

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

CCDC13 GENİNDEKİ MUTASYONUN NÖROGELİŞİMSEL BİR
HASTALIKTAKİ ROLÜNÜN KNOCKOUT ZEBRA BALIĞI MODELİ İLE
ARAŞTIRILMASI

Hatice Eda SÜZEK
ORCID: 0009-0000-3546-4663

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR

TEMMUZ 2025

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2021970231

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

CCDC13 GENİNDEKİ MUTASYONUN NÖROGELİŞİMSEL BİR
HASTALIKTAKİ ROLÜNÜN KNOCKOUT ZEBRA BALIĞI MODELİ İLE
ARAŞTIRILMASI

Hatice Eda SÜZEK
ORCID: 0009-0000-3546-4663

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sultan CİNGÖZ

ORCID:0000-0002-4112-9850

İZMİR

TEMMUZ 2025



T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
ETİK BEYANI

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğum 'CCDC13 Genindeki Mutasyonun Nörogelişimsel Bir Hastalıktaki Rolünün Knockout Zebra Balığı Modeli İle Araştırılması' başlıklı Yüksek Lisans tezim için elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışının olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

İmza

Hatice Eda SUZEK

30.05.2025

TEŐEKKÜR

Bilgisi ve deneyimleriyle bana rehberlik eden danışman hocam sayın Prof. Dr. Sultan CİNGÖZ'e sunduğu her türlü destek ve yardımları için çok teőekkür ederim.

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakóltesi, Çocuk Nörolojisi Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Semra HIZ KURUL ve Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü öğretim görevlisi Dr. Tülay Öncü ÖNER'e katkıları için çok teőekkür ederim.

Zebra balığı çalışmaları kapsamında çok değerli yardımları için İzmir Biyotıp ve Genom Enstitüsü öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Hatice Güneş ÖZHAN ve ekibinden Dr. Esra KATKAT ve Uzm. Umut ÇAĞIRAL'a çok teőekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca destekleri için Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda görev alan tüm hocalarıma ve tüm bölüm arkadaşlarıma ayrıca bu süreç boyunca karşılaştığım bütün zorluklarda yanımda olan ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Uzm. Ayça Yeşil'e çok teőekkür ederim

Aldığım her kararda beni sonuna kadar destekleyen ve hep arkamda olan sevgili ailem, Ümmühan SÜZEK ve Zeki SÜZEK'e benim için yaptıkları bütün fedakarlıklar için çok teőekkür ederim.

Ve her koşulda yanımda olan Ekin Doğaç ÖZTÜRK'e sabrı ve desteği için çok teőekkür ederim.

Hatice Eda SÜZEK

İÇİNDEKİLER

TABLolar DİZİNİ	i
ŞEKİLLER DİZİNİ	ii
KISALTMALAR	iii
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
1.1. Problemin Tanımı ve Önemi.....	1
1.2. Araştırmanın Amacı.....	2
1.3. Araştırmanın Soruları.....	2
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Nörogelişimsel Hastalıklar.....	3
2.1.1. Nörogelişimsel Hastalıklarda Nadir Varyasyonlar.....	5
2.1.2. Nadir Varyasyonların Değerlendirilmesi.....	6
2.2. CCDC13 Geni.....	8
2.2.1. CCDC13 geni ve Siliyopatiler.....	12
2.3. Genom Düzenleme Teknolojileri.....	15
2.3.1. Çinko Parmak Nükleazlar (ZFN'ler).....	16
2.3.2. Transkripsiyon Aktivatör Benzeri Efektör Nükleazlar (TALEN'ler).....	16
2.3.3. CRISPR-Cas9 Teknolojisi.....	17
2.4. Zebra Balığı'nın Model Organizma Olarak Kullanılması.....	20
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	24
3.1. Araştırmanın Tipi.....	24
3.2. Araştırmanın Yeri, Zamanı ve Planı.....	24
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları.....	24
3.4. Çalışma Materyali.....	24
3.5. Araştırmanın Değişkenleri.....	25
3.6. Veri Toplama Araçları.....	25
3.6.1. Akış Şeması.....	25
3.6.2. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler.....	26
3.6.3. Veri Tabanlarının İncelenmesi.....	28

3.6.4.	sgRNA Tasarımı	28
3.6.5.	sgRNA Sentezi	30
3.6.6.	mRNA Sentezi.....	31
3.6.7.	Cas9/gRNA Kompleks Hazırlığı.....	33
3.6.8.	Mikroenjeksiyon	33
3.6.9.	Genomik DNA İzolasyonu ve Sanger Dizileme.....	34
3.6.10.	RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi	36
3.6.11.	Kantitatif PCR (QPCR).....	37
3.6.12.	Whole Mount In Situ Hibridizasyon	38
3.6.13.	Zebra Balığı Bakımı ve Yetiştirilmesi	41
3.7.	Araştırmanın Sınırlılıkları	41
3.8.	Etik Kurul Onayı.....	42
4.	<i>BULGULAR</i>	43
4.1.	Veri Tabanlarının İncelenmesi.....	43
4.1.1.	İnsan CCDC13 Genindeki Varyasyonların Klinik Fenotip Karşılaştırmaları .	43
4.1.2.	İnsan ve Zebra Balığı CCDC13 Protein Dizilerinin Karşılaştırılması.....	44
4.2.	CCDC13 Geninin, Zebra Balığı Larva Döneminde Ekspresyonu	44
4.3.	CRISPR-Cas9 Teknolojisi ile ccdc13 Knockout Larvaların Oluşturulması.....	45
4.4.	Knockout Zebra Balığı Larvalarının Doku ve Hücrelerinde ccdc13 Gen İfadesinin İncelenmesi.....	50
4.5.	mRNA'nın Aşırı Ekspresyonu ile Fonksiyonel Kurtarma Deneyleleri	56
4.6.	ccdc13 mRNA Aşırı İfadesinin Gelişim Aşamasındaki Larvalara Etkisi.....	59
5.	<i>TARTIŞMA</i>.....	60
6.	<i>SONUÇ VE ÖNERİLER</i>.....	64
7.	<i>KAYNAKLAR</i>	66
8.	<i>EKLER</i>.....	74
8.1.	Etik Kurul Raporu 1	74
8.2.	Etik Kurul Raporu 2	75
8.3.	Özgeçmiş.....	76

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. Araştırma planı	24
Tablo 2. Araştırmalar Sırasında Kullanılan Cihazlar	26
Tablo 3. Araştırmalar Sırasında Kullanılan Malzemeler	26
Tablo 4. sgRNA sentezi için gerekli primer dizileri	29
Tablo 5. dsDNA oluşturmak için kullanılan bileşenlerin konsantrasyonları	30
Tablo 6. ccdc13 oligonükleotitleri ile kurulan ısı profili.	30
Tablo 7. sgRNA için hazırlanan karışım bileşenlerinin konsantrasyonları.....	31
Tablo 8. mRNA sentezi için PCR bileşenlerin konsantrasyonları	32
Tablo 9. mRNA sentezi PCR ısı profili	32
Tablo 10. İVT için kullanılan bileşenlerin konsantrasyonları.....	33
Tablo 11. Mutasyon bölgesini çoğaltmak için tasarlanan PCR primerleri	35
Tablo 12. ccdc13 mutasyon bölgesi PCR bileşenlerinin konsantrasyonları	35
Tablo 13. ccdc13 mutasyon bölgesi PCR ısı profili	35
Tablo 14. cDNA sentezinde kullanılan bileşenlerin miktarı	37
Tablo 15. ccdc13 qPCR primerleri	38
Tablo 16. qPCR karışım bileşenlerinin konsantrasyonları	38
Tablo 17. qPCR ısı profili	38
Tablo 18. ccdc13 RNA Probu için PCR Primer dizileri	39
Tablo 19. ccdc13 RNA Probu PCR karışımı bileşenlerinin konsantrasyonları	39
Tablo 20. ccdc13 RNA Prob sentezi bileşenlerinin konsantrasyonları	40
Tablo 21. Enjeksiyonda kullanılan bileşenlerin konsantrasyonları	46
Tablo 22. Enjeksiyonda kullanılan bileşenlerin konsantrasyonları	50
Tablo 23. Kullanılan RNA probları ve hedefledikleri dokuların isimleri	55
Tablo 24. Kurtarma deneyleri için karışım bileşenlerinin konsantrasyonları ...	57

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Sentrozom ve sentriolar uyduların şematik gösterimi.....	9
Şekil 2. Sentriolar uydu proteinlerinin protein-protein etkileşimlerinin	10
Şekil 3. Aksonemal düzende silyum yapısının genel görünümü	12
Şekil 4. Primer ve hareketli silyum yapılarının gösterimi	13
Şekil 5. Genom hedefleme sistemlerinin gösterimi.....	16
Şekil 6. DNA tamir mekanizmaları	19
Şekil 7. Fertilizasyondan 120 saat sonra zebra balığı larvalarının morfolojisi.	20
Şekil 8. Zebra balığının embriyonik gelişim evreleri	22
Şekil 9. Araştırmanın akış şeması.....	25
Şekil 10. gRNA dizisinin genomik DNA üzerinde gösterimi.....	29
Şekil 11. İnsan CCDC13 protein domainlerinin gösterimi.....	43
Şekil 12. İnsan ve zebra balığı Ccdc13 protein dizilerinin hizalaması.....	44
Şekil 13. 5 günlük larvalarda Whole Mount In Situ Hidridizasyon	45
Şekil 14. 24 saatin sonunda larvaların görüntüleri	47
Şekil 15. 48 saatin sonunda larvaların görüntüleri	47
Şekil 16. 72 saatin sonunda larvaların görüntüleri	47
Şekil 17. PCR ürünlerinin jel görüntüsü.....	48
Şekil 18. Sanger Dizileme sonuçları.....	49
Şekil 19. Fertilizasyondan 48 saat sonra larvaların görüntüsü	51
Şekil 20. Fertilizasyondan 72 saat sonra larvaların görüntüsü	52
Şekil 21. Fertilizasyondan 120 saat sonra larvaların görüntüsü	53
Şekil 22. Ccdc13 geni için qPCR istatistiksel sonucu	54
Şekil 23. WMISH yöntemi gerçekleştirilen larvaların görüntüleri	55
Şekil 24. Knockout deney grubuna ait anormal fenotip gözlemlenen larvalar.	57
Şekil 25. Karıştırılmış RNA kullanılan deney grubunun görüntüleri.....	58
Şekil 26. Knockout deney grubunun görüntüleri.....	58
Şekil 27. gRNA ve mRNA kullanılan kurtarma deney grubunun görüntüleri..	58
Şekil 28. mRNA kullanılan mRNA kontrol deney grubunun görüntüleri	59

KISALTMALAR

ACMG: American College of Medical Genetics

BBS: Bardet-Biedl sendromu

Cas9: CRISPR İlişkili Protein 9

CCDC13: Coiled-Coil Domain Containing 13

CNV: Kopya Sayısı Varyasyonu

CRISPR: Kümelenmiş Düzenli Aralıklı Kısa Palindromik Tekrarlar

DEHB: Dikkat Eksikliği Hiperaktivite Bozukluğu

DNA: Deoksiribonükleik asit

DSB: DNA çift zincir kırılmaları

dsDNA: Çift sarmallı DNA

EVC: Ellis-Van Creveld Sendromu

FGF: Fibroblast Büyüme Faktörü

FISH: Floresan In Situ Hibridizasyon

sgRNA: Tek Rehber RNA

GWAS: Genom Çapında İlişkilendirme Çalışmaları

HDR: Homoloji Yönlendirmeli Onarım

INDEL: İnsersiyon ve Delesyon

JS: Joubert Sendromu

MCPH: Primer Mikrosefali

MKS: Meckel-Gruber sendromu

MTOC: Mikrotübül Organizasyon Merkezi

NGB: Nörogelişimsel bozukluklar

NGS: Yeni Nesil Dizileme

NHEJ: Homolog olmayan uç birleştirme

NPHP: Nefronofthisis

OFD1: Oral-Fasiyal-Dijital Tip 1

OSB: Otizm Spektrum Bozukluğu

PCD: Primer Siliyer Diskinezi

PCM: Perisentriyol Materyal

PCNT: Pericentrin

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PKD: Polikistik Böbrek Hastalığı

PDGF- α : Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü- α

RNA: Ribonükleik asit

RNP: Ribonükleoprotein

SMC: Kromozom Yapısal Bakım Bölgesi

SNP: Tek Nükleotid Polimorfizmi

SNV: Tek Nükleotit Varyantı

TALEN: Transkripsiyon Aktivatörü Benzeri Efektör Nükleaz

VUS: Önemi belirsiz Varyantlar

WES: Tüm Ekzom Dizileme

WGS: Tüm Genom Dizileme

ZE: Zihinsel engellilik

ZFN: Çinko Parmak Nükleaz

**CCDC13 GENİNDEKİ MUTASYONUN NÖROGELİŞİMSEL BİR
HASTALIKTAKİ ROLÜNÜN KNOCKOUT ZEBRA BALIĞI MODELİ İLE
ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Hatice Eda SÜZEK

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Nörogelişimsel hastalıklar, dünya genelinde çocukların %3'ünden fazlasını etkilemektedir. Nörogelişimsel bozuklukların etiolojisinde nadir varyasyonlar ve de novo mutasyonların belirleyici roller oynadığı bilinmektedir. CCDC13 geninin, mitoz sırasında DNA hasarının artmasını önleyerek genom stabilitesini koruduğu ayrıca PCM1, Cep290 ve pericentrin gibi proteinlerle etkileşime girerek silyum biyogenezinde görev alan sentriyolar uydu proteinlerinden birini kodladığı ve siliyopati proteini BBS4'ün lokalizasyonu için gerekli bir bileşen olduğu gösterilmiştir. CCDC13 proteini, birçok nörogelişimsel hastalık ve siliyopati ile ilişkilendirilen uydu proteinleriyle etkileşim halinde olmasına rağmen, literatürde CCDC13 genindeki herhangi bir germ hattı varyasyonunun nörogelişimsel ya da başka bir hastalıkla ilişkisini ortaya koyan bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada, indeks hasta ve literatür taramalarında tespit ettiğimiz hastalarda CCDC13 geninde de novo varyasyonlar bildirilmiştir. Ancak gendeki varyasyonların herhangi bir hastalıkla ilişkisini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Araştırmamızda CCDC13 genindeki nadir mutasyonların nörogelişimsel fenotiplere katkısını ortaya koymak amaçlanmıştır. CRISPR-Cas9 teknolojisi ile zebra balığı (*Danio rerio*) embriyolarında hedeflenen *ccdc13* gen lokusu işlevsiz hale getirilmesiyle oluşan model ile gendeki varyasyonların genotip-fenotip ilişkisi deneysel olarak test edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: CCDC13, CRISPR-Cas9, Nörogelişimsel hastalıklar

Tezin Sayfa Adedi: 77

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sultan CİNGÖZ

**INVESTIGATION OF THE ROLE OF THE CCDC13 GENE
MUTATION IN A NEURODEVELOPMENTAL DISORDER USING A
KNOCKOUT ZEBRAFISH MODEL**

Yüksek Lisans Tezi

Hatice Eda SÜZEK

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

ABSTRACT

Neurodevelopmental disorders affect more than 3% of children worldwide. Rare variants and de novo mutations are known to play decisive roles in the etiology of neurodevelopmental disorders. The CCDC13 gene is known to preserve genomic stability by preventing increased DNA damage during mitosis and to encode one of the centriolar satellite proteins involved in ciliogenesis through interactions with proteins such as PCM1, Cep290, and pericentrin. It is also recognized as an essential component for the localization of the ciliopathy-associated protein BBS4. Although the CCDC13 protein interacts with satellite proteins associated with various neurodevelopmental disorders and ciliopathies, there are no studies in the literature demonstrating an association between any germline variant in the CCDC13 gene and neurodevelopmental or other diseases. In this study, de novo variants in the CCDC13 gene were identified in the index patient and in additional cases found through literature review. However, no study has established an association between the gene variants and any disease. The aim of our research is to elucidate the contribution of rare mutations in the CCDC13 gene to neurodevelopmental phenotypes. The genotype-phenotype correlation of the gene variants was experimentally assessed using a model generated by the functional disruption of the target *ccdc13* gene locus in zebrafish (*Danio rerio*) embryos via CRISPR-Cas9 technology.

Key Words: CCDC13, CRISPR-Cas9, Neurodevelopmental disorders

Page Number: 77

Advisor: Prof. Dr. Sultan CİNGÖZ

1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. Problemin Tanımı ve Önemi

Nörogelişimsel hastalıklar, insan beyninin gelişiminde rol oynayan genlerde ortaya çıkan varyasyonlar sonucunda görülen geniş klinik spektruma sahip, bilişsel, davranışsal ve motor gelişimi etkileyen karmaşık hastalık gruplarıdır(1). Genetik temellerinin karmaşık heterojen yapısı, epigenetik ve çevresel faktörlerin etkileşimi bu bozuklukların etiolojisinin halen tam olarak aydınlatılamamasının sebepleri olarak kabul edilmektedir(2)(3). Günümüze kadar gerçekleştirilmiş araştırmalar, birçok nörogelişimsel bozukluğun temelinde nadir varyasyonlar ve de novo mutasyonların önemli rol oynadığını ortaya koymuştur(4)(5).

CCDC13 geni silyogenez, mikrotübül organizasyonu ve DNA hasar yanıtı gibi hücrel süreçlerde aktif rol alan bir gen olarak tanımlanmaktadır. Kodladığı “Coiled-Coil Domain Containing 13” isimli protein, sentrozomal uydulara lokalize olarak diğer uydu proteinleriyle girdiği etkileşimler ile silya oluşumunda görev almaktadır. Ancak, CCDC13 geninin organizmalardaki fonksiyonel rolü ve nörogelişimsel gelişim ile ilişkisi henüz detaylı şekilde tanımlanamamıştır. Günümüze kadar bildirilen CCDC13 patojenik varyantlarının organizmalardaki fenotip-genotip etkileşimleri ve nörogelişimsel fenotiplere katkıları ise henüz yeterince anlaşılammıştır(6)(7). Silyumun yapısal bütünlüğünü ve düzenlenmesini sağlayan proteinlerin mutasyonlar sebebi ile ortaya çıkan fonksiyonel değişimleri, beyin gelişiminde bozulmalara yol açarak nörogelişimsel hastalıklara ait klinik bulguların görülmesine neden olmaktadır(8)(9)(10).

Zebra balıkları, beyin gelişimi ve fonksiyonunun analizindeki faydalar sebebiyle değerli bir model sistem olarak kabul edilmektedir. Boyutları, hızlı jenerasyon süreleri ve düşük maliyetinden dolayı genetik ve moleküler bir deneysel model olarak araştırmalarda kullanılmaktadır. Nörogelişimsel süreçler zebra balığının embriyonik evrelerinde saydam yapısı sayesinde kolayca izlenebilmektedir. Günümüzde birçok insan hastalığı zebra balığında başarıyla modellenmiştir. Mutasyonların zebra balığı modelinde araştırılması CRISPR-Cas9 gibi genetik manipülasyonlar aracılığıyla

kompleks gen düzenleme teknolojilerine kıyasla daha düşük maliyet ve daha kısa sürelerde gerçekleştirilebilmektedir(11).

Genetik mutasyonların fenotip ve genotip üzerindeki etkilerinin araştırılması, nörogelişimsel hastalıkların moleküler mekanizmalarının anlaşılması açısından büyük önem taşımaktadır. Genotip-fenotip ilişkisinin açıklığa kavuşmasının, kişiye özgü tanı ve tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine katkı sağlayacağı ve bu alanda gerçekleştirilecek tanımlayıcı araştırmalara zemin hazırlayacağı düşünülmektedir.

1.2. Araştırmanın Amacı

Araştırmanın amacı önceliklendirdiğimiz nadir patojenik de novo heterozigot varyasyonlar içeren CCDC13 genini, zebra balığı larvalarında modelleyerek nörogelişimsel fenotipe katkısını araştırmak ve değerlendirmektir. Elde edilecek bulgular, CCDC13 genindeki nadir patojenik varyasyonlara sahip bireylerde genotip-fenotip ilişkisini ortaya koyarak hastalıkların nörobiyolojik mekanizmalarını belirlemeye yardımcı olacaktır.

1.3. Araştırmanın Soruları

İndeks vakasının CCDC13 geninde saptanan varyasyon hastada gözlemlenen herhangi bir fenotip ile ilişkili midir? CRISPR-Cas9 gen düzenleme teknolojisi kullanılarak oluşturulan cdc13 knockout G0 zebra balığı hattında gözlenen fenotipik değişiklikler nelerdir? Knockout zebra balıklarında indeks vakadaki fenotiplere benzer fenotipik özellikler gözlemleyebilecek miyiz?

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nörogelişimsel Hastalıklar

Nörogelişimsel bozukluklar (NGB'ler), yaşamın erken döneminde beynin gelişimsel aşamalarındaki aksaklıklar sonucunda bilişsel ve motor işlevlerde gerilik, gelişimsel evrelerini eksiksiz tamamlayamama gibi klinik bulgular meydana getiren ve insan popülasyonunda %3'ünden fazla yenidoğanı etkileyen heterojen kökenli malformasyonlardır. NGB'ler arasında otizm spektrum bozukluğu (OSB), zihinsel engellilik (ZE), dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu (DEHB) ve epilepsi yer alır ve bu hastalıkların psikomotor gelişimleri gibi çeşitli becerilerde bozulmalara yol açtığı bilinmektedir. Bu hastalıklar çoğu zaman birbirinden farklı birincil tanılara sahip olmasına rağmen aralarında fenotipik örtüşmeler göstermekte ve belirgin klinik heterojeniteleri ile dikkat çekmektedir. Genetik ve epigenetik değişikliklerin yanı sıra, embriyonik dönemde maruz kalınan uygunsuz çevresel koşullar da bu hastalıkların oluşumunda önemli rol oynamaktadır(12).

Günümüze kadar yapılan çalışmalar, nörogelişimsel bozuklukların benzer moleküler mekanizmalarla ilişkili olduklarını ve bu nedenle tek bir bireyde birden fazla hastalığın birlikte ortaya çıkabileceğini göstermektedir. Klinik fenotip açısından belirgin heterojenlik tanı sürecini zorlaştırmaktadır. Epilepsili çocukların yaklaşık %20'sinde konjenital beyin malformasyonlarına rastlanmaktadır. Korpus kallozum anomalisi başta olmak üzere çeşitli yapısal beyin bozukluklarının; zihinsel yetersizlik, otizm, epilepsi, serebral palsi ve şizofreni gibi nörogelişimsel hastalıklarla birlikte görüldüğü bildirilmiştir. Ayrıca, minör dismorfik bulgular ya da kardiyolojik ve nefrolojik gibi çoklu konjenital anomaliler de bu hastalıklara eşlik edebilmektedir. Bu durum, nörogelişimsel hastalıklar ile bazı doğumsal hastalıklar arasında epidemiyolojik ve moleküler düzeyde ortak patogenez mekanizmalarının varlığına işaret etmektedir. Literatürde, otizm, zihinsel yetersizlik ve epilepsi gibi farklı nörogelişimsel bozuklukların ortak genomik değişiklikler ve moleküler yollarla açıklanabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur(12)(13). Bu hastalıkların çoğunlukla genetik, metabolik, yapısal, enfeksiyöz, immünolojik, toksik ve travmatik etkiler gibi çeşitli nedenlerden kaynaklandığı bilinmektedir. NGB ile çocukluk dönemi psikiyatrik bozukluklar arasında örtüşen ilişkiler mevcuttur bu sebeple tanılar genellikle

davranışsal semptom kümelerine göre ayrıştırılarak konulmaktadır(1). Nörogelişimsel bozuklukların sınıflandırılmasında büyük ölçüde davranışsal fenotiplere dayanma durumuna karşı birçok ilişkili kuruluş genetik düzeyde sınıflandırmanın önemli bir değişken olduğunu savunmaktadır. Moleküler biyoloji ve genetik alanındaki ilerlemeler, vakalarda gen ve varyant temelli gruplandırmaları mümkün kılmıştır ancak yüksek klinik ve genetik heterojeniteden dolayı kesin genetik tanı koymak büyük bir zorluktur. Karmaşık bozukluklar olarak tanımlanan NGB'lerin, çoklu genetik olaylar ve çevresel etkilerle ortaya çıkması fenotip-genotip ilişkisinin daha net kurulabilmesi için yeni yaklaşımların geliştirilmesinin gerekli olduğunu göstermektedir(14).

