

**T.C  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TGFBI GENİNDE GENOM DÜZENLEME TEKNİĞİ İLE  
OLUŞTURULAN VARYASYONLARIN ZEBRA BALIĞI  
KORNEASINDAKİ FENOTİPİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**Dr. Fulya YAYLACIOĞLU TUNCA Y**

**Tıbbi Biyoloji Programı  
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA  
2019**



**T.C  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TGFBI GENİNDE GENOM DÜZENLEME TEKNİĞİ İLE  
OLUŞTURULAN VARYASYONLARIN ZEBRA BALIĞI  
KORNEASINDAKİ FENOTİPİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**Dr. Fulya YAYLACIOĞLU TUNCAY**

**Tıbbi Biyoloji Programı  
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Pervin Rukiye Dinçer**

**ANKARA  
2019**

## ONAY SAYFASI

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ

**Tgfb Geninde Genom Düzenleme Tekniği ile Oluşturulan  
Varyasyonların Zebra Balığı Korneasındaki Fenotipik Etkilerinin  
İncelenmesi**

Fulya Yaylacioğlu Tuncay

Danışman: Prof. Dr. Pervin Rukiye Dinçer

Bu tez çalışması 02/09/2019 tarihinde jürimiz tarafından "Tıbbi Biyoloj Programı"nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

**Jüri Başkanı:** Prof. Dr. Rıza Köksal Özgül  
Hacettepe Üniversitesi

**Üye:** Prof. Dr. Fikret Rüştü Akata  
Gazi Üniversitesi

**Üye:** Prof. Dr. Hayat Yurter  
Hacettepe Üniversitesi

**Üye:** Prof. Dr. Şengül Özdek  
Gazi Üniversitesi

**Üye:** Dr. Öğr. Üyesi Beril Talim  
Hacettepe Üniversitesi







Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

03 Eylül 2019



Prof. Dr. Diclehan ORHAN

Enstitü Müdürü



## YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. <sup>(1)</sup>
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. <sup>(2)</sup>
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. <sup>(3)</sup>

19 / 08 / 2019

(İmza)

Öğrencinin Adı SOYADI

Fulya Yayla Cioğlu Tuncay

<sup>1</sup>“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulgular içeren tezler hakkında tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir \*. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlerle ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.
- Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

\* Tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.**

## ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Tez Danışmanının Prof. Dr. Pervin Rukiye Dinçer danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Dr. Fulya Yaylacıoğlu Tuncay



## TEŞEKKÜR

Genetik bilimine duyduğum yoğun ilgi nedeniyle başladığım MD-PhD programının ilk günlerinden beri elimden tutan, bana yol gösteren, cesaret veren ve her zaman destek olan değerli hocam ve danışmanım Prof. Dr. Pervin Rukiye Dinçer'e;

Tezin her aşamasında değerli fikirleriyle katkı sağlayan değerli hocalarım Prof.Dr. Rıza Köksal Özgül'e ve Prof. Dr. Fikret Akata'ya;

Göz hastalıkları ihtisasım sırasında kalıtsal hastalıklara olan ilgimi değerlendirmeme fırsat veren, beni bu konuda teşvik eden ve desteğini hep arkamda hissettiğim kıymetli hocam Prof. Dr. Şengül Özdek'e,

Zebra balıklarında gözün histolojik kesitlerini incelerken aynı zamanda beni bilim insanı olmanın incelikleriyle buluşturan, karşıma çıkan engellerde yılmadan devam etmemi öğütleyen değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Beril Talim'e,

Tez savunma sınavımdaki değerli jüri üyesi hocalarım Prof. Dr. Hayat Yurter'e, Dr. Öğr. Üyesi Gamze Bora'ya, Doç. Dr. Özlen Konu'ya;

Tezimin genom düzenleme araçları ile *knock in* oluşturma aşamasında sağladığı önemli katkılar için Dr. Adife Gülhan Ercan Şençicek'e ve Dr. Kaya Bilguvar'a;

Doktora eğitimim ve öncesinde desteklerini hep hissettiğim Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan tüm değerli hocalarıma;

Laboratuvarda çalışmayı ve veri tartışmayı eğlenceli hale getiren, takıldığım her noktada bana yardımcı olan sevgili grup arkadaşlarım Gülsüm Kayman Kürekçi'ye, Ecem Kural Mangıt'a, Şeyda Ünsal'a, Zeynep Çınar'a ve Dr. Sezen Güntekin Ergün'e;

Bu tezin gerçekleştirildiği Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı bünyesindeki tüm çalışanlara ve sevgili çalışma arkadaşlarıma;

Destekleriyle her zaman yanımda olduklarını hissettiren, bana yol gösteren ve her zaman başaracağıma inanan biricik annem, babam ve kardeşime;

Hayat arkadaşım, sevgili eşim Oktay'a ve canım oğlum Ata Toprak'a;

En içten duygularla teşekkür ederim.

## ÖZET

**YAYLACIOĞLU TUNCAY F. TGFBI Geninde Genom Düzenleme Tekniği ile Oluşturulan Varyasyonların Zebra Balığı Korneasındaki Fenotipik Etkilerinin İncelenmesi. Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2019.** TGFBI-ilişkili kornea distrofileri, bu gende meydana gelen yanlış anlamlı mutasyonlar sonucu oluşan protein ürününün amiloid ya da hiyalin yapıda korneada birikmesiyle ortaya çıkan kalıtsal bir hastalık grubudur. TGFBI geni zebra balığında tek kopya olarak bulunmakta olup protein dizisi insandaki ortoloğu ile %65 homolojiye sahiptir. Bu genin protein ürünü (TGFBIp) zebra balığı korneasında gösterilmiştir. TGFBI'da 124. amino asit olan arjinini kodlayan kodon bu hastalık grubunda en sık bildirilen mutasyon bölgelerinden biridir. 124. arjinin amino asidi zebra balığında da korunmuştur. Bu verilerden yola çıkarak tez kapsamında zebra balığında *tgfb1*'de hedefteki arjinin rezidüsünü kodlayan bölgede TALEN ya da CRISPR/Cas9 genom düzenleme araçlarını kullanarak *in frame* değişiklik yapmayı amaçladık. *Tgfb1*'de hedef bölgedeki değişiklik homolog olmayan uç birleştirme tamir mekanizması ile oluşturulmuş olup hedef arjinin amino asidini ortadan kaldıracak şekilde p. Ser115\_Arg117delinsLeu (c. 347\_353delinsT) varyasyonu elde edilmiştir.

Bu varyasyon hastalığı zebra balığında taklit etme potansiyeline sahiptir. Varyasyonu heterozigot olarak taşıyan 3 aylık zebra balıklarının gözlerinde ışık mikroskobu ile yapılan histolojik incelemelerde hematoksilen eosin, masson trikrom ve kongo kırmızısı ile boyamada hiyalin veya amiloid birikim saptanmamıştır. Bu tez çalışması, *tgfb1* geninde kornea distrofilerine neden olan 124. arjinin amino asidini zebra balığı genomunda ortadan kaldırarak *in frame indel* oluşturan ilk çalışmadır. Bu varyasyonu taşıyan zebra balıklarının daha ileri yaşlarda incelenmesi sonucu fenotipik değişiklikler tespit edilerek TGFBI-ilişkili kornea distrofilerinin modellenmesi ve hastalığın patogenezinin ortaya konulması mümkün olabilecektir.

**Anahtar Kelimeler:** CRISPR/Cas9, TALEN, TGFBI, *knock-in*, zebra balığı, kornea distrofisi, genom düzenleme

## ABSTRACT

**YAYLACIOĞLU TUNCAY F Evaluation of Phenotypic Effects of Genome Editing Mediated TGFBI Variation on Zebrafish Cornea. Hacettepe University, Graduate School of Health Sciences, Medical Biology Program PhD Thesis, Ankara, 2019.** TGFBI-related corneal dystrophies are hereditary disorders characterized by accumulation of the abnormal protein product of TGFBI gene in the hyaline or amyloid form due to missense mutations of this gene. This gene exists in the zebrafish genome without duplication and its protein product has 65% homology to its human orthologue. Protein product of *tgfb1* (TGFBIp) was shown in the cornea of zebrafish. Mutations of this gene that effect the arginine residue on the 124th position of TGFBIp were reported as one of the hot spots for this group of corneal dystrophies. This arginine residue was also conserved in zebrafish. According to these data; in this study we aimed to make an in frame change in the region that codes the 124th amino acid residue of *tgfb1* in the zebrafish genome by using TALEN or CRISPR/Cas9. Finally, we achieved indel variation at the target sequence that resulted in p. Ser115\_Arg117delinsLeu (c. 347\_353delinsT) by nonhomology mediated repair. This variation could mimic the disease process in the zebrafish cornea. The 3 months old zebrafish eyes were examined histopathologically under the light microscope but no amyloid or hyaline deposits could be detected with hematoxylen-eosin, masson-trichrome and congo red staining. Thus, this study is the first in literature that succeeded to make an in frame variation effecting the hot spot arginine residue in *tgfb1* protein and further studies could detect phenotypical changes in older zebrafish that could mimic the TGFBI-related corneal dystrophies and help to reveal the disease pathogenesis.

**Keywords:** CRISPR/Cas9, TALEN, TGFBI, knock-in, zebrafish, corneal dystrophy, genome editing

## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xvii
<b>1. GİRİŞ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	3
2.1 Korneanın Yapısı ve Özellikleri	3
2.1.1. Epitel Tabakası	3
2.2. TGFBI-İlişkili Kornea Distrofileri	8
2.2.1. TGFBI-İlişkili Kornea Distrofilerinde Klinik	9
2.2.2 TGFBI-İlişkili Kornea Distrofilerinde Patogenez	11
2.2.3 TGFBI-İlişkili Kornea Distrofilerinde Tedavi	16
2.3 Zebra Balığı	16
2.3.1 Zebra Balığı Korneası	17
2.4 Genom Düzenleme Teknolojileri	20
2.4.1 Meganükleazlar	20
2.4.2 Çinko-Parmak Nükleazlar (ZFN)	21
2.4.3 Transkripsiyon Aktivatör Benzeri Efektör Nükleazlar (TALEN)	22
2.4.4 CRISPR/Cas9	23
2.4.5 Endojen Hücre Tamir Mekanizmaları	24
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	25
3.1. Gereçler	25
3.1.1. Zebra Balığı Bakımı, İdamesi ve Çiftleştirilmesi	25
3.1.2. Zebra Balığı Embriyosundan DNA İzolasyonu	25
3.1.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	25

3.1.4. Agaroz Jel Elektroforezi	25
3.1.5. DNA Dizi Analizi	26
3.1.6. TALEN Konstraktlarının Hazırlanması ve TALEN mRNA Sentezi	26
3.1.7. CRISPR/Cas9 Konstraktlarının Hazırlanması, CRISPR/Cas9 mRNA Sentezi ve Kalıp DNA Hazırlığı	27
3.1.8. Zebra Balığı Embriyolarına Mikroenjeksiyon	28
3.1.9. T7 Endonükleaz Enzim 1 ile Kesim Analizi (T7EI)	28
3.1.10. Restriksiyon Enzimi ile Kesim Analizi (RFLP)	28
3.1.11. Zebra Balığı İskelet Kası Dokusundan Protein İzolasyonu	28
3.1.12. Zebra Balığı Göz Dokusunda Histokimyasal Boyamalar	29
3.1.13. Western Blot Analizi	30
3.2. Yöntemler	30
3.2.1. Zebra Balıklarının Bakımı ve Etik Kurul İzininin Alınması	30
3.2.2 Zebra Balıklarında Hedef Bölgenin DNA Dizi Analizi ile Polimorfizmler Açısından İncelenmesi	32
3.2.3. TALEN Konstraktlarının Tasarlanması	32
3.2.4. TALEN Konstraktlarının Hazırlanması	33
3.2.5. Tgfb1-TALEN mRNA Sentezi ve Saflaştırılması	39
3.2.6. CRISPR/Cas9 Konstraktlarının Tasarlanması	39
3.2.7 CRISPR/Cas9 Konstraktlarının Hazırlanması	44
3.2.8. <i>Knock-in</i> için ssODN Tasarımı ve Hazırlanması	50
3.2.9. Zebra Balığı Embriyolarına Mikroenjeksiyon	52
3.2.10. Zebra Balığında DNA İzolasyonu	53
3.2.11. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	53
3.2.12. DNA Dizi Analizi	54
3.2.13. T7EI Analizi	55
3.2.14. RFLP Analizi	55
3.2.15. Heterozigot F1 Hattının Oluşturulması	56
3.2.16. Zebra Balığı Gözünden Protein İzolasyonu	57
3.2.17. Western Blot	57
3.2.18. Zebra Balığı Gözünde Histokimyasal Boyamalar	58
<b>4. BULGULAR</b>	<b>60</b>

4.1. Yabancıl Tip Zebra Balıklarında Tgfbi Geninde Ekson 4'ün Dizi Analizi	60
4.2. Tgfbi-TALEN Konstraktlarının Embriyolara Mikroenjeksiyonu Sonrasında Yapılan Varyasyona Yönelik Analiz Sonuçları	61
4.3. CRISPR/Cas9 Konstraktlarının Embriyolara Mikroenjeksiyonu Sonrasında Yapılan Varyasyona Yönelik Analiz Sonuçları	63
4.3.1. Tgfbi-sgRNA-1 ve Cas9 Mikroenjeksiyonu	63
4.3.2. Tgfbi-sgRNA-1, Cas9 ve Tgfbi-e4-ssODN Mikroenjeksiyonu	65
4.3.3. Tgfbi Geninde Hedef Kodona Daha Yakın Mesafeden Bağlanabilen ve/veya Daha Yüksek Etkinlikte Çift Zincir Kırık Oluşturması Beklenen Yeni sgRNA'lar ile Yapılan Mikroenjeksiyonlar	66
4.3.4. Tgfbi-sgRNA-2, Cas9 mRNA ve Tgfbi-ssODN-nt veya Tgfbi-ssODN-t Mikroenjeksiyonu	72
4.3.5. Tgfbi-sgRNA-2, Cas9 mRNA/protein ve Tgfbi-ssODN-nt veya Tgfbi-ssODN-t Mikroenjeksiyonu	75
4.4. Multiplex Tgfbi-sgRNA-6, Tgfbi-sgRNA-7 ve VQR Varyant Cas9 mRNA'sı ile Mikroenjeksiyon Yapılan Grupta Hedef Bölgede <i>Inframe</i> Varyasyon Taşıyan Zebra Balıklarının Seçilmesi	78
4.5. Üç Aylık Yabancıl Tip ve Heterozigot Zebra Balığı Gözlerinden Saflaştırılan Proteinlerde TGFBIp Varlığının Western Blot ile Gösterilmesi	82
4.6. Üç Aylık Yabancıl Tip ve Heterozigot Zebra Balığı Gözlerinde Makroskopik ve Histopatolojik Değerlendirme	83
<b>5. TARTIŞMA</b>	87
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	102
6.1. Sonuçlar	102
6.2. Öneriler	103
<b>7. KAYNAKLAR</b>	104
<b>8. EKLER</b>	
EK-1: Tez çalışması ile ilgili etik kurul izni	
EK-2: I. Tez yayını	
EK-4: Dijital makbuz	
EK-5: Orjinallik Ekran Çıktısı	
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>	



## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>AKD</b>	Avellino kornea distrofisi
<b>BIGH3</b>	<i>Transforming growth factor beta-induced gene</i>
<b>CRISPR</b>	Düzenli aralıklarla bölünmüş kısa palindromik tekrar kümeleri
<b>crRNA</b>	CRISPR RNA
<b>FAS1</b>	Fasciclin 1 bölgesi
<b>GKD1</b>	Granüler kornea distrofisi, tip 1
<b>GKD2</b>	Granüler kornea distrofisi, tip 2
<b>HDR</b>	Homolog rekombinasyon ile tamir
<b>ICD</b>	<i>International Classification of Disease</i>
<b>İndel</b>	İnsersiyon ve delesyonlar
<b>K3</b>	Keratin 3
<b>KS</b>	Keratansülfat proteoglikanı
<b>LKD1</b>	Lattis kornea distrofisi, tip 1
<b>MMP</b>	Matriks metalloproteinaz
<b>NHEJ</b>	Homolog olmayan uç birleştirme ile tamir
<b>ÖSF</b>	Ön segment fotoğrafı
<b>PAM</b>	<i>Protospacer adjacent motif</i>
<b>PTK</b>	Terapotik lazer keratektomi
<b>PZR</b>	Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>R</b>	Arjinin
<b>RBKD</b>	Reis–Bücklers kornea distrofisi
<b>RFLP</b>	Restriksiyon Enzimi ile Kesim Analizi
<b>RVD</b>	Tekrar değişken bölgeleri
<b>sgRNA</b>	Tek kılavuz RNA
<b>ssODN</b>	Tek zincirli oligonükleotit
<b>T7EI</b>	T7 endonükleaz enzim 1 ile kesim analizi
<b>TALEN</b>	Transkripsiyon aktivatör benzeri efektör nükleazlar
<b>TBKD</b>	Thiel-Behnke kornea distrofisi
<b>TEM</b>	Transmisyon elektron mikroskopisi
<b>TGFBI</b>	<i>Transforming growth factor beta-induced gene</i>
<b>TGFBIp</b>	<i>Transforming growth factor beta-induced protein</i>

<b>tracrRNA</b>	<i>Trans-activating crRNA</i>
<b>W</b>	Triptofan
<b>ZFN</b>	Çinko parmak nükleazlar

## ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Korneanın tabakaları: İnsanda korneanın tabakaları ışık mikroskopu ile gösterilmiştir (Hematoksilen-eozin ile boyama, x32).	4
2.2. TGFBI-ilişkili kornea distrofilerinde ön segment fotoğrafı (ÖSF) ve korneanın histopatolojik görüntüsü.	9
2.3. TGFBI geninde saptanan mutasyonlar ve yerleşimi.	12
2.4. TGFBIp yapısal modeli.	13
2.5. Zebra balığı gözünün embriyonik ve erişkin dönemde karşılaştırılması.	18
2.6. Genom düzenleme araçları ve hücre içi tamir mekanizmaları.	21
3.1. Hedef bölgeye uygun TALEN konstraktları.	33
3.2. Tgfbı'de hedef bölge ve seçilen TALEN konstraktının hedef bağlanma bölgesi.	34
3.3. Hedef bölgeye uygun tasarlanan sağ ve sol TALEN konstraktları.	34
3.4. REAL yöntemi ile TALEN sentezi.	34
3.5. TALEN plasmid kütüphaneleri kullanılarak RVD'lerin bir plasmitten diğerine takılıp birbirine bağlanması.	35
3.6. SAĞ TALEN konstraktı ve homodimerik vektör aşamasında DNA dizileme sonucu.	35
3.7. SOL TALEN konstraktı ve homodimerik vektör aşamasında DNA dizileme sonucu.	36
3.8. Tgfbı-TALEN-mRNA'ları.	39
3.9. CRISPRDirect ( <a href="https://crispr.dbcls.jp/">https://crispr.dbcls.jp/</a> ) ile sgRNA (single-guide RNA) hedefi seçilmesi.	40
3.10. Tgfbı'de hedef dizi ve tgfbı-sgRNA-1 tasarımı.	40
3.11. Alternatif sgRNA'ların etkinlikleri.	41
3.12. Tgfbı-sgRNA-2 (GG16NGG).	42
3.13. Tgfbı-sgRNA-3 (gg18NGG).	42
3.14. Tgfbı-sgRNA-4 (gg18NGAG) ve tgfbı-sgRNA-5 (gG15NGAG).	43
3.15. Tgfbı-sgRNA-6 ve tgfbı-sgRNA-7 (gA18NGAG).	44
3.16. Tgfbı-sgRNA-8 ve tgfbı-sgRNA-9.	44
3.17. sgRNA ve Cas9 mRNA %1,2'lik agaroz jel görüntüsü.	46
3.18. Oligonükleotit birleştirme reaksiyonu sonrası agaroz jel görüntüsü.	48
3.19. SgRNA'ların sentez sonrası agaroz jel görüntüsü.	49

3.20.	Cas9 ve Cas9 VQR varyantı mRNA'nın sentez sonrası agaroz jel görüntüsü.	50
3.21.	Tasarlanan tgfb-e4-ssODN ve CRISPR/Cas9 ile birlikte kullanımı sonrası zebra balığı genomunda beklenen değişiklikler.	51
3.22.	SgRNA-Cas9 Proteini ve DNA etkileşimi.	52
3.23.	Tgfb-ssODN-nt ve tgfb-ssODN-t tasarımları.	52
3.24.	Apal restriksiyon enzimi tanıma ve kesme dizisi.	56
4.1.	AB yabancı tip balıklardaki kromatogram görüntüleri.	60
4.2.	Tgfb-TALEN mRNA enjeksiyonu sonrası DNA dizi analizi yapılan örneklerden ve kontrolden kromatogram görüntüsü.	62
4.3.	Tgfb-sgRNA-1 ve Cas9 mRNA enjeksiyonu sonrası kromatogram görüntüsü ve hedef tgfb dizisi.	64
4.4.	Enjeksiyon yapılan embriyolara ait kromatogram görüntüsü.	66
4.5.	Enjeksiyon gruplarında T7EI analiz sonuçlarına ait agaroz jel görüntüleri.	71
4.6.	Tgfb-sgRNA-2 ve Cas9 mRNA enjeksiyonu sonrası mozaik embriyoda insersiyon ve delesyonlara bağlı çerçeve kaymasının izlendiği kromatogram görüntüsü.	72
4.7.	Multiplex olarak enjekte edilen tgfb-sgRNA-6 ve tgfb-sgRNA-7 ile VQR varyant Cas9 mRNA enjeksiyonu sonrası mozaik embriyoda insersiyon ve delesyonlara bağlı çerçeve kaymasının izlendiği kromatogram görüntüsü.	72
4.8.	Tgfb-sgRNA-2, Cas9 mRNA ve tgfb-ssODN-t/nt ile mikroenjeksiyonu sonrası RFLP sonuçları.	74
4.9.	Tgfb-sgRNA-2, Cas9 mRNA ve tgfb-ssODN-t/nt ile mikroenjeksiyon sonrası T7EI ve DNA dizi analizi sonuçları.	75
4.10.	Tgfb-sgRNA-2, Cas9 mRNA/protein ve tgfb-ssODN-nt veya tgfb-ssODN-t mikroenjeksiyonu sonrası RFLP sonuçları.	77
4.11.	Tgfb-sgRNA-2, Cas9 mRNA/protein ve tgfb-ssODN-nt veya tgfb-ssODN-t mikroenjeksiyonu sonrası birinci enjeksiyon grubu örneklerinden 1.'de yapılan dizi analiz sonucu.	77
4.12.	Erişkin balıklarda <i>fin clip</i> sonrası varyasyon tespit edilen ve edilmeyen balıklardaki DNA dizi analizi sonuçları.	80
4.13.	Varyasyon saptanan beş erişkin balıkta <i>germ line</i> aktarımı izlemek ve aktarılan varyasyonu tespit etmek için yabancı tip balıklarla çiftleştirme sonrası elde edilen embriyolarda DNA dizi analizi sonuçları.	81
4.14.	3 aylık F1 heterozigot varyasyon taşıyan balıklarda DNA dizi analizi kromatogram görüntüsü.	82
4.15.	Yabancı tip ve heterozigot balık gözü örneklerinde western blot sonuçları.	83
4.16.	Yabancı tip zebra balığı gözünde kraniokaudal ekseninde alınan transvers kesit, Hematoksilen-eozin ile boyama.	85

- 4.17.** Yabamı tip ve heterozigot zebra balıklarında kraniokaudal ekseninde gözü içeren enine kesitler.

## TABLOLAR

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa</b>
<b>3.1.</b> Zebra balığı genomunda hedef bölgenin incelenmesi için tasarlanan primer dizileri.	32
<b>3.2.</b> Tasarlanan sgRNA dizilerine ait promotör tipi ve oligonükleotit dizileri.	46
<b>3.3.</b> Klonlamadan bağımsız sentez reaksiyonları sonrası elde edilen sgRNA konsantrasyonları.	49
<b>4.1.</b> TALEN platformu ile ilk mikroenjeksiyon.	61
<b>4.2.</b> TALEN platformu ile ikinci mikroenjeksiyon.	62
<b>4.3.</b> TALEN platformu ile üçüncü mikroenjeksiyon.	63
<b>4.4.</b> Tgfbi-sgRNA-1 ve Cas9 ile mikroenjeksiyon.	64
<b>4.5.</b> Tgfbi-sgRNA-1, Cas9 ve tgfbi-e4-ssODN ile mikroenjeksiyon.	66
<b>4.6.</b> Tgfbi-sgRNA-2 ve Cas9 mRNA'sı ile mikroenjeksiyon.	67
<b>4.7.</b> Tgfbi-sgRNA-3 ve Cas9 mRNA'sı ile mikroenjeksiyon.	68
<b>4.8.</b> Multiplex tgfbi-sgRNA-4, tgfbi-sgRNA-5 ve Cas9 mRNA'sı ile mikroenjeksiyon.	68
<b>4.9.</b> Multiplex tgfbi-sgRNA-6, tgfbi-sgRNA-7 ve VQR varyant Cas9 mRNA'sı ile mikroenjeksiyon.	69
<b>4.10.</b> Multiplex tgfbi-sgRNA-8, tgfbi-sgRNA-9 ve Cas9 mRNA'sı ile mikroenjeksiyon.	70
<b>4.11.</b> Tgfbi-sgRNA-2, Cas9 mRNA ve tgfbi-ssODN-t/nt ile mikroenjeksiyon.	73
<b>4.12.</b> Tgfbi-sgRNA-2, Cas9 mRNA/protein ve tgfbi-ssODN-nt veya tgfbi-ssODN-t mikroenjeksiyonu.	76
<b>4.13.</b> Multiplex tgfbi-sgRNA-6, tgfbi-sgRNA-7 ve VQR varyant Cas9 mRNA'sı ile mikroenjeksiyon.	82

## 1. GİRİŞ

Kornea distrofileri kornea saydamlığında ve görme keskinliğinde azalmaya neden olan korneanın farklı tabakalarını etkileyen bir grup kalıtsal hastalıktır. TGFBI (transforming growth factor beta-induced-BIGH3) geninde yer alan mutasyonlar Bowman tabakasını ve stromayı etkileyen kornea distrofilerinden sorumludur (1,2). Bu genin ürünü olan transforming growth factor  $\beta$ -induced proteini (TGFBIp, keratoepitelin) mutasyona bağlı olarak amiloid veya hiyalin yapıda korneada birikmektedir. Proteini oluşturan amino asit dizisindeki değişikliklere bağlı olarak hastalığın ciddiyeti, başlangıç yaşı, birikim tipi ve yerleşimi değişiklik göstermektedir: 124. amino asit olan arjininin yerine sistein geçtiğinde Lattis kornea distrofisi ve stromada amiloid birikimi gözlenirken; bu amino asit pozisyonuna histidin geçtiğinde Avellino kornea distrofisi ve stromada amiloid ve hiyalin yapıda birikim; lösin geçtiğinde Reis-Buckler kornea distrofisi ve Bowman tabakasında hiyalin yapıda birikim ve serin geçtiğinde ise Granüler kornea distrofisi, tip 1 ve stromada hiyalin yapıda birikim izlenmektedir (2, 3).

Günümüzde bu hastalıkların tedavisinde birikimi önleyen, durduran ya da geri çeviren etkin bir tedavi mevcut değildir. Bu hastalık grubunun genetik altyapısı büyük oranda ortaya konmuş olmakla birlikte farklı mutasyonların neden farklı fenotipler oluşturduğu henüz açıklığa kavuşmamıştır.

Bu hastalık grubu için hayvan modellerinin eksikliği patogenezi ve tedaviye yönelik araştırmaları sınırlandırmaktadır. Zebra balığı korneası insan korneası ile benzer yapı ve içeriğe sahip olup kornea hastalıklarının incelenmesi için uygun bir hayvan modeli olarak düşünülmektedir (4-6). Tgfbi zebra balığında tek gen olarak bulunmakta ve insan TGFBI geni ile nükleotit ve amino asit dizisi özellikle mutasyonların sık görüldüğü noktalarda benzerlik göstermektedir. Bu genin ürünü olan keratoepitelin ise embriyolojik gelişim sırasında ve erişkin zebra balığında immünohistokimyasal olarak korneada saptanmıştır (4).

Genom düzenleme teknolojileri DNA'da çift zincir kırık oluşturup hücrelerin homolog olmayan uç birleştirme ve/veya homolog rekombinasyon ile tamir mekanizmalarını devreye sokarak DNA'da hedefli değişiklikler oluşturulmasını sağlayan böylece hedef genin zebra balığı gibi model organizmalarda mutantının oluşturulmasına olanak sağlayan araçlardır. Bu araçlar içerisinde: TALEN, Çinko

parmak nükleazlar, meganükleazlar ve özellikle son dönemde daha sıklıkla kullanılan CRISPR/Cas9 sistemi yer almaktadır (7,8).

Bu tez kapsamında hastalarda insan keratoepitelin proteininde 124. arjinin amino asidinde görülen değişimlere benzer hedefli değişiklik zebra balığı tgfb1 geninde genom düzenleme araçları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu değişikliği taşıyan erişkin zebra balıklarının korneası incelenmiştir. Bu hastalıkların zebra balığı gibi model bir organizmada çalışılabilmesi, hastalığın patogenezinin araştırılması ve hedefli tedavilerin geliştirilmesi açısından önem taşımaktadır.



## 2. GENEL BİLGİLER

Kornea saydam ve avasküler bir bağ dokusu olup gözü enfeksiyonlara ve dış etkenlere karşı koruyan bir bariyer olarak görev yapar. Ayrıca onu kaplayan göz yaşı film tabakası ile birlikte gözün ön kırıcı yüzeyini oluşturarak optik fonksiyon da üstlenmektedir. Bu saydam tabaka, retina gibi nörobiyolojik özelliklere ya da lens gibi dinamik hareket yeteneğine sahip değildir ancak bu yapının saydamlığını etkileyen tüm patolojiler gözün görmek için gerekli fonksiyonu yerine getirmesine engel olur (9). Bu nedenle korneanın saydamlığının kaybı ile sonuçlanabilen kornea distrofileri, dejenerasyonları, enfeksiyonları ve travmaları göz hekimlerinin ve araştırmacıların kalıcı çözümler aradıkları önemli hastalık gruplarıdır.

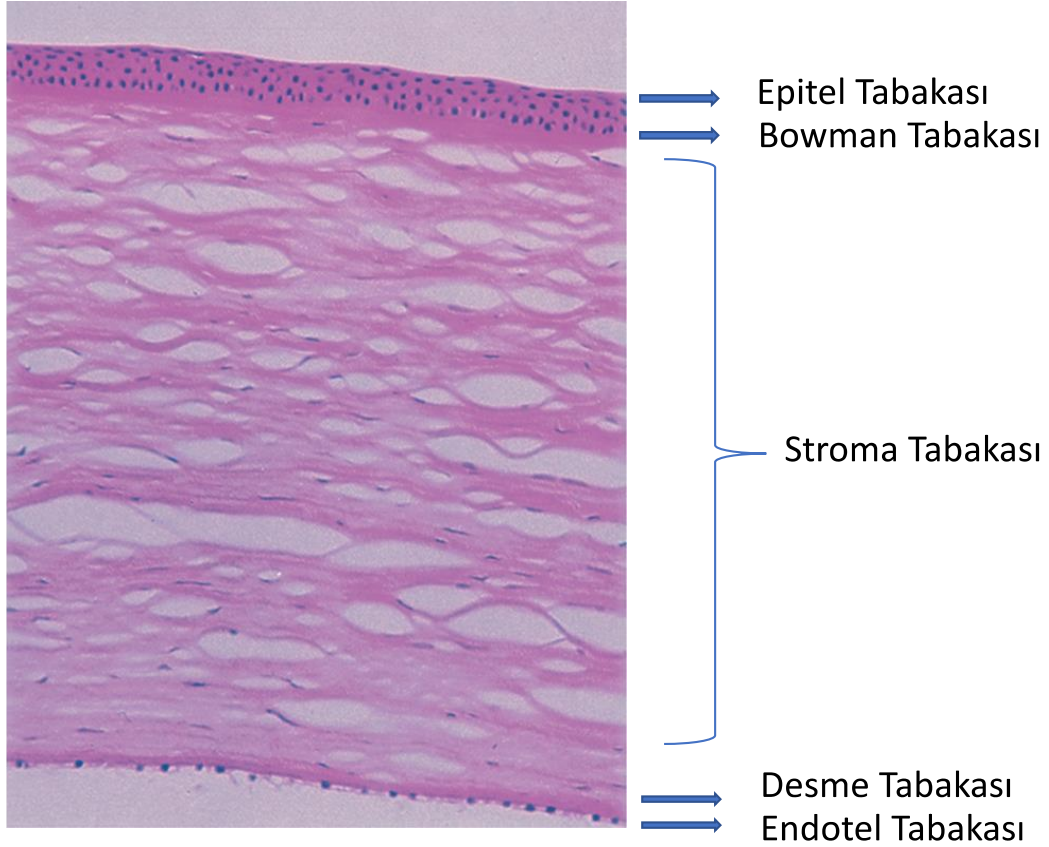
### 2.1. Korneanın Yapısı ve Özellikleri

Erişkinde korneanın horizontal çapı 11,5-12 mm olup vertikal çapından yaklaşık olarak 1mm daha uzundur (10). Merkezde kornea kalınlığı 0,5 mm olup periferde doğru giderek artar ve 1 mm'ye ulaşır. Kornea merkezde dik, periferde ise daha düz olup asferik bir optik sistem oluşturur (9).

İnsan korneası dıştan içe doğru epitel tabakası, Bowman tabakası, stroma tabakası, Desme membranı ve endotel tabakası olmak üzere beş farklı tabakadan oluşmaktadır (Şekil 2.1).

#### 2.1.1. Epitel Tabakası

Epitel tabakası korneanın en dışta yer alan kısmı olup dış ortama karşı korneanın birincil bariyerini oluşturur. Embriyolojik olarak kornea epiteli yüzey ektoderminden intrauterin hayatın 5. ile 6. haftaları arasında gelişir. Bu tabaka keratinleşmemiş çok katlı yassı epitelden oluşur. Kalınlığı 40-50 µm olup, 4-6 hücre katmanı içerir (11).



**Şekil 2.1.** Korneanın tabakaları: İnsanda korneanın tabakaları ışık mikroskopu ile gösterilmiştir (Hematoksilen-eozin ile boyama, x32).

Epitel tabakasının dış yüzeyini sırasıyla lipid, aköz ve müsün tabakalardan oluşan göz yaşı film tabakası kaplar. Göz yaşı film tabakası sayesinde epitelin ön yüzündeki optik açıdan önemli olan düzensizlikler giderilir ve hava-göz yaşı ara yüzü ile birlikte kornea, gözün kırıcılık gücünün üçte ikisini oluşturur. Göz yaşı film tabakası aynı zamanda korneayı enfeksiyon ajanlarından, kimyasallardan, toksinlerden ve yabancı cisimlerden korur, epitel hücrelerinin sağlığı, çoğalması ve tamiri için gerekli immünolojik faktörleri ve büyüme faktörlerini sağlar (12).

Kornea epitel hücrelerinin ortalama yaşam süreleri 7-10 gündür (13). Haftada bir, tüm epitel hücre tabakası derindeki hücrelerin çoğalarak yüzeyden dökülen hücrelerin yerini almalarıyla yenilenir. En yüzeydeki epitel hücreleri ortalama 2-3 tabaka yassı poligonal hücrelerden oluşur. Bu hücrelerin yüzeyinde çok sayıda mikrovillus, mikropilika bulunur. Bu uzantılar göz yaşı filminin müsünöz tabakası ile

hücre zarı arasındaki temas ve tutunma alanını arttırarak düzgün ve saydam bir optik sistem sağlanması için kilit rol oynarlar (11).

Yüzey hücreleri arasında sıkı bağlantılar mevcuttur. Bu bağlantılar göz yaşının hücreler arası alana girişine engel olur. Aynı zamanda toksin ve enfeksiyon ajanları için de bariyer oluşturarak bunların korneanın derin tabakalarına ulaşmalarına engel olurlar (11).

Yüzeyel hücre tabakası ile bazal epitel tabakası arasında suprabazal ya da kanat hücreleri olarak adlandırılan hücreler bulunur. Bu hücreler 2-3 tabaka halinde ve daha az yassı hücrelerdir, aralarında sıkı bağlantılar vardır (9).

Kornea epitelinin en derin hücresel tabakası tek sıra kolumnar epitelden oluşan bazal tabakadır. Kök hücrelerin ve geçici çoğalabilen hücrelerin dışında bazal hücreler mitoz yeteneğine sahip tek kornea epitel hücreleridir. Bu hücreler kanat ve yüzeyel hücrelerin kaynağıdır. Bazal hücreler arasında oluklu bağlantı (nekzus) ve ara bağlantı birimleri mevcuttur. Ayrıca bu hücreler hemidezmozomlar ile de altta bazal membrana tutunur ve bu güçlü bağlantı epitel tabakasının alttaki diğer kornea tabakalarından ayrılmasına engel olur (9).

Epitel bazal membranı 0,05 µm kalınlığında olup, bazal hücrelerin ürettiği tip IV kollajen ve lamininden oluşur (11).

### **Bowman Tabakası**

Bowman tabakası stromanın hemen önünde yer alır, gerçek bir membran yapısında olmayıp stromanın en önde asellüler yoğunlaşması sonucu oluşmuştur. Bu tabaka 15 µm kalınlığında olup korneanın şeklini korumasına destek olur. Hasar gördüğünde rejenere olamaz ve fibrotik skar oluşumu gerçekleşir (9).

### **Stroma**

Stroma korneanın kalınlığının %80-85 kadarını ve korneanın yapısal çerçevesini oluşturur. Embriyolojik olarak stroma, primitif endotelin oluşumundan sonra gestasyonun 7. haftasında nöral krest hücrelerinin ikinci dalga göçü ile oluşur (11). Stroma kollajenden oluşan diğer dokulardan farklı olarak saydamdır ve bunu sağlayan stromadaki kollajen liflerin ve hücre dışı matriksin hassas organizasyonudur. Kollajen lifler paralel demetler halinde dizilmiştir ve fibril olarak adlandırılırlar. Bu

fibriller de lamella denilen paralel tabakalar halinde paketlenirler. İnsan gözünde stroma tabakası 200-250 ayrı lamelladan oluşmaktadır ve her lamelladaki kollajen fiberler komşu lamelladakine dik açıda olacak şekilde dizilmişlerdir. Periferde stroma merkeze göre daha kalındır ve kollajen lifler periferde doğru yön değiştirerek dairesel şekilde limbusa uzanırlar (14,15). Bu organizasyon ışık saçılmasını azaltır ve korneanın saydamlığına katkıda bulunur, aynı zamanda korneaya mekanik kuvvet sağlar (14).

Stromadaki kollajen lifleri tip V kollajen ile heterodimerik kompleks oluşturan tip I kollajenden oluşur ve bu yapı liflerin korneaya özgü sıkı paketlenmelerini sağlar. Kollajen komplekslerinin etrafını keratan sülfat veya kondroitin sülfat/dermatan sülfat yan zincirlerine sahip özelleşmiş proteoglikan molekülleri sararak hidrasyonun ve yapısal özelliklerin kontrolünü sağlarlar (9).

Keratositler, stromanın majör hücre tipidir ve hücre dışı matriksin devamlılığını sağlarlar. Stromada homeostazis sağlanmasında önemli olan kollajen, glikozaminoglikan ve matriks metalloproteinazlarının (MMP) sentezini gerçekleştirir. Keratositlerin çoğu ön stromada yer alır ve suda çözünen kristallin proteinlerini içerirler. Kristallinler keratositlerden ışık saçılımını önleyerek kornea saydamlığına katkıda bulunurlar (16).

### **Desme Membranı**

Gestasyonun 8. haftasından itibaren endotel hücreleri Desme membranını sentezlemeye başlarlar. Elektron mikroskopi ile incelendiğinde anteriordaki doğumdan önce sentezi tamamlanan 3  $\mu\text{m}$ 'lik kısım farklı ve çizgili yapıda izlenir. Doğum sonrası sentezlenen Desme membranı ise çizgili değildir ve amorf yapıya sahiptir. Yaşla birlikte Desme membranı kalınlığı 10  $\mu\text{m}$ 'ye ulaşır (11).

### **Endotel Tabakası**

Endotel tabakası korneanın hidrasyon durumunu kontrol ederek kornea saydamlığının korunmasında önemli rol oynar. İnsanda endotel tabakası tek sıra arkadan bakıldığında arı kovanı görünümü sergileyen poligonal endotel hücrelerinden oluşur (9).

Embriyogenezin erken safhalarında nöral-krest kökenli küboidal hücreler korneanın arkasını tek sıra halinde kaplarlar. Zamanla bu hücreler yassılaşılarak kalınlıkları 10  $\mu\text{m}$  'den 4  $\mu\text{m}$  'ye düşer (17). Hücrelerin önündeki asellüler tabakada Desme membranını oluşturur (18). Hücreler bazal kısımlarında bulunan hemidesmozomlarla Desme membranına tutunurlar. Hücrelerin lateral kısımlarında  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPaz pompası bulunur (19). Komşu hücreler birbirine sıkı bağlantılar ve oluklu bağlantılarla bağlanırlar.

Endotel hücre yoğunluğu ve topografisi yaşam boyu değişim gösterir. İkinci dekattan sekizinci dekada gelindiğinde hücre yoğunluğu 3000-4000 hücre/ $\text{mm}^2$ 'den 2600 hücre/ $\text{mm}^2$ 'ye düşer. Hekzogonal hücre oranı ise yaklaşık %75'den %60'a geriler. Normal korneada merkezde kornea yoğunluğu yılda %0,6 oranında azalır (20).

Stromanın su oranının diğer dokulara göre daha düşük tutulması endotel hücrelerin aktivitesi ile sağlanır. Bu dehidrasyon göreceli hipo-ozmotik stromadan hipertonic aköz hümöre sıvı akışı ile gerçekleşir. Bu akış enerji gerektirmez ancak bu görece farklılığı sağlamak için endotel hücrelerinin zarlarında bulunan  $\text{Na}^+$  ATPaz,  $\text{K}^+$  ATPaz ve hücre içi karbonik anhidraz yolağı enerji gerektirir. Bu sistemler stromadan aköze net iyon akışı sağlarlar. Endotelin bariyer fonksiyonu bu ozmotik meyili sağlayacak ölçüde iyon akışına izin verir (21).

Endotel hücrelerinin *in vivo* koşullarda mitotik aktivitesi yoktur, ancak insanlar endotel sayısı konusunda önemli bir rezerv ile doğarlar. Endotel hücre sayısı 500 hücre/ $\text{mm}^2$ 'nin altına düştüğünde kornea ödemi gelişme riski oluşur. Endotel hücre morfolojisi de pompa fonksiyonu ile ilişkilidir. Hücre boyutu artışı (*polimegatizm*) ve hücre şekil değişkenliğinde artış (*pleomorfizm*) endotel hücrelerinde korneayı kuru tutma kapasitelerindeki azalışın göstergesi olarak tespit edilmiştir. Endotel hücre sayısı yaş, travma, inflamasyon ve diğer hastalıklar nedeniyle azalır. Endotel tabakası sayıca bu azalmayı hücre boyutu artışı ve hücrelerin hekzogonal şekillerini yitirmesiyle telafi etmeye çalışır (11).

### **Kornea İnervasyonu ve Damar Yapısı**

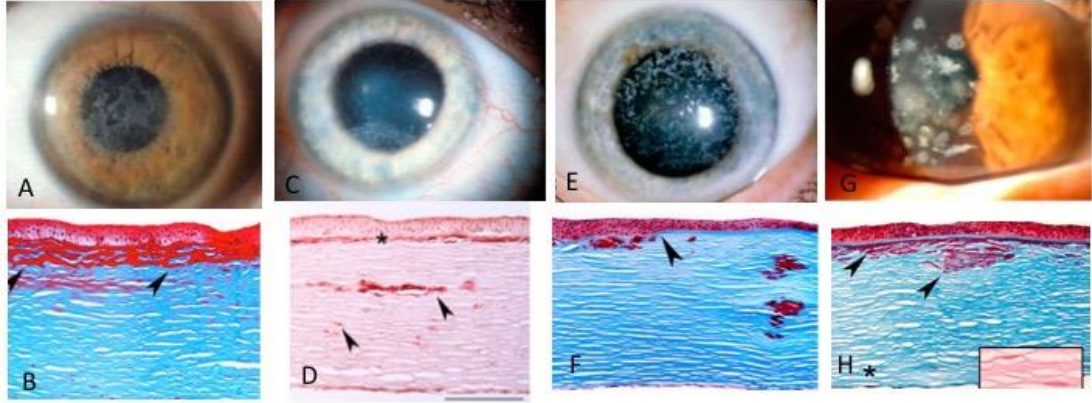
Kornea avasküler bir yapı olmakla birlikte, sağlıklı kalmak için besin ve oksijene ihtiyaç duyar. Bunlar, korneanın en dış sınırında yer alan ince damarlar, aköz hümör ve göz yaşı filmi ile korneaya ulaştırılır.

Kornea vücutta inervasyonu en fazla olan dokulardan biridir. Kornea sinirleri trigeminal sinirin oftalmik dalının nazosilyer dalından köken alırlar. Yüzeysel korneada sinirler radial olarak kalın gövdeler halinde stromaya girerler burada sinir pleksusu oluşturup daha ince dallarla Bowman zarını delerek bazal epitel altında zengin bir ağ oluştururlar. Kornea aynı zamanda otonom sempatik sinirlere de sahiptir (22).

