleri

Transwell migrasyon analiz yöntemi, hücrelerin bir kemo-atraktan (kemokinler, biyoaktif lipidler veya büyüme faktörleri) yönelik kemotaktik hareket kapasitesini ölçmeye dayanır. Büyüme faktörlerini içeren FBS kemo-atraktan olarak kullanılabilir. Bu yöntemde 24 kuyucuklu tabaklara koyulmak üzere tasarlanan insertlerin alt taban kısmı hücrelerin geçebileceği porlardan oluşur. Hücreler bu insertlerin içerisine düşük kemo-atraktan (0.2 % FBS) içeren besiyeriyle birlikte koyulur. İinsertin yerleştirileceği 24 kuyucuklu tabakların içerisineyse yüksek oranda kemo-atraktan (10% FBS) içeren besiyeri koyulur. İinsert 24 kuyucuklu tabaklara yerleştirilir. İinsertin üstünde %0.2 FBS içeren besiyerinde bulunan hücrelerin insertin alt tabanında bulunan porları geçerek yüksek besine doğru hareket etme kapasiteleri incelenir. Hareket ederek porlardan geçen hücreler insertin taban kısmının dış tarafında konumlanır. Deney sonunda bu hücreler boyanarak analiz edilir. Çok sayıda hücrenin boyanması hücrelerin hareket kabiliyetiyle korelasyon gösterir (205).

Yara-çizik analizinden sonra *PLAGL2* knock-out ve kontrol hücrelerinin migratif özellikleri transwell insertler kullanılarak da analiz edildi. Migrasyon yöntemi için kullanılacak olan insertler, 24 kuyucuklu tabaklara pens yardımı ile yerleştirildi ve insertlerin içine %0.2 FBS içeren 200 µL besiyeri eklendi. Ardından insertlerin yerleşik olduğu kuyucukların içine %10 FBS içeren 500 µL besiyeri eklendi. Tripsinize edilen hücrelerin 1X PBS ile yıkandı ve %0.2 FBS içeren 200 µL besiyerinin içinde 1×10^5 hücre homojen bir şekilde insertlere dikkatlice eklendi. Ardından hücreler 37 °C'de %5 CO₂ içeren etüvde 24 ve 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sona erdiğinde öncelikle insertlerin içindeki, ardından kuyucukların içindeki besiyeri uzaklaştırıldı. İinsertler pens yardımıyla kuyucuklardan çıkarıldı. Göç eden hücreler insertin dış kısmında kaldığı için, insertin iç kısmı steril bir pamuklu çubukla dikkatli bir şekilde temizlendi. İinsertler pens yardımıyla kuyucuklara tekrar yerleştirildikten sonra kuyucukların içine 300 µL soğuk metanol eklendi

ve 20 dakika fiksasyona bırakıldı. Fiksasyonu takiben kuyucukların içindeki metanol uzaklaştırıldı ve kuyucuklara 200 µL kristal viyole (0.1%) eklenerek 15 dakika inkübasyona bırakıldı. Boyama aşaması sona erince, insertler pens yardımıyla dikkatlice alındı ve distile su dolu bir beherin içerisine batırılarak yıkandı. Ardından temiz bir peçetenin üzerine, insertlerin alt kısımları üstte kalacak şekilde yerleştirildi ve yaklaşık 1-2 saat kurumaya bırakıldı. Kuruyan insertler pens yardımıyla alınarak 24 kuyucuklu tabağın temiz kuyucuklarına yerleştirildi ve entegre kameralı invert ışık mikroskobu (Nikon) aracılığıyla fotoğraflandı.

Yara iyileşme deneyiyle benzer şekilde hücre çoğalmasını dışlamak adına deney bir defada önceden serum açlığı çektirilen hücreler kullanılarak gerçekleştirildi. Bu deneyin tek farkı hücrelerin 24 saat 0.2 FBS içeren büyüme ortamında aç bırakılmasıydı ve ardından benzer şekilde transwell migrasyon analizi gerçekleştirildi.

Koloni Oluşturma Analizleri

Bazı çalışmalarda onkogenik özelliği gösterilen *PLAGL2*'nin (105) koloni oluşturma kapasitesini incelemek üzere *PLAGL2* knock-out ve kontrol hücreleri klonojenik formasyon analiziyle incelendi. Bu analizde harekete dayalı koloni oluşturma veya çoklu hücre bölünmesine dayalı çoğalma kapasitesi incelenir (206, 207). Bu bağlamda çalışmada kullanılacak hücreler ilk olarak tripsinize edilip sayıldıktan sonra ve 2 mL besiyeri içeren altı kuyucuklu tabaklara her kuyuda yaklaşık 2×10^2 hücre olacak şekilde eklendi. Ardından hücreler 37 °C'de 5% CO₂ içeren etüvde 14 gün inkübasyona bırakıldı. Her üç günde bir büyüme ortamı taze medyum ile değiştirildi. Süre bitiminin ardından hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler soğuk 1X PBS ile yıkandı. Daha sonra, 4% paraformaldehit fiksatif solüsyonuyla 20 dakika boyunca fiksasyon gerçekleştirildi. Fiksasyon süresi tamamlanınca hücrelerin üzerindeki solüsyon uzaklaştırıldı ve 1X PBS ile bir kez yıkandı. Yıkamanın ardından kuyucuklara kristal viyole (0.1%) boyası ilave edildi ve hücreler 20 dakika boyunca boyada bekletildi. Boyama süresi sona erince hücrelerin üzerindeki boya uzaklaştırıldı ve hücreler distile su ile boya kalıntıları temizlenene kadar yıkandı. Yıkama işlemlerinin ardından koloniler harici bir kamera ile fotoğraflandı ve Image J programı kullanılarak 1 mm²'den büyük koloni sayısı analiz edildi.

3.2.6.6. Hücre Sinyal Yolağı Analizi: Wnt/β-katenin Sinyal Yolağı

Bağırsak epitel kök hücrelerinde ve nöronal kök hücrelerinde Wnt/β-katenin sinyal yolağında fonksiyonu gösterilmiş olan *PLAGL2*'nin (129, 152) çalışmamızda HaCaT

hücrelerinde yolak üzerine etkisi WNT-duyarlı promotöre sahip lusiferaz raportör vektör pGL3-BARL (pBAR) (208) kullanılarak analiz edildi. Analizler esnasında *PLAGL2* knock-out ve kontrol hücrelerinde lusiferaz raportör vektörünün yanı sıra farklı örnekler arasında transfeksiyon verim farkından kaynaklanan raportör ekspresyonunu normalize etmek için Beta-galaktosidaz eksprese eden pCMV- β -Gal (β -Gal) vektörü de kullanıldı (209). İlave olarak *PLAGL2* proteinini fazladan ekspres etmek için gereken deney koşulunda önceki çalışmalarımızda oluşturulmuş *PLAGL2*'yi fazladan ekspres eden memeli hücre ekspresyon vektörü de (pDEST-3x-Flag-*PLAGL2*) deneye dahil edildi. Ayrıca Wnt/ β -katenin sinyal yolağının hücre içi sinyal kaskadının transkripsiyon faktörü β -katenin (pDEST-3x-Flag-Beta-Katenin) hücrelerde fazladan ekspres edilerek sinyal yolağının hücre içi pozitif kontrolü olarak kullanıldı (210, 211). Her kondisyon için toplam 0.35 μ g vektör kullanıldı. Kondisyonlar aşağıdaki tabloda detaylı bir şekilde gösterilmiştir (Tablo 21). Ek olarak bir kondisyonda, Wnt/ β -katenin sinyal yolağının *PLAGL2* tarafından aktiveleştirilip aktiveleştirilmediğini belirlemek için (*PLAGL2*'nin pozitif kontrolü) HEK293 hücrelerinde *PLAGL2*'yi fazladan ekspres eden (pDEST-3x-Flag-*PLAGL2*) vektörü kalsiyum fosfat yöntemiyle transfekte edilerek Wnt/ β -katenin sinyal yolağı analizi gerçekleştirildi.

Tablo 21. Wnt/ β -katenin sinyal yolağı analizi için uygulanan kondisyonlar, içerik ve vektör miktarları

Kondisyonlar	İçerikler (Vektörler)	Vektör Miktarları (μ g)
1	pBar + β -Gal +Boş Flag	pBar: 0.125
2	pBar+Flag- <i>PLAGL2</i> + β -Gal+ Boş Flag	β -Gal: 0.075
3	pBar+Flag- β -katenin+ β -Gal+ Boş Flag	Flag- <i>PLAGL2</i> : 0.075
4	pBar+Flag- <i>PLAGL2</i> + Flag- β -katenin+ β -Gal	Flag- β -katenin: 0.075

PLAGL2 knock-out hücrelerine vektörlerin transfeksiyonu esnasında PEI ajanı, tarafımızdan optimize edildiği haliyle, kullanıldı ve transfeksiyon verimini artıran ters (reverse) transfeksiyon stratejisi uygulandı. Lusiferaz raportör kit (Promega) ile verilen 5X hücre lizis tamponu 1X olacak şekilde sterile dH₂O ile seyreltildi. Ters transfeksiyondan ve kalsiyum fosfat yöntemiyle transfeksiyondan 24 saat sonra 1X PBS ile yıkanan hücrelerin üzerine 1X hücre lizis tamponundan 72 μ L eklendi ve buz üzerinde 20 dakika çalkalanarak hücreler patlatıldı.

Bu deney esnasında kantitatif ölçüme olanak sağlayan farklı koşullardaki transfeksiyon verimi β -galaktosidaz'ın substratı olan o-nitrophenyl β -D-galactopyranoside (ONPG, 4 mg/mL) kullanılarak belirlendi (212). Bu amaçla her örnek için ayrılan hücre lizatından 10 μ L alınıp üstüne 120 μ L substrat tampon (substrat tampon içeriği; 100 μ L Z tamponu, 0.27 μ L β -merkaptotanol, 20 μ L ONPG) eklendi. Örnekler alüminyum folyo ile kaplanarak 37 °C'de 10-15 dakika inkübe edildi. β -galaktosidaz varlığına bağlı olarak giderek sarı renge dönen reaksiyonu durdurmak için 50 μ L 1 M Na₂CO₃ ortama ilave edildi, enzim aktivitesiyle orantılı sarı renk yoğunluğu spektrofotometrede (Eppendorf) 420 nm'de okunarak β -galaktosidaz aktivitesi kantite edildi.

Lizattaki lusiferaz aktivitesi (firefly luciferase) lusiferaz assay kit sistemi (Promega) kullanılarak luminometre (SpectraMax) cihazında 570 nm'de ölçüldü. 20 μ L lizat için cihazın 25 μ L lusiferaz substratını enjekte etmesi ayarlandı ve enjeksiyondan hemen sonra okuma alındı (213). Son olarak vektörler aracılığıyla fazladan ürettirilen Flag etiketli PLAGL2 ve Beta-Katenin'in ekspres olduklarını doğrulamak için örneklerden alınan 20 μ L lizat SDS-PAGE'de yürütüldü ve immüno blot yöntemiyle Flag antikoru (Sigma-Aldrich) kullanarak analiz edildi (*Bkz Alt Başlık 3.2.3.3*).

3.2.7. İstatistiksel Analizler

Yapılan tüm deneyler, üçerli olarak farklı zamanlarda en az üç bağımsız çalışma olarak gerçekleştirildi. Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri GraphPad Prism 8.0.1 programı ile yapıldı. İki grup arasındaki farkları karşılaştırmak için Student's t (two-tailed) testi kullanıldı. Çeşitli gruplar arasındaki farklılıklar two-way ANOVA karşılaştırma testi kullanılarak analiz edildi. Verileri tanımlamak için ortalamalar ve standart sapmalar kullanıldı (SD). *P* değerinin 0.05'ten küçük olması anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. CRISPR/Cas9n Sisteminin Hazırlanması, Uygulanması ve Analiz Edilmesi

Bu çalışmada *PLAGL2* geninin tamamen susturulduğu keratinosit hücre hattı oluşturulup, temel hücresel fonksiyonlarının karakterize edilmesi amaçlandı. Bu amaca yönelik yeni nesil genom düzenleme sistemi olan CRISPR/Cas9n sistemine başvuruldu (169).

4.1.1. Rehber RNA (sgRNA) Tasarlanması

Bu kapsamda birçok farklı algoritmanın kullanıldığı web tabanlı programlar on-target ve off-target değerleri açısından incelendi ve sgRNA'lar Benchling programı kullanılarak tasarlandı. Tasarladığımız sgRNA'ların on-target ve off-target skorları Tablo 22'de verilmiştir. Off-target etkisini azaltmak veya on-target etkisini arttırmak üzere iki sgRNA kullanılması sgRNA seçimini sınırlayabilmektedir. Bunun sonucunda daha düşük off-target veya on-target skoru olan sgRNA'lar seçilmek durumunda kalılabilmektedir. Bu nedenle iki set olarak seçilen sgRNA'ların off-target skorları 50'nin ya da on-target skorları 60'ın altında olabilir. CRISPR uygulaması esnasında, Benchling üzerinde *PLAGL2*'ye özgül tasarlanan sgRNA'lar ve deneye dahil edilen scramble sgRNA dizisi Tablo 22'de gösterilmektedir.

Tablo 22. Benchling biyoinformatik aracı kullanılarak *PLAGL2* hedef lokasyonunda elde edilen sgRNA dizileri ve skorları

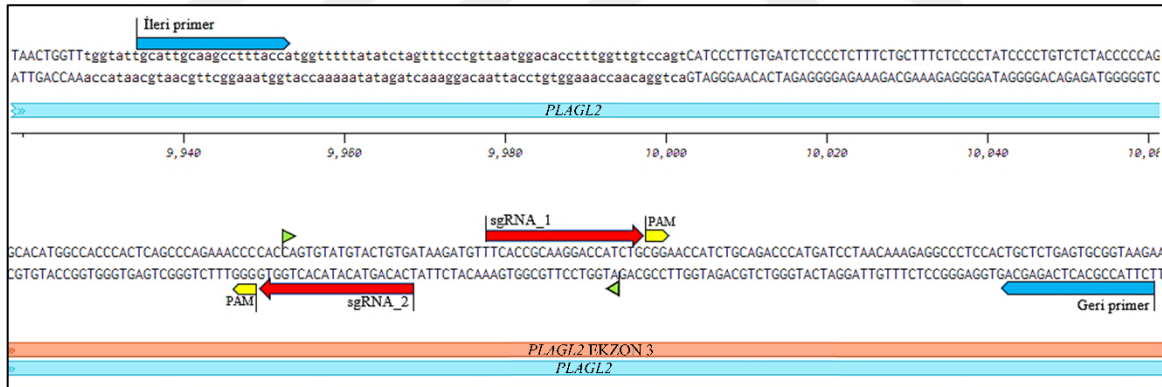
sgRNA Adı	sgRNA Dizisi	On-target	Off-target	PAM Dizisi
PLAGL2_Cas9n_sgRNA1	TTCACCGCAAGGACCATCTG	71.2	41.3	CGG
PLAGL2_Cas9n_sgRNA2	TCACAGTACATACACTGGTG	66.2	41.5	TGG
Scramble_sgRNA	GTATTACTGATATTGGTGGG	-	-	-

Ayrıca, Tablo 22'de belirtilen gRNA'ların PX462 vektöründeki *BbsI* enzim kesim bölgesine klonlanabilmesi için oligonükleotidler tasarlanırken uçlarına ilave olarak *BbsI* kesim enzimi için uygun olan nükleotidler eklendi (Tablo 23). *BbsI* tanıma dizilerinin altı çizilmiş ve koyu renkle gösterilmiştir.

Tablo 23. *PLAGL2* için tasarlanan komplementer sgRNA'ların ve scramble'ın ileri-geri oligoları

sgRNA Adı	Oligo Dizisi 5'→3'
sgRNA 1 ileri oligo	<u>CACCG</u> TCACAGTACATACTGGTG
sgRNA 1 geri oligo	<u>AAACC</u> CACCAGTGTATGTACTGTGAC
sgRNA 2 ileri oligo	<u>CACCG</u> TTCACCGCAAGGACCATCTG
sgRNA 2 geri oligo	<u>AAACC</u> CAGATGGTCCTTGCGGTGAAC
Scramble ileri oligo	<u>CACCG</u> TATTACTGATATTGGTGGG
Scramble geri oligo	<u>AAACC</u> CCCAATATCAGTAATAC

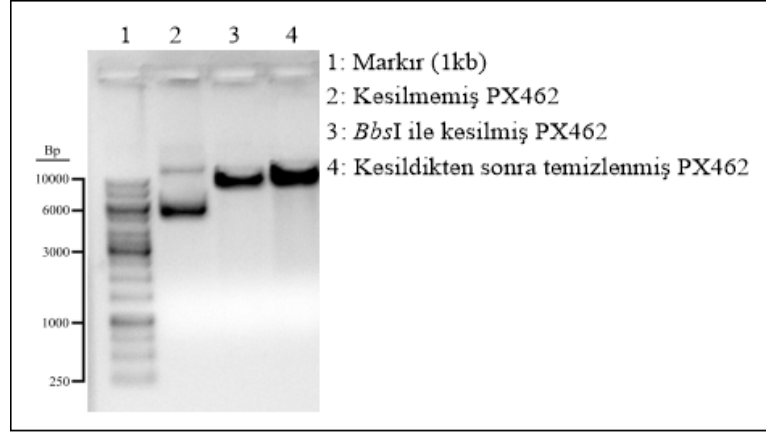
PLAGL2 üç ekzondan oluşan bir gen olup protein kodlamaya 2. ekzonunun ortalarından başlar ve proteinin çoğunluğu ekzon üç tarafından kodlanır. Bu nedenle biyoinformatik araçlar üzerinde sgRNA tasarlaması yapılırken, hedef bölge olarak *PLAGL2*'nin N-terminal kısmına yerleşik çinko parmak motifini kodlayan ekzon üç'ün başlangıç kısmı seçildi (Şekil 15).



Şekil 15. *PLAGL2* ekzon 3 üzerindeki CRISPR/Cas9n hedef bölgesi. (Mavi: Hedef bölgeyi PCR ile çoğaltmada ve Sanger dizilemede kullanılan primerler, kırmızı: sgRNA'lar, sarı: PAM dizileri, yeşil: Cas9n kesim bölgesi)

4.1.2. PX462 Vektörünün Hazırlanması

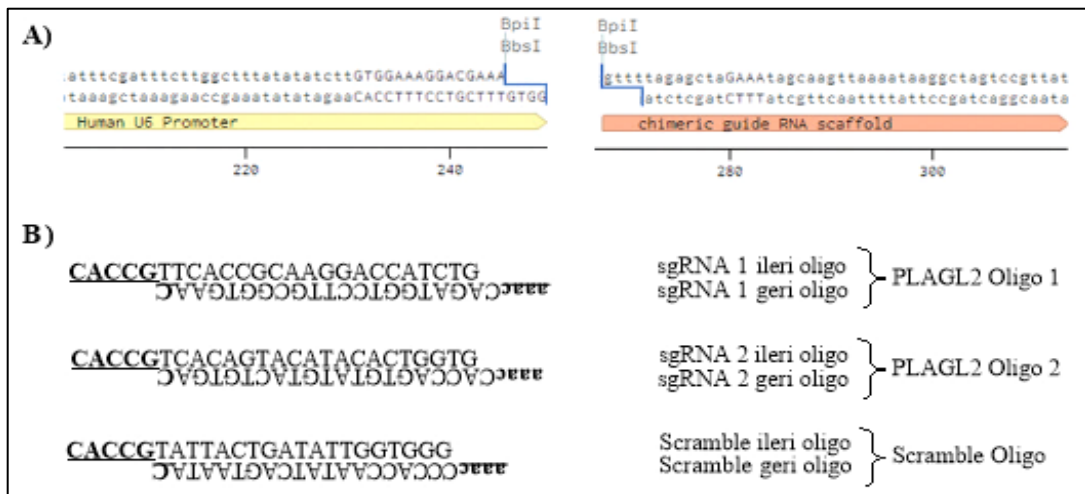
PX462 vektörü bakteride çoğaltıldıktan sonra endotoksin içermeyen Mini Prep kiti ile izole edildi. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda sgRNA'ların vektöre klonlanabilmesi için PX462 vektörü *BbsI* enzimi ile kesildi. Kesim sonrası linearize vektör, temizlendi ve agaroz jelde görüntülendi (Resim 6).



Resim 6. PX462 vektörünün *Bbs*I enzimiyle kesiminin %0.6'lık agaroz jelde görüntülenmesi

4.1.3. sgRNA'lerden Oligo Oluşturulması

*Bbs*I enzimiyle kesim yapıldıktan sonra PX462'de oluşan yapışkan uçlara (Şekil 16A) sgRNA'ların klonlama işlemi gerçekleştirildi. Bu amaçla ilk olarak, *PLAGL2* için tasarlanan komplementer sgRNA'ların (oligo 1 ve oligo 2) ve scramble (negatif kontrol) ileri-geri oligoları T4 polinükleotid kinaz varlığında ısıtılıp oda sıcaklığına getirilerek çift zincir hale getirildi. T4 polinükleotid kinaz ile çift sarmal oligomerlerin 5' uçlarında vektörde bulunan 3'OH ile fosfodiester bağ oluşturması için fosfat grubu eklenmiş oldu. Böylelikle *Bbs*I ile kesilmiş PX462'ye klonlamaya uygun *Bbs*I komplementer uçlara sahip çift sarmal oligomerler oluşturuldu (Şekil 16B).



Şekil 16. Kesimi yapılmış olan PX462 ve oligolar. **A)** PX462 vektörü üzerinde *Bbs*I kesimi sonrası oluşan yapışkan uçlar. **B)** *PLAGL2* ve scramble için oluşturulan *Bbs*I komplementer uçlara sahip oligomerler.

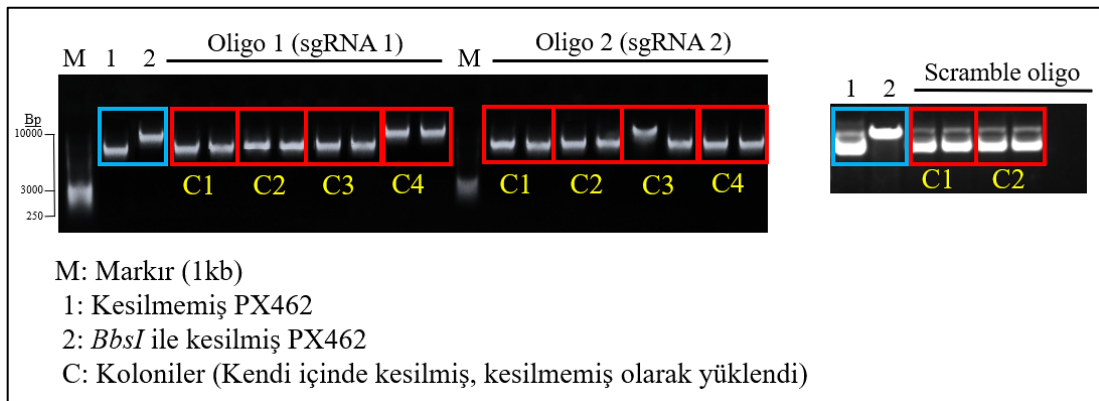
4.1.4. Hazırlanan Oligoların PX462 Vektörüne Klonlanması

Oluşturulan oligolar (Oligo 1, 2 ve kontrol) *BbsI* ile kesilmiş olan PX462'ye klonlandıktan sonra ligasyon ürünü *E.coli* DH5 α suşuna transforme edildi, seçilen bakteri kolonilerinden (Resim 7) mini-prep ile izole edilen vektörlerde sgRNA oligomerlerinin yerleşimi hem *BbsI* enzim kesimiyle hem de Sanger dizileme yöntemiyle kontrol edildi.



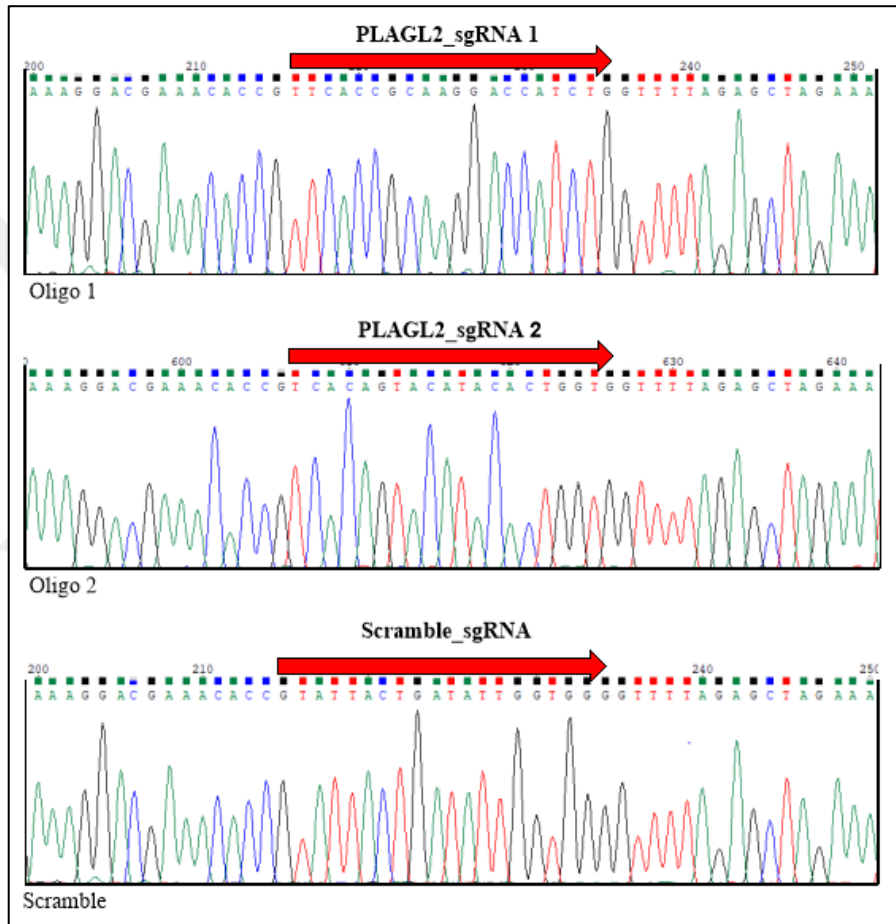
Resim 7. Oligo 1 ve 2'yi içeren PX462'nin DH5 α hücrelerine transformasyonundan sonra oluşan koloniler (sol oligo 1, sağ oligo 2).

Vektörün *BbsI* kesim bölgesine oligomerin girmesi vektör üzerindeki *BbsI* enzim bağlanma bölgesinin kaybolmasına neden olmaktadır. Bu durumda oligomerin girmediği vektörün *BbsI* ile kesilmesi beklenirken oligomerin girdiği vektörde kesim gerçekleşmez. Bu bilgiden yola çıkılarak transforme edilen DH5 α 'dan oligo bir ve iki için dört koloni, kontrol için iki koloni seçildi. Bakterilerden izole edilen vektör *BbsI* enzimi ile kesildi. Deney iç kontrolü olarak kesim yapılmamış vektör kullanıldı. Kesim reaksiyonu sonucu ürünler agaroz jelde görüntülendikten sonra oligo 1 için klon 1 (C1), 2 (C2) ve 3'ün (C3), oligo 2 için klon 1 (C1), 2 (C2) ve 4'ün (C4), kontrol oligo içinse her iki klon (C1 ve C2) içerisine oligoların yerleşmiş olduğu görüldü (Resim 8).



Resim 8. *BbsI* enzimi ile kesilen klonların analizi

Kesim reaksiyonu sonrasında *BbsI* enzimi ile kesilmediği gösterilen klonlar için bir sonraki doğrulama aşamasına geçildi. İçerisine oligomer yerleşmiş olduğu düşünülen oligo 1, 2 ve kontrol klonlarından C1 seçilip PX462 vektörüne ait U6 primeri (İleri, Pr. 1697) kullanılarak dizilendi. Klonlama doğrulanarak sgRNA'ların baz diziliminde herhangi bir değişiklik olmadığı görüldü (Şekil 17). Doğrulan klonlar çoğaltılarak transfeksiyon için gerekli olan vektörler hazır hale getirildi.



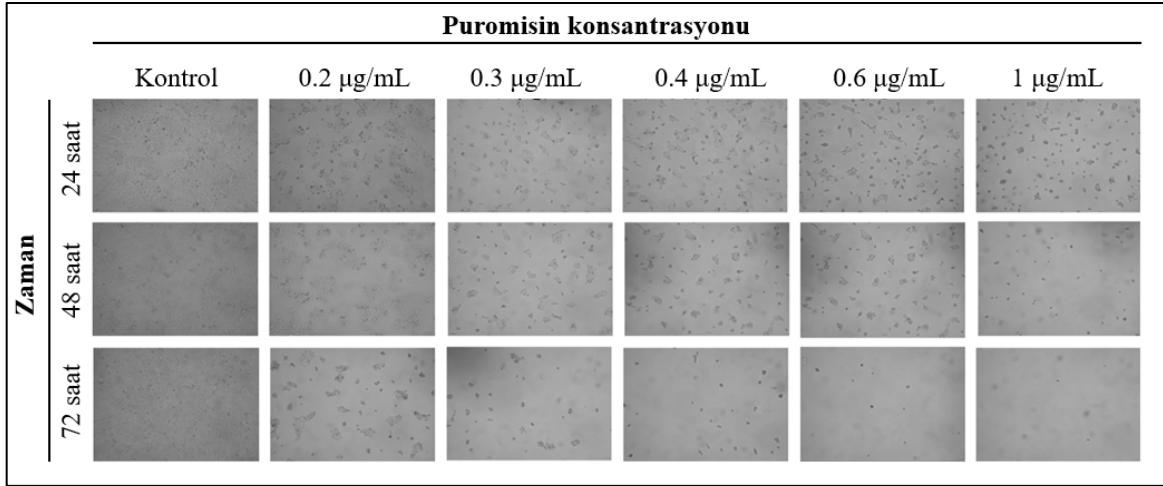
Şekil 17. Oligoların klonlandığı PX462'nin, *BbsI* ile kesilmeyen (C1) klonlarına ait Sanger dizileme sonuçları (Kırmızı oklar sgRNA'ların dizisini göstermektedir.)

4.1.5. Seleksiyon için Antibiyotik Dozunun Belirlenmesi

CRISPR/Cas9n sistemini uygulamak için kullandığımız PX462 vektörü Puromisin direnç geni içerdiğinden (Şekil 14) HaCaT hücrelerinde seçilimin sağlanması adına hücrelerin tamamını öldüren en düşük dozunun belirlenmesi çalışmaları gerçekleştirildi. Bu amaçla altı kuyucuklu tabağın her kuyusunda hücreler ekildi ve ertesi gün, hücrelere

belirlenen dozlarda Puromisin içeren besiyeri verildi ve 72 saat boyunca 24 saatte bir hücrelerin fotoğrafları çekildi.

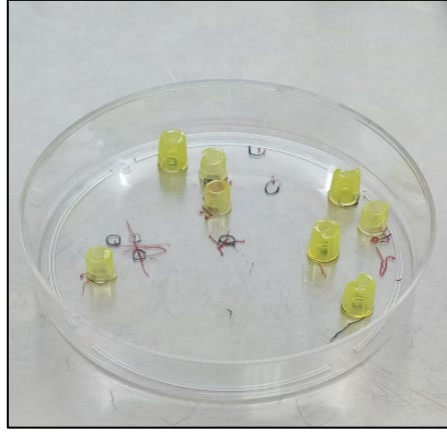
Yapılan çalışma sonucunda hücrelerin tamamını öldüren dozun 1 µg/mL ve sgRNA'ları içeren PX462 vektörünün hücrede tutulumunu sağlamak için gereken zamanın ise 72 saat olduğunu belirlendi (Resim 9).



