

TEKNOFEST
HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ
BİYOTEKNOLOJİ İNOVASYON YARIŞMASI

PROJE DETAY RAPORU

ÜNİVERSİTE VE ÜZERİ SEVİYESİ SEVİYESİ FİKİR
KATEGORİSİ

TAKIM ADI

İstanbul Okmeydanı Gençlik Merkezi Biofuture

PROJE ADI

Somatik Hücrelerden Kök Hücre Üretimi

BAŞVURU ID

412307

İçindekiler

1. Proje Özeti.....	2
2. Problem/Sorun.....	3
3. Çözüm.....	3
3.1 Pluripotent özelliği sağlayan genler ve metilasyon durumları.....	3
3.2 Demetilasyon ve TET1 enzimi.....	5
3.3 CRISPR/Cas9 ile demetilasyon.....	6
4. Yöntem.....	7
4.1 Hücrelerin Eldesi.....	7
4.2 Fibroblast Hücrelerin Kültürü.....	7
4.3 guideRNA'nın Tasarlanması ve Plazmide Klonlanması.....	7
4.4 sgRNA+dCas9 Kompleksinin Fibroblastlara Aktarımı.....	8
4.5 Demetilasyonun Kontrolü.....	8
5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü.....	8
6. Uygulanabilirlik.....	9
7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması.....	9
8. Proje Fikrinin Hedef Kitle (Kullanıcılar)	10
9. Riskler.....	10
10. Kaynaklar	10

1. Proje Özeti (Proje Tanımı)

Projemiz biyoteknolojinin birçok farklı alanında kullanılmakta olan insan kök hücrelerini, demetilasyon yoluyla elde etmeyi amaçlamaktadır. Kök hücreler; özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilen ve kendini yenileme yeteneği olan hücrelerdir. Kök hücre tedavisi ve ilaç endüstrisi gibi alanlarda önem taşıyan kök hücreler; eldesi, etik tartışmaları, standart uygulama prosedürleri açısından bazı sıkıntılara sebep olmaktadır. Bu nedenle yetişkin somatik hücrelerden kök hücre programlanması için farklı teknikler üstünde çalışılmaktadır. Bu proje, kök hücre metilasyon modelinin olgun hücrelerle olan farkından yararlanmaktadır. Olgunlaşmış doku hücrelerinin bazı genleri metilasyon durumu bakımından kök hücrelerle farklılık gösterir. Bu metilasyon, dokunun farklılaşmasına sebep olur. Biz projemizde CRISPR/Cas9 sistemini belli genlerin metilasyonunu kaldırmak için, TET enzimi ile bağlayarak kullanmayı hedeflemekteyiz. Dizisini bildiğimiz bu genleri dCas9 ve kılavuz RNA (sgRNA) yardımıyla doğrudan hedefleyip o bölgeye TET1 enzimi ile müdahale ederek genin susturulmasına neden olan metilasyonu kaldırmayı planlamaktayız. Bu yöntem sayesinde gen dizilimine müdahale edilmeden sadece gen ifadesi değiştirilmiş olur. Bunun sonucu olarak zaman içinde farklılaşmış ve pluripotent özelliğini kaybetmiş insan somatik hücrelerine tekrardan kök hücre özelliği kazandırmayı amaçlamaktayız. Embriyonik kök hücre alternatifi olarak görülen bu metot; doku/organ onarımı, ilaç endüstrisi ve klinik çalışmalarda kullanılacak yenilikçi bir uygulamadır.

2. Problem/Sorun

21. yüzyılda değişen çevre koşulları, ilerleyen yaş, yenilenen beslenme alışkanlıkları ve çeşitli yaşam tarzları gibi birçok etmen sebebiyle farklı hastalıklarla karşı karşıya kalmaktayız. İnsanoğlu ise var olduğundan beri yaptığı gibi bu hastalıklara çözüm için tedavi yöntemleri bulmaya çalışmaktadır. Özellikle son yıllarda hücresel uygulamalardaki yenilikler, biyoteknoloji ve tıp alanındaki tedavi yöntemleri, bu yolda emin adımlarla yürüyor olduğumuzun kanıtları. Bu teknolojiler günümüzdeki birçok sağlık sorununun çözümünde kullanılıyor olsa da doku ve organ hasarlarının tedavisi, ilaç geliştirme ve canlıların biyolojisini daha iyi anlama konusundaki en önemli alanlardan biri kök hücre araştırmalarıdır.