## 2.2. TGFBI-İlişkili Kornea Distrofileri

Kornea distrofileri korneanın farklı tabakalarına yerleşmiş olan protein yapıda hücre dışı ya da hücre içi birikimler gözlenen kornea saydamlığını ve görme keskinliğini etkileyen kalıtsal hastalıklardır (23). Bu hastalıkların sınıflandırılması başlangıçta sadece klinik ve histopatolojik özelliklerine göre yapılmıştır (Şekil 2.2). 1994 yılında kornea distrofilerine neden olan genin 5. kromozomda yer aldığı tespit edilmiştir (1). Munier ve ark. 2002’de bu genin TGFBI olduğunu göstermişler ve bu gende yer alan hastalığa neden olan mutasyonları saptamışlardır (2). Bu tespitin sonrasında farklı ülkelerden çok sayıda farklı mutasyon bildirilmiştir. Bu hastalık grubundaki genetik bilginin artışı yeni sınıflandırmayı da beraberinde getirmiştir. 2007 yılında bu hastalık grubunun ‘International Classification of Disease (ICD)’ tarafından ICD3 sınıflaması yayınlanmıştır (24). Bu sınıflamaya göre TGFBI- ilişkili distrofiler anatomik yerleşimlerine göre Bowman tabakası distrofileri ve stroma distrofileri olmak üzere iki grupta toplanmaktadır. Ardından 2015’de ICD3’de en son yapılan değişiklikler sonrasında ‘‘Epitel ve Stroma TGFBI Distrofileri’’ adı altında bir ana grup oluşturulmuştur (25). Bu ana grubun altında yer alan hastalıklar:

1. Reis–Bücklers kornea distrofisi (RBKD)
2. Thiel-Behnke kornea distrofisi (TBKD)
3. Lattis kornea distrofisi, tip 1 (LKD1) — ve varyantları (III, IIIA, I/IIIA, IV)
4. Granüler kornea distrofisi, tip 1 (GKD1)
5. Granüler kornea distrofisi, tip 2 (GKD2)



**Şekil 2.2.** TGFBI-ilişkili kornea distrofilerinde ön segment fotoğrafı (ÖSF) ve korneanın histopatolojik görüntüsü.

A. RBKD hastasında ÖSF, B. RBKD'de Masson-Trikrom ile boyamada keratohyalin birikimler, C. LKD1 hastasında ÖSF, D. LKD1'de Kongo kırmızısı ile boyamada amiloid birikimler, E. GKD1 hastasında ÖSF, F. GKD1'de Masson-Trikrom ile boyamada keratohyalin birikimler, G. GKD2 hastasında ÖSF, H. GKD2'de Masson Trikrom ile boyamada keratohyalin birikimler ve Kongo kırmızısı ile boyamada (alt soldaki küçük fotoğraf) amiloid birikim gösterilmiştir.(24).

### 2.2.1. TGFBI-İlişkili Kornea Distrofilerinde Klinik

#### Reis-Bücklers Kornea Distrofisi

Bowman tabakası erişkinlerde 8-12 µm kalınlığında tip I, tip III, tip V ve tip VII kollajen ağından oluşmaktadır. TGFBI genindeki mutasyonlar bu tabakada iki farklı formda hiyalin yapıda birikimle karakterize olan Reis-Bücklers kornea distrofisi (RBKD) ve Thiel-Behnke kornea distrofisine (TBKD) neden olurlar. Klinik olarak bu iki distrofiyi birbirinden ayırmak güçtür (26,27).

RBKD, Bowman tabakasında ve ön stromada bebeklik çağında gelişen çok sayıda düzensiz şekilli opasite ile bulgu verir. Etkilenen bireylerde tekrarlayan epitel erozyonları ve ilerleyici görme kaybı gelişir. Histopatolojik incelemede Masson Trikrom ile boyanan granüler yapıda birikimlerin Bowman tabakasını kapladığı izlenir. R124L mutasyonu bu fenotipten sorumludur.

#### Thiel-Behnke Kornea Distrofisi

TBKD, 10-20 yaş arasında ortaya çıkan bal peteği görünümünde subepitelyal opasiteler ile karakterizedir. Birikimler Masson Trikrom ile boyanır. Bu fenotipten R555Q mutasyonu sorumludur.

RBKD ve TBKD fenotiplerinin ayrımı zordur. Ancak transmisyon elektron mikroskopisi (TEM) ile RBKD'de subepitel tabakada elektron-dense çubuk şeklinde birikimler izlenirken TBKD'de kıvrımlı 9-15 nm'lik lifler izlenir (26, 27).

### **Lattis Kornea Distrofisi, Tip 1 ve Varyantları (III, IIIA, I/IIIA, IV)**

Bu hastalıkta ince çizgisel opasiteler mevcuttur ve bunlar lattis çizgileri olarak isimlendirilir. Perifer kornea her zaman saydamdır ve hastalarda görme kaybından çok tekrarlayan epitel erozyonların neden olduğu irritasyon en sık şikayettir. LKD'de kornea stromasında amiloid birikimler vardır, Kongo kırmızısı ile boyanır. İmmünohistokimyasal incelemede birikimler sadece proteinin karboksil ucuna özgül antikolarla pozitif reaksiyon verir (28). LKD'nin çok sayıda alt tipi vardır. Bunlardan en sık görülen LKD1 olarak isimlendirilen erken başlangıçlı ve amiloid birikimlerin anterior stromada yerleştiği klasik tiptir. Bunun dışında kalanlar varyant LKD olarak adlandırılırlar. LKD1'de en sık saptanan mutasyon R124C'dir (29).

### **Granüler Kornea Distrofisi, Tip 1**

Bu hastalıkta başlangıç erken çocukluk dönemidir. Korneada kırıntı benzeri opasiteler gözlenir. Opasiteler arası kornea saydamdır. Opasiteler limbusa uzanmazlar, santralde yerleşirler. Pinhol etkisi nedeniyle hastalar görme kaybından daha ileri yaşlarda etkilenir. Kornea stromasında hiyalin materyal birikimi mevcuttur ve bu birikim Masson Trikrom boyama ile parlak kırmızı renkte boyanır (7). İmmünohistokimyasal incelemede hem N-terminali hem de C-terminaline yönelik antikolarla pozitif reaksiyon verir (28). TEM'de heterojen 100-500 nm'lik çubuk şeklinde paketlenmiş filamanlar izlenir. R555W mutasyonu bu grupta en sık rastlanan mutasyondur. Homozigot hastalarda daha ciddi bir seyir gözlenir (30).

### **Granüler Kornea Distrofisi, Tip 2**

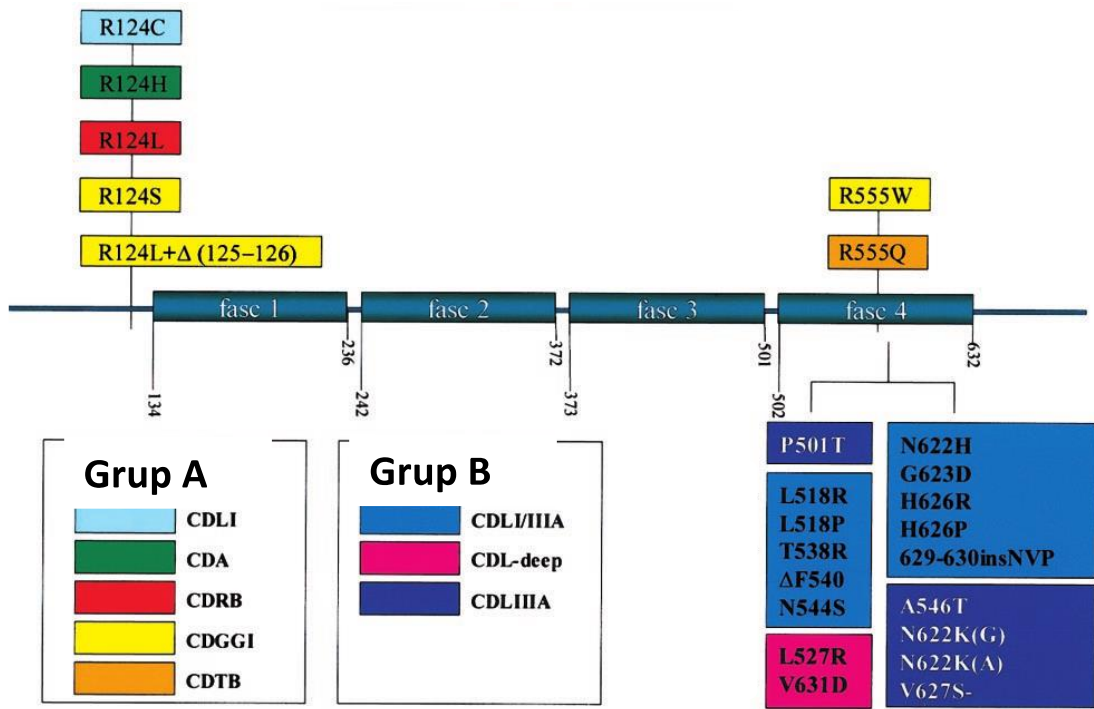
Bu distrofi Avellino kornea distrofisi (AKD) olarak da isimlendirilmektedir. Bu hastalıkta korneal birikim hem hiyalin hem de amiloid formdadır. Bu hastalarda önce granüler lezyonlar belirir yaş ilerledikçe lattis lezyonları gelişir. Bu grupta en sık rastlanan mutasyon R124H'dir (31,32).



### 2.2.2 TGFBI-İlişkili Kornea Distrofilerinde Patogenez

Otozomal dominant olarak kalıtılan Bowman tabakası ve stroma distrofileri için ortak bir genetik lokus olduğu yapılan haritalama çalışmalarında ortaya konmuştur. Bu çalışmalar sonrasında 5. kromozomun uzun kolundaki genin TGFBI olduğu tespit edilmiştir (2). Bu gende tespit edilen farklı mutasyonlar farklı distrofilere neden olmaktadır. Bu hastalık grubu otozomal dominant olarak kalıtılmakta olup eksik penetrans ve eksik baskınlık gösterilmiştir. Bu ortak özelliklerin dışında bu grupta yer alan tüm distrofi tipleri klinik ve histopatolojik özellikleri bakımından birbirlerinden farklı özelliklere sahiptirler.

Otozomal dominant kornea distrofilerinden ilk ve geniş kapsamlı olarak TGFBI geninde mutasyon analizi çalışmaları Munier ve ark. tarafından gerçekleştirilmiştir. 2002'de yayınlanan ve 61 indeks hasta (30 LKD, 12 GKD1, 7 AKD, 8 RBKD, 4 TBKD) içeren çalışmada 50 hastada TGFBI geninde mutasyon saptanmıştır (2). Bu gende iki mutasyon sıcak bölgesi mevcuttur: R124 ve R555. Saptanan mutasyonların %50'si bu iki noktada yer almaktadır. Bu iki noktadaki mutasyonlar farklı fenotiplerle sonuçlanmaktadır: R124C, LKD1'e; R555W ve R124S, GKD1 'e; R124H, GKD2'ye, R124L, RBKD'ye; R555Q, TBKD'ye neden olmaktadır. LKD'nin varyant formlarında ise genotip-fenotip ilişkisi gen bölgesine özgüdür ve tüm genetik varyasyonlar 4.Fasciclin 1(FAS1) bölgesinde ya da onun sınırında gerçekleşmektedir. Munier bu çalışmanın sonunda bu heterojen hastalık grubunu genetik analiz sonuçlarına göre ikiye ayırmıştır. A grubunda genotip-fenotip ilişkisinin amino asit bağımlı olduğu kornea distrofileri, B grubunda ise bu ilişkinin aynı gen bölgesinde çeşitli varyasyonlarla oluştuğu ve LKD varyantlarını içeren kornea distrofileri yer almıştır (Şekil 2.3). Bu kapsamlı çalışmanın ardından çok sayıda popülasyonda otozomal dominant kornea distrofisi hastalarında TGFBI geninde yer alan genetik varyasyonlar araştırılmıştır ve 70 farklı mutasyon rapor edilmiştir (33, 34). Birinci ve dördüncü FAS1 bölgesi mutasyonların en sık olarak rastlandıkları bölgeler olarak saptanmıştır, yani TGFBI geninin 4. ve 12. ekson bölgeleri mutasyonların en sık görüldüğü eksonlardır.



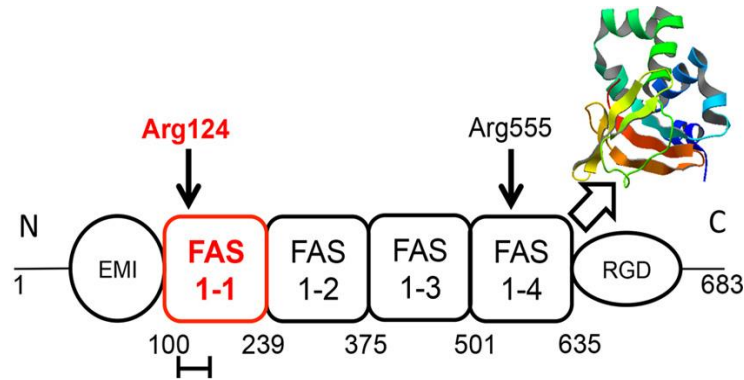
**Şekil 2.3.** TGFBI geninde saptanan mutasyonlar ve yerleşimi.

Munier ve arkadaşlarının TGFBI’de saptanan mutasyonları A ve B grubu olarak sınıflandırdığı gösterilmiştir (2).

Bu grupta yer alan GKD1 ve GKD2’de eksik baskınlık yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur. R124H mutasyonunun homozigot olduğu GKD2 hastalarının ve R555Q mutasyonunun homozigot olduğu GKD1 hastalarının bu mutasyona heterozigot olarak sahip olanlara göre daha erken yaşta daha ciddi belirtilerle karşılaştıkları ve daha erken yaşta keratoplastiye ihtiyaç duydukları gösterilmiştir (30, 35).

Bu heterojen hastalık grubunda Türkiye’den yapılmış üç çalışma mevcuttur. Koçak ve ark.’nın 2001’de yaptıkları çalışmada granüler kornea distrofilisi bir ailede TGFBI analiz edilmiş ve heterozigot olarak R555W mutasyonu hasta bireylerde saptanmıştır (36). Kıratlı ve ark.’nın 2001’de yaptığı çalışmada ise 26 GKD1 hastası içeren geniş tek bir ailede R555W mutasyonu heterozigot olarak tespit edilmiş ve hastaların fenotipik özellikleri vurgulanmıştır (37). Bu grup distrofililerde Türkiye’den grubumuz tarafından yapılan en geniş kapsamlı çalışmada farklı ailelere mensup 4 LKD1 hastasında R124C, 12 GKD1 hastasında ise R555W mutasyonu saptanmıştır (38).

TGFBI, 17 eksondan oluşmaktadır. Protein ürünü keratoepitelin ya da transforming growth factor  $\beta$  induced protein (TGFBIp) olarak adlandırılmaktadır. Keratoepitelin, 682 amino asitten oluşan 68 kDa ağırlığında bir proteindir (39). Protein, sekresyon sinyal dizisi, N-terminal sisteinden zengin bölge (EMI bölgesi), C-terminal hücre adezyonundan sorumlu integrinleri tanıyan bölge (Arg-Gly-Asp, RGD bölgesi) ve birbirine oldukça benzeyen 4 adet internal tekrar bölgesi içerir (**Şekil 2.4**). Bu bölgeler *Drosophila*'nın fasciclin-1 dizisi ile homolog olduğu için FAS1 bölgeleri olarak adlandırılırlar. EMI bölgesi protein-protein etkileşimleri için önemlidir. FAS1 bölgeleri adezyon bölgesi olarak önem taşır ve bağ dokunun stabilitesi için önemlidir (40). Bu protein hücre adezyonu, migrasyonu, proliferasyonu, apoptosisi ve angiogenezde önemli rol oynadığı düşünülen bir hücre dışı matriks proteindir (41). TGFBI *knock down* çalışmalarında zebra balığında somitogenez süreci bozulmuş; farede ise kemik dokuda bozulma, büyüme geriliği, spontan ve indüklenmiş kansere yatkınlık gözlenmiştir (42). TGFBI, gelişen nukal ve periodontal ligamentler, aort, böbrek, erişkin kornea, deri, mesane, kan ve kemik gibi çok sayıda dokuda ifade olmakla birlikte mutasyonları sonucunda oluşan anormal proteinler sadece korneada birikmektedir (43).



**Şekil 2.4.** TGFBIp yapısal modeli.

Sekresyon sinyal dizisi, N-terminal sisteinden zengin bölge (EMI bölgesi), C-terminal hücre adezyonundan sorumlu integrinleri tanıyan bölge (Arg-Gly-Asp, RGD bölgesi) ve birbirine oldukça benzeyen 4 adet internal tekrar bölgesi (FAS) gösterilmiştir (40).

Normal korneada keratoepitelin epitel, stroma, Desme membranı ve endotelde izlenmiştir. TGFBI'de yer alan mutasyonlar nedeniyle anormal keratoepitelin proteini üretilir (44). Korneada bu protein daha çok epitelde, sınırlı miktarda da keratositlerde

üretir ve kornea stroması içine girer. Ancak mutasyonlar nedeniyle normalde olduğu gibi metabolize edilemez ve birikir (28,45). Amiloid ve amiloid yapıda olmayan birikimlerin içeriklerini inceleyen birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların birinde: Amiloid yapıda olmayan birikimde keratoepitelin, serum amiloid-P komponenti, *clusterin*, keratin-3, histone H3-benzeri protein tespit edilmiştir. Amiloid yapıdaki birikimde ise benzer olarak serum amiloid-P komponenti, *clusterin*, ve farklı olarak 4. FAS1 bölgesinde yer alan Y571-R588 rezidülerini içeren C-terminal fragmanı, apolipoprotein A-IV, serin-proteaz HtrA1 tespit edilmiştir (46). Amiloid yapıdaki birikimlerde serin proteaz HtrA1 varlığı ve beraberinde keratoepitelin içerisindeki FAS1-4 bölgesinde yer alan kesim noktalarının bununla uyumlu olması amiloidojenik süreçte bu proteazın rol oynadığını göstermektedir (47). 2015 yılında yapılan başka bir çalışmada GKD1 birikimlerinde ve farklı varyasyonlara sahip LKD hasta kornealarından elde edilen birikimlerde tespit edilen proteinler kontrol kornealarda elde edilen proteinler ile karşılaştırılmıştır: R555W mutasyonu olan korneadaki birikimlerde 3 farklı protein tespit edilirken, stromadaki amiloid depozitlerde 18 farklı; Bowman tabakasındaki amiloid depozitlerde ise 24 farklı protein tespit edilmiştir. Bu çalışmada ayrıca amiloid depozitlerde TGFBIp'nin mevcut mutasyona göre farklı bölgelerden kesime uğradığını göstermişlerdir (48).

TGFBI'nin çok sayıda dokuda ifade olmasına rağmen sadece korneada birikmesinin sebebi henüz açıklık kazanmamıştır ancak korneadaki lokal faktörlerin ve protein-protein etkileşimlerinin bunda rolü olduğu düşünülmektedir. Keratoepitelin, biglikan ve dekorin gibi proteoglikanlar, fibronektin, kollajen, periostin, gibi çok sayıda hücre dışı matriks proteini ile etkileşmektedir (40). Kim ve ark. 2002'de biriken mutant keratoepitelin birikimleri içerisinde periostinin de biriktiğini göstermişlerdir ve bu durum keratoepitelin ile periostinin distrofilerin patogeneğinde birlikte rol oynayabileceklerini düşündürmüştür (49).

124. rezidü olan arjinin amino asidi bu hastalık grubunun yaklaşık yarısında kilit nokta olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu amino asitte gerçekleşen değişimlerin protein konformasyonunda yarattığı değişimlere yönelik kanıtlanmış veriler henüz yoktur. Bu noktada yer alan arjinin amino asidinin *C. elegans*, *D. melanogaster*, zebra balığı, tavuk, fare, köpek gibi pek çok canlıda korunduğu görülmektedir. Bu bölgede yer alan değişimlerin proteinin kimyasal yıkım, proteoliz gibi etkenler karşısında total

stabilitesini 4. FAS1 bölgesindeki mutasyonlarda olduğu gibi değiştirmedığı gözlenmiştir (50). 2002’de yapılan bir çalışmada keratoepitelinin amiloid oluşturma yatkınlığını belirleyen etmenler ortaya konmuştur: 124. amino asitin hangi amino asit olduğu, 112 ve 113. pozisyonda valin amino asidinin bulunması ve disülfid ve hidrojen bağlarının varlığı amiloid oluşumunu tetikleyen etmenler olarak bildirilmiştir. Birikimlerin sadece korneada gözlenip diğer dokularda gözlenmemesinin ise korneada glikozaminoglikanlar gibi yapısal diğer proteinlerle etkileşimin olması ile ve/veya korneanın iyon ve su transferine yarı geçirgen olan fizyolojik yapısı ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (51). Proteinin birikim oluşturma yatkınlığı dışında birikim oluşma mekanizmasında oksidatif stress (52), bozulmuş otofaji (53,54), mitokondri fonksiyon değişimleri (55), artmış TGF- $\beta$  sinyalinin (56) de etkili olabileceği elde edilen verilerle öngörülmekle beraber farklı birikimlerin oluşmasıyla sonuçlanan farklı mutasyonların neden olduğu süreç net olarak ortaya konamamıştır.

Kornea distrofilerinin genetik temeli büyük oranda açığa çıkmış olmakla birlikte aynı gendeki farklı mutasyonların neden farklı fenotiplere yol açtığı henüz açıklık kazanmamıştır. Yüksek oranda fenotipik çeşitlilik, eksik penetrans ve hayvan modellerinin yokluğu patogenezin anlaşılmasını zorlaştırmaktadır.

Bu hastalık gruplarında hayvan modeli oluşturulmasına yönelik sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. R555W mutasyonunu taşıyan insan TGFBI ile farede hastalık modeli oluşturulamamıştır; retinal problemler ve erken yaşlanma izlenmiş ancak korneal opasite gözlenmemiştir (57). İnsan TGFBI’nın yüksek oranda ifadesi ile farelerde yapılan bir diğer çalışmada korneal opasite oluşumu izlenmiştir. Ancak opasitenin klinik görünümü insanlardaki klinik görünümle uyumlu değildir ve opasitelerin birikim sonucu olup olmadığına dair bir çalışma yapılmamıştır (58). Yamazoe ve ark. 2015’de yaptıkları çalışmada R124H mutasyonunu içeren insan TGFBI genini kullanarak farede GKD2 modeli oluşturmayı başarmışlardır. Ancak bu model insanda görülen hastalıktan bazı yönleriyle farklılıklar göstermektedir. Amiloid birikimi bu modeldeki tüm farelerde gözlenmemiştir. Homozigot farelerde hastalık insanlarda olduğu gibi daha ağır bir fenotip ortaya koymamıştır. Bu durumda farelerde patogenezde farklılıklar olduğu düşünülmüştür (59).

### 2.2.3 TGFBI-İlişkili Kornea Distrofilerinde Tedavi

Kornea distrofilerinde temelde uygulanan iki tedavi mevcuttur. Birikimlerin yüzeysel olduğu gruplarda terapotik lazer keratektomi (PTK) uygulanır. Kornea distrofilerinin daha uzun soluklu başarılı tedavi yöntemi şu an için keratoplasti olarak karşımıza çıkmaktadır. Her iki tedavide de önümüze çıkan en önemli sorun hastalığın tekrarmasıdır (60). Henüz elimizde birikimlerin oluşmasını yavaşlatan, durduran ya da var olan birikimlerin yok olmasını sağlayan bir tedavi mevcut değildir. Fotodinamik lazer tedavisi (61), anti-TGFBIp tedavisi (62), Lityum iyonu aracılı TGFBI ifadesinin baskılanması (63) ve RNA-interferans temelli tedaviler (64) ise halen üzerinde çalışılan tedavi seçenekleridir. Ayrıca özellikle GKD2 hastalarında bozulmuş otofajinin patogeneizde sorumlu olduğuna dair çalışmalar mevcuttur ve bu çalışma sonucunda otofaji aktivasyonu sağlayabilen rapamycin, melatonin ve lityumun bu hastaların tedavisi için kullanılabileceğine dair görüşler mevcuttur (54).

### 2.3 Zebra Balığı

Zebra balığı (*Danio rerio*) tropik bir balık olup biyomedikal araştırmalarda gittikçe artan bir popüleriteye sahiptir. Bunun nedenleri, jenerasyon zamanının kısalığı, düşük maliyeti, kolay bakımı, embriyoların optik transparan olması ve gen manipulasyonlarının kolaylığıdır. Optik transparanlık ve gelişimin uterus dışında olması görüntülemeyi de çok kolaylaştırmaktadır. Ayrıca doğurganlığın yüksek olması nedeniyle bir balıktan haftada 200-300 embriyo elde edilebilmesi, gelişimin hızlı olması ve major organların fertilizasyondan 24 saat sonra oluşması en önemli avantajlarıdır. Bu özellikleri nedeniyle yüksek ölçekli ilaç araştırmalarında da çok tercih edilirler. Zebra balığı larvalarının 96 kuyucuklu haznelere yerleştirilerek ve binlerce embriyonun eş zamanlı olarak yüksek ölçekli ilaç taramalarında kullanılabilmesi ilaç araştırmaları için ne kadar önemli olduklarını göstermektedir (65). Ayrıca zebra balığında dinamik hücre süreçlerini *in vivo* olarak ve belirli zaman aralıklarında canlı üzerinde incelemek mümkündür. Hastalık durumunda canlı dokusundaki görüntüyü alabilmek ve gerçek zamanlı olarak patolojiyi gözleyebilmek zebra balığı ile çalışmanın en önemli avantajıdır. Zebra balığı genomu tamamı ile bilinmektedir (66). Tek dezavantajı, genlerin çoğunun iki kopya olmasıdır.

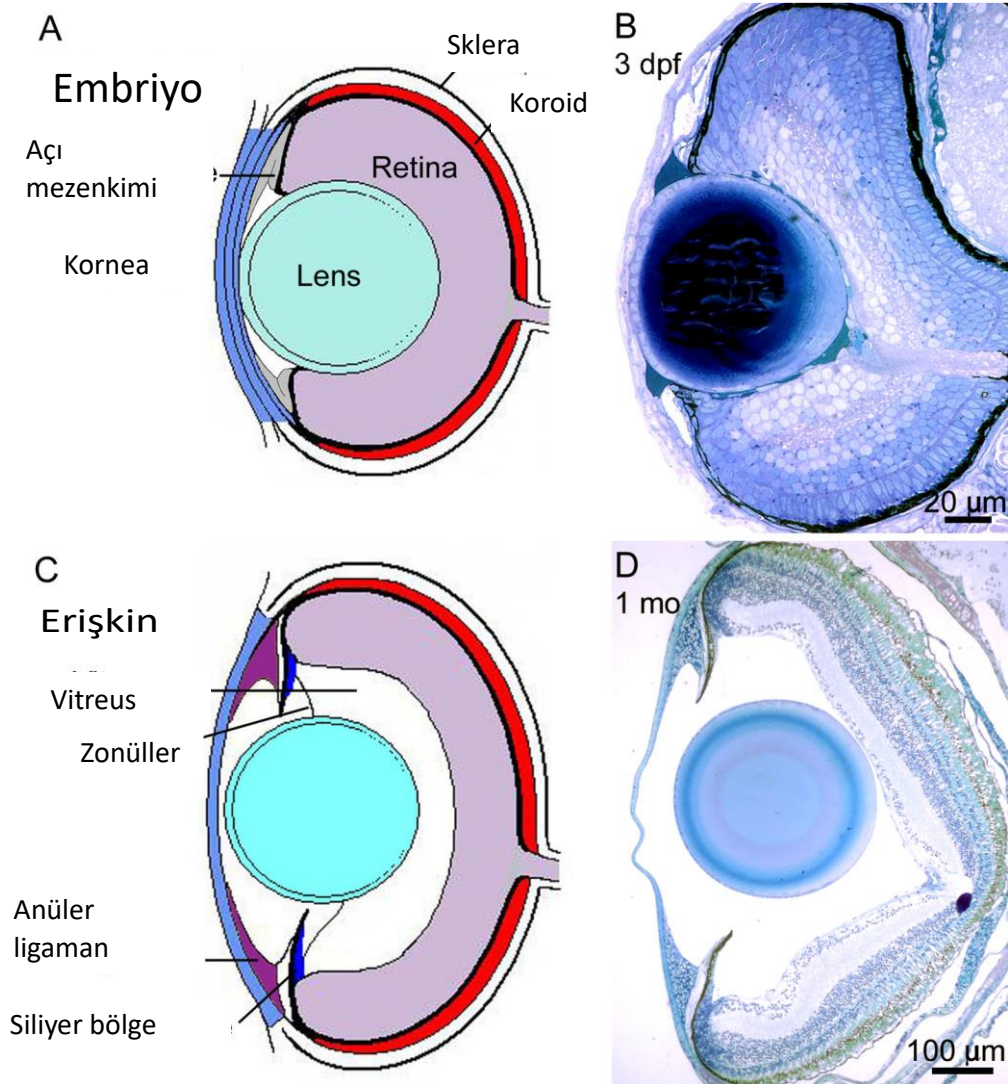
Zebra balığına hastalık modellerinin oluşturulmasında son yıllara kadar en sık kullanılan temel yaklaşımlar rastgele mutagenез veya morfolino ile gen ifadesinin baskılanması idi. Bu yaklaşımlar hastalık geninin saptanmasında ve validasyonunda halen çok önemlidir. Birçok insan hastalığı zebra balığında başarılı bir şekilde modellenmiştir. Ancak gene özgül hedeflenmenin olmaması ve hastalık modelinin sürekliliğinin sağlanamaması bu modellerin kullanımlarını kısıtlamaktaydı (67). Ancak son yıllarda genom düzenleme teknolojilerinin kullanılmasıyla birlikte TALEN ve CRISPR/Cas9 sistemleri zebra balığında gene özgül hedefleme ve süreklilik imkanı verdi ve bu sayede hastalıkların modellenmesinde bu sistemler kullanılmaya başlandı.

### 2.3.1 Zebra Balığı Korneası

Zebra balığında korneanın embriyolojik gelişiminin insanla benzer özelliklerinin olduğu ortaya konmuştur (5, 68) (Şekil 2.4). Zebra balığı korneası da insan korneası gibi beş farklı tabakadan oluşmaktadır: Epitel tabakası, Bowman tabakası, stroma tabakası, Desme membranı ve endotel tabakası (5). Kornea içeriğinin de benzer olduğu yapılan immünohistokimyasal çalışmalarda gözlenmiştir: BIGH3, keratin 3 (K3) ve kornea keratansülfat proteoglikanı (KS) hem 24 saatlik embriyoda hem de 3 aylık erişkin zebra balığı korneasında insan korneası ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir ve benzer lokalizasyonlarda ve benzer miktarlarda belirteç sayılabilecek bu proteinlerin ifadesi gösterilmiştir (4).

Zebra balığı ve insan korneası arasındaki benzerliğin yanısıra birtakım farklılıklar da tespit edilmiştir. Tip 1 kollajen ifadesi erişkin zebra balığı korneasında insan korneasından farklı olarak stromanın dışında daha az olmakla birlikte epitel tabakasında da izlenmiştir. Zebra balığında göz kapağı yoktur ve bu nedenle gözün epitel tabakası dış etkenlere daha fazla maruz kalmaktadır, tip 1 kollajenin epitel tabakasını bu açıdan daha dayanıklı sağlayabileceği düşünülmüştür (4). İnsan ve zebra balığı korneasındaki önemli sayılabilecek bir diğer farklılık ise kornea kalınlığıdır. Erişkin zebra balığı korneası 20 µm kalınlığına sahiptir, insan kornea kalınlığı ise 600 µm kadardır (69). Tüm göz boyutu insan ve zebra balığında karşılaştırıldığında da kornea göreceli olarak ince kalmaktadır. Ayrıca stromanın kornea kalınlığına katkısı da insan korneası ile karşılaştırıldığında daha azdır: %30-40 vs %90 (4,69). Zebra balığı korneasındaki bir diğer farklılık da kornea endotel tabakasının daha gevşek

organizasyonudur. Endotel hücreleri arasındaki hücreler arası bağlantılar zebra balığında ilk 4 haftada gelişirken epitel hücrelerinin çok daha erken dönemde sıkı bağlantılarla birbirine bağlandığı izlenmiştir. Bu da balık korneasında kornea epitelinin endotelden daha öncelikli bir bariyer fonksiyonu yaptığını göstermektedir (4).



**Şekil 2.5.** Zebra balığı gözünün embriyonik ve erişkin dönemde karşılaştırılması.

A. Zebra balığı embriyosunda şematik görünüm, B. Zebra balığı embriyosunda histolojik görünüm, C. Erişkin zebra balığında şematik görünüm, D. Erişkin zebra balığında histolojik görünüm izlenmektedir (68).

Yapılan TEM incelemelerinde, insan korneasında stromadaki kollajen tabakaların ön stromada Bowman tabakasının hemen altında yoğunlaştığı izlenirken, zebra balığında böyle bir yoğunlaşma izlenmemiştir. Bu yoğunlaşma insan



korneasında kırıcılıkta önemli olan ön kornea eğriliğinin sağlanması açısından önemlidir. Zebra balığında ise diğer suda yaşayan canlılarda olduğu gibi ön kornea eğriliğinin kornea kırıcılığına bir etkisi olmamaktadır (5). İnsan korneasında kollajen tabakaları daha kalınken ( $835 \pm 22$  nm) zebra balığında bu tabakalar daha ince ( $305 \pm 77$  nm) olarak tespit edilmiştir. Ayrıca kollajen fibrilleri de daha ince (18 nm vs 23 nm) ve aralarındaki proteoglikan alanları da daha büyük olarak izlenmiştir (490 vs 110 nm) (5).

Zebra balığında korneanın oluşumu 20. saatte başlamaktadır. Kuşlarda ve primatlarda olduğu gibi endotel hücre ve keratositler korneaya iki farklı dalgada ulaşmaktadır. Zebra balığında farklı olarak ikinci dalga gecikmektedir. Zebra balığında kornea yapısı olgun yapısına 28. günde ulaşmaktadır. Bu dönemde %90 oranında saydamlığa erişmektedir (5,70).

Kornea distrofilerinin çalışılması için zebra balıklarının uygun model organizmalar olabileceği düşünülmektedir. Zebra balığında kornea yapısının insan korneasına benzerliği bu açıdan önemlidir. Bowman tabakası zebra balığında açıkça mevcutken (4,5,71), farelerde bu tabakanın varlığı tartışmalıdır (72-74). Bu tabaka RBKD gibi kornea distrofilerinde birikimin gerçekleştiği tabakadır, ayrıca bu tabaka kornea yara iyileşmesi, keratokonus gibi hastalıklar açısından da önemlidir. Bu özellik zebra balıklarına kornea hastalıklarının modellenmesi açısından bir avantaj sağlamaktadır. Çok sayıda kornea proteininin insan ve zebra balığında ortak olması, zebra balığı korneasının bir ay gibi kısa bir sürede erişkin kornea özelliklerine kavuşması ve embriyolojik dönemde gelişiminin gözlenebilir olması da modellemede zebra balığını ön plana çıkarmaktadır. Zebra balığında kornea epitel tabakası insan ve fareye göre toplam kornea kalınlığının daha büyük bir oranını oluşturmaktadır. Stroma tabakası ise göreceli olarak daha incedir (5). Bu durum epitelde sentezlenip stromada birikim yapan keratoepitelin gibi proteinler için hastalık modelinin oluşturulması konusunda zebra balığı lehine bir avantaj olarak düşünülebilir. Çok sayıda insan kornea distrofisinden sorumlu olan TGFBI tek kopya olarak zebra balığı genomunda yer almaktadır, iki kopya değildir. Zebra balığında korneanın gelişimi esnasında TGFBI geninin ürünü olan keratoepitelin proteininin varlığı stromada gösterilmiştir (4). TGFBIp amino asit dizisi zebra balığı ve insanda %64 oranında homoloji göstermektedir. Bu genin ifade paternlerinin de insan ve zebra balığında uyumlu

olduğu izlenmiştir. Bu gende saptanan mutasyonların çoğu zebra balığı ve insanda korunmuş bölgelerde yer almaktadır. R124 zebra balığında korunurken R555 korunmamıştır. Özellikle, dizideki 124. arjinin amino asidinin farklı kornea distrofilerinin ortaya çıkışında etkili olması ve bu arjinin amino asidinin zebra balığında da korunmuş olması; bu hastalıkların zebra balığında modellenmesine uygun zemin oluşturmaktadır. Henüz zebra balığında bu hastalık grubu çalışılmamıştır.

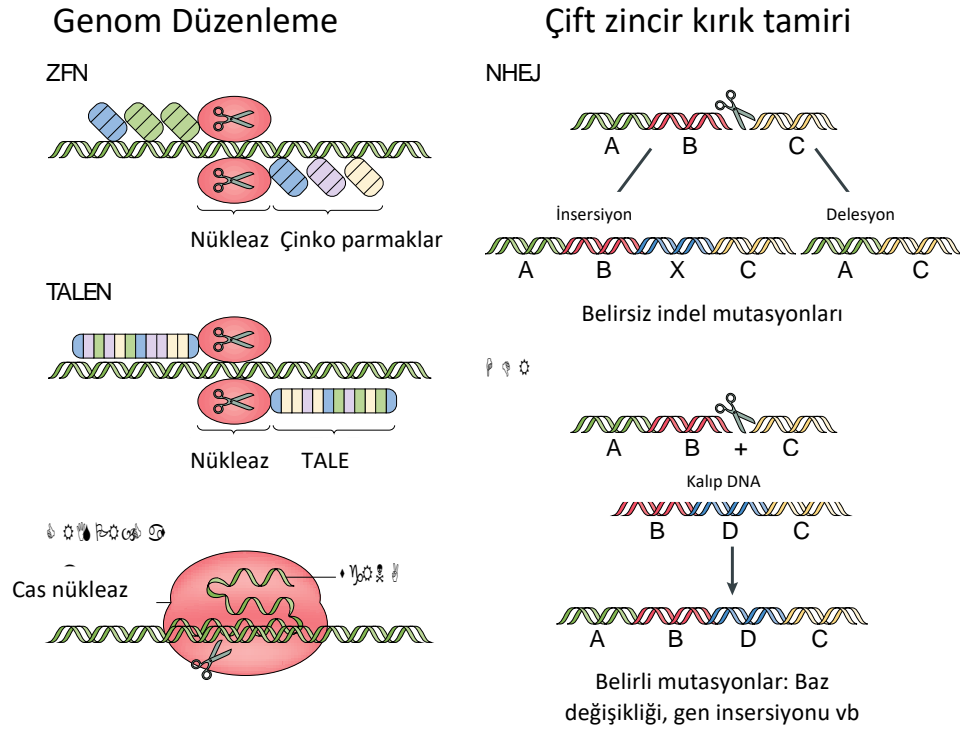
## **2.4 Genom Düzenleme Teknolojileri**

Genom düzenleme teknolojilerinin ortaya çıkışı ile birlikte araştırmacılar hızlı ve daha ekonomik bir şekilde istedikleri her canlının genomunda hedefledikleri bölgede özgül değişiklik yapabilme kapasitesine kavuşmuşlardır. Bu teknoloji hem araştırma hem de genetik hastalıkların tedavisi konusunda oldukça önemli bir gelişme olarak anılmaktadır.

Genom düzenleme mekanizması temelde hedef DNA dizisinde çift zincir kırık oluşturma ve hücrenin kendi DNA tamir mekanizmalarının uyarılmasına dayanmaktadır (75,76). Bu teknolojinin gelişiminde DNA'da kırık oluşturmak için farklı platformlar keşfedilmiştir. Bu platformlar arasında meganükleazlar, çinko parmak nükleazlar, transkripsiyon aktivatör benzeri efektör nükleazlar (TALEN) ve CRISPR/Cas9 yer almaktadır (Şekil 2.6).

### **2.4.1 Meganükleazlar**

Meganükleazlar tanımlanan ilk hedefli nükleaz grubudur. LADLIDADG ailesi bu enzimlerin en büyük grubunu oluşturmaktadır. Bu grupta yer alan nükleazların hedef özgülüklerini değiştirmek için protein mühendisliği gerekmektedir. Boyutlarının 20-37 kDA gibi göreceli ufak oluşu ve 14-40 bç kadar uzun bir diziyi tanıyabilme özellikleri başlıca avantajlarıdır (77). Tek viral vektöre paketlenerek taşınabilmeleri kolaylık sağlarken, DNA'yı tanıma ve kesme bölgeleri birbirinden ayrılmadığı için yeni hedefleri tanıyabilen monomerik enzimlerin tasarımının pahalı, zaman alıcı ve zor olması bu grubun genom düzenleme aracı olarak kullanımını kısıtlamıştır (75).



**Şekil 2.6.** Genom düzenleme araçları ve hücre içi tamir mekanizmaları.

ZFN, TALEN, CRISPR/Cas genom düzenleme araçları (solda) ve çift zincir kırık tamir mekanizmaları olan NHEJ ve HDR (sağda) gösterilmiştir (132).

### 2.4.2 Çinko-Parmak Nükleazlar (ZFN)

Çinko-parmak nükleazlar FokI kaynaklı DNA-kesimi yapan bölge ve Cys2-His2 bölgesinden oluşan DNA bağlanma bölgesinden oluşan hibrit proteinlerdir (78). Çinko atomu varlığında DNA'nın büyük oluşuna özgül olarak bağlanırlar. Çinko-parmak nükleazlar, bu şekilde tanıma bölgelerinin 3 veya 6'sının arka arkaya dizilmesiyle ve 9-18 bç tanımlarıyla oluşurlar. Ayrıca nükleazın aktif olması için hedef bölgeye iki ZFN'nin dimer halinde bağlanması gerekmektedir. Bu nedenle her ZFN hedef bölgesi dimer halindeki FokI nükleazın bağlandığı 5-7 bç'lik aralayıcı bölgeyi ve bunun her iki yanında Çinko-parmakların bağlandığı bölgeyi içermelidir (79). ZFN'ler de meganükleazlarda olduğu gibi yeni hedef için protein mühendisliği ile yeni protein sentezi gerektiğinden kullanımı zordur. Ancak, ZFN'ler genom düzenleme uygulamalarında zebra balığı da dahil pek çok canlıda denenmiştir ve genetik hastalıkların tedavisinde onay bekleyen veya kullanıma sunulmuş ZFN platformunu içeren ürünler mevcuttur (80).

### 2.4.3 Transkripsiyon Aktivatör Benzeri Efektör Nükleazlar (TALEN)

TALEN'ler DNA üzerinde istenilen bölgeye bağlanarak çift zincir kırıkları oluşturan genom mühendisliği ile oluşturulmuş yapay moleküllerdir. TALEN'ler ZFN'lar gibi kimerik nükleazlardır. FokI endonükleaz bölgesi ve değiştirilebilir DNA bağlanma bölgesinden meydana gelirler. Transkripsiyonu aktive eden proteinlere benzer efektörler olarak isimlendirilen TALE proteinleri, bitki patojeni olan *Xanthomas* bakterisinde keşfedilmişlerdir ve oldukça korunmuş 33-35 amino asitten oluşan tekrarlardan oluşurlar (81,82). DNA'ya özgül bağlanmayı sağlayan ise bu korunmuş dizideki 12. ile 13. amino asitlerin oluşturduğu tekrar değişken bölgeleridir (RVD). RVD kodunun çözülmesi ile TALEN'lerin istenildiği şekilde değiştirilebilmesi ve genomda her bölgenin hedeflenmesi mümkün hale gelmiştir (8,83). TALE dizilerini sentezlemek için çok sayıda platform mevcuttur: Standart klonlama tekniği, Golden Gate klonlama sistemi, katı faz biraraya getirme sistemi ve ligasyon bağımsız teknikler (78). Nükleaz bölgesi FokI'den oluştuğu için TALEN sistemi de kırık oluşturmak için dimerizasyon gerektirir, bu durum sistemin özgüllüğünü arttırmaktadır (84). TALEN hedef bölgesi, karşılıklı DNA zincirlerinde TALE bağlayıcı hedef bölgeleri içeren ve bunların arasında FokI nükleazların bağlandığı 12-20 bp'den oluşan aralayıcı bölgeyi içerir. TALEN için hedef bölge seçilirken tek kısıtlama hedef dizinin 5' ucunda timidin bulunması zorunluluğudur. Bu nükleotidin TALEN konstraktının N-terminal bölgesi ile etkileşime geçtiği gösterilmiştir (83).

TALEN konstraktlarının yeni hedef diziler için sentezi ZFN'dan daha kolay ve daha ekonomik olduğu için genom düzenleme için ZFN'dan daha sıklıkla tercih edilen bir platform haline gelmiştir. TALEN'ler yüksek oranda dizi özgüllüğü göstermelerinin yanında çok düşük düzeyde *off-target* (hedef dışı bağlanma) etki gösterirler. TALEN'in diğer önemli bir avantajı, hedef bölge seçiminde hiçbir dizi kısıtlaması getirmemesidir, ancak özgül TALEN konstraktlarının hazırlanışı birçok klonlama basamağından oluşup zahmetlidir. TALEN'in en önemli dezavantajı ise boyutunun büyük olması nedeniyle *in vivo* taşıma sistemleri için zorluk yaratmasıdır (80).

