



İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

KRANİYOEKTODERMAL DİSPLAZİYE SEBEP OLAN
YENİ BİR MUTASYONUN MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU

Yüksek Lisans Tezi

ASLI KARAMAN

OCAK 2023



İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

KRANİYOEKTODERMAL DİSPLAZİYE SEBEP OLAN
YENİ BİR MUTASYONUN MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU

Yüksek Lisans Tezi

ASLI KARAMAN

Danışman

Prof. Dr. Berna DEMİRCAN TAN

Eş Danışman

Doç. Dr. Şükrü Sadık Öner

OCAK 2023

TEZ JÜRİSİ ONAYI

Aslı KARAMAN tarafından hazırlanan "Kraniyoektodermal Displaziye Sebep Olan Yeni Bir Mutasyonun Moleküler Karakterizasyonu" başlıklı bu Yüksek Lisans Tezi, Moleküler Tıp Anabilim Dalı'nda hazırlanmış ve jürimiz tarafından kabul edilmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ

İMZA

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Berna DEMİRCAN TAN

Kurumu: İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Eş Danışman:

Doç. Dr. Şükrü Sadık ÖNER

Kurumu: Göztepe Prof. Dr. Süleyman Yalçın Şehir Hastanesi

Üyeler:

Doç. Dr. Birsen Elibol

İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Elif Yılmaz Güleç

İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Salih Gencer

İstanbul Medipol Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 18/01/2023

BEYANLAR

Yazım ve Kaynak Gösterme Kılavuzu Beyanı

Danışmanlığında yazılan bu tezin vancouver yazım ve kaynak gösterme kılavuzunda belirtilen kurallara uygun olarak yapılandırıldığı ve bu kılavuzun vancouver kaynak gösterme standartlarının bu tezde tutarlı olarak uygulandığı tarafımdan incelenerek teyit edilmiştir.



İmza

Prof. Dr. Berna
DEMİRCAN
TAN

Etik İlkeler Sadakat Beyanı

Hazırladığım bu tezin tamamen kendi çalışmam olduğunu, akademik ve etik kuralları gözeterek çalıştığımı ve her alıntıya kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

İmza

Aslı KARAMAN

TEŞEKKÜR

Tezimde bana destek olan, yardıma ihtiyacım olduğunda her anda yardımlarını esirgemeyen, her zaman anlayışlı yaklaşan, danışmanım Prof. Dr. Berna DEMİRCAN TAN'a

Mesleğe ilk adımımı atmamı sağlayan, bilimsel ve akademik olarak edindiğim tüm tecrübelerimi borçlu olduğum, beni her anlamda yetiştiren eş danışmanım Doç. Dr. Şükrü Sadık ÖNER'e

Yaşasaydı tez sürecimin tümünde yanımda olacağından tereddüt etmediğim, sahip olduğumuz tüm zamanlarda sevgisini desteğini esirgemeyen Dr. Fatima TEMEL'e

Çocukluktan itibaren aynı yolda yürüdüğümüz, aynı sıraları paylaşmaktan aynı laboratuvarları paylaşmaya ulaşabildiğimiz hem çocukluk arkadaşım hem meslektaşım olmasından mutluluk duyduğum Ahsen Merve BAYRAK'a

Sevgisiyle, desteğiyle her zaman yanımda olan, yüzümü güldürebilen, varlığıyla zor zamanları da güzelleştiren yol arkadaşım Muhammet EROL'a

Tüm eğitim hayatım boyunca beni destekleyen, bugünlere ulaşmamı sağlayan, kendilerinden fekadarlık etmekte çekinmeyen, her zaman arkamda duran, CANIM AİLEM, annem Saniye KARAMAN'a, babam Recep KARAMAN'a, ablam Nazlı KARAMAN'a ve kardeşim Oğuzhan KARAMAN'a, tüm kalbimle teşekkürlerimi sunuyorum.

ÖZET

KRANIYOEKTODERMAL DİSPLAZİYE SEBEP OLAN YENİ BİR MUTASYONUN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

KARAMAN, Aslı

Yüksek Lisans Tezi, Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Berna DEMİRCAN TAN

Eş Danışman: Doç. Dr. Şükrü Sadık Öner

Ocak 2023

Bu çalışmanın amacı, kranioektodermal displaziye sebep olan yeni bir mutasyonun siliya üzerindeki etkilerini araştırmaktır. Kranioektodermal displazi, siliyopati grubundaki hastalıklardan biri olarak sınıflandırılan ve vücudun birçok bölümünü etkileyerek, karakteristik yüz özellikleri, kemik anormallikleri, eklem laksitesisi, ektodermal displazi, büyüme geriliği ve retinal distrofi gibi problemlerle karakterize olan bir nadir hastalıktır. Siliyalar, mikrotübül bazlı bir aksonemden oluşan ve plazma membranından dışarıya doğru hücresel çıkıntı şeklindeki organellerdir, hareketli ve hareketsiz (primer) olmak üzere ikiye ayrılırlar. Primer siliyalar hücre dışı ortamdan aldığı moleküler sinyalleri ileterek, duyu işlevlerinin yerine getirilmesinde görev almaktadır. Primer siliyalardaki yapısal ve fonksiyonel bozukluklar ise siliyopati olarak adlandırılan geniş bir organ-sistem etkileşimine neden olan hastalık grubunu oluşturmaktadır.

Akraba evliliğinin çok olduğu geniş bir ailede, hastalarda yapılan tüm genom analizleri sonucunda elde edilen verilerde siliyogenezde önemli görevler aldığı bilinen "ciliogenesis associated kinase 1 (CILK1)" geninin C-terminal bölgesinde bir mutasyon tespit edilmiştir. Bu mutasyonun siliya yapı ve fonksiyonlarındaki etkilerini araştırmak amacı ile hasta ve kontrol gönüllülerinden alınan deri örnekleri ile fibroblast hücre hatları elde edilmiştir. Bu hücre örnekleri ile yapılan immünohistokimyasal çalışmalarda, mutasyonun siliya yapısını değiştirdiği ve qPCR deneyleri sonucunda da siliya ile ilişkilendirilmiş olan IFT70 geninin ekspresyonunun artmasına yol açtığı gözlenmiştir. Elde edilen bu verilerle CILK1 genindeki bu mutasyonun, siliya yapısı üzerinde nasıl etki ettiği ve bir siliyopati olan ektodermal displazi hastalığının tanısında yeni bir tanı kriteri olduğu gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Primer Siliya, Siliyogenez, Siliyopati, Kranioektodermal Displazi, CILK-1,

ABSTRACT

KRANİYOEKTODERMAL DİSPLAZİYE SEBEP OLAN YENİ BİR MUTASYONUN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

KARAMAN, Aslı

Master's Thesis, Department of Molecular Medicine

Supervisors:

Prof. Dr. Berna DEMİRCAN TAN

Assoc. Prof. Dr. Şükrü Sadık ÖNER

January 2023

The aim of this study is to investigate the effects of a new mutation that causes cranioectodermal dysplasia on cilia. Cranioectodermal dysplasia is a rare disease that is classified as one of the diseases in the ciliopathy group and is characterized by problems affecting many parts of the body, such as characteristic facial features, bone abnormalities, joint laxity, ectodermal dysplasia, growth retardation and retinal dystrophy. Cilia are organelles consisting of a microtubule-based axoneme and in the form of a cellular protrusion outward from the plasma membrane, they are divided into mobile and immobile (primary). Primary cilia are involved in the fulfillment of sensory functions by transmitting the molecular signals they receive from the extracellular environment. Structural and functional disorders in primary cilia constitute a group of diseases that cause a wide range of organ-system interactions called ciliopathy.

In a large family where consanguineous marriage is common, a mutation was detected in the C-terminal region of the “ciliogenesis associated kinase 1 (CILK1)” gene, which is known to play an important role in ciliogenesis, in the data obtained as a result of whole genome analyzes performed on patients. In order to investigate the effects of this mutation on cilia structure and functions, fibroblast cell lines were obtained from skin samples (which, that) taken from patient and control volunteers. In immunocytochemical studies with these cell samples, it was observed that the mutation changed the cilia structure and increased the expression of the IFT70 gene, which was associated with cilia, as a result of qPCR experiments. With these data, it has been shown how this mutation in the CILK1 gene affects the cilia structure and is a new diagnostic criterion in the diagnosis of ectodermal dysplasia, which is a ciliopathy.

Keywords: Primary Cilia, Ciliogenesis, Ciliopathy, Cranioectodermal Dysplasia, CILK-1

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR	ii
ŞEKİLLER	iv
TABLOLAR.....	v
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kraniyoektodermal Displazi (KED – Cranioectodermal Dysplasia, CED) ..	4
2.2. Siliya	6
2.3. Hareketli Siliyalar	9
2.4. Hareketsiz (Primer) Siliyalar.....	10
2.5. Siliyopati	14
2.6. Siliyogenezle İlişkili Kinaz 1 (CILK1)	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM	22
3.1. Gereçler	22
3.1.1. Kimyasallar	22
3.1.2. Ekipmanlar	23
3.1.3. Kitler	25
3.2. Yöntem.....	25
3.2.1. Primer Dizaynı	25
3.2.2. Hücre Kültürü	33
3.2.3. Poli-D-Lizin ile Kaplama	38
4. BULGULAR.....	42
4.1. KED Hastası ve Pedigri Analizi.....	42
4.2. CILK1 Mutasyonu	44
4.3. Siliyanın Görüntülenmesi.....	45
4.4. Siliya Rezorpsiyon Deneyi.....	49
4.5. Yapısal Siliya Genlerindeki Farklılıklar	50
5. TARTIŞMA.....	52
6. KAYNAKÇA.....	57

KISALTMALAR

- CILK1:** Silyogenezle İlişkili Kinaz 1 (CILK1)
- KED:** Krroniyoektodermal Displazi
- ECO:** Endokrin-Serebro Osteodisplazi
- PDGF:** Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü
- PDGFR:** Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü Reseptörü
- BBS:** Bardet-Biedl Sendromu
- MKS:** Meckel Sendromu
- JBTS:** Joubert Sendromu
- NPHP:** Nefroftiz
- SLSN:** Senior-Løken Sendromu
- JATD:** Jeune Boğucu Torasik Disrofi
- OFD1:** Oro-Yüz-Dijital Sendrom Tip 1
- EVC:** Ellis Van Creveld Sendromu
- ALMS:** Alstrom Sendromu
- PKD:** Polikistik Böbrek Hastalığı
- IFT:** İntraflagellar Taşıma
- IFT43:** İntraflagellar Taşıma Proteini 43
- IFT52:** İntraflagellar Taşıma Proteini 52
- IFT122:** İntraflagellar Taşıma Proteini 122
- IFT140:** İntraflagellar Taşıma Proteini 140
- WDR19:** WD Repeat Domain Proteini 19
- WDR35:** WD Repeat Domain Proteini 35
- WES:** Tam Ekzom Sekanslaması
- Shh:** Sonic Hedgehog
- TGF-beta:** Transforme Edici Büyüme Faktör-Beta
- mTOR:** Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi
- TULP3:** Tubby Ailesi Proteini 3
- ECM:** Ekstraselüler Matris
- GLI:** Glioma

PCP: Düzlemsel Hücre Polaritesi
ARL13B: ADP Ribosilasyon Benzeri Protein 13
RCK: v-ros Cross-Hybridizing Kinaz
CDK: Siklin Bağımlı Kinaz
MAPK: Mitojenle Aktive Olan Kinaz
GSK: Glikojen Sentaz Kinaz
CLK: CDC Benzeri Kinaz
ICK: Bağırsak Hücre Kinazı
MAK: Erkek Germ Hücre İlişkili Kinaz
CCRK: Hücre Döngüsü ile İlgili Kinaz
CDK20: Sikline Bağımlı Kinaz 20
CTD: C Terminal Bölgesi
NTD: N Terminal Bölgesi
CCP110: Centriolar Coiled-Coil Protein 110
CEP290: Sentrozomal Protein 290
IFT70: İntraflagellar Taşıma Proteini 70
IFT139: İntraflagellar Taşıma Proteini 139
IFT88: İntraflagellar Taşıma Proteini 88
KIF3A: Kinesin Ailesi Üyesi 3a

ŞEKİLLER

Şekil 1. Kranyoektodermal Displazinin (KED) Klinik ve Radyografik Özellikleri....	5
Şekil 2. Siliyumun Yapısı.....	7
Şekil 3. Siliyanın yapısal elemanları ve sınıflandırılması	9
Şekil 4. İntraflageller Taşımayı Gösteren Primer Siliya Yapısı ve Siliyopati Proteinleri	11
Şekil 5. Çok Çeşitli Klinik Özellikleri Olan Siliyopatiler Arasındaki Klinik Örtüşme	16
Şekil 6. Siliyer Protein Kompleksleri	17
Şekil 7. Siliyogenez İle İlişkili Kinaz 1 (CILK1) Proteinin Yapısı	19
Şekil 8. CILK1 Sinyalizasyonunun İşleyen Bir Modeli	20
Şekil 9. Hasta ve Sağlıklı Bireyden Alınan Doku Parçalarının Kültür Kabına Aktarılmış Hali.....	34
Şekil 10. Hasta ve Sağlıklı Bireyden Alınan Doku Parçalarının Bir Hafta Sonraki Durumu	34
Şekil 11. Hasta ve Sağlıklı Bireyden Alınan Doku Parçalarının İki Hafta Sonraki Durumu	35
Şekil 12. Hasta ve Sağlıklı Bireyden Alınan Doku Parçalarının Üç Hafta Sonraki Durumu	35
Şekil 13. İncelenen CILK1 Mutasyonlu Hastanın Klinikte Görülen Semptomları...	42
Şekil 14. CILK1 geninde c.1664_1665delAT, p.Tyr555CysfsTer48 mutasyona sahip 3 hastanın geniş aile pedigri analizi	43
Şekil 15. CILK1’de Meydana Gelen Mutasyonun Gen Üzerinde Gösterimi.....	44
Şekil 16. Kontrol ve CILK1 Mutasyonlu Hastanın Fibroblastlarında Siliya Uzunluğunun Değişimi	46
Şekil 17. CILK-1 Mutasyonunun Siliya Yapısı Üzerine Etkisi.....	47
Şekil 18. CILK-1 Mutasyonunun Siliya Yapısı Üzerine Etkisi.....	48
Şekil 19. CILK-1 Mutasyonunun Siliya Yapısı Üzerine Etkisi.....	49
Şekil 20. Siliya Rezorpsiyon Grafiği.....	50
Şekil 21. Hasta ve Kontrol Hücrelerinde Siliya İle İlişkili Olan Genlerinin Kantitatif Ekspresyon Oranları	51

TABLÖLER

Tablo 1. Görölme Sıklıklarına Göre Kranioektodermal Displazinin Özellikleri	4
Tablo 2. Kranioektodermal Displazi İle İlişkili Bilinen Genler.....	6
Tablo 3. Siliyopatilerin Ortak Klinik Özellikleri	15
Tablo 4. Çok Organlı Sistemlerde CILK1 Fonksiyon Bozukluğu Fenotipleri	21
Tablo 5. Kimyasallar	22
Tablo 6. Ekipmanlar.....	23
Tablo 7. Kitler	25
Tablo 8. CILK1'in Klonlanması İçin Kullanılan Primerler	26
Tablo 9. TransStart® FastPfu DNA Polimeraz Kitine Göre Reaksiyon Bileşenleri	26
Tablo 10. PCR Reaksiyonu İçin Sıcaklık Döngüleri	27
Tablo 11. CILK-1 pEGFP-N1'in Çift Kesimi İçin Bileşenler.....	29
Tablo 12. Ligasyon İşlemleri İçin Bileşenler	31
Tablo 13. Applied Biosystems™ High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kitine Göre Gerekli Bileşenler	37
Tablo 14. cDNA Reaksiyonu İçin Gerekli Termal Döngü Aşamaları	37
Tablo 15. Promega GoTaq® qPCR Master Mix İçin Reaksiyon Bileşenleri	38
Tablo 16. qPCR'da Kullanılan Siliya Genlerinin Primer Listesi	38
Tablo 17. Real time PCR İçin Sıcaklık Döngüleri	38
Tablo 18. Siliya Rezorpsiyonu İçin Tasarlanan Deney Şekli	41

1. GİRİŞ

Siliyalar hücreden dışarı doğru tüysü bir çıkıntı şeklinde gelişen, 5-15 µm boyutlarında ve farklı protein kompozisyonlarına sahip olan mikrotübül bazlı organellerdir. Siliya temel olarak bazal gövde, geçiş bölgesi ve siliyer uç kısımlarından oluşmaktadır ve hareketli ve hareketsiz olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır. Hareketli siliyalar belirli hücre tiplerinde oluşan, sıvıların hücre yüzeyi boyunca akışını ve temizlenmesini kolaylaştırmak için kordineli bir şekilde kırbaç benzeri vuruşlar yapabilen bir organeldir. Primer siliyalar olarak da bilinen hareketsiz siliyalar, mekanosensör, kemosensör ve ozmosensör gibi fonksiyonlara sahiptir (1). Ayrıca, Hedhehog, Wnt ve reseptör tirozin kinaz ligandları gibi hücresel davranış, doku gelişimi ve homeostazis ile ilgili olan sinyal yollarının koordinasyonunda görev almaktadır (2). Hedgehog sinyal sistemi, özellikle embriyonik dönemde siliya organeline lokalizedir ve organogenezin kontrolünden sorumludur. Bu nedenle, organların düzgün yerleşimi ve ekstremitelerin düzgün gelişimi açısından önemlidir. İlerleyen dönemlerde tümörögenezi de etkilediği bilinmekte ve birçok sinyal iletim sistemi ile ortak bağlantılar yapmaktadır. Kanonik ve kanonik olmayan Wnt sinyalizasyonunda rol alan proteinler siliyer/bazal siliya lokalizasyonunda bulunmaktadır. Kanonik Wnt sinyalizasyonu hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını ve büyümesinde rol alarak hücre göçü ve embriyonik gelişimin düzenlenmesini sağlarken, kanonik olmayan Wnt sinyalizasyonu gastrulasyon ve nörolasyon sırasında yakınsama uzantısı (convergence extension) için gerekli olan hücre polarite, hücre göçü veya mitotik iğ oryantasyonu ve düzlemsel hücre polaritesinin (Planar Cell Polarity, PCP) kontrolünde görev almaktadır. Siliya hastalıklarında oluşan açık göz kapakları, nöral tüp defektleri ve bozulmuş koklear stereosiliyer demetler Wnt sinyalizasyonu ile ilişkilendirilmiştir. PDGFR (Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü Reseptörü) sinyalizasyonu da primer siliya aracılığıyla, hücre döngüsü kontrolü, hücre göçü ve doku homeostazisi gibi birçok süreçte önemli rol oynamaktadır (3).

Siliyanın yapısındaki anormallikler ve fonksiyonundaki kayıplar sebebiyle oluşan hastalık grubu siliyopati olarak adlandırılmıştır. Siliya ile ilişkili proteinlerde oluşan mutasyonlar ile meydana gelen bu siliyopati hastalıklarında neredeyse tüm organları etkileyen çok çeşitli semptomlar/fenotipler görülmektedir. Bu semptomlar retinal defekt, anozmi (koku alamama), duyu kaybı, organların yer değiştirmesi, iskelette meydana gelen anormallikler, altı parmaklılık, kısırılık, beyinde meydana gelen hasarlar (ataksi,

epilepsi, zekâ geriliği), hidrosefali, doğuştan gelen kalp rahatsızlıkları, akciğer/hava yolu defektleri, renal anormallikler, karaciğer fibrozu gibi semptomlardır. Primer siliyadan kaynaklanan bazı siliyopatiler Bardet-Biedl sendromu, Joubert sendromu, kraniyoektodermal displazi gibi multisistemik etkilenim gösteren hastalık tablolarına yol açarken, bazılarında göz, böbrek ve iskelet sistemiyle sınırlı fenotipler ortaya çıkabilmektedir (2,4). Siliyopatilerin genetik nedenlerini belirlemede, Yeni Nesil Dizileme (NGS) teknolojisinin kliniğe uyarlanması ile siliyopatilere sebep olduğu tespit edilen yeni gen sayısı artmaktadır.