Hâlihazırda özelleşmiş; hücreler arasında bulunan embriyonik olmayan kök hücreler dokuyu tamir edip bütünlüğü sağlamakla görevlidirler ancak bu hücreler başka dokular üretmek için kullanılamamaktadır. Dolayısıyla embriyonik kök hücrelerin pluripotent özelliğe sahip olması bizim için bir avantaj. Pluripotent hücreler neredeyse bütün hücre tiplerine farklılaşabilir. Kök hücrelerin bu fonksiyonu hücresel tedavilerde benzersiz bir fırsat sağlamaktadır fakat embriyonik kök hücre kullanımı konusunda etik tartışmalar mevcut. Bireyler arası kök hücre aktarımında uyumsuzluk sıkıntıları yaşanabilir. Bireyin kendi embriyosunun kullanılması için ise embriyonik kök hücrenin uzun yıllar boyunca muhafaza edilmesi gerekmekte ve oldukça maliyetli olmaktadır. Bu sebeple farklı çözümler gerekmektedir. Olgun kök hücre kullanımının bir opsiyon olmasına karşın eldesi zordur, farklılaşma potansiyeli düşüktür ve belirli prosedürlerden geçmelidir.

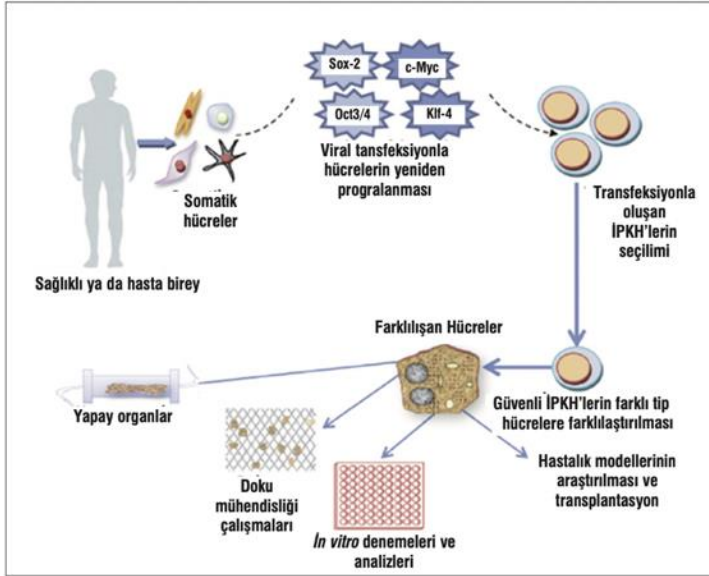
Organ hasarları için kök hücre tedavisinin yanı sıra organ nakli de uygulanmaktadır. Ancak organ nakillerinde genomik uyumsuzluk kaynaklı doku uyumsuzlukları söz konusu olmaktadır ki bu durumda alıcının immün saldırısı ile vücut yeni organı reddetmektedir. Ayrıca donör organ azlığı ve hukuki ve etik engellerin varlığı da bu yöntemi daha az avantajlı hale getirmektedir. Klinik çalışmalarda da kök hücre ihtiyacı olmasından ötürü, yapacağımız çalışma gelecekteki bilimsel araştırmalara zemin hazırlayabilir.

3. Çözüm

3.1 Pluripotent özelliği sağlayan genler ve metilasyon durumları

Pluripotent özellik, organizmanın bütün dokularındaki hücreleri oluşturabilme özelliğidir ve sadece embriyonik kök hücre (EKH)'ler bu özelliğe sahiptir. Somatik hücreler, çeşitli epigenetik mekanizmalar sonucunda pluripotent özelliklerini kaybedmektedir [1,2].

İlk olarak 2006 yılında Takahashi ve Yamanaka isimli araştırmacıların çalışmaları ile somatik bir hücreye gen aktarılması sonucu pluripotent özellikte hücreler elde edilmiştir ve bu hücrelere indüklenmiş pluripotent kök hücre (İPKH) adı verilmiştir. EKH'lerde karakteristik olan üç germ tabakasına ait hücrelere farklılaşabilme potansiyeli İPKH'lerde de bulunmaktadır. İPKH'lerin eldesinde somatik hücrenin yeniden programlanarak pluripotent özellikte bir hücreye dönüşmesi söz konusudur. Hücrelerin yeniden programlanması çeşitli yollarla olmaktadır. Bunlar; hücre füzyonu, somatik hücre çekirdek aktarımı ve gen aktarımıdır. Takahashi ve Yamanaka yapılan çalışmada, pluripotent özelliği sağladığı düşünülen 24 adet gen tanımlanmış ve bu genlerden Oct 3/4, Sox2, c-Myc ve Klf4'ün pluripotent özelliğin sağlanmasında yeterli olduğu gözlemlenmiştir [3,4].



Şekil 1. İndüklenmiş pluripotent kök hücrelerin oluşturulması ve kullanım alanları.

