T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GRANÜLER KORNEA DİSTROFİSİ TİP 1 HASTALARININ PERİFERAL KAN MONONÜKLEER HÜCRELERİNDE *TGFBI* GENİNDEKİ R555W MUTASYONUNUN CRISPR/Cas9 TEKNOLOJİSİ İLE DÜZENLENMESİ

Burak DAĞDELEN

DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Hilal ARIKOĞLU

KONYA-2024

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GRANÜLER KORNEA DİSTROFİSİ TİP 1 HASTALARININ PERİFERAL KAN MONONÜKLEER HÜCRELERİNDE *TGFBI* GENİNDEKİ R555W MUTASYONUNUN CRISPR/Cas9 TEKNOLOJİSİ İLE DÜZENLENMESİ

Burak DAĞDELEN

DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Hilal ARIKOĞLU

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü Tarafından 19102037 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2024

ÖNSÖZ

Doktora tezi olarak sunulan bu çalışma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü Tarafından 19102037 proje numarası kapsamında alınan destek ile Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Bölümünde Sayın Prof. Dr. Hilal ARIKOĞLU yöneticiliğinde hazırlanmıştır.

Özellikle tez konusu seçiminde genom düzenleme teknolojisi alanında çalışma isteğimi destekleyen, çalışmalarımda bilgi, birikim ve deneyimleriyle beni aydınlatan, ilgi ve desteklerini sakınmayan çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Hilal ARIKOĞLU'na,

Tez çalışmam boyunca ufkumu genişleterek beni cesaretlendiren kıymetli hocalarım Doç. Dr. Nadir KOÇAK ve Doç. Dr. Dudu ERKOÇ KAYA'ya,

Tez çalışmam için gereken klinik desteği sağlayan Prof. Dr. Banu BOZKURT'a,

Çalışmalarımın deneysel aşamalarında destekleri ile yanımda olan Şeyma Hazal ÇETİN, Batuhan ŞANLITÜRK, Muhammet Emin SARI, Gönül AKMEŞE ve Okan MÜLAZIMOĞLU'na,

Doktora eğitim süreci boyunca manevi desteklerini esirgemeyen kıymetli hocalarım Prof. Dr. Ahmet AK ve Prof. Dr. Fikret KANAT'a,

Ayrıca bugüne gelmemde en büyük paya sahip ve en değerli varlıklarım; sevgili eşim Merve DAĞDELEN, abim Fatih Emin DAĞDELEN, annem Yaşar DAĞDELEN ve babam İsmail DAĞDELEN'e en içten duygularla teşekkür ederim.

Burak DAĞDELEN

Kasım / 2024

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ **3**
SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **v**
ÖZET ..... **ix**
SUMMARY ..... **x**
1. GİRİŞ **1**
1.1. DNA Zincir Kırıkları 3
1.2. DNA Çift Zincir Kırığı Onarım Mekanizmaları 4
1.2.1. Homolog Olmayan Uç Birleştirme (NHEJ) Onarım Mekanizması 4
1.2.2. Mikrohomoloji Aracılı Uç Birleştirme (MMEJ) Onarım Mekanizması 5
1.2.3. Homolog Rekombinasyon (HR) Onarım Mekanizması 7
1.3. Genom Düzenleme Teknolojisi 9
1.3.1. Meganükleazlar (MgN) 10
1.3.2. Çinko Parmak Nükleazlar (ZFN) 11
1.3.3. Transkripsiyon Aktivatörü Benzeri Efektör Nükleazlar 12
1.3.4. Düzenli Aralıklarla Bölünmüş Kısa Palindromik Tekrarlar/CRISPR-İlişkili Nükleaz-9 (CRISPR/Cas9) 13
1.4. Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta ile İndüklenen Gen ve Protein 19
1.5. Kornea 23
1.6. Kornea Distrofileri 25
1.6.1. *TGFBI* Geni ile İlişkili Kornea Distrofileri 26
1.6.2. Granüler Kornea Distrofisi Tip 1 27
1.7. Kornea Distrofilerinin Tedavisi 28
2. GEREÇ ve YÖNTEM **30**
2.1. Gereç 30
2.1.1. Ekipmanlar 30
2.1.2. Kimyasallar ve Sarf Malzemeler 31
2.2. Yöntem 33
2.2.1. Hasta Bireyin Çalışmaya Dahil Edilmesi 33
2.2.2. CRISPR/Cas9 Yapılarının Oluşturulması 37
2.2.3. Tek Zincirli Oligonükleotid Donör Dizilerin Tasarımı 54
2.2.4. Periferal Kan Mononükleer Hücre İzolasyonu 56
2.2.5. Transfeksiyon 57
2.2.6. PBMC Kültürü ve Seçilim 59
2.2.7. Genom Düzenleme Analizi 60

2.2.8. Deney Sonuçlarının İstatiksel Değerlendirilmesi 63
3. BULGULAR 64
3.1. *TGFBI* Geni Ekzon 12 Bölgesinin Dizi Analiz Bulguları 64
3.2. CRISPR/Cas9 Yapılarının Analiz Bulguları 64
3.2.1. Plazmidlerin Saflık ve Konsantrasyon Tayini Bulguları 64
3.2.2. BbsI Restriksiyon Enzim Kesim Ürünü Plazmidlerin Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi ile Analiz Bulguları 65
3.2.3. BbsI Restriksiyon Enzim Kesim Ürünü Plazmidlerin Transformasyon ile Analiz Bulguları 66
3.2.4. Transformasyon Bulguları 67
3.2.5. Rekombinant Plazmidlerin PCR Dizi Analizi Bulguları 69
3.3. Hücresel Bulgular 73
3.3.1. GFP+ PBMC'lerin Floresan Mikroskop ile İncelenme Bulguları 73
3.3.2. PBMC'lerin İnvert Mikroskop ile İncelenme Bulguları 74
3.3.3. Flow (Akış) Sitometri Bulguları 76
3.4. Genom Düzenleme Bulguları 84
3.4.1. Erime Eğrisi Analiz Bulguları 84
3.4.2. T7 Endonükleaz I Analiz Bulguları 86
3.5. İstatiksel Bulgular 87
4. TARTIŞMA 88
5. SONUÇ ve ÖNERİLER 109
6. KAYNAKÇA 110
7. EKLER 123
EK-A Etik Kurul Kararı 123
EK-B Tez Başlığı Değiştirme Etik Kurul Kararı 125
EK-C Turnitin Raporu 127
EK-D Gönüllü Onam Formu 127
EK-E Tezden Üretilmiş Sözlü Sunum 131
8. ÖZGEÇMİŞ 132

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
bç	Baz çifti
cm	Santimetre
CO_2	Karbondioksit
dk	Dakika
g	Gravite
gr	Gram
kb	Kilobaz
kDa	Kilodalton
l	Litre
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
nt	Nükleotid
^{o}C	Santigrat derece
OD	Optik dansite
pmol	Pikomol
rpm	Dakikadaki devir sayısı
sn	Saniye
T	Timin
Tm	Erime sıcaklığı
U	Enzim ünitesi
UV	Ultraviole
V	Volt
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar

AAV	Adeno-ilişkili virüsler
AFLP	Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi
AmpR	Ampisilin antibiyotik direnci
Arg	Arginin
BCD	Bietti kristalin korneoretinal distrofi
CAR	Kimerik antijen reseptörü
Cas	CRISPR ilişkili protein
CF	Kistik fibröz
CHED	Konjenital kalıtsal endotelyal distrofi
CMV	Sitomegalovirüs
CRISPR	Düzenli aralıklarla bölünmüş kısa palindromik tekrar dizileri
crRNA	CRISPR RNA
CSS	Coffin-Siris sendromu
DALK	Derin anterior lamellar keratoplasti
DMEK	Desme membran endotelyal keratoplastisi
DSAEK	Desme soymalı otomatize endotelyal keratoplasti
DSB	Çift zincir kırığı
dsODN	Çift zincirli oligonükleotid
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
eSpCas9	Cas9 endonükleaz kodlama bölgesi
FAS	İnternal tekrar bölgesi
FDA	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi
FECD	Fuchs endotelyal korneal distrofi
GCD1	Granüler kornea distrofisi tip 1
GCD2	Granüler kornea distrofisi tip 2
GFP	Yeşil floresan protein
HB	Hemofili B
HBSS	Hank'ın dengeli tuz solüsyonu
HDR	Homoloji yönlendirilmiş onarım
hESC	İnsan embriyonik kök hücreler
HIV	İnsan bağışıklık yetmezliği virüsü
HR	Homolog rekombinasyon
IC3D	Uluslararası Kornea Distrofilerinin Sınıflandırılması Komitesi

IR	İyonize radyasyon
İndel	İnsersiyon/delesyon
İPSC	İndüklenmiş pluripotent kök hücreler
KE	Keratoepitelin
LCA	Leber konjenital amorozisi
LCD1	Latis kornea distrofisi tip 1
LESC	Limbal epitel kök hücreler
LESC	Limbal epitelyal kök hücre
LET	Lineer enerji transferi
LHON	Leber'in kalıtsal optik nöropatisi
LSCD	Limbal kök hücre eksikliği
MCD	Maküler kornea distrofisi
MECD	Meesmann epitelyal kornea distrofisi
MgN	Meganükleaz
miRNA	MikroRNA
MMEJ	Mikrohomoloji aracılı uç birleştirme
MRN	MRE11-RAD50-NBS1
NGS	Yeni nesil sekanslama
NHEJ	Homolog olmayan uç birleştirme
NLS	Nükleer lokalizasyon sinyali
PAM	Protoaralık bitişik motif
PARP1	Poli ADP-riboz polimeraz 1
PBMC	Periferal kan mononükleer hücre
PBS	Fosfat tamponlu tuz
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PHA	Fitohemaglutinin
PK	Penetran keratoplasti
PTK	Fototerapötik keratektomi
PuroR	Ampisilin antibiyotik direnci
R124C	Arginin 124 sistein değişimi
R124H	Arginin 124 histidin değişimi
R124L	Arginin 124 lösin değişimi
R555Q	Arginin 555 glutamin değişimi
R555W	Arginin 555 triptofan değişimi

RAK	Rotasyonel otokeratoplasti
RBCD	Reis Buckler kornea distrofisi
RGD	Arginin- glisin-aspartat
RNP	Ribonükleoprotein
ROS	Reaktif oksijen türü
RP	Retinitis Pigmentosa
RPA	Replikasyon proteini A
rSAP	Alkalin fosfataz
RVD	Tekrar değişken bölgeleri
SCD	Orak hücre hastalığı
sgRNA	Tek rehber RNA
shRNA	Kısa saç tokası RNA
siRNA	Küçük engelleyici RNA
SMRT	Tek molekül gerçek zamanlı dizileme
SP	Sinyal peptit dizisi
SRSS	Kısa düzenli aralıklı tekrarlar
SSB	Tek zincir kırığı
ssODN	Tek zincirli oligonükleotid
T4PNK	T4 polinükleotid kinaz
T7E1	T7 endonükleaz I
TAE	Tris-Asetat-EDTA
TALEN	Transkripsiyon aktivatörü benzeri efektör nükleaz
TBCD	Thiel-Beknke kornea distrofisi
TBS	Tripan mavi solüsyonu
TE Buffer	Tris-EDTA Buffer
TGFBI	Transforme edici büyüme faktörü beta ile indüklenen gen
TGFBIp	Transforme edici büyüme faktörü beta ile indüklenen protein
TracrRNA	Trans aktive edici protein
Trp	Triptofan
US	Usher sendromu
XLRS	X'e bağlı retinoskizis
ZFN	Çinko parmak nükleaz
ZFP	Çinko parmak protein

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GRANÜLER KORNEA DİSTROFİSİ TİP 1 HASTALARININ PERİFERAL KAN MONONÜKLEER HÜCRELERİNDE *TGFBI* GENİNDEKİ R555W MUTASYONUNUN CRISPR/Cas9 TEKNOLOJİSİ İLE DÜZENLENMESİ

Burak DAĞDELEN

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ/ KONYA- 2024

Transforme edici büyüme faktörü beta ile indüklenen gen (*TGFBI*) 683 aminoasit rezidüsünden oluşan bir hücre dışı matriks elemanı olan transforme edici büyüme faktörü beta ile indüklenen proteini (TGFBIp) kodlamaktadır. TGFBIp, farklı tip kolajen ve integrinlerle birlikte korneanın yapısal bütünlüğü ve şeffaflığının korunmasında görev almaktadır. *TGFBI* genindeki mutasyonlar, yüzeysel korneada bulanık agregatlar birikmesi sonucu görme bozukluğu oluşan bir dizi kornea distrofisi ile ilişkilendirilmiştir. Patogenezi tam olarak bilinmeyen kornea distrofilerinde, *TGFBI* genindeki mutasyonların protein salgılanmasını veya katlanmasını bozabileceği ve korneada artan stabiliteye sahip mutant TGFBIp agregatlarının birikimi ile sonuçlanabileceği düşünülmektedir. *TGFBI* geninde bugüne kadar 70'den fazla farklı mutasyon tanımlanmıştır. Bu mutasyonlardan R555W sıcak nokta mutasyonu granüler kornea distrofisi (GCD) tip 1 ile ilişkilendirilmiştir. Kornea distrofilerinin tedavisinde uygulanan mevcut yaklaşımlar agregatların oluşmasını yavaşlatmak, durdurmak ya da yok olmasını sağlamak bakımından yetersiz kalmaktadır. Bu yüzden kalıcı çözümlerin arandığı genetik temelli araştırmalar gün geçtikçe önem kazanmaktadır. Çalışmamızda GCD Tip 1 tanısı almış ve R555W mutasyonuna sahip olduğu PCR-dizi analizi ile belirlenmiş hasta bireylerden elde edilen periferal kan mononükleer hücreler (PBMC)'de, CRISPR/Cas9 genom düzenleme tekniği ile R555W mutasyonun düzenlenmesi amaçlandı. Bu amaçla, *TGFBI* geni R555W mutasyonun düzenlenmesine yönelik üç farklı rehber RNA (sgRNA) ve üç farklı tek zincirli oligonükleotid (ssODN) donör dizileri https://www.benchling.com/ adresi üzerinden ulaşılabilen online uygulaması kullanılarak tasarlandı ve ticari olarak temin edildi. Çalışmamızda CRISPR/Cas9 bileşenleri, pX459V2.0-eSpCas9(1.1) ve pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid vektörleri ile oluşturuldu. sgRNA oligolarının plazmid vektörlerine ligasyonu AT klonlama metodu ile gerçekleştirilerek, DH5alpha (*E.coli*) kimyasal kompotent bakterilerine transforme edildi. Ligasyon işlemleri PCR-dizi analiz yöntemi ile doğrulandı. Dizi analizi sonuçlarına göre, başarılı bir şekilde klonlanan plazmid vektörler ve ssODN'ler, GCD1 hastalarından elde edilen PBMC'lere elektroporasyon yoluyla transfekte edildi. pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA ve ssODN oligolarının transfekte edildiği GFP+ hücreler, GFP+ sinyal vermeyen hücrelerden FACS cihazı ile ayıklandı. GFP+ sinyal veren hücrelerden elde edilen DNA'lar ile R555W mutasyon bölgesini amplifiye edecek primerler kullanılarak erime eğrisi analizi yapıldı. Yapılan kantitatif analizler sonucunda, pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA1 plazmid ve ssODN1 şablonun birlikte transfekte edildiği hücre grubunda ~%5,64 oranında, pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA2 plazmid ve ssODN2 şablonun birlikte transfekte edildiği hücre grubunda ~%15,77 oranında, pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA3 plazmid ve ssODN3 şablonun birlikte transfekte edildiği hücre grubunda ~%20,78 oranında değişim saptandı. Bu tez çalışması, GCD1 hastalarından elde edilen primer hücrelerde R555W mutasyonun CRISPR/Cas9 sistemi ile düzenlenmesini içeren literatürdeki ilk çalışma olup elde edilen sonuçlar ile ileride yapılacak *in vitro* ve *in vivo* çalışmalara zemin hazırlanmıştır. Bu zeminden temel alarak yapılacak daha kapsamlı çalışmalar ile kornea distrofilerinin tedavilerinde umut vadeden bir yaklaşım olan CRISPR/Cas9 tabanlı gen tedavi stratejilerinin geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: *TGFBI* geni, CRISPR/Cas9, genom düzenleme

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

EDITING OF THE R555W MUTATION IN *TGFBI* GENE IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS OF GRANULAR CORNEAL DYSTROPHY TYPE 1 PATIENTS USING CRISPR/Cas9 TECHNOLOGY

Burak DAĞDELEN

Department of Medical Biology

PhD THESIS / KONYA-2024

The transforming growth factor beta-induced (*TGFBI*) gene encodes the transforming growth factor beta-induced protein (TGFBIp), which is an extracellular matrix element, consisting of 683 amino acid residues. TGFBIp, together with different types of collagen and integrins, is involved in maintaining the structural integrity and transparency of the cornea. Mutations in the *TGFBI* gene have been associated with a number of corneal dystrophies in which vision impairment occurs as a result of the accumulation of cloudy aggregates in the superficial cornea. In corneal dystrophies of fully unknown pathogenesis, it is thought that mutations in the *TGFBI* gene may disrupt protein secretion or folding that may result in the accumulation of mutant TGFBIp aggregates with increased stability in the cornea. To date, more than 70 different mutations have been identified in the *TGFBI* gene. Among these mutations, the R555W hotspot mutation has been associated with granular corneal dystrophy (GCD) type 1. Current approaches used to treat corneal dystrophies are insufficient to slow down, stop or eliminate the formation of aggregates. Therefore, genetic-based research seeking permanent solutions is gaining importance day by day. In our study, it is aimed to edit R555W mutation by using CRISPR/Cas9 technique in peripheral blood mononuclear cells obtained from patients with GCD Type 1 and having R555W mutation determined by PCR-sequence analysis. For this purpose, three different guide RNA (sgRNA) and three different single-stranded oligonucleotide (ssODN) donor sequences were designed using the online application accessible at https://www.benchling.com/ and commercially obtained for editing R555W mutation in *TGFBI* gene. In our study, CRISPR/Cas9 components were constructed with the plasmid vectors pX459V2.0-eSpCas9(1.1) and pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA. Ligation of sgRNA oligos to plasmid vectors was performed using the AT cloning method and transformed into DH5alpha (*E. coli*) chemically competent bacteria. Ligation results were confirmed by PCR-seq analysis method. According to the results of sequence analysis, successfully cloned plasmid vectors and ssODNs were transfected into PBMCs obtained from GCD1 patients by electroporation. GFP+ cells transfected with pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA and ssODN oligos were seperated from GFP+ non-signaling cells by FACS sorting. Melting curve analysis was performed using primers to amplify the R555W mutation site using DNAs obtained from GFP+ signaling cells. As a result of quantitative analyses, ~5.64% change was detected in the cell group co-transfected with pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA1 plasmid and ssODN1 template, ~15.77% change was detected in the cell group co-transfected with pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA2 plasmid and ssODN2 template, and ~20.78% change was detected in the cell group co-transfected with pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA3 plasmid and ssODN3 template. This thesis is the first study in the literature involving the editing of the R555W mutation in primary cells obtained from GCD1 patients with the CRISPR/Cas9 system and the results obtained in the study have prepared a groundwork for future *in vitro* and *in vivo* studies. More comprehensive studies based on this groundwork are needed to develop CRISPR/Cas9 based gene therapy strategies which is a promising approach in the treatment of corneal dystrophies.

Keywords: *TGFBI* gene, CRISPR/Cas9, genome editing

1. GİRİŞ

Genetik değişiklikler ve hastalıklar arasındaki ilişki yıllardır bilinmesine rağmen, bazı hastalık fenotiplerinin oluşmasına neden olan mutasyonlar genom üzerinde yapılacak değişiklikler ile giderilebilir. Genom düzenleme teknolojisi; kalıtsal, bulaşıcı ve neoplastik hastalıklar için yeni bir tedavi yöntemi olarak ortaya çıkmıştır. Genom düzenleme teknolojisine dayalı gen tedavi yaklaşımlarında, yabancı terapötik DNA'nın bir hastanın hücrelerine aktarılmasıyla kalıcı genetik nedenlerin sürekli olarak ele alınması amaçlamaktadır. Güvenli ve verimli yeni genom düzenleme araçlarının geliştirilmesi tedavi amaçlı kliniğe ulaşan gen tedavi uygulamalarının hız kazanmasını sağlamıştır. Özellikle bakteri savunma mekanizmasının önemli bir parçası olduğu anlaşılan düzenli aralıklarla bölünmüş kısa palindromik tekrarlar (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats; CRISPR)/CRISPR-ilişkili nükleaz-9 (CRISPR associated protein 9; Cas9) mekanizması ve bu doğal mekanizmanın genom düzenleme teknolojisi olarak kullanılabilme potansiyelinin ortaya konulması ile genom düzenleme alanında çığır açılmıştır. Ökaryotik hücrelerin çift zincir kırığı onarım mekanizmasını indükleyerek genom modifikasyonu sağlayabilen CRISPR/Cas9 teknolojisi ile etkin bir şekilde mutasyon düzeltilmesi gerçekleştirilebilmektedir.

Retinal gen terapisindeki gelişmeler genom düzenleme çalışmalarına öncülük etmiştir ve retina hastalıkları için devam eden birçok klinik çalışma bulunmaktadır. Bununla birlikte göz hastalıklarının tedavisine yönelik gen tedavilerin çoğunun deneysel olması, insanlar üzerinde yapılan klinik çalışmaların önemli bir kısmının hala araştırma aşamasında olması sınırlayıcı gözükse de çalışmaların cesaretlendirici sonuçlar vermesi gözü genom düzenleme çalışmalarının merkezi haline getirmiştir. Ayrıca, küçük yüzey alanı ve kolay ulaşılabilir olmasından dolayı gözün kornea tabakası hedefe yönelik gen tedavisi çalışmaları için ideal bir adaydır. Üstelik korneanın avüsküler yapısı korneaya iletilen gen bazlı terapötiklerin vücudun diğer organ ve dokularına ulaşmamasına ve böylece hedef dışı etki riskinin en aza inmesine neden olmaktadır. Tüm bunların yanı sıra, gen bazlı terapötiklere karşı bağışıklık tepkisi en az olan doku olması, korneaya gen düzenleme için kritik olan benzersiz bir bağışıklık ayrıcalıklı doku statüsü sağlamaktadır. Deneysel bir bakış açısına göre önemli bir tercih nedeni ise korneanın birkaç hafta boyunca kültürlenmiş

ex vivo bir doku olarak birkaç hafta boyunca kültüre edilebilmesidir. Bu sayede gen terapisi ürünlerinin etkinliği ve güvenirliği değerlendirilerek gen transfer optimizasyonu sağlanabilir.

Korneada granüler opasitelerin birikimi distrofilerle ilişkilendirilmiştir. Bu distrofilerin bir kısmına transforme edici büyüme faktörü beta ile indüklenen (Transforming growth factor beta-induced; *TGFBI)* gende meydana gelen mutasyonlar neden olmaktadır. Yapılan çalışmalar ile kornea distrofileri ile ilişkili *TGFBI* geninde 74 farklı mutasyon tanımlanmıştır. Çoğunlukla kornea epitel hücrelerinde *TGFBI* geninden ifade olan TGFBI proteininin, kornea şeffaflığının sağlanması ve sürdürülmesinde önemli olduğu bilinmektedir. *TGFBI* geninde sıcak nokta mutasyonu olarak bilinen ekzon 12'de yer alan R555W mutasyonu, 555 pozisyonunda Arginin (Arg; R) rezidüsündeki yanlış anlamlı mutasyondur ve granüler kornea distrofisi tip 1 (Granular corneal dystrophy type 1; GCD1) ile ilişkilendirilmiştir. GCD1'de, mutant TGFBIp agregatlarının kornea matriksinde birikimi ile opasiteler oluşur ve süreçle birlikte opasite oluşumu artarak devam eder. Günümüzde opasitelerin oluşmasını yavaşlatan, durduran ya da yok olmasını sağlayan klinik tedaviler yetersiz kalmaktadır. Korneal epitel hücrelerin rejenerasyon sürecinin hızlı olması ve sürekli yenilenmesi tedavilerin kalıcılığını etkilemektedir. Bu nedenle kalıcı gen tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç duyulmaktadır.

Periferal kan mononükleer hücreler (Peripheral blood mononuclear cells; PBMC); lenfosit, monosit ve makrofaj gibi çekirdekli hücrelerdir. PBMC eldesi ve *in vitro* ortamda sürdürülmesi diğer primer hücrelere kıyasla çok daha kolay olması nedeniyle genom düzenleme çalışmalarında tercih edilmektedirler.

Bu tez kapsamında CRISPR/Cas9 genom düzenleme yöntemi ile granüler kornea distrofili tip 1 hasta bireylerden elde edilen PBMC'lerde, *TGFBI* geni ekzon 12 bölgesinde yer alan sıcak nokta mutasyonu R555W'nun düzenlenmesi amaçlanmıştır.

1.1. DNA Zincir Kırıkları

DNA, endojen ya da ekzojen ajanlar ve anormal DNA metabolik süreçlerinden kaynaklı sürekli bir hasar tehdidi altındadır. DNA yapısında oluşan lezyonların büyük bir kısmı fosfodiester bağlarını etkilemeyen DNA baz modifikasyonlarını içerir. Oksidasyon ve ultraviyole (UV) ışık gibi ekzojen ajanların neden olduğu apirimidinik ya da apürinik (abazik alanlar, AP) bölgeler DNA baz modifikasyonlarına örnektir (Chatterjee ve Walker 2017, Ranjha ve ark 2018). Bazı ajanlar ise Şekil 1.1'de gösterildiği gibi DNA yapısında fosfodiester omurgasının bozulması ile oluşan tek zincir kırığına (Single strand break; SSB) ya da çift zincir kırığına (Double strand break; DSB) neden olurlar (Ni ve ark 2017).

Şekil 1.1. SSB ve DSB'nin şematik gösterimi (Ni ve ark 2017).

SSB'ler topoizomeraz I aktivitesi sırasında enzimatik kesim, iyonize radyasyon ve hücresel metabolizma tarafından üretilen reaktif oksijen türleri (ROS) gibi mutajenlerin indüklemesi ile meydana gelir. DSB'ler iyonize radyasyon, genotoksik bileşenler, ROS, DNA replikasyonu sırasında oluşabilecek hatalar, mayotik rekombinasyon sırasında oluşan tamir olayları, nükleazlar gibi DNA'ya doğrudan veya dolaylı olarak zarar verebilen endojen ve ekzojen kaynaklar tarafından indüklenebilir (Jeppesen ve ark 2011).

SSB'ler çift zincirli DNA'nın yapısal bütünlüğünü bozmaz. Fakat SSB tamir edilmez ise sonraki hücre bölünmesi sırasında gerçekleşecek DNA replikasyonu işlemi ile çift zincirli DNA sarmalını tek zincire ayıran replizom kompleksi SSB'yi DSB'ye dönüştürür (Ranjha ve ark 2018).

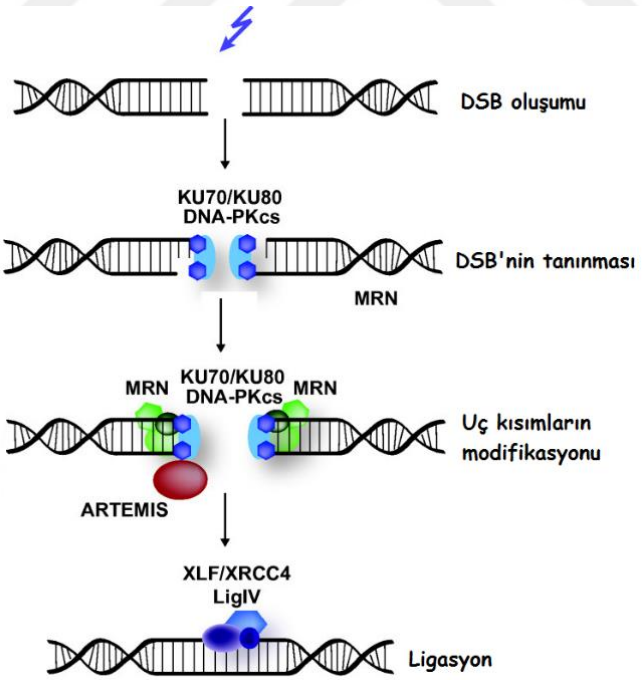
Tamir edilmeyen DSB'ler hücrelerde ciddi sorunlara sebep olur. Bu yüzden DSB'nin hızlı ve doğru bir şekilde tamiri hücre sağkalımı için oldukça önemlidir (Ma ve Dai 2018).

1.2. DNA Çift Zincir Kırığı Onarım Mekanizmaları

SSB ve DSB, farklı hücresel sinyal yolakları ve protein faktörlerini içeren nispeten bağımsız süreçlerle tamir edilir. Bu tamir mekanizmaları homolog olmayan uç birleştirme (non-homologous end joining; NHEJ), mikrohomoloji aracılı uç birleştirme (microhomology-mediated end joining; MMEJ) ve homolog rekombinasyon (homologous recombination; HR) DNA onarım mekanizmalarıdır (Ma ve Dai 2018).

1.2.1. Homolog Olmayan Uç Birleştirme (NHEJ) Onarım Mekanizması

NHEJ kromozomal DNA onarım mekanizmasıdır. NHEJ, DSB meydana gelen bölgede kırık uçları modifiye ederek birbirine bağlar. Kırık uçlar birleştirilirken genin kodlama bölgesinde meydana gelebilecek insersiyon ya da delesyonlar (*indel)* çerçeve kayması (*frameshift*) mutasyonları ile sonuçlanarak proteinlerde işlev kaybına neden olabilir. NHEJ ile DNA onarımı birkaç nükleotid kaybı ile sonuçlanabilir ve bundan dolayı hata eğilimli DNA onarım mekanizması olarak da bilinir (Gaj ve ark 2013).



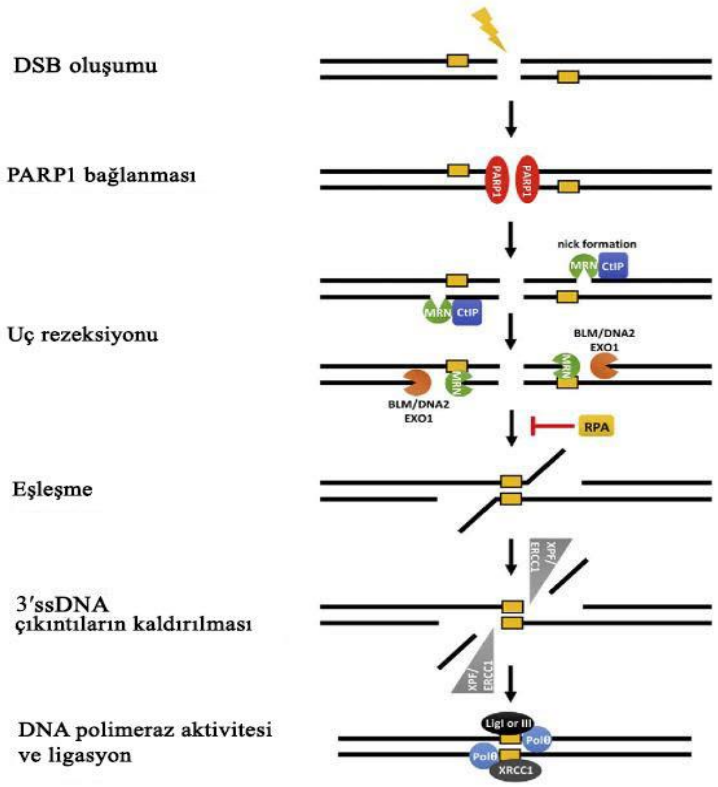
Şekil 1.2. NHEJ onarımının şematik gösterimi (Lans ve ark 2012).

Şekil 1.2'de gösterildiği gibi Ku70 ve Ku80 proteinlerinden oluşan halka şeklindeki Ku70/Ku80 heterodimeri, diziden bağımsız bir şekilde DSB'yi tanır ve DSB uçlarına sıkıca bağlanarak NHEJ onarımını başlatır. Bu yüzden Ku bağımlı klasik homolog olmayan uç birleştirme (cNHEJ) olarak da adlandırılır. DNA'ya

bağımlı protein kinaz katalitik alt ünite (DNA-PKcs), DNA uçlarını birbirine yakın tutan Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) kompleksi gibi NHEJ mekanizmasında yer alan aktive edici proteinleri bir araya getirme rolüne sahiptir. Ku70/Ku80 heterodimeri, DNA-PKcs'yi mekanizmaya dahil eder ve oluşan dimerizasyon ile DNA uçları arasında bir bağlantı oluşturulur. Uçlar arasındaki bağlantılar, XRCC4-LIG4-XLF ve DNA-PKcs otofosforilasyonu ile sağlanır. DSB'nin uçları ligasyon için uyumlu değilse, DNA uçlarını modifiye eden Artemis nükleaz veya Polμ and Polλ gibi DNA polimeraz enzimleri gerekir. Artemis, komplementer nükleotid uzantılarını ortaya çıkarmak için 3' ve 5' tek zincir uçlarını modifiye eder. NHEJ onarımının son adımında LIG IV DNA ligaz, XLF/XRCC4 kompleksini stabilize ederek ligasyonu katalizler (Lennartsson ve ark 2006, Zha ve ark 2009, Rulten ve Grundy 2017, Sishc ve Davis 2017, Wang ve Xu 2017).

1.2.2. Mikrohomoloji Aracılı Uç Birleştirme (MMEJ) Onarım Mekanizması

MMEJ, DSB'leri onarmaya yönelik yollardan birisidir. Ku proteininin yokluğunda veya c-NHEJ eksikliği olan hücrelerde, alternatif homolog olmayan uç birleştirme (a-NHEJ) olarak da bilinen mikrohomoloji aracılı uç birleştirme (MMEJ) gözlemlenebilir (Wang ve Xu 2017).



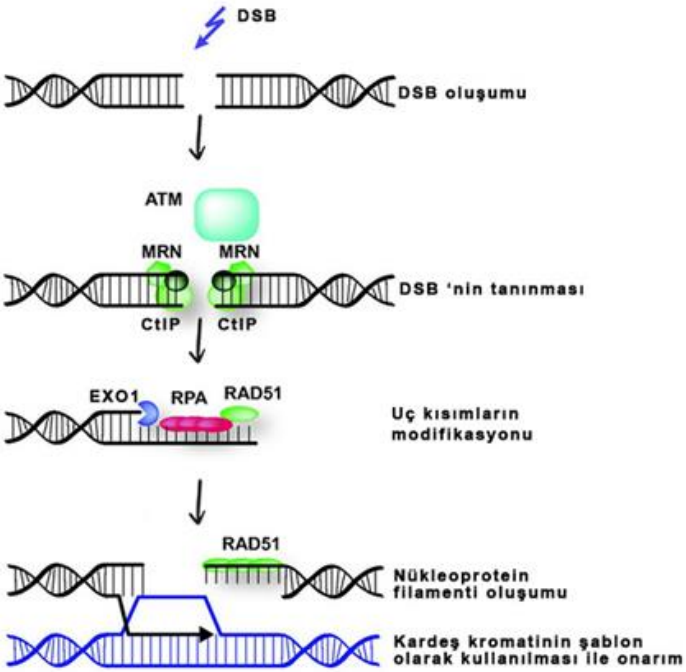
Şekil 1.3. MMEJ onarımının şematik gösterimi (Seol ve ark 2017).

Şekil 1.3'de gösterildiği gibi MMEJ, cNHEJ onarım mekanizmasında olduğu gibi hasarlı DNA'yı onarmak için herhangi bir şablona ihtiyaç duymaz. Kırık uçların birleştirilmeden önce hizalanması sırasında DSB'nin her iki tarafındaki mikrohomolog diziler kullanılır. Replikasyon proteini A (RPA), bağlanmayı önleyerek MMEJ aktivasyonunu engellerken, poli ADP-riboz polimeraz 1 (PARP1) DNA parçalarını bir arada tutar ve bağlanma reaksiyonunu teşvik eder (Wang ve ark 2006, Deng ve ark 2014). MMEJ'de DSB'nin onarımı, hasar algılayan MRN kompleksi (MRE11-RAD50-NBS1) ve etkileşim ortağı C-terminal bağlayıcı protein etkileşimli protein (CtIP) tarafından uç rezeksiyonu ile başlatılır ve tek sarmallı çıkıntılar oluşturulur (Lee ve Paull 2004, Sartori ve ark 2007, Truong ve ark 2013). Hücre döngüsünün S/G2 fazları sırasında CtIP fosforilasyonu, DSB bölgesi 5' uçlarında bir çentik oluşturan ve DNA uçlarından Ku'yu kaldırarak cNHEJ'i önleyen MRE11 endonükleaz aktivitesini uyarır (Sartori ve ark 2007). EXO1 veya Bloom helikaz (BLM)-DNA2'nin 5′-3′ ekzonükleaz aktiviteleri tarafından 3′ ssDNA çıkıntıları oluşturulur. Elde edilen ssDNA çıkıntıları daha sonra RPA ile kaplanır (Nimonkar ve ark 2011, Ma ve ark 2017). Açığa çıkartılan tek sarmallı çıkıntılar, DNA polimeraz tetanın (pol θ)'nın helikaz alanı tarafından, iki sarmal arasında genellikle 5-25 baz çifti komplementer bölgeleri olan mikrohomolojilerle bir araya getirilir (Jinek ve ark 2013). Mikrohomolog diziler DNA'nın en uçlarındaysa, kırpmaya gerek yoktur. Fakat DNA uçlarına uzaktaysa ortaya çıkan heterolog 3' ssDNA çıkıntıları, XPF-ERCC1 endonükleazı tarafından kaldırılır ve boşluklar DNA pol θ tarafından doldurulur (Ahmad ve ark 2008, Sfeir ve Symington 2015). Boşluklar doldurulduktan sonra DNA ligaz III (LigIII) veya DNA ligaz I (LigI) tarafından yürütülen ligasyon ile süreç tamamlanır (Liang ve ark 2008). MMEJ onarımı Ku proteini, DNA-PK veya Ligaz IV gibi faktörlere ihtiyaç duymaz. Bu yüzden MMEJ, C-NHEJ'den tamamen bağımsızdır (Simsek ve Jasin 2010).

MMEJ; delesyon, translokasyon, inversiyon ve diğer karmaşık yeniden düzenlemeler gibi kromozom anormallikleri ile ilişkilendirilir (Ahrabi ve ark 2016). MMEJ, DSB onarımının küçük bir kısmını (%10) oluşturur ve homolog rekombinasyon için kardeş kromatidin mevcut olmadığı durumlarda kullanıldığı düşünülmektedir. DSB oluşumunu takiben MMEJ, insan HR onarım faktörleri tarafından baskılanır (Truong ve ark 2013).

1.2.3. Homolog Rekombinasyon (HR) Onarım Mekanizması

HR, DSB bulunan bölgenin onarımının homolog bir şablon varlığında hatasız olarak yapıldığı kromozomal DNA onarım mekanizmasıdır. DSB'nin bulunduğu kromatidi onarmak için şablon olarak kardeş kromatid kullanılır (Stracker ve Petrini 2011).



Şekil 1.4. HR onarımının şematik gösterimi (Lans ve ark 2012).

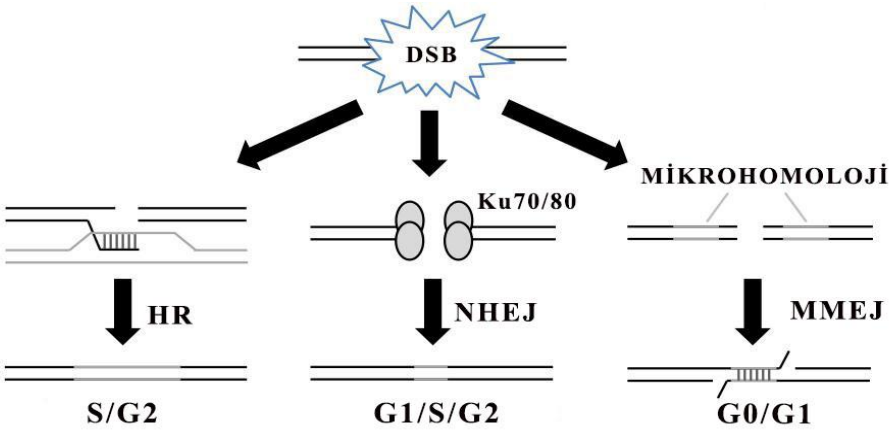
Şekil 1.4'de gösterildiği gibi HR tamir mekanizması bir kırık sensörü olarak görev alan MRN (Mre11, Rad50 ve Nbs1) kompleksinin DSB'yi tanıyarak bağlanması ile başlar (Iyama ve Wilson 2013). DSB etrafında oluşan MRN kompleksi ile CtIP etkileşimi, 5'-3' yönünde DNA'yı keser. Exo1 tek zincir DNA uzanımlarını ortaya çıkarmak için daha kapsamlı bir kesim gerçekleştirir. RPA, DNA üzerinde ikincil yapıların oluşmasını engellemek ve DNA'yı nükleazlardan korumak için BRCA1 tarafından lezyonun bulunduğu bölgeye yönlendirilir. RPA, BRCA2 tarafından DNA'ya yönlendirilen Rad51 rekombinaz aracılığı ile DNA'dan uzaklaştırılır. Rad51, tek zincir DNA boyunca bir nükleoprotein filamenti oluşturur. Bu filament kardeş kromatid zincir invazyonuna izin veren bir fonksiyona sahiptir (Jekimovs ve ark 2014). Rad51 nükleoprotein filamenti ile kaplanmış tek zincir DNA ile şablon olarak kullanılacak homolog DNA bölgesinin zincir invazyonu gerçekleştirilir. İnvazyonun gerçekleşmesiyle dört DNA ipliği arasında hareketli bağlantı olarak bilinen holliday kavşağı oluşur. Değişim ve invazyonu takiben, bir

polimeraz (genellikle polδ) tarafından DNA uzatılır ve ligasyonla süreç tamamlanır (Slupphaug ve ark 2003, Iyama ve Wilson 2013).

İnsan hücre hatlarında kromozomlara entegre edilen floresan belirteçler, NHEJ'in HR'den çok daha hızlı ve onarım olaylarının yaklaşık %75'inden sorumlu olduğunu ortaya çıkarmıştır. NHEJ onarım mekanizması yaklaşık 30 dakika içinde gerçekleşirken, HR onarım mekanizmasının gerçekleşmesi birkaç saat sürmektedir (Her ve Bunting 2018).

Yapılan çalışmalar sonrasında elde edilen bulgular DSB yapısının DNA onarım mekanizmasının seçilimini etkilediğini göstermiştir. Hücre döngüsüne özel yapılan çalışmalarda nakavt hücre hatları kullanılarak G2'de iyonize radyasyon (IR) ile indüklenen DSB'lerin %80'inin NHEJ tarafından onarıldığı görülmüştür. Yine kızıl ötesi mikro ışınımı veya lineer enerji transferi (LET) kullanılarak indüklenen DSB'ler, I-SceI endonükleaz enzimi ile indüklenenlerden daha karmaşık bir yapıya sahip olma eğilimindedir. Bu yaklaşımlar kullanılarak üretilen DSB'ler, NHEJ tarafından hızlı bir şekilde onarılamadığı için HR onarım mekanizması tarafından onarılmıştır (Her ve Bunting 2018).

DSB onarım mekanizmalarının hücre döngüsü boyunca etkin olduğu evreler Şekil 1.5'de gösterilmiştir. NHEJ, HR'den farklı olarak onarıma kılavuzluk yapması için homolog bir şablona ihtiyaç duymaz. Bu yüzden hücre döngüsü sırasında herhangi bir evrede gerçekleşebilir (Rein ve ark 2018). Aralarında yüksek oranda homoloji bulunan kardeş kromatidler, HR tarafından ideal bir şablon olarak kullanılırlar. Kardeş kromatidlere kolayca erişilebilen S ve G2 evrelerinde HR, G1 fazında ise NHEJ tamir mekanizması görülme sıklığı daha yüksektir (Heyer ve ark 2010).

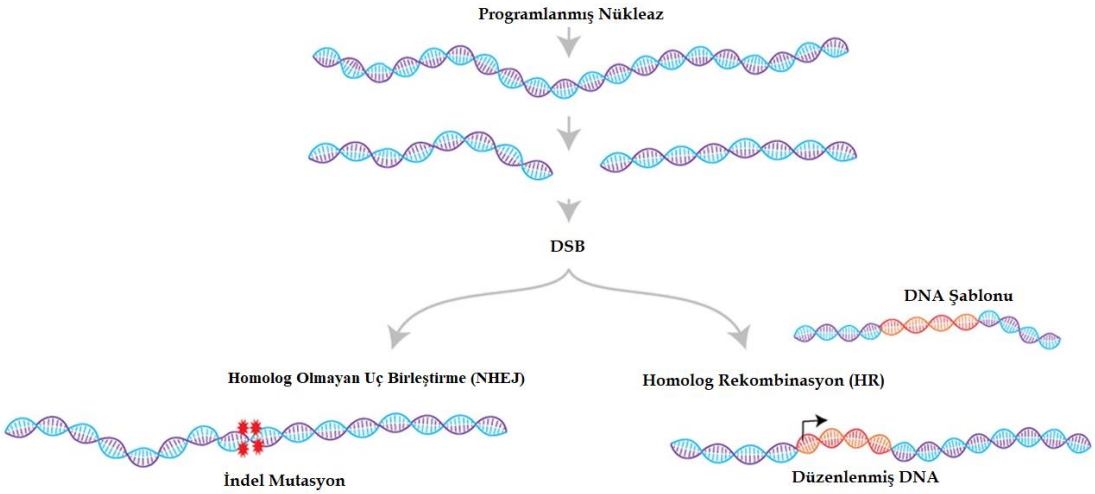


Şekil 1.5. DSB onarım mekanizmalarının hücre döngüsü sırasında ortaya çıktığı evrelerin gösterimi.

1.3. Genom Düzenleme Teknolojisi

Ökaryotik organizmaların genomları milyarlarca nükleotid barındıran DNA dizilerinden oluşur. Nükleotidlerin genom içerisinde istenilen şekilde değiştirilmesi yaklaşımı moleküler biyoloji ve tıpta büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla genom düzenleme çalışmaları ön plana çıkmaya başlamıştır (Adli 2018).

Genom düzenleme, DNA kırılmalarını tamir eden doğal hücresel yollar aracılığı ile bir hücrenin veya organizmanın genomunu düzenlemek için kullanılan bir tekniktir. Şekil 1.6'da gösterildiği gibi genom üzerinde istenilen bir yerde DSB oluşumuna yol açan programlanmış bir nükleazın kullanılmasını ve takiben NHEJ ya da HR yoluyla bir endojen DNA onarım işlemini içerir. DSB'nin bir kodlama bölgesinde yer aldığı NHEJ sırasında nükleotidlerin rastgele insersiyonu ya da delesyonu *frameshift* mutasyonlara neden olabilir. *Frameshift* mutasyonlar ise hedeflenen genin veya genomik elementin işlevinin bozulmasına neden olur. Bu nedenle hata eğilimli DNA onarım işlemi NHEJ genellikle gen *knock-out* çalışmalarında kullanılmaktadır. HR aracılı hatasız onarımı ise homolog veya benzer dizileri içeren bir şablon DNA'nın kullanımına dayalı genom düzenlenme çalışmalarında kullanılmaktadır (Şekil 1.6) (Pawelczak ve ark 2018, Yu ve Wu 2018).



Şekil 1.6. Programlanmış nükleaz ile genom düzenleme modellerinin şematik gösterimi (Adli 2018).

Homoloji kolları olan bir DNA şablonu ve programlanmış bir nükleazın birlikte hücre içine yönlendirilmesi ile hassas genom modifikasyonunun sağlandığı bu süreç homoloji yönlendirilmiş onarım (HDR) olarak adlandırılmaktadır (Yu ve Wu 2018). Ancak NHEJ onarımının HDR'ye göre çok daha hızlı ve aktif olması hücrede öncelikli olarak NHEJ mekanizmasının kullanılmasına neden olduğundan

HDR kullanarak öngörülebilen değişiklikleri gerçekleştirmesini oldukça zorlaştırmaktadır. Bu nedenle HDR etkinliğini artırmak için DNA şablonunda bazı modifikasyonların yapılması veya NHEJ tamir mekanizmasına katılan anahtar moleküllerin baskılanması gibi yaklaşımlar denenmektedir (Chu ve ark 2015).

Bugüne kadar genomda hedefe yönelik DSB indükleme yeteneğinin ortak yöntemini paylaşan farklı genom düzenleme araçları geliştirilmiştir. Bu düzenleme araçları şunlardır:

1.3.1. Meganükleazlar (MgN)

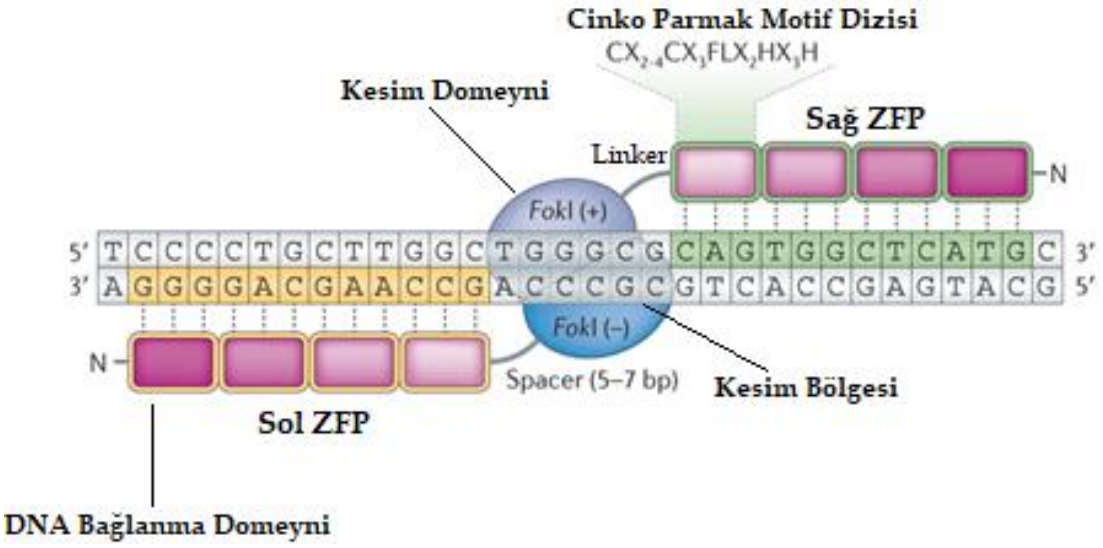
Meganükleaz (Meganucleases; MgN)'lar doğal süreçlerde intronlar ve inteinler tarafından kodlanan, restriksiyon endonükleaz enzimlerinin aksine uzun tanıma dizilerine (>14 baz çifti) ve yüksek aktiviteye sahip enzimlerdir (Chevalier ve Stoddard 2001, Aglawe ve ark 2018).

Bazı bakteri, mantar ve bitki türleri dahil olmak üzere çeşitli organizmalarda tanımlanmış yüzlerce farklı MgN vardır. DNA dizilerini değiştirmek, ortadan kaldırmak veya modifiye etmek için kullanılan ilk genom düzenleme araçları MgN'lerdir. MgN'ler restriksiyon enzimlerinden farklı olarak 12 ve 42 baz çifti (bç) uzunluğundaki DNA dizilerini tanıyan grup I, grup II intronlar ve inteinlerle kodlanırlar. En yaygın kullanılan MgN'ler arasında LAGLIDADG aminoasit motifinin kopyalarına sahip I-SceI ve I-CreI nükleazları bulunur (Aglawe ve ark 2018). MgN'ler hedeflenen sekansta nokta mutasyonları düzenleyebilmelerine rağmen yüksek bir özgüllük ile karakterize edilirler. MgN'lerin yüksek özgüllüklerinden ötürü hedeflenebilir dizilerin repertuarı çok sınırlıdır (Pâques ve Duchateau 2007). MgN'lerin sahip olduğu yüksek özgüllüklerine rağmen genom düzenleme işlemlerinde kullanımı, birçok organizmada tek tanıma bölgesinin varlığı ve DNA bağlama alanları ile kesim bölgelerinin örtüşmesinden dolayı kısıtlıdır (Aglawe ve ark 2018). MgN'lerin hedefe özgüllükleri protein mühendisliği işlemleri ile değiştirilebilir. MgN'lerin genom düzenleme deneylerinde kullanımını artırmak için DNA tanıma alanları değiştirilerek tasarlanmış MgN'ler üretilmiştir. Fakat tasarlanmış MgN'lerin üretiminin oldukça zor ve maliyetinin yüksek olması bilim insanlarını yeni genom düzenleme araçları keşfetmeye yönlendirmiştir (Silva ve ark 2011). Bununla beraber, doğal süreçlerle oluştukları için ve spesifik bölgelere etki

ettikleri için hücreler açısından diğer genom düzenleme araçlarına kıyasla daha az toksik etki göstermeleri MgN'lerin avantajlarıdır (Khan 2019).