Kraniyoektodermal displazi (Sensenbrenner sendromu, KED), siliyopati grubundaki hastalıklardan biri olarak sınıflandırılan, kranial ve iskelet anomalileri (kraniosinostoz, dar göğüs kafesi, kısa uzuvlar ve brakidaktili) nefronoftizis benzeri böbrek lezyonları, hepatik fibroz, kalp kusurları ve retinit pigmentoz ile karakterize nadir görülen heterojen otozomal resesif bir hastalıktır (5). Özellikle karaciğer ve böbrek anormallikleri erken ölümlere ilişkilendirilmiştir (5). Bugüne kadar, IFT43, IFT52, IFT122, IFT140, WDR19 ve WDR35 genleri olmak üzere altı farklı gende KED ile ilişkilendirilmiş mutasyonlar bulunmaktadır. Bir siliyopati olan KED'nin etiyolojisinde bilinen genler hastaların yaklaşık üçte ikisinin tanı almasını sağlayabilirken, üçte birinde etiyolojiden sorumlu yeni gen keşiflerine ihtiyaç vardır (6).

Tıbbi genetik kliniğine başvuran, aynı aileden üç farklı hastada ortak klinik özellikler olarak, kronik böbrek yetmezliği, nefronoftizi, dismorfik yüz özellikleri, seyrek saçlar, seyrek kaşlar, seyrek kirpikler, kısa parmaklar, distrofik tırnaklar, retinal distrofi, karaciğer yetmezliği ya da karaciğer enzim yüksekliği bulunmaktaydı. Yapılan pedigrî analizleri ile üç hastanın da ebeveynleri arasında akrabalık bulunduğu ve hastaların birbirlerinin yakın ya da uzak kuzenleri olduğu tespit edilmiştir. Aynı kuşakta birikim gösteren hastalığın pedigrî analizine göre otozomal resesif kalıtım modeli ile uyumlu olduğu değerlendirilmiştir. Ayrıca aynı kuşakta benzer organ-sistem tutulumları ile ölümle sonuçlanan başka hasta bireylerin de var olduğu öğrenildi. Yapılan tüm değerlendirmeler sonucunda hastalara KED klinik tanısı konulmuştur.

Yapılan ekzom analizlerinde bu hastaların CILK-1 (ICK olarak da bilinen, ciliogenesis associated kinase 1, NM_014920) geninin 1664-1665. nükleik asitleri olan AT'nin silinmesi ile açık okuma çerçevesinde (open reading frame) meydana gelen kayma sonucu 144 bazlık yani 48 amino asitlik yeni bir bölge oluşmuştur

(c.1664_1665delAT, p.Tyr555CysfsTer48) ve bu durum üç hastada da homozigottur. Bu sebeple, CILK1 geni KED etiyolojisinde yeni bir aday gen olarak değerlendirilmiştir.

CILK1 geninin kodladığı “serin/treonin-protein kinaz ICK” proteininin N-terminal bölgesindeki kinaz domaininin proteinin katalitik fonksiyonlarına aracılık ettiği bilinmektedir. Bu bölgenin fonksiyonlarını etkileyen bazı yanlış anlamalı varyantlar (p.R272Q ve p.G120C) homozigot durumda; endokrin sistem etkilenimi, serebral anomaliler ve osteodisplaziyi içeren erken neonatal dönemde letal seyirli bir hastalık olan “Endokrin-serebroosteodisplazi (OMIM #612651)” ile ilişkilendirilmiştir (7). Yine kinaz bölgesinde yerleşen ve fonksiyon kaybına yol açan başka bir homozigot yanlış anlamalı varyant (p.E80K) erken letal seyirli başka bir iskelet displazisi olan kısa kot-polidaktili sendromu ile ilişkilendirilmiştir (8). Serin/treonin-protein kinaz ICK proteininin N-terminal bölgesindeki kinaz bölgesinin fonksiyonel özellikleri ve ilişkili olduğu hastalık klinikleri biliniyor olsa da, proteinin C-terminal bölgesindeki non-katalitik domain ile ilgili bilgiler kısıtlıdır. Yakın zamanlı in vitro çalışmalarda non-katalitik domainin protein bağlanması, substrat tanınması ve siliyer hedefleme ile ilgili fonksiyonel özellikler gösterdiği belirlenmiş olsa da henüz bu bölgede yerleşen biallelik varyantlarla ilişkilendirilmiş bir hastalık bulunmamaktadır.

Hastalarda belirtilen varyantın ilişkili proteinin C-terminal bölgesindeki non-katalitik bölgede bir aminoasit dizisinin kaybı ve yeni bir aminoasit dizisinin eklenmesine yol açması beklenmektedir. Bu çalışmanın amacı, klinikte KED tanısı konulan ve hastanın CILK1 geninde yeni tanımlanan mutasyonunun siliyada sebep olduğu değişimlerin moleküler temellerini anlamak ve olası yeni genotip-fenotip ilişkisini araştırmaktır. Bu sayede klinik semptomların moleküler alt yapıları anlaşılabilir ve siliya ile ilişkili hastalıkların mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına ve hastalıkların çözüm yollarının daha iyi tespit edilmesine olanak sağlanabilecektir. Ek olarak siliya gelişiminde önemli fonksiyonları bulunan CILK1 geninde saptanan varyantın proteinin C-terminal bölgesindeki non-katalitik domainin fonksiyonuna ve siliyogeneze etkileri araştırılarak KED’in etiyolojisinde yeni bir gen mutasyonu daha tanımlanması mümkün olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kranioektodermal Displazi (KED – Cranioectodermal Dysplasia, CED)

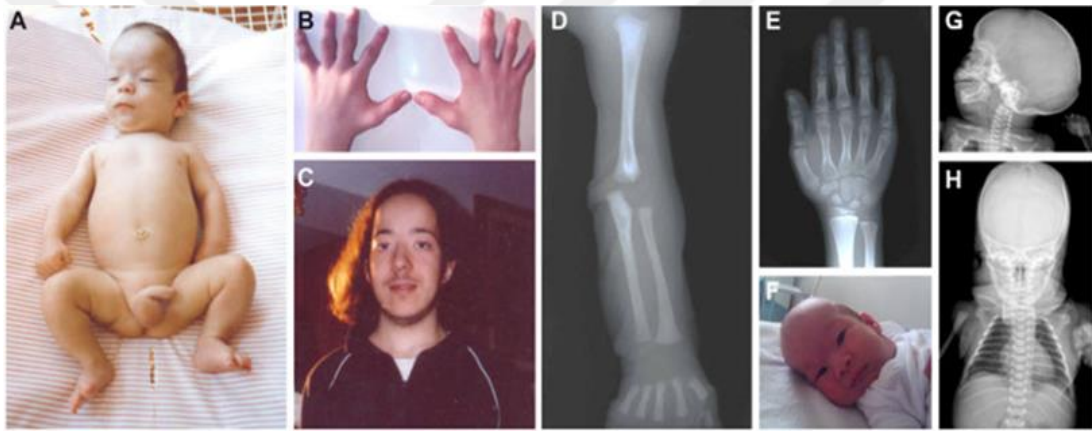
Sensenbrenner Sendromu olarak da bilinen kranioektodermal displazi (KED), siliyopati grubundaki hastalıklardan biri olarak sınıflandırılan ve klinikte iskelet tutulumu (dar toraks, kısalmış proksimal uzuvlar, sindaktili, polidaktili, brakidaktili), ektodermal özellikler (geniş aralıklı hipoplastik dişler, hipodonti, seyrek saç, cilt gevşekliği, anormal tırnaklar), eklem gevşekliği, büyüme geriliği, karakteristik yüz özellikleri (frontal çıkıntı, düşük basit kulaklar, yüksek alın, telekantus, epikantal kıvrımlar, dolgun yanaklar, dışa dönük alt dudak), retinal distrofi, kronik böbrek (nefronftizis) ve karaciğer hastalığı ile karakterize çoklu anomali içeren bir nadir hastalıktır (5).

Tablo 1. Görülme Sıklıklarına Göre Kranioektodermal Displazinin Özellikleri

Sıklık	Özellikler (Semptomlar)
Sık (>%75)	Karakteristik yüz özellikleri (örn. alın çıkıntı, düşük/basit kulaklar, yüksek alın, telekantus, epikantal kıvrımlar, dolgun yanaklar, dışa dönük alt dudak)
	Brakidaktili
	Dolikosefali ve sagital kraniosinostoz
	Proksimal kemiklerin (çoğunlukla humeri) kısalması (ve bükülmesi)
	Kısa boy
Yaygın (%50-%75)	Dar toraks (displastik kaburgalar ve pektus ekskavatum ile)
	Dental anormallikler (bozuk, geniş aralıklı dişler ve/veya hipodonti)
	Seyrek ve/veya ince saç
	Nefronftizis
	Gelişimsel gecikme (çoğunlukla motor gelişimi etkiler)
Daha Az Yaygın (%25-%50)	Eklem gevşekliği
	Karaciğer hastalığı (hepatik fibroz, siroz ve/veya hepatomegali)
	Sindaktili
	Polidaktili
	Anormal tırnaklar
	Cilt gevşekliği
	Tekrarlayan akciğer enfeksiyonları
	Bilateral kasık fıtıkları

Seyrek (<%25)	Retina distrofisi
	Kalça displazisi
	Kistik higroma
	Doğuştan kalp kusuru
	Zihinsel engelli

İskeletsel ve ektodermal anomaliler nedeniyle KED olarak anılmıştır (9). KED tanısı karakteristik bulguları ve radyografik özellikleri sayesinde klinik olarak konabilmektedir. Sagital kraniyosinostoza sekonder olan dolikosefali ve ektodermal bulguların belirgin olması KED’i diğer siliopatilerin çoğundan ayıran özellikler olarak dikkat çekmektedir. Tüm KED hastaları için, böbrek ve karaciğer hastalıkları, çok önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir (5).



Şekil 1. Kranyoektodermal Displazinin (KED) Klinik ve Radyografik Özellikleri. A) Kollarda rizomelik kısalma, dar toraks ve belirgin alın, oküler hipertelorizm ve düşük kulaklarla karakteristik yüz ifadesiyle KED’li yenidoğan B) 16 yaşında interfalangeal şişlik olan kısa, geniş eller C) Genç bir yetişkinde KED yüz özellikleri D) Yenidoğan döneminde rizomeli gösteren röntgen E) Dokuz yaşında kısa falanksları gösteren röntgen. F) Belirgin bir alın ve iki taraflı epikantal kıvrımlar dahil olmak üzere tipik yüz özelliklerine sahip kadın G) Yenidoğan döneminde dolikosefali gösteren röntgen H) Dar göğüs kafesini gösteren röntgen (6).

Nadir bir hastalık olan KED’in kesin sıklığı bilinmemekle birlikte, bugüne kadar literatürde 100’den daha az sayıda hasta tanımlanmıştır. KED, otozomal resesif bir şekilde kalıtılır. Fonksiyonel çalışmalarla desteklenen bazı bildirimlerde KED etiyolojisinde IFT43, IFT52, IFT122, IFT140, WDR19 ve WDR35 genlerinde mutasyonlar tanımlanmıştır. Bugüne kadar KED’li hastalarda tanımlanan patojenik varyantların çoğu, retrograd transportta görev alan IFT-A heksamer protein kompleksinin üyelerini kodlayan genlerde (IFT43, IFT122, IFT140, WDR19 ve WDR35) saptanmıştır.

Anterograd transportta görevli IFT-B kompleksinin bir üyesini kodlayan IFT52 geninde yalnızca bir KED vakasında patojen varyant bildirilmiştir (6).

Mikrodizi analizi, hedefli ve tam ekzom sekanslaması (WES) gibi genetik analizlerde yapılan belirgin ilerlemeler, moleküler heterojenite ve sendromun siliya disfonksiyonundan kaynaklandığını göstermiştir (9).

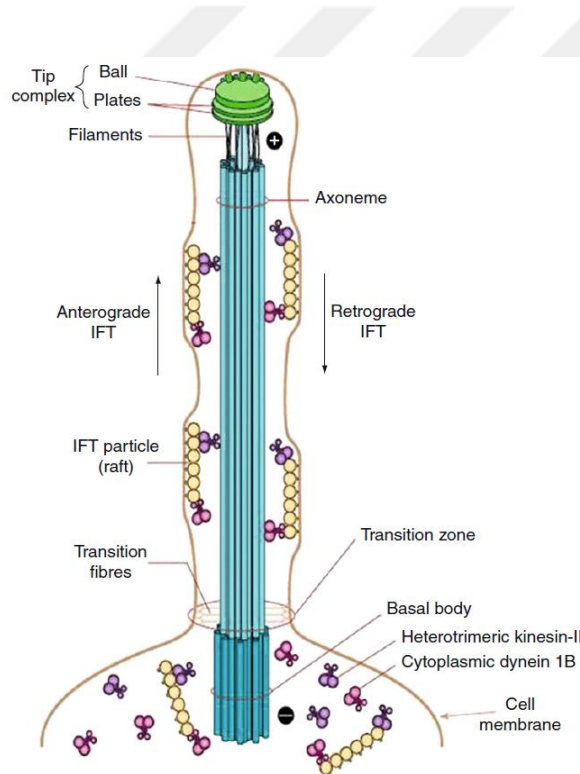
Tablo 2. Kranioektodermal Displazi İle İlişkili Bilinen Genler

Gen	Kromozom Lokusu	Protein	Lokusa Özgü Veritabanları	HGMD	ClinVar
IFT43	14q24.3	Intraflagellar transport protein 43 homolog		IFT43	IFT43
IFT52	20q13.12	Intraflagellar transport protein 52 homolog		IFT52	IFT52
IFT122	3q21.3-q22.1	Intraflagellar transport protein 122 homolog	IFT122 database	IFT122	IFT122
IFT140		Intraflagellar transport protein 140 homolog	IFT140 LOVD	IFT140	IFT140
WDR19	4p14	WD repeat-containing protein 19	WDR19 LOVD	WDR19	WDR19
WDR35	2p24.1	WD repeat-containing protein 35		WDR35	WDR35

2.2. Siliya

Siliyalar, hemen hemen tüm hücre tiplerinin plazma membranından dışarıya doğru uzanan ve mikrotübül bazlı küçük, tüysü çıkıntılara benzeyen organellerdir. Yüksek oranda korunmuş yapılardır ve çok çeşitli türlerde bulunurlar ancak yalnızca omurgalılarda her yerde bulunabileceği gözlemlenir. Siliyalar yapısal olarak bazal gövde, geçiş bölgesi, aksonem, siliyer membran ve siliyer uç olarak alt bölümlere ayrılabilir (Şekil 1). Bu yapılar, sentriol türevli bazal gövdeye sabitlenmiş özel bir plazma membranından oluşurlar ve spesifik bir mikrotübül iskeleti olan aksonem tarafından

desteklenirler (3). Aksonemin en yakın bölgesi olan geçiş bölgesi (transition zone), farklı bir yapıya ve protein bileşimine sahiptir. Bazal gövde, siliyogenezi organize eden ve siliyaları belirli bir yönde sabitleyen bir siliyerin tabanında bulunan özel bir sentriyoldür (9). Burada, bazal gövde ve geçiş bölgesi, sitozolik bileşenlerin ve siliyer membran bileşiminin giriş ve çıkışını kontrol eden "siliyer geçidi" "ciliary gate" oluşturur ve böylece siliyanın sinyal alımı ve iletimi için özelleşmiş bir hücresel bölme yapmış olur. (2, 10). Siliyer proteinler de mikrotübül ile ilişkili (microtubule-associated) kinesin ve dinein tarafından siliyalara taşınmayı beklerken bazal gövdeye kenetlenirler (11). Membranın ve siliyaların iç kısmının protein ve lipid bileşimleri, bir geçirgenlik/difüzyon bariyeri olarak geçiş bölgesinin varlığıyla sırasıyla plazma zarı ve sitoplazmanınkinden ayırt edilir (11).

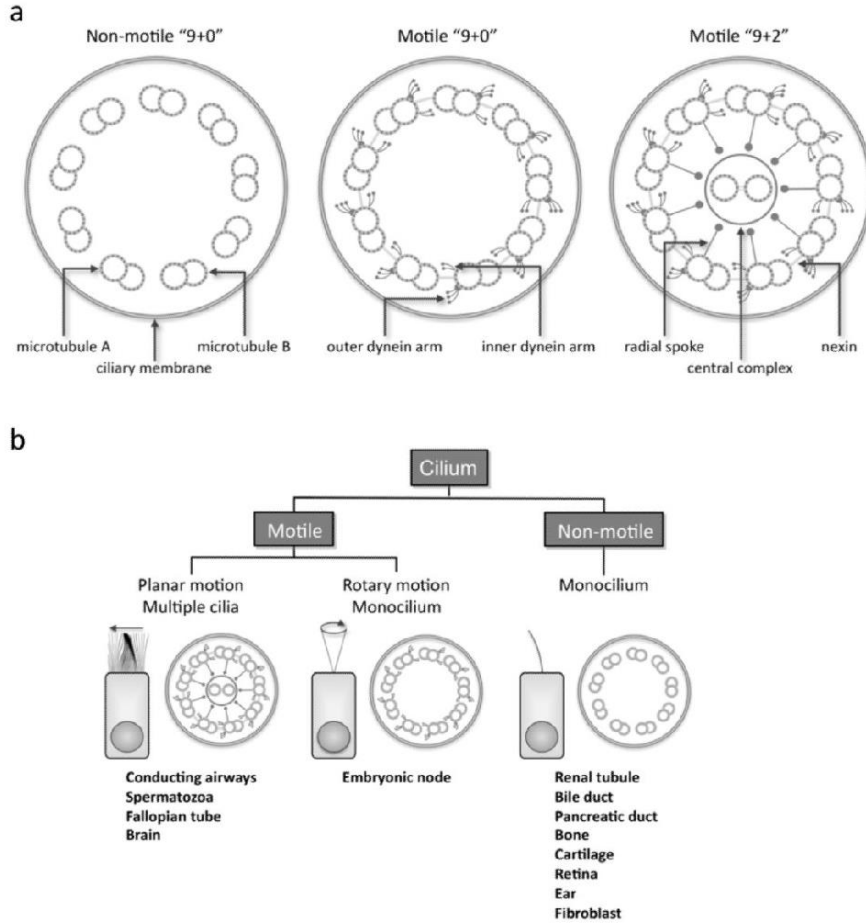


Şekil 2. Siliyumun Yapısı (12).

Siliyalar yaptıkları görevlere istinaden yapısal farklılık gösterirler. Bu yapısal farklılıklarına göre içerdikleri mikrotübül sayılarını ifade eden 3 ana gruba ayrılırlar; “9+2” hareketli, “9+0” hareketli ve “9+0” hareketli olmayan silyalar (13). Hem hareketli hem de duyuşal siliyalar, sarmal protofilamentler halinde düzenlenmiş tübülünin α ve β -monomerlerinden oluşan organize mikrotübül dizilerinden oluşur. Hücre yüzeyinde katlar halinde oluşma ve tek yönlü sıvı akışı sağlamak için birbirleriyle uyum içinde olma

eğilimindedirler. Her mikrotübül ikilisi, 13 tübülün protofilamentlerinden oluşan bir "A" zincirinden ve 10 protofilamentten yapılmış bir "B" zincirinden oluşur (12). Hareketli siliyalar, üst ve alt solunum yollarının apikal yüzeyinde, merkezi sinir sisteminin karıncıklarını kaplayan ependimal hücrelerde, dişi üreme sisteminin yumurta kanallarında ve erkek spermatozoanın flagellumunda bulunur. Bu hareketli siliyalar, karakteristik "9+2" düzeninde, merkezi bir mikrotübül çifti çevreleyen dokuz mikrotübül çifti halinde bulunur. Siliyanın merkezi fibriller demeti, plazma zarı ile sürekli olan bir zarla kaplıdır. A mikrotübülünden kaynaklanan dinein motor proteinleri ağır, orta ve hafif zincirden oluşan karmaşık yapılardır ve çapraz bağlanır. Dinein (dynein) moleküler motorlar olarak hareket eden ve periferik mikrotübüler çiftlerin birbirine kaymasını sağlayan ATPazlar içerirken neksin, bitişik mikrotübüler çiftlerinin nispi hareketini sağlar ve sınırlar. Radial teller (radial spoke) da iç mikrotübül çiftiyle dış kolları birbirine bağlayarak sinyaller ileten dinein aktivitesini kontrol eder, böylece hareketi, ritmik bir vuruşa dönüştürür (12, 13). Bir vuruş (darbe-beat) sırasında, dinein kolları bitişikteki mikrotübül çiftleriyle bir bağlanma, geri çekilme ve serbest bırakma döngüsüne girer, bu da mikrotübül çiftlerinin birbiri üzerinde kayma hareketi ile sonuçlanır. Bazal gövde mikrotübülleri tutturur (anchor) ve nexin bağlantıları, radyal teller ve siliyer membran, mikrotübüller arasındaki kayma derecesini sınırlar, böylece kaymayı siliyer dalga formunun karakteristiği olan bir bükülmeye dönüştürür. "9+2" hareketli siliyalar, ileri ve geri olarak senkronize bir dalga biçiminde vuruş yapar ve bu vuruşun yönü merkezi mikrotübüllerin yönüne bağlıdır. Siliyalarda, normal koşullar altında hava yolunda siliyer vuruş, açıklık bağlantıları (gap junctionlar) yoluyla epitel hücreleri arasındaki kalsiyum sinyali ile koordine edilir. Herhangi bir hareketli siliyanın organize edilmiş hareketindeki karışıklıklar hastalığa yol açabilir (14).