Oct $\frac{3}{4}$: DNA'da ATTTGCAT oktomerini tanıma özelliği olan oktomer bağlanma transkripsiyon faktörüdür. Embriyonun iç hücre kitlesi hücrelerinin gelişimi için gereklidir. Bu faktörün düşük seviyede ifade edilmesiyle hücreler pluripotent özellikte kalmakta ve farklılaşma olmamasına; 2 kat artışla ifadesinde hücrelerin primitif endoderm ve mezoderm yönünde farklılaşmasına; ifadesinin baskılanması durumunda ise hücrelerin pluripotent özelliğini kaybedip tropoekdoderm yönünde farklılaşmasına neden olmaktadır [5].

Sox2: SRY ilişkili, DNA'da küçük oluğa bağlanan transkripsiyon faktörleri ailesindedir. EKH'lerin kendi kendini yenileme özelliği için gereklidir. İfadesinin baskılanması durumunda embriyo gelişiminde epiblast oluşumunda sorun olduğundan embriyolar yok olur. Yapılan araştırmalarda Sox2 ve Oct $\frac{3}{4}$ birbirinin ifadesini etkileyerek kök hücrelerin pluripotent özelliğini etkiledikleri gösterilmiştir. c-Myc; tümörlerde yüksek aktivasyona sahip bir onkogendir. Histon asetilasyonunda rol aldığı için kromatin yapısının düzenlenmesinde etkilidir. EKH'ler de kendi kendini yenileme ve pluripotent özelliğin devamı için gerekli bir faktördür [3].

Klf4: epitelden bağırsağa, böbrek ve deriye kadar birçok dokuda bulunan bir transkripsiyon faktörüdür. Yüksek seviyede ifade edildiğinde hücrenin G1-S fazında kalmasını sağlar. EKH'lerin kendi kendini yenileme özelliği için gerekli bir faktördür.

Nanog: İPKH'ler programlanmasında kullanılan diğer transkripsiyon faktörleridir. Nanog EKH'lerde kök hücre olarak kalma özelliğini ve pluripotent özelliğini etkileyen önemli bir faktördür. Yapılan çalışmalarda Nanog geni hasarlı EKH'lerin kendi kendini yenileme özelliğini kaybettiği ve ekstraembriyonik doku hücrelerine farklılaştığı görülmüştür [5].

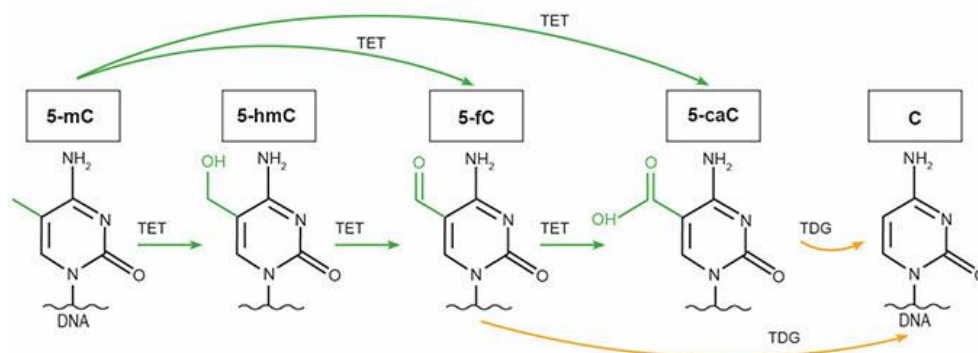
Bütün bu transkripsiyon faktörleri bir hücrenin pluripotent özelliğe sahip olması için yeterli olan faktörlerdir. Fibroblast gibi somatik bir hücrenin bu genleri ifade etmesi pluripotent hücre yönünde programlandığını göstermektedir. Ayrıca c-Myc'nin bir onkogen olması nedeniyle bazı çalışmalarda c-Myc geni aktarılmadan hücrelerin farklılaştırılması yönünde çalışmalar da yapılmıştır.

3.2 Demetilasyon ve TET1 enzimi

Genler sıklıkla hipermetilasyon tarafından sessizleştirilirler, demetilasyonla aktifleşirler. Metilasyon gen ifadesini ve hücre fonksiyonlarını değiştirerek DNA metiltransferaz (DNMT) katalizinde, bir metil grubunun kovalent şekilde, bir CpG dinükleotidindeki sitozinin 5'karbonuna eklenmesini ifade eden epigenetik bir olaydır. DNMT S-adenosil-metioninden bir metil grubunun sitozin rezidülerine transferini katalizler. Böylelikle sitozin, 5'metilsitozin haline gelir ve bu modifiye baz en çok genomdaki CpG alanlarında bulunur. Bu alanlar genomda yüksek bir sıklıkta bulunursa CpG adacıkları olarak adlandırılır. Paternal ya da maternal kromozomlardaki spesifik genlerden yalnız birinin ifade olması anlamına gelen genomik imprinting(baskılama)'de DNA metilasyonunu içermektedir. İmprinting genleri ayrıcalıklı olarak ana-babasal kopyalarından yalnızca biri tarafından ifade olurlar. Konak memeli hücrelerinin genomuna birleştirilen viral DNA'nın metilasyon tarafından inaktivasyona uğratılması, bu yöntemin enfeksiyon ajanlarına karşı bir koruma mekanizması olarak görev aldığını da göstermektedir [6].