Nörogelişimsel bozuklukların genetik yapısı karmaşıktır ve birçoğu kromozomal yeniden düzenlemeler, kopya sayısı varyasyonları, indeller ve nokta mutasyonları gibi değişiklikler ile ilişkilidir. Günümüzdeki veriler yaklaşık 900'den fazla genin NGB'ler ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Araştırmacılar genetik varyasyonları anlamlandırabilmek için çalışmalara önce karyotipleme, FISH ve kromozomal mikroarray gibi tekniklerle başlayıp teknolojik ilerlemelerle birlikte tüm ekzom dizileme (WES) ve tüm genom dizileme (WGS) gibi yöntemleri kullanarak nadir ve de novo mutasyonları daha ayrıntılı saptanabilir hale getirmişlerdir. NGB'lerin heterojen etiyolojisi tanıyı zorlaştırmaktadır ancak yeni nesil dizileme (NGS) teknolojileri tanı süreçleri için önemli yenilikler sağlamıştır. Maliyet ve verim açısından; yalnızca protein kodlayan bölgeleri hedefleyen tüm ekzom dizileme (WES) yöntemi, ebeveynlerin dahil olduğu analizlerde %40'ın üzerinde tanı başarısı göstermesiyle yüksek oranda tercih edilmektedir. Bu başarısının yanında kodlamayan bölgelerdeki mutasyonlar ve epigenetik değişiklikler gibi bazı nedenleri tespit edememektedir. Bu nedenle, mikroarray ve PCR gibi yöntemlerin kullanıldığı daha kapsamlı tanı yaklaşımları geliştirilmiştir(13)(15). Geçmişte ileri fenotipleme olarak isimlendirilen yani fenotipten genotipe doğru yol izleme prensibine sahip yaklaşımlar tercih ediliyordu. Günümüzde ise tüm genom çapında genotipleme teknolojileri ile genetik araştırmalarda büyük miktarda veri üretmek mümkün hâle geldiği için hastalıkların genetik nedenlerini belirlemede genom çapında tarafsız taramalar yapılabilmektedir. Bu incelemelerde, tanımlanmış klinik fenotiplere dayanmak yerine öncelik olarak genetik veriler değerlendirmeye alınır. Ters fenotipleme olarak

isimlendirilen bu yöntemde genetik varyantlar incelenerek, aynı genetik belirteçleri taşıyan bireylerin ortak klinik özellikleri belirlenmeye çalışılmaktadır. Geleneksel tanı koyma seçenekleri yerine kullanılan bu yaklaşım ile genetik açıdan benzer bireylerden oluşan yeni fenotipik gruplar tanımlanmaktadır. Hastalıkların genetik temelleriyle daha uyumlu alt gruplar tanımlanabilir ve tanı ve tedavi süreçlerini daha etkili hale getireceği düşünülmektedir(14).

2.1.1. Nörogelişimsel Hastalıklarda Nadir Varyasyonlar

Kopya sayısı varyasyonu (CNV), insan genomunda 1 kilobaz (kb) ve daha büyük DNA segmentlerinin bireyler arasında farklı sayıda kopyaya sahip olduğu bir varyasyon çeşididir. CNV'ler delesyon, duplikasyon gibi farklı yapısal değişiklikler şeklinde görülebilmektedir. Gen ifade düzeylerini etkiledikleri için fenotipik çeşitliliğe ve hastalık risklerinde artmaya sebep olmaktadır. Tek nükleotid varyasyonu (SNV), DNA dizisinde tek bir bazın değişmesiyle oluşan farklılıktır. CNV'ler bazı hastalıklara doğrudan neden olabilir veya risklerini artırır, SNV'ler genellikle bireysel farklılıklar ve genetik yatkınlıklarla ilişkilidir(16)(4)(17). Nadir varyant, genetik bir lokustaki genellikle %1'in altında düşük frekanslı alelleri ifade eder ve genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) gibi standart genom tarama yöntemleriyle değil, daha özel analizlerle saptanabilen varyantlardır(18).

Otozomal dominant mutasyonlarda hem hasta birey hem de ebeveyn mutasyonu taşır. Otozomal resesif mutasyonlarda ise ebeveynler taşıyıcıdır, hasta çocuk her iki mutasyonu alarak hastalık belirtilerini taşır. Bu mutasyonlar genellikle gen fonksiyon kaybına yol açar. Otozomal resesif kalıtımın bir alt tipi olan bileşik heterozigotlukta, aynı gende iki farklı mutasyon iki ebeveyninden de aktarılır. X'e bağlı mutasyonlar çoğunlukla erkek bireylerde etkili olur. De novo mutasyonlar ise kalıtsal değildir, kendiliğinden oluşurlar; fonksiyon kaybı, fonksiyon kazanımı veya dominant negatif etkiyle bir hastalığa neden olabilir. Somatik mutasyonlar ise bazı belirli hücrelerde bulunur. Bu kalıtım türleri, hastalıkların genetik nedenlerinin belirlenmesini kolaylaştırmaktadır(19). Özellikle sporadik vakalarda görülen de novo mutasyonların, kalıtsal mutasyonlara kıyasla daha zararlı olduğu ve otizm, zihinsel yetersizlik, şizofreni gibi nörogelişimsel hastalıkların altında yatan önemli etkenlerden biri olduğu ortaya konmuştur(20). De novo mutasyonlar kalıtsal mutasyonlara kıyasla daha

zararlıdır çünkü negatif seleksiyon baskısına uğramadan yeni nesilde ortaya çıkarlar. Bu durum daha yüksek CADD ve REVEL skorlarıyla işlevsel olarak daha yıkıcı olduklarını göstermektedir. Bu mutasyonlar özellikle beyin gelişimi, transkripsiyon regülasyonu ve sistem gelişimi gibi hassas biyolojik süreçleri kontrol eden genleri hedef alırlar bu sebeple otizm, epilepsi, şizofreni gibi nörogelişimsel ve psikiyatrik hastalıklarla sık ilişkilendirilmektedirler. Germline mozaiklik mevcutsa yani ebeveynin sperm veya yumurta hücrelerinden bir kısmında mutasyon olma ihtimali varsa tekrar riski artmaktadır. Çoğunlukla paternal kökenlilerdir ve baba yaşı arttıkça mutasyonların sıklıklarının arttığı bilinmektedir. Çok sayıda farklı gende görülebilmeleri geniş genetik heterojeniteye neden olmaktadır. Doğal seleksiyon süzgecinden geçmemeleri, gelişimle ilgili hayati genleri hedef almaları, yaşla artan paternal mutasyon riski, yüksek penetranslı olmaları ve genetik çeşitliliği artırmaları gibi nedenler de novo mutasyonların hastalık yapıcı potansiyelini artırmaktadır(21)(22). Trio analizleriyle yapılan WES çalışmaları, hastalığın kalıtsal değil, gametogenez veya erken embriyonik dönemde oluşan yeni mutasyonlara bağlı geliştiğini göstermektedir. Bu da, nadir varyasyonların fenotip üzerindeki güçlü etkisini ve kişiselleştirilmiş tanı stratejilerindeki yerini daha belirgin hale getirmiştir(23)(24).

2.1.2. Nadir Varyasyonların Değerlendirilmesi

Genetik kökenli hastalıkların tarihsel sürecinin başlarında sadece fenotip veya semptomlar göz önünde bulundurularak tanı koymak oldukça zordu ancak son dönemde genom dizileme alanındaki yenilikler daha hızlı ve moleküler düzeyde hassas bir şekilde tanımlama yapılmasını mümkün kılmıştır. Gen dizileme teknolojileri tanı sürecini kısaltma, hastalıkların biyolojik mekanizmalarını anlama ve olası tedavi yaklaşımlarını geliştirme konusunda önemli olanaklar sağlamaktadırlar(25)(26). Geçmişte hastanın klinik bulguları ile ilişkili genetik mutasyonları belirlemek amacıyla hem yüksek maliyetli hem de uzun yıllar süren bağlantı haritalama ve aday gen dizileme yöntemleri kullanılıyordu. Günümüzde ise tanı süreçleri, yeni nesil dizileme (NGS) teknolojilerindeki ilerlemeler sayesinde çok daha hızlı ve etkili şekilde yürütülmektedir. Bu ilerlemeler özellikle tüm ekzom dizileme (WES) ve tüm genom dizileme (WGS) gibi genetik tanı alanında yüksek kapsamlı yaklaşımlar sunarak tanı oranlarında büyük artış sağlamaktadır. İnsan Genom Projesi sonrası tüm

genom dizileme (WGS) maliyetlerinin düşmesi sebebiyle araştırma sayılarında yüksek artışlar olmuştur. Patojenik mutasyonlar yaklaşık olarak %85 oranında protein kodlayan bölgelerde bulunduğu için tüm ekzom dizileme (WES) maliyetini minimum seviyelere indirmiştir ve bu sebeple etkin bir seçenek olarak öne çıkarmaktadır. WES, kodlayan bölgelerin dışındaki alanları kapsamasa da çoğu mutasyonu saptayabilmektedir. Günümüzde çalışmaların %60'ında yeni hastalık genlerinin tanımlanmasını sağlamıştır(19). Dizileme teknolojilerindeki bu gelişmeler, varyantların ilgilenilen hastalıkla ilişkili olup olmadığının değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır.

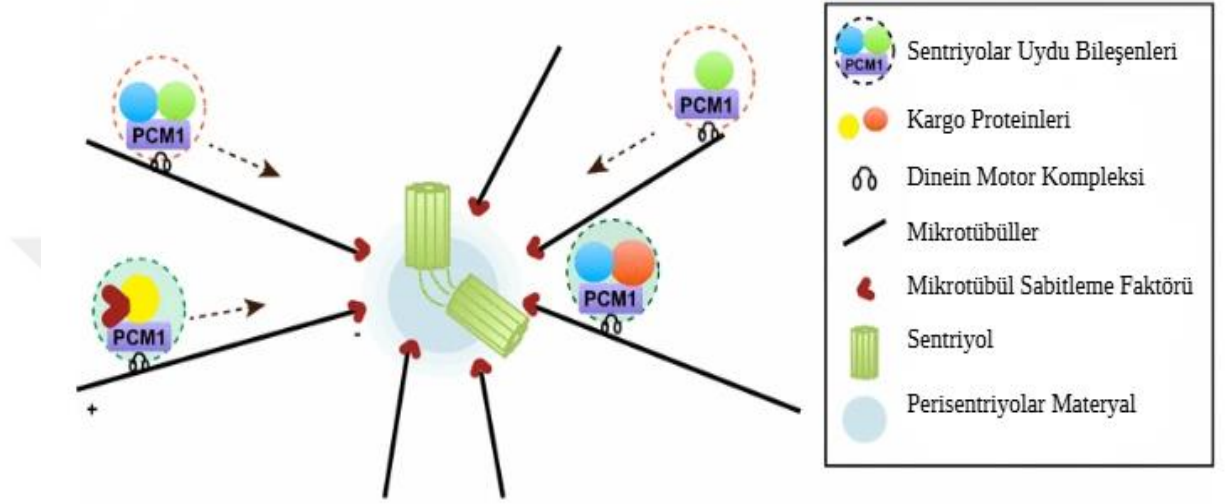
Genom dizilemenin tanıda rutinleşmesinin sonucunda hekimlerden önce hastanın genomik verilerine daha sonra fenotipik belirtiler ve semptomlara dayanarak tanı koyması beklenmektedir ancak aynı genin farklı patojenik varyantları farklı nörogelişimsel hastalıklara neden olabildiğinden, bu varyantların sonuçları ve tedavi yaklaşımları hastalığa göre değişmektedir. Bu sebeple her biri ayrı hastalık olarak ele alınmalıdır(27)(25). Nörogelişimsel hastalıkların tanı aşamasında sonuç güvenilirliğini ve varyantın patojenite açısından doğru şekilde değerlendirilmesini sağlamak için sırasıyla uygulanması gereken beş temel adım bulunmaktadır. İlk olarak, varyant erişimi aşamasında, ilgilenilen hastalıklarla ilişkili hedef genlerde bildirilen varyantlar mevcut bilimsel literatür taramasıyla belirlenir. İkinci adım olan veri iyileştirme sürecinde, ilgili gen varyantları, klinik semptomlar, fenotipik özellikler, hasta bilgileri ve varyantların genomik konumları dikkate alınarak detaylı şekilde analiz edilir. Üçüncü adım olan uyumlaştırma, varyant noktalarının standart insan referans genomuyla eşleştirilerek optimizasyonunun sağlanması ve olası belirsizliklerin giderilmesini içerir. Dördüncü adımda, patojenite sınıflandırması yapılır. Her varyant için, ACMG (American College of Medical Genetics) kılavuzlarına göre patojenik, muhtemelen patojenik, önemi belirsiz, muhtemelen iyi huylu veya iyi huylu şeklinde kategorize edilir. Son aşama olarak, açıklama adımı, varyantların biyolojik etkileri herkese açık veri tabanları kullanılarak değerlendirilir(25).

2.2. CCDC13 Geni

CCDC13 (Coiled-Coil Domain Containing 13) geni, insan genomunda 3. kromozomun kısa kolu olan 3p22.1 bölgesinde konumlanmış, evrimsel olarak yüksek derecede korunmuş protein kodlayan bir gendir. CCDC13 proteini, özellikle sentrozom ve primer silyum bölgelerinde lokalize olarak hücre döngüsüne bağlı şekilde dinamik bir yer değişimi gösterir. CCDC13, PCM1, Cep290, Cep131 ve Pericentrin gibi çeşitli sentriolar uydu proteinleri ile etkileşerek bu kompleksin stabilitesinin sağlanmasında görev almaktadır. Silyogenez sürecinde bazal cisimde birikerek primer silyum oluşumuna katkıda bulunur ve silyumla ilişkili proteinlerin taşınmasına dolaylı olarak aracılık etmektedir. Genom stabilitesinin korunmasında önemli bir rol oynayan CCDC13'ün eksikliğinde silyum uzunluğu ve sayısında azalma, sentrozom anormallikleri, kromozom ayrılma kusurları ve DNA hasar belirteçlerinde artış gibi hücresel bozukluklar gözlenmiştir(6).

Mikrotübüller, α ve β tübülün proteinlerinden oluşan dinamik yapılardır; hücre döngüsünün düzenlenmesi, silyogenez, hücre hareketi ve çoğalması gibi temel hücresel olaylarda rol alırlar. Sentrozom, hücrenin bölünmesi, farklılaşması ve gelişimi gibi biyolojik süreçlerde görev alan ve mikrotübül organizasyon merkezi (MTOC) olarak kabul edilen bir organeldir. Yapısal olarak birbirlerine dik yerleşmiş iki sentriyol çifti ve çevresindeki perisentriyolar matriks (PCM) adı verilen bir fibröz protein bulutundan oluşmaktadır. Memeli hücrelerindeki sentriyolar uydular adı verilen, sentrozom çevresinde kümelenmiş ve zarla çevrili olmayan 70–100 nm çapındaki küçük küresel parçacıklar ile sentrozom tanımı genişlemiştir. Sentriolar uydular özellikle silyogenez, mikrotübül organizasyonu, mitoz iğ ipliği kutuplarının kontrolü, sentrozom çoğalması, hücre iskeletinin düzenlenmesi ve nöronal gelişim gibi süreçlerde rol oynayan proteinleri içermektedir. PCM1 proteini, sentriolar uydular için yapısal bir alan oluşturur ve bir iskelet görevi görür bu sebeple proteinin işlevi bozulduğu zaman uydu yapısının da bütünlüğü bozulur ve dağılır. Bir proteinin sentriyolar uydu bileşeni olarak sınıflandırılabilmesi için PCM1 proteini ile lokalizasyon göstermesi ve PCM1 proteinin kaybında perisentrozomal alandan ayrılması gerekmektedir. Bu sebeple PCM1'in tükenmesi, sentiyolar uyduların işlevlerini araştırmak için kullanılan önemli bir çalışma alanı olarak kabul edilmektedir(28). Yaklaşık olarak 100 farklı sentriyolar uydu proteinin varlığı

bilinmektedir. Bu proteinlerin temel görevleri silya biyogenezini sağlamak ve mikrotübül organizasyonunu düzenlemektir. Yapılan klinik çalışmalarda PCM1 ve diğer uydu proteinlerini kodlayan genlerdeki mutasyonların Bardet-Biedl sendromu, Joubert sendromu, Meckel-Gruber sendromu ve Primer mikrosefali (MCPH) gibi siliyopati ilişkili nörogelişimsel hastalıklarla ilişkili oldukları bildirilmiştir(29)(30).

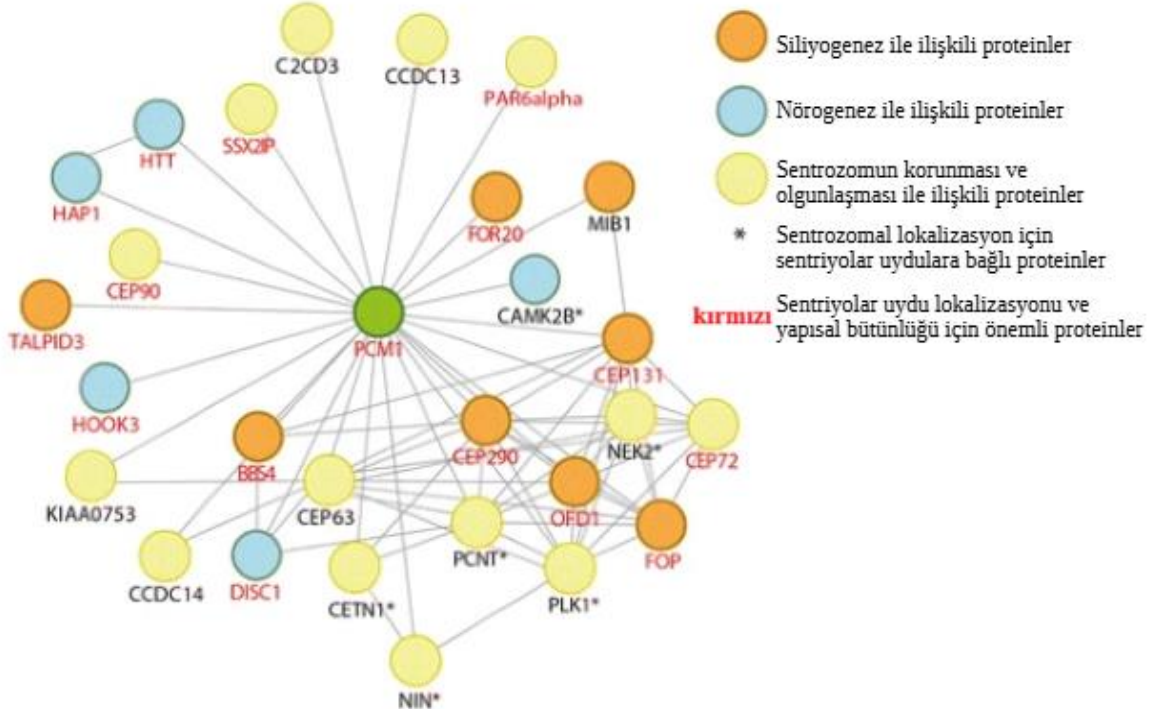


Şekil 1. Sentrozom ve sentriolar uydu yapılarının şematik gösterimi(29).

Sentriolar uydu yapıları, sentrozom çevresi ve silyalı hücrelerin bazal kısmı yakınında yoğunlaşırlar. Hücre döngüsü tamamlanmış hücrelerde sentrioller bazal cisim hâline gelerek silyanın aksonem mikrotübüllerinin oluşumunu ve stabilitesini sağlamaktadırlar. Sentriolar uydu yapıları yalnızca interfaz evresinde gözlemlenebilirler; sentrozom etrafında kümelenirler ve sitoplazmada dağınık halde bulunurlar ancak mitoz başlangıcında sentrozoma geri döner ve çözünerek kaybolurlar. Sitokinez evresinden sonra yeniden oluşarak eski konumlarına dönerler ve tekrar lokalize olurlar(30). PCM1 içerdiği sarılı sarmal bölgeleri ile kendiliğinden oligomer yapısı oluşturarak diğer sentriolar uydu bileşenleri ile etkileşime girer ve aralarındaki bağlantının kurulmasını sağlar. Başta BBS4 ve OFD1 olmak üzere CCDC11, CCDC12, CCDC13, CCDC14, CCDC18, CCDC66, CEP63, CEP72, CEP90, CEP126, CEP131/AZI1, CEP290, FOR20, HAP1, HTT, KIAA0753, Par6 α ve SDCCAG8 gibi bazı proteinler de bu yapının korunmasında rol oynar ve aynı zamanda sentrozom ve primer silya yapılarında işlevsel olarak görev alırlar. PCM1'in yapısal platform rolü

oynadığı bu düzende diğer bileşenlerin düzenleyici roller oynadığı düşünülmektedir. İlgili alanda gerçekleştirilen çalışmalardan elde edilen bilgiler göz önüne alındığında sentriyolar uydu proteinlerinin PCM1'in perisentrozomal dağılımını etkilediği bilinmektedir ancak bu etkileşimlerin moleküler mekanizmaları henüz netleştirilmemiştir(29).

CCDC (Coiled-Coil Domain Containing) proteinleri, α -helikal peptidlerin birbirine sarılmasıyla oluşan ve evrimsel olarak korunmuş bir protein motifi olan sarılı sarmal (coiled coil) yapısında proteinlerdir. Sarılı sarmal motifler genellikle aynı zincire ya da farklı protein zincirlerinden gelen iki ila altı heliksin paralel veya antiparalel dizilmesiyle oluşur. Bu yapılar amino asit eklenmesi ile bölgesel şekil bozulmalarına sebep olabilir bu durum yapısal çeşitliliğe katkı sağlar. Tüm proteomun yaklaşık %10'unu bu yapıları oluşturan dizilerden oluşmaktadır. CCDC proteinleri ekspresyon gösterdiği hücre ve dokularda farklı bölgelerde konumlanarak kromozomların ayrılmasının kontrolü, sentriyol yapısı düzenleme, protein iskeleti oluşturma ve vezikül bağlantısı gibi birçok fizyolojik süreçte görev alır(7).



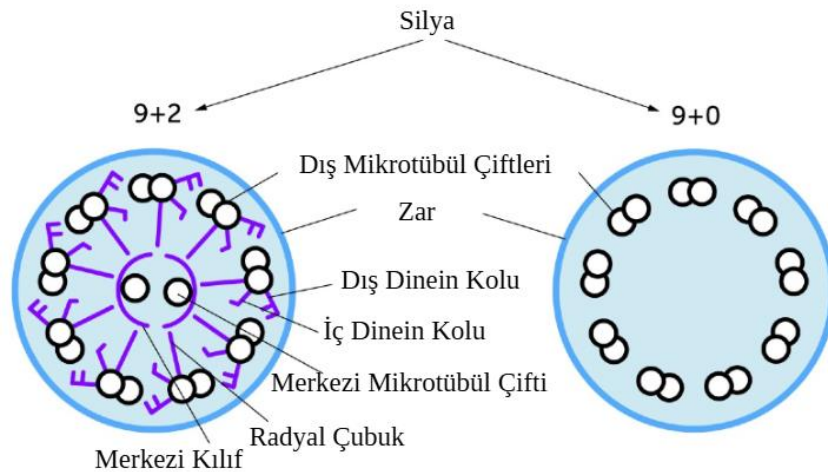
Şekil 2. Sentiolar uydu proteinleri ile etkileşen proteinler arasındaki öngörülen protein-protein etkileşimlerinin STRING platformu (sürüm 9.1) kullanılarak hazırlanmış temsili gösterimi(30).

CCDC13 (Coiled-Coil Domain Containing 13) geni, insan genomunda 3. kromozomun kısa kolunda (3p22.1) konumlanmış olan ve protein kodlayan bir genidir. Kromozom yapısal bakım bölgesi (SMC) bulduran protein memelilerden zebra balıklarına kadar birçok canlıda evrimsel olarak yüksek derecede korunmuş bir yapıya sahiptir. CCDC13 proteini hücrede özellikle sentrozom ve primer silyum bölgelerinde yer alır ve hücre döngüsüne bağlı olarak konumunu değiştirir; interfazda perisentriolar uydularda, mitozda iğ ipliklerinin kutuplarında, telofaz ve sitokinezde ise yeniden sentriyolar uydu yapısına döner. Dinamik yapısı sayesinde hücre iskeletinin organizasyonu ve hücre bölünmesi gibi süreçlerle doğrudan bir ilişkisi olduğu bilinmektedir. CCDC13, PCM1 proteini başta olmak üzere Pericentrin (PCNT), Cep290, Cep131, Cep215, Cep72 ve Cep90 gibi birçok sentriyolar uydu proteiniyle moleküler düzeyde etkileşim içindedir ve uydu kompleksinin stabilitesine katkı sağlamaktadır. PCM1 ile ortak bir lokalizasyon gösterdiği için dinein-dinaktin motor protein kompleksi ile hücre içi hareketini gerçekleştirir. Hücrenin siliyogenez sürecinde CCDC13 proteini bazal cisimde birikerek primer silyum oluşumuna katkıda bulunur. Silyum yapısı için gerekli bir protein olan BBS4 proteininin PCM1 aracılığıyla silyuma taşınmasında dolaylı olarak rol alır. CCDC13 proteinin eksikliğinde silyum sayılarında ve uzunluklarında azalma olduğu gözlenmiştir. Genom stabilitesinin korunmasında önemli bir protein olduğu için işlevsiz hale gelmiş CCDC13 proteini bulduran hücrelerde, sentrozom sayısının anormal seviyelerde artması sebebiyle hücre döngüsünde aksaklıklar ve kromozom ayrılmasında hatalar oluşması, mitoz evrelerinde anafaz köprüleri gibi kusurlar oluşması, mikronükleus oluşumları ve γ H2AX, pATM, pDNA-PK, 53BP1 olarak isimlendirilen DNA hasar belirteçlerinde artış gibi sonuçlar gözlenmiştir. Bu farklılaşmalara rağmen yapılan çalışmalarda CCDC13 proteinin eksikliğinde hücrelerde yoğun bir apoptoz gözlenmemiştir; bu sonuçlara sebep olarak homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) gibi DNA onarım mekanizmalarının aktif kaldığı düşünülmektedir. Bulgular göz önüne alındığında CCDC13 proteinin, genin hem hücre iskeleti organizasyonu ve hücre bölünmesinin düzenlenmesinde hem de genetik bütünlüğün korunması açısından kritik bir bileşen olduğu gözlenmektedir. Son zamanlardaki araştırmalarda edinilen bulgulara göre CCDC13 geni, genom stabilitesiyle ilişkili hastalıklar olan

nörolojik bozukluklar ve kanser için potansiyel bir terapötik bir hedef olarak değerlendirilmektedir(6)(31)(32).