#### 2.4.4 CRISPR/Cas9

En son keşfedilen genom düzenleme platformu CRISPR (düzenli aralıklarla bölünmüş kısa palindromik tekrar kümeleri) ve onunla birlikte çalışan nükleaz Cas9'dur. Aslında bu sistem prokaryotların virüslere ve plazmidlere karşı adaptif bağışıklık sisteminin bir parçasıdır. Bu sistemlerden biri olan ve *Streptococcus pyogenes*'de bulunan tip II'nin farklı bileşenleri bulunmaktadır: Nükleaz (Cas9), hedef diziyeye komplementer olan 20 nükleotit içeren kılavuz RNA (gRNA) ile DNA'ya bağlanan CRISPR RNA (crRNA) ve crRNA-Cas9'a köprüsünü kuran trans-aktive edici crRNA (tracrRNA) (85). Bu sistemin iki bileşeni olan tracrRNA ve crRNA tek kılavuz RNA (sgRNA) halinde biraraya getirilip tek komponent haline getirilmiştir ve sadece bu komponentte hedef DNA dizisine komplementer olan kısmın dizisini değiştirerek CRISPR/Cas9 sistemini DNA'da farklı bir hedefe yönlendirmek mümkün olmaktadır (86). Bu iki bileşenli sistem mayalarda, memelilerde başarı ile kullanılmıştır. Hedef dizinin SpCas9 tarafından tanınabilmesi için hedef DNA dizisinin 3' ucunda PAM dizisi (*Protospacer adjacent motif*) olarak adlandırılan NGG bulunması gerekmektedir. DNA çift zincir kırığı PAM dizisinin 3 bç yukarisından gerçekleşir (80). Doğada SpCas9 dışında çok sayıda Cas9 ortoloğu bulunmaktadır. Cpf1 bunlardan biridir ve farklı bir PAM dizisine sahiptir (TTN), ayrıca SpCas9'dan farklı olarak yapışkan uçlu kırık oluşmasını sağlar (87,88). *S. aureus*'tan elde edilen Cas9 ise yine farklı bir PAM dizisine sahiptir (NNGRRT) ve hücrelere taşınmasında kolaylık sağlayacak şekilde SpCas9'a göre daha ufak boyuttadır (89). Ek olarak mevcut Cas9 proteinleri mühendislikle değiştirilerek farklı PAM dizilerini tanıyan ve farklı özelliklere sahip Cas9 varyantları da yapılmaktadır (90). Tüm bunlar CRISPR/Cas9 sistemi ilk keşfedildiğinde yaygın kullanımında kısıtlamaya neden olan sınırlı sayıda dizi tanıma dezavantajının aşılmasını sağlamıştır.

CRISPR/Cas9 sistemi diğer genom düzenleme platformlarına göre sentezinin kolaylığı, ekonomik oluşu nedeniyle avantajlıdır. En önemli dezavantajı ise spesifik olmayan hedef dışı etkilerinin diğer platformlara göre daha yüksek oluşudur. Ancak bu hedef dışı etkilerin öngörülmesini sağlayabilen "CRISPRScan" gibi çok sayıda biyoinformatik araç mevcuttur (80).

### 2.4.5 Endojen Hücre Tamir Mekanizmaları

Canlı hücrelerde çift zincir kırıkları iki onarım mekanizmasıyla ile tamir edilmektedir: Homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) ve homolog rekombinasyon (HDR) (91). NHEJ sırasında kırık uçlar birleştirilirken küçük insersiyon ve delesyonlar (*indel*) meydana gelir ve bu durum çerçeve kayması ile sonuçlanarak proteinde fonksiyon kaybı ile sonuçlanabilir ya da daha az sıklıkta çerçeve kayması olmaksızın proteinde sadece amino asit değişikliğine neden olur. Bu kırık *splicing* bölgesinde ya da transkripsiyon faktörü bağlanma bölgesinde de olabilir (92). Ortamda kırık oluşan bölgeye homolog veya benzer dizileri içeren kalıp DNA mevcutsa, homolog rekombinasyon ile hatasız bir tamir gerçekleşir. Canlı ve bölünebilen hücrelerde kardeş kromatitler sayesinde bu tamir mekanizması kullanılır. Genom düzenleme sırasında ise bu tamir mekanizmasını kullanabilmek için dışarıdan kesim gerçekleşen bölge ile homolog dizi içeren plazmit ya da tek zincirli oligonükleotit (ssODN) verilerek tamirin HDR yoluyla gerçekleşmesi sağlanabilir (93). Hücrelerde NHEJ tamir mekanizması HDR'ye göre çok daha aktiftir bu nedenle genomda HDR kullanarak kesin öngörülebilir değişiklikleri gerçekleştirmek çok daha zordur. Hücrelerde HDR etkinliğini arttırmak için NHEJ yolağındaki enzimleri baskılayan ajanlar kullanılmaktadır. Kalıp DNA'da değişimlerle HDR etkinliğini artırma çalışmaları mevcuttur. Nükleaz modifikasyonu, baz-editleme, nikaz kullanımı ve NHEJ yolunu kullanarak *knock-in* gerçekleştirme çalışmaları da hedefte öngörülebilir değişiklikleri yüksek etkinlikte gerçekleştirmek için denenmekte olan yöntemlerdir (94).

Literatürden elde edilen bu bilgilere dayanarak, zebra balığının tek kopya olan *tgfb1* geninde hedef bölgede TALEN ya da CRISPR/Cas9 teknolojisini kullanılarak varyasyon oluşturulması mümkün görülmektedir. Bu varyasyon sonucunda zebra balığı korneasında meydana gelecek patolojik değişimleri embriyolojik gelişim aşamasında ve erişkin zebra balığında takip ederek insan kornea distrofilerinin oluşum mekanizmaları hakkında bilgi sahibi olunabilir, bu hastalıkların zebra balığı modeli oluşturulabilir ve bu hastalıklara tedavi geliştirilmesi aşamasında bu model kullanılabilir.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Gereçler

##### 3.1.1. Zebra Balığı Bakımı, İdamesi ve Çiftleştirilmesi

Embriyo solüsyonu (60X stok):

- NaCl (Merck): 5 mM
- KCl (Carlo Erba): 0,17 mM
- CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (Sigma): 0,33 mM
- MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (Merck): 0,33 mM
- Metilen mavisi, %0,01 (Sigma)

Kullanılan yemler:

- Toz artemia, 100 mikron (Gemma)
- Granül yem, 500 mikron (Gemma)
- Artemia yumurtası (Salt Lake Aquafeed, Premium Artemia Cyst)

##### 3.1.2. Zebra Balığı Embriyosundan DNA İzolasyonu

50 mM Sodyum hidroksit (NaOH) (Merck)

40mM Tris-Hidroklorik asit (Tris-HCl), pH:8,0 (Sigma)

##### 3.1.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Taq Polimeraz Kit (Thermofischer Scientific)

*Thermal Cycler* (Thermofischer Scientific MiniAmp Plus)

Primerler (*Forward* ve *Reverse*), 10 uM

dNTP set, 100 uM (Roche)

##### 3.1.4. Agaroz Jel Elektrofrezisi

Agaroz (Biomax)

TAE (Tris-Asetat-EDTA) tamponu, 50X (pH 8,0)

*Orange G* boyası (Merck)

EtBr (Etidyum bromür) (Sigma)

Moleküler ağırlık belirleyicisi (100 bç) (Bioline)

### 3.1.5. DNA Dizi Analizi

*BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, 4336917)

Hi-Di Formamid (Applied Biosystems)

*Genetic Analyzer 10X Running Buffer with EDTA* (25 ml) (Applied Biosystems)

3130 POP-7 Polimer (7 ml) (Applied Biosystems)

3130-*Avant Capillary array*, 4 x 36 cm *Capillaries* (Applied Biosystems)

3M Sodyum asetat, pH: 5 (Carlo Erba)

Etanol, %100 ve %70 (Carlo Erba)

### 3.1.6. TALEN Konstraktlarının Hazırlanması ve TALEN mRNA Sentezi

*ZiFiT Targeter Version 4.2* (Zinc Finger Consortium) çevrimiçi yazılımı

Her bir TALE tekrarını kodlayan plasmid kütüphanesi (bkz. Addgene: <http://www.addgene.org/talengineering>)

Homodimerik TALEN ifade vektörleri (pJDS70, pJDS71, pJDS74 ve pJDS78)

Heterodimerik TALEN ifade vektörleri (sol TALEN için pMLM290, sağ TALEN için pMLM292)

NEB 5-alpha kompetant E. Coli bakterileri (High Efficiency, DH5a derivative, recA1, reduced recombination, NEB cat. no. C2987)

Agar, bakteriyoloji kullanımı saflığında (AppliChem)

Sıvı *Lysogeny broth* (LB) besiyeri (pH 7,0-7,5)

Katı LB besiyeri

*Ampicillin* (Sigma, cat. No C1389)

*New England Biolabs* Restriksiyon Enzimleri ve Bufferlar: BamHI (cat. no. R0136S), BamHI-HF (cat. no. R3136S), BbsI (cat. no. R0539L), BsaI (cat. no. R0535L), BsmBI (cat. no. R0580L), ve KpnI-HF (cat. no. R3142L), PmeI (cat. no. R0560S)

T4 DNA Ligaz (New England Biolabs, cat. No. M2200L)

*NucleoSpin Plasmid Miniprep* kit (Macherey-Nagel, Cat. No. 740588.50)

TALEN tekrarları sekansı için M13-pUC-F primeri

Sekans primeri OK163: 5' CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC 3'

Sekans primeri JDS2978: 5' TTGAGGCGCTGCTGACTG 3'



Sekans primeri JDS2980: 5' TTAATTCAATATATTCATGAGGCAC 3'

Sekans primeri: 5' CTGGCGCAATGCGCTCAC 3'

*Gel and PCR Purification Kit*, Promega

*mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra Kit* (Ambion)

*MEGAClear kit* (Ambion)

*Quantifluor RNA System* (Promega)

### **3.1.7. CRISPR/Cas9 Konstraktlarının Hazırlanması, CRISPR/Cas9 mRNA Sentezi ve Kalıp DNA Hazırlığı**

CHOPCHOP (<http://chopchop.cbu.uib.no/>) veri tabanı

CRISPRScan (<https://www.crisprscan.org>) veri tabanı

pDR274 vektörü (Addgene #42250)

pCS2-Cas9 vektörü (Wellcome Trust Sanger Institute)

*Annealing buffer*, 10X (400 mM Tris pH 8.0, 200 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM NaCl, 10 mM EDTA pH 8.0.)

BsaI Enzimi (NEB, cat. no. R0535L)

*Zymoclean Gel DNA Pürifikasyon Kiti* (Zymo Research)

T4 DNA Ligaz (New England Biolabs, cat. No. M2200L)

*Kanamycin* (Sigma, cat. No 60615)

Sekans primeri: M13 Forward (-20) (ThermoFisher)

DraI enzimi, 20000 units/ml (NEB)

*RiboMAX Large Scale RNA Production kit*, T7, P1300 (Promega)

*Hybrid-R miRNA pürifikasyon kiti* (GeneAll)

NotI enzimi, 10000 units/ml (NEB)

*mMessage mMachin* SP6 kit (Ambion)

3 M Sodium acetate, pH 5.2 (Quality Biological, cat. no. 351-035-721)

Saf etil alkol (Sigma-Aldrich, cat. no. 459844)

*MAXIScript SP6 Transcription Kit* (Thermo Fisher Scientific, cat. no. AM1308)

*Phusion High Fidelity DNA Polymerase and associated 5× buffer* (NEB, cat. no. M0530S)

Cas9 nükleaz proteini, *S. pyogenes* (NEB)

*HiScribe T7 Quick High Yield RNA Synthesis Kit* (NEB, cat. no. E2050S)

*RNA Clean and Concentrator-5 Kit* (Zymo, cat. no. R1016)

*Annealing buffer, 10X:*

- 1M Tris pH 8: 400 µl
- 1M MgCl<sub>2</sub>: 200 µl
- 5M NaCl: 100 µl
- 0,5M EDTA, pH 8: 20 µl
- Distile H<sub>2</sub>O: 280 µl

### **3.1.8. Zebra Balığı Embriyolarına Mikroenjeksiyon**

Çiftleştirme tankları

Stereomikroskop

Mikrokapiller tüpler (Borosilicate Standard Wall without Filament, 1.0 mm OD, 0.58 mm ID, 152 mm)

*Needle puller*, P-30 Vertical Micropipette puller (Suter Instruments, USA)

Nitrojen gazı ve PLI-90 Pico-Injector

İnkubatör 28,5 °C

Mineral yağı (Sigma-Aldrich, cat. no. M5904)

Enjeksiyon cetveli (FYSCOPE Dia24 mm eyepiece graticule)

Mikroenjeksiyon kalıbı

### **3.1.9. T7 Endonükleaz Enzim 1 ile Kesim Analizi (T7EI)**

T7 Endonükleaz I, 10000 U/ml (NEB)

*NEB II Buffer*, 10X (NEB)

### **3.1.10. Restriksiyon Enzimi ile Kesim Analizi (RFLP)**

ApaI enzimi, 5000 U/ml (NEB)

*Cut smart buffer*, 10X (NEB)

### **3.1.11. Zebra Balığı İskelet Kası Dokusundan Protein İzolasyonu**

Protein izolasyon tamponu (pH 7.4)

- Tris HCl: 0,5M

- EDTA: 0,5 M
- SDS: %20
- Proteaz inhibitör tableti (Roche)

#### Laemmlı Tampon

- Tris HCl: 100 mM
- SDS: %2
- Gliserol: %20
- B-Mercaptoetanol: %4
- Bromfenol: %0.01

#### RIPA Tampon

- Tris-HCl: 50 mM
- EDTA: 1 mM
- Triton X-100: %1
- *Sodium deoxycholate*: 0.5%
- SDS: %0,1
- NaCl: 150 mM

Sonikatör (Sonics Vibra Cell, işlemci modeli VCX 130, prob modeli CV18)

*Bicinchoninic Acid (BCA) Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific Inc., NH, USA)

### **3.1.12. Zebra Balığı Göz Dokusunda Histokimyasal Boyamalar**

Alkol (Limco)

Hematoksilen (Merck)

Eozin (Merck)

Asetik asit (Merck)

Potasyum Alimunyum Sülfat (Riedel de Haen)

HCL (Merck)

Amonyak (Carlo Erba)

Masson trikrom (BDH)

Kongo kırmızısı (BDH)

*Crytome* cihazı (Thermo Shandon)

Etüv

### 3.1.13. Western Blot Analizi

%30 Akrilamid / bisakrilamid (Sigma/Carlo Erba)

1,5 M Tris, pH: 8,8 (Sigma)

1 M Tris, pH: 6,8 (Sigma)

% 10 SDS (Carlo Erba)

% 10 amonyum persülfat (APS) (Sigma)

TEMED (Sigma)

Mini Protean II elektroforez seti (Bio-Rad)

Laemmli yükleme tamponu (2x)

*Precision Plus Protein™ Dual Color Standarts* (mol wt 10,000-250,000 Da)  
(Bio-Rad)

Yarı kuru elektroforetik transfer cihazı (Bio-Rad, TransBlot Turbo Transfer System)

Nitroselüloz membran (0,45µm kalınlığında) (Thermo Scientific)

Whatmann filtre kağıdı

*Ponceau S* çözültisi

*Coomassie Blue* çözültisi

Yağsız süt tozu

Tavşan poliklonal Anti-TGFBI (Sigma, AV44268)

Fare monoklonal Anti-beta Actin, HRP konjuge (Abcam, ab49900)

Keçi Anti-Tavşan IgG (H+L) HRP konjuge (Invitrogen)

*SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate* (Thermo Scientific)

*GeneGenome5* kemilüminesans görüntüleme cihazı (Syngene)

## 3.2. Yöntemler

### 3.2.1. Zebra Balıklarının Bakımı ve Etik Kurul İzininin Alınması

Tez kapsamında, zebra balıklarında planlanan çalışmalar için Hacettepe Tıp Fakültesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu'na başvuru yapılmıştır. Tez önerisi gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve etik açıdan

araştırma yapılması için uygun bulunduğu 05.11.2015 tarihli ve 2015/76-1 karar numaralı değerlendirme raporuyla bildirilmiştir.

Çalışmada Hacettepe Üniversitesi Deneysel Hayvanları Üretim ve Araştırma Ünitesi'ne bağlı Zebra Balığı Laboratuvarı'nda mevcut, yabancı TU-AB tip zebra balıkları kullanılmıştır. Bu laboratuvarında balıkların bakımı, çiftleştirilmesi ve büyütülmesi için iki ayrı kapalı sistemde olmak üzere toplamda 30 adet 10x20x25 cm, 20 adet 15x20x25 cm ve 12 adet 25x20x25 cm ebatlarında tank bulunmaktadır. İki kapalı sisteme ek olarak 18 adet 10x20x25 cm ebatında tankların yer aldığı, dışarıdan transfer edilen balıkların kısa süreyle tutulması için tasarlanan karantina ünitesi mevcuttur. İki kapalı sistem ve karantina sistemine ait filtrasyon sistemleri bağımsız olarak tasarlanmıştır. Sistem suyu, kalite kontrolü yapılmış ve standartlara uygun şebeke suyundan ters osmoz sistemi ile filtrelenerek çekilmiştir. Ters osmoz aracılığı ile şebeke sisteminden çekilen filtrelenmiş su 1, 5, 10 ve 30 mikron boyutlarında sediment, aktif karbon, biyolojik sünger, biyolojik elyaf ve bilye içeren biyolojik filtrasyon sisteminden geçirilmiş ve sisteme bağlı pH metre ve ORP miktarını ayarlayan dozaj pompaları aracılığı ile suyun kimyasal özellikleri zebra balıkları için uygun sınırlarda (pH: 7.0-7.5 ve ORP: 300-350) tutulması sağlanmıştır. Su iletkenliğinin takibi günlük olarak yapılmış ve 300-350 µs değeri manuel olarak kaya tuzu eklenerek korunmuştur. Su, düzenli aralıklarla çalıştırılan UV lamba ile zararlı tüm mikroorganizmalardan arındırılmıştır. Laboratuvar ve sistem içi su sıcaklığı her iki sisteme ayrı ayrı bağlanan Giesemann marka soğutma cihazları ve klima ile 27 °C-29°C'de tutulmuştur. Zebra balıkları doğal yaşam koşullarına uygun olarak, zamanlayıcıya bağlı ışık sistemi ile günde 14 saat aydınlığa (08:00-22:00), 10 saat karanlığa (22:00-08:00) maruz bırakılmaktadır. Hacettepe Üniversitesi Deneysel Hayvanları Üretim ve Araştırma Ünitesi Zebra Balığı Laboratuvarı'nda embriyo dönemindeki balıkların gelişimi için iki adet etüv yer almaktadır. Zebra balığı embriyoları gelişimlerinin ilk beş gününde sıcaklığı 28,5°C'ye ayarlı etüv içerisinde tutulmuş ve ardından özel yavru tanklarına alınarak bakımlarına burada devam edilmiştir. Zebra balığı embriyolarının beslenmesinde ilk bir ay günde bir defa Gemma 100 mikron kuru yem ve günde iki defa canlı artemia kullanılmıştır. Genç zebra balıkları günde bir defa Gemma 150 mikron kuru yem ve günde iki defa 24 saatlik canlı artemia ile ve erişkin zebra balıkları ise günde bir defa Gemma 300 mikron kuru

yem ve günde iki defa 24 saatlik canlı artemia ile beslenmiştir. Canlı artemia üretimi Hacettepe Üniversitesi Deneysel Hayvanları Üretim ve Araştırma Ünitesi Zebra Balığı Laboratuvarı'nda günlük olarak 500 ml'lik iki adet artemia tankında yapılmıştır. Erişkin, genç ve embriyo dönemindeki zebra balıklarının günlük beslenme programları; iki ayrı kapalı sisteme ait sıcaklık, pH, ORP ve tuzluluk değerleri; laboratuvar sıcaklığı, üretilen embriyo sayısı, ölen balık sayısı; artemia kurulumu ve bakımı düzenlenen çizelgelerle günlük olarak takip edilmiştir.

### 3.2.2 Zebra Balıklarında Hedef Bölgenin DNA Dizi Analizi ile Polimorfizmler Açısından İncelenmesi

12 adet yabancı tip zebra balığı DNA'sında, tasarlanacak genom düzenleme aracı konstraktlarının bağlanmasını etkileyebilecek dizi varyasyonunun olup olmadığını incelemek amacıyla hedef bölgeye özgül tasarlanan primerler (Tablo 3.1) ile PZR reaksiyonu gerçekleştirildi ve saflaştırma sonrası dizi analizi için örnekler hazırlandı. Dizi analizi ile genom düzenleme araçlarının tasarımında kullanılacak olan Ensembl veri tabanındaki ENSDARG00000071586 kodlu referans dizide bildirilmemiş olan varyasyonların varlığı incelenmiştir.

**Tablo 3.1.** Zebra balığı genomunda hedef bölgenin incelenmesi için tasarlanan primer dizileri.

Primerin ismi	Primer dizisi
Tgfbi-e4-F1	5'CAGTAAGAGCACTGGGTCAAGA3'
Tgfbi-e4-R1	5'AGACGCATTGGGAACACTCACAG3'

### 3.2.3. TALEN Konstraktlarının Tasarlanması

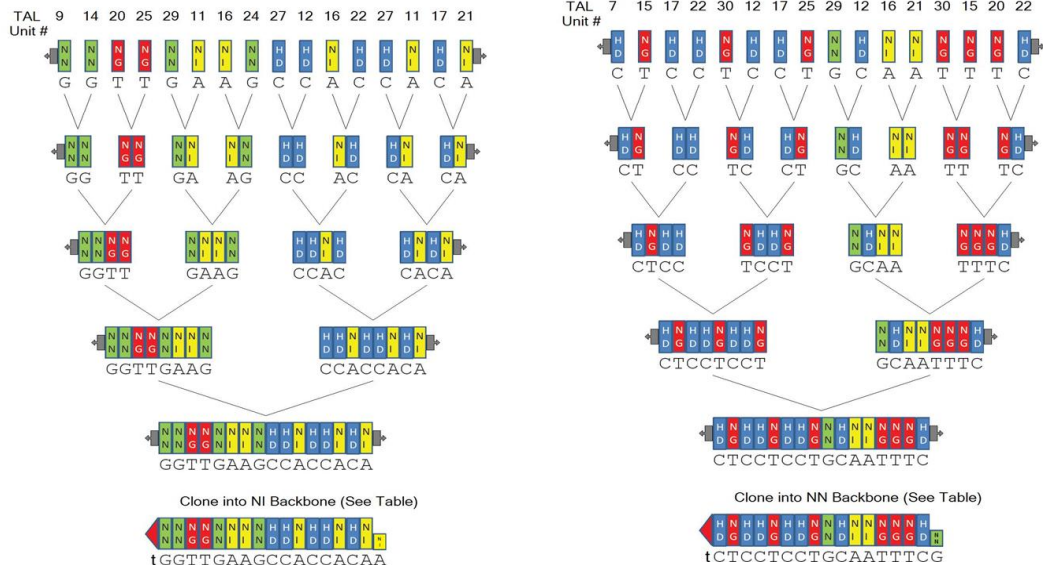
TALEN konstraktları ZiFiT *Targeter Version 4.2* (Zinc Finger Consortium) çevrimiçi yazılımı kullanılarak tasarlanmıştır (Şekil 3.1). 'Real' yöntemi ile sentezlenmek üzere tasarlanan TALEN konstraktının zebra balığı *tgfbi* genindeki, insanda 4. eksonda 124. arjinin amino asidini kodlayan kodona homolog olan, 117. amino asidi kodlayan kodonda çift zincir kırığı oluşturması planlandı (Şekil 3.2). ZiFiT yazılımında tasarlanan sağ ve sol TALEN konstraktlarının TALEN plazmit kütüphanesindeki numaraları Şekil 3.3'de gösterilmiştir. Tasarlanan TALEN



SOL TALEN  
 TG**GGTTGAAGCCACCACAA**CTAAGATGTACTCCGAGAGAGCGAAATTCAGGAGGAGATCGA  
 ACACCAACTTCGGTGGTGTGATCTACATGAGGCTCTCTCG**CTTTAACGTCCTCCT**AGCT  
 SAĞ TALEN

**Şekil 3.2.** Tgfb1'de hedef bölge ve seçilen TALEN konstraktının hedef bağlanma bölgesi.

TALEN konstraktlarının bağlanma bölgeleri dizi üzerinde sarı renkle işaretlenmiştir, Fok 1 enziminin çift zincir kırık oluşturacağı hedef bölge ise kırmızı ile vurgulanmıştır.

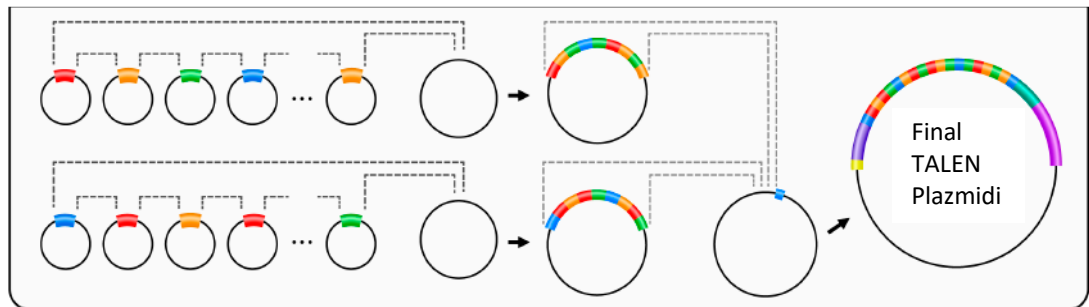


sağ TALEN kolu

sol TALEN kolu

**Şekil 3.3.** Hedef bölgeye uygun tasarlanan sağ ve sol TALEN konstraktları.

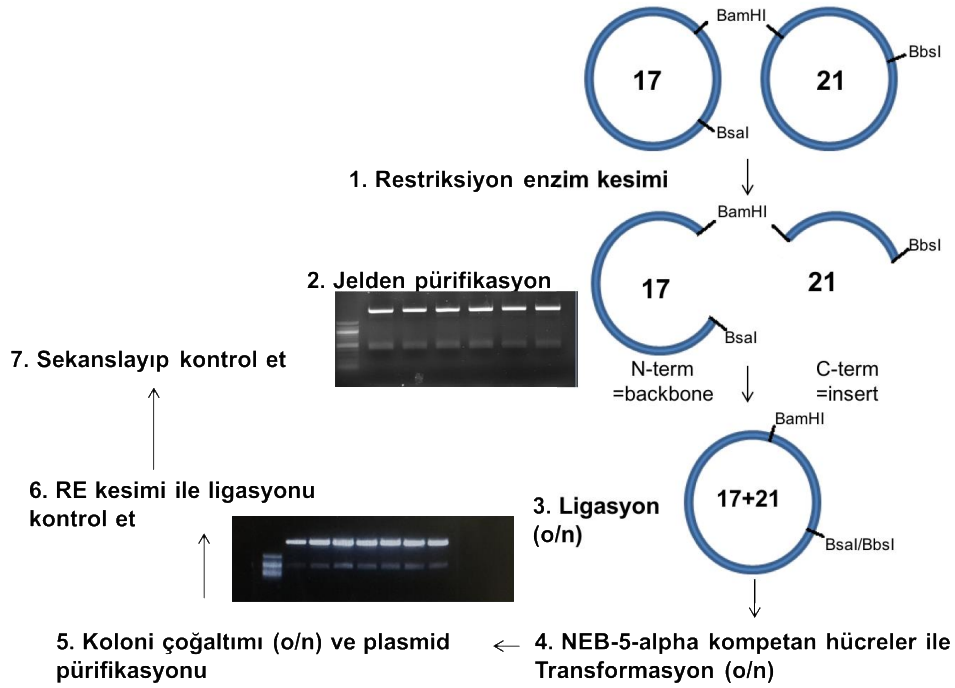
Konstraktların sentezinde kullanılacak plasmid kütüphanesine ait numaralar ve bunların basamak basamak birleştirilmeleri gösterilmiştir.



**Şekil 3.4.** REAL yöntemi ile TALEN sentezi

Restriksiyon enzim kesimi ve ligasyon basamaklarından oluşan klonlama tabanlı sentez aşamaları gösterilmiştir (95).

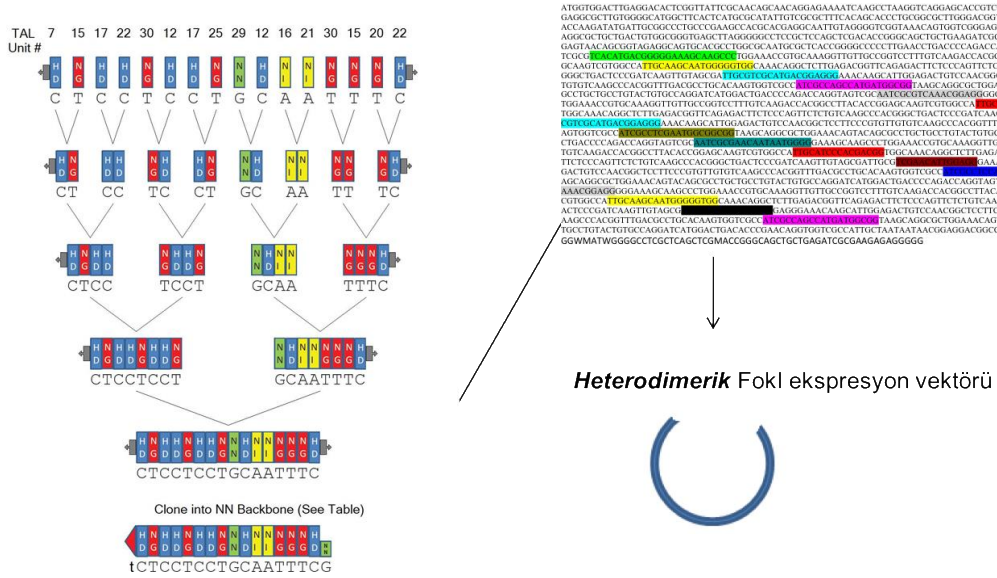




Şekil 3.5. TALEN plasmid kütüphaneleri kullanılarak RVD'lerin bir plasmitten diğerine takılıp birbirine bağlanması.

2. ve 6. Aşamadaki agaroz jel görüntüleri de akış şeması içerisinde yer almaktadır.

## Sağ TALEN



Şekil 3.6. SAĞ TALEN konstraktı ve homodimerik vektör aşamasında DNA dizileme sonucu.

Her TALE tekrarındaki RVD bölgelerinin dizileri renkli olarak belirtilmiştir.



d) Ligasyon ürünü ile kompetan hücrelerin transformasyonu

10 µl ligasyon ürünü 90 µl XL1-Blue kompetan hücrelere eklenmiş ve 5 dk. buz üzerinde inkübasyona bırakılmıştır. 42°C'de 1 dk. boyunca bekletilerek ısı şoku yapıldıktan sonra 1 dk. buzda bekletilmiştir. Hücrelere 500 µl LB (Lysogeny Broth) medium eklenerek 37°C'de 250 rpm çalkalama ile 45 dk. boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Çoğaltılan hücrelerden 100 µl alınıp LB+Ampisilin kaplı petri kaplarına ekim yapılarak 12-14 saat boyunca 37°C'de bekletilmiştir.

e) Tranforme kompetan hücrelerin çoğaltılması ve plasmid izolasyonu

Her petri kabından üç adet koloni toplanarak, her bir koloni 3 ml LB+Ampisilin içerisinde 250 rpm çalkalama ile 37°C'de 12-14 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Çoğalan hücrelerden Qiagen, *Plasmid Mini-Prep* Kiti ile plasmid izolasyonu yapılmıştır.

f) Ligasyon kontrolü

Vektörlerin birleştiğini kontrol etmek için, vektör XbaI ve BamHI-HF restriksiyon enzimleri ile kesilerek 1 saat 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. %1,2'lik TAE-agaroz jelde yürütülerek ligasyon kontrolü yapılmıştır. Ligasyonun başarılı olduğu fragmanların boyutu,  $[(M + N) \times 102] + 33$  baz çifti uzunluğunda olduğu doğrulanmıştır (M ve N, sırasıyla N-terminal tekrar sayısı ve C- terminal tekrar sayısıdır).

g) DNA dizi analizi

İki tekrar fragmanı birleştirildikten sonra, doğru dizilerin birleştirildiğini kontrol etmek amacıyla M13F ve M13R primerleri kullanılarak DNA dizi analizi yapılmıştır.

h) a-g aşamalarının tekrarı

İlk ligasyon seti tamamlandıktan sonra (ikili tekrarların oluşturulması), 16 tekrar uzunluğundaki dizi elde edilene kadar a-g aşamaları tekrar edilmiştir.

i) TALEN tekrarlarının homodimerik FokI ifade vektörüne klonlanması

pJDS70, pJDS71, pJDS74 veya pJDS78 vektörleri arasından ZiFiT programında belirtilen homodimerik FokI ifade vektörü BsmBI restriksiyon enzimi ile doğrusallaştırmak üzere 3 saat boyunca 55°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Vektör %1 agaroz jelden izole edilip DNA saflaştırılmıştır.

h) aşamasında hazırlanan TALEN tekrar vektörü BbsI ve BsaI restriksiyon enzimleri ile doğrusallaştırılmak üzere 2 saat boyunca 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. DNA fragmanı %1 agaroz jelden saflaştırılmıştır.

Doğrusallaştırılmış TALEN tekrar dizisi (50 ng) doğrusal homodimerik TALEN ifade vektörü (50 ng) içerisine T4 DNA Ligaz ile klonlanmış ve 14-16 saat boyunca 16 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. Ligasyon ürünü XL1-Blue kompetan hücrelerinin transformasyonunda kullanılmıştır (d-e). Ligasyon kontrolü, saflaştırılan plazmidin KpnI-HF ve BamHI-HF restriksiyon enzimleri ile kesilmesi ile gerçekleştirilmiş ve 2 saat boyunca 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Ürün %1 agaroz jelde yürütülerek,  $(650 + [N \times \sim 102])$  bp uzunluğunda bir fragman olduğu kontrol edilmiştir (N, vektördeki TALEN tekrar sayısı). Vektör JDS2978 (F) ve JDS2980 (R) primerleri ile sekanslanarak doğrulanmıştır.

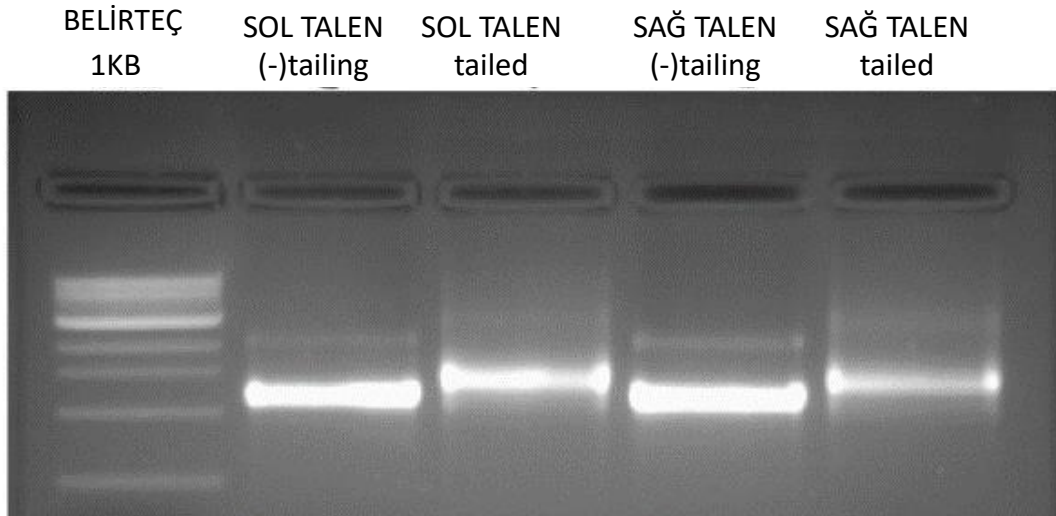
j) TALEN tekrarlarının homodimerik vektörden heterodimerik FokI vektöre transfer edilmesi

Elde edilen homodimerik TALEN vektörü ile, heterodimerik FokI vektörü (sağ TALEN için pMLM290, sol TALEN için pMLM292) NheI ve BamHI restriksiyon enzimleri kullanılarak kesilmiş ve 2 saat boyunca 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. DNA fragmanları %1 agaroz jelde yürütülmüş ve homodimerik fragmanlar için 2.2-2.5 kb uzunluğundaki fragman, heterodimerik FokI vektörleri için 5.6 kb uzunluğundaki fragman jelden saflaştırılmıştır. İki vektör T4 DNA Ligaz ile birleştirilmiştir. Ligasyon ürünü ile kompetan hücrelerin transformasyonu yapılmıştır. İzole edilen plazmit DNA’sının ligasyon kontrolü için, NheI ve BamHI enzimleri ile kesim yapılmıştır. Her kesimde 5.6 ve 2.2-2.4 kb uzunluğundaki fragmanların olduğu kontrol edilmiştir.

Elde edilen TALEN vektörleri PmeI restriksiyon enzimi ile doğrusallaştırıldıktan sonra, %1 agaroz jelde yürütülmüş ve yaklaşık 8 kb uzunluğudaki fragmanın olduğu kontrol edilmiştir.

### 3.2.5. Tgfbi-TALEN mRNA Sentezi ve Saflaştırılması

Tgfbi-TALEN mRNA sentezi için *mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra* Kit (Ambion) kiti kullanılarak *in vitro* transkripsiyon gerçekleştirildi. Reaksiyon için 0.6 µg kalıp TALEN DNA'sı kullanıldı ve 2 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. DNase uygulaması ve *poly-A tailing* kitle belirtildiği gibi gerçekleştirildi. Ardından fenol-kloroform yöntemi ile sentezlenen RNA saflaştırıldı ve %1,2'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi (Şekil 3.8). Sentezlenen RNA'nın Quantus fluorometrede konsantrasyon ölçümü yapıldı. Sağ Tgfbi-TALEN mRNA miktarı 998 ng/ul; sol Tgfbi-TALEN mRNA miktarı ise 881 ng/ul olarak ölçüldü.



Şekil 3.8. Tgfbi-TALEN-mRNA'ları.

%1,2 agaroz jelde, poli-A kuyruk takımından önce (-tailing) ve sonra (tailed) TALEN mRNA'ları gösterilmiştir.

### 3.2.6. CRISPR/Cas9 Konstraktlarının Tasarlanması

#### Tgfbi-sgRNA-1 Tasarımı

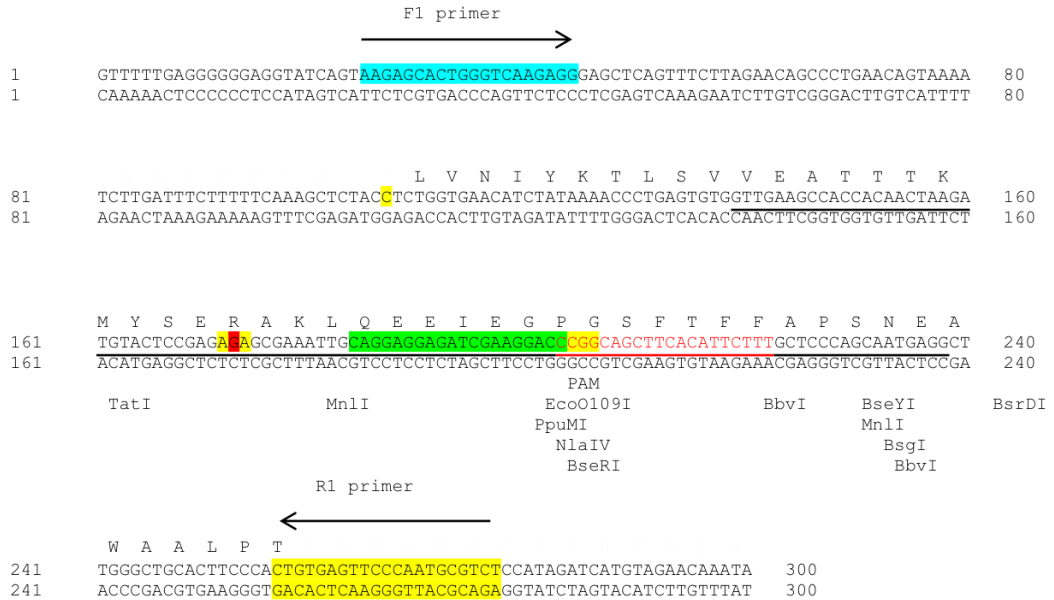
CRISPR/Cas9 platformunun zebra balığı *tgfb1* geninde hedef kodonda çift zincir kırık oluşturması için uygun sgRNA tasarımı, çalışmanın ilk döneminde mevcut

çevrimiçi programların kullanımı ile mümkün olmamıştır. Ancak hedef kodonun yakınlığında çift zincir kırık oluşturmak için sgRNA tasarımı yapılabildiği. Çalışmanın başında Cas9 enziminin kesim yapması için hedef dizide bulunması gereken 3'NGG PAM dizisinin taranması CRISPRDirect (<https://crispr.dbcls.jp/>) çevrimiçi yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. En yüksek skorları gösteren ve en düşük hedef dışı bağlanma bölgesi olan sgRNA hedefi seçildi. (Şekil 3.9 ve 3.10). Seçilen sgRNA için klonlamaya dayalı sistemle sgRNA sentezine uygun oligonükleotit çifti tasarlandı (Tablo 3.2). 5' ucunda U7 RNA polimeraz promotöründe gerekli olan G nükleotidi oligo dizisine tasarım aşamasında eklendi.

### CRISPR Direct

position start - end	target sequence 20mer+PAM (total 23mer)	sequence information				number of target sites ?		
		GC% of 20mer	Tm of 20mer	TTTT in 20mer	restriction sites	20mer +PAM	12mer +PAM	8mer +PAM
11 - 33	- [CCA]CCACAACCTAAGATGTACTCC [gRNA]	45.00 %	68.67 °C	-		1 [detail]	5 [detail]	1808 [detail]
14 - 36	- [CCA]CAACTAAGATGTACTCCGAG [gRNA]	45.00 %	67.54 °C	-		1 [detail]	2 [detail]	629 [detail]
30 - 52	+ CTCCGAGAGCGGAAATTGC[AGG] [gRNA]	55.00 %	72.61 °C	-		1 [detail]	3 [detail]	1871 [detail]
32 - 54	- [CCG]AGAGAGCGAAATTGCAGGAG [gRNA]	50.00 %	71.96 °C	-		1 [detail]	4 [detail]	637 [detail]
33 - 55	+ CGAGAGAGCGAAATTGCAGG[AGG] [gRNA]	55.00 %	72.59 °C	-		1 [detail]	3 [detail]	1142 [detail]
43 - 65	+ AAATTGCAGGAGGAGATCGA[AGG] [gRNA]	45.00 %	70.28 °C	-		1 [detail]	8 [detail]	431 [detail]
49 - 71	+ CAGGAGGAGATCGAAGGACC[CGG] [gRNA]	60.00 %	75.38 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	1469 [detail]

Şekil 3.9. CRISPRDirect (<https://crispr.dbcls.jp/>) ile sgRNA (single-guide RNA) hedefi seçilmesi.

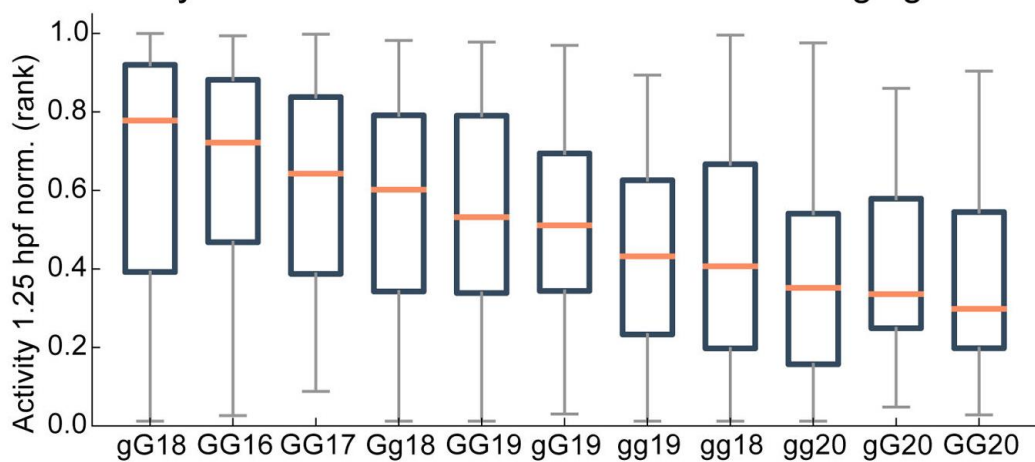


Şekil 3.10. Tgfbi'de hedef dizi ve tgfbi-sgRNA-1 tasarımı.

Tgfbi geni 4. eksonunda gRNA bağlanma bölgesi (yeşil), hemen 3'komşuluğunda PAM dizisi (sarı), hedef nükleotit (kırmızı) ve varyasyon taraması için tasarlanan primer dizileri (sarı ve mavi) belirtilmiştir.