"9+0" mikrotübül düzeniyle hareketli i başka bir türü olan nodal siliyalar embriyonik gelişim sırasında gastrulanın ventral düğümünde(node) yalnızca geçici olarak bulunur. Hareketli nodal siliyalarının 9+0 aksonemleri, merkezi mikrotübüllerden yoksundur, ancak dinein kollarına sahiptir. Hücre dışı sıvının sola akışını yönlendiren dairesel bir dönme hareketi oluşturur ve sol-sağ vücut oryantasyonunu belirlemede hayati bir rol oynar. Burada oluşan anormallikler de lateralite kusurlarına yol açabilir (13, 15).



Şekil 3. Siliyanın yapısal elemanları ve sınıflandırılması. a) "9+2" hareketli, "9+0" hareketli ve "9+0" hareketsiz siliyer aksonemlerin yapısal bileşenlerini gösteren şematik diyagram. b) Hareketli "9+2" siliyaların koordineli eşzamanlı hareketi ile hareketli "9+0" nodal monosiliyumun ve hareketsiz "9+0" birincil monosiliyumun dönme hareketini gösteren farklı siliyaların bulundukları yerler ve sınıflandırılması (13).

2.3. Hareketli Siliyalar

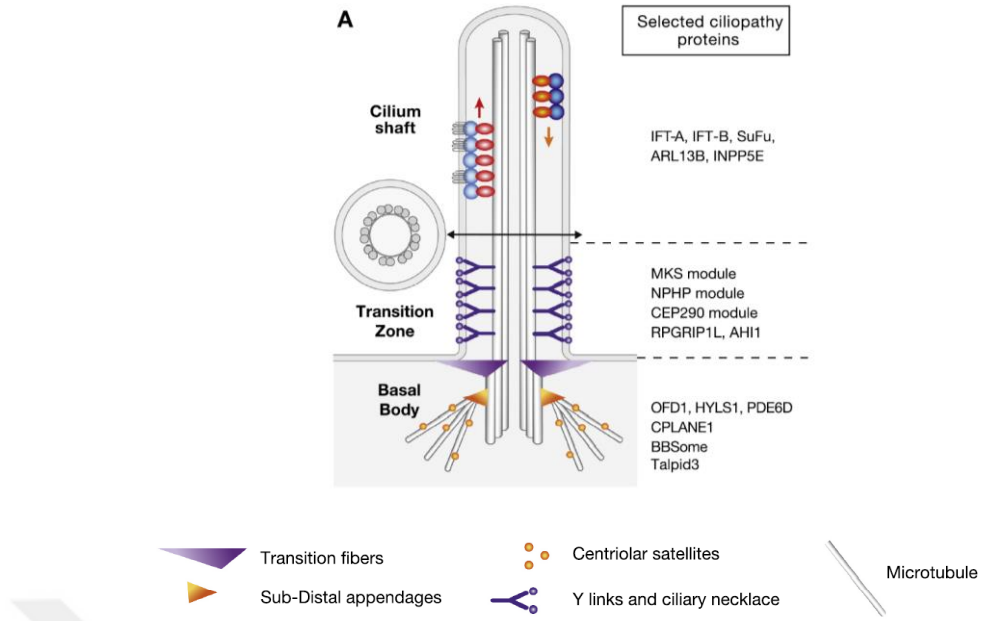
Hareketli (motor) siliyalar solunum yolunun korunması ve akciğer hasarının önlenmesi için oldukça önemlidir. Siliyalı hücreler epitel yüzeyinde biriken bakteri ve partikülleri mekanik olarak ortadan kaldırarak hava yolunu koruyan sistemlere (savunmalara) sahiptir. Siliyer hücreler nazofarenks, orta kulak, paranazal sinüsler ve trakeadan bronşiyollere kadar alt solunum yollarını kaplar. Her siliyalı hücre, yüzeyinden koordineli bir şekilde çıkan yaklaşık 200 silya içerir dolayısıyla ultra-yapısaldırlar. Oryantasyonları, sıvıları, mukus ve solunan yabancı maddeleri vektörel olarak distalden daha çok proksimal hava yollarına hareket ettirerek alt solunum yollarının verimli bir şekilde temizlenmesini sağlar. İletken hava yollarında etkili bir mukosiliyer klirens (mucociliary clearance) elde etmek için, siliyer hareketi, hava yolu yüzey sıvı hacmini, sıvı bileşimini ve makromolekül (örn., müsin) salgısını koordine eder (13). Siliyaların

hareketsiz, hareket kaybı veya hareketlerinde şaşma gibi herhangi bir bozulma, sinopulmoner semptomlarla kendini gösterebilir. Siliyerin karmaşık yapısını oluşturan 400 proteinden herhangi birinde meydana gelen mutasyonlar mukosiliyer klirensin bozulmasına neden olabilir. Dinein kollarının kesilmesi veya yokluğu, primer siliyer diskineziye görülen en yaygın ultra-yapısal anormalliktir ve tanımlanmış ultra-yapısal defektleri olan vakaların yüzde 90'na yakın bir kısmını oluşturur. Mikrotübüler transpozisyon, radyal tel ve neksin bağlantı kusurları, siliyer agenezi ve siliyer oryantasyon bozukluğu da primer siliyer diskineziye sebep olan diğer formlardır (13).

2.4. Hareketsiz (Primer) Siliyalar

Hareketsiz (primer) siliyalar, hemen hemen tüm omurgalı hücrelerinde oluşur ve yalnızca interfaz sırasında meydana gelerek tek bir çıkıntı (siliya) olarak görünür. Primer siliyalar, gelişim ve doku homeostazında önemli olan sinyal yollarına, mekanik uyarılara, kemosenzasyona, ışığa, sıcaklığa yanıt verebilen hücre dışı reseptörleri içerir (16). Primer siliyalar “9+0” düzenine sahiptirler yani sentriyol türevli bir bazal gövdeden uzanan 9 mikrotübül çiftinden oluşan bir silindir yapısındadır ve merkezi mikrotübül çifti ile dinein kollarından yoksundur. Bu nedenle bu yapıları hareketsiz kalır (13,17).

Siliyalar Sonic hedgehog (Shh), TGF-beta, Wnt, PDGFa, Notch, Hippo ve mTOR gibi hem embriyo hem de yetişkinde hücre oluşumunun, davranışının, farklılaşmasının, proliferasyonunun ve hücre döngüsünün birçok önemli yönünü düzenleyen, genetik hastalık veya kanserde bozulan çeşitli sinyal yollarının organizasyonunda önemli rollere sahiptirler. Bu işlevleri yerine getirmek için siliyer zarın spesifik reseptörleri ve iyon kanalları vardır (11). Siliyanın yapısındaki ve işlevindeki kusurlar, birçok doku ve organın gelişimini ve işlevini etkileyen, 'siliyopatiler' olarak adlandırılan pleiotropik, geniş bir yelpazede birçok hastalığa yol açar (18). Körlük, obezite, böbrek fonksiyon bozukluğu, kemik anormallikleri ve zihinsel yetersizlik ile karakterize edilen Bardet-Biedl sendromu ve bu anormalliklerle birlikte arka beyin malformasyonunun (mid-hindbrain malformation) kardinal semptomlarıyla Joubert Sendromu siliyopati hastalıklarına örneklerdir (19). Kültür hücrelerinde, siliyogenez genellikle hücrenin quiescence durumu ile ilişkilidir, ancak embriyolarda, primer siliyalar döngülü progenitör hücrelerde (cycling progenitor cells) de bulunur ve siliyanın birleşmesi ve dağılımı hücre döngüsüne sıkı bir şekilde bağlıdır (20). Gelişmekte olan merkezi sinir sistemindeki primer siliyalar, farklılaşmış nöronların yanı sıra progenitör hücrelerde bulunur.



Şekil 4. İntraflagellar Taşımayı Gösteren Primer Siliya Yapısı ve Siliyopati Proteinleri (22).

İntraflagellar taşıma (IFT), hücre yüzeyinde duyuşal ve sinyali aygıtı olarak görev yapan siliyanın oluşumu ve siliyer işlevi için gereklidir. IFT sistemi, moleküler motorlarla ilişkili IFTA/B ve BBSome kargo adaptörlerinden oluşur ve proteinleri organelle iletmek ve proteinleri organelden çıkarmak için siliyer mikrotübüller boyunca çift yönlü olarak çalışan döngüsel bir süreçtir. Anterograd taşıma siliyaların ucuna doğru yapılır, işlev bozukluğu olan daha uzun veya şişkin kirpiklere yol açarken, retrograde taşıma siliyer tabanına doğru yapılır. Anterograd taşıma, kinesin-2 motoru ve IFT-B kompleksi tarafından yürütülürken, dinein-2 motoru ve IFT-A kompleksi, taşımayı ters yönde düzenler. TULP3 adaptör proteini ile birlikte altı alt birimden oluşan IFT-A kompleksi (6 protein), biyokimyasal olarak çekirdek (IFT122/140/144) ve çekirdek olmayan (IFT43/121/139) alt modüller halinde organize olmuştur ve bu kompleks kargo yüklü retrograd IFT zincirlerinin siliyer uç oluşumunu ve bazı membran proteinlerinin (GPCR gibi) siliyer uca gidişini (ciliary import) düzenler (11). IFT-B kompleksi (16 protein) çekirdek B1 (IFT22/25/2746/52/56/70/81/88) ve periferik B2 (IFT20/38/54/57/80/172) alt komplekslerinden oluşur. BBSome (BBS1/2/4/5/7/8/9 ve BBIP10) ARL6/BBS3 GTPaz ile birlikte sekiz üyeli, üçüncü bir IFT kargo adaptörüdür ve retrograd IFT yoluyla siliyalardan zar proteini çıkarılmasıyla ilişkilidir. Retrograd IFT yoluyla siliyalardan zar proteininin çıkarılmasıyla ilişkilidir ve duyuşal nöronal siliyalarda IFT-A/B kompleks protein trafiğini koordine eder (3, 11, 21) (Şekil 4).

Siliyalarla ilişkili tanımlanan birçok hastalık merkezi sinir sistemini, iskeleti veya diğer organ sistemlerini etkileyen gelişimsel kusurlarla ilgilidir ve bunlara yol açan siliyer fonksiyonda özellikle birkaç sinyal yolağı önemli rol oynamaktadır. Primer siliyer membranı trombosit türevli büyüme faktörü reseptörü (PDGFR), somatostatin reseptörü 3, serotonin reseptörü 5, melanin konsantr edici hormon reseptörü 1, polisistiner 1 ve 2, Hedgehog (Hh) ve Wnt sinyal yollarının bileşenleri dahil olmak üzere bir dizi reseptör ve iyon kanalını içermektedir (23). Bu nedenle, primer siliyumun esas olarak duyuşal bir organel olarak işlev gördüğü kabul edilmektedir (24). Duyuşal organeller olarak işlev gören primer siliyalar için koku alma organlarında bulunan duyuşal siliyalar ve fotoreseptörlerinin dış bölümleri örneklerindendir. İkincisi, başlangıçta gözün gelişimi sırasında primer silyalardan oluşur ve diğer silya türlerinin geçiş bölgesine işlevsel ve yapısal olarak eşdeğer olan kısa bir "bağlayıcı silyum" ile yetişkin retinasındaki iç segmente bağlı kalır. Fotoreseptörlerin dış bölümü yüksek bir hızda döner ve bu nedenle büyük miktarlarda foto transdüksiyon proteini, esas olarak intraflagellar taşıma (IFT) mekanizmasıyla (süreciyle) sürekli olarak içten dış bölüme taşınır. IFT'deki kusurlar, foto transdüksiyon proteinlerinin içten dış segmente taşınmasını bozar ve dış segmentlerin dejenerasyonuna yol açar, sonuçta körlükle sonuçlanır (25). Benzer şekilde, siliyumun koku alma nöronları üzerindeki disfonksiyonu anosmiye yol açar ve bunların dejenerasyonuna yol açar (24).

PDGF'ler ve PDGFR'ler yoluyla sinyalizasyon, kanser, vasküler bozukluklar ve fibroz dahil olmak üzere bir dizi hastalığa neden olan bozukluklarla birlikte, gastrulasyon, fetal gelişim ve dokuların korunması sırasında hücre sağ kalımı, büyüme kontrolü ve hücre göçünde önemli bir rol oynar (26). Fibroblast primer siliyum yoluyla sinyal gönderen PDGFR, doku homeostazında önemli olabilirken, bu yoldaki bozulmalar onkogeneze yol açabilir. Bu sayede fibroblast primer siliyumu, yönlü göçü ve PDGFR aracılı kemotaksiyi koordine eden hücreşel bir GPS işlevi görebilir (24).

Primer siliyalar, hücre hareket ettikçe hücre dışı matris (ECM) proteinleri ile doğrudan etkileşime girerek mekanik bilgiyi dış ortamdaki hücreye iletebilir. Vasküler düz kas hücrelerinde, PKD1, PKD2 ve integrinler içeren primer siliyalar hücre-ECM etkileşimi ve siliyaların ECM'ye doğru çıkıntı yapmasına ve potansiyel olarak yara iyileşmesini kontrol etmesine izin veren mekanik algılama için kritik öneme sahiptir [96]. Ayrıca, kondrositlerde primer siliyalar, spesifik ECM reseptörleri aracılığıyla ECM bileşenleri ile doğrudan fiziksel temas kurar, bu da mekanik uyarıların doku gelişimini

kontrol etmek ve mekanik olarak sağlam bir iskelet sistemi oluşturmak için siliyum yoluyla iletebileceğini düşündürür (27, 28).

Siliyalarda hedgehog (Hh) sinyalizasyonu, intraflagellar taşıma mekanizmasını içerir ve bu transport mekanizması Hh sinyal yolağının bileşenlerini fonksiyonel bölgelerine doğru hareket ettirilmesini sağlar. Memelilerde, Hh sinyalinin ana hedefleri glioma (GLI) transkripsiyon faktörleri GLI1, GLI2 ve GLI3'tür (3). Hh sinyalizasyonunun içerdiği IFT mekanizmasıyla transkripsiyon faktörleri glioma (GLI) ve birleştirilmiş süpresörler (suppressor of fused) (SUFU) siliyer uca taşınır. IFT mekanizması, Hh reseptörü Patched-1'in aşağısında ve Hh'nin doğrudan transkripsiyonel hedeflerinin yukarısında (Upstream) Hh sinyali için esastır. Patched-1'e Hh bağlanmasının yokluğunda, düzleştirilmiş (SMO) Patched-1'den salınmaz ve bu nedenle GLI3 sürekli olarak proteolitik olarak baskılayıcı (repressor) GLI3R'ye bölünür. Hh ligandının Patched-1 (PTCH1) reseptörüne bağlanmasıyla düzleştirilmiş (smoothened) (SMO) serbest bırakılır ve SUFU ile etkileşime girerek GLI işlemeyi kapattığı siliyer uca taşınır. GLI transkripsiyon faktörünün aktivatör formu hücre gövdesine taşınır ve çekirdeğe girer. Burada GLI, renal patern (PAX2, SALL1) oluşturma, hücre döngüsü regülasyonu (CCND1 (cyclin D1), N-MYC), GLI ailesi üyelerinin kendileri (GLI1, GLI2) ve PTCH1 (self induction) ile ilgili olanlar gibi genlerin ekspresyonunu indükler (3). Hedgehog sinyal yolağının aktivite kaybı sonucunda holoprosensefali, polidaktili, kraniofasial kusurlar ve iskelet malformasyonları dahil olmak üzere çeşitli doğum kusurları meydana gelebilir (29).

Primer siliyum hücre proliferasyonunu, hücre kaderinin belirlenmesini ve göçü (migration) düzenleyen Wnt sinyalizasyonunda da rol oynamaktadır. Wnt sinyalleri en az üç farklı yolağa bölünür ve hepsi Wnt ailesinin bir ligandının bir 7-transmembran Frizzled (Fz) reseptörüne bağlanmasıyla başlar. Kanonik Wnt sinyali, transkripsiyonel bir koaktivatör olarak hizmet eden ve sırayla hücre döngüsü ilerlemesini, çoğalmasını, farklılaşmasını ve büyümesini indükleyen katenin'in dağınık (Dvl, dishevelled) aracılı stabilizasyonunu içerir ve ayrıca embriyonik gelişimin düzenlenmesini ve göçünü sağlar. Kanonik olmayan veya kateninden bağımsız Wnt sinyal yolları, örneğin gastrulasyon ve nörolasyon sırasında yakınsama uzantısı (convergence extension) için gerekli olan hücre polariteyi, göçü ve PCP'yi kontrol etmek için aPCK, CamK ve JNK aracılığıyla hareket eder. Kanonik olmayan veya kateninden bağımsız Wnt sinyal yolları, örneğin gastrulasyon ve nörolasyon sırasında yakınsama uzantısı (convergence extension) için

gerekli olan hücreyel polariteyi, göçü ve PCP'yi kontrol etmede görev almaktadır [30]. Degredasyon kompleksi üyeleri GSK-3 ve APC'ye ek olarak PCP proteinleri inversin, Vangl-2 ve Fat4'ün siliyer/bazal vücut lokalizasyonu nedeniyle, primer siliyum ve bazal gövdeye hem kanonik hem de kanonik olmayan Wnt sinyal yollarının düzenlenmesinde bir rol verilmiştir (3).

Siliya aracılı sinyalizasyon, kanonik Wnt ve PCP yolağı olarak da bilinen kanonik olmayan Wnt sinyal yolları arasında bir geçiş (anahtar-switch) görevi görür. Evrimsel olarak korunan PCP yolağı, hücre göçü veya mitotik iğ oryantasyonu gibi hücreyel süreçleri kontrol ederek bir hücre katmanı düzleminde polaritenin gelişmesine katkıda bulunur (31).

Kanonik olmayan Wnt yolağının mutantlarında gözlemlenen fenotipler ile siliya ile ilişkili olan Bardet-Biedl sendromuna (BBS) yol açan Bbs1, Bbs4 veya Bbs6 (Mkks olarak da bilinen ve McKusick-Kaufman sendromu proteinini kodlayan) genlerindeki mutasyonların sebep olduğu fenotipler benzerlik sergiler. Bunlar arasında açık göz kapakları, nöral tüp defektleri ve bozulmuş koklear stereosiliyer demetler bulunur (30). Yapılan çalışmalarda PCP proteini VANGL2'nin BBS proteinleri ile bazal gövdeye ve siliyer aksoneme kolokelize olduğu gözlemlenmiştir bu da siliyaların PCP sinyalizasyonuna dahil olduğunu göstermektedir. Meckel-Gruber sendromu (MKS type 1–3) proksimal nöral tüp defektleri (ensefaloseller) ile ilişkili olan otozomal resesif ölümcül bir malformasyon bozukluğudur ve MKS1 ve MKS3'teki mutasyonları ile ilişkilidir. Embriyogenez sırasında nöral tüpün kapanması, polarize epitel hücrelerinin apikal-bazal eksene dik tek bir düzlemde oryantasyonunu ve ayrıca gelişim sırasında dokuların daralmasına ve uzamasına yol açan yakınsak uzantıyı gerektirir. Bu nedenle, kusurlu siliya aracılı sinyalleme nedeniyle PCP yolunun bozulması, nöral tüp kusurlarını açıklayabilir (3).