2.2.1. *CCDC13* geni ve Siliyopatiler

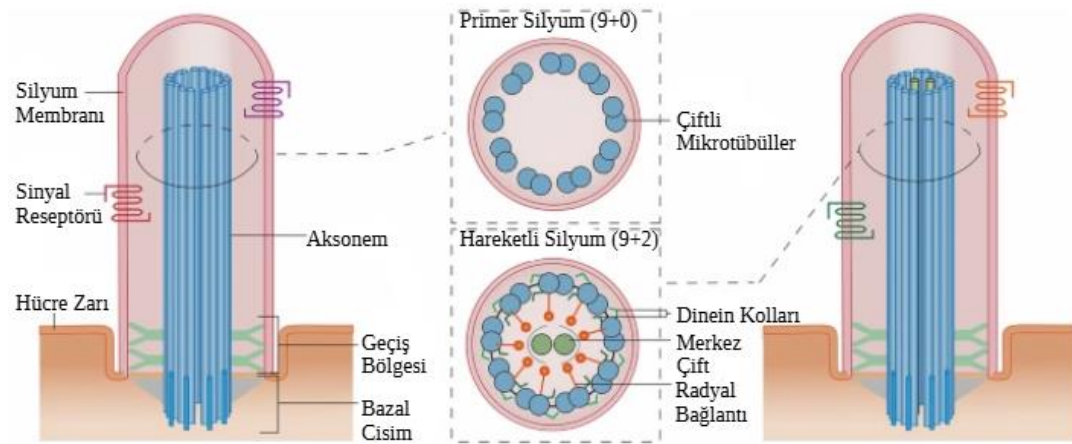
Siller, protozoalardan primatlara kadar birçok organizmada bulunan evrimsel olarak korunmuş, insan vücudunda neredeyse her hücre tipinde görülen karmaşık duyu ve hareket organelleridir. Fizyolojik ve gelişimsel süreçte kilit rollerde görev alırlar(33). Silyalar, hareket sağlamak ve sinyal iletimine aracılık etmek gibi hücre düzeyinde iki temel görevi bulunmaktadır. Organizmaların embriyonik gelişimlerinde sol-sağ asimetrinin belirlenmesi, uzuv gelişimi ve beyin yapılarının oluşumu gibi süreçler için önemlidir. Yetişkin memelilerde ise koku alma, görme, solunum temizliği, üreme hücresi taşınımı ve böbrek yapısının korunması gibi görevleri bulunmaktadır. Mikrotübüllerden oluşan bir iskelet sistemiyle desteklenir(34). Silyalar tekil veya çoklu olarak sayısına göre, hareket kabiliyetlerine göre ve silyumların iç yapısında mikrotübüllerin nasıl dizildiğini ifade eden aksonemin ultrastrüktürel düzenlerine göre olmak üzere üç temel özelliğe göre sınıflandırılır. Aksonemin iki temel ultrastrüktürel düzeni, hareketli silyumlarda bulunan 9+2 yapısı (9 çift mikrotübül dışta + 2 tek mikrotübül merkezde) ve hareketsiz (primer) silyumlarda görülen 9+0 yapısı (9 çift mikrotübül dışta + merkezde mikrotübül yok) olarak ayrılmıştır. Aksonemin yapısındaki genetik bozukluklar, siliyopatiler gibi birçok nadir genetik hastalığın temelini oluşturur(35).



Şekil 3. Aksonemal düzende silyum yapısının genel görünümü(36)

Hem hareketsiz hem de embriyonik nod bölgesindeki hareketli silyumların oluşturduğu primer silyumlar, Hedgehog (Hh), Wingless (WNT), trombosit kaynaklı büyüme faktörü- α (PDGF- α) ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) gibi sinyal iletim yollarının düzenlenmesinde görev alırlar. Hücre içi kalsiyum dengesinde önemli bir rolü olan primer silyumlar aynı zamanda duyuşsal organel işlevi görür(37).

Primer silyumlar, çevresel sinyallerin algılanması ve Hedgehog (Hh) sinyal yolu başta olmak üzere gelişimsel sinyal yollarının iletiminde kritik rol oynamaktadır. Hh sinyal molekülleri silyum üzerinde lokalize olur ve bu yolak, sinir sistemi gelişimi, uzuv oluşumu, hücre proliferasyonu ve farklılaşması gibi temel embriyolojik süreçleri düzenler. Wnt gibi diğer sinyal yolları da primer silyumla ilişkilidir, ancak bu etkileşim Hh yolu kadar ayrıntılı olarak tanımlanmamıştır. Primer silyum dairesel düzende dokuz mikrotübül çifti içerir ve temel işlevi sinyal iletimidir. Silyum oluşumunun başlangıç noktası olan bazal cisim, bir geçit kontrol işlevi görerek silyer proteinlerin giriş çıkışını düzenleyen geçiş bölgesi ve Primer silyumun şeklini belirleyen aksonem olmak üzere yapısal olarak üç bölüme ayrılmaktadır(38).



Şekil 4. Primer ve hareketli silyum yapılarının gösterimi(39)

Silyopati terimi, embriyonik nod üzerinde bulunan 9+0 yapılı hareketli silyumlar hariç tutularak, hareketsiz 9+0 yapıdaki primer silyuma ait klinik bozukluklar için kullanılmaktadır. Hareketli 9+2 silya yapısına bağlı klinik bozukluklar Primer Silyer Diskinezi (PCD) olarak adlandırılır(35). Yalnızca hareketli silyumların bulunduğu organları etkileyen PCD hastalığı tekrarlayan solunum yolu enfeksiyonları, vücut yönelim (laterality) kusurları ve kısırlıkla ilişkilidir(40). 9+0

yapısındaki bozukluklar ise Joubert sendromu, Meckel–Gruber sendromu gibi klinik bozukluklara yol açar(35)(41). Siliyopatiler genetik açıdan heterojen bir hastalık grubudur ve şimdiye kadar bilinen hepsi otozomal veya X'e bağlı olmak üzere resesif bir kalıtım modeli ile aktarılmaktadır. Her bir siliyopatiye ait fenotiplerin ortaya çıkması için hasta bireyde bir genin iki alelinde mutasyon bulunması gerektiği anlamına gelmektedir. Ayrıca aynı gendeki mutasyon birden fazla hastalığa yol açarak farklı siliyopatik tabloların gelişimine neden olabilir. Bunun sonucunda oluşan yüksek genetik çeşitlilik ve fenotipik değişkenlik nedeniyle, hastalarda klinik gidişatı öngörmek güçleşmektedir. Bu koşullar dolayısıyla günümüze kadar çok az sayıda genotip-fenotip ilişkisi tanımlanabilmiştir(38)(8).

Son yıllarda yapılan araştırmalar ile silyaların gelişimsel süreçlerdeki düzenleyici rolleri ve nörolojik dokulardaki işlevleri temel alınarak siliyopatilerin çeşitli nörogelişimsel bozukluklara yol açabileceğini kanıtlayan veriler ortaya çıkmıştır. Primer silyalar, embriyonun beyin gelişiminde önemli rolleri olan Wnt, Hedgehog ve Notch sinyal yollarını düzenleyerek hücre çoğalması, hücre göçü ve hücre farklılaşması süreçlerini kontrol etmektedirler. Silyalardaki işlev bozulmaları serebral korteks gelişimi, nöron göçü ve sinaptik bağlantılarda sorunlara yol açar ve mikrosefali, bilişsel gerilik, otizm spektrum bozukluğu ve epilepsi gibi nörogelişimsel bozukluklara neden olur. Joubert sendromu, Bardet-Biedl sendromu, Meckel-Gruber sendromu gibi bazı sendromik siliyopatilerde nörogelişimsel semptomlar sıklıkla gözlenmektedir. Siliyopati genleri genellikle silyanın bazal cisim ve geçiş bölgeleriyle ilişkilidir. Bu bölgelerde oluşan mutasyonlar beyin dokusundaki sinyal iletimini bozabilir. Silyalarda meydana gelen bozukluklar ayrıca hipokampus ve kortekste nöronal gelişimi etkiler ve iyon kanal regülasyonu, sinaptik denge ve glia etkileşimlerini bozulabilir bu durum epilepsi oluşumuna zemin hazırlar(10)(42). CCDC13 proteini, primer silyumun oluşumunda görevli bazal cisimde birikerek silyogenez sürecine doğrudan katkıda bulunmaktadır. Özellikle BBS4 gibi siliyopatiyle doğrudan ilişkili proteinlerin PCM1 aracılığıyla silyuma taşınmasında dolaylı olarak rol oynaması, CCDC13'ün bu hastalık grubu ile bağlantısını göstermektedir. CCDC13 eksikliğinde gözlenen silyum sayısı ve uzunluğunda azalma, siliyopatilerin temel patofizyolojik mekanizmalarından biri olan primer silyum disfonksiyonunu yansıtmaktadır. Ayrıca CCDC13'ün, PCM1, Cep290, Pericentrin gibi

silyum yapısı ve fonksiyonlarıyla ilişkili proteinlerle moleküler düzeyde etkileşim içinde olması silyum kompleksinin stabilitesini korumasındaki rolünü göstermektedir. Bu bulgular, CCDC13'ün primer silyum disfonksiyonuna yol açarak siliyopatilerin etiolojisinde rol oynayabileceğini göstermektedir(6)(35).

2.3. Genom Düzenleme Teknolojileri

DNA'nın keşfinden itibaren, genom üzerinde hedefe özgü düzenlemeler yapabilmeyen olasılıkları düşünülmüştür. Bakteri ve maya gibi organizmalarda doğal DNA onarım yolları ve DNA rekombinasyon mekanizmaları üzerine yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar, hücrelerin ölümcül çift sarmallı DNA kırıklarını (DSB'ler) onarmak için kullandığı endojen mekanizmaları olduğunu kanıtlamıştır(43). Son yıllarda ortaya çıkan üç büyük genom mühendisliği teknolojisi ile farklı tür organizmalara ait genlerin hedeflenen bölgelerine etkili bir şekilde düzenleme yapılması mümkün hale gelmiştir(44).

Çinko Parmak Nükleaz (ZFN), Transkripsiyon Aktivatörü Benzeri Ektör Nükleaz (TALEN) ve Kümelenmiş Düzenli Aralıklı Kısa Palindromik Tekrarlar (CRISPR)/CRISPR ilişkili Cas9 stratejilerine dayanan çeşitli genom düzenleme yaklaşımları, belirli gen manipülasyonlarını hassas bir şekilde gerçekleştirmek için ek yetenekler sağlamıştır. Bu stratejiler, genomun hedeflenen bölgesinde çift sarmallı kırık (DSB) oluşturmak için farklı mekanizmalar kullanır. ZFN ve TALEN dizi spesifikliğini sağlamak için protein-DNA etkileşimlerini, CRISPR ise RNA/DNA hedeflemesini içermektedir. Her üç metodoloji de daha sonra etkili ve kalıcı mutajenik sonuçlar elde etmek için ortak doğal onarım süreçlerini devreye sokar(44)(45).



Şekil 5. ZFN, TALEN ve CRISPR teknolojilerine ait genom hedefleme sistemlerinin gösterimi; A) ZFN'ler (Çinko Parmak Nükleazları) ile hedefleme, B)TALEN'ler ile hedefleme, C) CRISPR/Cas9 ile hedefleme (45)

2.3.1. Çinko Parmak Nükleazlar (ZFN'ler)

ZFN'ler, doğal transkripsiyon faktörlerinden elde edilen DNA bağlayıcı modüllerin, Tip IIS restriksiyon enzimi FokI'nin nükleaz bölgesiyle birleştirilmesiyle oluşur. Çinko parmak proteinleri, çinko parmak DNA bağlayıcı alanlarını FokI endonükleazının kesme alanıyla birleştirir. FokI, DNA'yı kesmek için dimerize olmalıdır. Bu sebeple tek bir alanı hedeflemek için iki ZFN molekülüne ihtiyaç vardır(46). İki çinko parmak proteini, yakın zıt iplikli DNA dizilerini bağlayarak işlevsel bir dimer oluşturur(47). ZFN'ler etkili genom düzenleme ajanları olsalar da belirli bir DNA dizisini hedeflemek için bu tür proteinlerin tasarlanmasındaki zorluklar yöntemin geniş çapta kabul görmemesine sebep olmuştur(43).

2.3.2. Transkripsiyon Aktivatör Benzeri Efektör Nükleazlar (TALEN'ler)

TALEN'ler, TALE olarak bilinen transkripsiyon aktivatörü benzeri efektörlerden elde edilen DNA bağlanma domaini ile FokI endonükleazlarının katalitik bölgesinin

birleştirilmesinden oluşturulmuştur(47). TAL efektör nükleazları (TALEN'ler) üretmek ZFN'lere göre daha kolaydır ancak, proteini tasarlama, sentezleme ve doğrulamadaki zorluklar bu genom düzenleme stratejisinin de ZFN gibi nükleazların rutin kullanımı için kabul görmesine engel olmuştur(43).

Bu yöntemlerin her ikisi de bir proteinin hedeflenmiş bir DNA dizisi ile etkileşime girme yeteneğine dayanmaktadır. Bu sebeple araştırmacılar ilgilenilen DNA dizilerine bağlanabilmeyi kolaylaştıran yeni strateji arayışlarına devam etmişlerdir. ZFN ve TALEN gibi gen düzeltme teknolojilerine kıyasla; CRISPR Cas9, kullanım kolaylığı, basit tasarımı, düşük maliyeti ve yüksek verimliliği ile öne çıkmaktadır(43)(48).

2.3.3. CRISPR-Cas9 Teknolojisi

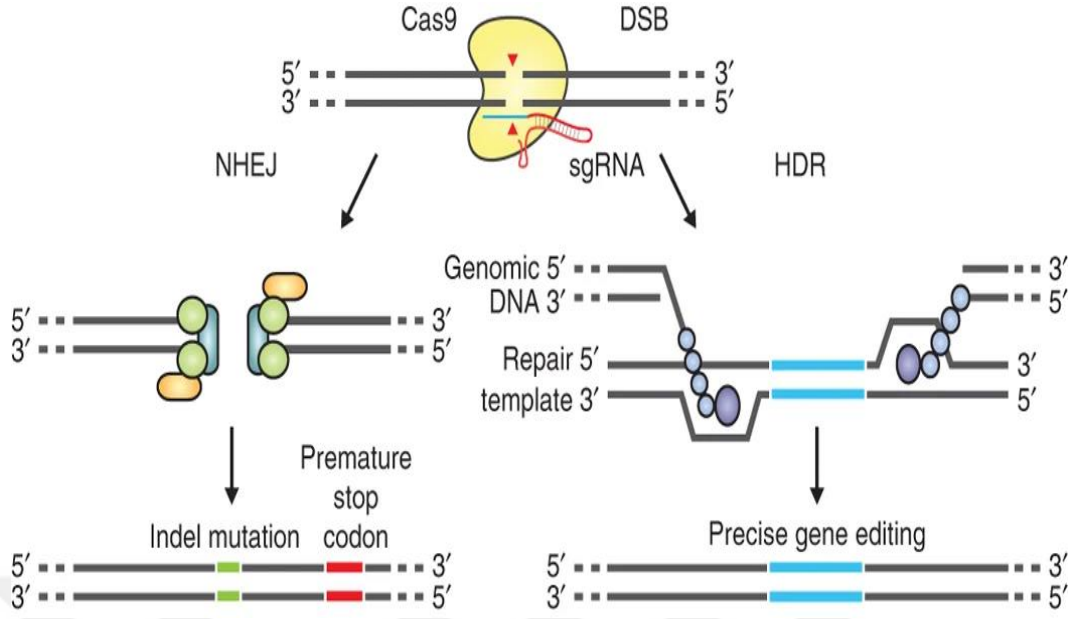
CRISPR-Cas9 sistemi, bakterilerin virüslere karşı geliştirdiği doğal bağışıklık mekanizmasından türetilmiş bir gen düzenleme teknolojisidir. 1980'li yıllarda araştırmacılar bakterilerin genomlarında tekrar eden kısa DNA dizileri tespit etmişlerdir. 2000'li yıllarda devam eden farklı çalışmalar ile işlevi bilinmeyen bu dizilerin, bakterilerin daha önce karşılaştığı virüslerden edindiği DNA parçalarını içerdiği ve bir bağışıklık hafızası oluşturduğu keşfedilmiştir. 2012 yılında Jennifer Doudna ve Emmanuelle Charpentier, *Streptococcus pyogenes* bakterisinden elde ettikleri Cas9 (SpyCas9) proteini ile bu sistemi laboratuvar ortamında hedef DNA'yı kesebilecek şekilde yeniden yapılandırmışlardır. CRISPR sistemleri altı tipe ayrılır; Bunlarından Tip II sisteminde hedef DNA'nın kesilmesi için yalnızca Cas9 proteini yeterli olmaktadır. CRISPR/Cas9 sistemi crRNA ve tracrRNA birleşimi olan bir rehber RNA (gRNA) ve Cas9 isimli bir endonükleaz ile iki bileşenden oluşmaktadır. crRNA, hedef DNA dizisini tanıyan özel bir diziyeye sahiptir, tracrRNA ise Cas9 proteiniyle etkileşime girerek CRISPR/Cas9 sistemini aktive etmekle görevlidir. Laboratuvar koşullarında bu iki RNA birleştirilerek sgRNA'yı (single guide RNA) oluşturur. Üretilen sgRNA, hedef DNA dizisini tanırdan PAM dizisinin (NGG gibi) varlığına bağlı olarak gRNA hedef DNA ile eşleşir ve sonucunda bir R-loop oluşturur. Cas9 proteini diziyeye bağlanır, aktivasyonunu sağlamak için şekil değiştirir ve HNH ve RuvC nükleaz bölgeleri aracılığıyla PAM dizisinin üç baz çifti yukarısından iki zinciri de keser ve çift zincirli kırık oluşturur(49).

Kesim işlemi gerçekleştikten sonra hücre, bu kırığı yüksek hata riski olan homolog olmayan uç birleştirme yöntemi (NHEJ) ya da bir kalıp dizi kullanarak homoloji yönlendirmeli onarım (HDR) mekanizması yolu ile tamir eder(47)(50).

2.3.3.1. Tamir Mekanizmaları

Çift zincirli DNA kırıkları birbirinden farklı birkaç onarım mekanizmasıyla giderilebilmektedir. CRISPR-Cas9 teknolojisiyle oluşturulan DNA kırıkları için homolog olmayan uç birleştirme veya homoloji yönlendirmeli onarım mekanizmaları kullanılmaktadır. NHEJ, dışarıdan kalıp olarak kullanılmak üzere homolog DNA gerektirmeden kırık DNA parçalarını enzimatik işlemlerle birleştiren ve rastgele indel mutasyonlarına sebep olan yüksek hata oranlı bir tamir yoludur. Çerçeve kayması mutasyonları veya erken durma kodonu oluşumu gibi sonuçlar doğurur bu yüzden genin işlevini kaybetmesiyle sonuçlanabilir. Hataya çok yüksek eğilim göstermesine rağmen bütün hücre döngüsünde görev almaktadır(51).

HDR, eklenen homolog DNA kalıpları ile düzenlemek istenen bölgedeki genetik değişikliklerin yüksek hassasiyet ile hedefe eklenmesini sağlar. Hücre döngüsünde S fazının geç evreleri ve G2 fazında yüksek aktiflik göstermektedir. Laboratuvar ortamında genomik knockout oluşturulması için yapılan çalışmalarda tamir mekanizması olarak NHEJ onarım yolu kullanılmaktadır. Bu mekanizma ile onarılan DNA kırığı bölgesinde insersiyon ve delesyonlar (INDEL) oluşur ve bu durum hedef genin inaktivasyonuna sebep olmaktadır(45)(52).



Şekil 6. CRISPR-Cas9 teknolojisi ile oluşturulmuş çift zincir kırıklarının (DSB) homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) ve homoloji yönlendirmeli onarım (HDR) tamir mekanizmaları ile onarımına ait gösterim (53)

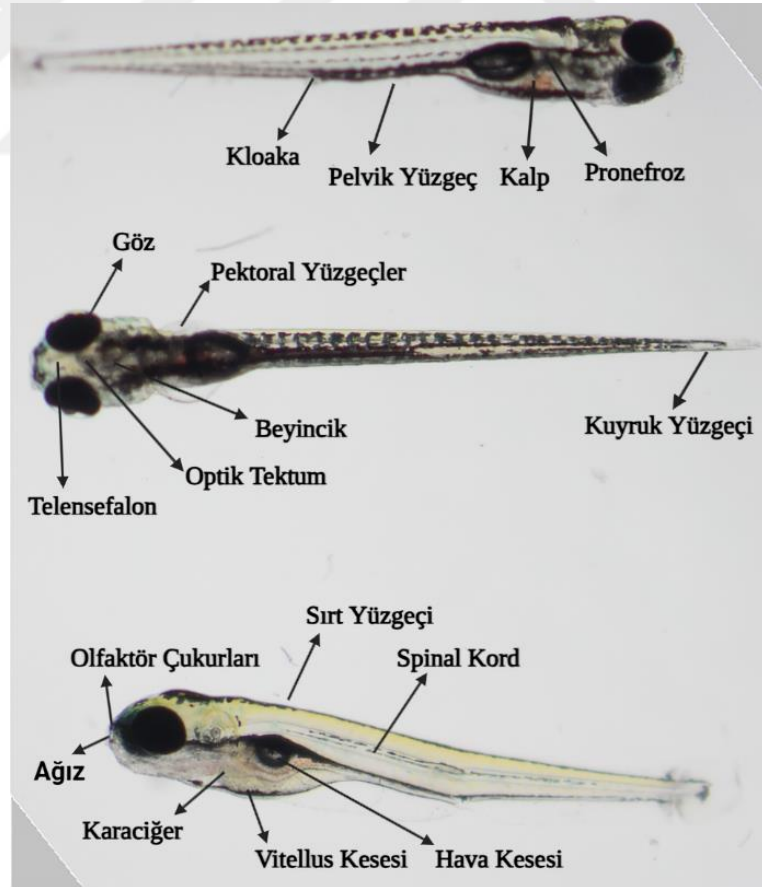
CRISPR-Cas9 teknolojisini diğer genom düzenleme teknolojileri ile karşılaştırdığımızda hedef DNA'yı protein yapılarla değil, RNA rehberliğiyle tanıyabilmektedir. Bu avantaj sistemi hızlı, kolay ve düşük maliyetli bir hale getirir. Genlerin fonksiyonel özelliklerini anlamak için yapılan araştırmalar, kalıtsal hastalıkların tedavisi, kanser terapileri ve tarım gibi alanlarında kullanılabilir olmasıyla öne çıkar ancak off-target etkiler, immün yanıt ve toksik etki gibi sınırlamalar bulundurmaktadır(54)(55).

CRISPR teknolojisindeki ilerlemeler, zebra balığında birçok geni aynı anda hedef olarak mozaik ya da kalıcı mutant zebra balığı hatlarının üretilmesini mümkün kılmıştır(55). Mikroenjeksiyon gibi yöntemlerin fenotip üzerinde yapay etki oluşturabileceği göz önünde bulundurularak, kullanılan CRISPR yöntemlerinin dikkatli bir şekilde analiz edilmesi gerekmektedir(56)(57). Başarılı bir gen nakavtını fenotip ve genotipte doğru bir şekilde inceleyebilmek için Cas9 proteininin hedef bölgeye özgü bir kesim yapması, hedef dışı etkilerin azaltılması ve küçük mutasyonların doğru tespit edilmesi gerekmektedir. Dizileme yöntemleri veya doğrulama analizleri için kullanılan laboratuvar yöntemleri bu amaç doğrultusunda kullanılabilir(58). Ayrıca gRNA'nın kesim veriminin tahmini ve hedef dışı

bölgelerin saptanması için tasarlanmış veri tabanları ile biyoinformatik analizler gerçekleştirilebilmektedir(59).