1.3.2. Çinko Parmak Nükleazlar (ZFN)

Çinko parmak nükleaz (zinc-finger nuclease; ZFN)'lar genomda istenilen DNA dizilerini kesmek için özel olarak programlanmış nükleazlardır. DNA'ya bağlanan bir çinko parmak protein domeyni ile hedeflenen bölgede DSB oluşturulmasından sorumlu FokI nükleaz kesim domeyninin füzyonundan oluşturulan kimerik protein yapısına sahip restriksiyon enzimleridir. Şekil 1.7'de gösterildiği gibi ZFN, DSB indüklemesi için her iki DNA zincirini bağlanma bölgesi dışından kesen 5-7 bç'lik aralayıcı dizi ile ayrılmış iki monomer olarak tasarlanmıştır. Her ZFN çifti linker dizinin yardımıyla N-terminalindeki bir çinko parmak protein (zinc-finger protein; ZFP) ve C-terminalindeki bir FokI nükleaz domeyninden oluşur. Çinko parmak motif dizisinde X herhangi bir amino asidi temsil eder. ZFP çiftlerinin hedef dizisi, FokI nükleazın bağlandığı ve kestiği 5–7 bç'lik bir ara bölge dışındaki 18 - 36 bç uzunluktaki dizilerdir (Kim ve Kim 2014).



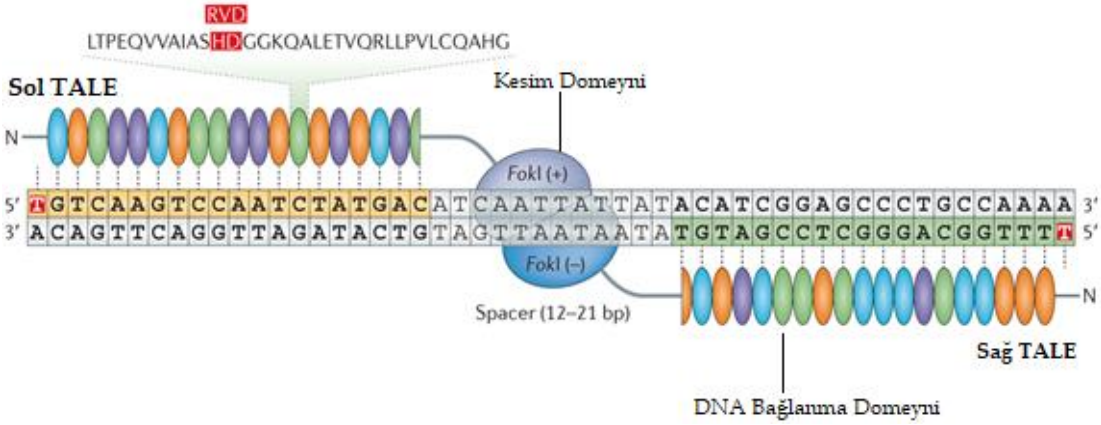
Şekil 1.7. ZFN yapısının şematik gösterimi (Kim ve Kim 2014).

ZFN'ler genomda istenilen bölgede DSB indüklemesi yoluyla indüklenen HR onarımı ile genom düzenlemesini kolaylaştırır. Nükleotid tripletlerini tanıyan ZFN tabanlı genom düzenleme uygulaması için en önemli faktör genomdaki spesifik bir DNA dizisini tam olarak hedefleyebilen ZFN'lerin üretilmesidir (Urnov ve ark 2010, Periwal 2017). ZFN'ler kullanılarak genomdaki herhangi bir genomik lokusa hızlı bir şekilde müdahale edilebilir. ZFN'ler de MgN'ler gibi protein mühendisliği ile

tasarlanmış yeni bir protein üretimi gerektirdiğinden kullanımı zor, maliyeti yüksek ve verimi düşüktür. ZFN'ler ile genom düzenleme işlemi sırasında oluşabilecek hedef dışı etki (*off-target*) kalıcıdır ve kalıtsal olabilir. Bu yüzden genom düzenleme işlemlerinde çok tercih edilmezler (Mohanta ve ark 2017).

1.3.3. Transkripsiyon Aktivatörü Benzeri Efektör Nükleazlar

NHEJ ve HR'yi uyarmak için bir genom düzenleme aracı olarak kullanılabilen transkripsiyon aktivatörü benzeri efektör nükleaz (transcription activator-like effector nucleases; TALEN)'lar ZFN'lere benzer şekilde özelleştirilebilir DNA bağlanma domeyni ve FokI nükleaz domeyninin füzyonu ile oluşur (Bi ve Yang 2017). Şekil 1.8'de gösterildiği gibi TALEN amino terminalindeki transkripsiyon aktivatör benzeri efektörler (TALE) ve karboksil terminalindeki FokI nükleaz domeyninden oluşur. Her TALE monomeri 33-35 aminoasit tekrar alanı içerir. 12 ve 13. pozisyonlarda son derece değişken iki aminoasit rezidüsü olan RVD (repeat-variable diresidue) TALE özgüllüğünden sorumludur (Kim ve Kim 2014).



Şekil 1.8. TALEN yapısının şematik gösterimi (Zych ve ark 2018).

Konakçı bitki hücrelerinde genlerin transkripsiyonunu değiştirmek için *Xanthomonas* bakterileri tarafından salgılanan proteinler olan TALE, DNA bağlanma bölgesi yüksek oranda korunmuş tekrarlardan oluşur (Joung ve Sander 2013). DNA bağlanma alanının modüler yapısı göz önüne alındığında farklı özgüllüklere sahip RVD'ler, DNA dizilerini hedeflemek için dizilere birleştirilebilir. TALEN genellikle 16-24 bç'lik bir dizilimi tanıyarak hedef sitede 32-48 bç'lik bir birleşik özgüllük elde eder. TALE kullanımı ile ilgili tek sınırlama TALE bağlanma bölgelerinin timin ile başlamasıdır (Şekil 1.8). Tasarlanmış TALEN'lerin hedeflenen kromozomlarda %2 ila %55'i arasında *indel* varyasyonları oluşturduğu bildirilmiştir (Petersen 2017).

Genom düzenleme aracı olarak TALEN'in ZFN'ye kıyasla çok tercih edilmesinin sebebi hedeflenen DNA dizilerinde tek nükleotidleri tanıması, hedef dışı etkisinin az olması ve sentez maliyetinin düşük olmasıdır (Zych ve ark 2018). TALEN'lerin ZFN'lere kıyasla daha büyük boyutlarda olması ise hücrelere iletilmesi ve ifade edilmesini zorlaştırmaktadır (Holkers ve ark 2013).

1.3.4. Düzenli Aralıklarla Bölünmüş Kısa Palindromik Tekrarlar/CRISPR-İlişkili Nükleaz-9 (CRISPR/Cas9)

Ishino ve arkadaşları 1987 yılında *Escherichia coli*'nin genomunda, *Apoptoz Inhibitör Protein (iap)* gen dizisinin aşağı bölgesinde fonksiyonu tam olarak bilinmeyen tekrar eden dizilerin varlığını keşfetmişlerdir (Ishino ve ark 1987). Francisco Mojica ve arkadaşları ise bir arke türü olan *Haloferax mediterranei* genomunda yaptıkları çalışmalarda bu dizilerin 36 bç'lik aralayıcılar (spacer) ve 30 bç'lik tekrar dizileri olduğunu bildirmişlerdir (Mojica ve ark 1993). İlk zamanlarda kısa düzenli aralıklı tekrarlar (short regularly spaced repeats-SRSS) olarak adlandırılan, fakat fonksiyonu tanımlanamayan bu tekrar ve spacer dizilerine daha sonra düzenli kümelenmiş aralayıcı kısa palindromik tekrar dizileri (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats; CRISPR) adı verilmiştir. Yapılan çalışmalarla farklı bakteri türlerinde CRISPR lokuslarının varlığı gösterilmiştir (Mojica ve ark 2000, Jansen ve ark 2002). Bu dizilerden bazılarının faj, konjugatif plazmid veya virüs kaynaklı olduğunu belirleyen Dr. Mojica, CRISPR'ın adaptif immün sistemin bir parçası olduğunu bildirdi (Mojica ve ark 2005). Bolotin ve arkadaşlarının 2005 yılında, CRISPR yapılarının yakınında endonükleaz enzimi kodlayan *Cas* genlerinin varlığını göstermesi, CRISPR/Cas'ın yabancı DNA degredasyonu ile ilişkili olabileceği düşüncesinin oluşmasına yol açtı (Bolotin ve ark 2005). CRISPR ve Cas endonükleazın bakteriel fajların tanınması ve yok edilmesini sağlayan önemli bir bileşen olduğu Barrangou ve arkadaşları tarafından 2007 yılında yapılan çalışma ile ortaya konuldu (Barrangou ve ark 2007).

CRISPR/Cas sisteminde, virüs ile enfekte olan bir bakteri, virüs genomunu parçalayarak virüse ait bazı dizileri, kendi genomunda yer alan CRISPR dizilerine eklemekte ve böylece virüse ait diziyi kayıt altına almaktadır. Bakteri bu sistem sayesinde karşılaştığı bu virüse karşı immun hafıza geliştirerek bu virüsle bir sonraki olası karşılaşmasında daha hızlı yanıt oluşturarak dirençli hale gelmektedir. Bu

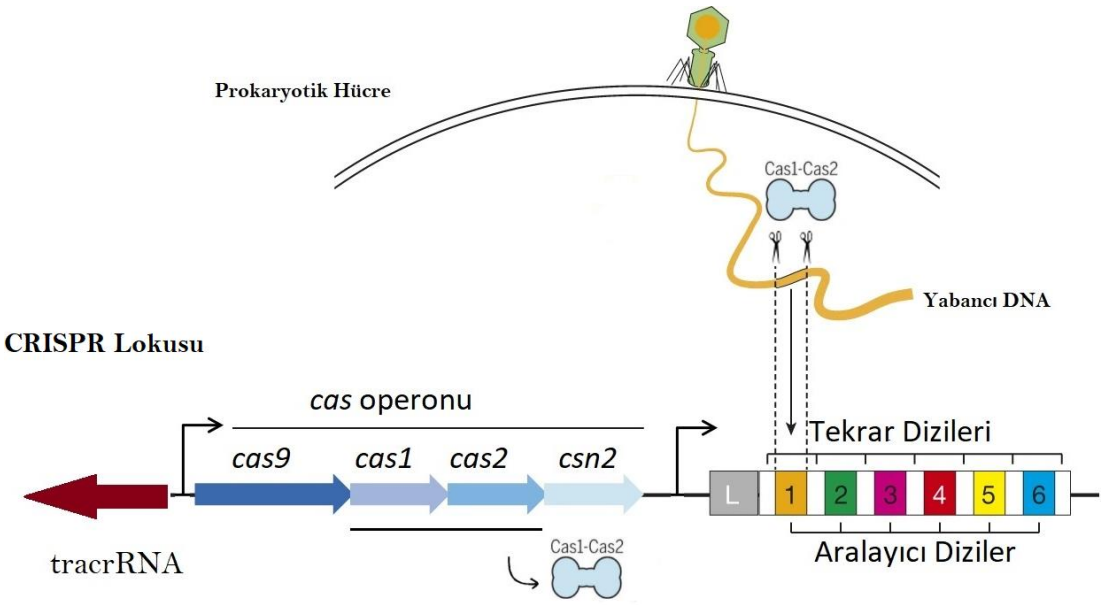
sistem sayesinde bakteri enfekte olduğu virüslere ait çok sayıda kaydı tutabilmektedir. (Rath ve ark 2015). CRISPR gen bölgelerinin, bakterilerin yaklaşık %40'ında, arkelerin ise %90'ında bulunduğu ortaya konulmuştur (Javed ve ark 2018).

Bakteri ve arkeler için oldukça önemli olan bu adaptif bağışıklık sistemi; adaptasyon, CRISPR RNA üretimi ve savunma olmak üzere üç temel adımla çalışmaktadır (Barrangou ve ark 2007).

- **Adaptasyon**

Prokaryotik hücre genomunda bulunan CRISPR lokusu; Cas (CRISPR-associated protein) operonu, aralayıcı diziler, aralayıcı diziler arasına serpiştirilmiş tekrar dizileri ve Cas operonunun yukarı akışında yer alan kodlamayan bir RNA olan trans-aktive edici CRISPR RNA (tracrRNA) kodlayan bölgeden oluşur.

Cas operonu tarafından Cas1 ve Cas2 nükleazlar ifade edilir. Şekil 1.9'da gösterildiği gibi prokaryotik hücrelerde yabancı DNA varlığı tespit edildiğinde Cas1 ve Cas2'den oluşan Cas nükleaz kompleksi yabancı DNA'yı keserek fragmanlara ayırır. Oluşan DNA fragmanları konakçı genomu üzerinde CRISPR lokusuna csn2 tarafından aralayıcı dizi olarak, yeni oluşturulan bir tekrar dizisinin sonrasına entegre edilir ve istilacı genetik elemanların moleküler kayıtları oluşturulur ve bu süreç adaptasyon olarak bilinir (Khalaf ve ark 2020).



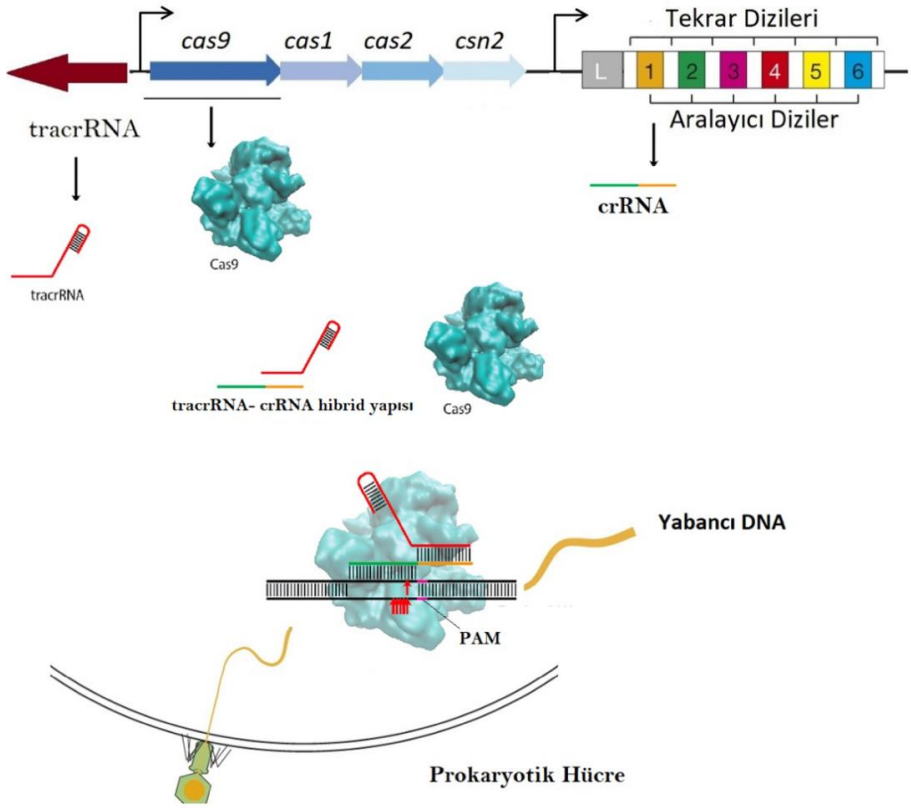
Şekil 1.9. CRISPR lokusuna yeni bir aralayıcı dizi eklenmesinin şematik gösterimi (Marraffini 2015).

- **CRISPR RNA Üretimi**

Adaptasyon sürecinde moleküler kaydı oluşturulan herhangi bir mobil genetik etken prokaryotik hücrede tekrar tespit edildiğinde CRISPR lokusuna aralayıcı dizi olarak entegre edilen ilgili genetik etkenin DNA parçaları şablon olarak kullanılarak öncül CRISPR RNA (pre-crRNA) olarak bilinen kısa RNA parçacıkları ve tracrRNA olarak bilinen başka bir kodlamayan RNA parçası üretilir. tracrRNA kısmen pre-crRNA'ya tamamlayıcıdır. tracrRNA, pre-crRNA'ya bağlanır ve RNaseIII modifikasyonu ile olgun crRNA-tracrRNA hibrid yapısı oluşturulur (Şekil 1.10) (Lone ve ark 2018).

- **Savunma**

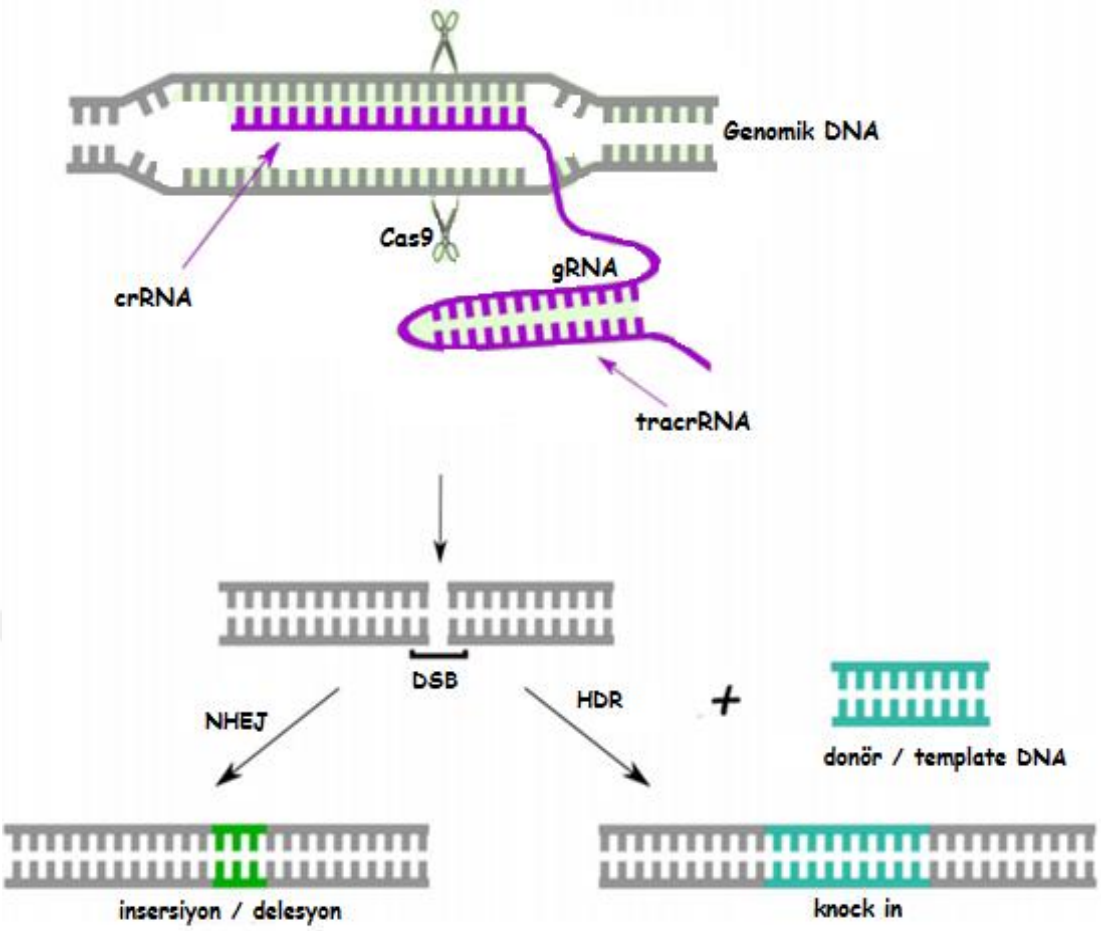
Olgun crRNA-tracrRNA hibrid yapısı ile Cas9 nükleaz arasında ribonükleoprotein (crRNP) kompleksi oluşturulur. crRNA-tracrRNA yapısı hedef DNA'yı parçalayacak olan Cas9 nükleaza rehberlik eder. Cas9-crRNA-tracrRNA ribonükleoprotein (crRNP) kompleksinde crRNA, yabancı DNA üzerinde protoaralık bitişik motif (protospacer adjacent motif; PAM) ile eşleşir ve hedef DNA'nın kesilerek yok edilmesi için Cas9'u uyarır. Bu şekilde prokaryotlarda istilacı genetik elemanlara karşı adaptif bağışıklık sağlanmış olur (Şekil 1.10) (Lone ve ark 2018).



Şekil 1.10. CRISPR ile adaptif bağışıklığın şematik gösterimi (Marraffini 2015).

CRISPR/Cas sistemi, Cas proteinin dizi ve yapısına göre Tip I, II ve III olarak sınıflandırılmıştır. Tip I ve Tip III bakteri ve arkealar için bağışıklık sağlarken, Tip II yalnızca bakterilere özgüdür (Makarova ve ark 2011). Tip I CRISPR/Cas sisteminde, helikaz ve DNaz aktivitesi olan Cas3 proteini işlev görmektedir (Sinkunas ve ark 2011). Tip II CRISPR/Cas sisteminde, Cas9 proteini tek bir nükleaz olarak işlev görmektedir. Tip III CRISPR/Cas sistemi, Tip III-A ve Tip III-B olarak iki gruba ayrılır. Tip III-A DNA ve Tip III-B RNA yapısının fragmentize edilmesinden sorumludur (Jiang ve Doudna 2015). Tip I ve Tip II CRISPR/Cas sisteminde protospacer tanıma PAM'a bağlı bölge iken, Tip III CRISPR/Cas sisteminde PAM bölgesinden bağımsızdır (Tyagi ve ark 2020). Tek bir nükleaz kullanan Tip II, genom düzenleme aracı olarak uyarlanan ilk CRISPR/Cas sistemidir.

CRISPR/Cas sistemi, 2012 yılında Amerika'da J. Doudna ve Çin'de F. Zhang tarafından yürütülen çalışmalar ile "Genom Düzenleme Teknolojisi" olarak bilim dünyasına tanıtılmıştır (Jinek ve ark 2012, Cong ve ark 2013). Genom düzenlemesinde kolay uygulama amacıyla tüm crRNA ve tracrRNA bileşenlerini içeren kimerik yapıda rehber RNA (single guide RNA; sgRNA) tasarlanmıştır (Doudna ve Charpentier 2014). Genom üzerinde PAM dizisi bitişiğinde hedefe spesifik tasarlanan sgRNA rehberliğinde Cas enzimi DSB indükleyerek hücresel DNA onarım sürecini başlatmaktadır. Şekil 1.11'de gösterildiği gibi NHEJ ya da HDR gibi hücresel DNA onarım süreçleri indüklenerek genom modifikasyonu sağlanır. 2-6 nt uzunlukta PAM dizileri ile eşleşen 20-24 nt uzunluğunda sgRNA taşıyan çoklu CRISPR/Cas9 bileşenleri geliştirilmiştir. Bu nedenle CRISPR/Cas9 teorik olarak çoğu genomda benzersiz olan 22-30 nt ile spesifik bir DNA dizisini hedefleyebilmektedir (Zhang ve ark 2014).



Şekil 1.11. CRISPR/Cas9 nükleaz aracılı genom modifikasyonunun şematik gösterimi.

Tasarlanmış nükleaz teknolojileri arasında CRISPR/Cas9 yüksek özgüllük, yüksek başarı eldesi, tasarımının basitliği ve maliyetinin düşük olması gibi nedenlerden ötürü en popüler genom düzenleme aracı haline gelmiştir. CRISPR/Cas9 genom düzenleme sistemi gen tedavi çalışmaları, transgenik hayvan ve hücre modellerinin oluşturulması, hastalık modellemesi, gen fonksiyon araştırmaları, epigenom düzenleme, hücre etiketleme ve genetik tarama gibi amaçlarla uygulanmaktadır (Yu ve Wu 2018).

Genom düzenleme teknolojisinde CRISPR/Cas9'un büyük potansiyeline rağmen ele alınması gereken bazı önemli hususlar vardır. Bunlar;

- Hedef dışı mutasyonlar,
- PAM bağımlılığı,
- sgRNA üretimi,
- CRISPR/Cas bileşenlerinin aktarımıdır.

Hedef dışı mutasyonlar CRISPR/Cas9 aracılı genom düzenleme sistemi için en önemli sorundur. Büyük genomlar genellikle hedef DNA dizileri ile özdeş veya

oldukça homolog olan çoklu DNA dizileri içerebilirler. CRISPR/Cas9 hedef DNA dizilerinin yanı sıra bu özdeş veya yüksek homoloji gösteren DNA dizilerinde de değişimlere yol açabilir. Bu değişimlere hedef dışı mutasyonlar denir. CRISPR/Cas9 sisteminde hedef dışı mutasyon ihtimali hedeflenen bölge dışında herhangi bir dizi ile homolojisi olmayan sgRNA'ların tasarlanması ile ortadan kaldırılır (Fu ve ark 2013). Ayrıca hedef dışı mutasyonların oluşumu ile ilgili dikkat edilmesi gereken bir diğer husus, CRISPR/Cas9 bileşenlerinin uygulama dozajıdır (Hsu ve ark 2013).

Teorik olarak CRISPR/Cas9 sistemi tasarlanmış sgRNA ile herhangi bir DNA dizisine uygulanabilir. CRISPR/Cas9'un özgüllüğü sgRNA/hedef dizi uyumunun yanı sıra hedef dizinin aşağı akışında yer alan 2-5 nt uzunluğundaki PAM dizisine bağlıdır (Jinek ve ark 2012). PAM bağımlılığı ise CRISPR/Cas9 sisteminin özgüllüğünü artırır. *Streptococcus pyogenes*'de NGG, *Streptococcus thermophiles*'de NGGNG ile NNAGAAW ve *Neisseria meningitidis*'de NNNNGATT PAM dizileri tanımlanmıştır. Protein mühendisliği ile geliştirilen mutant Cas9'larda PAM çeşitliliğini artırmaktadır. PAM çeşitliliğinin artması ise araştırmacılara farklı genomik lokusları hedefleme şansı sunmaktadır. Ayrıca PAM dizisinin uzaması da CRISPR/Cas9'un özgüllüğünü artıran bir özelliktir (Zhang ve ark 2014).

CRISPR/Cas9 aracılı genom düzenleme teknolojisi uygulamalarında dikkatle ele alınması gereken bir diğer husus ise sgRNA üretimi ve CRISPR/Cas9 bileşenlerinin organizmalara aktarım yöntemleridir. Cas9 ve sgRNA'yı hedef hücreye taşıyacak ve ifade edilmesini sağlayacak plazmid vektörlerin doğru seçimi, transkripsiyon ve post-transkripsiyonel modifikasyonlar açısından büyük önem arz etmektedir. CRISPR/Cas9 bileşenlerinin hedef hücrelere aktarılması için DNA ve RNA tabanlı enjeksiyon teknikleri, lipofeksiyon veya elektroporasyon yöntemleri kullanılmaktadır. Aktarılma yöntemlerinin belirlenmesi ve etkinliği, hedef hücre ve doku tiplerine bağlı olarak değişebilmektedir (Zhang ve ark 2014).

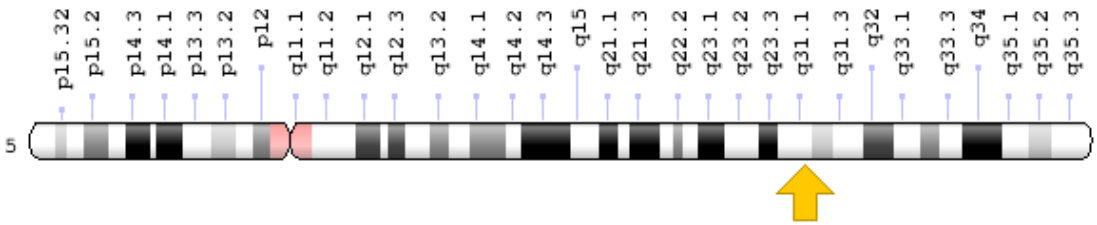
Yukarıda bahsedilen genom düzenleme tekniklerinin avantajları, dezavantajları ve kısıtlamaları Tablo 1.1'de özetlenmiştir.

Tablo 1.1. Genom düzenleme yöntemlerinin karşılaştırılması (Zych ve ark 2018).

Metot	Avantaj	Dezavantaj	Kısıtlamalar
MgN	Yüksek özgüllük Düşük toksisite Büyük DNA dizilerinin tanınması	Son derece zahmetli Tanıma ve kesme fonksiyonunu kodlayan tek bir domeyn	Kısıtlı tanıma bölgesi
ZFN	Yüksek etkinlik Herhangi bir DNA bölgesini tanıyabilmesi	Yüksek maliyet ZFN çiftleri gerekliliği Hedef dışı etkiler	Tanıma bölgesinin 3-6 nükleotid olması
TALEN	Hedef sekanstaki tek bir nükleotidin tanınması Düşük maaliyet Yüksek özgüllük	TALEN dizilerindeki özdeş tekrar dizileri TALE moleküllerinin büyük boyutundan ötürü hücrelere ulaştırılması güçlüğü TALEN çiftleri gerekliliği	Tanıma bölgesinin 5' ucundan önce timin nükleotid varlığı
CRISPR/Cas	Basit ve etkili Düşük maliyet Aynı anda farklı hedeflerde etkinlik Bir jenerasyonda mutant bir organizma elde etme kabiliyeti	Hedef dışı etkiler Mosaizm	PAM dizilerinin mevcudiyetine bağlı olarak sınırlı hedef dizileri

1.4. Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta ile İndüklenen Gen ve Protein

Skonier ve arkadaşları tarafından 1992 yılında keşfedilen transforme edici büyüme faktörü beta ile indüklenen gen (Transforming growth factor beta-induced; *TGFBI*) 5 nolu kromozomun uzun kolunun 31.1 pozisyonunda, 136.028.988-136.063.818 bç aralığında lokalizedir (Şekil 1.12) (Skonier ve ark 1992).



Şekil 1.12. *TGFBI* gen lokalizasyonu (https://ghr.nlm.nih.gov/gene/TGFBI#location)

TGFBI (Gen ID:7045) geni *BIGH3, CDB1, CSD, CDG2, CSD1, CSD2, CSD3, CDGG1, EBMD* ve *LCD1* olarak da isimlendirilmektedir. *TGFBI* geni 17 ekzon ve 16 intron bölgesi içermektedir.

TGFBI geni; 68 kDa moleküler ağırlığında 683 aminosit rezidüsünden oluşan bir hücre dışı matriks elemanı olan transforme edici büyüme faktörü beta ile indüklenen proteini (Transforming growth factor beta-induced protein; TGFBIp) kodlar. *TGFBI* geninin kodlanan dizisi ve protein dizisi Şekil 1.13'de verilmiştir.

TGFBIp; hücre adezyonu, göçü, proliferasyonu anjiyogenez, morfogenez, inflamasyon ve yara iyileşmesi gibi birçok fizyolojik sürece katılır (Ween ve ark 2012). TGFBIp; akciğer, kalp, pankreas, deri (Skonier ve ark 1992), kemik (Kitahama ve ark 2000), tendon (Ferguson ve ark 2003), böbrek (Lee ve ark 2003), kan plazması (Klintworth ve ark 1998), karaciğer, böbrek, testis, mide (Ivanov ve ark 2008), endometriyum (Carson ve ark 2002) ve kornea (Klintworth ve ark 1994) gibi vücudun çeşitli organ ve yapılarında yüksek miktarda ifade edilir. TGFBIp; keratoepitelin (KE), BIGH3, βig-h3 ya da βigh3 olarak da adlandırılmaktadır (Nielsen ve ark 2020).

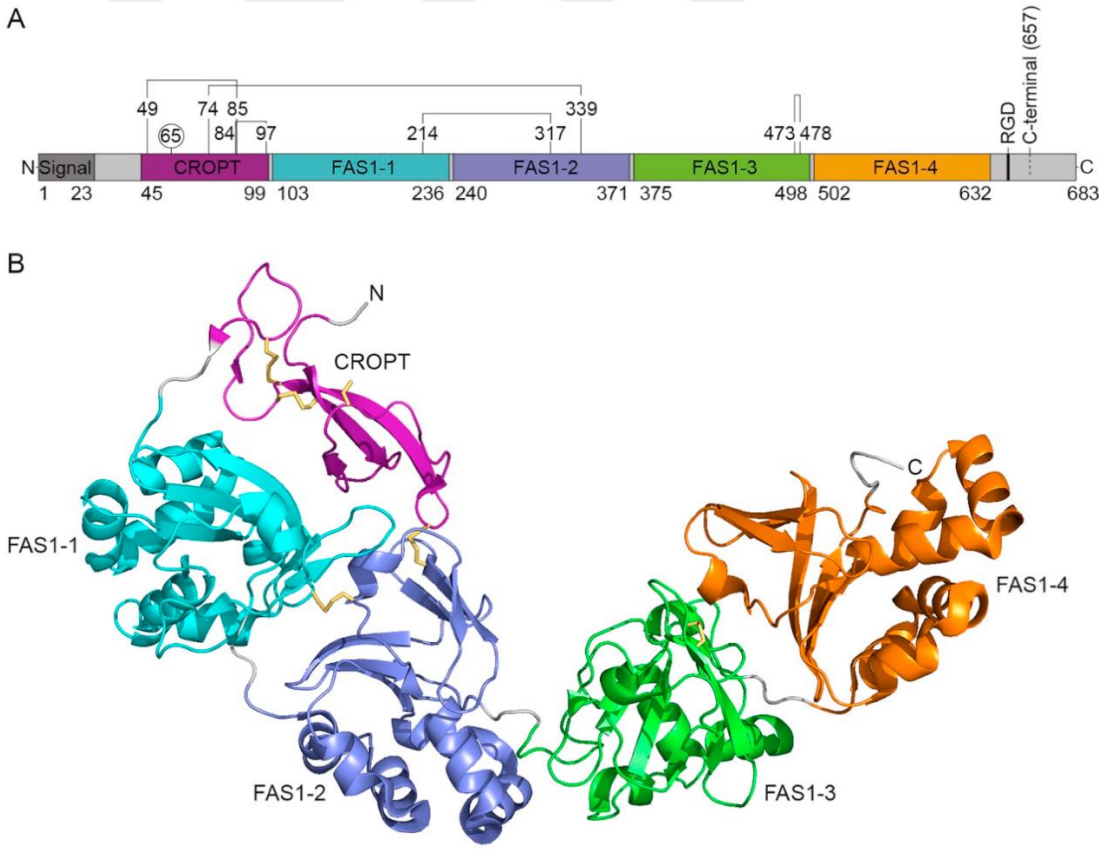
Hücre dışı matriks; hücresel homeostazinin, organizmanın uygun gelişiminin ve doku morfogenezininin başlaması ve sürdürülmesi için çok önemlidir (Tumbarello ve ark 2016). TGFBIp; integrin, kolajen, fibronektin ve proteoglikan gibi diğer hücre dışı matriks proteinleri ile etkileşim kurarak hücre dışı matriks kararlılığının korunması ve sürdürülmesini sağlar (Poulsen ve ark 2018). Hızlı bir yarılanma ömrüne (*turn-over*) sahip olan TGFBIp, spesifik büyüme faktörlerini ayırır ve modüle eder (Viloria ve Hill 2016).

```
   1 ATGGCGCTCTTCGTGCGGCTGCTGGCTCTCGCCCTGGCTCTGGCCCTGGGCCCCGCCGCG     60
   1 -M--A--L--F--V--R--L--L--A--L--A--L--A--L--A--L--G--P--A--A-     20

  61 ACCCTGGCGGGTCCCGCCAAGTCGCCCTACCAGCTGGTGCTGCAGCACAGCAGGCTCCGG    120
  21 -T--L--A--G--P--A--K--S--P--Y--Q--L--V--L--Q--H--S--R--L--R-     40

 121 GGCCGCCAGCACGGCCCCAACGTGTGTGCTGTGCAGAAGGTTATTGGCACTAATAGGAAG    180
  41 -G--R--Q--H--G--P--N--V--C--A--V--Q--K--V--I--G--T--N--R--K-     60

 181 TACTTCACCAACTGCAAGCAGTGGTACCAAAGGAAAATCTGTGGCAAATCAACAGTCATC    240
  61 -Y--F--T--N--C--K--Q--W--Y--Q--R--K--I--C--G--K--S--T--V--I-     80

 241 AGCTACGAGTGCTGTCCTGGATATGAAAAGGTCCCTGGGGAGAAGGGCTGTCCAGCAGCC    300
  81 -S--Y--E--C--C--P--G--Y--E--K--V--P--G--E--K--G--C--P--A--A-    100

 301 CTACCACTCTCAAACCTTTACGAGACCCTGGGAGTCGTTGGATCCACCACCACTCAGCTG    360
 101 -L--P--L--S--N--L--Y--E--T--L--G--V--V--G--S--T--T--T--Q--L-    120

 361 TACACGGACCGCACGGAGAAGCTGAGGCCTGAGATGGAGGGGCCCGGCAGCTTCACCATC    420
 121 -Y--T--D--R--T--E--K--L--R--P--E--M--E--G--P--G--S--F--T--I-    140

 421 TTCGCCCCTAGCAACGAGGCCTGGGCCTCCTTGCCAGCTGAAGTGCTGGACTCCCTGGTC    480
 141 -F--A--P--S--N--E--A--W--A--S--L--P--A--E--V--L--D--S--L--V-    160

 481 AGCAATGTCAACATTGAGCTGCTCAATGCCCTCCGCTACCATATGGTGGGCAGGCGAGTC    540
 161 -S--N--V--N--I--E--L--L--N--A--L--R--Y--H--M--V--G--R--R--V-    180

 541 CTGACTGATGAGCTGAAACACGGCATGACCCTCACCTCTATGTACCAGAATTCCAACATC    600
 181 -L--T--D--E--L--K--H--G--M--T--L--T--S--M--Y--Q--N--S--N--I-    200

 601 CAGATCCACCACTATCCTAATGGGATTGTAACTGTGAACTGTGCCCGGCTGCTGAAAGCC    660
 201 -Q--I--H--H--Y--P--N--G--I--V--T--V--N--C--A--R--L--L--K--A-    220

 661 GACCACCATGCAACCAACGGGGTGGTGCACCTCATCGATAAGGTCATCTCCACCATCACC    720
 221 -D--H--H--A--T--N--G--V--V--H--L--I--D--K--V--I--S--T--I--T-    240

 721 AACAACATCCAGCAGATCATTGAGATCGAGGACACCTTTGAGACCCTTCGGGCTGCTGTG    780
 241 -N--N--I--Q--Q--I--I--E--I--E--D--T--F--E--T--L--R--A--A--V-    260

 781 GCTGCATCAGGGCTCAACACGATGCTTGAAGGTAACGGCCAGTACACGCTTTTGGCCCCG    840
 261 -A--A--S--G--L--N--T--M--L--E--G--N--G--Q--Y--T--L--L--A--P-    280

 841 ACCAATGAGGCCTTCGAGAAGATCCCTAGTGAGACTTTGAACCGTATCCTGGGCGACCCA    900
 281 -T--N--E--A--F--E--K--I--P--S--E--T--L--N--R--I--L--G--D--P-    300

 901 GAAGCCCTGAGAGACCTGCTGAACAACCACATCTTGAAGTCAGCTATGTGTGCTGAAGCC    960
 301 -E--A--L--R--D--L--L--N--N--H--I--L--K--S--A--M--C--A--E--A-    320

 961 ATCGTTGCGGGGCTGTCTGTAGAGACCCTGGAGGGCACGACACTGGAGGTGGGCTGCAGC   1020
 321 -I--V--A--G--L--S--V--E--T--L--E--G--T--T--L--E--V--G--C--S-    340

1021 GGGGACATGCTCACTATCAACGGGAAGGCGATCATCTCCAATAAAGACATCCTAGCCACC   1080
 341 -G--D--M--L--T--I--N--G--K--A--I--I--S--N--K--D--I--L--A--T-    360

1081 AACGGGGTGATCCACTACATTGATGAGCTACTCATCCCAGACTCAGCCAAGACACTATTT   1140
 361 -N--G--V--I--H--Y--I--D--E--L--L--I--P--D--S--A--K--T--L--F-    380

1141 GAATTGGCTGCAGAGTCTGATGTGTCCACAGCCATTGACCTTTTCAGACAAGCCGGCCTC   1200
 381 -E--L--A--A--E--S--D--V--S--T--A--I--D--L--F--R--Q--A--G--L-    400

1201 GGCAATCATCTCTCTGGAAGTGAGCGGTTGACCCTCCTGGCTCCCCTGAATTCTGTATTC   1260
 401 -G--N--H--L--S--G--S--E--R--L--T--L--L--A--P--L--N--S--V--F-    420

1261 AAAGATGGAACCCCTCCAATTGATGCCCATACAAGGAATTTGCTTCGGAACCACATAATT   1320
 421 -K--D--G--T--P--P--I--D--A--H--T--R--N--L--L--R--N--H--I--I-    440

1321 AAAGACCAGCTGGCCTCTAAGTATCTGTACCATGGACAGACCCTGGAAACTCTGGGCGGC   1380
 441 -K--D--Q--L--A--S--K--Y--L--Y--H--G--Q--T--L--E--T--L--G--G-    460

1381 AAAAAACTGAGAGTTTTTGTTTATCGTAATAGCCTCTGCATTGAGAACAGCTGCATCGCG   1440
 461 -K--K--L--R--V--F--V--Y--R--N--S--L--C--I--E--N--S--C--I--A-    480

1441 GCCCACGACAAGAGGGGGAGGTACGGGACCCTGTTCACGATGGACCGGGTGCTGACCCCC   1500
 481 -A--H--D--K--R--G--R--Y--G--T--L--F--T--M--D--R--V--L--T--P-    500

1501 CCAATGGGGACTGTCATGGATGTCCTGAAGGGAGACAATCGCTTTAGCATGCTGGTAGCT   1560
 501 -P--M--G--T--V--M--D--V--L--K--G--D--N--R--F--S--M--L--V--A-    520

1561 GCCATCCAGTCTGCAGGACTGACGGAGACCCTCAACCGGGAAGGAGTCTACACAGTCTTT   1620
 521 -A--I--Q--S--A--G--L--T--E--T--L--N--R--E--G--V--Y--T--V--F-    540

1621 GCTCCCACAAATGAAGCCTTCCGAGCCCTGCCACCAAGAGAACGGAGCAGACTCTTGGGA   1680
 541 -A--P--T--N--E--A--F--R--A--L--P--P--R--E--R--S--R--L--L--G-    560

1681 GATGCCAAGGAACTTGCCAACATCCTGAAATACCACATTGGTGATGAAATCCTGGTTAGC   1740
 561 -D--A--K--E--L--A--N--I--L--K--Y--H--I--G--D--E--I--L--V--S-    580

1741 GGAGGCATCGGGGCCCTGGTGCGGCTAAAGTCTCTCCAAGGTGACAAGCTGGAAGTCAGC   1800
 581 -G--G--I--G--A--L--V--R--L--K--S--L--Q--G--D--K--L--E--V--S-    600

1801 TTGAAAAACAATGTGGTGAGTGTCAACAAGGAGCCTGTTGCCGAGCCTGACATCATGGCC   1860
 601 -L--K--N--N--V--V--S--V--N--K--E--P--V--A--E--P--D--I--M--A-    620

1861 ACAAATGGCGTGGTCCATGTCATCACCAATGTTCTGCAGCCTCCAGCCAACAGACCTCAG   1920
 621 -T--N--G--V--V--H--V--I--T--N--V--L--Q--P--P--A--N--R--P--Q-    640

1921 GAAAGAGGGGATGAACTTGCAGACTCTGCGCTTGAGATCTTCAAACAAGCATCAGCGTTT   1980
 641 -E--R--G--D--E--L--A--D--S--A--L--E--I--F--K--Q--A--S--A--F-    660

1981 TCCAGGGCTTCCCAGAGGTCTGTGCGACTAGCCCCTGTCTATCAAAAGTTATTAGAGAGG   2040
 661 -S--R--A--S--Q--R--S--V--R--L--A--P--V--Y--Q--K--L--L--E--R-    680

2041 ATGAAGCATTAG                                                   2052
 681 -M--K--H--*-                                                    683
```

Şekil 1.13. *TGFBI* geninin kodlanan bölgesi ve aminoasit dizisinin gösterimi (https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Sequence_cDNA?db=core;g=ENSG00000120708;r=5:136028988-136063818;t=ENST00000442011). 555 pozisyonundaki R aminoasiti ve onu kodlayan DNA dizisi koyu renk ile işaretlenmiştir.

TGFBIp'nin N-terminalinde sinyal peptid dizisi (SP, Met1-Ala23), sisteince zengin domeyn (CROPT, Gly45-Ala99) ve dört adet internal tekrar bölgesi (FAS1, Ala100-Pro635) ile C-terminalinde arginin-glisin-aspartat (RGD, Arg642-Gly643-Asp644) motifi bulunur (Nielsen ve ark 2020). 24 aminoasitten oluşan SP dizisi, TGFBIp'nin endoplazmik retikulum lümenine yönelmesi ve hücre dışına salınması için gerekli dizidir. CROPT domeyni, 75 aminoasitten oluşan ve multimer oluşumunu sağlayan domeyndir (Doliana ve ark 2000). CROPT domeyninde bulunan son sistein (65. Sistein; C65) hernagi bir molekül içi disülfit bağı ile etkileşim kuramaz (Nielsen ve ark 2020). Her biri 140 aminoasit ihtiva eden FAS1 alanları hücre adezyonu, hücre farklılaşması, kanserojenez, yara iyileşmesi ve apoptozis süreçleri ile ilişkilendirilmiştir. RGD motifi integrinler için tanıma ve bağlanma görevi görür (Bae ve ark 2002, Kim ve ark 2003).

TGFBIp primer ve uzaysal konformasyon gösterimi Şekil 1.14'de verilmiştir.



Şekil 1.14. TGFBIp'nin şematik gösterimi. A) TGFBIp yapısı üzerinde domeynlerin dizilimi ve RGD motifi, B) TGFBIp'nin uzaysal konformasyon gösterimi. Eflatun ile CROPT, camgöbeği ile FAS1-1, mavi ile FAS1-2, yeşil ile FAS1-3 ve turuncu ile FAS1-4 alanları renklendirilmiştir. Disülfüt bağları ve bağ yapmamış C65, sarı ile renklendirilmiştir (Nielsen ve ark 2020).

TGFBIp, matrikste fibroblast, keratinosit, endotel ve epitel hücreleri ile Tablo 1.2'de verilen integrinler aracılığıyla etkişelim kurar.

Tablo 1.2. Farklı hücre tiplerinde TGFBIp ile bağlantı kuran integrinler

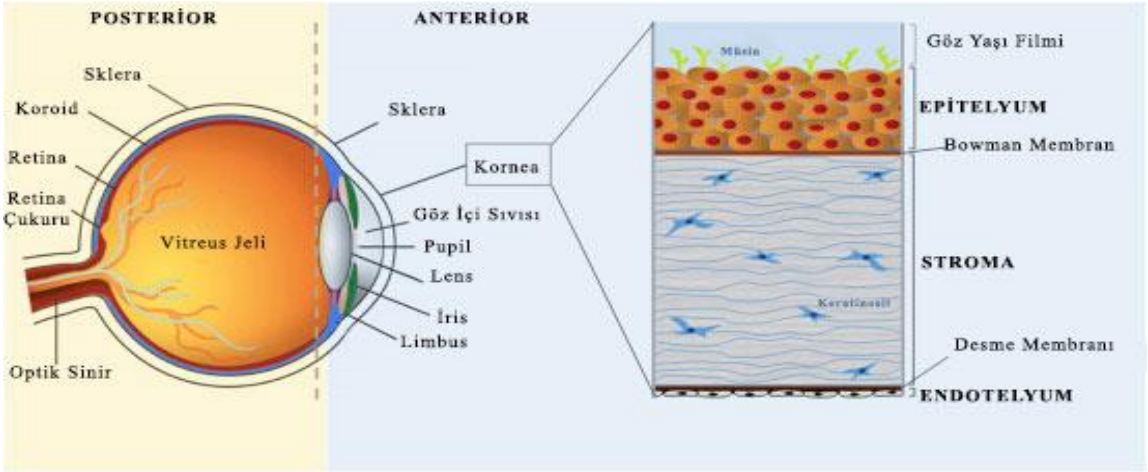
İntegrin	Hücre Tipi
α1β1	Fibroblast (Ohno ve ark 1999)
α5β1	Trombosit (Kim ve ark 2009)
αIIbβ3	Trombosit (Kim ve ark 2009)
α3β1	Korneal epitel hücreleri ve keratinositler (Kim ve ark 2000, Bae ve ark 2002)
αVβ3	Endotel hücreleri ve korneal fibroblast (Nam ve ark 2003, Choi ve ark 2015)
αVβ5	Skleral fibroblast ve düz kas hücreleri (Kim ve ark 2002, Lee ve ark 2006)
α7β1	İskelet kası hücreleri (Ferguson ve ark 2003)
αMβ2	Monositler (Kim ve Kim 2008)

İntegrin a3β1 için bağlayıcı motif, FAS1-2 ve FAS1-4 alanlarında yüksek oranda korunmuş izolösin ve aspartat rezidüleridir. FAS1-2 alanındaki bağlayıcı motif NKDIL, FAS1-4 alanındaki bağlayıcı motif ise EPDIM rezidisüdür (Kim ve ark 2000, Bae ve ark 2002). İntegrin αVβ3 ve αVβ5 için bağlayıcı motif ise tirozin, histidin ve lösin/izolösin rezidüleri içeren YH18 rezidisüdür (Kim ve ark 2002, Lee ve ark 2006). TGFBIp ve integrin αVβ3 arasındaki etkileşim RGD motifine bağlıdır (Choi ve ark 2015). RGD motifi iyi bilinen bir integrin bağlanma motifidir, fakat α1β1 ve αMβ2 integrinleri için gözlemlendiğinde FAS1 alanları da bağlanma afinitesine sahip olduğundan dolayı, TGFBIp etkileşimi için her zaman gerekli değildir (Ohno ve ark 1999, Kim ve Kim 2008).

1.5. Kornea

Kornea gözün ön yüzeyinde yer alan, ışığı odaklamak ve gözü dış etkenlerden korumak için özelleşmiş saydam ve avasküler dokudur. Epitel, endotel hücreler ve keratositler korneanın hücresel bileşenleridir. Kolajen ve glikozaminoglikan (GAG)'lardan oluşan matriks ise korneanın hücresiz bileşenidir (Sridhar 2018).

Düzenlenmiş hidrasyon ve korneanın hassas mimarisi objektifin içinden geçen ışığın retinaya iletilmesi için gerekli olan saydamlığı sağlayarak görüntü oluşumunu desteklemektedir (Klausner ve ark 2007).



Şekil 1.15. Gözün şematik gösterimi (Torrecilla ve ark 2018).

Kornea; epitel, bowman membranı, stroma, desme membranı ve endotel olmak üzere 5 katmandan oluşmaktadır (Şekil 1.15). Epitel tabaka yaklaşık 50 mikron kalınlığa sahiptir ve 7-10 günlük bir süre ile rejenere olmaktadır. Epitel hücreler IL-1β, IL-6, IL-8 ve TNF-α gibi proinflamatuar sitokinler salgılayarak gözü mikroorganizma ve toksinlerden korurlar (Eghrari ve ark 2015). Bowman membranı 8-14 mikron kalınlığına sahip hücre içermeyen, pürüzsüz ve rejenere olmayan bir katmandır ve kolajen liflerin rastgele düzenlenmesiyle oluşur. Fizyolojik rolü hala belirsiz olmasına rağmen subepitelyal sinir pleksusunu korumak için fiziksel bir bariyer görevi olduğu düşünülmektedir (Lagali ve ark 2009). Epitel veya endotel tabakalarda meydana gelen herhangi bir hasar korneal şeffaflığın kaybı ile sonuçlanmaktadır (Tidu ve ark 2020).

Stroma, kornea kalınlığının %90'ından fazlasını oluşturan tabakadır. Stroma tabakası, Kolajen Tip I, III, IV, V, VII ve Tip XII ile keratan sülfat, kondroitin sülfat, dermatan sülfat ve lümikan gibi proteoglikanlar ve keratositlerden oluşur. Kolajen fibriller, korneaya özgü bir organizasyonla, paralel olarak düzenlenerek lamel yapılarını oluştururlar ve oluşan lameller birbirlerine 90°'lik açıyla bağlanırlar. Bu düzenli dizilim ile korneanın şeffaf yapısı sağlanır. TGFBIp, hücre dışı matriks için önemli bir bileşen olan kolajenin etkileşim ortağı olarak tanımlanmaktadır. TGFBIp, birçok hücre tipinde çeşitli matriks bileşenlerini birbirine bağlayan ve hücre-kolajen etkileşimlerini kolaylaştıran bağlayıcı protein olarak işlev görür (Poulsen ve ark 2018). Hücre dışı matriksteki genel öneminin yanı sıra, TGFBI proteini, korneadaki özgün rolü ile de önemli bir yer tutmaktadır. TGFBIp, korneanın stroma tabakasının 2. en bol bulunan proteinidir ve Tip I, II, IV, VI ve XII kolajenlerle birlikte kornea

stromasının mimarisinde yapısal bütünlüğün ve şeffaflığının korunmasında kritik rol oynamaktadır. Kolajen Tip I, II ve IV'ün TGFBIp ile kovalent olmayan, kolajen tip VI'nın ise TGFBIp ile hem kovalent hem de kovalent olmayan etkileşimler oluşturduğu gösterilmiştir (Nielsen ve ark 2020). Ancak kolajen-TGFBIp bağlantısının kornea mimarisi için önemli olduğu bilinmekle birlikte TGFBIp miktarının nasıl düzenlendiği tam olarak bilinmemektedir.

Ayrıca, TGFBIp fibronektin, biglikan ve dekorin gibi hücre dışı matriks bileşenlerine de bağlanır. Dekorin ve biglikan gibi proteoglikanlar TGFBIp ile çekirdek proteinleri aracılığıyla bağlanırken, fibronektin ve TGFBIp arasındaki etkileşim fibronektinin kolajen/jelatin bağlama alanı arasında olmaktadır (Billings ve ark 2002, Reinboth ve ark 2006).