Resim 9. HaCaT hücrelerinde uygun Puromisin dozunun belirlenmesi

4.1.6. PLAGL2'ye Ait sgRNA'ları İçeren PX462 Vektörünün HaCaT Hücrelerine Transfeksiyonu ve Monoklonal Hücre Seçimi

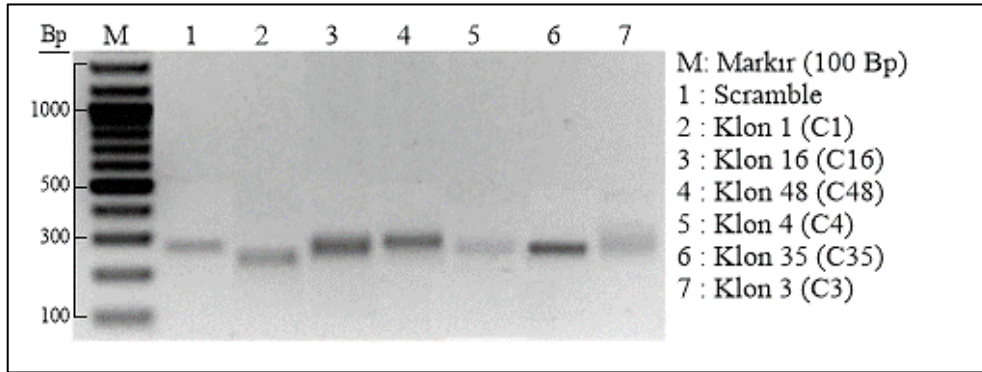
PLAGL2'nin knock-out edilmesi için tasarlanan iki sgRNA'nın klonlandığı vektörler HaCaT hücrelerine Lipofectmax ajanı ile transfekte edildi. Transfeksiyon sonrasında hücreler belirlenen Puromisin dozunda (1 µg/mL) 72 saat inkübe edildi. Sonrasında hücreler seyreltilerek monoklonal hücre seçilimi yapıldı. Koloniler ortaya çıktıktan sonra scramble tabağından iki adet, PLAGL2 sgRNA'ların transfekte edildiği transfeksiyon tabaklarından toplam 50 adet monoklonal olduğu düşünülen koloni seçildi. (Resim 10).



Resim 10. CRISPR/Cas9n uygulama sonrası monoklonal hücre seçilimi

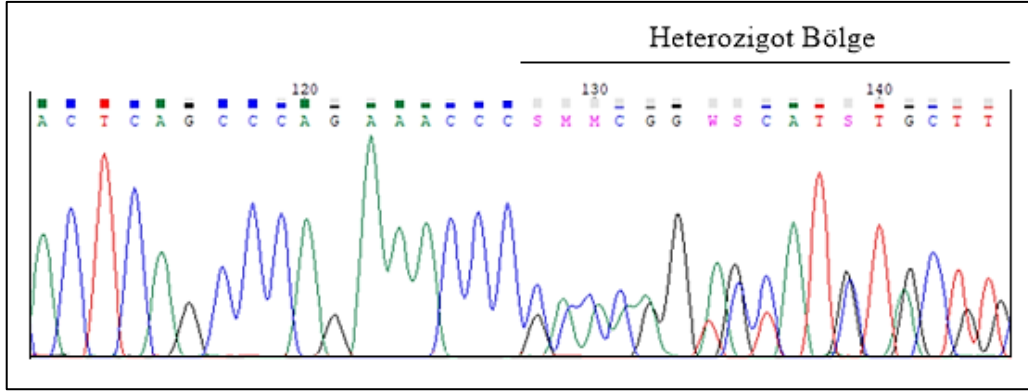
4.1.7. CRISPR/Cas9n Sisteminin Uygulandığı Klonların INDEL Analizlerinin Gerçekleştirilmesi (On-Target)

PLAGL2'nin knock-out edilmesi için uygulanan CRISPR/Cas9n sisteminin hedef lokasyonda meydana getirdiği varyasyonları analiz etmek amacıyla hedef bölgede INDEL analizleri gerçekleştirildi. Bu doğrultuda, PLAGL2 için seçilen klonlardan elde edilen hücrelerden genomik DNA izole edildi ve Cas9n'nin hedeflendiği bölge (Şekil 15)'de belirtilen primerler kullanılarak (Pr. 1654 ileri- Pr. 1055 geri) PCR ile çoğaltıldı (Resim 11).



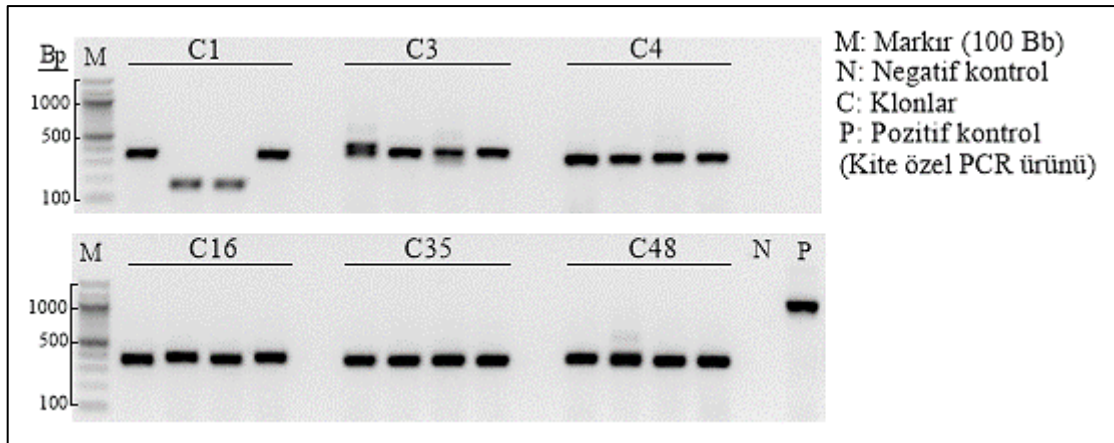
Resim 11. Hedef bölgenin PCR ile analizi

Sonrasında PCR ürünleri aynı ileri primer kullanılarak (Pr. 1654 ileri) Sanger dizileme yöntemiyle analiz edildi. Varyasyonların analiz edilemediği heterozigot ve bileşik heterozigot durumlarında (Şekil 18) PCR ürünleri pJET1.2/blunt vektörüne klonlandı ve aleller ayrı ayrı dizilendi.



Şekil 18. *PLAGL2* hedef Cas9n kesim bölgesinde meydana gelen heterozigot değişimin Sanger dizileme yöntemiyle gösterilmesi

INDEL analizleri için 50 klonun 33'ü Sanger yöntemi ile dizilendi. Her iki alelinde de farklı INDEL'lerin (heterozigot veya bileşik heterozigot) belirlendiği klonlarda (C1, C3, C4, C16, C35, C48) INDEL'lerin alel bazında belirlenmesi için elde edilen PCR ürünleri pJET1.2/blunt vektörüne üretici firmanın önerileri doğrultusunda yerleştirilerek kompetan DH5 α hücrelerine transforme edildi. Transformasyon sonrasında her bir klondan dörder koloni seçildi ve kolonilerde bulunan aleller, vektöre ait ileri-geri primerlerle koloni PCR yapılarak çoğaltıldı (Resim 12). Her klona ait dört koloninden ikişer tane seçilip yine aynı ileri primerle dizilenerek alel bazlı INDEL analizler yapıldı.



Resim 12. Heterozigotluk gösteren klonlarda alellerinin koloni PCR ile analizi

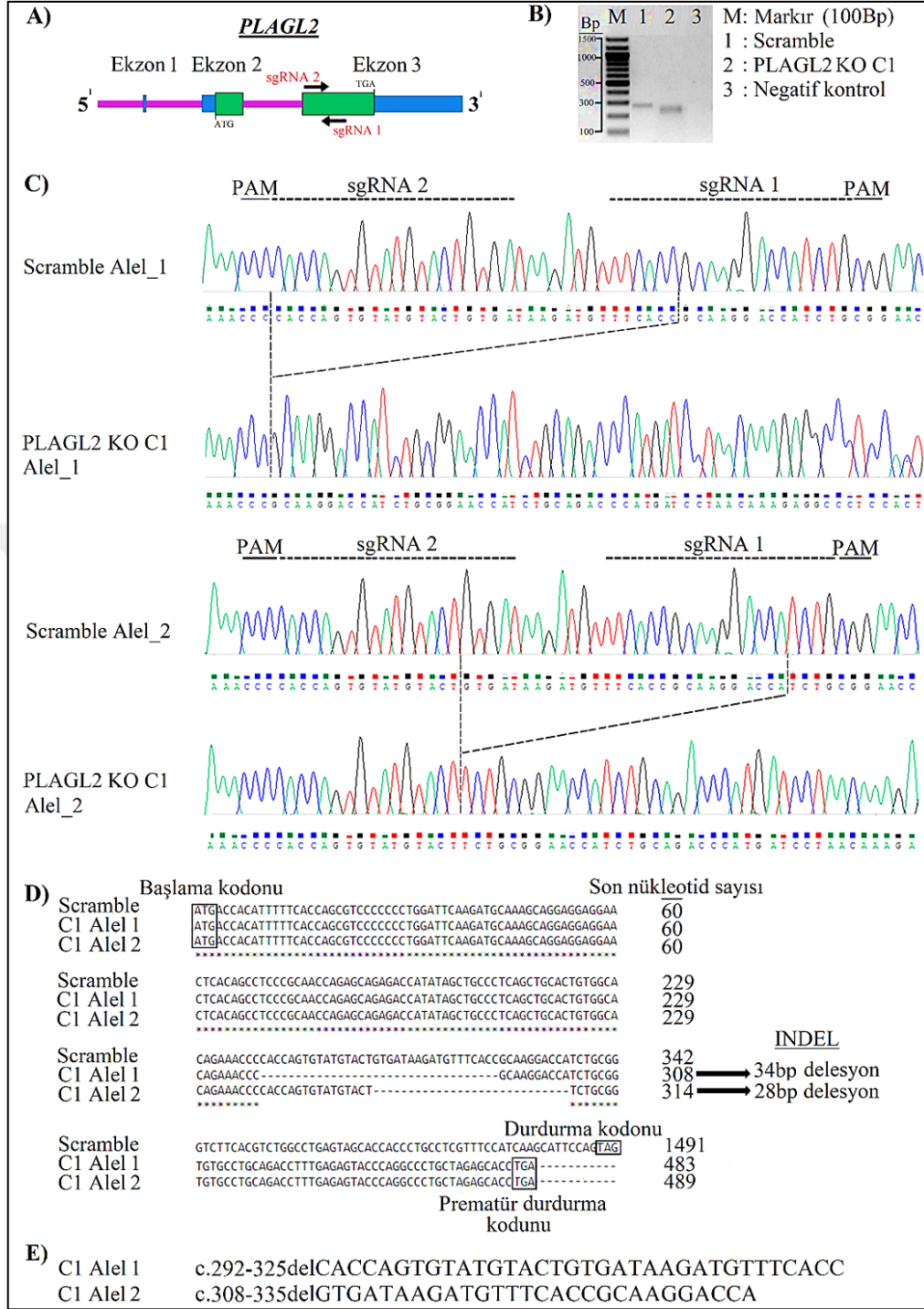
Sonuç olarak, C1'de 1 ve 4., C4'te 2 ve 3., C16'da 1 ve 2., C35'te 1 ve 2., C48'de 1 ve 3. kuyu PCR ürünleri seçilerek vektöre ait ileri primer ile Sanger yöntemi ile dizilendi. INDEL analizleri Tablo 24'te gösterilmektedir. Dizileme analizleri sonrasında Klon 1

(C1)’de agaroz jelde görüntülenen yaklaşık 150 baz çiftlik beklenmeyen fragmanın (Resim 12, kuyu 2 ve 3) primer dimer’inin vektöre girmesinden kaynaklandığı görüldü. Klon 3 (C3)’de ise üç farklı alel tespit edildi. Bu sonuç klon seçimi esnasında başka bir klonun seçilen klona karıştığını göstermektedir. Bundan dolayı Klon 3 (C3) sonraki analizlere dahil edilmedi.

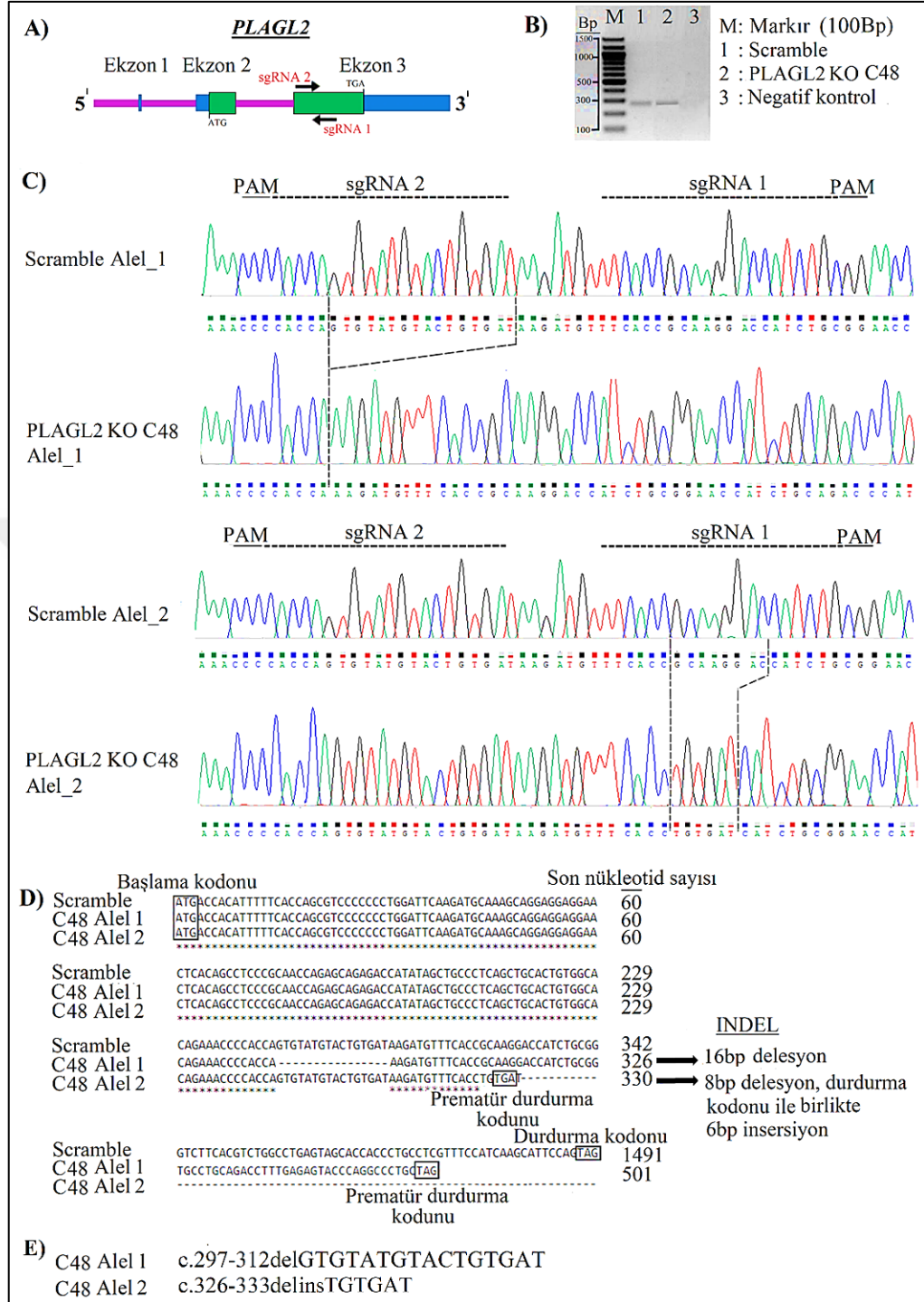
Tablo 24. *PLAGL2* için CRISPR/Cas9n uygulaması sonucunda seçilen klonlara ait varyasyonların alel bazlı analiz sonuçları

Klon	Varyasyon Gösterimi (cDNA ve Protein)		
C1	Alel 1	c.292-325delCACCAGTGTATGTACTGTGATAAGATGTTTCACC	p.His98AlafsX64
	Alel 2	c.308-335delGTGATAAGATGTTTCACCGCAAGGACCA	p.Cys103PhefsX61
C4	Alel 1	c.318-346delInsAAGATGTGTTTCACCG	p.Met106IlefsX62
	Alel 2	c.302-312delTGTACTGTGAT	p.Met101LysfsX16
C16	Alel 1	c.316-330delATGTTTCACCGCAAG	p.MFHRK106-110del
	Alel 2	INDEL YOK	-
C35	Alel 1	c.314-331delInsTGATA	p.Lys105MetfsX63
	Alel 2	c.324-335delCCGCAAGGACCA	p.RKDH109-112del
C48	Alel 1	c.297-312delGTGTATGTACTGTGAT	p.Cys100ArgfsX68
	Alel 2	c.326-333delInsTGTGT	p.His109Leu fsX1

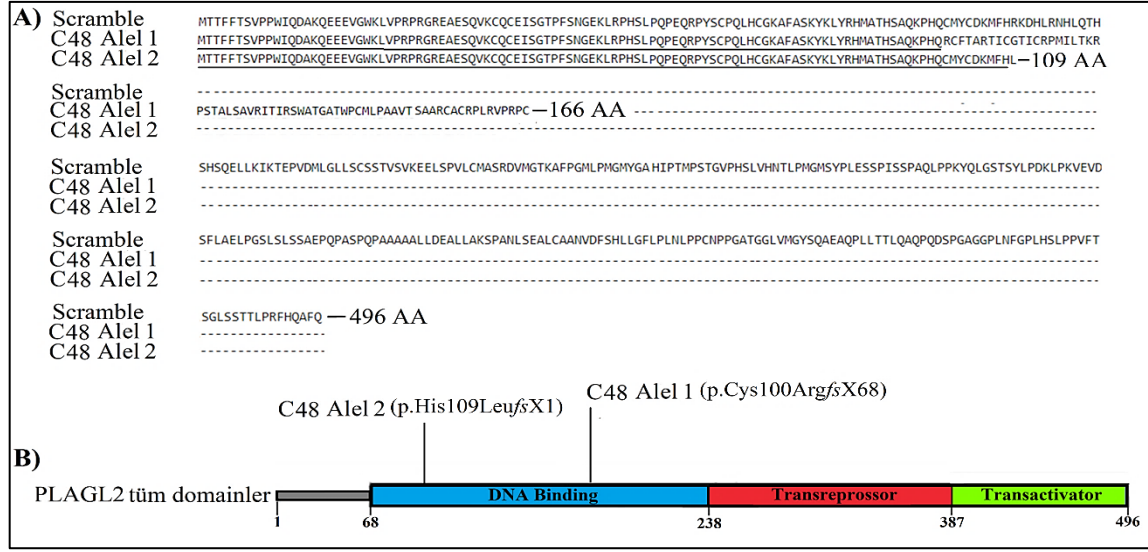
Biyoinformatik araçlar kullanılarak analiz edilen klon 1’e ait alellerde INDEL’lerin *PLAGL2* proteinini çinko parmak DNA bağlanma domainin ortasında, klon 48’e ait alellerde başında ve ortasında sonlandığı görüldü. Analizler esnasında izlenen süreç C1 için Şekil 19 ve 20’de C48 için Şekil 21 ve 22’de detaylı olarak açıklandı. Seçilen bu iki klon *PLAGL2* knock-out klon 1 (*PLAGL2* KO C1) ve *PLAGL2* knock-out klon 48 (*PLAGL2* KO C48) olarak adlandırıldı ve sonraki çalışmalarda bu iki klon kullanıldı. Ayrıca negatif kontrol (Scramble) tabağından seçilen kontrol hücresi de Scramble olarak adlandırıldı.



Şekil 19. C1'de *PLAGL2*'nin CRISPR/Cas9n yöntemiyle knock-out edilmesinin DNA ve RNA düzeyinde şematik olarak gösterilmesi. **A)** *PLAGL2* hedef geni üzerinde sgRNA'ların konumlandırılması: mavi ekzon, mor intron, yeşil kodlayan bölge. **B)** *PLAGL2* CRISPR/Cas9n hedef bölgesinin PCR ile çoğaltılması. **C)** *PLAGL2*'nin knock-out edilmesinin DNA üzerinde (alel 1 ve alel 2), scramble ile karşılaştırılarak Sanger dizileme yöntemiyle gösterilmesi. sgRNA 1, sgRNA 2 ve PAM dizisi gen üzerinde altı çizili olarak vurgulanmıştır. **D)** Her iki alelde meydana gelen INDEL'lerin mRNA üzerine yansması. Başlama, durdurma ve alellerde çerçeve kayması sonucu oluşan prematür durdurma kodonu gösterilmiştir. **E)** cDNA üzerindeki varyasyon gösterimi.



Şekil 21. C48'de *PLAGL2*'nin CRISPR/Cas9n yöntemiyle knock-out edilmesinin DNA ve RNA düzeyinde şematik olarak gösterilmesi. **A)** *PLAGL2* hedef geni üzerinde sgRNA'ların konumlandırılması: mavi ekzon, mor intron, yeşil kodlayan bölge. **B)** *PLAGL2* CRISPR/Cas9n hedef bölgesinin PCR ile çoğaltılması. **C)** *PLAGL2*'nin knock-out edilmesinin DNA üzerinde (alel 1 ve alel 2), scramble ile karşılaştırılarak Sanger dizileme yöntemiyle gösterilmesi. sgRNA 1, sgRNA 2 ve PAM dizisi gen üzerinde altı çizili olarak vurgulanmıştır. **D)** Her iki alelde meydana gelen INDEL'lerin mRNA üzerine yansıması. Başlama, durdurma ve alellerde çerçeve kayması sonucu oluşan prematür durdurma kodunu gösterilmiştir. **E)** cDNA üzerindeki varyasyon gösterimi.



Şekil 22. C48’de *PLAGL2*’nin CRISPR/Cas9n yöntemiyle knock-out edilmesinin protein düzeyinde şematik olarak gösterilmesi. **A)** Scramble ile C48’e ait her iki alelden elde edilen amino asit değişimlerinin karşılaştırılması. Ortak olan amino asitlerin altı çizgiyle vurgulanmıştır. Alel 1, 166. amino asitte Alel 2, 109. amino asitte sonlanmıştır. **B)** *PLAGL2* ait tüm domainlerin konumu. DNA bağlanma domaini mavi ile temsili olarak gösterilmiştir. Klon 48 (C48) ’e ait alellerde mutant proteinin ifadesi alel 1’de DNA bağlanma domainin ortalarında, alel 2’de DNA bağlanma domainin başlarında sonlanmıştır. Varyasyonların protein üzerine yansması şekil üstünde gösterilmiştir.

4.1.8. CRISPR/Cas9n Sistemi İçin Tasarlanan sgRNA’ların Seçilen Klonlarda Hedef Dışı Analizlerinin Gerçekleştirilmesi (Off-Target)

Bu kapsamda Benchling biyoinformatik aracı kullanılarak tasarlanan ve *PLAGL2*’nin sessizleştirilmesinde kullanılan sgRNA 1 ve 2 için hedef-dışı analizleri, CCTop biyoinformatik web arayüzü (193) kullanılarak gerçekleştirildi. Hedef dışı analiz sonucunda sgRNA 1 ve 2’nin hedeflenme ihtimalinin olduğu genlerin ilk 20 tanesi sıralandı. Bu genler arasında seçim yapılırken sgRNA 1 için hedef-dışı olma ihtimali en yüksek gen *RP11-274J2.1* (ekzonda bir baz değişim olan) ve sgRNA 2 için *TREML2* geni (ekzonda dört baz değişim olan) dizileme analizlerini gerçekleştirmek üzere seçildi. Seçim yapılırken hedef dışı ihtimali olan bölgelerin, öncelikle ekzonik bölge olması sonrasındaysa hedefle farkının en düşük Mis-match’e (MM) sahip olması tercih edildi. Bu doğrultuda, sgRNA 1 için ekzonik bölgeye sahip üç farklı gen arasından bir Mis-match’e sahip *RP11-274J2.1* (Şekil 23A), sgRNA 2 içinse ekzonik bölgeye sahip iki farklı gen arasından dört Mis-match’e sahip *TREML2*’nin (Şekil 23B), hedef dışı gen adayları olarak düşünülerek INDEL analizlerini gerçekleştirmek üzere seçildi.

A) Legend for off-target site positon: E = exonic; I = intronic; - = intergenic

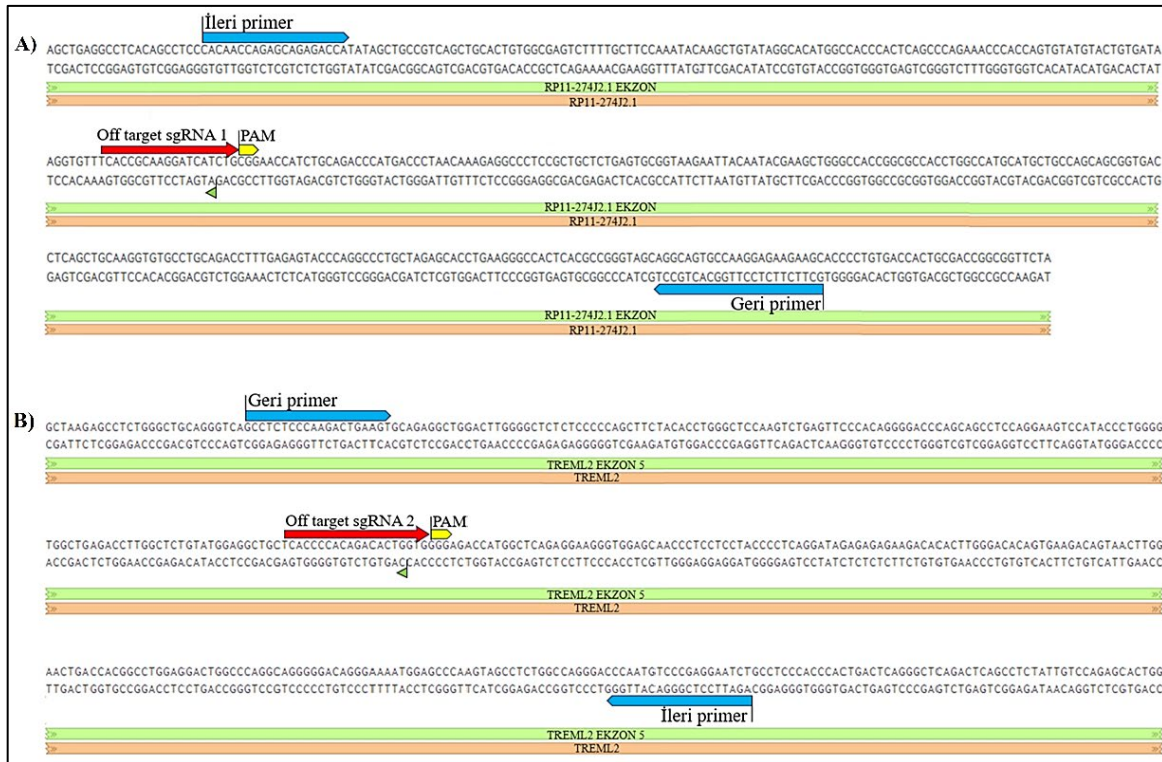
Coordinates	strand	MM	target_seq	PAM	distance	gene name	gene id
chr20:32197601-32197623	-	0	TTCACCGC[AAGGACCATCTG]	CGG	0	E PLAGL2	ENSG00000126003
chr3:12840570-12840592	-	4	ACTACCGG[AAGGACCATCTG]	GGG	0	E RPL32	ENSG00000144713
chr3:129397468-129397490	-	4	ACTACCGG[AAGGACCATCTG]	GGG	120	I SNORA7B	ENSG00000207088
chr4:84244318-84244340	+	1	TTCACCGC[AAGGATCATCTG]	CGG	0	E RP11-274J2.1	ENSG00000214980
chr5:883489-883511	+	4	ACCACCAC[AAGGACCATCTG]	TGG	0	E BRD9	ENSG00000028310
chr5:149665149-149665171	+	4	TTTTCAGC[AAGGACCATCTG]	TGG	30181	- ARHGEF37	ENSG00000183111
chr9:119530853-119530875	+	4	ATCACCTC[CTGGACCATCTG]	TGG	6728	- RP11-295D22.1	ENSG00000260970
chr8:141578526-141578548	-	3	TTCACCTC[AGGTACCATCTG]	TGG	59789	- AC138647.1	ENSG00000226490
chr5:74354252-74354274	-	4	TTAACCAC[AGGAACCATCTG]	AGG	14100	- CTD-2275D24.1	ENSG00000251041
chr1:156260000-156260022	-	4	ATCACAC[ATGGGCCATCTG]	GGG	429	I SMG5	ENSG00000198952
chr5:33964884-33964906	-	4	TGCACCAG[AAGGAACATCTG]	AGG	868	I SLC45A2	ENSG00000164175
chr6:166755179-166755201	-	4	TTTACCCC[AGGGGCCATCTG]	AGG	2326	I RPS6KA2	ENSG00000071242
chr15:31903503-31903525	-	3	TGCACAGC[AAGGACCATCTG]	CGG	24778	- SNORA18	ENSG00000206849
chr8:100483234-100483256	+	4	TCCACCTC[TAGGACCATCTG]	GGG	81	I KB-1615E4.2	ENSG00000253666
chr20:10435477-10435499	-	4	TTCACCTG[AAGGAACATCTG]	AGG	24	I SLX4IP	ENSG00000149346
chr8:56069028-56069050	-	4	CTCACCCC[ATGGATCATCTG]	AGG	498	I RPS20	ENSG00000008988
chr11:32249948-32249970	-	4	TTCTCCTC[AGGGAACATCTG]	AGG	4376	I THEM7P	ENSG00000227160
chr17:77885925-77885947	-	4	TTCATAGC[AAGACCATCTG]	AGG	1838	- FLJ45079	ENSG00000204283
chr1:118231331-118231353	+	4	TCCACCAT[AAGGACCATCTG]	GGG	33019	- RNA5SP56	ENSG00000222209
chr15:75138148-75138170	+	4	CTCACAGC[CAGGACCTTCTG]	GGG	16482	- SCARNA20	ENSG00000252722

B) Legend for off-target site positon: E = exonic; I = intronic; - = intergenic

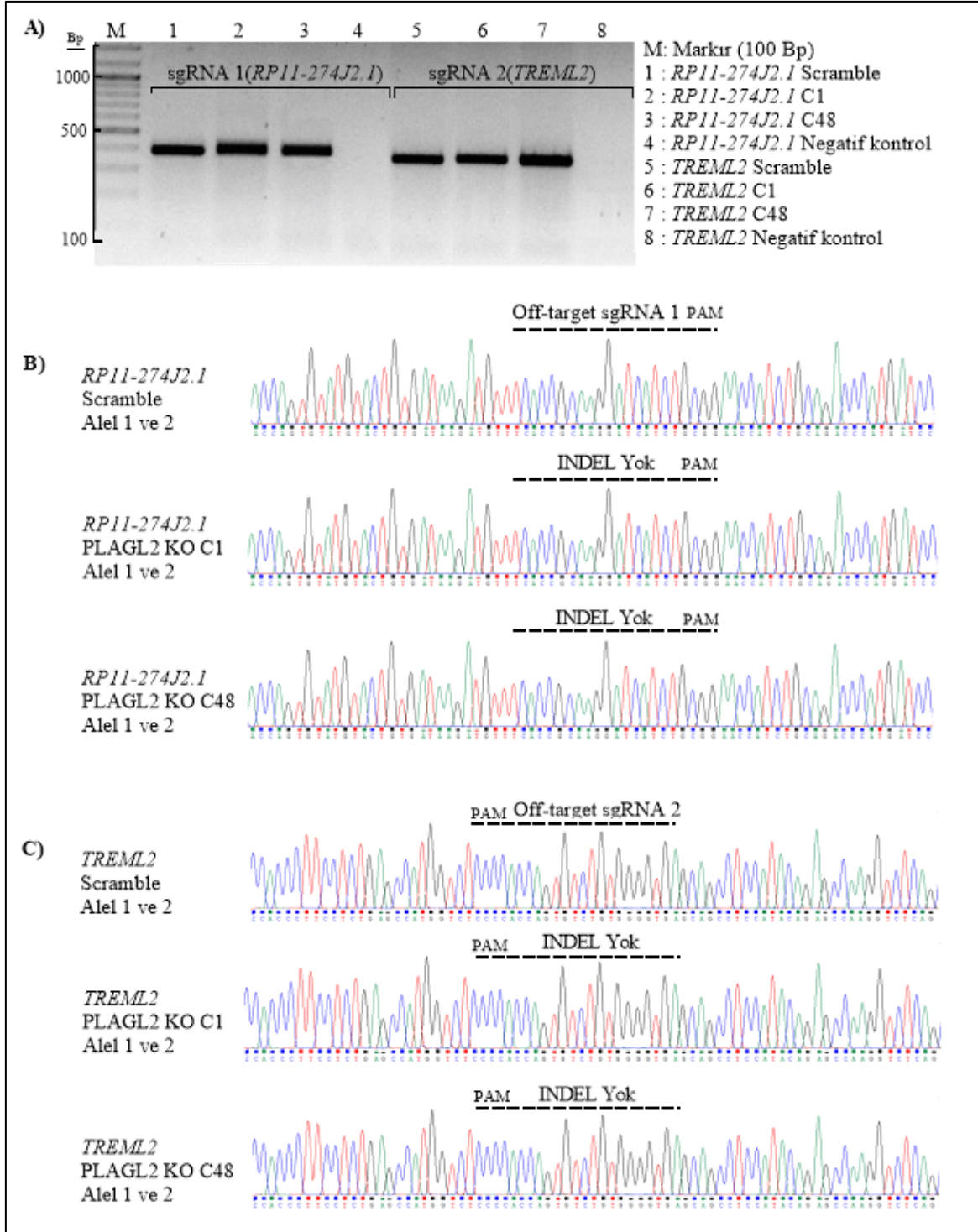
Coordinates	strand	MM	target_seq	PAM	distance	gene name	gene id
chr20:32197632-32197654	+	0	TCACAGTA[CATACACTGGTG]	GGG	0	E PLAGL2	ENSG00000126003
chr8:88259372-88259394	+	4	ACAATGTT[CATACACTGGTG]	AGG	62066	I MMP16	ENSG00000156103
chr2:72778567-72778589	+	4	TACCAATT[CATACACTGGTG]	AGG	17965	I SNORD78	ENSG00000212378
chr17:20698407-20698429	-	4	TCAGTTTC[CATACACTGGTG]	TGG	11996	- AC087499.8	ENSG00000264874
chr4:178572061-178572083	+	4	CCAGAGGA[ATATACACTGGTG]	AGG	NA	- NA	NA
chr18:22546046-22546068	-	4	CCACATTC[CGTACACTGGTG]	AGG	40397	- RPS4XP18	ENSG00000239490
chr6:87677722-87677744	-	4	TCACCTTC[TATACACTGGTG]	CGG	74	I AKIRIN2	ENSG00000135334
chr5:138015259-138015281	-	4	GGACAGTG[CATCCACTGGTG]	TGG	3021	I FAM13B	ENSG00000031003
chr1:237259787-237259809	+	4	GCCCAGTT[CATCCACTGGTG]	GGG	10688	I RYR2	ENSG00000198626
chr4:1304130-1304152	-	3	TCACAGAA[AACACACTGGTG]	AGG	4161	I MAEA	ENSG00000090316
chr6:41191519-41191541	-	4	TCACCCCA[CAGACACTGGTG]	GGG	0	E TREML2	ENSG00000112195
chr1:22216407-22216429	-	4	ACACAGGG[CAACACTGGTG]	AGG	49810	- MIR4418	ENSG00000266564
chr7:16308614-16308636	+	4	TCATAGTC[ACTACACTGGTG]	TGG	0	E ISPD	ENSG00000214960
chr4:181743573-181743595	+	4	TCTCAGAA[AAGACACTGGTG]	AGG	76424	- RP11-540E16.2	ENSG00000251336
chr4:47225950-47225972	-	4	TCACAGCC[AGTACACTGGTG]	GGG	64481	I GABRB1	ENSG00000163288
chr2:106045024-106045046	-	3	TCACATTA[CAATCACTGGTG]	AGG	18200	- C2orf40	ENSG00000119147
chr12:30624160-30624182	+	3	TCACAGGA[CAACACTGGTG]	AGG	4806	- IPO8	ENSG00000133704
chr11:83364173-83364195	-	3	TCCAGTGC[CATACAACTGGTG]	TGG	22793	I H19_3	ENSG00000274004
chr1:241530107-241530129	+	4	TGGCAATA[CATACACTGGTG]	AGG	2005	- KMO	ENSG00000117009
chr10:54881765-54881787	+	4	TCATAGTC[AATAGACTGGTG]	GGG	12643	I RP11-264A11.1	ENSG00000236958

Şekil 23. Tasarlanan sgRNA 1 ve 2'nin hedef dışında gitme ihtimali olan genlerin listesi. **A)** sgRNA 1. **B)** sgRNA 2. Analizi yapılacak olan genler kırmızı ok ile gösterilmiştir. Hedef dizinin genomdaki konumu, kırmızı harf ile gösterilen E: ekzonik, sarı harf ile gösterilen I: intronik, yeşil ile gösterilen ise intergenik olarak belirtilmiştir. sgRNA'ların gitme ihtimali olan hedef dizilerde *PLAGL2*'ye özgü sgRNA dizilerinden farklı olarak değişen bazlar (MM) kırmızı punto belirtilmiştir.