### Tgfb $\beta$ -sgRNA-2 Tasarımı

SgRNA'nın sentezinde kullanılan T7 ve SP6 promotörleri için sgRNA'ların 5' ucunda GG veya GA nükleotitlerinin bulunmasını zorunluluğu çalışmalarda hedeflenebilir dizi oranına kısıtlama getirmektedir. Bu kısıtlamayı aşmak için Giraldez ve arkadaşları yaptıkları çalışmada farklı uzunluklarda (18-22nt) ve 5' ucunda 1 ya da 2 yanlış eşleşme içeren (g ile belirtilmiştir) alternatif sgRNA'ların etkinliklerini karşılaştırmışlardır (120). Şekil 3.11'de alternatif sgRNA'ların çift zincir kırık oluşturma aktiviteleri gösterilmektedir. Bu çalışma sonuçlarını sgRNA tasarlama aracı olan "CRISPRScan"e de uyarlamışlar ve hedeflenebilir dizi miktarını zebra balığı genomunda 8 kat arttırmayı başarmışlardır. Bu gelişmeler doğrultusunda "CRISPRScan" programını kullanarak (<http://www.crisprscan.org>) ve bu çalışma dikkate alınarak hedef bölge için tgfb $\beta$ -sgRNA-2 tasarlanmıştır (Şekil 3.12). Bu sgRNA bir önceki sgRNA ile aynı PAM dizisini tanımaktadır ve hedef kodon ile aynı mesafede yer almaktadır. Tgfb $\beta$ -sgRNA-1 5' ucunda hedef dizi ile tek yanlış eşleşmeye sahipken (gG20); tgfb $\beta$ -sgRNA-2 daha kısadır ancak hedef dizi ile yanlış eşleşme içermemektedir (GG16). Şekil 3.11'de Mateos ve arkadaşlarının sgRNA'ların aktivasyon düzeylerini karşılaştırdıkları grafikte tgfb $\beta$ -sgRNA-1'in beklenen aktiflik düzeyi 0.4 iken tgfb $\beta$ -sgRNA-2'nin yaklaşık 0.8 olup daha yüksek olarak belirtilmiştir (120).



Şekil 3.11. Alternatif sgRNA'ların etkinlikleri.

Zebra balıklarında farklı tasarımlara sahip sgRNA çift zincir kırık oluşturma etkinlikleri gösterilmiştir (120).



GTACTCCGAGAGCGAAATTGCAGGAGGAGATCGAAGGACCGGCAGCTTCACATTCTTTGCTCC  
 Hedef kodon SgRNA PAM

### Şekil 3.12. Tgfbi-sgRNA-2 (GG16NGG).

Hedef kodon kırmızı ile, sgRNA hedef dizisi yeşille ve 3' ucunda yer alan PAM dizisi sarı renkle belirtilmiştir.

### Tgfbi-sgRNA-3 Tasarımı

Şekil 3.13'te hedef kodonun hemen komşuluğundan çift zincir kırık oluşturma kapasitesine sahip olan tgfbi-sgRNA-3 dizisi gg18NGG olacak şekilde "CRISPRScan" programı kullanılarak tasarlanmıştır. Ancak şu ana kadar yapılan dizi analizlerinde yabancı tip AB zebra balıklarında bu sgRNA'nın tanıdığı PAM dizisinde heterozigot olarak ya da homozigot olarak polimorfizm gözlenmiştir. Bu sgRNA için beklenen etkinlik, hem 3' ucunda iki yanlış eşleşme içermesi hem de enjekte edilen embriyolarda PAM dizisinde polimorfizm gözlenmesi nedeniyle düşük olmakla birlikte, dizi hedef kodona olan yakınlığı nedeniyle tercih edilmiştir.

Hedef kodon  
 GTACTCCGAGAGCGAAATTGCAGGAGGAGATCGAAGGACCGGCAGCTTCACATTCTTTGCTCC  
 PAM SgRNA

### Şekil 3.13. Tgfbi-sgRNA-3 (gg18NGG).

Hedef kodon kırmızı ile, sgRNA hedef dizisi yeşille ve 3' ucunda yer alan PAM dizisi sarı renkle belirtilmiştir.

### Tgfbi-sgRNA-4 ve Tgfbi-sgRNA-5 Tasarımı

Yabancı tip Cas9 proteininin hedeflenen bölgeye bağlanabilmesi için, tasarlanan sgRNA'nın 3' ucunda PAM dizisi (NGG) bulunmak zorundadır. Bu dizinin bulunması koşulu bu çalışmada olduğu gibi özel dizi değişikliklerinin hedeflendiği durumlarda başarısızlığa neden olmaktadır. Hedef bölgede HDR'nin daha etkin gerçekleşmesi için çift zincir kırığın hedefe 10-20 nükleotit uzaklıkta oluşturulmasının başarı oranını arttırdığı belirtilmektedir (117). Bu kısıtlama için çalışmalarda sunulan çözümlerden biri SpCas9 varyantlarıdır. Proteinin PAM dizisine bağlanma bölgesinde oluşturulan özgün amino asit değişiklikleri farklı PAM dizilerinin tanınmasını sağlamaktadır. Bu bağlamda daha önce gerçekleştirilen bir çalışmada zebra balığı embriyolarında NGAG PAM dizisine bağlanarak %20-43 etkinlikte çift zincir kırık



oluşturduğu gösterilmiş olan SpCas9 VQR varyantının hedef bölge için daha uygun sgRNA tasarımına imkân sağlayabileceği düşünülmüştür (90). Aynı çalışmada belirtilen “CasBLASTR” (<http://www.CasBLASTR.org>) biyoinformatik aracı kullanılarak ve Giraldez tarafından yapılan çalışma (120) göz önünde bulundurularak, T7 promotörüne uygun *tgfb1*-sgRNA-4 (gg18NGAG) ve *tgfb1*-sgRNA-5 (gG15NGAG) tasarlanmıştır (Şekil 3.14).

### Tgfb1-sgRNA-6 ve *tgfb1*-sgRNA-7 Tasarımı

Hedef kodona yaklaşabilmek için NGAG PAM özgülüğüne sahip VQR varyantı sgRNA tasarımında 3’ ucunda esneklik sağlarken 5’ ucunda T7 promotörü nedeniyle yanlış eşleşme ve/veya ideal olmayan uzunlukta sgRNA’lar (gg18 ve gG15) tasarlanmasına neden olmuştur. Bu durum çift zincir kırık oluşturma etkinliğini azaltabileceği için alternatif olarak 5’ ucunda T7 yerine SP6 promotörü için gerekli GA dizisi koşulu sadece tek yanlış eşleşme ile sağlanarak *tgfb1*-sgRNA-6 (gA18NGAG) ve *tgfb1*-sgRNA-7 (gA18NGAG) tasarlanmıştır (Şekil 3.15). İki farklı tasarım yapılmasının nedeni daha önce bahsedilen yabancı tip balıklarda gözlenen C/T polimorfizminin sgRNA hedef dizisi içerisinde yer almasıdır. Enjeksiyon yapılan embriyolar bu bölgede homozigot da olsa heterozigot da olsa her iki aleli de hedef haline getirebilmek için iki farklı aleli de tanıyabilecek iki farklı sgRNA tasarlanmıştır.

**A.**

Hedef kodon

GTA CTCC GAGAG GCGAAAATTG CAGGA GGAGATCGAAGGACCCGGCAGCTTCACATTCTTTGCTCC

PAM SgRNA

**B.**

Hedef kodon

GTA CTCC GAGAG GCGAAAATTG CAGGA GGAGGAGATCGAAGGACCCGGCAGCTTCACATTCTTTGCTCC

PAM SgRNA

**Şekil 3.14.** *Tgfb1*-sgRNA-4 (gg18NGAG) ve *tgfb1*-sgRNA-5 (gG15NGAG).

A. *Tgfb1*-sgRNA-4; B. *Tgfb1*-sgRNA-5. Hedef kodon kırmızı ile, sgRNA hedef dizisi yeşille ve 3’ ucunda yer alan SpCas9 VQR varyantına özgü PAM dizisi sarı renkle belirtilmiştir.

TATAAAACCCTGAGTGTGGTTGAAGCCACCA **CAACTAAGATGTACTCC** **TCGAGAGAG**CGAAA  
 SgRNA PAM

### Şekil 3.15. Tgfbi-sgRNA-6 ve tgfbi-sgRNA-7 (gA18NGAG).

Hedef kodon kırmızı ile, sgRNA hedef dizisi yeşille, 3' ucunda yer alan SpCas9 VQR varyantına özgü PAM dizisi sarı renkle ve yabancı tip balıklarda sıklıkla gözlenen C/T varyasyonu mavi renkle belirtilmiştir.

### Tgfbi-sgRNA-8 ve Tgfbi-sgRNA-9 Tasarımı

CRISPR/Cas9 sisteminde HDR olasılığını arttırmak ve kısa insersiyonu gerçekleştirmek için bir diğer seçeneğin ise, hedef kodunun sağ (proksimal) ve sol (distal) tarafından 10-20 nükleotit uzaklıkta eş zamanlı iki adet çift zincir kırık oluşturmak ve ssODN eşliğinde mevcut 20-400 bp'lik alanın HDR ile istenilen varyasyonları taşımasını sağlamak olabileceği düşünülmüştür (121). Bu amaçla çift zincir kırık oluşturma etkinliğinin yüksekliği ön planda olmak koşuluyla CRISPRScan programı kullanılarak tgfbi-sgRNA-7 ve tgfbi-sgRNA-8 tasarlanmıştır (Şekil 3.16).

81 TCTTGATTCTTTTCAAAGCTCTACCTCTGGTGAACATCTATAAAACCCTGAGTGTGGTTGAAG **CCA** **CCACA**ACTAAGC 160  
 81 AGAACTAAAGAAAAAGTTTCGAGATGGAGACCACTGTAGATATTTGGGACTCACACCAACTTCGGTGGTGTGATTCT 160  
 PAM  
 Hedef sgRNA2  
 161 **TG**TACTCC **CAG** **GAGCG**AAATTCAGGAGGAGATCGAAGGACCCGGCAGCTTCACATTCTTTGCTCCAGCAATGAGGCT 240  
 161 ACATGAGGCTCTCTCGCTTAAACGTCCTCTAGCTTCTGGCCGTCGAAGTGTAAGAAACGAGGGTCGTTACTCCGA 240  
 PAM

### Şekil 3.16. Tgfbi-sgRNA-8 ve tgfbi-sgRNA-9.

Hedef kodon kırmızı ile, sgRNA hedef dizileri yeşille, PAM dizileri sarı renkle yabancı tip balıklarda sıklıkla gözlenen C/T varyasyonu mavi renkle belirtilmiştir.

### 3.2.7 CRISPR/Cas9 Konstraktlarının Hazırlanması

CRISPR sgRNA'larının sentezi için çalışma sırasında iki farklı yöntem kullanılmıştır.

#### Klonlama Yöntemi ile sgRNA Sentezi

Kullanılan CRISPR/Cas9 protokolü Hwang ve arkadaşlarının protokollerinden uyarlanmıştır (103). CRISPR/Cas9 sistemi, hedef bölgeye bağlanacak sgRNA'nın sentezi için kalıp olarak kullanılacak 22 bç uzunluğundaki oligonükleotitlerin

birleştirilmesi ve T7 promotörü içeren pDR274 plazmidine yerleştirilmesi ile hazırlanmıştır.

Oligoların birleştirilmesi (annealing) reaksiyonu:

100 µM Oligo 1	1 µl
100 µM Oligo 2	1 µl
10x annealing buffer	5 µl
Distile H2O	43 µl

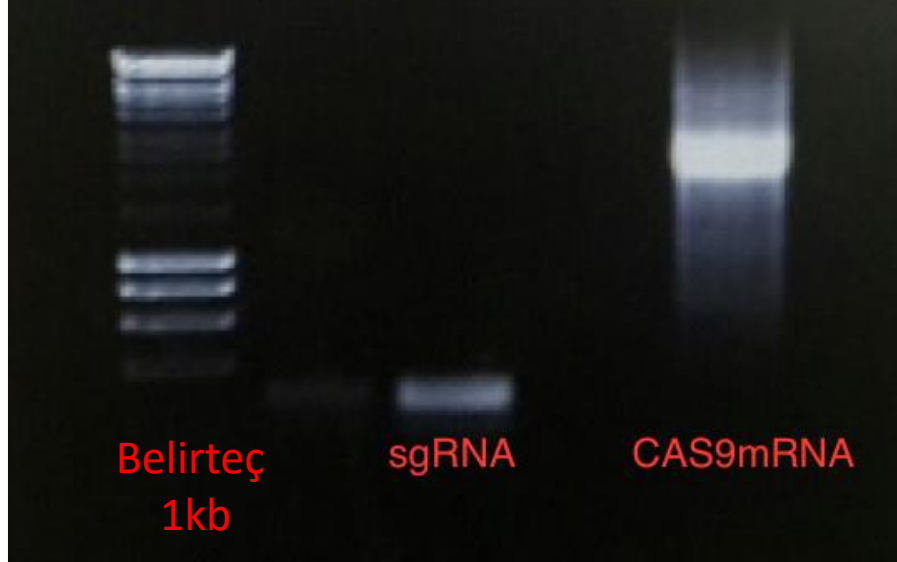
Birleştirme reaksiyonu için PZR cihazında kullanılan program:

95°C	5 dk 12 sn
85°C	1 dk 12 sn
75°C	1 dk 12 sn
65°C	1 dk 12 sn
55°C	1 dk 12 sn
45°C	1 dk 12 sn
35°C	1 dk 12 sn
25°C	1 dk
4°C	∞

T7 promotörü içeren pDR274 vektörü BsaI restriksiyon enzimi ile kesilmiş ve doğrusallaştırılmış vektör ile biraraya getirilmiş oligolar T4 DNA Ligaz ile birleştirilmiştir. Ligasyon ürünü XL1-Blue kompetan hücrelere verilerek transformasyon yapılmıştır. Çoğaltılan plasmit DNA saflaştırıldıktan sonra M13F (-21) universal primer ile sekanslanarak doğrulanmıştır.

Pozitif klonlar DraI restriksiyon enzimi ile kesilerek doğrusallaştırılmıştır. %3 agaroz jelde yürütülerek 285 bp uzunluğunda fragman olduğu kontrol edilmiştir. RiboMAX Large Scale RNA Production Kit, T7, P1300 (Promega) kullanılarak sgRNA sentezi gerçekleştirilmiştir. SgRNA'lar fenol-kloroform yöntemi ile veya GeneAll, Hybrid-R miRNA kiti (Cat. No. 325-150) kullanılarak saflaştırılmış ve %1,2 agaroz jelde yürütülerek kırık olup olmadığı kontrol edilmiştir (Şekil 3.17). Ardından

QuantiFluor RNA System, Promega, E3310 kiti ile RNA ölçümü yapılmıştır (sgRNA: 180 ng/ul; Cas9 mRNA: 280 ng/ul).



Şekil 3.17. sgRNA ve Cas9 mRNA %1,2'lik agaroz jel görüntüsü.

**Tablo 3.2.** Tasarlanan sgRNA dizilerine ait promoter tipi ve oligonükleotit dizileri.

SgRNA	Promoter tipi	Oligonükleotit dizisi
Tgfb1-sgRNA-1 gG20NGG	T7	Oligo-1: TAGGCAGGAGGAGATCGAAGGACC Oligo-2: AAACGGTCCTTCGATCTCCTCCTG
Tgfb1-sgRNA-2 GG16NGG	T7	taatacgactcactataGGAGGAGATCGAAGGACCggttttagagctagaa
Tgfb1-sgRNA-3 gg18NGG	T7	taatacgactcactataGGCTCCTGCAATTCGCTCTCTggttttagagctagaa
Tgfb1-sgRNA-4 gg18NGAG	T7	taatacgactcactataGGCAATTCGCTCTCTCTggttttagagctagaa
Tgfb1-sgRNA-5 gG15NGAG	T7	taatacgactcactataGGCTGCAATTCGCTCTCTCTggttttagagctagaa
Tgfb1-sgRNA-6 gA18NGAG	SP6	atttaggtgactcactataGAACTAAGATGTACTCCGAGggttttagagctagaaatagc
Tgfb1-sgRNA-7 gA18NGAG	SP6	atttaggtgactcactataGAACTAAGATGTACTCTGAGggttttagagctagaaatagc
Tgfb1-sgRNA-8 gG18NGG	T7	taatacgactcactataGGAGTACATCTTAGTTGTGGggttttagagctagaa
Tgfb1-sgRNA-9 gG18NGG	T7	taatacgactcactataGGAGAGAGCGAAATTCAGGggttttagagctagaa
Universal primer	-	aaaagcaccgactcgggcccacttttcaagttgataacggactagccttattttaactg ctatttctagctctaaaac

### Klonlamadan Bağımsız sgRNA Sentezi

Klonlamadan bağımsız sgRNA sentezi için Burgess ve arkadaşlarının çalışmalarında önerdiği protokol kullanılmıştır (121). Bu protokole göre sgRNA tasarımı sonrası oligonükleotit dizileri ve sentez aşamasında kullanılan evrensel primer dizisi Tablo 3.2'de gösterilmiştir.

Oligonükleotitlerin birleştirilmesi için iki farklı yöntem kullanılmıştır:

a. Tek sgRNA sentezi: 100  $\mu$ M sgRNA oligonükleotit ve evrensel primer stok solüsyonları nükleazdan arındırılmış su ile son konsantrasyon 10  $\mu$ M olacak şekilde sulandırılmıştır. Oligonükleotit birleştirmek için kullanılan protokol aşağıda yer almaktadır.

Bileşen	Miktar ( $\mu$ l)
Kappa PCR enzyme mix	12.5 (2x)
SgRNA oligo (10 $\mu$ M)	1
Universal oligo (10 $\mu$ M)	1
Nükleazdan arındırılmış su	10.5
Son hacim	25

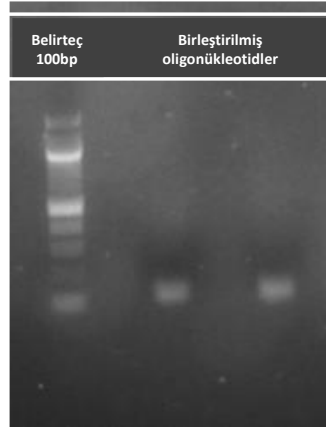
b. Multiplex sgRNA sentezi: Zebra balığı embriyolarına aynı anda enjekte edilmesi planlanan sgRNA oligonükleotit solüsyonlarından her biri 10  $\mu$ M konsantrasyonda olacak şekilde tek bir oligonükleotit karışım solüsyonu hazırlanmıştır. Oligonükleotit birleştirmek için kullanılan protokol aşağıdadır.

Bileşen	Miktar ( $\mu$ l)
Kappa Taq Ready Mix	12.5 (2x)
SgRNA oligo karışımı (10 $\mu$ M)	1
Universal oligo (10 $\mu$ M)	1
Nükleazdan arındırılmış su	10.5
Son hacim	25

Oligonükleotit birleştirme ve uzatma işlemi için hazırlanan karışımlar aşağıda belirtilen sıcaklıklarda ve sürelerde PZR cihazında inkübasyona bırakılmıştır:

95°C – 3 dk  
 95°C – 30 sn  
 45°C – 30 sn  
 72°C – 20 sn. } x 35  
 72°C – 5 dk.  
 4°C - ∞

*Qiagen Quick PZR* saflaştırma kiti kullanılarak üreticinin talimatları doğrultusunda saflaştırma işlemi yapılmıştır. Ardından saflaştırılmış ürün %2,5 agaroz jelde yürütülmüştür (Şekil 3.18). Doğru birleşmiş oligonükleotit bant boyutu 117-120 bç olarak izlenmelidir.



**Şekil 3.18.** Oligonükleotit birleştirme reaksiyonu sonrası agaroz jel görüntüsü.

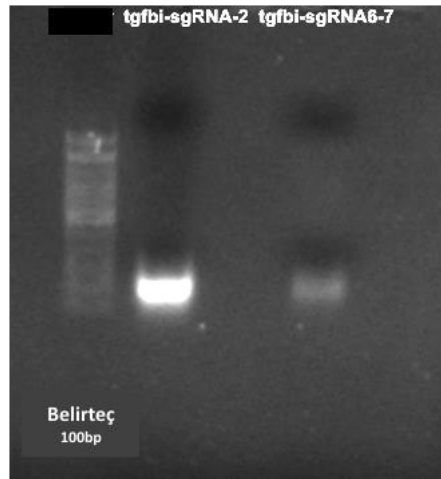
Saflaştırma işleminin ardından sgRNA'nın *in-vitro* sentezi için birleştirilmiş oligonükleotitlerdeki promotör dizi T7 ise *AmpliScribe T7-Flash Transcription Kit* (Epicentre); SP6 ise *MAXIScript SP6 Transcription Kit* (Invitrogen) üreticinin talimatları doğrultusunda kullanılmıştır.

Her iki reaksiyon sonrasında da elde edilen ürün *RNA Clean and Concentrator-5 Kit*'i kullanılarak üreticinin talimatları doğrultusunda saflaştırılmıştır. Elde edilen sgRNA Nanodrop cihazında ölçülmüştür. SgRNA konsantrasyonları Tablo 3.3'te yer almaktadır.

Ardından saflaştırılmış ürün %2 agaroz jelde yürütülerek RNA' da kırık olup olmadığı kontrol edilmiştir. SgRNA'da kırık olmadığı gösterilmiştir. (Şekil 3. 19). Doğru birleşmiş oligonükleotit bant boyutu 100-200 bp aralığında tek ya da iki bant olarak izlenebilir. Şekil 3.19'da tek bant olarak izlenmiştir.

**Tablo 3.3.** Klonlamadan bağımsız sentez reaksiyonları sonrası elde edilen sgRNA konsantrasyonları.

SgRNA	Miktarı (ng/μl)
Tgfb1-sgRNA-2	612
Tgfb1-sgRNA-3	726
Tgfb1-sgRNA-4 ve 5 (multiplex)	578
Tgfb1-sgRNA-6 ve 7(multiplex)	174
Tgfb1-sgRNA-8 ve 9 (multiplex)	743



**Şekil 3.19.** SgRNA'ların sentez sonrası agaroz jel görüntüsü.

### Cas9 ve Cas9 VQR Varyantı mRNA'larının Sentezlenmesi

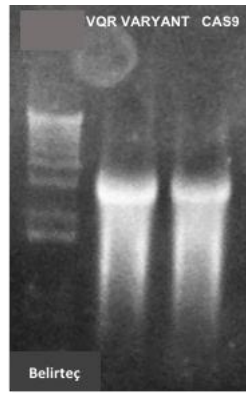
Cas9 ve Cas9 VQR varyantı mRNA'larının transkripsiyon ile sentezlenmesi için pT3TS-nls-zCas9-nl (121) plazmidi kullanılmıştır.

5μg pT3TS-nls-zCas9-nls plazmit DNA'sı XbaI restriksiyon enzimi ile son hacim 50μl olacak şekilde 37°C'de 2 saat inkübe edilerek doğrusallaştırılmıştır.

Ardından kesim ürünleri *QIAquick PCR purification* kit kullanılarak üreticinin talimatları doğrultusunda saflaştırılmıştır. Doğrusallaştırmanın kontrolü için elde

edilen ürün %1'lik agaroz jelde 1kb DNA eşliğinde yürütülmüştür ve 7.3 kb'lik tek bant elde edildiği gösterilmiştir.

*In-vitro* transkripsiyon, *mMessage mMachin* *T3 Transcription Kit* kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her iki reaksiyon sonrasında da elde edilen ürün *RNA Clean and Concentrator-5 Kit*'i kullanılarak üreticinin talimatları doğrultusunda saflaştırılmıştır. Elde edilen mRNA'ların konsantrasyonu Cas9 mRNA için 620 ng/μl ve Cas9 VQR varyantı için 860 ng/μl olarak saptanmıştır. Ardından saflaştırılmış ürün %1 agaroz jelde yürütülerek RNA'da kırık olmadığı kontrol edilmiştir (Şekil 3.20).



**Şekil 3.20.** Cas9 ve Cas9 VQR varyantı mRNA'nın sentez sonrası agaroz jel görüntüsü.

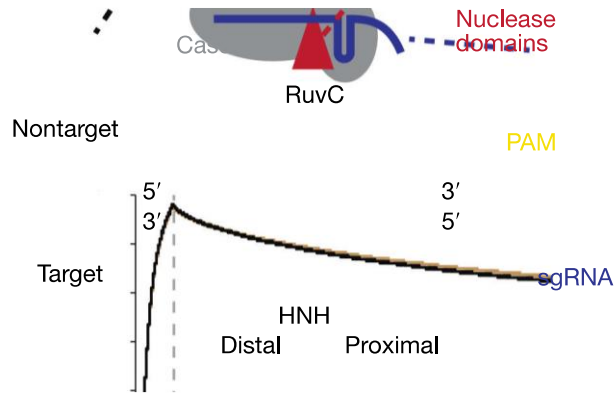
### 3.2.8. *Knock-in* için ssODN Tasarımı ve Hazırlanması

Kısa insersiyon (<100bp) söz konusu olduğunda plasmid yerine tek zincirli oligonükleotit (ssODN) kullanımı daha avantajlı olarak bildirilmektedir. Bu nedenle *tgfb1* amino asit dizisinde hedeflenen tek amino asit değişikliğini sağlamak için ssODN kullanmanın uygun olduğuna karar verildi. SsODN tasarımında homoloji kollarının uzunluğu farklı çalışmalarda farklı uzunluklarda bildirilmekle birlikte Armstrong ve ark. yaptıkları çalışmada ssODN uzunluğunu 23bp yerine 100 bp olarak kullandıklarında HDR oranının daha yüksek olduğu bildirmişlerdir (10). Bu çalışmaya dayanarak çalışmanın başında 101 bp uzunluğunda *tgfb1-e4*-ssODN tasarımı yapıldı, gRNA'nın bağlanmasını önlemek için ve amino asit dizisini hedef bölgede değiştirmek için gerekli düzenlemeler gerçekleştirildi (Şekil 3.21).

İlk tasarlanan ssODN'de restriksiyon enzim kesim noktası bulunmamasının enjeksiyon yapılan embriyoların PZR-RFLP ile tarama imkanı vermemesi nedeni ile







Şekil 3.22. SgRNA-Cas9 Proteini ve DNA etkileşimi.

Richardson ve ark. yaptıkları çalışmada Cas9'un sgRNA ve hedef DNA dizisi ile etkileşimi gösterilmiştir (122).

**Tgfb1 ekzon 4' ün bir kısmı :**

**HEDEF KODON**      **sgRNA**      **PAM**

5' ATGTACTCTGAG **CGG**GAATTGCAGG**AGCA**GATCGA**AGCA**CC**CC**CCAGCTTCACATTCCTTGCCTCCAGCAATGAGGCTTGGCTGCACTTCCCACTGTGAGTCCCAATGCCTCT3'

**Tgfb1-ssODN-nt :**

**Arg/Cys**      **NEW RESITE**

5' ATGTACTCTGAG **CGG**GAATTGCAGG**AGCA**GATCGA**AGCA**CC**CC**CCAGCTTCACATTCCTTGCCTCCAGCAATGAGGCTTGGCTGCACTTCCCACTGTGAGTCCCAATGCCTCT3'

**Tgfb1-ssODN-t :**

5' AGACGCATTTGGAACTCACAGTGGAAAGTGCAGCCCAAGCCTCATTGCTGGGAGCAAGAATGTGAAGCTC**CCG**CC**CC**TCGATCTCCTTGCATTTGGC**CC**CTCAGAGTACAT3'

Şekil 3.23. Tgfb1-ssODN-nt ve tgfb1-ssODN-t tasarımları

Mavi renkle istenilen amino asit değişikliğine sebep olan varyasyonlar, yeşil renkle ise restriksiyon enzim kesim bölgesi oluşturan sessiz varyasyonlar belirtilmiştir.

### 3.2.9. Zebra Balığı Embriolarına Mikroenjeksiyon

Yabanıl tip AB balıkların çiftleşmesini takiben ilk 15 dakika içerisinde embriyolar toplanmıştır. Tek hücreli zebra balığı embriolarına, çeşitli konsantrasyonlarda sağ/sol TALEN mRNA'ları ya da sgRNA/Cas9 mRNA karışımları ssODN eklenerek ya da eklenmeden fenol kırmızısı ile enjekte edilmiştir. Mikroenjeksiyon işlemi stereomikroskop altında önceden hazırlanmış borosilicate mikropiller tüpler ile kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Enjeksiyon için yaklaşık 100 tek hücreli embriyo enjeksiyon kalıbına yerleştirilmiştir. Enjeksiyon için hazırlanan karışım mikropiller tüpe 5 µl olacak şekilde konulmuştur. Mikropiller tüp pico-enjektör cihazına yerleştirilmiştir. Enjeksiyon miktarı mikroskop altında

mikroenjeksiyon cetveli ve mineral yağı sayesinde 2nl olacak şekilde ayarlanmıştır. Ardından her bir embriyonun yolk kısmına enjeksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Enjeksiyon yapılmayan embriyolarla kontrol olarak saklanmıştır. Enjeksiyon sonrası tüm embriyolar 5 gün boyunca takip edilmiş ve ölüm, hasar ve hayatta kalma oranları kaydedilmiştir. Her bir enjeksiyon grubundan seçilen embriyolardan DNA izolasyonu yapıp, hedef bölgede varyasyon varlığı araştırılmıştır. Varyasyon tespit edilmesi durumunda, embriyolar büyütölmek üzere bakıma alınmıştır.

### 3.2.10. Zebra Balığında DNA İzolasyonu

24 saatlik embriyolar tek tek PZR tüplerinin içine aktarılmıştır. Aktarılan embriyoların üzerine 10 ul 50 mM NaOH çözeltisi eklenmiş ve 20 dakika boyunca 95 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra vortekslenerek tüm embriyonun dağılması sağlanmış ve 10 ul 40 mM Tris-Hidroklorik asit çözeltisi eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. Reaksiyonlar için elde edilen ana stok DNA 1/50 oranında distile su ile dilue edilmiştir.

Kuyruk dokusundan genotiplendirme ise 3 aydan büyük balıklardan yapılmıştır. Kuyruk dokusu alınacak balıklar *tricaine* ile anestezi altına alınmıştır. Bistüri yardımı ile kesilen kuyruk dokusu PZR tüplerine alınmıştır. Bu süreçte balıklar karışmamaları için ayrı ayrı tutulmuştur. Kuyruk dokularının üzerine 20 ul 50 mM NaOH çözeltisi eklenmiş ve 30 dakika boyunca 95°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra vortekslenerek tüm dokunun dağılması sağlanmış ve 20 ul 40 mM Tris-Hidroklorik asit çözeltisi eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. Reaksiyonlar için elde edilen ana stok DNA 1/50 oranında distile su ile dilue edilmiştir.

### 3.2.11. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Tgfb1 geninde hedef bölgenin çoğaltılması ve analizlerde kullanılabilmesi için PZR reaksiyonu gerçekleştirildi. Bu reaksiyonda kullanılan primerler Tablo 3.1’de yer almaktadır. Reaksiyon için; PZR tüpünde son hacim 25 µl olup içeriği şu şekildedir: Her primerden 0.5 µl, MgCl<sub>2</sub> (25 mM) 2 µl, dNTP (10 mM) 1 µl, PZR tamponu 2,5 µl, Taq DNA polimeraz (5 U / 50 µl) 0.2µl, DNA 7 µl (250 ng), 11,3µl distile su.

PZR işlemini gerçekleştirmek için, otomatik ısı döngü cihazı aşağıda belirtilen sıcaklık ve sürelerle göre ayarlanmıştır.

94°C – 5 dk.	1 döngü
94°C – 30 sn 58°C – 30 sn 72°C – 30 sn	35 döngü
72°C – 30 sn	1 döngü
4°C	∞

### 3.2.12. DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizinde dizilenmek istenen bölge öncelikli olarak uygun primerler kullanılarak PZR reaksiyonu ile çoğaltılmıştır. Daha sonra PZR ürünleri DNA kalıbı olarak kullanılmış ve Sanger dizileme yöntemini taban alan floresan işaretli ddNTP'ler kullanılarak aşağıdaki reaksiyon gerçekleştirilmiştir:

5X Sequencing buffer: 4 ul

Forward primer (3,2 uM): 1 ul

Big Dye Mix: 2 ul

PCR ürünü (60 ng/ul): 1 ul

Distile H2O: 12 ul

PZR cihazında kullanılan program:

94°C – 5 dk.	1 döngü
94°C – 15 sn. 50°C – 15 sn. 60°C – 4 dk	25 döngü
60°C – 1 dk.	1 döngü
4°C	∞

DNA dizi analizi reaksiyon ürünlerinin saflaştırılması: DNA dizi analizi reaksiyon ürünleri üzerine, 2 µl sodyum asetat (3M, pH 5) eklenmiştir. Her bir örneğin tamamı, 1,5 ml'lik tüpe aktarıldıktan sonra, üzerine 60 µl %100 etanol eklenmiştir ve -20 °C'de bir gece boyunca bekletilmiştir. Örnekler, 16.000 g'de 30 dk. çöktürülmüştür. Oluşan pelete dokunmadan üst faz atılmıştır. Örnekler, %70 etanol eklendikten sonra, 16.000 g'de 30 dk. çöktürülmüştür. Pelete dokunmadan üst faz atılmıştır ve bir sonraki basamağa geçmeden önce peletin tamamen kuruması

beklenmiştir. Örnekler, 20 µl Formamid eklendikten sonra, 94 °C’de 10 dk. denatürasyona bırakılmıştır ve denatürasyon bitiminde 4 °C’ ye soğutulmuştur. Soğutulan örnekler, 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) cihazına yüklenerek DNA dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, Chromas Lite programı (versiyon 2.4.1) ve 4Peaks (v1.8) ile incelenmiştir.

### 3.2.13. T7EI Analizi

T7 Endonükleaz 1, yanlış eşleşme analizi için DNA örneklerinden hedef bölge PZR reaksiyonu ile çoğaltılmıştır. PZR ürünlerinin 10µl’sinde heterodupleks oluşturma reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu reaksiyon PZR cihazında, PZR ürününün 95 °C 10 dakika tutularak denatüre edilmesi ardından sıcaklığın saniyede 2 °C azaltılarak 85 °C’ye düşürülmesi ve ardından saniyede 1 °C azaltılarak 25 °C’ye kadar düşürülmesi ile tamamlanır. Ardından aşağıda belirtilen bileşenler kullanılarak hazırlanan solüsyon 45 dakika boyunca 37°C’de PZR cihazında inkübe edilmiş ve elde edilen tüm ürün %3’lük agaroz jelde yürütülmüştür. Yanlış eşleşme gözlenen yani pozitif sonuç alınan örneklerde birden fazla bant izlenirken, yanlış eşleşme bulunmayan örneklerde tek bant izlenmiştir.

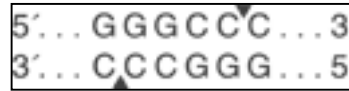
Bileşen	Miktar (µl)
Heterodupleks PCR ürünü	10
10x NEB II Buffer	1.5 (1x)
T7 Endonükleaz I (10000 U/ml)	0.5
Nükleazdan arındırılmış su	3
Son hacim	15

### 3.2.14. RFLP Analizi

Enjeksiyon yapılan embriyolarda tasarlanmış olan ssODN ile HDR aracılı genom düzenleme gerçekleşmesi durumunda örneklerde mozaik olarak ApaI restriksiyon enzim kesim noktası taşıyan diziye sahip olacaklardır. PZR ile bu DNA parçasının çoğaltılması sonrası yapılacak RFLP analizinde bunu çift bant görerek tespit etmek mümkündür (10). ApaI restriksiyon enziminin tanıma bölgesi Şekil

3.24'de gösterilmiştir. 0.2 ml'lik ependorf tüpünün içine 15 µl PZR ürünü, 2 µl tampon, 10 ünite ApaI restriksiyon enzimi eklendi. Bu bileşenler üreticinin talimatları doğrultusunda 25°C' de 15 dakika inkübe edildikten sonra tüplerden alınan 8 µl kesim ürünü ile 3 µl Bromfenol mavisi ile karıştırılarak %4'lük agaroz jele yüklendi. %4'lük agaroz jelde PBR322 moleküler ağırlık belirteci, örnekler ve kontrol 120 dakika 120V sabit akımda yürütülüp ultraviyole lamba altında incelenip fotoğrafı çekilmiştir. Çift bantın varlığı ve yokluğu örneklerde kontrol edilmiştir.

Bileşenler	Miktar (µl)
ApaI enzimi (50000 U/ml)	0.5
Cut smart buffer (10X)	2
Distile su	2.5
PCR ürünü	15
Final volüm	20



**Şekil 3.24.** ApaI restriksiyon enzimi tanıma ve kesme dizisi.

Kesim yaptığı bölgeler oklarla belirtilmiştir.

### 3.2.15. Heterozigot F1 Hattının Oluşturulması

Enjeksiyon yapılan embriyolarda DNA dizi analizleri ile istenilen bölgede varyasyon tespit edilen embriyolar üç ay boyunca büyütülmüştür. *Germ line* aktarımı test etmek için büyütülen balıklar yabancı (wt) balıklar ile çaprazlanarak progen embriyolar (F1) toplanmıştır. Bu embriyolarda DNA dizi analizi ile hedef bölgede mevcut varyasyonlar saptanmıştır. Hedefte uygun varyasyon taşıyan embriyoları veren atasal balık F0 (*founder*) olarak ayrılmıştır. Varyasyonun embriyolara aktarım oranı, F0'ların *germ line* hücrelerindeki mozaisizm oranına bağlıdır. F0'ların yabancı tip balıklarla çaprazlaşması sonucu elde edilen embriyolar 3 aylık oluncaya kadar büyütülmüşlerdir. *Fin clip* yöntemi ve DNA dizi analizi ile uygun varyasyonu heterozigot olarak taşıyan F1 balıklar tespit edilmiştir. Hastalığın heterozigot balıklarda da görülmesi beklendiğinden bu balıklar hastalığın varlığı açısından ileri çalışmalar için ayrılmıştır.

### 3.2.16. Zebra Balığı Gözünden Protein İzolasyonu

Yabanıl tip ve tgfb1-heterozigot zebra balığı gözünden protein izolasyonu yapılmıştır. Zebra balıklarında yüksek doz *tricaine* kullanılarak ötenazi yapılmıştır. Stereomikroskop altında penset, bistüri ve enjektör yardımı ile her iki göz diseksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bir balıktan elde edilen iki adet göz porselen havanda sıvı azot kullanılarak toz haline getirilmiştir. Toz halindeki dokular falkon tüpüne aktarılıp tartılmış ve tartılan doku miktarının iki katı kadar olan protein izolasyon tamponu içerisine alınmıştır. Örnek, buz üzerine alınıp sonikatör ile 10 saniyede bir 10 saniye süresince bekletilerek %50 amplitütte, homojen olana dek parçalanmıştır. Parçalanmış dokular +4 °C'de 15 dk. 14,000 rpm'de çöktürülmüştür. Çöken hücre artıkları atılarak, proteinlerin bulunduğu üst faz yeni bir tüpe aktarılmıştır.

Proteinlerin derişimleri BCA *Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak ölçülmüştür. %1 SDS kullanılarak kör çözelti hazırlanmıştır. 2 mg/ml derişimindeki albümin standartları %1 SDS ile seyreltilerek 0,4 mg/ml, 0,8 mg/ml, 1,2 mg/ml, 1,5 mg/ml ve 1,8 mg/ml konsantrasyonlu standart çözeltiler hazırlanmıştır. Protein örnekleri %1 SDS ile 20 kat seyreltilmiştir. Kit içerisinde yer alan A ve B çözeltileri 50:1 oranında karıştırılarak çalışma çözeltisi hazırlanmıştır. Standart çözeltiler ve seyreltilen protein örnekleri üzerine 1'er ml çalışma çözeltisi eklenmiştir. 37°C'de 30dk.inkübasyona bırakılmıştır. Standart çözeltilerin spectramax cihazında 562 nm dalga boyunda verdikleri absorbans değerleri ile standart eğri çizilmiştir. Elde edilen değerler sulandırma faktörü olan 20 ile çarpılarak proteinin konsantrasyonu hesaplanmıştır.

### 3.2.17. Western Blot

Poliakrilamid jel elektroforezi için kullanılan camlar %70'lik etanol ile temizlenmiş ve camlar üst üste konularak jel dökme aparatına yerleştirilmiştir. %10'luk ayırıcı jel hazırlanmış ve camların arasına dökülmüştür. Jelin üzerine izopropil alkol eklenmiştir. Jel polimerleşince izopropil alkol dökülmüş ve jel distile su ile yıkanmıştır. %5'lik toplayıcı jel hazırlanarak ayırıcı jelin üzerine dökülmüş ve 10 kuyucuklu tarak jelin üzerine yerleştirilmiştir. Jel polimerleştikten sonra camlar elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Tank içerisine camların üzerini örtecek kadar yürütme tamponu konulmuş ve tarak jelden çıkarılmıştır. Kuyucuklar enjektör yardımı

ile temizlenmiştir. Toplam hacim 25 µl olacak şekilde 40 µg protein 1:1 oranında Laemmli yükleme tamponu ile muamele edildikten sonra 100°C suyun içerisinde 4 dk. denatürasyona bırakılmış ve ardından jele yüklenmiştir. Örnekler toplayıcı jelden ayırıcı jele geçinceye kadar 80 V'ta 20dk. yürütülmüştür. Protein ağırlık belirleyicisi takip edilerek 120V'ta yaklaşık 3 saat yürütmeye devam edilmiştir. Yürütme işlemi tamamlandığında jel tanktan çıkarılmış ve toplayıcı jel kesilerek atılmıştır. Jel, jel boyutlarında kesilmiş 9 adet whatmann kağıdı ve nitroselüloz membran 15 dk. süresince yarı kuru transfer tamponunda bekletilmiştir. Yarı kuru transfer aletine sırasıyla 5 adet whatmann kağıdı, nitroselüloz membran, jel ve tekrar 4 adet whatmann kağıdı yerleştirilmiştir. Yarı kuru transfer, 25V'ta 30 dakika yapılmıştır. Transfer sonrasında jel Coomassie Blue çözeltisi ile membran ise Ponceau S çözeltisi ile boyanmıştır. Ponceau S çözeltisi distile su ile temizlendikten sonra membran çalkalayıcı üzerinde 1x TBS-T içinde %5'lik süt tozu çözeltisi ile 1 saat inkübasyona bırakılarak bloklama işlemi yapılmıştır. Bloklamanın ardından membran +4°C 'de çalkalayıcı üzerinde 1x TBS-T içinde %5'lik süt tozu çözeltisi ile hazırlanmış primer antikor solüsyonu ile 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. Membran çalkalayıcı üzerinde üç defa 10 dk. süresince 1x TBS-T ile yıkanmıştır. Yıkama sonrasında membran oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 1x TBS-T içinde %5'lik süt tozu çözeltisi ile hazırlanmış sekonder antikor solüsyonu ile 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Membran çalkalayıcı üzerinde üç defa 10 dk. boyunca 1x TBS-T ile yıkanmıştır. Görüntüleme kitinin içinde bulunan solüsyonlar 1:1 oranında karıştırılmış ve membran karanlık bir ortamda bu karışım ile 5dk. boyunca muamele edilmiştir. GeneGenome kemilüminesans görüntüleme cihazı kullanılarak 3 dk.'lık poz süreleri ile fotoğraflar çekilmiştir.

### 3.2.18. Zebra Balığı Gözünde Histokimyasal Boyamalar

Zebra balıklarında yüksek doz *tricaine* (250 mg/L) ile ötenazi yapılmıştır. Zebra balıklarının baş bölgesi bistüri kullanılarak mikroskop altında gövde bölgesinden ayrılmıştır ve %10 formol solüsyonu içerisinde 24 saat tespit edilmiştir. Rutin doku takip işlemlerini takiben parafin içerisinde kraniokaudal ekseninde gömülen baş bölgesinden korneanın merkezine yakın bölgelerden geçecek şekilde 3 farklı seviyeden 8 µm kalınlığında ardışık transvers kesitler alınmıştır. Korneanın genel



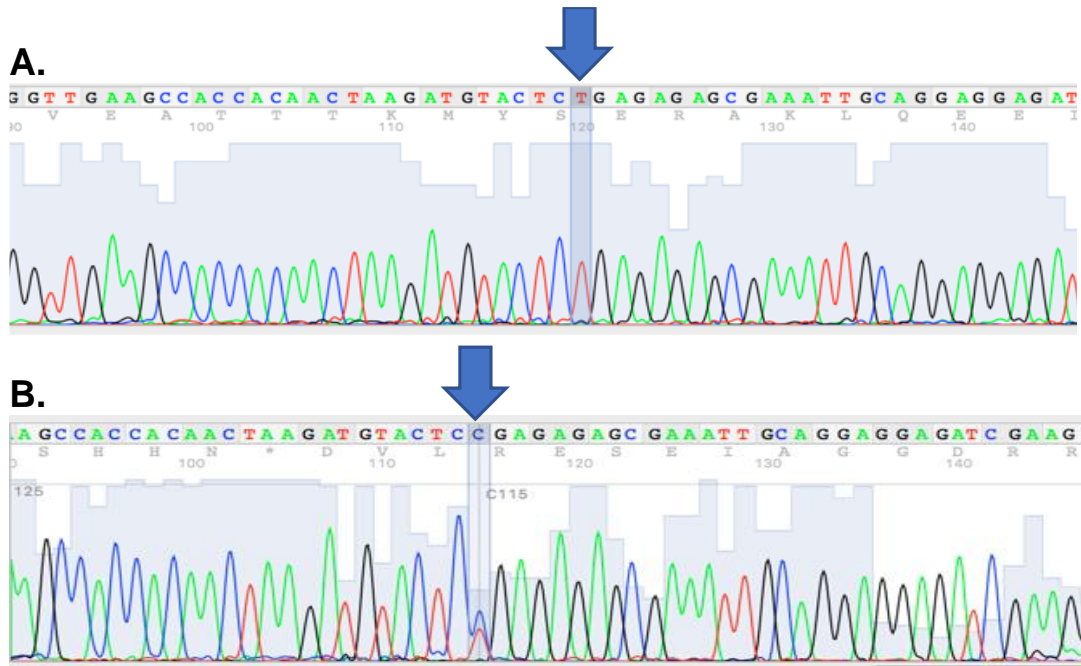
yapısını ve katmanlarını incelemek üzere Hematoksilen ve Eozin ile boyama gerçekleştirilmiştir. Hastalık gelişimi açısından da yabancı tip ve heterozigot balıklarda ardışık kornea kesitleri amiloid yapıda olmayan birikimleri görmek için Masson trikrom ile, amiloid yapıda birikimleri görmek için ise Kongo kırmızısı ile boyanmıştır. Tüm örnekler Nikon Eclipse E-400 mikroskopunda incelenmiş ve DXM 1200F digital kamera ile fotograflanmıştır.