DNA metilasyon ve demetilasyonu DNA replikasyonunun ve DNA transkripsiyonunun başlatılmaması, DNA tamiri, mutagenesis, ikili sarmal DNA stabilitesinin sağlanması, lokal mutasyon oranının artırılması, nükleer parçalanmanın engellenmesi, kromozom paketlenmesi, hücre farklılaşması, X-kromozom inaktivasyonu, gen ekspresyonu, yaşlanma, tümör baskılayıcı gen inaktivasyonu ve proto-onkogen aktivasyonu aracılı onkogenezis, genomun aktif gen ya da kondanse bölgeler şeklinde yapılması ve yerleşimi ile apoptoziste etkin rol almaktadır [6].

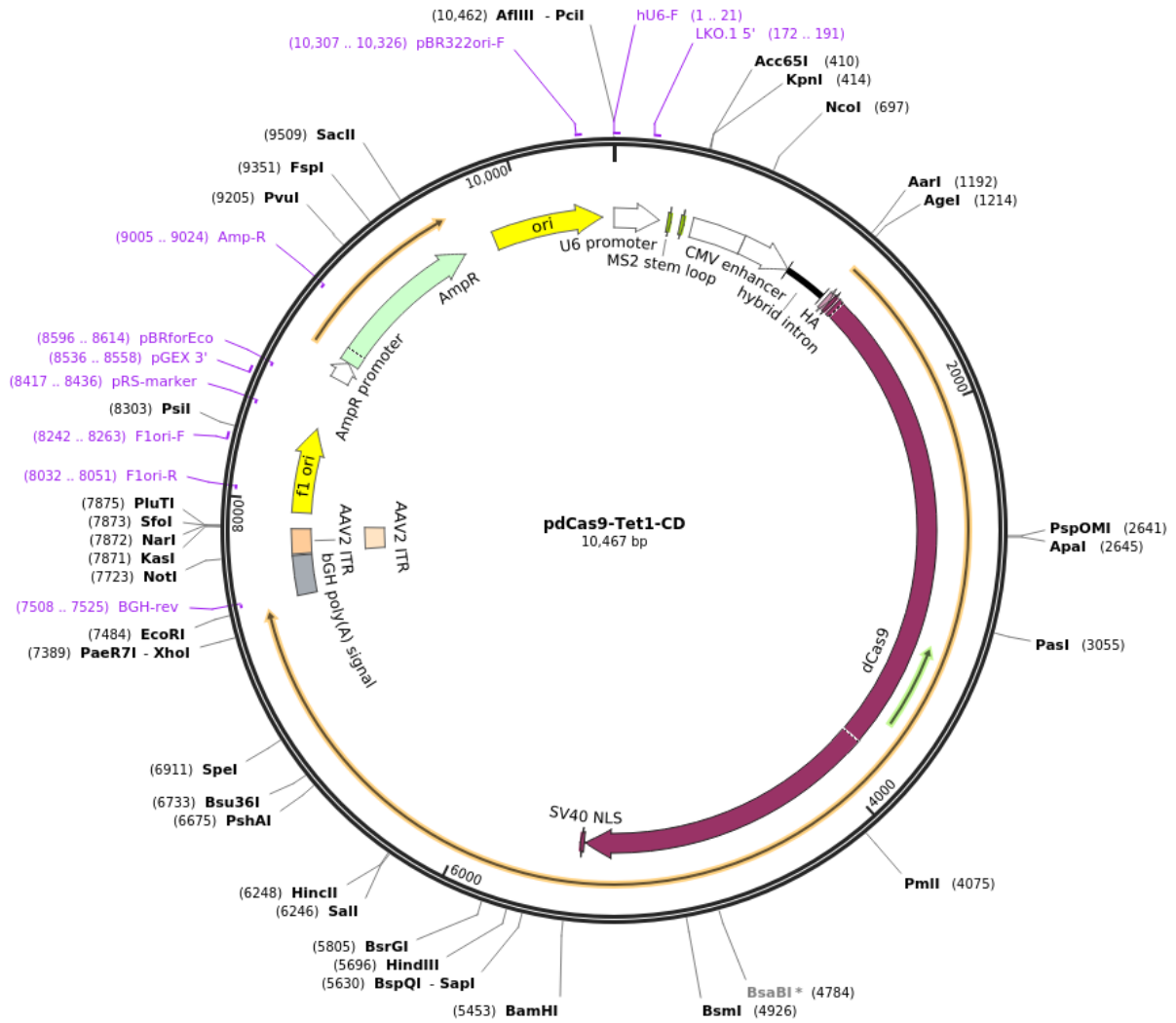
Bir başka epigenetik modifikasyon olan DNA metilasyonu, hücreler farklılaştıkça Oct4 ve Nanog dahil olmak üzere anahtar pluripotens genlerinin susturulmasında önemli bir rol oynar. Pluripotens genlerinin promotör bölgeleri, ES hücrelerinde demetillenir, ancak fibroblastlarda kuvvetli bir şekilde metillenir. Sadık bir şekilde yeniden programlanmış iPS hücrelerinde bu promotörler içinde DNA metilasyonunun olmaması, yeniden programlama sırasında, indüklenmiş pluripotensinin kurulmasına izin vermek için bu baskılayıcı işaretin silinmesi gerektiğini kuvvetle önerir [6].