Hedef dışı analizler için seçilen genlerin ekzonlarındaki hedef diziyi (Off target sgRNA 1 ve 2) içine alan bölgeye özel primer tasarlandı (Şekil 24). *RP11-274J2.1* için (İleri Pr. 1701-Geri Pr. 1702), *TREML2* için (İleri Pr. 1703- Geri Pr. 1704) primerler kullanılarak hedef bölge PCR ile çoğaltıldı ve aynı ileri primerler kullanılarak Sanger dizilemeyle analiz edildi.



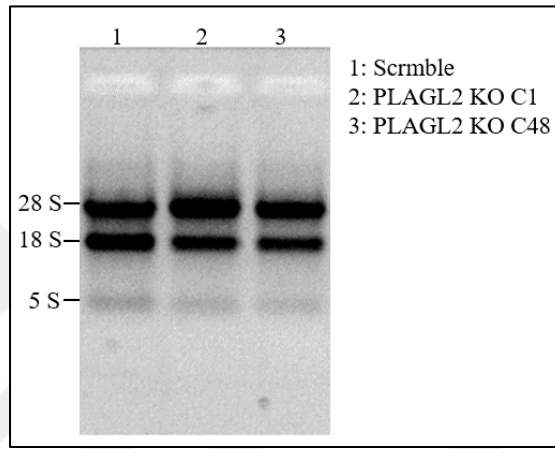
Hedef dışına yönelme ihtimali olan diziyi içeren bölgeyi çoğaltmak amacıyla yapılan PCR sonucunda (Resim 13A), *RP11-274J2.1*. ve *TREML2* genlerine ait PCR ürünleri yine aynı ileri primerler kullanılarak Sanger dizileme ile analiz edildi. *PLAGL2* knock-out C1 ve C48 klonlarında yapılan dizileme analizi sonucunda hem *RP11-274J2.1*. hem de *TREML2*'nin hedeflenme olasılığı olan dizisinde herhangi bir değişimin olmadığı görüldü (Resim 13B ve C). Böylelikle *PLAGL2* için seçtiğimiz sgRNA'larla uyguladığımız CRISPR/Cas9n sisteminin yönelme ve ekspresyonlarını susturma olasılıklarının yüksek olduğu iki geni etkilemediği gösterilmiş oldu.



Resim 13. *PLAGL2* knock-out klonlarda hedef dışı analizler için seçilen *RP11-274J2* ve *TREML2* genlerinin hedef bölgelerinin PCR ile çoğaltılması ve INDEL analizleri. **A)** PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüsü. **B)** *RP11-274J2* hedef bölgesine ait Sanger dizileme sonuçları. **C)** *TREML2* hedef bölgesine ait Sanger dizileme sonuçları.

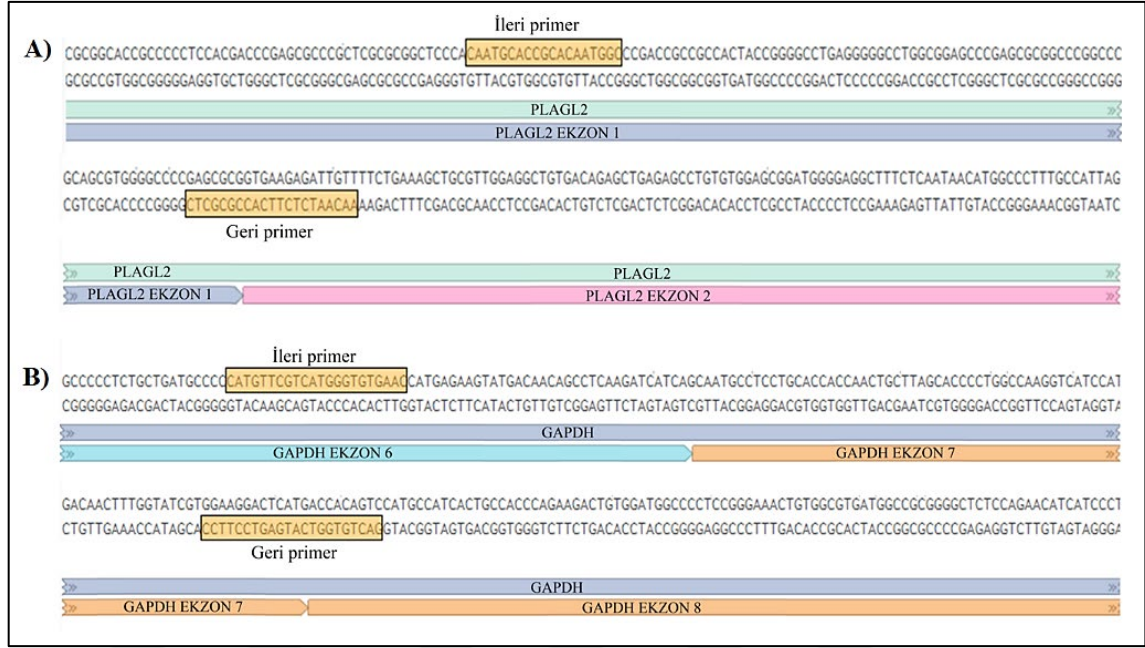
4.2. Seçilen Klonlarda *PLAGL2* Ekspresyonundaki Değişimin Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR) Yöntemi ile İncelenmesi

PLAGL2'nin susturulduğu DNA düzeyinde gösterilen klonlarda (C1 ve C48) *PLAGL2* gen ifadesinin mRNA seviyesindeki kantitatif değişimi analiz etmek amacıyla qRT-PCR yöntemine başvuruldu. Bu amaçla, ilk olarak örneklerden Macherey-Nagel (MN) RNA izolasyon kiti kullanarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda toplam RNA izole edildi (Resim 14).



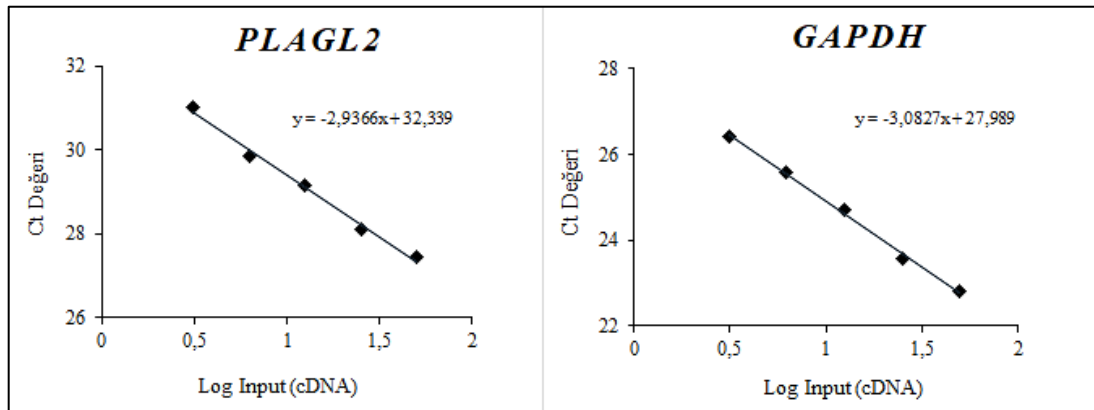
Resim 14. *PLAGL2* knock-out C1 ve C48 klonlarından RNA izolasyonu

Elde edilen RNA örneklerinden Wizscript cDNA sentez kiti kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda cDNA'lar oluşturuldu ve qRT-PCR reaksiyonu SYBR Green koşulları dikkate alınarak kuruldu. *PLAGL2* (İleri, Pr. 1656-Geri, Pr. 1657) ve normalizasyonda kullanılacak olan housekeeping *GAPDH* (İleri Pr. 1664-Geri, Pr. 1665) genine ait primerler olası genomik DNA kaynaklı çoğalmayı tamamen dışlamak adına ekzon-ekzon bağlantısından seçildi (Şekil 25).



Şekil 25. qRT-PCR'da kullanılacak olan primerlerin gen üzerinde konumlandırılması. **A)** *PLAGL2* (116 bp'lik ürün) ileri ve geri primeri. **B)** *GAPDH* (148 bp'lik ürün) ileri ve geri primerleri.

Yapılan qRT-PCR reaksiyonu sonucunda *PLAGL2* ve *GAPDH* genlerinin miktarı standart eğriye dayalı kantitatif qRT-PCR metodu ile hesaplandı (196). Bu metod için *PLAGL2* ve *GAPDH* primerleri kullanılarak Ct değerlerine karşı log cDNA miktarı olacak şekilde standart grafikleri çizildi. Standart eğrilerinden eğim değerleri *PLAGL2* ve *GAPDH* için sırasıyla -2.93 ve -3.08 olarak bulundu (Şekil 26).

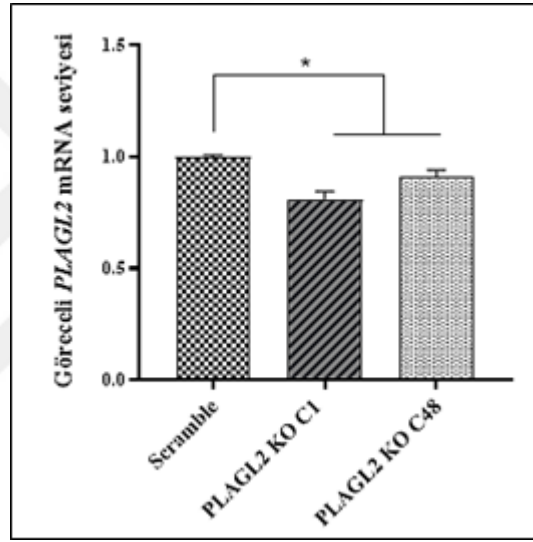


Şekil 26. *PLAGL2* ve *GAPDH* standart eğrileri

Deneyde elde edilen eğimlere denk gelen amplifikasyon verimi ‘Eşitlik 1’ denklemi kullanılarak *PLAGL2* ve *GAPDH* için sırasıyla %119 ve %111 olarak hesaplandı. Eğim değeri için -2.92 ile -3.92 arasında, eğim verimi içinse 100 ± 20 kabul edilebilir bir aralık olarak belirtilmiştir (214).

$$\text{Amplifikasyon verimi (\%)} = (10^{(-1/\text{eğim})} - 1) \quad (\text{Eşitlik 1})$$

Standart eğri çizilerek hesaplanan kantitatif karşılaştırma sonucunda *PLAGL2* ekspresyonunda kontrole kıyasla klon 1 (C1)’de yaklaşık %20, klon 48 (C48)’de yaklaşık %9’luk anlamlı bir azalma olduğu görüldü (Şekil 27).



Şekil 27. CRISPR/Cas9n uygulaması sonrası seçilen C1 ve C48 klonlarında *PLAGL2* mRNA seviyesi. * $p < 0.05$

CRISPR gen knock-out sisteminde asıl hedef bir geni protein seviyesinde susturmak olduğu için, bir sonraki aşamada *PLAGL2* knock-out klonlarda *PLAGL2* protein seviyesi immüno blot yöntemiyle analizi edildi.

4.3. *PLAGL2*'nin HaCaT Klonlarında Knock-out Edildiğinin İmmüno blot ile Doğrulanması

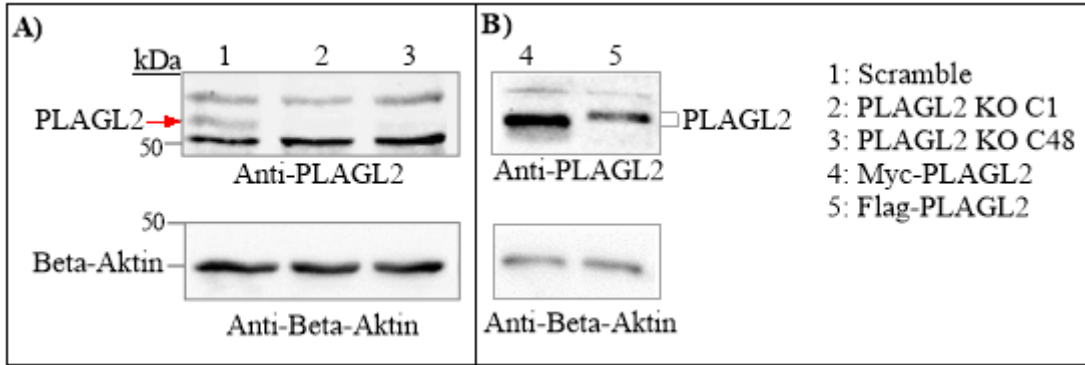
4.3.1. Hücrelerden Protein Lizatı Eldesi ve Protein Miktarı Tayini

INDEL'lerin analizi sonucunda *PLAGL2* proteinin erken sonlandığı DNA ve mRNA düzeyinde teorik olarak gösterilen C1 ve C48 klonlarında, *PLAGL2* ekspresyonunu protein seviyesinde göstermek amacıyla immüno blot analizi gerçekleştirildi. Bu hedefe

yönelik ilk olarak kontrol, *PLAGL2* knock-out C1 ve C48 klonlarından protein lizati elde edildi. Ayrıca, endojen *PLAGL2* proteininin görüntülenmesi esnasında daha evvel Myc- ve Flag- etiketleriyle füzyon olarak HEK293 hücrelerinde geçici fazladan ifade ettirilen etiketli *PLAGL2* proteinin olduğu lizat da görüntüleme esnasında kolaylık sağlaması açısından pozitif kontrol olarak deneye eklendi (Resim 15B). Protein miktarı BCA kiti kullanılarak kantite edildi ve jele eşit miktarda protein yüklendi.

4.3.2. SDS-PAGE Elektrofrez ve İmmünoiblot Analizi

PLAGL2 ekspresyonu *PLAGL2*'ye özgü antikor kullanılarak %7.5'lik SDS/PAGE jelinde analiz edildi (Resim 15A). Scramble sgRNA'nın kullanıldığı hücrede *PLAGL2* ekspres olurken, C1 ve C48 klonlarında ekspresyon görülmedi. Pozitif kontrol olarak kullandığımız Myc etiketli (~1.2 kDa) ve 3xFlag etiketli (~3 kDa) *PLAGL2*, beklediğimiz üzere endojen *PLAGL2*'nin çok az gerisinde yürüdü (Resim 15B). Proteinin her örnek için jele eşit miktarda yüklendiği housekeeping protein olan β -aktin ile gösterildi.



Resim 15. *PLAGL2* knock-out klonlarda *PLAGL2*'nin immünoiblot ile analizi **A)** Kontrol, *PLAGL2* knock-out C1 ve C48 klonlarında *PLAGL2* (54 kDa) ifadesi. *PLAGL2* kırmızı ok ile gösterilmiştir. **B)** Pozitif kontrol olarak HEK293 hücrelerinde geçici fazladan ifade ettirilen Myc ve Flag etiketli *PLAGL2*.

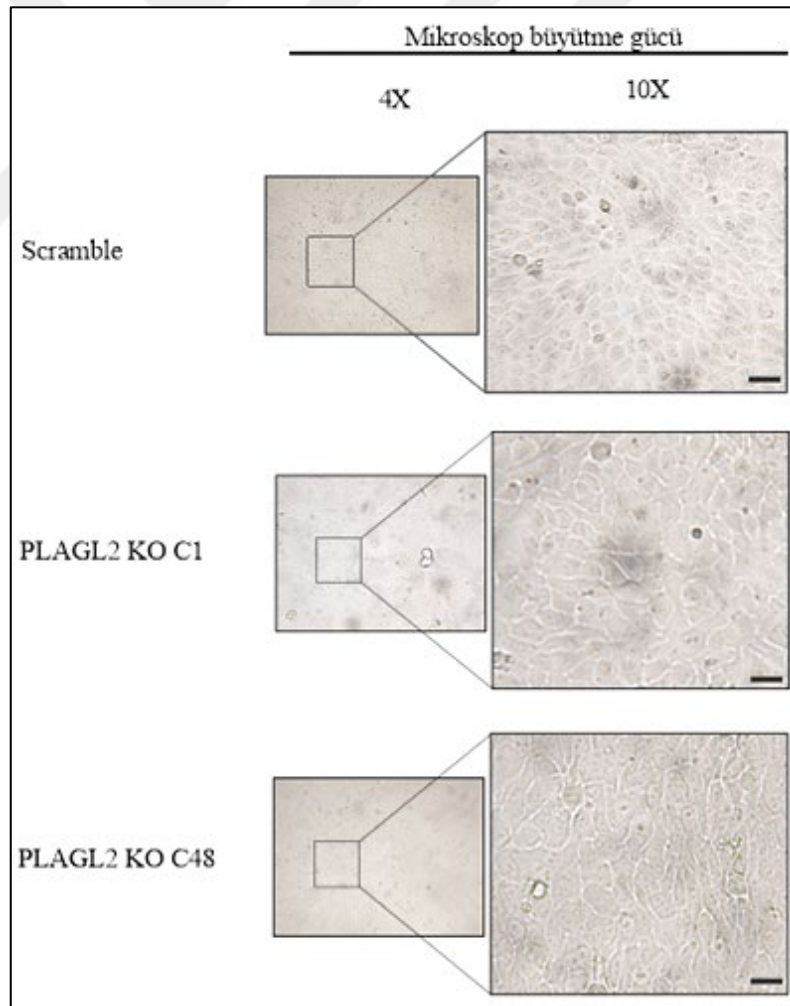
PLAGL2 ekspresyonunun yok edildiği protein seviyesinde kanıtlanan *PLAGL2* knock-out klonlarda CRISPR/Cas9n sisteminin amacına ulaştığı gösterilmiş oldu. Elde edilen bu klonlar bir sonraki karakterizasyon çalışmaları için önce çoğaltıldı sonra kısa vadede kullanılmak üzere -80 °C'de uzun vadede kullanılmak üzere sıvı nitrojende dondurularak saklandı.

4.4. *PLAGL2* Knock-out HaCaT Hücrelerinin Morfolojisinin İncelenmesi

PLAGL2'nin knock-out edildiği doğrulandıktan sonra klonlar öncelikle morfolojik açıdan incelendi. Bu çalışmalar kapsamında hücreler ilk olarak ışık mikroskobu altında analiz edildi. Sonrasında hücre kompartmanlarını analiz edilmesine olanak sağlayan immünofloresan yöntemiyle konfokal mikroskobunda incelendi.

4.4.1. Işık Mikroskobu Altında *PLAGL2* Knock-out Hücrelerinin Morfolojisinin İncelenmesi

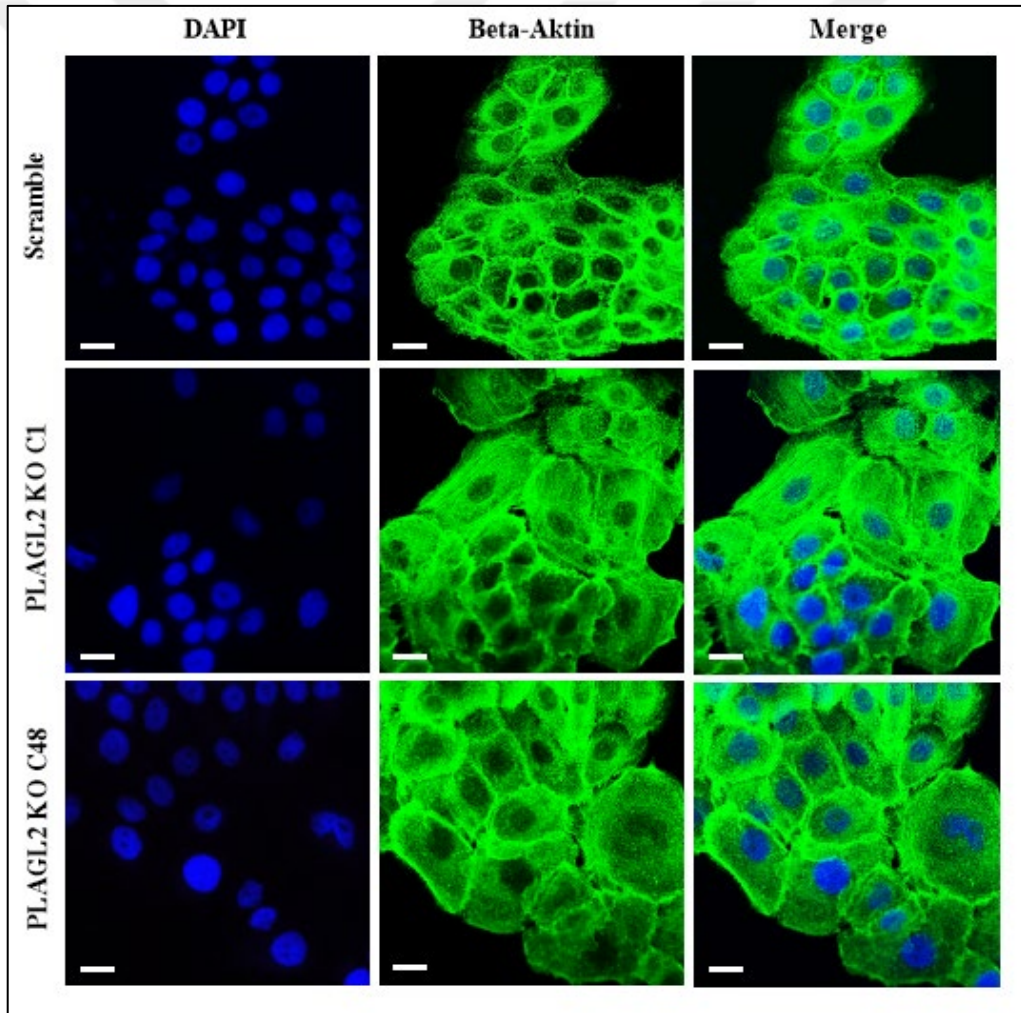
Uygun büyüme koşullarında çoğaltılan ve yaklaşık %80-90'lık doluluk oranına ulaşan *PLAGL2* knock-out hücreler Canon fotoğraf makinesi bağlantılı 'inverted mikroskop' ile görüntülendi. Analizi sonrasında *PLAGL2* knock-out hücrelerin kontrole kıyasla boyut olarak belirgin bir şekilde daha büyük olduğu gözlemlendi (Resim 16).



Resim 16. *PLAGL2* knock-out ve kontrol hücrelerinin ışık mikroskobu altındaki görünümü. Ölçek çubuğu: 25 µm.

4.4.2. Konfokal Mikroskobu ile *PLAGL2* Knock-out Hücrelerinin Morfolojisinin İncelenmesi

Işık mikroskopisine dayalı gözlemlerimiz *PLAGL2* knock-out hücrelerin kontrole kıyasla daha büyük olduğunu gösterdi. Bu gözlemimizin ardından, hücre sınırlarını daha detaylı bir şekilde incelemek adına hücrelerde hücre şekil ve sınırlarının belirlenmesinde sıklıkla kullanılan beta-aktin proteini (188) immüno Floresan yöntemiyle β -aktin antikorunu kullanılarak konfokal mikroskopta analiz edildi. Işık mikroskopuyla örtüşür şekilde konfokal mikroskop analiz sonucunda *PLAGL2* knock-out hücrelerinin hücre boyutunun belirgin şekilde daha büyük olduğu görüldü (Resim 17 ve Ek 2).

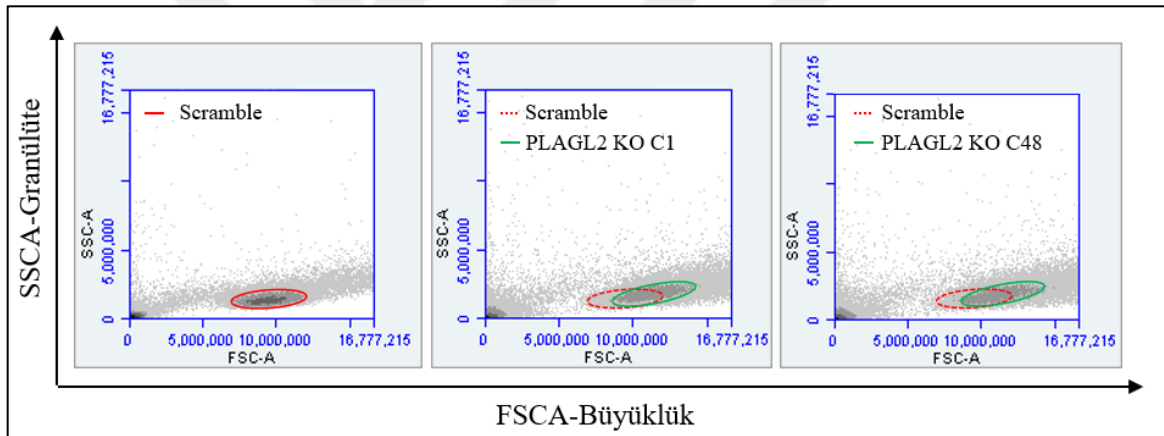


Resim 17. *PLAGL2* knock-out hücrelerde Beta-aktin ile hücre iskeleti organizasyonunun analizi. DAPI: Mavi, Alexa Flour 488: Yeşil. Ölçek çubuğu: 20 μ m.

4.4.3. Akış Sitometrisi ile *PLAGL2* Knock-out Hücrelerinin Morfolojisinin İncelenmesi

Işık ve konfokal mikroskobunda yüzeye tutunan hücreler üzerinde gerçekleştirilen morfolojik incelemelerin ardından *PLAGL2* knock-out hücrelerde gözlemlediğimiz hücre boyutundaki artışın yüzeye tutunma şekline mi yoksa boyuttaki artışa mı bağlı olduğunu belirlemek ve boyuttaki artış olması durumunda bunu kanıtlamak üzere hücreler akış sitometrisi cihazında analiz edildi. Ayrıca hücrelerin granülite ölçümü de gerçekleştirildi (Şekil 28).

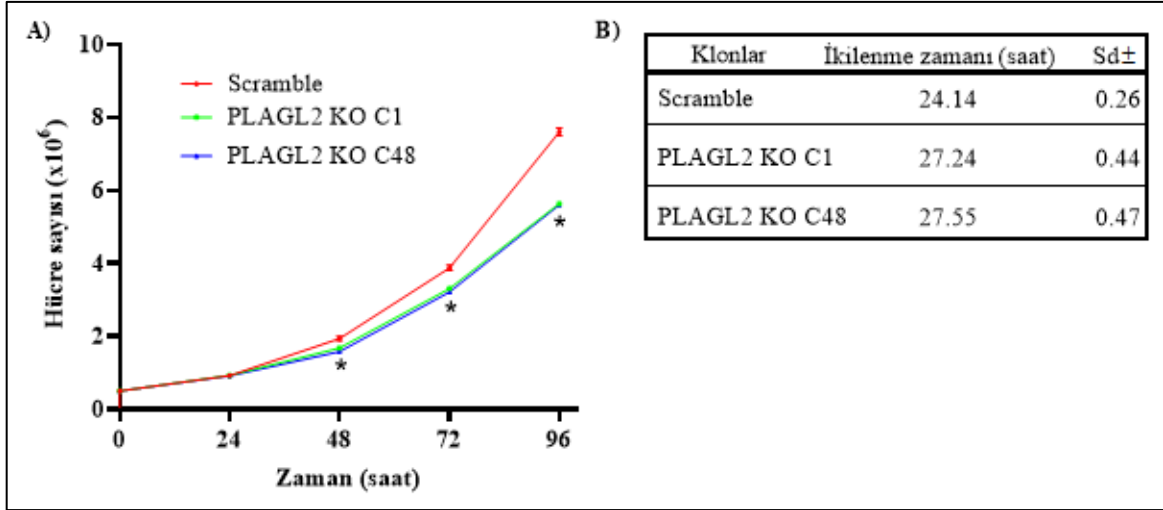
Akış sitometrisinden elde edilen sonuç, yüzeye yapışık hücrelerde gözlemlediğimiz mikroskop analizleri ile örtüşür şekilde *PLAGL2* knock-out HaCaT hücrelerin hücre-yüzey etkileşiminden bağımsız olarak boyutlarının x-ekseninde (FSC-A) sağa ve granülütelerinin y-ekseninde (SSC-A) yukarı kümülatif olarak kaydığı görüldü (Şekil 28).



Şekil 28. *PLAGL2* knock-out hücrelerinin büyüklük ve granülütelerinin akış sitometrisi ile analizi. Kırmızı halka Scramble, yeşil halkalar *PLAGL2* KO hücre popülasyonunun yoğunlaştığı bölgeyi temsil etmektedir.