Korneal endotelyumun taban zarı olan desme membranı ise kolajen ve lamininden oluşur. Endotel ise başlıca rolü stromal hidrasyonun düzenlenmesi olan 5 mikron kalınlığında bir tabakadır ve rejenerasyon kabiliyeti yoktur. Endotel hücrelerinin herhangi bir şekilde zarar görmesi sonucu stromaya sıvı geçişi olur ve görme kaybı ile sonuçlanır (Klausner ve ark 2007).

1.6. Kornea Distrofileri

Kornea distrofileri 1890 yılında ilk kez Groenouw (Groenouw 1890) tarafından tanımlanmıştır. Korneal distrofiler, korneanın farklı katmanlarında oluşan agregatlardan dolayı korneal şeffaflığın kaybı ve görme bozukluğu ile sonuçlanan, genetik ve epigenetik nedenlere dayalı enflamatuvar olmayan hastalık grubunu içerir. Çevresel, enflamatuvar veya sistemik faktörler korneal distrofilerin oluşumunu etkilemez iken, distrofilerin ilerleyişini etkileyebilir. Korneal distrofiler popülasyonda %0.09 insidans oranına sahiptir (Bourges 2017).

Klinik olarak korneal distrofiler üç gruba ayrılır. Bunlar,

- Anterior kornea distrofileri,
- Stromal distrofileri,
- Posterior kornea distrofileridir (Klintworth 2009).

Uluslararası Kornea Distrofilerinin Sınıflandırılması Komitesi (IC3D) kornea distrofilerini; C1, C2, C3 ve C4 olmak üzere 4 grupta kategorize etmiştir. Tanımlanmış nedensel genler ve bilinen mutasyonlarla ilişkili distrofiler C1

kategorisinde olmak üzere, klinik ve genetik kanıtların hala belirsiz olduğu distrofiler C4 kategorisidir (Weiss ve ark 2015).

Farklı kornea distrofilerine *CHST6, KRT3, KRT12, PIP5K3, SLC4A11, TACSTD2, UBIAD1 ve TGFBI* genlerindeki mutasyonlar neden olmaktadır. Kornea distrofilerinin çoğu monogeniktir, otozomal dominant ya da otozomal resesif kalıtım modeli ile aktarılabilmektedir (Salman ve ark 2022).

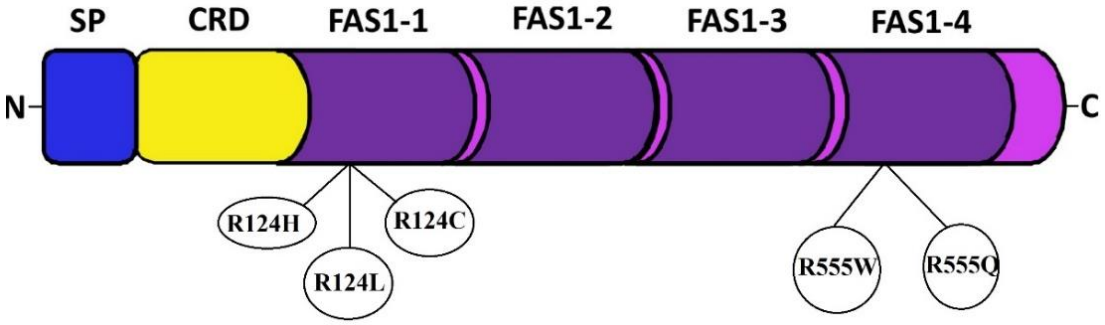
1.6.1. *TGFBI* Geni ile İlişkili Kornea Distrofileri

TGFBI geni mutasyonlarına bağlı olarak ortaya çıkan kornea distrofileri, korneanın çeşitli katmanlarını etkiler ve epitelyal-stromal *TGFBI* kornea distrofileri olarak bilinir. *TGFBI* ilişkili kornea distrofileri güçlü allelik ve fenotipik heterojenite sergilerler (Soh ve ark 2020).

TGFBIp baskın olarak kornea epitel hücrelerinde ifade edilir ve stromal tabakaya taşınır (Han ve ark 2016). *TGFBI* genindeki mutasyonlar, yüzeysel korneada bulanık agregatlar birikmesi sonucu görme bozukluğu oluşan bir dizi kornea distrofisi ile ilişkilendirilmiştir. Kornea distrofileri, *TGFBI* genindeki mutasyonlarla ilişkili bilinen tek patolojik hastalığı temsil eder. Patogenez mekanizmaları tam bilinmemekle birlikte *TGFBI* genindeki mutasyonların protein salgılanmasını veya katlanmasını bozabileceği ve korneada artan stabiliteye sahip mutant TGFBIp agregatlarının birikimi ile sonuçlanabileceği düşünülmektedir (Kannabiran ve Klintworth 2006). Bu birikintiler korneada yırtılmaya, fotofobiye, ağrıya ve sonuç olarak görme kaybına neden olabilmektedir (Han ve ark 2016).

TGFBI geninde bugüne kadar yapılan çalışmalar ile 74 farklı mutasyon tanımlanmış ve bu mutasyonların farklı tip kornea distrofilerine yol açtığı raporlanmıştır (Nielsen ve ark 2020). Bu mutasyonlar tüm *TGFBI* genini kapsasa da sıcak nokta mutasyonları (hotspot) olarak bilinenleri ekzon 4 ve 12'de yer alan R124H, R124C, R124L, R555W, R555Q mutasyonlarıdır (Evans ve ark 2016). Bu hotspot mutasyonlardan R555W Granüler Kornea Distrofisi Tip 1 (GCD1), R124H Granüler Kornea Distrofisi Tip 2 (GCD2), R124C Latis Kornea Distrofisi Tip 1 (LCD1), R124L Reis Buckler Kornea Distrofisi (RBCD), R555Q Thiel-Behnke Kornea Distrofisi (TBCD) ile ilişkilendirilmektedir (Munier ve ark 1997, Okada ve ark 1998). TGFBIp'nin 124. ve 555. rezidülerinde meydana gelen bu

varyasyonlar *TGFBI* geni Fas1-1 ve Fas1-4 domeynlerini kodlayan gen bölgelerindedir (Şekil 1.16) (Courtney ve ark 2015).



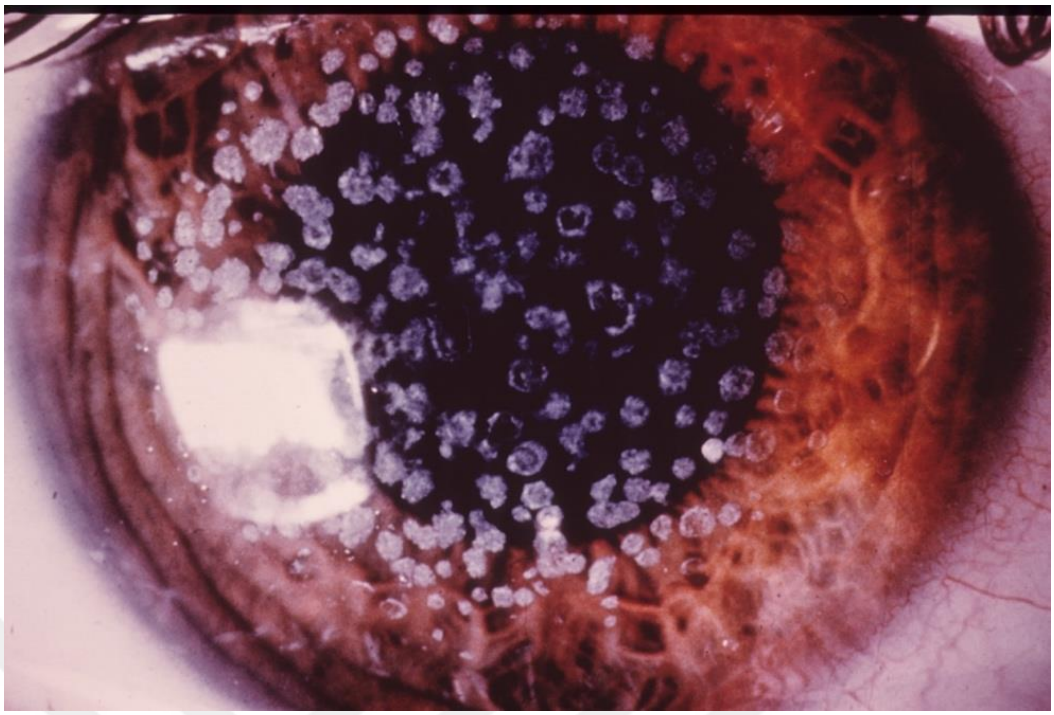
Şekil 1.16. Kornea distrofilerindeki mutasyonları gösteren TGFBIp şematik gösterimi.

1.6.2. Granüler Kornea Distrofisi Tip 1

TGFBI geni ekzon 12'de meydana gelen c.1663C>T transisyonu, proteinin 555. pozisyonunda Argininin (Arg, R) aminoasidinin Triptofan (Trp, W) aminoasidine yer değişimi (R555W) ile sonuçlanır ve bu mutasyon GCD1 ile ilişkilendirilmiştir.

GCD1 otozomal dominant kalıtım gösteren bir hastalıktır. Yaşamın ilk veya ikinci on yılında korneanın stroma tabakasında çoklu, küçük, gri-beyaz renkli granüler agregatlar görülür. Hastalığın erken evresinde agregatlar arasındaki stroma saydam olduğu için görme genellikle etkilenmez, fakat yaşın ilerlemesine bağlı olarak agregatlar daha büyük ve yoğun hale gelerek görme kaybına yol açar (Akiya ve Brown 1970, Weidle ve Lisch 1984). Agregatlar başlangıçta orta ve derin stromada bulunurken, hastalık ilerledikçe tüm stromayı kaplayarak ışığa hassasiyete neden olur. GCD1'e neden olan mutasyonu homozigot veya heterozigot olarak taşıyan hastaların klinik semptomlarında ciddi farklılıklar gözlemlenmekle birlikte, homozigot olduğu durumda hastalığın daha erken yaşlarda başladığı ve çok daha şiddetli ilerlediğine dair raporlar bulunmaktadır (Okada ve ark 1998).

Şekil 1.17'de gösterildiği gibi GCD1'de TGFBIp agregatları ile oluşan değişken şekilli opasiteler birlikte bulunarak görme keskinliğini farklı derecelerde etkilemektedirler (Klintworth 2009).



Şekil 1.17. GCD1 hastalarında TGFBIp agregatların mikroskop ile görüntülenerek fotoğraflanması (https://disorders.eyes.arizona.edu/disorders/corneal-dystrophy-granular).

1.7. Kornea Distrofilerinin Tedavisi

TGFBI geni ile ilişkili kornea distrofilerinde klinikte uygulanan bazı tedavi yöntemleri mevcuttur. Bunlar;

- Jel ya da merhemler ve terapötik kontakt lensler,
- Granüler agregatların kornea yüzeyinden 100 mikron derinliğe kadar ulaştığı hastalarda fototerapötik lazer keratektomi (PTK),
- Granüler agregatların kornea yüzeyinden 100 mikrondan daha derin olduğu hastalarda keratoplasti,
- Kornea transplantasyonudur (Lee ve Kim 2003, Wu ve ark 2021).

Kornea allograft nakli için oldukça başarılı bir dokudur. Fakat mevcut kornea transplantasyon yönetiminde; karmaşık cerrahi prosedürler, uygun donör kornea eksikliği, donör ile ilişkili bulaşıcı hastalık riski, cerrahi sonrası komplikasyonlar, greft reddi ve hastalığın tekrarlaması gibi çeşitli zorluklar vardır (Alio ve ark 2021).

Kornea epiteli limbus bölgesinde bulunan limbal kök hücre kaynaklı sürekli bir rejenerasyon halindedir. Yaşam boyu kendini yenileme kapasitesine sahip olan limbal kök hücreler korneadaki periferal epitel hücrelerini üretme yeteneğine sahiptir. Limbustan korneanın merkezine göç ettikleri, daha sonra hızla çoğaldıkları

ve merkezi kornea epitel hücrelerine farklılaştıkları düşünülmektedir. Bu süreç normal kornea homeostazisi ve yara iyileşmesi sırasında gerçekleşir. *TGFBI* geni ile ilişkili kornea distrofileri epitelyal kökenli olduğundan klinik tedavilerde karşılaşılan en önemli sorun hastalığın tekrarlamasıdır. Çünkü tedaviler kornea epiteli ile sınırlıyken hastalığın kaynağı epitel hücrelerin kökeni olan limbal kök hücrelerdir. Bu durum ise tranplastasyon dahil etkili tüm tedavilerin geçici olmasına neden olmaktadır (Ljubimov ve Saghizadeh 2015). Şu an için agregatların oluşmasını yavaşlatan, durduran ya da yok olmasını sağlayan klinik tedaviler yetersiz kalmaktadır. Bu yüzden kök hücrelere yönelik genetik temelli araştırmalar gün geçtikçe önem kazanmaktadır. Gelecek vaat eden genom düzenleme, miRNA ve kök hücre tedavileri gelişmektedir. Mevcut verilere göre, son on yılda kornea hücrelerinin iyileşmesine ilişkin çalışmalarda ve klinik uygulamalarda önemli ilerlemeler kaydedilmiştir (Han ve ark 2016). Ancak GCD1'e yol açan R555W mutasyonunu düzeltmeyi esas alan gen tedavisine yönelik çalışmalar halen yok denecek kadar azdır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Ekipmanlar

- -20 Buzdolabı (Profilo)
- -80 Derin Dondurucu (Haier)
- CO_2 İnkübatör (Thermo Scientific, 372)
- Elektroforez Güç Kaynağı (Thermo Scientific, EC 300XL2)
- Elektroforez Tankı (Thermo Scientific)
- Elektroporasyon Küveti (Bio-Rad)
- FACS Aria III Flow Sitometri (BD, Pharmingen)
- GenePulser Xcell Elektroporasyon Cihazı (Total System, Bio-Rad)
- Hassas Terazi (Sartorius, GE212)
- İnkübatör (WiseCube, WIG-50)
- Kar Üretme Cihazı (Scotsman)
- Laminar Kabin (Telstar, CytoUltra Class II Cabinet)
- Laminer Hava Akım Kabini (MetiSafe, LFH-120)
- Mikrodalga Fırın (Arçelik, MD 564)
- Mikroskop Dijital Kamera (Olympus, DP72)
- Mini Santrifüj (AOSHENG)
- Nanodrop Cihazı (NanoDrop™ 2000, Thermo Scientific)
- Otoklav (HMC HIRAYAMA)
- Ph Metre (Mettler Toledo Seven Compact)
- Ph Metre (Mettler Toledo Seven Compact)
- Real-Time PCR (Roche, LightCycler® 480 II)
- Soğutmalı Santrifüj (Thermo MicroCL 17R)
- Su Banyosu (Wisebath, WB22)
- Thermal Cycler PCR Cihazı (Bio-Rad, MyCycler)
- Trinoküler İnvert Floresan Mikroskop (Olympus, BX51)
- UV Görüntüleme Cihazı (Vilber Lourmat, Quantum-ST4)
- UV/Vis. Spektrofotometre (Boeco, S-22)
- Vortex (Wisd, WiseMix VM-10)

2.1.2. Kimyasallar ve Sarf Malzemeler

- 1.5 ve 2 ml Ependorf Tüp (Kirgen)
- 10 ml Serolojik Pipet Ucu (İsolab)
- 10 µl Filtreli Pipet Ucu (Kirgen)
- 100 µl Filtreli Pipet Ucu (Kirgen)
- 1000 µl Filtreli Pipet Ucu (Kirgen)
- 15 ml ve 50 ml Steril Falkon Tüp (Kirgen)
- 150 mm petri plakları (İsolab)
- 5 ml Serolojik Pipet Ucu (İsolab)
- 50 ve 100 bç DNA Ladder (Hibrigen)
- 6 ve 12 Kuyucuklu Hücre Kültür Plakları (Sarsted)
- 6X yükleme boyası (Qiagen)
- Agaroz (Sigma, A9539)
- Ampisilin (Gold Biotechnology, A-301-10)
- BbsI Restriksiyon Kesim Enzimi (NEB, R0539S)
- $CaCl.2H_2O$ (Merck, 10035-04-8)
- DH5alpha (*E.coli*) Kimyasal Kompotent Bakteri (NEB, C2992H)
- DNA Marker (Hibrigen)
- dNTP (ThermoScientific, L:4160)
- Drikalski spatülü (Marienfeld Superior)
- Etidyum Bromür (AppliChem, A1152)
- FastStart Essential DNA Green Master (Roche, 06402712001)
- FBS (Gibco, 16000044)
- Filtreli mikropipet uçları (Kirgen)
- Genomik DNA İzolasyon Kiti (Promega, A1120)
- Genomik DNA İzolasyon Kiti (Promega, A2360)
- Gliserol (Sigma, 56-81-5)
- gRNA forward (Sentebiolab)
- gRNA reverse (Sentebiolab)
- HBSS (Gibco, 14175053)
- Jel İzolasyon Kiti (Qiagen, 163045849)
- Jelden DNA ekstraksiyon Kiti (Qiagen, 163045849)

- LB Broth (Sigma, L3522)
- LB Broth with Agar (Sigma, L2897)
- Lymphopure (BioLegend, 426201)
- MgCl2 (ThermoScientific, L:00783322)
- Mikropipet Seti (Eppendorf)
- Opti-MEM (Gibco, 31985062)
- Öze (İsolab)
- PBS (Sigma, P4417)
- pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA Plazmid Vektör (Addgene, #79145)
- PCR Tüpü (Axygen)
- Penisilin/streptomisin (Gibco, 15140122)
- PHA (Gibco, 10576015)
- Plazmid Vektör İzolasyon Kiti (Promega, A1330)
- Polimeraz zincir reaksiyonu primerleri (Sentebiolab)
- Puromisin (Gibco, A1113803)
- pX459V2.0-eSpCas9(1.1) Plazmid Vektör (Addgene, #108292)
- RPMI (Gibco, 21875034)
- rSAP enzimi (NEB, M0371S)
- SOC medyum (NEB, B9020S)
- ssODN (IDT)
- T4 DNA Ligase (NEB, M0202S)
- T4 DNA Ligase (Promega, M1801)
- T4PNK (NEB, M0201S)
- T7 endonükleaz I enzimi (T7E1) (NEB, M0302S)
- TAE Tamponu (Thermo, B49)
- *Taq* DNA polimeraz (Vivantis, PL1202)
- TBS (Sigma, T8154)
- Thoma Lamı (Marienfeld)
- Tris-EDTA Buffer (Sigma, 93283)
- X-tracta™ Jel Ekstraktör (Promega, A2121)

2.2. Yöntem

Çalışmamızda GCD1 tanısı almış ve R555W mutasyonu taşıdığı tespit edilmiş bireylerden elde edilen PBMC'lerde CRISPR/Cas9 teknolojisi kullanılarak R555W mutasyonun düzenlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda çalışma planı, hastaların seçimi ve çalışmaya dahil edilmesi, CRISPR/Cas9 bileşenlerinin tasarlanması, eldesi ve uygun plazmid vektörlere klonlanması, klonlanan vektörlerin PBMC hücrelerine elektroporasyon ile transfeksiyonu, PBMC kültürü ve sürdürülmesi ile hedeflenen genom düzenleme işleminin analiz adımları olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

2.2.1. Hasta Bireyin Çalışmaya Dahil Edilmesi

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalında detaylı oftalmolojik muayenede klinik olarak GCD1 tanısı alan hasta bireyler ve kornea distrofisi veya başka herhangi bir göz hastalığı olmayan sağlıklı bireyler, çalışma hakkında bilgilendirildikten sonra onamları alınarak çalışmaya dahil edildi. Çalışmamız Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu 2021/327 sayılı kararı ile gerçekleştirildi. Çalışmamızın tüm deneysel aşamaları Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi. Çalışmamızın tüm basamakları tam ekipmanlı biyogüvenlik kabininde gerçekleştirilmiştir.

2.2.1.1. DNA Eldesi

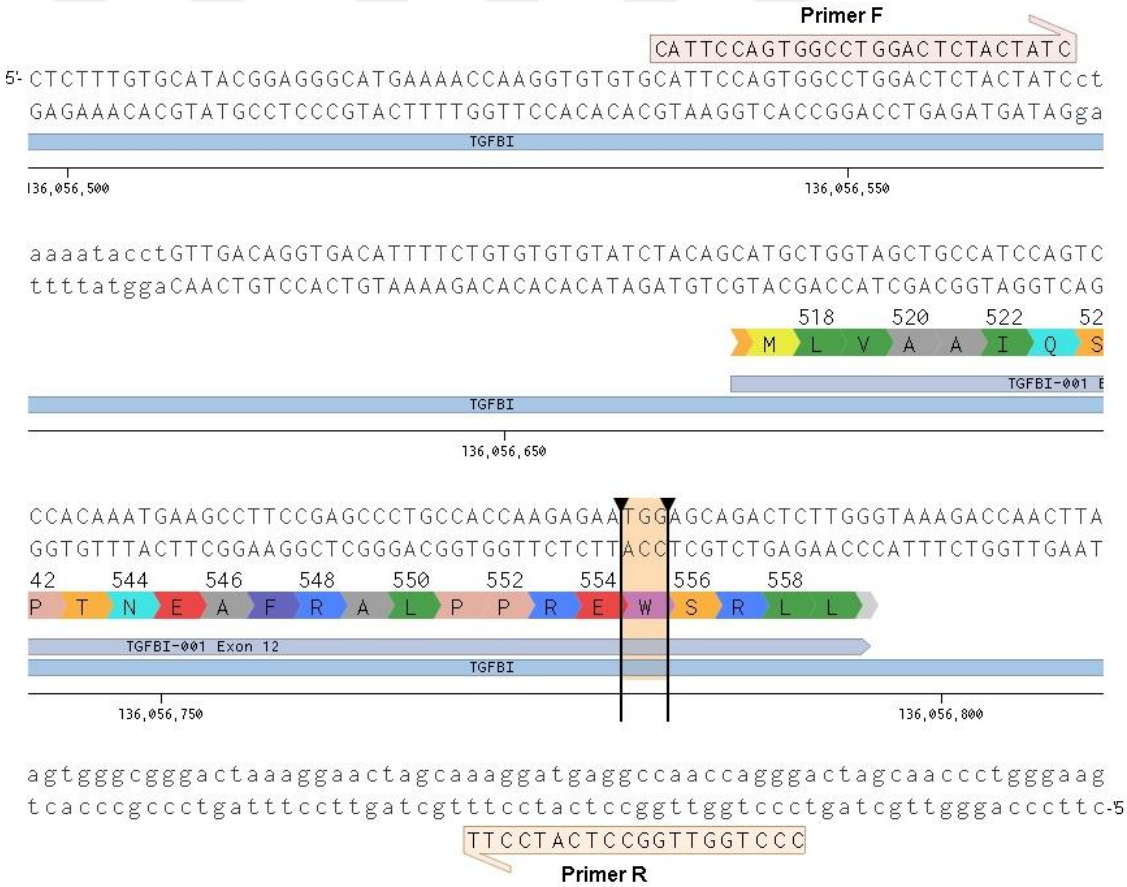
Hasta ve sağlıklı bireylerden EDTA'lı tüplere 10 ml periferal kan alındı. 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilen kan örnekleri, 3000 x g'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası pellet atıldı ve dipte kalan kan hücreleri toplandı. 3 ml soğuk PBS eklenip hücreler tekrar çözülerek yıkandı. Yıkama basamağı 3-4 defa tekrar edildi. Yıkama aşamasının sonunda PBS ortamdan uzaklaştırılarak hücrelerden DNA eldesi 'Wizard® Genomic DNA Purification System' kiti ile üretici firmanın (Promega, ABD; Katalog No: A1120) protokolü takip edilerek yapıldı. Elde edilen DNA'ların konsantrasyon, A_{260}/A_{280} ve A_{260}/A_{230} oranları nanodrop cihazında ölçüldü.

2.2.1.2. PCR-Dizi Analizi Yöntemi

Çalışmaya alınan bireylerin R555W (c.1663C>T) mutasyonu taşıyıp taşımadıkları polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)-dizi analizi ile araştırıldı. *TGFBI* geni ekzon 12 bölgesinin kodlanan bölgesinin tamamı, uygun ileri (Primer F) ve geri (Primer R) primerler ile çalışılarak çoğaltıldı (Şekil 2.1) (Li ve ark 2012). İleri ve geri primer dizileri ve bağlanma sıcaklığı (Tm) Tablo 2.1'de gösterilmiştir. Primerler 100 pmol/µl konsantrasyonda ticari olarak temin edildi.

Tablo 2.1. *TGFBI* geni ekzon 12 bölgesine özgü primerler

Primer	Nükleotid Dizisi	Tm (°C)
F	5'-CATTCCAGTGGCCTGGACTCTACTATC-'3	62.8
R	5'-CCCTGGTTGGCCTCATCCTT-'3	62.8



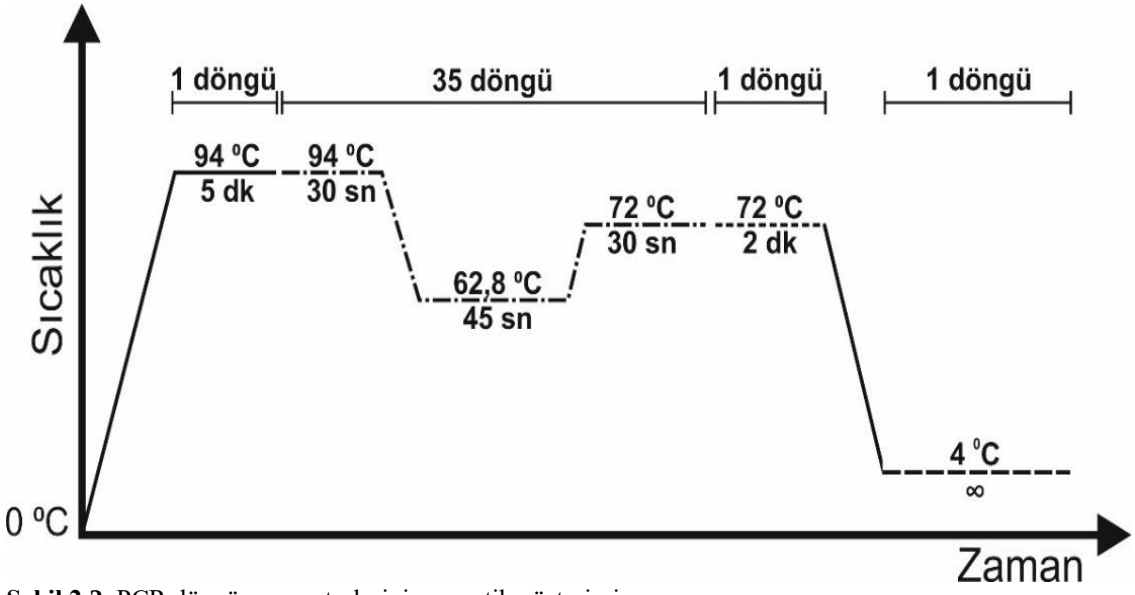
Şekil 2.1. *TGFBI* geni ekzon 12 dizisi ve spesifik primerlerin şematik gösterimi. İleri ve geri primerler (F ve R) kutu içinde gösterilmektedir. Ekzon 12 R555W mutasyonu koyu alan olarak işaretlenmiştir.

PCR reaksiyonu toplam 10 µl olacak şekilde biyogüvenlik kabini içerisinde buz üzerinde hazırlandı (Tablo 2.2).

Tablo 2.2. PCR reaksiyonu için gerekli bileşen ve miktarları

Bileşenler	**Miktar (µL)**
ddH_2O (Steril)	6,525 µl
PCR buffer (10x)	1 µl
dNTP (2 mM)	0,7 µl
$MgCI_2$ (25 mM)	1 µl
F primer	0.06 µl
R primer	0.06 µl
Taq DNA polimeraz (Vivantis)	0,055 µl
DNA (50ng)	0,6 µl

PCR tüpleri thermocycler PCR (MyCycler, Bio-Rad) cihazına yerleştirilerek Şekil 2.2'de verilen basamaklar izlendi ve toplam 35 döngü olacak şekilde programlandı.



Şekil 2.2. PCR döngü parametrelerinin şematik gösterimi.

Agaroz Jel Elektroforezi

Elde edilen PCR reaksiyon ürünleri agaroz jel elektroforez yöntemi ile kalitatif olarak değerlendirildi.

%1'lik Agaroz Jel Hazırlanması

- Agaroz (Sigma, ABD) …….....…..…… 1 gr
- 1X Tris-Asetat-EDTA (TAE) tamponu (Sigma, ABD) ..…..... 100 mL
- Etidyum bromür (AppliChem) ….....……..……... 5 µl

Agaroz ve 1X TAE tamponu ile oluşturulan solüsyon mikrodalga fırında ısıtılarak homojen hale getirildi. 40-45°C'ye kadar soğutulan homojen solüsyona etidyum bromür eklendi. Solüsyon, içerisinde tarak olan jel tepsisine döküldü. Jel oluşumunu takiben jel tepsisi elektroforez tankına alındı. Tankın içine 1X TAE tamponu eklenip tarak çıkartılarak kuyular oluşturuldu.

Örneklerin Jele Yüklenmesi

6X yükleme boyası (Qiagen, Hollanda) ……...…….. 2 µl

PCR reaksiyon ürünleri …….....……..… 10 µl

6X yükleme boyası ile renklendirilen PCR reaksiyon ürünleri ve 100 bç DNA moleküler boyut belirteci (Hibrigen) farklı kuyulara yüklendi.

Örneklerin Jelde Yürütülmesi ve Görüntülenmesi

90 Volt (V) elektrik potansiyeli 1 saat uygulanarak yürütme işlemi tamamlandı. UV görüntüleme cihazı (Quantum Vilber Lourmat) kullanılarak jel görüntülendi ve fotoğraflandı.

Dizi Analizi

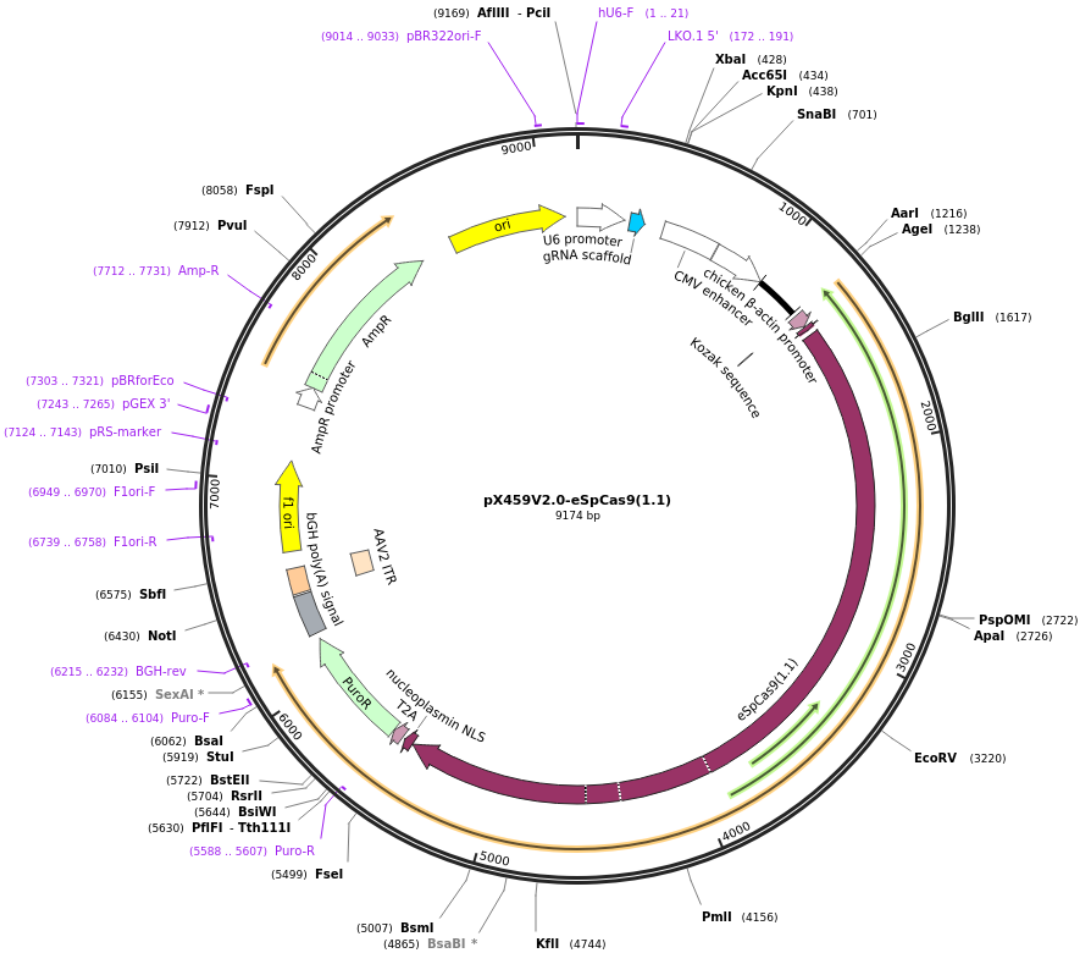
TGFBI geni ekzon 12 bölgesi çift yönlü dizi analizi Bmlabosis Biyoteknoloji firması tarafından Sanger dizileme yöntemi ile elde edildi. DNA dizi analizinde oluşabilecek olası hatalı sonuçları önlemek için çift yönlü dizi analizi yapıldı. Elde edilen dizi sonuçları SnapGene programı ile pik şeklinde görüntülendi ve NCBI blast online uygulaması ile gen bankasındaki dizilerle eşleştirildi. Blast sonuçları ve pik görüntüleri dikkatli bir biçimde karşılaştırılarak değişiklikler değerlendirildi.

2.2.2. CRISPR/Cas9 Yapılarının Oluşturulması

2.2.2.1. Plazmid Vektör Seçimi

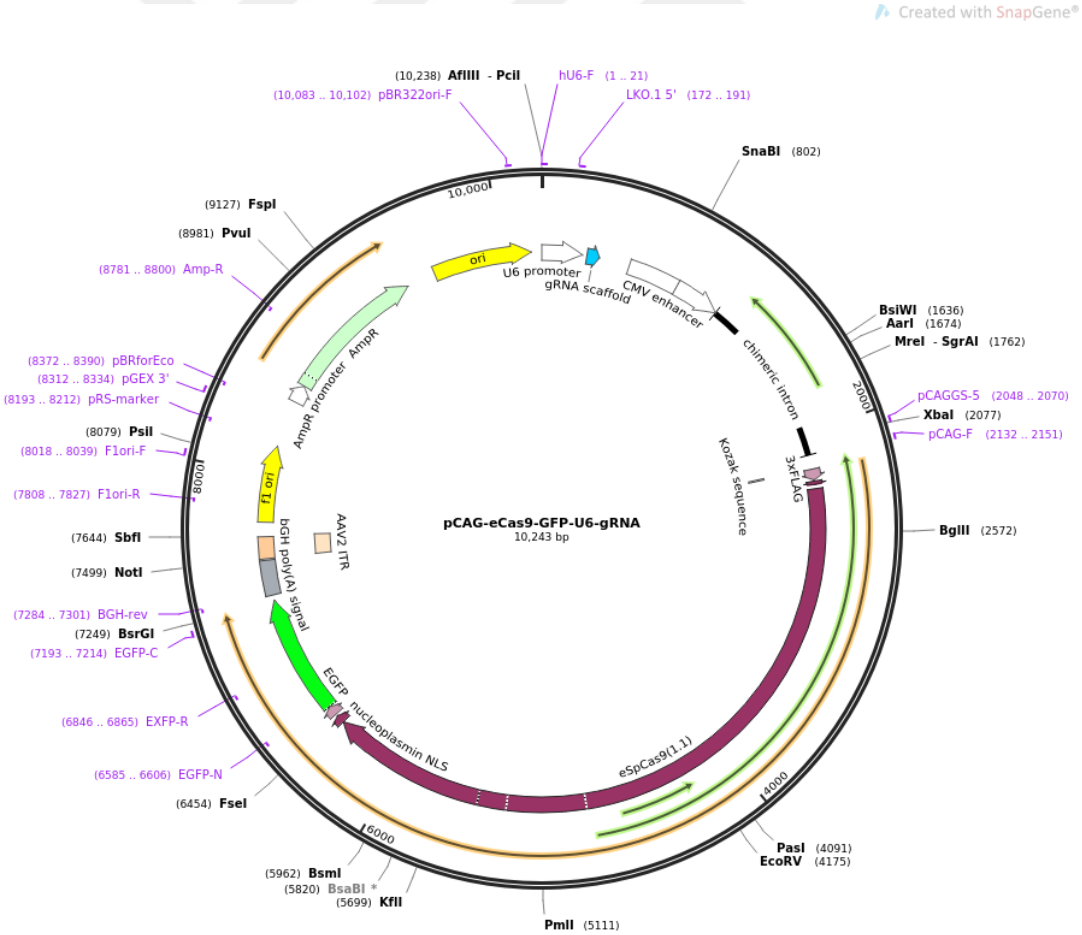
Çalışmamızda CRISPR/Cas9 yapıları pX459V2.0-eSpCas9(1.1) (Addgene, #108292) (Kato-Inui ve ark 2018) plazmid vektörü ile oluşturuldu. 9174 bç pX459V2.0-eSpCas9(1.1) plazmid vektörü; bakteriyel replikasyon bölgesi (f1ori), transkripsiyon için promotor bölge (U6 promoter), transkripsiyon düzenleyici bölge (CMV), restriksiyon kesim ve gRNA scaffold bölgesi, β-actin promotor bölge, kozak sekans bölgesi (translasyonu başlatmak için gerekli motif), Cas9 endonükleaz kodlama bölgesi (eSpCas9), nükleer lokalizasyon sinyal (NLS) dizisi, plazmid transformasyonu gerçekleştirilen bakterilerin seçilimini sağlayan ampisilin antibiyotik direnç (AmpR) bölgesi ve plazmid transfeksiyonu gerçekleştirilen ökaryotik hücrelerin seçilimini sağlayan puromisin antibiyotik direnç (PuroR) gen bölgesini içermektedir (Şekil 2.3).

Created with SnapGene®



Şekil 2.3. pX459V2.0-eSpCas9(1.1) plazmid vektör yapısının şematik gösterimi (https://www.addgene.org/108292/).

Çalışmamızda ikinci bir vektör olarak pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA (Addgene, #79145) plazmid vektörü kullanıldı. 10243 bç pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid vektörü; bakteriyel replikasyon bölgesi (F1 ori), transkripsiyon için promotor bölge (U6 promoter), transkripsiyon düzenleyici bölge (CMV), restriksiyon kesim ve gRNA scaffold bölgesi, kozak sekans bölgesi (translasyonu başlatmak için gerekli motif), Cas9 endonükleaz kodlama bölgesi (eSpCas9), plazmid transformasyonu gerçekleştirilen bakterilerin seçilimini sağlayan ampisilin antibiyotik direnç (AmpR) gen bölgesi içermektedir. Ayrıca pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid vektörü yapısında yeşil floresan protein (EGFP, enhanced green fluorescent protein) gen bölgesi bulunmaktadır (Şekil 2.4). EGFP gen bölgesi ise ökaryotik hücrelerde GFP kodlar ve GFP floresan/konfakal mikroskoplar ile incelendiğinde görüntülenebilir. Seçilen transfeksiyon yöntemi ve optimizasyonun doğrulanması için floresan/konfokal mikroskopta izlenebilir olan pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid vektörü ikinci bir vektör olarak kullanılmıştır.



Şekil 2.4. pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid vektör yapısının şematik gösterimi (https://www.addgene.org/79145/).

2.2.2.2. sgRNA Tasarımı

CRISPR/Cas9 tekniğinde tasarlanan sgRNA oligosunun etkinliği ve özgüllüğü bazı hususlara bağlıdır. Bunlar;

- Tasarlanan sgRNA oligoların PAM dizisi bitişiğinde olması,
- 20-25 nt uzunluğunda olması,
- *Off-target* ve *on-target* değerleri,
- Düzenleme yapılacak bölge ya da 50-100 nt mesafede DSB oluşturmasıdır.

Tüm bu hususlar dikkate alınarak, *TGFBI* geni ekzon 12 bölgesi R555W mutasyonun düzenlenmesine yönelik sgRNA oligoları https://www.benchling.com/ adresi üzerinden ulaşılabilen online uygulaması kullanılarak tasarlandı. 5'-3' (+) ve 3'-5' (-) yönünde DNA zincirlerine spesifik *on-target* ve *off-target* değerleri en yüksek olan sgRNA'lar seçildi (Şekil 2.5).

Target Region 136056771 136056790 +

Start	End	Annotations	Genome Region
136056665	136056795	TGFBI-001 Exon 12	chr5 136.056.665—136.056.795

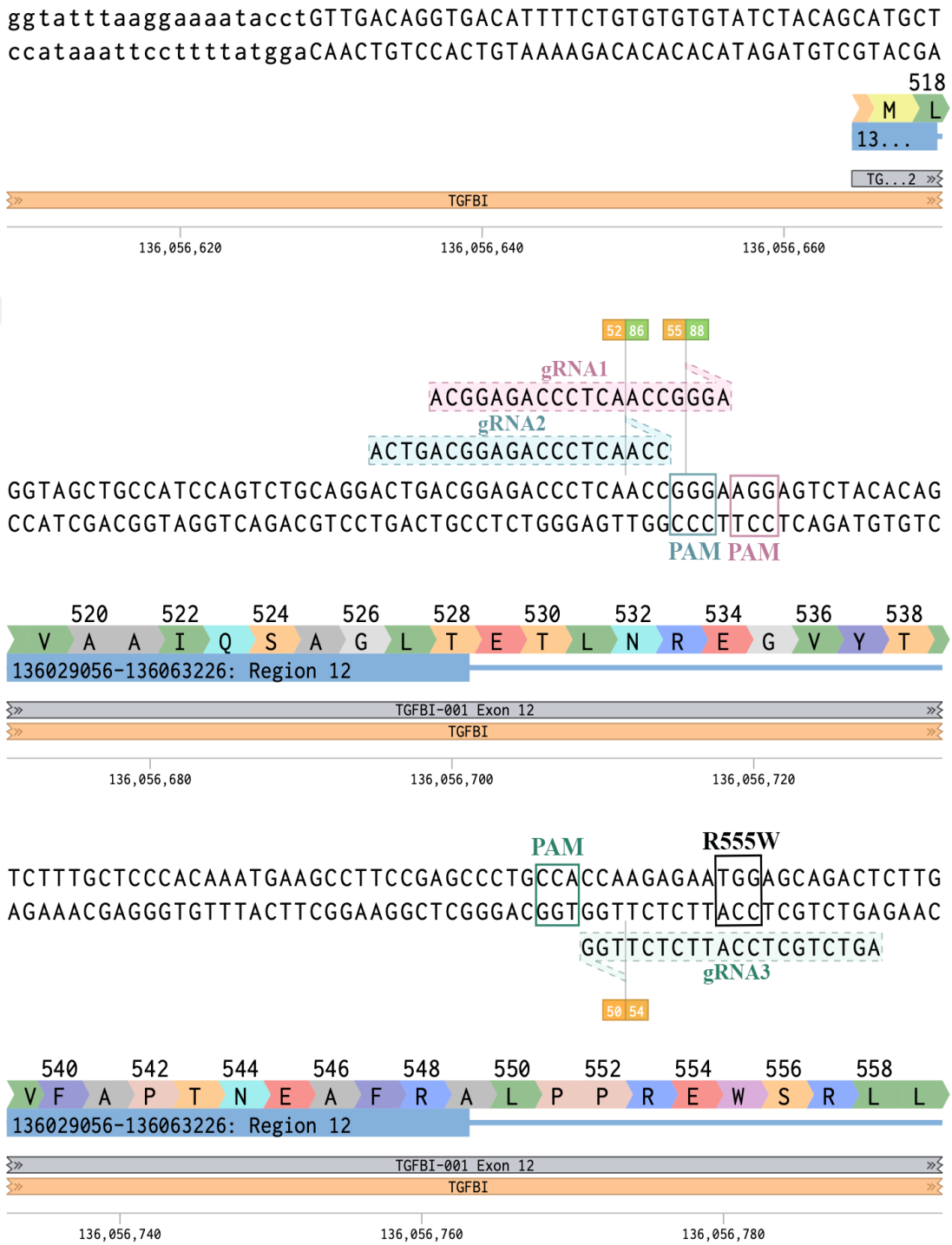
Export Save Assemble 3 selected 1-20 of 20 Prev Next

Cut Position	Strand	Guide Sequence	PAM	On-Target Score	Off-Target Score
136056716	+	ACGGAGACCCTCAACCGGGA	AGG	56.0	88.4
136056712	+	ACTGACGGAGACCCTCAACC	GGG	52.4	86.5
136056697	+	CATCCAGTCTGCAGGACTGA	CGG	51.9	58.9
136056774	–	AGTCTGCTCCATTCTCTTGG	TGG	50.1	54.4
136056719	–	AGACTGTGTAGACTCCTTCC	CGG	49.0	72.6
136056689	+	GTAGCTGCCATCCAGTCTGC	AGG	48.5	73.5
136056713	–	TGTAGACTCCTTCCCGGTTG	AGG	47.2	87.9
136056689	–	TCTCCGTCAGTCCTGCAGAC	TGG	45.8	68.8

Şekil 2.5. Tasarlanan sgRNA oligoların *on-target* ve *off-target* değerleri. İşaretlenmiş sgRNA'lar çalışmada kullanılmak üzere seçildi.

TGFBI geni ekzon 12 bölgesi için tasarlanan sgRNA oligoları,

- sgRNA1: 5'-ACGGAGACCCTCAACCGGGA-'3,
- sgRNA2: 5'-ACTGACGGAGACCCTCAACC-'3,
- sgRNA3: 5'-AGTCTGCTCCATTCTCTTGG-'3 dizilimindedir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. sgRNA1, sgRNA2 ve sgRNA3 oligoların PAM dizileri, *on-target* ve *off-target* değerleri sırasıyla turuncu ve yeşil kutucuklar içerisinde gösterilmiştir. R555W mutasyonun konumu siyah kutucuk ile işaretlenmiştir.

Tasarlanan sgRNA oligoların insan genomu içerisindeki homolojisi blastlama (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) yapılarak kontrol edildi. Blastlama işleminin organizmaya özgü blast sayfasından yapılması, tasarlanan sgRNA oligoların *off-target* etkisi ihtimalinin önüne geçilmesinde büyük önem arz etmektedir.

sgRNA dizilerinin çalışmada kullanılan pX459V2.0-eSpCas9(1.1) ve pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid vektör yapılarına klonlanması ve hücre içerisinde salınımı için bazı nükleotid eklentileri yapıldı. Bunlar;

- Restriksiyon kesim sonrası vektörde açığa çıkarak yapışkan uç oluşturacak nükleotidlere komplementer dizi eklentileri,
- Vektör yapısında var olan U6 RNA polimeraz için başlangıç nükleotidi olarak kabul edilen 5' uçlara eklenecek guanin (G) nükleotid eklentisini içermeleri gerekmektedir.

pX459V2.0-eSpCas9(1.1) ve pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid vektör yapıları çift zincirli DNA yapısındadır. pX459V2.0-eSpCas9(1.1) ve pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid vektörlere klonlanacak herhangi bir dizinin komplementeri ile oligodubleks haline getirilmesi gerekir. Bundan dolayı sgRNA1, sgRNA2 ve sgRNA3 oligoları ileri ve geri sgRNA çiftleri olarak liyofilize halde Sentebiolab firmasından temin edildi.

Tablo 2.3. CRISPR/Cas9 yapısı için tasarlanan sgRNA oligoları.

sgRNA1_F	caccGACGGAGACCCTCAACCGGGA
sgRNA1_R	aaacTCCCGGTTGAGGGTCTCCGTC
sgRNA2_F	caccGACTGACGGAGACCCTCAACC
sgRNA2_R	aaacGGTTGAGGGTCTCCGTCAGTC
sgRNA3_F	caccGAGTCTGCTCCATTCTCTTGG
sgRNA3_R	aaacCCAAGAGAATGGAGCAGACTC

Kırmızı renkte gösterilen diziler tasarlanan sgRNA1, sgRNA2 ve sgRNA3 oligoları ile komplementer dizilerine aittir, siyah renkte gösterilen diziler ise G nükleotid ve restriksiyon kesimi sonrası vektöre ligasyon için yapışkan uç oluşturacak (5'cacc..... '3, 3'aaac..... '5) eklentilerdir.

2.2.2.3. DH5alpha (*E.coli*) Kimyasal Kompotent Bakterilerin Çoğaltılması

Çalışmamızda ticari olarak temin edilen DH5alpha (*E.coli*) (NEB, İngiltere) kimyasal kompotent bakterileri kullanıldı. Öncelikle kimyasal kompotent bakteri stok sayısı artırıldı.

LB Broth Besiyeri Hazırlama

- LB (Luria Bertani) broth (Sigma), ABD) …….....…..…… 0,25 gr
- ddH_2O ..……..... 10 mL

Çalışmalarımızda kullanılan tüm LB broth besiyerleri 25 gr/L olacak şekilde hazırlandı. 0,25 gr LB broth tartılarak kapaklı erlen içerisinde 10 mL ddH_2O ile çözüldü. 121ºC 15 dk otoklav uygulaması ile LB broth besiyeri hazırlandı.

Kimyasal Kompotent Bakteri Hücrelerinin Çoğaltılması

- 50 µl DH5alpha (*E.coli*) kimyasal kompotent bakterileri 10 mL LB broth medyum içerisine transfer edildi. Gece boyu 37°C'de 150 rpm çalkalamalı etüvde inkübe edilerek ön kültür oluşturuldu.
- Ön kültürden 500 µl alınıp 50 mL LB broth besiyerine transfer edilerek ana kültür oluşturuldu.
- Ana kültür 37°C' de 150 rpm çalkalamalı etüvde inkübe edildi.
- Yaklaşık 1-2 saat sonra OD_{600} değeri 0,35-0,4 arasına ulaştığında ana kültür 50 mL steril falkon tüpe aktarıldı.
- 6000 rpm'de 4°C'de 8 dk santrifüj yapılarak bakteriler çöktürüldü ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- Bakteriler üzerine 20 mL $CaCl.2H_2O$ (50 mM) (Merck, ABD) çözeltisi ilave edilip 20 dk buzda bekletildi.
- 6000 rpm'de 4°C'de 8 dk santrifüj yapılarak bakteriler tekrar çöktürüldü ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- Bakteriler üzerine %10 steril gliserol (Sigma, ABD) içeren 2,5 mL $CaCl_2$ eklenerek hafifçe pipetaj yapıldı.
- Steril 2 mL'lik ependorf tüplerde 100 µl alikotlara ayrılarak hazırlanan DH5alpha (*E.coli*) kimyasal kompotent bakterileri -80°C'de stoklandı.

2.2.2.4. Plazmidlerin Bakterilere Transformasyonu ve Çoğaltılması

pX459V2.0-eSpCas9(1.1) ve pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid örnekleri ısı-şok transformasyon metodu olarak bilinen aşağıda verilen adımlar uygulanarak DH5alpha (*E.coli*) kimyasal kompotent bakterilerine aktarıldı.

LB Agar Besiyeri Hazırlama

- LB agar (Sigma, ABD) ..….....…...…....……..…...… 3,5 gr
- ddH_2O ……...……...…..... 100 mL
- Ampisilin (Gold Biotechnology, ABD) …….....……... 100 µg/mL

Çalışmalarımızda kullanılan bütün LB agar besiyerleri 35 gr/L olacak şekilde hazırlandı. 3,5 gr LB agar tartılarak cam şişe içerisinde 100 mL ddH_2O ile çözüldü. 121ºC'de 15 dk otoklav işlemine tabi tutuldu. Otoklav işlemi sonrası LB agar sıvı çözeltisine 100 µg/mL ampisilin antibiyotik eklendi. Biyogüvenlik kabini içerisinde beck alevi yakınında LB agar sıvı çözeltisi katı hale gelmeden steril plaklara yaklaşık 20 mL olacak şekilde dağıtıldı.

- Kimyasal kompotent DH5alpha (*E.coli*) bakterileri içeren iki adet ependorf tüp -80°C'den alınıp buz üzerinde çözünmesi sağlandı. Tüplere sırasıyla 1-5 µl (100 ng) pX459V2.0-eSpCas9(1.1) ve pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid örnekleri eklendi.
- Ependorf tüpler sırası ile buz üzerinde 30 dk, su banyosunda 42°C 30 sn ve buz üzerinde 5 dk bekletilerek bakterilerin ısı-şok işlemine maruz kalması sağlandı.
- Isı-şok işlemi sonrası ependorf tüplere 950 µl SOC medyum (NEB, İngiltere) eklenerek 37°C 250 rpm çalkalamalı etüvde 60 dk inkübe edildi.
- 60 dk inkübasyon sonrası ependorf tüplerden 250 µl numune alınarak LB-ampisilin plaklarına aktarıldı.
- Steril cam öze ile yayma ekim yapılarak gece boyu 37°C'de inkübasyona bırakıldı.
- Gece boyu inkübasyona bırakılan LB-ampisilin plaklarında koloni oluşumu gözlemlendi.

2.2.2.5. Bakterilerden Plazmid Eldesi

LB-ampisilin plaklarında koloni oluşturan DH5alpha (*E.coli*) bakterilerinden plazmid eldesi için aşağıda verilen adımlar sırası ile takip edildi.