Histokimyasal boyamalar ve sonuçların değerlendirilmesi Dr. Öğretim üyesi Beril Talim'in sorumluluğunda Pediatrik ve Perinatal Patoloji Bölümü'nin sarf ve alt yapı olanakları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Yabanıl Tip Zebra Balıklarında Tgfb Geninde Ekson 4'ün Dizi Analizi

Toplam 12 yabanıl tip zebra balığında hedef bölgede herhangi bir polimorfizm olup olmadığını göstermek amacı ile DNA dizi analizi yapıldı. Bu analizlerde yabanıl tip AB zebra balıklarında 14. kromozom 4. eksonda 26.523.317 lokasyonunda Ensemble veri tabanında ENSDARG00000071586 kodlu referans dizide bildirilmemiş olan C/T varyasyonu heterozigot olarak ya da homozigot olarak gözlenmiştir (Şekil 4.1). Bu varyasyon hedef kodonun komşuluğunda yer alması nedeniyle genom düzenleme araçlarının tasarlanması ve tasarlanan araçların etkinliklerinin değerlendirilmesinde farklılıklara yol açabilecek özelliktedir. Dolayısıyla tasarım aşamasında bu polimorfizm dikkate alınarak ya bu bölgeyi hedeflemeyen araçlar tasarlandı ya da birden fazla tasarım yapılarak her iki alelin de hedeflenebilmesi sağlandı.



Şekil 4.1. AB yabanıl tip balıklardaki kromatogram görüntüleri.

A. homozigot ya da B. heterozigot olarak gözlenen C/T polimorfizmi (mavi okla belirtilmiştir).

#### 4.2. Tgfbi-TALEN Konstraktlarının Embriyolara Mikroenjeksiyonu Sonrasında Yapılan Varyasyona Yönelik Analiz Sonuçları

Tek hücreli zebra balığı embriyolarına, belirli oranlarda sağ/sol TALEN mRNA'larının enjeksiyonu yapıldı. İlk yapılan denemedeki enjeksiyon miktarları ve enjeksiyon sonrası 24. saatte elde edilen sonuçlar Tablo 4.1'de gösterilmiştir. Ardından enjeksiyonda kullanılan mRNA miktarları azaltılarak enjeksiyonlar tekrarlandı (Tablo 4.2 ve 4.3). Her bir enjeksiyon grubundan seçilen embriyolardan DNA izolasyonu yapıp, hedef bölgede çift zincir kırık oluşumunun olup olmadığını anlamak üzere DNA dizi analizi yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre 100 pg ve üzeri TALEN mRNA'sının toksik olduğu ve hiçbir embriyonun yaşamadığı gözlemlendi. 20 ve 50 pg kullanılarak yapılan TALEN mRNA enjeksiyonları zebra balığı embriyoları için toksik olmamakla birlikte DNA dizi analizi sonucunda hiçbir grupta çift zincir kırık tespit edilemedi (Şekil 4.2). Bu durumda TALEN konstraktının kırık oluşturma etkinliğinin düşük olduğu ya da olmadığı düşünülebilir. Çift zincir kırık ve mutasyon henüz tespit edilmediği için, TALEN RNA'larının verici kalıp DNA ile birlikte embriyolara mikroenjeksiyonu planlanmadı. TALEN yerine çift zincir kırık oluşturmak için CRISPR/Cas9 sisteminin kullanılmasına karar verildi.

**Tablo 4.1.** TALEN platformu ile ilk mikroenjeksiyon.

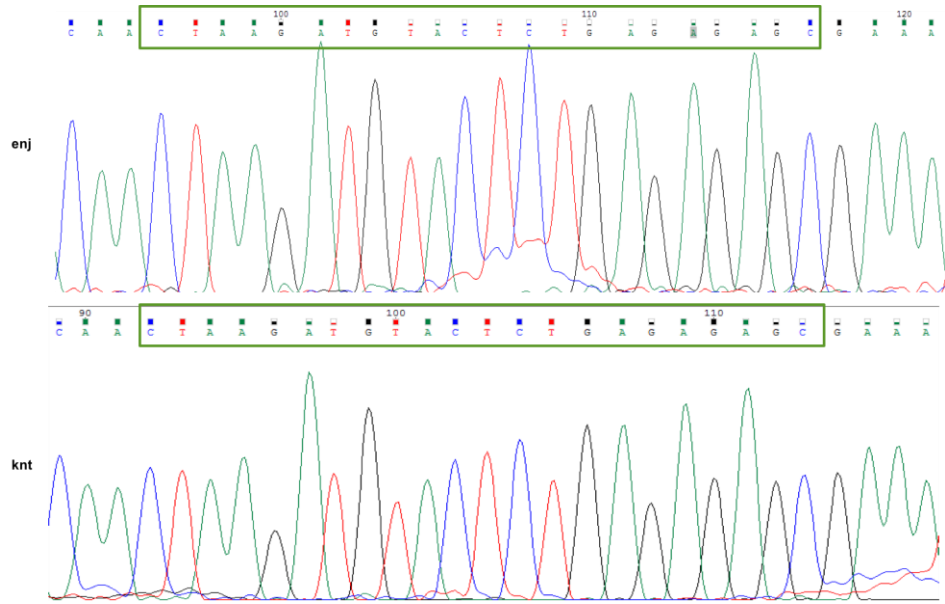
	Enjeksiyon 1	Enjeksiyon 2	Kontrol
Sol TALEN mRNA	300 pg	150 pg	-
Sağ TALEN mRNA	300 pg	150 pg	-
Embriyo sayısı	50	24	26
24. saat yaşayan embriyo	25	12	22
24. saat ölü embriyo	25	12	4
24. saat hasarlı embriyo	1	1	02
Örnek sayısı	8	8	-
Mozaiklik tespit edilen	0	0	-

Her embriyo için enjeksiyonda kullanılan TALEN mRNA miktarları, 24. saatte enjeksiyon gruplarında ve enjeksiyon yapılmayan kontrollerde kaydedilen ölü, canlı ve hasarlı embriyo sayıları ve toplanan örnek embriyolarda yapılan DNA dizi analiz sonuçlarındaki mozaiklik saptanan embriyo sayıları belirtilmiştir.

**Tablo 4.2.** TALEN platformu ile ikinci mikroenjeksiyon.

	Enjeksiyon 1	Enjeksiyon 2	Enjeksiyon 3	Kontrol
Sol TALEN mRNA	100 pg	50 pg	20 pg	-
Sağ TALEN mRNA	100 pg	150 pg	20 pg	-
Embriyo sayısı	40	42	28	40
24. saat yaşayan embriyo	2	24	17	38
24. saat ölü embriyo	38	18	11	2
24. saat hasarlı embriyo	0	1	0	02
Örnek sayısı	10	10	10	-
Mozaiklik tespit edilen	0	0	0	-

Her embriyo için enjeksiyonda kullanılan TALEN mRNA miktarları, 24. saatte enjeksiyon gruplarında ve enjeksiyon yapılmayan kontrollerde kaydedilen ölü, canlı ve hasarlı embriyo sayıları ve toplanan örnek embriyolarda yapılan DNA dizi analiz sonuçlarındaki mozaiklik saptanan embriyo sayıları belirtilmiştir.

**Şekil 4.2.** Tgfbi-TALEN mRNA enjeksiyonu sonrası DNA dizi analizi yapılan örneklerden ve kontrolden kromatogram görüntüsü.

Enjeksiyon yapılan ve kontrol örneklerin her ikisinde de dizi analizinde mozaiklik bulgusu gözlenmemiştir.

**Tablo 4.3.** TALEN platformu ile üçüncü mikroenjeksiyon.

	<b>Enjeksiyon 1</b>	<b>Enjeksiyon 2</b>	<b>Kontrol</b>
Sol TALEN mRNA	50 pg	20 pg	-
Sağ TALEN mRNA	50 pg	20 pg	-
Embriyo sayısı	38	28	29
24. saat yaşayan embriyo	18	17	27
24. saat ölü embriyo	20	11	2
24. saat hasarlı embriyo	0	0	0
Örnek sayısı	10	10	-
Mozaiklik tespit edilen	0	0	-

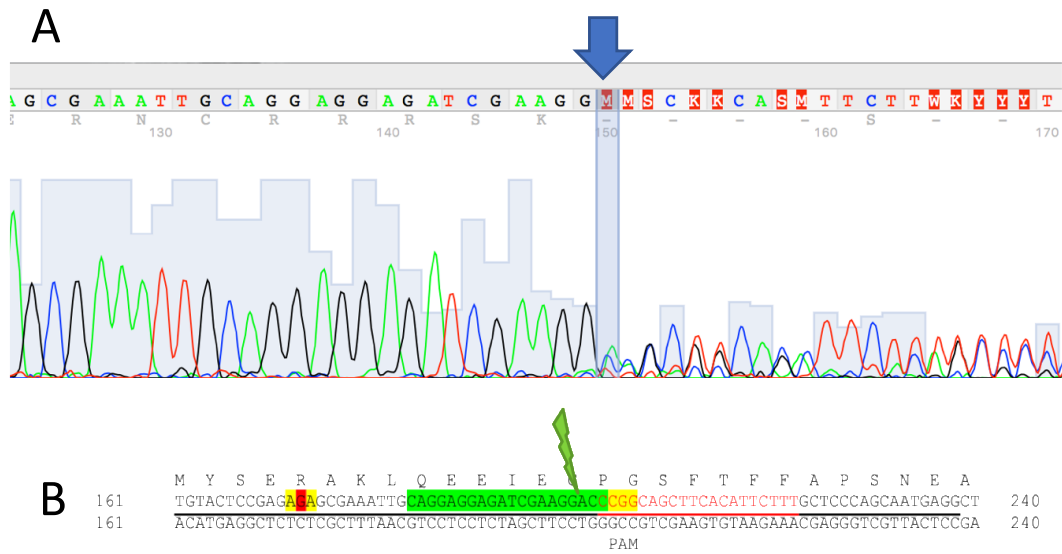
Her embriyo için enjeksiyonda kullanılan TALEN mRNA miktarları, 24. saatte enjeksiyon gruplarında ve enjeksiyon yapılmayan kontrollerde kaydedilen ölü, canlı ve hasarlı embriyo sayıları ve toplanan örnek embriyolarda yapılan DNA dizi analiz sonuçlarındaki mozaiklik saptanan embriyo sayıları belirtilmiştir.

### **4.3. CRISPR/Cas9 Konstraktlarının Embriyolara Mikroenjeksiyonu**

#### **Sonrasında Yapılan Varyasyona Yönelik Analiz Sonuçları**

##### **4.3.1. Tgfbi-sgRNA-1 ve Cas9 Mikroenjeksiyonu**

Mikroenjeksiyon sırasında her bir embriyo için enjeksiyon gruplarında kullanılan sgRNA ve Cas9 mRNA miktarları; 24. saatte enjeksiyon gruplarında ve enjeksiyon yapılmayan kontrollerde kaydedilen ölü, canlı ve hasarlı embriyo sayıları ve toplanan örnek embriyolarda yapılan DNA dizi analizi sonuçlarındaki mozaiklik saptanan embriyo sayıları Tablo 4.4'te belirtilmiştir. Dizi analizi yapılan embriyoların bir kısmında çift zincir kırık gerçekleştiğini gösteren kromatogram görüntüsü Şekil 4.3'te yer almaktadır.



**Şekil 4.3.** Tgfb1-sgRNA-1 ve Cas9 mRNA enjeksiyonu sonrası kromatogram görüntüsü ve hedef tgfb1 dizisi.

A. Kromatogramda insersiyon ve delesyonlara bağlı çerçeve kayması ve üst üste çakışan nükleotitlerin başladığı nokta mavi okla belirtilmiştir, B. PAM dizisinin 3 bç *upstream* 'inde oluşan çift zincir kırık yeşil okla gösterilmiştir.

**Tablo 4.4.** Tgfb1-sgRNA-1 ve Cas9 ile mikroenjeksiyon.

	Enjeksiyon 1	Enjeksiyon 2	Enjeksiyon 3	Kontrol
Tgfb1-sgRNA-1	130 pg	100 pg	50 pg	-
Cas9 mRNA	235 pg	235 pg	235 pg	-
Embriyo sayısı	24	31	24	46
24. saat yaşayan embriyo	7	21	12	36
24. saat ölü embriyo	17	10	12	2
24. saat hasarlı embriyo	0	0	0	
Canlılık oranı	%29	%67	%50	%56
Örnek sayısı	6	8	7	-
Mozaiklik (+)	1	4	0	-

Her embriyo için enjeksiyonda kullanılan miktarlar, 24. saatte enjeksiyon gruplarında ve enjeksiyon yapılmayan kontrollerde kaydedilen ölü, canlı ve hasarlı embriyo sayıları ve toplanan örnek embriyolarda yapılan DNA dizi analiz sonuçlarındaki mozaiklik saptanan embriyo sayıları belirtilmiştir.

Sonuç olarak, yapılan enjeksiyonlarda çift zincir kırık oluşturma etkinliğinin en yüksek olarak tespit edildiği grup tgfb1 geni için tgfb1-sgRNA-1 ile hedeflenen bölgede %50 (8/4) mozaik sekans sonucu ile 2. enjeksiyon grubu olmuştur. Bu

mozaiklik oranı kalıp DNA ile insersiyon aşamasına geçilmesi için yeterli bulunmuştur. Bu nedenle mikroenjeksiyona ssODN eşliğinde devam edilmesine karar verilmiştir.

#### **4.3.2. Tgfbi-sgRNA-1, Cas9 ve Tgfbi-e4-ssODN Mikroenjeksiyonu**

Yabani tip AB balıkların çiftleşmesini takiben ilk 15 dakika içerisinde embriyolar toplanmıştır. Embriyolar henüz tek hücreli iken farklı konsantrasyonlarda hazırlanan sgRNA/Cas9 mRNA ve ssODN karışımları ile mikroenjeksiyon gerçekleştirilmiştir (Tablo 4.5). Enjeksiyon yapılan embriyolarda hedeflenen gende DNA'da kırık oluşup oluşmadığını ve kısa insersiyonun gerçekleşip gerçekleşmediğini tespit etmek amacıyla her enjeksiyon grubundan rastgele seçilen 20 adet embriyoda DNA dizi analizi yapılmıştır. Test edilen embriyo sayısının bir önceki aşamaya göre fazla tutulmasının sebebi literatürde belirtilen HDR aracılı kısa insersiyon oranlarının %0 ile %8 arasında, oldukça düşük bildirilmesidir (107). DNA örneklerinin kromatogram görüntüsünde, PAM dizisine yakın bir noktada üstüste çakışan (mozaikliği ifade eden) nükleotit sinyalleri görülmesi çift zincir kırık oluşumunu gösterirken, ssODN dizisinde mevcut olan nükleotit değişikliklerinin heterozigot olarak gözlenmesi kısa insersiyonun gerçekleştiğini gösterecektir. Ancak embriyolara ait DNA dizi analizi sonuçlarında herhangi bir mozaiklik tespit edilememiştir (Şekil 4.4). Bu sonuçlar kullanılan sgRNA etkinliğinin yeterince yüksek olmamasıyla açıklanabilir. Bir diğer açıklama ise enjeksiyon yapılan embriyolarda mozaiklik oranının dizileme yöntemi ile tespit edilemeyecek kadar düşük oranda gerçekleşmesi olabilir. Bu sonuçlar nedeniyle sonraki aşamada tgfb1 geninde hedeflenen bölgeye daha yakın bir noktadan ve daha yüksek etkinlikte çift zincir kırık oluşturan bir sgRNA dizisinin tasarlanması hedeflenmiştir.

**Tablo 4.5.** Tgfbi-sgRNA-1, Cas9 ve tgfbi-e4-ssODN ile mikroenjeksiyon.

	Enjeksiyon 1	Enjeksiyon 2	Enjeksiyon 3	Enjeksiyon 4	Kontrol
Tgfbi-sgRNA-1	100 pg	100 pg	100 pg	130 pg	-
Cas9 mRNA	235 pg	235 pg	235 pg	235 pg	-
Tgfbi-e4-ssODN	60 pg	90 pg	120 pg	120 pg	-
Embriyo sayısı	60	66	52	57	94
Canlı embriyo sayısı	35	30	22	12	55
Ölü embriyo sayısı	25	36	30	45	39
Hasarlı embriyo sayısı	2	2	4	4	0
% canlılık	%58	%45	%42	%21	%58
Örnek sayısı	20	20	20	12	-
Mozaiklik (+)	0	0	0	0	-

Her embriyo için enjeksiyonda kullanılan miktarlar, 24. saatte enjeksiyon gruplarında ve enjeksiyon yapılmayan kontrollerde kaydedilen ölü, canlı ve hasarlı embriyo sayıları ve toplanan örnek embriyolarda yapılan DNA dizi analiz sonuçlarındaki mozaiklik saptanan embriyo sayıları belirtilmiştir.

**Şekil 4.4.** Enjeksiyon yapılan embriyolara ait kromatogram görüntüsü.

Herhangi bir mozaiklik bulgusu gözlenmemiştir (mavi okla belirtilen alan değişiklik hedeflenen kodon).

### 4.3.3. Tgfbi Geninde Hedef Kodona Daha Yakın Mesafeden Bağlanabilen ve/veya Daha Yüksek Etkinlikte Çift Zincir Kırık Oluşturması Beklenen Yeni sgRNA'lar ile Yapılan Mikroenjeksiyonlar

Daha önceki çalışmalarda %50 etkinlikle hedef bölgenin 26 nükleotit uzaklığında çift zincir kırık oluşturulduğu gösterilen tgfbi-sgRNA-1'in, ssODN



eşliğinde yapılan denemelerde etkin olmadığı gösterildiği için CRISPR/Cas9 alanındaki yeni çalışma sonuçları da değerlendirilerek bu sgRNA'ya alternatif olarak hedefe daha yakın noktadan kırık oluşturabilme olasılığına sahip ve/veya daha yüksek etkinlikte kırık oluşturabilecek sgRNA'lar tasarlanmıştır (Tablo 3.4). Her grupta enjekte edilen sgRNA ve Cas9 mRNA miktarları, enjeksiyon yapılan embriyo sayısı, enjeksiyondan 24 saat sonra kaydedilen canlı, ölü ve hasarlı embriyo sayıları Tablo 4.6-4.10'da gösterilmiştir. Enjeksiyon yapılan embriyolarda hedeflenen bölgede DNA'da kırık oluşup oluşmadığını tespit etmek amacıyla her enjeksiyon grubundan fertilizasyon sonrası 48. saatte rastgele seçilen 16-24 adet embriyoda T7 Endonükleaz I (T7EI) analizi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca T7EI analizinde pozitif sonuç elde edilen örneklerin bir kısmında çift zincir kırık oluşumunu teyit etmek amacıyla DNA dizi analizi yapılmıştır. Buna ek olarak T7EI analizinde pozitif sonuç alınmayan gruplarda da DNA dizi analizi yapılmıştır. 5 farklı enjeksiyon grubuna ait sonuçlar Şekil 4.5'te gösterilmiştir. T7EI analizinde en yüksek oranda pozitif sonuç tgfb-sgRNA-2'nin kullanıldığı enjeksiyon grubunda elde edilmiştir.

**Tablo 4.6.** Tgfb-sgRNA-2 ve Cas9 mRNA'sı ile mikroenjeksiyon.

	<b>Enjeksiyon 1</b>	<b>Enjeksiyon 2</b>	<b>Kontrol</b>
Tgfb-sgRNA-2 miktarı	40 pg	80 pg	-
Cas9 mRNA miktarı	300 pg	300 pg	-
Embriyo sayısı	60	52	78
Canlı embriyo sayısı	35	12	40
Ölü embriyo sayısı	25	40	38
Hasarlı embriyo sayısı	2	2	0
% canlılık	%58	%23	%51
T7EI (+)	%100	%100	-

Her embriyo için enjeksiyonda kullanılan miktarlar, 24. saatte enjeksiyon gruplarında ve enjeksiyon yapılmayan kontrollerde kaydedilen ölü, canlı ve hasarlı embriyo sayıları ve toplanan örnek embriyolarda yapılan T7EI analiz sonuçlarındaki yanlış eşleşme saptanan embriyo oranı belirtilmiştir.

**Tablo 4.7.** Tgfbi-sgRNA-3 ve Cas9 mRNA'sı ile mikroenjeksiyon.

	<b>Enjeksiyon 1</b>	<b>Enjeksiyon 2</b>	<b>Enjeksiyon 3</b>	<b>Kontrol</b>
Tgfbi-sgRNA-3 miktarı	40 pg	80 pg	120 pg	-
Cas9 mRNA miktarı	300 pg	300 pg	300 pg	-
Embriyo sayısı	100	86	52	92
Canlı embriyo sayısı	55	40	15	51
Ölü embriyo sayısı	45	46	37	41
Hasarlı embriyo sayısı	1	3	3	0
% canlılık	%55	%46	%29	%55
T7EI (+)	%0	%0	%0	-

Her embriyo için enjeksiyonda kullanılan miktarlar, 24. saatte enjeksiyon gruplarında ve enjeksiyon yapılmayan kontrollerde kaydedilen ölü, canlı ve hasarlı embriyo sayıları ve toplanan örnek embriyolarda yapılan T7 analiz sonuçlarındaki yanlış eşleşme saptanan embriyo oranı belirtilmiştir.

**Tablo 4.8.** Multiplex tgfbi-sgRNA-4, tgfbi-sgRNA-5 ve Cas9 mRNA'sı ile mikroenjeksiyon.

	<b>Enjeksiyon 1</b>	<b>Enjeksiyon 2</b>	<b>Kontrol</b>
Multiplex tgfbi-sgRNA-4 + tgfbi-sgRNA-5 miktarı	25 pg	50 pg	-
VQR Cas9 mRNA miktarı	300 pg	300 pg	-
Embriyo sayısı	50	61	46
Canlı embriyo sayısı	30	25	26
Ölü embriyo sayısı	20	36	20
Hasarlı embriyo sayısı	1	2	0
% canlılık	%60	%41	%56
T7EI (+)	%0	%0	-

Her embriyo için enjeksiyonda kullanılan miktarlar, 24. saatte enjeksiyon gruplarında ve enjeksiyon yapılmayan kontrollerde kaydedilen ölü, canlı ve hasarlı embriyo sayıları ve toplanan örnek embriyolarda yapılan T7EI analiz sonuçlarındaki yanlış eşleşme saptanan embriyo oranı belirtilmiştir.

**Tablo 4.9.** Multiplex tgfb-sgRNA-6, tgfb-sgRNA-7 ve VQR varyant Cas9 mRNA'sı ile mikroenjeksiyon.

	<b>Enjeksiyon 1</b>	<b>Enjeksiyon 2</b>	<b>Kontrol</b>
Multiplex tgfb-sgRNA-6 + tgfb-sgRNA-7 miktarı	25 pg	50 pg	-
VQR Cas9 mRNA miktarı	300 pg	300 pg	-
Embriyo sayısı	87	66	82
Canlı embriyo sayısı	57	31	66
Ölü embriyo sayısı	30	34	16
Hasarlı embriyo sayısı	1	1	0
% canlılık	%65	%47	%80
T7EI (+)	%0	%12,5	-

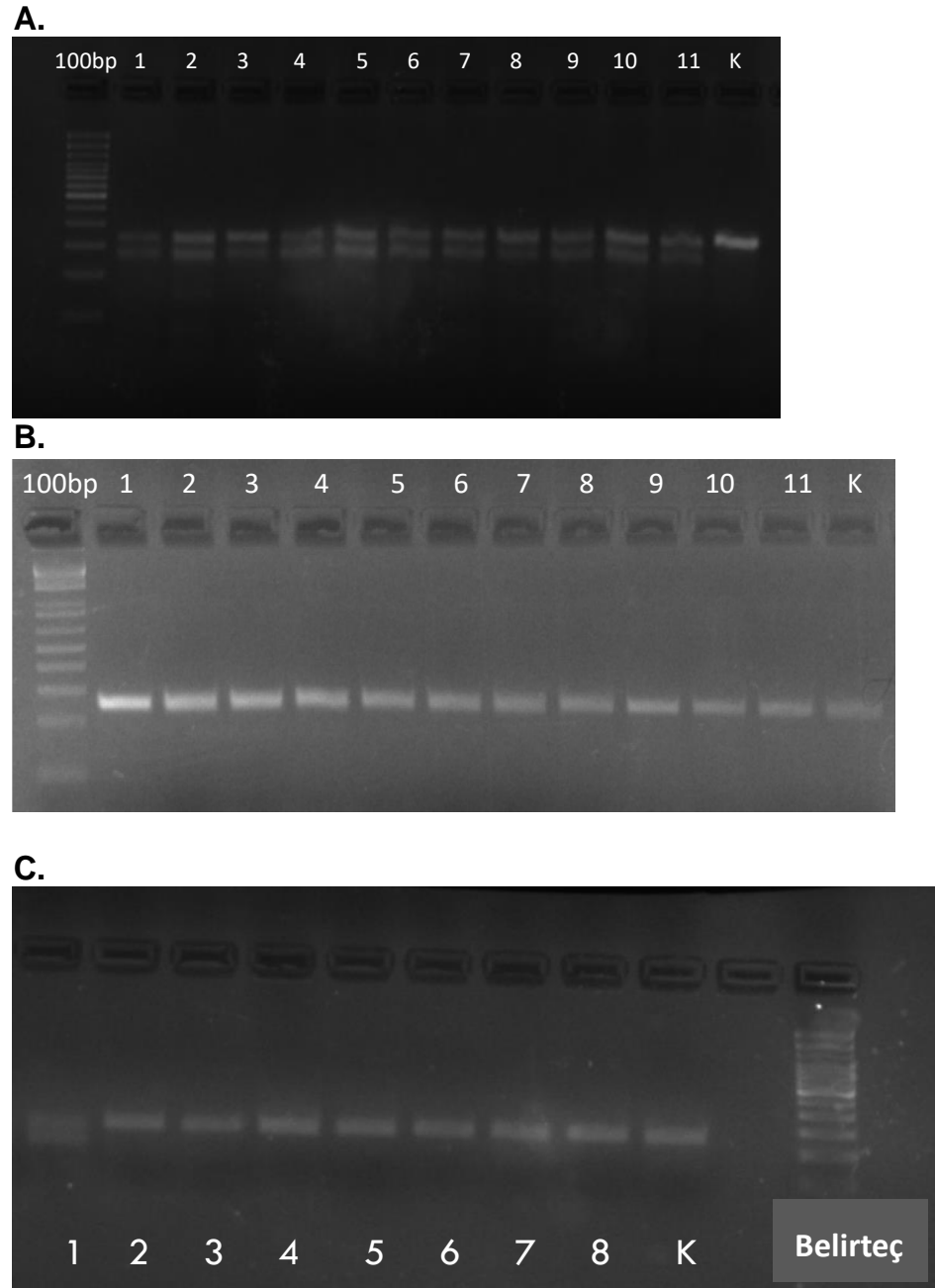
Her embriyo için enjeksiyonda kullanılan miktarlar, 24. saatte enjeksiyon gruplarında ve enjeksiyon yapılmayan kontrollerde kaydedilen ölü, canlı ve hasarlı embriyo sayıları ve toplanan örnek embriyolarda yapılan T7EI analiz sonuçlarındaki yanlış eşleşme saptanan embriyo oranı belirtilmiştir

Enjeksiyon gruplarında seçilen en az 8 örnekte DNA dizi analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde T7EI analizi ile uyumlu olarak kromatogramda PAM dizisine yakın noktada üstüste çakışan (mozaikliği ifade eden) nükleotit sinyalleri tgfb-sgRNA-2'nin kullanıldığı enjeksiyon grubunda elde edilmiştir (Şekil 4.6). Bu grupta taranan embriyoların tamamında çift zincir kırık tespit edilmiştir (20/20). Multiplex olarak enjekte edilen tgfb-sgRNA-6 ve tgfb-sgRNA-7 ile VQR varyant Cas9 mRNA enjeksiyon grubunda ise T7EI analizinde pozitif sonuç alınan örnekte yapılan DNA dizi analizinde kırık beklenen bölge ile uyumlu olarak üstüste çakışan (mozaikliği ifade eden) nükleotit sinyalleri izlenmiştir (Şekil 4.7). Multiplex tgfb-sgRNA-8, tgfb-sgRNA-9 ve Cas9 mRNA'sı ile mikroenjeksiyon yapılan grupta da hedefin solunda kırık düşük düzeyde izlenmiş ancak sağında izlenmemiştir. Ancak diğer gruplarda çift zincir kırık oluşumuna dair bir bulgu saptanamamıştır. Sonuç olarak, ssODN eşliğinde HDR gerçekleştirebilmek için kullanılmasına karar verilen en uygun sgRNA tgfb-sgRNA-2 olmuştur.

**Tablo 4.10.** Multiplex tgfb1-sgRNA-8, tgfb1-sgRNA-9 ve Cas9 mRNA'sı ile mikroenjeksiyon.

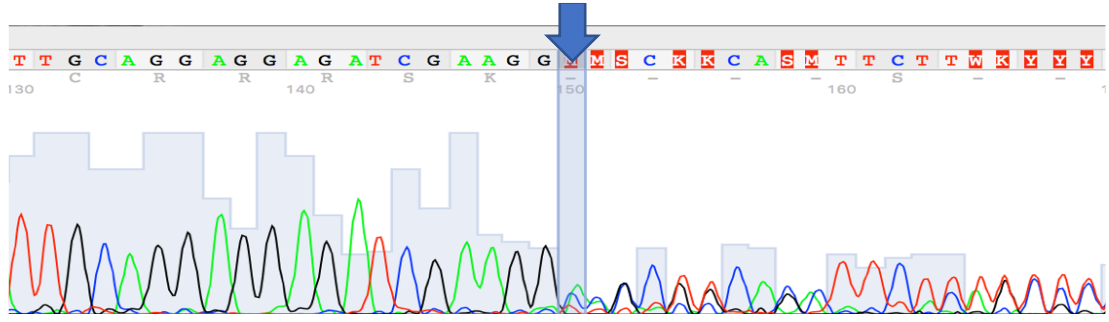
	<b>Enjeksiyon 1</b>	<b>Enjeksiyon 2</b>	<b>Kontrol</b>
Multiplex tgfb1-sgRNA-8 + tgfb1-sgRNA-9 miktarı	25 pg	50 pg	-
Cas9 mRNA miktarı	300 pg	300 pg	-
Embriyo sayısı	54	52	55
Canlı embriyo sayısı	26	27	35
Ölü embriyo sayısı	28	25	20
Hasarlı embriyo sayısı	1	2	0
% canlılık	%48	%52	%63
T7EI (+) Proksimal sgRNA	%0	%0	-
T7EI (+) Distal sgRNA	%10	%15	-

Her embriyo için enjeksiyonda kullanılan miktarlar, 24. saatte enjeksiyon gruplarında ve enjeksiyon yapılmayan kontrollerde kaydedilen ölü, canlı ve hasarlı embriyo sayıları ve toplanan örnek embriyolarda yapılan T7EI analiz sonuçlarındaki yanlış eşleşme saptanan embriyo oranı belirtilmiştir.



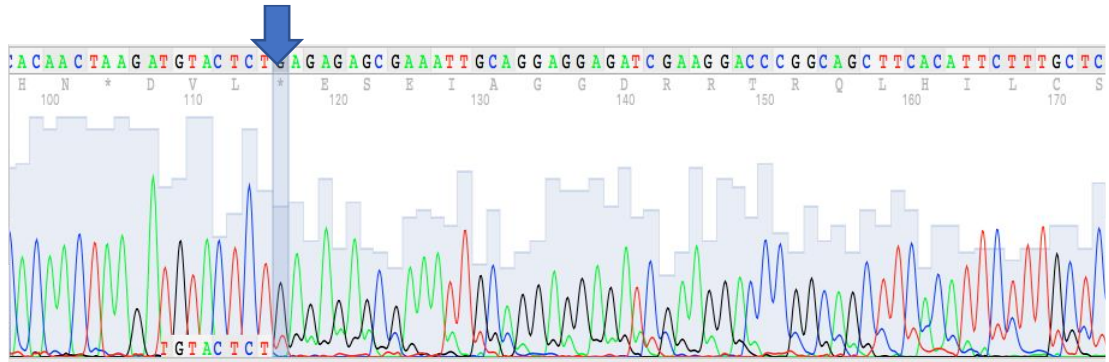
**Şekil 4.5.** Enjeksiyon gruplarında T7EI analiz sonuçlarına ait agaroz jel görüntüleri.

A. *tgfb1*-sgRNA-2 enjeksiyon grubu örneklerinde T7EI analizinde sondaki kontrol dışında tüm örneklerde çift bant izlenmiştir. B. *tgfb1*-sgRNA-3 enjeksiyon grubu örneklerinde T7EI analizinde sondaki kontrol ve tüm örneklerde tek bant izlenmiştir. C. Multiplex olarak enjekte edilen *tgfb1*-sgRNA-6 ve *tgfb1*-sgRNA-7 ile VQR varyant Cas9 mRNA enjeksiyon grubu örneklerinde T7EI analizinde bir örnekte çift bant izlenmiştir. (Yanlış eşleşme gözlenen yani çift zincir kırık gözlenen örneklerde birden fazla bant izlenirken, yanlış eşleşme bulunmayan yani çift zincir kırık gözlenmeyen örneklerde tek bant izlenmiştir.)



**Şekil 4.6.** Tgfbi-sgRNA-2 ve Cas9 mRNA enjeksiyonu sonrası mozaik embriyoda insersiyon ve delesyonlara bağlı çerçeve kaymasının izlendiği kromatogram görüntüsü.

(insersiyon ve delesyonlara bağlı üst üste çakışan nükleotitlerin başladığı nokta mavi okla belirtilmiştir).



**Şekil 4.7.** Multiplex olarak enjekte edilen tgfbi-sgRNA-6 ve tgfbi-sgRNA-7 ile VQR varyant Cas9 mRNA enjeksiyonu sonrası mozaik embriyoda insersiyon ve delesyonlara bağlı çerçeve kaymasının izlendiği kromatogram görüntüsü.

İnsersiyon ve delesyonlara bağlı üst üste çakışan nükleotitlerin başladığı nokta mavi okla belirtilmiştir.

#### 4.3.4. Tgfbi-sgRNA-2, Cas9 mRNA ve Tgfbi-ssODN-nt veya Tgfbi-ssODN-t Mikroenjeksiyonu

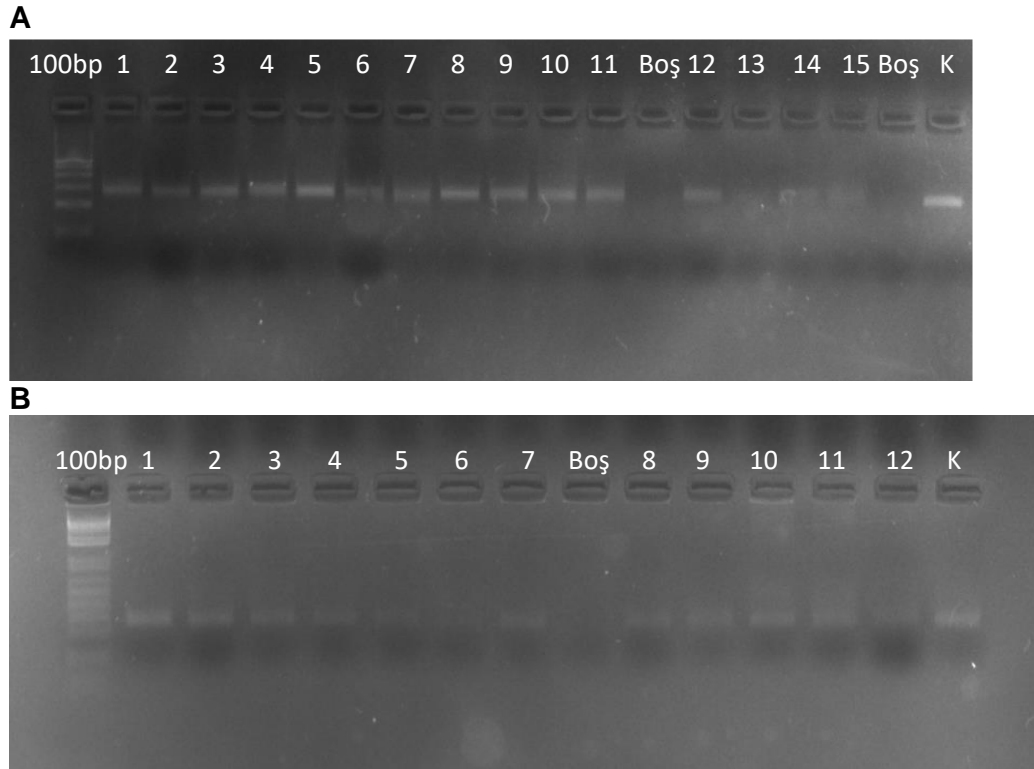
Enjeksiyon grupları ve enjekte edilen sgRNA, Cas9 mRNA ve ssODN miktarları miktarları Tablo 4.11’de gösterilmiştir. Enjeksiyon yapılan embriyolarda hedeflenen gende kısa insersiyonu tespit etmek amacıyla her enjeksiyon grubundan fertilizasyon sonrası 24. saatte rastgele seçilen 16-24 adet embriyoda restriksiyon enzimi fragman uzunluğu (RFLP) analizi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca örneklerin bir kısmında T7EI ve DNA dizi analizi de gerçekleştirilmiştir. ApaI restriksiyon enzimi

kullanılarak gerçekleştirilen RFLP analiz sonuçlarında herhangi bir enjeksiyon grubunda çift bant yani HDR aracılıklı kısa insersiyon oluştuğuna dair bulgu görülmemektedir (Şekil 4.6). Enjeksiyon gruplarından elde edilen örneklerde yapılan T7EI analizi ve DNA dizi analizi (Şekil 4.8 ve 4.9) sonuçlarında, beklenen bölgede çift zincir kırık oluştuğu görülmüştür ancak HDR aracılıklı kısa insersiyonun gerçekleştiğine dair bulgu saptanmamıştır. Sonuç olarak; mevcut denemelerde hedef dizide HDR aracılıklı genom düzenleme gerçekleştirilememiştir. Ayrıca Tablo 4.11’de belirtilen konsantrasyonlarda yapılan mikroenjeksiyonlar sonrası embriyolarda ölüm oranı da oldukça yüksektir (%69-79). Bir aylık takipte bu enjeksiyon gruplarında balıklar yaşatılamamıştır. Aynı konsantrasyonlarda sadece sgRNA enjeksiyonu yapılan embriyolarda ise 24 saat sonunda ölüm oranı %42 olarak saptanmıştır. Bu durum ssODN enjekte edilen gruplarda toksik etkinin arttığını göstermektedir. Embriyoya enjekte edilen RNA ve ssODN miktarını azaltmak için enjeksiyon karışımında yer alan bileşenlerin konsantrasyonları ya da total enjeksiyon volümü azaltılarak çalışmalar tekrarlanabilirdi, ancak daha düşük konsantrasyonlarda çift zincir kırık oluşma oranı dolayısıyla HDR etkinliği düşecektir (107). Bu nedenle enjeksiyon konsantrasyonlarını azaltmayıp Cas9 mRNA’sı yerine Cas9 proteini kullanarak hem enjeksiyon toksisitesini azaltmak hem de HDR etkinliğini değiştirmemek ya da arttırmak hedeflenmiştir.

**Tablo 4.11.** Tgfbi-sgRNA-2, Cas9 mRNA ve tgfbi-ssODN-t/nt ile mikroenjeksiyon.

	Enjeksiyon 1	Enjeksiyon 2	Enjeksiyon 3	Enjeksiyon 4	Kontrol
tgfbi-sgRNA-2	40 pg	40 pg	40 pg	40 pg	-
Cas9 mRNA	300 pg	300 pg	300 pg	300 pg	-
tgfbi-ssODN-t	60 pg	-	120 pg	-	-
tgfbi-ssODN-nt	-	60 pg	-	120 pg	-
Embriyo sayısı	102	110	75	68	-
Canlı embriyo sayısı	32	34	18	15	62
Ölü embriyo sayısı	70	76	57	53	48
Hasarlı embriyo sayısı	3	2	4	4	0
% canlılık	%31	%31	%24	%22	%56

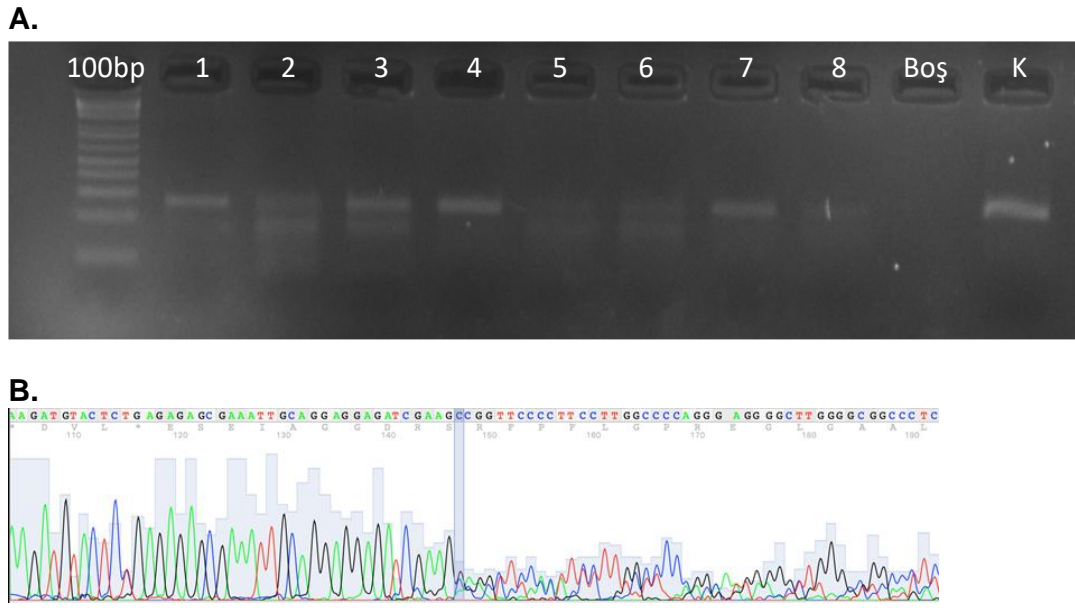
Enjekte edilen tgfbi-sgRNA-2, Cas9 mRNA ve tgfbi-ssODN-t/nt miktarları, enjeksiyon yapılan embriyo sayısı, enjeksiyondan 24 saat sonra kaydedilen canlı, ölü ve hasarlı embriyo sayıları gösterilmiştir.



**Şekil 4.8.** Tgfb $\beta$ 1-sgRNA-2, Cas9 mRNA ve tgfb $\beta$ 1-ssODN-t/nt ile mikroenjeksiyonu sonrası RFLP sonuçları.

A) Enjeksiyon grubu 1 ve 2' den elde edilen örneklerde RE kesimi sonrası agaroz jel görüntüsü: Sondaki kontrolde ve örneklerde 300bp hizasında tek bant izleniyor. B) Enjeksiyon grubu 3 ve 4' den elde edilen örneklerde RE kesimi sonrası agaroz jel görüntüsü: sondaki kontrolde ve örneklerde 300bp hizasında tek bant izleniyor.





**Şekil 4.9.** Tgfb<sup>i</sup>-sgRNA-2, Cas9 mRNA ve tgfbi-ssODN-t/nt ile mikroenjeksiyon sonrası T7EI ve DNA dizi analizi sonuçları.

A. T7EI analizinde bazı örneklerde çift (2,3,5,6,8) bazı örneklerde tek bant (1,4,7) izleniyor. Kontrolde ise tek bant izleniyor. B. DNA dizi analizinde ise sadece çift zincir kırık bulgusuna ait kromatogram görüntüsü saptanmıştır.