2.4. Zebra Balığı'nın Model Organizma Olarak Kullanılması

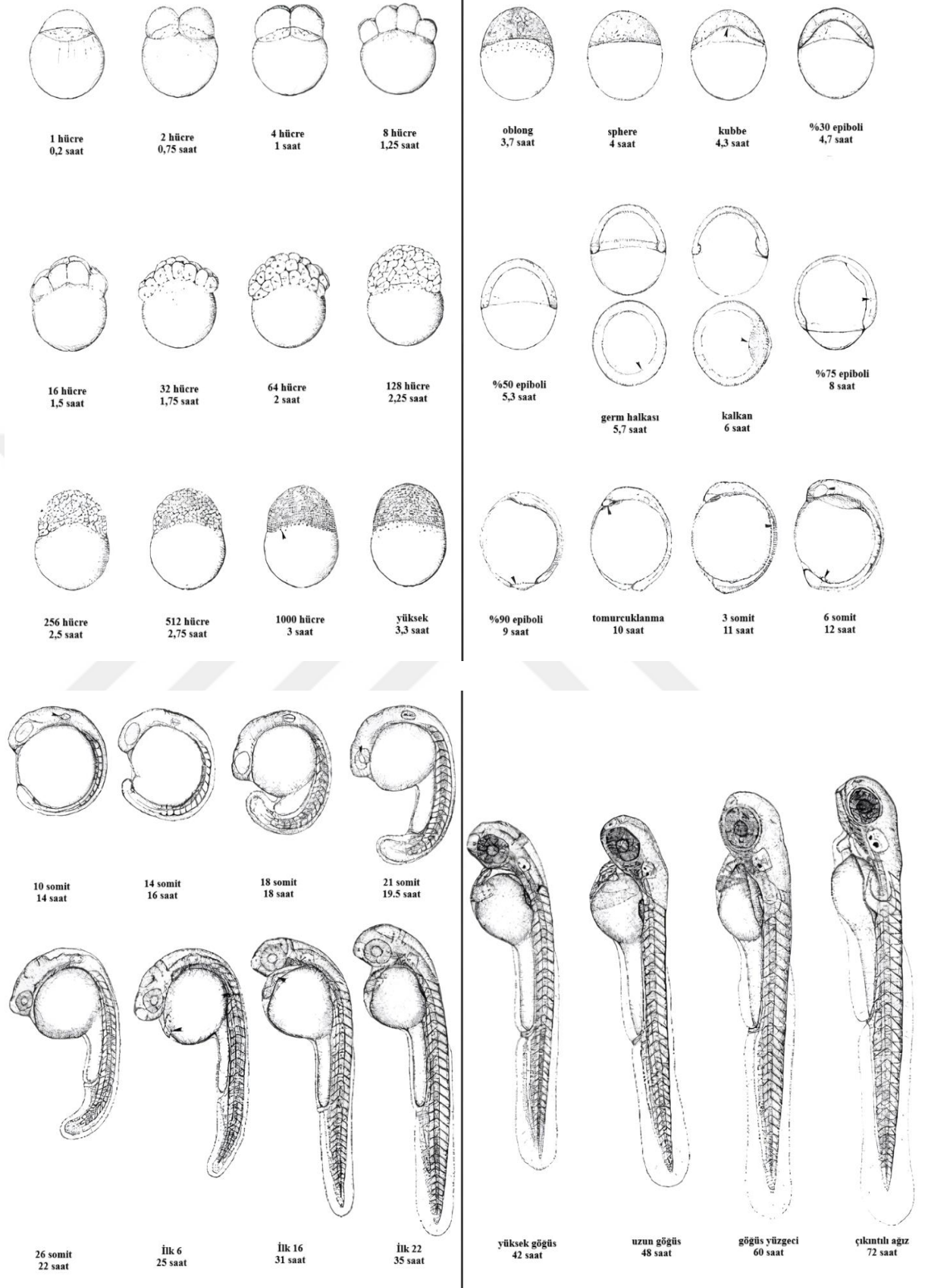
Zebra balığı (*Danio rerio*), Cyprinidae familyasına ait küçük ve kemikli bir balık türüdür, boyları 2,5 ila 4 santimetre uzunluğuna ulaşır. Bu canlılar ağırlıklı olarak böceklerden ve zooplanktonlardan oluşan hepçil bir beslenme düzenine sahiptirler. Normal şartlarda esas olarak Güney Asya'nın Himalaya bölgesinde yayılım gösterirler ve genellikle tatlı su habitatlarını tercih ettikleri bilinmektedir. Laboratuvar ortamı gibi koşulların optimize edildiği durumlarda ortalama yaşam süreleri yaklaşık 42 aydır. Zebra balıklarını ilk kez 19. yüzyılda Francis Hamilton tanımlamıştır fakat model organizma olarak bilimsel alanda yaygın kullanımları 1960'lı yıllardan sonra başlamıştır(60).



Şekil 7. Fertilizasyondan 120 saat sonra zebra balığı larvalarının morfolojisi

Zebra balıkları, beyin gelişimi ve fonksiyonunun analizindeki faydalar sebebiyle değerli bir model sistem olarak kabul edilmektedir. Basit omurgalılar olarak filogenetik ağaçta insanlar ile nematodlar (*Caenorhabditis elegans*) veya meyve sineklerinden (*Drosophila melanogaster*) daha yakındırlar. Dış ortamda gelişen çok sayıda embriyo elde edilmesi ve hızlı jenerasyon süreleri bu canlıyı cazip bir genetik ve moleküler deneysel model haline getirmiştir. Küçük boyutu ve düşük bakım maliyeti, büyük kolonilerin yetiştirilmesini kolaylaştırır. Bu avantajlar sayesinde birçok insan hastalığı zebra balığında başarıyla modellenmiştir(61).

Döllenmeyi takiben 72 saat süren embriyonik gelişim evreleri zigot, bölünme, blastula, gastrula, segmentasyon, faringula ve kuluçka dönemleri olarak sınıflandırılmaktadır. Embriyonik gelişim evreleri sonrasında gençlik ve yetişkinlik dönemleri olarak gelişim aşamaları devam etmektedir. Döllenmeden sonraki 72. saat balıkların neredeyse serbest yüzmeye başladığı larva döneminin başlangıcıdır ve 27 gün boyunca bu süreç devam etmektedir. Gelişmekte olan zebra balığı larvası şeffaftır, bu özellik görüntüleme koşullarını iyileştirir ve analizleri kolaylaştırır. Larval beyin, 5. günde telensefalik organizasyon belirtileri gösterir. Larval beyinde erişkin zebra balıklarına özgü tüm ana yapılar bulunur ve optik tektum kortikal tabakalaşma gösterir(62)(38).



Şekil 8. Zebra balığının embriyonik gelişim evreleri(63)

Zebra balığı genomu yaklaşık 1.412 gigabaz (Gb) büyüklüğündedir ve 25 kromozom üzerinde dağılmıştır. Teleosta özgü genom çoğalması olayı nedeniyle zebra balığı genomu, insandan daha fazla sayıda gen içerir. Bu genlerden 26.206 tanesini protein kodlayan genler oluşturmaktadır. Yaklaşık 20.500 insan protein kodlayan geninden %71'inin zebra balığında bir ortoloğu vardır yani bir kopyasını taşır. Bu durum hastalık modellemeleri açısından büyük bir avantaj sağlamaktadır. İnsanlarda hastalık oluşturan genlerin ise %82'si zebra balığında bir ortoloğa sahiptir(11).

Zebra balığı siliyopati mutantları genetik taramalarda bir avantaj olarak genellikle kıvrılmış bir vücut ekseni gibi kolay fark edilen fenotiplere sahiptir. Zebra balıkları embriyonik gelişim dış ortamda gerçekleştiği için bu durum erken gelişimin kolay incelenmesini ve karakterize edilmesini mümkün kılar. Zebra balığında çok sayıda insan hastalıklarına sebep olan çok sayıda mutasyonun modellenmesindeki en önemli sebeplerden biri kolay tanımlanması, incelenmesi ve düşük maliyetle araştırmaların sürdürülebilir olmasıdır. Bu avantajlar sayesinde geniş bir mutant koleksiyonu mevcuttur(34)(64). Zebra balığı genomunu düzenlemek amacıyla TALEN ve CRISPR/Cas9 gibi teknolojilerinin kullanılması da insanlardaki gen mutasyonlarının zebra balığında modellenmesini önemli ölçüde kolaylaştırmıştır(65)(59).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırmanın tipi deneysel niteliktedir.

3.2. Araştırmanın Yeri, Zamanı ve Planı

Araştırma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda, Nisan 2023 - Haziran 2025 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir.

Tablo 1. Araştırma planı

Tarih	Araştırma Planı
Kasım 2022 - Mart 2023	Konu seçimi
	Literatür araştırması
Mart 2023	Etik kurul onayı
Nisan 2023	Tez önerisi sunumu ve kabulü
Mayıs - Eylül 2023	Malzeme alımlarının gerçekleştirilmesi
Ekim 2023 - Kasım 2024	Deneysel aşamaların gerçekleştirilmesi
Kasım 2024 - Mart 2025	Deneysel verilerin analizi
Mart 2025 - Mayıs 2025	Tez yazım aşaması

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları

İndeks hastanın CCDC13 geninde tüm ekzom dizileme sonuçları ile önceliklendirdiğimiz heterozigot missense de novo varyasyonu ve hastanın klinik fenotipindeki bulgular göz önünde bulundurularak CRISPR-Cas9 gen düzenleme teknolojisi ile ccdc13 knockout zebra balığı larvalarında modellenmiş ve deneysel olarak araştırılmıştır.

3.4. Çalışma Materyali

Deneylerde, AB suşu, yabanıl tip (wild type) zebra balığı embriyoları kullanılmıştır.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Çalışmada tanımlanabilen bağımlı, bağımsız ve kontrol değişkenler mevcut değildir.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Akış Şeması



Şekil 9. Araştırmanın akış şeması

3.6.2. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

Tablo 2. Araştırmalar Sırasında Kullanılan Cihazlar

Cihaz Adı	Cihaz Markası	Cihaz Modeli	Kullanım Amacı
Thermal Cyclers	Bio-rad	MJ Mini	PCR reaksiyonlarının kurulması
Mikrosantrifüj	Thermo Scientific	Espresso Personal	Spin-down aşaması
Vorteks	IKA	MS3 Basic	PCR reaksiyon karışımı
Mikroplaka Spektrofotometresi	Thermo Scientific	Multiskan Go	Nükleik asitlerin konsantrasyon ölçümü
Derin dondurucu (-20°C)	Bosch	GSD26N13NE	Örneklerin saklanması
Jel elektroforez sistemi	Thermo Scientific	Easycast B2	Ürünlerin agaroz jelde yürütülmesi
Jel görüntüleme cihazı	Vilber	E-box CX5	Jeldeki ürünlerin görüntülenme
Güç kaynağı	Bio-rad	PowerPac Basic	Ürünlerin jelde yürütülmesi
Mikrodalga fırın	Beko	MD1510	Jel Hazırlanması
Hassas terazi	Precisa	205A SCS	Tartma
Mikroenjeksiyon	World Precision Instruments	PV820/PV830 Pnömatik Picopomp MicroCL17	Hücrelerin içerisine sıvı enjekte edilmesi
Mikropipet çekici	P-97 Flaming/Brown	Sutter Instrument	Mikropipet çekici
qPCR Cihazı	Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System	qPCR çalışmalarının gerçekleştirilmesi
Stereo Microscope	ZEISS	Stemi 305	Zebra balıklarının fenotip analizleri

Tablo 3. Araştırmalar Sırasında Kullanılan Malzemeler

Malzeme Adı	Malzeme Markası	Katalog Numarası	Kullanım Amacı
Q5 DNA polimeraz	New England BioLabs	M0491S	mRNA sentezinde in vitro transkripsiyon için kalıp olarak kullanılacak dizinin PCR yöntemi ile çoğaltılması
Cas9	ThermoScientific	A36496	CRISPR çalışmalarında kullanılan enzim
Phusion DNA polimeraz	New England BioLabs	M0530	gRNA sentezi için kalıp DNA dizisinin birleştirilmesi
Taq DNA Polimeraz	Thermo Scientific	EP0602	PCR reaksiyonu için gerekli enzim
Primer	Bioligo		gRNA tasarımı ve Mutasyon bölgesine spesifik bağlanma
dNTP mix (10mM)	New England BioLabs	N044	Reaksiyon için gerekli dNTP karışımı
10X Buffer	New England BioLabs		Reaksiyon için gerekli tampon

Nükleaz-free water	Thermo Scientific	10977015	Kontaminasyona engel olmak için
PCR tüpleri (0.2 ml)	Isolab	123.01.002	Reaksiyonların kurulacağı tüp
PCR tüpleri (0.5 ml)	Isolab	123.01.005	Sarf Malzeme
1.5 ml mikrosantrifüj tüpü	Greiner	616201	Sarf Malzeme
1000 µl'lik Pipet Ucu	Thermo	94052410	Sarf Malzeme
100 µl'lik Pipet Ucu	Neptune	BT100	Sarf Malzeme
20 µl'lik Pipet Ucu	Greiner	773363	Sarf Malzeme
10 µl'lik Pipet Ucu	Greiner	771288	Sarf Malzeme
Agaroz	Invitrogen	16500-100	Agaroz jel oluşturmak için
Etidyum bromür	Invitrogen	15585-011	DNA çift ipliği arasında ışımaya yapma
100 bp DNA marker	New England BioLabs	N3231S	DNA'nın boyutunun belirlenmesi
Jel Yükleme Boyası	New England BioLabs	B7021S	Jele örnek yüklerken görüntülenmesi
Parafilm	Brand	BR701650	Sarf malzeme
T7 RNA Sentez Kiti	New England BioLabs	E2040S	In vitro transkripsiyon için gerekli kit
PCR Ürünü Temizleme Kiti	Macherey-Nagel	REF 740609.50	PCR ürünlerinin saflaştırılması
RNA Temizleme Kiti	Zymo Research	R1017	IVT sentezlenen RNA'ların saflaştırılması
Go taq qPCR Master Mix	Promega	A6002	Gen ekspresyon analizi
Tricaine Methanesulfonate	Sigma-Aldrich	886-86-2	Balıklarda anestezi ve ötenazi için kullanılan kimyasal madde
Qiazol	Qiagen	79306	RNA izolasyonu için lizis reaktifi
RNeasy Micro Kit	Qiagen	74004	RNA izolasyonu
Proteinase K	Thermo Scientific	25530015	DNA izolasyonu için proteaz enzimi
PFA	Thermo Scientific	416780030	Doku fiksasyonu için gerekli
Tween 20	Sigma-Aldrich	P9416	Whole mount in situ hibridizasyon yöntemi için gerekli
DIG-RNA Etiketleme Karışımı	Sigma-Aldrich	11277073910	RNA probu oluşturmak için
Anti-DIG AP Antikor	Roche	11093274910	DIG etiketli RNA problemlerini tanıyan antikor
EDTA	Amresco	0105	Nükleik asit izolasyonu için
Isopropanol	Sigma-Aldrich	1.09634.2511	Nükleik asit izolasyonu için
Sodium Acetate	Merck	127-09-3	Nükleik asit izolasyonu için
96 Well Light Cycler	Roche	04729692001	QPCR için kullanılacak

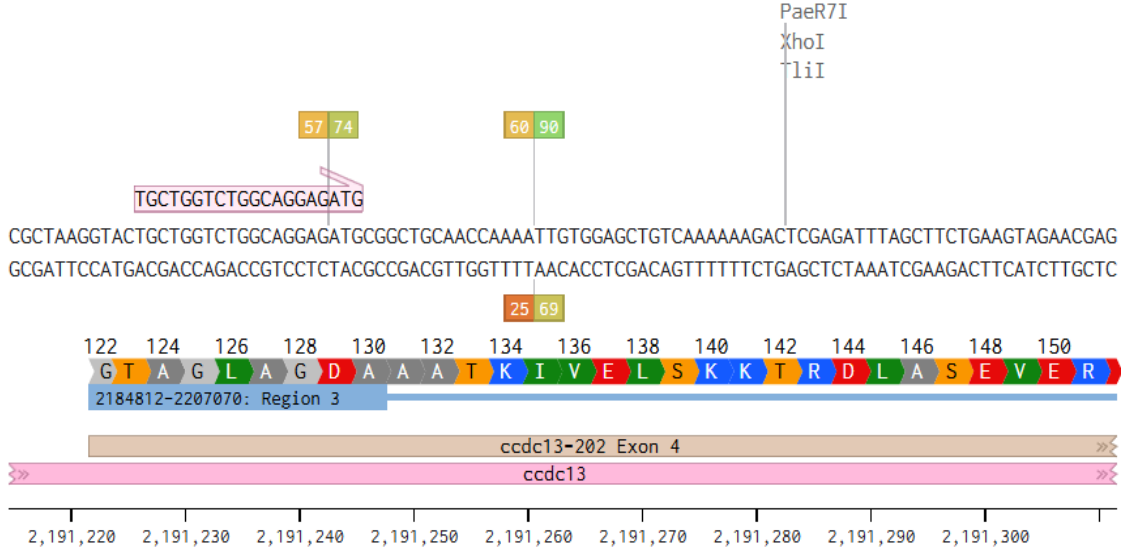
EtOH	Merck	100983	Saflaştırma kiti ve nükleik asit izolasyonları için gerekli
T7 RNA Polimeraz	Thermo Scientific	EP0111	DIG etiketli RNA Probu sentezinde kullanılacak

3.6.3. Veri Tabanlarının İncelenmesi

İndeks hastaya ait CCDC13 genindeki nadir patojenik varyantı değerlendirmek ve daha önce veri tabanlarında bildirilen vakalarla karşılaştırmak amacıyla, araştırma sürecinde ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), DECIPHER (<https://www.deciphergenomics.org/>), GeneMatcher (<https://genematcher.org/>), Varsome (<https://varsome.com/>) ve MyGene (<https://mygene.info/>) gibi veri tabanları tarandı. Elde edilen bilgiler dahilinde nadir patojenik varyasyonları zebra balığı larvalarında modellemek amacıyla uygun varyasyonlar önceliklendirildi ve yöntemler belirlendi.

3.6.4. sgRNA Tasarımı

Zebra balığı ccdc13 geninde işlev kaybı mutasyonu oluşturmak amacıyla, protein sentezinin başlama bölgesine yakın bir alanda delesyon oluşturup bir çerçeve kayması mutasyonu gerçekleştirmek için 55 nükleotidlik sgRNA Benchling (<https://benchling.com>) platformu aracılığıyla dizayn edildi. ccdc13 geninin 4. ekzonundaki 129. amino asidi hedefleyen en yüksek skora sahip gRNA seçildi. Hedef genom olarak zebra balığına ait GRCz11 referans dizisi kullanıldı. İn vitro transkripsiyonu artırmak amacıyla 20 nükleotidlik hedefe özgü dizinin 5' ucuna Guanin nükleotidi eklendi. Kullanılan diziler Tablo 4'te listelenmiştir.



Şekil 10. Hedef bölgenin ve gRNA dizisinin genomik DNA üzerinde gösterimi

Tablo 4. sgRNA sentezi için gerekli primer dizileri

sgRNA	Oligonükleotit dizisi (5'-3')
CCDC13	TTCTAATACGACTCACTATAGTGCTGGTCTGGCAGGAGATGTTTTAGAGCTAGA
Universal primer	aaaagcaccgactcggcgccacttttcaagttgataacggactagcctattttaactgctatttctagctctaaaac

İleri gRNA primer dizisinin 5' ucuna T7 promotör tanıma bölgesi, 3' ucuna ise örtüşen bir dizi eklendi. gRNA, gene özgü diziyi içeren kısım ve rekombinant Cas9 proteinine bağlanan gRNA iskeletini (scaffold) sağlayan kısım olmak üzere bir bütünün iki parçası şeklinde tasarlandı. Her iki dizi de BİOLİGO Araştırma ve Geliştirme A.Ş. (Ankara)'den sipariş edildi. Liyofilize formda teslim alındı. Önce 100 μ M sonra çalışmalarda kullanılmak üzere 10 μ M olacak şekilde nükleaz içermeyen su ile sulandırıldı.

3.6.5. sgRNA Sentezi

sgRNA sentezi için kalıp DNA dizisi, ileri primerin T7 promotörü ve hedeflenen gRNA dizisini, geri primerin ise standart kimerik sgRNA iskeletini birleştiren PCR tabanlı bir yöntemle üretildi. Dizinin 3' ucu, Cas9 bağlanma dizisinin 5' ucuna komplementer olacak şekilde tasarlandı. Bu şekilde iki dizi tek bir çift sarmallı DNA'ya (dsDNA) kolayca dönüştürülebildi. Bu işlem, standart PCR yönteminden farklı olarak, herhangi bir kalıp olarak kullanılacak DNA dizisi eklenmeden gerçekleştirildi. Diziler, Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) kullanılarak daha önceden optimize edilmiş olan protokol izlenerek birleştirildi.

Tablo 5. dsDNA oluşturmak için kullanılan bileşenlerin konsantrasyonları

Bileşenler	Son Konsantrasyon	1 X (50µl)
5X Tampon	1X	10
10 mM dNTPs	0,2 mM	1
Primer karışımı	0.6 pmol/µl	5
Phusion DNA polimeraz	1 U/50 µl	0.5
Nükleaz içermeyen su		33.5
Toplam		50

Tablo 6. ccd13 oligonükleotitleri ile kurulan ısı profili.

Basamaklar	Sıcaklık (°C)	Süre
Başlangıç Denatürasyonu	98	30 saniye
Denatürasyon	98	10 saniye
Primer Bağlanması	60	30 saniye
Zincir Uzaması	72	15 saniye
Son Döngüde Zincir Uzaması	72	10 dakika
Döngü Sayısı	35	

Sentez, MJ Mini Gradient Thermal Cycler (Bio-Rad) cihazında yukarıdaki koşullarda gerçekleştirildi. Ürün, %2 agaroz jel elektroforezi ile doğru boyut ve doğruluk açısından analiz edildi. Elde edilen çift sarmallı oligonükleotidler, NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (MACHEREY-NAGEL) spin-kolon protokolüne göre saflaştırıldı

ve saf suda geri eldesi sağlandı. Elde edilen çift sarmallı oligonükleotidler, son konsantrasyonları 500 ng olacak şekilde sgRNA sentezi için kalıp olarak olarak kullanıldı ve HiScribe™ T7 Quick High Yield RNA Synthesis Kit'i (New England Biolabs) ile in vitro transkripsiyon yöntemi gerçekleştirildi.

Tablo 7. sgRNA için hazırlanan karışım bileşenlerinin konsantrasyonları

Bileşenler	1 X (30µl)
NTP Tamponu	10
T7 RNA polimeraz	2
Kalıp	2
Nükleaz içermeyen su	16
Toplam	30

16 saat 37°C'de inkübe edildi. Bu sürenin ardından her bir tüpe 20 µl nükleaz içermeyen su ve 2 µl DNaz I eklendi. 20 dakika 37°C'de inkübe edildi.

Sentezlenen RNA'lar, RNA Clean and Concentrator-25 Kit (Zymo Research) kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre saflaştırıldı. gRNA'lar %2 agaroz jel elektroforezi ile doğrulanmıştır.

3.6.6. mRNA Sentezi

Zebra balığı larvasında işlevsiz hale getirilmesi hedeflenen Ccdc13 proteininin hücre içerisinde sentezlenmeye devam etmesini sağlamak için in vitro koşullarda mRNA sentezi yapıldı. In vitro transkripsiyon için kalıp DNA olarak kullanılacak dizi PCR yöntemi ile çoğaltıldı.

ZFIN (<https://zfin.org/>) kullanılarak zebra balığı genomunda seçilen transkript dizisi ile bütün ccdc13 mRNA dizisini kapsayabilecek aralıkta ileri ve geri primer dizaynı yapıldı. PCR için yetişkin zebra balığından elde edilen cDNA kalıp olarak kullanıldı. Reaksiyon Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) ile MJ Mini Gradient Thermal Cycler (Bio-Rad) cihazında aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi.

Tablo 8. mRNA sentezi için PCR karışımındaki bileşenlerin konsantrasyonları

Bileşenler	Son Konsantrasyon	1 X (µl)
5X Reaksiyon Tamponu	1X	6
10 mM dNTPs	0,2 mM	0,6
Primer Karışımı 10µM (Forward/Reverse)	0.6 pmol/µl	3
Q5 High Fidelity DNA Polimeraz	0.02 U/µl	0.3
Nükleaz içermeyen su		19,1
Kalıp DNA	500 ng	1
Toplam		30

Tablo 9. mRNA sentezi PCR ısı profili

Basamaklar	Sıcaklık (°C)	Süre
Başlangıç Denatürasyonu	95	5 dakika
Denatürasyon	95	30 saniye
Primer Bağlanması	60	30 saniye
Zincir Uzaması	72	2 dakika
Son Döngüde Zincir Uzaması	72	7 dakika
Döngü Sayısı	35	

PCR ürünü, NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (MACHEREY-NAGEL) spin-kolon protokolüne göre saflaştırıldı ve saf suda geri eldesi sağlandı.

mRNA sentezi için PCR ürünü kalıp olarak kullanıldı ve Invitrogen mMMESSAGE mMACHINE™ T7 Transcription Kit (Thermo Scientific) ile in vitro transkripsiyon adımları gerçekleştirildi. 37°C’de 3 saat inkübe edildi. Bu sürenin ardından her bir tüpe 20 µl nükleaz içermeyen su ve 2 µl DNaz I eklendi. 20 dakika 37°C’de inkübe edildi. Sentezlenen ccdc13 mRNA, Clean and Concentrator-25 Kit (Zymo Research) kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre saflaştırıldı.

Tablo 10. İn vitro transkripsiyon için kullanılan bileşenlerin konsantrasyonları

Bileşenler	Son Konsantrasyon	1X (20µl)
2X NTP/CAP	1X	10
Enzim Karışımı	-	2
Kalıp DNA	200 ng	2
10X Reaksiyon Buffer	1X	2
Nükleaz içermeyen su		4
Toplam		20

3.6.7. Cas9/gRNA Kompleks Hazırlığı

Enjeksiyon için Rekombinant Cas9 proteini (ThermoScientific) ve sentezlenen gRNA karıştırılarak Cas9/sgRNA ribonükleoprotein (RNP) kompleksleri oluşturuldu. Karışıma enjeksiyon kontrolünü sağlamak ve takibini kolaylaştırmak amacıyla %0.05 oranında fenol kırmızısı (Sigma-Aldrich) eklendi.

3.6.8. Mikroenjeksiyon

Enjeksiyon karışımları, sadece Cas9/gRNA ribonükleoproteinini (RNP) içeren *Knockout Grubu*, karıştırılmış (Scrambled) RNA ve Cas9 içeren *Negatif Kontrol Grubu*, işlevsiz hale getirilen proteinin sentezlenmeye devam etmesini sağlamak için gRNA, mRNA ve Cas9 ile oluşturulan *Kurtarma Grubu* ve son olarak gRNA yokluğunda mRNA'nın işlevini incelemek için hazırlanan sadece mRNA ve Cas9 içeren *mRNA Kontrol Grubu* olarak dört farklı deney grubu şeklinde isimlendirildi. Yine her gruba enjeksiyon kontrolünü sağlamak amacıyla %0.05 oranında fenol kırmızısı (Sigma-Aldrich) eklendi.

Hazırlanan karışımlar Flaming/Brown Mikropipet Çekici (Sutter Instrument) ile borosilikat kapiler iğnelere (World Precision Instruments) Microloader uçları (Eppendorf) kullanılarak yüklendi. Deney tüpleri enjeksiyon süresi boyunca buz üzerinde tutuldu.

Mikroenjeksiyon işlemi, bir hücreli evredeki zebra balığı embriyolarına karışımdan her birine yaklaşık 0.5–1 nL Cas9/sgRNA kompleksi enjekte edilerek gerçekleştirildi. İşlem için PV820/PV830 Pnömatik Picopomp MicroCL17 (World Precision Instruments) cihazı kullanıldı.