- Transformasyon sonrası LB-ampisilin plaklarında oluşan bakteri kolonilerinden steril öze ile rastgele seçilip içerisinde ampisilin (100 µg/ml) bulunan 10 mL LB broth besiyerleri içerisine aktarıldı.
- 16 saat 37ºC 150 rpm'de çalkalamalı etüvde inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası LB broth besiyerleri içerisinden 2 mL alınarak steril 2 mm'lik ependorf tüplere aktarıldı.
- 10000 g'de 5 dk santrifüj yapıldı.
- Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı ve bakteriler elde edildi.

DH5alpha (*E.coli*) bakterilerinden pX459V2.0-eSpCas9(1.1) ve pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid eldeleri 'Wizard® *Plus* SV Minipreps DNA Purification System' kiti ile üretici firmanın (Promega, ABD, Katalog No:A1330) protokolü takip edilerek yapıldı.

Elde edilen pX459V2.0-eSpCas9(1.1) ve pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid DNA konsantrasyon, A_{260}/A_{280} ve A_{260}/A_{230} oranları nanodrop cihazında (NanoDrop™ 2000, Thermo Scientific) ölçüldü.

2.2.2.6. Plazmidlerin Agaroz Jel Elektroforezi Yönteminde Doğrulanması

Elde edilen plazmid DNA örnekleri agaroz jel elektroforez yöntemi kullanılarak kalitatif olarak değerlendirildi.

%1'lik Agaroz Jel Hazırlanması

- Agaroz ……..……..... 1 gr
- 1X TAE tamponu….……....…….....……... 100 mL
- Etidyum bromür ….....…….....……...… 5 µl

Agaroz ve 1X TAE tamponu ile oluşturulan solüsyon mikrodalga fırında ısıtılarak homojen hale getirildi. 40-45°C'ye kadar soğutulan homojen solüsyona etidyum bromür eklendi. Solüsyon, içerisinde tarak olan jel tepsisine döküldü. Jel oluşumunu takiben jel tepsisi elektroforez tankına alındı. Tankın içine 1X TAE tamponu eklenip tarak çıkartılarak kuyular oluşturuldu.

Örneklerin Jele Yüklenmesi

- 6X yükleme boyası ....……....…...…… 1 µl
- Sirküler pX459V2.0-eSpCas9(1.1) .....…….....…… 3 µl

- Sirküler pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid .....….....…. 3 µl
- DNA moleküler boyut belirteci ….....……...…….....…… 3 µl

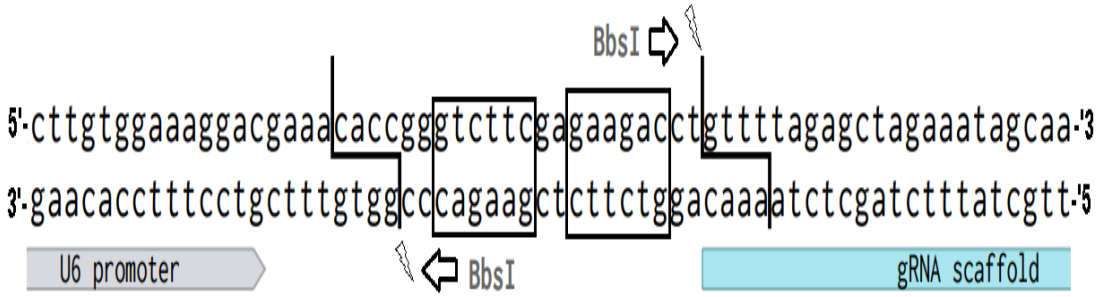
6X yükleme boyası ile renklendirilen pX459V2.0-eSpCas9(1.1), pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid DNA örnekleri ve 1000 bç DNA moleküler boyut belirteci farklı kuyulara yüklendi.

Örneklerin Jelde Yürütülmesi ve Görüntülenmesi

90 V elektrik potansiyeli 1 saat uygulanarak yürütme işlemi tamamlandı. UV görüntüleme cihazı kullanılarak jel görüntülendi ve fotoğraflandı.

2.2.2.7. Plazmid Kesim ve Defosforilizasyonu

pX459V2.0-eSpCas9(1.1) ve pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid DNA'sını gRNA scaffold bölgesinden kesmek için BbsI (NEB, İngiltere) Tip II restriksiyon enzimi kullanıldı. BbsI restriksiyon enzimi pX459V2.0-eSpCas9(1.1) ve pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid vektörlerini Şekil 2.7'de gösterildiği gibi gRNA scaffold bölgelerinde var olan 5'…G A A G A C (N) 2 ↓…3' ve 3'...C T T C T G (N) 6 ↑...5' dizilimlerden tanıyarak kesmektedir.



Şekil 2.7. BbsI restriksiyon enziminin pX459V2.0-eSpCas9(1.1) ve pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid DNA dizileri üzerinde tanıma ile kesim bölgelerinin (5'…G A A G A C (N) 2 ↓…3' ve 3'...C T T C T G (N) 6 ↑...5') kutucuklar içerisinde şematik olarak gösterilmesi.

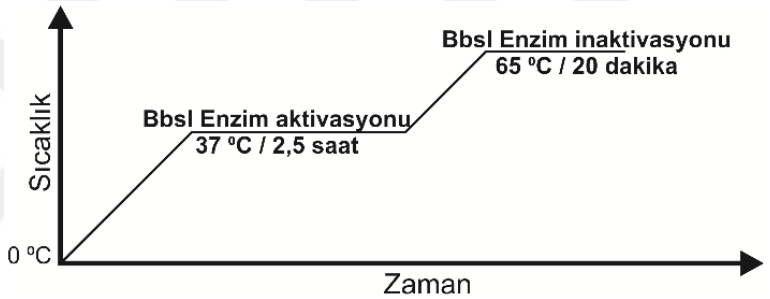
pX459V2.0-eSpCas9(1.1) ve pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid vektörleri için PCR tüpleri içerisinde BbsI restriksiyon enzim reaksiyon koşulları oluşturuldu (Tablo 2.4).

Tablo 2.4. BbsI restriksiyon enzim kesim reaksiyon bileşenleri.

Reaksiyon bileşenleri
1 µg pX459V2.0-eSpCas9(1.1) veya pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid DNA
2 µl 10x NEBuffer
1 µl BbsI restriksiyon enzim
X µl ddH_2O
20 µl toplam hacim

pX459V2.0-eSpCas9(1.1) ve pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid vektör kesim ve defosforilizasyon işlemleri için iki farklı PCR tüpünde BbsI restriksiyon enzim reaksiyonu kuruldu.

PCR tüpleri thermocycler PCR cihazına yerleştirilerek Şekil 2.8'de belirtilen basamaklar takip edildi.



Şekil 2.8. BbsI restriksiyon enzimi sıcaklık döngüsünün şematik gösterimi.

Kesilen pX459V2.0-eSpCas9(1.1) ve pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid DNA yapıları 5' fosfat gruplarının kaldırılarak stabilizasyonunun sağlanması için defosforilizasyon işlemi yapıldı. Defosforilizasyon işlemi alkalin fosfataz (rSAP) enzimi kullanılarak yapıldı. rSAP karidesten elde edilmiş ısıya duyarlı bir alkalin fosfatazdır.

PCR tüplerine 1 µl rSAP (NEB, İngiltere) enzimi eklendi. Restriksiyon kesim reaksiyonunda kullanılan enzim buffer, rSAP enzimi içinde geçerli olduğundan enzim buffer kullanılmadı.

PCR tüpleri thermocycler PCR cihazına yerleştirilerek 37ºC'de 30 dk defosforilizasyon işlemi yapıldı. Defosforilizasyon işlemini takiben PCR cihazında 65ºC'de 20 dk daha inkübasyon yapılarak rSAP enzim inaktivasyonu gerçekleştirildi.

2.2.2.8. Plazmid Kesiminin Agaroz Jel Elektroforezinde Yürütülmesi

BbsI restriksiyon tip 2 enzimi ile kesim sonrası;

- Açığa çıkan DNA fragmanları pX459V2.0-eSpCas9(1.1) ve pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid DNA'larından uzaklaştırmak,
- Kesilmiş sirküler pX459V2.0-eSpCas9(1.1) ve pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid DNA yapılarını lineer pX459V2.0-eSpCas9(1.1) ve pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid DNA yapılarına dönüştürmek için agaroz jel elektroforez yöntemi kullanıldı.

%1'lik Agaroz Jel Hazırlanması

- Agaroz ……...……..... 1 gr
- 1X TAE tamponu ...……....…….……... 100 mL
- Etidyum bromür ….....……...…...… 5 µl

Agaroz ve 1X TAE tamponu ile oluşturulan solüsyon mikerodalga fırında ısıtılarak homojen hale getirildi. 40-45°C'ye kadar soğutulan homojen solüsyona etidyum bromür eklendi. Solüsyon, içerisinde tarak olan jel tepsisine döküldü. Jel oluşumunu takiben jel tepsisi elektroforez tankına alındı. Tankın içine 1X TAE tamponu eklenip tarak çıkartılarak kuyular oluşturuldu.

Jele Yükleme

- 6X yükleme boyası ……...…..…….....……..... 4 µl
- pX459V2.0-eSpCas9(1.1) plazmid kesim reaksiyonu ..... 21 µl
- pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid kesim reaksiyonu ..... 21 µl

pX459V2.0-eSpCas9(1.1) ve pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid kesim reaksiyonları 6X yükleme boyası ile renklendirilerek farklı kuyulara yüklendi.

Jelde Yürütme

70 V elektrik potansiyeli 90 dk uygulanarak yürütme işlemi tamamlandı. UV transilüminatör (Bio-Rad, ABD) yardımıyla jel üzerinde bantlar görüntülenerek fotoğraflandı.

2.2.2.9. Plazmidlerin Jelden Eldesi

Bant gözlemlenen jel bölgeleri X-tracta™ jel ekstraktör (Promega, ABD) ile çıkartıldı. Lineer pX459V2.0-eSpCas9(1.1) ve pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid DNA'ların jelden eldesi 'QIAquick Gel Extraction Kit' ile üretici firmanın (Qiagen, Hollanda; Katalog No:28704) protokolü takip edilerek yapıldı.

Lineer pX459V2.0-eSpCas9(1.1) ve lineer pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid DNA konsantrasyon, A_{260}/A_{280} ve A_{260}/A_{230} oranları nanodrop cihazında ölçüldü.

2.2.2.10. Restriksiyon Kesim ve Defosforilizasyon İşlemlerinin Doğrulanması

Elde edilen lineer pX459V2.0-eSpCas9(1.1), lineer pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid yapılarını doğrulamak için sirküler pX459V2.0-eSpCas9(1.1), sirküler pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid DNA yapıları ve yalnızca su kullanılan aşağıda gösterilen 5 farklı ısı-şok transformasyon reaksiyonu gerçekleştirildi.

- Sirküler pX459V2.0-eSpCas9(1.1) plazmid DNA ..... DH5alpha (*E.coli*)
- Sirküler pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid DNA . DH5alpha (*E.coli*)
- Lineer pX459V2.0-eSpCas9(1.1) plazmid DNA ..... DH5alpha (*E.coli*)
- Lineer pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid DNA .... DH5alpha (*E.coli*)
- ddH_2O ....……...…. DH5alpha (*E.coli*)

3,5 gr LB agar tartılarak cam şişe içerisinde 100 mL ddH_2O ile çözüldü. 121ºC'de 15 dk otoklav işlemine tabi tutuldu. Otoklav işlemi sonrası LB agar sıvı çözeltisine 100 µg/mL ampisilin antibiyotik eklendi. Biyogüvenlik kabini içerisinde beck alevi yakınında LB agar sıvı çözeltisi steril plaklara yaklaşık 20 mL olacak şekilde dağıtılarak ampisilin plakları hazırlandı.

Transformasyon ürünleri 37°C 250 rpm'da çalkalamalı etüvde 60 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 250 µl transformasyon reaksiyon ürünleri alınarak LB-ampisilin plaklarına aktarıldı. Steril cam öze ile yayma ekim yapılarak gece boyu 37ºC'de inkübasyona bırakıldı.

2.2.2.11. sgRNA'ların Oligodubleks Hale Getirilmesi

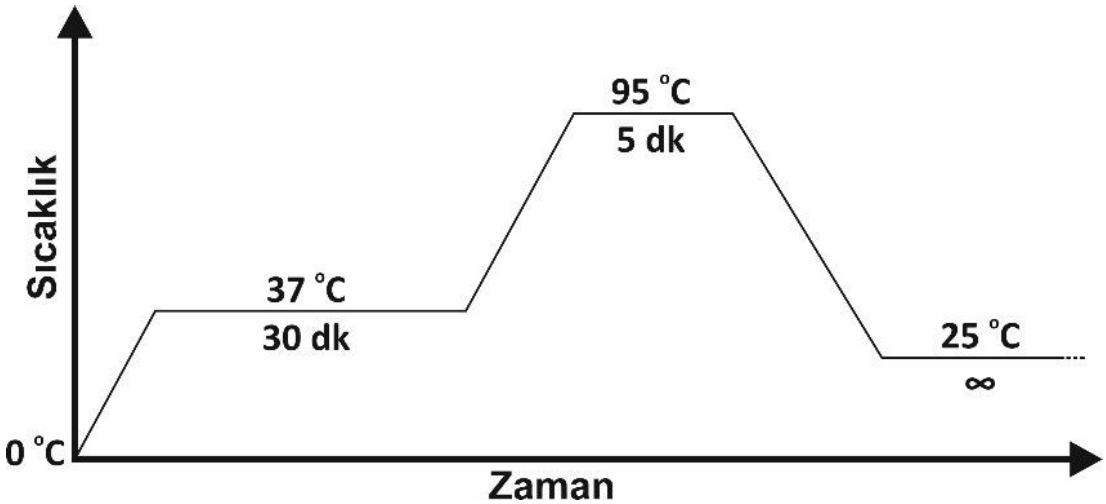
Ticari olarak Sentebiolab firmasından liyofilize halde temin edilen sgRNA1, sgRNA2 ve sgRNA3 oligoları mikrolitrelede 100 pmol/µl olacak şekilde Tris-EDTA (TE) buffer (Sigma, ABD) ile çözüldü.

Çözünen sgRNA1, sgRNA2 ve sgRNA3 oligoların 5' uçlarına fosfat grupları eklemek için T4 Polinükleotid Kinaz (T4PNK) (NEB, İngiltere) enzimi kullanıldı. sgRNA1, sgRNA2 ve sgRNA3 oligo çiftleri için farklı PCR tüplerinde T4PNK enzim reaksiyonu kuruldu. PCR tüpleri içerisinde T4PNK enzim reaksiyon koşulları oluşturuldu (Tablo 2.5).

Tablo 2.5. T4PNK enzim reaksiyon bileşen ve miktarları

Reaksiyon bileşenleri
300 pmol sgRNA (1,2 veya 3) F
300 pmol sgRNA (1,2 veya 3) R
5 µl T4PNK Buffer 10X (NEB, İngiltere)
5 µl ATP (10 mM)
1 µl T4PNK
X µl ddH_2O
50 µl toplam hacim

PCR tüpleri thermocycler PCR cihazına yerleştirilerek Şekil 2.9'da belirtilen basamaklar takip edildi.



Şekil 2.9. T4PNK enzim reaksiyon sıcaklık döngüsünün şematik gösterimi.

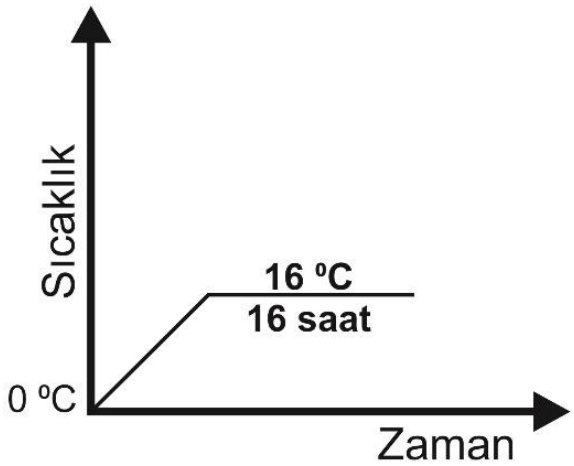
2.2.2.12. Ligasyon

Ligasyon, rekombinant DNA teknolojisinde klonlanacak geni taşıyan DNA fragmanları ile vektörün bir enzim aracığılıyla birbirlerine bağlanması işlemine denilmektedir. Çalışmada, lineer pX459V2.0-eSpCas9(1.1) plazmid ve lineer pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA yapısına sgRNA1, sgRNA2 ve sgRNA3 oligodublekslerin ligasyonu için PCR tüpleri içerisinde Tablo 2.6'da verilen T4 DNA ligaz (Promega, ABD) enzim reaksiyon koşulları oluşturuldu.

Tablo 2.6. T4 DNA ligaz enzim reaksiyon bileşen ve miktarları

Reaksiyon bileşenleri
100 ng lineer pX459V2.0-eSpCas9(1.1) veya pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid
1 µl sgRNA (1,2 veya 3) oligodubleks (1:200 oranında seyreltilmiştir)
1 µl 10X T4 DNA ligaz buffer (Promega, ABD)
1 µl T4 DNA Ligaz
X µl ddH_2O
10 µl toplam hacim

sgRNA1, sgRNA2 ve sgRNA3 oligodublekslerin lineer pX459V2.0-eSpCas9(1.1) plazmid ve lineer pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid vektörlerine ligasyonları için 6 farklı PCR tüpünde T4 DNA ligaz enzim reaksiyonu kuruldu. PCR tüpleri thermocycler PCR cihazına yerleştirilerek Şekil 2.10'da belirtilen basamaklar takip edildi.



Şekil 2.10. T4 DNA ligaz enzim reaksiyon sıcaklık döngüsünün şematik gösterimi.

2.2.2.13 Klonlanan Plazmidlerin Bakterilere Transformasyonu ve Çoğaltılması

sgRNA1, sgRNA2 ve sgRNA3 oligodublekslerin klonlandığı pX459V2.0-eSpCas9(1.1) ve pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid yapılarını çoğaltmak için aşağıda gösterilen transformasyon reaksiyonları hazırlanarak ısı-şok transformasyon metodu uygulandı.

- gRNA1, pxX459V2.0-eSpCas9(1.1) ..... DH5alpha (*E.coli*)
- gRNA2, pxX459V2.0-eSpCas9(1.1) ..... DH5alpha (*E.coli*)
- gRNA3, pxX459V2.0-eSpCas9(1.1) ..... DH5alpha (*E.coli*)
- pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA1 ..... DH5alpha (*E.coli*)
- pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA2 ..... DH5alpha (*E.coli*)
- pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA3 ..... DH5alpha (*E.coli*)

Transformasyon ürünleri 37°C 250 rpm'da çalkalamalı etüvde 60 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 250 µl transformasyon reaksiyon ürünleri alınarak LB-ampisilin plaklarına aktarıldı. Steril cam öze ile yayma ekim yapılarak gece boyu 37ºC'de inkübasyona bırakıldı.

2.2.2.14. Bakterilerden Klonlanan Plazmidlerin Eldesi

Uygun koşullarda biyogüvenlik kabini içerisinde LB-ampisilin plaklarında oluşan kolonilerden rastgele seçilerek içerisinde ampisilin bulunan LB-broth sıvı besiyerine transfer edildi. 16-24 saat kadar 37ºC 150 rpm çalkalamalı etüvde inkübasyon yapılarak bakteriler çoğaltıldı.

DH5alpha (*E.coli*) bakterilerinden sgRNA1, sgRNA2 ve sgRNA3 oligodublekslerin klonlandığı pX459V2.0-eSpCas9(1.1) ve pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid eldeleri 'Wizard® *Plus* SV Minipreps DNA Purification System' kiti ile üretici firmanın (Promega, ABD; Katalog No: A1330) protokolü takip edilerek yapıldı.

Elde edilen pX459V2.0-eSpCas9(1.1) ve pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmidlerin DNA konsantrasyon, A_{260}/A_{280} ve A_{260}/A_{230} oranları nanodrop cihazında ölçüldü.

2.2.2.15. Dizi Analiz Yöntemi ile Ligasyonun Doğrulanması

pX459V2.0-eSpCas9(1.1) ve pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid DNA'larına sgRNA1, sgRNA2 ve sgRNA3 oligodublekslerin ligasyonu PCR-dizi analiz yöntemi ile doğrulandı.

pX459V2.0-eSpCas9(1.1) plazmidin gRNA scaffold bölgesinin dahil olduğu toplamda 674 nükleotid uzunlukta bölgeyi amplifiye edebilecek px459F1 ve px459R1 primerleri ile çalışılması planlandı (Şekil 2.11) (Batır ve ark 2019).

Şekil 2.11. pX459V2.0-eSpCas9(1.1) plazmid için kullanılan primerlerin şematik gösterimi.

px459F1 ve px459R1 primerler için Tm (°C), dizilim, %GC içeriği kontrol edildikten sonra Tablo 2.7'de belirtilen dizilim ve değerlerde liyofilize halde Sentebiolab firmasından temin edildi.

Tablo 2.7. px459F1 ve px459R1primerlere ait bilgiler (Batır ve ark 2019).

Primer	Nükleotid Dizisi	Tm (°C)
px459F1	5'-TTTGTGATGCTCGTCAGGGG-'3	60 ºC
px459R1	5'-CCAAGTGGGCAGTTTACCGT-'3	60 ºC

gRNA scaffold bölgesinin dahil olduğu toplamda 624 nükleotid uzunlukta bölgeyi amplifiye edebilecek şekilde pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmidine

spesifik, ileri primer (F) olarak hU6-F evrensel primeri ve Cmv-R geri primeri kullanıldı. Cmv-R geri primeri http://frodo.wi.mit.edu/ online uygulaması kullanılarak tasarlandı (Şekil 2.12). Tasarlanan primerin plazmid içerisinde farklı bölgeler ile homolojisi blastlama yapılarak kontrol edildi. Primerlere ait nükleotid dizisi blastlama sayfasına (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) kopyalandı ve organizma kısmına pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid dizisi yüklenerek blast işlemi yapıldı. İlgili bölge dışında herhangi bir dizi ile homoloji saptanamadı.

Şekil 2.12. pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid için tasarlanan primerlerin şematik gösterimi.

Evrensel hU6-F ve tasarlanan Cmv-R primerler için Tm (°C), dizilim, %GC içeriği kontrol edildikten sonra Tablo 2.8'de belirtilen dizilim ve değerlerde liyofilize halde Sentebiolab firmasından temin edildi.

Tablo 2.8. hU6-F ve Cmv-R primerlere ait bilgiler

Primer	Nükleotid Dizisi	Tm (°C)
hU6-F	5'-GAGGGCCTATTTCCCATGATT-'3	52,40ºC
Cmv-R	5'-GGATAACCGCAATGATACCCT-'3	52,40ºC

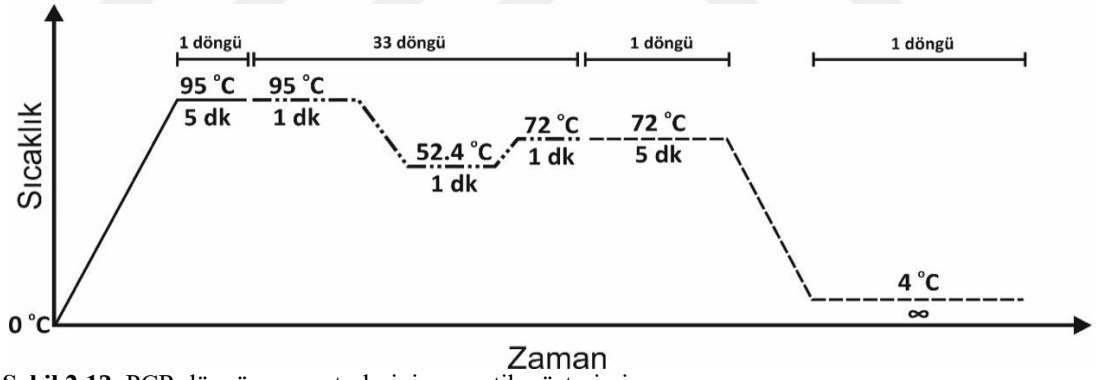
PCR tüpleri içerisinde Tablo 2.9'da verilen *Taq* DNA polimeraz enzim reaksiyon koşulları oluşturuldu.

Tablo 2.9. PCR bileşen miktar ve konsantrasyonları

Bileşenler	Son Konsantrasyon	Miktar (µL)
ddH_2O (Steril)	-	20,7 µl
PCR Buffer (10x)	1X	3 µl
dNTP (10 mM)	200 µM	0,6 µl
$MgCI_2$ (50 mM)	2,0 mM	1,4 µl
hU6-F primer	0,25 µM	1 µl
Cmv-R primer	0,25 µM	1 µl
Taq DNA Polimeraz	0.05 U	0,3 µl
Plazmid DNA (50 ng)	100 ng	2 µl
		30 µl Toplam Hacim

sgRNA1, sgRNA2 ve sgRNA3 oligodublekslerin klonlandığı pX459V2.0-eSpCas9(1.1) ve pCAG-eCas9-GFP-U6 plazmid DNA örnekleri için toplamda 6 farklı PCR reaksiyonu kuruldu.

PCR tüpleri thermocycler PCR cihazına yerleştirilerek Şekil 2.13'de belirtilen parametreler takip edildi.



Şekil 2.13. PCR döngü parametrelerinin şematik gösterimi.

sgRNA1, sgRNA2 ve sgRNA3 oligodublekslerin klonlandığı pX459V2.0-eSpCas9(1.1) ve pCAG-eCas9-GFP-U6 plazmid DNA örneklerinden amplifiye edilen DNA bölgelerinin dizi analizi Letgen Biyoteknoloji firması tarafından Sanger dizileme yöntemi ile elde edildi. Elde edilen dizi sonuçları FinchTV programı ile pik şeklinde görüntülenerek değerlendirildi.

2.2.3. Tek Zincirli Oligonükleotid Donör Dizilerin Tasarımı

TGFBI geni ekzon 12 bölgesi R555W mutasyonunun düzenlenmesine spesifik tek zincirli oligonükleotid (ssODN) donör dizilerin tasarımları aşağıda

belirtilen hususlar dikkate alınarak https://www.benchling.com/ adresi üzerinden ulaşılabilen online uygulaması kullanılarak yapıldı. Bu hususlar ssODN şablonların;

- En az 200 nükleotid tek zincir DNA yapısında olması,
- Hedeflenen bölgede değişimi hedeflenen nükleotid dizisini içermesi,
- Cas9 aktivitesinden etkilenmemek için sessiz mutasyon içermesidir.

Tasarlanan ssODN dizileri Tablo 2.10'da gösterilmiştir.

Tablo 2.10. Tasarlanan ssODN dizilerine ait bilgiler

ssODN1	5'-C A T C C A G T C T G C A G G A C T G A C G G A G A C C C T C A A **T A** G G G A A G G A G T C T A C A C A G T C T T T G C T C C C A C A A A T G A A G C C T T C C G A G C C C T G C C A C C A A G A G A A **C** G G A G C A G A C T C T T G G G T A A A G A C C A A C T T A A G T A C A C G T C T C C A T T T T T C T A A A G T A G T G A T C C C T C A G G G C C C C A G C A G C A A A C A G T T G G C A C A T C A A-'3
ssODN2	5'-C A T C C A G T C T G C A G G A C T G A C G G A G A C C C T C A A C **C** G C G A A G G A G T C T A C A C A G T C T T T G C T C C C A C A A A T G A A G C C T T C C G A G C C C T G C C A C C A A G A G A A **C** G G A G C A G A C T C T T G G G T A A A G A C C A A C T T A A G T A C A C G T C T C C A T T T T T C T A A A G T A G T G A T C C C T C A G G G C C C C A G C A G C A A A C A G T T G G C A C A T C A A-'3
ssODN3	5'-C A T C C A G T C T G C A G G A C T G A C G G A G A C C C T C A A C C G G G A A G G A G T C T A C A C A G T C T T T G C T C C C A C A A A T G A A G C C T T C C G A G C C C T G C C A C C A A G **G** G A A **C** G G A G C A G **G** C T C T T G G G T A A A G A C C A A C T T A A G T A C A C G T C T C C A T T T T T C T A A A G T A G T G A T C C C T C A G G G C C C C A G C A G C A A A C A G T T G G C A C A T C A A-'3

Siyah renkli nükleotidler ssODN dizilerine ait yabanıl tip sekans bilgileridir, kırmızı renkli nükleotidler sessiz mutasyon oluşumunu sağlayacak nükleotid değişimleri ve mavi renkli nükleotidler ise R555W mutasyonun hasta hücre hatlarında düzenlenmesini sağlayacak nükleotid değişimleridir

Ticari olarak liyofilize halde temin edilen ssODN1, ssODN2 ve ssODN3 dizileri (Integrated DNA Technologies; IDT, ABD) TE buffer (Sigma, ABD) ile çözüldü.

2.2.4. Periferal Kan Mononükleer Hücre İzolasyonu

Periferal kan mononükleer hücre (PBMC) eldesi lymphopure (Biolegend) aracılığıyla üretici firmanın aşağıda belirttiği adımlar izlenilerek yapıldı.

- R555W mutasyonu taşıdığı PCR dizi analizi yöntemi ile belirlenen GCD1 hastası bireyden EDTA'lı tüpe 10 mL periferal kan alındı.
- EDTA'lı tüp içerisindeki periferal kan falkon tüpe aktarılarak 1:1 oranında seyreltilecek şekilde üzerine fosfat tamponlu tuz (PBS) (Sigma, ABD) eklendi.
- Seyreltilmiş periferal kanın toplam hacminin yarısı kadar lymphopure farklı bir falkon tüpe eklendi.
- İçerisinde lymphopure bulunan falkon tüpe seyreltilmiş periferal kan eklendi.
- Oda sıcaklığında 800 g'de 20 dk santrifüj yapıldı.
- Santrifüj sonrası falkon tüp içerisinde PBMC'ler bulutsu şekilde bir ara faz oluşturdu. Steril bir pastör pipeti yardımıyla ara fazı oluşturan PBMC'ler toplanıp farklı bir falkon tüpe aktarıldı.

Hücre yıkama işlemi PBS veya Hank'ın dengeli tuz solüsyonu (HBSS) ile yapıldı. PBS ile yıkama işlemi sonrası 330 g'de 7 dk santrifüj edildi ve hücreler çöktürülerek PBS ortamdan uzaklaştırıldı. Yaklaşık 1 mL RPMI (Gibco, ABD) ile hücreler yeniden çözüldü. Hücrelerin sayımı için içerisinde 15 µl tripan mavisi solüsyonü (TBS) (Sigma, ABD) bulunan 0,2 mL'lik tüpe 15 µl çözünmüş hücre aktarılıp hafifçe pipetaj yapıldı. Oda sıcaklığında yaklaşık 5 dk bekletildikten sonra hücre ve TBS karışımdan yaklaşık 10 µl alınarak thoma lamına (Marienfeld) aktarıldı. İnvert mikroskopta (Olympus) hücre sayımı yapıldı. Toplam, canlı ve ölü hücre sayısı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

1 ml'de hücre sayısı = A x SF x 10^4

A: Karede sayılan hücre adedi

SF: Seyreltme faktörü

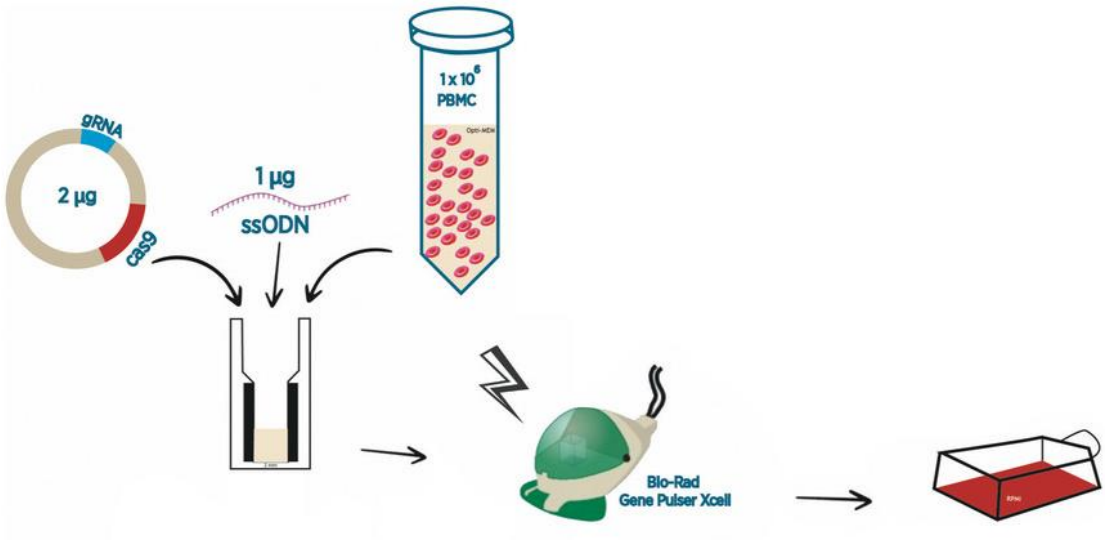
10^4:0,1 mm^3'deki sayım sonucunu 1 mL'deki sayıya dönüştürmek ve standart sonuç elde etmek için kullanılan bir değişmez.

2.2.5. Transfeksiyon

Transfeksiyon için elektroporasyon tekniği kullanıldı. Transfeksiyonun görüntülenmesi amacıyla ilk olarak hücrelere aktarıldığında GFP salınımı yapabilen sgRNA1, sgRNA2, sgRNA3 oligoların klonlandığı pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmidler ve ssODN1, ssODN2, ssODN3 şablonların PBMC'lere transfeksiyonu aşağıda belirtildiği gibi 6 grupta gerçekleştirildi.

- pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA1 ..... PBMC
- pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA2 ..... PBMC
- pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA3 ..... PBMC
- pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA1, ssODN1 ..... PBMC
- pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA2, ssODN2 ..... PBMC
- pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA3, ssODN3 ..... PBMC

Opti-MEM (Sigma, ABD) içerisinde süspanse edilmiş 1 x 10^6 PBMC ve 2 µg plazmid DNA:1 µg ssODN olacak şekilde 2:1 oranda plazmid:ssODN karışımının 0,2 cm'lik elektroporasyon küvetine (Bio-Rad, ABD) eklendi (Şekil 2.14). PBMC ve oligoların eklendiği küvetler buz üzerinde 5 dk bekletildi. Küvetler elektroporasyon cihazına (GenePulser Xcell, Bio-Rad) yerleştirilerek 150V, 5 ms, 1 atış ve 200V, 5 ms, 1 atış olacak şekilde iki farklı voltajda elektroporasyon işlemleri uygulandı. Elektroporasyon sonrası transfeksiyonu gerçekleştirilen PBMC'ler elektroporasyon küveti içerisinde 5 dk 24ºC'de bekletildi.

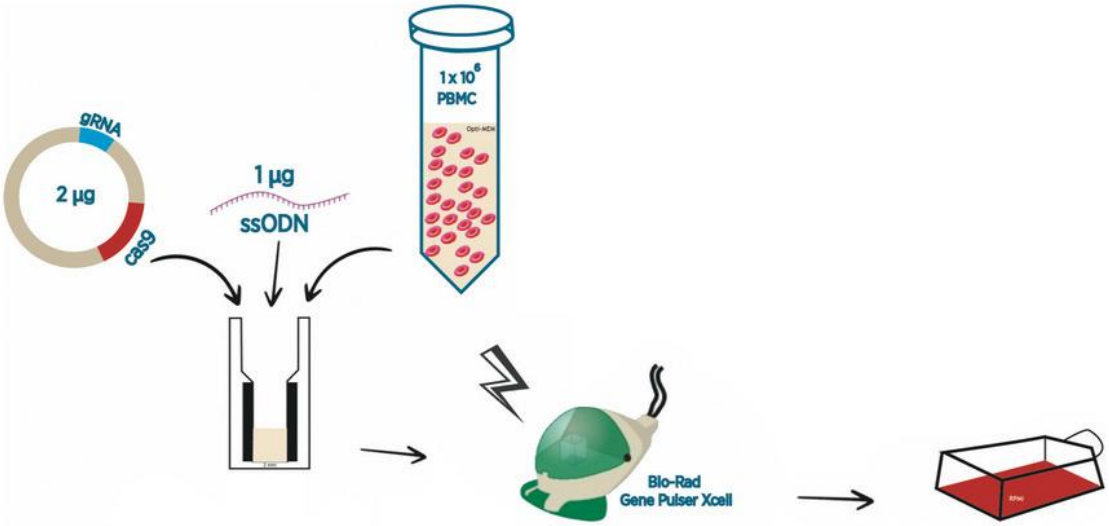


Şekil 2.14. Elektroporasyon işleminin şematik gösterimi.

Ökaryotik hücrelerde selektif antibiyotik seçilimi için yapısında puromisin direnç (PuroR) geni bulunduran sgRNA1, sgRNA2, sgRNA3 oligoların klonlandığı pX459V2.0-eSpCas9(1.1) plazmidler ve ssODN1, ssODN2, ssODN3 şablonların PBMC'lere transfeksiyonu aşağıda gösterildiği şekilde 6 grupta gerçekleştirildi.

- gRNA1/pX459V2.0-eSpCas9(1.1) plazmid ..... PBMC
- gRNA2/pX459V2.0-eSpCas9(1.1) plazmid ..... PBMC
- gRNA3/pX459V2.0-eSpCas9(1.1) plazmid ..... PBMC
- gRNA1/pX459V2.0-eSpCas9(1.1) plazmid, ssODN1 ..... PBMC
- gRNA2/pX459V2.0-eSpCas9(1.1) plazmid, ssODN2 ..... PBMC
- gRNA3/pX459V2.0-eSpCas9(1.1) plazmid, ssODN3 ..... PBMC

Opti-MEM içerisinde süspanse edilmiş 1 x 10^6 PBMC ve 2 µg plazmid DNA, 1 µg ssODN olacak şekilde 2:1 oranda plazmid:ssODN karışımının 0,2 cm'lik elektroporasyon küvetine eklendi (Şekil 2.15). PBMC ve oligoların eklendiği küvetler buz üzerinde 5 dk bekletildi. Küvetler elektroporasyon cihazına yerleştirilerek, daha önce yapılan optimizasyon çalışmasından elde edilen hücre sağ kalımının ve transfeksiyon veriminin en yüksek olduğu elektroporasyon standartlarında (200V elektrik akımı, 5 ms ve 1 atışta) transfeksiyon işlemleri gerçekleştirildi. Elektroporasyon işlemi sonrası transfeksiyonu gerçekleştirilen PBMC'ler elektroporasyon küveti içerisinde 5 dk 24ºC'de bekletildi.



Şekil 2.15. Elektroporasyon işleminin şematik gösterimi.

2.2.6. PBMC Kültürü ve Seçilim

Transfeksiyonu gerçekleştirilen PBMC'leri yaşatmak için uygun medyum hazırlandı (Tablo 2.11). 6'lı hücre kültür plaklarının her bir bölmesinde, $1x10^6$ PBMC/mL medyum olacak şekilde hücreler dağıtıldı. Transfeksiyon sonrası hücrelerde plazmid ifadesinin sağlanması için 37ºC %5 CO_2'li etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonra PBMC'lerin çoğalmasını indüklemek için medyum ortamına fitohemaglutinin (PHA, Invitrogen) eklemesi yapıldı.

Tablo 2.11. Hücre kültür medyum bileşen ve konsanstrasyonları

Bileşenler	Yüzdelik Oran	Miktar (ml)
RPMI (Gibco, ABD)	%89	8,9 mL
FBS (Fetal Bovine Serum) (Gibco, ABD)	%10	1 mL
Penisilin/Streptomisin (Gibco, ABD)	%1	0,1 mL
		Toplam hacim 10mL

2.2.6.1. GFP+ Hücrelerin Görüntülenmesi

Elektroporasyon sonrası 24 saat inkübe edilen sgRNA1, sgRNA2 ve sgRNA3 oligodublekslerinin klonlandığı pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmidlerin transfekte edildiği PBMC'leri içeren medyumlar 330 g'de 7 dk boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası medyumlar ortamdan uzaklaştırıldı. Lizinli lam üzerinde 10 µl PBMC pelleti ile hazırlanan preparat Olympus BX51 trinoküler floresan mikroskopta incelendi ve Olympus DP72 kamera ile çeşitli objektif büyütmelerinde dijital olarak görüntülendi.

2.2.6.2. Flow (Akış) Sitometri ile GFP+ Hücrelerin Seçilimi

sgRNA1, sgRNA2 ve sgRNA3 oligodublekslerin klonlandığı pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmidlerinin transfekte edildiği PBMC pelletleri 300 µl 1X HBSS (Gibco, ABD) içerisinde çözüldü ve akış sitometri tüplerine (BD Pharmingen, ABD) alınarak 250 g'de 5 dk santrifüj edildi. PBMC pelletleri 200 µl %2 FBS/HBSS içerisinde çözüldü. Bu hazırlık işleminin ardından GFP+ hücreler hücre saflaştırma özellikli akım sitometri cihazı (FACS Aria III – BD Pharmingen, ABD) ile FL1 kanalından okutularak kapılandı ve içinde taze besiyeri bulunan akım sitometri tüpüne saflaştırıldı. GFP+ PBMC'ler saflaştırma işleminden sonra içerisinde yaklaşık 1 mL medyum bulunduran 6'lı hücre kültür plaklarına ekilerek 37ºC, %5 CO_2'li etüvde 72 saat inkübasyona bırakıldı.

2.2.6.3. Puromisin Seçilimi

Elektroporasyon sonrası 24 saat inkübe edilen sgRNA1, sgRNA2 ve sgRNA3 oligodublekslerin klonlandığı pX459V2.0-eSpCas9(1.1) plazmidlerin transfekte edildiği PBMC'leri içeren medyum ortamına içerisinde 2 µg/mL puroR (Gibco, ABD) bulunan medyum ilavesi yapıldı. Hücrelere puromisin uygulaması 24 saat aralıklarla toplamda 72 saat sürecek şekilde uygulandı.

2.2.7. Genom Düzenleme Analizi

Erime eğrisi analizi, gerçek zamanlı PCR (real time PCR)'ın kullanıma girmesi ile 1997'de geliştirilen bir yöntemdir (Ririe ve ark 1997). Erime eğrisi analizi farklı sıcaklıklarda çift sarmallı DNA miktarını ölçerek belirli bir PCR ürününün erime eğrisini ortaya çıkaran floresans bazlı bir tekniktir ve standart PCR bileşenleri ile çift zincirli DNA'nın varlığında floresan sinyal veren boyalara ihtiyaç duymaktadır. Floresan boyalar ile DNA denatürasyonu takip edilir. PCR işlemi sırasında artan sıcaklıkta çift zincirli DNA'nın tek zincirli DNA'ya dönüşmesi ile floresan sinyal şiddetinde azalma meydana gelir. Floresan sinyal şiddetinde meydana gelen değişimlerin görüntülenerek hesaplanması ile analiz edilmektedir.

Çalışmamızda nükleotid değişimlerinin hızlı ve etkili bir şekilde tanımlanması için erime eğrisi analizi uygulandı. Genom düzenleme etkinliğini değerlendirmek için yapılan tüm analizlerde CRISPR/Cas9 uygulanmış ve CRISPR/Cas9 uygulanmamış hasta bireye ait PBMC'ler ile çalışıldı.

2.2.7.1. DNA Eldesi

Kültür ortamından alınan PBMC'ler 1,5 mL'lik ependorf tüpe aktarıldı. PBMC'ler toplandıktan sonra 13.000–16.000 g aralığında 10 sn santrifüjlenerek medyum ortamdan uzaklaştırıldı. Elde edilen PBMC'ler PBS ile yıkandı. PBS'i ortamdan uzaklaştırmak için 13.000–16.000 g aralığında 10 sn santrifüj yapıldı. PBMC'lerden DNA eldesi kimyasal temelli 'Wizard® Genomic DNA Purification System' kiti ile üretici firmanın (Promega, ABD; Katalog No A1120) protokolü takip edilerek yapıldı.

Elde edilen DNA'ların konsantrasyon, A_{260}/A_{280} ve A_{260}/A_{230} oranları nanodrop cihazında ölçüldü.

2.2.7.2. Erime Eğrisi Analizi

TGFBI geni ekzon 12 bölgesi R555W bölgesinin dahil olduğu toplamda 177 nt bölge amplifiye edildi (Tablo 2.12).

Tablo 2.12. Erime eğrisi analizi için tasarlanan primerlere ait bilgiler

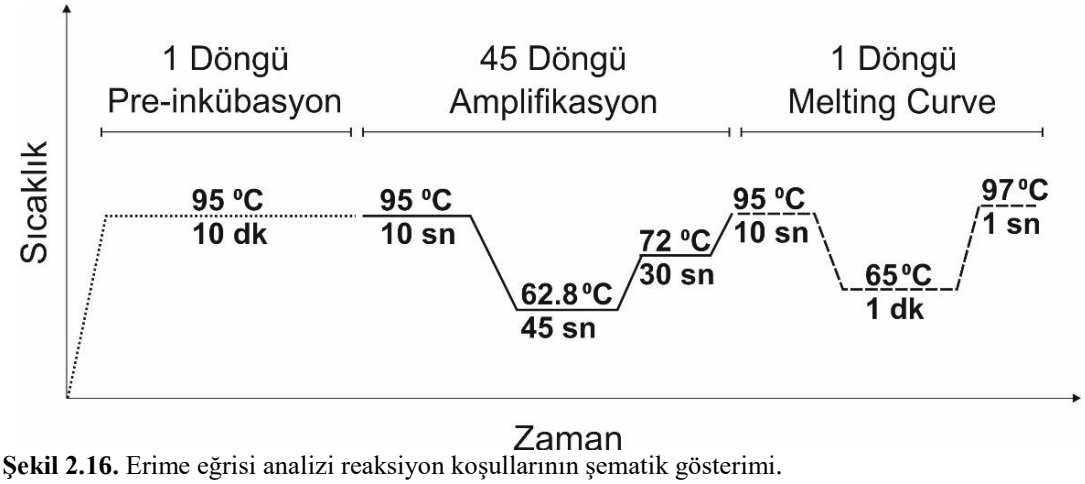
Primer	Nükleotid Dizisi	Tm (°C)
Primer F	5'-CAACCGGGAAGGAGTCTACA-'3	52,40ºC
Primer R	5'-GCCCTGAGGGATCACTACTTT-'3	52,40ºC

FastStart Essential DNA Green Master (Roche, İsviçre) kullanılarak PCR tüpleri (Axygen, ABD) içerisinde toplam 20 µl olacak şekilde reaksiyon koşulları oluşturuldu (Tablo 2.13).

Tablo 2.13. Real Time PCR Reaksiyonu için gerekli bileşen ve miktarları

Bileşenler	Miktar (µL)
ddH_2O, PCR Grade	3 µl
Master Mix (2x)	10 µl
İleri primer (10x)	1 µl
Geri primer (10x)	1 µl
DNA (50 ng)	5 µl

PCR tüpleri The LightCycler® 96 Real-Time PCR (Roche, İsviçre) cihazına yerleştirilerek Şekil 2.16'da verilen basamaklar takip edildi.



Şekil 2.16. Erime eğrisi analizi reaksiyon koşullarının şematik gösterimi.

2.2.7.3. T7 Endonükleaz I Kesimi

T7 endonükleaz I enzimi (T7E1); çift iplikli DNA üzerinde yanlış baz eşleşmelerini tespit eder ve bu bölgelerde kesim yapar. Bu özelliğinden dolayı çalışmamızın etkisinin değerlendirilmesinde T7E1 (NEB, İngiltere) enzimi kullanıldı.

Tablo 2.12'de gösterilen primer çifti kullanılarak PCR tüpleri içerisinde toplam 50 µl olacak şekilde reaksiyon koşulları oluşturuldu (Tablo 2.2). PCR tüpleri PCR cihazına yerleştirilerek Şekil 2.2.'de verilen basamaklar takip edildi.

PCR ile hedef bölgenin çoğaltımından sonra farklı DNA örneklerinin her biri için PCR tüpleri içerisinde toplam 19 µl olacak şekilde reaksiyon koşulları oluşturuldu (Tablo 2.14). PCR tüpleri yerleştirilen ısı döngü cihazı 95°C'de 5 dakika, 95°C'den 85°C'ye saniyede 2°C, 85°C'den +4°C'ye saniyede 0,1°C azalacak şekilde programlandı.

Tablo 2.14. T7 endonükleaz 1 enzim reaksiyon bileşen ve miktarları.

Reaksiyon bileşenleri
200 ng PCR ürünü DNA
2 µl 10X NEBuffer 2
X µl ddH2O
19 µl toplam hacim

İşlem sonunda PCR tüplerine 1 µl T7E1 enzimi eklenerek ısı döngü cihazında 37 °C'de 15 dakika olacak şekilde yeniden programlandı. 2 µl 0,25 M EDTA eklenerek reaksiyon sonlandırıldı ve elektroforetik analiz ile değerlendirildi.

Gen modifikasyon oranı aşağıdaki formül ile belirlenir:

% gen modifikasyonu=100x(1 – (1 – kesilen amplikon oranı)1/2).

Kesilen amplikon oranı ise kesime uğramayan hedef bölgenin jel üzerindeki tek bant yoğunluk değerinin, kesime uğrayan hedef bölgenin jel üzerindeki iki bant yoğunluğuna bölünmesi ile elde edilir.

2.2.8. Deney Sonuçlarının İstatiksel Değerlendirilmesi

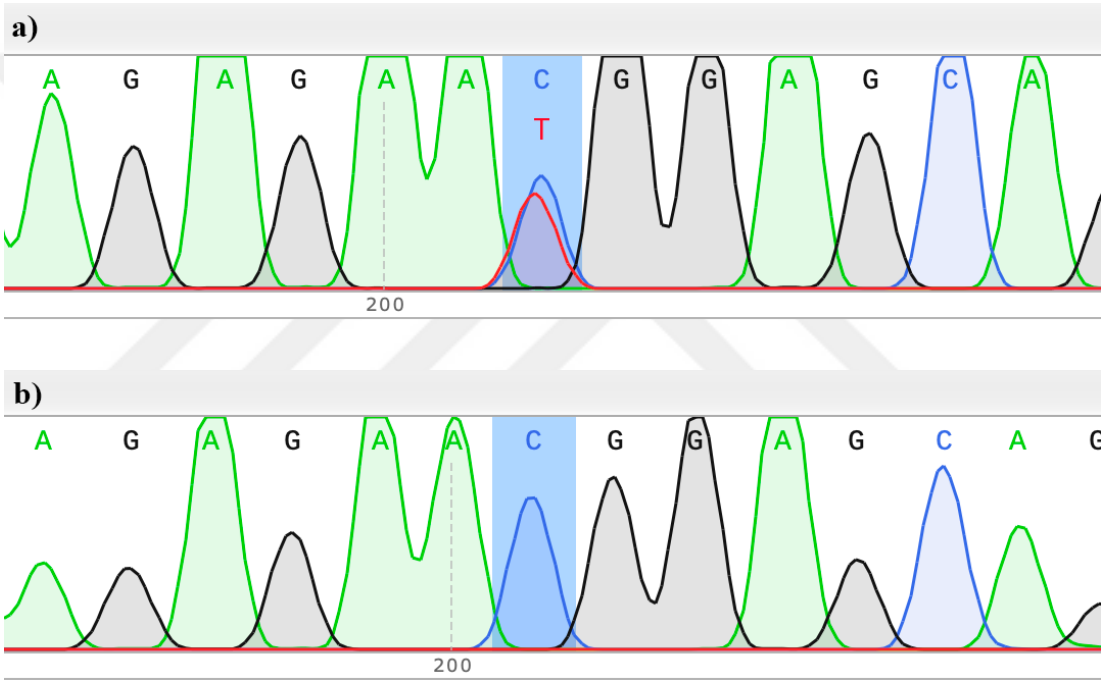
Bu tez kapsamında çalışılan TGFBI geni ekzon 12 bölgesinin erime eğrilerinin gösterildiği real-time PCR sonuçlarının CRISPR uygulanmamış ve CRISPR uygulanmış hücre grupları arasındaki farkların istatistiki önemi ikili karşılaştırma testi olarak bilinen Unpaired t test analizi ile karşılaştırıldı.

pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA1 plazmid ve ssODN1 şablon, pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA2 plazmid ve ssODN2 şablon, pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA3 plazmid ve ssODN3 şablonun birlikte transfekte edildiği hücrelerden elde edilen erime eğrisi analizleri sonucunda, erime eğrisi altında kalan alanlar ImageJ/Fiji programı kullanılarak hesaplandı. Her bir örnek için triplicate olarak yapılan analizlerde, kantitatif oransal değişim belirlendi. CRISPR uygulama öncesi ve sonrası alan değişimleri SPSS yazılımı, sürüm 21 (IBM SPSS Corp.; Armonk, NY, ABD) kullanılarak istatistiki değerlendirmeye tabi tutuldu. $p<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. *TGFBI* Geni Ekzon 12 Bölgesinin Dizi Analiz Bulguları

Detaylı oftalmolojik incelemede klinik olarak GCD1 tanısı almış hasta ve sağlıklı bireyleri çalışmaya dahil etmek üzere PCR-Dizi analizi yapıldı. Elde edilen analiz sonuçları SnapGene programında pik şeklinde görüntülendi. *TGFBI* geni ekzon 12 bölgesinin Şekil 3.1.a'da gösterilen dizi analiz sonuçlarına göre GCD1 tanısı almış hasta bireylerin R555W sıcak nokta mutasyona neden olan c.1663C>T değişimini heterozigot olarak taşıdıkları tespit edildi. Şekil 3.1.b'de gösterilen dizi analiz sonuçlarına göre sağlıklı bireylerin mutasyonu taşımadığı doğrulandı.