#### 4.3.5. Tgfb<sup>i</sup>-sgRNA-2, Cas9 mRNA/protein ve Tgfbi-ssODN-nt veya Tgfbi-ssODN-t Mikroenjeksiyonu

Cas9 mRNA'sı yerine Cas9 proteinini kullanmak hem enjeksiyon toksisitesini azaltmak hem de HDR etkinliğini arttırmak açısından denenmiştir. Tgfbi-sgRNA-2, tgfbi-ssODN-t/nt ve Cas9 proteini farklı konsantrasyonlarda embriyolar henüz tek hücreli halde iken enjekte edilmiştir (Tablo 4.12). Enjeksiyon yapılan embriyolarda hedeflenen gende kısa insersiyonu tespit etmek amacıyla her enjeksiyon grubundan fertilizasyon sonrası 48. saatte rastgele seçilen 8-16 adet embriyoda kısa insersiyon varlığına bakılmıştır. Enjeksiyon yapılan embriyolarda tasarlanmış olan ssODN ile HDR aracılı genom düzenleme gerçekleşmesi durumunda örneklerde mozaik de olsa ApaI enzim kesim noktası taşıyan DNA olacaktır. PZR ile bu DNA parçasının çoğaltılması sonrası yapılacak RFLP analizinde bunu çift bant görerek tespit etmek mümkündür (10). RFLP analiz sonuçlarında hiçbir enjeksiyon grubunda çift bant izlenmemiştir (Şekil 4.10). Enjeksiyon gruplarından elde edilen örneklerde yapılan DNA dizi analizi (Şekil 4.11) sonuçlarında, beklenen bölgede çift zincir kırığı olduğu

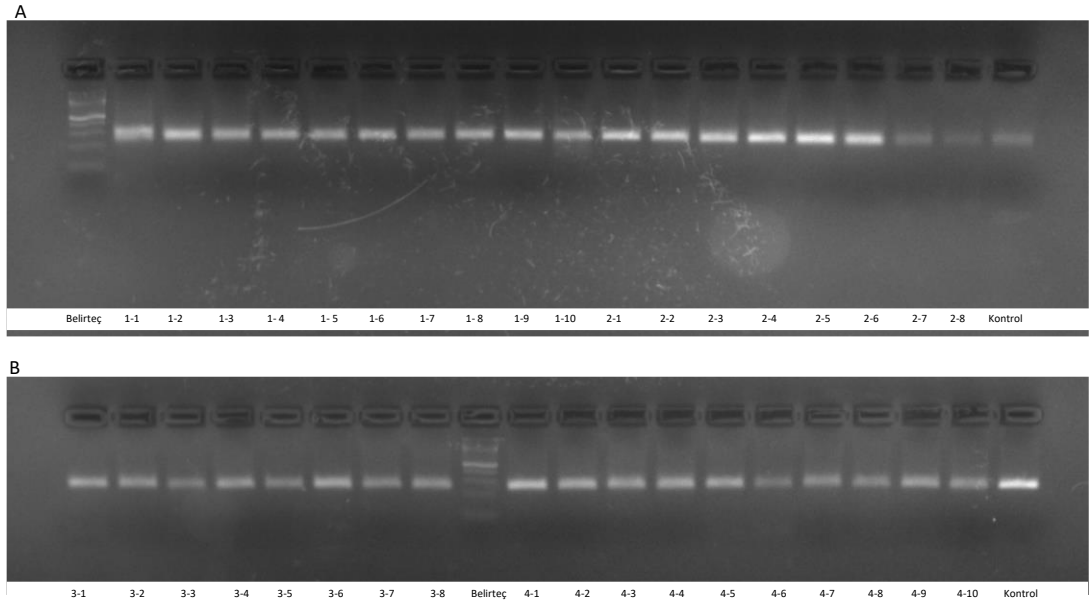
görülmüştür ancak HDR aracılı kısa insersiyonun gerçekleştiğine dair bulgu saptanmamıştır.

Sonuç olarak; mevcut denemelerde hedef dizide HDR aracılı genom düzenleme gerçekleştirilememiştir. Ancak Tablo 4.11’de belirtilen konsantrasyonlarda yapılan mikroenjeksiyonlar sonrası embriyolarda ölüm oranı Cas9 mRNA yapılan gruba göre daha düşüktür (%71 vs %37). Bu durum göstermektedir ki; ssODN enjekte edilen gruplarda Cas9 mRNA yerine Cas9 proteini kullanılarak benzer etkinlikte kırık oluşturulabilmekte, toksik etki azaltılmaktadır ancak HDR etkinliği Cas9 proteini kullanılan enjeksiyon gruplarında Cas9 mRNA kullanılan gruplarda olduğu gibi gösterilememiştir.

**Tablo 4.12.** Tgfbi-sgRNA-2, Cas9 mRNA/protein ve tgfbi-ssODN-nt veya tgfbi-ssODN-t mikroenjeksiyonu.

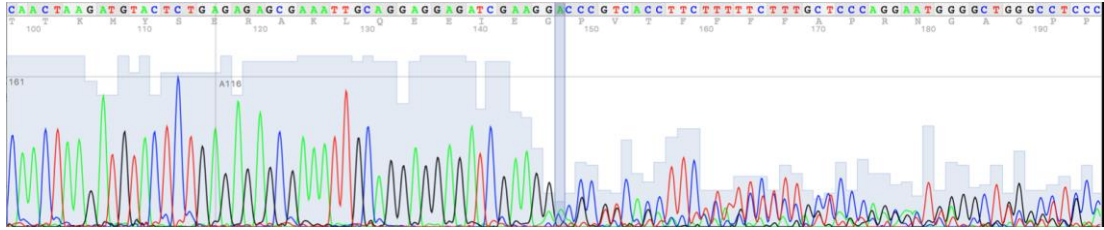
	Enj 1	Enj 2	Enj 3	Enj 4	Enj 5	Enj 6	Kontrol
<b>tgfbi-sgRNA-2</b>	40 pg	40 pg	60 pg	60 pg	40 pg	40 pg	-
<b>Cas9 protein</b>	400 pg	400 pg	400 pg	400 pg	-	-	-
<b>Cas9 mRNA</b>	-	-	-	-	300 pg	300 pg	
<b>tgfbi-ssODN-t</b>	60 pg	-	120 pg	-	60 pg	-	-
<b>tgfbi-ssODN-nt</b>	-	60 pg	-	120 pg	-	60pg	-
<b>Embriyo sayısı</b>	78	64	74	73	65	54	-
<b>Canlı embriyo sayısı</b>	44	46	34	41	24	22	102
<b>Ölü embriyo sayısı</b>	34	28	30	32	41	32	78
<b>Hasarlı embriyo sayısı</b>	1	0	0	1	2	1	0
<b>% canlılık</b>	%56	%71	%46	%56	%37	%40	%76

Enjekte edilen tgfbi-sgRNA-2, Cas9 mRNA/protein ve tgfbi-ssODN-t/nt miktarları, enjeksiyon yapılan embriyo sayısı, enjeksiyondan 24 saat sonra kaydedilen canlı, ölü ve hasarlı embriyo sayıları gösterilmiştir.



**Şekil 4.10.** Tgfb1-sgRNA-2, Cas9 mRNA/protein ve tgfb1-ssODN-nt veya tgfb1-ssODN-t mikroenjeksiyonu sonrası RFLP sonuçları.

A. Enjeksiyon grubu 1 ve 2' den elde edilen örneklerde RE kesimi sonrası agaroz jel görüntüsü: Sondaki kontrolde ve örneklerde 300bp hizasında tek bant izlenmiştir. B. Enjeksiyon grubu 3 ve 4' den elde edilen örneklerde RE kesimi sonrası agaroz jel görüntüsü: sondaki kontrolde ve örneklerde 300bp hizasında tek bant izlenmiştir. (DNA belirteç: 100bp)



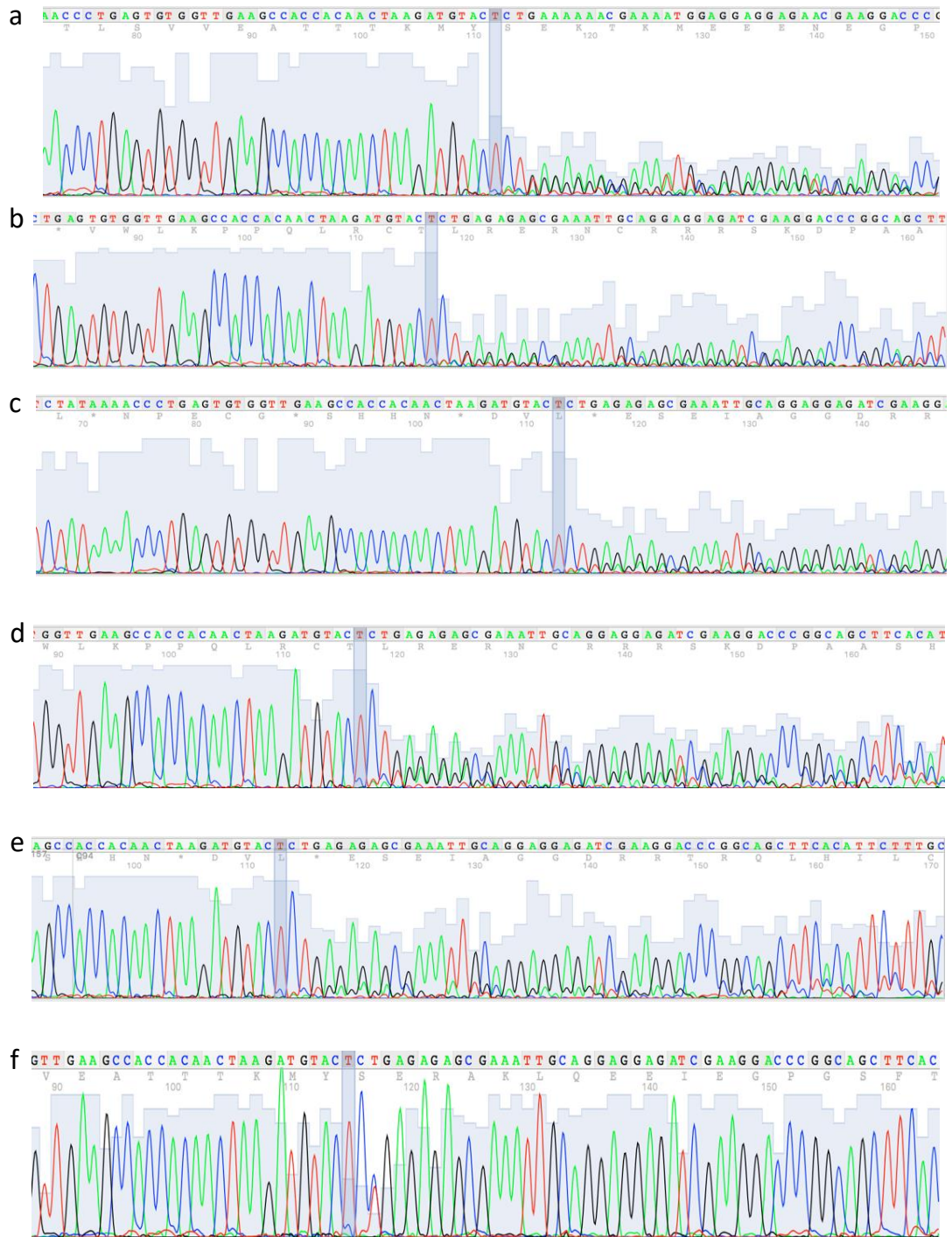
**Şekil 4.11.** Tgfb1-sgRNA-2, Cas9 mRNA/protein ve tgfb1-ssODN-nt veya tgfb1-ssODN-t mikroenjeksiyonu sonrası birinci enjeksiyon grubu örneklerinden 1.'de yapılan dizi analiz sonucu.

Sadece çift zincir kırık bulgusuna ait kromatogram görüntüsü izlenmiştir.

#### 4.4. Multiplex Tgfb1-sgRNA-6, Tgfb1-sgRNA-7 ve VQR Varyant Cas9 mRNA'sı ile Mikroenjeksiyon Yapılan Grupta Hedef Bölgede *Inframe* Varyasyon Taşıyan Zebra Balıklarının Seçilmesi

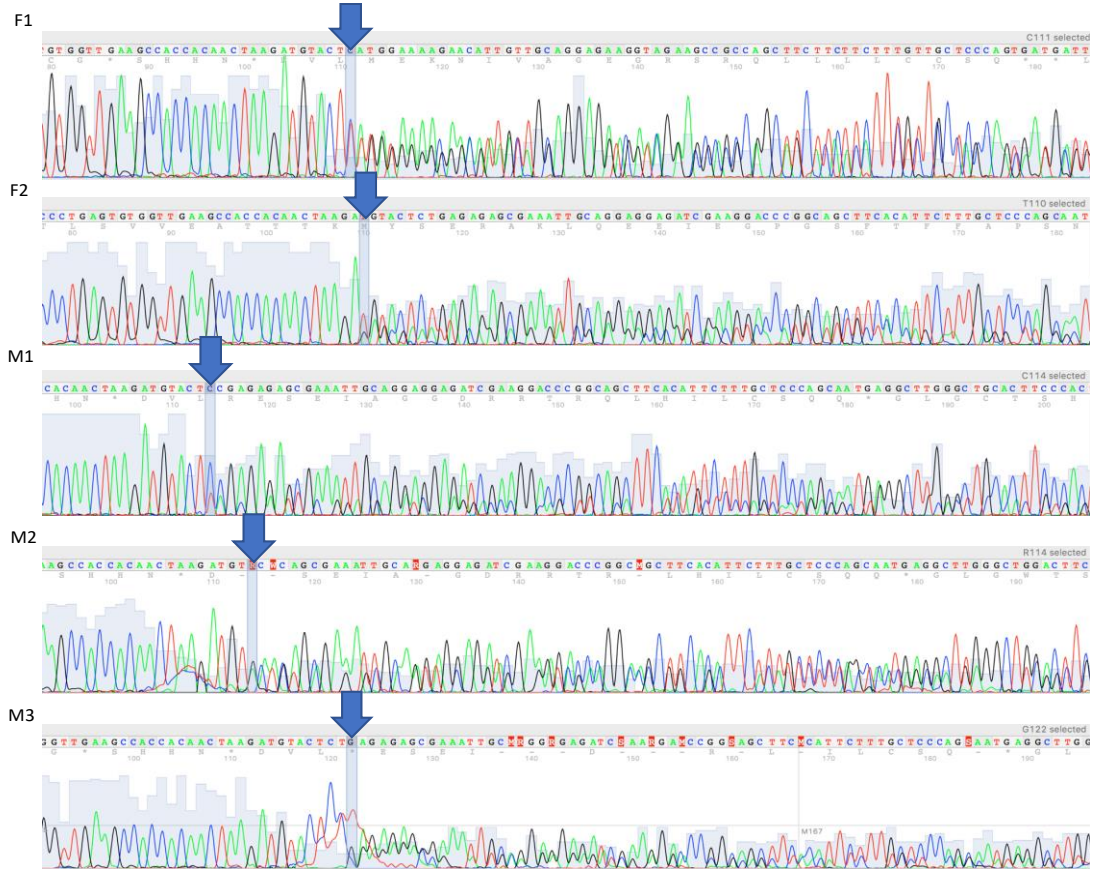
Enjeksiyon grupları içerisinde tgfb1-sgRNA-6 ve tgfb1-sgRNA-7 ile VQR varyant Cas9 mRNA'nın enjekte edildiği embriyolarda somatik mutasyon analizinde HDR için yeterli oranda olmamakla birlikte hedef bölgede kırık olduğu izlenmiştir (Şekil 4.5). Bu grupta DNA çift zincir kırığı hedef bölgede gerçekleştiği için kırık sonrası NHEJ aracılı tamir mekanizması sonucu oluşan minik insersiyon ve delesyonlardan, *in frame* olan ve hedefteki arjinin amino asidini kodlayan nükleotit dizisini etkileyen değişimlerin gerçekleşmesinin mümkün olabileceği düşünülmüştür. Böyle bir değişimi taşıyan balığın saptanması, *knock-in* yönteminin başarılı olmaması durumunda bize sonraki analizleri yapabilmek için "B planı" alternatifini sunmuştur. Proteinin amino asit dizisinde arjinin amino asidini etkileyen *in frame* bir değişiklik daha önce tez önerisinde de belirtildiği gibi zebra balığı korneasında benzer fenotipik etkiler oluşturabilir. Dolayısıyla bu gruptaki embriyolar üç ay boyunca büyütülmüş ve erişkin balıklarda *fin clip* yöntemi ile kuyruktan izole edilen DNA örneklerinde hedef bölgede mutasyon varlığı Sanger dizileme ile incelenmiştir. 16 erişkin balığın 5'inde hedef bölgede mutasyon mozaik olarak tespit edilirken 11 balıkta herhangi bir varyasyon tespit edilememiştir (Şekil-4.12). Varyasyon tespit edilen balıkların 3'ü erkek (M1, M2, M3), 2'si ise dişidir (F1 ve F2). Tespit edilen varyasyonların *germ line* aktarımını test etmek için bu 5 balık, yabanıl (wt) balıklar ile çaprazlanarak progen embriyolar (F1 hattı) toplanmıştır. Bu embriyolardan rastgele seçilen 8 örnekte DNA dizi analizi ile varyasyonların varlığı ve özelliği saptanmıştır (Şekil 4.13). Beş mutant erişkin balığın embriyolarında saptanan varyasyonlar ve bu varyasyonların amino asit dizisinde neden olacağı değişiklikler Tablo 4.13'te gösterilmiştir. M2 ve M3'de izlenen varyasyon dur kodonu oluşumuna neden olmaktadır, F1 ve F2'de izlenen varyasyonlarda ise hedef arjinin amino asidi etkilenmemektedir. M1 olarak adlandırılan zebra balığında ise yabanıl balık ile çiftleşmesi sonucu elde edilen embriyolarda heterozigot olarak hedefteki arjinin amino asidini etkileyecek *in frame* varyasyon izlenmiştir. Bu varyasyon p. Ser115\_Arg117delinsLeu olup (c. 347\_353delinsT), hedefteki arjinin amino asidi, 115. pozisyonundaki serin ve 116.

pozisyondaki glutamat amino asitleri diziden ayrılmakta, lösün ise diziye eklenmektedir. Bu embriyoları veren atasal balık F0 founder olarak ayrılmıştır. *In frame* varyasyonun tespit edildiği kalan F1 hattı embriyoları (n=32) üç ay boyunca büyütülmüştür. Üç aylık olabilen F1 hattı 15 balıkda *fin clip* ile kuyruktan elde edilen DNA'da dizi analizi yapılmıştır. Hedef varyasyonu heterozigot olarak taşıdıkları tespit edilen 6 balık hastalık gelişimi açısından incelenmek üzere ayrılmıştır (Şekil 4.14).



**Şekil 4.12.** Erişkin balıklarda *fin clip* sonrası varyasyon tespit edilen ve edilmeyen balıklardaki DNA dizi analizi sonuçları.

Hedef bölgede varyasyon olduğuna işaret eden kromatogram görüntüsü (a-e), hedef bölgede varyasyon olmadığını gösteren kromatogram görüntüsü (f) izleniyor.



**Şekil 4.13.** Varyasyon saptanan beş erişkin balıkta *germ line* aktarımı izlemek ve aktarılan varyasyonu tespit etmek için yabancı tip balıklarla çiftleştirme sonrası elde edilen embriyolarda DNA dizi analizi sonuçları.

Heterozigot balıklardaki dizilerin üst üste çakışma noktaları mavi okla gösterilmiştir.



**Tablo 4.13.** Multiplex tgfb-sgRNA-6, tgfb-sgRNA-7 ve VQR varyant Cas9 mRNA'sı ile mikroenjeksiyon.

WT: ACAACTAAGATGTACTCCGAGAGAGCGAAATTGCAGGAGGAGATCGAAGGACCCGGCAGCTTCACATTC

M---Y---S---E---R---A---K---L---Q

F1: ACAACTAAGATGTACTTATGTGAGAGAGCGAAATTGCAGGAGGAGATCGAAGGACCCGGCAGCTTCACATTC +3 (+4 -1)

M---Y---L---C---E---R---A---K---L---Q

F2: ACAACTAAGA-----GAGCGAAATTGCAGGAGGAGATCGAAGGACCCGGCAGCTTCACATTC -12

-----R---A---K---L---Q

M1: ACAACTAAGATGTACT-----AGCGAAATTGCAGGAGGAGATCGAAGGACCCGGCAGCTTCACATTC -6 (+1 -7)

M---Y---L-----A---K---L---Q

M2: ACAACTAAGATGT-----GAAGAGCGAAATTGCAGGAGGAGATCGAAGGACCCGGCAGCTTCACATTC -6 (+2 -8)

M---STOP

M3: ACAACTAAGATGTACTCTGAGAGAGCGAAATTGCAGGAGGAGATCGAAGGACCCGGCAGCTTCACATTC +1

M---Y---S---STOP

Varyasyon saptanan beş erişkin balığın yabancı tip balıklarla çiftleştirme sonrası elde edilen embriyolarında DNA dizi analiz sonuçlarında izlenen varyasyonlar ve bunların protein dizisindeki yansımaları gösterilmiştir.



**Şekil 4.14.** 3 aylık F1 heterozigot varyasyon taşıyan balıklarda DNA dizi analizi kromatogram görüntüsü.

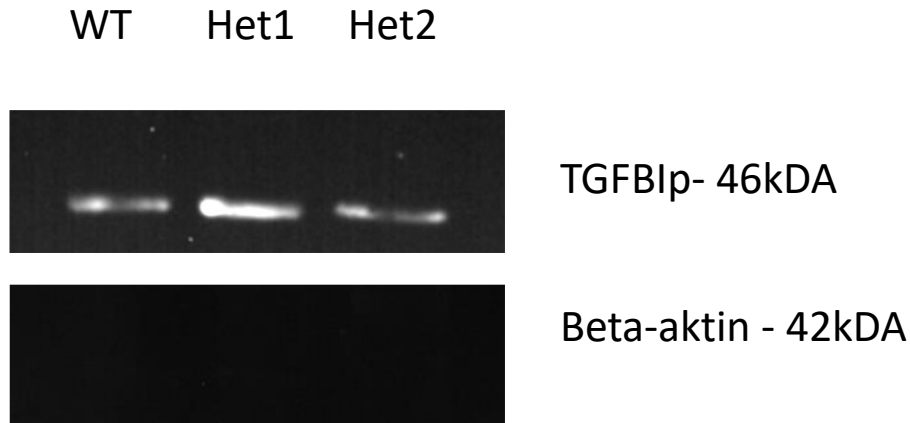
Heterozigot balıklardaki dizilerin üst üste çakışma noktaları mavi okla gösterilmiştir.

#### 4.5. Üç Aylık Yabancı Tip ve Heterozigot Zebra Balığı Gözlerinden Safılaştırılan Proteinlerde TGFBIp Varlığının Western Blot ile Gösterilmesi

Yabancı tip ve heterozigot olarak tgfb'da p. Ser115\_Arg117delinsLeu varyasyonunu taşıyan üç aylık birer zebra balığında yüksek doz *tricaine* ile ötenaziyi takiben her iki göz küresinden diseksiyon sonrası protein izolasyonu yapılmıştır.



Protein örneklerinde konsantrasyon tayini BCA *Protein Assay* Kit ile yapılmıştır. Yabani zebra balığından elde edilen örnekteki protein konsantrasyonu 11,03 µg/ml heterozigot zebra balığından elde edilen örnekteki protein konsantrasyonu ise 12,74 µg/ml olarak saptanmıştır. Yabani tip ve heterozigot balık gözlerinden saflaştırılan protein örneklerinde poliklonal anti-TGFBI antikoru kullanılarak tgfbı geninin protein ürününün zebra balığı göz dokusundaki varlığına bakılmıştır. Ayrıca beta-aktin (*house keeping*) proteini kullanılarak her iki tip erişkin balıkta bu proteinin ifadesi bakımından farklılık olup olmadığına bakılmıştır. Yabani tip ve heterozigot zebra balığı gözlerinden saflaştırılan protein örneklerinde aynı miktarda TGFBIp bulunmaktadır (Şekil 4.14). Bu örneklerde beta-aktin kullanılarak yapılan karşılaştırmada örneklerdeki TGFBIp miktarları Image J programı kullanılarak analiz edilmiş “relative density” hesaplanmıştır. Örnekler arasında farklılık saptanmamıştır ( $p < 0,05$ ). Heterozigot olarak tgfbı geninde balıklarda mevcut olan varyasyon genin protein ifadesinde yabani tip balıklara göre belirgin artış ya da azalışa neden olmamaktadır.



**Şekil 4.15.** Yabani tip ve heterozigot balık gözü örneklerinde western blot sonuçları.

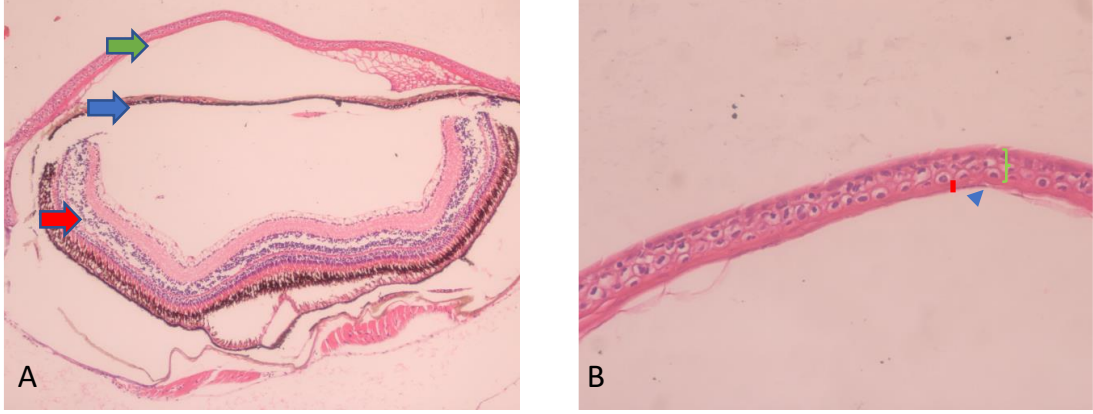
Her üç örnekte de anti-TGFBI ile saptanan protein varlığı izlenmiştir (WT: Yabani tip, Het 1: Heterozigot balık örnek 1, Het2: Heterozigot balık örnek 2).

#### 4.6. Üç Aylık Yabani Tip ve Heterozigot Zebra Balığı Gözlerinde Makroskopik ve Histopatolojik Değerlendirme

Yabani tip ve heterozigot balıkların gözleri makroskopik olarak incelendiğinde boyut ve görünüş açısından bir farklılık izlenmemiştir. Her ikisinde de

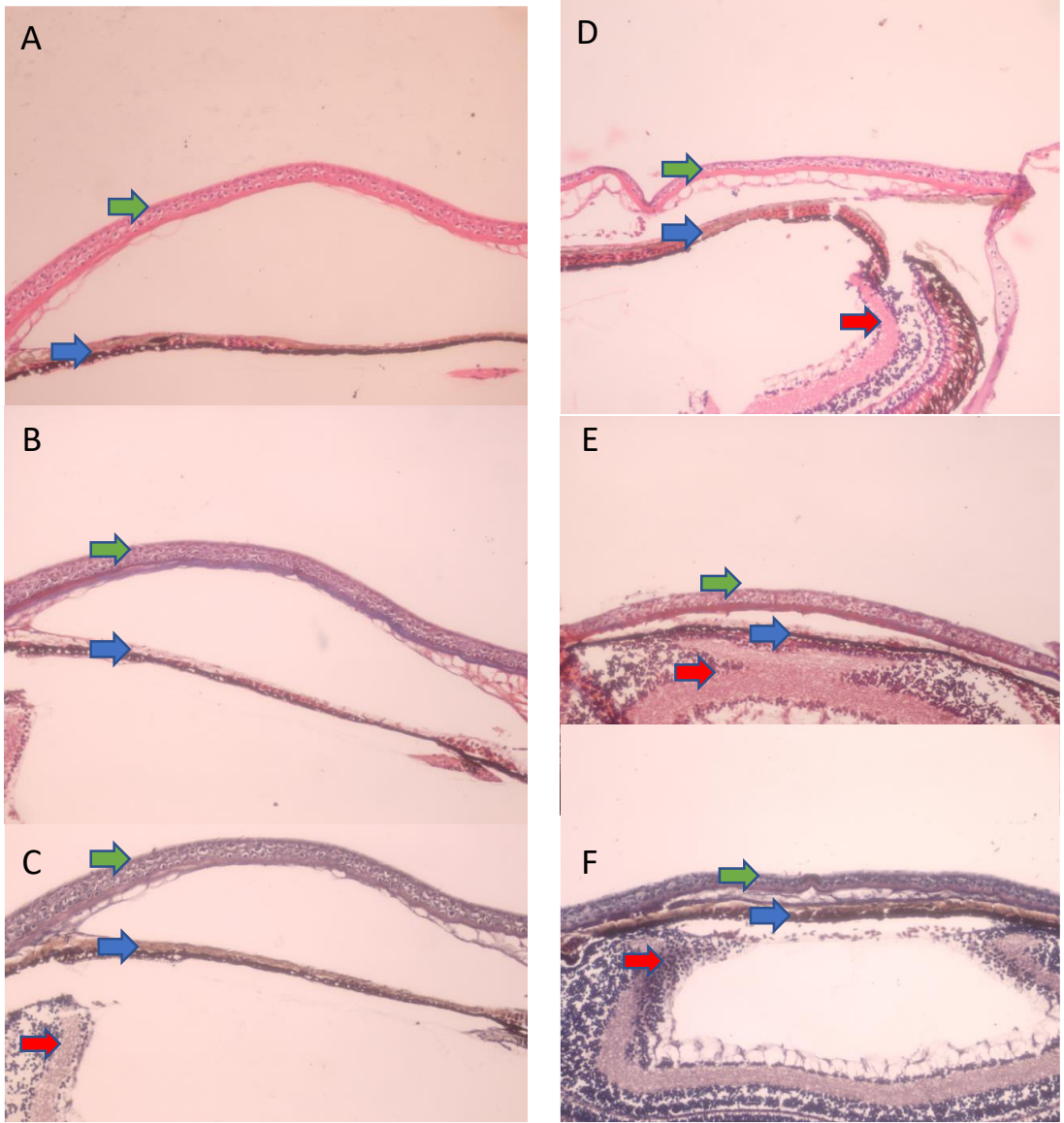
iris pigmentasyonu benzer şekilde mevcuttur. Heterozigot balıklarda kornea ve iriste şekil bozukluğu gözlenmemiştir.

Yabanıl tip ve heterozigot zebra balıklarının baş bölgesinde gözü içerecek şekilde kraniokaudal ekseninde alınan horizontal kesitlerde histopatolojik değerlendirme için ilk olarak hematoksilin ve eozin ile boyama gerçekleştirilmiştir. Ardışık kesitler amiloid birikim açısından değerlendirmek için Kongo kırmızısı ile; amiloid olmayan hiyalin yapıdaki birikimi değerlendirmek için de Masson trikrom ile boyanmıştır. Yabanıl tip balık grubunda üç aylık dört balık, heterozigot varyasyona sahip balık grubunda da ise üç aylık üç balık incelenmiştir. Tüm balıklarda baş bölgesinden gözü içerecek şekilde alınan üç farklı seviyeden ardışık horizontal kesitlerde histopatolojik inceleme yapılmıştır. Tüm kesitlerde kornea merkezinde epitel, stroma ve endotel tabakası seçilirken, Bowman ve Desme tabakaları seçilememiştir. İnsanlardan farklı olarak ve literatürde de bildirildiği gibi tüm balıklarda, kornea epitel tabakasının stroma tabakasına göre belirgin olarak daha kalın olduğu izlenmiştir (Şekil 4.16 ve 4.17). Hasta insanlarda birikimler sıklıkla kornea merkezinden ve Bowman tabakası ve/veya stromanın yüzeysel kısımlarından başlayıp perifere ve derine ilerlediği için varyasyon taşıyan heterozigot balıklarda stromanın tamamı, korneanın 2/3 merkezini kapsayacak şekilde büyük büyütmede (x40) ve üç farklı boyama tipi ile birikimler açısından incelenmiştir. Heterozigot balık gözlerinden elde edilen görüntüler yabanıl tip balıklardan elde edilenlerle karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Göz kesitlerinde her iki grup arasında histolojik görünüm açısından belirgin bir fark izlenmemiş olup, heterozigot balıklarda kesitlerin hiçbirinde korneanın epitel ve stroma tabakalarında hiyalin veya amiloid birikim lehine bulgu saptanmamıştır (Şekil 4.17).



**Şekil 4.16.** Yabanıl tip zebra balığı gözünde kraniokaudal ekseninde alınan transvers kesit, Hematoksilen-eozin ile boyama.

A. Kornea (yeşil ok), iris (mavi ok) ve retina (kırmızı ok) tabakaları izleniyor (10X), B. Kornea epitel (yeşil belirteç), stroma (kırmızı çizgi) ve endotel (mavi ok ucu) tabakaları izleniyor (40X).



**Şekil 4.17.** Yabanıl tip ve heterozigot zebra balıklarında kraniokaudal ekseninde gözü içeren enine kesitler.

20X. A: WT, Hematoksilen ve Eozin, B: WT, Masson trikrom, C: WT, Kongo-kırmızısı, D: Heterozigot balık, Hematoksilen ve Eozin, E: Heterozigot balık, Masson trikrom, F: Heterozigot balık Kongo-kırmızısı. (Kornea yeşil ok, iris mavi ok ve retina kırmızı ok ile gösterilmiştir) Birikim görüntüsü kesitlerin hiçbirinde gözlenmemiştir (Görüntülerde yabanıl tip balıklarda iris ve retina tabakaları korneadan daha uzakta, heterozigot balıklarda ise korneaya daha yakın olarak izlenmektedir. Bu, göz küresinin içinin boş olması nedeni ile kesit alınırken kolaylıkla deformasyona uğraması sonucunda oluşabilen yapay bir durumdur).

## 5. TARTIŞMA

TGFBI-ile ilişkili kornea distrofileri, TGFBIp'nin ya da fragmanlarının amiloid ya da hiyalin yapıda korneanın Bowman ve/veya stroma tabakasında birikerek görme kaybına neden olduğu bir grup kalıtsal hastalıktır. Bu hastalık grubundan sorumlu gen TGFBI olup (1,2), hastalarda çok sayıda yanlış anlamlı mutasyon bildirilmiştir (33, 34). Ancak mutasyonların daha sıklıkla bildirildiği iki sıcak bölge mevcuttur: R124 ve R555 (2). Kornea distrofilerinin genetik temeli büyük oranda açığa çıkarılmış olmakla birlikte aynı gendeki farklı mutasyonların neden farklı fenotiplere yol açtığı henüz açıklık kazanmamıştır. Patogeneizde otofaji (53, 54), protein-protein etkileşimleri (40, 47, 49), hasarlı protein yıkım yolları (28, 45), oksidatif stres (52), mitokondri fonksiyon bozuklukları (55) gibi pek çok etken araştırma konusu olmuştur. Çalışmalarda bu etkenlerin herbirine yönelik olumlu veriler elde edilmiş olmakla birlikte farklı birikimlerin oluşmasıyla sonuçlanan farklı mutasyonların neden olduğu süreç henüz aydınlatılamamıştır. Yüksek oranda fenotipik çeşitlilik, eksik penetrans ve hayvan modellerinin yokluğu patogenezin anlaşılmasını zorlaştırmaktadır. Patogenezin anlaşılabilmesi birikimleri önleyebilecek, durdurabilecek ya da geri döndürebilecek tedaviler üzerinde çalışılmasına engel teşkil etmektedir. Günümüzde bu hastalık gruplarında etkin olan ve en sık uygulanan tedavi yöntemi kornea naklidir (60).

İnsan ve zebra balığında kornea yapısı ve içeriği oldukça benzerdir (5, 68). TGFBI geni tek kopya olarak zebra balığı genomunda yer almakta olup insandaki ortoloğu ile %64 oranında homolojiye sahiptir. Yüz yirmi dördüncü arjinin rezidüsü zebra balığında korunmuştur. TGFBI ifadesi zebra balığında fertilizasyon sonrası 24. saatten itibaren korneada gösterilmiştir (4). Zebra balığında genom düzenleme teknolojilerini kullanarak hedef dizide istenilen varyasyonu oluşturabilme imkanı vardır (7, 8, 92, 95, 97). Zebra balığı tgfb1 geninde insan R124 ortoloğu R117 rezidüsünü kodlayan bölgedir. Hedefteki bu arjinin amino asidini etkileyen varyasyon genom düzenleme araçları kullanılarak iki şekilde oluşturulabilir: Eğer bu varyasyon çift zincir kırık sonrası homolog rekombinasyon ile tamir sonucu oluşursa keratoepitelinde 124. amino asit rezidüsünde arjinin yerine herhangi bir amino asidin geçmesi sağlanabilir. Eğer hedeflenen varyasyon bu şekilde oluşmaz ise ikinci ve daha sıklıkla gerçekleşen homolog olmayan uç birleştirme ile tamir mekanizması sonucu

hedefteki arjinin amino asidini etkileyen minik insersiyon ve delesyonlar gelişebilir. Bu insersiyon ve delesyonlar çerçeve kayması ve erken dur kodonu oluşturmayıp arjinin amino asidinin ortadan kalkmasını sağlayabilir ve mutant proteinin üretimi devam ederek insandakine benzer biçimde birikim oluşumu sağlanabilir. Bu tez kapsamında, zebra balığı genomunda *tgfb1* geninde 117. pozisyonundaki arjinin amino asidini kodlayan kodonda genom düzenleme araçları ile hedeflenen değişiklik yapılarak erişkin zebra balıklarının kornealarının histopatolojik olarak incelenmesi amaçlanmıştır. Böylece elde edilen bulguların insandaki hastalık verileri ile benzerliklerinin saptanması ile hastalık patogenezinin aydınlatılmasında ve bu hastalığa yönelik tedavilerin geliştirilmesinde uygun bir model organizma oluşturulabilir.

Tezin hedefine ulaşabilmesi için gerçekleştirilmesi gereken ilk aşama zebra balığında *tgfb1* geninde hedef bölgede veya yakınlarında yüksek etkinlikte çift zincir kırık oluşturulmasıdır. Çift zincir kırık oluşumu için ilk olarak TALEN genom düzenleme aracı kullanılmıştır. Bunun nedenlerinden biri tez çalışmalarının başladığı dönemde zebra balığında TALEN sistemi ile başarılı çalışmaların literatürde bildirilmiş olması (92, 95, 97) ve hedeflediğimiz dizinin TALEN kontraktı tasarlamak için uygun olmasıdır. Diğer bir neden ise mevcut biyoenformatik araçlar ve literatürdeki verileri kullanarak hedef yakınlarında uygun CRISPR/Cas9 kontraktı tasarlanamamasıdır (8). CRISPR/Cas9 sisteminin TALEN'e göre bildirilen en önemli dezavantajlarından biri hedef dışı etkilerinin fazlalığı dışında hedeflenebilir dizinin daha sınırlı olmasıdır (8). TALEN sistemi kullanılarak yapılan enjeksiyonlarda embriyo başına sağ ve sol TALEN kontraktından 300, 150, 100, 50 ve 20 pg olmak üzere beş farklı konsantrasyonda enjeksiyon gerçekleştirilmiştir. Literatürde 600 pg'a kadar bildirilmiş enjeksiyonlar mevcuttur (98). Enjeksiyonlarda 300pg'dan daha yüksek bir konsantrasyon denenmemesinin sebebi 100 pg ve üzeri yapılan enjeksiyon gruplarında ölüm oranının kontrol ile karşılaştırıldığında yüksek olmasıdır. Enjeksiyon yapılan embriyolarda çift zincir kırık tespit edilmediği halde ölüm oranının yüksek olması RNA toksisitesine bağlanmakta olup bu durumda daha yüksek konsantrasyonların denenmesi önerilmemektedir (103). Literatürde TALEN ile zebra balığında somatik mutagenез çalışmaları ilk olarak 2011 yılında Sander ve ark. ve Huang ve ark. tarafından yapılmıştır (96, 99). Bu çalışmalarda farklı TALEN

konstraktları kullanılarak iki farklı gen hedeflenmiştir ve bildirilen mutasyon oranları %2,6 ile %33 arasındadır (96). Huang ve ark. tespit edilen bu varyasyonların bir sonraki kuşağa aktarım oranını %33 olarak tespit ettiklerini belirtmiştir (99). Cade ve ark. tarafından yapılan bir başka çalışmada zebra balığında farklı genler için tasarlanan 10 farklı TALEN konstraktından 7 tanesinin %2 ile %76 oranları arasında hedef bölgede kırık oluşturduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmada bir sonraki jenerasyona mevcut varyasyonun kalıtılması oranı bazı konstraktlar için %100'e yakın oranlarda bildirilmiştir (95). Bildirilen başarılı sonuçlara rağmen çalışmada kullanılan TALEN konstraktları ile farklı konsantrasyonlarda yapılan enjeksiyonlardan sonra 24 saatlik embriyolardan elde edilen DNA ile gerçekleştirilen dizi analizlerinde hedef bölgede çift zincir kırık oluştuğuna dair bulgu tespit edilememiştir. Bunun iki nedeni olabilir: Birincisi TALEN sistemi zebra balıklarında yüksek etkinliğe sahip olsa da bu oran %100 olarak bildirilmemektedir. Tasarım olarak uygun konstrakta rağmen çift zincir kırık oluşumu tespit edilemeyen denemeler literatürde mevcuttur (95, 96, 99). Bunda özellikle *in vivo* çalışmalarda hedef lokusun epigenetik durumunun önemli olduğu bildirilmektedir (97). Hedef bölgede CpG adacıklarının birden fazla olmasının TALEN bağlanma etkinliğini düşürdüğü gösterilmiştir. Ayrıca Sander ve ark. TALEN etkinliğine yönelik yaptığı çalışmada epigenetik faktörlerin etkisini ortadan kaldırmak için daha önce zebra balığında ZFN kullanarak başarı elde ettiği iki hedefi kullanmıştır (96). Bu çalışmada tasarlanan TALEN konstraktlarının hedef bölgelerinde birer adet CpG adası mevcuttur. Bu durum TALEN konstraktlarının bağlanma etkinliğini azaltmış olabilir. Ancak tgfb1'de hedef bölge için tek konstrakt tasarım seçeneği mevcut olduğu için farklı bir konstrakt denenememiştir. İkinci neden ise hedef bölgede somatik mutasyon analizinde DNA'da dizi analiz yönteminin kullanılması olabilir. Mozaiklik oranının %10'dan düşük olması durumunda DNA dizi analizinde çift zincir kırığın tespit edilebilmesi mümkün olmayabilir (100). Cade ve ark. yaptığı çalışmada 12 embriyodan elde ettiği DNA havuzundan PZR ile hedef amplifikasyonu yapmış, sonra pGEM-5Zf (+) vektörüne bu diziyi klonlamış ve 96 farklı kolonide dizi analizi gerçekleştirmiştir. Böylece %95 doğrulukla mutasyon etkinliği %3,125 ve üzeri olan TALEN konstraktlarının etkilerini gösterebilmiştir (95). Bu yöntemler *knock-out* çalışmaları için önem taşımakla birlikte bu çalışmada HDR aracılı tamir hedeflendiği için çift zincir kırık oluşturma etkinliğinin %50 ve üzerinde olması gerekmektedir.

(101, 102). Çalışmada kullanılan TALEN konstraktının %50'nin altında olabilecek çift zincir kırık oluşturma etkinliğinin gösterilmesi HDR aracılı kısa insersiyon için yetersiz olacaktır. Dolayısıyla mozaiklik oranı düşük olan embriyolarda çift zincir kırık oluşturma oranının saptanmasının gerekli olmamasından dolayı somatik mutasyon analizinde farklı bir yöntem kullanılmamıştır.

Hazırlanan tgfb1-TALEN konstraktının zebra balık embriyolarında enjeksiyon sonrası çift zincir kırık oluşturduğunun tespit edilememesi ve günümüzde CRISPR/Cas9 genom düzenleme aracının hedef dizi koşullarının esnetilebildiğini bildiren çalışmalar olması (103-105) nedeniyle tgfb1'deki hedef bölge için sgRNA tasarımının yeni literatür bilgisi doğrultusunda yapıp CRISPR/Cas9 tekniğinin denenmesine karar verilmiştir. CRISPR/Cas9 aracı için ilk çıkan yayınlarda hedef dizinin 3' ucunda PAM dizisi (NGG) ve 5' uçta da T7 promotör ile gRNA sentezi için GG dizisi veya U6 promotör ile sentez için GA dizisi olması ve bu iki dizi arasında da 15-20 kadar nükleotit bulunması gerektiği bildirilmekteydi (106). SgRNA tasarımı için hedef dizide 5' uçta bir ya da iki yanlış eşleşmenin kabul edilebilir olması tgfb1 için hedef bölgede 5' uçta tek yanlış eşleşmeye sahip tgfb1-sgRNA-1'in tasarımına (gG20NGG-küçük g harfi ile yanlış eşleşmeye sebep olacak T/G değişikliği belirtilmektedir) imkan sağlamıştır. Tgfb1-sgRNA-1'in Cas9 mRNA ile enjeksiyonu sonucu %50 oranında çift zincir kırık somatik mutasyon analizinde tespit edilmiştir.