2.5. Siliyopati

Sensöryal görevleri ve sinyal iletim yolları ile ilişkileri sebebiyle önemli hücreyel fonksiyonları olan siliyaların fonksiyonel ve yapısal problemleri siliyopati olarak bilinen hastalıklara neden olmaktadır. Bu problemler siliyogenez, siliar protein iletimi, siliyer sinyalizasyon, duyuşsal algı bozukluğu gibi birçok süreçle ilişkilendirilebilir (22). Siliyopati grubu hastalıkları çoğunlukla hareketsiz (primer)

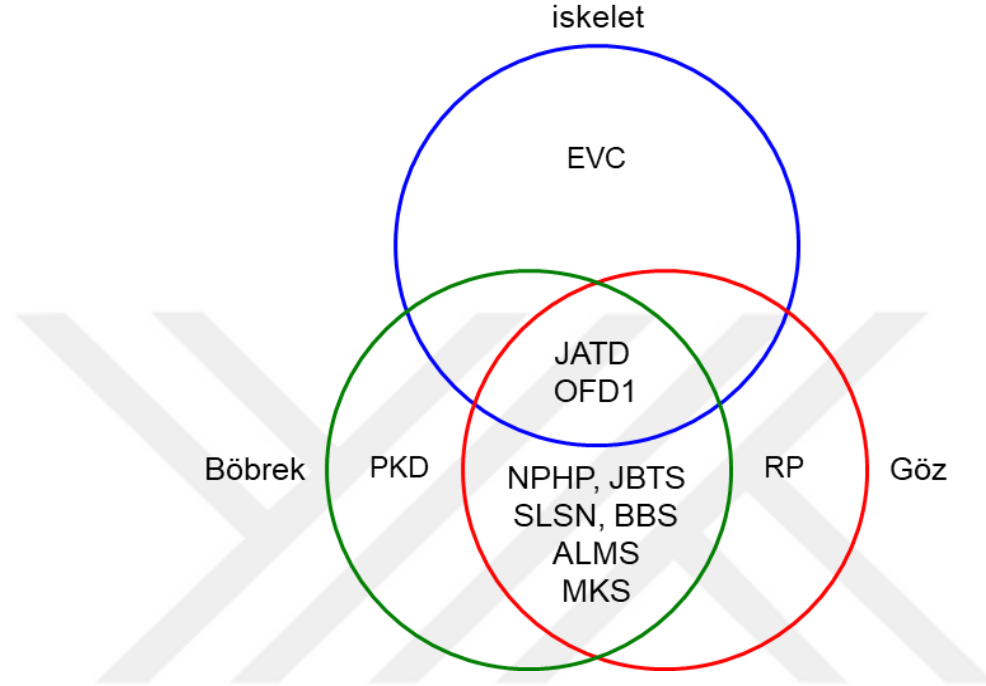
siliyaların disfonksiyonunu temsil ederken, hareketli siliyaların disfonksiyonunu primer siliyer diskinezi grubu hastalıklar temsil etmektedir. Yapısal ve düzenleyici molekülleri kodlayan genler dahil olmak üzere siliya genlerinin hepsini ortaya çıkarmak için büyük çaba gösterilse de, hala tüm siliya genlerini içeren bir listeye sahip olmaktan çok uzaktayız. Siliyopati tanısı sadece klinik verilerle konulabilen ve genetik alt yapısı belirlenemeyen hastaların oranı, tüm siliyopati hastalarına oranı %25-30 seviyesindedir.

Primer siliyalardan kaynaklanan siliyopatiler geniş bir organ-sistem etkilenimine yol açabilmektedir. Siliyopatilerin izole veya çoklu organ sistem tutulumları ile giden birçok farklı tipi bulunmaktadır. Retinal distrofi, anozmi, işitme kaybı gibi sensöryel problemler, ataksi, epilepsi, entelektüel yetersizlik, çeşitli beyin malformasyonları gibi sinir sistemi problemleri, ilerleyici disfonksiyonlara sebep olabilen böbrek ve karaciğer hastalıkları, parmak anomalileri ve toraks deformiteleri gibi iskelet sistemi anomalileri ve enerji homeostazi bozuklukları primer siliyaların disfonksiyonu sonucu oluşabilen çoklu sistem etkilenimi tablosu içerisinde bulunabilmektedir (32, 33). Joubert sendromu, Bardet-Biedl sendromu, Senior-Loken sendromu, polikistik böbrek hastalığı, Retinitis pigmentosa, Meckel-Gruber sendromu (MKS), nefronofitizis (NPHP), siliyopati hastalıklarından bazılarıdır (34, 35, 36).

Tablo 3. Siliyopatilerin Ortak Klinik Özellikleri

Özellikler	BB S	MK S	JBT S	NPH P	SLS N	JAT D	OFD 1	EV C	ALM S	PK D
Böbrek Kistleri	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓
Hepatobiliyer Hastalık	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓
Yanal kusurlar	✓	✓		✓		✓				
Polidaktili	✓	✓	✓			✓	✓	✓		
Karpus Kallosum Agenezisi	✓	✓	✓			✓	✓		✓	
Kognitif Bozukluk	✓	✓	✓			✓	✓	✓		
Retina Dejenerasyonu	✓	✓	✓		✓	✓			✓	
Posterior Fossa Defektleri/Ensefalosel	✓	✓	✓			✓		✓		
İskelet Kemliği Kusurları						✓	✓	✓		
Obezite	✓								✓	

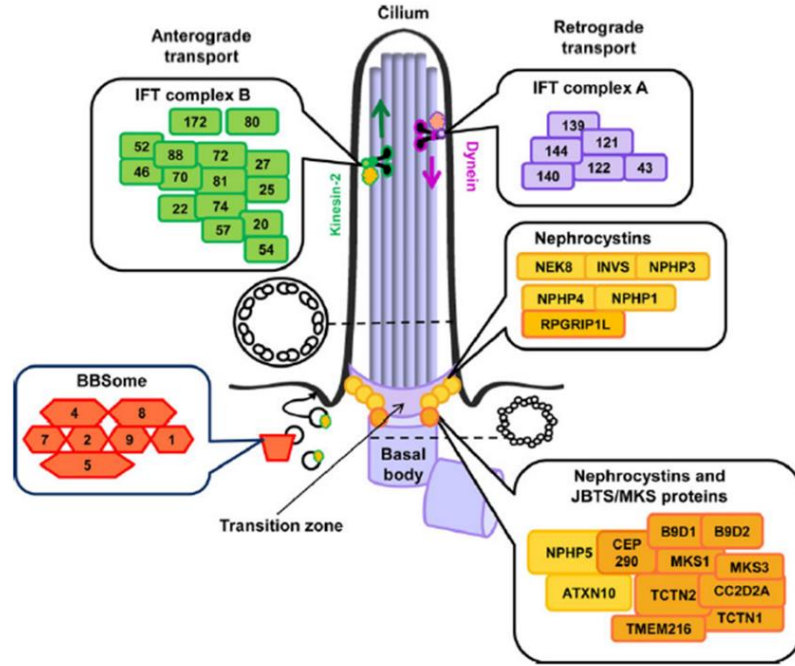
BBS: Bardet-Biedl Sendromu; MKS: Meckel Sendromu; JBTS: Joubert Sendromu; NPHP: Nefroftiz; SLSN: Senior-Løken Sendromu; JATD: Jeune Sendromu; OFD1: Oro-Yüz-Dijital Sendrom Tip 1; EVC: Ellis Van Creveld Sendromu; ALMS: Alstrom Sendromu; PKD: Polikistik Böbrek Hastalığı (12).



Şekil 5. Çok Çeşitli Klinik Özellikleri Olan Siliyopatiler Arasındaki Klinik Örtüşme (12).

Hastalıkla ilgili proteinlerin çoğu siliyumun kendisinde değil, tabanında, bazal gövdede, geçiş bölgesinde veya sentrozomda ifade edilir. Bununla birlikte, ortak fenotip muhtemelen yetersiz siliyer sinyalizasyondan kaynaklanmaktadır (37). Siliya üzerindeki geçiş bölgesi proteinleri, farklı model sistemlerde fiziksel ve genetik etkileşimlerine göre gruplandırılmış MKS, NPHP ve CEP290 modülleri adı verilen üç ana modül oluşturur. Geçiş bölgesinin birleşim ve geçit işlevi için iş birliği yapan çözünür ve zarla ilişkili proteinlerden oluşurlar. Diğer şiddetli siliyopati proteinleri aksonemde lokalizedir ve ARL13B, INPP5E veya PDE6D gibi siliyer sinyalizasyonda yer alır (2). Bazal vücut proteinlerini etkileyen mutasyonlar da siliyopatilere yol açar. Örneğin, Oro-Facial-Dijital sendromu tip 1 (OFD1, OMIM 311200), sık beyin malformasyonlarıyla X'e bağlı baskın(dominant) bir siliopatidir ve siliogenezin düzenlenmesinde rol oynayan bazal bir gövdeyi ve sentriolar uydu proteinini kodlayan OFD1 genindeki mutasyonlardan kaynaklanır (38). HYLS1 gibi bazal gövdenin distal bölgesinin bileşenlerindeki

mutasyonlar, hidrosefali ve beyin kusurları (Finnish hydrolethalus syndrome, HLS) veya JBTS üretir [39]. Not olarak, bu siliyopati proteinlerinin çoğu, geçiş bölgesi, bazal gövde, siliyer shaft (cilium shaft), sentriolar uyduklar (centriolar satellites) veya hücre bağlantıları (cell junctions) gibi hücre tipine veya hücre durumuna bağlı olarak çeşitli yerlerde bulunabilir (38) bu da kısmen, işlevlerinin çeşitliliğini ve karmaşıklığını ve işlev bozukluklarına bağlı geniş fenotipik spektrumu açıklayabilir (22).



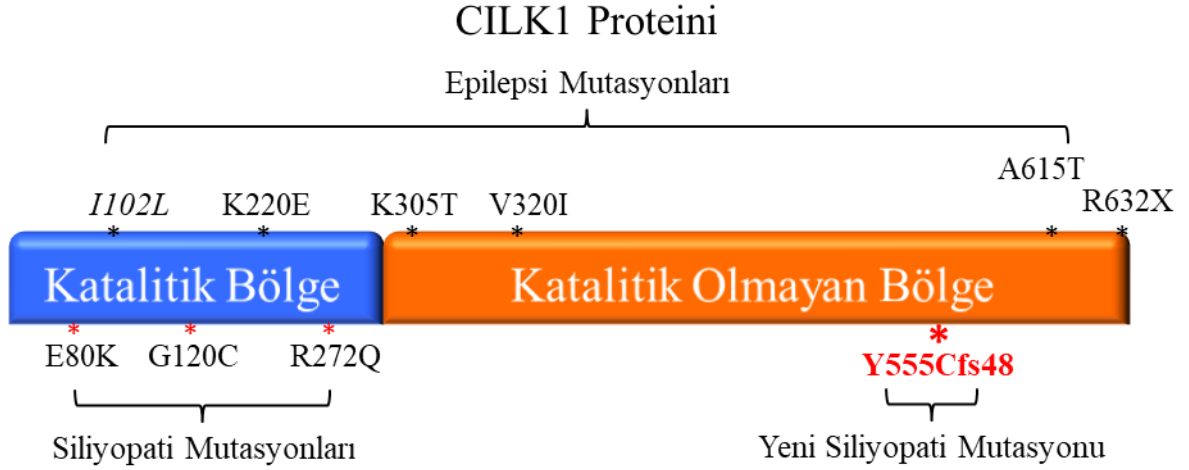
Şekil 6. Siliyer Protein Kompleksleri (40).

Farklı tipler arasında klinik benzerlikler bulunmasının yanı sıra siliyopatilerle ilişkilendirilmiş genlerin çoğu birden fazla siliyopati kliniği ile de ilişkilendirilmiştir. Siliya biyogenezi ile ilgili proteinlerin sayısının 300'den fazla olduğu tahmin edilirken siliyopatilerle ilişkilendirilmiş gen sayısı 180'in üzerindedir. Yeni nesil dizileme teknolojilerinin ve kollaboratif çalışmaların yaygınlaşması sayesinde genetik ve klinik heterojenitenin fazla olduğu bu hastalık ailesinin etiyolojisinde her geçen gün yeni genler ve yeni genotip-fenotip ilişkileri açığa çıkarılmaktadır. Klinikte siliyopati tanısı konulabilen, altında tanımlanmış genetik bir malformasyon olmayan hasta oranı yaklaşık olarak %30 oranındadır. Bu nedenle yeni genlerin ve mutasyonların tanımlanması oldukça önemlidir.

2.6. Siliyogenezle İlişkili Kinaz 1 (CCLK1)

CCLK1 yaygın olarak eksprese edilen, yüksek oranda korunan ve mitojenle aktive olan bir serin/treonin protein kinazdır. İlk olarak bağırsak hücrelerinden klonlandığı için bağırsak hücre kinazı (Intestinal Cell Kinase-ICK) adını almıştır fakat daha sonra her yerde ifade edilebildiği ve sıklıkla siliyaların distal ucunda bulunduğu gösterilmiştir. Eksikliğinin siliyaların uzamasına yol açtığı ve insanlarda siliyopatilere neden olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, ICK'nin siliyer uca nasıl taşındığı hakkında çok az şey bilinmektedir. HUGO gen terminoloji komitesi tarafından da silyogenezdeki evrimsel olarak korunmuş işlevini iletmek amacıyla gen adı ve sembolü bağırsak hücre kinazından (ICK) silyogenezle ilişkili kinaz 1'e (CCLK1) değiştirilmiştir (41).

İnsan kinomunun büyük CMGC (CDK/MAPK/GSK/CLK) dalı, RCK (v-ros cross-hybridizing kinaz) adlı alt grubu içerir (1). Bu RCK protein kinazları ICK/MRK (intestinal cell kinase/MAK-related kinase), MAK (male germ cell-associated kinase) ve MOK'tan oluşur (MAPK/MAK/MRK-overlapping kinase) (41, 42). CCLK1, biyolojik fonksiyonların ve sinyal mekanizmalarının araştırılması için N-terminal katalitik alanında hem mitojenle aktive olan protein kinazlar (MAPK'ler) hem de sikline bağımlı protein kinazlar (CDK'ler) ile benzerlikleri olan bu kinazlar grubu için prototiptir. CCLK1, CCRK (hücre döngüsü ile ilgili kinaz) olarak da bilinen bir upstream activating kinaz CDK20 (sikline bağımlı kinaz 20) tarafından aktivasyon döngüsündeki MAPK benzeri TDY motifinin fosforilasyonu ile aktive edilir (43). N-ucuna yakın CDK benzeri düzenleyici bölgesi Tyr15'in fosforilasyonu ile kısmen inaktive edilir. CCLK1, substrat bağlanması ve siliyaları hedeflemek için bir katalitik olmayan C-terminal alanına (CTD) (intrinsically unstructured non-catalytic C-terminal domain (CTD)) sahiptir (41). KIF3A, Scythe ve mTORC1 gibi CCLK1 için aday substratlar (candidate substrates) ortaya çıkmıştır (44, 45).

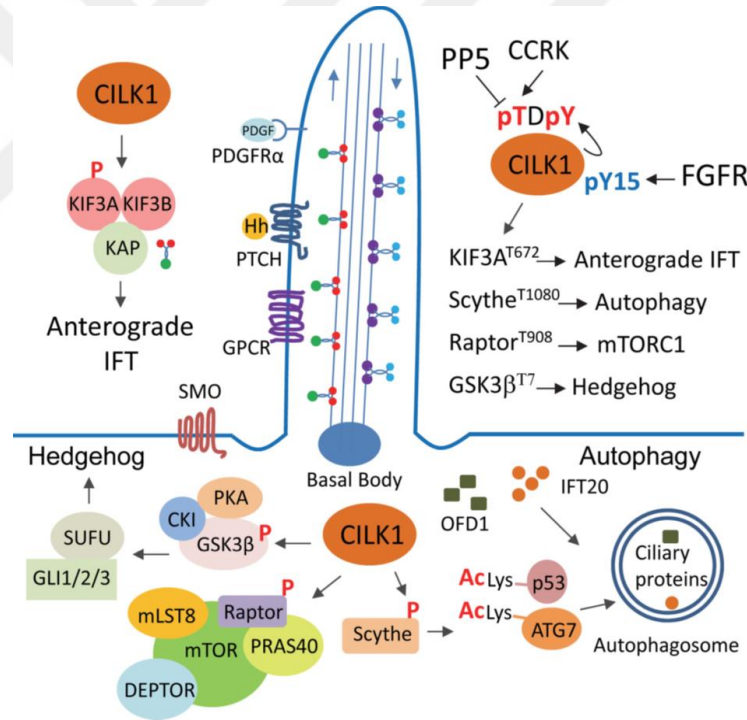


Şekil 7. Siliyogenez İle İlişkili Kinaz 1 (CILK1) Proteinin Yapısı. Epilepsi mutasyonları (siyah) ve siliyopati mutasyonlarına (kırmızı) ek olarak Kraniyoektodermal Displaziye neden olan yeni siliyopati mutasyonu da gösterilmektedir (45'ten uyarlanmıştır).

CILK1 geninin kodladığı serin/treonin-protein kinaz proteini N-terminal bölgesindeki kinaz domaininin proteinin katalitik fonksiyonlarına aracılık etmektedir. Bu bölgenin fonksiyonlarını etkileyen bazı yanlış anlamalı varyantlar (p.R272Q ve p.G120C) homozigot durumda; endokrin sistem etklenimi, serebral anomaliler ve osteodisplaziye içeren erken neonatal dönemde letal seyirli bir hastalık olan “Endokrin-serebroosteodisplazi (OMIM #612651)” ile ilişkilendirilmiştir (7). Yine kinaz domaininde yerleşen ve fonksiyon kaybına yol açan başka bir homozigot yanlış anlamalı varyant (p.E80K) erken letal seyirli başka bir iskelet displazisi olan kısa kot-polidaktili sendromu ile ilişkilendirilmiştir. Bunların dışında CILK1'in patojenik varyantları juvenil miyoklonik epilepsi (JME) ile de ilişkilendirilmiştir (46). CILK1'in JME varyantları, mitoz, hücre döngüsü çıkışı ve göç(migration) gibi nöronal hücre aktivitelerinin bozulmasına sebep olmaktadır (45). Serin/treonin-protein kinaz ICK proteininin N-terminal bölgesindeki kinaz domaininin fonksiyonel özellikleri ve ilişkili olduğu hastalık klinikleri biliniyor olsa da, proteinin C-terminal bölgesindeki non-katalitik domain ile ilgili bilgiler kısıtlıdır.

IFT-B aracılı anterograd trafficking ve IFT-A aracılı retrograd trafficking mekanizmaları karşılaştırıldığında, IFT mekanizmasının yeniden modellendiği ve anterograd kinesin-2 motorunun retrograd dinein-2 motoruyla değiştirildiği yer olan siliyer ucundaki geri dönüş(turnaround) olayı hakkında çok az şey bilinmektedir (47, 48). Mitojenle aktive olan protein kinaz superailisine ait ICK-CILK1, geri dönüş olayının

(turnaround event) bir aday anahtar düzenleyicisidir (49). ICK'nin C-terminal katalitik olmayan bölgesi, IFT makinesinin intraflagellar taşıma (IFT) –B kompleksi ile etkileşime girer ve siliyer ucuna taşınmasına katılır. Total internal reflection floresan mikroskopuyla, ICK'nin, IFT parçacıklarına (particles-trains) benzer şekilde siliyalar içinde çift yönlü harekete geçtiği gösterilmiştir. ICK eksikliğinde, IFT partiküllerinin ve siliyer G proteini-bağlı reseptörlerin geriye dönük ticaretini (retrograde trafficking) ciddi şekilde bozduğu ve siliyer proteinlerin, yırtılmış (torn off) ve hücre dışı bir vezikül olarak çevreye salınmış gibi görünen şişkin siliyer ucunda biriktiği gösterilmiştir. ICK nakavt hücrelerde çeşitli ICK yapılarının ekzojen ekspresyonu, ICK'nin IFT'ye bağlı taşınmasının yanı sıra kinaz aktivitesi ve kanonik TDY motifindeki fosforilasyonunun ICK işlevi için gerekli olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, siliyer ucuna taşınan ICK'nin retrograd siliyer protein iletimi ve dolayısıyla normal siliyer fonksiyon için gerekli olduğu kesin olarak gösterilmiştir (11).



Şekil 8. CILK1 Sinyalizasyonunun İşleyen Bir Modeli. CILK1'in aktivitesi, TDY motifinin ve korunmuş N-terminal düzenleyici bölge Tyr15'in fosforilasyonu ile düzenlenebilir. CILK1'in bu sinyalizasyonda nasıl düzenlendiği büyük ölçüde bilinmemektedir. KIF3A, Scythe, Raptor ve GSK3β olmak üzere CILK1 için potansiyel olarak CILK1'in siliya yapısı, sinyalizasyonu ve fonksiyon üzerindeki etkisine aracılık edebilen dört aday substrat tanımlanmıştır (41).