3.6.9. Genomik DNA İzolasyonu ve Sanger Dizileme

3.6.9.1. Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA izolasyonu, fertilizasyondan sonra 5. gündeki (dpf) zebra balığı larvalarından gerçekleştirildi. Seçilen larvaların her biri 1.5 mL'lik Eppendorf tüplerine yerleştirildi ve üzerlerine 50 µL DNA ekstraksiyon tamponu (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM KCl, %0.3 Tween-20, 1 mM EDTA) eklendi. 98°C'de 10 dakika inkübe edildi. Her tüpe 3 µL Proteinaz K (5 mg/mL)(Sigma-Aldrich) eklendi ve örnekler 55 °C'de gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Enzimi inaktive etmek için tüpler tekrar 98 °C'de 10 dakika inkübe edildi. Ardından örnekler 14.000 rpm'de 8 dakika santrifüj edilerek süpernatantlar yeni tüplere aktarıldı.

Her tüp için 50 µL ddH₂O, 10 µL Sodyum Asetat ve 180 µL İzopropanol eklendi ve vorteks ile homojen hale gelene kadar karıştırıldı. Karışımlar buz üzerinde 10 dakika bekletildi. Sonrasında +4°C'de 14.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar atıldı, oluşan pellet %70 soğuk etanol ile yıkandı ve 15 dakika oda sıcaklığında kurutuldu. Elde edilen DNA'lar 10 µL nükleaz içermeyen su içerisinde çözüldü. Genomik DNA'ların konsantrasyonu, NanoDrop™ (ThermoScientific) cihazı ile ölçüldü.

3.6.9.2. Sanger Dizileme

CRISPR-Cas9 enjeksiyonlarının sonucunda oluşan mutasyonları tam olarak belirlemek amacıyla hedeflenen CCDC13 gen lokusu, Sanger Dizileme için PCR ile çoğaltıldı. İzole edilen genomik DNA, kalıp olarak kullanıldı. Primerler mutasyon bölgesini içerecek şekilde tasarlandı.

Tablo 11. Mutasyon bölgesini çoğaltmak için tasarlanan PCR primerleri

	ccdc13 PCR Primerleri	Ürün Boyutu
Forward (5' - 3')	TGGCAGCAACTGGTTAATCA	454 bp
Reverse (3' - 5')	TGTCGTCTTTCCGGGATTTA	

Tablo 12. ccdc13 mutasyon bölgesi PCR bileşenlerinin konsantrasyonları

Bileşenler	Son Konsantrasyon	1 X (µl)
Reaksiyon Tamponu	1X	3
25 mM MgCl ₂	2,5 mM	3
10 mM dNTPs	0,2 mM	0,6
Primer Karışımı 10µM (Forward/Reverse)	0.5 pmol/µl	3
Taq Polimeraz	1.25 U/µl	0.3
Kalıp DNA	25 ng/ µl	2
Nükleaz içermeyen su		18,1
Toplam		30

PCR, MJ Mini Gradient Thermal Cycler (Bio-Rad) cihazında aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi.

Tablo 13. ccdc13 mutasyon bölgesi PCR ısı profili

Basamaklar	Sıcaklık (°C)	Süre
Başlangıç Denatürasyonu	95	5 dakika
Denatürasyon	95	30 saniye
Primer Bağlanması	55	30 saniye
Zincir Uzaması	72	30 saniye
Son Döngüde Zincir Uzaması	72	5 dakika
Döngü Sayısı	35	

PCR ürünlerinin boyutları ve doğrulukları %2 agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. Örnekler sekanslama için Macrogen Europe Amsterdam şubesine gönderildi. Her örnek için firmadan saflaştırma hizmeti yapılması istendi. Mutasyon bölgelerinin tanınması için ilk olarak Forward primer ile tek yönlü okuma yapıldı. Sonuçlar elektronik posta ile tarafımıza ulaştırıldı. Kromatogram sonuçları ab1, pdf ve metin dosyası formatlarında gönderildi.

3.6.10. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

3.6.10.1. Larvaların Toplanması, Fiksasyonu ve Saklanması

Döllenmeden sonraki 5. gün bütün deney gruplarından qPCR için her tüpe 20 larva WMISH için ise her tüpe 30 larva olacak şekilde 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine yerleştirildi. Toplanan larvalar, yüksek dozda Tricaine (50 mg/mL) ile ötenazi edildi. Fiksasyon için PBS içerisinde %4 paraformaldehit (PFA) ile gece boyunca bekletildi. Fiksasyon sonrasında larvalar sırasıyla %25, %50 ve %75 metanol içeren PBS serilerinden geçirilerek dehidrate edildi ve sonraki kullanıma kadar -20°C'de %100 metanolde saklandı.

3.6.10.2. RNA İzolasyonu

CCDC13 geninin kodlama dizisini elde etmek için yapılan RNA izolasyonunda, daha önce toplanıp deney gruplarına göre tüplere ayrılmış ve ötenazi edilmiş larvalar kullanıldı. RNA ekstraksiyonu için, larvalar RNaz içermeyen tek kullanımlık eziciler ve Vorteks cihazı yardımı ile QIAzol lizis reaktifi (Qiagen) içinde homojenize edildi. Organik ve inorganik fazı birbirinden ayırmak için QIAzol hacminin %20'si (500 µl QIAzol için 100 µl Kloroform) kadar Kloroform karışımının içine eklendi. Tüp birkaç dakika elde çalkalandıktan sonra oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra +4°C'de 10.000 x g ile 10 dakika santrifüj edildi. Üstteki sulu faz, alttaki bulanık tabakaya dokunulmadan dikkatlice çekildi ve yeni bir tüpe aktarıldı. Ardından RNA'nın silika membran üzerinden alkol ile yıkanması esasına dayanan. RNeasy® Micro Kit (Qiagen) kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre adımlar gerçekleştirildi. Toplam RNA konsantrasyonu, NanoDrop™ 2000/C spektrofotometresi ile ölçüldü (Thermo Fisher Scientific).

3.6.10.3. cDNA Sentezi

İzole edilen RNA ürününden 1 µg kullanılarak, RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) ile birinci iplik (first strand) cDNA sentezi gerçekleştirildi. Reaksiyon, MJ Mini Gradient Thermal Cycler (Bio-Rad) cihazında, 42°C’de 60 dakika ve ardından 70°C’de 5 dakika olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA 1:10 oranında seyreltilerek, daha sonraki çalışmalarda kullanıldı.

Tablo 14. cDNA sentezinde kullanılan bileşenlerin miktarı

Bileşenler	1X (20 µl)
Kalıp RNA	2 µl
5X Reaksiyon Tamponu	4 µl
10 mM dNTP Karışımı	2 µl
RiboLock RNase İnhibitörü	1 µl
Reverse Transkriptaz (200 U/µl)	1 µl
Oligo(dT)	1 µl
Nükleaz İçermeyen Su	8 µl
Toplam	20

3.6.11. Kantitatif PCR (QPCR)

Her iki dizi de BİOLİGO Araştırma ve Geliştirme A.Ş. (Ankara) sipariş edildi. Liyofilize formda teslim alındı. Önce 100 µM sonra çalışmalarda kullanılmak üzere 10 µM olacak şekilde nükleaz içermeyen su ile sulandırıldı.

Kantitatif PCR reaksiyonu için GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, A6002) kullanıldı. Kullanılan qPCR primer dizileri Tablo 15’te belirtilmiştir. qPCR reaksiyonlarını gerçekleştirmek için Applied Biosystem 7500 Fast Real-Time PCR cihazı kullanıldı. Gen ekspresyonlarındaki değişim, karşılaştırmalı Ct metodu ile hesaplandı. Sonuçların karşılaştırılmasında normalizasyon sağlamak için kontrol grubu olarak RPL13a geni (housekeeping gen) kullanılmıştır.

Tablo 15. ccdc13 qPCR primerleri

	Ccdc13 qPCR Primerleri	Ürün Boyutu
Forward (5' - 3')	CCGGAGAGACTGGAGGGATT	111 baz çifti
Reverse (3' - 5')	CGTTTTCTTCGAGCTGCAGTG	

Tablo 16. qPCR karışım bileşenlerinin konsantrasyonları

Bileşenler	Son Konsantrasyon	1 X (20µl)
10µM qPCR İleri Primer	0.1 pmol/µl	1
10µM qPCR Geri Primer	0.1 pmol/µl	1
2X QPCR Enzim Karışımı	1X	10
Kalıp cDNA	25 ng/ µl	4
Nükleaz içermeyen su		4
Toplam		20

Tablo 17. qPCR ısı profili

Basamaklar	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
Enzim aktivasyonu	95	2 dakika	1
Denatürasyon	95	15 saniye	40
Primer Bağlanması ve Uzama	60	1 dakika	

3.6.12. Whole Mount In Situ Hibridizasyon

3.6.12.1. DIG-etiketli RNA Prob Sentezi

Hedef genin antisens RNA probunu oluşturmak amacıyla, primerler ccdc13 genindeki mutasyon oluşturulması hedeflenen bölgeyi içerisine alacak aralıkta seçilerek tasarlandı. Kalıp olarak yetişkin zebra balığından elde edilen cDNA kullanıldığı için hedef dizinin 3' ucunda konumlanacak şekilde geri primere (antisens proplar için geri primer, sens proplar için ileri primer) T7 RNA Polimeraz promotörü dahil edildi. Her iki dizi de BİOLİGO Araştırma ve Geliştirme A.Ş. (Ankara)'den sipariş edildi. Liyofilize formda teslim alındı. Önce 100 µM sonra çalışmalarda

kullanılmak üzere 10 µM olacak şekilde nükleaz içermeyen su ile sulandırıldı. PCR yöntemi Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) ile gerçekleştirildi. Elde edilen PCR ürünü, NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (MACHEREY-NAGEL) spin-kolon protokolüne göre saflaştırıldı ve saf suda geri eldesi sağlandı.

Tablo 18. ccdc13 RNA Probu için PCR Primer dizileri

	CCDC13 Prob PCR Primerleri	Ürün Boyutu
Forward (5' - 3')	GGGCTCCAAAGCCAGGAATA	822 baz çifti
Reverse (3' - 5')	AAAGTAATACGACTCACTATAGGGCTGCAGTGCCAGCCTTACT	

Tablo 19. ccdc13 RNA Probu PCR karışımı bileşenlerinin konsantrasyonları

Bileşenler	Son Konsantrasyon	1 X (µl)
Reaksiyon Tamponu	1X	3
25 mM MgCl ₂	2,5 mM	3
10 mM dNTPs	0,2 mM	0,6
10µM Prob Primer Karışımı (Forward/Reverse)	0.5 pmol/µl	3
Taq Polimeraz	1.25 U/µl	0.3
Kalıp DNA	25 ng/ µl	2
Nükleaz içermeyen su		18,1
Toplam		30

PCR ürünü saflaştırıldıktan sonra transkripsiyon için kalıp çift sarmallı dizi olarak kullanıldı. DIG-etiketli antisens RNA probu sentezlemek üzere T7 RNA Polimeraz (Thermo Scientific) ve DIG RNA Etiketleme Karışımı (Sigma-Aldrich) kullanılarak in vitro transkripsiyon adımları gerçekleştirildi.

Tablo 20. ccdc13 RNA Prob sentezi bileşenlerinin konsantrasyonları

Bileşenler	Son Konsantrasyon	1X (20µl)
5X Reaksiyon Tamponu	1X	4
T7 RNA polimeraz	20 U/µl	1
Kalıp DNA	500 ng	5
RiboLock RNase Inhibitörü	20 U/µl	1
10X DIG Etiketleme Karışımı	1X	2
Nükleaz içermeyen su		7
Toplam		20

Tüp içerisinde hazırlanan karışım 37°C’de 3 saat inkübe edildi. Sentezlenen antisense DIG-etiketli RNA Probları, RNA Clean and Concentrator-25 Kit (Zymo Research) kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre saflaştırıldı.

3.6.12.2. Hibridizasyon

Fiksasyon sonrası -20°C’de muhafaza edilen larvaların yeniden hidrasyonu için bu bu sefer %75, %50, %25 metanol içeren PBS serilerinden geçirildi. 20 dakika Proteinaz K (10 µg/mL) ile inkübe edildi sonrasında 2 kere PBT (1X PBS, %0.1 Tween20) ile yıkama yakıldı. Sindirimi durdurmak ve porlar açıldıktan sonra tekrar fiksasyon gerçekleştirmek için PBS içerisinde %4 PFA ile 20 dakika inkübe edildi. Kalan paraformaldehiti gidermek için 1X PBT ile 5 kez, her seferinde 5 dakika süreyle yıkandı. Larvalar, 67°C’de 3 saat boyunca 1 mL Hibridizasyon Karışımı (%50 deiyonize formamid, 5X SSC, %0.1 Tween 20, %0.1 Heparin ve 0.1M Sitrik asit) içerisinde bekletilerek hibridizasyon için hazır hale getirildi. Hibridizasyon aşaması için larvalar, Hibridizasyon Karışımı içinde hazırlanan 1 ng/µL antisense DIG-labeled ccdc13 RNA probu ile gece boyunca inkübe edildi. Tuz konsantrasyonunu düşürmek için larvalar 67°C’de Hibridizasyon Karışımı 1 kere 20 dakika, %50 formamid ve %50 SSCT ile 3 kez 20 dakika, 2X SSCT ile 2 kez 20 dakika, 0.2X SSCT ile 4 kez 30 dakika ve son olarak oda sıcaklığında PBST ile 5 dakika yıkandı.

PBT içinde %5 Koyun Serumu ve 10 mg/mL BSA ile bloklama solüsyonu hazırlandı. Örnekler bloklama solüsyonu ile 2 saat inkübe edildi. Bloklama sonunda antikor inkübasyonu için anti-DIG AP antiserumu PBST içinde 2 mg/mL BSA kullanılarak 1:4000 oranında seyreltilerek hazırlandı. +4°C'de gece boyunca inkübe edildi. Sonraki gün antikor solüsyonu uzaklaştırıldı ve larvalar PBST ile 2 kez durulandı ve ardından 4 kere 30 dakika tekrar PBST ile yıkandı. Yıkamalardan sonra taze NTMT Tamponu (100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, 50 mM MgCl₂ ve %1 Tween 20) hazırlandı ve larvalar bu tamponla 3 kez yıkandı. Son adım olarak, larvalar %0.35 NBT ve BCIP reaktifi ile inkübe edildi ve 37°C'de bekletildi. NTMT Tamponunu uzaklaştırmak için 2 kere PBST yıkaması yapıldı. Görüntüleme için %80 PBS içerisinde gliserol karışımı eklendi. Larvalar çözelti içinde spot plakasına yerleştirildi ve üstten aydınlatılan bir stereo mikroskop kullanılarak reaksiyon izlendi.

3.6.13. Zebra Balığı Bakımı ve Yetiştirilmesi

Zebra balıkları, İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi (IBG) yönergelerine uygun olarak, standart koşullarda, 12 saat aydınlık/12 saat karanlık döngüsünde, 28°C sıcaklıkta, 360 tank kapasiteli bir akvaryum sisteminde yetiştirilmiştir. Bu sistem, IBG Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (IBG-HADYEK) tarafından tanımlanan kurallara göre yürütülmektedir. Balıklar rotifer, taze artemia kültürü ve pul yem içeren standart bir diyetle beslenmektedir

Deneylerde, AB suşu, yabanıl tip (wild type) zebra balığı kullanılmıştır. Mikroenjeksiyonlar, tek hücre evresindeki embriyolara, birden fazla yumurtlamadan elde edilen embriyolar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deneyler için kullanılan embriyolar ve larvalar 5 günlük gelişim sürecine kadar E3 ortamı içinde ve 28°C'lik inkübatörlerde tutuldu.

3.7. Araştırmanın Sınırlılıkları

Veri tabanlarından elde edilen bulgularla ilgili, ccdc13 Knockout zebra balığı larvalarında ilişkilendirilebilecek bir nükleotit değişikliğinin bulunamaması.

3.8. Etik Kurul Onayı

Araştırma için Dokuz Eylöl Üniöersitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 30.04.2025 tarihinde 9772-GOA protokol numarası ve 2025/14-22 karar numarası ile etik kurul onayı alınmıştır. Etik Kurul Onayları Ekler'de verilmiştir.

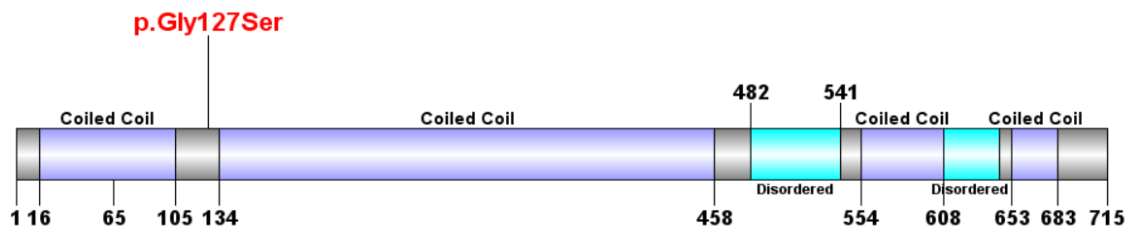


4. BULGULAR

4.1. Veri Tabanlarının İncelenmesi

4.1.1. İnsan CCDC13 Genindeki Varyasyonların Klinik Fenotip Karşılaştırmaları

Veri tabanları, insan CCDC13 genindeki nadir patojenik de novo varyasyonların klinik etkisini değerlendirmek benzer varyasyonları taşıyan yeni vakaları belirlemek ve varyasyonların daha önce bildirilen genotip-fenotip ilişkileriyle uyumunu incelemek için detaylı bir şekilde tarandı. Hastamıza ait tüm ekzom dizileme sonuçları ile önceliklendirdiğimiz CCDC13 geninde bulunan de novo, heterozigot missense varyasyonun, GnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org/>) veri tabanında gerçekleştirdiğimiz incelemeler sonucunda sağlıklı toplumdaki alel frekansının 122/1.614.070 (0.00007559) oranı gibi düşük bir değerde olduğuna ulaşılmıştır. Ayrıca Combined Annotation Dependent Depletion (CADD) skorunun ise 23 olduğu tespit edilmiştir. ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) veri tabanında ise gendeki aynı varyasyona ait sadece bir vaka (NM_144719.4(CCDC13):c.379G>A (p.Gly127Ser)) bildirilmiştir ve klinik önemi belirsiz varyant (VUS) olarak sınıflandırılmıştır. c.379G>A (p.G127S) değişikliği, CCDC13 geninin 4. ekzonunda yer almaktadır. Bu değişiklik, 379. nükleotid pozisyonundaki Guanin bazının Adenin bazına dönüşmesiyle oluşur ve sonucunda 127. amino asitte yer alan glisin yerine serin gelir.



Şekil 11. Hastaya ait mutasyon bölgesinin insan CCDC13 protein domainleri üzerinde gösterimi

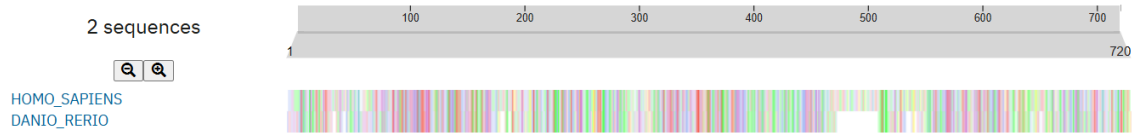
Veri tabanları, CCDC13 genindeki benzer varyasyonları taşıyan yeni vakaları belirlemek, vaka sayısını artırmak ve gen ile fenotip arasındaki ilişkiyi güçlendirmek amacıyla kullanılmıştır. İncelemeler sonucunda önceliklendirilen genin eksikliğinde nörogelişimsel fenotip üzerindeki potansiyel etkileri daha kapsamlı bir şekilde

değerlendirebilmek için zebra balığı larvalarında knockout modeli ile çalışmaya karar verilmiştir.

CCDC13 geninde de novo, heterozigot missense varyasyonu bulunan indeks hastaya ait bulgular epilepsi ve gelişimsel gerilik olarak bildirilmiştir. Deneyler ile elde edilen zebra balığı larvalarına ait fenotipik bulgular hastaya ait klinik bulgular göz önüne alınarak değerlendirilecektir.

4.1.2. İnsan ve Zebra Balığı CCDC13 Protein Dizilerinin Karşılaştırılması

Zebra balığı Ccdc13 proteini ile insan CCDC13 proteini dizi benzerliği analizine tabi tutuldu. Protein dizilerinin hizalama işlemi Ensemble veri tabanından alınan FASTA dizileri kullanılarak Clustal Omega ile gerçekleştirildi. İnsan CCDC13 proteini yaklaşık 715 amino asitten oluşurken zebra balığı Ccdc13 proteini 664 amino asit içerir.



Şekil 12. Clustal Omega ile insan CCDC13 ve zebra balığı Ccdc13 protein dizilerinin hizalaması. 1) Homo sapiens CCDC13 ENSP00000309836, 2) Danio rerio Ccdc13: ENSDARP00000124394

Aynı hizalama işlemi NCBI Protein Blast ile gerçekleştirildi. Ortolog proteinlerin dizi hizalaması sonucunda %42.51 oranında dizilim benzerliği göstermiştir. Bu durum, protein yapısının evrimsel olarak orta düzeyde korunduğunu göstermektedir.

4.2. CCDC13 Geninin, Zebra Balığı Larva Döneminde Ekspresyonu

Zebra balığında ccdc13 geninin ekspresyonlarını motifini incelemek için ZFIN (<https://zfin.org/>) ve Daniocell (<https://daniocell.nichd.nih.gov/>) veri tabanları kullanıldı. Gerçekleştirilen taramalarda ccdc13 geni ekspresyonunun erken larva döneminde başladığı ve giderek arttığı bulgularına ulaştık. Genin eksprese olduğu dokuların gelişim süreçleri tamamlanırken zebra balığı larvalarını 5 güne kadar

büyüterek ekspresyon desenini incelemek amacıyla Whole Mount In Situ Hibridizasyon (WMISH) yöntemi gerçekleştirildi.

WMISH sonuçları, CCDC13 gen ekspresyonunun erken dönemde başladığını ve fertilizasyondan 5 gün sonra görmeyi hedeflediğimiz dokularda net bir ekspresyon deseni göstermiş oldu. En belirgin ve beklenen ekspresyon, Spinal kord, Olfaktör bulbus ve beyin ventrikülü gibi bölgelerde gözlemlendi.



Şekil 13. 5 günlük larvalarda CCDC13 ekspresyonunun Whole Mount In Situ Hidridizasyon ile gösterimi

4.3. CRISPR-Cas9 Teknolojisi Aracılığıyla ccdc13 Knock-Out Larvaların Oluşturulması

Çalışmamızda zebra balığı ccdc13 geninin fenotipteki rolünü daha iyi anlamak üzere deleşyon ve çerçeve kayması mutasyonları oluşturarak işlevsel olmayan bir proteinin sentezlenmesine yol açmak ve ccdc13 ekspresyonu olmayan knockout zebra balığı larvaları (G0) üretmek istedik. Bu hedefe ulaşmak için CRISPR/Cas9 genom düzenleme teknolojisinden yararlandık ve Benchling platformunu kullanarak 5.

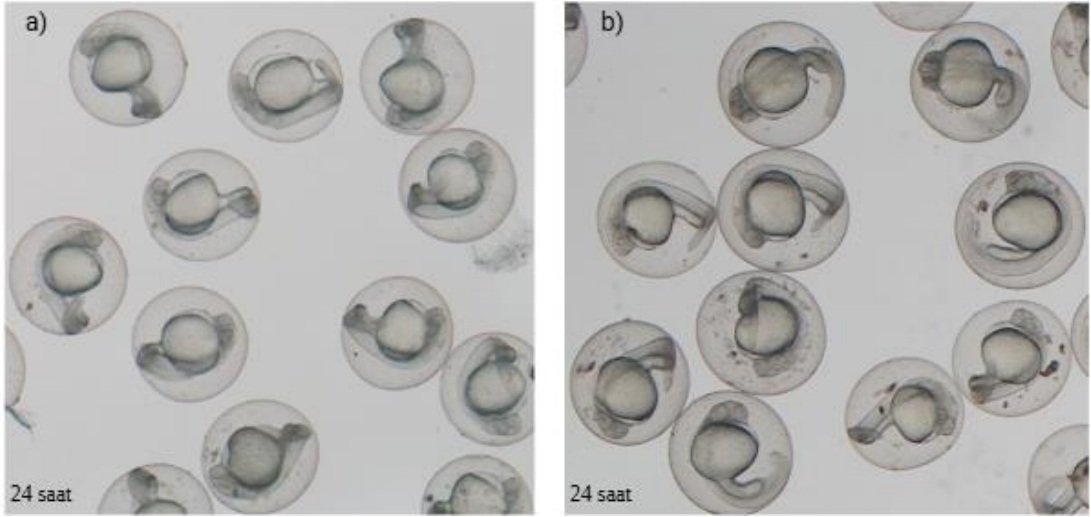
ekzonu hedefleyen bir gRNA tasarladık. Tasarlanan gRNA, Cas9 ile Cas9/sgRNA ribonükleoprotein (RNP) kompleksi oluşturarak tek hücre evresindeki zebra balığı embriyolarına mikroenjeksiyon yöntemi ile enjekte edildi. Negatif Kontrol Grubu karıştırılmış RNA ve Cas9 ile oluşturuldu.

gRNA ve Cas9 içeren knockout deney grubu, karıştırılmış RNA ve Cas9 içeren negatif kontrol deney grubu ve gelişim aşamalarını incelemek, fenotipleri kıyaslayabilmek için rehber olarak izlenecek hiç enjeksiyona maruz kalmamış embriyoların oluşturduğu kontrol deney grubu şeklinde 3 grup oluşturuldu. Aşağıdaki tabloda verilen konsantrasyonlarda hazırlanan karışımlar mikroenjeksiyon yöntemi ile tek hücre aşamasındaki zebra balığı embriyolarının hücre içerisine verildi. Cas9 proteini ile gRNA oranı 2:1 (500ng/μl:250ng/μl) olarak optimize edildi.