Şekil 3.1. *TGFBI* geni ekzon 12 bölgesinde R555W mutasyona neden olan 1663C→T değişimine ait dizi analizi sonuçları. a) Hasta bir bireye ait C/T heterozigot genotipinin elektroferogram görüntüsü, b) Sağlıklı bir bireye ait C/C homozigot genotipinin elektroferogram görüntüsü.

3.2. CRISPR/Cas9 Yapılarının Analiz Bulguları

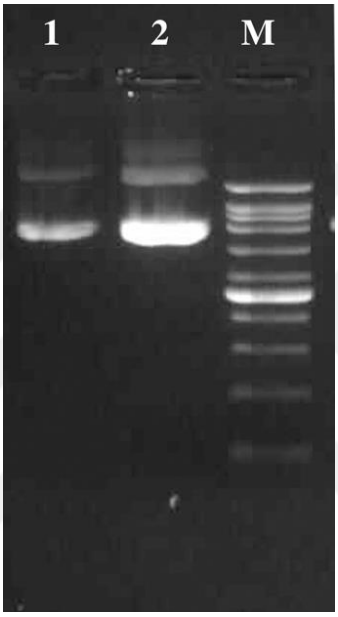
3.2.1. Plazmidlerin Saflık ve Konsantrasyon Tayini Bulguları

DH5alpha (*E.coli*) kimyasal kompotent bakterilerinden elde edilen pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA ve pX459V2.0-eSpCas9(1.1) plazmidlerin DNA konsantrasyon, A_{260}/A_{280} ve A_{260}/A_{230} oranları nanodrop ölçüm sonuçları Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Plazmid DNA'ların nanodrop ölçüm sonuçları.

Plazmid	**Konsantrasyon**	**A_{260}**	**A_{280}**	**A_{260}/A_{280}**	**A_{260}/A_{230}**
pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA	750,58 ng/µl	15,01	8,16	1,84	1,86
pX459V2.0-eSpCas9(1.1)	634,9 ng/µl	8,909	4,856	1,83	1,89

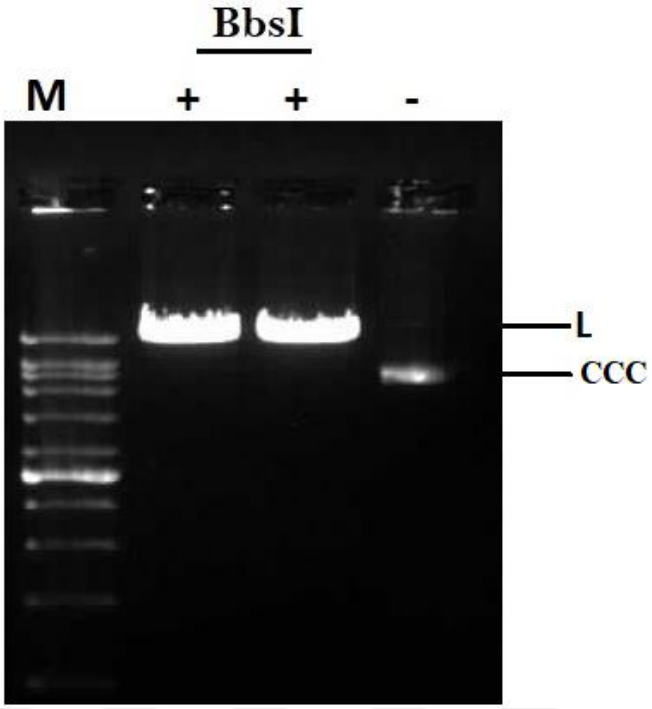
Elde edilen plazmidler ve 1kb'lık marker (M) agaroz jel elektroforez yönteminde yürütülerek UV görüntüleme cihazında görüntülendi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Plazmid DNA'ların agaroz jel elektroforez işleminden sonra görüntülenmesi. 1 numaralı kuyucukta pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid, 2 numaralı kuyucukta pX459V2.0-eSpCas9(1.1) plazmid ve 3 numaralı kuyucukta 1 kb'lık marker gösterilmiştir.

3.2.2. BbsI Restriksiyon Enzim Kesim Ürünü Plazmidlerin Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi ile Analiz Bulguları

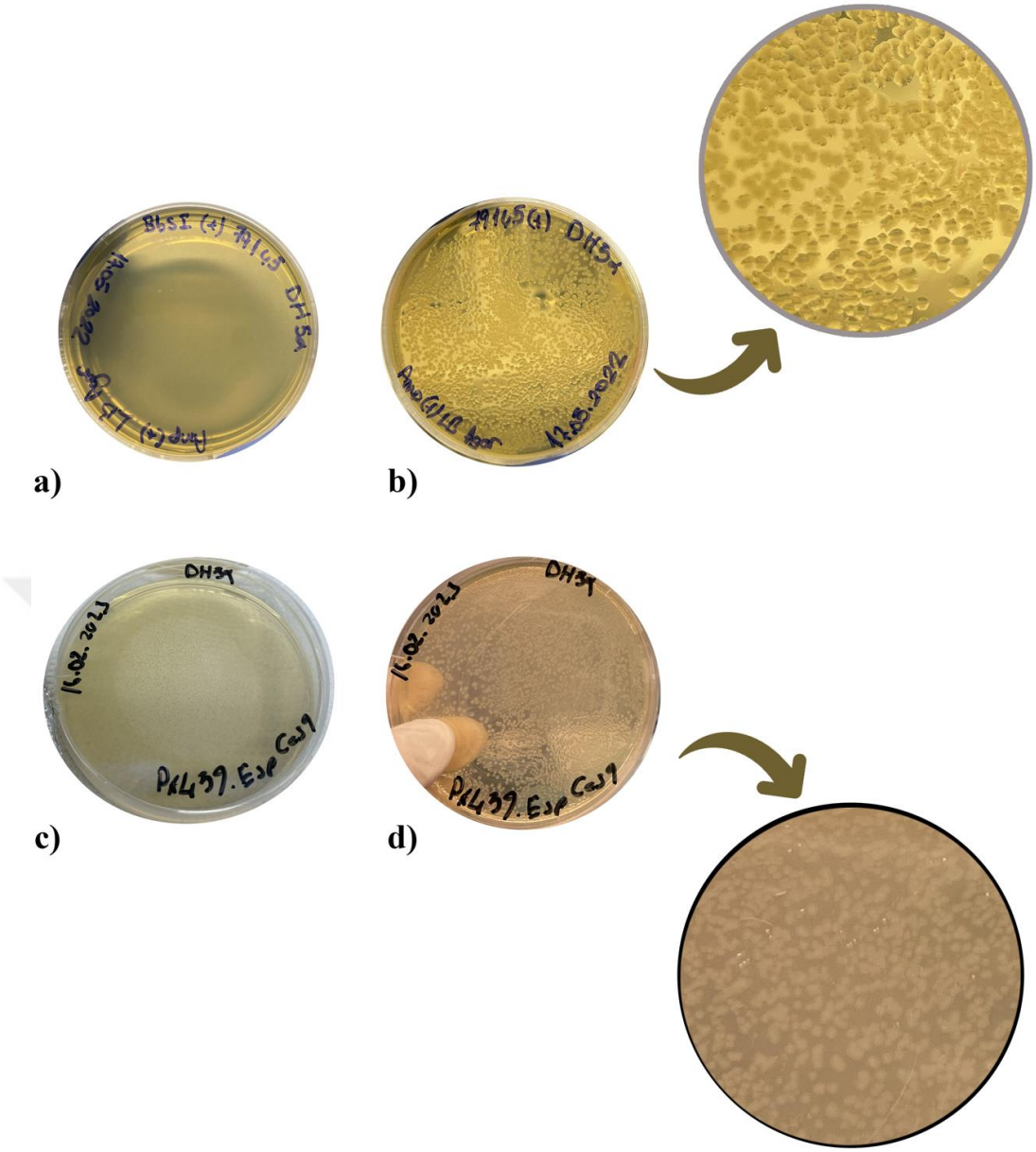
BbsI restriksiyon tip 2 enzim kesim ürünü plazmidler, herhangi bir kesim enzimi ile müdahale edilmemiş plazmid ve 1 kb boyutunda marker birlikte agaroz jel elektroforez yönteminde yürütülerek UV görüntüleme cihazında görüntülendi (Şekil 3.3). pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA ve pX459V2.0-eSpCas9(1.1) plazmid DNA yapılarının BbsI restriksiyon enzimi ile kesilerek sirküler formdan lineer forma dönüştürüldüğü gözlendi.



Şekil 3.3. BbsI restriksiyon endonükleaz enzim kesim reaksiyonun agaroz jel elektroforez işleminden sonra görüntülenmesi. BbsI kesim reaksiyonu içerisindeki pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA ve pX459V2.0-eSpCas9(1.1) plazmidler pozitif (+) kuyucuklar ve herhangi bir kesim enzimi ile müdahale edilmemiş plazmid ise negatif (-) kuyucuk olarak gösterilmiştir. M (Marker); 1 Kb, L; lineer plazmid, CCC; kapalı kovalent sirküler (Covalently Closed Circular) plazmid.

3.2.3. BbsI Restriksiyon Enzim Kesim Ürünü Plazmidlerin Transformasyon ile Analiz Bulguları

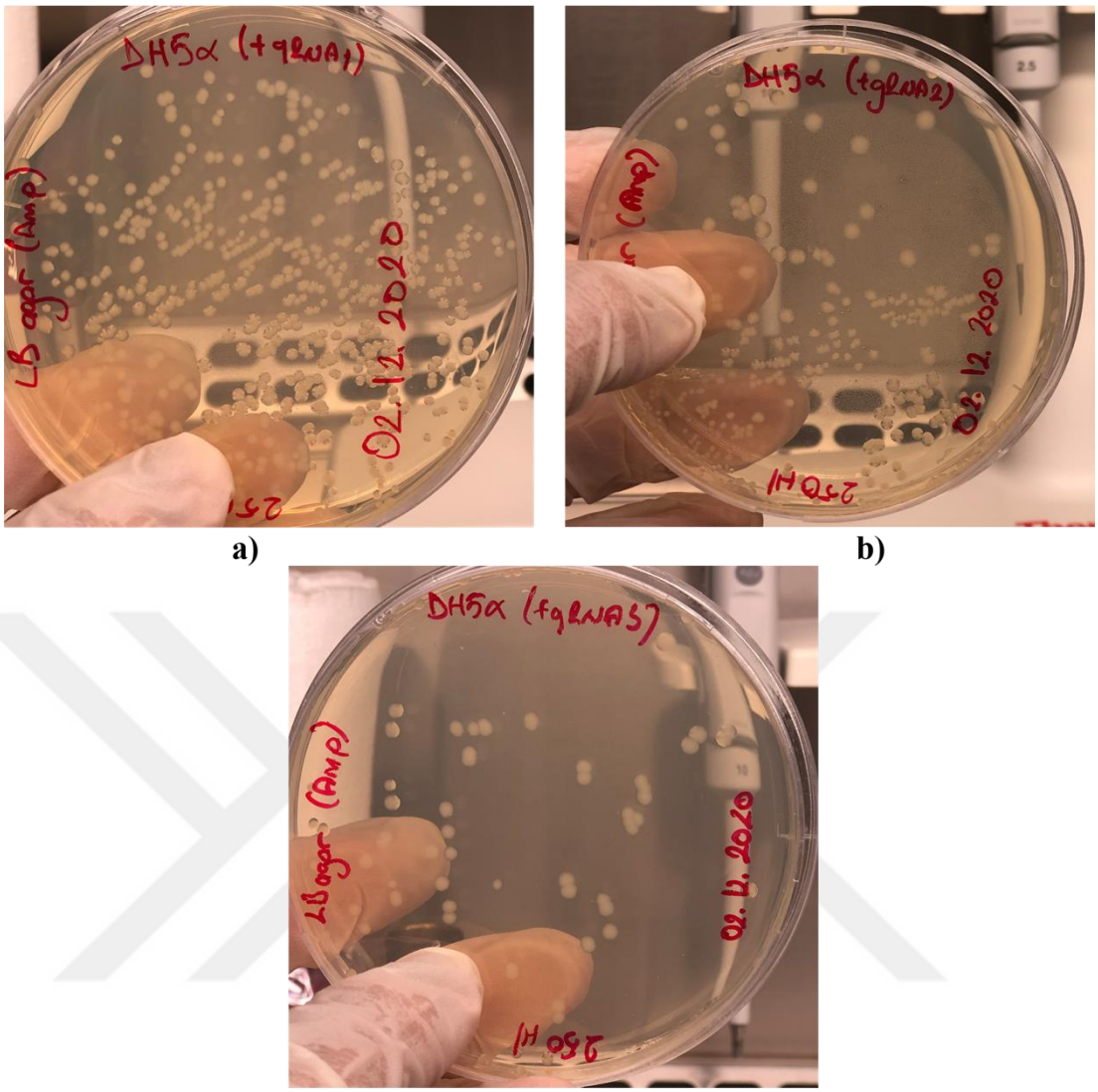
LB-ampisilin plaklarında gece boyu inkübasyona bırakılan kesilmiş pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA ve pX459V2.0-eSpCas9(1.1) plazmidlerin aktarıldığı bakterilerde koloni gelişimi gözlenmezken herhangi bir kesim enzimi ile müdahale edilmemiş pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA ve pX459V2.0-eSpCas9(1.1) plazmidlerin aktarıldığı bakterilerde koloni gelişimi gözlendi (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. a) Jelden geri kazanılan kesim reaksiyonu ürünü pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmidin transforme edildiği bakterilerin 1 gece bekletildikten sonraki görüntüsü, b) pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmidin transforme edildiği bakterilerin 1 gece bekletildikten sonraki görüntüsü, c) Jelden geri kazanılan kesim reaksiyonu ürünü pX459V2.0-eSpCas9(1.1) plazmidin transforme edildiği bakterilerin 1 gece bekletildikten sonraki görüntüsü, d) pX459V2.0-eSpCas9(1.1) plazmidin transforme edildiği bakterilerin 1 gece bekletildikten sonraki görüntüsü.

3.2.4. Transformasyon Bulguları

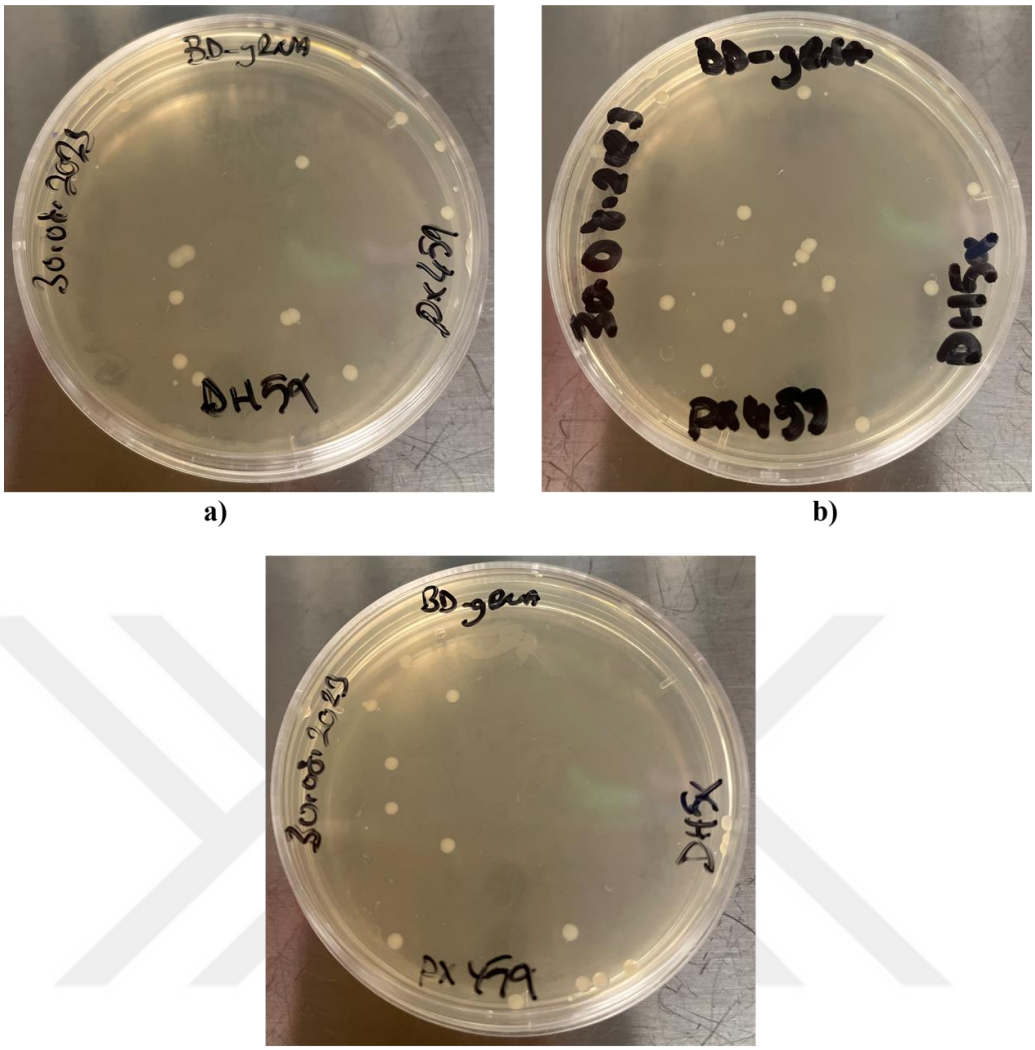
Lineerize edilerek jelden geri kazanılan pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid DNA'ları ve oligodubleks haline getirilen sgRNA1, sgRNA2 ve sgRNA3 ile gerçekleştirilen ligasyon ürünü sirküler pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmidler kimyasal kompotent DH5alpha (*E.coli*) bakterilerine ısı-şok transformasyon metodu ile aktarıldı. LB-ampisilin plaklarında 37°C'de gece boyu inkübasyona bırakılan bakterilerde koloni gelişimi gözlendi (Şekil 3.5).



a) b) c)

Şekil 3.5. İnkübasyon sonrası gelişen bakteri kolonileri. a) sgRNA1 oligodubleksin klonlandığı pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA1 plazmidin transforme edildiği bakteriler, b) sgRNA2 oligodubleksin klonlandığı pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA2 plazmidin transforme edildiği bakteriler, c) sgRNA3 oligodubleksin klonlandığı pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA3 plazmidin transforme edildiği bakteriler.

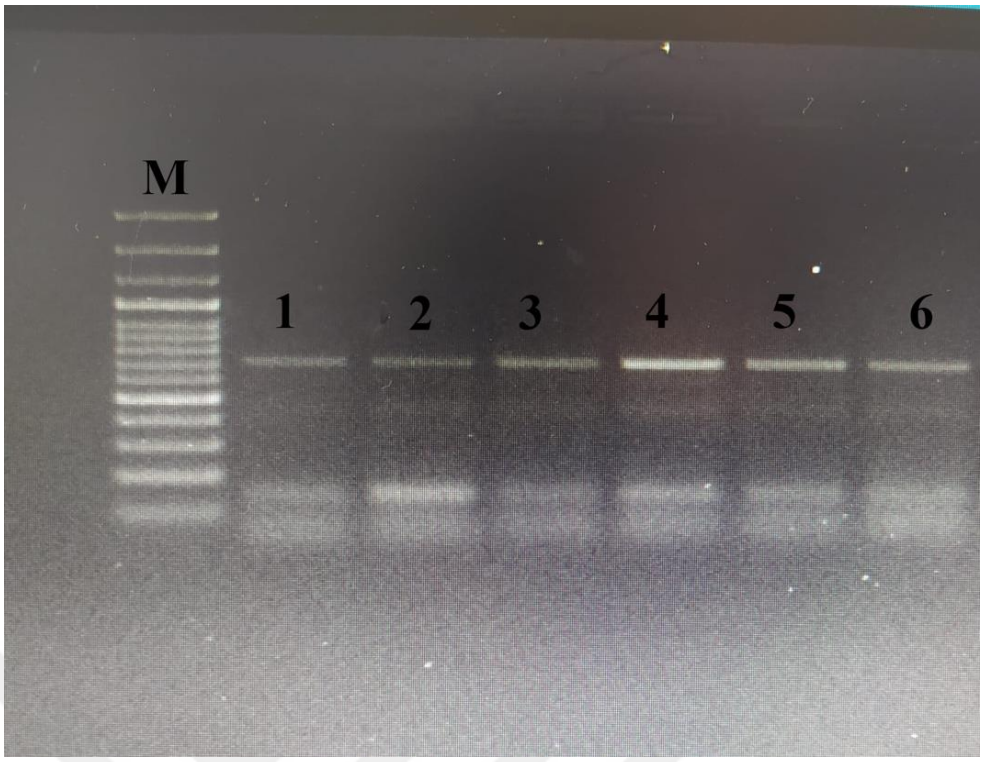
Yukarıda bahsedilen işlemler pX459V2.0-eSpCas9(1.1) plazmidleri için de uygulandı. Ligasyonu gerçekleştirilen pX459V2.0-eSpCas9(1.1) plazmid yapıları kimyasal kompotent DH5alpha (*E.coli*) bakterilerine ısı-şok transformasyon metodu ile aktarıldı. LB-ampisilin plaklarında 37°C'de gece boyu inkübasyona bırakılan bakterilerde koloni gelişimi gözlendi (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. İnkübasyon sonrası gelişen bakteri kolonileri. a) gRNA1 oligodubleksin klonlandığı pX459V2.0-eSpCas9(1.1) plazmidin transforme edildiği bakteriler, b) gRNA2 oligodubleksin klonlandığı pX459V2.0-eSpCas9(1.1) plazmidin transforme edildiği bakteriler, c) gRNA3 oligodubleksin klonlandığı pX459V2.0-eSpCas9(1.1) plazmidin transforme edildiği bakteriler.

3.2.5. Rekombinant Plazmidlerin PCR Dizi Analizi Bulguları

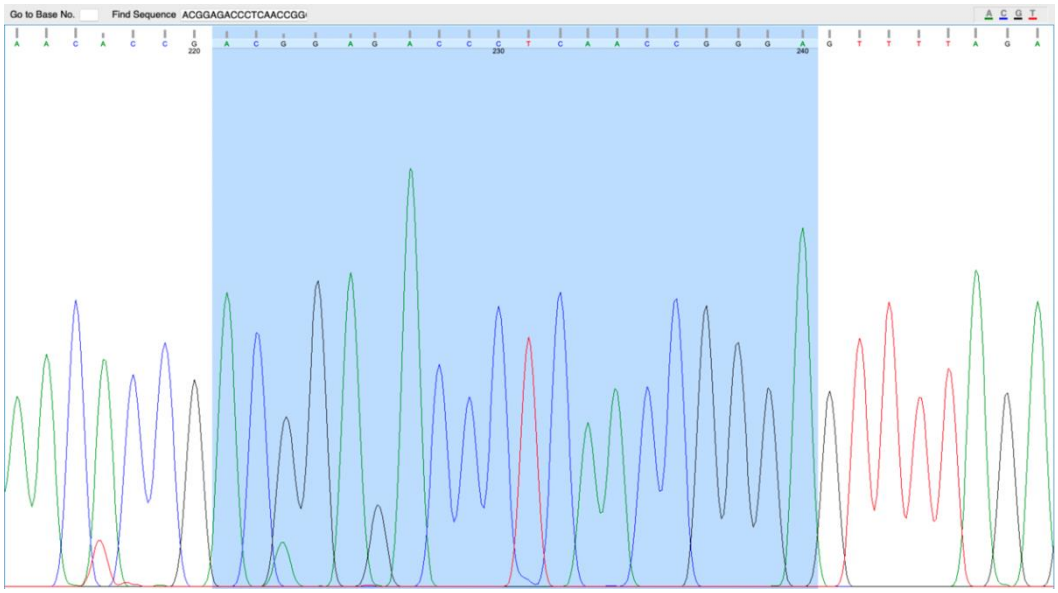
İnkübasyon sonrası LB-ampisilin plaklarında gelişen bakteri kolonilerinden rastgele seçilerek LB-ampisilin sıvı besiyerinde çoğaltma işlemi yapıldı. Klonlama işleminin doğrulanması için LB-ampisilin sıvı besiyerinde çoğalan bakterilerden pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA ve pX459V2.0-eSpCas9(1.1) plazmidler elde edildi. sgRNA'ların plazmid yapısına dahil olduğu gRNA scaffold bölgesini kapsayacak şekilde amplifiye edecek primer çifti ile PCR yapıldı. PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde kantitatif olarak analiz edildi. Agaroz jel elektroforez yönteminde, PCR ürünleri yürütülerek UV görüntüleme cihazında görüntülendi. pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid DNA'ları ile yapılan PCR işleminde 674 bç bant aralığında hedef bölgelerin çoğalmış olduğu gözlendi (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez işleminden sonra görüntülenmesi. 1 ve 2 numaralı kuyucukta sgRNA1 oligodubleksinin klonlandığı plazmid, 3 ve 4 numaralı kuyucukta sgRNA2 oligodubleksinin klonlandığı plazmid, 5 ve 6 numaralı kuyucukta sgRNA3 oligodubleksinin klonlandığı plazmid görünmektedir. M (Marker); 100 bç.

3.2.5.1. pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmidlerin PCR Dizi Analiz Bulguları

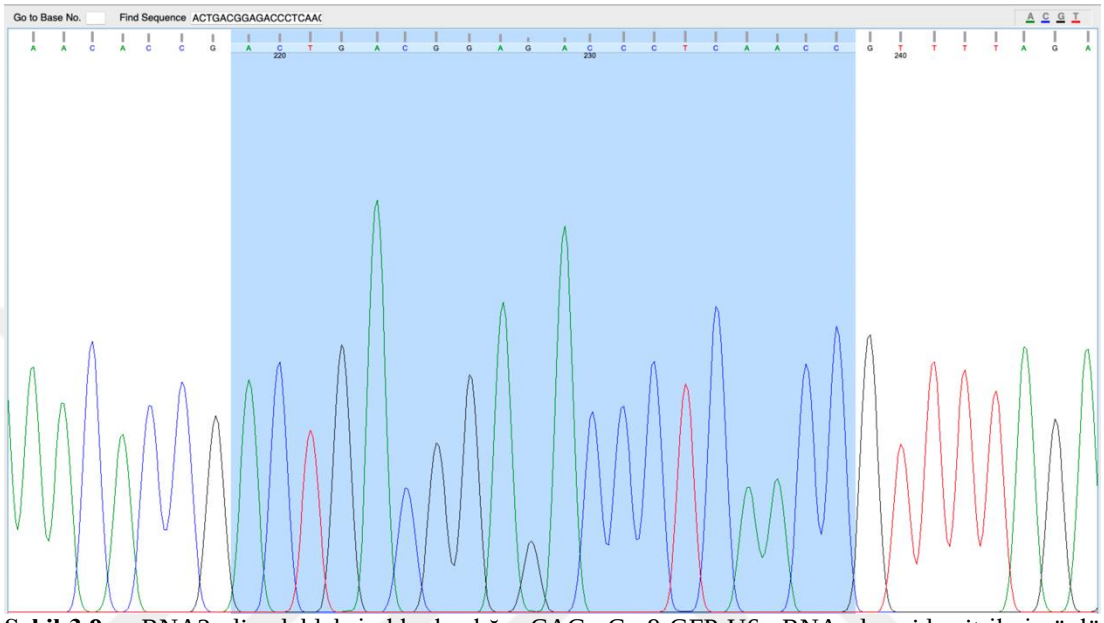
sgRNA1 oligodubleksin dizisi 5'-ACGGAGACCCTCAACCGGGA-3' şeklinde olup analiz sonuçlarında ilgili dizinin pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmide gRNA scaldfold bölgesinden dahil olduğu görülmektedir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. sgRNA1 oligodubleksin klonlandığı pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmide ait ileri yönlü dizi analiz sonucu elektroferogram görüntüsü.

Sonuç olarak CRISPR/Cas9 yapısı olarak rekombinant pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA1 plazmid yapısı başarıyla oluşturuldu.

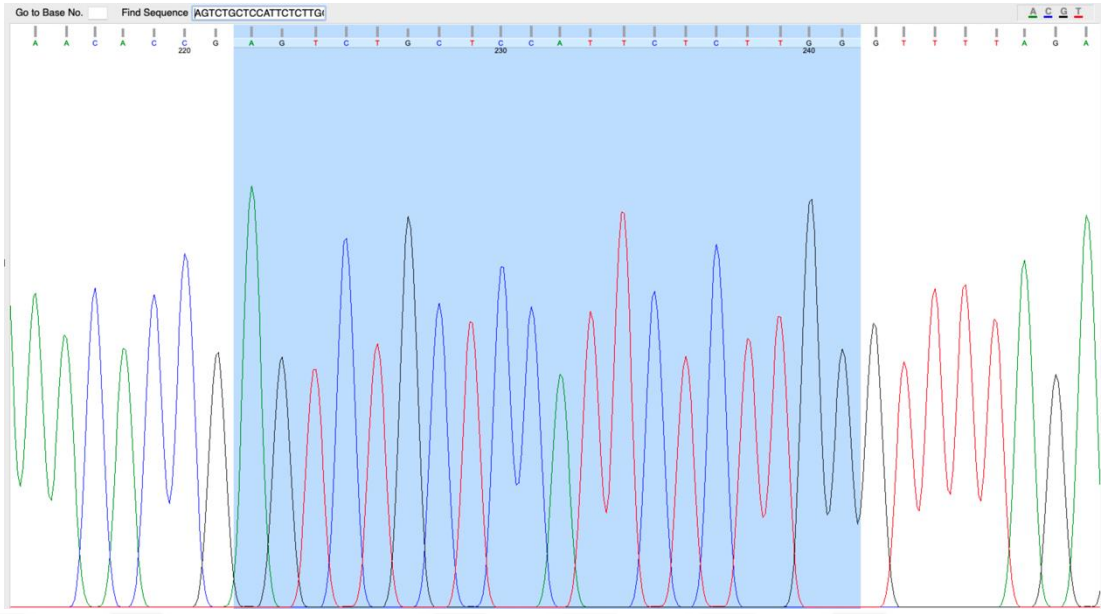
sgRNA2 oligodubleksin dizisi 5'-ACTGACGGAGACCCTCAACC-3' şeklinde olup analiz sonuçlarında ilgili dizinin pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmide gRNA scaldfold bölgesinden dahil olduğu görülmektedir (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. sgRNA2 oligodubleksin klonlandığı pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmide ait ileri yönlü dizi analiz sonucu elektroferogram görüntüsü.

Sonuç olarak CRISPR/Cas9 yapısı olarak rekombinant pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA2 plazmid yapısı başarıyla oluşturuldu.

sgRNA3 oligodubleksin dizisi 5'-AGTCTGCTCCATTCTCTTGG-3' şeklinde olup analiz sonuçlarında ilgili dizinin pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmide gRNA scaldfold bölgesinden dahil olduğunu göstermektedir (Şekil 3.10).

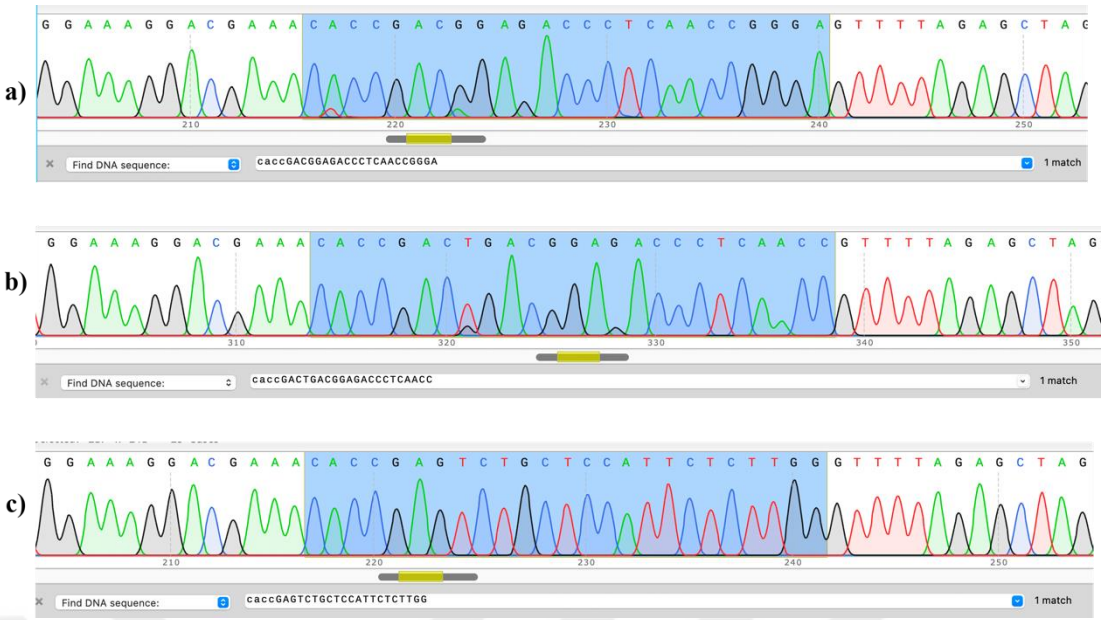


Şekil 3.10. sgRNA3 oligodubleksin klonlandığı pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmide ait ileri yönlü dizi analiz sonucu elektroferogram görüntüsü.

Sonuç olarak CRISPR/Cas9 yapısı olarak rekombinant pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA3 plazmid yapısı başarıyla oluşturuldu.

3.2.5.2. pX459V2.0-eSpCas9(1.1) plazmidlerin PCR Dizi Analiz Bulguları

pX459V2.0-eSpCas9(1.1) plazmid DNA'larından elde edilen PCR ürünlerinde ileri ve geri yönlü olmak üzere çift yönlü dizileme yapıldı. Elde edilen analiz sonuçları SnapGene programında pik şeklinde görüntülendi. sgRNA1, sgRNA2 ve sgRNA3 oligodublekslerin klonlandığı pX459V2.0-eSpCas9(1.1) plazmide ait dizi analiz sonuçları ile klonlamaların başarılı olduğu gösterildi (Şekil 3.11). Sonuç olarak CRISPR/Cas9 yapısı olarak sgRNA1, sgRNA2 ve sgRNA3'ün klonlandığı rekombinant pX459V2.0-eSpCas9(1.1) plazmid yapıları elde edildi.

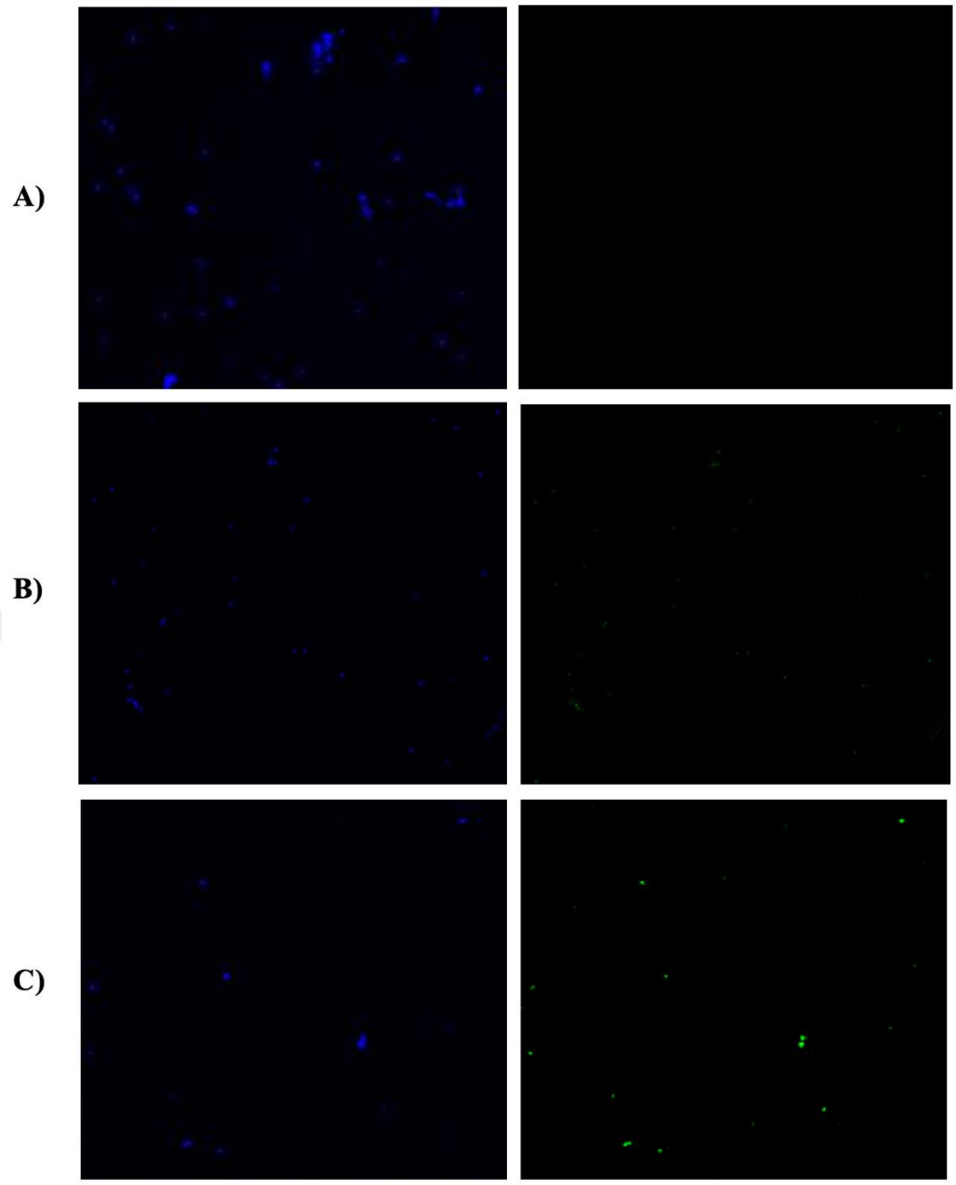


Şekil 3.11. pX459V2.0-eSpCas9(1.1) plazmide ait ileri yönlü elektroferogram görüntüsü. a) İleri yönlü sgRNA1 (5'-caccGACGGAGACCCTCAACCGGGA-'3) diziliminin elektroferogram görüntüsü, b) İleri yönlü sgRNA2 (5'-caccGACTGACGGAGACCCTCAACC-'3) diziliminin elektroferogram görüntüsü, c) İleri yönlü sgRNA3 (5'-caccGAGTCTGCTCCATTCTCTTGG-'3) diziliminin elektroferogram görüntüsü.

3.3. Hücresel Bulgular

3.3.1. GFP+ PBMC'lerin Floresan Mikroskop ile İncelenme Bulguları

PBMC'lere elektroporasyon ile transfeksiyonu optimize etmek amacıyla farklı voltajlarda atışlar ile pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmidleri PBMC'lere transfekte edildi. Elektroporasyona maruz bırakılmamış hücreler GFP+ sinyali vermezken 150V ve 200V atışlar ile pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid transfekte edilen hücreler elektroporasyon işleminden 24 saat sonra incelendiğinde GFP+ sinyali verdi. En yüksek transfeksiyon etkinliğinin ise 200V ile yapılan elektroporasyon işleminden alındığı belirlendi (Şekil 3.12).

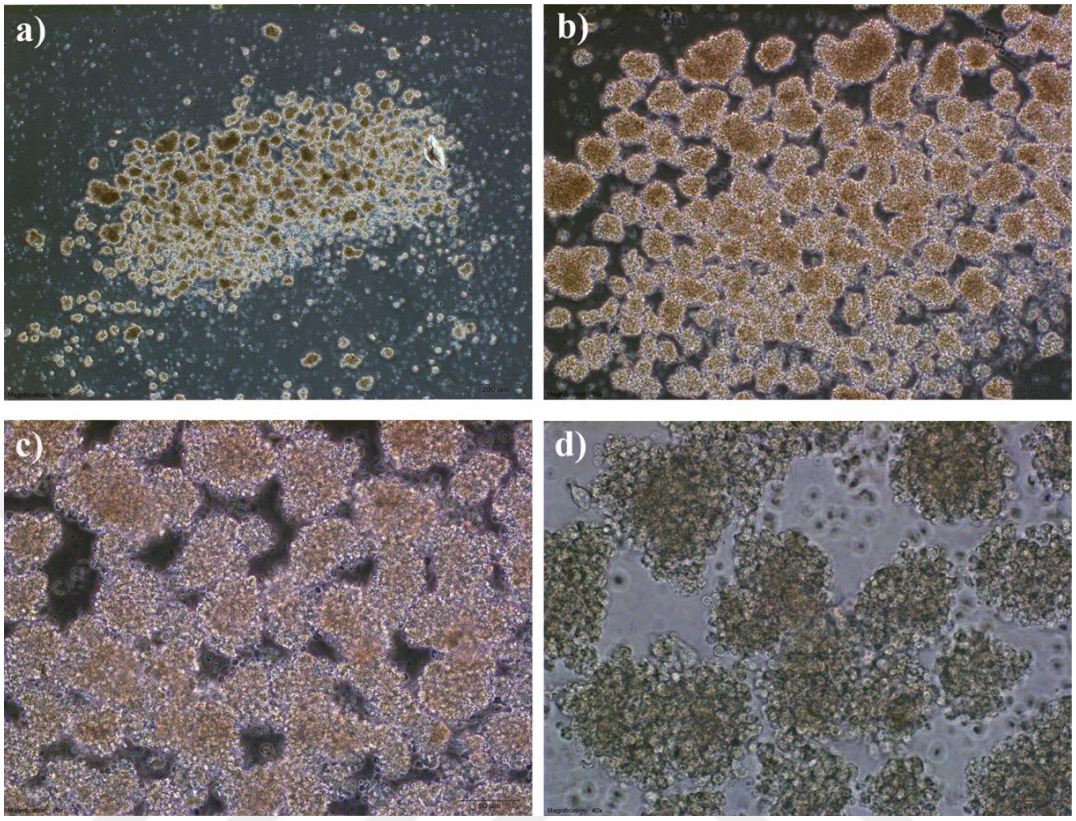


Şekil 3.12. GFP salınımının immunfloresans görüntüleri. A) Transfeksiyon yapılmayan hücrelerin görüntülenmesi, B) 150V elektrik akımı ile elektroporasyon uygulanmış hücrelerin görüntüleri, C) 200V elektrik akımı ile elektroporasyon uygulanmış hücrelerin görüntüleri. Sol panel: DAPI görüntüleri, Sağ panel: GFP salınım görüntüleri. Büyütme X10.

3.3.2. PBMC'lerin İnvert Mikroskop ile İncelenme Bulguları

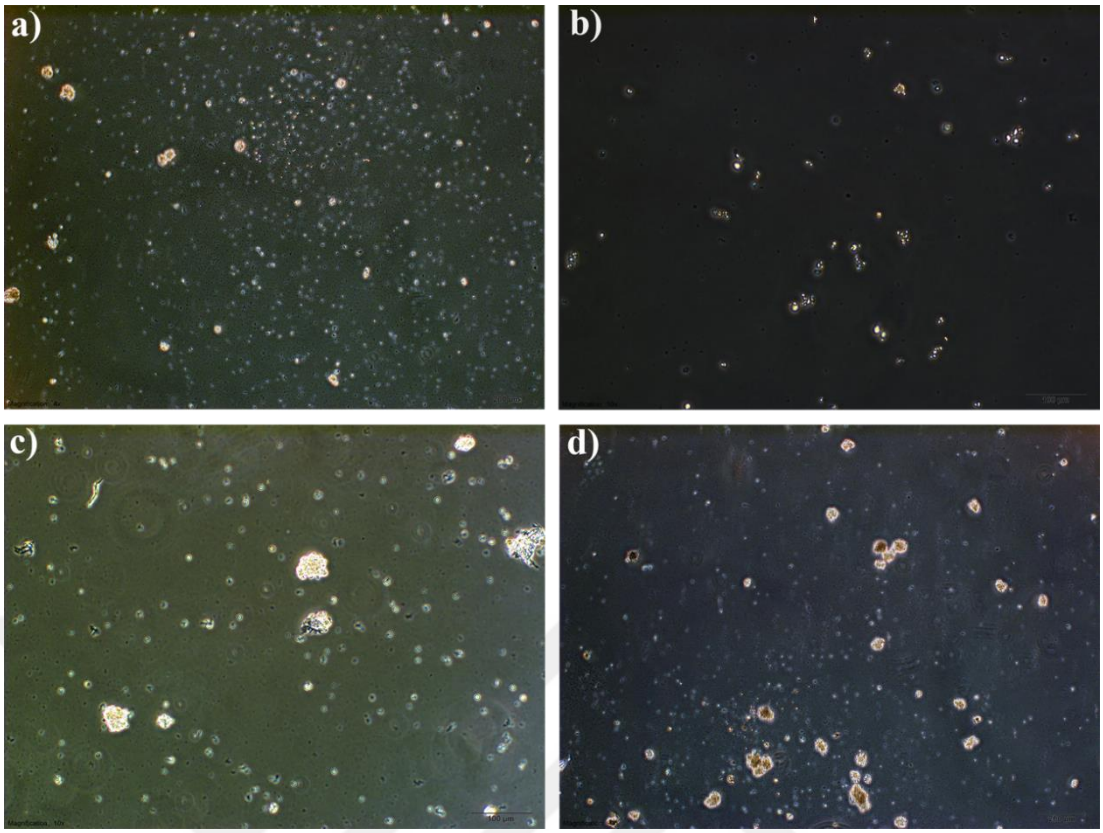
sgRNA1, sgRNA2, sgRNA3 oligodublekslerin klonlandığı pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmidler ve ssODN1, ssODN2, ssODN3 şablonların birlikte transfekte edildiği PBMC'lerin mitotik indeksleri dikkate alınarak %90 RPMI, %10 FBS içeren medyum ortamında 37°C'de %5 CO_2'li etüvde kültüre edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra medyum ortamına %1 penisilin/streptomisin ve 20 mg/ml PHA eklendi. Transfeksiyondan 72 saat sonra hücreler inverted mikroskop ile

farklı objektif büyütmelerinde incelendi. Sonuç olarak PBMC'ler elektroporasyon sonrası başarılı bir şekilde yaşatıldı (Şekil 3.13).



Şekil 3.13. PBMC'lerin invert mikroskop görüntüleri.

Yukarıda bahsedildiği gibi sgRNA1, sgRNA2, sgRNA3 oligodublekslerin klonlandığı pX459V2.0-eSpCas9(1.1) plazmidler ve ssODN1, ssODN2, ssODN3 şablonların birlikte transfekte edildiği PBMC'lerin mitotik indeksleri dikkate alınarak %90 RPMI, %10 FBS içeren kültür vasatında 37°C'de %5 CO_2'li etüvde kültüre edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra kültür vasatına %1 penisilin/streptomisin, 20 mg/ml PHA ve 2 µg/mL puromisin eklendi. Puromisin eklemesi 24 saat arayla 2 defa yapıldı. Transfeksiyondan 72 saat sonra hücreler inverted mikroskop ile farklı objektif büyütmelerinde incelendi. Sonuç olarak PBMC'lerin sağ kalımı sağlanamadı (Şekil 3.14).



Şekil 3.14. PBMC'lerin invert mikroskop görüntüleri.

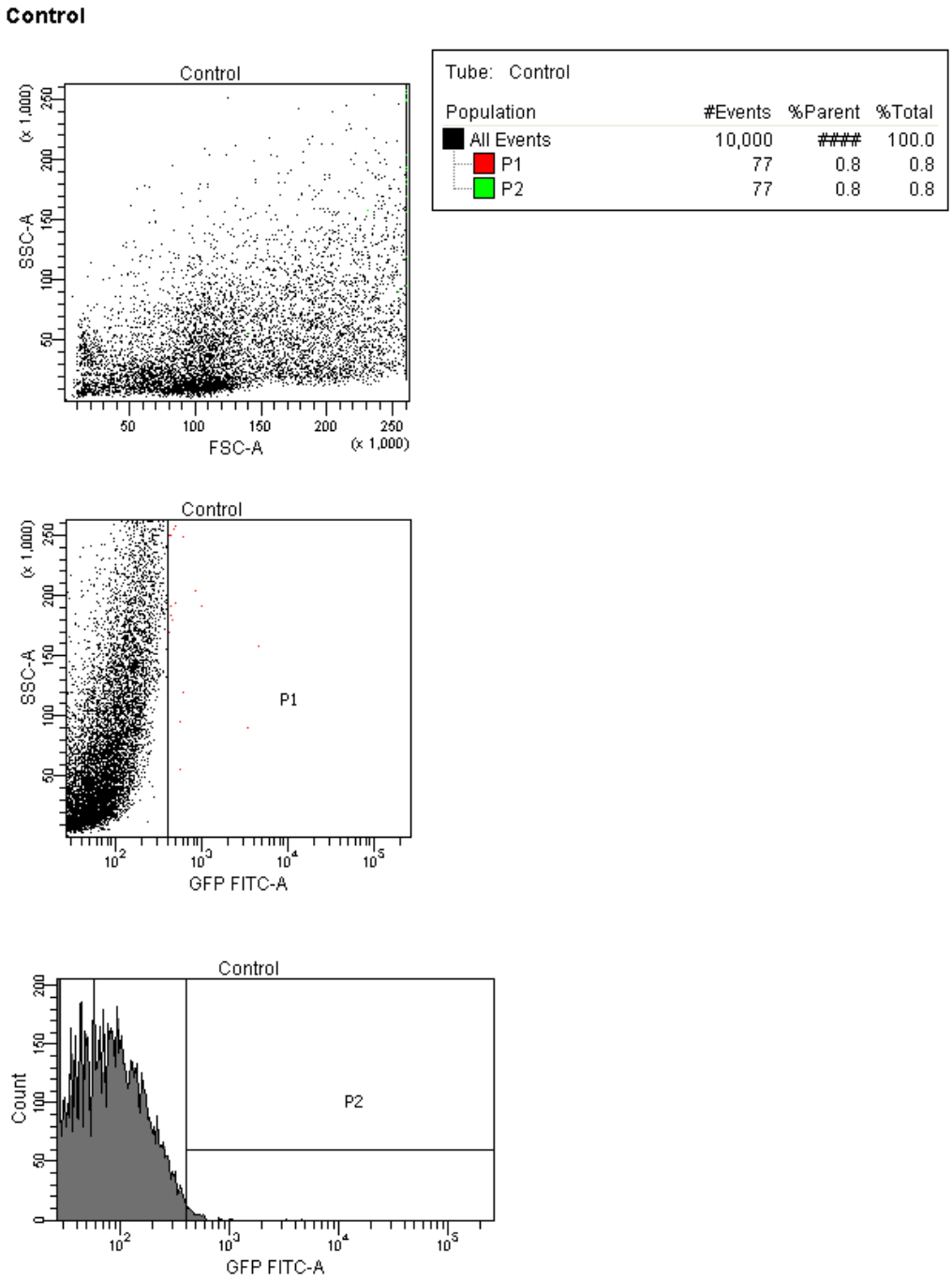
3.3.3. Flow (Akış) Sitometri Bulguları

sgRNA1, sgRNA2, sgRNA3 oligodublekslerin klonlandığı pX459V2.0-eSpCas9(1.1) plazmidler ve ssODN1, ssODN2, ssODN3 şablonların birlikte transfekte edildiği PBMC'ler ile yapılan flow sitometri bulguları Tablo 3.2.'de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Akış sitometri ile GFP+ ışıma veren PBMC'lerin orantısal olarak gösterimi.