Şekil 2. TET enziminin demetilasyon mekanizması.

3.3 CRISPR/Cas9 ile demetilasyon

Kullanılacak olan plazmid Ronggui Hu'nun laboratuvarında pX330 plazmidine yapılan eklemeler ile tasarlanmıştır. Cas9, D10A ve H840A mutasyonlarına maruz bırakılarak deadCas9 (dCas9) oluşturulmuştur. dCas9 domaini ve TET1-CD'nin (catalytic domain) bağlanması linker yardımıyla mümkün olmuştur. Bu plazmid, bakterilerin içinde agar besiyerinde olmak üzere hazır bir şekilde temin edilebilmektedir. Spesifik guideRNA dizilim bilgisi plazmidin digestion bölümünden kesim yapılarak plazmide dahil edilir ve böylelikle hücre içerisinde yalnızca hedeflenen genlerde işlem yapmak üzere gRNA-dCas9 kompleksi oluşturulur. Bu memeli ekspresyon vektörünün istenilen hücreye bir sgRNA ile beraber aktarılması durumunda, Cas9 hücrede hali hazırda üretilmiş olan TET1 enzimiyle birleşir ve sgRNA sayesinde istenilen bölgedeki metilasyonlar enzim yardımıyla kaldırılır [7].



Şekil 3. dCas9-Tet1-CD plazmidi

4. Yöntem

4.1 Hücrelerin Eldesi

Fibroblastlar, hayvanlardaki bağ dokusundaki en temel hücre tipleridir. Kolayca erişilebilir olmaları ve kök hücre benzeri bazı özelliklere sahip olmaları sebebiyle çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Hastalık modellemesi ve hücre yeniden programlanmasında sıklıkla tercih edilen bu hücrelerin eldesi, kültürü ve in-vitro olarak korunması kolayca sağlanmaktadır. Bu nedenle indüklenmiş pluripotent kök hücre üretiminde (iPSC) kullanılabilir. [8,9]

Fibroblastlar, hastanın lokal anestezisi altında gerçekleşen yüzeysel bir cilt biyopsisi prosedürü ile elde edilir. Hastanın rızası ile kulak arkasından yaklaşık 0,3 cm² büyüklüğünde deri parçası örneği alınır. Alınan örneğin etrafındaki yağ doku ve deri altı doku ayrılır ve sadece dermis ve epidermis doku elde edilir. Elde edilen deri, içinde Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) ve Antibiotic-Antimycotic solüsyonu bulunan tüpe konulara buz üzerinde laboratuvara taşınır [8].

4.2 Fibroblast Hücrelerin Kültürü

Deri örneği DMEM/F12 içeren fosfat tamponlu salin çözeltisi ile 3 defa yıkanır. Daha sonra örnek DMEM/F12, %10 Fetal Bovine Serum, l-glutamin, MEM NEAA, Antibiotic-Antimycotic içeren kültür kaplarına aktarılır ve 37°C sıcaklıkta ve %5 CO₂ atmosferinde bir inkübatörde tutulur. 1 hafta sonra, eksplant kültürlerinin besiyeri 2-3 günde bir değiştirilir. 2-3 hafta sonunda yeterli hücre sayısına ulaşılır [8].