Tablo 4. Çok Organlı Sistemlerde CILK1 Fonksiyon Bozukluğu Fenotipleri

Organlar	Majör Klinik Anormallikler	Gelişimsel ve Hücresel Kusurlar
Beyin	Holoprosensefali, Hidrosefali, Korpus Kallosum hipoplazisi, Anormal serebral korteks	Nöronal progenitör hücrelerinin büyümesi ve aktivitesinde azalma, nöral progenitör hücreler kusurlu radyal migrasyonu, kusurlu doğum sonrası nörogenez
Akciğer	Hipoplazi solunum sıkıntısı hava boşluğu eksikliği	Azaltılmış sakküler alana sahip anormal ilkel alveoller, azalmış dallanma ve mezenkimal proliferasyon, hiperselüler interstisyum ve anormal mezenkimal farklılaşma
İskelet	Polidaktili, Kısa kaburgalar, Eğri uzuvlar, Kısalmış ve hipoplastik uzun kemikler, Kusurlu intervertebral disk ile deforme olmuş omurga	Epifizyal plak yapısının bozulması, kısaltılmış proliferatif bölge(zon) ve yetersiz oluşturulmuş hipertrofik bölge, azaltılmış mineralizasyon ve azaltılmış tip X kollajen eksprese eden hipertrofik kondrosit sayısı, kusurlu kondrosit farklılaşması ve olgunlaşması
Koklea İç Kulak	Bozulmuş işitsel fonksiyon	Tüylü hücrelerde düzlemsel hücre polaritesinde bozulma, stereocilia'nın yanlış yönelimi ve kinocilium'un anormal pozisyonu
Kalp	Ventriküler septal defekt (sadece bir vaka)	Açıklama yok, az çalışılmış
Böbrek	Büyük ve hiperekojenik böbrekler	Korteks ve medullada değişken ölçüde kistik olarak genişlemiş tübüller
Endokrin Bezleri	Eksik veya hipoplastik adrenal ve hipofiz bezleri	Açıklama yok, az çalışılmış

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kimyasallar

Tablo 5. Kimyasallar

Bileşenler	Marka
Hücre Kültürü Besiyeri	Gibco™ Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)
Serum	Gibco™ Fetal Bovine Serum
Pen/Strep	100X Gibco™ Penicillin/Streptomycin
Trypsin	BioShop, TRYPsin, 1:250 Porcine Pancreas
Hücre Yıkama Solüsyonu (PBS)	Gibco™ DPBS, No calcium, No magnesium Catalog no: 14190144
TAE Buffer	Tris-Acetate-EDTA, 50X Solution, Fisher BioReagents
Etidyum Bromür	Ethidium Bromide, Fisher BioReagents
Yükleme Boyası	5x DNA Loading Buffer Blue, Bioline
DNA Ladder	HyperLadder™ 1kb, Bioline
Agaroz	Agarose, Fisher BioReagents
Kanamisin	Kanamycin A. sulfate, Enzo
Gliserol	BioFroxx
Poly-D-Lysine	Poly-D-lysine hydrobromide (SIGMA-ALDRICH, Cat No: P7405)
Triton X-100	BioShop, Biotechnology Grade, TRITON X-100
Tween20	Merck Tween20
Primer Antikor	Cell Signalling Technology, Acetyl- α -Tubulin (Lys40) (D20G3) XP® Rabbit mAb Catalog No: 5335 Proteintech, ARL13B antibody (17711-1-AP) Proteintech, IFT88 antibody (13967-1-AP)
Sekonder Antikor	Invitrogen, Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody Katalog No: A32740 Invitrogen, Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor Plus 488 Katalog No: A32731
DAPI	Sigma-Aldrich, DAPI, Katalog No: D9542
Serum (ICC için)	Gibco™ Goat Serum, Katalog No: 16210072
BSA	Gibco™ Bovine Albumin Fraction V (7.5% solution)
Paraformaldehit	Merck, Paraformaldehyde
Sükroz	Merck, Sucrose
NaOH	Merck, Sodium Hydroxide
Fluoromount	Invitrogen™, Fluoromount-G™ Mounting Medium
DMSO	BioShop, Dimethyl Sulfoxide (DMSO)
NaCl	Merck Sodium chloride
KCl	BioFroxx, Potassium Chloride

MgSO₄	VWR, Magnesium Sulfate
KH₂PO₄	Bioshop, Potassium Phosphate Monobasic
Na₂HPO₄	BioShop, Sodium Phosphate Dibasic
D-Glucose	Merck, D-(+)-Glucose
Yeast	BioFroxx
Dekstroz	Dextrose, Sigma
EDTA	
Alkol	Merck, Absolute Ethanol Alkomed, 96% Ethanol

3.1.2. Ekipmanlar

Tablo 6. Ekipmanlar

Ekipmanlar	Marka
Laminar Flow Hood	Herasafe™ KS, Class II Biological Safety Cabinet
Işık Mikroskopu	Carl ZEISS Primovert Light Microscope
Floresan Mikroskop	ZEISS Axio Vert.A1
Vakum	Fluid Aspiration Systems, ISOLAB, Rocker 300 Vakum Pompası
Real Time PCR Cihazı	Applied Biosystems, QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Instrument (A28134)
Falcon tubes	Conical Centrifuge Tube, SPL
Su Banyosu	BIOBASE, Water Bath
Isı Döngüleyici	T100™ Thermal Cycler, BIORAD
UV Transillüminatör	Benchtop UV Transilluminators by UVP, DNR MiniBis Pro
Elektroforez Sistemi	Thermo Scientific Owl EasyCast B2 Gel System
Güç Kaynağı	Biorad PowerPac 300 Electrophoresis Power Supply
Mikrodalga	Arçelik MD 674 Microwave
Çalkalayıcı	Labwit ZWY-100H Laboratory Shaker Incubator
İnkübatör	BINDER, CO ₂ Incubator
Hassas Terazî	Electronic Analytical Balance, BIOBASE

Bilgisayar	Casper, Philips
Sıvı Nitrojen Tankı	Thermo Scientific™, Locator™ Cryogenic Rack and Box System
Kültür Kabı	FALCON, SUNUB, SPL
Pipet	EPPENDORF EASYPET 3
Distile Su Cihazı	Mili-Q water, ELIX water and Distilled water
Lam	ISOLAB
Lamel	ISOLAB
Mini Santrifüj	BIOBASE, Mini-7
Santrifüj	Beckman Coulter Allegra X-15R, Hettich® MIKRO 120 centrifuge
Santrifüj Tüpleri	Axygen® Microcentrifuge Tubes, Sarstedt Microcentrifuge Tubes
Pipet Uçları	VWR, Eppendorf, LLG
Pipet Takımları	Corning® Lambda™ Plus, Nichipet EXII
Vorteks	BIOBASE, Vortex/Mixer Fixed Speed MX-S
Isı Bloğu	BIOBASE, Heating Dry Bath
pH Metre	BIOBASE, PHS-3BW Benchtop pH Meter
Spektrofotometre, Nanodrop	DeNovix DS-11 Spectrophotometer
Eldivenler	Beybi, Dolphin
Hemositometre	Counting chambers with V-slash, MARIENFELD
Otoklav	Nüve, Ot 90L Otoklav
Buz Cihazı	Scotsman, AF 80 Kar Buz Makinesi
Buzdolabı	Grundig GFSE 6240
Dondurucu	Haier -86 °C Derin Dondurucu, DW-86L628
Şırınga Filtresi	VWR® Syringe Filters 0.2 µm, 0.45 µm
Serolojik Pipet	SPL
Rotatör	BIOBASE MX-RD-Pro, Rotator Rotating Mixer Laboratory
Manyetik Karıştırıcı	BIOBASE, Hotplate Magnetic Stirrer BS-4H

3.1.3. Kitler

Tablo 7. Kitler

Kitler	Marka
Total RNA İzolasyon Kiti	Thermo Scientific™ GeneJET RNA Purification Kit (Catalog number: K0731)
cDNA Sentez Kiti	Applied Biosystems™ High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Catalog number: 4368814)
Real Time PCR Kiti	Promega, GoTaq® qPCR Master Mix (A6001)
Polimeraz Zincir Reaksiyonu Kiti (PCR)	TransStart® FastPfu DNA Polimeraz (TRANS, Kat No: AP221)
PCR Pürifikasyon Kiti	EasyPure® PCR Saflaştırma Kiti (TRANS, Kat No: EP101)
Jel Pürifikasyon Kiti	Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (ZYMO Kat No: D4007)
Miniprep (Plazmit İzolasyon) Kiti	NucleoSpin Plazmit Mini kiti (MACHEREY-NAGEL, Kat No: 740588)

3.2. Yöntem

3.2.1. Primer Dizaynı

Primerler, kalıp DNA'ya bağlanarak amplifiye edilecek DNA bölgesinin sentezini sağlar, bu nedenle mümkün olduğunca bağlanabilecek şekilde tasarlanmıştır. CILK-1 geninin başından ve sonundan yaklaşık 20 bp seçilmiştir. Forward ve reverse primerler için sırasıyla XhoI (5' - CTCGAG - 3') ve HindIII (5' - AAGCTT - 3') enzim sekansları eklendi. Enzimler için buffer uyumlu olacak şekilde seçildi. XhoI forward primer için

GC oranı %50 ve HindIII reverse primer için GC oranı %55'dir. Annealing için tasarlanan primerlerin sıcaklık analizleri NEB Tm hesaplayıcıda yapılmıştır. Primerlerin durumları analiz edilerek uygunlukları kontrol edildi. CILK-1 geninin pEGFP-N1 (#6085-1) plazmitine klonlanması için tasarlanan primerler tablo 9'da gösterilmektedir.

Tablo 8. CILK1'in Klonlanması İçin Kullanılan Primerler

XhoI Forward Primer	5' – ggCTCGAGACCatgaatagatacacaacaatcaggcagc – 3'
HindIII Reverse Primer	5' – gacAAGCTTtcgccgagatgcgtacttgg – 3'

3.2.1.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz Zincir Reaksiyonunda (Polymerase Chain Reaction, PCR) TransStart® FastPfu DNA Polimeraz (TRANS, Kat No: AP221) kullanılmıştır. Tablo 10'daki oranlara göre toplam 100 µl PCR reaksiyonu hazırlandı. CILK-1 genini endojen olarak üretebilen HEK hücrelerinden üretilen cDNA kullanıldı. Primerlerin optimum bağlanma sıcaklığı için PCR reaksiyonu optimize edildi ve bağlanma (annealing) sıcaklığı 60 °C olarak belirlendi.

Tablo 9. TransStart® FastPfu DNA Polimeraz Kitine Göre Reaksiyon Bileşenleri

Bileşenler	Miktar	Final Konsantrasyon
Template DNA (HEK cDNA)	3 µl	Gerektiği kadar
Forward Primer (10 µM)	2 µl	0.2 µM
Reverse Primer (10 µM)	2 µl	0.2 µM
5X TransStart® FastPfu Buffer	20 µl	1 X
2.5 mM dNTPs	4 µl	0.2 µM
TransStart® FastPfu DNA Polymerase	1 µl	1.25 Ünite
Nükleaz-Free Su	68 µl	-
Total Hacim	100 µl	-

PCR'ın sıcaklık koşulları, tablo 11'de verildiği gibi TransStart® FastPfu DNA Polimeraz Kitine göre ısı döngüleyicide (thermal cycler'da) inkübe edildi.

Tablo 10. PCR Reaksiyonu İçin Sıcaklık Döngüleri

Adımlar	Sıcaklık	Zaman	Siklus Sayısı
Başlangıç	95 °C	3 dakika	1
Denatürasyonu			
Denatürasyon	95 °C	20 saniye	
Bağlanma	60-62 °C	30 saniye	35
Uzama	72 °C	1 dakika	
Final Uzama	72 °C	10 dakika	1
İnkübasyon	4 °C	∞	

3.2.1.2. Jel Elektroforezi

Jel elektroforezi, elektrik akımı kullanılarak makromolekülleri boyutlarına ve yüklerine göre ayırarak varlığının ve boyutunun belirlenmesine imkân sağlayan bir yöntemdir. Agaroz jel elektroforezinde, negatif yüklü DNA fragmanları, agaroz adı verilen özel bir polisakkarit matrisi ve akımı iletebilen bir salin tampon çözeltisi içinde anottan katoda taşınır. Moleküller şekillerine, boyutlarına ve yüklerine bağlı olarak farklı hızlarda ayrılırlar. Agaroz jel gözenekli bir yapıya sahiptir ve küçük DNA moleküllerinin büyük olanlardan daha hızlı hareket etmesine olanak sağlar. Agaroz konsantrasyonuna göre DNA molekülleri farklı hızlarda hareket eder. Lineer DNA fragmanları agaroz jel üzerinde olması gerektiği gibi doğru ilerlerken, supercoiled, sirküler gibi DNA molekülleri jel üzerinde daha kolay ve hızlı yürüyerek gerçek boyutlarından daha küçük sonuçlar verebilmektedir. Elektroforez tekniği uygulandıktan sonra jele eklenen Ethidium Bromid gibi DNA bağlayıcı floresan boya sayesinde bir marker yardımıyla UV ışığı altında DNA parçalarının varlığı ve boyutu tespit edilir.

CILK-1'i saptamak için %0,8'lik 100 ml agaroz jel hazırlandı. 0.8 g agaroz tartıldı ve 100 ml 1X TAE bufffer içerisine konuldu ve agaroz çözünmesi için mikrodalgada kaynatıldı. Agaroz çözüldükten sonra sıvı jel bir süre soğutuldu (hala sıvı halde) ve ardından 4 µl etidyum bromür (miktar-oran) ile karıştırıldı. Sıvı jel taraklı tablaya dökülerek donması beklendi. Jel katılaştıktan sonra tarak çıkarıldı ve TAE tamponu içeren bir elektroforez tankına yerleştirildi. 3 µl 100 µl PCR ürünü, 2 µl 5X yükleme boyası ve 5 µl nükleaz içermeyen su karıştırılarak toplam 10 µl karışım hazırlandı ve

jeldeki kuyucuklara eklendi. PCR ürünü jel üzerinde 100 Volt'ta yaklaşık 100 dakika yürütüldü ve UV transillüminatörde görüntüler alındı.

3.2.1.3. PCR Pürifikasyonu

Klonlamada PCR ürününün konsantrasyonunu artırmak ve aşamaların doğru ilerleyebilmesi için PCR ürününü oligolar ve tuzlar gibi PCR bileşenlerinden ayırarak saflaştırmak gerekir. Bu amaçla CILK-1 PCR ürünü jel elektroforezi ile doğrulandıktan sonra EasyPure® PCR Saflaştırma Kiti (TRANS, Kat No: EP101) kullanılarak saflaştırıldı:

- PCR ürünü 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve 1 volüm PCR ürününe karşılık 5 volüm Binding Buffer eklendi.
- Numune kısa bir süre vorteksenerek karıştırıldı.
- Örneğin tümü, toplama tüpünün içinde bulunan Spin Kolona aktarıldı ve saflaştırılmış DNA verimini artırmak için tüp, oda sıcaklığında bir dakika inkübe edildi.
- Tüp 11.000 x rpm'de 1 dakika santrifüjlendi ve süpernatant atıldı.
- Spin Kolonuna 650 µl Wash Buffer eklendi ve 11.000 x rpm'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı.
- Boş Spin Kolonu, kalan Wash Bufferı uzaklaştırmak için 11.000 x rpm'de 2 dakika santrifüjlendi.
- Spin Kolonu yeni bir 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi ve Spin Kolon'un filtre kısmına, filtreyi delmeden doğrudan üzerine 30 µl Elution Buffer eklendi.
- Elution Buffer'ın filtreye nüfuz etmesi için tüp oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi.
- Tüp 11.000 x rpm'de 1 dakika santrifüjlendi ve DNA elde edildi.

3.2.1.4. Enzim Kesimi

PCR işleminde PCR ürününe enzim bölgeleri primerler aracılığıyla eklenir. Bu enzim bölgeleri, kısıtlama sindirim işlemi ile yapışkan uç haline getirilir. DNA fragmanı ve plazminin yapışkan uç formu haline gelmesi, bir sonraki ligasyon sürecinde birbirleri ile entegrasyonunu sağlar. Böylece DNA fragmanı ve plazmid dairesel hale gelir ve bakterilere aktarılabilir.

CILK-1 ve pEGFP-N1, XhoI ve HindIII enzimleri ile tablo12'ye göre 2 farklı tüpte double digestion için hazırlandı. Her biri 50 µl olacak şekilde hazırlandı ve 37°C'de 3 saat tutuldu. NEB enzimleri ve bufferı kullanıldı.

Tablo 11. CILK-1 pEGFP-N1'in Çift Kesimi İçin Bileşenler

Bileşenler	Hacim
PCR product of CILK-1	30 µl
pEGFP-N1	10 µg
XhoI (NEB)	2 µl
HindIII (NEB)	2 µl
10X NEBuffer 3.1	5 µl
Nükleaz-free Su	50 µl'te tamamlanacak şekilde

3 saatlik inkübasyonun ardından, 2 numune 12.5 ul 5X yükleme boyası ile karıştırıldı ve %0.8 200 ml agaroz jel içinde 70 Volt'ta yaklaşık 110 dakika çalıştırıldı. Örneklerle birlikte kesim işlemine uğramayan bazı plazmitler yükleme boyası ile karıştırılarak jel üzerinde yürütülerek plazmitlerin kesilip kesilmediği kontrol edildi.

3.2.1.5. Jel Ekstraksiyonu

PCR işleminde primerler çoğaltılacak DNA fragmanı dışında ekstra bağlanma yaparak diğer bölgeleri çoğaltabilirler. Bu gibi durumlarda PCR pürifikasyonu gibi yöntemler gerçek DNA fragmanını elde etmek için yeterli değildir. Kesilmiş plazmitler ayrıca aynı enzim dizisini içeren birden fazla bölgeyi taşıyabilir. Bu durumda jelde istenilen parçanın boyutuna göre bant elde etmek gerekir. Numuneler, restriction digestion işleminden sonra jelde yürütülür ve doğru boyuttaki DNA, jelden kesilerek ayrıştırılabilir. Böylece sonraki aşamalar için daha saf ve daha doğru DNA ile çalışmak mümkün olur. CILK-1 ve pEGFP-N1 Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (ZYMO Kat No: D4007) ile jelden ekstrakte edildi:

- Boş 1,5 ml mikrosantrifüj tüpleri tartıldı.
- Doğru DNA boyutuna sahip fragmanlar UV transillüminatör ile belirlendi ve cerrahi bıçak ile jelden kesildi.
- Kesilen jel parçaları boş tüplere konulup tekrar tartılarak kütleleri belirlendi.
- Her 100 mg agaroz jel parçası için 3 volüm ADB Buffer (300 µl) eklendi.
- Tüpler, jel parçası tamamen çözülene kadar, yaklaşık 10 dakika, 55°C'de inkübe edildi.

- Her bir tüpteki erimiş agaroz çözeltileri, bir toplama tüpü içindeki Zymo-Spin™ Kolonuna aktarıldı.
- Tüpler 11.000 x rpm'de 1 dakika santrifüjlendi ve süpernatantlar atıldı.
- Kolonlara 200 µl DNA Wash Buffer eklendi. Tüpler 11.000 x rpm'de 1 dakika santrifüjlendi ve süpernatantlar atıldı.
- Yıkama adımı tekrarlandı.
- Boş kolonlar, kalan Wash Bufferı uzaklaştırmak için 11.000 x rpm'de 2 dakika santrifüjlendi.
- Kolonlara yeni 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpleri yerleştirildi ve filtreleri delmeden her bir filtre üzerine direkt olarak 30 µl DNA Elution Buffer eklendi.
- Elüsyon Bufferın filtrelere nüfuz etmesi için tüpler oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi.
- Tüpler 11.000 x rpm'de 1 dakika santrifüjlendi ve filtrelerden DNA elüsyonu yapıldı.
- pEGFP-N1 ve CILK-1 miktarları nanodrop cihazında ölçüldü.