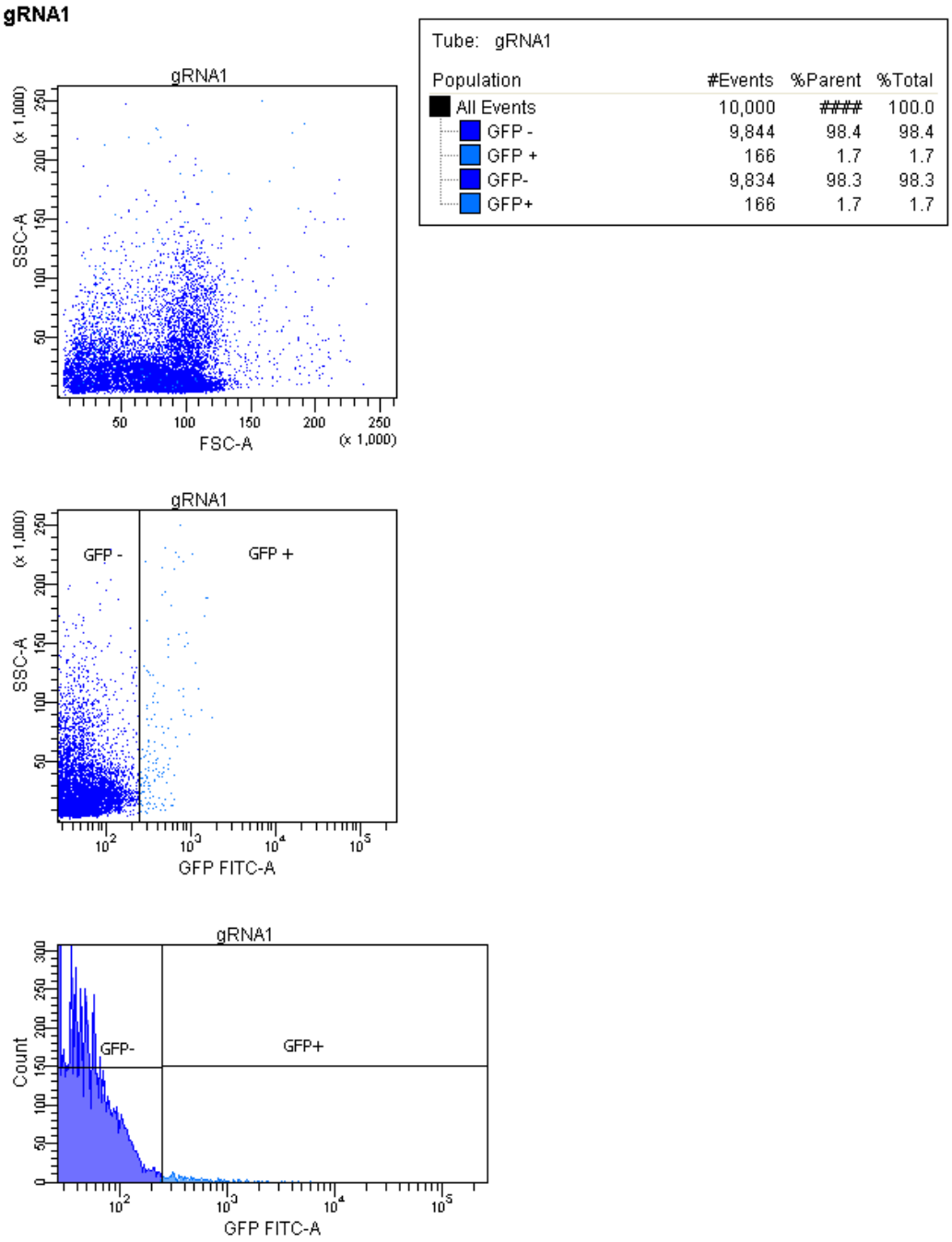
Transfeksiyon Grubu Hücreler	GFP-	GFP+
pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA1 plazmid	%98,3	%1,7
pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA2 plazmid	%98,4	%1,6
pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA3 plazmid	%98,6	%1,4
pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA1 plazmid + ssODN1	%96,3	%3,7
pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA2 plazmid + ssODN2	%97,3	%2,7
pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA3 plazmid + ssODN3	%97,7	%2,4

GFP+ hücreler, GFP+ sinyal vermeyen hücrelerden FACS cihazı ile FITC kanalından okunarak ayıklandı. Referans olarak transfeksiyon yapılmayan PBMC'ler kullanıldı (Şekil 3.15).



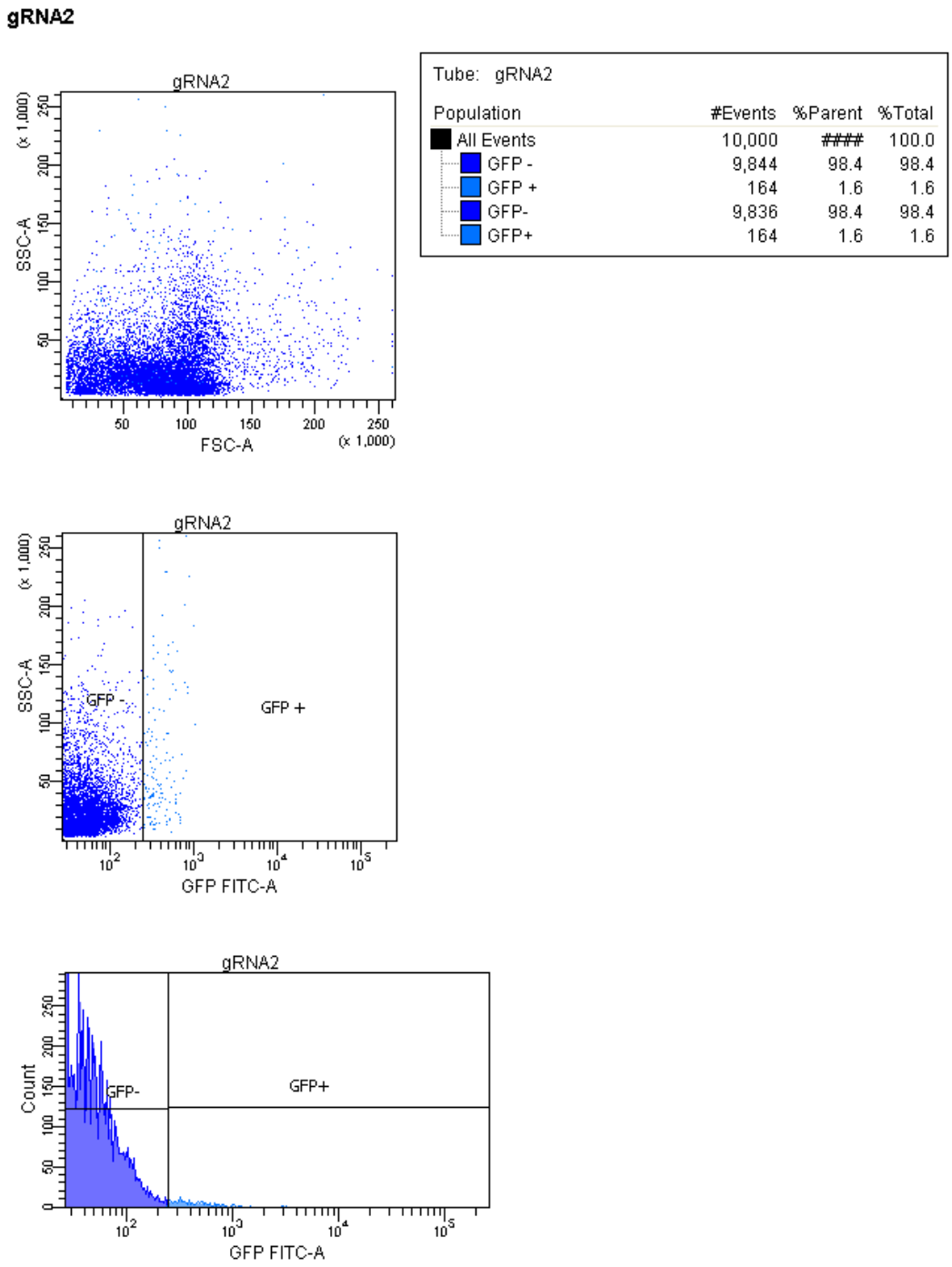
Şekil 3.15. Akış sitometri ile referans grubu hücrelerin granülite ve FITC kanalı okuma sonucu grafiksel gösterimi.

pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA1 plazmid transfekte edildiği PBMC'lerde %1,7 oranında GFP+ sinyal veren hücre tespit edilerek ayıklandı (Şekil 3.16).



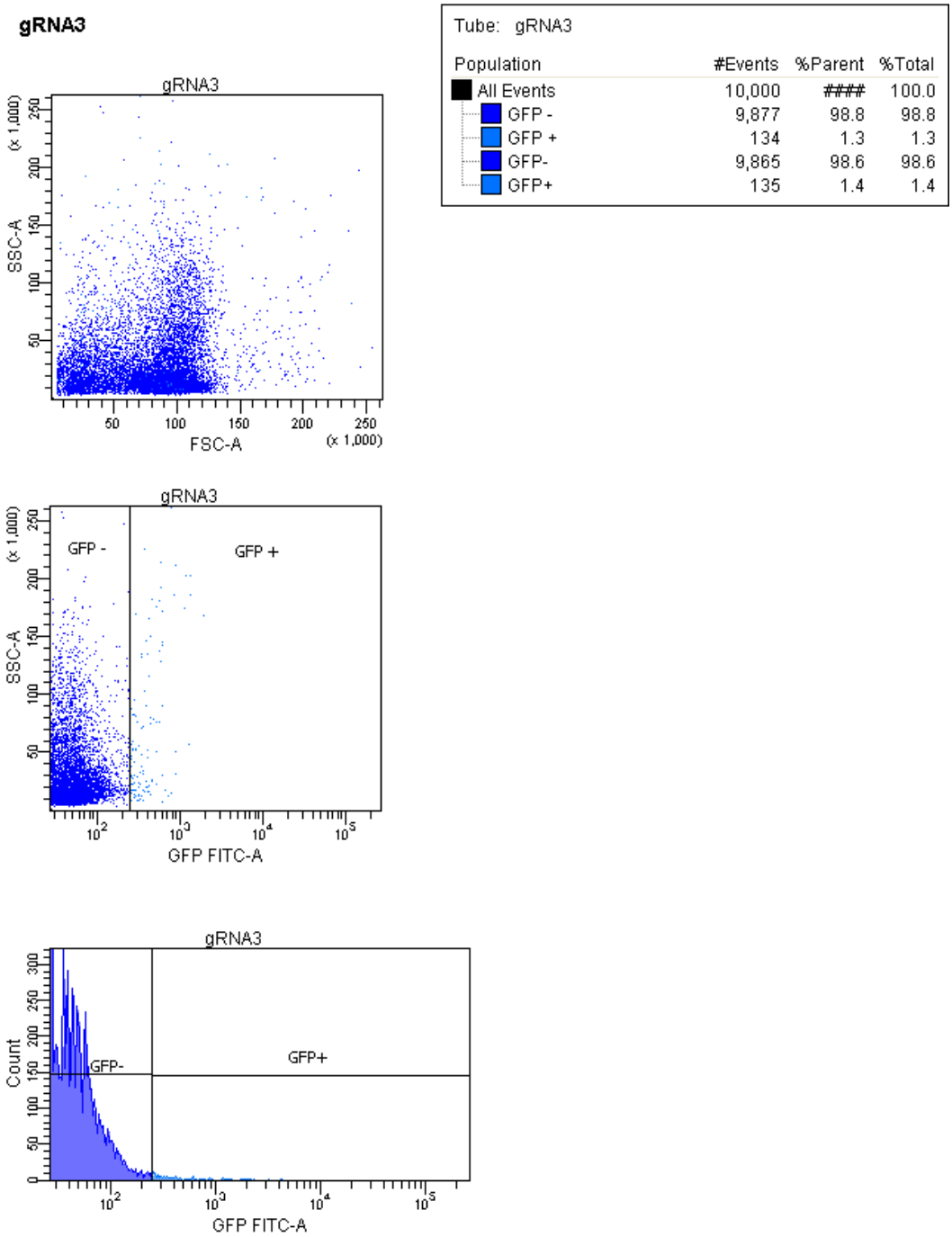
Şekil 3.16. Akış sitometri ile pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA1 plazmid transfekte edilen GFP+ ışıma veren hücrelerin granülite ve FITC kanalı okuma sonucu grafiksel gösterimi.

pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA2 plazmid transfekte edildiği PBMC'lerde %1,6 oranında GFP+ sinyal veren hücre tespit edilerek ayıklandı (Şekil 3.17).



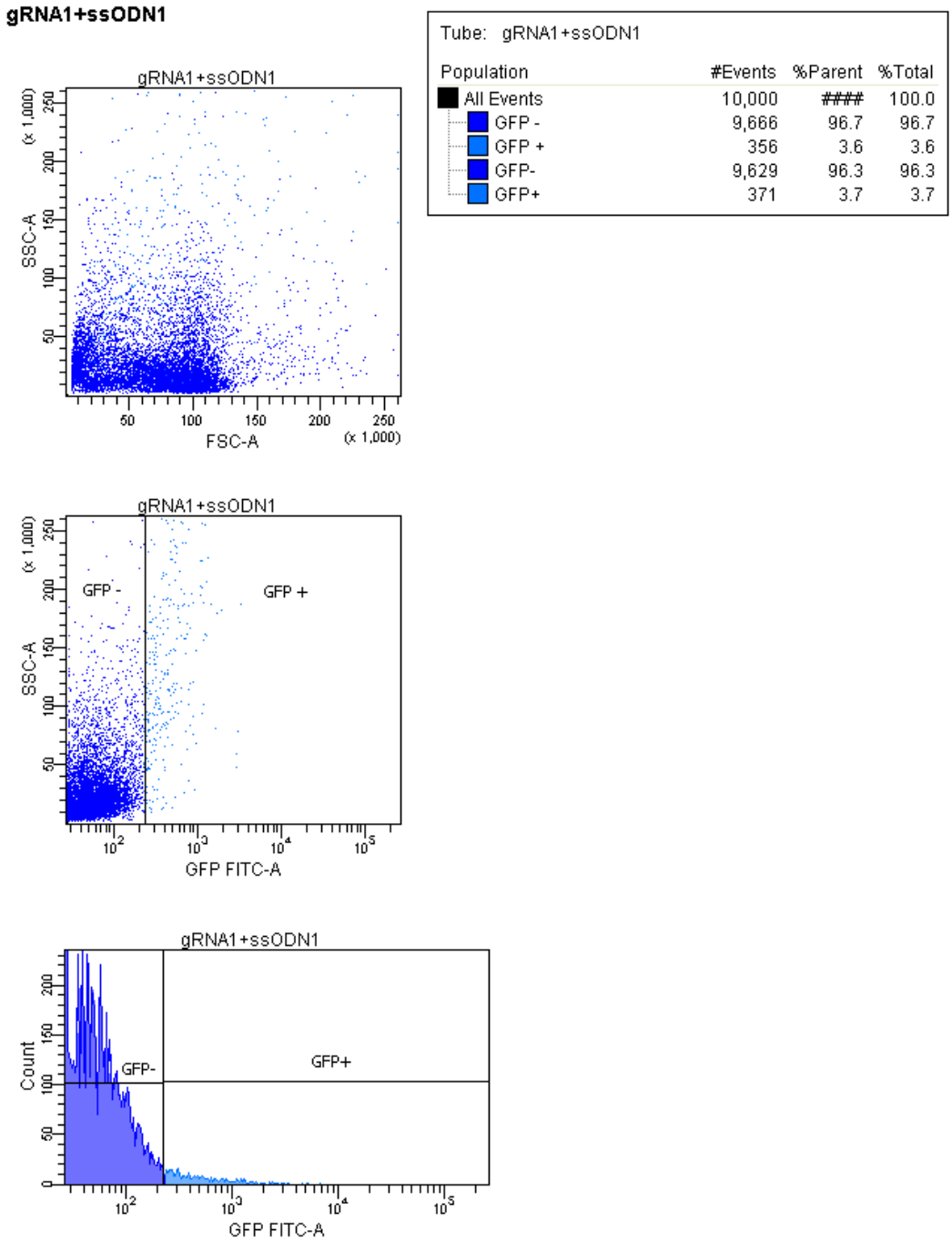
Şekil 3.17. Akış sitometri ile pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA2 plazmid transfekte edilen GFP+ ışıma veren hücrelerin granülite ve FITC kanalı okuma sonucu grafiksel gösterimi.

pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA3 plazmid transfekte edildiği PBMC'lerde %1,4 oranında GFP+ sinyal veren hücre tespit edilerek ayıklandı (Şekil 3.18).



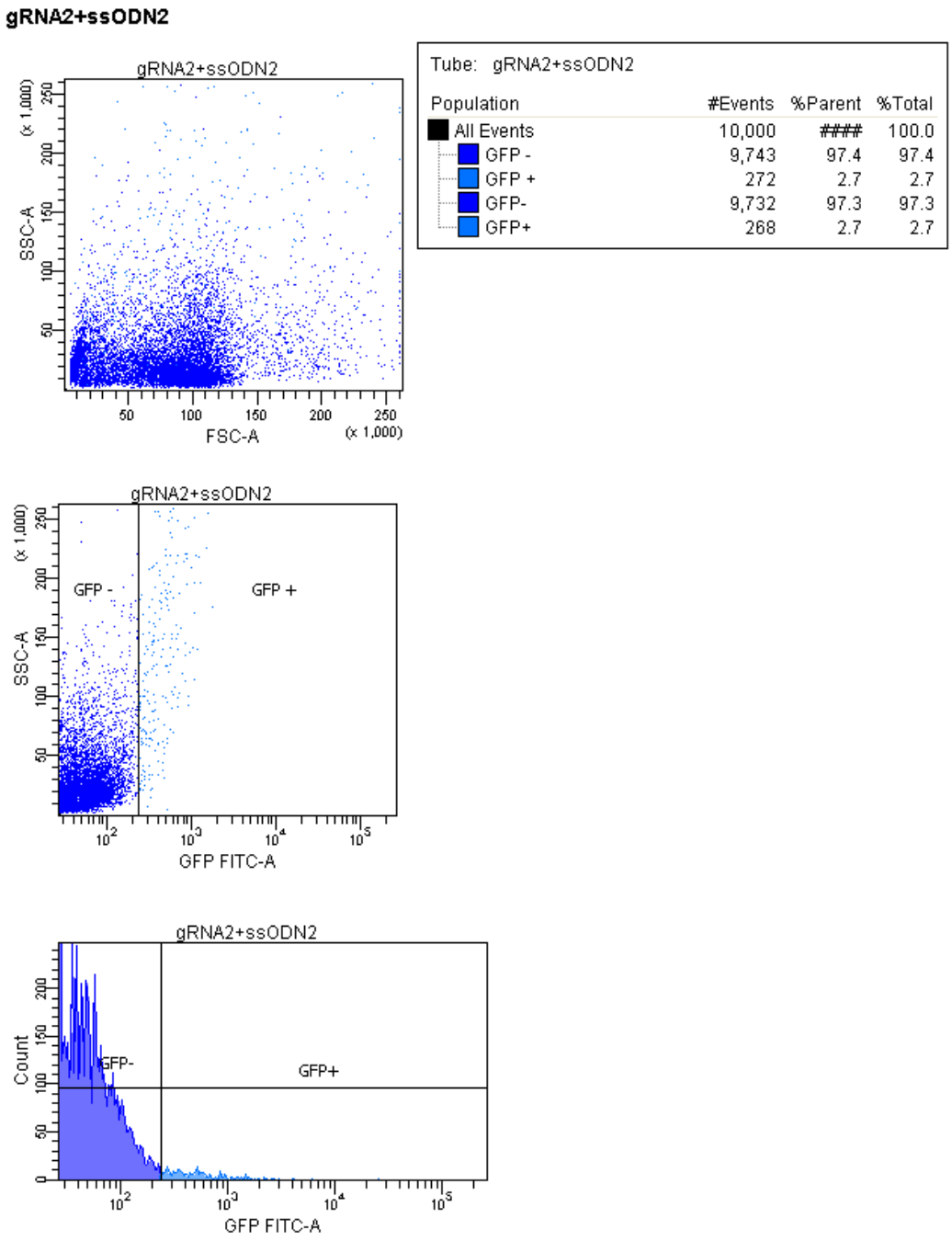
Şekil 3.18. Akış sitometri ile pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA3 plazmid transfekte edilen GFP+ ışıma veren hücrelerin granülite ve FITC kanalı okuma sonucu grafiksel gösterimi.

pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA1 plazmid ve ssODN1 şablonun birlikte transfekte edildiği PBMC'lerde %3,7 oranında GFP+ sinyal veren hücre tespit edilerek ayıklandı (Şekil 3.19).



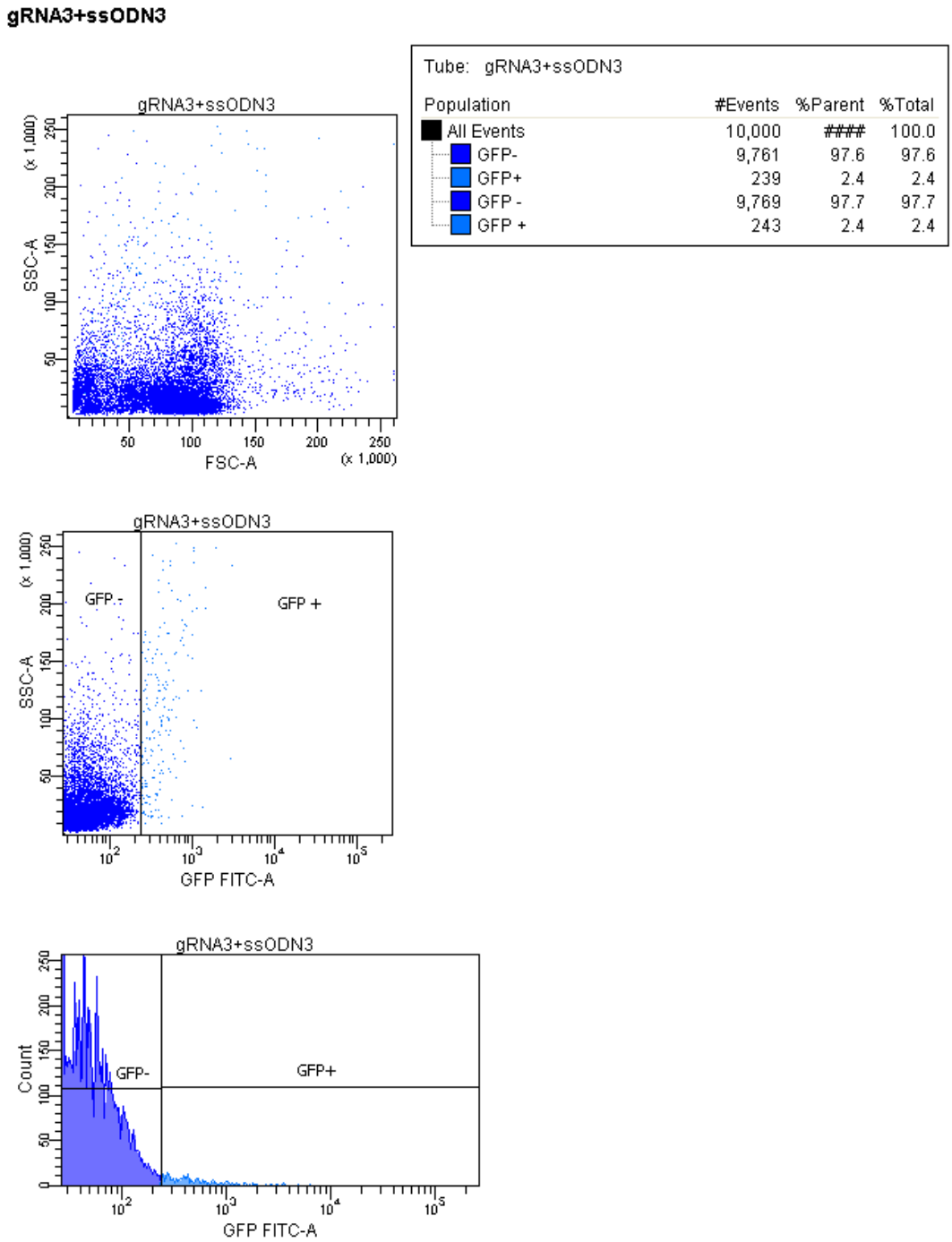
Şekil 3.19. Akış sitometri ile pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA1 plazmid ve ssODN1 şablonun birlikte aktarıldığı GFP+ ışıma veren hücrelerin granülite ve FITC kanalı okuma sonucu grafiksel gösterimi.

pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA2 plazmid ve ssODN2 şablonun birlikte transfekte edildiği PBMC'lerde %2,7 oranında GFP+ sinyal veren hücre tespit edilerek ayıklandı (Şekil 3.20).



Şekil 3.20. Akış sitometri ile pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA2 plazmid ve ssODN2 şablonun birlikte aktarıldığı GFP+ ışıma veren hücrelerin granülite ve FITC kanalı okuma sonucu grafiksel gösterimi.

pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA3 plazmid ve ssODN3 şablonun birlikte transfekte edildiği PBMC'lerde %2,4 oranında GFP+ sinyal veren hücre tespit edilerek ayıklandı (Şekil 3.21).



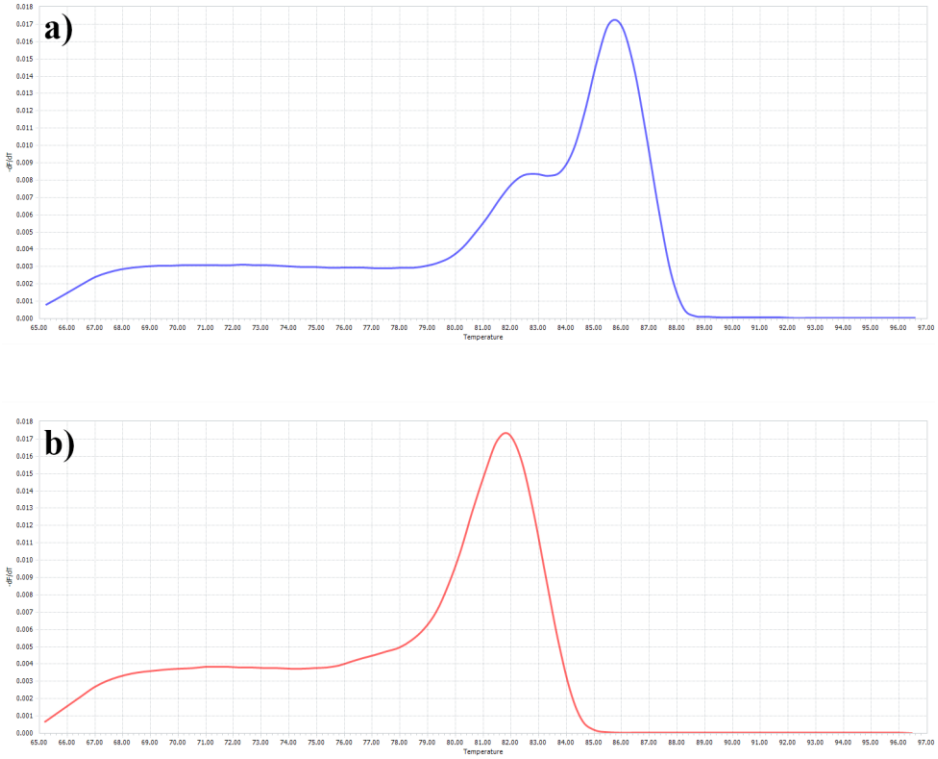
Şekil 3.21. Akış sitometri ile pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA3 plazmid ve ssODN3 şablonun birlikte aktarıldığı GFP+ ışıma veren hücrelerin granülite ve FITC kanalı okuma sonucu grafiksel gösterimi.

3.4. Genom Düzenleme Bulguları

3.4.1. Erime Eğrisi Analiz Bulguları

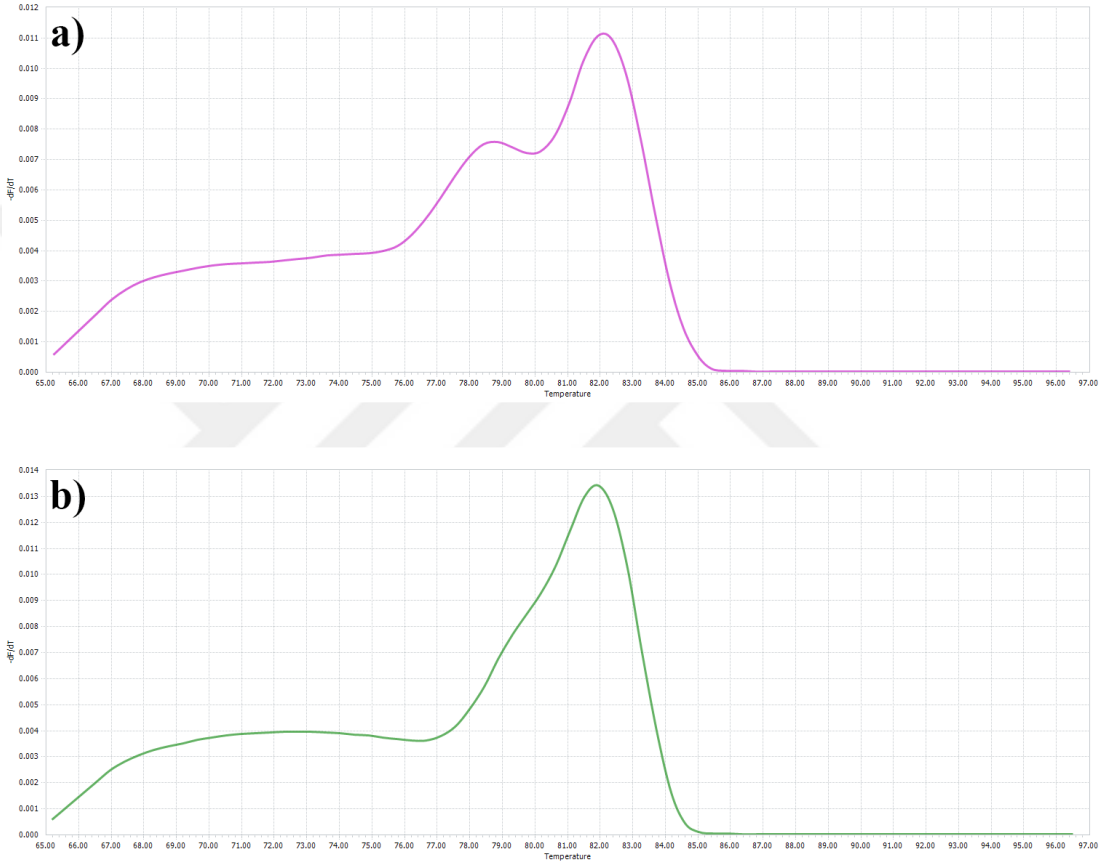
Akış sitometrisinde GFP+ sinyal veren ayıklanmış hücrelerden elde edilen DNA'lar ile R555W mutasyon bölgesini amplifiye edecek primerler kullanılarak erime eğrisi analizi yapıldı. Verilerin yorumlanmasını kolaylaştırmak için, erime eğrisi profili negatif türev (−dF/dT) olarak sunulmakta ve böylece PCR ürünü için erime zirvesi hesaplanmaktadır. Erime eğrisinin negatif birinci türevinin grafiği (-dF/dT), amplifikasyon reaksiyonundaki floresan seviyesinin değişim oranını temsil etmekte ve oluşan tepecikler kullanılarak *Tm* belirlenmektedir.

CRISPR uygulanmamış R555W mutasyonunu heterozigot olarak taşıyan hücrelere ait erime eğrisi analizinde ikiden fazla dalgalanmış eğri elde edildi (Şekil 3.22.a). pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA1 plazmid ve ssODN1 şablonun birlikte transfekte edilerek CRISPR uygulanan R555W mutasyonu heterozigot taşıyan PBMC'lerde heterozigot piklerdeki dalgalanmanın azaldığı dolayısıyla mutasyonun düzeltilerek daha kararlı bir erime eğrisinin elde edildiği gözlemlendi (Şekil 3.22.b). Yapılan kantitatif analizler sonucunda, pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA1 plazmid ve ssODN1 şablonun birlikte transfekte edildiği PBMC'lerde ~%5,64 oranında değişim saptandı.



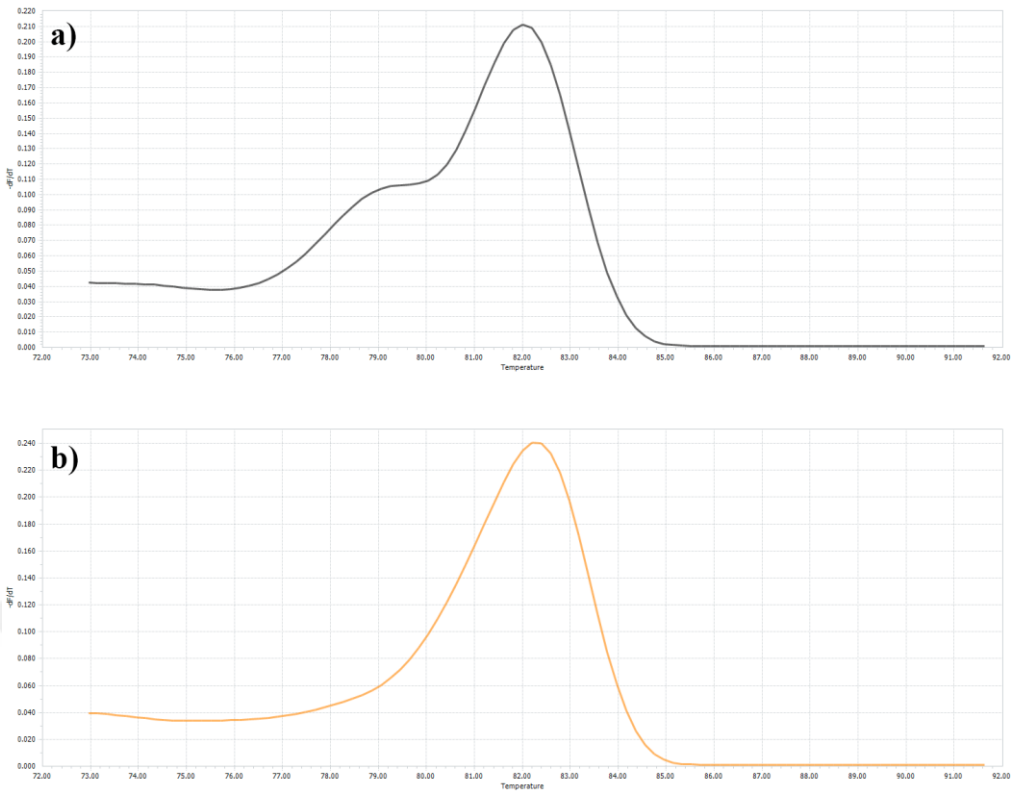
Şekil 3.22. Erime eğrisi analizi sonucu elde edilen pikler. a) CRISPR uygulanmamış hasta grubu erime eğrisi, b) CRISPR uygulanmış hasta grubu erime eğrisi.

pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA2 plazmid ve ssODN2 şablonun birlikte transfekte edildiği yani CRISPR uygulanan R555W mutasyonu heterozigot taşıyan PBMC'lerde heterozigot piklerdeki dalgalanmanın azaldığı dolayısıyla mutasyonun düzeltilerek daha kararlı bir erime eğrisi elde edildiği gözlemlendi (Şekil 3.23). Yapılan kantitatif analizler sonucunda, pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA2 plazmid ve ssODN2 şablonun birlikte transfekte edildiği PBMC'lerde ~%15,77 oranında değişim saptandı.



Şekil 3.23. Erime eğrisi analizi sonucu elde edilen pikler. a) CRISPR uygulanmamış hasta grubu erime eğrisi, b) CRISPR uygulanmış hasta grubu erime eğrisi.

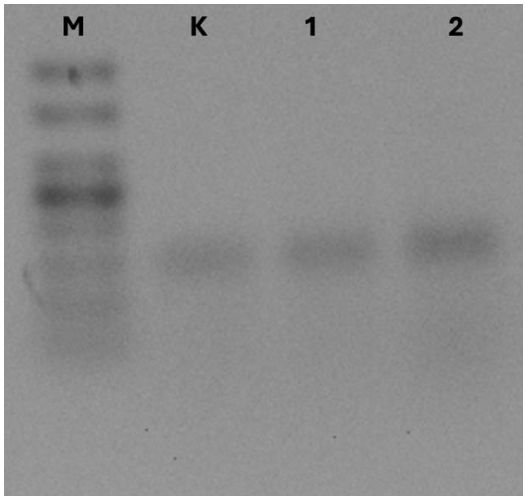
pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA3 plazmid ve ssODN3 şablonun birlikte transfekte edildiği, CRISPR uygulanan R555W mutasyonu heterozigot taşıyan PBMC'lerde heterozigot piklerdeki dalgalanmanın azaldığı dolayısıyla mutasyonun düzeltilerek daha kararlı bir erime eğrisi elde edildiği gözlemlendi (Şekil 3.24.b). Yapılan kantitatif analizler sonucunda, pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA3 plazmid ve ssODN3 şablonun birlikte transfekte edildiği PBMC'lerde ~%20,78 oranında değişim saptandı.



Şekil 3.24. Erime eğrisi analizi sonucu elde edilen pikler. a) CRISPR uygulanmamış hasta grubu erime eğrisi, b) CRISPR uygulanmış hasta grubu erime eğrisi.

3.4.2. T7 Endonükleaz I Analiz Bulguları

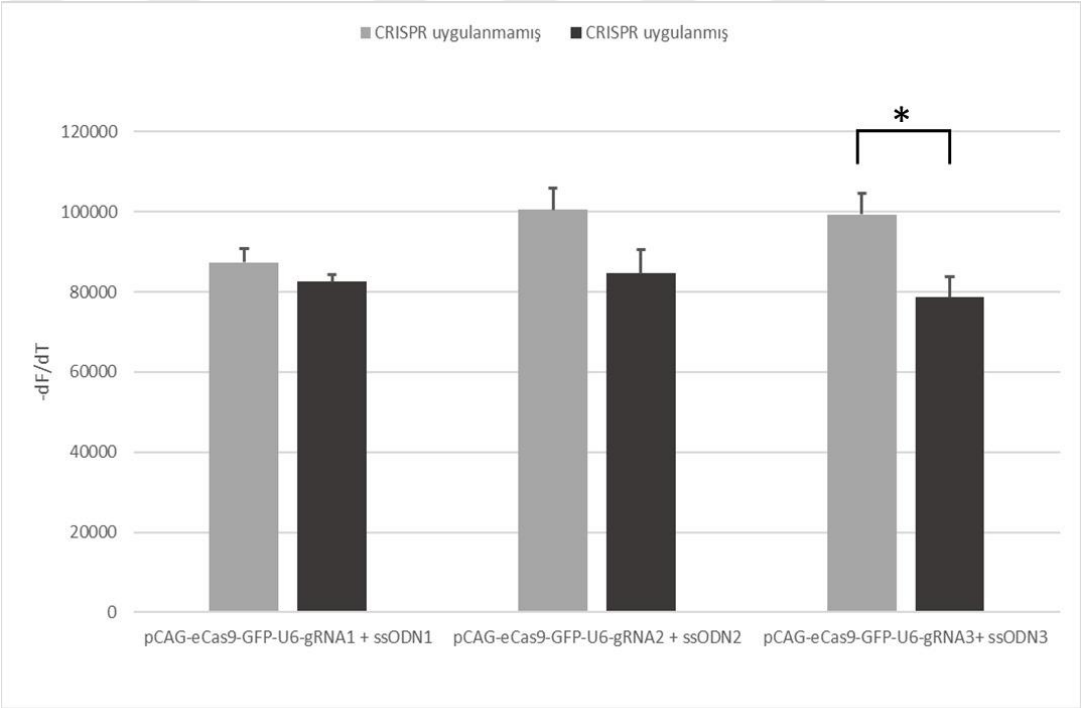
pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA3 plazmid ve ssODN3 şablonun birlikte transfekte edildiği, CRISPR uygulanan R555W mutasyonu heterozigot taşıyan PBMC'lerden elde edilen DNA'lar ile yapılan T7E1 analiz deneyi sonrası elde edilen jel görüntüsü incelendi ve kontrol grubuna kıyasla CRISPR uygulanan grupta bir değişim saptanmadı (Şekil 3.25).



Şekil 3.25. T7E1 enzim kesim analizinin elektroforez ortamında gösterimi. **M:** Markır; **K:** Kontrol grubu, **1:** sgRNA3 transfekte edilen PBMC grubu, **2:** sgRNA3+ssODN3 transfekte edilen PBMC grubu

3.5. İstatiksel Bulgular

pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA1 plazmid ve ssODN1, pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA2 plazmid ve ssODN2, pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA3 plazmid ve ssODN3 transfekte edildikten sonra akış sitometri ile ayıklanan PBMC'ler ile yapılan erime eğrisi analizleri sonucunda pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA3 plazmid ve ssODN3 şablonun birlikte transfekte edildiği PBMC'lerde, CRISPR öncesi ve sonrasındaki değişimin istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p<0.05$). pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA2 plazmid ve ssODN2 şablonun birlikte transfekte edildiği PBMC'lerde ki değişim ise marjinal olarak anlamlıdır ($p\leq0.05$). pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA1 plazmid ve ssODN1 şablonun birlikte transfekte edildiği PBMC'lerde ki değişim ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$) (Şekil 3.26).



Şekil 3.26. Erime eğrilerinin CRISPR uygulama öncesi ve sonrası istatiksel analizi (*p < 0.05)

4. TARTIŞMA

Çalışmamız, gözün kornea tabakasında bulanık agregatlar oluşumuyla karakterize olan, zamanla görme kaybı ve kornea nakline kadar ilerleyebilen granüler kornea distrofisi tip 1 tanısı almış hastaların periferal kan mononükleer hücrelerinde, hastalığa neden olan *TGFBI* geni R555W mutasyonunun CRISPR/Cas9 genom düzenleme teknolojisiyle düzeltilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. R555W mutasyonunu heterozigot olarak taşıyan hasta bireylerin PBMC'lerinde yapılan bu i*n vitro* çalışmada; sgRNA1+ssODN1 birlikte transfeksiyonu ile %5,64 oranında, sgRNA2+ssODN2 birlikte transfeksiyonu ile %15,77 oranında ve sgRNA3+ssODN3 birlikte transfeksiyonu ile %20.78 oranında mutasyon düzeltme başarısı sağlanmıştır. Bu çalışma ile ilk kez GCD1 hastalarının PBMC'lerinde hastalığa neden olan R555W mutasyonunun CRISPR/Cas9 teknolojisi ile düzeltilmesi gerçekleştirilmiş ve daha sonra yapılacak *in vitro, in vivo* ve *ex vivo* çalışmalara zemin hazırlanmıştır.

Kornea distrofileri, korneada değişik şekilli granüler agregatların birikmesi sonucu görme kaybına kadar ilerleyen görme bozuklukları ile karakterize bir hastalık grubudur (Weidle ve Lisch 1984). Kornea distrofilerinden en yaygın görünen formu olan GCD1'de çocuklukta başlayan bu agregatlar, yaş ilerledikçe artarak görmeyi etkilemekte, ışığa hassasiyet, fotofobi ve daha ileri yaşlarda görme kaybı ile sonuçlanabilmektedir. GCD1, otozomal dominant kalıtım kalıbıyla geçiş gösterdiği için mutasyonun taşınması durumunda dahi hastalık ortaya çıkmaktadır. *TGFBI* geni büyük oranda kornea epitel hücreleri tarafından kısmen de stromal keratositler tarafından ifade edilerek kornea matriksine salgılanmaktadır. *TGFBI* genindeki mutasyonların protein katlanmasını ya da protein sekresyonunu bozabileceği, mutant proteinin degrede edilemediğinden birikimle sonuçlanabileceği öngörülmektedir (Clout ve Hohenester 2003, Kannabiran ve Klintworth 2006).

Kornea distrofilerinin mevcut tedavi yaklaşımları, biriken agregatların temizlenmesine yöneliktir, ancak korneanın sürekli rejenere olması nedeniyle iyileşme geçici olup bir süre sonra agregatlar yeniden oluşmaktadır. Görme kaybının yüksek olduğu durumlarda kornea nakli yapılmakla birlikte, kornea epitelinin sürekli yenilenmesi ve kornea epitel hücrelerinin kornea periferinde yer alan ve nakil sırasında korunan, hastanın kendi limbal kök hücrelerinden köken alması nedeniyle bir süre sonra opasiteler oluşmaya başlamaktadır. GCD1 hastalığının tedavisinde,

agregatların oluşmasını yavaşlatan, durduran ya da yok olmasını sağlayan klinik yaklaşımların olmaması nedeniyle kalıcı genetik nedenlerin onarılmasını esas alan gen tedavi yaklaşımları önem kazanmaktadır.

Gen tedavisi, kalıtsal hastalıkların iyileştirilmesinde kullanılmak üzere geliştirilen yöntemler için kullanılan genel bir ifadedir ve 3 farklı stratejiden oluşur. Bunlar; gen takviyesi (replesman), gen susturma ve hedef hücrelerde genom düzenlemedir. Gen replesman; fonksiyonel yabanıl tip genin hedef hücrelere iletimini kapsayan yaklaşım şeklidir. Gen susturma; hastalık patojenitesinde yer alan genin işlevselliğinin etkisiz hale getirilmesidir. Genom düzenleme ise gen dizilerinde hedeflenen değişiklikleri mümkün kılan bir moleküler sistemin sağlanmasını içerir (Kaufmann ve ark 2013). Geleneksel olarak, gen replesman yaklaşımı kusurlu genin işlevsel bir kopyasının hastalığı iyileştirmek için sunulduğu gen tedavisi stratejilerine atıfta bulunmaktadır (Moore ve ark 2018). Bu yaklaşım, otozomal resesif retina distrofi tedavi yaklaşımı olarak uygulanmıştır (DiCarlo ve ark 2018). Ancak gen replesman yaklaşımı, mevcut mutant allelden mutant proteinin sürekli üretimi nedeniyle *TGFBI* ilişkili kornea distrofileri gibi otozomal dominant hastalıkların tedavisi için uygun olmamaktadır. Aksine, mutant alleli susturmayı amaçlayan gen susturma ve mutant alleli düzenlemeyi amaçlayan gen düzenleme yaklaşımlarının otozomal dominant hastalıklar için uygulanabilir bir tedavi stratejisi sunabileceği öngörülmüştür. Gen replesman yaklaşımında gene özgü cDNA taşıyan vektörler kullanılırken, gen susturma işleminde antisens RNA, küçük engelleyici RNA (siRNA) ve mikroRNA (miRNA)'lar kullanılmaktadır (Gaj ve ark 2013).

İnsan genomunda en sık rastlanan gen değişimleri nokta mutasyonlarıdır ve mutasyonların %50'sinden fazlasını oluşturmaktadır (Kim ve ark 2024). Homoloji yönlendirmeli tamir (HDR)'e dayalı genom düzenleme teknolojileri, özellikle hastalıklara neden olan nokta mutasyonlarını onarmak için kullanılmaktadır (Zhang 2021). Yakın zamanda geliştirilen CRISPR/Cas9 yeni nesil genom düzenleme teknolojisi, etkili bir mutasyon düzeltme tekniği olarak öne çıkmaktadır. CRISPR/Cas9 sistemi, hedef DNA dizisinde DSB oluşumunun indüklemesini takiben DSB'nin ekzojen donör DNA varlığında HDR aracılığıyla tamir edilmesi esasına dayanmaktadır (Torrecilla ve ark 2018).

Son yıllarda, nokta mutasyonların yol açtığı kornea distrofilerinde, CRISPR/Cas9 mekanizması yoluyla *in vitro* ve *in vivo* olarak nedensel mutasyonun

düzeltilmesini hedeflemeye yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Ancak bu çalışmaların yakın geçmişte başlaması nedeniyle CRISPR/Cas9 genom düzenleme sistemi ile *TGFBI* geninde meydana gelen mutasyonların düzenlendiği çalışmalar henüz sınırlı düzeydedir.

Taketani ve arkadaşları tarafından 2017 yılında GCD2 hastasına ait kornea dokusundan elde edilen primer kornea keratositlerinde *ex vivo* yapılan çalışmada CRISPR/Cas9 aracılı gen düzenlemenin başarılı olduğu gösterilmiştir. *TGFBI* geni ekzon 4 bölgesinde yer alan R124H mutasyonunun neden olduğu GCD2 hastalarının primer kornea keratosit hücrelerine, CRISPR plazmidi ve ssODN *in vitro* olarak kimyasal yöntem ile transfekte edilmiş ve kornea keratosit hücrelerinin DNA onarım yeteneğinin yüksek olması nedeniyle HDR'nin %60'ın üzerinde allel onarımı sağladığı rapor edilmiştir. Herhangi bir *off-target* etkinin saptanmadığının rapor edildiği bu çalışma, CRISPR/Cas9 ve HDR kullanılarak primer kornea hücrelerinde *TGFBI* geni R124H mutasyonun in vitro düzenlenmesini gösteren ilk çalışmadır (Taketani ve ark 2017).

HDR onarımı çoğu hücre tipinde nispeten nadir görülen bir mekanizma olarak kabul edilirken, NHEJ onarımı daha sık gözlenmektedir (Richardson ve ark 2018). Bir genin kodlama bölgesinde meydana gelecek NHEJ aracılı *indel* mutasyonlar translasyonun erken sonlanarak mRNA'nın bozulmasına yol açan, hedef genin kalıcı olarak susturulduğu çerçeve kayması mutasyonlarıyla sonuçlanabilmektedir. *TGFBI* geni ilişkili kornea distrofilerinde, *TGFBI* geninin haplo-yeterli oluşundan ötürü mutant allel susturulmasının sağlıklı alleli etkilemeksizin hastalık fenotipini giderek azalttığı bildirilmiştir (Christie ve ark 2017). Kim ve arkadaşları tarafından 2019 yılında yapılan çalışmada sağlıklı kornea dokularından elde edilen limbal epitel kök hücrelerde (Limbal Epithelial Stem Cells; LESC) CRISPR/Cas9 genom düzenleme sistemi ile *TGFBI* geni hedeflenmiştir. Yapılan genomik analizlerde, *TGFBI* geni ekzon 4 bölgesinde NHEJ aracılı düzenlenen delesyonlar sonucu oluşan çerçeve kayması mutasyonları ile stop kodonları oluşturulduğu ve mutant *TGFBI* geninin nakavt edildiği bildirilmiştir. Western blot analizi ile nakavt LESC klonlarında mutant TGFBIp ifadesinin olmadığı doğrulanmıştır. Çalışmadan elde edilen bulgular, CRISPR/Cas9 teknolojisinin bir uygulaması olarak, allel spesifik NHEJ aracılı gen susturulmasıyla

otozomal dominant hastalıkların tedavi edilebileceği fikrini ortaya çıkarmaktadır (Kim ve ark 2019).

TGFBI ilişkili kornea distrofileri gibi çok sayıda mutasyonun belirli bir hastalıkla ilişkili olduğu durumlarda, her mutasyon için farklı bir hedefleme potansiyeli yüksek, sgRNA tasarlamayı gerektiren CRISPR/Cas9 teknolojisi mümkün olamamaktadır. Fakat otozomal dominant kalıtılan *TGFBI* geni ilişkili kornea distrofileri bir model olarak kullanılarak, mutasyondan bağımsız allel spesifik CRISPR düzenleme bir hedefleme yaklaşımı olarak önerilmiştir. Otozomal dominant hastalıklar çoğunlukla tek nükleotid mutasyon (SNP)'larından kaynaklanmaktadır. Bu yüzden mutant allelin CRISPR sistemi ile NHEJ aracılı susturulması için, Cas9'un yalnızca tek nükleotid değişikliğiyle farklılık gösteren sağlıklı ve mutant alleller arasında iyi ayrım yapabilmesi gerekmektedir. CRISPR/Cas9 aracılığıyla mutasyonların allele spesifik düzenlenmesi, mutasyonun tasarlanan sgRNA dizisinde bulunduğu kılavuz spesifik bir yaklaşım veya mutasyonun yeni bir PAM ürettiği PAM-spesifik bir yaklaşım kullanılarak gerçekleştirilebilir. Kılavuz spesifik yaklaşımın başarılı bir şekilde uygulanması için hedeflenen mutasyonun yakın mesafesinde kullanılabilir bir PAM dizisine sahip olması gerekmektedir ve hedeflenen mutasyon, PAM dizisinden ne kadar uzaktaysa o kadar az allel ayrımcılığı gözlemleneceği için bu durumun yaklaşımı sınırladığı bilinmektedir. Benzer şekilde, yeni bir PAM dizisinin kullanılmasının ise allel özgüllüğü sağladığı gösterilmiş olsa da, mutasyonların yalnızca bir kısmı yeni bir PAM üretecektir. Her iki yaklaşım da belirli mutasyonlar bağlamında verimli bir şekilde kullanılabilirken, her ikisi de mutasyon bağımlı bir yaklaşımın sınırlamalarını vurgulamaktadır.

Sonuç olarak, hedefleme yaklaşımının artık mutasyonun yeri ile sınırlı olmayıp, ortak varyantların kullanılması ile belirli bir popülasyondaki etkilenen bireylerin çoğunu tedavi etmek için kullanılabileceği öngürülmüştür. Bu anlamda Christie ve arkadaşları 2020 yılında yaptıkları çalışmada, mutasyondan bağımsız bir stratejinin uygulanabilirliği araştırmak için NHEJ aracılı CRISPR/Cas9 genom düzenleme sistemini kullanarak başarılı sonuçlar elde etmişlerdir. Araştırmacılar ilk olarak *TGFBI* lokusundaki varyantları belirlemek için 1000 Genom Projesi faz 3 kohortundaki bireyleri minör allel frekansı (MAF)>0,1 olacak şekilde taramışlar ve bu kriterlere uyan 24 SNP belirlemişlerdir. Belirledikleri SNP'lerin bağlantı dengesizliği (linkage disequilibrium; LD) bloğunda yer almaları durumunda allel

ayrımı için yararlılığı azalacağından, bu SNP'lerin uygun olup olmadığını incelemişlerdir. *TGFBI* geni R124H mutasyonu için sadece mutant allel üzerinde bulunan PAM dizisini hedefleyecek şekilde tasarlanan gRNA yönlendirmeli Cas9 ribonükleoprotein kompleksi GCD2 hastasından elde edilen PBMC'lere kimyasal transfeksiyon ile aktarılarak allele özgü CRISPR/Cas9 genom düzenleme sistemi başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Elde edilen bulgular ile allele özgü CRISPR/Cas9 genom düzenleme sistemi otozomal dominant hastalıkların tedavisi için kalıcı bir yaklaşım olarak önerilmiştir (Christie ve ark 2020).

Yeni terapötik yaklaşımların araştırılmasına olanak sağlayacak kornea distrofisi modellemesine yönelik CRISPR/Cas9 genom düzenleme çalışmaları da literatürde mevcuttur. Bunların başarılı bir örneği 2020 yılında yapılan bir çalışma ile bildirilmiştir. Kitamoto ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, farelerde HDR aracılı CRISPR/Cas9 genom düzenleme sistemi ile LCD1 ile ilişkilendirilen *Tgfbi* geni ekzon 4 bölgesinde yer alan R124C mutasyon modeli oluşturulduğu bildirilmiştir. LCD1 hastalık patogenezinin araştırılması için modellenen farelerde, insan *TGFBI* ilişkili kornea distrofilerinde gözlemlenen benzer kornea opaklığı gibi klinik belirtiler gözlemlenmiştir. Bu çalışma, CRISPR/Cas9 yoluyla *Tgfbi* genine uygulanan nükleotid değişiminin kornea distrofisi gelişimini tetikleyebileceğini gösteren ilk çalışmadır (Kitamoto ve ark 2020).