4.3 sgRNA'nın Tasarlanması ve Plazmide Klonlanması

Belirlenen genlerin (SOX2, NANOG, OCT4 vb.), metilasyon modelini kaldırmak için kullanılacak olan enzim (TET) ökaryot hücrelerde hali hazırda katalitik aktivite gösteren enzimdir. Ancak bu enzimin yalnızca istediğimiz genlere spesifik aktivite göstermesi için modifikasyonlar gerekmektedir. Bu modifikasyonlar sgRNA tasarımı ile gerçekleştirilecektir. Belirlenen genlere spesifik sgRNA üretimi ile TET enzimi kombine olacak ve yalnızca istenilen gen bölgelerindeki metilasyon paterni ortadan kaldırılacaktır. Planlanan sgRNA Tasarımı 3 adımda gerçekleşecektir.

İlk adım: Hedeflenen genlerdeki PAM dizilerinin konumu belirlenir.

```
GTT GGG GGG AGG GGT CGG CAA TTG AAC CGG TGC CTA GAG AAG GTG GCG CGG
CAA CCC CCC TCC CCA GCC GTT AAC TTG GCC ACG GAT CTC TTC CAC CGC GCC
PAM
```

İkinci adım: PAM dizisi belirlenen hedef genin 3'-5' ipliğinde PAM dizisi dahil edilmeden 5' ucundan başlanarak yaklaşık 20 nükleotid olmak üzere 3' ucuna doğru geriye sayılır.

```
GTT GGG GGG AGG GGT CGG CAA TTG AAC CGG TGC CTA GAG AAG GTG GCT CGG
CAA CCC CCC TCC CCA GCC GTT AAC TTG GCC ACG GAT CTC TTC CAC CGC GCC
PAM
```

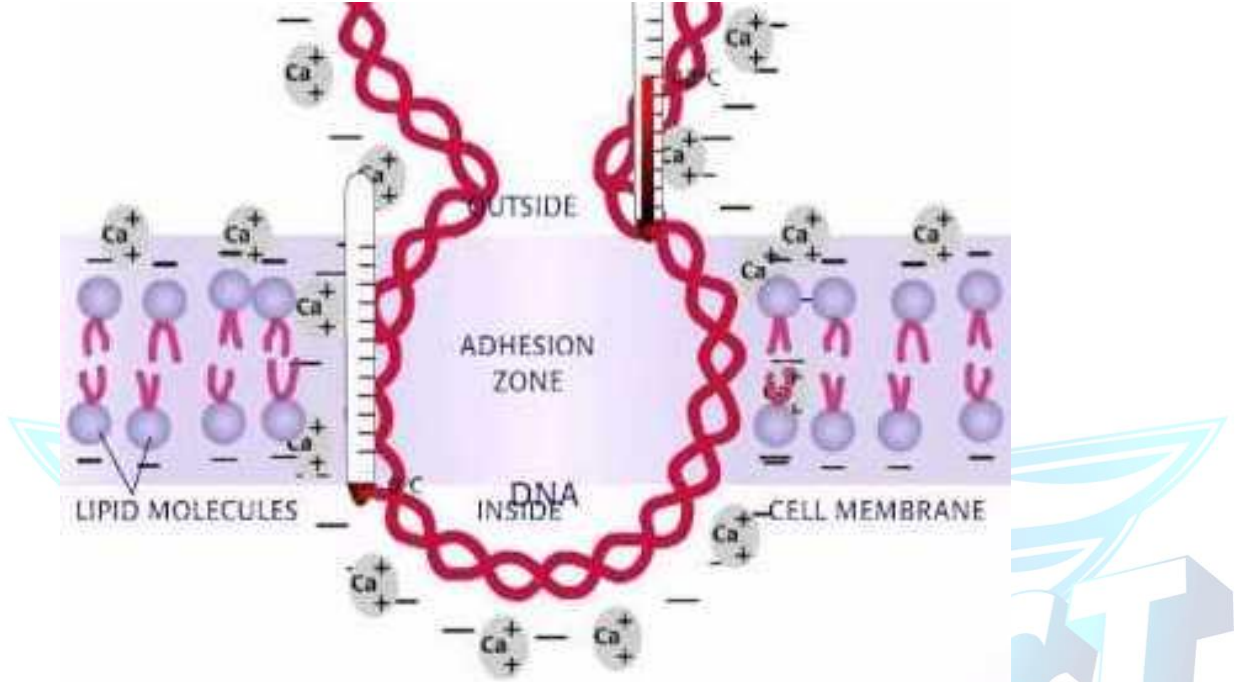
Üçüncü adım: sgRNA dizilimi belirlenir.

```
GTT GGG GGG AGG GGT CGG CAA TTG AAC CGG TGC CTA GAG AAG GTG GCG CGG
CAA CCC CCC TCC CCA GCC GTT AAC TTG GCC ACG GAT CTC TTC CAC CGC GCC
PAM
5' G AAC CGG TGC CTA GAG AAG G
```

Plazmitin BbSI hedef bölgesi ilgili enzimle kesilir ve tasarlanan guideRNA bu bölüme eklenir.