3.2.1.6. Ligasyon

Ligasyon işleminde, DNA fragmanlarının uçları, ATP'ye bağlı olarak bir nükleotidin 3'-hidroksil grubu ile diğerinin 5'-fosfat grubu arasında kovalent bir fosfodiester bağının oluşumuyla bağlanır. CILK-1'in pEGFP-N1 ile birleştirilmesi Thermo Scientific™ T4 DNA Ligaz (THERMO SCIENTIFIC, Cat No: EL0011) ile gerçekleştirildi. pEGFP-N1, ve CILK-1'in nanogram ve boyutları ile Insilico Ligation Calculator'da 1:1, 1:3 ve 1:5 vektör-insert oranları için kullanılacak nanogramlar belirlendi. Gerekli insert ve vektör nanogramları mikrolitre olarak hesaplandı. Toplam vektör ve insert nanogramı yaklaşık 100 ve 150 ng arasında tutuldu. Kontrol olarak ligasyon reaksiyonu da sadece kesilmiş pEGFP-N1 plazmiti ile oluşturuldu. Reaksiyon miktarları tablo ...'de belirtilmiş ve karıştırıldıktan sonra 22°C'de 10 dakika bekletilmiştir.

Tablo 12. Ligasyon İşlemleri İçin Bileşenler

Örnekler	Vektör (pEGFP)	CILK1	T4 DNA Ligaz	10X T4 DNA Ligaz Buffer	Su
1:1 Ratio		0.6 µl			
1:3 Ratio	0.5 µl	1.1 µl	0.2 µl	2 µl	20 µl'e kadar
1:5 Ratio		2.5 µl			
pEGFP-N1 Control		-			

3.2.1.7. Transformasyon

Transformasyonda bakteri hücrelerinin zarındaki gözenekler kimyasal veya fiziksel yöntemlerle genişletilerek bakterilerin DNA'yı alabilmesi için kompetent hücreler haline getirilir. DH5-Alpha bakterileri kullanılmadan önce kalsiyum klorür (CaCl₂) kimyasal yöntemi ile kompetent hücreler haline getirildi ve -80'de saklandı. CILK-1 pEGFP-N1 plazmidlerinin Dh5-Alpha bakterilerine transfer işlemi heat-schok yöntemiyle gerçekleştirildi:

- Ligasyon ürünlerinin her birinden 5 µl, 50 µl kompetan DH5-Alpha bakteril ile karıştırıldı ve buz üzerinde 20 dakika inkübe edildi.
- Buz üzerinde inkübasyondan sonra bakteriler önce 42°C'de 1 dakika sonra buz üzerinde 2 dakika çalkalandı.
- Bakteriler 1 ml SOC Buffer ile karıştırıldı ve 37°C'de 1 saat 200 x rpm'de çalkalandı.
- Bakteriler çalkalama işleminden sonra 4.000 x g'de 10 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü.
- Bakteriyi süspanse hale getirmek için tüp içerisinde az miktarda SOC buffer bırakılarak geri kalanı atılmıştır.
- Bakteri peleti bakterileri süspanse edilip ve pEGFP-N1'e direnç geni olan 30 µg/ml Kanamisin içeren LB agar üzerine yayıldı.
- LB agar plakalar bir gece boyunca 37°C'de inkübe edildi.

- Ligasyon işleminde sirküler hale gelen ve direnç geni taşıyan bakterilere giren plazmitler inkübasyon sonrası koloniler oluşturdular ve birkaç koloni seçilerek 30 µg/ml Kanamisin içeren 5 ml LB'ye eklendi ve gece boyunca 37°C'de çalkalandı.
- Bir gece boyunca çalkalanan bakteriler çoğaldı ve miniprep işlemi ile plazmit DNA izole edilebilecek yoğunluğa ulaştırıldı.

CILK-1 geni ile başarılı bir şekilde birleşerek dairesel hale gelen pEGFP-N1 plazmiti, kanamisine karşı direnç genini ifade edebilir. Bu nedenle transformasyon sonrasında kanamisinli LB agar plaklarında oluşan kolonilerden bakteriler seçildi ve plazmit izolasyonu için kanamisinli LB besiyerinde çoğaltıldı.

3.2.1.8. Miniprep – Plazmit İzolasyonu

CILK-1 pEGFP-N1 plazmitinin DH5-Alpha'dan izolasyonu, NucleoSpin Plazmit Mini kiti (MACHEREY-NAGEL, Kat No: 740588) ile gerçekleştirilmiştir:

- Miniprep aşamalarından önce, 250 µl E.Coli LB kültürü ve 250 µl %60 steril gliserol, gliserol stokları olarak 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerinde karıştırıldı ve -80 °C'de muhafaza edildi.
- 15 ml'lik falcon tüplerindeki 5 ml E.Coli LB kültürü 4000 x g'de 10 dakika santrifüj edilerek bakteriler pelet formunda elde edildi. Süpernatant mümkün olduğu kadar çıkarıldı.
- Her tüpe 250 µl Buffer A1 eklendi ve hücre peletleri, hiç pelet kalmayacak şekilde pipetaj yapılarak tamamen yeniden süspanse edildi.
- Her bir tüpe 250 µl Buffer A2 eklendi ve tüpler yaklaşık 6-8 kez alt üst edilerek vortekslenmeden hafifçe karıştırıldı (Örnekler buffer ile mavi rengine dönüştü).
- Tüpler oda sıcaklığında yaklaşık 5 dakika inkübe edildi.
- Her bir tüpe 300 µl Buffer A3 eklendi ve mavi renkteki örnekler renksiz hale gelinceye kadar yaklaşık 6-8 kez alt üst edilerek vortekslenmeden tamamen karıştırıldı.
- Tüpler 12.000 x rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
- NucleoSpin® Plazmit / Plazmid (Kapaksız) Kolonları Toplama Tüplerine (2 mL) yerleştirildi ve süpernatantlar maksimum 700 µl olacak şekilde kolonlara aktarıldı. Tüpler 1 dakika 12.000 x rpm'de santrifüjlendi. Süpernatantlar atıldı, kolonlar aynı toplama tüplerine yerleştirildi ve bu işlem karışım bitene kadar tekrarlandı.
- Önceden 50 °C'ye ısıtılmış 500 µL Buffer AW kolonlara eklendi ve tüpler 12.000 x rpm'de 1 dakika santrifüjlendi. Süpernatantlar atıldı.

- Kolonlara 600 µl Buffer A4 eklendi ve tüpler 12.000 x rpm'de 1 dakika santrifüjlendi. Süpernatantlar atıldı.
- Toplama tüplerindeki boş kolonlar 12.000 x rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
- Kolonlara yeni 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpleri yerleştirildi ve 50 µl Buffer AE eklendi. Tampon AE'nin filtreler'e nüfuz etmesi için tüpler oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi.
- 12.000 x rpm'de 1 dakika santrifüj edildi ve DNA ayrıştırıldı.
- Ayrıştırılan CILK-1 pEGFP-N1 plazmitinin miktarı nanodrop cihazında ölçüldü.

İlk kontrol olarak plazmitler, CILK-1 geninin pEGFP-N1 plazmitine girip girmediğini gözlemlemek için XhoI ve HindIII enzimleri ile kesildi. Reaksiyonlar restriksiyon digestion prosedüründe olduğu gibi 10 µl'de hazırlandı ve 37°C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüm reaksiyonlar ve kontrol olarak 1 µl kesilmemiş miniprep alındı ve 5X yükleme boyası ile karıştırıldı. Hazırlanan örnekler 100 ml %0,8 agaroz jel içerisinde 110 voltta 90 dakika çalıştırıldı ve UV transillüminatörde 1899 bp olan CILK-1 genine ait bir bant olup olmadığı kontrol edildi.

3.2.1.9. Sekanslama

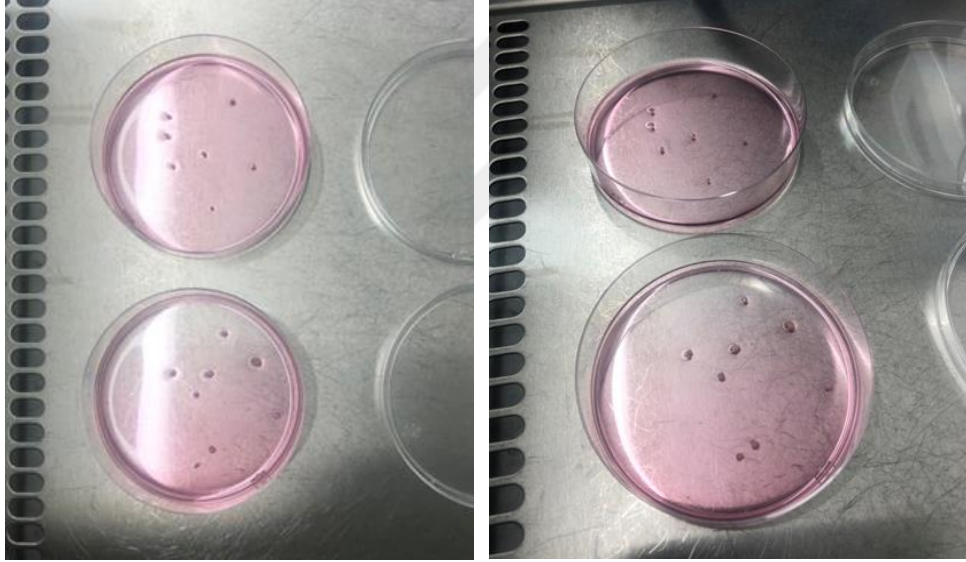
Restriction Digestion yöntemiyle kontrol edilen ve jelde CILK-1 genini gösteren miniprep numuneleri seçildi. Plazmitlerin nükleotit dizilimlerinde herhangi bir değişiklik veya mutasyon olup olmadığını gözlemlemek için miniprep örnekleri özel bir şirket olan MACROGEN tarafından dizilendi. Örneklerin dizilimi için CMV-F forward ve EGFP-N reverse primerleri kullanıldı. Dizileme için gerekli örnek miktarı MACROGEN tarafından istenilen şekilde hazırlandı.

3.2.2. Hücre Kültürü

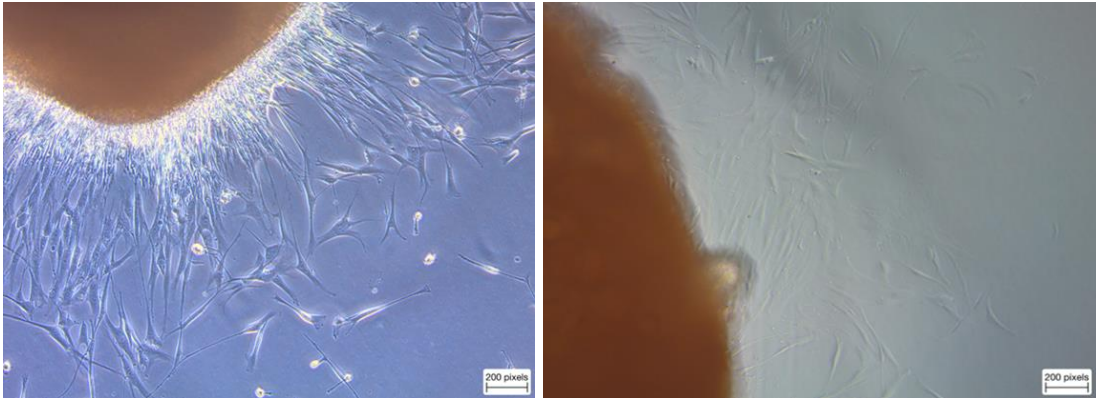
Hasta ve sağlıklı bireylerden alınan doku örnekleri parçalara ayrılarak 100 mm'lik kültür kabına konuldu ve mantarlaşmayı önlemek amacıyla 2.5ug/ml Amfoterisin B içeren 3 ml besi yeri eklendi. Bir hafta boyunca doku parçalarının yüzeyden kalkmasının engellemek amacıyla besi yeri 3 ml (2.5ug/ml Amfoterisin B içeren) olacak şekilde değiştirildi. Bir hafta sonra besi yeri miktarı 6 ml'e(2.5ug/ml Amfoterisin B içeren) çıkartılarak değiştirildi. Totalde 3 haftanın sonunda hücreler yeteri miktarda çoğaltılmış oldu ve dokularından uzaklaştırılarak yeni 100 mm'lik kültür kabına alındı. Hücreler için besiyeri olarak DMEM (Gibco™ Dulbecco's Modified Eagle's Medium) kullanıldı ve

besiyeri her kullanımdan önce %10 Serum (Gibco™ Fetal Bovine Serum) ve %1 Pen/Strep (100X Gibco™ Penisilin/Streptomisin) içerecek şekilde hazırlandı. Hücreler, 37 °C'de %5 CO² inkübatörü altında inkübe edildi. Pasajlamada hücreleri yıkamak için PBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, DPBS, Corning®), hücreleri tabakların yüzeyinden uzaklaştırmak için Tripsin (%0.25 Tripsin, %0.1 D(+)-Glukoz, 0.02% EDTA) kullanıldı:

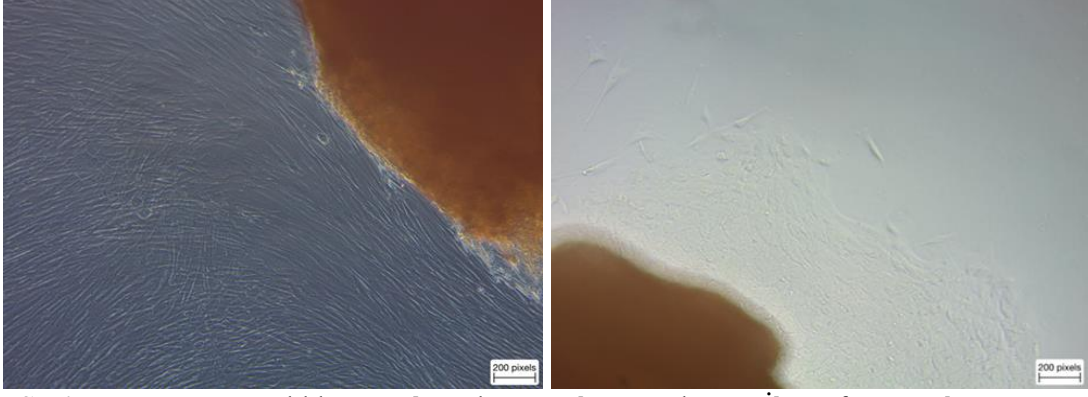
- İçinde doku parçaları bulunan kültür kabının besiyeri vakum aracılığıyla uzaklaştırıldı ve 5 ml 1X PBS eklenerek hücreler yıkandı.
- Yıkama işleminden sonra 2 ml 1X Tripsin damlatılarak eklendi ve dokular 3 dk etüvde (37 °C'de %5 CO²) inkübe edildi.
- İnkübasyondan sonra hücrelerin üzerine 5 ml taze besiyeri eklendi ve pipetaj yoluyla hücreler zeminden kaldırılıp taze besiyeri içeren yeni kültür kaplarına aktarıldı.



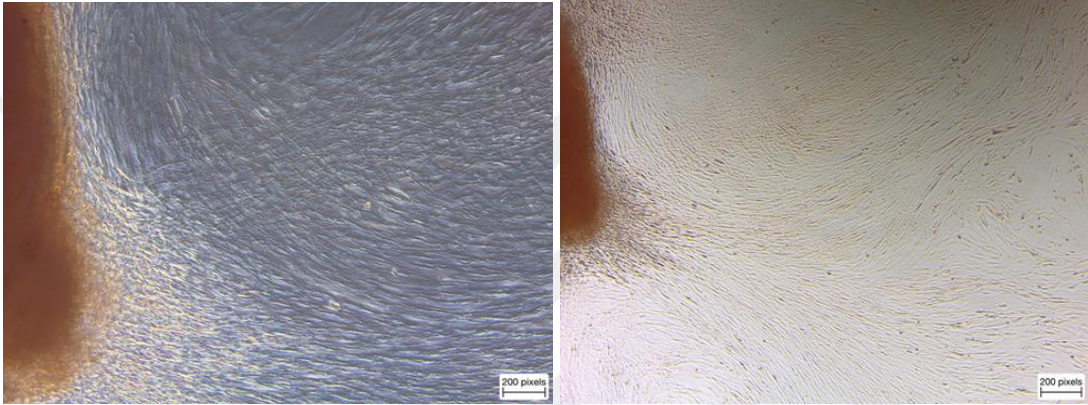
Şekil 9. Hasta ve Sağlıklı Bireyden Alınan Doku Parçalarının Kültür Kabına Aktarılmış Hali



Şekil 10. Hasta ve Sağlıklı Bireyden Alınan Doku Parçalarının Bir Hafta Sonraki Durumu



Şekil 11. Hasta ve Sağlıklı Bireyden Alınan Doku Parçalarının İki Hafta Sonraki Durumu



Şekil 12. Hasta ve Sağlıklı Bireyden Alınan Doku Parçalarının Üç Hafta Sonraki Durumu.

Hücreler çoğaldıkça bu işlem uygulandı ve sonrasında bir kısmı kültüre devam ederken bir kısmı 10% DMSO içeren besi yerlerinde dondurularak hücre stoğu olarak sıvı nitrojende saklandı. Devam eden hücreler kullanılarak immunositokimya ve real time pcr deneyleri yapıldı:

- Real time deneyi için hücreler tripsinizasyon yöntemiyle kültür kabından kaldırıldıktan sonra 15ml'lik falkon türlere aktarıldı ve 250xg'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası besi yeri vakum aracılığıyla uzaklaştırıldı ve 5 ml soğuk 1X PBS eklendi ve pipetaj yapılarak homojenleştirildi.
- Ardından 250xg'de 5 dakika santrifüj edildi ve PBS vakum aracılığıyla uzaklaştırıldı.
- PBS ile yıkama işlemi bir kez daha tekrar edildi.
- Yıkama işlemlerinden sonra hücre pelleti RNA izolasyonu için kullanıldı. (Hücre pelleti bu işleme geçene kadar -80 °C 'de bekletilebilir.)

3.2.2.1. Total RNA İzolasyonu

qPCR işleminde kalıp DNA olarak kullanılmak üzere cDNA'yı sentezlemek için ilk olarak total RNA izole edildi. Siliya ile ilişkili genlerin ekspresyon düzeylerini incelemek için hasta ve kontrol hücrelerinden total RNA izolasyonu GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific™, Cat No: K0731) ile gerçekleştirildi.

- Örnekler üzerine eklenmeden önce 1176 µl liziz buffer ile 24 µl β-merkaptoetanol karıştırılarak, 600'er µl olarak hasta ve kontrol hücrele peletlerine eklendi, önce pipetaj ardından 10 saniye vortekslendi.
- 360 µl %96 etanol eklendi ve örnekler pipetaj yapılarak karıştırıldı.
- Örnek lizatları içerisinden 700 µl alınarak toplama tüplerinin içinde bulunan GeneJET RNA purifikasyon kolonuna transfer edildi ve 13000 x rpm' de 1 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve kolonlar tekrar toplama tüpüne yerleştirildi.
- Aynı işlem kalan lizatlar için tekrar edildi.
- GeneJET RNA saflaştırma kolonlarına 700'er µl Yıkama Bufer 1 eklendi ve 13000 x rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve kolonlar tekrar toplama tüpüne yerleştirildi.
- GeneJET RNA saflaştırma kolonlarına 600'er µl Yıkama Bufer 2 eklendi ve 13000 x rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve kolonlar tekrar toplama tüpüne yerleştirildi.
- GeneJET RNA saflaştırma kolonlarına 250'şer µl Yıkama Bufer 2 eklendi ve 13000 x rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve kolonlar tekrar toplama tüpüne yerleştirildi.
- Boş GeneJET RNA saflaştırma kolonları maximum hızda 1 dakika santrifüj edildi ve kolonlar yeni 1.5 ml'lik RNaz-free mikrosantrifüj türlerine yerleştirildi.
- 75 µl nükleaz-free su GeneJET RNA saflaştırma kolonunun membranı üzerine eklendi ve 13000 x rpm'de 1 dakika santrifüjlenerek RNA elde edildi.
- RNA miktarları nanodropta ölçülerek bir miktarı cDNA'ya çevrildi, geri kalanlar aliquatlanarak -80'e kaldırıldı.

3.2.2.2. cDNA Sentezi

Hasta ve kontrol RNA'ları totalde 6 µg olacak şekilde nükleaz-free su ile karıştırılarak 20 µl hacminde hazırlandı ve Applied Biosystems™ High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Katalog No: 4368814) kullanılarak bu RNA'lardan cDNA elde edildi.

Bileşenler tablo 14'teki gibi hazırlandı ve tablo 15'te olduğu gibi thermal cycler'da inkübe edildi ve ardından qPCR işleminde kullanıldı. Bu işlem dışında cDNA'lar -20°C'de muhafaza edildi.