Hedefte çift zincir kırık oluşturma aşamasını takiben HDR aracılı tamir için uygun kalıp DNA eşliğinde enjeksiyonların yapılması gerekir. Zebra balıklarında HDR aracılı kısa insersiyon çalışmalarında farklı kalıplar kullanılmıştır: Tek zincirli kısa deoksionükleotit (ssODN: 30-200 baz), çift zincirli kalıp DNA (dsDNA), plazmid ve uzun homoloji kollarına sahip dsDNA (107). Zebra balıklarında genom düzenleme aracı ve kalıp DNA kullanılarak gerçekleştirilen ilk kısa insersiyon çalışmasında Bedell ve arkadaşları TALEN ve 20 nükleotit sol-18 nükleotit sağ homoloji koluna sahip ssODN ile iki farklı lokusta insersiyonun hatasız gerçekleştiğini göstermeyi başarmışlardır (108). Bu çalışmada farklı homoloji kolu uzunlukları denenmiş ve homoloji kollarının uzunluğunun artmasının HDR etkinliğini azalttığı ifade edilmiştir. CRISPR/Cas9 ve kalıp DNA kullanarak yapılan kısa insersiyon çalışmalarından ilki ise Chang ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir (109). Bedell ve arkadaşlarının TALEN ile yaptığı çalışmanın benzerini CRISPR/Cas9



kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Her iki çalışmada da bildirilen olumsuzluk kısa insersiyonun hatasız gerçekleşme oranının düşük olmasıdır. Hedeflenen değişimin 3' ve 5' uçlarında beklenmedik insersiyon ve/veya delesyonlar sıklıkla izlenmektedir. Bu durumun kullanılan genom düzenleme aracından bağımsız olarak gerçekleştiği belirtilmiştir (108, 109). Bir sonraki çalışma Hwang ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada ssODN hem anlamlı hem de anlamlı olmayan DNA'ya komplementer olacak şekilde tasarlanmıştır. Kısa insersiyon olarak hedeflenen tek nükleotit değişimidir. Kullanılan sgRNA'larda çift zincir kırık oluşturma etkinliği T7EI ile %25-55 arasında tespit edilmiştir, PZR ve sekanslama ile yapılan somatik mutasyon analizinde başarı oranı %0-8 oranında bildirilmiştir. Anlamlı ve anlamlı olmayan kalıplar arasında farkın hedeflenen lokusun özelliğine bağlı olduğu ileri sürülmüştür (106). Hruscha ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmada 30-50 nükleotitlik homoloji kollarına sahip ssODN kullanmışlar, PZR ve yeni nesil dizileme kullanarak yaptıkları somatik mutasyon analizinde 1,7-3,5% oranında enjeksiyon yapılan embriyolarda hatasız insersiyon gerçekleştiğini göstermişlerdir (102). Bildirilen bu oranlar somatik mutasyon analizlerine aittir ve oldukça düşüktür. Bir sonraki jenerasyona aktarım oranları bu çalışmalarda bildirilmemekle birlikte daha düşük olması muhtemeldir. Armstrong ve arkadaşları ise zebra balığında CRISPR/Cas9 ve ssODN kullanarak *tardbp* (*TAR DNA binding protein*) ve *fus* (*FUS RNA binding protein*) genlerinde nükleotit değişimi gerçekleştirdiklerini ve bunun sonraki jenerasyona %2-4 oranında aktarıldığını göstermişlerdir (100). Bu çalışmaların yanı sıra daha uzun homoloji kolları ve çift zincirli DNA kullanarak zebra balığında kısa insersiyon bildiren çalışmalar da mevcuttur. Zhang ve arkadaşları 400-500 bp'lik homoloji koluna sahip dsDNA kalıp ve %65 çift zincir kırık oluşturma etkinliğine sahip sgRNA/Cas9 kullanarak *twist2* geninde nükleotit değişikliği oluşturmayı başarmışlardır. Bu mutasyonun sonraki jenerasyona aktarım oranı %3,3 olarak bildirilmiştir (110). Çalışmalarda kalıp olarak uzun homoloji kollarına (>500 baz) sahip çift zincirli DNA ve plazmit daha sıklıkla HDR aracılı uzun insersiyon gerçekleştirilmesi için tercih edilmektedir (101, 111-113). Bu tez kapsamında hedefimiz kısa insersiyon olduğu için kalıp olarak ssODN kullanılmıştır. Armstrong ve arkadaşlarının yaptığı göreceli olarak daha başarılı kısa insersiyon çalışması esas alınarak; hedef dizide çift zincir kırık bölgesini içeren, kırığın proksimalinde daha

uzun asimetrik homoloji kolları olan, hedeflenen amino asit değişikliğine yönelik nükleotit değişikliklerini ve tamir edilen diziyeye yeniden sgRNA bağlanmasını engelleyecek ancak amino asit dizisini değiştirmeyecek nükleotit değişikliklerini içeren 101 nükleotit uzunluğunda bir ssODN tasarlanmıştır. Enjeksiyon sonrası yapılan somatik mutasyon analizlerinde 20 adet embriyodan DNA izolasyonu yapılmıştır. Test edilen embriyo sayısının fazla tutulmasının sebebi literatürde HDR aracılı kısa insersiyon oranlarının oldukça düşük bildirilmiş olmasıdır. Tgfb1-sgRNA-1 ve tgfb1-e4-ssODN kullanılarak yapılan enjeksiyonlarda DNA dizi analizlerinde herhangi bir mozaiklik tespit edilememiştir. Bu sonuçlar kullanılan sgRNA etkinliğinin yeterince yüksek olmaması (%50) ile açıklanabilir.

HDR ile kısa insersiyonda etkinliği arttırmak adına iki koşul öne sürülmektedir: Bunlardan ilki TALEN ya da CRISPR/Cas9 ile gerçekleşen çift zincir kırık oranının yüksek olmasıdır (107). Bu oran literatürde somatik mutasyon analizlerinde %70 ve üzeri olarak belirtilmektedir (101, 102, 114). Hedef bölge civarında kırık etkinliği en yüksek olan sgRNA'nın seçilmesi gerektiği vurgulanmaktadır (107). Bu koşulu sağlamak için mutlaka öncesinde laboratuvarında kullanılacak yabancı tip balıklarda hedef bölge için dizi analizi yapılmasını ve polimorfizmlerin saptanmasını ve bu analiz sonuçlarına göre sgRNA tasarlanmasını önermektedirler (107). İkinci koşul ise değişiklik yapılmak istenen bölge ile kırık oluşturulan bölgenin birbirine uzak olmamasıdır (110). Literatürde çift zincir kırığın mümkünse değişiklik hedeflenen noktada olması ya da 20 bp'den daha uzak olmaması gerektiği vurgulanmaktadır (115-118). 20-40 bp uzaklıkta etkinliğin düştüğü bildirilmektedir (119). Tgfb1-sgRNA-1'de kırık, nükleotit değişikliği öngörülen noktadan 26 bp uzakta yer almakta ve etkinliği de %70'in altında kalmaktadır. Dolayısıyla bu sgRNA ile daha fazla deneme yapılmayarak daha etkin ve daha yakından kırık oluşturabilecek alternatif sgRNA'ların tasarlanmasına karar verilmiştir.

Giraldez ve arkadaşları yaptıkları çalışmada farklı uzunluklarda (18-22nt) ve 5' ucunda 1 ya da 2 yanlış eşleşme içeren (g ile belirtilmiştir) alternatif sgRNA'ların etkinliklerini karşılaştırmışlardır (120). Şekil 3.11'de alternatif sgRNA'ların çift zincir kırık oluşturma aktiviteleri gösterilmiştir. Bu çalışma sonuçlarını sgRNA tasarlama aracı olan CRISPRScan'e de uyarlamışlar ve hedeflenebilir dizi miktarını zebra balığı genomunda 8 kat arttırmayı başarmışlardır. Bu gelişmeler doğrultusunda CRISPRScan

programını kullanarak (<http://www.crisprscan.org>) ve bu çalışma dikkate alınarak hedef bölge için tgfb-sgRNA-2 tasarlanmıştır. Bu sgRNA bir önceki sgRNA ile aynı PAM dizisini tanımakta olup hedef kodon ile aynı mesafede yer almaktadır. Tgfb-sgRNA-1 5' ucunda hedef dizi ile tek yanlış eşleşmeye sahipken (gG20); tgfb-sgRNA-2 daha kısadır ancak hedef dizi ile yanlış eşleşme içermemektedir (GG16). Şekil 3.11'de Mateos ve arkadaşlarının sgRNA'ların aktivasyon düzeylerini karşılaştırdıkları grafikte tgfb-sgRNA-1'in beklenen aktiflik düzeyi 0.4 iken tgfb-sgRNA-2'nin yaklaşık 0.8 olup daha yüksek olarak belirtilmiştir (120). Tgfb-sgRNA-2 ile yapılan enjeksiyonlar sonrası bu bilgi ile uyumlu olarak daha yüksek etkinlikte (%100) çift zincir kırık olduğu gösterilmiştir. Tgfb-sgRNA-2'nin HDR ile kısa insersiyon açısından tek dezavantajı hedef nükleotitten 26 bç uzaklıkta kesim oluşturmasıdır.

Tgfb dizisi, literatürde bildirilen ideal sgRNA özellikleri gözönünde bulundurularak hedef nükleotide daha yakın bölgeden kırık oluşturmak açısından incelendiğinde tüm koşullara uyan özellikte bir sgRNA mevcut olmadığı görülmüştür. Yine de ideal koşullar esnetilerek hedef nükleotide kırık oluşturacak olan tgfb-sgRNA-3 tasarlanmış ancak yapılan enjeksiyonlarda kırık tespit edilememiştir. Bu sgRNA'nın çift zincir kırık oluşturamamasının nedeni 3' ucunda iki yanlış eşleşme içermesi ve enjekte edilen embriyolarda PAM dizisinde heterozigot ya da homozigot olarak polimorfizm bulunması ile açıklanabilir.

Hedef kodunun sağ (proksimal) ve sol (distal) tarafından 10-20 nükleotit uzaklıkta eş zamanlı iki adet çift zincir kırık oluşturmak ve ssODN eşliğinde bu daha büyük boyuttaki kırığın HDR aracılı tamirini sağlamak da bir seçenek olarak literatürde bildirilmiştir. (121). Bu amaçla CRISPRScan programı kullanılarak tgfb-sgRNA-8 ve tgfb-sgRNA-9 tasarlanmıştır. Ancak yapılan enjeksiyon denemelerinde distalde kırık olduğu saptanırken, proksimalde kırık olduğu gösterilememiştir. Kırık oranının %10 civarında olması nedeniyle HDR ile kısa insersiyon denemesi bu grupta yapılmamıştır. CRISPRScan vb analiz programları kullanılarak tasarlanan yüksek etkinlikte kırık oluşturması beklenen bazı sgRNA'ların *in vivo* denemelerde kırık oluşturmadıkları literatürde bildirilmektedir (107). Bu durum enjeksiyon esnasında hedef bölgenin ulaşılabilirliğinin yani epigenetik faktörlerin etkisiyle açıklanmaktadır.

Yabancı tip Cas9 proteininin hedeflenen bölgeye bağlanabilmesi için, tasarlanan sgRNA'nın 3' ucunda PAM dizisi (NGG) bulunmak zorundadır. Bu dizinin bulunması koşulu bu çalışmada olduğu gibi özel dizi değişikliklerinin hedeflendiği durumlarda Cas9 kullanımını sınırlandırmaktadır. Çünkü çift zincir kırığın hedefe 10-20 nükleotitten daha uzakta olması durumunda HDR etkinliğinin düştüğü bildirilmiştir. Bu kısıtlama için çalışmalarda sunulan çözümlerden biri SpCas9 varyantlarıdır (90). Cas9'un PAM dizisine bağlanma bölgesinde oluşturulan özgün amino asit değişiklikleri farklı PAM dizilerinin tanınmasını sağlamaktadır. Bu bağlamda daha önce gerçekleştirilen bir çalışmada zebra balığı embriyolarında NGAG PAM dizisine bağlanarak %20-43 etkinlikte çift zincir kırık oluşturduğu gösterilmiş olan SpCas9 VQR varyantının hedef bölge için daha uygun sgRNA tasarımına imkân sağlayabileceği düşünülmüştür (90). Aynı çalışmada belirtilen CasBLASTR (<http://www.CasBLASTR.org>) biyoinformatik aracı kullanılarak, Giraldez tarafından yapılan çalışma (120) ve yabancı tip balıklardaki hedef dizi polimorfizmleri de gözönünde bulundurularak T7 promotörüne uygun tgfb-sgRNA-4 (gg18NGAG) ve tgfb-sgRNA-5 (gG15NGAG) tasarlanmıştır. Ancak bu sgRNA'lar ile yapılan enjeksiyon denemelerinde çift zincir kırık olduğu gösterilememiştir. Bunun nedenlerinden biri tgfb-sgRNA-4'ün 5' uçta iki adet yanlış eşleşme içermesi nedeniyle etkinliğin düşmesi olabilir. Bir diğeri ise tgfb-sgRNA-5'in literatürde belirtilenden daha kısa olması ve 5' uçta bir adet yanlış eşleşme içermesi sonucunda düşük etkinlik göstermesi olabilir.

Hedef kodona yaklaşabilmek için NGAG PAM özgülüğüne sahip VQR varyantı sgRNA tasarımında 3' ucunda esneklik sağlarken 5' ucunda T7 promotörü nedeniyle yanlış eşleşme ve/veya ideal olmayan uzunlukta sgRNA'lar (gg18 ve gG15) tasarlanmasına neden olmuştu. Bu durum çift zincir kırık oluşturma etkinliğini azaltabileceği için alternatif olarak 5' ucunda T7 yerine SP6 promotörü için gerekli GA dizisi koşulu sadece tek yanlış eşleşme ile sağlanarak tgfb-sgRNA-6 (gA18NGAG) ve tgfb-sgRNA-7 (gA18NGAG) tasarlanmıştır. İki farklı tasarım yapılmasının nedeni daha önce bahsedilen yabancı tip balıklarda gözlenen C/T polimorfizminin sgRNA hedef dizisi içerisinde yer almasıdır. Enjeksiyon yapılan embriyolar bu bölgede homozigot da olsa heterozigot da olsa her iki aleli de hedef haline getirebilmek için iki farklı aleli de tanıyabilecek iki farklı sgRNA tasarlanmış

ve enjeksiyonlar *multiplex* olarak yapılmıştır. Bu grupta yapılan enjeksiyonlarda çift zincir kırık tespit oranı T7EI ile %12,5 olarak saptanmıştır. Etkinlik düşük olduğu için HDR denemesi bu grupta da yapılmamıştır.

HDR gerçekleştirebilmek için iki koşuldan biri olan yüksek etkinlikte çift zincir kırık oluşturma koşulunu tam olarak sağlayan, diğerini ise hedefe 26 bç uzaktan kırık oluşturarak kısmi sağlayan *tgfb1-sgRNA-2* ile kalıp DNA eşliğinde enjeksiyonlar denemesine karar verilmiştir. Önceki enjeksiyon gruplarında kullanılan *tgfb1-e4-ssODN*'de restriksiyon enzim kesim noktası bulunmamasının enjeksiyon yapılan embriyoların PZR-RFLP ile taranmasına imkanı vermemesi ve literatüre bu konu ile ilgili yeni yayınların eklenmesi nedeniyle iki farklı ssODN tasarlanmıştır. Richardson ve arkadaşları HDR ile gerçekleştirilen genom düzenleme etkinliğinin ssODN tasarımından etkilendiğini ortaya koymuşlardır. Cas9'un çift zincirli DNA'dan 6 saat gibi bir sürede yavaşça ayrıldığını ve asimetric olarak bu ayrılma sürecinde hedef olmayan dizinin 3' ucunun daha erken olarak serbestleştiğini göstermişlerdir. Bu veri ile uyumlu olarak hedef olmayan diziyeye komplementer ve sağ homoloji kolu (çift zincir kırığın proksimalinde sağında kalan kısım) daha uzun olan ssODN kullanarak memeli hücre kültüründe yaptıkları denemelerde HDR oranını %60 oranında arttırdığını ortaya koymuşlardır (122). Bu çalışmanın zebra balığında yapılmamış olması nedeniyle ssODN hem hedef (*tgfb1-ssODN-t*) hem de hedef olmayan (*tgfb1-ssODN-nt*) dizi ile aynı ve asimetric homoloji kollarına sahip olacak şekilde tasarlanmıştır. Her iki tasarıma da yabancı diziden farklı olacak ancak amino asit dizisini değiştirmeyecek restriksiyon enzim ile kesim bölgesi ve amino asit dizisini istenildiği şekilde değiştirecek hedef kodon değişiklikleri eklenmiştir. Çalışmalarda sgRNA'nın tamir bölgesine tekrar bağlanmasını engelleyecek değişikliklerin mümkünse PAM dizisinde ya da PAM dizisine yakın çekirdek bölgede yapılması gerektiği vurgulanmaktadır (8, 100, 107, 122-123). PAM bölgesinde amino asit dizisini değiştirmeden nükleotit değişikliği yapmak mümkün olmadığından ve RE kesim bölgesi için yapılan iki nükleotit değişikliği de PAM dizisi yakınlarında olduğu için başka değişiklik yapılmamıştır. *Tgfb1-sgRNA-2* ve *tgfb1-ssODN-t/nt* ile gerçekleştirilen enjeksiyon denemeleri sonrasında RFLP ile yapılan analizlerde HDR olduğuna dair bulgu saptanamamıştır. Bu mikroenjeksiyonlarda embriyolarda ölüm oranı oldukça yüksek saptanmış (%69-79) ve bir aylık takipte bu enjeksiyon

gruplarında balıklar yaşatılamamıştır. Zebra balığı embriyolarında TALEN ve CRISPR/Cas9 enjeksiyonu sonrasında gelişen ölü ve hasarlı embriyo oranları toksisite göstergesi olarak bildirilmekte ve bu oranların genom düzenleme aracının çift zincir kırık oluşturma etkinliği ile uyumlu olmadığı bildirilmemektedir (95, 96, 103). Aynı konsantrasyonlarda sadece sgRNA enjeksiyonu yapılan embriyolarda ise 24 saat sonunda ölüm oranı %42 olarak saptanmıştır. Bu durum ssODN enjekte edilen gruplarda toksik etkinin arttığını göstermektedir. Enjeksiyon yapılan mRNA miktarının bir embryo için 500 pg'dan fazla olmaması önerilmektedir (121). Bu sınırı aşmamakla birlikte etkin kırık oluşturan cas9 mRNA ve sgRNA miktarı toplamda embriyo başına 350 pg'dır. Buna ek olarak 60 ve 120 pg ssODN eklenmesi toksik bildirilen doza ulaşmamakla yine de yüksektir. Bunun önüne geçmek için embriyoya enjekte edilen karışımda yer alan bileşenlerin konsantrasyonları ya da total enjeksiyon volümü azaltılarak çalışmaların tekrarlanması düşünülebilir, ancak daha düşük konsantrasyonlarda, HDR gerçekleşme etkinliğinin artması çift zincir kırık oluşma etkinliği azalacağı için beklenemezdi. Bu nedenle enjeksiyon denemelerinde Cas9 mRNA'sı yerine Cas9 proteini (Cas9p) kullanılmasına karar verildi.

Cas9 proteini Cas9 mRNA'sına göre HDR aracılı insersiyon açısından daha avantajlı olarak görünmektedir. Öncelikle yapılan çalışmalarda Cas9p kullanıldığında çift zincir kırık oluşturma etkinliğinin arttığı gösterilmiştir (107, 124, 125). Cas9p kullanılan çalışmalarda embriyo toksisite oranının da belirgin olarak düştüğü izlenmiştir (107). Ayrıca enjeksiyonlarda total mRNA'nın toksik etkisi söz konusu olduğundan Cas9p kullanıldığında daha yüksek sgRNA konsantrasyonları kullanarak kırık oluşturma etkinliğini arttırabilmek de mümkün olmaktadır (125). Ek olarak Cas9p daha erken yıkıma uğradığından etkisi daha kısa sürmekte ve hedef dışı etkinin de bu nedenle daha az olabileceği belirtilmektedir (126). Ayrıca Cas9p kullanımının zebra balıklarında HDR aracılı tamir açısından da avantajlı olduğu bildirilmiştir. Zebra balıklarında embriyogenezin ilk saatlerinde NHEJ aktif olan tamir mekanizması olmadığı, Cas9 proteininin NHEJ'nin daha az aktif olduğu dönemde kırık oluşumu sağlarken Cas9 mRNA'sının daha geç kırık oluşumuna neden olarak NHEJ ile tamirinin daha fazla olduğu ile bu durum açıklanmıştır (107, 127-129). Cas9p kullanarak yapılan enjeksiyonlarda literatür ile uyumlu olarak embriyolarda ölüm oranı Cas9 mRNA yapılan gruba göre daha düşük saptanmıştır (%71 vs %37). Bu

durum göstermektedir ki; ssODN enjekte edilen gruplarda Cas9 mRNA yerine Cas9 proteini kullanılarak benzer etkinlikte kırık oluşturulabilmekte, toksik etki azaltılmaktadır. Ancak HDR etkinliği Cas9 proteini kullanılan enjeksiyon gruplarında da gösterilememiştir. Cas9p kullanılan enjeksiyon denemelerinde çift zincir kırık oluşturma etkinliği beklenildiği gibi yüksektir ve bu HDR oluşturma etkinliği için yeterlidir ancak kırığın oluştuğu nokta Cas9 mRNA ile yapılan denemelerde olduğu gibi hedef nükleotitten 26 bç uzakta olduğu için HDR'nin önceki denemelerle aynı nedenlerden dolayı gerçekleşmediği düşünülmüştür.

Yabanıl tip zebra balıklarında *tgfb1*'de hedef bölgede CRISPR/Cas9 genom düzenleme aracı ve ssODN kullanarak yapılan HDR-aracılı kısa insersiyon denemelerinde somatik mutasyon analizlerinde kısa insersiyon lehine bulgu saptanamamıştır. Literatürde zebra balıklarında genom düzenleme araçları kullanılarak yapılan HDR aracılı kısa insersiyon çalışmalarında bildirilen başarı oranları %0-8 arasındadır ve bu şekildeki çalışma sayısı da çok fazla değildir (88, 100, 102, 106, 107, 111). Bütün çalışmalarda belirtilen ortak kanı bu sistemin etkinliğinin zebra balıklarında düşük olduğu yönündedir. Ek olarak bu çalışmada, HDR-aracılı kısa insersiyon için literatürde belirtilen hedefe yakın ve yüksek etkinlikte çift zincir kırık oluşturan sgRNA koşullarının her ikisini de sağlayan hedefe uygun sgRNA yoktur. Ayrıca literatürdeki çalışmalarda somatik mutasyon analizi aşamasında yeni nesil dizileme teknolojilerinin kullanılması etkinlik çok düşük bile olsa yakalanması açısından avantajlı olarak bildirilmektedir (102, 107). Bu çalışmada PZR-RFLP ve Sanger dizileme kullanıldığı için düşük olan etkinliği saptamada yetersiz kalmış olabilir. Bunlar dışında zebra balığında hedef bölgenin genom düzenleme araçları ile etkileşiminde önemli rol oynayan epigenetik faktörler de literatürde de belirtildiği gibi bu sonuçta bir etken olarak düşünülebilir (107).

Zebra balıklarında *tgfb1*'deki hedef bölgede varyasyon gerçekleştiriminin alternatif olan yolu sadece hedefte ya da hedefe çok yakın bir noktada çift zincir kırık oluşturmak ve bu bölgenin NHEJ ile tamiri sonrası gelişen varyasyonları taramaktır. Bu şekilde gelişecek varyasyonu önceden bilmek mümkün olmadığı için enjeksiyon sonrası yaşayan tüm balıkların taranması gereklidir. Taramalar sonucunda hedef arjini etkileyen, çerçeve kayması ve dur kodonu oluşumu ile sonuçlanmayan *in frame* varyasyon saptanabilmesi durumunda bu balıklar korneada gelişebilecek

patolojiler açısından incelenerek TGFBI-ilişkili kornea distrofilerinin patogenezi hakkında ileri çalışmalara fırsat tanıyabilir. Bu alternatifte en uygun sgRNA grubu çoklu olarak enjekte edilen *tgfb1-sgRNA-6* ve *tgfb1-sgRNA-7* idi. Bu gruptaki enjeksiyonlar hedef kodonda kırık oluşumu ile sonuçlandığı için bu grupta enjeksiyon yapılan embriyolar büyütülmüştür ve daha sonra yabancı tip balıklarla çaprazlanarak embriyolarda hedefte varyasyon varlığı ve tipi Sanger dizileme ile saptanmıştır. Bu gruptaki beş erişkin balığın (F0) incelenen embriyolarında saptanan mutasyonlara baktığımızda M2 ve M3’de izlenen varyasyon dur kodonu oluşumuna neden olurken, F1 ve F2’de izlenen varyasyonlarda ise hedef arjinin amino asidi etkilenmemektedir. M1 olarak adlandırılan zebra balığında ise yabancı balık ile çiftleşmesi sonucu elde edilen embriyolarda heterozigot olarak hedefteki arjinin amino asidini etkileyen *in frame* varyasyon izlenmiştir. Bu embriyoları veren atasal balık F0 founder olarak ayrılmıştır ve *in frame* varyasyonun tespit edildiği kalan F1 hattı embriyoları üç ay boyunca büyütülmüştür. Bu varyasyon zebra balığı *tgfb1* ürününde 115. pozisyondaki serin, 116. pozisyondaki glutamat ve 117. pozisyondaki arjinin amino asitlerinin diziden silinmesine ve bu bölgeye lösin amino asidinin eklenmesine neden olmaktadır: p. Ser115\_Arg117delinsLeu. Buna benzer bir mutasyon olan R124L+ del (125-126) heterozigot olarak insanlarda granüler kornea distrofisi tip-1’e neden olarak bildirilmiştir (2). İnsandakinden farklı olarak bu varyasyon ile zebra balığında arjininin N’ ucundaki iki polar özellikteki amino asit ortadan kalkmaktadır. Bu varyasyonun zebra balığı kornealarında birikim ile sonuçlanması mümkün olarak görünmektedir. Çünkü hedef arjinin yerine polar olmayan lösin amino asidi geçmektedir. R124L mutasyonu da RBKD yani insanlarda yine GKD-1’de olduğu gibi amiloid olmayan hiyalin yapıda birikime neden olmaktadır. GKD-1’de bu birikim stromada, RBKD’de ise Bowman tabakasında gerçekleşmektedir (2). Zebra balığı kornealarında da benzer yapıda birikimin gözlenmesi muhtemeldir.

TGFBIp’in heterozigot balıklarda da ifade olduğunu göstermek için gözden protein izolasyonu yapılarak Western Blot yöntemi ile ve anti-TGFBI poliklonal antikor kullanılarak protein ifade analizi yapılmıştır. Hem yabancı tip hem de heterozigot olarak p. Ser115\_Arg117delinsLeu varyasyonunu taşıyan balıklarda TGFBIp aynı düzeyde ifade olmaktadır (Şekil 4.15). Bu beklenen bir sonuçtur. Çünkü varyasyon *in frame* olduğu için protein ifadesini bozmaması beklenmektedir.



Üç aylık erişkin dört yabancı tip ve üç heterozigot zebra balığı kornealarında histopatolojik inceleme yapılmıştır. İnceleme için heterozigot balıklarda korneayı içerecek üç farklı seviyede kesit alınmasına dikkat edilmiştir. Böylece birikim açısından daha fazla alanın incelenmesi sağlanmıştır. İnsanlarda korneada birikim, merkezi ve yüzeysel başlamakta, perifere ve derine doğru giderek artmaktadır (2). Bu nedenle özellikle kornea merkezinin kesitlerde yer almasına dikkat edilmiştir. Tüm balıklarda histopatolojik kesitlerde çok katlı epitel tabakası, epitele göre daha ince bir stroma ve altında ise endotel tabakası seçilmekle birlikte Bowman tabakası ve Desme tabakası ayrı bir tabaka olarak izlenememiştir. Literatürde zebra balıklarında insanlarda olduğu gibi Desme ve Bowman tabakalarının varlığını bildiren çalışmalar (4, 5, 68) olmakla birlikte, 2018 yılında bir çalışmada bu tabakaların zebra balığı kornealarında mevcut olmadığı bildirilmiştir (130). P. Ser115\_Arg117delinsLeu varyasyonunu heterozigot olarak taşıyan balıklarda birikimlerin amiloid olmayan hiyalin yapıda olmasını beklemekle birlikte üç farklı seviyeden alınan ardışık kesitler hematoxilen-eozin, Masson trikrom ve Kongo kırmızısı ile boyanmıştır. Tüm kesitlerdeki kornea görüntüleri taranmış ancak yabancı tip balıklar ile heterozigot balıklar arasında bir fark ya da heterozigot balıklarda birikim lehine bir bulgu saptanamamıştır. Birikimlerin mekanizmasına yönelik yapılan çalışmalarda en çok üzerinde durulan konu protein-protein etkileşimleri, yapım ve yıkım dengesizlikleri ve kornea mikroçevresidir (25, 45-51). TGFBIp'de meydana gelen ve amino asit değişikliğine yol açan mutasyonların, proteinin konformasyonunu ve diğer proteinlerle etkileşimini değiştirerek korneada farklı olan mikroçevrenin de etkisiyle yapım ve yıkım arasındaki dengenin bozulmasına ve birikimlere neden olduğu öne sürülmektedir (131). TGFBIp'de meydana gelen farklı mutasyonlar sonucu farklı etkileşimler farklı fenotiplerin açıklaması olarak düşünülmektedir. Farelerde yapılan bir çalışmada R124H varyasyonunu içeren insan TGFBIp üretimi, korneada insanla birebir uyumlu olmamakla birlikte birikim oluşumu ile sonuçlanmıştır. Farklılıkları birikimlerin ağırlıklı olarak hiyalin yapıda olması, heterozigot ve homozigotlarda birikimlerin miktarı açısından belirgin fark olmamasıdır (59). GKD-1 ve LKD hastalıklarına yönelik herhangi bir model organizma çalışması yoktur. Zebra balıkları daha önce kornea distrofileri açısından uygun model organizmalar olarak öne sürülmekle birlikte (4, 5, 68) zebra balığında bu alanda yayınlanmış bir çalışma mevcut

değildir. Bu tez çalışması GKD2 hariç diğer TGFBI-ilişkili kornea distrofilerinin zebra balığında modelini oluşturmak için yapılmış ilk çalışmadır. Zebra balıklarında *tgfb1*'de genom düzenleme araçları ile p. Ser115\_Arg117delinsLeu varyasyonu oluşturularak hedef arjinin rezidüsü *in frame* olarak ortadan kaldırılmıştır. Bu varyasyonu heterozigot olarak taşıyan zebra balıklarının erişkin sayıldıkları üçüncü ayda gözleri protein birikimi açısından incelenmiştir ancak birikim lehine bir bulgu saptanamamıştır. Mutant proteinin birikmesi yapım ve yıkım dengesinin bozulmasını gerektirmektedir (131). Üç aylık balıklarda henüz bu denge bozulmamış olabilir. Ayrıca birikimlerin oluşumunda kornea mikroçevresinin, protein-protein etkileşimlerinin önemi çalışmalarda vurgulanmakta olup hastalardaki fenotipik farklılıklar ve bu proteinin ifade olduğu diğer dokularda birikimin gözlenmemesi bu etkenlere bağlanmaktadır. Zebra balığı korneasındaki mikroçevre ve protein-protein etkileşimleri birikime bu anlamda yatkınlık oluşturmayabilir. Tüm bu etkenler heterozigot balıklarda birikimin gözlenmemesini açıklamakla birlikte bu aşamada kesin sonuca varmak mümkün değildir. Zebra balıklarında birikimin ne zaman oluşacağı da öngörülememektedir. İnsanlarda RBKD hastalarında başlangıç çocukluk dönemi olarak bildirilmekte, GKD-1'de 2 yaş kadar erken görülebilmekle birlikte hastalığın ortaya çıkışı erişkinlik dönemine kadar uzayabilmektedir (25). Farelerde GKD2'yi modelleme çalışmasında heterozigot fareler 52 haftalık olduklarında incelenmiş ve amiloid yapıda olmayan birikimler saptanmıştır (59). Fareler de 3. ayda erişkinliğe ulaşmaktadırlar ancak bu çalışmada bir yaşını geçen farelerde inceleme yapılmıştır. Literatürde zebra balıklarında korneanın 2. aydan itibaren erişkin özelliğe kavuştuğu belirtilmektedir (66-68). Zebra balıkları ise 3. aydan itibaren erişkin olarak sınıflandırılmaktadırlar (65). Bu nedenle bu tez çalışmasında heterozigot olarak varyasyonu taşıyan zebra balıkları korneadaki fenotipik etkiler açısından 3 aylık olduklarında incelenmişlerdir. Ancak yukarıda da belirtildiği gibi birikimin oluşumu yapım ve yıkım dengesine bağlandığı için bu dengenin aşılması zebra balıkları için daha çok zaman gerektirebilir (131). Balıkların da farede olduğu gibi 1 yaşını geçtikten sonra incelenerek birikimin oluşup oluşmadığını gözlemek kornea distrofilerinin modellenmesi için zebra balıklarının uygun model organizmalar olup olmadığına karar vermek açısından daha uygun olabilir.

Sonuç olarak bu tez kapsamında zebra balıklarında protein ifadesini etkilemeden insan TGFBI-ilişkili kornea distrofilerinin patogenezinde önemli olan hedef arjinin amino asidini etkileyen varyasyon genom düzenleme araçları kullanılarak *tgfb1*'de oluşturulmuştur. Bu varyasyonun zebra balığı korneasındaki fenotipik etkileri üç aylık erişkin balıklarda histopatolojik kesitlerde görülmemiştir. Ancak balıkların büyütülmeye devam etmesi sonrasında yapılacak incelemelerde fenotipik etkiler gözlenebilir ve bu model organizmada hastalıkların patogenezinin ve tedavisine yönelik ileri çalışmalar yapılabilir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

### 6.1. Sonuçlar

Hacettepe Üniversitesi Zebra Balığı Laboratuvarında mevcut olan yabancı tip AB zebra balıklarında Ensemble veri tabanında ENSDARG00000071586 kodlu tgfb1 referans dizide bildirilmemiş olan 14. kromozom 4. eksonunda 26.523.317 lokasyonunda C/T varyasyonu heterozigot ya da homozigot olarak gösterildi.

Zebra balığında tgfb1 geninin 117. arjinin amino asidini kodlayan nükleotit grubunun yakınlarında uygun TALEN hedef dizisi varlığı gösterildi. Ancak sentezlenen bu TALEN aracı ile hedef dizide çift zincir kırık oluşumu somatik mutasyon analizinde gösterilemedi.

Zebra balığı tgfb1 geninde hedef bölgeye 26 bç uzaklıkta sgRNA tasarlandı ve tgfb1-sgRNA-1'in 5' ucunda tek yanlış eşleşme içermesine rağmen %50 etkinlikte çift zincir kırık oluşturduğu gösterildi.

CRISPRScan programı kullanılarak tasarlanan tgfb1-sgRNA-2'nin programla uyumlu olarak hedef bölgeye 26 bç uzaklıkta %100 etkinlikte kırık oluşturduğu gösterildi.

Cas9 VQR varyantı ve "CASBlast" programıyla tasarlanan tgfb1-sgRNA-6 ve tgfb1-sgRNA-7 kullanılarak zebra balığında tgfb1'de hedef kodonda çift zincir kırık %12,5 etkinlikle oluşturuldu.

Tgfb1-sgRNA-2, Cas9 mRNA ve ssODN kullanılarak yapılan kısa insersiyon denemelerinde RFLP ile somatik mutasyon analizinde HDR lehine bulgu saptanmadı.

Cas9 mRNA yerine Cas9p kullanılarak yapılan enjeksiyon denemeleri sonrasında 24. Saatte ölüm oranının %50 oranında azaldığı gösterildi.

Tgfb1-sgRNA-2, Cas9p ve ssODN kullanılarak yapılan kısa insersiyon denemelerinde RFLP ile somatik mutasyon analizinde HDR lehine bulgu saptanmadı.

Cas9 VQR varyantı ile tgfb1-sgRNA-6 ve tgfb1-sgRNA-7 kullanılarak enjeksiyon yapılan zebra balıklarının büyütülmesi sonrasında beş balığın hedef bölgede varyasyon taşıdığı ve bunu sonraki jenerasyona aktarabildikleri gösterildi. Bu varyasyonlardan biri p. Ser115\_Arg117delinsLeu olup hedef bölgede arjinin amino asidini ortadan kaldıran *in frame* bir varyasyondur.

Tgfb1'de p. Ser115\_Arg117delinsLeu varyasyonunu heterozigot olarak taşıyan altı adet zebra balığı 3 aylık'a kadar büyütüldü.

Tgfb1'de p. Ser115\_Arg117delinsLeu varyasyonunu taşıyan 3 aylık bir balığın ve 3 aylık yabancı tip balığın gözlerinden protein izolasyonu yapıldı ve western blot ile her ikisinde de TGFBIp'nin ifadesi arasında anlamlı fark olmadığı gösterildi.

Zebra balığı gözlerinden elde edilen histolojik kesitlerde hematoksilen eozin ile yapılan boyamada korneanın çok katlı epitel tabakası, epitel tabakasından daha ince bir stroma tabakası ve tek katlı endotel tabakasından oluştuğu gösterildi.

Tgfb1'de p. Ser115\_Arg117delinsLeu varyasyonunu taşıyan 3 aylık heterozigot balıkların gözlerinden elde edilen histolojik kesitlerde korneada hematoksilen eozin, masson trikrom ve kongo kırmızısı boyamalarında birikim lehine bir bulgu gösterilemedi.

## 6.2. Öneriler

- Tgfb1'de p. Ser115\_Arg117delinsLeu varyasyonunu taşıyan heterozigot balıkların büyütülmesi ve histolojik incelemenin bir yaşında veya daha ileri yaşlarda birikimler açısından tekrarlanması,
- Tgfb1'de p. Ser115\_Arg117delinsLeu varyasyonunu taşıyan heterozigot balıkların yabancı tip balıklarla çaprazlanıp dişi ve erkek erişkin balık eldesini takiben heterozigot balıkların kendi aralarında çaprazlanarak homozigot balık elde edilmesi ve homozigot balıkların gözlerinde histolojik incelemenin yapılması,
- p. Ser115\_Arg117delinsLeu varyasyonunu taşıyan zebra balığı gözlerinde 12. ayda transmisyon elektron mikroskobu ile korneanın stroma ve Bowman tabakalarının ek patolojik bulgular yönünden incelenmesi,
- Zebra balıklarında başarılı olarak uygulanan baz-editleme tekniğinin kullanılarak tgfb1'de hedef nükleotitte değişiklik sağlanması için denemeler yapılması,
- Zebra balıklarında HDR-aracılı kısa insersiyon için literatürdeki yeniliklerin takip edilerek denemelerin devam ettirilmesi önerilmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Stone EM, Mathers WD, Rosenwasser GO, Holland EJ, Folberg R, Krachmer JH, ve ark. Three autosomal dominant corneal dystrophies map to chromosome 5q. *Nat Genet.* 1994;6:47-51.
2. Munier FL, Korvatska E, Djemaï A, Le Paslier D, Zografos L, Pescia G, Schorderet DF. Kerato-epithelin mutations in four 5q31-linked corneal dystrophies. *Nat Genet.* 1997;15:247-51.
3. Lisch W, Seitz B. The clinical landmarks of corneal dystrophies. *Dev Ophthalmol.* 2011;48:9-23.
4. Zhao XC, Yee RW, Norcom E, Burgess H, Avanesov AS, Barrish JP, ve ark. The zebrafish cornea: structure and development. *J. Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47(10): 4341-8.
5. Akhtar S, Schonhaler HB, Bron AJ, Dahm R. Formation of stromal collagen fibrils and proteoglycans in the developing zebrafish cornea. *Acta Ophthalmol.* 2008 Sep;86(6):655-65.
6. Bibliowicz J, Tittle RK, Gross JM. Toward a better understanding of human eye disease insights from the zebrafish, *Danio rerio*. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2011;100:287-330.
7. Nemudryi AA, Valetdinova KR, Medvedev SP, Zakian SM. TALEN and CRISPR/Cas Genome Editing Systems: Tools of Discovery. *Acta Naturae.* 2014 Jul;6(3):19-40.
8. Auer TO, Del Bene F. CRISPR/Cas9 and TALEN mediated knockin approaches in zebrafish. *Methods.* 2014 Sep;69(2):142-50.
9. DelMonte DW, Kim T. Anatomy and physiology of the cornea. *J Cataract Refract Surg.* 2011;37:588–98.
10. Ruffer F, Schroeder A, Erb C. White-to-white corneal diameter; normal values in healthy humans obtained with the Orbscan II topography system. *Cornea.* 2005;24:259–61.
11. Farjo A, McDermott M, Soong HK. Corneal anatomy, physiology, and wound healing. In: Yanoff M, Duker JS, eds, *Ophthalmology*, 3rd ed. St. Louis, MO, Mosby, 2008;203–8.
12. Cameron JD. Corneal reaction to injury. In: Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ, eds, *Cornea*, 2nd ed. Philadelphia, PA, Elsevier Mosby, 2005;115–133.
13. Hanna C, Bicknell DS, O'Brien JE. Cell turnover in the adult human eye. *Arch Ophthalmol.* 1961;65:695–8.
14. Boote C, Dennis S, Newton RH, Puri H, Meek KM. Collagen fibrils appear more closely packed in the prepupillary cornea: optical and biomechanical implications. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44:2941–8.
15. Meek KM, Boote C. The organization of collagen in the corneal stroma. *Exp Eye Res.* 2004;78:503–12.

16. Jester JV, Moller-Pedersen T, Huang J, Sax CM, Kays WT, Cavanagh HD, Petroll WM, Piatigorsky J. The cellular basis of corneal transparency: evidence for 'corneal crystallins'. *J Cell Sci.* 1999;112:613–22.
17. Beebe DC, Coats JM. The lens organizes the anterior segment: specification of neural crest cell differentiation in the avian eye. *Dev Biol.* 2000;220: 424–31.
18. Watsky MA, McDermott ML, Edelhauser HF. In vitro corneal endothelial permeability in rabbit and human: the effects of age, cataract surgery and diabetes. *Exp Eye Res.* 1989;49:751–67.
19. Stiemke MM, Edelhauser HF, Geroski DH. The developing corneal endothelium: Correlation of morphology, hydration and Na/K ATPase pump site density. *Curr Eye Res.* 1991;10:145-56.
20. Yee RW, Matsuda M, Schultz RO, Edelhauser HF. Changes in the normal corneal endothelial cellular pattern as a function of age. *Curr Eye Res.* 1985;4:671–8.
21. Geroski DH, Matsuda M, Yee RW, Edelhauser HF. Pump function of the human corneal endothelium; effects of age and cornea guttata. *Ophthalmology.* 1985;92:759–63.
22. Oliveira-Soto L, Efron N. Morphology of corneal nerves using confocal microscopy. *Cornea.* 2001;20:374–84.
23. Mc Tighe JW. The human cornea: a light and electron microscopic study of the normal cornea and its alterations in various dystrophies. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1967;65:591-660.
24. Lisch W, Seitz B. New international classification of corneal dystrophies and clinical landmarks. *Klin Monbl Augenheilkd.* 2008;225:616-22.
25. Weiss JS, Møller HU, Aldave AJ, Seitz B, Bredrup C, Kivelä T, Munier FL, ve ark. IC3D Classification of Corneal Dystrophies—Edition 2. *Cornea.* 2015;34:117–59.
26. Ellies P, Renard G, Valleix S, Boelle PY, Dighiero P. Clinical outcome of eight BIGH3-linked corneal dystrophies. *Ophthalmology.* 2002;109:793-7.
27. Kobayashi A, Sugiyama K. In vivo laser confocal microscopy findings for Bowman's layer dystrophies (Thiel-Behnke and Reis-Bücklers corneal dystrophies). *Ophthalmology.* 2007;114:69-75.
28. Korvatska E, Munier FL, Chaubert P, Wang MX, Mashima Y, Yamada M, ve ark. On the role of keratoepithelin in the pathogenesis of 5q31-linked corneal dystrophies. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40:2213-9.
29. Klintworth GK. Lattice corneal dystrophy. An inherited variety of amyloidosis restricted to the cornea. *Am J Pathol.* 1967;50(3):371-99.
30. Okada M, Yamamoto S, Watanabe H, Shimomura Y, Tano Y. Granular corneal dystrophy with homozygous mutations in the kerato-epithelin gene. *Am J Ophthalmol.* 1998;126:169-76.

31. Holland EJ, Daya SM, Stone EM, Folberg R, Dobler AA, Cameron JD ve ark. Avellino corneal dystrophy: Clinical manifestations and natural history. *Ophthalmology*. 1992;99(10):1564-8.
32. Lucarelli MJ, Adamis AP. Avellino corneal dystrophy. *Arch Ophthalmol*. 1994;112 (3):418-9.
33. Aldave AJ. The genetics of the corneal dystrophies. *Dev Ophthalmol*. 2011;48:51-66.
34. Kheir V, Cortés-González V, Zenteno JC, Schorderet DF. Mutation update: TGFBI pathogenic and likely pathogenic variants in corneal dystrophies. *Hum Mutat*. 2019 Jun;40(6):675-93.
35. Fujiki K, Hotta Y, Nakayasu K, Kanal A. Homozygotic patient with BIGH3 gene mutation in granular dystrophy. *Cornea*. 1998;17:288-92.
36. Kocak-Altintas AG, Kocak-Midillioglu I, Akarsu AN, Duman S. BIGH3 gene analysis in the differential diagnosis of corneal dystrophies. *Cornea*. 2001;20:64–8.
37. Kıratlı H, Irkeç M, Özgül K, Oğuş A. The phenotype of arg555trp mutation in a large Turkish family with corneal granular dystrophy. *Eur J Ophthalmol*. 2001;11(4):333-7.
38. Yaylacioglu Tuncay F, Kayman Kurekci G, Guntekin Ergun S, Pasaoglu OT, Akata RF, Dincer PR. Genetic analysis of CHST6 and TGFBI in Turkish patients with corneal dystrophies: Five novel variations in CHST6. *Mol Vis*. 2016 Oct; 22:1267-79.
39. Skonier J, Bennett K, Rothwell V, Kosowski S, Plowman G, Wallace P, ve ark. Beta igh3: a transforming growth factor-beta-responsive gene encoding a secreted protein that inhibits cell attachment in vitro and suppresses the growth of CHO cells in nude mice. *DNA Cell Biol*. 1994;13: 571–84.
40. Lakshminarayanan R, Chaurasia SS, Murugan E, Venkatraman A, Chai SM, Vithana EN, Beuerman RW, Mehta JS. Biochemical properties and aggregation propensity of transforming growth factor-induced protein (TGFBip) and the amyloid forming mutants. *Ocul Surf*. 2015 Jan;13(1):9-25.
41. Thapa N, Lee BH, Kim IS. TGFBip/betaig-h3 protein: a versatile matrix molecule induced by TGF-beta. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39:2183-94.
42. Lee JM, Lee EH, Kim IS, Kim JE. Tgfbi deficiency leads to a reduction in skeletal size and degradation of the bone matrix. *Calcif Tissue Int*. 2015 Jan;96(1):56-64.
43. Skonier J, Neubauer M, Madisen L, Bennett K, Plowman GD, Purchio AF. cDNA cloning and sequence analysis of beta igh3, a novel gene induced in a human adenocarcinoma cell line after treatment with transforming growth factor-beta. *DNA Cell Biol*. 1992;11:511-22.
44. Karring H, Runager K, Valnickova Z, Thøgersen IB, Møller-Pedersen T, Klintworth GK, Enghild JJ. Differential expression and processing of transforming growth factor beta induced protein (TGFBip) in the normal human cornea during postnatal development and aging. *Exp Eye Res*. 2010; 90:57-62.