4.5. *PLAGL2* Knock-out HaCaT Hücrelerinin İkilenme Zamanının Analizi

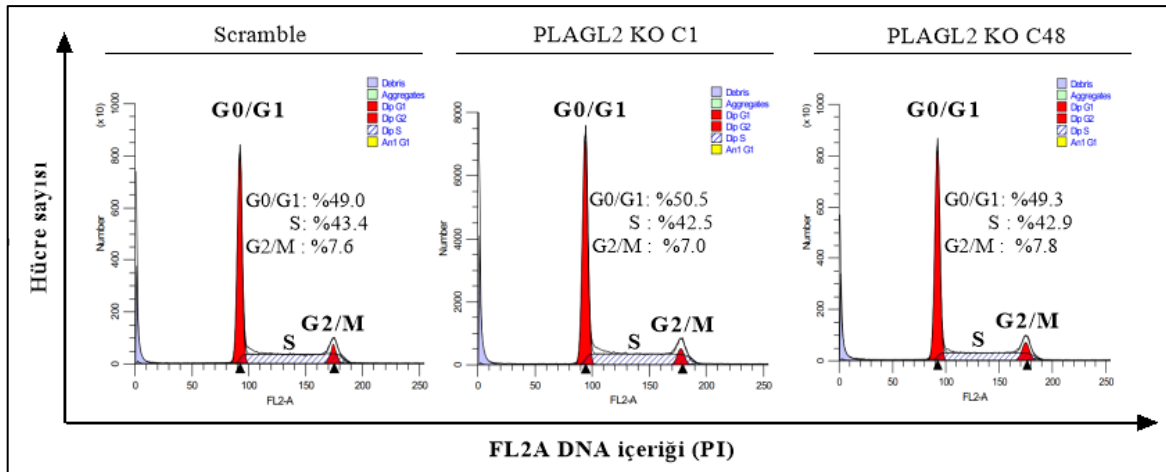
PLAGL2 knock-out hücrelerin proliferatif özelliklerini belirlemek amacıyla hücrelerin bölünerek sayılarını iki katına çıkardıkları zaman (ikilenme zamanı: doubling time) analiz edildi. Hücrelerin ikilenme zamanının belirlenmesi için 0, 24, 48, 72 ve 96. saatlerde akış sitometrisi kullanılarak hücre sayımı yapıldı ve büyüme eğrileri çizildi (Şekil 29A). Elde edilen veriler doğrultusunda ikilenme zamanı kontrol hücrelerinde 24.14 saatken, *PLAGL2* knock-out hücrelerde sırasıyla; 27.24 ve 27.55 saat olarak belirlendi (Şekil 29B).



Şekil 29. *PLAGL2* knock-out hücrelerinin hücre proliferasyon (ikiye katlanma) analizleri. **A)** Hücrelerin büyüme eğrileri, kontrol: kırmızı, *PLAGL2* knock-out C1: yeşil, *PLAGL2* knock-out C48: mavi. **B)** İkiye katlanma zamanları. * $p < 0.05$

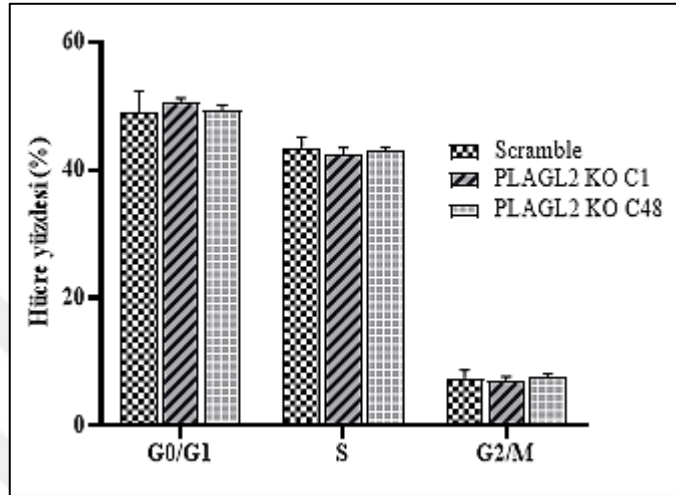
4.6. *PLAGL2* Knock-out HaCaT Hücrelerinin Hücre Döngüsü Analizi

PLAGL2'nin knock-out edilmesinin, hücre döngüsünün ilerlemesi üzerine etkisini belirlenmek amacıyla *PLAGL2* knock-out hücrelerinin kontrol ile karşılaştırılarak normal koşullarda (%10 FBS) hücre döngüsü analizi gerçekleştirildi. Normal koşullardaki analiz için, 'hücre ikilenme zamanlarının analizi sırasında 72. saatte toplanan ve hücre yoğunluğu %70-80 arasında olan hücreler kullanıldı. Sonrasında PI ile boyanan hücreler akış sitometrisi kullanılarak BD Accuri C6 Plus ve ModFit LT™ yazılımlarıyla analiz edildi (Şekil 30).



Şekil 30. *PLAGL2* knock-out hücrelerinin hücre döngüsü analizleri

PLAGL2 knock-out hücrelerde hücre döngüsünün PI boyama yöntemi ile analiz edilmesinin ardından, hücre döngüsü fazlarındaki değişimler istatistiksel olarak analiz edildi. *PLAGL2* knock-out hücrelerin hücre döngüsü fazlarındaki yığılımında kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmedi (Şekil 31).

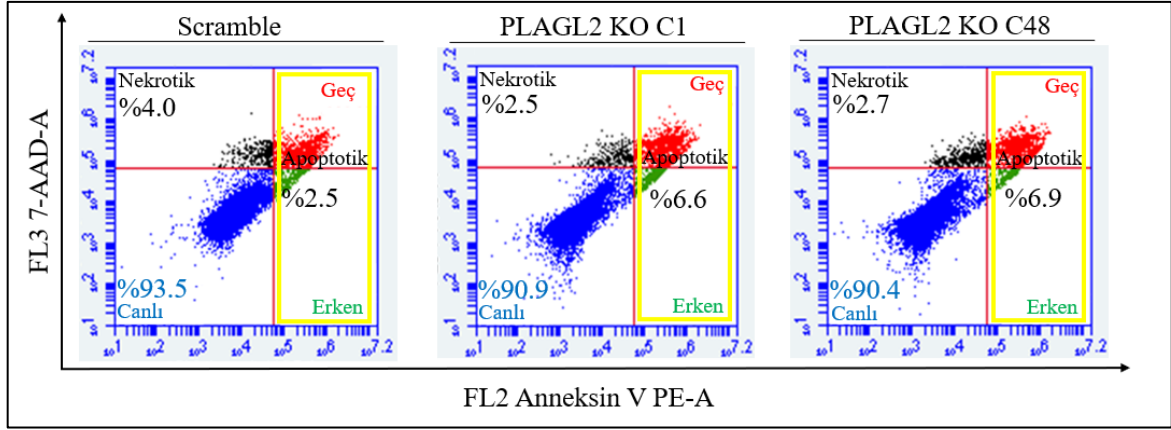


Şekil 31. *PLAGL2* knock-out hücrelerde hücre döngüsü fazlarının istatistiksel analizi

4.7. *PLAGL2* Knock-out HaCaT Hücrelerinin Hücre Ölümü Analizi

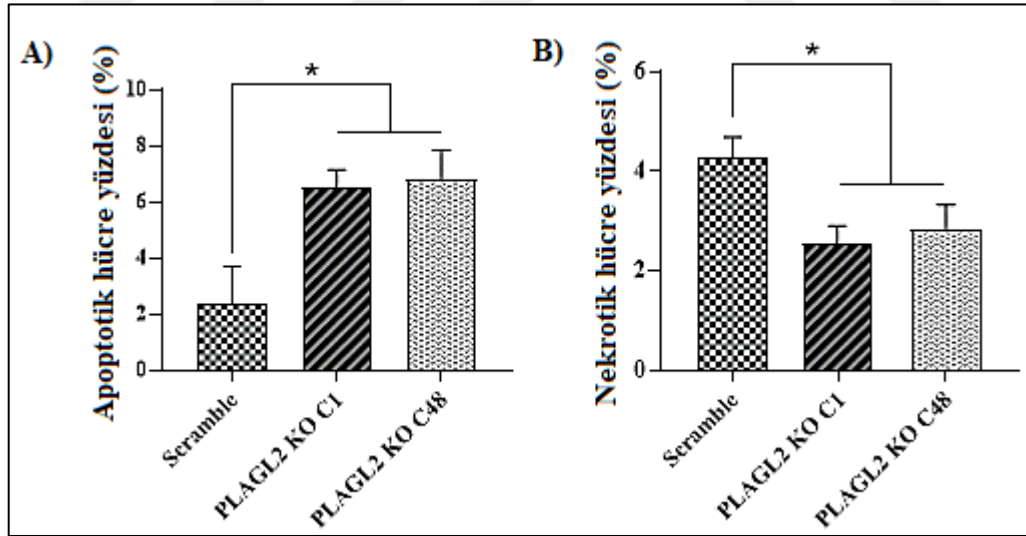
Hücre ölümü analizi Annexin V/7-AAD boyama yöntemi ile flow sitometrik olarak analiz edildi. Kontrol ve *PLAGL2* knock-out hücrelerine yönelik hücre ölüm analizleri esnasında toplam apoptotik hücre yüzdesi erken ve geç apoptotik hücre popülasyonlarının toplamı olarak değerlendirildi.

Normal besiyerinde büyütülen hücrelere yönelik hücre ölümü analiz sonuçlarında kontrol hücrelerine kıyasla, *PLAGL2* knock-out hücrelerinde apoptotik hücre popülasyonunda sırasıyla yaklaşık 2.6 ve 2.8 kat artış tespit edildi. Ayrıca, bu hücrelerde nekrotik hücre yüzdesinde kontrole kıyasla yaklaşık 1.5 kat anlamlı bir azalma görüldü (Şekil 32).



Şekil 32. *PLAGL2* knock-out hücrelerde hücre ölümü (apoptoz) analizi (Mavi: canlı, siyah: nekrotik, yeşil: erken apoptotik, kırmızı: geç apoptotik hücre popülasyonunu temsil etmektedir.)

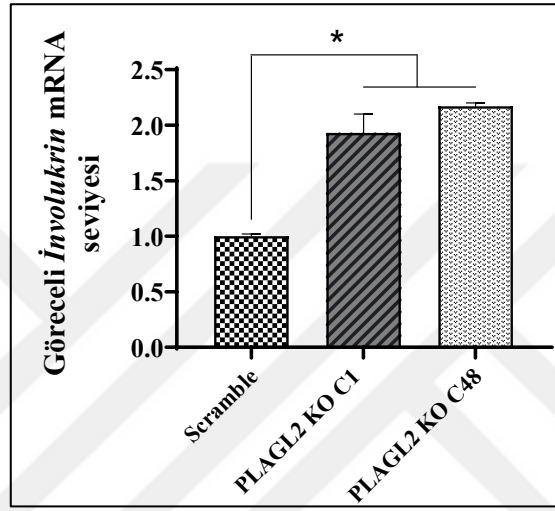
Hücre ölümü analiz deneyinde *PLAGL2* knock-out hücrelerde hücre ölümündeki artış istatistiksel olarak analiz edildi. Kontrole kıyasla hücrelerdeki apoptotik hücre ölümünün artmasının ve nekrotik hücre ölümünün azalmasının istatistiksel olarak da anlamlı olduğu belirlendi (Şekil 33).



Şekil 33. *PLAGL2* knock-out hücrelerde hücre ölümünün istatistiksel analizi. **A)** Apoptotik hücre popülasyonu. **B)** Nekrotik hücre popülasyonu. * $p < 0.05$

4.8. *PLAGL2* Knock-out HaCaT Hücrelerde *İnvolukrin* Ekspresyonu Analizi

PLAGL2 knock-out hücrelerin keratinosit farklılaşma seviyesini daha ileriye taşıyıp taşımadığını belirlemek amacıyla hücrelerde ileri farklılaşma markörü *İnvolukrin* mRNA ekspresyonu analiz edildi. -3.02 eğim (Ek 1) ve %114 verimle, kontrole kıyasla *PLAGL2* knock-out hücrelerinde *İnvolukrin* ekspresyon seviyesinde yaklaşık 2 katlık anlamlı bir artış tespit edildi (Şekil 34).



Şekil 34. *PLAGL2* knock-out hücrelerde *İnvolukrin* mRNA seviyesi. * $p < 0.05$

4.9. *PLAGL2* Knock-out HaCaT Hücrelerinin Hücre Hareketi Analizlerinin Yapılması

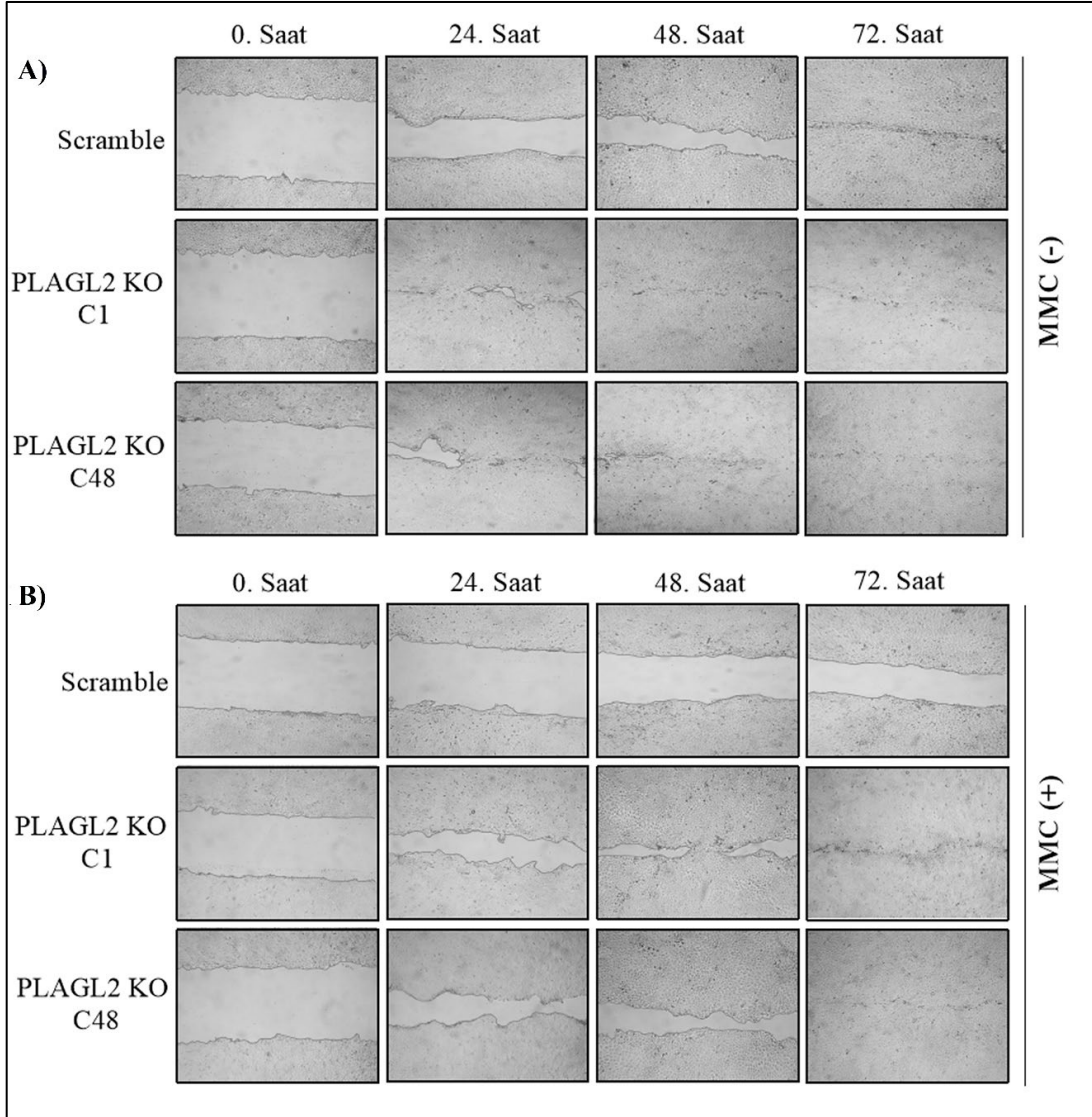
4.9.1. Yara İyileşmesi Analizleri (Wound-Healing)

PLAGL2'nin keratinosit hücrelerinde hücre migrasyonuna etkisinin olup olmadığını incelemek için *PLAGL2*'nin knock-out edildiği hücrelerde *in vitro* yara iyileşmesi modeli çalışmaları gerçekleştirildi. Bu modelde hücrelerin tüm yüzeyini kapladığı bir hücre kültürü tabağında sonradan oluşturulan yara benzeri boşluğun hücreler tarafından doldurulma hızı ölçülür. Bu hız, zaman açısından yaranın kapanma oranı olarak ifade edilir.

Bu analiz %10 FBS içeren normal büyüme koşullarında gerçekleştirildi. Ayrıca, analiz esnasında boşluğun doldurulmasında hücre bölünmesini olabildiğince dışlamak ve yalnızca hücre göçünün süreçteki etkisini analiz etmek için hücreler DNA sentezini engelleyerek hücre bölünmesini durduran Mitomisin C'ye (MMC) maruz bırakıldı.

Yapılan hücre hareketi analizleri sonucunda normal büyüme ortamında ve MMC yokluğunda *PLAGL2* knock-out hücrelerinin 24. saatteki görüntülerinde yara alanının

neredeyse tamamının hızla kapandığı görüldü. Kontrol hücrelerin boşluğun tamamını kapatması ise 72 saati buldu (Resim 18A). Benzer durum hücre bölünmesinin durdurulduğu MMC varlığında da görüldü ve *PLAGL2* knock-out hücrelerde yaranın kapanması 72 saatte tamamlanırken, kontrol hücrelerde yaranın kapanması için 72 saat yeterli gelmedi (Resim 18B).

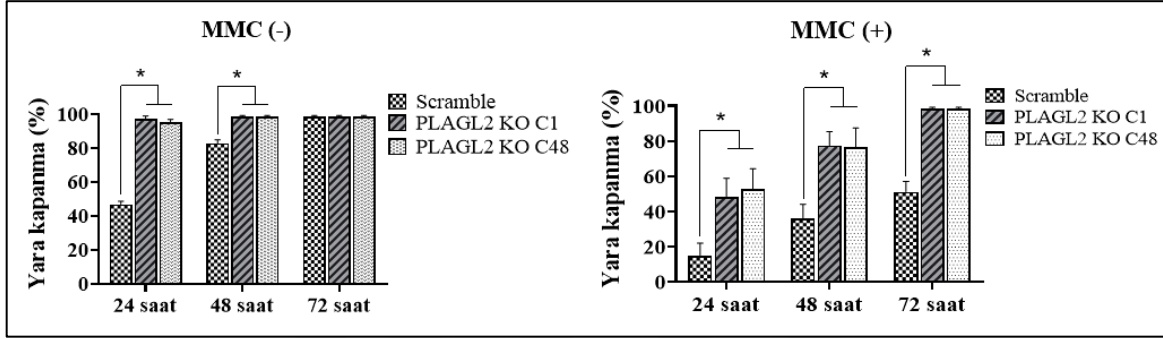


Resim 18. *PLAGL2* knock-out hücrelerinin *in vitro* yara iyileşmesi ile hücre göç hızının analizi. **A)** MMC yokluğunda. **B)** MMC varlığında.

Normal büyüme ortamında (%10 FBS) MMC varlığında ve yokluğunda keratinosit hücrelerinde *PLAGL2*'nin, hücrelerin migrasyon kapasitesi üzerinde oluşturduğu etkiyi kantite etmek için çekilen fotoğraflar üzerinde Image J programı kullanılarak boş alanlar

hesaplandı. Hücrelerin migrasyon kapasiteleri, kapalı alan yüzdesi dikkate alınarak belirlendi. Elde edilen veriler istatistiksel olarak analiz edildi.

Yapılan analizler sonucunda *PLAGL2* knock-out hücrelerde MMC yokluğunda 24 ve 48. saatlerde ve MMC varlığında 24, 48 ve 72 saatlere yönelik yapılan analizlerde kontrole kıyasla kapanma hızındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu. (Şekil 35).

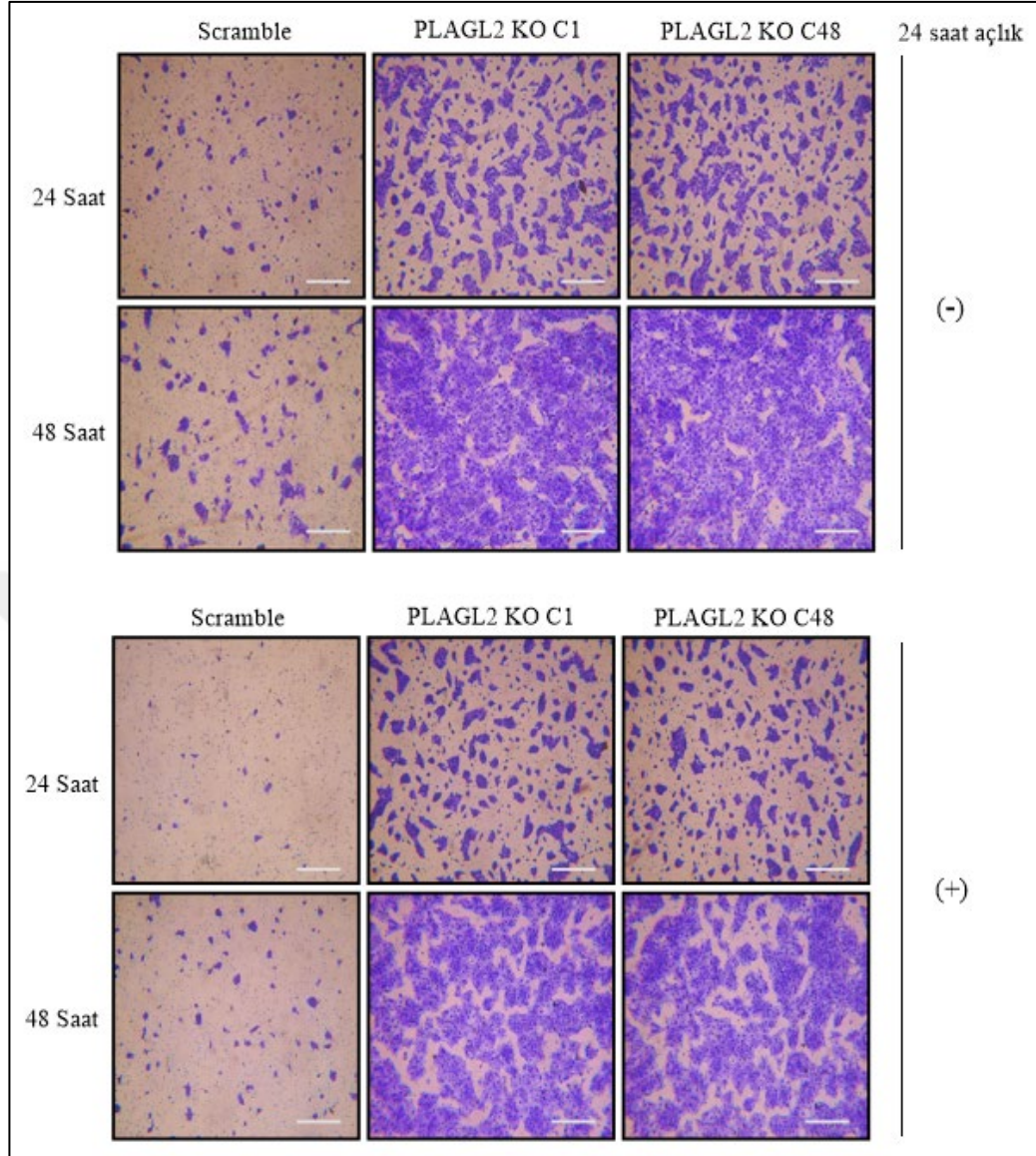


Şekil 35. *PLAGL2* knock-out hücrelerinin *in vitro* yara kapanma analizleri. * $p < 0.05$

4.9.2. Transwell Migrasyon Analizleri

PLAGL2 knock-out hücrelerin hücre göç hızına dayalı yara iyileşmesi analizlerinin yapılmasının ardından farklı bir hücre migrasyon analizi olan transwell migrasyon analizi gerçekleştirildi. İlk olarak deney normal koşullarda büyütülen hücrelerle gerçekleştirildi. Bu hücrelerin %0.2 FBS eklenmiş besiyeri içeren transwell insert bölmesinden kemo-atraktan görevi gören %10 FBS içeren besiyeri bölmesine göçü analiz edildi. Ayrıca, *in vitro* yara iyileşme analizinde kullanılan yaklaşıma benzer olarak, hücre göçünde hücre proliferasyonunun etkisine sınırlama getirmek için hücreler transwell inserte konulmadan önce 24 saat boyunca %0.2 FBS içeren medyumda bekletildiler.

Yapılan analizler sonucunda transwell inserte konulmadan evvel %10 FBS ve %0.2 FBS içeren büyüme ortamında bekletilen *PLAGL2* knock-out hücrelerin inserte konulduktan 24 ve 48 saat sonrasında yapılan migrasyon analizlerinde kontrol hücrelere kıyasla migrasyon kapasitesinin belirgin şekilde yüksek olduğu tespit edildi. (Resim 19).

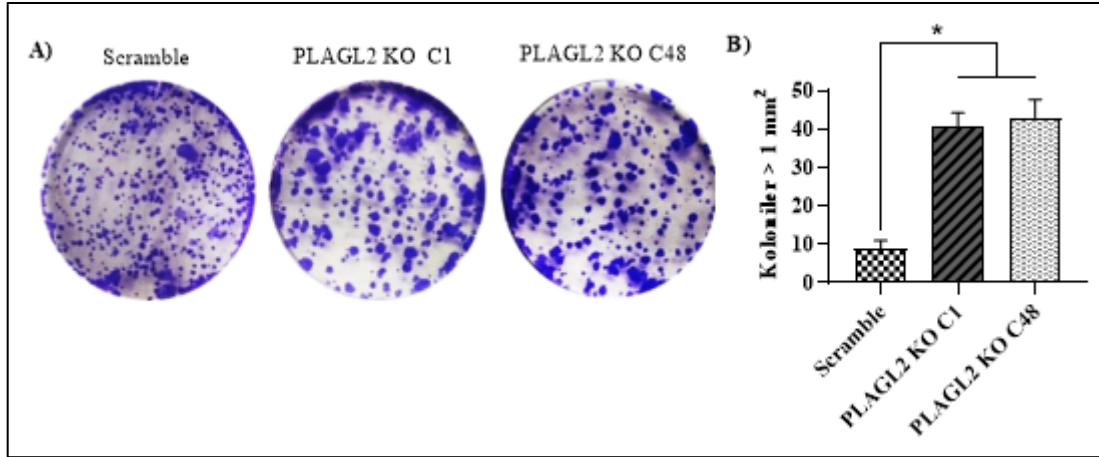


Resim 19. *PLAGL2* knock-out hücrelerinin açlık durumunda ve normal koşullarda 24 ve 48 saatlik transwell migrasyonu. Ölçek çubuğu 200 μ m.

4.10. *PLAGL2* Knock-out HaCaT Hücrelerinin Koloni Oluşturma Analizinin Yapılması

PLAGL2 knock-out hücrelerin harekete ve çoklu hücre bölünmesine dayalı çoğalma özelliklerindeki değişimin belirlenebilmesi için ayrıca koloni oluşturma analizi gerçekleştirildi. *PLAGL2* knock-out hücreleri altı kuyucuklu hücre kültürü tabaklarına ekildi ve normal büyüme ortamında 14 gün sonunda oluşturdıkları koloniler gözlemlendi (Resim 20A).

Yapılan analiz sonucunda, *PLAGL2* knock-out hücrelerin kontrole kıyasla daha büyük koloniler oluşturduğu gözlemlendi. Koloni büyüklüğü dikkate alınarak, 1 mm²'den büyük kolonilerin sayıldığı tabaklarda *PLAGL2* knock-out hücrelerin oluşturduğu koloni sayısının kontrole kıyasla sırasıyla 4.51 ve 4.77 kat arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (Resim 20B).

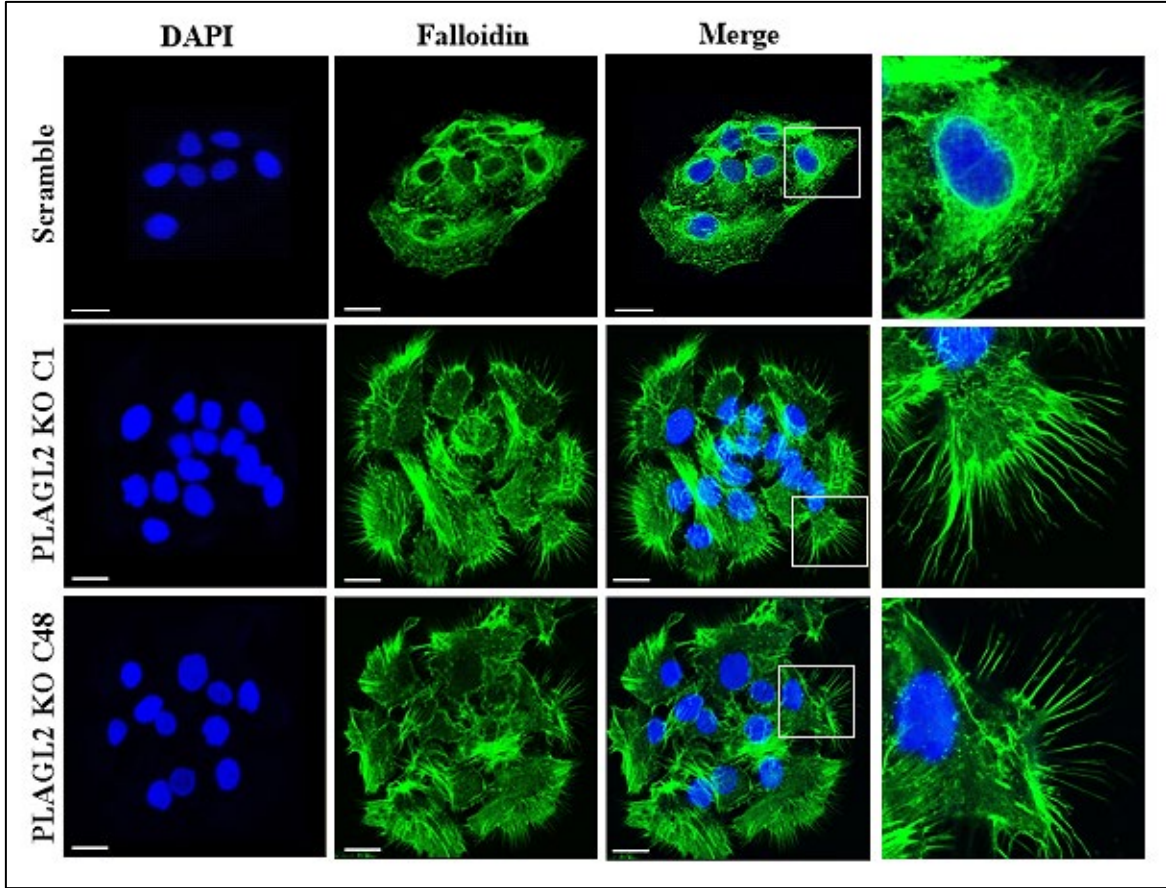


Resim 20. *PLAGL2* knock-out hücrelerde koloni formasyon analizleri. A) Altı kuyucuklu tabak içerisinde oluşan koloniler. B) 1 mm²'den büyük koloni sayılarının istatistiksel analizi. *p < 0.05

4.11. *PLAGL2* Knock-out HaCaT Hücrelerinin Filopodia Formasyon Analizinin Yapılması

Filopodlar, göç eden hücrelerde görülen sitoplazmik bir hücre uzantısı (yalancı ayak) olup iplikçi yapılardır. Bu yapılar, F-aktin mikrofilamentlerin bir araya gelmesiyle oluşur. Hücre hareketinden sorumlu olan filopod yapıları, hareket kazanma özelliğiyle öne çıkan *PLAGL2* knock-out hücrelerde analiz edildi. F-aktinleri tanıyan falloidin ajanıyla boyanan hücreler immüno Floresan yöntemiyle görüntülendi.

Yapılan analiz sonucunda *PLAGL2* knock-out hücrelerde hareketten sorumlu filopod yapının dikkat çekici bir şekilde arttığı ve boylarının uzadığı görüldü (Resim 21 ve Ek 3).