4.4 sgRNA+dCas9 Kompleksinin Fibroblastlara Aktarımı

İzole edilen plazmidler fibroblastların içine aktarılır. Normal şartlarda, hücre zarı ve plazmid DNA'nın yapısının negatif yükleri nedeniyle hücre içine DNA'nın geçişi gerçekleşemez. Bu geçişin sağlanabilmesi için CaCl₂ transformasyonu yöntemi kullanılır. Fosfolipit zincirin daha stabil durması için hücre düşük sıcaklıkta tutulurken ortama CaCl₂ eklenir. Ca⁺² iyonu, negatif yüklü fosfolipitler ve DNA'nın dış yüzü ile etkileşime girerek daha nötr bir ortam oluşturur. Bu kimyasal işlem ardından ısı şoku yapılarak iyonik bariyerin kırılması ve plazmid DNA'nın genişleyen porlardan geçebilmesi sağlanır [9].



Şekil 4. CaCl₂ transformasyon yöntemi

4.5 Demetilasyonun Kontrolü

Tüm işlemlerden sonra istenilen bölgelerde demetilasyon gerçekleştiğinden emin olmak için metilasyon analizi yapılır. DNA'nın metilasyon durumunu belirlemek için sodyum bisüfit muamelesi sıkça kullanılmaktadır. Bu yöntemle DNA'daki metillenmemiş sitozinler kimyasal reaksiyonla urasile dönüşür. Ardından DNA, PCR ile amplifiye edilir. Durumu merak edilen CpG konumu ile örtüşen primerler kullanılarak bu bölgelerin metilasyon statüsü belirlenir. Sekanslama esnasında urasile dönüştürülen metillenmemiş sitozinler timin olarak, metillenmiş sitozinler ise sitozin olarak ölçülür [10].

5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü

Yapılan literatür taramalarında bizim tespit ettiğimiz genlerdeki metilasyonların geri alınmasıyla kök hücre eldesine rastlanmamıştır. CRISPR uygulamaları oldukça yeni olduğundan ötürü bu yöntem kullanılarak yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Özellikle de kök hücre bazında yapılan araştırmaların miktarı oldukça kısıtlıdır. Projemizde bireye ve dokuya özgü kök hücre tedavisi imkanı sunulması hedeflenmektedir. Bu sayede kök hücreleri kordon kanından alarak saklama ihtiyacı ortadan kalkacak ve kordon kanı saklanmamış bireylerde de ileri farklılaşma yeteneğine sahip kök hücreler elde edilebilecektir.

6. Uygulanabilirlik

Projede kullanılacak hücre örneğinin eldesi için faydalanılacak deri biyopsisi yöntemi risk azlığı, vücudun birkaç farklı yerinden yapılabilmesi, kişiye zarar vermeden, ağrısız kısa süreli iyileşme sağlanabilen ve sıkça uygulanan bir yöntem olması açısından kullanışlıdır. Fibroblastlar kök hücre araştırmaları kapsamında çalışmaya elverişlidir. Ayrıca laboratuvar ortamında kolayca saklanabilmektedir. Birçok şirket tarafından bakterinin içine yerleştirilerek satılan memeli ekspresyon vektörünün kullanımı kolaydır ve düşük bir maliyetle satın alınabilmektedir. Projede uygulanacak plazmid ve CRISPR kompleksinin hücreye aktarılması hücrede değişiklik yapılması planındaki aşamalar bilinen ve halihazırda araştırmacılar tarafından kullanılan yöntemler olması açısından başarısı yüksek protokollerle gerçekleştirilebilir. Gerekli araştırma, deneme ve üretim aşamalarının olumlu sonuçlanması halinde proje ticari bir ürüne dönüştürülebilecektir.

7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması

Zaman Çizelgesi

	1. Ay	2. Ay	3. Ay	4. Ay
Aşamalar	Plazmid siparişi	Vektörlerin kültürü	sgRNA'nın tasarlanması	Hücrelerin kültürü
	Deri biyopsisi	Fibroblast kültürü	sgRNA'nın plazmide aktarımı	Plazmid kontrolü (Antibiyotik testi)
			Plazmid izolasyonu ve transfeksiyon	Metilasyon analizi+PCR

Tahmini Maliyet:

İşlem/Malzemeler	Tahmini Maliyet
Deri biyopsisi ve fibroblast kültürü	1000
Plazmid	1200
sgRNA üretimi	3000
Plazmid transfeksiyonu	3800
Metilasyon analizi	3800
Toplam	12800