Wang ve arkadaşları 2022 yılında fareler üzerinde HDR aracılı CRISPR/Cas9 genom düzenleme sistemi ile Thiel-Behnke kornea distrofisi (TBCD) ile ilişkilendirilen *TGFBI* geni ekzon 12 bölgesinde yer alan R555Q mutasyonunu oluşturarak hastalık modelleme çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir. Yaptıkları genomik ve klinik analizler ile korneasında TBCD hastalarına benzer birikintileri olan *Tgfbi* geni p.Gly623_Tyr626del mutasyonuna sahip fare modelleri oluşturulduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışma ile *Tgfbi* gen mutasyonlarının patojenik mekanizmaları hakkında da yeni bilgiler literatüre kazandırılmıştır. Modellenen mutasyonun bozulmuş otofaji ve lizozomal disfonksiyon eşliğinde mutant TGFBIp birikimine yol açtığı gözlemlenmiştir (Wang ve ark 2022).

Yaylacıoğlu ve arkadaşları ise 2024 yılında yaptıkları çalışmalarında, TALEN ve CRISPR/Cas9 genom düzenleme sistemleri ile, Avelino olarak da bilinen GCD2 ile ilişkilendirilen, *TGFBI* geni R124H mutasyon modelinin zebra balıklarında başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini bildirmişlerdir. R124H mutasyonuna spesifik

tasarlanan TALEN ve CRISPR bileşenleri zebra balığı kornealarına *in vivo* olarak transfer edilmiştir. Elde edilen genomik analizlere göre TALEN bileşenlerinin herhangi bir değişime neden olmadığı, CRISPR bileşenlerinin ise hedef bölgede p.Ser115_Arg117delinsLeu varyasyonuna neden olduğu rapor edilmiştir. Bu durumun, genom düzenleme tekniği olarak CRISPR'ın TALEN'e kıyasla daha etkin olduğunun bir göstergesi olduğunu belirtmişlerdir. CRISPR/Cas9 ile modellenen 3 aylık ve 1 yıllık zebra balığı kornealarında yapılan histopatolojik değerlendirmelerde ise herhangi bir birikime rastlanılmamış, fakat ilerleyen yaşlarda birikintiler görülebileceği bildirilmiştir. Çalışma zebra balıklarında *TGFBI* geni R124H mutasyonun *in vivo* modellendiği ilk çalışma olarak literatüre geçmiştir (Yaylacıoğlu Tuncay ve ark 2024).

TGFBI geni ile ilişkili olmayan kornea distrofilerine yönelik çeşitli CRISPR tabanlı gen tedavi çalışmaları da literatürde yer almaktadır. Kornea epitelinin rejenerasyon süresi ortalama 2 haftalık bir süreçtir (HANNA ve ark 1961). Limbus olarak bilinen konjonktiva ile kornea sınırında yer alan LESC'ler, kornea epitelinin yenilenmesinden sorumludur (Schermer ve ark 1986). Limbal kök hücre eksikliği (limbal stem cell deficiency; LSCD), limbus bölgesinin hasar görmesi nedeniyle korneanın rejeneratif yeteneğini kısmen veya tamamen kaybettiği bir patolojidir (Barut Selver ve ark 2017). Otolog limbal kök hücre eksplantlarının LSCD hastalarına transplantasyonu ilk olarak 1997'de rapor edilmiştir ve ciddi şekilde hasar görmüş kornealarda epitelyal fonksiyon ve görüşün onarılmasında dikkate değer sonuçlar elde edilmiştir (Pellegrini ve ark 1999, Rama ve ark 2010). Courtney ve arkadaşları ise 2014 yılında yaptıkları çalışmada, CRISPR/Cas9 kullanarak epidermal kök hücreleri genetik olarak değiştirmek için bu tekniği uyarlamaya odaklanmışlardır. Çalışmalarında Meesmann epitelyal kornea distrofisi (MECD) hastasından alınan limbal biyopsiden LESC'leri kültüre etmişler ve mutasyonun allele spesifik susturulmasını başarmışlardır. Bu çalışma, kültür ortamında LESC'lerin genetik olarak manipüle edilmesine yönelik konseptin bir kanıtıdır ve kök hücre nakil tedavisi öncesinde CRISPR/Cas9 mutant LESC'leri kalıcı olarak düzeltmek için benzer şekilde uygulanabilir (Courtney ve ark 2014).

Kornea epitel hücrelerinin ara filamanları olan KRT3 ve KRT12 proteinlerini kodlayan *K3* ve *K12* genlerinde görülen mutasyonlar ile ilişkilendirilen MECD'de hücre iskeletinin işlev bozukluğu, epitel kırılganlığı ve agregat oluşumu

gözlenmektedir (Irvine ve ark 1997). Courtney ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada mutant *K12* gen ifadesini ve agregat oluşumunu azaltmak için farklı stratejiler uygulanmıştır. Bunlardan ilki; insan MECD hücre hatlarında allel spesifik siRNA'ların kullanılarak mutant *K12* gen ifadesinin başarıyla baskılanmasıdır (Courtney ve ark 2014). Diğeri ise *K12 geni* Lösin132Prolin (L132P) (c. 395 T>C) mutasyonunu hedef alan kornea distrofilerinde ilk CRISPR/Cas9 gen düzenleme çalışmasıdır. Araştırmacılar bu çalışmada insanlaştırılmış fare modellerine instrastromal enjeksiyon ile spesifik CRISPR/Cas9 bileşenleri uygulayarak mutant allel üzerinde bir stop kodonu oluşturmuşlar ve protein seviyesinde önemli bir azalış gözlemlemişlerdir. Çalışmalarında herhangi bir *off-target* etki gözlenmediğini de rapor etmişlerdir. *In vitro* ve *in vivo* olarak yapılan çalışmalarda, siRNA yöntemi ile geçici mutant *K12* gen ifadesi baskılanması sağlanırken, CRISPR/Cas9 gen düzenleme yöntemi ile kalıcı mutant *K12* gen ifadesi baskılanmasının sağlandığı rapor edilmiştir. Mutant protein ifadesinin siRNA tarafından baskılanması geçici olduğundan ve göze sürekli uygulama/enjeksiyon gerektireceğinden, CRISPR/Cas9 gen düzenleme yöntemi ile kalıcı baskılanma sağlanması dikkat çekici bir alternatif strateji oluşturmaktadır (Courtney ve ark 2016).

Korneanın endotel tabakasında agregatların birikimiyle karakterize olan kornea endotel distrofilerinde de etkin bir tedavi mevcut değildir. Chang ve arkadaşları (2018), proliferatif kapasite açısından sınırlı olan kornea endotel hücrelerinin rejenerasyonunun, spesifik genlerin ifadesinin düzenlenmesi yoluyla indüklenebileceği düşüncesinden yola çıkarak yaptıkları çalışmada, CRISPR/dCas9 aktivasyon sistemi ile *SOX2* olarak bilinen transkripsiyon faktörünün ifadesini artırarak kornea endotel hücrelerinin proliferatif kapasitesini araştırmışlardır. Elde ettikleri verilere göre, düzenlenmiş *SOX2* aşırı ifadesinin hem *in vitro* hem de sıçan modelinde korneada yara iyileşmesini ve kornea endotel hücre proliferasyonunu indüklediğini bildirmişlerdir (Chang ve ark 2018). Benzer şekilde Joo ve arkadaşlarının 2020 yılında CRISPR/dCas9 aktivasyon sistemini kullanarak SIRT1'in kornea endotel hücrelerinin proliferatif kapasite üzerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında, SIRT1a'nın *in vivo* transfeksiyonun korneal endotel hücre proliferasyonunu indüklediğini göstermişlerdir. Çalışma sonuçlarından yola çıkarak SIRT1a'yı kullanan gen işlev aktivasyon terapisinin, insan korneal endotel

hastalıkları için yeni bir tedavi stratejisi olabileceğini önermişlerdir (Joo ve ark 2020).

Katarakt, glokom, keratopati, limbal kök hücre yetmezliği ve foveal hipoplazi gibi çeşitli klinik fenotipler ile seyreden konjenital aniridia otozomal dominant bir oftalmolojik hastalıkdır. Hastalığa *PAX6* genindeki heterozigot mutasyonların yol açtığı bilinmektedir. Genellikle yaşamın ilk on yılında başlayan ve tekrarlayan kornea erozyonları, subepitelyal fibrozis ve kornea opaklaşmasıyla sonuçlanan bu hastalık için etkili bir tedavi mevcut değildir. Roux ve arkadaşları 2018 yılında yaptıkları çalışmada, CRISPR/Cas9 genom düzenleme teknolojisini kullanarak limbal epitelyal kök hücrelerde heterozigot bir *PAX6* gen mutasyonu taşıyan *in vitro* aniridia hastalık modeli oluşturduklarını bildirmişlerdir. Dizileme sonuçlarına göre herhangi bir *off-target* mutasyon olmadan, %3,7'ye karşılık gelen bir başarı oranı ile *PAX6* geninde heterozigot p.E109X mutasyon modeli oluşturulmuştur. Böylece CRISPR/Cas9 genom düzenlemenin, yeni terapötik yaklaşımların uygulamasını büyük ölçüde kolaylaştıracak ilgili oküler hastalık hücresel modellerinin oluşturulmasına olanak sağladığı gösterilmiştir (Roux ve ark 2018).

Mirjalili Mohanna ve arkadaşları ise 2020 yılında yaptıkları çalışmada; konjenital aniridia için diğer terapötik yaklaşımların yanı sıra CRISPR tabanlı genom düzenlemeyi fare modeli üzerinde test etmişlerdir. CRISPR/Cas9 sistemi kullanarak yaptıkları germ hattı gen düzenlemesi ile mutant alleli %25 oranda düzenlemişlerdir. Sonuç olarak *Pax6* gen ifadesinin arttığı ve gen düzenlenmesi yapılmış fare modellerinde hastalık belirtisi oküler fenotipin ortadan kalktığı gözlemlenmiştir (Mirjalili Mohanna ve ark 2020).

Hafford ve arkadaşları tarafından 2019 yılında yapılan çalışmada, Fuchs endotelyal korneal distrofi (Fuchs' endothelial corneal dystrophy; FECD) ile ilişkili intronik *TCF4* geni üçlü tekrarın (CTG18.1) moleküler teşhisi için CRISPR/Cas9 destekli tek molekül gerçek zamanlı (Single-Molecule Sequencing in Real Time; SMRT) dizileme analizi yapılması amaçlanmıştır. Araştırmacılar tarafından SMRT kısaca; genomik DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesimi, gRNA rehberli Cas9 enziminin kesilmiş DNA fragmentlerinde spesifik bölgelerde DSB indüklemesi, DSB indüklenen fragmentlere spesifik adaptörler bağlanması ve adaptörlerin çeşitli bağlanmalar ile analiz edilmesi prensibine dayanan bir yöntem olarak kullanılmıştır. Sonuç olarak, bir FECD kohortu içindeki CTG18.1 uzunluk seviyelerine ilişkin yeni

bilgiler sağlanmış ve CRISPR bir moleküler tanı yöntemi olarak kullanılmıştır (Hafford-Tear ve ark 2019).

Uehara ve arkadaşları 2021 yılında yaptıkları çalışmada, *Col8a2* geninde Q455K ve L450W mutasyonları taşıyan FECD fare modelinde, CRISPR/Cas9 tabanlı genom düzenleme çalışması gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada Cas9 geni ve gRNA'yı kodlayan bir adenovirüsün (Ad-Cas9-Col8a2gRNA) kornea endotel hücrelerine intraoküler enjeksiyonu sonrası, mutant *Col8a2* gen ifadesinin etkili bir şekilde baskılandığı ve endotel hücre kaybının önlendiği raporlanmıştır. Bu çalışma proliferatif kapasitesi düşük hücre temelli hastalıkların tedavisinde dahi CRISPR/Cas9'un etkili bir şekilde kullanılabileceğini göstermiş olması bakımından dikkat çekicidir (Uehara ve ark 2021).

Konjenital kalıtsal endotelyal distrofi (CHED), otozomal resesif kalıtılan monogenik bir kornea hastalığıdır. Genellikle bebeklik döneminde başlayan, iki taraflı, simetrik ilerleyici kornea bulanıklığıyla karakterize edilen bir fonksiyon bozukluğudur. CHED vakalarının tedavisi, uygun cerrahi yöntem seçimi konusundaki ikilem ve diğer konservatif yaklaşımların eksikliği nedeniyle zorlayıcı olmaktadır. Uygulanan tedaviler arasında; kornea transplantasyonu, penetran keratoplasti (PK), rotasyonel otokeratoplasti (RAK), derin anterior lamellar keratoplasti (DALK), Desme soymalı otomatize endotelyal keratoplasti (DSAEK) ve Desme membran endotelyal keratoplastisi (DMEK) yer almaktadır. Ancak bu tedavi uygulamalarında, uygun donör kornea eksikliği, donör ile ilişkili bulaşıcı hastalık riski, karmaşık cerrahi prosedürler, ebeveynlerin çocuklarını ufak yaşta ameliyat ettirmeme isteği ve en önemlisi akut ve kronik evrelerde oluşabilecek greft reddi gibi sorunlarla karşı karşıya kalınmaktadır. Bu nedenle *SLC4A11* geninde meydana gelen mutasyondan kaynaklanan CHED tedavisinde, CRISPR/Cas9 teknolojisi kullanılarak mutasyonun *in vivo* olarak düzenlenmesinin sağlanabileceği önerilmektedir (Mehta ve Ramappa 2023).

Bir diğer distrofi olan, Bietti kristalin korneoretinal distrofi (BCD)'sinde, Meng ve arkadaşlarının 2024 yılında yaptıkları çalışmalarında hastalıkla ilişkilendirilen *CYP4V2* genindeki mutasyon hedeflenmiş ve CRISPR/Cas9 genom düzenleme teknolojisi HEK293T hücre hattına, BCD'li hastalardan elde edilen indüklenmiş pluripotent kök hücrelere (induced pluripotent stem cell; İPSC) ve Cyp4v3 fare modeline (h-Cyp4v3mut/mut) uygulanmıştır. sgRNA yönelimli Cas9 ile

donör dizinin birlikte aktarımı İPSC'lere kimyasal transfeksiyon, farelere ise subretinal enjeksiyon ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre *CYP4V2* geni ekzon 7 ile 11'de stop kodonu oluşturulduğu bildirilmiştir. Sonuç olarak CRISPR/Cas9 tabanlı gen düzenlemenin, BCD hastaları için umut verici yeni bir terapötik strateji olabileceğini ve tek bir enjeksiyonun yaşam boyu etkinlik sağlayabileceği bildirilmiştir (Meng ve ark 2024).

TGFBIp'nin fizyolojik rolü hakkında daha fazla bilgi sahibi olmak için yapılan genom düzenleme çalışmaları kornea ile sınırlı değildir. Bunun bir örneği olarak Allaman-Pillet ve arkadaşları 2015 yılında yaptıkları çalışmada, retina pigment epitel hücrelerinde *Tgfbi geni knock-out* edilmiş fare modeli oluşturduklarını rapor etmişlerdir. Cre-loxP sistemi kullanılarak *Tgfbi geni knock-out* edilen farelerde belirgin bir fenotipik değişiklik gözlenmediği, canlılığının ve fertilitesinin etkilenmediği belirtilmiştir. Bunun yanı sıra *knock-out* işleminin TGFBIp'nin en çok bulunduğu korneada dahi herhangi bir gelişimsel bozulma ya da anormal fenotipe yol açmadığı gözlenmiştir. *Tgfbi* gen ifadesi farklı hayvan türleri ve insan korneasında tanımlanmış olmasına rağmen, retinadaki ifadesi bu çalışma ile araştırılmış ve retina pigment epitel hücrelerinde *Tgfbi* gen ifadesinin gözlemlendiği bildirilmiştir (Allaman-Pillet ve ark 2015). Çalışma ile genomu düzenlenmiş otolog hücrelerin naklinin, retina distrofileri için de geçerli bir tedavi seçeneği olabileceği gösterilmiştir.

Çalışmamızda CRISPR/Cas9 tekniği kullanılarak *TGFBI* geni ekzon 12 bölgesinde yer alan R555W mutasyonun düzeltilmesi amaçlandı. Öncelikle mutasyonun düzenlenmesi için DSB indüklemesi yapacak en etkin sgRNA'nın belirlenmesi hedeflendi. Bunun için R555W mutasyonuna neden olan 1663.T nükleotid bölgesi dahilinde veya yakınında DSB indüklemesi yapabilecek 3 adet sgRNA tasarlandı. Tasarlanan sgRNA1, sgRNA2 ve sgRNA3 oligolarına ait *on-target* ve *off-target* skorlar yüksek güvene dayalı Benchling online programı kullanılarak belirlendi. Programın sunduğu alternatifler arasından en ideal *off-target* ve *on-target* skorlara sahip sgRNA oligoları ile çalışıldı. Tasarlanan sgRNA'ların hedeflenen gen bölgesi haricinde bir homoloji göstermemesi, genom içerisinde herhangi bir *off-target* mutasyon ihtimalinin en aza indirgenmesi anlamına geldiği için, blastlama işlemi ile doğrulama yapıldı. Blastlama sonucunda organizma (*homo sapiens*) içerisinde hedeflenen gen bölgesi haricinde bir homoloji saptanmadı.

Elde ettiğimiz bulgulardan yola çıkarak yaptığımız istatistiksel analizlerde, en yüksek genom düzenleme etkinliğini sgRNA3 yönlendirmeli Cas9 ve ssODN3 donör şablonun birlikte transfekte edildiği hücrelerde gözlemlendi. Bunun nedeninin sgRNA1 ve sgRNA2'ye göre sgRNA3 yönlendirmeli Cas9'un R555W mutasyon bölgesine daha yakın noktada DSB indükleyebilmesi olduğu öngörüldü. Çalışma bulgularımız, sgRNA'nın hedef mutasyon dahilinde veya yakınında DSB indüklenmesinin genom düzenleme etkinliğini artırdığını bildiren literatür bulgularını destekler yöndeydi. Ayrıca hedeflenen bölge dışında herhangi bir dizi ile homoloji göstermeyen yani *off-target* skoru en ideal olan sgRNA oligolarının kullanımının (Xiao ve ark 2014) önemi çalışmamızda da ortaya konulmuş oldu.

HDR aracılı CRISPR/Cas9 genom düzenleme etkinliğinin birçok faktör tarafından etkilendiği ve en önemlisinin homolog onarım şablonu olarak eksojen donör DNA kullanımı olduğu kabul edilmektedir (Li ve ark 2014). Song ve arkadaşları tarafından 2017 yılında yapılan çalışmada HDR etkinliğinin artırılmasında homoloji kolunun uzunluğunun önemli bir rol oynadığı ve homoloji kolların uzunluğu arttıkça genom düzenleme etkinliğinin de arttığı bildirilmiştir (Song ve Stieger 2017). Bir diğer faktör ise konak genomuna entegrasyonu engellemek için çift zincirli donör DNA (dsODN) yerine tek zincirli donör DNA (ssODN) kullanımıdır. ssODN, genlerin kodlama bölgesi içindeki tek bir nükleotid değişimi veya onarımını yönlendirmek için gen düzenleme işlemlerinde şablon olarak kullanılmaktadır (Rivera-Torres ve Kmiec 2016). Tüm bu hususlar dikkate alınarak, çalışmamızda homolog onarım şablonu olarak 200 nt uzunluğunda 3 adet ssODN tasarlanmıştır. HDR ile genom düzenleme etkinliğini değerlendirmek için çalışmada sgRNA1 DSB indüklemesi sonrası onarım şablonu olarak ssODN1, sgRNA2 için ssODN2 ve sgRNA3 için ssODN3 tasarımı gerçekleştirildi. ssODN1, ssODN2 ve ssODN3 onarım şablonları mutant tabana göre düzenlenmesi istenilen değişimleri içermekteydi. Bu değişimler ssODN'lerin; *TGFBI* geni ekzon 12 bölgesinde R555W mutasyonuna neden olan 1663. pozisyonda T nükleotid yerine C içermesi ve onarım gerçekleştikten sonra düzenleme bölgesinde Cas9 nükleazın tekrar bağlanamaması için mutant tabanda var olan PAM dizisinde meydana getirilecek sessiz mutasyon oluşturacak dizi değişiklikleri idi.

Gen tedavi alanındaki en önemli zorluklardan birisi gen bazlı terapötiklerin hücreye iletimi olarak bilinmektedir. Herhangi bir hastalığın tedavisi için gen

tedavisinin başarısı, terapötik transgenin hedef hücre tipine iletilebilme verimliliğine bağlıdır. Nükleik asitlerin büyük boyutları, stabiliteleri ve negatif yükleri hücrelere iletimini verimsiz hale getirmektedir. Nükleik asitlerin hedef hücrelere iletim etkinliğini artırmak için viral ya da viral olmayan vektörler kullanılmaktadır (Deyle ve Russell 2009). Gen tedavisi için ideal bir vektörün kolay, basit ve ucuz bir yöntemle üretilerek gerekli tüm CRISPR/Cas9 bileşenlerini taşıyabilecek bir kargo kapasitesine, spesifik hücre popülasyonu için hücre tropizmine, minimal genotoksisite ve konak hücrede ihmal edilebilir bir bağışıklık tepkisine sahip olması istenmektedir. Vektörün hedef dokuya etkili bir şekilde iletilmesi, konak organizma bağışıklık sistemi tarafından tespit edilmekten kaçınabilmesi, herhangi bir *off-target* etkiye neden olabilecek kadar uzun süre etkisinin olmaması, fakat en azından terapötik bir etki ortaya çıkaracak tepki süresine sahip olması beklenmektedir.

Gen tedavilerinde kullanılan viral vektörler; adenovirüsler, adeno-ilişkili virüsler (AAV), retrovirüsler ve lentivirüslerdir. Büyük bir kargo kapasitesine sahip olan adenovirüslerin ciddi bağışıklık tepkisi başlatabildiği bilinmektedir (Borrás ve ark 2001). AAV'ler ise minimum bağışıklık tepkisi ile etkili transdüksiyon sağlarken sınırlı paketleme kapasitesi olması nedeniyle kullanım alanları dardır (Sharma ve ark 2010). Büyük bir kargo kapasitesine sahip olmaları nedeniyle tercih edilen lentivirüsler ise genomda istenmeyen entegrasyonlara neden olabilmektedir (Athanasopoulos ve ark 2017). Bugüne kadar terapötik genlerin korneaya *in vitro, ex vivo* ve *in vivo* olarak aktarılması için farklı viral ve viral olmayan vektörler test edilmiştir. AAV, özellikle oküler gen tedavisinde, yüksek başarı oranı nedeniyle tercih edilen viral vektör olmuştur. AAV'nin yanısıra retrovirüsler ve lentivirüsler de kornea transdüksiyonunda kullanım açısından kapsamlı bir şekilde test edilmiş, ancak vektörlerden hiçbirinin arzu edilen kriterlerin tamamını sunmadığı görülmüştür (Mohan ve ark 2012).

Viral vektörlerin immünojenite ve onkojeniteyi indükleyebilme ve büyük boyutlu nükleik asitleri paketleyememe gibi dezavantajları, alternatif olarak daha güvenilir ancak etkinliği daha düşük olan viral olmayan vektörlerin gen tedavisinde kullanımına yol açmıştır. Viral olmayan plazmid vektörler daha az verimli olmasına rağmen, büyük boyutlu nükleik asitleri taşıyabilme ve daha güvenli olmaları nedeniyle tercih edilmektedirler (Moore ve ark 2018).

Yin ve arkadaşları tarafından 2017 yılında yapılan bir çalışmada, CRISPR bileşenlerini kapsüllemek için viral olmayan lipit nanopartiküllerinin kullanıldığı ve intravenöz enjeksiyon sonrası fare karaciğerinde *Pcsk9* geninin %80'den fazlasının düzenlendiği bildirilmiştir. Bu dikkat çekici sonuç ile göz için gen düzenlemede viral olmayan vektörler kullanımının viral vektörlere alternatif sunduğu gösterilmiştir (Yin ve ark 2017).

Çalışmamızda tasarlanan sgRNA1, sgRNA2, sgRNA3 oligolarının hedef hücrelere taşınımı ve sgRNA rehberli Cas9 salınımı için pX459V2.0-eSpCas9(1.1) ve pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA CRISPR/Cas9 plazmid vektörleri kullanılmıştır. Literatürde pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA ve pX459V2.0-eSpCas9(1.1) plazmid vektörlerin kullanıldığı ve başarılı sonuçların elde edildiği CRISPR/Cas9 genom düzenleme çalışmaları bulunmaktadır. Batır ve arkadaşları tarafından 2019 yılında yapılan çalışmada, insan prostat kanseri hücre hattı PC-3'ün TP53 geninde bulunan 414delC (p.K139fs*31) mutasyonunun HDR aracılı CRISPR/Cas9 ile düzenlenmesi için pX459V2.0-eSpCas9(1.1) plazmid vektörü ve ssODN'ler kullanılmıştır. TP53 414delC pozisyonunda %19,95 ve %26,0 oranlarında düzenleme yapıldığı bildirilmiştir (Batır ve ark 2019). Johnston ve arkadaşları tarafından yapılan CRISPR/Cas9 genom düzenleme çalışmasında ise lenfoblastoid hücre hatlarında (lymphoblastoid cell line; LCL) DSB indüklemesi için pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid vektörü kullanılmıştır. Daha önce birçok hücre tipinde yapılan çalışmalarda HDR aracılı düzenleme verimliliğin %5–10 oranları arasında olduğunu, kendi çalışmalarında ise %20 gibi yüksek bir düzenleme etkinliğinin elde edildiğini raporlamışlardır (Johnston ve ark 2019). pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid vektörünün kullanıldığı bir diğer CRISPR/Cas9 çalışması ise Boestler ve arkadaşları tarafından 2020 yılında yapılan insan embriyonik kök hücrelerinde (Human Embryonic Stem Cells; hESC) Coffin-Siris sendromu (CSS)'nun modellemesidir. Elde edilen verilere göre, *ARID1B* geninin ekzon 5 ve 6 bölgelerinde oluşturdukları delesyonlar ile ARID1B+/- hESC'lerin modellemesini başardıklarını bildirmişlerdir (Boerstler ve ark 2020). Daha önceki yapılan çalışmaları destekler şekilde çalışmamız pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA ve pX459V2.0-eSpCas9(1.1) plazmidlerinin, CRISPR/Cas9 genom düzenleme teknolojisi için ideal birer vektör adayı olduğunu göstermektedir.

In vitro çalışmalarda CRISPR/Cas9 etkinliğini değiştiren bir diğer önemli husus, çalışılan hücrelerin primer ya da sekonder hücre hatları olması durumudur. Bireyden elde edilen primer periferal kan mononükleer hücrelerine CRISPR/Cas9 bileşenlerinin iletimi, düşük transfeksiyon etkinlikleri nedeniyle sınırlıdır (Mandal ve ark 2014). Bu yüzden PBMC çalışmalarında gözlemlenebilecek CRISPR/Cas9 aktivite eksikliği, plazmid DNA aktarım yetersizliği ve özellikle lenfositlerin yabancı nükleik asitlere karşı doğuştan gelen bağışıklık tepkisi gibi bir dizi faktöre bağlıdır (Monroe ve ark 2014). Ancak özellikle hasta bireylerden yapılan çalışmalarda kolay erişilebilir olması ve bir girişime ihtiyaç olmaması nedeniyle periferik kandan elde edilen hücreler kullanım avantajı sağlamaktadır. Bu nedenle elektroporasyon yöntemi kullanılarak, CRISPR/Cas9 plazmid bileşenlerinin PBMC'lere geçici olarak aktarılması ile bu zorluğun üstesinden gelinebilmektedir (Schumann ve ark 2015). Çalışmamızda elektroporasyon tekniği kullanılarak CRISPR/Cas9 bileşenleri ve ssODN oligolarının PBMC'lere geçici transfeksiyonunun gerçekleştirilmesi sağlandı.

Çalışmamızda, PBMC'ler elektroporasyondan önceki üç gün boyunca, transfeksiyon verimini artırdığı bilinen PHA ile uyarılarak kültüre edildi. Ayrıca, transfekte edilecek plazmid konsantrasyonu, iletilecek hücre sayısı, uygulanacak elektrik alan kuvveti gibi bir dizi parametrenin transfeksiyon verimi ve işlem sonrası hücre canlılığın devamı için önemli olduğu bilindiğinden (Zhang ve ark 2018) elektroporasyon işlem verimini artırmak için elektrik alan kuvveti göz önüne alarak pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid vektörleri ile optimizasyon çalışması gerçekleştirildi. Plazmidin yapısında bulunan GFP gen bölgesi yeşil floresan proteini ifade ettiğinden plazmidin başarılı bir şekilde hücre içerisine transfer edildiğini göstermede kullanıldı. Çalışmamızda, GenePulser Xcell cihazı 'square wave' programında 150V ve 200V olacak şekilde farklı elektrik alan kuvvetleri ile transfeksiyon işlemi gerçekleştirildi. Elektroporasyon işlemi sonrası 24. saatte floresan mikroskop altında GFP+ hücre canlılığı gözlemlendi. Transfeksiyon işleminin etkinliği, PBMC'lerin canlılığı ve sürdürülebilirliği için optimal elektroporasyon koşulları olarak cihazın 'square wave' programında 200V, 3ms dalga süresince 1 atış olarak belirlendi. PBMC'lere transfeksiyon için optimize ettiğimiz çalışmamız elektroporasyon değerleri daha önceki yıllarda Wong ve arkadaşları tarafından yapılan optimizasyon çalışmasından elde edilen değerler ile benzerlik gösterdi (Wong ve ark 2020).

Elektroporasyon işleminden 24 saat sonra, akış sitometri cihazında pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA1 ve ssODN1'in birlikte transfekte edildiği hücrelerde %3,7, pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA2 ve ssODN2'nin birlikte transfekte edildiği hücrelerde %2,7 ve pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA3 ve ssODN3'ün birlikte transfekte edildiği hücrelerde %2,4 oranında GFP+ sinyal veren hücre tespit edilerek GFP- hücrelerden ayıklandı. Ayıklanan hücreler invert floresan mikroskop ile inceleyerek GFP+ ışıması görüntülendi. Çalışmamızın akış sitometri bulguları ile Johnston ve arkadaşlarının pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA plazmid vektörü kullanarak lenfositlerde yaptığı CRISPR/Cas9 çalışmasına ait akış sitometri bulguları uyum göstermektedir (Johnston ve ark 2019).

Çalışmamızda, sgRNA1, sgRNA2 ve sgRNA3 oligodublekslerin klonlandığı pX459V2.0-eSpCas9(1.1) plazmidler ve ssODN1, ssODN2, ssODN3 şablonların birlikte transfekte edildiği PBMC'lerde transfekte olan hücrelerin seçiliminde ise plazmidin puromisin dirençlilik geni taşımasından dolayı antibiyotik seçilimi uygulandı. Elektroporasyon sonrası 24 saat inkübe edilen PBMC'lerin besiyeri ortamına, içerisinde 2 µg/mL puromisin bulunan besiyeri ilavesi yapıldı. Puromisin antibiyotik içeren besiyeri ilavesinden 24 saat sonra PBMC'lerde çoğalmanın durduğu ve apoptoza girerek hücre kayıpların başladığı görüntülendi. İlerleyen süreçte hücre kaybının artması ile pX459V2.0-eSpCas9(1.1) plazmid vektörü transfekte edilen PBMC'ler kaybedildi. Bu durumun nedeni olarak uygulanan puromisin miktarının fazla olduğu öngörüldü. Bu yüzden çalışmamız genom düzenleme analizlerinde pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA1 ve ssODN1, pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA2 ve ssODN2, pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA3 ve ssODN3'ün birlikte transfekte edildiği hücreler kullanıldı.

CRISPR/Cas9 ile R555W mutasyonun düzenleme etkinliğini belirlemek için pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA1 ve ssODN1, pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA2 ve ssODN2, pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA3 ve ssODN3'ün birlikte transfekte edildiği PBMC'lerden elde edilen DNA'lar kullanılarak, farklı sıcaklıklarda çift sarmallı DNA miktarını ölçerek belirli bir PCR ürünü için erime eğrisini ortaya çıkaran floresans bazlı bir teknik olan erime eğrisi analizi gerçekleştirildi. Nükleotid değişimlerinin hızlı ve etkili bir şekilde test edildiği bu analiz, homozigot örnekten elde edilen bir homodubleks ürünün belirli bir erime eğrisine sahip iken, heterozigot örnekten elde edilen bir heterodubleks ürünün ek bir erime eğrisine sahip olması

esasına dayanmaktadır (Thomas ve ark 2014). Tek nükleotid polimorfizmlerin tespitinde rutin olarak kullanılan bir teknik olan erime eğrisi analizi son zamanlarda CRISPR/Cas9 sistemi ile düzenlenen nükleotid değişimlerinin analiz edilmesi amacıyla da sıklıkla kullanılmaktadır. Wang ve arkadaşları tarafından 2015 yılında yapılan çalışmada, insan 293T hücre hatlarının *IL2RG* ve *EMX1* genlerini CRISPR/Cas9 yöntemi ile düzenlenerek, erime eğrisi analizi ve çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi (Amplified Fragment Length Polymorphism; AFLP) yöntemleri ile analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; zaman alıcı ve zahmetli AFLP yöntemine kıyasla daha basit ve kısa bir süre uygulama gerektiren erime eğrisi analizin sonuçlarının daha kesin ve yüksek hassasiyet içerdiği bildirilmiştir (Wang ve ark 2015).

Denbow ve arkadaşları tarafından 2017 yılında yapılan çalışmada CRISPR/Cas9 aracılı bir mutasyon taşıyan Arabidopsis mutantlarının erime eğrisi analizi kullanılarak başarılı bir şekilde tespit edildiği bildirilmiştir (Denbow ve ark 2017). Kojin ve arkadaşları tarafından 2021 yılında yapılan çalışmada ise Sarıhumma sivrisineklerinde (*Aedes* aegypti) CRISPR/Cas9 aracılı düzenledikleri *indel* mutasyonların tespitinde ve mutant hatların kurulmasında erime eğrisi analizinin başarılı bir şekilde kullanıldığı bildirilmiştir (Kojin ve ark 2021).

PCR ürününün nükleotid sayısı erime eğrisi analiz duyarlılığını etkileyen en önemli faktörlerden birisidir. Kuzpınar tarafından 2007 yılında yapılan çalışmada amplikon boyutunun erime eğrisi analiz duyarlılığı üzerine olan etkisi araştırılmış ve amplikon boyutunun 300 nükleotid altında olduğu durumlarda erime eğrisi analiz duyarlığının arttığı raporlanmıştır (Kuzpınar 2007). Thomas ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise erime eğrisi analiz duyarlılığını artırmak için amplikon boyutunun olabildiğince azaltılması gerektiği vurgulanmıştır (Thomas ve ark 2014). Daha önceki yapılan çalışmalar dikkate alınarak, çalışmamızda erime eğrisi analiz duyarlılığını artırmak için 170 nükleotid amplikon üretecek şekilde tasarladığımız primerler kullanıldı.

CRISPR uygulanmamış R555W mutasyonu heterozigot taşıyan hücre DNA'ları ile yapılan erime eğrisi analizinde birden fazla dalgalanmış eğri elde edilirken, CRISPR uygulanan R555W mutasyonu heterozigot taşıyan hücre DNA'ları ile yapılan erime eğrisi analizinde daha kararlı bir tek eğri elde edildi. Bu dikkat çekici değişikliğin nedeni olarak, erime eğrisi analizlerinin akış sitometresinde

GFP+ olarak ayıklanan hücrelerden elde edilen DNA'lar ile yapılmasından kaynaklandığı öngörülmektedir.

Sonuç olarak, çalışmamızda elde edilen veriler CRISPR uygulanmış hücrelerde HDR ile *TGFBI* geni R555W mutasyon düzenlemesinin başarı ile gerçekleştiğine dair güçlü kanıt olabilecek niteliktedir. Çalışmamızda pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA1 ve ssODN1, pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA2 ve ssODN2, pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA3 ve ssODN3'ün PBMC'lere birlikte transfeksiyonlarının *TGFBI* geni R555W mutasyonunu farklı oranlarda düzenlediği gözlemlendi. pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA1 ve ssODN1 için %5,64, pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA2 ve ssODN2 için %15,77, pCAG-eCas9-GFP-U6-gRNA3 ve ssODN3 için ise %20,78 oranında *TGFBI* geni R555W mutasyonunu düzenlenmiş PBMC analiz edildi. Çalışmamızda analiz edilen düzenleme oranlarındaki bu farklığın nedeni olarak, tasarlanan sgRNA'ların, hedeflenen R555W mutasyon bölgesinden farklı nükleotid uzaklıklarda DSB oluşumunu indüklemesine bağlı olduğu düşünülmektedir. Hedeflenen R555W mutasyonu için sgRNA1 68 nükleotid, sgRNA2 64 nükleotid, sgRNA3 ise 6 nükleotid uzaklıkta DSB oluşumunu indükleyecek şekilde tasarlandığı için, sgRNA3 yönlendirmeli Cas9 genom düzenlemenin diğerlerine göre daha etkin olacağı beklenmekteydi. CRISPR/Cas9 tarafından oluşturulan DSB'ler, hedef nükleotidin 50 nükleotid dahilinde olması durumunda gen düzenleme verimliliğinin maksimuma çıktığı, DSB bölgesinin hedef nükleotid bölgesinden uzaklaşması durumunda ise düzenleme sıklığının azaldığı raporlanmıştır (Briggs ve ark 2012, Yang ve ark 2013, Rivera-Torres ve ark 2014). Daha önceki yapılan çalışmalar ile ortaya konan bu durum çalışma bulgularımız ile de doğrulanmıştır.

In vitro çalışmaların yanı sıra genomu düzenlenmiş otolog hücrelerin transplantasyonu ile preklinik ve klinik denemelerde etkili sonuçlar elde edilmiştir (Klausner ve ark 2007). Bu denemeler, kornea ile sınırlı olmayıp genetik hastalıkların tıbbi tedavisinde yeni bir çağ açmış ve kalıtsal hastalıkların tedavisinde CRISPR/Cas9 teknolojisinin kullanılabileceğini göstermiştir. Hoban ve arkadaşları tarafından 2016 yılında yapılan çalışmada orak hücre hastalığına (Sickle Cell Disease; SCD) neden olan nokta mutasyonunun CD34+ hücrelerinde düzeltilmesi için CRISPR/Cas9 teknolojisinden başarılı bir şekilde yararlanılmıştır (Hoban ve ark 2016). Marangi ve arkadaşları ise 2018 yılında yaptıkları çalışmada kistik fibröz (CF) hastalığına neden olan mutasyonu onarmak için CRISPR/Cas9 sistemi

kullandıklarını, doku ve hayvan modellerinde başarılı sonuçlar elde ettiklerini raporlamışlardır (Marangi ve Pistritto 2018). Stephens ve arkadaşları da 2019 yılında yaptıkları çalışmada Hemofili B (HB) hastalığına neden olan mutasyonların hayvan modellerinde CRISPR/Cas9 sistemi ile onarılabileceğini göstererek, gen tedavileri anlamında umut verici sonuçlar ortaya koymuştur (Stephens ve ark 2019).

Bazı monogenik hastalıklara yönelik CRISPR/Cas9 tabanlı gen düzenleme terapisi ile yapılan çalışmalar klinik deneme safhasına ulaşmıştır. Frangoul ve arkadaşları tarafından 2021 yılında başlatılan çalışmada, transfüzyona bağlı β-talasemi ve orak hücre hastalığını tedavi etmek için CRISPR/Cas9 tabanlı *in vitro* gen düzenleme çalışmasının başarıyla tamamlanmasından 2 yıl sonra faz III klinik denemesi de tamamlanmıştır. Tedavi sonrası hastaların büyük kısmında gen düzenleme terapisinin ciddi bir şekilde faydası gözlemlenmiştir. Denemelerde bildirilen yan etkiler diğer otolog kök hücre nakli işlemlerine benzer şekilde mide bulantısı, yorgunluk, ateş ve yüksek enfeksiyon riskleri olduğu görülmüş olmakla birlikte ciddi yan etkiler bildirilmemiştir (Frangoul ve ark 2021).

İnsan genetik hastalıklarını terapötik olarak düzeltmek için CRISPR/Cas9 sisteminin kullanılmasına yönelik birçok çaba sarf edilmektedir ve genetik problemin doğasına bağlı olarak farklı yaklaşımlar benimsenmiştir. Leber konjenital amorozisi (Leber Congenital Amaurosis; LCA), kalıtsal retina distrofilerinin bir kısmını oluşturan ve erken çocukluk döneminde körlüğe sebep olabilen bir hastalık grubudur. Klinik CRISPR çalışmalarında, AAV vektörleri kullanılarak LCA'ya neden olan patojenik mutasyonların düzenlenmesi ile gen fonksiyonunda bir kazanç olduğu gösterilmiştir (Clinical trial.gov NCT03872479).

İzole edilmiş T hücrelerinin CRISPR ile düzenlemesi, üzerinde kimerik antijen reseptörü (chimeric antigen receptor; CAR) bulunan tasarlanmış T hücrelerinin geliştirilmesine yol açmıştır. Düzenlenmiş CAR-T hücreleri, kanser hücrelerinde bulunan antijene spesifiktir ve kanserli hücreye karşı "canlı bir ilaç" görevi görmektedir. CAR-T hücreleri kullanılarak yapılan klinik çalışmalarda birçok kanser türü hedef alınmaktadır (ClinicalTrial.gov NCT04035434, NCT04502446, NCT04438083).

CRISPR ile düzenlenmiş kök hücreler ise başka bir yaklaşımdır. Son zamanlarda, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi (FDA), orak hücre

hastalığı (SCD) tedavisi için kırmızı kan hücrelerinde yüksek düzeyde fetal hemoglobin üretebilen CRISPR/Cas9 ile düzenlenmiş hematopoietik kök hücreleri bağışlamaktadır (ClinicalTrials.gov NCT03655678).

Klinikte yürütülen bazı çalışmalar olmasına rağmen CRISPR teknolojisi henüz araştırma aşamasındadır ve çözülmesi gereken bazı kısıtlamalar vardır. Bunlar, *off-target* etki, *indel* jenerasyonları, toksisite, düşük gen düzenleme etkinliği ve vektöre karşı konakçı bağışıklık tepkisidir. CRISPR teknolojisi için kornea hastalığına özgü başka kısıtlamalar da vardır. Bunlardan en önemlisi ise yaşlanmaya bağlı olarak korneanın tek katmanlı endotel tabakasının hücre yoğunluğunun azalması ve CRISPR gen düzenleme çalışmaları için sınırlı hücre kaynağı oluşturmasıdır. CRISPR/Cas9 genom düzenleme klinik deneylere doğru ilerlerken dikkate alınması gereken bir kısıtlama ise vektöre karşı konakçı bağışıklık tepkisidir. Cas9'un en yaygın kullanılan ortologları *Staphylococcus aureus* ve *Streptococcus pyogenes* kökenlidir. Bu iki bakteri türünün insan popülasyonunu yüksek sıklıkla enfekte ettiğini göz önüne alarak Charlesworth ve arkadaşları tarafından 2019 yılında yapılan çalışmada, SaCas9 (*S. aureus*) ve SpCas9 (*S. pyogenes*) türetilen Cas9 ortologlarına karşı daha önceden var olabilecek herhangi bir adaptif bağışıklık tepkileri araştırılmıştır. Araştırmacılar tarafından ELISA testi ile anti-Cas9 antikorlarının varlığı açısından insan donörlerin serumunu incelemiş ve sırasıyla %78 ve %58'inde hem SaCas9 hem de SpCas9'a karşı antikorlar tespit edilmiştir. Ve yine donörlerin %78'inde anti-SaCas9 T hücreleri ve %67'sinde anti-SpCas9 T hücreleri tespit edilmiş ve Cas9'a özgü bir sitokin tepkisi göstererek bu T hücrelerinin Cas9'a özgü olduğu doğrulanmıştır. Elde edilen veriler ile insanlarda Cas9'a karşı önceden var olan humoral ve adaptif bağışıklık tepkilerinin olduğunu gözlemlenmiştir (Charlesworth ve ark 2019). Bu anlamda, CRISPR/Cas9 bileşenlerini taşıyıcı vektörün hedef hücrelere ulaşmasını engelleyecek ve törapötik etkinliğini azaltabilecek antikorlar oluşabilir; ancak diğer dokulara oranla kornea bağışıklık açısından avantajlı konumu ile bu riski asgariye indirerek CRISPR/Cas9 çalışmaları için ideal bir aday haline gelmektedir.

Diğer taraftan CRISPR/Cas9 aracılı genom düzenleme teknolojisinde HDR yönelimli genom düzenlemenin sınırlı oluşu, hücrelerin NHEJ yolunu öncelikli tercih etmesi tekniğin etkinliğini zayıflatmaktadır (Wang ve ark 2013). NHEJ'in hata eğilimli onarım yolu olduğu göz önüne alındığında, HDR aracılı genom düzenleme

lehine NHEJ''i inhibe etmek için bazı stratejiler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Araştırmacılardan bazıları NHEJ yolunu inaktive ederek ya da HDR aktivasyonunu artırarak bu durumun üstesinden gelmeye çalışmışlardır. Örneğin, Maruyama ve arkadaşları farelerde yaptıkları çalışmada, NHEJ onarımının temel bileşenlerinden DNA Ligaz IV'ün inhibitörü olan Scr7'nin in vitro ve in vivo HDR onarımını artırdığını göstermişlerdir (Maruyama ve ark 2016). Chu ve arkadaşları ise benzer şekilde DNA ligaz IV'ü ve NHEJ onarımının başlaması için gerekli olan KU60 proteini hedef alan kısa saç tokası RNA (short hairpin RNA; shRNA)'ları kullanarak NHEJ onarımını baskılamaya çalışmışlardır (Chu ve ark 2015). Song ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmada HDR indükleyici RS-1'in *in vitro* HDR onarımında lokusa bağlı olarak yaklaşık 5 kat artışa, *in vivo* HDR onarımında ise %14'ten %33'e kadar artışa neden olduğunu göstermişlerdir (Song ve ark 2016). HDR aracılı onarım alanındaki bu gelişmeler, HDR aracılı genom düzenleme tekniğini terapötik fayda elde etmek için daha geniş çapta uygulanabilir hale getirmiştir.

Yukarıda bahsedilen tüm gelişmeler ışığında gelinen nokta değerlendirildiğinde, oküler bozukluklardaki genetik değişiklikleri düzenlemek ve normal görme fonksiyonunu yeniden sağlamak için gelenekselin dışında yeni bir terapötik potansiyelin varlığı ve bu yaklaşımların gözün farklı tabakalarında uygulanabilirliği öngörülmektedir. Özellikle gözün yüzeysel ve kolay erişilebilir bir organ olması, gen tedavi yaklaşımlarındaki en önemli sorunların başında gelen tedavinin hedefe ulaşma probleminin üstesinden gelinmesinde önemli kolaylık sağlamaktadır. Gözün kornea tabakasının avasküler şeffaf yapısı, bağışıklık ayrıcalıklı oluşu, köklü cerrahi tekniklere uygun olması, harici olarak konumlandırılması, erişim kolaylığı, saklanması için özel göz bankalarına ve gelişmiş görüntülenme tekniklerine sahip olması, korneayı *in vivo* ve *ex vivo* gen tedavi çalışmaları için ideal bir aday haline getirmiştir (Klausner ve ark 2007).

Ancak gen terapi uygulamalarında kornea her ne kadar bazı avantajlara sahip olsa da gen terapi bileşenlerinin farklı kornea katmanlarına iletilmesinde bazı sorunların üstesinden gelinmesi gerekmektedir. Gözün en dış yüzeyi olan kornea, gen terapisi ajanının girişini engelleyen, gözyaşı filmi gibi, koruyucu adaptasyonlara da sahiptir (de la Fuente ve ark 2010). Gözyaşı filmi ise gözü nemlendiren, temizleyen, kayganlaştıran ve göze yabancı madde girişine karşı ilk bariyer görevi gören kısımdır (Le Bourlais ve ark 1998). Yabancı maddelerin karşılaştığı bir sonraki

bariyer ise hücrelerin sıkı bağlantılarla bağlandığı kornea epiteli olmaktadır (Hämäläinen ve ark 1997). Bu durum terapötik ajanların yalnızca gözün arka bölümüne değil, aynı zamanda kornea katmanlarının her birine transkorneal girişini ciddi şekilde sınırlamaktadır. Mevcut biyolojik engellere ek olarak DNA'nın hücrelere girişi de zordur. Boyutunun büyük, hidrofilik ve negatif yüklü olmasından dolayı, DNA'nın hücre zarından nüfuz etmesi zordur (Oliveira ve ark 2017). Maddeler epitelden taşıyıcılar ile transselüler yol veya hücreler arası matriksten paraselüler yol aracılığıyla geçebilmektedir. Hidrofobik moleküller paraselüler yol aracılığı ile daha kolay geçerken DNA molekülleri kornea epitelinin son derece sıkı olan bağlantı noktalarında gezinmek zorunda kalabilirler (Romanelli ve ark 1994).

Yukarıda bahsedilen biyolojik bariyerler nedeniyle terapötik ajanların topikal uygulaması verimsiz kornea penetrasyonuna neden olduğu için uygun bir aktarım şekli olmaktan çıkmaktadır. Fakat başlangıçtaki biyolojik engelleri ortadan kaldıran kornea epitel debridmanını takiben yapılan topikal uygulamanın viral vektörlerin geçişine izin verebileceği gösterilmiştir (Spencer ve ark 2000). DNA, siRNA veya AAV gibi gen terapi ajanlarının intrastromal veya intrakameral enjeksiyon yoluyla lokal uygulanması ile biyolojik bariyer sorununun ortadan kalkacağı düşünülmektedir. Fakat fare gözünde yapılan enjeksiyon sırasında oluşan basınç DNA'yı hücrelere aktarmak için etkili olmasına rağmen, insan gözüne ölçeklendirildiğinde oluşacak düşük basınç nedeniyle aktarma işleminin çok etkili olmayabileceği düşünülmüktedir (Matthaei ve ark 2012).

Etkili bir klinik sonuç için kornea distrofilerinde bu yaklaşımların geniş çapta incelenmesi gerekmektedir. Genel olarak, CRISPR/Cas sisteminin geliştirilmesi ve uygulanması için araştırmalar halen devam etmektedir. Yapılan çalışmalar ise GCD tedavisi için yeni araştırma perspektifleri sunmaktadır.

Daha yüksek genom düzenleme etkinliğinin optimizasyonu ve klinik öncesi çalışmalarda hedef dışı ve olası sitotoksik etkilerin ortadan kaldırılmasıyla CRISPR ile başarılı bir terapötik uygulama elde edilebilir. CRISPR genom mühendisliğinin başarısı, kornea distrofileri için kişiselleştirilmiş tıbbın ilerlemesini sağlayacaktır. Genom düzenleme artık genom bilimi tarihinde daha önce hiç olmadığı kadar ulaşılabilir hale geldiğinden, CRISPR tabanlı tekniklerin hastalara karşı veya biyoterörizm şeklinde kötüye kullanılmasını önlemeye yönelik düzenleyici adımlarda her zaman dikkatli olunmalıdır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Kornea distrofilerinde uygulanan mevcut tedavilerin sınırlı olması ve tedavi sonrasında hastalığın tekrarlaması nedeniyle kalıcı ve etkili tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Kalıcı genetik nedenleri sürekli olarak ele alan bir yaklaşım olan CRISPR/Cas9 genom düzenleme sistemi yeni ve gelecek vaat eden bir teknolojidir.

Çalışmamızda yapılan tüm analizlerin sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, GCD1 hastalarından elde edilen PBMC'lerde CRISPR/Cas9 aracılı-HDR ile *TGFBI* geni ekzon 12 R555W mutasyonun düzenlendiğine dair güçlü kanıtlar elde edilmiştir. Planlanan R555W mutasyon düzenleme işleminin in vitro adımları bu araştırma kapsamında gerçekleştirilmiştir. Çalışmamız, GCD1 hastalarından elde edilen primer hücrelerde R555W mutasyonun CRISPR/Cas9 sistemi ile düzenlenmesini içeren literatürdeki ilk çalışmadır ve elde ettiğimiz sonuçlar kornea distrofisi tedavilerinde gen terapisi yaklaşımlarına önemli katkılar sunmaktadır. Çalışmamızın preklinik ve klinik araştırmalar yapılmasına öncülük edeceği öngörülmektedir.