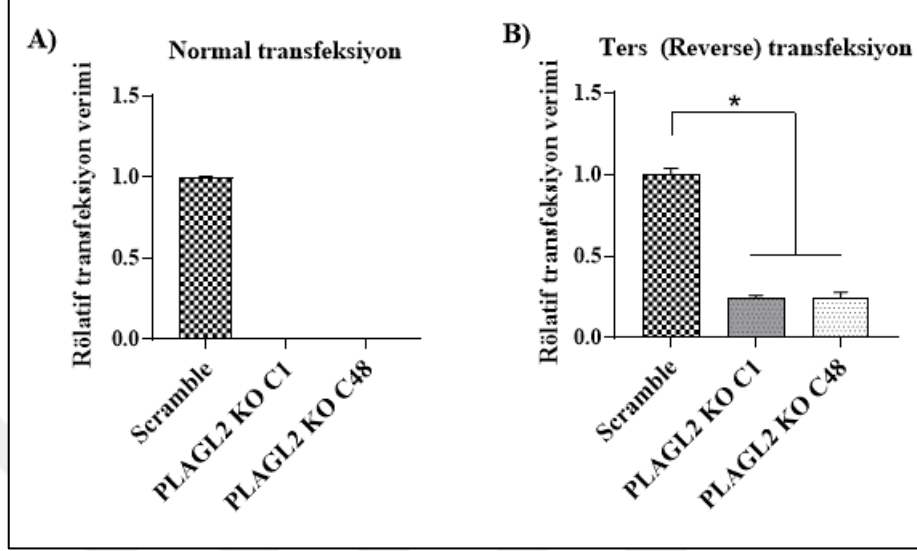
Resim 21. *PLAGL2* knock-out hücrelerde falloidin ile filopodia organizasyonunun gösterilmesi. DAPI: Mavi (çekirdek), Alexa Flour 488: Yeşil (F-aktin). Ölçek çubuğu: 25 μ m.

4.12. *PLAGL2* Knock-out HaCaT Hücrelerinin Wnt/ β -katenin Sinyal Yolağı Analizi

PLAGL2'nin keratinosit hücrelerinde Wnt/ β -katenin sinyal yolağındaki rolünü incelemek için *PLAGL2* knock-out hücrelerde WNT yolağına özgü lusiferaz raportör sistemi kullanılarak WNT sinyal yolağı analiz edildi. Deneyde yolak analizi için gereken plazmidler, daha evvel HaCaT hücrelerinde yüksek transfeksiyon verimi elde ettiğimiz PEI ajanı kullanılarak hücrelere aktarıldı.

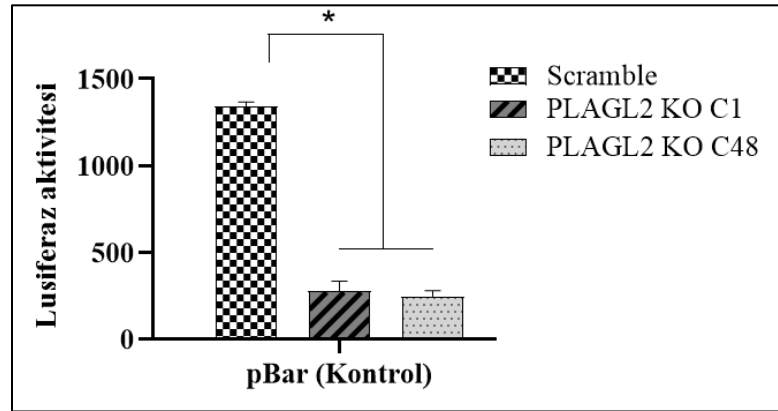
Deney sonucunda *PLAGL2* knock-out hücrelerinin transfekte olmadıkları gözlemlendi (Şekil 36A). Bunun üzerine, transfeksiyon verimini artırmak amacıyla hücrelerin süspanse hale getirilerek transfeksiyonun gerçekleştirildiği ters (reverse) transfeksiyon yöntemiyle, transfeksiyon gerçekleştirildi. Transfeksiyon veriminin kantitasyonu için hücreler WNT raportör plazmidinin yanında β -galaktozidaz üreten plazmid ile de transfekte edildi. Ters transfeksiyon uygulamasıyla *PLAGL2* knock-out

hücrelerinin, kontrole kıyasla transfeksiyon verimi yaklaşık beş kat daha düşük olsa da analiz için yeterli plazmid transfekte edilebildi (Şekil 36B).



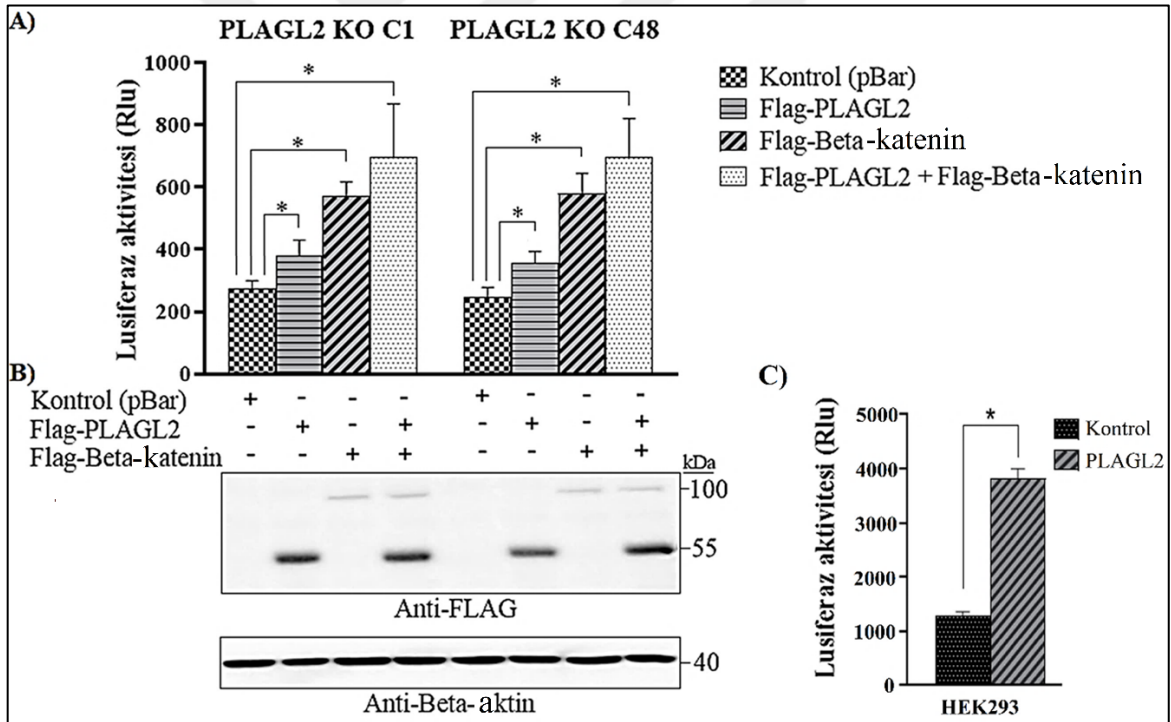
Şekil 36. *PLAGL2* knock-out hücrelerde transfeksiyon verim analizleri. **A)** Normal transfeksiyon sonuçları. **B)** Ters transfeksiyon sonuçları. * $p < 0.05$

Transfeksiyon sonrasında lusiferaz aktivitesi lüminesans mikroyuvar okuyucu cihazında okundu, örnekler arasındaki farklı transfeksiyon verimi, ölçülen β -galaktozidaz aktivitesiyle normalize edildi. Yapılan Wnt/ β -katenin sinyal yolağı analizi sonucunda, *PLAGL2* knock-out hücrelerde kontrole kıyasla lusiferaz aktivitesinde anlamlı bir azalma olduğu görüldü (Şekil 36).



Şekil 37. *PLAGL2* knock-out hücrelerde Wnt/ β -katenin sinyal yolağı analizi. * $p < 0.05$

PLAGL2'nin Wnt/ β -katenin sinyal yolağı üzerindeki etkisini aydınlatmak üzere *PLAGL2* knock-out hücrelerde *PLAGL2*'nin ektopik ekspresyonunun gerçekleştirilerek yolak üzerindeki telafi edici etkisi incelendi. Buna ilave olarak, yolağın ana transkripsiyon faktörü olan Beta-katenin ile *PLAGL2*'nin birlikte ektopik ekspresyonunun etkisi de değerlendirildi. Knock-out hücrelerde *PLAGL2*'nin ektopik ekspresyonu kontrol grubuna göre yolak üzerinde anlamlı bir sinyal artışına neden oldu. Beklenildiği üzere ektopik Beta-katenin ekspresyonu WNT sinyalini arttırdı. *PLAGL2* knock-out hücrelerde Beta-katenin ve *PLAGL2*/Beta-katenin ikilisinin birlikte ekspresyonları sinyali daha da arttırdı (Resim 22A). Lusiferaz raportör analiz deneylerinde *PLAGL2* ve Beta-katenin proteinlerinin ektopik ekspresyonları immünoblot ile doğrulandı (Resim 22B). Ayrıca *PLAGL2*'nin fazladan ekspres edilmesinin HEK293 hücrelerinde Wnt/ β -katenin sinyal yolağını aktifleştirdiği gösterilen diğer bir kondisyon da deneye pozitif kontrol olarak dahil edildi (Resim 22C).



Resim 22. *PLAGL2* knock-out HaCaT ve HEK293 hücrelerinde WNT sinyal yolağı analizi. **A)** *PLAGL2* knock-out hücrelerde ayrı ayrı *PLAGL2*, Beta-katenin ve *PLAGL2*-Beta-katenin proteinlerin ektopik ekspresyonunun lusiferaz analizi sonuçları. **B)** İmmünoblot analizi sonuçları. **C)** HEK293 hücrelerinde *PLAGL2*'nin fazladan ekspres edilmesinin Wnt/ β -katenin sinyal yolağını aktifleştirmesi. * $p < 0.05$

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Tez çalışmamızda, anabilim dalımız tarafından varyasyonu BPS ile ilişkilendirilmiş olan RIPK4 ile (5) etkileştiği gösterilen *PLAGL2*'nin (7) keratinositlerdeki rolünü aydınlatmaya yönelik araştırmalar gerçekleştirildi. Bir genin fonksiyonunun anlaşılmasında en etkin yaklaşımlardan biri, o genin yokluğunda hücresel fonksiyonları incelemektir. Güncel bir yaklaşım olan CRISPR/Cas9 genom düzenleme sisteminin, istenilen genin susturulmasında ve oluşturulan knock-out hücrelerde genin işlevini tanımlamada son derece etkin olduğu literatürde birçok kez kanıtlanmıştır (215-218). *PLAGL2*'nin keratinositlerdeki fonksiyonunu aydınlatmaya yönelik verilere ulaşmayı amaçlayan tez çalışmamızda CRISPR/Cas9n sistemiyle *PLAGL2*'nin susturulduğu HaCaT hücre hattı kullanıldı.

CRISPR/Cas9 çok etkili bir gen düzenleme aracı olsa da hedef dışı bölgelerde çift zincir kırıkları oluşturma ihtimali yönetime yönelik çekinceler yaratmıştır (219). Bu nedenle, Cas9'un bir varyantı olan Cas9n'in genom düzenlemelerinde kullanımı denenmiş ve Cas9 ile karşılaştırıldığında hedef dışı gen düzenlemeleri 50-1000 kat arasında azalttığı gösterilmiştir (169). Cas9n, Cas9'un aksine DNA'da tek kırık oluşturur. Bundan dolayı, Cas9n sistemi kullanılırken iki farklı sgRNA tasarlanıp konağa verilir. Hedef bölgede çift zincir kırığı sonucunda INDEL'lerin oluşması için bu iki sgRNA'nın DNA'da aynı anda aynı yerde olması gerekir. sgRNA'lar DNA'da aynı anda aynı yere geldiğinde çift zincir kırığı oluşur ve NHEJ tamir mekanizması devreye girer. sgRNA'ların bir tanesi istenmeyen farklı bölgelere yönelse (Off-target) bile orada tek zincir kırığı oluşturur ve bu kırığın çift zincir kırıklarına göre tamir edilmesi daha kolaydır (220). Bunun üzerine CRISPR/Cas9n aracılı gen düzenleme sistemi, CRISPR/Cas9'un hedef dışı istenmeyen etkilerini azaltmak için kullanılmaya başlanmıştır. Bundan ötürü, tez çalışmamızda *PLAGL2* genini knock-out etmek için CRISPR/Cas9n aracılı gen düzenleme sistemini tercih edildi ve bu sisteme özgü iki farklı sgRNA Benchling biyoinformatik aracı kullanarak tasarlandı (Tablo 22). Üç ekzona sahip *PLAGL2*, protein kodlamaya ekzon 2'den başladığı için ilk olarak ekzon 2'nin tamamı seçilerek sgRNA tasarlamaya çalışıldı. Ancak, yüksek "on target" oranına sahip ikili sgRNA seti bulunsa bile "off-target" riski yüksek olduğu için bu setler tercih edilmedi. On target ve off target skorları en uygun sgRNA setleri *PLAGL2*'nin üçüncü ekzonunun başlangıç kısmından elde edildi (Şekil 15). Tasarlanan sgRNA'lar PX462 vektörüne klonlandı ve dizileri doğrulandı (Şekil 17). Ardından iki farklı sgRNA'nın klonlandığı bu iki vektör HaCaT hücrelerine birlikte transfekte edilerek CRISPR/Cas9n sistemi uygulandı.

CRISPR/Cas9n uygulaması sonrası yapılan INDEL (on-target) analizleri sonucunda, INDEL'lerin *PLAGL2*'nin başlangıcında çerçeve kaymasına ve erken STOP kodonunun oluşmasına neden olduğu *PLAGL2* knock-out C1 ve C48 klonları çalışmalarda kullanılmak üzere seçildi (Şekil 19, 20, 21, 22). Cas9n'in off-target yönlenme riski, Cas9'a kıyasla oldukça düşük olsa dahi, vardır. Bunun için olası off-target bölgelerin analiz edilmesi gerekir (221-224). Bundan ötürü tasarladığımız iki sgRNA'nın olası off-target analizleri CCTOP web arayüzü üzerinden gerçekleştirildi. sgRNA 1 ve 2'nin yönelme ihtimali olan 20 gen genomda ekzonik, intronik ve intergenik bölgeler olarak program tarafından listelendi. Ekzonik bölgeler dikkate alınarak, sgRNA 1 için elde edilen listede programa göre üç gen (*RPL32*, *RP11-274J2.1* ve *BRD9*), sgRNA 2 için iki gen (*TREML2* ve *ISPD*) üzerine yoğunlaşıldı. Bu bağlamda, tasarlamış olduğumuz sgRNA 1'den bir baz farklı olan *RP11-274J2.1* geninin hedef bölgesi, sgRNA 2'den dört baz farklı olan *TREML2* geninin hedef bölgesi off-target analizleri için seçildi (Şekil 23A, B). Olası off-target genlerin hedef bölgelerini içerisine alan primerler kullanılarak hedef bölge PCR ile çoğaltıldı ve Sanger yöntemiyle dizilendi (Resim 13). Yapılan dizileme analizi sonucunda tasarlamış olduğumuz sgRNA 1'in *RP11-274J2.1* geni üzerinde, sgRNA 2'nin *TREML2* geni üzerinde her iki klonda da (*PLAGL2* knock-out C1 ve C48) INDEL oluşturmadığı görüldü. Hedeflenen bölgede tasarlamış olduğumuz sgRNA'dan yalnızca bir bazlık fark gösteren *RP11-274J2.1* 'de INDEL oluşmamış olması, dört bazlık değişim içeren diğer potansiyel off-target genlerin (*RPL32*, *BRD9*, *ISPD*) olası hedef bölgelerinde de INDEL oluşmayacağına işaret ettiğinden bu genler analiz edilmedi.

PLAGL2'nin CRISPR/Cas9n ile knock-out edildiğini DNA seviyesinde gösterdikten sonra, mRNA seviyesinde de etkisi analiz edildi. *PLAGL2* knock-out C1 ve C48 klonlarında gerçekleştirdiğimiz *PLAGL2* ekspresyon analizlerinde kontrole kıyasla sırasıyla %20 ve %9'luk bir azalma tespit edildi. Uygulama mRNA'yı az miktarda eksiltti (Şekil 27). Bulgularımızla benzer şekilde *Marcel ve ark.* yaptıkları bir çalışmada CRISPR/Cas9 sistemiyle HeLa hücrelerinde bir genin tamamen susturulduğu tek hücreden oluşturulan klonlarda ilgili genin mRNA'sının ekspresyonunun kontrole göre her bir klonda farklı oranlarda azaldığı, tamamen sonlanmadığını göstermiştir (225). mRNA biyogenezinde ökaryotik hücrelerde mRNA stabilitesi kontrol altında tutulur ve düzenlenir. Translasyon sırasında veya sonrasında 5' ucundaki 2,2,7-trimetil guanosin (m⁷G) şapkası ve 3'poli-A kuyruğunun da içinde bulunduğu pre-mRNA üzerindeki cis-etkili elementler ve mRNA dışındaki trans-etkili faktörler aracılığıyla mRNA yıkılır (226). Eğer mRNA'da herhangi bir

varyasyon sonucu erken sonlandıran prematür stop kodonu oluşmuşsa nonsense-aracılı bozulma (NMD) mekanizması devreye girer. NMD, ekspresyonu genellikle organizmaya zararlı olan prematür durdurma kodonuna sahip anormal mRNA'ları tespit eden ve ortadan kaldıran bir gözetim mekanizmasıdır (227, 228). mRNA üzerinde meydana gelen prematür durdurma kodonunun mRNA üzerindeki konumu NMD mekanizmasıyla mRNA'nın yıkımında belirleyici olabilmektedir. Eğer oluşan prematür stop kodonu mRNA'nın 5' ucundan uzak, ortalara veya sonlara yakınsa NMD ile yıkımdan kaçabilir (229). Analizlerimiz *PLAGL2* knock-out klonlarda *PLAGL2* mRNA'sında oluşan prematür durdurma kodonlarının mRNA'nın ortalarına yakın olduğu gösterdi (Şekil 19D, 21D). *PLAGL2* mRNA'sının tamamen yıkılmama sebebinin NMD-aracılı yıkımdan kaçmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

CRISPR/Cas9n aracılı gen susturma çalışmalarında nihai hedef ilgili genin protein seviyesinde susturulmasıdır. Bundan ötürü, *PLAGL2* knock-out C1 ve C48 klonlarında *PLAGL2*, protein seviyesinde immünblot ile analiz edildi. *PLAGL2*'ye özgü primer antikor kullanarak gerçekleştirdiğimiz analiz sonucunda kontrol hücrelerinde *PLAGL2* proteini ekspres olurken *PLAGL2* knock-out C1 ve C48 klonlarında ekspresyon görülmedi (Resim 15A). Tüm bu sonuçlara baktığımızda HaCaT hücrelerinde *PLAGL2* genini susturmak için uygulanan CRISPR/Cas9n sisteminin başarılı bir şekilde hedefine ulaştığı gösterildi. Ardından, *PLAGL2* knock-out C1 ve C48 klonlarında *PLAGL2*'nin fonksiyonunun araştırılmasına yönelik çalışmalara başlandı.

Çalışmamızda ilk olarak *PLAGL2* knock-out HaCaT hücrelerinin ışık mikroskopuyla morfolojileri incelendi. Yapılan analizler sonucunda *PLAGL2* knock-out hücrelerin kontrol hücrelerine kıyasla daha büyük olduğu gözlemlendi (Resim 16). Bunun üzerine hücre sınırlarını daha net belirlemek için β -aktin primer antikoru kullanılarak immünofloresan yöntemiyle konfokal mikroskopunda hücreler analiz edildi. Işık mikroskopundaki sonuçları destekler şekilde *PLAGL2* knock-out hücrelerde hücre büyüklüğünün arttığı immünofloresan sonuçlarıyla da gösterilmiş oldu (Resim 17 ve Ek 2). Gerçekleştirdiğimiz bu analizlerin sonucundaki boyut artışını doğrulamak amacıyla süspanse hale getirilen hücreler akış sitometrisi cihazında boyut (Forward scatter, FSC-A) ve granülite (Side-scatter, SSC-A) ölçümlerini kullanarak analiz edildi. Akış sitometrisi analizleri sonucunda *PLAGL2* knock-out hücrelerde boyut artışı gösteren ve granüliteye sahip hücre popülasyonlarının arttığı görüldü (Şekil 28). Böylelikle hücre boyutuna yönelik ışık ve

konfokal mikroskopla gözlemlenen artış, akış sitometri bulgusuyla da desteklenmiş oldu. Yapılan bir çalışmada embriyonik kök hücre markörü OCT4'ün HaCaT keratinositlerde CRISPR/Cas9 ile knock-out edilmesi sonucu oluşan OCT4 knock-out HaCaT klonlarında hücre boyutunda artış görülmüş ve bu artış OCT4'ün keratinositlerdeki aktin hücre iskeleti düzenleyicisi rolüyle bağdaştırılmıştır (192). BioGRID veri tabanında PLAGL2'nin aktin polimerizasyonunu düzenleyerek hücre iskeleti oluşumunda rol oynayan KANK2 ile etkileştiğine dair veri bulunmaktadır (108). Ayrıca, PLAGL2'nin nöral kök hücre markörü olduğu (129) ve hücre iskeleti dinamiklerini düzenleyici rolünün bulunduğu gösterilmiştir (133). PLAGL2'nin OCT4 knock-out ile benzer fenotip göstermesi, keratinositlerde PLAGL2'nin OCT4 ile ilişkilendirilmiş benzer roller, hücre iskeleti düzenleyicisi ve kök hücre markörü olmak gibi, üstlendiğine yönelik ipuçları vermektedir.

Literatür incelendiğinde hücre büyüklüğünün artması keratinosit-ilişkili hücrel farklılaşmayla ve senesensle (hücre yaşlanması) ilişkilendirilmiştir (230-233). Literatürde senesense girmiş nöral kök hücrelerde PLAGL2'nin ektopik olarak ekspresyonun artırılmasının nöronlarda senesensle ilgili genleri baskıladığı ve kök hücre potansiyeliyle ilgili genleri indüklediği gösterilmiştir (139). Bulgularımızda *PLAGL2* knock-out hücrelerde hücre büyüklüğünün belirgin bir şekilde artması, PLAGL2'nin, nöral hücrelerdeki görevine benzer şekilde, keratinosit farklılaşması sürecinde deri kök hücrelerinin kök hücre kalmasını sağladığı ve eksikliğin hücrel senesens süreçlerini tetikleyerek senesensle ilişkilendirilmiş büyük ve yaygın hücre fenotipine neden olabileceğini düşündürmektedir. Bu konuya ilişkin olarak *PLAGL2* knock-out hücreler bir senesens markörü olan artmış beta-galaktozidaz aktivitesi (234, 235) açısından değerlendirilmiş, ancak aktivite görülmemiştir. İleriki süreçte farklı senesens markörleriyle hücrelerin analiz edilmesi planlanmaktadır.

PLAGL2'nin tümör hücrelerinde ve nöral kök hücrelerde proliferasyonu düzenlediği bilinmektedir (121, 129, 132). Ayrıca, hücre bölünmesi esnasında, mitotik iç düzeneği kontrol noktası düzenleyicisi MAD2L2 ile etkileştiğine dair veri bulunmaktadır (108). Bundan ötürü, PLAGL2'nin, keratinosit hücre döngüsü ilerlemesi üzerindeki etkisi, HaCaT hücrelerinde analiz edildi. Kontrol hücrelerine kıyasla *PLAGL2* knock-out hücrelerde hücre döngüsü fazları (G0/G1, S, G2/M) üzerinde anlamlı bir fark tespit edilmedi (Şekil 30, 31). *Kouwenhoven ve ark.*'nin çalışmasının destekleyici ekler kısmında epidermal farklılaşma esnasında keratinosit kök hücrelerde ekspresyonu fazla olan genlerin listesinde *PLAGL2* de yer almaktadır. Bahse konu çalışmada *PLAGL2*'nin de içinde bulunduğu gen kümesi 'hücre

proliferasyonunun fazla olduğu keratinositlerde ekspres edilen genler' olarak gruplandırılmıştır (155). Bu bulgu nöral kök hücrelerin proliferasyonunda etkili olan *PLAGL2*'nin keratinosit kök hücrelerinde de benzer role sahip olduğu hipotezini güçlendirmektedir. Hücre döngüsü analizlerimiz sonucunda *PLAGL2*'nin hücre döngüsü üzerindeki etkisini görememiş olmamız, analizlerimizi deri kök hücrelerinde değil de farklılaşmış keratinositlerde gerçekleştirmiş olmamızdan kaynaklandığını düşündürmektedir.

Fonksiyonel çalışmalarımız kapsamında *PLAGL2* knock-out hücrelerde apoptotik hücreler Annexin V/7-AAD boyama yöntemiyle flow sitometrik analiz yaklaşımı kullanılarak analiz edildi. *PLAGL2* knock-out hücrelerde kontrole kıyasla apoptotik hücre yüzdesinde sırasıyla yaklaşık 2.6 ve 2.8 kat artış görüldü (Şekil 32, 33A). *PLAGL2*'nin apoptoz üzerindeki etkisi hücre ve kanser tipine göre farklılık göstermekte, bazı kanser hücrelerinde ve hücre hatlarında apoptozu artırırken bazılarında ise azaltmaktadır (99, 100, 131, 236). Keratinositlerde *PLAGL2*'nin apoptoz üzerinde etkisi ilk kez tez çalışmamız kapsamında çalışılmış ve sonuçlarımız *PLAGL2*'nin keratinositlerde apoptozu engellediğini göstermiştir. Nöral kök hücre markörü olarak bilinen *PLAGL2*'nin keratinositlerde de benzer şekilde hücre proliferasyonunu indüklerken ölümünü baskıladığı düşünülebilir. Bundan ötürü, hücrelerimizde olduğu gibi *PLAGL2*'nin yokluğu apoptozu tetikleyebilir. *PLAGL2*'nin keratinositlerdeki apoptoz engelleyici rolünün hangi apoptoz tipi, iç (intrinsic) veya dış (extrinsic) yolak (237) üzerinden gerçekleştiğinin incelenmesi sürece yönelik detaylı bilgi sağlayacaktır.

Nekroz, fiziksel travmaya dayalı hücrenin membran bütünlüğünün bozulmasıyla karakterizedir (238). Hücre ölümü analizleri esnasında *PLAGL2* knock-out hücrelerde nekrotik hücre yüzdesinde kontrole kıyasla yaklaşık 1.5 kat anlamlı bir azalma görüldü (Şekil 32, 33B). Farklılaşma sürecinin en son aşaması olan kornifikasyon esnasında, proteinler ve lipitler birbirine çapraz bağlantılarla bağlanarak mekanik açıdan dirençli, korneosit zarını oluşturur (12). *PLAGL2* knock-out hücrelerin nekroza karşı direnç göstermesi bu hücrelerin keratinosit farklılaşma seviyesinin kontrole kıyasla ileride olduğuna, bundan ötürü de dirençli korneosit benzeri bir membrana sahip olduğuna işaret etmektedir. *PLAGL2* knock-out hücrelerde farklılaşma seviyesi korneosit markörü olarak bilinen İnvolukrin artışı (Şekil 34) ve granülitesi artan hücre popülasyonu (Şekil 28) bu düşüncemizi destekler niteliktedir.

PLAGL2 knock-out hücrelerin proliferatif özellikleri hücre döngüsünün yanında hücre ikilenme zamanları (doubling-time) hesaplanarak da analiz edildi. Sonuç olarak, ikilenme zamanının *PLAGL2* knock-out hücrelerinde kontrol hücrelere kıyasla 3-3.5 saat uzadığı gösterildi (Şekil 29). *PLAGL2* yokluğunda uzayan ikilenme zamanının hücre döngüsüne yansımaları beklenirken döngüde bir fark görülmedi. (Şekil 30, 31). Bu durumun, *PLAGL2* knock-out hücrelerde gözlemlenen apoptoz artışının hücre sayısı üzerine etkisinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Gelişimde hücre hareketi önemli bir yer tutar. Epidermin oluşumunda ise bazal katmandan ayrılan hücreler göç ederek yukarı katmanlara çıkar. Deride bir yaralanma söz konusu olduğunda ve derinin bütünlüğü bozulduğunda keratinositler göç ederek bütünlüğü yeniden sağlarlar (13, 239-241). Bulgularımız kapsamında *PLAGL2* knock-out hücrelerinde yapılan *in vitro* yara iyileşmesi (Wound-healing) analizleri sonucunda *PLAGL2*'nin knock-out edilmesinin keratinosit hücrelerinde hareket hızını arttırdığı görüldü (Resim 18A ve Şekil 35). Yara boşluğunun doldurulmasında yalnızca hücre göçünün süreçteki etkisini göstermek adına hücreler proliferasyonu engelleyen MMC varlığında da analiz edildi ve *PLAGL2* knock-out hücrelerdeki hücre hareketi artışının hücre bölünmesinden bağımsız olduğu gösterildi (Resim 18B ve Şekil 35). Daha evvel kanser hücrelerinde *PLAGL2*'nin fazladan ekspresyonunun arttırılmasının *in vitro* yara iyileşmesi deneyi ile hücre hareketini arttırdığı gösterilmiştir (115, 131). İlave olarak, bu hareketin detayı incelenmiş ve *PLAGL2*'nin hareketi düzenlemesinin aktin hücre iskeleti üzerinden olduğu rapor edilmiştir (133). Ancak, bulgularımız bu literatür bilgileriyle örtüşmeyerek *PLAGL2*'nin keratinositlerde tam tersine hareketi engellediğini gösterdi. Bu durum, *PLAGL2*'nin ya doğrudan ya da transkripsiyon faktörü olarak ekspresyonunu düzenlediği genler aracılığıyla hücre hareketi üzerinde engelleyici bir rolünün olabileceğine işaret etmektedir.

Hücre hareket/göç analizleri kapsamında *PLAGL2* knock-out hücrelerde diğer bir hücre hareket analiz yaklaşımı olan transwell migrasyon analizi gerçekleştirildi. *In vitro* yara iyileşmesi sonucunu destekler şekilde yapılan analizlerde *PLAGL2*'nin knock-out edilmesinin transwell üzerinden migrasyon kapasitesini belirgin şekilde arttırdığı görüldü (Resim 19).

Hücre hareketinden sorumlu lamelipodlar, hücrelerin öncü ucunda bulunan geniş, levha benzeri uzantılardır ve aktin filaman ağı içerirler. Filopodlar ise lamelipodlardan büyüyen plazma zarının F-aktinden oluşan aktin demetleri (F-aktin; ADP bağlı G aktinlerin

polimerize olmuş hali) ile desteklenmiş ince ipliksi uzantılarıdır. Hücre hareketi esnasında filopod yapıların oluşumu ve geri çekilmesi aktin filamanlarının yapılanması ve ayrışması ile düzenlenir. Hücreler hareket edeceği zaman filopod organizasyonu artar (242-244) Çalışmamızda hareketin arttığını gördüğümüz *PLAGL2* knock-out hücrelerde filopod organizasyonunun analizi için hücreler F-aktin'i tanıyan falloidin konjuge boyası kullanılarak konfokal mikroskobunda incelendi. Analiz sonucunda *PLAGL2* knock-out hücrelerde filopod yapılarının belirgin bir şekilde arttığı ve uzadığı görüldü (Resim 21 ve Ek 3). Diğer birçok hücrede olduğu gibi HaCaT hücrelerinde hareketin artmasıyla filopod yapılarının arttığı gösterilmiştir (189). *PLAGL2*'nin meme kanseri hücrelerinde ekspresyonunun arttırılmasıyla Rac1 gibi küçük guanazin trifosfatazların (GTPase) aktivitelerini düzenleyerek aktin sitoskeletonin organizasyonu aracılığıyla hücre migrasyonunda rol aldığı gösterilmiştir (133). Her ne kadar karsinogenezdeki hücre hareketi *PLAGL2*'nin fazladan ekspresyonu ile artış gösterse de falloidin boyaması sonucumuz, keratinositlerde *PLAGL2*'nin filopod (F-aktin) yapılanmasını engellediğini gösterdi. *PLAGL2* knock-out hücrelerde gördüğümüz hareket hızı artışı ve filopod yapılanmasının artması birbirini desteklemektedir.

Hücre hareketi kapsamında çalışmalarımızda *PLAGL2* knock-out hücreler koloni formasyon analiziyle de incelendi. *PLAGL2*'nin karsinogenezde onkogenik özelliğiyle koloni sayısını arttırdığı gösterilmesine rağmen (105, 115) çalışmamızda keratinosit hücrelerinde *PLAGL2*'nin knock-out edilmesi koloni oluşumunu azaltmadı. Buna karşın, *PLAGL2* knock-out hücrelerde 14 gün sonunda oluşan 1 mm²'den büyük kolonilerde anlamlı artış tespit edildi (Resim 20). Büyük koloni oluşturma durumunu, *PLAGL2* knock-out hücrelerin morfolojik olarak daha büyük olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Literatür bilgileri ve sonuçlarımız dikkate alındığında *PLAGL2* knock-out hücrelerin boyut artışı göstermesi, hareket hızının ve hareket ilişkili filopod (F-aktin) yapılanmasının artması *PLAGL2*'nin aktin bazlı hücre iskeletinin düzenlenmesinde rol aldığını göstermektedir. Ayrıca, yaptığımız tüm harekete dayalı çalışmalarımızın sonucu *PLAGL2*'nin keratinositlerde hücre hareketini engellediğini gösterir kanıtlar ortaya koymaktadır.