Tablo 13. Applied Biosystems™ High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kitine Göre Gerekli Bileşenler

Bileşenler	Miktar
RNA	20 µl
10X RT Buffer	4 µl
25X dNTP Mix (10mM)	1.6 µl
10X Oligo dT Primerler	4 µl
MultiScribe™ Reverse Transkriptaz	2 µl
RNaz İnhibitör	2 µl
Nükleaz-free Su	6.4 µl
Total	40 µl

Tablo 14. cDNA Reaksiyonu İçin Gerekli Termal Döngü Aşamaları

	1.	2.	3.	4.
Sıcaklık	25°C	37°C	85°C	4°C
Süre	10 dakika	120 dakika	5 dakika	∞

3.2.2.3. qPCR

Bileşenler tablo 16'da yer alan 6 farklı primer çifti için hem hasta hem de kontrol hücre cDNA'sı kullanılarak Promega GoTaq® qPCR Master Mix (Kat No: A6001) protokolüne göre tablo 17'deki gibi hazırlandı ve tablo 18'de olduğu gibi Applied Biosystems, QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Instrument (A28134) cihazında inkübe edilerek sonuç alındı. Elde edilen Ct sonuçlarıyla ΔCt değerleri belirlenip, $2^{-\Delta \Delta Ct}$ yöntemiyle kontrol ve hasta hücrelerinde bakılarak analizler yapıldı.

Tablo 15. Promega GoTaq® qPCR Master Mix İçin Reaksiyon Bileşenleri

Bileşenler	Miktar (Hacim)	Final Konstrantrasyon
GoTaq® qPCR Master Mix (2X)	10 µl	1X
Forward Primer	0.75 µl	200nM–1µM
Reverse Primer	0.75 µl	200nM–1µM
cDNA	1 µl	
Nükleaz-free Su	7.5 µl	

Tablo 16. qPCR’da Kullanılan Siliya Genlerinin Primer Listesi

CCP110	Forward	5’ – TGTCTCAAGCGGACTCACTCCA – 3’
TV6	Reverse	5’ – CCAGAGGTAGAATGGTGCTTCG – 3’
NM_001323572.2		
CEP290	Forward	5’ – TCTTCTGGACCAGTCACAAAAGG – 3’
NM_025114.4	Reverse	5’ – TGGCTCTTTAGCCGTTCTACTAG – 3’
IFT70 TTC30B	Forward	5’ – TGGCAACCTGTTGCTGCTCTAC – 3’
NM_152517.3	Reverse	5’ – CTCTTCAGGAGCTGTCTGGCAA – 3’
IFT139 TTC21B	Forward	5’ – CCTTCAGAATGTTACAGCCGAAC – 3’
NM_024753.5	Reverse	5’ – CCAAGGAGAAGAAAAGACCGAGG – 3’
KIF3A TV1	Forward	5’ – GTTTGGACTATGCTGATGGCTGC – 3’
NM_001300791.2	Reverse	5’ – GTTGCCGAATGTTCTCCAGTAGG – 3’
IFT88 TV1	Forward	5’ – TCGGCTAGATGAGGCTTTGGAC – 3’
NM_175605.5	Reverse	5’ – CACTGACCACCTGCATTAGCCA – 3’

Tablo 17. Real time PCR İçin Sıcaklık Döngüleri

Adımlar	Siklus Sayısı	Sıcaklık	Süre
GoTaq® Hot Start		95 °C	2 dakika
Polymerase Aktivasyonu	1		
Denatürasyon		95 °C	15 saniye
Bağlanma ve Uzama	40	60 °C	1 dakika

3.2.3. Poli-D-Lizin ile Kaplama

ICC prosedürlerinde, mikroskop altında görüntü elde edebilmek için hücreler poli-D-lizin ile kaplanmış lamellere ekilir. Poli-D-lizin hücrelerin lamellere yapışmasını sağlayarak immunositokimya deneyinin uygulanmasına olanak sağlar. Bura araştırmada, lameller poli-D-lizin (SIGMA-ALDRICH, Kat No: P7405) ile kaplayıp 6 kuyulu kültür kaplarına yerleştirildi ve tüm adımlar steril kabin içerisinde gerçekleştirildi:

- 24 x 24 mm'lik mikroskop lamelleri 6 kuyulu kültür kaplarına yerleştirildi.
- Lamellerin yıkanması için her kuyucuğa 2 ml steril su eklendi ve daha sonra su vakumlanarak uzaklaştırıldı.

- 5 mg poli-D-lizin 50 ml steril suda çözdürüldü ve lamelin yüzeyini kaplayacak ama taşmayacak şekilde eklendi.
- Poli-D-lizin lamellerin yüzeyinde 30 dakika bekletildi.
- 30 dakika sonra pipet yardımıyla poli-D-lizin toplandı.
- Her kuyucuk tekrar 2 ml steril su ile yıkandı ve su vakumlanarak uzaklaştırıldı.
- 6 kuyulu kültür kapları yaklaşık 30 dakika UV ışığında bekletildi ve UV ışığından sonra kuruyana kadar laminar flow hood içinde tutuldu.
- 6 kuyucuklu kültür kabı sterilitesi bozulmadan paketlenildi.

3.2.3.1. İmmünohistokimya (ICC)

İmmünohistokimya (ICC), antikor gibi biyomolekülleri floresan boya, florofofor veya enzim gibi raportöre(haberci-reporter) bağlayarak hedef peptitlerin veya protein antijeninin dağılımını, lokalizasyonunu ve ekspresyonunu tespit etmeyi sağlayan bir tekniktir. Biyomolekül ile haberci(reporter) arasındaki bu bağlanma dolaylı ya da direkt olarak yapılabilmekte ve bağlanma sonrasında oluşan bu enzim reaksiyonu ile haberci(reporter) bir floresan ya da renk vermektedir. Mikroskop raportör tipine göre seçilir, böylece etkileşimin sonucu raportör etkisi ile tespit edilir. Genel olarak, immünohistokimya, hücre ekimi, immün boyama, görüntüleme ve görüntü analizi aşamalarına ayrılır. Silya durumunun incelenmesi için hasta ve kontrol hücrelerine indirect(dolaylı ICC) uygulandı.

ICC uygulamasında önce hücreler Poly-D-lysine ile kaplanmış lameller içeren 6-kuyulu hücre kaplarına ekildi. Hasta ve kontrol hücreleri hemositometre kullanılarak sayıldı ve kuyu başına 2.5×10^5 hücre olacak şekilde ekim yapıldı.

- Kuyulardaki besi yerleri vakum aracılığıyla uzaklaştırıldı ve hücreler 2 ml 1X PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8 mM KH_2PO_4 , 10 mM Na_2HPO_4) içerisinde iki kez yıkandı.
- Hücreler sabitlenmesi için paraformaldehit solüsyonu (%4 paraformaldehit + %4 süktroz) ile 10 dakika inkübe edildi ve ardından 2 ml 1X PBS ile üç kez yıkandı.
- Hücreler %0,1 Triton X-100 ile 5 dakika inkübe edildi ve ardından 2 ml 1X PBS ile üç kez yıkandı.
- Hücreler %10 goat serum ile 1 saat inkübe edildi ve ardından 2 ml 1X PBS ile üç kez yıkandı.

- Hücreler, 1/600 oranında seyreltilmiş acetylated tubulin rabbit primer antikoru ile antikor solisyonu (1% BSA ve %0.2 tween20 içeren 1X PBS) içinde 1 saat inkübe edildi ve ardından 2 ml 1X PBS ile üç kez yıkandı.
- Hücreler, 1/500 seyreltilmiş 594 (Kırmızı) anti-rabbit sekonder antikoru ile antikor solisyonu (1% BSA ve %0.2 tween20 içeren 1X PBS) içinde 1 saat inkübe edildi ve ardından 2 ml 1X PBS ile üç kez yıkandı.
- Hücreler 0,5 µg/ml DAPI ile 5 dakika inkübe edildi ve ardından 2 ml 1X PBS ile üç kez yıkandı.
- Her bir lamel için mikroskop lamalarına bir damla Mounting Medium (Invitrogen™ Fluoromount-G™, Katalog numarası: 00-4958-02) eklendi.
- Lameller forseps ile alındı ve lamelin hücre içeren yüzeyi mounting medium damlatılmış mikroskop lamalarına yerleştirildi.
- Hücreler gece boyunca karanlıkta tutuldu ve son olarak floresan mikroskobu ile görüntülendi.

3.2.3.2. İkinci ICC

Acetylated tubulin ile beraber silya ile ilişkili farklı primer ve sekonder antikorlar kullanılarak ICC işlemi aynı adımlar şeklinde yapıldı. Hasta ve kontrol hücreleri;

- ARL13B Rabbit 1/600 + Acetylated Tubulin Mouse 1/200 – 594 Anti Mouse 1/500 + 488 Anti Rabbit 1/500
- IFT88 Rabbit 1/200 + Acetylated Tubulin Mouse 1/200 – 594 Anti Mouse 1/500 + 488 Anti Rabbit 1/500
- Polyglutamylated Mouse 1/200 + Acetylated Tubulin Rabbit 1/600 – 488 Anti Mouse 1/500 + 594 Anti Rabbit 1/500

şeklinde hazırlanan primer ve sekonder antikorlarla muamele edildi.

3.2.3.3. Üçüncü ICC

Silya rezorpsiyonunu incelemek adına hasta ve kontrol hücreleri serum free mediumda bekletildikten sonra farklı saat aralıklarıyla serumlu mediuma geçirildi. Hücreler 6-kuyucuklu kültür kaplarına ekildikten bir gün sonra bir kuyu serumlu mediumda tutulmaya devam ederken diğer kuyular serumsuz besi yerine alındı ve 2 gün serumsuz besi yerinde inkübe edildi. Her bir kuyu immünositokimya deneyine başlamadan önce 8 saat, 6 saat, 4 saat, 2 saat sürelerinde serumlu besi yerine geçirilerek

inkübe edildi ve bir kuyu serumsuz besi yerinde kaldı. Serumlu ve serumsuz besi yerleri her gün taze besi yerleriyle değiştirildi. Bu hazırlık aşamasından sonra ICC deneyi yapıldı. Primer antikor olarak acetylated tubulin rabbit 1/600 oranında ve sekonder antikor olarak 488 antirabbit 1/500 oranında seyreltilerek kullanıldı.

Tablo 18. Siliya Rezorpsiyonu İçin Tasarlanan Deney Şekli

Serumlu besi yerinde inkübasyon	12 saat serumlu besi yerinde inkübasyon	6 saat serumlu besi yerinde inkübasyon
Serumsuz besi yerinde inkübasyon	9 saat serumlu besi yerinde inkübasyon	3 saat serumlu besi yerinde inkübasyon

Bu çalışma, S. B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu tarafından onaylanan 2022/0725 karar nolu etik kurul izni ile gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

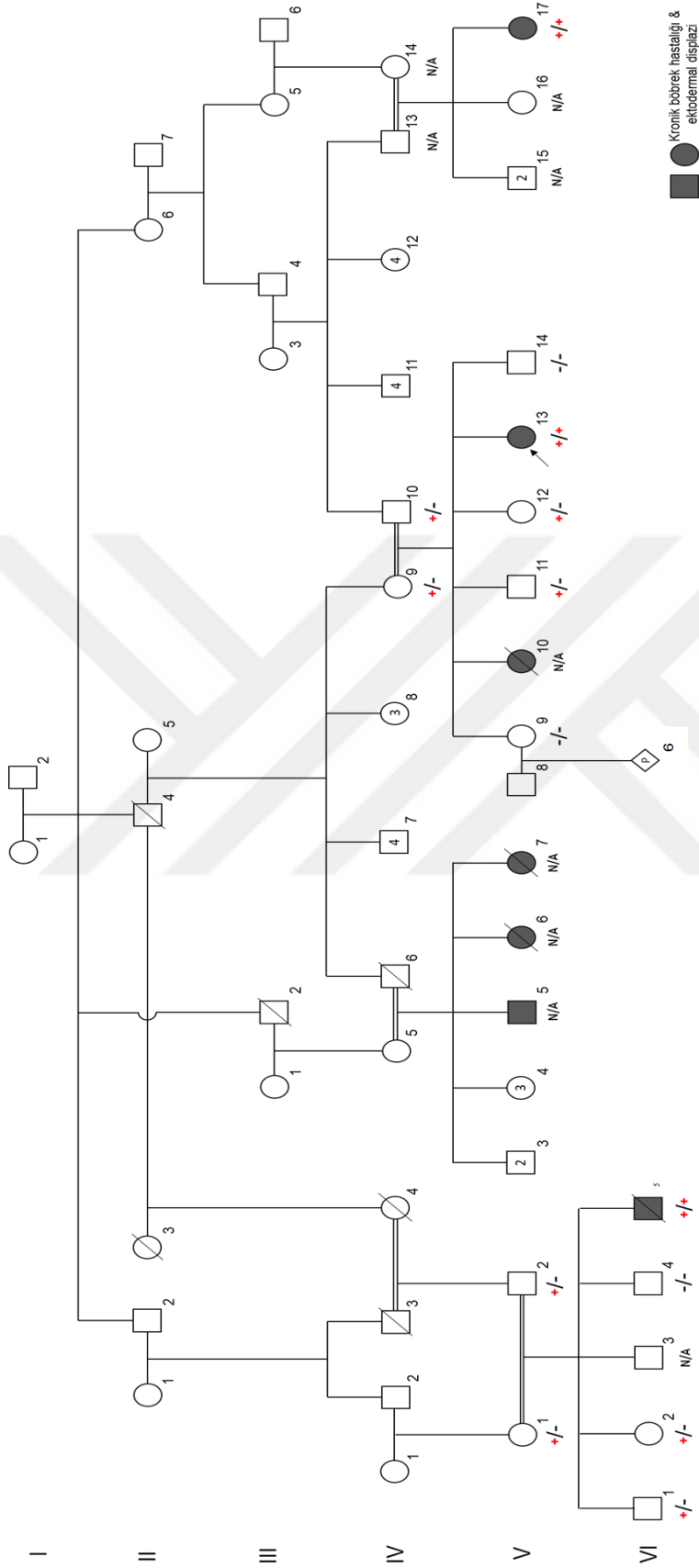
4.1. KED Hastası ve Pedigri Analizi

Pediyatrik nefrolojiye böbrek şikayetleri ile başvuran hastanın yapılan detaylı muayene ve anamnezinde benzer şikayetlerin diğer aile bireylerinde de görüldüğü tespit edilmiştir. Hastada görülen kronik böbrek yetmezliği, nefronofitizi, dismorfik yüz özellikleri, seyrek saçlar, seyrek kaşlar, seyrek kirpikler, kısa parmaklar, distrofik tırnaklar, retinal distrofi, karaciğer yetmezliği ya da karaciğer enzim yüksekliği ile klinik olarak kraniyoektodermal displazi (KED) tanısı konulmuş (Şekil 13) ve pedigri analizi yapılmıştır. Pedigri analizinde hem akrabalık ilişkileri hem de etkilenen bireyler net bir şekilde gözükmemektedir (Şekil 14).

Pedigri analizinde, Irak kökenli ailede 67 kişiden oluşan 6 neslin analizini içermektedir ve bunlardan 2'si erkek 5'i kız olmak üzere 7 bireyde klinik olarak KED tanısı konulmuştur. Fenotip olarak etkilenen 7 bireyden 4'ü ölmüştür. KED otozomal çekinik bir siliyopatidir. Pedigri analizinde görüldüğü üzere, hastalığın ortaya çıkabilmesi için heterozigotluk (+/-) değil, homozigotluk (++) gerekmektedir yani soyağacı otozomal çekinik durumla uyumludur.



Şekil 13. İncelenen CILK1 Mutasyonlu Hastanın Klinikte Görülen Semptomları. Kraniyoektodermal displazi ile uyumlu dismorfik yüz, seyrek ve ince saç, belirgin çıkıntılı alın, brakidaktili ve dental anormallikler görülmüştür.



Şekil 14. CILK1 geninde c.1664_1665delAT, p.Tyr55CysfsTer48 mutasyona sahip 3 hastanın geniş aile pedigrisi analizi. Soyağacının en üstünden başlayarak nesiller büyük romen rakamlarıyla numaralandırılmıştır ve her nesildeki bireyler de numaralandırılarak gösterilmiştir. Semboller: □/■: Etkilenmemiş erkek/Etkilenmiş erkek, ○/●: Etkilenmemiş kadın/Etkilenmiş kadın, ○/◐: Etkilenmiş ölü erkek, ◐/◑: ölü kadın/ölü erkek, +/-: Heterozigot taşıyıcı, +/-: homozigot etkilenmiş, -/-: akrabalık ve ◊: bilinmeyen cinsiyeti temsil etmektedir. ○ ve □ içerisinde belirtilen numaralar birey sayısını temsil etmektedir. 13 numaralı örnekten punch biyopsi ile numune alınmıştır ve fibroblast elde edilerek incelenmiştir.

4.2. CILK1 Mutasyonu

Pedigride de görüldüğü gibi, bu geniş ailede akraba evlilikleri yaygın olarak gerçekleşmiştir bu da nesilden nesile ilerledikçe çekinik durumun ortaya çıkmasına neden olmuştur. Fenotipik olarak KED ile uyumlu klinik gösteren bireylerde yapılan ön genetik araştırmada KED'e sebep olduğu bilinen IFT43, IFT52, IFT122, IFT140, WDR19 ve WDR35 genlerinde herhangi bir mutasyona rastlanmamıştır. Daha sonra yapılan tüm ekzom analizinde CILK1 geninde (c.1664_1665delAT - p.Tyr555CysfsTer48), 1664 ve 1165. pozisyonda bulunan A ve T nükleotidleri silinmiş, çerçeve kayması tipinde bir mutasyon tanımlanmıştır. Bu kayma neticinde var olan protein yapısı bozulmuş ve mutasyondan sonra yeni 48 farklı amino asit oluşmuş sonraki kısım ise silinmiştir (Şekil 15).

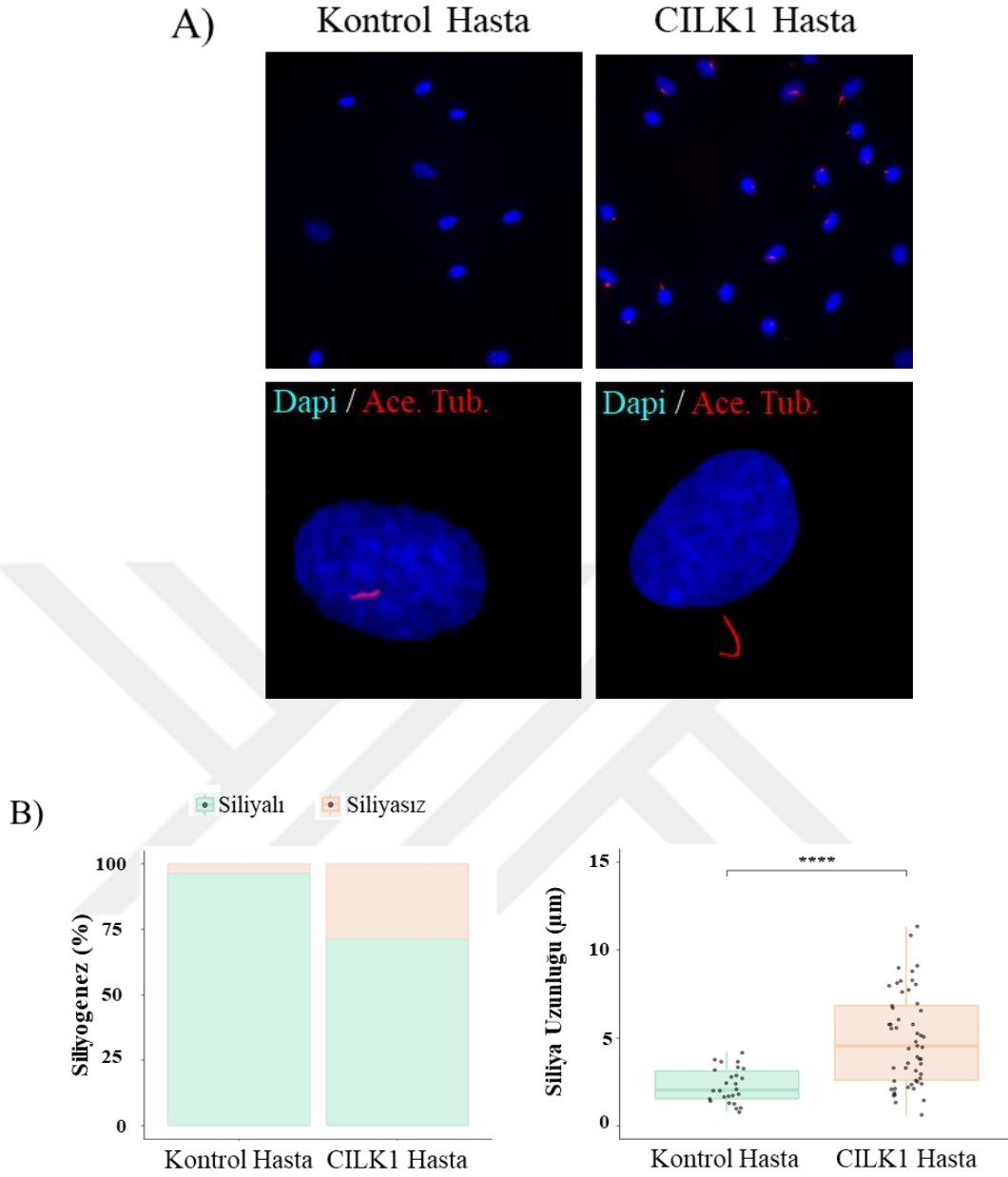


Şekil 15. CILK1’de Meydana Gelen Mutasyonun Gen Üzerinde Gösterimi. A) CILK1 geninin (mutasyon bölgesinin) doğru biçimdeki nükleotid dizilimi gösterilmiştir. B) CILK1 geninin çerçeve kayması mutasyonu sonu oluşan nükleotid dizilimindeki değişiklik gösterilmiştir. CILK1 geninin 1664 ve 1665. Nükleotidleri AT’nin silinmesi ile meydana gelen çerçeve kayması mutasyonu ile tirozin aminositi sisteine dönüşmüştür. Peşi sıra gelen aminoasitlerin değişimi kırmızı, ve silinen sekans gri ile işaretlenerek belirtilmiştir.