8. Proje Fikrinin Hedef Kitle (Kullanıcılar)

Gerçekleştirmeyi tasarladığımız kök hücre temini yöntemi ile bilimsel faaliyetler hız kazanacak ve kolaylaşacaktır. Bilim insanları laboratuvarlarda yaptıkları deneylerden daha sağlıklı, gerçekçi ve hızlı sonuçlar elde etmek için yararlanabilir. Özellikle kitlesel can kayıpları ve olumsuzluklara sebep olan hastalıklara efektif ve inovatif çözümlerin bulunabilmesi için eşi bulunmaz bir zemin hazırlayabilir. Kanser ve daha birçok hastalığın tedavisinde gerekli ilaçların geliştirilmesi, temini ve çeşitlendirilmesine olanak sunar. Dokusal zedelenmeler veya ameliyatlardan sonraki bireylerin doku nakli ihtiyacını, bekleme sıraları, doku uyumsuzlukları ve zaman kaybı gibi olumsuz parametrelerden bağımsız bir şekilde giderilmesine imkân tanır.

9. Riskler

Projemizdeki süreçlerden biri olan plazmidin hücreye aktarımındaki hata oranı göz ardı edilmemelidir. Dolayısıyla plazmidin başarıyla hücreye aktarıldığını anlamak için ortama plazmidin direnç genine sahip olduğu antibiyotik (dCas9-Tet1-CD için bu ampisilindir.) verilir. Hücrelerin hayatta kalma durumu, plazmidin doğru şekilde hücreye aktarıldığı anlamına gelir. Aksi halde işlem tekrarlanabilir.

Tüm işlemler sonucunda hücrelerin demetile olmuş bölgelerinin zaman içinde tekrar metillenmesi gözlemlenebilir. Bunun engellenmesi için hücrelerin dondurularak saklanması ve ihtiyaç halinde tekrar çözülmesi gerekebilir.

Histonların sıkıca paketlenmesine bağlı olarak istenen demetilasyon miktarı tüm potansiyeline ulaşamayabilir. Bu durumda histon asetilasyonu yapılarak histonlar gevşetilebilir ve genlerin ekspresyonu artırılır, demetilasyonun gerçekleşmesi kolaylaşır. Histon asetilasyonu için p300 enzimini yönlendirecek bir CRISPR Cas9 kompleksi daha kullanılabilir.

10. Kaynaklar

- [1] Sevim, H., & Gulpinar, O. A. (2011). Induced Pluripotent Stem Cells And Their Applications. Marmara Medical Journal. <https://doi.org/10.5472/mmj.2011.01922.1>
- [2] Iskender, B., & Canatan, H. (2013). Induced pluripotent stem cells and cell therapy. Journal of Clinical and Experimental Investigations, 4(4). <https://doi.org/10.5799/ahinjs.01.2013.04.0346>
- [3] Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. Cell, 131(5), 861–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
- [4] Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. Cell, 126(4), 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- [5] Schmidt, R., & Plath, K. (2012). The roles of the reprogramming factors Oct4, Sox2 and Klf4 in resetting the somatic cell epigenome during induced pluripotent stem cell generation. Genome Biology, 13(10), 251. <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-10-251>

- [6] *Kalıtımın Epigenetik Boyutunda DNA Metilasyon Desenleri*. (2015). ResearchGate. https://www.researchgate.net/publication/325895660_Kalıtımın_Epigenetik_Boyutunda_DNA_Metilasyon_Desenleri
- [7] Xu, X., Tao, Y., Gao, X., Zhang, L., Li, X., Zou, W., Ruan, K., Wang, F., Xu, G. L., & Hu, R. (2016). A CRISPR-based approach for targeted DNA demethylation. *Cell Discovery*, 2(1). <https://doi.org/10.1038/celldisc.2016.9>
- [8] Rieske, P., Krynska, B., & Azizi, S. A. (2005). Human fibroblast-derived cell lines have characteristics of embryonic stem cells and cells of neuro-ectodermal origin. *Differentiation*, 73(9–10), 474–483. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2005.00050.x>
- [9] Fernandes, I. R., Russo, F. B., Pignatari, G. C., Evangelinellis, M. M., Tavolari, S., Muotri, A. R., & Beltrão-Braga, P. C. B. (2014). Fibroblast sources: Where can we get them? *Cytotechnology*, 68(2), 223–228. <https://doi.org/10.1007/s10616-014-9771-7>
- [10] Asif A., Mohsin H., Tanvir R., Rehman Y. (2017). Revisiting the Mechanisms Involved in Calcium Chloride Induced Bacterial Transformation. 10.3389/fmicb.2017.02169.
- [11] Li, Y., & Tollefsbol, T. O. (2011). DNA Methylation Detection: Bisulfite Genomic Sequencing Analysis. *Methods in Molecular Biology*, 11–21. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-316-5_2