Mekanosensör adı verilen çeşitli proteinler hücre iskeleti aracılığıyla mekanik kuvvetleri algılar ve hücrelere hareket esnasında ne yapmaları gerektiğini bildirirler (245, 246). Bir mekanosensör olan PIEZO1'in, nöral kök hücre kaderinin belirlenmesinde ve

hücre büyüklüğünün düzenlenmesinde rol aldığı bildirilmekle beraber (247, 248) keratinositlerde PIEZO1'in knock-out edilmesiyle hem *in vitro* hem de *in vivo* yara iyileşmesinde yara alanının daha hızlı kapanarak hücre göçünü arttırdığı gösterilmiştir (249). PIEZO1 knock-out hücrelerle benzer fonksiyonlar gösteren *PLAGL2* knock-out hücrelerimiz, *PLAGL2*'nin keratinositlerde ayrıca mekanosensör olarak görev yapabileceğine dair ipucu vermektedir.

Literatürde, farklı hücre hatlarında *PLAGL2* ve WNT yolağı ilişkisine yönelik çok sayıda yayın olmasından ötürü, *PLAGL2* knock-out hücrelerde Wnt/ β -katenin sinyal yolağı β -katenin duyarlı promotöre sahip lusiferaz raportör vektör kullanılarak analiz edildi. Analizlerin yapılabilmesi için hücrelerin ilgili vektörlerle transfekte edilmesi gerekiyordu. Ancak, yüzeye yapışık olarak büyütülen *PLAGL2* knock-out hücreler hiçbir şekilde transfekte edilemedi (Şekil 36A). Transfeksiyon deneyine yönelik deneyimlerimiz hücrelerin süspanse edilmesinin transfeksiyon verimini arttırdığını göstermişti. Buna dayanarak, knock-out hücreler süspanse hale getirilerek transfekte edildi. Bu durumda verim kontrole kıyasla düşük olsa da hücreler analiz edilebildi (Şekil 36B). *PLAGL2* knock-out hücrelerde transfeksiyon veriminin düşük olması bu hücrelerde hücre membran içeriğinin ve yapısının kontrol hücrelerden farklı olduğuna işaret etmektedir. Hücre kültürü çalışmalarımız boyunca *PLAGL2* knock-out hücreler Tripsin/EDTA ile yüzeyden kaldırılırken, kontrol hücrelerine kıyasla daha uzun süre (yaklaşık 5 dakika daha fazla) Tripsin/EDTA'da bekletilmeye ihtiyaç duyulmuştur. Bu durumun *PLAGL2* knock-out hücrelerin hücre-yüzey ve hücre-hücre sıkı bağlantılarının artmış olmasından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Diğer taraftan, hücre ölüm analizlerinde *PLAGL2* knock-out hücrelerde kontrole kıyasla daha az nekroz görülmesine (Şekil 33B) yönelik yorumumuz bu hücrelerin membran yapılarından ötürü fiziksel hasardan kontrole göre daha az etkilendiğine yönelik olmuştur. Bu iki sonuç *PLAGL2* knock-out hücre membranının kontrol hücrelere kıyasla içerik olarak farklı olduğunu ve bu yapının hücreleri mekanik ve kimyasal etkenlere karşı dirençli kıldığını destekler niteliktedir.

Hücre membranından direkt geçemeyen maddeler fagositoz ve pinositoz olmak üzere iki farklı endositoz mekanizmayla hücre içine alınmaktadır (80). Daha evvel, *PLAGL2*'nin knock-out edildiği farelerde yapılan çalışmalarda, *PLAGL2*'nin, bağırsak geçirgenliğinden sorumlu enterosit hücrelerinde, hücre içine lipit taşınmasıyla yakından ilişkili genleri düzenlediği, böylelikle *PLAGL2*'nin lipit emiliminde önemli bir rol üstlendiği gösterilmiştir

(137). Lipozom bazlı ajanlar kullanılarak gerçekleştirilen transfeksiyon deneylerinde DNA'nın hücre içine alınmasında endositoz mekanizmasının aracılık ettiği gösterilmiştir (250). Bu bağlamda, *PLAGL2* knock-out hücrelerde lipozom bazlı transfeksiyon veriminin oldukça düşük olması *PLAGL2*'nin endositoz sürecinin düzenleyici bir bileşeni olabileceğini de işaret etmektedir.

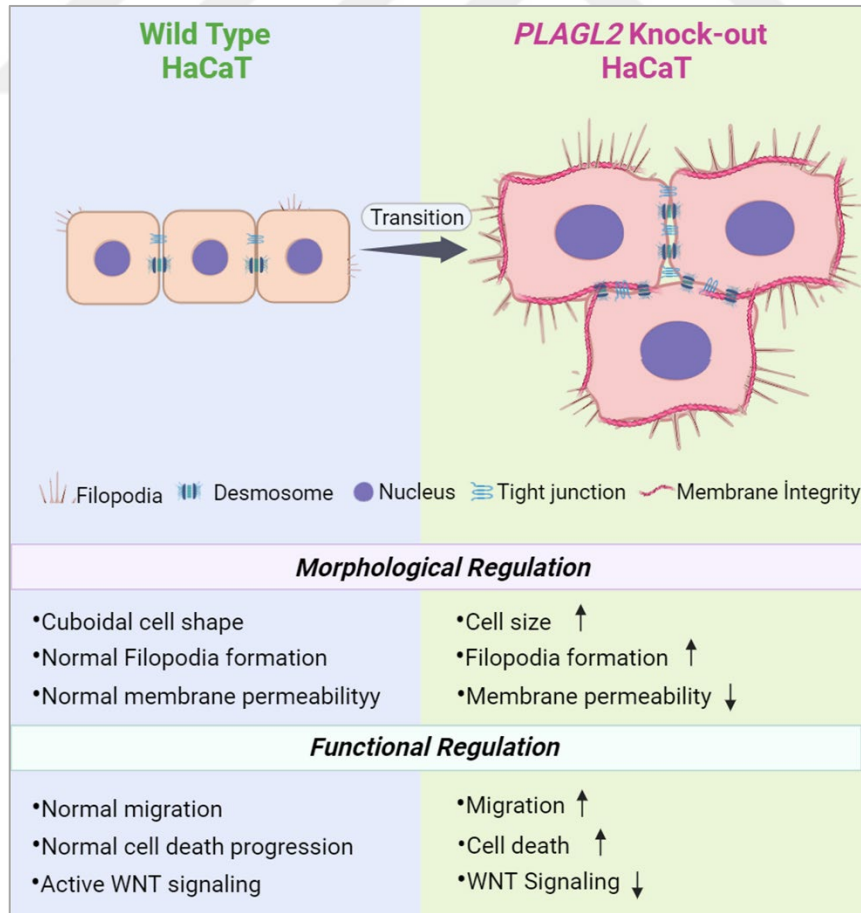
Embriyonik gelişimde ve yetişkin doku homeostazında Wnt/ β -katenin sinyal yolağının kritik bir rolü olduğu bilinmektedir (143, 251-253). Wnt/ β -katenin sinyal yolağının derinin de içinde bulunduğu birçok organda organa özgü kök hücrelerin proliferasyonunu indüklediği rapor edilmiştir (254, 255). Ayrıca, epidermin bazal katmanındaki kök hücrelerin bazal membranla bağlantılarını koruyarak kök hücre kalmalarını sağlanmasında Wnt/ β -katenin sinyalinin önemi gösterilmiştir (256), Çalışmamızda, *PLAGL2* knock-out hücrelerde ' β -katenin Lusiferaz Raportör sistemi' üzerinden Wnt/ β -katenin sinyal yolağı analiz edildi. Sonuçlarımız hücrelerde sinyal yolağı etkinliğinin azaldığını gösterdi (Şekil 37). Sinyaldeki azalmanın özgül olarak *PLAGL2*'ye bağlı olduğunu doğrulamak adına, *PLAGL2* knock-out hücrelerde, yabancıl tip (wt) *PLAGL2* ektopik olarak ürettirildi. Knock-out hücrelerde *PLAGL2*'nin fazladan ekspresyonunun WNT yolağı etkinliğini tekrar arttırdığı görüldü (Resim 22). Sonuçlarımızla örtüşür şekilde, literatürde *PLAGL2*'nin bağırsak epitelyal kök hücrelerinde (152) ve kolon kanseri hücrelerinde Wnt/ β -katenin sinyal yolağının bileşenlerinin ekspresyonunu düzenleyerek yolağı aktive ettiği gösterilmiştir (115, 153). Kolon kanseri hücrelerinde yapılan başka bir çalışmada *PLAGL2*'nin Wnt/ β -katenin sinyal yolağı ligandı olan *Wnt6* geninin direkt promotörüne bağlanarak ekspresyonunu artırdığı ve yolağı aktive ettiği gösterilmiştir (106). Dahası, *PLAGL2*'nin Wnt/ β -Katenin sinyal yolağı aracılığıyla nöronal kök hücrelerde farklılaşmayı engellediği, hücre çoğalmasını aktive ettiği gösterilmiştir ve bu bulgulara bağlı olarak *PLAGL2* kök hücre markörü olarak önerilmiştir (129, 152). Ayrıca, WNT sinyal yolağının HaCaT hücrelerinin sağkalımı için gerekli olduğu, eksikliğinde apoptozun tetiklendiği gösterilmiştir (257). Çalışmamızda *PLAGL2* knock-out hücrelerde Wnt/ β -katenin sinyal yolağının baskılanması ve hücre ölümünün artması, bu literatür bulgusuyla örtüşmektedir. *PLAGL2*'nin kolon epitelyal ve nöronal kök hücrelerinde Wnt/ β -katenin sinyal yolağını düzenliyor olması, bazal katmandaki keratinosit kök hücrelerinde de *PLAGL2*'nin etkin bir şekilde Wnt/ β -katenin sinyal yolağını düzenleyerek bazal keratinosit kök hücrelerin devamlılığını destekliyor olabileceğine işaret etmektedir.

Epidermin bazal katmanındaki keratinosit kök hücrelerin devamlılığı için kritik olan $\Delta Np63$ 'ün Wnt/ β -katenin yolağını aktive ettiği ve aynı yolak tarafından transkripsiyonunun aktive olduğu gösterilmiştir (33, 258). *RIPK4* gibi *PLAGL2*'nin de promotör bölgesinde transkripsiyonel olarak aktif p63 bağlanma dizisi bulunmaktadır (155). İlave olarak verilerimiz *RIPK4* gibi *PLAGL2*'nin de Wnt/ β -katenin sinyal yolağını düzenlediğini göstermektedir. Bu durum, keratinositlerde *PLAGL2* ve *RIPK4*'ün Wnt/ β -katenin sinyal yolağını birlikte düzenlediklerine işaret etmektedir. *Kouwenhoven ve ark.* ekspresyon verilerini detaylı incelememiz üzerine keratinosit farklılaşmasıyla birlikte *PLAGL2* ekspresyonu azalırken, *RIPK4* ekspresyonunun arttığı fark edilmiştir (155). Bunu doğrular şekilde *PLAGL2* knock-out hücrelerimizde ileri farklılaşma markörü *İnvolukrin*'in ekspresyonu artmıştır. Ayrıca, daha evvel bölümümüzde yapılan bir çalışmada *RIPK4*'ün keratinositlerde knock-out edilmesiyle *İnvolukrin* ekspresyonu azalmış ve farklılaşmış hücrelerin keratinosit kök hücrelere benzer hücrelere dönüştüğü gözlemlenmiştir (259). Bu bulgular *PLAGL2*'nin farklılaşmayı engellerken *RIPK4*'ün farklılaşmayı tetiklediğini dolayısıyla bu iki proteinin farklılaşma sürecinde zıt yönde etki ettiğine işaret etmektedir. Yine anabilim dalımızda yapılan bir çalışmada *RIPK4*'ün hücre hareketini düzenlediği gösterilmiştir (78). Verilerimiz, *PLAGL2*'nin de hücre hareketini düzenlediğini göstermektedir. Dolayısıyla *RIPK4*-*PLAGL2* etkileşimi hücre hareketi için de önemli olabilir. Deri oluşumu ve yenilenmesinde hücre hareketi önemli bir yer tutmaktadır. *RIPK4* ve *PLAGL2* etkileşimi hücre hareketini düzenleyerek ilgili süreçleri kontrol edebilir. Bulgularımız *RIPK4*-*PLAGL2* etkileşiminin keratinositlerde belirli bir fonksiyonu yerine getirmek için bir araya geldiklerine işaret etmektedir.

Sonuç olarak, bu tez çalışması kapsamında *PLAGL2*'nin ilk kez keratinositlerde fonksiyonu analiz edilmiştir. Çalışmamızda, *PLAGL2*'nin keratinosit hücrelerinde knock-out edilmesinin hücre döngüsü üzerinde bir değişime sebep olmadığı görülmüştür. *PLAGL2*'nin knock-out edilmesi hücre membran bütünlüğünü değiştirmiş, hücre büyüklüğünde ve hücre ölümünde artışa sebep olmuştur. *In vitro* yara iyileşme deneyi, transwell deneyi ve hücrelerin hareketliliğin bir göstergesi olan artmış filopodlardan kaynaklanan kirpi hücre morfolojisi *PLAGL2*'nin özellikle de keratinosit-ilişkili hücre hareketini engellediğine dair güçlü kanıtlar ortaya koymuştur. Dahası, *PLAGL2*'nin knock-out edilmesi keratinositlerde kök hücre devamlılığının sağlanmasında rolü gösterilen Wnt/ β -katenin sinyal yolağı etkinliğini azaltmıştır. *PLAGL2* ekspresyonunun p63 tarafından düzenleniyor olması ve *RIPK4* ile etkileşmesinin yanında, literatür bilgileri ve kendi

bulgularımız dikkate alındığında *PLAGL2*'nin keratinositlerde temel hücresel aktiviteler üzerindeki etkisi ortaya konulmuş olup, deri oluşumu ve yenilenmesi sürecinde de düzenleyici bir rolünün olabileceğine dair ilave kanıtlar elde edildi. Sonuçlarımızın özeti 'grafiksel özet' olarak Şekil 38'de verilmiştir.

Bununla birlikte tez çalışmamız sonucu elde edilen özgün veriler, TÜBİTAK 1001 projemizde tamamlamış olduğumuz *PLAGL2*'nin knock-out keratinositlerde farklılaşmayla değişen genlerin (RNA-Seq) zenginleştirme analizi sonuçlarına fonksiyonel olarak destek sağlar niteliktedir. Verilerimiz, epidermal homeostazinin yer aldığı her türlü doku/organ gelişiminin altında yatan moleküler mekanizmaların anlaşılmasına katkı sağlayacak olup, deriyle ilişkilendirilmiş hastalıklara karşı terapötik yaklaşımlar geliştirilmesinin önünü açacaktır. İleride *PLAGL2* knock-out hücrelerle oluşturulacak olan 'çip üzerinde deri' ve üç boyutlu deri organoidleri model olarak kullanılarak keratinosit farklılaşması ve keratinosit-ilişkili fonksiyonel süreçlerinin araştırılması, *PLAGL2*'nin keratinosit-ilişkili hücresel süreçlerdeki rolünün aydınlatılmasına önemli katkılar sağlayacağı kanaatindeyiz.



Şekil 38. Grafiksel özet

6. KAYNAKLAR

1. Fuchs E (2008). Skin stem cells: rising to the surface. *J Cell Biol* 180: 273-84.
2. Marks R (1980). Is epidermal homeostasis in necessity? Comments on epidermal growth control. *Br J Dermatol* 103: 697-702.
3. Budtz PE (1986). Expectations of human epidermal kinetic homeostasis. *Br J Dermatol* 114: 645-50.
4. Lopez-Pajares V, Yan K, Zarnegar BJ, Jameson KL, Khavari PA (2013). Genetic pathways in disorders of epidermal differentiation. *Trends Genet* 29: 31-40.
5. Kalay E, Sezgin O, Chellappa V, Mutlu M, Morsy H, Kayserili H, Kreiger E, Cansu A, Toraman B, Abdalla EM, Aslan Y, Pillai S, Akarsu NA (2012). Mutations in RIPK4 cause the autosomal-recessive form of popliteal pterygium syndrome. *Am J Hum Genet* 90: 76-85.
6. Sümer C (2018). Keratinosit farklılaşmasında rol alan reseptörle etkileşen serin treonin kinaz 4 (RIPK4) ve keratin 14 (KRT14) proteinleri arasındaki etkileşimin araştırılması. Doktora tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Trabzon.
7. Boz Er AB (2016). Reseptörle etkileşen serin treonin kinaz 4 (RIPK4) ve pleimorfik adenomagen benzeri 2 (PLAGL2) proteinlerinin etkileşimlerinin araştırılması. Yüksek lisans tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Trabzon.
8. Sümer C, Boz Er AB, Dinçer T (2019). Keratin 14 is a novel interaction partner of keratinocyte differentiation regulatoreceptor-interacting protein kinase 4. *Turkish J Biol* 43: 225-234.
9. Hsu YC, Li L, Fuchs E (2014). Emerging interactions between skin stem cells and their niches. *Nat Med* 20: 847-856.
10. Alonso L, Fuchs E (2003). Stem cells of the skin epithelium. *Proc Natl Acad Sci* 100: 11830-11835.
12. Moreci RS, Lechler T (2020). Epidermal structure and differentiation. *Curr Biol* 30: 144-149.

13. Blanpain C, Fuchs E (2009). Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 207-17.
14. Yousef H, Alhajj M, Sharma S (2022). Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. StatPearls Treasure Island (FL) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470464/>.
15. Slominski AT, Zmijewski MA, Skobowiat C, Zbytek B, Slominski RM, Steketee JD (2012). Sensing the environment: regulation of local and global homeostasis by the skin's neuroendocrine system. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 212: v, vii, 1-115.
16. Eckhart L, Lippens S, Tschachler E, Declercq W (2013). Cell death by cornification. *Biochim Biophys Acta- Mol Cell Res* 1833: 3471-3480.
17. Markiewicz A, Sigorski D, Markiewicz M, Owczarczyk-Saczonek A, Placek W (2021). Caspase-14-From Biomolecular Basics to Clinical Approach. A Review of Available Data. *Int J Mol Sci* 22: 5575.
18. Chu EY, Hens J, Andl T, Kairo A, Yamaguchi TP, Briskin C, Glick A, Wysolmerski JJ, Millar SE (2004). Canonical WNT signaling promotes mammary placode development and is essential for initiation of mammary gland morphogenesis. *Development* 131: 4819-29.
19. DasGupta R, Fuchs E (1999). Multiple roles for activated LEF/TCF transcription complexes during hair follicle development and differentiation. *Development* 126: 4557-68.
20. Demehri S, Turkoz A, Kopan R (2009). Epidermal Notch1 loss promotes skin tumorigenesis by impacting the stromal microenvironment. *Cancer cell* 16: 55-66.
21. Suzuki A, Itami S, Ohishi M, Hamada K, Inoue T, Komazawa N, Senoo H, Sasaki T, Takeda J, Manabe M, Mak TW, Nakano T (2003). Keratinocyte-specific Pten deficiency results in epidermal hyperplasia, accelerated hair follicle morphogenesis and tumor formation. *Cancer Res* 63: 674-81.
22. Yang L, Mao C, Teng Y, Li W, Zhang J, Cheng X, Li X, Han X, Xia Z, Deng H, Yang X (2005). Targeted Disruption of Smad4 in Mouse Epidermis Results in Failure of Hair Follicle Cycling and Formation of Skin Tumors. *Cancer Res* 65: 8671-8678.
23. Abe Y, Tanaka N (2017). Roles of the Hedgehog Signaling Pathway in Epidermal and Hair Follicle Development, Homeostasis, and Cancer. *J Dev Biol* 5:12.

24. Zhang JY, Green CL, Tao S, Khavari PA (2004). NF-kappaB RelA opposes epidermal proliferation driven by TNFR1 and JNK. *Genes Dev* 18: 17-22.
25. Beretta C, Chiarelli A, Testoni B, Mantovani R, Guerrini L (2005). Regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p57Kip2 expression by p63. *Cell cycle* 4: 1625-31.
26. Laurikkala J, Mikkola ML, James M, Tummers M, Mills AA, Thesleff I (2006). p63 regulates multiple signalling pathways required for ectodermal organogenesis and differentiation. *Development* 133: 1553-63.
27. Rinne T, Clements SE, Lamme E, Duijf PHG, Bolat E, Meijer R, Scheffer H, Rosser E, Tan TY, McGrath JA, Schalkwijk J, Brunner HG, Zhou H, van Bokhoven H (2008). A novel translation re-initiation mechanism for the p63 gene revealed by amino-terminal truncating mutations in Rapp-Hodgkin/Hay-Wells-like syndromes. *Hum Mol Genet* 17: 1968-77.
28. Watt FM, Collins CA (2008). Role of beta-catenin in epidermal stem cell expansion, lineage selection, and cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 73: 503-12.
29. Patturajan M, Nomoto S, Sommer M, Fomenkov A, Hibi K, Zangen R, Poliak N, Califano J, Trink B, Ratovitski E, Sidransky D (2002). DeltaNp63 induces beta-catenin nuclear accumulation and signaling. *Cancer cell* 1: 369-79.
30. Truong AB, Kretz M, Ridky TW, Kimmel R, Khavari PA (2006). p63 regulates proliferation and differentiation of developmentally mature keratinocytes. *Genes Dev* 20: 3185-97.
31. Koster MI, Dai D, Marinari B, Sano Y, Costanzo A, Karin M, Roop DR (2007). p63 induces key target genes required for epidermal morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 3255-60.
32. Li Y, Giovannini S, Wang T, Fang J, Li P, Shao C, Wang Y; TOR centre; Shi Y, Candi E, Melino G, Bernassola F (2023). p63: a crucial player in epithelial stemness regulation. *Oncogene* 42: 3371-3384.
33. Koster MI, Roop DR (2004). The role of p63 in development and differentiation of the epidermis. *J Dermatol Sci* 34: 3-9.

34. Dohn M, Zhang S, Chen X (2001). p63alpha and DeltaNp63alpha can induce cell cycle arrest and apoptosis and differentially regulate p53 target genes. *Oncogene* 20: 3193-205.
35. Mills AA, Zheng B, Wang XJ, Vogel H, Roop DR, Bradley A (1999). p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature* 398: 708-13.
36. Leoyklang P, Siriwan P, Shotelersuk V (2006). A mutation of the p63 gene in non-syndromic cleft lip. *J Med Genet* 43: e28.
37. Rinne T, Hamel B, van Bokhoven H, Brunner HG (2006). Pattern of p63 mutations and their phenotypes--update. *Am J Med Genet A* 140: 1396-406.
38. Ianakiev P, Kilpatrick MW, Toudjarska I, Basel D, Beighton P, Tsipouras P (2000). Split-hand/split-foot malformation is caused by mutations in the p63 gene on 3q27. *Am J Med Genet* 67: 59-66.
39. Clements SE, Techanukul T, Coman D, Mellerio JE, McGrath JA (2010). Molecular basis of EEC (ectrodactyly, ectodermal dysplasia, clefting) syndrome: five new mutations in the DNA-binding domain of the TP63 gene and genotype-phenotype correlation. *Br J Dermatol* 162: 201-207.
40. Van Bokhoven H, Hamel BC, Bamshad M, Sangiorgi E, Gurrieri F, Duijf PH, Vanmolkot KR, van Beusekom E, van Beersum SE, Celli J, Merckx GF, Tenconi R, Fryns JP, Verloes A, Newbury-Ecob RA, Raas-Rotschild A, Majewski F, Beemer FA, Janecke A, Chitayat D, Crisponi G, Kayserili H, Yates JR, Neri G, Brunner HG (2001). p63 Gene mutations in eec syndrome, limb-mammary syndrome, and isolated split hand-split foot malformation suggest a genotype-phenotype correlation. *Am J Med Genet* 69: 481-92.
41. McGrath JA, Duijf PH, Doetsch V, Irvine AD, de Waal R, Vanmolkot KR, Wessagowit V, Kelly A, Atherton DJ, Griffiths WA, Orlow SJ, van Haeringen A, Ausems MG, Yang A, McKeon F, Bamshad MA, Brunner HG, Hamel BC, van Bokhoven H (2001). Hay-Wells syndrome is caused by heterozygous missense mutations in the SAM domain of p63. *Hum Mol Genet* 10: 221-229.
42. Yang A, Zhu Z, Kapranov P, McKeon F, Church GM, Gingeras TR, Struhl K (2006). Relationships between p63 binding, DNA sequence, transcription activity, and biological function in human cells. *Mol Cell* 24: 593-602.

43. Mitchell K, O'Sullivan J, Missero C, Blair E, Richardson R, Anderson B, Antonini D, Murray JC, Shanske AL, Schutte BC, Romano RA, Sinha S, Bhaskar SS, Black GC, Dixon J, Dixon MJ (2012). Exome sequence identifies RIPK4 as the Bartsocas-Papas syndrome locus. *Am J Hum Genet* 90: 69-75.
44. Leslie EJ, O'Sullivan J, Cunningham ML, Singh A, Goudy SL, Ababneh F, Alsubaie L, Ch'ng GS, van der Laar IM, Hoozeboom AJ, Dunnwald M, Kapoor S, Jiramongkolchai P, Standley J, Manak JR, Murray JC, Dixon MJ (2015). Expanding the genetic and phenotypic spectrum of popliteal pterygium disorders. *Am J Med Genet Part A* 167A: 545-52.
45. Bartsocas CS, Papas CV (1972). Popliteal pterygium syndrome. Evidence for a severe autosomal recessive form. *J of Medical Genet.* doi:10.1136/jmg.9.2.222.
46. Hall JG, Reed SD, Rosenbaum KN, Gershanik J, Chen H, Wilson KM (1982). Limb pterygium syndromes: A review and report of eleven patients. *Am J Med Genet* 12: 377-409.
47. Ceylaner G, Güven MA, Ceylaner S, Uzel M, Müftüoğlu K (2007). Prenatal diagnosis of a Turkish Bartsocas-Papas syndrome case with upper limb pterigia. *Prenat Diagn.* doi:10.1002/pd.1723.
48. Dolan SM, Shanske AL, Marion RW, Gross SJ (2003). First-trimester diagnosis of Bartsocas-Papas syndrome (BPS) by transvaginal ultrasound: Case report and review of the literature. *Prenat Diagn.* doi:10.1002/pd.560.
49. Abdalla EM, Morsy H (2011). Bartsocas-Papas Syndrome: Unusual Findings in the First Reported Egyptian Family. *Case Rep Genet* 2011: 1-6.
50. Aslan Y, Erduran E, Kutlu N (2000). Autosomal recessive multiple pterygium syndrome: a new variant? *Am J Med Genet* 93: 194-7.
51. Martinez-Frias ML, Frias JL, Vazquez I, Fernandez J (1991). Bartsocas-Papas syndrome: Three familial cases from Spain. *Am J Med Genet* 39: 34-37.
52. Massoud AA, Ammaari AN, Khan ASS, Katraman BV, Teebi AS (1998). Bartsocas-Papas Syndrome in an Arab Family with Four Affected Sibs: Further Characterization. *J Med Genet* 79:16-21.

53. Papadia F, Zimbalatti F, La Rosa CG (1984). The Bartsocas-Papas syndrome: Autosomal recessive form of popliteal pterygium syndrome in a male infant. *Am J Med Genet* 17: 841-847.
54. Veenstra Knol HE, Kleibeuker A, Timmer A, Ten Kate LP, Van Essen AJ (2003). Unreported Manifestations in Two Dutch Families with Bartsocas-Papas Syndrome. *Am J Med Genet* 123 A: 243-248.
55. Dinçer T, Gümüş E, Toraman B, Er İ, Yildiz G, Yüksel Z, Kalay E (2021). A novel homozygous RIPK4 variant in a family with severe Bartsocas-Papas syndrome. *Am J Med Genet Part A* 185: 1691-1699.
56. Gripp KW, Ennis S, Napoli J (2013). Exome Analysis in Clinical Practice: Expanding the Phenotype of Bartsocas-Papas Syndrome. *Am J Med Genet Part A* 161: 1058-1063.
57. Gollasch B, Basmanav FB, Nanda A, Fritz G, Mahmoudi H, Thiele H, Wehner M, Wolf S, Altmüller J, Nürnberg P, Frank J, Betz RC (2015). Identification of a novel mutation in RIPK4 in a kindred with phenotypic features of Bartsocas-Papas and CHAND syndromes. *Am J Med Genet Part A* 167A: 2555-62.
58. Busa T, Jeraiby M, Clémenson A, Manouvrier S, Granados V, Philip N, Touraine R (2017). Confirmation that RIPK4 mutations cause not only Bartsocas-Papas syndrome but also CHAND syndrome. *Am J Med Genet Part A* 173: 3114-3117.
59. Bähr C, Rohwer A, Stempka L, Rincke G, Marks F, Gschwendt M (2000). DIK, a novel protein kinase that interacts with protein kinase Cdelta. Cloning, characterization, and gene analysis. *J Biol Chem* 275: 36350-7.
60. Chen L, Haider K, Ponda M, Cariappa A, Rowitch D, Pillai S (2001). Protein Kinase C-associated Kinase (PKK), a Novel Membrane-associated, Ankyrin Repeat-containing Protein Kinase. *J Biol Chem*. doi:10.1074/jbc.M008069200.
61. Meylan E, Martinon F, Thome M, Gschwendt M, Tschopp J (2002). RIP4 (DIK/PKK), a novel member of the RIP kinase family, activates NF-kappa B and is processed during apoptosis. *EMBO Rep* 3: 1201-8.
62. Humphries F, Yang S, Wang B, Moynagh PN (2015). RIP kinases: key decision makers in cell death and innate immunity. *Cell death and differentiation* 22: 225–36.

63. Holland P, Willis C, Kanaly S, Glaccum M, Warren A, Charrier K, Murison J, Derry J, Virca G, Bird T, Peschon J (2002). RIP4 is an ankyrin repeat-containing kinase essential for keratinocyte differentiation. *Curr Biol* 12: 1424-8.
64. Rountree RB, Willis CR, Dinh H, Blumberg H, Bailey K, Dean C, Peschon JJ, Holland PM (2010). RIP4 Regulates Epidermal Differentiation and Cutaneous Inflammation. *J Invest Dermatol* 130: 102-112.
65. De Groote P, Tran HT, Fransen M, Tanghe G, Urwyler C, De Craene B, Leurs K, Gilbert B, Van Imschoot G, De Rycke R, Guérin CJ, Holland P, Berx G, Vandenabeele P, Lippens S, Vleminckx K, Declercq W (2015). A novel RIPK4-IRF6 connection is required to prevent epithelial fusions characteristic for popliteal pterygium syndromes. *Cell Death Differ* 22: 1012-24
66. Urwyler Rösselet C, Tanghe G, Leurs K, Gilbert B, De Rycke R, De Bruyne M, Lippens S, Bartunkova S, De Groote P, Niessen C, Haftek M, Vandenabeele P, Declercq W (2018). Keratinocyte-Specific Ablation of RIPK4 Allows Epidermal Cornification but Impairs Skin Barrier Formation. *J Invest Dermatol* 138: 1268-1278.
67. Kwa MQ, Huynh J, Aw J, Zhang L, Nguyen T, Reynolds EC, Sweet MJ, Hamilton JA, Scholz GM (2014). Receptor-interacting protein kinase 4 and interferon regulatory factor 6 function as a signaling axis to regulate keratinocyte differentiation. *J Biol Chem*. doi:10.1074/jbc.M114.589382.
68. Huang XD, McGann JC, Liu BY, Hannoush RN, Lill JR, Pham V, Newton K, Kakunda M, Liu J, Yu C, Hymowitz SG, Hongo JA, Wynshaw-Boris A, Polakis P, Harland RM, Dixit VM (2013). Phosphorylation of Dishevelled by protein kinase RIPK4 regulates Wnt signaling. *Science* 339: 1441-5.
69. Lee P, Jiang S, Li Y, Yue J, Gou X, Chen SY, Zhao Y, Schober M, Tan M, Wu X (2017). Phosphorylation of Pkp1 by RIPK4 regulates epidermal differentiation and skin tumorigenesis. *EMBO J* 36: 1963-1980.
70. Yi H, Su YZ, Lin R, Zheng XQ, Pan D, Lin D-M, Gao X, Zhang R (2021). Downregulation of RIPK4 Expression Inhibits Epithelial-Mesenchymal Transition in Ovarian Cancer through IL-6. *J Immunol Res* 2021: 8875450.