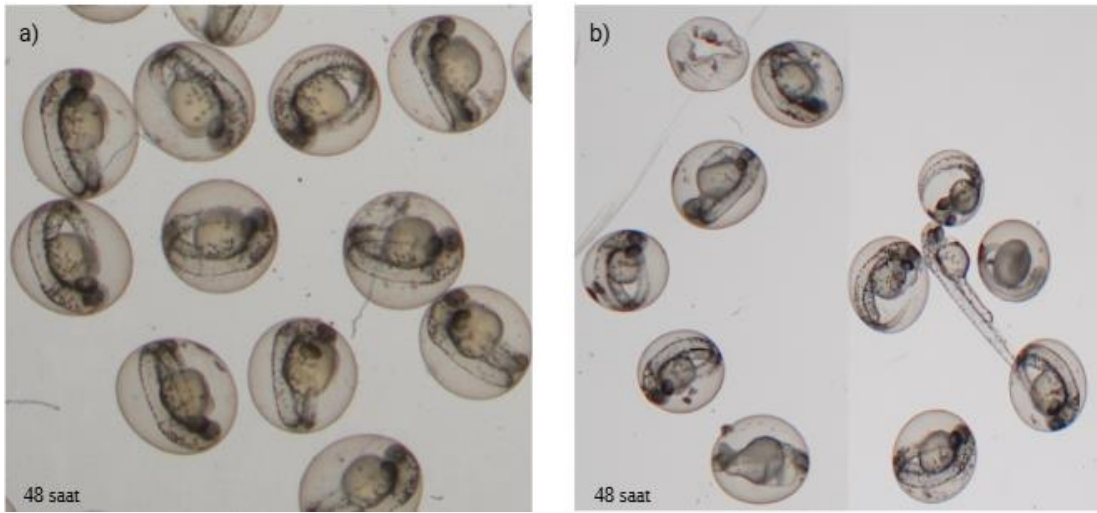
Tablo 21. Enjeksiyonda kullanılan bileşenlerin konsantrasyonları

Bileşenler	Son Konsantrasyon
Cas9	500 ng/μl
gRNA	250 ng/μl
Karıştırılmış RNA	250 ng/μl

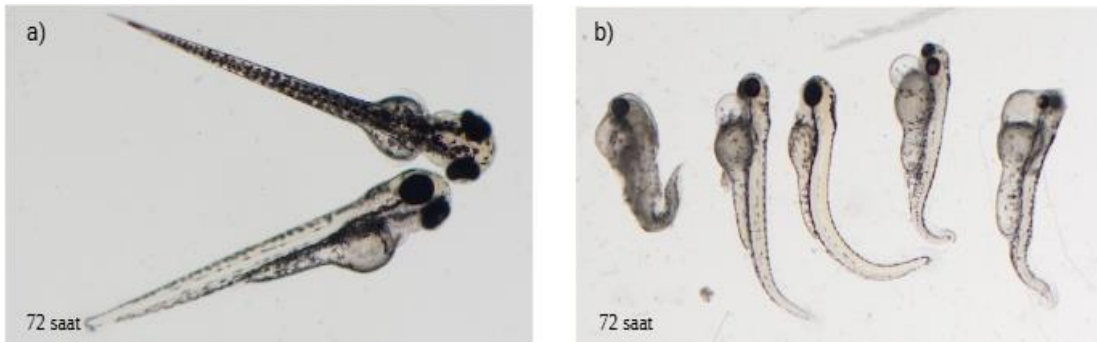
Zebra balığı embriyoları gelişim süreçleri boyunca izlendi. Fenotipler hem klinik bulgular hem de enjeksiyona uğramamış grup fenotipleri göz önünde bulundurularak analiz edildi. Hedeflediğimiz ccdc13 geni erken evrelerde ekspresyon göstermeye başladığı için zebra balığı larvaları fertilizasyondan sonraki 24, 48, 72 saatin sonunda mikroskop altında incelendi.



Şekil 14. 24 saatin sonunda larvaların mikroskop altındaki görüntüleri
a)Kontrol deney grubu b)Knockout deney grubu



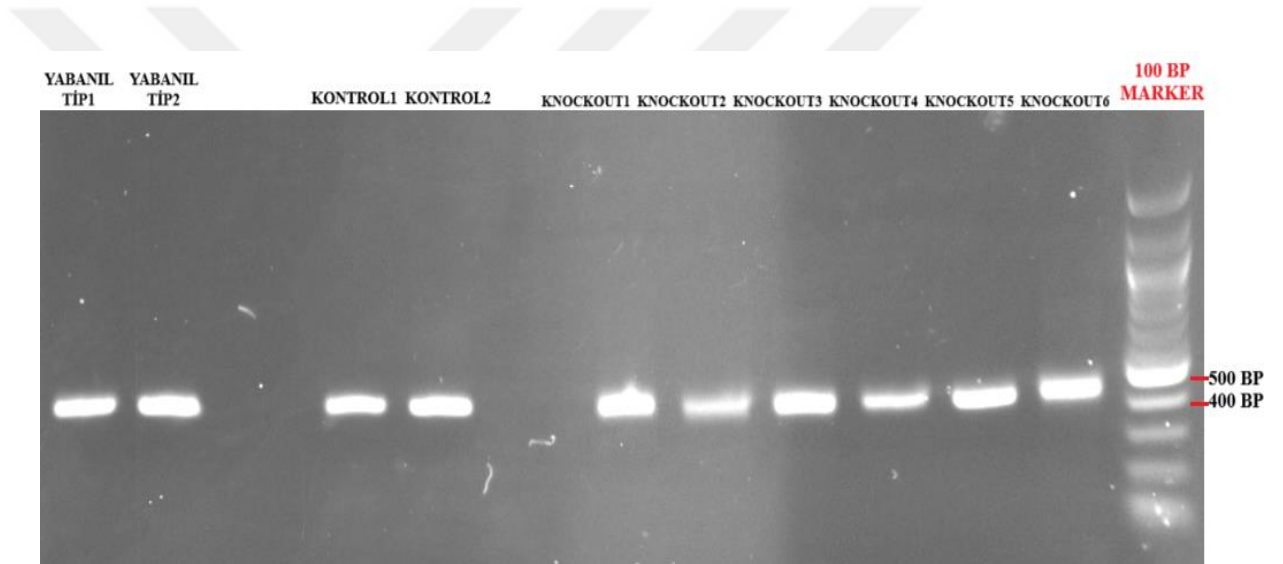
Şekil 15. 48 saatin sonunda larvaların mikroskop altındaki görüntüleri
a)Kontrol deney grubu b)Knockout deney grubu



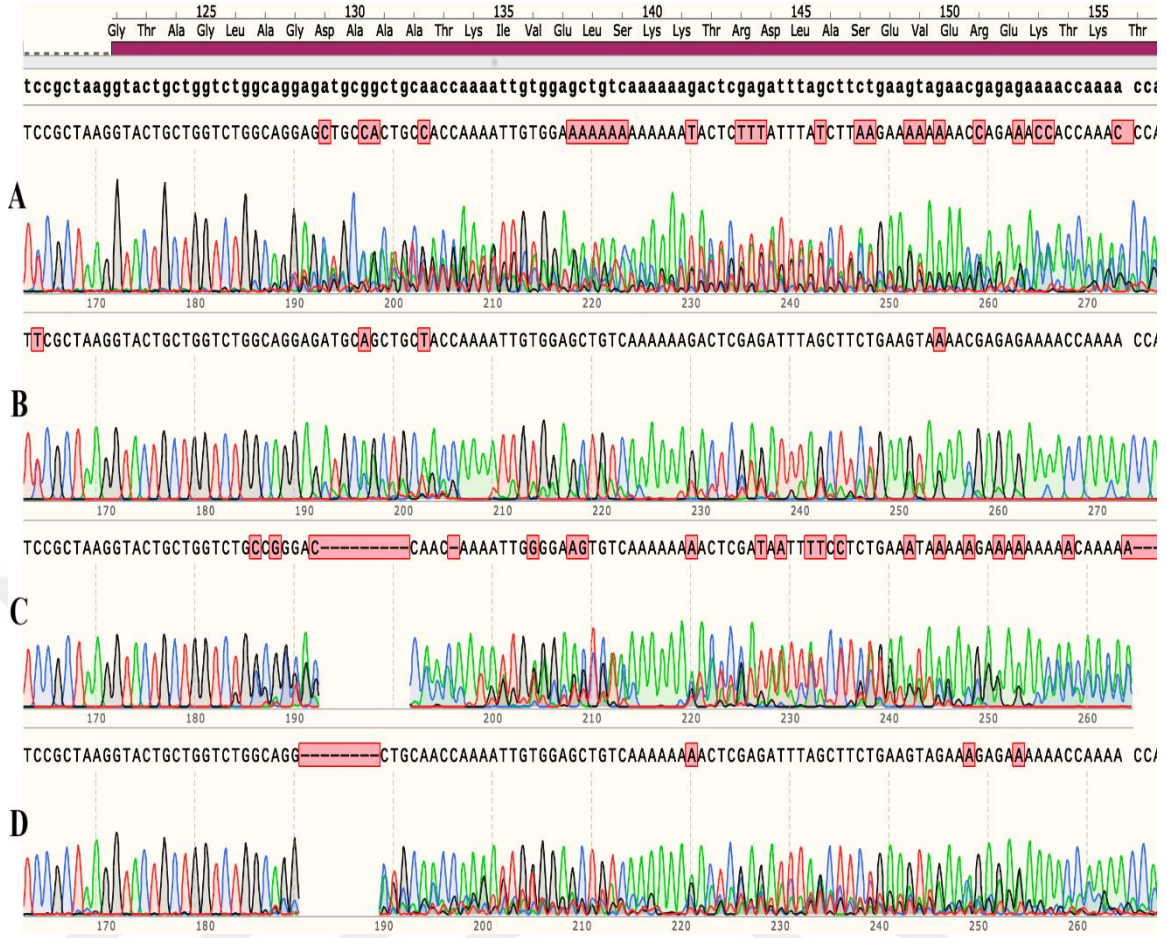
Şekil 16. 72 saatin sonunda larvaların mikroskop altındaki görüntüleri
a)Kontrol deney grubu b)Knockout deney grubu

72 saatin sonunda zebra balığı gelişim evrelerine göre bulunması gereken evrenin gerisinde kalmış ve morfolojik olarak anormal fenotip bulgularına rastladığımız larvalar seçildi ve farklı tüplere yerleştirildi. Bütün larvalar için ötenazi işlemi gerçekleştirildi. Seçilen her larva için farklı tüplerde (Gereç ve Yöntemler bölümünde anlatıldığı şekilde) ayrı ayrı genomik DNA izolasyonu gerçekleştirildi.

Seçtiğimiz larvalardaki fenotip bulgularının hedeflediğimiz bölgedeki mutasyonların etkisinden dolayı mı kaynaklandığını belirlemek amacıyla hedeflenen gen lokusu, mutasyon bölgesini içerecek şekilde tasarlanan primerler ile Sanger Dizileme için PCR ile çoğaltıldı. İzole edilen genomik DNA kalıp olarak kullanıldı.



Şekil 17. Seçilen larvalardan izole edilen genomik DNA'lar ile gerçekleştirilen PCR ürünlerinin jel görüntüsü (Yabanıl Tip grubu; hiç enjeksiyona maruz kalmamış larvalar, Kontrol grubu; Cas9 nükleazının karıştırılmış RNA'lar ile embriyolara verildiği larvalar, Knockout grubu; Cas9 nükleazı ve gRNA'nın birlikte embriyolara verildiği larvalar)



Şekil 18. ccde13 knockout zebra balığı hattında fenotiplerine göre seçilen larvaların Sanger Dizileme sonuçları. Seçilen larvalara ait diziler A, B, C ve D olarak isimlendirilmiştir.

Agaroz jel görüntüsü ve sanger dizileme sonuçlarına ait görsellerde A; knockout6, B; knockout3, C; knockout2, D; knockout1 isimli larvalara karşılık gelmektedir.

Dizileme verilerine göre, CRISPR kesim noktasının, kodlayan bölgede hedeflenmesi nedeniyle indel mutasyonların okuma çerçevesini kaydırarak (çerçeve kayması mutasyonu) protein sentezinde erken bir durdurma kodonu oluşmasına yol açabileceği söylenebilmektedir. A ve B örneklerinde dizileme kalitesi farklılıklarından dolayı delesyonlar gözlemlenememiştir.

C ve D örneklerinde ortak olarak görülen büyük bir delesyon (C-G-C-G-G-A-C dizisinin kaybı) bu iki örneğin benzer yapısal mutasyonlar taşıyan larvalar olduğunu göstermektedir. Bu mutasyonların, genin kodlayan bölgesinde yer aldığı için çerçeve

kaymasına veya amino asit değişimlerine yol açarak proteinin yapısını ve işlevini ciddi şekilde etkilediği düşünölebilmektedir.

4.4. Knockout Zebra Balığı Larvalarının Doku ve Hücrelerinde ccdc13 Gen İfadesinin İncelenmesi

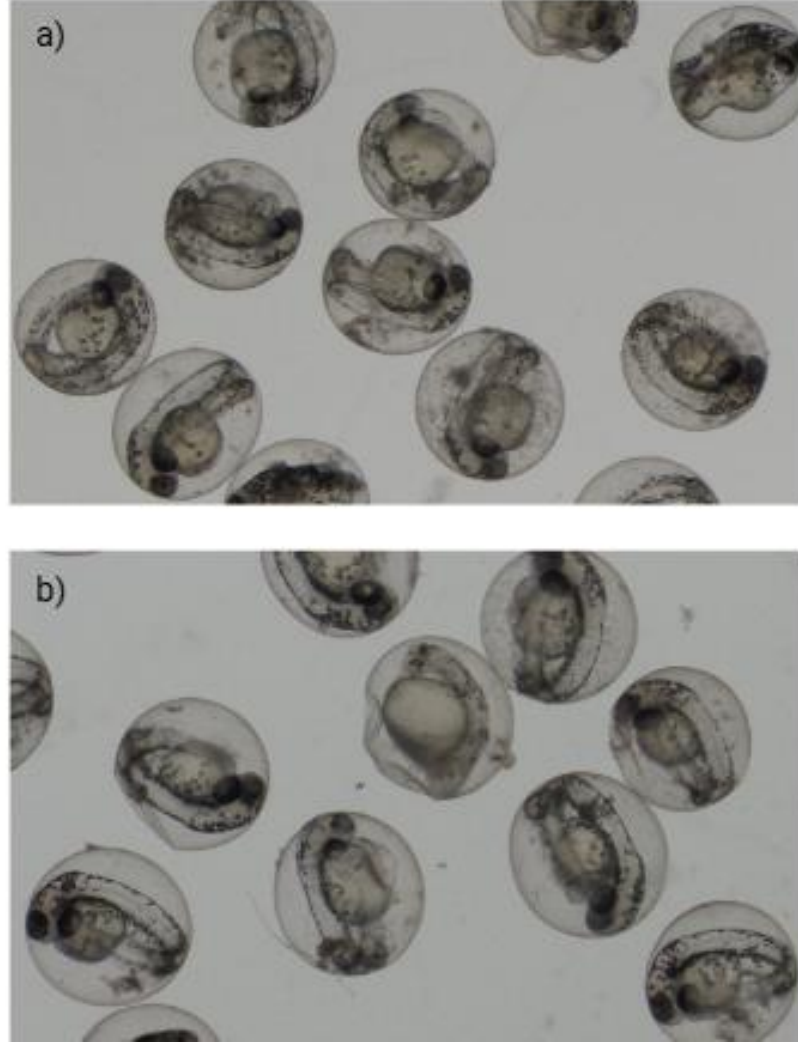
Sanger Dizileme sonuçlarının incelenmesinden sonra mutant larvalarda karşılaştığımız fenotipik bulguların dizileme sonuçlarında gRNA ile hedeflenen bölgedeki mutasyonlardan kaynaklandığı sonucuna varıldı. Genin işlev kaybının kesin olarak teyidi için gen ekspresyonu analizleri gibi destekleyici çalışmalar gerçekleştirilmek üzere mutant zebra balığı hatlarının tekrar oluşturulmasına karar verildi. Knockout deneylerinin karışım konsantrasyonları önceki deney bileşenlerinin konsantrasyonlarıyla aynı olacak şekilde tekrar tasarlandı. Hazırlanan karışımlar mikroenjeksiyon yöntemi ile tek hücre aşamasındaki zebra balığı embriyolarına verildi.

Tablo 22. Enjeksiyonda kullanılan bileşenlerin konsantrasyonları

Bileşenler	Son Konsantrasyon
Cas9	500 ng/μl
gRNA	250 ng/μl
Karıştırılmış RNA	250 ng/μl

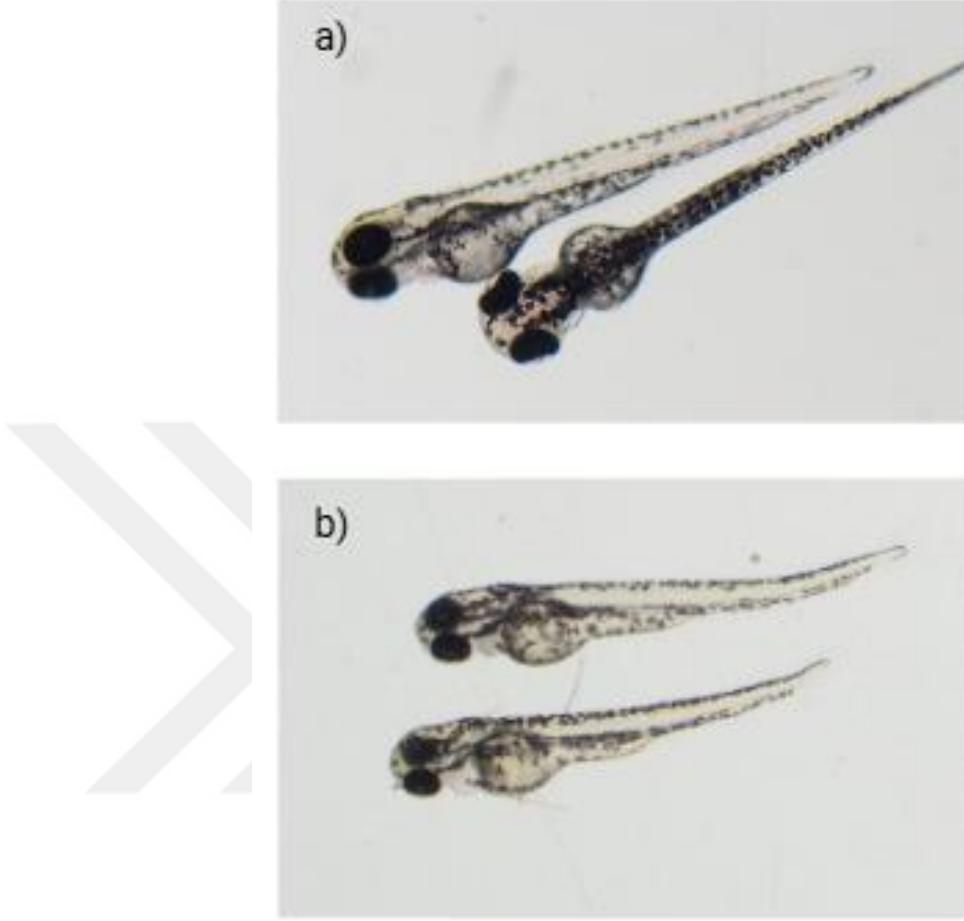
Zebra balığı larvaları tekrar fertilizasyondan sonraki 48, 72 ve 120 saatin sonunda mikroskop altında incelendi.

Aşağıda verilen şekildeki larvaların 48. saatin sonunda henüz koryonlarından çıkmadıkları görüldü. Morfolojilerinde anormallik gözlemlenmedi.



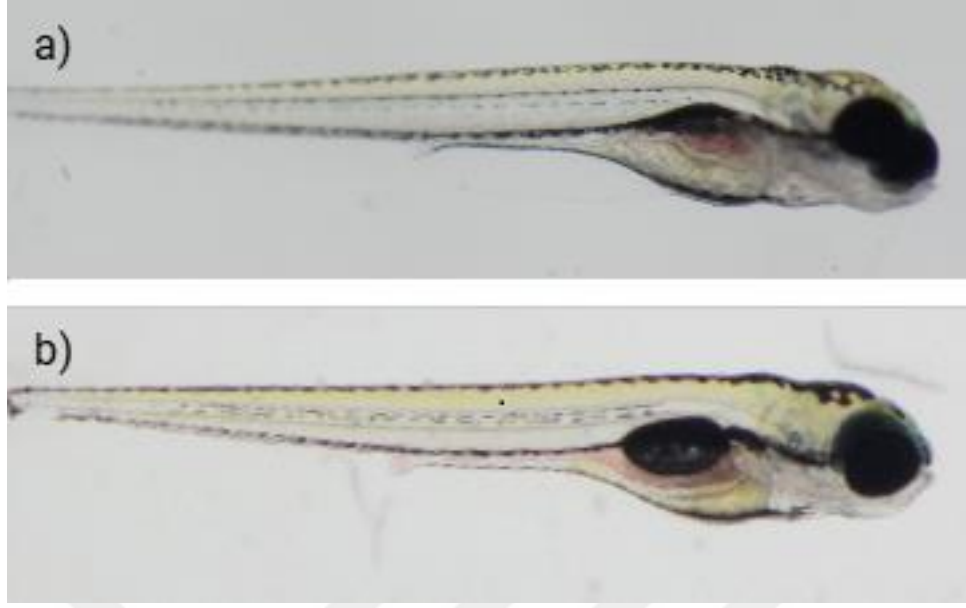
Şekil 19. Fertilizasyondan 48 saat sonra larvaların mikroskop altında görüntüsü
a) Negatif Kontrol Grubu b)Knockout Grubu

Fertilizasyondan 72 saat sonra larvalar mikroskop altında tekrar gözlemlendi ve gelişimlerinde gerilik veya anormal bir fenotip gözlemlenmedi.



Şekil 20. Fertilizasyondan 72 saat sonra larvaların mikroskop altında görüntüsü
a) Negatif Kontrol Grubu b) Knockout gurubu

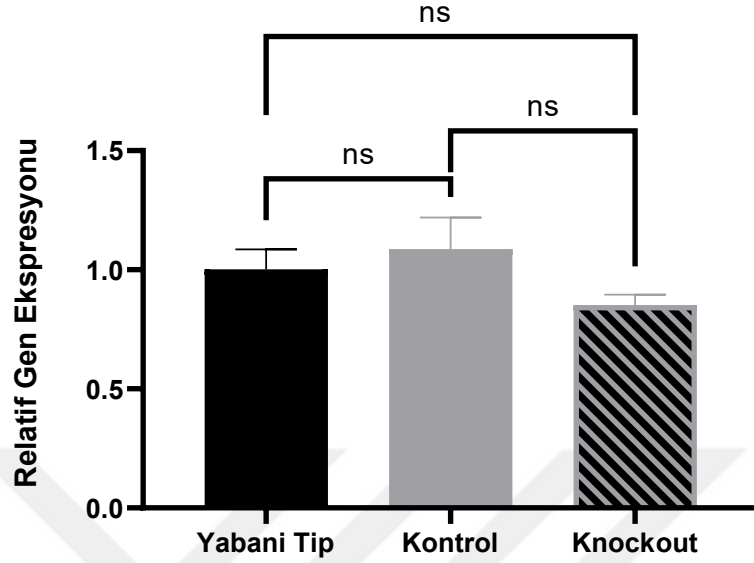
Fertilizasyondan sonraki 120. saatin sonunda, ötenazi işlemi gerçekleştirilmeden önce zebra balığı larvaları mikroskop altında incelendi. Gözlemlenen fenotipler zebra balıklarının literatürdeki gelişim evreleri ile karşılaştırıldı ve gelişim geriliği olmadığına karar verildi. İlk incelemelerde epilepsi benzeri fenotip gözlemlenemedi ayrıca zebra balığı *ccdc13* geninin yoğun olarak eksprese olduğu olfaktör bulbus, beyin ventrikülü ve spinal kord bölgeleri incelendi fakat yabancı tip zebra balığı larvalarından farklı bir görünüm tekrar gözlemlenemedi. Daha detaylı incelemeler için larvalara fiksasyon işlemi uygulandı.