CRISPR/Cas9 özellikle korneal distrofilerin tedavisi için umut vaat eden bir yaklaşım olmasına rağmen genom düzenleme etkinliği ve analizi için daha kapsamlı çalışmalar yapılmasına ihtiyaç vardır. Bunlar;

- HDR şablonu olarak 200 nükleotidden daha uzun ssODN donör dizilerin kullanımı,
- Sürekli ifadenin sağlanması için HDR şablonu olarak dsODN donör dizi tasarlanıp taşıyıcı bir vektör ile transfer edilmesi,
- HDR onarım mekanizmasını aktive edecek ya da NHEJ onarım mekanizmasını baskılayabilecek bileşenlerin uygulanması,
- Primer hücre hattında yapılan genom düzenleme işlemlerinin hayvan ve hücre modellerinde denenmesi,
- Hedeflenen gen bölgesinde yeni nesil sekanslama (next generation sequencing; NGS) işlemi ile genom düzenleme işleminin doğrulanması,
- Genom düzenleme işleminde Cas nükleazın *off-target* aktivitesinden dolayı meydana gelebilecek muhtemel dezavantajların tüm genom sekanslama veya tüm ekzon sekanslama ile kapsamlı olarak araştırılması önerilebilir.

6. KAYNAKÇA

Adli M, 2018. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. Nat Commun, 9, 1, 1911.

Aglawe SB, Barbadikar KM, Mangrauthia SK, Madhav MS, 2018. New breeding technique "genome editing" for crop improvement: applications, potentials and challenges. 3 Biotech, 8, 8, 336.

Ahmad A, Robinson AR, Duensing A, van Drunen E, Beverloo HB, Weisberg DB, Hasty P, Hoeijmakers JH, Niedernhofer LJ, 2008. ERCC1-XPF endonuclease facilitates DNA double-strand break repair. Mol Cell Biol, 28, 16, 5082-92.

Ahrabi S, Sarkar S, Pfister SX, Pirovano G, Higgins GS, Porter AC, Humphrey TC, 2016. A role for human homologous recombination factors in suppressing microhomology-mediated end joining. Nucleic Acids Res, 44, 12, 5743-57.

Akiya S, Brown SI, 1970. Granular Dystrophy of the Cornea: Characteristic Electron Microscopic Lesion. Archives of Ophthalmology, 84, 2, 179-92.

Alio JL, Montesel A, El Sayyad F, Barraquer RI, Arnalich-Montiel F, Alio Del Barrio JL, 2021. Corneal graft failure: an update. Br J Ophthalmol, 105, 8, 1049-58.

Allaman-Pillet N, Oberson A, Bustamante M, Tasinato A, Hummler E, Schorderet DF, 2015. Tgfbi/Bigh3 silencing activates ERK in mouse retina. Exp Eye Res, 140, 159-70.

Athanasopoulos T, Munye MM, Yáñez-Muñoz RJ, 2017. Nonintegrating Gene Therapy Vectors. Hematology/Oncology Clinics of North America, 31, 5, 753-70.

Bae J-S, Lee S-H, Kim J-E, Choi J-Y, Park R-W, Yong Park J, Park H-S, Sohn Y-S, Lee D-S, Bae Lee E, Kim I-S, 2002. βig-h3 supports keratinocyte adhesion, migration, and proliferation through α3β1 integrin. Biochemical and Biophysical Research Communications, 294, 5, 940-8.

Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P, 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. Science, 315, 5819, 1709-12.

Barut Selver Ö, Yağcı A, Eğrilmez S, Gürdal M, Palamar M, Çavuşoğlu T, Ateş U, Veral A, Güven Ç, Wolosin JM, 2017. Limbal Stem Cell Deficiency and Treatment with Stem Cell Transplantation. Turk J Ophthalmol, 47, 5, 285-91.

Batır MB, Şahin E, Çam FS, 2019. Evaluation of the CRISPR/Cas9 directed mutant TP53 gene repairing effect in human prostate cancer cell line PC-3. Mol Biol Rep, 46, 6, 6471-84.

Bi HH, Yang B, 2017. Gene Editing With TALEN and CRISPR/Cas in Rice. Prog Mol Biol Transl, 149, 81-98.

Billings PC, Whitbeck JC, Adams CS, Abrams WR, Cohen AJ, Engelsberg BN, Howard PS, Rosenbloom J, 2002. The Transforming Growth Factor-β-inducible Matrix Protein βig-h3 Interacts with Fibronectin*. Journal of Biological Chemistry, 277, 31, 28003-9.

Boerstler T, Wend H, Krumbiegel M, Kavyanifar A, Reis A, Reis A, Lie DC, Winner B, Turan S, 2020. CRISPR/Cas9 mediated generation of human ARID1B heterozygous knockout hESC lines to model Coffin-Siris syndrome. Stem Cell Res, 47, 101889.

Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD, 2005. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. Microbiology (Reading), 151, Pt 8, 2551-61.

Borrás T, Gabelt BAT, Klintworth GK, Peterson JC, Kaufman PL, 2001. Non-invasive observation of repeated adenoviral GFP gene delivery to the anterior segment of the monkey eye in vivo. The Journal of Gene Medicine, 3, 5, 437-49.

Bourges JL, 2017. Corneal dystrophies. Journal Français d'Ophtalmologie, 40, 6, e177-e92.

Briggs AW, Rios X, Chari R, Yang L, Zhang F, Mali P, Church GM, 2012. Iterative capped assembly: rapid and scalable synthesis of repeat-module DNA such as TAL effectors from individual monomers. Nucleic Acids Res, 40, 15, e117.

Carson DD, Lagow E, Thathiah A, Al-Shami R, Farach-Carson MC, Vernon M, Yuan L, Fritz MA, Lessey B, 2002. Changes in gene expression during the early to mid-luteal (receptive phase) transition in human endometrium detected by high-density microarray screening. Mol Hum Reprod, 8, 9, 871-9.

Chang YK, Hwang JS, Chung TY, Shin YJ, 2018. SOX2 Activation Using CRISPR/dCas9 Promotes Wound Healing in Corneal Endothelial Cells. Stem Cells, 36, 12, 1851-62.

Charlesworth CT, Deshpande PS, Dever DP, Camarena J, Lemgart VT, Cromer MK, Vakulskas CA, Collingwood MA, Zhang L, Bode NM, Behlke MA, Dejene B, Cieniewicz B, Romano R, Lesch BJ, Gomez-Ospina N, Mantri S, Pavel-Dinu M, Weinberg KI, Porteus MH, 2019. Identification of preexisting adaptive immunity to Cas9 proteins in humans. Nat Med, 25, 2, 249-54.

Chatterjee N, Walker GC, 2017. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. Environ Mol Mutagen, 58, 5, 235-63.

Chevalier BS, Stoddard BL, 2001. Homing endonucleases: structural and functional insight into the catalysts of intron/intein mobility. Nucleic Acids Res, 29, 18, 3757-74.

Choi S-i, Maeng Y-S, Kim T-i, Lee Y, Kim Y-S, Kim EK, 2015. Lysosomal Trafficking of TGFBIp via Caveolae-Mediated Endocytosis. PLOS ONE, 10, 4, e0119561.

Christie KA, Courtney DG, DeDionisio LA, Shern CC, De Majumdar S, Mairs LC, Nesbit MA, Moore CBT, 2017. Towards personalised allele-specific CRISPR gene editing to treat autosomal dominant disorders. Scientific Reports, 7, 1, 16174.

Christie KA, Robertson LJ, Conway C, Blighe K, DeDionisio LA, Chao-Shern C, Kowalczyk AM, Marshall J, Turnbull D, Nesbit MA, Moore CBT, 2020. Mutation-Independent Allele-Specific Editing by CRISPR-Cas9, a Novel Approach to Treat Autosomal Dominant Disease. Mol Ther, 28, 8, 1846-57.

Chu VT, Weber T, Wefers B, Wurst W, Sander S, Rajewsky K, Kühn R, 2015. Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. Nature Biotechnology, 33, 5, 543-8.

Clout NJ, Hohenester E, 2003. A model of FAS1 domain 4 of the corneal protein beta(ig)-h3 gives a clearer view on corneal dystrophies. Mol Vis, 9, 440-8.

Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F, 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science, 339, 6121, 819-23.

Courtney DG, Atkinson SD, Allen EHA, Moore JE, Walsh CP, Pedrioli DML, MacEwen CJ, Pellegrini G, Maurizi E, Serafini C, Fantacci M, Liao H, Irvine AD, McLean WHI, Moore CBT, 2014. siRNA Silencing of the Mutant Keratin 12 Allele in Corneal Limbal Epithelial Cells Grown From Patients With Meesmann's Epithelial Corneal Dystrophy. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 55, 5, 3352-60.

Courtney DG, Moore JE, Atkinson SD, Maurizi E, Allen EHA, Pedrioli DML, McLean WHI, Nesbit MA, Moore CBT, 2016. CRISPR/Cas9 DNA cleavage at SNP-derived PAM enables both in vitro and in vivo KRT12 mutation-specific targeting. Gene Therapy, 23, 1, 108-12.

Courtney DG, Toftgaard Poulsen E, Kennedy S, Moore JE, Atkinson SD, Maurizi E, Nesbit MA, Moore CBT, Enghild JJ, 2015. Protein Composition of TGFBI-R124C- and TGFBI-R555W- Associated Aggregates Suggests Multiple Mechanisms Leading to Lattice and Granular Corneal Dystrophy. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 56, 8, 4653-61.

de la Fuente M, Raviña M, Paolicelli P, Sanchez A, Seijo B, Alonso MJ, 2010. Chitosan-based nanostructures: A delivery platform for ocular therapeutics. Advanced Drug Delivery Reviews, 62, 1, 100-17.

Denbow CJ, Lapins S, Dietz N, Scherer R, Nimchuk ZL, Okumoto S, 2017. Gateway-Compatible CRISPR-Cas9 Vectors and a Rapid Detection by High-Resolution Melting Curve Analysis. Frontiers in Plant Science, 8.

Deng SK, Gibb B, de Almeida MJ, Greene EC, Symington LS, 2014. RPA antagonizes microhomology-mediated repair of DNA double-strand breaks. Nature Structural & Molecular Biology, 21, 4, 405-12.

Deyle DR, Russell DW, 2009. Adeno-associated virus vector integration. Curr Opin Mol Ther, 11, 4, 442-7.

DiCarlo JE, Mahajan VB, Tsang SH, 2018. Gene therapy and genome surgery in the retina. The Journal of Clinical Investigation, 128, 6, 2177-88.

Doliana R, Bot S, Bonaldo P, Colombatti A, 2000. EMI, a novel cysteine-rich domain of EMILINs and other extracellular proteins, interacts with the gC1q domains and participates in multimerization. FEBS Letters, 484, 2, 164-8.

Doudna JA, Charpentier E, 2014. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science, 346, 6213, 1258096.

Eghrari AO, Riazuddin SA, Gottsch JD, 2015. Overview of the Cornea: Structure, Function, and Development. Prog Mol Biol Transl Sci, 134, 7-23.

Evans CJ, Davidson AE, Carnt N, Rojas López KE, Veli N, Thaung CM, Tuft SJ, Hardcastle AJ, 2016. Genotype-Phenotype Correlation for TGFBI Corneal Dystrophies Identifies p.(G623D) as a Novel Cause of Epithelial Basement Membrane Dystrophy. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 57, 13, 5407-14.

Ferguson JW, Mikesh MF, Wheeler EF, LeBaron RG, 2003. Developmental expression patterns of Beta-ig (βIG-H3) and its function as a cell adhesion protein. Mechanisms of Development, 120, 8, 851-64.

Ferguson JW, Thoma BS, Mikesh MF, Kramer RH, Bennett KL, Purchio A, Bellard BJ, LeBaron RG, 2003. The extracellular matrix protein βIG-H3 is expressed at myotendinous junctions and supports muscle cell adhesion. Cell and Tissue Research, 313, 1, 93-105.

Frangoul H, Altshuler D, Cappellini MD, Chen YS, Domm J, Eustace BK, Foell J, de la Fuente J, Grupp S, Handgretinger R, Ho TW, Kattamis A, Kernytsky A, Lekstrom-Himes J, Li AM, Locatelli F, Mapara MY, de Montalembert M, Rondelli D, Sharma A, Sheth S, Soni S, Steinberg MH, Wall D, Yen A, Corbacioglu S, 2021. CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and β-Thalassemia. N Engl J Med, 384, 3, 252-60.

Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, Sander JD, 2013. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. Nat Biotechnol, 31, 9, 822-6.

Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF, III, 2013. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. Trends in Biotechnology, 31, 7, 397-405.

Groenouw A, 1890. Knotchenformige Hornhauttrubungen (noduli corneae). Arch Augenheilkunde, 21, 281-9.

Hafford-Tear NJ, Tsai Y-C, Sadan AN, Sanchez-Pintado B, Zarouchlioti C, Maher GJ, Liskova P, Tuft SJ, Hardcastle AJ, Clark TA, Davidson AE, 2019. CRISPR/Cas9-targeted enrichment and long-read sequencing of the Fuchs endothelial corneal dystrophy–associated TCF4 triplet repeat. Genetics in Medicine, 21, 9, 2092-102.

Hämäläinen KM, Kananen K, Auriola S, Kontturi K, Urtti A, 1997. Characterization of paracellular and aqueous penetration routes in cornea, conjunctiva, and sclera. Invest Ophthalmol Vis Sci, 38, 3, 627-34.

Han KE, Choi S-i, Kim T-i, Maeng Y-S, Stulting RD, Ji YW, Kim EK, 2016. Pathogenesis and treatments of TGFBI corneal dystrophies. Progress in Retinal and Eye Research, 50, 67-88.

HANNA C, BICKNELL DS, O'BRIEN JE, 1961. Cell Turnover in the Adult Human Eye. Archives of Ophthalmology, 65, 5, 695-8.

Her J, Bunting SF, 2018. How cells ensure correct repair of DNA double-strand breaks. J Biol Chem, 293, 27, 10502-11.

Heyer WD, Ehmsen KT, Liu J, 2010. Regulation of homologous recombination in eukaryotes. Annu Rev Genet, 44, 113-39.

Hoban MD, Lumaquin D, Kuo CY, Romero Z, Long J, Ho M, Young CS, Mojadidi M, Fitz-Gibbon S, Cooper AR, Lill GR, Urbinati F, Campo-Fernandez B, Bjurstrom CF, Pellegrini M, Hollis RP, Kohn DB, 2016. CRISPR/Cas9-Mediated Correction of the Sickle Mutation in Human CD34+ cells. Molecular Therapy, 24, 9, 1561-9.

Holkers M, Maggio I, Liu J, Janssen JM, Miselli F, Mussolino C, Recchia A, Cathomen T, Gonçalves MA, 2013. Differential integrity of TALE nuclease genes following adenoviral and lentiviral vector gene transfer into human cells. Nucleic Acids Res, 41, 5, e63.

Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, Li Y, Fine EJ, Wu X, Shalem O, Cradick TJ, Marraffini LA, Bao G, Zhang F, 2013. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. Nature Biotechnology, 31, 9, 827-32.

Irvine AD, Corden LD, Swensson O, Swensson B, Moore JE, Frazer DG, Smith FJD, Knowlton RG, Christophers E, Rochels R, Uitto J, McLean WHI, 1997. Mutations in cornea-specific keratin K3 or K12 genes cause Meesmann's corneal dystrophy. Nature Genetics, 16, 2, 184-7.

Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A, 1987. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product. J Bacteriol, 169, 12, 5429-33.

Ivanov SV, Ivanova AV, Salnikow K, Timofeeva O, Subramaniam M, Lerman MI, 2008. Two novel VHL targets, TGFBI (BIGH3) and its transactivator KLF10, are up-regulated in renal clear cell carcinoma and other tumors. Biochemical and Biophysical Research Communications, 370, 4, 536-40.

Iyama T, Wilson DM, 2013. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. DNA Repair, 12, 8, 620-36.

Jansen R, Embden JD, Gaastra W, Schouls LM, 2002. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. Mol Microbiol, 43, 6, 1565-75.

Javed MR, Sadaf M, Ahmed T, Jamil A, Nawaz M, Abbas H, Ijaz A, 2018. CRISPR-Cas System: History and Prospects as a Genome Editing Tool in Microorganisms. Current microbiology.

Jekimovs C, Bolderson E, Suraweera A, Adams M, O'Byrne KJ, Richard DJ, 2014. Chemotherapeutic compounds targeting the DNA double-strand break repair pathways: the good, the bad, and the promising. Front Oncol, 4, 86-.

Jeppesen DK, Bohr VA, Stevnsner T, 2011. DNA repair deficiency in neurodegeneration. Prog Neurobiol, 94, 2, 166-200.

Jiang F, Doudna JA, 2015. The structural biology of CRISPR-Cas systems. Curr Opin Struct Biol, 30, 100-11.

Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E, 2012. A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. Science, 337, 6096, 816-21.

Jinek M, East A, Cheng A, Lin S, Ma E, Doudna J, 2013. RNA-programmed genome editing in human cells. eLife, 2, e00471.

Johnston AD, Simões-Pires CA, Suzuki M, Greally JM, 2019. High-efficiency genomic editing in Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid B cells using a single-stranded donor oligonucleotide strategy. Communications Biology, 2, 1, 312.

Joo HJ, Ma DJ, Hwang JS, Shin YJ, 2020. SIRT1 Activation Using CRISPR/dCas9 Promotes Regeneration of Human Corneal Endothelial Cells through Inhibiting Senescence. Antioxidants (Basel), 9, 11.

Joung JK, Sander JD, 2013. INNOVATION TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. Nat Rev Mol Cell Bio, 14, 1, 49-55.

Kannabiran C, Klintworth GK, 2006. TGFBI gene mutations in corneal dystrophies. Hum Mutat, 27, 7, 615-25.

Kato-Inui T, Takahashi G, Hsu S, Miyaoka Y, 2018. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein 9 with improved proof-reading enhances homology-directed repair. Nucleic Acids Res, 46, 9, 4677-88.

Kaufmann KB, Büning H, Galy A, Schambach A, Grez M, 2013. Gene therapy on the move. EMBO Molecular Medicine, 5, 11, 1642-61.

Khalaf K, Janowicz K, Dyszkiewicz-Konwińska M, Hutchings G, Dompe C, Moncrieff L, Jankowski M, Machnik M, Oleksiewicz U, Kocherova I, Petitte J, Mozdziak P, Shibli JA, Iżycki D, Józkowiak M, Piotrowska-Kempisty H, Skowroński MT, Antosik P, Kempisty B, 2020. CRISPR/Cas9 in Cancer Immunotherapy: Animal Models and Human Clinical Trials. Genes, 11, 8.

Khan SH, 2019. Genome-Editing Technologies: Concept, Pros, and Cons of Various Genome-Editing Techniques and Bioethical Concerns for Clinical Application. Mol Ther Nucleic Acids, 16, 326-34.

Kim EK, Kim S, Maeng Y-S, 2019. Generation of TGFBI knockout ABCG2+/ABCB5+ double-positive limbal epithelial stem cells by CRISPR/Cas9-mediated genome editing. PLOS ONE, 14, 2, e0211864.

Kim H, Kim J, 2014. A guide to genome engineering with programmable nucleases. Nature Reviews Genetics, 15, 321-34.

Kim H-J, Kim I-S, 2008. Transforming growth factor-β-induced gene product, as a novel ligand of integrin αMβ2, promotes monocytes adhesion, migration and chemotaxis. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 40, 5, 991-1004.

Kim H-J, Kim P-K, Bae SM, Son H-N, Thoudam DS, Kim J-E, Lee B-H, Park R-W, Kim I-S, 2009. Transforming growth factor-β–induced protein (TGFBIp/β ig-h3) activates platelets and promotes thrombogenesis. Blood, 114, 25, 5206-15.

Kim HS, Kweon J, Kim Y, 2024. Recent advances in CRISPR-based functional genomics for the study of disease-associated genetic variants. Experimental & Molecular Medicine, 56, 4, 861-9.

Kim J-E, Jeong H-W, Nam J-O, Lee B-H, Choi J-Y, Park R-W, Park JY, Kim I-S, 2002. Identification of Motifs in the Fasciclin Domains of the Transforming Growth Factor-β-induced Matrix Protein βig-h3 That Interact with the αvβ5 Integrin*. Journal of Biological Chemistry, 277, 48, 46159-65.

Kim J-E, Kim S-J, Lee B-H, Park R-W, Kim K-S, Kim I-S, 2000. Identification of Motifs for Cell Adhesion within the Repeated Domains of Transforming Growth Factor-β-induced Gene,βig-h3 *. Journal of Biological Chemistry, 275, 40, 30907-15.

Kim JE, Kim SJ, Jeong HW, Lee BH, Choi JY, Park RW, Park JY, Kim IS, 2003. RGD peptides released from beta ig-h3, a TGF-beta-induced cell-adhesive molecule, mediate apoptosis. Oncogene, 22, 13, 2045-53.

Kitahama S, Gibson MA, Hatzinikolas G, Hay S, Kuliwaba JL, Evdokiou A, Atkins GJ, Findlay DM, 2000. Expression of fibrillins and other microfibril-associated proteins in human bone and osteoblast-like cells. Bone, 27, 1, 61-7.

Kitamoto K, Taketani Y, Fujii W, Inamochi A, Toyono T, Miyai T, Yamagami S, Kuroda M, Usui T, Ouchi Y, 2020. Generation of mouse model of TGFBI-R124C corneal dystrophy using CRISPR/Cas9-mediated homology-directed repair. Scientific Reports, 10, 1, 2000.

Klausner EA, Peer D, Chapman RL, Multack RF, Andurkar SV, 2007. Corneal gene therapy. J Control Release, 124, 3, 107-33.

Klintworth G, Enghild J, Valnickova Z. Discovery of a Novel Protein (Beta-Ig-H3) in Normal Human Cornea. INVESTIGATIVE OPHTHALMOLOGY & VISUAL SCIENCE, 1938-.

Klintworth GK, 2009. Corneal dystrophies. Orphanet J Rare Dis, 4, 7.

Klintworth GK, Valnickova Z, Enghild JJ, 1998. Accumulation of beta ig-h3 gene product in corneas with granular dystrophy. Am J Pathol, 152, 3, 743-8.

Kojin BB, Tsujimoto H, Jakes E, O'Leary S, Adelman ZN, 2021. Indel Detection following CRISPR/Cas9 Mutagenesis using High-resolution Melt Analysis in the Mosquito Aedes aegypti. J Vis Exp, 175.

Kuzpınar A, 2007. HIGH RESOLUTION MELTING CURVE (HRM) ANALİZ YÖNTEMİNİN DELESYON TİPİ MUTASYONLARIN SAPTANMASINDA KULLANIMI

, HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ, Ulusal Tez Merkezi.

Lagali N, Germundsson J, Fagerholm P, 2009. The role of Bowman's layer in corneal regeneration after phototherapeutic keratectomy: a prospective study using in vivo confocal microscopy. Invest Ophthalmol Vis Sci, 50, 9, 4192-8.

Lans H, Marteijn JA, Vermeulen W, 2012. ATP-dependent chromatin remodeling in the DNA-damage response. Epigenetics & Chromatin, 5, 1, 4.

Le Bourlais C, Acar L, Zia H, Sado PA, Needham T, Leverge R, 1998. Ophthalmic drug delivery systems—Recent advances. Progress in Retinal and Eye Research, 17, 1, 33-58.

Lee BH, Bae JS, Park RW, Kim JE, Park JY, Kim IS, 2006. βig-h3 triggers signaling pathways mediating adhesion and migration of vascular smooth muscle cells through αvβ5 integrin. Experimental and Molecular Medicine, 38, 2, 153-61.

Lee ES, Kim EK, 2003. Surgical do's and don'ts of corneal dystrophies. Current Opinion in Ophthalmology, 14, 4.

Lee JH, Paull TT, 2004. Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex. Science, 304, 5667, 93-6.

Lee S-H, Bae J-S, Park S-H, Lee B-H, Park R-W, Choi J-Y, Park JY, Ha S-W, Kim Y-L, Kwon T-H, Kim I-S, 2003. Expression of TGF-β–induced matrix protein βig-h3 is up-regulated in the diabetic rat kidney and human proximal tubular epithelial cells treated with high glucose. Kidney International, 64, 3, 1012-21.

Lennartsson J, Carlsson J, Stenerlow B, 2006. Targeting the epidermal growth factor receptor family in radionuclide therapy of tumors-signal transduction and DNA repair. Lett Drug Des Discov, 3, 6, 357-68.

Li K, Wang G, Andersen T, Zhou P, Pu WT, 2014. Optimization of Genome Engineering Approaches with the CRISPR/Cas9 System. PLOS ONE, 9, 8, e105779.

Liang L, Deng L, Nguyen SC, Zhao X, Maulion CD, Shao C, Tischfield JA, 2008. Human DNA ligases I and III, but not ligase IV, are required for microhomology-mediated end joining of DNA double-strand breaks. Nucleic Acids Research, 36, 10, 3297-310.

Ljubimov AV, Saghizadeh M, 2015. Progress in corneal wound healing. Progress in Retinal and Eye Research, 49, 17-45.

Lone BA, Karna SKL, Ahmad F, Shahi N, Pokharel YR, 2018. CRISPR/Cas9 System: A Bacterial Tailor for Genomic Engineering. Genet Res Int, 2018, 3797214-.

Ma A, Dai X, 2018. The relationship between DNA single-stranded damage response and double-stranded damage response. Cell Cycle, 17, 1, 73-9.

Ma CJ, Kwon Y, Sung P, Greene EC, 2017. Human RAD52 interactions with replication protein A and the RAD51 presynaptic complex. Journal of Biological Chemistry, 292, 28, 11702-13.

Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJJ, Charpentier E, Horvath P, Moineau S, Mojica FJM, Wolf YI, Yakunin AF, van der Oost J, Koonin EV, 2011. Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. Nature Reviews Microbiology, 9, 6, 467-77.

Mandal PK, Ferreira LM, Collins R, Meissner TB, Boutwell CL, Friesen M, Vrbanac V, Garrison BS, Stortchevoi A, Bryder D, Musunuru K, Brand H, Tager AM, Allen TM, Talkowski ME, Rossi DJ, Cowan CA, 2014. Efficient ablation of genes in human hematopoietic stem and effector cells using CRISPR/Cas9. Cell Stem Cell, 15, 5, 643-52.

Marangi M, Pistritto G, 2018. Innovative Therapeutic Strategies for Cystic Fibrosis: Moving Forward to CRISPR Technique. Front Pharmacol, 9, 396.

Marraffini LA, 2015. CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. Nature, 526, 7571, 55-61.

Maruyama T, Dougan SK, Truttmann MC, Bilate AM, Ingram JR, Ploegh HL, 2016. Correction: Corrigendum: Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. Nature Biotechnology, 34, 2, 210-.

Matthaei M, Meng H, Bhutto I, Xu Q, Boelke E, Hanes J, Jun AS, 2012. Systematic assessment of microneedle injection into the mouse cornea. European Journal of Medical Research, 17, 1, 19.

Mehta N, Ramappa M, 2023. Novel Proposed Algorithm in Congenital Hereditary Endothelial Dystrophy. Seminars in Ophthalmology, 38, 2, 108-15.

Meng X, Jia R, Zhao X, Zhang F, Chen S, Yu S, Liu X, Dou H, Feng X, Zhang J, Wang N, Xu B, Yang L, 2024. In vivo genome editing via CRISPR/Cas9-mediated homology-independent targeted integration for Bietti crystalline corneoretinal dystrophy treatment. Nature Communications, 15, 1, 3773.

Mirjalili Mohanna SZ, Hickmott JW, Lam SL, Chiu NY, Lengyell TC, Tam BM, Moritz OL, Simpson EM, 2020. Germline CRISPR/Cas9-Mediated Gene Editing Prevents Vision Loss in a Novel Mouse Model of Aniridia. Molecular Therapy - Methods & Clinical Development, 17, 478-90.

Mohan RR, Tovey JCK, Sharma A, Tandon A, 2012. Gene therapy in the Cornea: 2005–present. Progress in Retinal and Eye Research, 31, 1, 43-64.

Mohanta TK, Bashir T, Hashem A, Abd Allah EF, Bae H, 2017. Genome Editing Tools in Plants. Genes-Basel, 8, 12.

Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E, 2005. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. J Mol Evol, 60, 2, 174-82.

Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, Soria E, Juez G, 2000. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. Mol Microbiol, 36, 1, 244-6.

Mojica FJ, Juez G, Rodríguez-Valera F, 1993. Transcription at different salinities of Haloferax mediterranei sequences adjacent to partially modified PstI sites. Mol Microbiol, 9, 3, 613-21.

Monroe KM, Yang Z, Johnson JR, Geng X, Doitsh G, Krogan NJ, Greene WC, 2014. IFI16 DNA sensor is required for death of lymphoid CD4 T cells abortively infected with HIV. Science, 343, 6169, 428-32.

Moore CBT, Christie KA, Marshall J, Nesbit MA, 2018. Personalised genome editing – The future for corneal dystrophies. Progress in Retinal and Eye Research, 65, 147-65.

Munier FL, Korvatska E, Djemaï A, Le Paslier D, Zografos L, Pescia G, Schorderet DF, 1997. Kerato-epithelin mutations in four 5q31-linked corneal dystrophies. Nat Genet, 15, 3, 247-51.

Nam J-O, Kim J-E, Jeong H-W, Lee S-J, Lee B-H, Choi J-Y, Park R-W, Park JY, Kim I-S, 2003. Identification of the αvβ3 Integrin-interacting Motif of βig-h3 and Its Anti-angiogenic Effect*. Journal of Biological Chemistry, 278, 28, 25902-9.

Ni J, Bucci J, Chang L, Malouf D, Graham P, li Y, 2017. Targeting MicroRNAs in Prostate Cancer Radiotherapy. Theranostics, 7, 3243-59.

Nielsen NS, Poulsen ET, Lukassen MV, Chao Shern C, Mogensen EH, Weberskov CE, DeDionisio L, Schauser L, Moore TCB, Otzen DE, Hjortdal J, Enghild JJ, 2020. Biochemical mechanisms of aggregation in TGFBI-linked corneal dystrophies. Prog Retin Eye Res, 100843.

Nimonkar AV, Genschel J, Kinoshita E, Polaczek P, Campbell JL, Wyman C, Modrich P, Kowalczykowski SC, 2011. BLM-DNA2-RPA-MRN and EXO1-BLM-RPA-MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair. Genes Dev, 25, 4, 350-62.

Ohno S, Noshiro M, Makihira S, Kawamoto T, Shen M, Yan W, Kawashima-Ohya Y, Fujimoto K, Tanne K, Kato Y, 1999. RGD-CAP (βig-h3) enhances the spreading of chondrocytes and fibroblasts via integrin α1β1. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 1451, 1, 196-205.

Okada M, Yamamoto S, Tsujikawa M, Watanabe H, Inoue Y, Maeda N, Shimomura Y, Nishida K, Quantock AJ, Kinoshita S, Tano Y, 1998. Two distinct kerato-epithelin mutations in Reis-Bücklers corneal dystrophy. American Journal of Ophthalmology, 126, 4, 535-42.

Okada M, Yamamoto S, Watanabe H, Inoue Y, Tsujikawa M, Maeda N, Shimomura Y, Nishida K, Kinoshita S, Tano Y, 1998. Granular corneal dystrophy with homozygous mutations in the kerato-epithelin gene. Am J Ophthalmol, 126, 2, 169-76.

Oliveira AV, Rosa da Costa AM, Silva GA, 2017. Non-viral strategies for ocular gene delivery. Materials Science and Engineering: C, 77, 1275-89.

Pâques F, Duchateau P, 2007. Meganucleases and DNA Double-Strand Break-Induced Recombination: Perspectives for Gene Therapy. Current gene therapy, 7, 49-66.

Pawelczak KS, Gavande NS, VanderVere-Carozza PS, Turchi JJ, 2018. Modulating DNA Repair Pathways to Improve Precision Genome Engineering. ACS Chem Biol, 13, 2, 389-96.

Pellegrini G, Golisano O, Paterna P, Lambiase A, Bonini S, Rama P, De Luca M, 1999. Location and Clonal Analysis of Stem Cells and Their Differentiated Progeny in the Human Ocular Surface. Journal of Cell Biology, 145, 4, 769-82.

Periwal V, 2017. A comprehensive overview of computational resources to aid in precision genome editing with engineered nucleases. Brief Bioinform, 18, 4, 698-711.

Petersen B, 2017. Basics of genome editing technology and its application in livestock species. Reprod Domest Anim, 52, 4-13.

Poulsen ET, Runager K, Nielsen NS, Lukassen MV, Thomsen K, Snider P, Simmons O, Vorum H, Conway SJ, Enghild JJ, 2018. Proteomic profiling of TGFBI-null mouse corneas reveals only minor changes in matrix composition supportive of TGFBI knockdown as therapy against TGFBI-linked corneal dystrophies. Febs j, 285, 1, 101-14.

Rama P, Matuska S, Paganoni G, Spinelli A, Luca MD, Pellegrini G, 2010. Limbal Stem-Cell Therapy and Long-Term Corneal Regeneration. New England Journal of Medicine, 363, 2, 147-55.

Ranjha L, Howard SM, Cejka P, 2018. Main steps in DNA double-strand break repair: an introduction to homologous recombination and related processes. Chromosoma, 127, 2, 187-214.

Rath D, Amlinger L, Rath A, Lundgren M, 2015. The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. Biochimie, 117, 119-28.

Rein LAM, Yang H, Chao NJ, 2018. Applications of Gene Editing Technologies to Cellular Therapies. Biology of Blood and Marrow Transplantation.

Reinboth B, Thomas J, Hanssen E, Gibson MA, 2006. βig-h3 Interacts Directly with Biglycan and Decorin, Promotes Collagen VI Aggregation, and Participates in Ternary Complexing with These Macromolecules*. Journal of Biological Chemistry, 281, 12, 7816-24.

Richardson CD, Kazane KR, Feng SJ, Zelin E, Bray NL, Schäfer AJ, Floor SN, Corn JE, 2018. CRISPR–Cas9 genome editing in human cells occurs via the Fanconi anemia pathway. Nature Genetics, 50, 8, 1132-9.

Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT, 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. Anal Biochem, 245, 2, 154-60.

Rivera-Torres N, Kmiec EB, 2016. Genetic spell-checking: gene editing using single-stranded DNA oligonucleotides. Plant Biotechnology Journal, 14, 2, 463-70.

Rivera-Torres N, Strouse B, Bialk P, Niamat RA, Kmiec EB, 2014. The position of DNA cleavage by TALENs and cell synchronization influences the frequency of gene editing directed by single-stranded oligonucleotides. PLoS One, 9, 5, e96483.

Romanelli L, Valeri P, Morrone LA, Pimpinella G, Graziani G, Tita B, 1994. Ocular absorption and distribution of bendazac after topical administration to rabbits with different vehicles. Life Sci, 54, 13, 877-85.

Roux LN, Petit I, Domart R, Concordet JP, Qu J, Zhou H, Joliot A, Ferrigno O, Aberdam D, 2018. Modeling of Aniridia-Related Keratopathy by CRISPR/Cas9 Genome Editing of Human Limbal Epithelial Cells and Rescue by Recombinant PAX6 Protein. Stem Cells, 36, 9, 1421-9.

Rulten SL, Grundy GJ, 2017. Non-homologous end joining: Common interaction sites and exchange of multiple factors in the DNA repair process. Bioessays, 39, 3.

Salman M, Verma A, Singh VK, Jaffet J, Chaurasia S, Sahel DK, Ramappa M, Singh V, 2022. New Frontier in the Management of Corneal Dystrophies: Basics, Development, and Challenges in Corneal Gene Therapy and Gene Editing. Asia Pac J Ophthalmol (Phila), 11, 4, 346-59.

Sartori AA, Lukas C, Coates J, Mistrik M, Fu S, Bartek J, Baer R, Lukas J, Jackson SP, 2007. Human CtIP promotes DNA end resection. Nature, 450, 7169, 509-14.

Schermer A, Galvin S, Sun TT, 1986. Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. Journal of Cell Biology, 103, 1, 49-62.

Schumann K, Lin S, Boyer E, Simeonov DR, Subramaniam M, Gate RE, Haliburton GE, Ye CJ, Bluestone JA, Doudna JA, Marson A, 2015. Generation of knock-in primary human T cells using Cas9 ribonucleoproteins. Proc Natl Acad Sci U S A, 112, 33, 10437-42.

Seol J-H, Shim EY, Lee SE, 2017. Microhomology-mediated end joining: Good, bad and ugly. Mutation research, 809, 81-7.

Sfeir A, Symington LS, 2015. Microhomology-Mediated End Joining: A Back-up Survival Mechanism or Dedicated Pathway? Trends Biochem Sci, 40, 11, 701-14.

Sharma A, Tovey JCK, Ghosh A, Mohan RR, 2010. AAV serotype influences gene transfer in corneal stroma in vivo. Experimental Eye Research, 91, 3, 440-8.

Silva G, Poirot L, Galetto R, Smith J, Montoya G, Duchateau P, Paques F, 2011. Meganucleases and other tools for targeted genome engineering: perspectives and challenges for gene therapy. Curr Gene Ther, 11, 1, 11-27.

Simsek D, Jasin M, 2010. Alternative end-joining is suppressed by the canonical NHEJ component Xrcc4-ligase IV during chromosomal translocation formation. Nat Struct Mol Biol, 17, 4, 410-6.

Sinkunas T, Gasiunas G, Fremaux C, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V, 2011. Cas3 is a single-stranded DNA nuclease and ATP-dependent helicase in the CRISPR/Cas immune system. Embo j, 30, 7, 1335-42.

Sishc BJ, Davis AJ, 2017. The Role of the Core Non-Homologous End Joining Factors in Carcinogenesis and Cancer. Cancers, 9, 7.

Skonier J, Neubauer M, Madisen L, Bennett K, Plowman GD, Purchio AF, 1992. cDNA Cloning and Sequence Analysis of βig-h3, a Novel Gene Induced in a Human Adenocarcinoma Cell Line after Treatment with Transforming Growth Factor-β. DNA and Cell Biology, 11, 7, 511-22.

Slupphaug G, Kavli B, Krokan HE, 2003. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 531, 1, 231-51.

Soh YQ, Kocaba V, Weiss JS, Jurkunas UV, Kinoshita S, Aldave AJ, Mehta JS, 2020. Corneal dystrophies. Nat Rev Dis Primers, 6, 1, 46.

Song F, Stieger K, 2017. Optimizing the DNA Donor Template for Homology-Directed Repair of Double-Strand Breaks. Molecular Therapy - Nucleic Acids, 7, 53-60.

Song J, Yang D, Xu J, Zhu T, Chen YE, Zhang J, 2016. RS-1 enhances CRISPR/Cas9- and TALEN-mediated knock-in efficiency. Nature Communications, 7, 1, 10548.

Spencer B, Agarwala S, Miskulin M, Smith M, Brandt CR, 2000. Herpes Simplex Virus–Mediated Gene Delivery to the Rodent Visual System. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 41, 6, 1392-401.

Sridhar MS, 2018. Anatomy of cornea and ocular surface. Indian J Ophthalmol, 66, 2, 190-4.

Stephens CJ, Lauron EJ, Kashentseva E, Lu ZH, Yokoyama WM, Curiel DT, 2019. Long-term correction of hemophilia B using adenoviral delivery of CRISPR/Cas9. J Control Release, 298, 128-41.

Stracker TH, Petrini JH, 2011. The MRE11 complex: starting from the ends. Nature reviews. Molecular cell biology, 12, 2, 90-103.

Taketani Y, Kitamoto K, Sakisaka T, Kimakura M, Toyono T, Yamagami S, Amano S, Kuroda M, Moore T, Usui T, Ouchi Y, 2017. Repair of the TGFBI gene in human corneal keratocytes derived from a granular corneal dystrophy patient via CRISPR/Cas9-induced homology-directed repair. Sci Rep, 7, 1, 16713.

Thomas HR, Percival SM, Yoder BK, Parant JM, 2014. High-Throughput Genome Editing and Phenotyping Facilitated by High Resolution Melting Curve Analysis. PLOS ONE, 9, 12, e114632.

Tidu A, Schanne-Klein MC, Borderie VM, 2020. Development, structure, and bioengineering of the human corneal stroma: A review of collagen-based implants. Exp Eye Res, 200, 108256.

Torrecilla J, del Pozo-Rodríguez A, Vicente-Pascual M, Solinís MÁ, Rodríguez-Gascón A, 2018. Targeting corneal inflammation by gene therapy: Emerging strategies for keratitis. Experimental Eye Research, 176, 130-40.

Truong LN, Li Y, Shi LZ, Hwang PY, He J, Wang H, Razavian N, Berns MW, Wu X, 2013. Microhomology-mediated End Joining and Homologous Recombination share the initial end resection step to repair DNA double-strand breaks in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 110, 19, 7720-5.

Tumbarello DA, Andrews MR, Brenton JD, 2016. SPARC Regulates Transforming Growth Factor Beta Induced (TGFBI) Extracellular Matrix Deposition and Paclitaxel Response in Ovarian Cancer Cells. PLOS ONE, 11, 9, e0162698.

Tyagi S, Kumar R, Das A, Won SY, Shukla P, 2020. CRISPR-Cas9 system: A genome-editing tool with endless possibilities. J Biotechnol, 319, 36-53.

Uehara H, Zhang X, Pereira F, Narendran S, Choi S, Bhuvanagiri S, Liu J, Ravi Kumar S, Bohner A, Carroll L, Archer B, Zhang Y, Liu W, Gao G, Ambati J, Jun AS, Ambati BK, 2021. Start codon disruption with CRISPR/Cas9 prevents murine Fuchs' endothelial corneal dystrophy. eLife, 10, e55637.

Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD, 2010. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. Nat Rev Genet, 11, 9, 636-46.

Viloria K, Hill NJ, 2016. Embracing the complexity of matricellular proteins: the functional and clinical significance of splice variation. Biomol Concepts, 7, 2, 117-32.

Wang H, Xu X, 2017. Microhomology-mediated end joining: new players join the team. Cell & Bioscience, 7, 1, 6.

Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, Jaenisch R, 2013. One-Step Generation of Mice Carrying Mutations in Multiple Genes by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering. Cell, 153, 4, 910-8.

Wang K, Mei DY, Liu QN, Qiao XH, Ruan WM, Huang T, Cao GS, 2015. Research of methods to detect genomic mutations induced by CRISPR/Cas systems. Journal of Biotechnology, 214, 128-32.

Wang L, Zhao C, Zheng T, Zhang Y, Liu H, Wang X, Tang X, Zhao B, Liu P, 2022. Torin 1 alleviates impairment of TFEB-mediated lysosomal biogenesis and autophagy in TGFBI (p.G623_H626del)-linked Thiel-Behnke corneal dystrophy. Autophagy, 18, 4, 765-82.

Wang M, Wu W, Wu W, Rosidi B, Zhang L, Wang H, Iliakis G, 2006. PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. Nucleic Acids Research, 34, 21, 6170-82.

Ween MP, Oehler MK, Ricciardelli C, 2012. Transforming growth Factor-Beta-Induced Protein (TGFBI)/(βig-H3): a matrix protein with dual functions in ovarian cancer. Int J Mol Sci, 13, 8, 10461-77.

Weidle EG, Lisch W, 1984. Die verschiedenen Trübungsformen der bröckeligen Hornhautdystrophie*. Klin Monbl Augenheilkd, 185, 09, 167-73.

Weiss JS, Møller HU, Aldave AJ, Seitz B, Bredrup C, Kivelä T, Munier FL, Rapuano CJ, Nischal KK, Kim EK, Sutphin J, Busin M, Labbé A, Kenyon KR, Kinoshita S, Lisch W, 2015. IC3D classification of corneal dystrophies--edition 2. Cornea, 34, 2, 117-59.

Wong L, Deanna W, Elizabeth D, 2020. Optimizing electroporation conditions for high-efficiency mRNA transfections of CD8+ T cells with the Gene Pulser Xcell Electroporation System. Bio-Rad Bulletin, 7304.

Wu J, Wu T, Li J, Wang L, Huang Y, 2021. DSAEK or DMEK for failed penetrating keratoplasty: a systematic review and single-arm meta-analysis. Int Ophthalmol, 41, 7, 2315-28.

Xiao A, Cheng Z, Kong L, Zhu Z, Lin S, Gao G, Zhang B, 2014. CasOT: a genome-wide Cas9/gRNA off-target searching tool. Bioinformatics, 30, 8, 1180-2.

Yang L, Guell M, Byrne S, Yang JL, De Los Angeles A, Mali P, Aach J, Kim-Kiselak C, Briggs AW, Rios X, Huang PY, Daley G, Church G, 2013. Optimization of scarless human stem cell genome editing. Nucleic Acids Res, 41, 19, 9049-61.

Yaylacıoğlu Tuncay F, Talim B, Dinçer PR, 2024. Mimicking TGFBI Hot-Spot Mutation Did Not Result in Any Deposit Formation in the Zebrafish Cornea. Curr Eye Res, 1-9.

Yin H, Song C-Q, Suresh S, Wu Q, Walsh S, Rhym LH, Mintzer E, Bolukbasi MF, Zhu LJ, Kauffman K, Mou H, Oberholzer A, Ding J, Kwan S-Y, Bogorad RL, Zatsepin T, Koteliansky V, Wolfe SA, Xue W, Langer R, Anderson DG, 2017. Structure-guided chemical modification of guide RNA enables potent non-viral in vivo genome editing. Nature Biotechnology, 35, 12, 1179-87.

Yu WH, Wu ZJ, 2018. In Vivo Applications of CRISPR-Based Genome Editing in the Retina. Front Cell Dev Biol, 6.

Zha S, Boboila C, Alt FW, 2009. Mre11: roles in DNA repair beyond homologous recombination. Nat Struct Mol Biol, 16, 8, 798-800.

Zhang B, 2021. CRISPR/Cas gene therapy. J Cell Physiol, 236, 4, 2459-81.

Zhang F, Wen Y, Guo X, 2014. CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. Hum Mol Genet, 23, R40-R6.

Zhang Z, Qiu S, Zhang X, Chen W, 2018. Optimized DNA electroporation for primary human T cell engineering. BMC Biotechnology, 18, 1, 4.

Zych AO, Bajor M, Zagozdzon R, 2018. Application of Genome Editing Techniques in Immunology. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 66, 4, 289-98.

EK-C Turnitin Raporu

Granüler Kornea Distrofisi Tip 1 Hastalarının Periferal Kan Mononükleer Hücrelerinde TGFBI Genindeki R555W Mutasyonunun CRISPR/Cas9 Teknolojisi ile Düzenlenmesi

ORIGINALITY REPORT

7%
SIMILARITY INDEX

PRIMARY SOURCES

1	acikbilim.yok.gov.tr Internet	383 words — 2%
2	www.addgene.org Internet	312 words — 1%
3	dergipark.org.tr Internet	71 words — < 1%
4	Sara M. Blazejewski, Sarah A. Bennison, Ngoc T. Ha, Xiaonan Liu, Trevor H. Smith, Kimberly J. Dougherty, Kazuhito Toyo-oka. "PEDF-Rpsa-Itga6 signaling regulates cortical neuronal morphogenesis", Cold Spring Harbor Laboratory, 2020 Crossref	48 words — < 1%
5	nek.istanbul.edu.tr:4444 Internet	47 words — < 1%
6	oftalmoloji.org Internet	28 words — < 1%
7	acikerisimarsiv.selcuk.edu.tr:8080 Internet	21 words — < 1%

pdffox.com

EK-D Gönüllü Onam Formu

Tarih :
Versiyon No:

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

ARAŞTIRMANIN ADI: Granüler Korneal Distrofi Tip 1 hastalarından elde edilen lenfositlerde *TGFBI* (Transforme edici büyüme faktörü beta ile indüklenen) genindeki R555W mutasyonunun CRISPR/Cas9 (düzenli aralıklarla bölünmüş kısa palindromik tekrar kümeleri/CRISPR-ilişkili nükleaz-9) ile indüklenmiş homoloji yönelimli onarım yoluyla düzenlenmesi

Bu çalışma, bir bilimsel araştırmadır. Çalışmaya, katılmak isteyip istemediğinize karar vermeden önce araştırmanın neden yapıldığını, bilgilerinizin nasıl kullanılacağını, çalışmanın neleri içerdiğini ve olası yararları ile risklerini doğru anlamanız önemlidir. Lütfen aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırınız.

ÇALIŞMANIN AMACI NEDİR?

Kalıtsal bir hastalık olan Granüler Kornea Distrofisi Tip 1 (GCD1)'in sorumlusu olarak gösterilen *TGFBI* genindeki mutasyonun yeni nesil genom düzenleme sistemi olarak geliştirilen CRISPR/Cas9 teknolojisi ile düzenlenmesi amaçlanmıştır

ÇALIŞMADA UYGULANACAK TEDAVİLER/İŞLEMLER NELERDİR? (ÇALIŞMANIN YÖNTEMİ NEDİR?

Çalışma Tıbbi Biyoloji laboratuarında gerçekleşecektir. Bunun için öncelikle klinik muayene değerlendirmelerine göre GCD1 tanısı almış ve moleküler genetik analizlerle *TGFBI* geninde R555W mutasyonu taşıdığı tespit edilmiş gönüllü hastalardan 5-6 cc periferik kan örneği alınacaktır. Kandan lenfosit hücreleri elde edilerek hücre kültürü yapılacaktır. Hücre kültürü ile çoğaltılan lenfosit hücrelerinde CRISPR/Cas9 teknolojisi kullanılarak mutasyonun düzeltilmesi sağlanacaktır.

ÇALIŞMANIN KAPSAMI NEDİR?

Kesin tedavisi olmayan kornea distrofilerinde hücresel ve gen tedavi çalışmaları son yıllarda başlamıştır. Bu amaç doğrultusunda, daha önce klinik değerlendirme ve moleküler analiz yapılarak GCD1 tanısı almış gönüllü hastalardan lenfosit hücresi eldesi, lenfosit hücrelerinin kültüre edilerek çoğaltılması ve bu hücrelerde CRISPR/Cas9 teknolojisi *TGFBI* genindeki mutasyonun düzeltilmesi çalışmanın kapsamıdır.

ÇALIŞMA SÜRESİ NE KADARDIR?

24 ay

ÇALIŞMAYA KATILMASI BEKLENEN TAHMİNİ GÖNÜLLÜ SAYISI NEDİR?

Çalışmaya sağlık güvencesi olan gönüllü 3-5 birey alınması planlanmaktadır.

ÇALIŞMADA BENİM NE YAPMAM GEREKİYOR?

Çalışmaya katılmayı gönüllülük içerisinde kabul ettiğiniz taktirde periferik kandan lenfosit hücrelerinin elde edilmesi ve bu hücrelerin kültüre edilerek değerlendirilmesine izin vermeniz ve bu formu okuyup imzalamanız gerekmektedir.

BU ÇALIŞMAYA KATILMAK ZORUNDA MIYIM?:

Çalışmaya katılıp katılmamak tamamen sizin serbest iradenize bırakılmıştır. Eğer çalışmaya katılmaya karar verirseniz imzalanmanız için size bu "Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu" verilecektir. Katılmaya karar verirseniz, çalışmadan herhangi bir zamanda ayrılmakta

4EBAT EURASIA BIOCHEMICAL APPROACHES & TECHNOLOGIES CONGRESS
03-06 NOVEMBER 2022 ANTALYA

OP06

Editing of R555W Mutation in the *TGFBI* Gene Related to GCD1 in Peripheral Blood Mononuclear Cells Using CRISPR/CAS9 Technology

Burak DAĞDELEN[a]*, Hilal Arıkoğlu[a], Dudu Erkoç Kaya[a], Banu Bozkurt[b]

[a]*Selçuk University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biology, Konya/Türkiye*
[b]*Selçuk University, Faculty of Medicine, Department of Ophthalmology, Konya/Türkiye*

**burakdagdelen@selcuk.edu.tr*

The transforming growth factor beta-induced (*TGFBI*) gene encodes the transforming growth factor beta-induced protein (TGFBIp), which consists of 683 amino acid residues. TGFBIp, which is a major component of the extracellular matrix especially in the cornea, plays an important role in maintaining the structural integrity and transparency of the cornea by interacting with different types of collagens and integrins. Mutations in the *TGFBI* gene, especially R124H, R124C, R124L, R555W, R555Q in the exons 4 and 12 lead to different types of granular corneal dystrophies (GCD), characterized by abnormal folding and accumulation of TGFBIp in the cornea. This causes severe visual impairment and loss. The R555W hot spot mutation has been shown to cause granular corneal dystrophy type 1 (GCD1). In this sense, this study aims to edit R555W mutation using CRISPR/Cas9 technique in peripheral blood mononuclear cells (PBMC). In this study, the PBMC was obtained from patients with GCD1 carried R555W mutation determined by PCR-sequence analysis.

Guide RNA (gRNA) and donor DNA (ssODN) were designed to edit R555W mutation in the *TGFBI* gene, using the https://www.benchling.com/ online software program and received commercially. Designed gRNA was also cloned into the plasmid vector (79145, Addgene). Following the cloning step, vectors were transformed into DH5alpha bacteria, an E.coli variant, and then PCR and sequence analysis were performed for confirmation. According to the sequence analysis results, successfully cloned gRNA and also ssODN were transfected by electroporation into PBMCs obtained from GCD1 patients. After transfection, PBMCs were cultured in growth medium supplemented with phytohemoglutinin. 24 hours later from the transfection, PBMCs were observed with a fluorescent microscope and sorted from the FITC channel with the FACS instrument to exclude GFP+ signalling cells from non-GFP+ signaling cells. Real-time PCR reaction was carried out thereby using primers designed specifically for the exon 12 region of the *TGFBI* gene and finally melting curve analysis was performed. The analytic findings of the study have revealed that there were important differences between the CRISPR-applied and non-applied PBMCs to edit the R555W mutation in the *TGFBI* gene using the CRISPR/Cas9 technology, which is a new and promising technology.

Permanent and effective treatment approaches are needed because of very limited treatment of corneal dystrophies and the recurrence of opacities after current treatments or corneal transplants. In conclusion, our study results presents a considerable contribution to gene therapy approaches incorneal dystrophies.