45. Streeten BW, Qi Y, Klintworth GK, Eagle RC Jr, Strauss JA, Bennett K. Immunolocalization of beta ig-h3 protein in 5q31-linked corneal dystrophies and normal corneas. *Arch Ophthalmol*. 1999;117:67–75.
46. Karring H, Runager K, Thøgersen IB, Klintworth GK, Højrup P, Enghild JJ. Composition and proteolytic processing of corneal deposits associated with mutations in the TGFBI gene. *Exp Eye Res*. 2012 Mar;96(1):163-70.
47. Karring H1, Poulsen ET, Runager K, Thøgersen IB, Klintworth GK, Højrup P, Enghild JJ. Serine protease HtrA1 accumulates in corneal transforming growth factor beta induced protein (TGFBIp) amyloid deposits. *Mol Vis*. 2013;19:861-76.
48. Courtney DG, Poulsen ET, Kennedy S, Moore JE, Atkinson SD, Maurizi E, Nesbit MA, Moore CB, Enghild JJ. Protein Composition of TGFBI-R124C- and TGFBI-R555W-Associated Aggregates Suggests Multiple Mechanisms Leading to Lattice and Granular Corneal Dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015 Jul;56(8):4653-61.
49. Kim JE, Park RW, Choi JY, Bae YC, Kim KS, Joo CK, Kim IS. Molecular properties of wild-type and mutant betaIG-H3 proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43:656–61.
50. Basaiawmoit RV, Oliveira CL, Runager K, Sørensen CS, Behrens MA, Jonsson BH, Kristensen T, Klintworth GK, Enghild JJ, Pedersen JS, Otzen DE. SAXS models of TGFBIp reveal a trimeric structure and show that the overall shape is not affected by the Arg124His mutation. *J. Mol Biol*. 2011 May; 408(3):503-13.
51. Schmitt-Bernard CF1, Chavanieu A, Herrada G, Subra G, Arnaud B, Demaille JG, Calas B, Argilés A. BIGH3 (TGFBI) Arg124 mutations influence the amyloid conversion of related peptides in vitro: Implications in the BIGH3-linked corneal dystrophies. *Eur J Biochem*. 2002;269:5149–56.
52. Zhu M, Yu P, Jiang B, Gu Y. Investigation of the influence of Arg555Trp and Thr538Pro TGFBI mutations on C-terminal cleavage and cell endoplasmic reticulum stress. *Mol Vis*. 2012;18:1156-64.
53. Choi SI, Maeng YS, Kim KS, Kim TI, Kim EK. Autophagy is induced by raptor degradation via the ubiquitin/ proteasome system in granular corneal dystrophy type 2. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;450(4):1505-11.
54. Nie D, Peng Y, Li M, Liu X, Zhu M, Ye L. Lithium chloride (LiCl) induced autophagy and downregulated expression of transforming growth factor  $\beta$ -induced protein (TGFBI) in granular corneal dystrophy. *Exp Eye Res*. 2018 Aug;173:44-50.
55. Choi SI, Kang SW, Kim EK. Altered Mitochondrial Function in Type 2 Granular Corneal Dystrophy. *Am J Pathol*. 2011 Aug;179(2):684-92.
56. Kim TI, Lee H, Hong HK, Kim KS, Choi SI, Maeng YS, Kim EK. Inhibitory Effect of Tranilast on Transforming Growth Factor-Beta-Induced Protein in Granular Corneal Dystrophy Type 2 Corneal Fibroblasts. *Cornea*. 2015 Aug;34(8):950-8.

57. Bustamante M1, Tasinato A, Maurer F, Elkochairi I, Lepore MG, Arsenijevic Y, Pedrazzini T, Munier FL, Schorderet DF. Overexpression of a mutant form of TGFBI/BIGH3 induces retinal degeneration in transgenic mice. *Mol Vis*. 2008;14:1129-37.
58. Liao X, Cui H, Wang F. Establishment of a transgenic mouse model of corneal dystrophy overexpressing human BIGH3. *Int J Mol Med*. 2013 Nov;32(5):1110-4.
59. Yamazoe K, Yoshida S, Yasuda M, Hatou S, Inagaki E, Ogawa Y, Tsubota K, Shimmura S. Development of a Transgenic Mouse with R124H Human TGFBI Mutation Associated with Granular Corneal Dystrophy Type 2. *PLoS One*. 2015 Jul;10(7):e0133397.
60. Lee ES, Kim EK. Surgical do's and don'ts of corneal dystrophies. *Curr Opin Ophthalmol*. 2003;14:186–91.
61. Ozawa D, Kaji Y, Yagi H, Sakurai K, Kawakami T, Naiki H, Goto Y. Destruction of amyloid fibrils of keratoepithelin peptides by laser irradiation coupled with amyloid-specific thioflavin T. *J Biol Chem*. 2011;286:10856-63.
62. Ohji M, SundarRaj N, Thoft RA. Transforming growth factor-beta stimulates collagen and fibronectin synthesis by human corneal stromal fibroblasts in vitro. *Curr Eye Res*. 1993;12:703-9.
63. Choi SI, Kim BY, Dadakhujaev S, Jester JV, Ryu H, Kim TI, Kim EK. Inhibition of TGFBIp expression by lithium: Implications for TGFBI-linked corneal dystrophy therapy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52:3293-300.
64. Yellore VS, Rayner SA, Aldave AJ. TGFBI-induced extracellular expression of TGFBIp and inhibition of TGFBIp expression by RNA interference in a human corneal epithelial cell line. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52:757-63.
65. Zon LI, Peterson RT. In vivo drug discovery in the zebrafish. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4:35–44.
66. Bibliowicz J, Tittle RK, Gross JM. Toward a better understanding of human eye disease insights from the zebrafish, *Danio rerio*. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2011;100:287-330.
67. Nasevicius A, Ekker SC. Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nat Genet*. 2000 Oct;26(2):216-20.
68. Soules KA, Link BA. Morphogenesis of the anterior segment in the zebrafish eye Morphogenesis of the anterior segment in the zebrafish eye. *BMC Dev Biol*. 2005 Jun;5:12.
69. Gipson IK, Joyce NC, Zieske JD. The anatomy and cell biology of the human cornea, limbus, conjunctiva, and adnexa. In: Foster CS, Azar DT, Dohlman CH, et al. *The Cornea: Scientific Foundations and Clinical Practice*, 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2005:1–35.
70. Cannon CJ, Siegler V, Meek KM, Hodson SA, Catterson B, Kinoshita S & Quantock AJ. Proteoglycan alterations and collagen reorganisation in the secondary avian cornea during development. *Ophthalmic Res*. 2003;35:177–84.

71. Swamynathan SK, Crawford MA, Robison WG Jr, Kanungo J & Piatigorsky J. Adaptive differences in the structure and macromolecular compositions of the air and water corneas of the “four-eyed” fish (*Anableps anableps*). *FASEB*. 2003;17:1996–2005.
72. Hazlett LD. Corneal and ocular surface histochemistry. *Prog Histochem Cytochem*. 1993;25:1–60.
73. Reh binder C. Fine structure of the mouse cornea. *Z Versuch- stierk*. 1978;20:28–34.
74. Haustein J. On the ultrastructure of the developing and adult mouse corneal stroma. *Anat Embryol*. 1983;168:291–305.
75. Maeder ML, Gersbach CA. Genome-editing Technologies for Gene and Cell Therapy. *Mol Ther*. 2016;24(3):430-46.
76. Rouet P, Smih F, Jasin M. Expression of a site-specific endonuclease stimulates homologous recombination in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91(13):6064-8.
77. Belfort M, Roberts RJ. Homing endonucleases: keeping the house in order. *Nucleic Acids Res*. 1997;25(17):3379-88.
78. Bibikova M, Golic M, Golic KG, Carroll D. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics*. 2002;161(3):1169-75.
79. Doyon Y, Vo TD, Mendel MC, Greenberg SG, Wang J, Xia DF, ve ark. Enhancing zinc-finger-nuclease activity with improved obligate heterodimeric architectures. *Nat Methods*. 2011;8(1):74-9.
80. Yaylacioglu Tuncay F, Dincer PR. Genome Editing Technologies: From Bench Side to Bedside. *Acta Medica*. 2018;49(3):30- 40.
81. A.J. Bogdanove, S. Schornack, T. Lahaye. TAL effectors: finding plant genes for disease and defense. *Curr Opin Plant Biol*. 2010;13:394–401.
82. H. Scholze, J. Boch. TAL effectors are remote controls for gene activation. *Curr Opin Microbiol*. 2011;14:47–53.
83. Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, ve ark. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*. 2009;326(5959):1509-12.
84. Kweon J, Kim A, Chon JK, Yoo JY, Kim HJ, Kim S, ve ark. A library of TAL effector nucleases spanning the human genome. *Nat. Biotechnol*. 2013;31:251–258.
85. Jore MM, Lundgren M, van Duijn E, Bultema JB, Westra ER, Waghmare SP, Wiedenheft B, ve ark. Structural basis for CRISPR RNA-guided DNA recognition by Cascade. *Nat Struct Mol Biol*. 2011;18(5):529-36.
86. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012;337(6096):816-21.

87. Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, Makarova KS, Essletzbichler P, Volz SE, ve ark. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*. 2015 Oct;163(3):759-71.
88. Moreno-Mateos MA, Fernandez JP, Rouet R, Vejnar CE, Lane MA, Mis E, ve ark. CRISPR- Cpf1 mediates efficient homology-directed repair and temperature-controlled genome editing. *Nat Commun*. 2017 Dec 8;8(1):2024.
89. Ran FA, Cong L, Yan WX, Scott DA, Gootenberg JS, Kriz AJ, ve ark. In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature*. 2015;520(7546):186-91.
90. Kleinstiver BP, Prew MS, Tsai SQ, Topkar VV, Nguyen NT, Zheng Z, ve ark. Engineered CRISPR- Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature*. 2015;523(7561):481-5.
91. Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, Morrison C, Hashimoto M, Utsumi H, Yamaguchi-Iwai Y, ve ark. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J*. 1998;17(18):5497-508.
92. Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas- based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol*. 2013;31(7):397-405.
93. Mao Z, Bozzella M, Seluanov A, Gorbunova V. Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells. *DNA Repair (Amst)*. 2008;7(10):1765-71.
94. Chu VT, Weber T, Wefers B, Wurst W, Sander S, Rajewsky K, Kühn R. Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nat Biotechnol*. 2015;33(5):543-8.
95. Cade L, Reyon D, Hwang WY, Tsai SQ, Patel S, Khayter C, Joung JK, Sander JD, Peterson RT, Yeh JR. Highly efficient generation of heritable zebrafish gene mutations using homo- and heterodimeric TALENs. *Nucleic Acids Res*. 2012 Sep;40(16):8001-10.
96. Sander JD, Cade L, Khayter C, Reyon D, Peterson RT, Joung JK, Yeh JR. Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs. *Nat Biotechnol*. 2011 Aug;29(8):697-8.
97. Valton J, Cabaniols JP, Galetto R, Delacote F, Duhamel M, Paris S, ve ark. Efficient strategies for TALEN-mediated genome editing in mammalian cell lines. *Methods*. 2014 Sep;69(2):151-70.
98. Sakuma T, Hosoi S, Woltjen K, Suzuki K, Kashiwagi K, Wada H, ve ark. Efficient TALEN construction and evaluation methods for human cell and animal applications. *Genes Cells*. 2013 Apr;18(4):315-26.
99. P. Huang, A. Xiao, M. Zhou, Z. Zhu, S. Lin, Zhang B. Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs. *Nat. Biotechnol*. 2011;29:699–700.

100. Armstrong GA, Liao M, You Z, Lissouba A, Chen BE, Drapeau P. Homology Directed Knock-in of Point Mutations in the Zebrafish *tardbp* and *fus* Genes in ALS Using the CRISPR/Cas9 System. *PLoS One*. 2016 Mar;11(3):e0150188.
101. Hisano, Y., Sakuma, T., Nakade, S., Ohga, R., Ota, S., Okamoto, ve ark. Precise in-frame integration of exogenous DNA mediated by CRISPR/Cas9 system in zebrafish. *Sci Rep*. 2015;5:8841.
102. Hruscha A, Krawitz P, Rechenberg A, Heinrich V, Hecht J, Haass C, Schmid B. Efficient CRISPR/Cas9 genome editing with low off-target effects in zebrafish. *Development*. 2013 Dec;140(24):4982-7.
103. Hwang WY, Fu Y, Reyon D, Maeder ML, Tsai SQ, Sander JD, Peterson RT, Yeh JR, Joung JK. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*. 2013 Mar;31(3):227-9.
104. Schneider, T.D. & Stormo, G.D. Excess information at bacteriophage T7 genomic promoters detected by a random cloning technique. *Nucleic Acids Res*. 1989;17:659–674.
105. Doench JG, Hartenian E, Graham DB, Tothova Z, Hegde M, Smith I, Sullender M, Ebert BL, Xavier RJ, Root DE. Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation. *Nat Biotechnol*. 2014 Dec;32(12):1262-7.
106. Hwang WY, Fu Y, Reyon D, Maeder ML, Kaini P, Sander JD, ve ark. Heritable and precise zebrafish genome editing using CRISPR-Cas9 system. *PLoS One*. 2013 Jul 9;8(7):e68708
107. Albadri S, De Santis F, Di Donato V, Del Bene F. CRISPR/Cas9-Mediated Knockin and Knockout in Zebrafish. In: Jaenisch R, Zhang F, Gage F, editors. *Genome Editing in Neurosciences* [Internet]. Cham (CH): Springer; 2017. 2017 Sep 15.
108. Bedell VM1, Wang Y, Campbell JM, Poshusta TL, Starker CG, Krug RG, ve ark. In vivo genome editing using a high-efficiency TALEN system. *Nature*. 2012 Nov;491(7422):114-8.
109. N. Chang, C. Sun, L. Gao, D. Zhu, X. Xu, et al. Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in zebrafish embryos. *Cell Res*. 2013 Apr; 23(4): 465-72.
110. Zhang Y, Huang H, Zhang B, & Lin S. TALEN- and CRISPR-enhanced DNA homologous recombination for gene editing in zebrafish. *Methods Cell Biol*. 2016;135:107-20.
111. Irlon, U., Krauss, J., Nusslein-Volhard, C. Precise and efficient genome editing in zebrafish using the CRISPR/Cas9 system. *Development*. 201;141(24):4827-30.
112. Shin J, Chen J, Solnica-Krezel L. Efficient homologous recombination-mediated genome engineering in zebrafish using TALE nucleases. *Development*. 2014;141(19):3807-18.
113. Zu Y, Tong X, Wang Z, Liu D, Pan R, Li Z, ve ark. TALEN-mediated precise genome modification by homologous recombination in zebrafish. *Nature Methods*. 2013;10(4):329-31.

114. Hoshijima K, Juryneć MJ, Grunwald DJ. Precise Editing of the Zebrafish Genome Made Simple and Efficient. *Dev Cell*. 2016;36:654-67.
115. Wang K, Tang X, Liu Y, Xie Z, Zou X, Li M, Yuan H, Ouyang H, Jiao H, Pang D. Efficient Generation of Orthologous Point Mutations in Pigs via CRISPR-assisted ssODN-mediated Homology-directed Repair. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2016 Nov;5(11):396.
116. Elliott, B., C. Richardson, J. Winderbaum, J. A. Nickoloff, and M. Jasin. Gene conversion tracts from double-strand break repair in mammalian cells. *Mol Cell Biol*. 1998;18:93–101.
117. Findlay GM, Boyle EA, Hause RJ, Klein JC, Shendure J. Saturation editing of genomic regions by multiplex homology-directed repair. *Nature*. 2013;513:120–123.
118. Yang L, Guell M, Byrne S, Yang JL, De Los Angeles A, Mali P, et al. Optimization of scarless human stem cell genome editing. *Nucleic Acids Res*. 2013;41:9049-61.
119. Feng Y, Chen C, Han Y, Chen Z, Lu X, Liang F, Li S, Qin W, Lin S. Expanding CRISPR/Cas9 Genome Editing Capacity in Zebrafish Using SaCas9. *G3 (Bethesda)*. 2016 Aug 9;6(8):2517-21.
120. Moreno-Mateos MA, Vejnar CE, Beaudoin JD, Fernandez JP, Mis EK, Khokha MK, Giraldez AJ. CRISPRscan: designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting in vivo. *Nat Methods*. 2015 Oct;12(10):982-8.
121. Varshney GK, Carrington B, Pei W, Bishop K, Chen Z, Fan C, Xu L, Jones M, LaFave MC, Ledin J, Sood R, Burgess SM. A high-throughput functional genomics workflow based on CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in zebrafish. *Nat Protoc*. 2016 Dec;11(12):2357-75.
122. Richardson CD, Ray GJ, DeWitt MA, Curie GL, Corn JE. Enhancing homology-directed genome editing by catalytically active and inactive CRISPR-Cas9 using asymmetric donor DNA. *Nat Biotechnol*. 2016 Mar;34(3):339-44.
123. Arno G, Agrawal SA, Eblimit A, Bellingham J, Xu M, Wang F, Chakarova C, et al. Mutations in REEP6 Cause Autosomal-Recessive Retinitis Pigmentosa. *Am J Hum Genet*. 2016 Dec;99(6):1305-15.
124. Gagnon JA, Valen E, Thyme SB, Huang P, Akhmetova L, Pauli A, et al. Efficient mutagenesis by Cas9 protein-mediated oligonucleotide insertion and large-scale assessment of single-guide RNAs. *PLoS One*. 2014;9(8):e106396
125. Burger A, Lindsay H, Felker A, Hess C, Anders C, Chiavacci E, et al. Maximizing mutagenesis with solubilized CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Development*. 2016 Jun 1;143(11):2025-37.
126. Kotani H, Taimatsu K, Ohga R, Ota S, Kawahara A. Efficient Multiple Genome Modifications Induced by the crRNAs, tracrRNA and Cas9 Protein Complex in Zebrafish. *PLoS One*. 2015 May 26;10(5):e0128319.
127. Siefert JC, Clowdus EA, Sansam CL. Cell cycle control in the early embryonic development of aquatic animal species. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2015;178: 8-15.

128. Thyme SB, Schier AF. Polq-Mediated End Joining Is Essential for Surviving DNA Double-Strand Breaks during Early Zebrafish Development Cell Rep. 2016 May 17;15(7):1611-3.
129. Haggmann M, Bruggmann R, Xue L, Georgiev O, Schaffner W, Rungger D, Spaniol P, Gerster T. Homologous recombination and DNA-end joining reactions in zygotes and early embryos of zebrafish (*Danio rerio*) and *Drosophila melanogaster*. Biol Chem. 1998 Jun;379(6):673-81.
130. Puzzolo D, Pisani A, Malta C, Santoro G, Meduri A, Abbate F, et al. Structural, ultrastructural, and morphometric study of the zebrafish ocular surface: a model for human corneal diseases? Curr Eye Res. 2018 Feb;43(2):175-85.
131. Han KE, Choi SI, Kim TI, Maeng YS, Stulting RD, Ji YW, Kim EK. Pathogenesis and treatments of TGFBI corneal dystrophies. Prog Retin Eye Res. 2016 Jan;50:67-88.
132. Yin H, Kauffman KJ, Anderson DG. Delivery technologies for genome editing. Nat Rev Drug Discov. 2017 Jun;16(6):387-39.

## 8. EKLER

### EK-1: Tez çalışması ile ilgili etik kurul izni



**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU**

06100 Sıhhiye-Ankara  
Telefon: 0 (312) 305 1090-1082 • Faks: 0 (312) 310 0580  
www.etikkurul.hacettepe.edu.tr/index\_hdk.php

Sayı: B.30.2.HAC.0.05.06.00/

Sayı: 52338575-127

#### HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

**TOPLANTI TARİHİ** : 05.11.2015 (PERŞEMBE)  
**TOPLANTI SAYISI** : 2015/08  
**DOSYA KAYIT NUMARASI** : 2015/76  
**KARAR NUMARASI** : 2015/76 – 1  
**ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ** Prof. Dr. Pervin DİNÇER

**HAYVAN DENEYLERİNDEN SORUMLU ARAŞTIRMACI** Prof.Dr. Pervin DİNÇER, Dr. Fulya Yaylıoğlu  
TUNCAY ve Gülsüm Kayman KÜREKÇİ

**YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR** : -  
**ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI** : Zebra balığı (Danio rerio) 330 embriyo, 40 juvenil,  
100 erişkin

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Pervin DİNÇER'in araştırma yürütücüsü olduğu 2015/76 kayıt numaralı "*TALEN Aracılı TGFBI'de Oluşturulan Varyasyonların Zebra Balığı Korneasındaki Fenotipik etkilerinin İncelenmesi*" isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir.

Sorumlu araştırmacı deneylere başlangıç tarihini Etik Kurula bildirmekle yükümlüdür

Prof. Dr. Sema ÇALIŞ  
Etik Kurul Başkanı



## Genetic analysis of *CHST6* and *TGFBI* in Turkish patients with corneal dystrophies: Five novel variations in *CHST6*

Fulya Yaylacioglu Tuncay,<sup>1,2</sup> Gülüm Kayman Kurekci,<sup>2</sup> Sezen Guntekin Ergun,<sup>3</sup> Ozge Tugce Pasaoglu,<sup>4</sup> Rustu Fikret Akata,<sup>5</sup> Pervin Rukiye Dincer<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Polatlı Duatetepe State Hospital, Ophthalmology Department, Ankara, Turkey; <sup>2</sup>Hacettepe Faculty of Medicine, Medical Biology Department, Ankara, Turkey; <sup>3</sup>Gazi Faculty of Medicine, Medical Genetics Department, Ankara, Turkey; <sup>4</sup>Gazi Faculty of Medicine, Biochemistry Department, Ankara, Turkey; <sup>5</sup>Gazi Faculty of Medicine, Ophthalmology Department, Ankara, Turkey

**Purpose:** To identify pathogenic variations in *carbohydrate sulfotransferase 6 (CHST6)* and *transforming growth factor, beta-induced (TGFBI)* genes in Turkish patients with corneal dystrophy (CD).

**Methods:** In this study, patients with macular corneal dystrophy (MCD; n = 18), granular corneal dystrophy type 1 (GCD1; n = 12), and lattice corneal dystrophy type 1 (LCD1; n = 4), as well as 50 healthy controls, were subjected to clinical and genetic examinations. The level of antigenic keratan sulfate (AgKS) in the serum samples of patients with MCD was determined with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to immunophenotypically subtype the patients as MCD type I and MCD type II. DNA was isolated from venous blood samples from the patients and controls. Variations were analyzed with DNA sequencing in the coding region of *CHST6* in patients with MCD and exons 4 and 12 in *TGFBI* in patients with LCD1 and GCD1. Clinical characteristics and the detected variations were evaluated to determine any existing genotype-phenotype correlations.

**Results:** The previously reported R555W mutation in *TGFBI* was detected in 12 patients with GCD1, and the R124C mutation in *TGFBI* was detected in four patients with LCD1. Serum AgKS levels indicated that 12 patients with MCD were in subgroup I, and five patients with MCD were in subgroup II. No genetic variation was detected in the coding region of *CHST6* for three patients with MCD type II. In other patients with MCD, three previously reported missense variations (c. 1A>T, c.738C>G, and c.631 C>T), three novel missense variations (c.164 T>C, c.526 G>A, c. 610 C>T), and two novel frameshift variations (c.894\_895 insG and c. 462\_463 delGC) were detected. These variations did not exist in the control chromosomes, 1000 Genomes, and dbSNP.

**Conclusions:** This is the first molecular analysis of *TGFBI* and *CHST6* in Turkish patients with different types of CD. We detected previously reported, well-known hot spot mutations in *TGFBI* in the patients with GCD1 and LCD1. Eight likely pathogenic variations in *CHST6*, five of them novel, were reported in patients with MCD, which enlarges the mutational spectrum of MCD.

Corneal dystrophies (CDs) are a group of hereditary disorders that affect one or several layers of the cornea and are usually bilateral, symmetric, and progressive. Affected patients generally suffer from recurrent erosions and/or progressive visual deterioration due to the increasing corneal opacity. Keratoplasty is still the most common treatment method when CD leads to important visual impairment [1]. Although CDs are relatively common in Turkey due to the high rate of consanguinity [2] and are among the most common indications of keratoplasty in Turkey [3], until now no comprehensive study has investigated genotype-phenotype properties of CDs.

During the past decade, important advances have been made in determining the genetic basis of CDs. According to

the updated classification based on this increasing knowledge, CDs are divided into four groups: epithelial and subepithelial dystrophies, epithelial-stromal *transforming growth factor, beta-induced (TGFBI)* (Gene ID: 7045, OMIM 601692) dystrophies, stromal dystrophies, and endothelial dystrophies [4]. The causative genes have been mapped, and the specific mutations are known for several types of CDs [5,6].

The *carbohydrate sulfotransferase-6 (CHST6)* (Gene ID: 4166, OMIM 605294) gene, on chromosome 16q22, encodes enzyme N-acetylglucosamine-6-sulfotransferase (GlcNAc6ST) [5,7]. Mutations in *CHST6* cause the deposition of low or unsulfated keratan sulfate (KS) in the corneal stroma [8] and result in autosomal recessively inherited macular corneal dystrophy (MCD, OMIM 217800). MCD causes bilateral, progressive corneal clouding and irregular corneal opacities [5]. MCD is the most common stromal CD in Iceland where the gene pool is small [9]. MCD is also common in countries such as Saudi Arabia and Turkey due to the high rate of consanguinity [2,10]. There are three

Correspondence to: Fulya Yaylacioglu Tuncay, Hacettepe Faculty of Medicine, Medical Biology Department, Sıhhiye, 06100, Ankara, Turkey; Phone: +90 (312) 305 10 80, +9054132738831 FAX: +90 (312) 310 05 80; email: drfulya83@hotmail.com



## Could autosomal dominant TGFBI-related corneal dystrophies be modelled in zebrafish by using CRISPR/Cas9: Challenges and Possibilities

Yaylıoğlu Tuncay Fulya<sup>1,2\*</sup> and Dinçer Pervin Rukiye<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Medical Biology, Ankara, Turkey

<sup>2</sup>Health Institutes of Turkey, Biotechnology Institute, Ankara, Turkey

\*Corresponding author: Fulya Yaylıoğlu Tuncay, Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Medical Biology, Ankara, Turkey.

Received Date: December 19, 2018  
Published Date: January 16, 2019

### Abstract

TGFBI-related corneal dystrophies are disorders characterized by accumulation of the abnormal protein product of TGFBI gene in the nonamyloid or amyloid form due to missense gain of function mutations of this gene. TGFBI gene exists in the zebrafish genome without duplication and has 65% homology to its human orthologue. Arginine residue on the 124<sup>th</sup> position of the protein product of this gene was conserved in zebrafish. According to these data; in this study we tried to knock-in one of the gains of function mutations in the region coding 124<sup>th</sup> aminoacid residue of TGFBI gene in the zebrafish genome by using CRISPR/Cas9-mediated homology dependent repair method that resulted in many challenges in zebrafish. Finally, we could not achieve knock-in of the precise mutation in the target sequence despite using several possibilities regarding CRISPR/Cas9 technique, but we could achieve in/del variations at the target sequence that could mimic the pathogenesis if the variation results in inframe change affecting the target arginine residue.

**Keywords:** CRISPR/Cas9; TGFBI; Knockin; Zebrafish; Corneal dystrophy; Genome editing

### Introduction

TGFBI-related corneal stromal dystrophies are a group of hereditary corneal diseases caused by the mutations of the TGFBI gene [1]. Reis-Bücklers corneal dystrophy (RBCD), Thiel-Behnke corneal dystrophy (TBCD) are included in this group and mainly affect the Bowman layer of the cornea. Granular corneal dystrophy type I (GCD1), granular corneal dystrophy type II (GCD2), lattice corneal dystrophy type I (LCD1) and variant lattice dystrophies are also included in this group, but they mainly affect the stromal layer of the cornea. TGFBI gene is located on chromosome 5q31 and has 17 exons [2]. The protein product of this gene is keratopithelin (TGFBIp) which is an extracellular matrix protein that is found in many tissues, but mutations in this gene cause production of abnormal protein causing progressive deposits detected only in the cornea [3]. Although several mutations from different countries were reported in this gene, there are two mutational hot spots, corresponding to arginine residues at positions 124 and 555 located in exons 4 and 12 of TGFBI, respectively [4,5]. Five genotype-phenotype correlations were mainly reported in these

two hot spots: R124C in LCD1, R124H in ACD, R124L in RBCD, R555Q in TBCD and R555W in GCD1 [4]. The exact underlying mechanisms causing these different phenotypes has not been revealed yet. Additionally, there are no animal models showing the similar phenotypical properties as seen in patients [6].

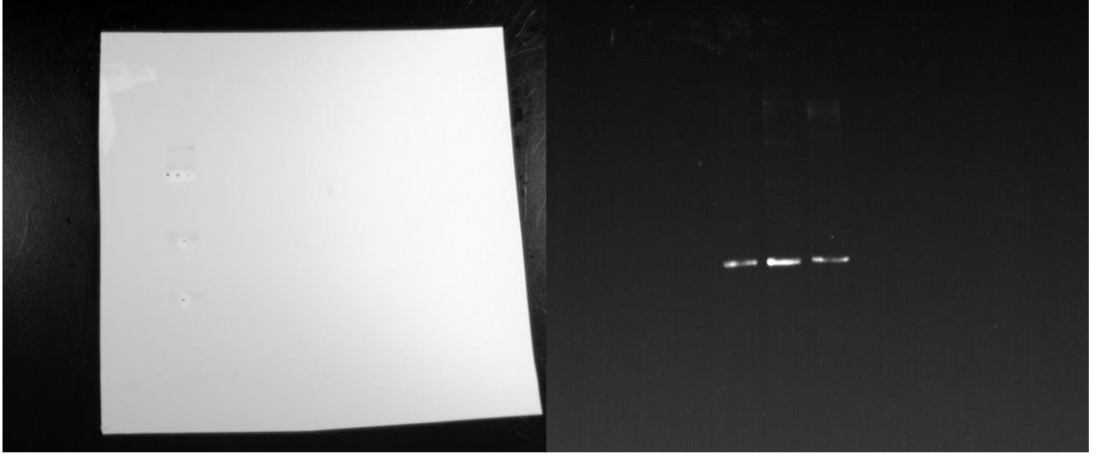
Zebrafish may be used as an animal model for this group of disorders because the structure and the content of the human and zebrafish cornea are very similar [7,8]. TGFBI gene exist in the zebrafish genome without duplication and has 65% homology to its human orthologue, arginine residue on the 124<sup>th</sup> position of the protein product of this gene was conserved in zebrafish and the corneal expression of TGFBI was shown from the 24<sup>th</sup> hour postfertilization in zebrafish [9]. Additionally, the genome editing methods, especially CRISPR/Cas9 system can be efficiently and easily used in zebrafish to mimic genetic diseases.

The latest discovered genome-editing platform is the CRISPR (Clustered regularly interspaced short palindromic repeat) and it is associated with Cas9 protein. The two components of this system

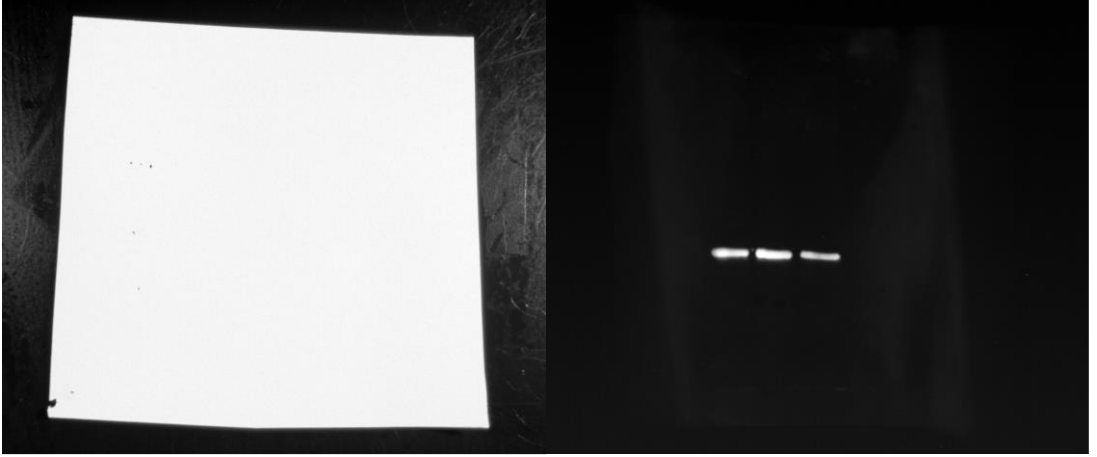


**EK-3:** Western blot görüntüleri: A. TGFBIp, B. Beta-aktin

A



B



## EK-4: Dijital makbuz



### Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Fulya Tuncay  
Ödev başlığı: Revision 1  
Gönderi Başlığı: tez  
Dosya adı: turnitin tez 2.docx  
Dosya boyutu: 163.63K  
Sayfa sayısı: 98  
Kelime sayısı: 23,603  
Karakter sayısı: 161,918  
Gönderim Tarihi: 02-Eyl-2019 04:27PM (UTC+0300)  
Gönderim Numarası: 1166240314



## EK-5: Orjinallik Ekran Çıktısı

tez

### ORIJINALLIK RAPORU

% <b>4</b>	% <b>3</b>	% <b>1</b>	% <b>2</b>
BENZERLIK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

### BİRİNCİL KAYNAKLAR

<b>1</b>	<a href="http://www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080">www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080</a> İnternet Kaynağı	% <b>2</b>
<b>2</b>	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	% <b>1</b>
<b>3</b>	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	<% <b>1</b>
<b>4</b>	<a href="http://semspub.epa.gov">semspub.epa.gov</a> İnternet Kaynağı <a href="http://semspub.epa.gov">http://semspub.epa.gov</a>	<% <b>1</b>
<b>5</b>	<a href="http://tbgder.org">tbgder.org</a> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>6</b>	<a href="http://lib.dr.iastate.edu">lib.dr.iastate.edu</a> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>7</b>	Submitted to Ondokuz Mayıs Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<% <b>1</b>
<b>8</b>	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<% <b>1</b>

## 9. ÖZGEÇMİŞ

Adres: Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Sıhhiye,  
Ankara

Telefon: 0312 305 25 41

E-mail: [drfulyatuncay@gmail.com](mailto:drfulyatuncay@gmail.com)

### 1. KİŞİSEL BİLGİLER

Doğum Tarihi : 29.05.1983  
Uyruğu : T.C.  
Medeni Hali : Evli  
Yabancı Dil : İngilizce, İtalyanca

### 2. İŞ

2019- Göz Hastalıkları Uzmanı,  
Polatlı Duatepe Devlet Hastanesi,  
Ankara, Türkiye

2017-2019 Araştırmacı,  
Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı,  
Ankara, Türkiye

2016-2017 Göz Hastalıkları Uzmanı,  
Özel Kudret Göz Hastanesi  
Ankara, Türkiye

2015-2016 Göz Hastalıkları Uzmanı,  
Turgut Özal Tıp Fakültesi,  
Ankara, Türkiye

2013-2015 Göz Hastalıkları Uzmanı,  
Sarıkaya Devlet Hastanesi,  
Yozgat, Türkiye

2007–2013 Araştırma görevlisi,  
Gazi Üniversitesi, Göz Hastalıkları ABD,  
Ankara, Türkiye

## EĞİTİM

- 2013–  
Doktora (Ph.D.)  
*Tez Başlığı: TGFBI geninde talen tekniği ile oluşturulan varyasyonların zebra balığı korneasındaki fenotipik etkilerinin incelenmesi*  
Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı  
Hacettepe Üniversitesi, Ankara
- 2007–2014  
Uzmanlık  
*Tez Başlığı: Türk populasyonunda psödoeksfolyasyonda LOXL1 polimorfizmlerinin ve Apolipoprotein E genotiplerinin araştırılması*  
Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı  
Gazi Üniversitesi, Ankara
- 2001–2007  
Lisans (B.Sc.)  
Tıp Fakültesi, İngilizce Bölümü  
Hacettepe Üniversitesi, Ankara
- 1994–2001  
Gazi Anadolu Lisesi, Ankara

### 3. YURTDIŐI EĞİTİM VE GÖREVLENDİRMELELER

- 01.03-22.06/2018 Yale University School of Medicine, Department of Ophthalmology, New Haven, Amerika (Gözlemci sıfatı ile Prof. Dr. Ron Adelman danışmanlığında)
- 10/2017-06/2018 Yale University School of Medicine, Department of Genetics, New Haven, Amerika (Fulbright tez araştırma bursu kapsamında, ziyaretçi doktora öğrencisi)
- 01.09-29.09/2017 Second International Summit in Human Genetics and Genomics in National Institutes of Health, Bethesda, Amerika (NIH bursu, kursiyer sıfatı ile katılım)
- 05/2012-08/2012 Second University of Naples, Kalıtsal Retinopati Kliniği, İtalya (ERASMUS Programı kapsamında gözlemci sıfatı ile Prof. Dr. Francesca Simonelli danışmanlığında)
- 10/2006-01/2007 Siena Tıp Fakóltesi, İtalya (ERASMUS Programı kapsamında intern sıfatı ile Pediatri ve Dahiliye ABD'da staj)



#### 4. STAJ, KURS, SEMİNER VE SERTİFİKALAR

Türk Oftalmoloji Derneği Ulusal Kongresi (2008-2016)

Mediretina Meeting IV, İstanbul, Haziran 2010

IV. International Congress of Molecular Medicine, İstanbul, Haziran 2011

XII. Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Antalya, Ekim 2011

World Glaucoma Congress, Vancouver, 2013 (Burslu)

12.Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu, 10-20 Aralık 2010

İstanbul Üniversitesi Hücre Kültürü ve Nükleik Asit Araştırmaları Kursu, 13-17 Mayıs  
2013

ESHG Course-Clinical Genomics and NGS, Bertinero, İtalya, 30 Nisan- 6 Mayıs 2017

European Human Genetics Conference, Copenhagen, Danimarka, 27-30 Mayıs 2017

6th Sardinian Summer School 'From GWAS to function, Pula, İtalya, 12 – 16 Haziran  
2017 (Burslu)

Qatar International Zebrafish Conference and Workshop, Doha, Katar, 13-17  
Nisan,2019 (Konuşmacı)

## 5. BURSLAR VE ÖDÜLLER

Mayıs 2019: Fellow of European Board of Ophthalmology

Nisan 2019: International Council of Ophthalmology, Visual Sciences and Optics-  
Refraction Examinations

2017-2018: Fulbright Doktora Tezi Araştırma Bursu

01/09/2017-29/09/2017: Second International Summit in Human Genetics and  
Genomics in National Institutes of Health, Bethesda, Amerika, NIH Kursu Katılım  
Bursu

12-16/06/2017: 6th Sardinian Summer School 'From GWAS to function, Pula,  
İtalya, IRGB Kongre katılım bursu

17-20/07/2013: 5th World Glaucoma Congress, Vancouver, WGA Kongre katılım  
bursu

09/2007: Tıpta Uzmanlık Sınavı, Klinik Bilimler Alanında Birincilik

06/2007: Hacettepe Tıp Fakültesi'nden İngilizce Tıp Bölüm Birinciliği ve Fakülte  
İkinciliği ile Mezuniyet

06/2001: Öğrenci seçme ve yerleştirme sınavı, Eşit Ağırlık Alanı'nda 16.'lık

06/2001-: Gazi Anadolu Lisesi, Birincilik ile Mezuniyet

2000: TÜBİTAK Ulusal Kimya Olimpiyatı'nda Bronz Madalya

## 6. ÜYELİKLER VE YÜRÜTTÜĞÜ FAALİYETLER

Türk Oftalmoloji Derneği (2007-)

Asian Eye Genetics Consortium (2017-)

Fulbright Mezunları Derneği (2019-)

## 7. GÖREV ALDIĞI PROJELER

Türk populasyonunda psödoeksfolyasyonda LOXL1 polimorfizmlerinin ve Apolipoprotein E genotiplerinin araştırılması (GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ BAP: 01-2011/96) Bursiyer

Korneal stromal distrofi tanısı almış hastalarda genetik varyasyonların araştırılması (TÜBİTAK-114S126) Bursiyer

Nadir Hastalıklara Özgün CRISPR-Cas9 Platformlarının Zebra Balığında Oluşturulması ve Sürdürülebilirliğinin Sağlanması (HACETTEPE TIP FAKÜLTESİ BAP-Araştırma alt yapı projesi: TAY-201712735) Yardımcı Araştırmacı

Graves hastalarında FoxP3 gen polimorfizmi oftalmopati gelişiminde bir risk faktörü mü? (GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ BAP başvuru aşamasında) Yardımcı Araştırmacı

## 8. YAYINLAR

### A. Uluslararası Hakemli Dergiler

**A.1. Yaylacioglu Tuncay F**, Dincer PR. Could autosomal dominant TGFBI-related corneal dystrophies be modelled in zebrafish by using CRISPR/Cas9: Challenges and Possibilities. *W J Ophthalmol & Vision Res.* 1(3): 2019. WJOVR.MS.ID.000513.

**A.2.** Yildiz BK, Aktas Z, Yuksel N, Ozdemir HB, Cingirt M, Gulbahar O, **Tuncay FY**, Hasanreisoglu M. Evaluation of renin and angiotensin II levels in pseudoexfoliation syndrome. *Arq Bras Oftalmol.* 2018 Sep 13. pii: S0004-27492018005001105. doi: 10.5935/0004-2749.20180092.

**A.3.** Yaylacioglu Tuncay F, Kayman Kurekci G, Guntekin Ergun S, Pasaoglu OT, Akata RF, Dincer PR. Genetic analysis of CHST6 and TGFBI in Turkish patients with corneal dystrophies: Five novel variations in CHST6. *Mol Vis.* 2016 Oct 26;22: 1267-1279.

**A.4.** Yazıcı H, Gürelik G, **Tuncay FY**, Göçün PU. Ciliary tissue transplantation in the rabbit eye: Does the localization of the graft affect survival? *Ophthalmic Res.* 2016 Jul 8.

**A.5.** Yıldız BK, Ozdek Ş, Ergün MA, Ergun SG, **Tuncay FY**, Elbeğ Ş, Hasanreisoglu B. CFH Y402H, VEGF polymorphisms and ANTI VEGF treatment response in exudative age related macular degeneration. *Ophthalmic Res.* 2016;56(3):132-8.

**A.6. Yaylacioglu Tuncay F**, Aktas Z, Guntekin S, Ergun MA, Hasanreisoglu M, Hasanreisoglu B. Association of polymorphisms in APOE and LOXL1 with Pseudoexfoliation Syndrome and Pseudoexfoliation Glaucoma in Turkish Population. *Ophthalmic Genet.* 2016 Mar 30:1-3.

**A.7.** Rossi S, Testa F, Li A, **Yaylacioğlu F**, Gesualdo C, Hetjmancik JF, Simonelli F. Clinical and genetic features in Italian Bietti crystalline dystrophy patients. *Br J Ophthalmol.* 2013 Feb;97(2):174-9

### B. Ulusal Hakemli Dergiler

**B.1. Yaylacioglu Tuncay F**, Dincer PR. Genome Editing Technologies: From Bench Side to Bedside. *Acta Medica* 2018; 49(3): 30 – 40.

**B.2.** Aktaş Z, **Yaylacioğlu F.** Avşin Özdemir F, Hasanreisöğlu M, Bölük SO, Kavaklı S. Glokomatöz ve Non-Glokomatöz Olgularda RTVue 100 ile Ölçülen Gangliyon Hücre Kompleksi ve Retina Sinir Lifi Tabakası Kalınlıklarının Karşılaştırılması. MN Oftalmol 2014; 21: 179-184

**B.3.** Ozdek S, Sekeryapan B, **Yaylacioglu F.** Passive Silicone Oil Removal with 23-Gauge Transconjunctival System. Ret-Vit 2013; 21: 105-108.

**B.4.** **Yaylacioğlu F,** Hasanreisöğlu M, Aktaş Z, Korkmaz Ş, Ozdek Ş. Protein-C Eksikliği ile İlişkili Bilateral Lökokori. MN Oftalmoloji 2014; 21:71-73.

**B.5.** Konuk O, **Yaylacioglu F.** Pediatrik Endoskopik Dakriyosistorinostomi: Erken Dönem Sonuçlarımız. MN Oftalmoloji 2011; 18-2: 116-121.

**B.6.** **Yaylacioğlu F,** Gürelik G. Santral Seröz Koryoretinopati. Retina-Vitreus Dergisi, 2010; 18-2: 85-111.