Şekil 21. Fertilizasyondan 120 saat sonra larvaların mikroskop altında görüntüsü
a) Negatif Kontrol Grubu b) Knockout Grubu

G0 zebra balığı embriyoları gelişim süreci boyunca izlendi ve fenotipler indeks hastaya ait klinik bulgular göz önünde bulundurularak analiz edildi. 120 saatin sonunda zebra balığı larvaları ötenazi işlemine tabi tutuldu ve fikse edildi. Gelişim evreleri 5 güne kadar izlenen larvaların fenotiplerinde ve davranış durumlarında beklediğimiz bulgular gözlemlenemedi ancak gen ekspresyonu düzeylerini incelemek üzere larvalar toplandıktan sonra her deney grubu için Kantitatif PCR (QPCR) gerçekleştirildi. Her deney grubu için ayrı izole edilen RNA'lardan sentezlenen cDNA'lar Kantitatif PCR için kalıp dizi olarak kullanıldı.

ccdc13



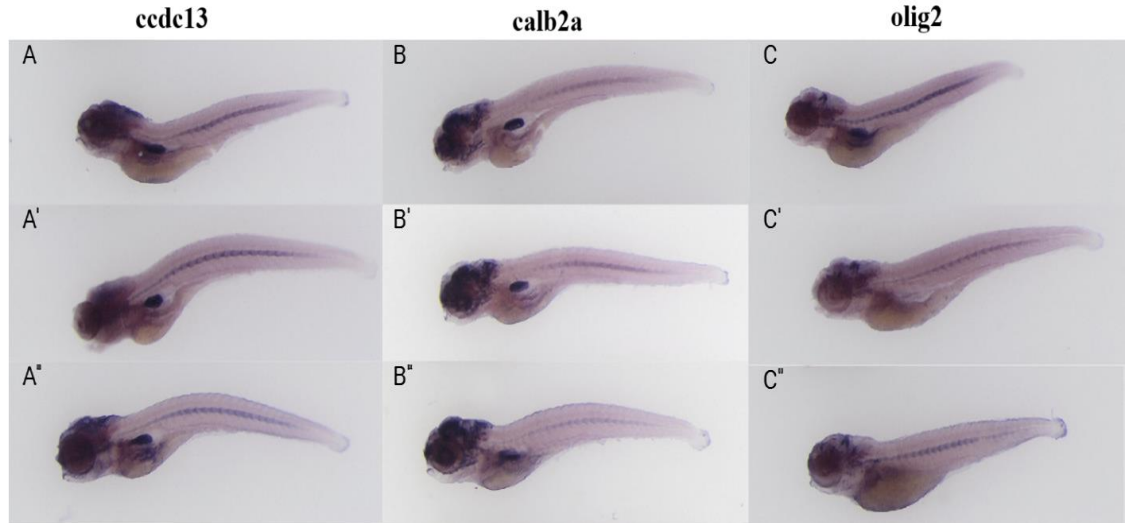
Şekil 22. Deneş gruplarına göre ayrılan larvalarda, *ccdc13* geninin ekspresyon analizi için gerçekleştirilen qPCR doğrulamalarının istatistiksel sonucu. Kontrol grubu karıştırmış RNA ve Cas9 içeren deneş grubunu, Knockout grubu gRNA ve Cas9 içeren deneş grubunu ifade etmektedir. Yabani tip zebra balığı larvalarından oluşan grupta hiç enjeksiyon gerçekleştirilmemiştir. *rpl13* geni evrensel (housekeeping) kontrol geni olarak kullanılmıştır. Tüm istatistiksel analizler One-way ANOVA kullanılarak yapıldı. Ortalama \pm standart sapma ($n = 3$) gösterildi.

Kantitatif PCR ile elde edilen sonuçlarda anlamlı bir sonuç gözlemlenemediği için genin ifade edilmeye devam ettiği sonucuna ulaşıldı. RNA düzeylerinde değişim olmasa bile knockout larvaların hedef bölgelerindeki mutasyonlar sebebiyle proteinin sentezlenemeyebilir olduğu düşünöldü. Bu sebeple *Ccdc13* proteinin eksprese olduğu dokularda gerçekleşen farklılaşmaları gözlemlmek amacıyla Whole Mount In Situ Hibridizasyon yönteminin uygulanmasına karar verildi. Bu yöntem ile fenotipte belirgin farklılar görölmese bile eğer CRISPR/Cas9 düzenlemesi başarılı olduysa mutant zebra balığı larvalarının *Ccdc13* proteinleri işlevsiz bir protein olarak sentezleneceği ve genin eksprese olduğu dokularda daha önce ekspresyon motifini göstermiş olduğumuz sonuçlara göre farklılık göstereceği düşünöldü. Bu amaçla her deneş grubu daha önceden hazırlamış olduğumuz DIG-etiketli *ccdc13* RNA probu ile hibridizasyon işlemine tabi tutuldu. Ayrıca yine *ccdc13* geninin ekspresyon gösterdiği dokularda ortak ekspresyon gösteren genler ile hazırlanmış DIG-etiketli RNA problemleri

da kullanıldı. Bu sayede daha fazla doku üzerinde gözlem yapmaya elverişli bir ortam hazırladık.

Tablo 23. Kullanılan RNA problemleri ve hedefledikleri dokuların isimleri

RNA PROB İSMİ	HEDEF DOKU
ccdc13	Olfaktör bulbus (koku soğancığı), Pronefroz (silli hücreler), Otitik/Yan Çizgi (otic-lüminal bölge), Omurilik (Spinal Kord), Glia hücreleri
calb2a	Beyincik, Kranial Ganglion, Arka Beyin, Nöron, Optik Tektum, Periferik Olfaktör Organı, Farengial Yay 3-7, Retina, Retina İç Nükleer Tabakası, Spinal Kord, Tegmentum, Beyin, Merkezi Sinir Sistemi, Duyusal Nöron
olig2	Oligodendrositler, Beyincik, Beyin Oligodendrositleri



Şekil 23. Dokuları gözlemlemek için WISH yöntemi gerçekleştirilen larvaların görüntüleri; A) ccdc13 RNA probu ile hiç enjeksiyon yapılmamış larvalar, B) calb2a RNA Probu ile hiç enjeksiyon yapılmamış larvalar, C) olig2 RNA Probu ile hiç enjeksiyon yapılmamış larvalar, A') ccdc13 RNA probu ve karıştırılmış RNA kullanılan negatif kontrol deney grubu, B') calb2a RNA probu ve karıştırılmış RNA kullanılan negatif kontrol deney grubu C') olig2 RNA probu ve karıştırılmış RNA kullanılan negatif kontrol deney grubu A'') ccdc13 RNA probu ile Knockout grubu B'') calb2a RNA probu ile Knockout grubu C'') olig2 RNA probu ile Knockout grubu

Bu yöntem ile incelediğimiz dokularda ekspresyon düzeyinde büyük bir farklılık göremediğimiz için Ccdc13 proteininin hala sentezleniyor olduğu sonucuna varıldı. Bu sebeple mikroenjeksiyon ile hücre içerisine verilen karışımın bileşenleri konsantrasyonları değiştirilerek tekrar hazırlandı ve ccdc13 mRNA enjeksiyonu ile gerçekleştirilecek olan kurtarma deneyleri için kullanıldı.

4.5. mRNA'nın Aşırı Ekspresyonu ile Fonksiyonel Kurtarma Deneyleri

Sanger dizileme ile elde ettiğimiz sonuçlarda fenotiplerine göre seçilen ccdc13 knockout larvaların mutasyon bölgeleri gösterilmişti ancak karşılaştığımız fenotiplerin indeller sonucunda oluşan çerçeve kayması mutasyonu sebebi ile işlevini kaybeden Ccdc13 proteininden mi kaynaklanıyor olduğu yoksa oluşan henüz varyantlarını tanımlayamadığımız farklı genlerin ekspresyonlarındaki değişimlerin etkisiyle mi ortaya çıktığını kanıtlamak amacıyla yabani tip zebra balığı ccdc13 mRNA'sı in vitro olarak sentezlenerek enjeksiyon gruplarına dahil edildi.

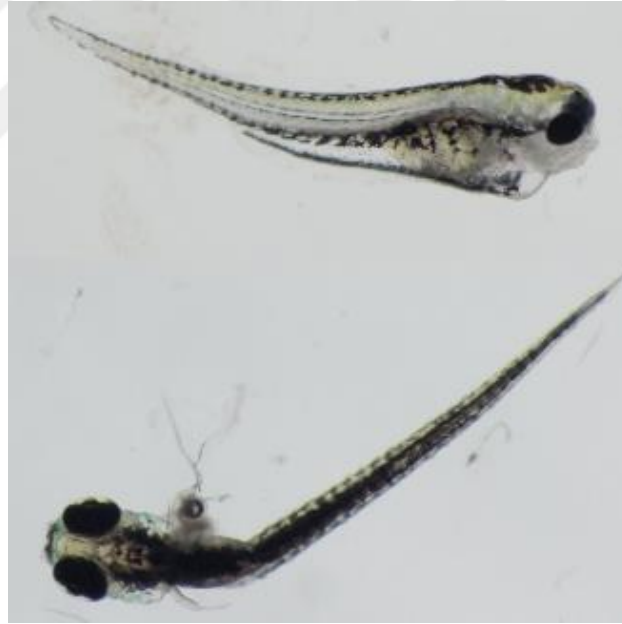
Burada amacımız, gRNA ile hedeflenen bölgenin kesilmesiyle oluşacak mutasyonlar sonucunda işlevsiz hale gelen Ccdc13 proteininin, hücre içine embriyonun tek hücre aşamasında mikroenjeksiyon yöntemi ile verilmiş ccdc13 mRNA'sı ile doğru bir şekilde sentezlenmeye devam etmesini sağlamaktır. Yabani tip mRNA hücre içerisine verildiğinde embriyo gelişimi sırasında eksik olan protein geçici olarak yerine konmuş olur. CRISPR/Cas9 ile oluşturmayı hedeflediğimiz ccdc13 gen mutasyonlarının etkilerini değerlendirmek için kullanılan bu kurtarma deneyi, knockout gruplarında gözlemlenen fenotiplerin spesifik olarak hedeflenen genin fonksiyon kaybından kaynaklandığını doğrulamak amacıyla kullanılan bir yöntemdir. Enjekte edilen mRNA'nın mutant fenotipleri düzelterek, mutasyonların spesifik etkilerini doğrulaması beklenir.

Bu aşamada, bir önceki knockout gruplarında beklediğimiz sonuçlara ulaşamamamızdaki sebebinin konsantrasyonlardan kaynaklanıyor olabileceği düşünüldü. Bu sebeple bütün bileşenler aynı konsantrasyonda olacak şekilde tekrar düzenlendi.

Tablo 24. Kurtarma deneyleri için hazırlanan karışım bileşenlerinin konsantrasyonları

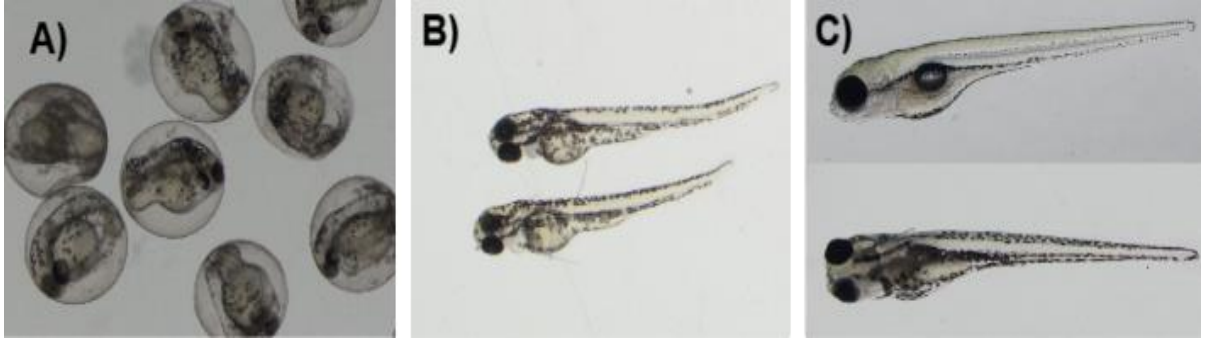
Bileşenler	Son Konsantrasyon
Cas9	500 ng/ μ l
gRNA	500 ng/ μ l
Karıştırılmış RNA	500 ng/ μ l
ccdc13 mRNA	500 ng/ μ l

Zebra balığı larvaları fertilizasyondan sonraki 48, 72 ve 120 saatin sonunda mikroskop altında incelendi. Aşağıda deney gruplarına göre sınıflandırılmış larvaların belirlenen günlere ait gelişim aşamaları mikroskop yardımıyla gösterilmiştir. Yapılan incelemeler ve karşılaştırmalara göre 120. saatin sonunda knockout deney grubundan iki larva hariç (şekil 23.) gözle görülür davranışsal veya gelişimsel olarak anormal bir bulgu gözlemlenemedi.



Şekil 24. Knockout deney grubuna ait anormal fenotip gözlemlenen larvalar

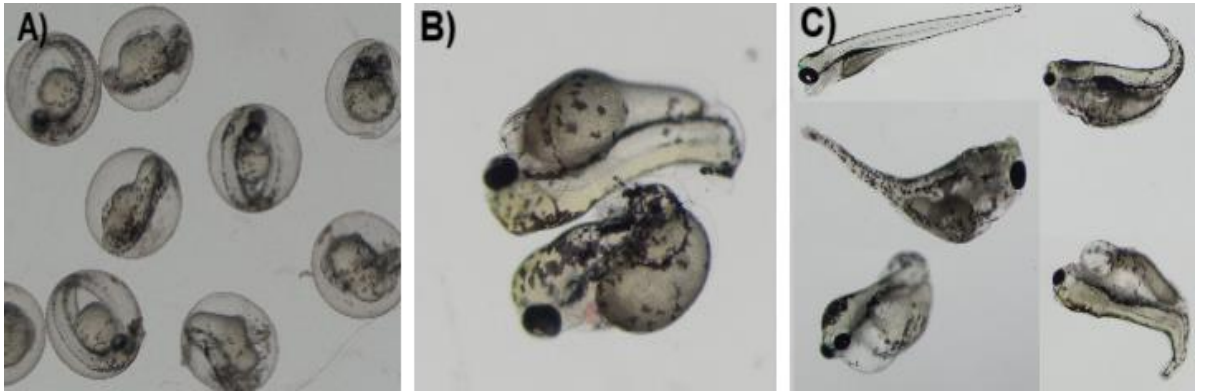
Knockout grubuna ait morfolojilerinde farklılık gözlemlenen 2 larva için gelecek çalışmalara yönelik sanger dizileme analizi yapılmasına karar verildi.



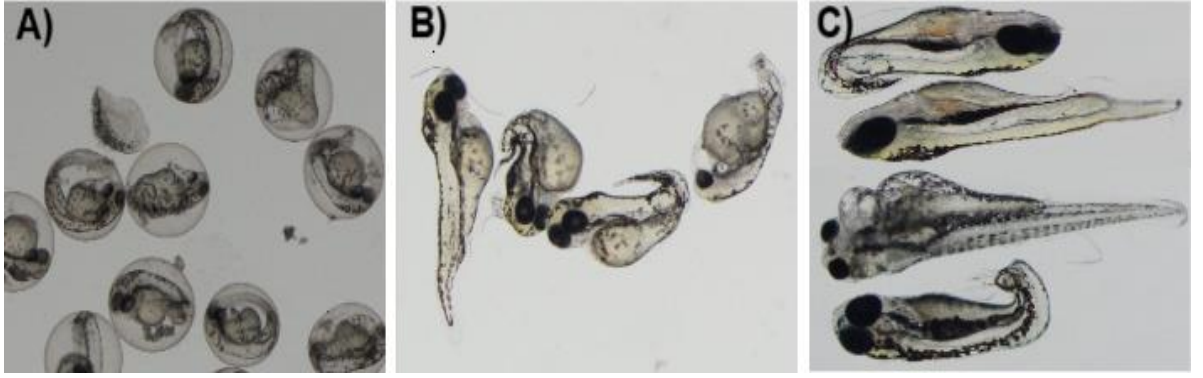
Şekil 25. Karıştırılmış RNA kullanılan negatif kontrol deney grubunun mikroskop altında görüntüleri; A) 48 saat sonunda B) 72 saat sonunda C) 120 saat sonunda



Şekil 26. Knockout deney grubunun mikroskop altında görüntüleri; A) 48 saat sonunda B) 72 saat sonunda C) 120 saat sonunda



Şekil 27. gRNA ve mRNA kullanılan kurtarma deney grubunun mikroskop altında görüntüleri; A) 48 saat sonunda B) 72 saat sonunda C) 120 saat sonunda



Şekil 28. Sadece mRNA kullanılan mRNA kontrol deney grubunun mikroskop altında görüntüleri; A) 48 saat sonunda B) 72 saat sonunda C) 120 saat sonunda

mRNA enjeksiyonu içeren deney gruplarına ait larvaların gelişimsel süreçlerinde ve morfolojilerinde yüksek seviyelerde anormal fenotip bulguları gözlemlendi.

4.6. ccdc13 mRNA Aşırı İfadesinin Gelişim Aşamasındaki Larvalara Etkisi

Kurtarma deneyleri ile oluşturduğumuz 4 zebra balığı hattı 120 saate kadar gelişim süreçleri boyunca mikroskop yardımı ile gözlemlendi. Knockout ve Karıştırılmış RNA kullanılan negatif kontrol gruplarının fenotiplerinde gelişim geriliği, epilepsi veya ccdc13 geninin yüksek seviyelerde ifade edildiği dokuların fenotiplerinde bir farklılık gözlemlenmedi.

Kurtarma grubu ve mRNA için kontrol grubu olan deney grubundaki larvaların davranışsal durumlarında ve fizyolojilerinde ise yüksek seviyelerde gözle görülür anormallikler gözlemlendi. Bu sonuçlara sebep olarak mRNA içeren enjeksiyon karışımlarında konsantrasyonun çok yüksek olduğu ve toksik etki yarattığı düşünüldü. Yüksek dozda mRNA enjeksiyonunun toksik etki gösterdiği ve hücreler arasında dengesiz protein seviyelerinin gelişimsel bozukluklara yol açtığına karar verildi.

Sanger Dizileme analizlerini gerçekleştirmek amacıyla deney gruplarından seçilen her bir larva için genomik DNA izolasyonu gerçekleştirildi.

5. TARTIŞMA

CCDC13, silyogenez, mikrotübül organizasyonu ve DNA hasar yanıtı gibi hücresel süreçlerde görev alan işlevsel bir proteini kodlayan genidir. CCDC13 proteini hücrede özellikle sentrozom ve primer silyum bölgelerinde konumlanır ve diğer uydu proteinleriyle bağlantılı bir şekilde silya oluşumunda görev almaktadır. CCDC13 proteinin eksikliğinde silyaların sayılarında ve boyutlarında azalma olduğu gözlenmiştir. İşlevsiz hale gelmiş CCDC13 proteini bulunduran hücrelerde, hücre döngüsü ve kromozom ayrılmasında hatalar oluşması ayrıca DNA hasar belirteçlerinde artış olduğu bildirilmiştir CCDC13 geni, genom stabilitesiyle ilişkili hastalıklar için potansiyel bir hedef gen olarak değerlendirilmektedir(6)

Bu çalışmada, indeks hastanın CCDC13 geninde, veri tabanlarında da bildirilen de novo missense varyasyonun nörogelişimsel süreçlerdeki etkileri deneysel olarak araştırılmıştır. Bu kapsamda, ccdc13 knockout zebra balığı modeli geliştirilerek genin nöronal gelişim süreçleri üzerinde potansiyel etkileri ve organizmadaki biyolojik rolü analiz edilmiştir(66). CCDC13 geninin, birçok nörogelişimsel hastalığın da dahil olduğu, silyopati ile ilişkili genler ile birlikte çalışması ve etkileşim içinde olması, hastamızdaki fenotipik özelliklerin bu gendeki değişiklikten kaynaklanabiliyor olduğu hipotezini güçlendirmiştir(67)(68).

Gendeki de novo varyasyonun sağlıklı toplumdaki alel frekansının düşük olması (%0.00007559) (122/1.614.070 alel, GnomAD v4.0) ve zamanla seçilime uğraması, de novo ve varyasyonun protein düzeyinde türler arası korunmuş olması, Combined Annotation Dependent Depletion (CADD)” skorunun 23 olması, genin şimdiye kadar herhangi bir nörolojik fenotip ile ilişkilendirilmemiş olması gibi kriterler temel alınarak, genle ilgili fonksiyonel çalışmalar hedeflenmiştir.

Staples ve ark. (2014) HeLa ve HEK293 insan hücre hatlarında gerçekleştirdiği çalışmada siRNA aracılığıyla CCDC13 gen ekspresyonunun baskılanmasını sağlayarak mikrotübül organizasyonunda bozulma ve DNA hasar belirteçlerinde artış gibi fonksiyonel özellikler saptamışlardır(6). Knockout fare modelleri ile yapılan diğer iki çalışmada ise, bu genin merkezi sinir sistemi gelişimi ve görsel sistem sağlığı açısından kritik bir rol oynadığı ortaya konmuştur. Wu ve ark. (2024) tarafından yapılan çalışmada, Ccdc13 knockout farelerde doğumdan itibaren başlayan konjenital

hidrosefali, ventriküler sistemde aşırı beyin omurilik sıvısı birikimi ve silya hareket bozukluğu ile ilişkilendirilmiştir. Bu sıvı birikimi, özellikle optik sinir glial yapılarında incelmeye neden olmuştur. Nörofilament ve mikrotübül parçalanması gibi aksonal dejenerasyon meydana geldiği tespit edilmiştir(69). 2024 yılında, kongre özeti olarak yayınlanan başka bir Ccdc13 knockout fare modelleri ile gerçekleştirilen çalışmada ise hidrosefalinin sadece mekanik bir basınç sonucu olmadığı, genetik ve moleküler temelli bir süreçle geliştiği belirtilmiştir.

Wu ve ark. (2025) tarafından *Drosophila* ve fare modelleri kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada, Ccdc13 geninin genetik olarak işlevsiz hâle getirilmesiyle genin fonksiyonu detaylı olarak incelenmiştir. Her iki model organizmada gerçekleştirilen Ccdc13 knockout deneyleri ile Ccdc13 geninin hareketli silyaların merkezi çift mikrotübül oluşumunda temel bir rol oynadığı gösterilmiştir. Ccdc13 knockout farelerde, özellikle endodermal hücrelerin silyalarında merkezi çift mikrotübül yapılarının kaybolduğu gözlemlenmiştir. Bu durum silya hareket bozukluğuna ve sonuç olarak konjenital hidrosefaliye neden olmuştur. Sperm flagellumunda, Ccdc13 proteinin eksikliği sperm hareket bozukluğu ve erkek bireyin kısırlılığı ile sonuçlanmıştır. *Drosophila* modelinde aynı şekilde Ccdc13 knockout bireylerde merkezi çift yapısı kaybolmuş ve spermlerin hareket seviyeleri bozulmuştur. (70). Çalışmamızda zebra balığı model organizması kullanılarak oluşturulan ccdc13 knockout bireylerde gözlemlenen fenotipler, yabani tip larvalarla fenotipik ve moleküler düzeyde karşılaştırılmıştır. Bu çalışmaların kapsadığı yöntemlerden biri olan Whole Mount In Situ Hibridizasyon ile zebra balığı ccdc13 genine özgü RNA probları kullanılarak genin ekspresyon gösterdiği dokular yabani tip ve knockout larva gruplarında gösterilmiştir. Araştırmaya ait elde edilen bulgular literatürde daha önce ccdc13 knockout zebra balığı modelinde çalışılmamış olmasından dolayı genin zebra balığındaki ekspresyon motifini ve fonksiyonunu anlamamız açısından önemlidir. *Drosophila* ve fare modellerinden elde edilen bulgularla uyumlu şekilde, CCDC13 geninin işlevini kaybetmesinin embriyonik gelişim sürecini doğrudan etkilediği düşünülmektedir. Özellikle mRNA enjeksiyonuyla gerçekleştirilen kurtarma deneylerinde doz bağımlı olarak gelişimsel anormalliklerin ortaya çıkması, genin ekspresyon seviyesine duyarlı olduğunu ve hücre homeostaz için kritik bir regülatör olduğunu düşündürmektedir.

CRISPR-Cas9 teknolojisi ile yapılan gen knockout deneylerini takiben aynı genin gRNA ve hedef genin mRNA'sını birlikte içeren bir kurtarma grubu oluşturulur(72). Bu yöntemin kullanımı deney gruplarının fenotiplerinde gözlemlenen gelişimsel bozuklukların CRISPR sisteminin rastgele bir yan etkisinden değil, doğrudan hedeflenen genin fonksiyonunu kaybetmesinden kaynaklandığını kanıtlamaktadır. mRNA enjeksiyonu sonrası fenotipin düzelmesi, mutasyon sonucu ortaya çıkan bozuklukların gerçekten hedeflenen genin eksikliğinden kaynaklandığını gösterir(73)(74). Zebra balığı embriyolarında tek hücre evresinde gerçekleştirilen mRNA enjeksiyonu, hedef genin erken ve translasyonel düzeyde aşırı ekspresyonunu sağlar. Bu yöntem, gen fonksiyonlarını gelişimin erken evrelerden itibaren değerlendirmek açısından oldukça önemli bir yöntemdir. Tek hücre aşamasındaki zebra balığı embriyolarına yapılan mRNA enjeksiyonu ile mRNA her hücre bölünmesinde eşit dağılır(59). Bu sebeple genin aşırı ifadesi vücudun her dokusunda gerçekleşebilir. Ancak literatürde, bu yöntemde kullanılan aynı gene ait mRNA yüksek doz enjeksiyonlarının, genetik eksikliği telafi etmekten çok, doz kaynaklı toksik etkiler yarattığı gösterilmiştir. Hedef proteinin fizyolojik sınırların üzerinde sentezlenmesiyle özellikle erken embriyogenez döneminde dozaj hassasiyeti yüksek olan Hedgehog, Wnt, Notch, BMP gibi gelişimsel yollarda hücrelerel sinyalleşme dengesinin bozulmasına ve sonuç olarak doku morfogenezi, embriyo eksenini oluşumu gibi süreçlerin aksamasına neden olabilmektedir(75). Aşırı ekspresyona bağlı toksisite endoplazmik retikulum stresi, protein katlanma bozuklukları, proteostatik yüklenme ve hatalı hücre sinyal iletimi gibi mekanizmalar üzerinden gelişimsel bozukluklara neden olduğu ve sonucunda morfolojik anomalilere ve spesifik olmayan fenotiplere yol açtığı düşünülmektedir(57). Araştırma konumuz olan CCDC13 geni, doğrudan spesifik bir sinyal yolağıyla ilişkilendirilmemiştir. Ancak, DNA hasar yanıtı, primer silyum oluşumu ve sentrozomal organizasyon gibi süreçlerde görev alır. Bu hücrelerel mekanizmalar, çeşitli sinyal yollarıyla dolaylı bağlantılar kurarak, hücre farklılaşması, bölünmesi ve gelişimi gibi olaylara katkı sunar. Dolayısıyla CCDC13'ün yüksek dozda eksprese edilmesi, doğrudan bir yoldan çok, hücrelerel bütünlüğü bozarak dolaylı yoldan gelişimsel anomalilere yol açabilir. Sonuç olarak, zebra balığı embriyolarında yapılan mRNA enjeksiyonlarında gözlenen fenotiplerin toksik etkiler mi yoksa gen fonksiyonuna mı bağlı olduğunun ayırt edilmesi için doz optimizasyonu

şarttır. mRNA aşırı ekspresyonuyla kurtarma deneyleri sonucunda, kurtarma grubu ve mRNA kontrol deney gruplarına ait fenotip bulgularının, mRNA enjeksiyonunda konsantrasyonun yüksek olması sebebiyle doz kaynaklı toksik etkiler sonucu meydana geldiğine karar verilmiştir.