71. Kim SW, Schifano M, Oleksyn D, Jordan CT, Ryan D, Insel R, Zhao J, Chen L (2014). Protein kinase C-associated kinase regulates NF- κ B activation through inducing IKK activation. *Int J Oncol* 45: 1707-14.
72. Moran ST, Haider K, Ow Y, Milton P, Chen L, Pillai S (2003). Protein kinase C-associated kinase can activate NF κ B in both a kinase-dependent and a kinase-independent manner. *J Biol Chem* 278: 21526-33.
73. Bae HC, Jeong SH, Kim JH, Lee H, Ryu WI, Kim M-G, Son ED, Lee TR, Son SW (2018). RIP4 upregulates CCL20 expression through STAT3 signalling in cultured keratinocytes. *Exp Dermatol* 27: 1126-1133.
74. Nakamura BN, Glazier A, Kattah MG, Duong B, Jia Y, Campo D, Shao L (2018). A20 regulates canonical wnt-signaling through an interaction with RIPK4. *Plos one* 13: e0195893.
75. Tanghe G, Urwyler-Rösselet C, De Groote P, Dejardin E, De Bock P-J, Gevaert K, Vandenabeele P, Declercq W (2018). RIPK4 activity in keratinocytes is controlled by the SCF β -TrCP ubiquitin ligase to maintain cortical actin organization. *Cell Mol Life Sci* 75: 2827-2841.
76. Bertrand MJM, Lippens S, Staes A, Gilbert B, Roelandt R, De Medts J, Gevaert K, Declercq W, Vandenabeele P (2011). cIAP1/2 are direct E3 ligases conjugating diverse types of ubiquitin chains to receptor interacting proteins kinases 1 to 4 (RIP1-4). *PloS one* 6: e22356.
77. Muto A, Ruland J, McAllister-Lucas LM, Lucas PC, Yamaoka S, Chen FF, Lin A, Mak TW, Núñez G, Inohara N (2002). Protein kinase C-associated kinase (PKK) mediates Bcl10-independent NF-kappa B activation induced by phorbol ester. *J Biol Chem* 277: 31871-6.
78. Dinçer T, Boz Er AB, Er İ, Toraman B, Yildiz G, Kalay E (2020). RIPK4 suppresses the TGF- β 1 signaling pathway in HaCaT cells. *Cell Biol Int* 44: 848-860.
79. Karoğlu Z (2012). Karpuzda (*Citrullus Lanatus L.*) İzole Edilmiş ERF Transkripsiyon Faktör Genlerinin Karakterizasyonu. Yüksek lisans tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Isparta.

80. Lodish H BA, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, and Darnell J (2008). *Molecular Cell Biology*. 6th edition. New York: W. H. Freeman and Company, USA, 623-665.
81. Nikolov DB, Burley SK (1997). RNA polymerase II transcription initiation: a structural view. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 15-22.
82. Ptashne M, Gann A (1997). Transcriptional activation by recruitment. *Nature* 386: 569-77.
83. Mitchell PJ, Tjian R (1989). Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* 245: 371-8.
84. Brivanlou AH, Darnell JE (2002). Signal Transduction and the Control of Gene Expression. *Science* 295: 813-818.
85. Kas K, Voz ML, Röijer E, Aström AK, Meyen E, Stenman G, Van de Ven WJ (1997). Promoter swapping between the genes for a novel zinc finger protein and beta-catenin in pleomorphic adenomas with t(3;8)(p21;q12) translocations. *Nat Genet* 15: 170-4.
86. Jain S, Hasan S, Vyas N, Shah N, Dalal S (2015). Pleomorphic Adenoma of the Parotid Gland: Report of a Case with Review of Literature. *Ethiop J Health Sci* 25: 189-94.
87. Panchal I, Wanjari A (2023). Pleomorphic Adenoma of a Minor Salivary Gland of the Hard Palate: A Case Report. *Cureus* 15: e47957.
88. Kas K, Voz ML, Hensen K, Meyen E, Van de Ven WJ (1998). Transcriptional activation capacity of the novel PLAG family of zinc finger proteins. *J Biol Chem* 273: 23026-32.
89. Juma AR, Damdimopoulou PE, Grommen SVH, Van de Ven WJM, De Groef B (2016). Emerging role of PLAG1 as a regulator of growth and reproduction. *J Endocrinol* 228: R45-R56.
90. Hensen K, Braem C, Declercq J, Van Dyck F, Dewerchin M, Fiette L, Denef C, Van de Ven WJM (2004). Targeted disruption of the murine *Plag1* proto-oncogene causes growth retardation and reduced fertility. *Dev Growth Differ* 46: 459-470.
91. Voz ML, Agten NS, Van de Ven WJ, Kas K (2000). PLAG1, the main translocation target in pleomorphic adenoma of the salivary glands, is a positive regulator of IGF-II. *Cancer Res* 60: 106-13.

92. Abdollahi A (2007). LOT1 (ZAC1/PLAGL1) and its family members: Mechanisms and functions. *J Cell Physiol* 210: 16-25.
93. Vega-Benedetti AF, Saucedo C, Zavattari P, Vanni R, Zugaza JL, Parada LA (2017). PLAGL1: an important player in diverse pathological processes. *J Appl Genet* 58: 71-78.
94. Enlund F, Persson F, Stenman G (2004). Molecular analyses of the candidate tumor suppressor gene, PLAGL1, in benign and malignant salivary gland tumors. *Eur J Hum Genet* 112: 545-7.
95. Zheng G, Yang YC (2005). Sumoylation and acetylation play opposite roles in the transactivation of PLAG1 and PLAGL2. *J Biol Chem* 280: 40773-40781.
96. PhosphoSitePlus (2024). PLAGL2, PTM sites [online]. Available from: <https://www.phosphosite.org/proteinAction?id=22924&showAllSites=true#appletMsg>. [Accessed 1 February 2024].
97. The Human Protein Atlas (2024). PLAGL2 tissue expression [online]. Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000126003-PLAGL2/tissue>. [Accessed 6 January 2024].
98. The Human Gene Database Gene cards (2024). PLAGL2 Gene-PLAG1 Like Zinc Finger 2 [online]. Available from: https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PLAGL2#protein_expression. [Accessed 8 January 2024].
99. Zhu G, Yang X, Zhou W, Lian X, Hao Y (2023). PLAGL2 induces nucleus pulposus cell apoptosis via regulating RASSF5 expression and thus accelerates intervertebral disc degeneration. *Exp Cell Res* 430: 113699.
100. Mizutani A, Furukawa T, Adachi Y, Ikehara S, Taketani S (2002). A zinc-finger protein, PLAGL2, induces the expression of a proapoptotic protein Nip3, leading to cellular apoptosis. *J Biol Chem* 277: 15851-8.
101. Ammons MCB, Siemsen DW, Nelson-Overton LK, Quinn MT, Gauss KA (2007). Binding of pleomorphic adenoma gene-like 2 to the tumor necrosis factor (TNF)- α -responsive region of the NCF2 promoter regulates p67 phox expression and NADPH oxidase activity. *J Biol Chem* 282: 17941-17952.

102. Guo Y, Yang MCW, Weissler JC, Yang YS (2008). Modulation of PLAGL2 transactivation activity by Ubc9 co-activation not SUMOylation. *Biochem Biophys Res Commun* 374: 570-575.
103. Wezensky SJ, Hanks TS, Wilkison MJ, Ammons MC, Siemsen DW, Gauss KA (2010). Modulation of PLAGL2 transactivation by positive cofactor 2 (PC2), a component of the ARC/Mediator complex. *Gene* 452: 22-34.
104. Landrette SF, Madera D, He F, Castilla LH (2011). The transcription factor PlagL2 activates Mpl transcription and signaling in hematopoietic progenitor and leukemia cells. *Leukemia* 25: 655-62.
105. Fischer AD, Veronese Paniagua DA, Swaminathan S, Kashima H, Rubin DC, Madison BB (2023). The oncogenic function of PLAGL2 is mediated via ASCL2 and IGF2 and a Wnt-independent mechanism in colorectal cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 325: G196-G211.
106. Li N, Li D, Du Y, Su C, Yang C, Lin C, Li X, Hu G (2019). Overexpressed PLAGL2 transcriptionally activates Wnt6 and promotes cancer development in colorectal cancer. *Oncol Rep* 41: 875-884.
107. Zhao Z, Shelton SD, Oviedo A, Baker AL, Bryant CP, Omidvarnia S, Du L (2020). The PLAGL2/MYCN/miR-506-3p interplay regulates neuroblastoma cell fate and associates with neuroblastoma progression. *J Exp Clin Cancer Res* 39: 41.
108. Biological General Repository for Interaction Datasets (BioGRID) (2024). PLAGL2 /network [online]. Available from: <https://thebiogrid.org/111342/table/homo-sapiens/plagl2.html>. [Accessed 10 February 2024].
109. Qian F, Wang J, Wang Y, Gao Q, Yan W, Lin Y, Shen L, Xie Y, Jiang X, Shen B (2021). MiR-378a-3p as a putative biomarker for hepatocellular carcinoma diagnosis and prognosis: Computational screening with experimental validation. *Clin Transl Med* 11.
110. Hu W, Zheng S, Guo H, Dai B, Ni J, Shi Y, Bian H, Li L, Shen Y, Wu M, Tian Z, Liu G, Hossain MA, Yang H (2021). PLAGL2-EGFR-HIF-1/2 α Signaling Loop Promotes HCC Progression and Erlotinib Insensitivity. *Hepatology* 73: 674-691.

111. Wang L, Sun L, Liu R, Mo H, Niu Y, Chen T, Wang Y, Han S, Tu K, Liu Q (2021). Long non-coding RNA MAPKAPK5-AS1/PLAGL2/HIF-1 α signaling loop promotes hepatocellular carcinoma progression. *J Exp Clin Cancer Res* 40.
112. Cao Y, Tao Q, Kao X, Zhu X (2021). Hsa-circRNA-103809 Promotes Hepatocellular Carcinoma Development via MicroRNA-1270/PLAG1 Like Zinc Finger 2 Axis. *Dig Dis Sci* 66: 1524-1532.
113. Majem B, Parrilla A, Jiménez C, Suárez-Cabrera L, Barber M, Marín A, Castellví J, Tamayo G, Moreno-Bueno G, Ponce J, Matias-Guiu X, Alameda F, Romero I, Sánchez JL, Pérez-Benavente A, Moran S, Esteller M, Reventós J, Rigau M, Gil-Moreno A, Segura MF, Santamaría A (2019). MicroRNA-654-5p suppresses ovarian cancer development impacting on MYC, WNT and AKT pathways. *Oncogene* 38: 6035-6050.
114. Li C, Dong B, Xu X, Li Y, Wang Y, Li X (2021). LncRNA ARAP1-AS1 aggravates the malignant phenotypes of ovarian cancer cells through sponging miR-4735-3p to enhance PLAGL2 expression. *Cytotechnology* 73: 363-372.
115. Wu L, Zhou Z, Han S, Chen J, Liu Z, Zhang X, Yuan W, Ji J, Shu X (2020). PLAGL2 promotes epithelial-mesenchymal transition and mediates colorectal cancer metastasis via β -catenin-dependent regulation of ZEB1. *Br J Cancer* 122: 578-589.
116. Zhou Z, Wu L, Liu Z, Zhang X, Han S, Zhao N, Bao H, Yuan W, Chen J, Ji J, Shu X (2020). MicroRNA-214-3p targets the PLAGL2-MYH9 axis to suppress tumor proliferation and metastasis in human colorectal cancer. *Aging* 12: 9633-9657.
117. Zhou J, Liu H, Zhang L, Liu X, Zhang C, Wang Y, He Q, Zhang Y, Li Y, Chen Q, Zhang L, Wang K, Bu Y, Lei Y (2018). DJ-1 promotes colorectal cancer progression through activating PLAGL2/Wnt/BMP4 axis. *Cell Death Dis* 9. DOI: 10.1038/s41419-018-0883-4.
118. Wang YP, Guo P-T, Zhu Z, Zhang H, Xu Y, Chen YZ, Liu F, Ma SP (2017). Pleomorphic adenoma gene like-2 induces epithelial-mesenchymal transition via Wnt/ β -catenin signaling pathway in human colorectal adenocarcinoma. *Oncol Rep* 37: 1961-1970.

119. Germot A, Maftah A (2019). POFUT1 and PLAGL2 gene pair linked by a bidirectional promoter: the two in one of tumour progression in colorectal cancer? *EBioMedicine* 46: 25-26.
120. Chen W, He Q, Liu J, Li N, Xiao K, Chen H (2023). PLAGL2 promotes Snail expression and gastric cancer progression via UCA1/miR-145-5p/YTHDF1 axis. *Carcinogenesis*. doi:10.1093/carcin/bgad016.
121. Wu L, Zhao N, Zhou Z, Chen J, Han S, Zhang X, Bao H, Yuan W, Shu X (2020). PLAGL2 promotes the proliferation and migration of gastric cancer cells via USP37-mediated deubiquitination of Snail1. *Theranostics* 11: 700-714.
122. Liu Q, Ran R, Song M, Li X, Wu Z, Dai G, Xia R (2022). LncRNA HCP5 acts as a miR-128-3p sponge to promote the progression of multiple myeloma through activating Wnt/ β -catenin/cyclin D1 signaling via PLAGL2. *Cell Biol Toxicol* 38: 979-993.
123. Zeng Z, Teng Q, Xiao J (2021). Long noncoding RNA ILF3-AS1 aggravates papillary thyroid carcinoma progression via regulating the miR-4306/PLAGL2 axis. *Cancer Cell Int* 21: 1-12.
124. Xu B, Zhang X, Wang S, Shi B (2018). MiR-449a suppresses cell migration and invasion by targeting PLAGL2 in breast cancer. *Pathol Res Pract* 214: 790-795.
125. Fan T, Wang C-Q, Li XT, Yang H, Zhou J, Song YJ (2021). MiR-22-3p Suppresses Cell Migration and Invasion by Targeting PLAGL2 in Breast Cancer. *J Coll Physicians Surg Pak* 31: 937-940.
126. Gao N, Ye B (2020). Circ-SOX4 drives the tumorigenesis and development of lung adenocarcinoma via sponging miR-1270 and modulating PLAGL2 to activate WNT signaling pathway. *Cancer Cell Int* 20: 1-12.
127. Lin Y, Lin P, Guo W, Huang J, Xu X, Zhuang X (2023). PLAGL2 promotes the stemness and is upregulated by transcription factor E2F1 in human lung cancer. *Environmental toxicology* 38: 941-949.
128. Yang YS, Yang MCW, Weissler JC (2011). Pleiomorphic adenoma gene-like 2 expression is associated with the development of lung adenocarcinoma and emphysema. *Lung cancer* 74: 12-24.

129. Zheng H, Ying H, Wiedemeyer R, Yan H, Quayle SN, Ivanova EV, Paik JH, Zhang H, Xiao Y, Perry SR, Hu J, Vinjamoori A, Gan B, Sahin E, Chheda MG, Brennan C, Wang YA, Hahn WC, Chin L, DePinho RA (2010). PLAGL2 regulates Wnt signaling to impede differentiation in neural stem cells and gliomas. *Cancer cell* 17: 497-509.
130. Guo J, Wang M, Wang Z, Liu X (2016). Overexpression of Pleomorphic Adenoma Gene-Like 2 Is a Novel Poor Prognostic Marker of Prostate Cancer. *PloS one* 11: e0158667.
131. Chen H, Yang W, Li Y, Ji Z (2023). PLAGL2 promotes bladder cancer progression via RACGAP1/RhoA GTPase/YAP1 signaling. *Cell Death Dis* 14: 433.
132. Hanks TS, Gauss KA (2012). Pleomorphic adenoma gene-like 2 regulates expression of the p53 family member, p73, and induces cell cycle block and apoptosis in human promonocytic U937 cells. *Apoptosis* 17: 236-47.
133. Sekiya R, Maeda M, Yuan H, Asano E, Hyodo T, Hasegawa H, Ito S, Shibata K, Hamaguchi M, Kikkawa F, Kajiyama H, Senga T (2014). PLAGL2 regulates actin cytoskeletal architecture and cell migration. *Carcinogenesis* 35: 1993-2001.
134. Wang G, Shen K, Xiao J, Fan H, Wang Y, Liu K, Zhou X, Cheng Q, Miao Y, Xu Z, Yang L (2023). Long non-coding RNA LGALS8-AS1 facilitates PLAGL2-mediated malignant phenotypes in gastric cancer. *J Gene Med* 25:e3487.
135. Liu X, Chen X, Zeng K, Xu M, He B, Pan Y, Sun H, Pan B, Xu X, Xu T, Hu X, Wang S (2018). DNA-methylation-mediated silencing of miR-486-5p promotes colorectal cancer proliferation and migration through activation of PLAGL2/IGF2/ β -catenin signal pathways. *Cell Death Dis* 9:1037.
136. Yang YS, Yang MCW, Guo Y, Williams OW, Weissler JC (2009). PLAGL2 expression-induced lung epithelium damages at bronchiolar alveolar duct junction in emphysema: bNip3- and SP-C-associated cell death/injury activity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297: L455-L466.
137. Van Dyck F, Braem CV, Chen Z, Declercq J, Deckers R, Kim BM, Ito S, Wu MK, Cohen DE, Dewerchin M, Derua R, Waelkens E, Fiette L, Roebroek A, Schuit F, Van de Ven WJ, Shivdasani RA (2007). Loss of the *plagl2* transcription factor affects lacteal uptake of chylomicrons. *Cell Metab* 6: 406-413.

138. Bhattay M, Fan R, Muir WM, Pruett SB, Nanduri B (2012). Transcriptomic analysis of peritoneal cells in a mouse model of sepsis: confirmatory and novel results in early and late sepsis. *BMC genomics* 13: 509.
139. Kaise T, Fukui M, Sueda R, Piao W, Yamada M, Kobayashi T, Imayoshi I, Kageyama R (2022). Functional rejuvenation of aged neural stem cells by *Plagl2* and anti-Dyrk1a activity. *Genes Dev* 36: 23-37.
140. Alam S, Zinyk D, Ma L, Schuurmans C (2005). Members of the *Plag* gene family are expressed in complementary and overlapping regions in the developing murine nervous system. *Dev Dyn* 234: 772-782.
141. Wang Q, Liu Z, Zhai G, Yu X, Ke S, Shao H, Guo J (2022). Overexpression of GATA5 Inhibits Prostate Cancer Progression by Regulating *PLAGL2* via the FAK/PI3K/AKT Pathway. *Cancers* 14: 2074.
142. Perugorria MJ, Olaizola P, Labiano I, Esparza-Baquer A, Marzioni M, Marin JJG, Bujanda L, Banales JM (2019). Wnt- β -catenin signalling in liver development, health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 16: 121-136.
143. Clevers H (2006). Wnt/ β -catenin signaling in development and disease. *Cell* 127: 469-80.
144. Niehrs C (2012). The complex world of WNT receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 767-79.
145. Cruciat C-M, Niehrs C (2013). Secreted and transmembrane wnt inhibitors and activators. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5: a015081.
146. Nusse R, Clevers H (2017). Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell* 169: 985-999.
147. Valenta T, Hausmann G, Basler K (2012). The many faces and functions of β -catenin. *EMBO J* 31: 2714-36.
148. Huang P, Senga T, Hamaguchi M (2007). A novel role of phospho- β -catenin in microtubule regrowth at centrosome. *Oncogene* 26: 4357-71.
149. He K, Gan W (2023). Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway in the Development and Progression of Colorectal Cancer. *Cancer Manag Res* 15: 435-448.

150. McCord M, Mukoyama Y, Gilbert MR, Jackson S (2017). Targeting WNT Signaling for Multifaceted Glioblastoma Therapy. *Front Cell Neurosci* 11:318.
151. Shimizu T, Kagawa T, Inoue T, Nonaka A, Takada S, Aburatani H, Taga T (2008). Stabilized beta-catenin functions through TCF/LEF proteins and the Notch/RBP-Jkappa complex to promote proliferation and suppress differentiation of neural precursor cells. *Mol Cell Biol* 28: 7427-41.
152. Strubberg AM, Veronese Paniagua DA, Zhao T, Dublin L, Pritchard T, Bayguinov PO, Fitzpatrick JAJ, Madison BB (2018). The Zinc Finger Transcription Factor PLAGL2 Enhances Stem Cell Fate and Activates Expression of ASCL2 in Intestinal Epithelial Cell. *Stem Cell Reports* 11: 410-424.
153. Li D, Lin C, Li N, Du Y, Yang C, Bai Y, Feng Z, Su C, Wu R, Song S, Yan P, Chen M, Jain A, Huang L, Zhang Y, Li X (2019). PLAGL2 and POFUT1 are regulated by an evolutionarily conserved bidirectional promoter and are collaboratively involved in colorectal cancer by maintaining stemness. *EBioMedicine* 45: 124-138.
154. Jin W, Wang X (2022). PLAGL2 Promotes the Proliferation and Migration of Diffuse Large B-cell Lymphoma Cells via Wnt/ β -catenin Pathway. *Ann Clin Lab Sci* 52: 359–366.
155. Kouwenhoven EN, Oti M, Niehues H, Van Heeringen SJ, Schalkwijk J, Stunnenberg HG, Van Bokhoven H, Zhou H (2015). Transcription factor p63 bookmarks and regulates dynamic enhancers during epidermal differentiation. *EMBO reports* 16: 863-78.
156. Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C (2007). CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic Acids Res* 35: W52-7.
157. 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: 5429-33.
158. Mojica FJ, Díez-Villaseñor 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: 244-6.

159. Jansen R, Embden JDA van, Gastra W, Schouls LM (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol* 43: 1565-75.
160. Perugorria MJ, Olaizola P, Labiano I, Esparza-Baquer A, Marzioni M, Marin JJG, Bujanda L, Banales JM (2019). Wnt- β -catenin signalling in liver development, health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 16: 121-136
161. Ebrahimi S, Teimoori A, Khanbabaie H, Tabasi M (2019). Harnessing CRISPR/Cas 9 System for manipulation of DNA virus genome. *Rev Med Virol* 29: e2009.
162. 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: 816-21.
163. 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: 481-5.
164. Mei Y, Wang Y, Chen H, Sun ZS, Ju X-D (2016). Recent Progress in CRISPR/Cas9 Technology. *J Genet Genomics* 43: 63-75.
165. The nobel prize (2024). The Nobel Prize in Chemistry 2020 [online]. Available from: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2020/press-release/>. [Accessed 20 February 2024].
166. Romanienko PJ, Giacalone J, Ingenito J, Wang Y, Isaka M, Johnson T, You Y, Mark WH (2016). A Vector with a Single Promoter for In Vitro Transcription and Mammalian Cell Expression of CRISPR gRNAs. *PloS one* 11: e0148362.
167. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* 8: 2281-2308.
168. AddGene (2024). CRISPR Guide [online]. Available from: <https://www.addgene.org/guides/crispr/>. [Accessed 24 February 2024].
169. Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann 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: 1380-9.

170. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 106: 761-71.
171. Schürer N, Köhne A, Schliep V, Barlag K, Goerz G (1993). Lipid composition and synthesis of HaCaT cells, an immortalized human keratinocyte line, in comparison with normal human adult keratinocytes. *Exp Dermatol* 2: 179-85.
172. Schoop VM, Fusenig NE, Mirancea N (1999). Epidermal Organization and Differentiation of HaCaT Keratinocytes in Organotypic Coculture with Human Dermal Fibroblasts. *J Invest Dermatol* 112: 343-353.
173. Seo MD, Kang TJ, Lee CH, Lee AY, Noh M (2012). HaCaT Keratinocytes and Primary Epidermal Keratinocytes Have Different Transcriptional Profiles of Cornified Envelope-Associated Genes to T Helper Cell Cytokines. *Biomol Ther* 20: 171-6.
174. Lemaître G, Lamartine J, Pitaval A, Vaigot P, Garin J, Bouet S, Petat C, Soularue P, Gidrol X, Martin MT, Waksman G (2004). Expression profiling of genes and proteins in HaCaT keratinocytes: Proliferating versus differentiated state. *J Cell Biochem* 93: 1048-1062.
175. Inoue H, Nojima H, Okayama H (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-8.
176. Phelan MC (2006). Techniques for mammalian cell tissue culture. *Curr Protoc Cytom* Appendix 3: Appendix 3B.
177. Jordan M, Schallhorn A, Wurm FM (1996). Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucleic Acids Res* 24: 596-601.
178. Okazaki A, Jo J-I, Tabata Y (2007). A reverse transfection technology to genetically engineer adult stem cells. *Tissue Eng* 13: 245-51.
179. Erfle H, Neumann B, Liebel U, Rogers P, Held M, Walter T, Ellenberg J, Pepperkok R (2007). Reverse transfection on cell arrays for high content screening microscopy. *Nat Protoc* 2: 392-9.
180. Addgene (2023). CRISPR/Cas9n plasmid vector [online] Available from: <https://www.addgene.org/62987/>. [Accessed 10 August 2023].

181. Cui Y, Xu J, Cheng M, Liao X, Peng S (2018). Review of CRISPR / Cas9 sgRNA Design Tools. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences* 10: 455-465.
182. Benchling (2020). CRISPR/Cas9n design sgRNA [online] Available from: <https://www.benchling.com/>. [Accessed 6 August 2020].
183. Center for organismal studies (CCTOP) (2022). CRISPR/Cas9 target online predictor [online]. Available from: <https://cctop.cos.uni-heidelberg.de/>. [Accessed 6 August 2022].
184. Doench JG, Fusi N, Sullender M, Hegde M, Vaimberg EW, Donovan KF, Smith I, Tothova Z, Wilen C, Orchard R, Virgin HW, Listgarten J, Root D (2016). Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol* 34: 184-191.
185. Primer3web (2022). Pick primers from a DNA sequence [online]. Available from: <https://primer3.ut.ee/>. [Accessed 24 August 2022].
186. Larionov A, Krause A, Miller W (2005). A standard curve-based method for relative real time PCR data processing. *BMC bioinformatics* 6: 62.
187. Clarke M, Spudich JA (1977). Nonmuscle Contractile Proteins: The Role of Actin and Myosin in Cell Motility and Shape Determination. *Annu Rev Biochem* 46: 797–822.
188. Dugina V, Zwaenepoel I, Gabbiani G, Clément S, Chaponnier C (2009). β - and γ -cytoplasmic actins display distinct distribution and functional diversity. *J Cell Biol* 122: 2980-2988.
189. Tyagi N, Bhardwaj A, Srivastava SK, Arora S, Marimuthu S, Deshmukh SK, Singh AP, Carter JE, Singh S (2015). Development and Characterization of a Novel in vitro Progression Model for UVB-Induced Skin Carcinogenesis. *Sci Rep* 5: 13894.
190. Bhardwaj A, Singh S, Srivastava SK, Arora S, Hyde SJ, Andrews J, Grizzle WE, Singh AP (2014). Restoration of PPP2CA expression reverses epithelial-to-mesenchymal transition and suppresses prostate tumour growth and metastasis in an orthotopic mouse model. *Br J Cancer* 110: 2000-10.
191. Srivastava SK, Bhardwaj A, Singh S, Arora S, McClellan S, Grizzle WE, Reed E, Singh AP (2012). Myb overexpression overrides androgen depletion-induced cell

cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cells and confers aggressive malignant traits: potential role in castration resistance. *Carcinogenesis* 33: 1149-57.

192. Christofidou ED, Tomazou M, Voutouri C, Michael C, Stylianopoulos T, Spyrou GM, Strati K (2024). Article Oct4 is a gatekeeper of epithelial identity by regulating cytoskeletal organization in skin keratinocytes. *CellReports* 43: 113859.
193. Tzur A, Moore JK, Jorgensen P, Shapiro HM, Kirschner MW (2011). Optimizing optical flow cytometry for cell volume-based sorting and analysis. *PloS one* 6: e16053.
194. Zaparte A, Schuch JB, Viola TW, Baptista TAS, Beidacki AS, do Prado CH, Sanvicente-Vieira B, Bauer ME, Grassi-Oliveira R (2019). Cocaine Use Disorder Is Associated with Changes in Th1/Th2/Th17 Cytokines and Lymphocytes Subsets. *Front Immunol* 10.
195. Doubling Time (2022). Calculate the doubling time of your cells [online]. Available from: <https://doubling-time.com/compute.php>. [Accessed 24 August 2022].
196. Kim KH, Sederstrom JM (2015). Assaying Cell Cycle Status Using Flow Cytometry. *Current protocols in molecular biology* 111: 28.6.1-28.6.11.
197. Van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP (1998). Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 31: 1-9
198. Modest EJ, Sengupta SK (1974). 7-Substituted actinomycin D (NSC-3053) analogs as fluorescent DNA-binding and experimental antitumor agents. *Cancer Chemother reports* 58: 35-48.
199. Zimmermann M, Meyer N (2011). Annexin V/7-AAD Staining in Keratinocytes pp 57-63. doi:10.1007/978-1-61779-108-6_8.
200. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184: 39-51.
201. Kim HA, Kim MC, Kim NY, Kim Y (2015). Inhibition of hedgehog signaling reduces the side population in human malignant mesothelioma cell lines. *Cancer Gene Ther* 22: 387-95.

202. Stokes CL, Lauffenburger DA, Williams SK (1991). Migration of individual microvessel endothelial cells: stochastic model and parameter measurement *J Cell Sci* 99: 419-430.
203. Verweij J, Pinedo HM (1990). Mitomycin C: mechanism of action, usefulness and limitations. *Anticancer Drugs* 1: 5-13.
204. Tomasz M (1995). Mitomycin C: small, fast and deadly (but very selective). *Chem Biol* 2: 575-579.
205. Justus CR, Leffler N, Ruiz-Echevarria M, Yang L V (2014). In vitro cell migration and invasion assays. *J Vis Exp*. doi:10.3791/51046.
206. Franken NAP, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Chem Biol* 1: 2315-9.
207. Lopez-Pajares V, Qu K, Zhang J, Webster DE, Barajas BC, Siprashvili Z, Zarnegar BJ, Boxer LD, Rios EJ, Tao S, Kretz M, Khavari PA (2015). A LncRNA-MAF:MAFB transcription factor network regulates epidermal differentiation. *Dev Cell* 32: 693-706.
208. Kagermeier-Schenk B, Wehner D, Özhan-Kizil G, Yamamoto H, Li J, Kirchner K, Hoffmann C, Stern P, Kikuchi A, Schambony A, Weidinger G (2011). Waif1/5T4 Inhibits Wnt/ β -Catenin Signaling and Activates Noncanonical Wnt Pathways by Modifying LRP6 Subcellular Localization. *Dev Cell* 21: 1129-1143.
209. Watanabe Y, Kameoka S, Gopalakrishnan V, Aldape KD, Pan ZZ, Lang FF, Majumder S (2004). Conversion of myoblasts to physiologically active neuronal phenotype. *Genes Dev* 18: 889-900.
210. Mosimann C, Hausmann G, Basler K (2009). Beta-catenin hits chromatin: regulation of Wnt target gene activation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 276-86.
211. Logan CY, Nusse R (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 781-810.
212. Smale ST (2010). Beta-galactosidase assay. *Cold Spring Harb Protoc* 2010: pdb.prot5423.
213. Smale ST (2010). Luciferase assay. *Cold Spring Harb Protoc* 2010: pdb.prot5421.