CCDC13 geni yalnızca hareketli silyaların organizasyonunda değil, aynı zamanda primer silyum oluşumu, sentrozomal dinamiklerin düzenlenmesi ve hücrel polaritenin korunmasında da görev almaktadır. CCDC13 proteini, PCM1, Cep290, Cep131, Cep72 ve Pericentrin gibi çok sayıda sentriyolar uydu proteinine bağlanarak hem silyum biyogenezinin koordinasyonuna katkı sağlamakta hem de DNA hasar yanıtı ve mitotik ilerleme gibi temel hücrel süreçlerde dolaylı etkiler oluşturmaktadır(32)(71). İlerleyen çalışmalarda, CCDC13'ün etkileşimde bulunduğu proteinlerin ko-regülasyon düzeyinde analiz edilmesi ve sinyal iletim yolları üzerindeki etkilerinin çok katmanlı sistem biyolojisi yaklaşımlarıyla aydınlatılması gerekmektedir. Bu veriler ilgilendiğimiz CCDC13 geninin silyaların yapısal bütünlüğü, hem de hücrel organizasyon ve genetik kararlılık açısından kritik bir rolü olduğunu ve genin mutasyonlarının nörogelişimsel hastalıkların patofizyolojisinde belirleyici bir konumda olabileceğini göstermektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

CCDC13 geni, mitoz sırasında DNA hasarının artmasını önler ve genom stabilitesini korur ayrıca PCM1, Cep290 ve pericentrin gibi proteinlerle etkileşime girerek silyum biyogenezinde görev alan sentriyolar uydu proteinlerinden birini kodlamaktadır. Siliyopati proteinlerinden biri olan BBS4'ün lokalizasyonu için gerekli bir bileşen olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada CCDC13 geninde saptanan nadir ve patojenik olduğu öngörülen de novo bir varyasyonun nörogelişimsel fenotiplerle ilişkisi CRISPR-Cas9 teknolojisi kullanılarak oluşturulan zebra balığı knockout modeli aracılığıyla deneysel olarak araştırılmıştır. CCDC13 geninde varyasyonu olan ve belirgin nörogelişimsel semptomlar sergileyen bir indeks vakasının klinik bulguları ile *ccdc13* knockout zebra balığı hattı oluşturulan larvaların gösterdiği fenotipler karşılaştırılmıştır.

Literatürde, CCDC13 proteinin eksikliğinde silyum sayısında ve uzunluğunda azalma, hücre döngüsünde aksaklık, sentrozom sayısında anormallikler ve DNA hasar belirteçlerinde artış gözlemlendiği bildirir. Bu bulgular hem genom stabilitesinin korunmasında hem de nöronal gelişimin düzenlenmesinde CCDC13'ün kritik öneme sahip bir gen olduğunu düşündürmektedir.

Gerçekleştirilen deneysel çalışmalarda zebra balığı embriyolarında hedeflenen *ccdc13* geninde, CRISPR-Cas9 teknolojisiyle knockout deneyleri gerçekleştirilerek genin işlevini kaybetmesi hedeflenmiştir. Elde edilen G0 larvaların fenotiplerinin incelenmesinin ardından moleküler ve genotipik analizler gerçekleştirilmiştir. Sanger dizileme ile doğrulanan mutasyonlar, genin hedef bölgesinde okuma çerçevesi kaymasına ve fonksiyonel kayba neden olmuştur.

Knockout zebra balığı larvalarının *ccdc13* gen ekspresyon düzeylerini ve proteinin ekspresyon gösterdiği dokularda gerçekleşen farklılaşmaları gözlemlemek üzere tekrarlanan deneylerinin sonucunda knockout gurubundaki larvalardan 2 tanesi hariç diğer larvalarda belirgin morfolojik ya da davranışsal bir fenotip gözlemlenmemiştir. Ancak yabani tip *ccdc13* mRNA'sının mikroenjeksiyon yöntemiyle tek hücre aşamasındaki zebra balığı embriyolarına verildiği kurtarma deneylerinde, yüksek doz mRNA uygulaması larvalarda toksik etkiler oluşturmuş ve morfolojik deformiteler gözlenmiştir. Bu durum, *ccdc13* geninin hücre içi doz

dengesinin oldukça hassas olduğunu, eksikliğinde ve aşırı ekspresyonunda gelişimsel süreçleri bozabileceğini göstermektedir.

Genomda oluşturulan hedefli işlev kaybı, belirli bir genin biyolojik rollerini, gelişimsel süreçlerdeki katkısını ve hastalık patogeneziindeki yerini anlamada güçlü bir araçtır. Bu çalışmada elde edilen knockout zebra balığı modeli, CCDC13 geninin nörogelişimsel fenotiplere etkisinin deneysel olarak araştırılması ve analiz edilmesini mümkün kılmıştır. CRISPR-Cas9 teknolojisinin bu şekilde kullanımı, genetik varyasyonların doğrudan model organizmalar üzerinde fonksiyonel doğrulamasını yapabileme açısından translasyonel araştırmalarda büyük bir yenilik olarak öne çıkmaktadır.

Çalışmadan elde edilen bulgular, CCDC13 geninin nörogelişimsel bozuklukların etiolojisinde potansiyel bir aday olduğunu düşündürmektedir. Ancak mevcut veriler, bu ilişkinin daha fazla destekleyici kanıtla güçlendirilmesini gerektirmektedir. Bu doğrultuda, genin proteom düzeyindeki ifadesinin immünohistokimya ya da Western blot gibi yöntemlerle doğrulanması, ayrıca genin hedef olduğu hücresel yolların transkriptomik analizlerle aydınlatılması önerilmektedir. Özellikle RNA-Seq gibi geniş ölçekli ekspresyon analizleri, CCDC13'ün regüle ettiği gen ağlarını ortaya çıkararak fonksiyonel bağlamda yeni bilgiler sunabilir. Ayrıca, CCDC13 geni için geliştirilen knockout zebrafish modelinin ileri nesillere aktarılması ve kalıcı mutasyon hattı oluşturulması, uzun dönemli gelişimsel ve nöroanatomik etkilerin değerlendirilmesine olanak sağlayacaktır. Kurtarma deneylerinde gözlemlenen doz bağımlı toksik etkiler göz önünde bulundurularak, mRNA doz optimizasyonu yapılmalı ve fizyolojik sınırları aşmayan düzeylerde enjeksiyonlar gerçekleştirilmelidir. Ek olarak, memeli model sistemlerinde yapılacak benzer genetik inaktivasyon çalışmaları, genin insan nörogelişimi üzerindeki etkilerini daha iyi ortaya koyacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Ismail FY, Shapiro BK. What are neurodevelopmental disorders? *Curr Opin Neurol.* 2019;32(4):611–6.
2. Norbury CF, Sparks A. Difference or Disorder? Cultural Issues in Understanding Neurodevelopmental Disorders. 2013;49(1):45–58.
3. Reichard J, Zimmer-Bensch G. The Epigenome in Neurodevelopmental Disorders. *Front Neurosci.* 2021;15(November):1–23.
4. Malhotra D, Sebat J. CNVs: Harbingers of a rare variant revolution in psychiatric genetics. *Cell* [Internet]. 2012;148(6):1223–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.039>
5. Satterstrom FK, Kosmicki JA, Wang J, Breen MS, De Rubeis S, An JY, ve ark. Large-Scale Exome Sequencing Study Implicates Both Developmental and Functional Changes in the Neurobiology of Autism. *Cell.* 2020;180(3):568-584.e23.
6. Staples CJ, Myers KN, Beveridge RDD, Patil AA, Howard AE, Barone G, ve ark. Ccdc13 is a novel human centriolar satellite protein required for ciliogenesis and genome stability. *J Cell Sci.* 2014;127(13):2910–9.
7. Priyanka PP, Yenugu S. Coiled-Coil Domain-Containing (CCDC) Proteins: Functional Roles in General and Male Reproductive Physiology. *Reprod Sci.* 2021;28(10):2725–34.
8. Lee JE, Gleeson JG. A systems-biology approach to understanding the ciliopathy disorders. *Genome Med.* 2011;3(9).
9. Waters AM, Beales PL. Ciliopathies: An expanding disease spectrum. *Pediatr Nephrol.* 2011;26(7):1039–56.
10. Valente EM, Rosti RO, Gibbs E, Gleeson JG. Primary cilia in neurodevelopmental disorders. *Nat Rev Neurol.* 2014;10(1):27–36.
11. Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, ve ark. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human

- genome. *Nature*. 2013;496(7446):498–503.
12. Mitchell KJ. The genetics of neurodevelopmental disease. *Curr Opin Neurobiol* [Internet]. 2011;21(1):197–203. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.conb.2010.08.009>
 13. Parenti I, Rabaneda LG, Schoen H, Novarino G. Neurodevelopmental Disorders: From Genetics to Functional Pathways. *Trends Neurosci* [Internet]. 2020;43(8):608–21. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.05.004>
 14. Morris-Rosendahl DJ, Crocq MA. Neurodevelopmental disorders-the history and future of a diagnostic concept. *Dialogues Clin Neurosci*. 2020;22(1):65–72.
 15. Tărlungeanu DC, Novarino G. Genomics in neurodevelopmental disorders: an avenue to personalized medicine. *Exp Mol Med*. 2018;50(8).
 16. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, et al. Global variation in copy number in the human genome. *Nature*. 2006;444(7118):444–54.
 17. Takumi T, Tamada K. CNV biology in neurodevelopmental disorders. *Curr Opin Neurobiol* [Internet]. 2018;48:183–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.conb.2017.12.004>
 18. Pierre A Saint, Génin E. How important are rare variants in common disease? *Brief Funct Genomics*. 2014;13(5):353–61.
 19. Wang G, Xu Y, Wang Q, Chai Y, Sun X, Yang F, et al. Rare and undiagnosed diseases: From disease-causing gene identification to mechanism elucidation. *Fundam Res* [Internet]. 2022;2(6):918–28. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fmre.2022.09.002>
 20. Veltman JA, Brunner HG. De novo mutations in human genetic disease. *Nat Rev Genet*. 2012;13(8):565–75.
 21. Lopes-Marques M, Mort M, Carneiro J, Azevedo A, Amaro AP, Cooper DN, et al. Meta-analysis of 46,000 germline de novo mutations linked to human inherited disease. *Hum Genomics*. 2024;18(1):1–10.

22. Gauthier J, Rouleau GA. De novo mutations in neurological and psychiatric disorders: effects, diagnosis and prevention. *Genome Med.* 2012;4(9).
23. Gilissen C, Hehir-Kwa JY, Thung DT, Van De Vorst M, Van Bon BWM, Willemsen MH, ve ark. Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. *Nature* [Internet]. 2014;511(7509):344–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature13394>
24. Acuna-Hidalgo R, Veltman JA, Hoischen A. New insights into the generation and role of de novo mutations in health and disease. *Genome Biol* [Internet]. 2016;17(1):1–19. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13059-016-1110-1>
25. Lyons EL, Watson D, Alodadi MS, Haugabook SJ, Tawa GJ, Hannah-Shmouni F, ve ark. Rare disease variant curation from literature: assessing gaps with creatine transport deficiency in focus. *BMC Genomics.* 2023;24(1):1–18.
26. Griggs RC, Batshaw M, Dunkle M, Gopal-Srivastava R, Kaye E, Krischer J, ve ark. Clinical research for rare disease: Opportunities, challenges, and solutions. *Mol Genet Metab* [Internet]. 2009;96(1):20–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2008.10.003>
27. Haendel M, Vasilevsky N, Unni D, Bologna C, Harris N, Rehm H, ve ark. How many rare diseases are there? *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 2020;19(2):77–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/d41573-019-00180-y>
28. Dammermann A, Merdes A. Assembly of centrosomal proteins and microtubule organization depends on PCM-1. *J Cell Biol.* 2002;159(2):255–66.
29. Hori A, Toda T. Regulation of centriolar satellite integrity and its physiology. *Cell Mol Life Sci.* 2016;74(2):213–29.
30. Tollenaere MAX, Mailand N, Bekker-Jensen S. Centriolar satellites: Key mediators of centrosome functions. *Cell Mol Life Sci.* 2015;72(1):11–23.
31. Li X, Lin P, Zhang Z, Wang R, Cai J, Feng X, ve ark. USO1 Coordinates Centriolar Satellites to Regulate Male Germ Cell Proliferation and Cell Cycle Progression. *Int J Mol Sci.* 2025;26(9):1–14.

32. Staples CJ, Myers KN, Beveridge RDD, Patil AA, Lee AJX, Swanton C, ve ark. The centriolar satellite protein Cep131 is important for genome stability. *J Cell Sci.* 2012;125(20):4770–9.
33. Ishikawa H, Marshall WF. Ciliogenesis: Building the cell’s antenna. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12(4):222–34.
34. Malicki J, Avanesov A, Li J, Yuan S, Sun Z. Analysis of Cilia Structure and Function in Zebrafish [Internet]. Third Edit. Vol. 101, *Methods in Cell Biology*. Elsevier Ltd; 2011. 39–74 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-387036-0.00003-7>
35. Shamseldin HE, Shaheen R, Ewida N, Bubshait DK, Alkuraya H, Almardawi E, ve ark. The morbid genome of ciliopathies: an update. *Genet Med [Internet]*. 2020;22(6):1051–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41436-020-0761-1>
36. Barsch F, Niedermair T, Mamilos A, Schmitt VH, Grevenstein D, Babel M, ve ark. Physiological and pathophysiological aspects of primary cilia—a literature review with view on functional and structural relationships in cartilage. *Int J Mol Sci.* 2020;21(14):1–19.
37. Ware SM, Gunay-Aygun M, Hildebrandt F. Spectrum of clinical diseases caused by disorders of primary cilia. *Proc Am Thorac Soc.* 2011;8(5):444–50.
38. Rusterholz TDS, Hofmann C, Bachmann-Gagescu R. Insights Gained From Zebrafish Models for the Ciliopathy Joubert Syndrome. *Front Genet.* 2022;13(June).
39. Li L, Ran J. Regulation of ciliary homeostasis by intraflagellar transport-independent kinesins. *Cell Death Dis.* 2024;15(1).
40. Mitchison HM, Valente EM. Motile and non-motile cilia in human pathology: from function to phenotypes. *J Pathol.* 2017;241(2):294–309.
41. Tobin JL, Beales PL. Restoration of renal function in zebrafish models of ciliopathies. *Pediatr Nephrol.* 2008;23(11):2095–9.

42. Karalis V, Donovan KE, Sahin M. Primary Cilia Dysfunction in Neurodevelopmental Disorders beyond Ciliopathies. *J Dev Biol.* 2022;10(4).
43. Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science (80-).* 2014;346(6213).
44. Zhang C, Hu L, Liu S, Wang W, Zhao K. Generation of ectodysplasin a (Eda)-targeted knockout zebrafish via the CRISPR/Cas9 system. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2020;26(3):371–6.
45. Sertori R, Trengove M, Basheer F, Ward AC, Liongue C. Genome editing in zebrafish: A practical overview. *Brief Funct Genomics.* 2016;15(4):322–30.
46. Carroll D. Genome engineering with targetable nucleases. *Annu Rev Biochem.* 2014;83:409–39.
47. Zhang HX, Zhang Y, Yin H. Genome Editing with mRNA Encoding ZFN, TALEN, and Cas9. *Mol Ther [Internet].* 2019;27(4):735–46. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.01.014>
48. Sternberg SH, Doudna JA. Expanding the Biologist’s Toolkit with CRISPR-Cas9. *Mol Cell [Internet].* 2015;58(4):568–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2015.02.032>
49. Collias D, Beisel CL. CRISPR technologies and the search for the PAM-free nuclease. *Nat Commun [Internet].* 2021;12(1):1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-20633-y>
50. Jiang F, Doudna JA. CRISPR – Cas9 Structures and Mechanisms. 2017;505–29.
51. Konermann S. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *J Clin Sleep Med.* 2016;12(2):263–6.
52. Mengstie MA, Wondimu BZ. Mechanism and applications of crispr/ cas-9-mediated genome editing. *Biol Targets Ther.* 2021;15:353–61.
53. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc.* 2013;8(11):2281–308.

54. Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol* [Internet]. 2013;31(7):397–405. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.04.004>
55. Espino-Saldaña AE, Rodríguez-Ortiz R, Pereida-Jaramillo E, Martínez-Torres A. Modeling Neuronal Diseases in Zebrafish in the Era of CRISPR. *Curr Neuropharmacol*. 2019;18(2):136–52.
56. Zhao Z, Cao Y, Li M, Meng A. Double-stranded RNA injection produces nonspecific defects in zebrafish. *Dev Biol*. 2001;229(1):215–23.
57. Rosen JN, Sweeney MF, Mably JD. Microinjection of zebrafish embryos to analyze gene function. *J Vis Exp*. 2009;(25):1–5.
58. Albadri S, De Santis F, Di Donato V, Del Bene F. CRISPR/Cas9-mediated knockin and knockout in Zebrafish. *Res Perspect Neurosci*. 2017;(9783319601915):41–9.
59. Uribe-Salazar JM, Kaya G, Sekar A, Weyenberg KC, Ingamells C, Dennis MY. Evaluation of CRISPR gene-editing tools in zebrafish. *BMC Genomics*. 2022;23(1):1–16.
60. Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol Rev*. 2008;83(1):13–34.
61. Choi TY, Choi TI, Lee YR, Choe SK, Kim CH. Zebrafish as an animal model for biomedical research. *Exp Mol Med*. 2021;53(3):310–7.
62. Hortopan GA, Dinday MT, Baraban SC. Zebrafish as a model for studying genetic aspects of epilepsy. *DMM Dis Model Mech*. 2010;3(3–4):144–8.
63. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn*. 1995;203(3):253–310.
64. Babin PJ, Goizet C, Raldúa D. Zebrafish models of human motor neuron diseases: Advantages and limitations. *Prog Neurobiol*. 2014;118:36–58.
65. Bedell VM, Wang Y, Campbell JM, Poshusta TL, Starker CG, Krug RG, ve

- ark. In vivo genome editing using a high-efficiency TALEN system. *Nature* [Internet]. 2012;491(7422):114–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature11537>
66. Ribierre T, Deleuze C, Bacq A, Baldassari S, Marsan E, Chipaux M, ve ark. Second-hit mosaic mutation in mTORC1 repressor DEPDC5 causes focal cortical dysplasia-associated epilepsy. *J Clin Invest*. 2018;128(6):2452–8.
 67. Gana S, Serpieri V, Valente EM. Genotype–phenotype correlates in Joubert syndrome: A review. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet*. 2022;190(1):72–88.
 68. Mill P, Christensen ST, Pedersen LB. Primary cilia as dynamic and diverse signalling hubs in development and disease. *Nat Rev Genet*. 2023;24(7):421–41.
 69. Wu M, Zhao X, Peng S, Zhang X, Ru J, Xie L, ve ark. Progressive Optic Neuropathy in Hydrocephalic Ccdc13 Mutant Mice Caused by Impaired Axoplasmic Transport at the Optic Nerve Head. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2024;65(13):5.
 70. Wu Z, Zhang Y, Liu J, Liu H, Niu J, Li Y, ve ark. Ccdc13 is essential for the assembly of ciliary central microtubules. *Natl Sci Rev* [Internet]. 2025;12(6). Available from: <https://doi.org/10.1093/nsr/nwaf095>
 71. Prosser SL, Pelletier L. Centriolar satellite biogenesis and function in vertebrate cells. *J Cell Sci*. 2020;133(1).
 72. Cark O, Katkat E, Aydogdu I, Iscan E, Oktay Y, Ozhan G. tubg1 Somatic Mutants Show Tubulinopathy-Associated Neurodevelopmental Phenotypes in a Zebrafish Model. *Mol Neurobiol*. 2024;(0123456789).
 73. Wu RS, Lam II, Clay H, Duong DN, Deo RC, Coughlin SR. A Rapid Method for Directed Gene Knockout for Screening in G0 Zebrafish. *Dev Cell* [Internet]. 2018;46(1):112-125.e4. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.06.003>
 74. Zhang C, Lu T, Zhang Y, Li J, Tarique I, Wen F, ve ark. Rapid generation of

maternal mutants via oocyte transgenic expression of CRISPR-Cas9 and sgRNAs in zebrafish. *Sci Adv.* 2021;7(32):1–14.

75. Stoick-Cooper CL, Weidinger G, Riehle KJ, Hubbert C, Major MB, Fausto N, et al. Distinct Wnt signaling pathways have opposing roles in appendage regeneration. *Development.* 2007;134(3):479–89.



8. EKLER

8.1. Etik Kurul Raporu 1

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Sayın Prof.Dr. Sultan Cingöz

Araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı aşağıda sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
TELEFON	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
FAKS	0 232 412 22 43
E-POSTA	goaek@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	9772-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ <input type="checkbox"/> MÜNFERİT ARAŞTIRMA <input type="checkbox"/> ÖÇM <input type="checkbox"/> YÜKSEKLİSANS <input checked="" type="checkbox"/> DOKTORA <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	CCDC13 Genindeki Mutasyonun Nörogelişimsel Bir Hastalıktaki Rolünün Knockout Zebra Balığı Modeli İle Araştırılması
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof.Dr. Sultan Cingöz Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D.
	TEZ SAHİBİNİ ADI SOYADI	Hatice Eda Sützek
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/> ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input checked="" type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>

8.2. Etik Kurul Raporu 2

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2025/14-22	Tarih:30.04.2025				
	Prof.Dr. Sultan Cingöz'ün sorumlusu olduğu "CCDC13 Genindeki Mutasyonun Nörogelişimsel Bir Hastalıktaki Rolünün Knockout Zebra Balığı Modeli İle Araştırılması" isimli bilimsel araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, araştırmanın mevcut haliyle etik yönden uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.					
ETİK KURUL BİLGİLERİ						
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu					
ETİK KURUL ÜYELERİ						
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile İlişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Mehmet Birhan Yılmaz (Başkan)	Kardiyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr. Şökran Köse (Başkan Yardımcısı)	Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	DEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr. Aylın Özgen Alpaydın	Göğüs Hastalıkları	DEÜ Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr. Özgür Er	Endodonti A.D.	Diş Hekimliği Fakültesi	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr. Hatice Şimşek Keskin	Halk Sağlığı	DEÜ Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Nil Hocaoğlu Aksay	Tıbbi Farmakoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Seher Özyürek	Muskuloskeletal Fizyoterapi	DEÜ Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Fakültesi	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr. Meryem Öztürk Haney	Halk Sağlığı Hemşireliği	Hemşirelik Fakültesi Halk Sağlığı Hemşireliği	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr. Şule Özbilgin	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	DEÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Tıp Bilimleri Bölümü	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Tolga Şahin	Spor Yönetim Bilimleri	Necat Hepkon Spor Bilimleri Fakültesi	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Gamze Tuna	Tıbbi Biyokimya	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	

8.3. Özgeçmiş



HATİCE EDA SÜZEK

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

İletişim Adresi

Telefon

E-posta

İnternet Sayfası

Öğrenim Bilgileri

11 Şubat 2022 - Şu Anda (3 yıl 5 ay)

Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK (YL) (TEZLİ)
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.67 / 4.0

12 Ağustos 2016 - 10 Temmuz 2020 (3 yıl 11 ay)

Lisans, Anadal/Normal Öğretim, AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE FEN-EDEBİYAT FAKÜLTESİ, MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PR.
Diploma Numarası: 0121-000083
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 2.7 / 4.0

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

ALMANCA (Okuma: Orta, Yazma: Orta, Konuşma: Orta)

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanları

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanı Bilgileri

Temel Bilimler -- Yaşam Bilimleri -- Moleküler Biyoloji ve Genetik -- Sitogenetik

Sağlık Bilimleri -- Tıp -- Dahili Tıp Bilimleri -- Tıbbi Genetik

Temel Bilimler -- Yaşam Bilimleri -- Biyokimya -- Proteomiks

Temel Bilimler -- Yaşam Bilimleri -- Moleküler Biyoloji ve Genetik -- Genetik Bozuklukların Moleküler Biyolojisi

Temel Bilimler -- Yaşam Bilimleri -- Moleküler Biyoloji ve Genetik -- Genomiks

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Görev	ARDEB	BİDEB	BİLİM TOPLUM	ÜİDB	TEYDEB	Toplam
Hakemlik/Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	0	0	0	0	0	0
Moderatorlük Sayısı	0	0	0	0	0	0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	0	0	0	0	0	0
Raportörlük Sayısı	0	0	0	0	0	0
Katılmadığı Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	0	0	0	0	0	0