214. Yun JJ, Heisler LE, Hwang IIL, Wilkins O, Lau SK, Hyrcza M, Jayabalasingham B, Jin J, McLaurin J, Tsao MS, Der SD (2006). Genomic DNA functions as a universal external standard in quantitative real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 34: e85.
215. Wang F, Guo T, Jiang H, Li R, Wang T, Zeng N, Dong G, Zeng X, Li D, Xiao Y, Hu Q, Chen W, Xing X, Wang Q (2018). A comparison of CRISPR/Cas9 and siRNA-mediated ALDH2 gene silencing in human cell lines. *Mol Genet Genomics* 293: 769-783.
216. Romashin D, Rusanov A, Arzumanian V, Varshaver A, Poverennaya E, Vakhrushev I, Netrusov A, Luzgina N (2024). Exploring the Functions of Mutant p53 through TP53 Knockout in HaCaT Keratinocytes. *Curr Issues Mol Biol* 46: 1451-1466.
217. Martens MC, Edelkamp J, Seebode C, Schäfer M, Stähle S, Krohn S, Jung O, Escobar HM, Emmert S, Boeckmann L (2021). Generation and characterization of a crispr/cas9-mediated snap29 knockout in human fibroblasts. *Int J Mol Sci* 22: 5293.
218. Gross T, Jeney C, Halm D, Finkenzeller G, Stark GB, Zengerle R, Koltay P, Zimmermann S (2021). Characterization of CRISPR/Cas9 RANKL knockout mesenchymal stem cell clones based on single-cell printing technology and Emulsion Coupling assay as a low-cellularity workflow for single-cell cloning. *PLOS ONE* 16: e0238330.
219. Zhang XH, Tee LY, Wang XG, Huang QS, Yang SH (2015). Off-target Effects in CRISPR/Cas9-mediated Genome Engineering. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 4: e264.
220. Lieber MR (2010). The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End-Joining Pathway. *Annu Rev Biochem* 79: 181-211.
221. Wu X, Scott DA, Kriz AJ, Chiu AC, Hsu PD, Dadon DB, Cheng AW, Trevino AE, Konermann S, Chen S, Jaenisch R, Zhang F, Sharp PA (2014). Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells. *Nat Biotechnol* 32: 670-6.
222. Anderson EM, Haupt A, Schiel JA, Chou E, Machado HB, Strezoska Ž, Lenger S, McClelland S, Birmingham A, Vermeulen A, Brabant Smith AV (2015). Systematic analysis of CRISPR-Cas9 mismatch tolerance reveals low levels of off-target activity. *J Biotechnol* 211: 56-65.

223. 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.
224. Sternberg SH, Doudna JA (2015). Expanding the Biologist's Toolkit with CRISPR-Cas9. *Mol Cell* 58: 568-574.
225. Kapahnke M, Banning A, Tikkanen R (2016). Random Splicing of Several Exons Caused by a Single Base Change in the Target Exon of CRISPR/Cas9 Mediated Gene Knockout. *Cells* 5: 45.
226. Tourrière H, Chebli K, Tazi J (2002). mRNA degradation machines in eukaryotic cells. *Biochimie* 84: 821-837.
227. Shyu A-B, Wilkinson MF, van Hoof A (2008). Messenger RNA regulation: to translate or to degrade. *EMBO Journal* 27: 471-481.
228. Miller JN, Pearce DA (2014). Nonsense-mediated decay in genetic disease: friend or foe? *Mutat Res Rev Mutat Res* 762: 52-64.
229. Coban Akdemir Z, White JJ, Song X, Jhangiani SN, Fatih JM, Gambin T, Bayram Y, Chinn IK, Karaca E, Punetha J, Poli C; Baylor-Hopkins Center for Mendelian Genomics; Boerwinkle E, Shaw CA, Orange JS, Gibbs RA, Lappalainen T, Lupski JR, Carvalho CMB (2018). Identifying Genes Whose Mutant Transcripts Cause Dominant Disease Traits by Potential Gain-of-Function Alleles. *Am J Hum Genet* 103: 171-187.
230. Gandarillas A, Davies D, Blanchard J-M (2000). Normal and c-Myc-promoted human keratinocyte differentiation both occur via a novel cell cycle involving cellular growth and endoreplication. *Oncogene* 19: 3278-3289.
231. Zanet J, Freije A, Ruiz M, Coulon V, Sanz JR, Chiesa J, Gandarillas A (2010). A Mitosis Block Links Active Cell Cycle with Human Epidermal Differentiation and Results in Endoreplication. *PLoS ONE* 5: e15701.
232. Gruber F, Kremslehner C, Eckhart L, Tschachler E (2020). Cell aging and cellular senescence in skin aging - Recent advances in fibroblast and keratinocyte biology. *Exp Gerontol* 130: 110780.
233. Davies DM, van den Handel K, Bharadwaj S, Lengefeld J (2022). Cellular enlargement - A new hallmark of aging? *Front Cell Dev Biol* 10:1036602.

234. Severino J, Allen RG, Balin S, Balin A, Cristofalo VJ (2000). Is beta-galactosidase staining a marker of senescence in vitro and in vivo? *Exp Cell Res* 257: 162-71.
235. Lee BY, Han JA, Im JS, Morrone A, Johung K, Goodwin EC, Kleijer WJ, DiMaio D, Hwang ES (2006). Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging cell* 5: 187-95.
236. Yang T, Huo J, Xu R, Su Q, Tang W, Zhang D, Zhu M, Zhan Y, Dai B, Zhang Y (2021). Selenium sulfide disrupts the PLAGL2/C-MET/STAT3-induced resistance against mitochondrial apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Clin Transl Med* 11: e536.
237. Kashyap D, Garg VK, Goel N (2021). Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis. *Adv Protein Chem Struct Biol* 125: 73-120.
238. Golstein P, Kroemer G (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biotechnol* 32: 37-43.
239. Lambert WC, Cohen PJ, Lambert MW (1984). Role of the epidermis and other epithelia in wound healing: Selected concepts. *Clinics in Dermatol* 2: 24-33.
240. Krawczyk WS (1971). A pattern of epidermal cell migration during wound healing. *J Cell Biol* 49: 247-263.
241. Odland G, Ross R (1968). Human wound repair. I. Epidermal regeneration. *J Cell Biol* 39: 135-51.
242. Kirfel G, Herzog V (2004). Migration of epidermal keratinocytes: mechanisms, regulation, and biological significance. *Protoplasma* 223.
243. Kurokawa K, Itoh RE, Yoshizaki H, Nakamura YOT, Matsuda M (2004). Coactivation of Rac1 and Cdc42 at lamellipodia and membrane ruffles induced by epidermal growth factor. *Mol biol cell* 15: 1003-10.
244. Morgan MR, Humphries MJ, Bass MD (2012). Europe PMC Funders Group Synergistic control of cell adhesion by integrins and syndecans. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 957–969.
245. Laly AC, Sliogeryte K, Pundel OJ, Ross R, Keeling MC, Avisetti D, Waseem A, Gavara N, Connelly JT (2021). The keratin network of intermediate filaments

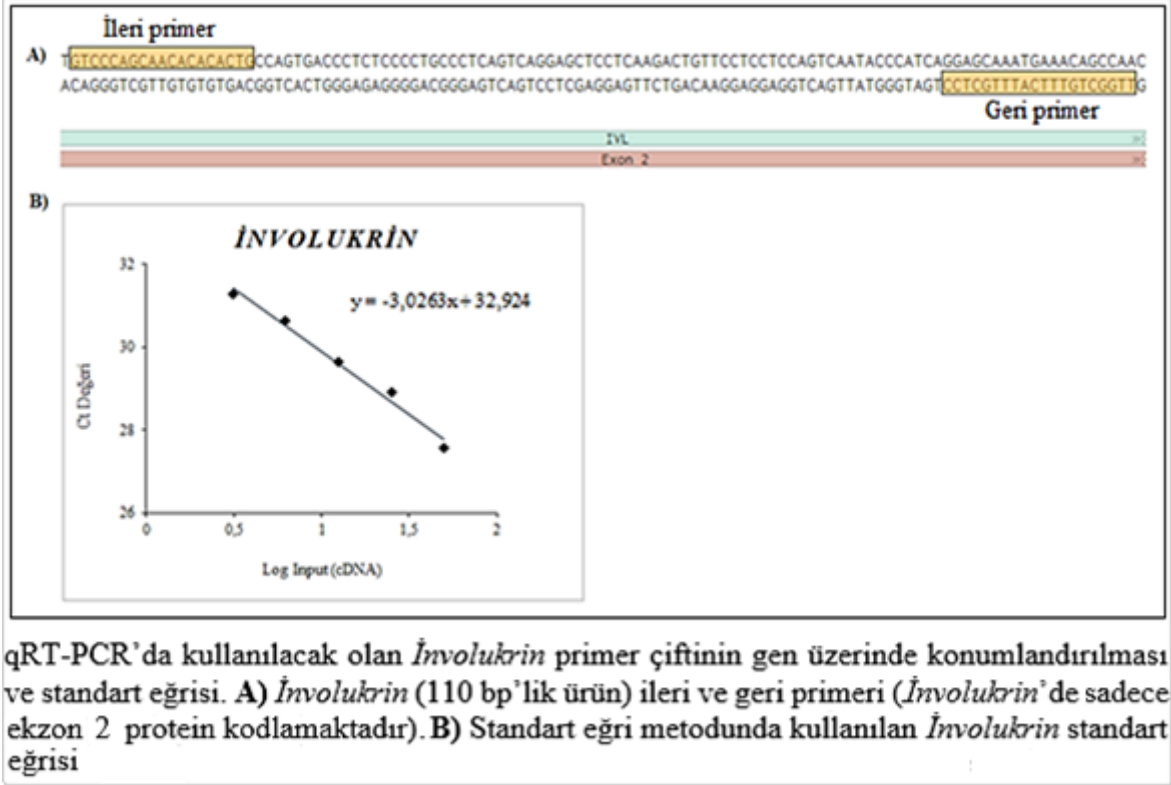
regulates keratinocyte rigidity sensing and nuclear mechanotransduction. *Sci Adv* 7: eabd6187.

246. Shutova MS, Borowczyk J, Russo B, Sellami S, Drukala J, Wolnicki M, Brembilla NC, Kaya G, Ivanov AI, Boehncke W-H (2023). Inflammation modulates intercellular adhesion and mechanotransduction in human epidermis via ROCK2. *iScience* 26: 106195.
247. Pathak MM, Nourse JL, Tran T, Hwe J, Arulmoli J, Le DTT, Bernardis E, Flanagan LA, Tombola F (2014). Stretch-activated ion channel Piezo1 directs lineage choice in human neural stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 16148-53.
248. Cahalan SM, Lukacs V, Ranade SS, Chien S, Bandell M, Patapoutian A (2015). Piezo1 links mechanical forces to red blood cell volume. *eLife* 4.
249. Holt JR, Zeng W-Z, Evans EL, Woo S-H, Ma S, Abuwarda H, Loud M, Patapoutian A, Pathak MM (2021). Spatiotemporal dynamics of PIEZO1 localization controls keratinocyte migration during wound healing. *eLife* 10: e65415.
250. Li A, Qiu J, Zhou B, Xu B, Xiong Z, Hao X, Shi X, Cao X (2020). The gene transfection and endocytic uptake pathways mediated by PEGylated PEI-entrapped gold nanoparticles. *Arab J Chem* 13: 2558-2567.
251. Zhuang L, Lawlor KT, Schlueter H, Pieterse Z, Yu Y, Kaur P (2018). Pericytes promote skin regeneration by inducing epidermal cell polarity and planar cell divisions. *Life Sci Alliance* 1: e201700009.
252. Lim X, Nusse R (2013). Wnt signaling in skin development, homeostasis, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5: a008029.
253. Clevers H, Loh KM, Nusse R (2014). An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control. *Science* 346: 1248012.
254. Shi Y, Shu B, Yang R, Xu Y, Xing B, Liu J, Chen L, Qi S, Liu X, Wang P, Tang J, Xie J (2015). Wnt and Notch signaling pathway involved in wound healing by targeting c-Myc and Hes1 separately. *Stem Cell Res Ther* 6: 120.
255. Perochon J, Carroll LR, Cordero JB (2018). Wnt Signalling in Intestinal Stem Cells: Lessons from Mice and Flies. *Genes* 9: 138.

256. Kosumi H, Watanabe M, Shinkuma S, Nohara T, Fujimura Y, Tsukiyama T, Donati G, Iwata H, Nakamura H, Ujiie H, Natsuga K (2022). Wnt/ β -Catenin Signaling Stabilizes Hemidesmosomes in Keratinocytes. *J Invest Dermatol* 142: 1576-1586.e2.
257. Zhang Y, Tu C, Zhang D, Zheng Y, Peng Z, Feng Y, Xiao S, Li Z (2015). Wnt/ β -Catenin and Wnt5a/ Ca^{2+} Pathways Regulate Proliferation and Apoptosis of Keratinocytes in Psoriasis Lesions. *Cell Physiol Biochem* 36: 1890-1902.
258. Chu WK, Dai PM, Li HL, Chen JK (2008). Glycogen synthase kinase-3 β regulates DeltaNp63 gene transcription through the beta-catenin signaling pathway. *J Cell Biochem* 105:447-53.
259. Dinçer T (2020). Knock-Out of Receptor-Interactin Serine/Threonine Kinase 4 (RIPK4) Induces De-Differentiation Process in Keratinocytes. *F Ü Med J Health Sci* 34: 117- 122.

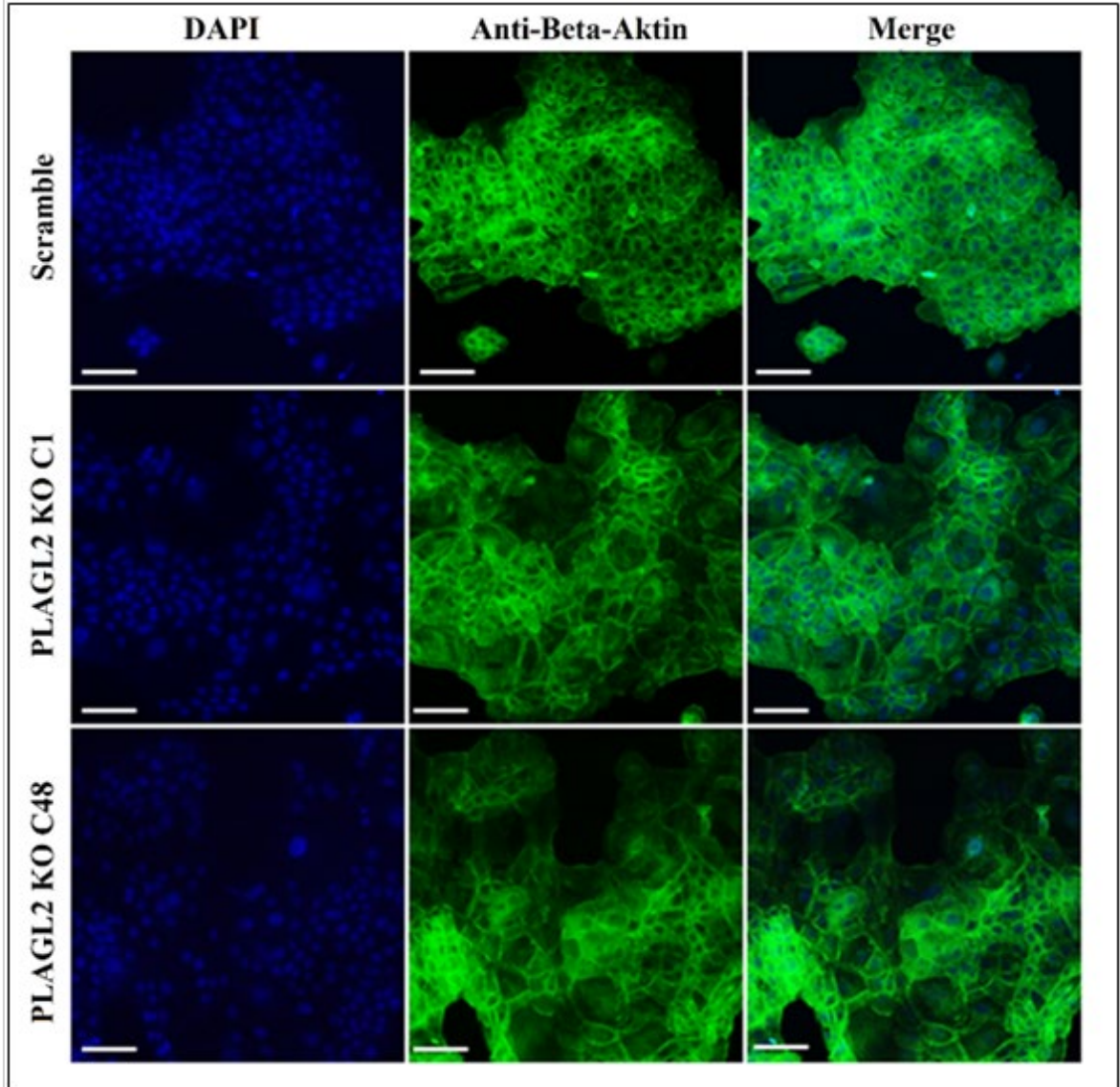


Ek 1. *İnvolukrin* mRNA ekspresyonunda kullanılan primerlerin gen üzerinde konumlandırılması ve standart eğrisi



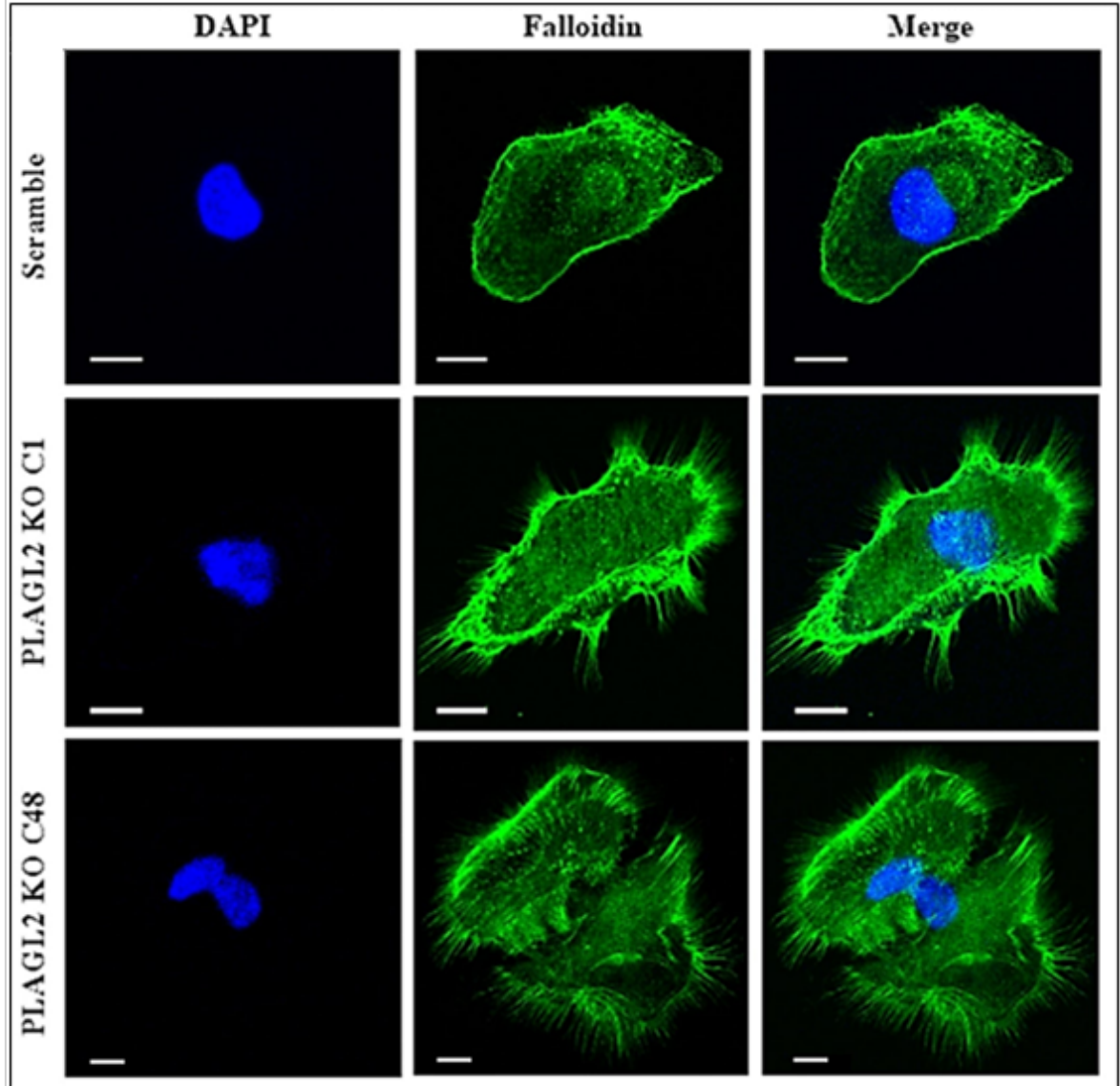
qRT-PCR'da kullanılacak olan *İnvolukrin* primer çiftinin gen üzerinde konumlandırılması ve standart eğrisi. A) *İnvolukrin* (110 bp'lik ürün) ileri ve geri primeri (*İnvolukrin*'de sadece ekzon 2 protein kodlamaktadır). B) Standart eğri metodunda kullanılan *İnvolukrin* standart eğrisi

Ek 2. *PLAGL2* Knock-out Hücrelerinin Büyüklüğünün β -aktin antikoruna ile İmmüno Floresan Yöntemiyle İncelenmesi



PLAGL2 knock-out klonlarda (C1 ve C48) Beta-Aktin ile hücre iskeleti organizasyonunun gösterilmesi. DAPI: Mavi (Çekirdek), Alexa Flour 488: Yeşil (β -Aktin). Ölçek çubuğu: 100 μ m.

Ek 3. *PLAGL2* Knock-out Hücrelerinin Filopodia Formasyonunun Falloidin ajanı ile İmmüno Floresan Yöntemiyle İncelenmesi



PLAGL2 knock-out klonlarda (C1 ve C48) falloidin ile filopodia organizasyonunun gösterilmesi. DAPI: Mavi (çekirdek), Alexa Flour 488: Yeşil (F-aktin). Ölçek çubuğu: 10 μ m.

ÖZGEÇMİŞ

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre
1. -	-	-

YABANCI DİL

İngilizce

UZMANLIK ALANI

İnsan Genetiği, Hücre Biyolojisi, Moleküler Biyoloji

YAYINLAR (SCI-E, ESCI)

1. Turkyilmaz SP, Duger K, Durukan I, Kilic AO, Baltacioglu E, Hakki S, Baran I, **Uzun U** (2023). *In vitro* investigation of the effect of different mouthwashes applied to restorative dental materials on adhesion of *Streptococcus* mutans. *Bezmialem Science* 11(4): 371-379.
2. Tüfekci EF, **Uzun U**, Sağlam Ertunga N, Biber A, Hıdıroğlu IA, Tekkılıç I, Altay B, Kılıc AO (2023). Investigation of antimicrobial activities and 16S rRNA sequences of actinomycetes isolated from karst caves in the eastern black sea region of Turkey. *KSU J. Agric Nat* 26(6): 1277-1290.
3. **Uzun U**, Yildirim Akatin M (2019). Immobilization and some application of α -Amylase purified from *Rhizoctonia Solani* AG-4 strain ZB-34. *Turk J Biochem* 44(3): 397-407.
4. **Uzun U**, Demirci E, Yildirim Akatin M (2018). Purification and characterization of *Rhizoctonia Solani* AG-4 strain ZB-34 α -Amylase produced by solid-state fermentation using corn bran. *Turk J Biochem* 43(3): 257-267.

YAYINLAR (DİĞER)

1. **Uzun U**, Dinçer T (2023). The analysis of the contribution of pleomorphic adenoma gene-like 2 (PLAGL2) on apoptosis in keratinocytes. *The Injector*, 2(3): 34-34.
2. Pektas S, Ozgumus OB, Durukan I, **Uzun U**, Karatas E, Kılıc AO (2023). Cloning, recombinant production and functional analysis of staphylococcal phage endolysins. *Farabi Med J* 2(2): 14-22.

HAKEMLİ KONGRELERDE SUNULAN BİLDİRİLER

1. **Uzun U***, Dinçer T (2023). The analysis of the contribution of pleomorphic adenoma gene-like 2 (PLAGL2) on apoptosis in keratinocytes. 18th National Medical Biology and Genetics Congress with International Participation, Ankara, Turkey, 26-29 October 2023, 134-134. *Oral presentation*
2. Yıldırım YE, Sahin ME, **Uzun U**, Ramoglu B* (2023). Investigation of the usability of carbon dots from broccoli leaves for bioimaging of HeLa cells. 12th National Molecular Biology and Biotechnology Congress, 7-9 October 2023, 21-21. *Oral presentation (Online)*
3. Ates M*, Sinim M, **Uzun U**, Kılıc A O, Ozgumus O, Pektas S (2022). Effect of TAD mutations on phosphorylation of p53 by DNA-PK. 5th International Eurasian Conference On Biological and Chemical Sciences, Ankara, Turkey, 23-25 November 2022, 337-337. *Oral presentation*
4. **Uzun U***, Dinçer T (2021). The function of pleomorphic adenoma gene-like 2 in human keratinocytes. 6th International Hippocrates Congress on Medical and Health Sciences, Elazığ, Turkey, 30 April-01 May 2021, 24-24. *Oral presentation (Online)*
5. **Uzun U**, Tufekci EF, Saglam Ertunga N, Biber A, Altay B, Tekkilic I, Tan K, Kilic AO* (2017). Antimicrobial effects of actinomycetes isolated from caves in the eastern black sea region of Turkey. 10th Balkan Congress of Microbiology, Sofia, Bulgaria, 16-18 November 2017, 146-146. *Poster presentation*
6. Ureyen UZ, Biber A, Altay B, Tekkilic I, Tan K, Tufekci EF, **Uzun U**, Saglam Ertunga N, Kilic AO* (2017). Microbial diversity of four caves in Turkey. 10th Balkan Congress of Microbiology, Sofia, Bulgaria, 16-18 November 2017, 375-375. *Poster presentation*

DAHİL OLUNAN PROJELER

1. Sezen FS (Yürütücü), Çoban Ö, Kılıç AO, Dinçer T, Engin S, Yıldırım S, **Uzun U**, Demirçi B, Eğin M (2024-Devam ediyor). Hedefe Özgü Pan-Kanser Terapiler (PAN-TER). TÜBİTAK 1004 Mükemmeliyet Merkezi Destek Programı. *Bursiyer*
2. Yıldız G (Yürütücü), Diner T, Karabulut S, **Uzun U** (2023-Devam ediyor). *LZTR1* Geninin Nakavt Edildiği ve Parental Hep3B Hücrelerinde Karşılaştırmalı RNA Dizileme Analizleriyle *LZTR1*'in Hepatoselüler Karsinomdaki Transkripsiyonel Etkilerinin Araştırılması, TÜSEB A Grubu Projesi. *Destek elemanı*

3. Sezen FS (Yürütücü), Renda G, Kaya Yaşar Y, Dinçer T, Engin S, Sevgi S, Gün E, Demir Öksüz Z, Serdaroğlu V, Ay İ, Kalha Z, Uzun U, Samancı YE (2022-Devam ediyor). Trabzon Kanaryaotu (*Senecio Ttrapezuntinus*) ve Allı Gelin (*Tchihatchewia Isatidea*) türlerinden izole edilen bileşiklerin ilaç etkin maddesi olabilme potansiyellerinin moleküler mekanizması ve deneysel hastalık modellerinde etkilerinin araştırılması. KTÜ İLAFAR (Karadeniz Teknik Üniversitesi İlaç ve Farmasötik Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi) ve DKMP (T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü (DKMP)) ortak Araştırma Projesi. Araştırmacı
4. Öksüz Demir Z (Yürütücü), Renda G, Sevgi S, Gün E, Dinçer T, Uzun U (2022-Devam ediyor). *Tchihatchewia Isatidea* ekstrelerinin *in vitro* psoriasis modeli olarak HaCaT keratinositleri üzerindeki etkilerinin incelenmesi. KTÜ BAP03 Başlangıç Destek Projesi, (Proje No: TDK-2021-10054). Araştırmacı
5. Taşdemir T (Yürütücü), Doğan ÜŞ, Buruk CK, Dinçer T, Uzun U (2022-2023). Dentin tübülleri içerisinde kolonize bakterilerin uzaklaştırılmasında beş farklı irrigasyon protokolünün etkinliği bir konfokal lazer çalışması. KTÜ BAP06 Lisansüstü Tez Projesi, Diş Hekimliğinde Uzmanlık Projesi (Proje No: TDK-2021-10057). Araştırmacı
6. Dinçer T (Yürütücü), Uzun U (2021-Devam ediyor). PLAGL2'nin CRISPR/Cas9 yöntemiyle susturulduğu HaCaT keratinosit hücre hattının karakterizasyonu. KTÜ BAP06 Lisansüstü Doktora Tez Projesi, (Proje No: TDK-2021-9752). Araştırmacı
7. Dinçer T (Yürütücü). Kalay E, Toraman B, Yıldız G, Güneş E, Uzun U (2019-2023). PLAGL2'nin epidermal farklılaşmadaki rolünün araştırılması. TUBİTAK-1001 Projesi (Proje No:118Z124). Destek elemanı
8. Sağlam Ertunga N (Yürütücü), Uzun U, Tüfekçi EF, Biber A, Altay B, Tekkiliç I, Tabbouche S, Kiliç AO (2016-2018). Doğu karadeniz bölgesindeki bazı mağaralardan bakteri ve mikroalg izolasyonu ve bu mikroorganizmaların antimikrobiyal madde üretimi yönünden araştırılması. KTÜ BAP01 Temel Araştırma Projesi (Proje No: FBA-2016-5481). Araştırmacı
9. Yıldırım Akatın M (Yürütücü), Uzun U (2015-2017). *Rhizoctonia Solani* AG4 ZB-34 α -amilazının katı faz fermentasyon tekniğiyle üretimi, saflaştırılması, immobilizasyonu ve çeşitli endüstriyel alanlardaki kullanılabilirliğinin incelenmesi. TUBİTAK 3001 Ar-Ge Destekleme Programı (Proje No:115Z109). Bursiyer

KURSLAR ve SERTİFİKALI EĞİTİMLER

1. **Cihaz Eğitimi** (2022). BMG LABTECH-SPECTROSTAR NANO mikropate okuyucu kullanımı eğitimi, Eğitim Sertifikası, İlaç ve Farmasötik Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (İLAFAR), Karadeniz Teknik Üniversitesi.
2. **Akademik Eğitim** (2022). Doktora eğitimi ve danışmanlık sempozyumu, Katılım Belgesi, Karadeniz Teknik Üniversitesi.
3. **Akademik Eğitim** (2022). Bilimsel bir makale nasıl yazılır ve yayımlanır eğitimi, Katılım Belgesi, TÜBİTAK/BİDEB 2237-A programı.
4. **Cihaz Eğitimi** (2022). LI-COR CLx Görüntüleme sistemi kullanım ve bakım eğitimi, Eğitim Sertifikası, İlaç ve Farmasötik Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (İLAFAR), Karadeniz Teknik Üniversitesi.
5. **Proje Yönetimi Eğitimi** (2021). Sağlık bilimleri alanında proje hazırlama eğitimi, Katılım Belgesi, Karadeniz Teknik Üniversitesi. TÜBİTAK 2237-B Proje Eğitimi Etkinliklerini Destekleme Programı
6. **Mesleki Kurs** (2019). Deneysel Çalışmalarda Hayvan Kullanımı Sertifikası Eğitim Programı, Eğitim Sertifikası, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK), Karadeniz Teknik Üniversitesi.
7. **Kalite Yönetimi Eğitimi** (2019). İyi Üretim Uygulamaları ve İyi Laboratuvar Uygulamaları (GMP-GLP) Gereklilikleri ve İç Denetim, Eğitim Sertifikası, İlaç ve Farmasötik Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (İLAFAR), Karadeniz Teknik Üniversitesi.
8. **Kalite Yönetimi Eğitimi** (2019). Deney ve kalibrasyon laboratuvarlarının yeterliliği için genel şartlar (ISO1725:2017) Gereklilikler ve İç Denetim, Eğitim Sertifikası, İlaç ve Farmasötik Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (İLAFAR), Karadeniz Teknik Üniversitesi.
9. **Kalite Yönetimi Eğitimi** (2019). Tıbbi Cihazlar Kalite Yönetim Sistemi (ISO13485:2016) Gereklilikleri ve İç Denetim, Eğitim Sertifikası, İlaç ve Farmasötik Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (İLAFAR), Karadeniz Teknik Üniversitesi.
10. **Kişisel Gelişim Eğitimi** (2012). Etkili iletişim beden dili ve imaj yönetimi, Katılım Belgesi, Karadeniz Teknik Üniversitesi.

BİLİMSEL KURULUŞLARA ÜYELİKLER

1. Türk Biyokimya Derneği, Türkiye, 2022-Halen

2. Tıbbi Biyoloji ve Genetik Derneği, Türkiye, 2021- Halen

BURSLAR

1. TÜBİTAK 2224-B Yurt İçi Bilimsel Etkinliklere Katılım Desteđi Programı Bursu, (2023/4).
2. TÜBİTAK BİDEB 2211-A, Genel Yurt İçi Doktora Bursu (2019-2023).
3. 100/2000 YÖK Doktora Projesi Bursu (2018-2022).
4. 10. Balkan Mikrobiyoloji Kongresi “Genç Bilim İnsanı Bursu” Sofya, Bulgaristan. (2017).