4.3. Siliyanın Görüntülenmesi

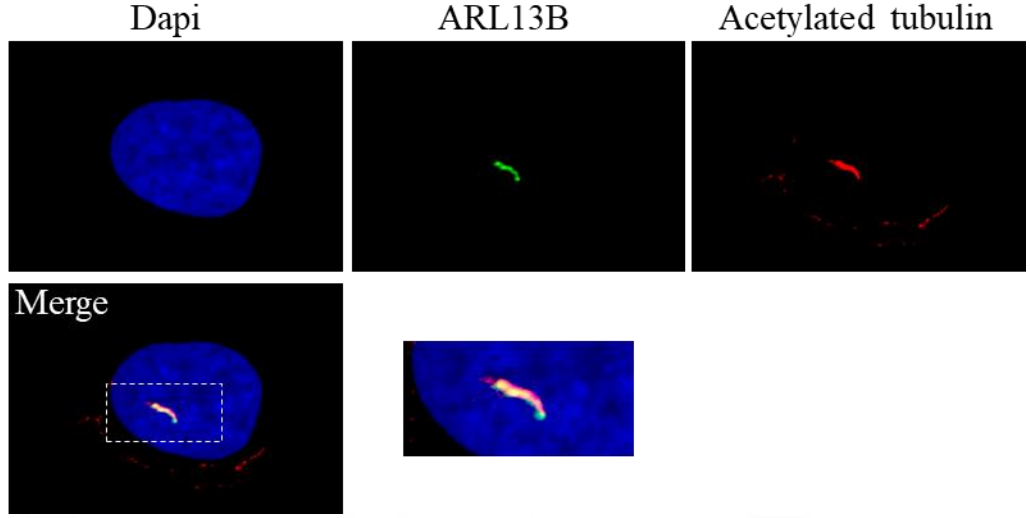
CILK1 geni ile ilgili daha önce yapılan çalışmalarda, bu gendeki mutasyonlarda endokrine-serebro-osteodisplazi (ECO) sendromu ve epileptik durumlarla karşılaşılmıştır. Bir siliyopati olan kraniyoektodermal displazide CILK1 geninde bir mutasyon daha önce tanımlanmadığı, bu mutasyonun gerçekten siliya yapısı ile alakalı problem oluşturup oluşturmadığını anlamak için, hastadan deri biyopsisi alınarak fibroblast hücreleri elde edilmiştir. Soyağacındaki 13 numaralı bireyden ve sağlıklı bireyden elde edilen fibroblast hücrelerinde immünohistokimya (ICC) deneyi yapılarak siliya yapısı ve hücrelerin siliyalaşma oranı tespit edilmiştir. Siliya işaretleyicisi olan asetillenmiş tübülün antikoru ile yapılan ICC deneyinde, fibroblastlarda oluşan siliyalar görüntülenmiştir (Şekil 16A). Hasta fibroblastlarında oluşan siliyaların uzunluğu kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında yaklaşık olarak 2 kat daha uzun olduğu gösterilmiştir (Şekil 16B.)

Siliya işaretleyicisi olarak kullanılan ve siliyanın yapısal proteinlerinden olan ARL13B (Şekil 17), IFT88 (Şekil 18) ve polyglutamylated tübülün (Şekil 19) ile asetillenmiş tübülün arasındaki kolokalizasyonda ICC deneyi ile gösterilmiştir. Siliya oluşumunu teşvik etmek için hücreler yine serumlu besi yerinde ekildikten sonra ICC öncesinde 48 saat boyunca serumsuz besi yerinde bekletilmiştir. Asetillenmiş tübülün, IF88 ve ARL13B ile benzer kolokalizasyon gösterirken, polyglutamylated tübülün, sadece kontrol hastanın siliya boyuna benzer boyama yapmış ancak fazla uzamanın olduğu bölgelerde bir işaretlemeye sebep olmamıştır.

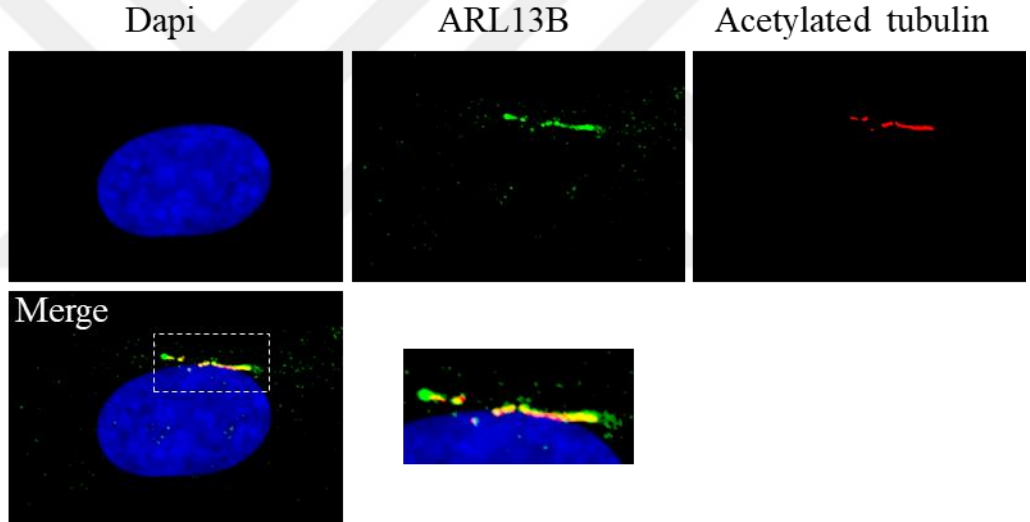


Şekil 16. Kontrol ve CILK1 Mutasyonlu Hastanın Fibroblastlarında Siliya Uzunluğunun Değişimi. Silya sayısındaki değişim yüzdelik olarak belirtilmiş, CILK1 hasta hücrelerinde azaldığı gösterilmiştir. Siliya uzunluğundaki değişim yaklaşık 2 katı kadardır. Deneyler üç kere tekrarlanmış ve analizler 200 hücre incelenerek oluşturulmuştur. Grafikler sırasıyla fisher exact test ve wilcoxon sigbe-rank testleriyle analiz edilmiştir.

A- Kontrol

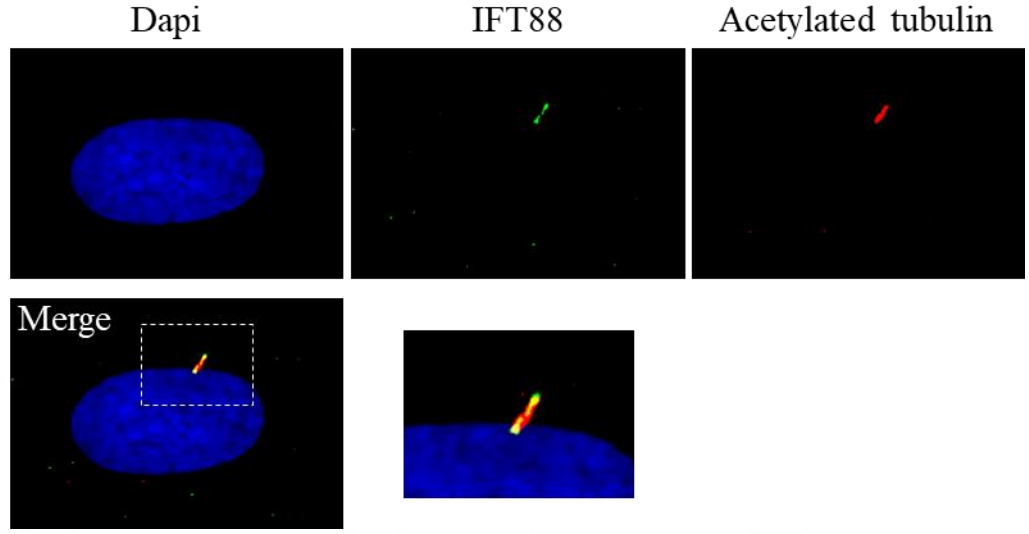


B- CILK1 Hasta

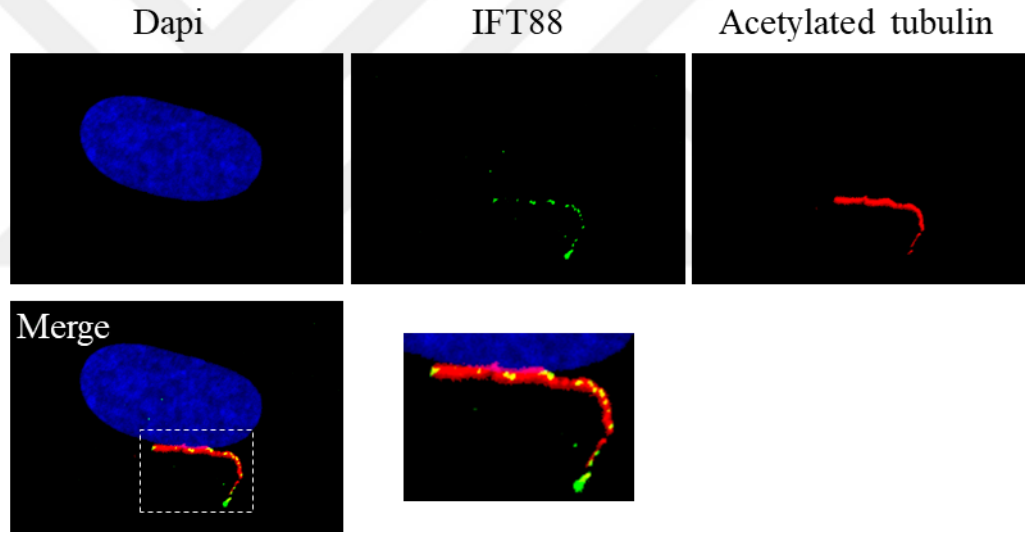


Şekil 17. CILK-1 Mutasyonunun Siliya Yapısı Üzerine Etkisi. Siliya belirteçlerinden biri olan ARL13B, acetylated tubulin ile beraber hasta ve kontrol fibroblastlarında floresan mikroskobu ile gösterilmiştir. Hücre çekirdeği dapi ile maviye, ARL13B proteini yeşile ve acetylated tubulin kırmızıya boyanmıştır.

A- Kontrol

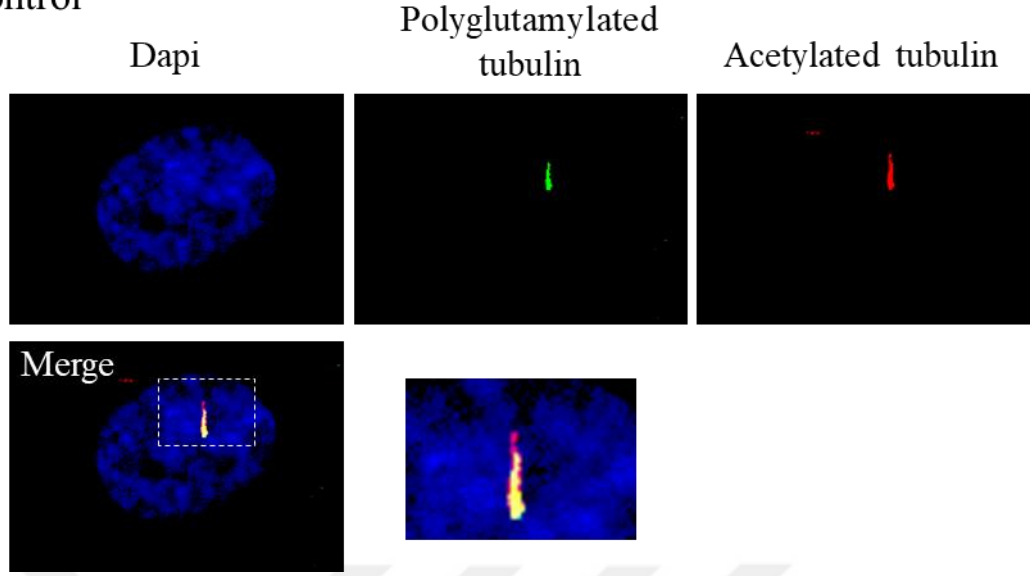


B- CILK1 Hasta

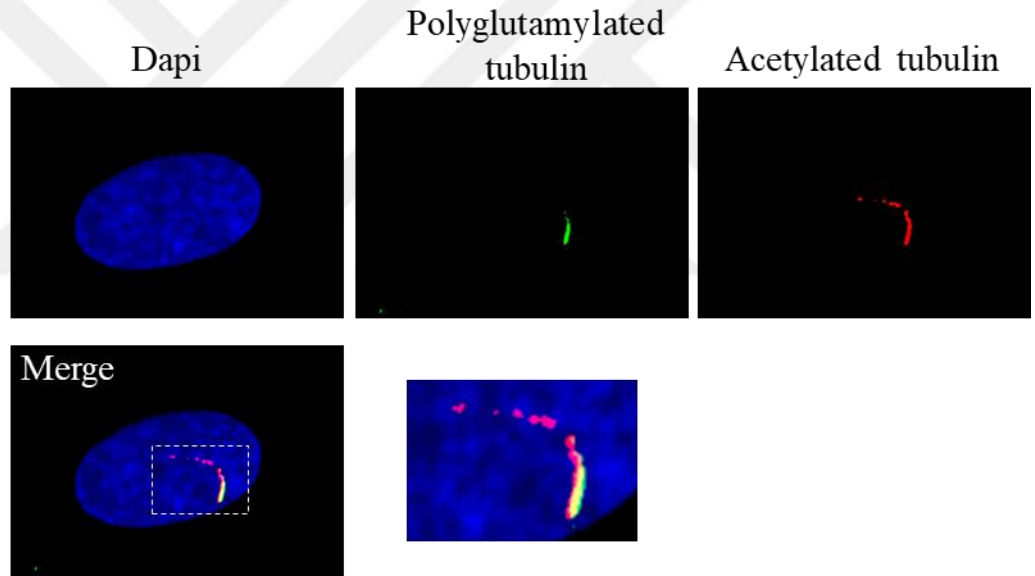


Şekil 18. CILK-1 Mutasyonunun Siliya Yapısı Üzerine Etkisi. Siliya belirteçlerinden biri olan IFT88, acetylated tubulin ile beraber hasta ve kontrol fibroblastlarında floresan mikroskobu ile gösterilmiştir. Hücre çekirdeği dapi ile maviye, IFT88 proteini yeşile ve acetylated tubulin kırmızıya boyanmıştır.

A- Kontrol



B- CILK1 Hasta



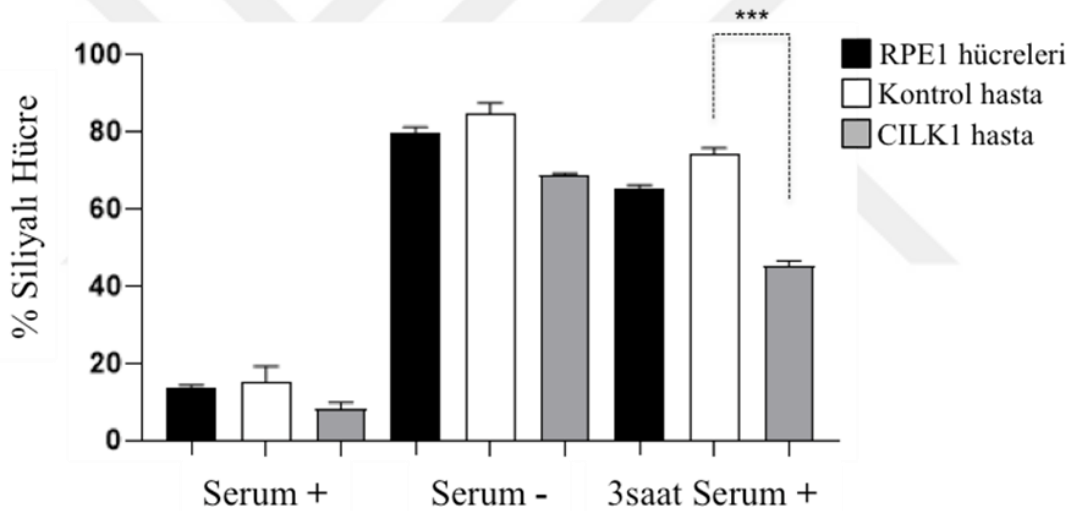
Şekil 19. CILK-1 Mutasyonunun Siliya Yapısı Üzerine Etkisi. Siliya belirteçlerinden biri olan polyglutamylated tubulin, acetylated tubulin ile beraber hasta ve kontrol fibroblastlarında floresan mikroskobu ile gösterilmiştir. Hücre çekirdeği dapi ile maviye, Polyglutamylated tubulin proteini yeşile ve acetylated tubulin kırmızıya boyanmıştır.

4.4. Siliya Rezorpsiyon Deneyi

Siliyalar, hücre siklusünün G1 fazında oluşurlar, hücrede dinamik bir şekilde oluşma ve geri çekilme (assemble/disassemble - resorption) yaparlar ve bu özellikleri sıkı kontrol altındadır. Siliyanın yapısal proteinlerinde meydana gelen mutasyonlar siliya oluşumunda sorunlar oluşturduğu gibi bazen siliyanın geri çekilmesinde (rezorpsiyon) de

problemler yaratabilirler. CILK1 T555C mutasyonu gösteren hastaların siliyalarında uzama görmüştük, siliya geri çekilmelerini değerlendirmek amacı ile siliya rezorpsiyon deneylerini tasarladık. Siliya rezorpsiyon deneyi, normalde 48 saat serumsuz ortamda kalarak siliya oluşumu tetiklenen hücrelerin 3 saat boyunca tekrar serum ile muamele edilerek oluşan siliya sayısındaki azalmaların karşılaştırılmasına dayanmaktadır.

CILK1 mutasyonu gösteren hasta ve kontrol hastası fibroblastlarının siliya rezorpsiyonlarına baktığımızda, 3 saat sonunda T555C mutasyonu olan hücrelerdeki siliya sayısının daha az olduğu gözlemlendi (Şekil 20). Yani daha uzun siliyalara sahip olmasına rağmen hasta fibroblastlarındaki siliya geri çekilmesi daha fazlaydı. Bu yapısal problemin nedenlerini anlamak, hastalığın moleküler özelliklerini daha iyi anlamamızı sağlayabilir. Bu amaçla hasta fibroblast hücrelerinden elde ettiğimiz cDNA havuzunda yapısal siliya proteinlerin genlerinin ifade düzeylerine bakmayı kararlaştırdık.

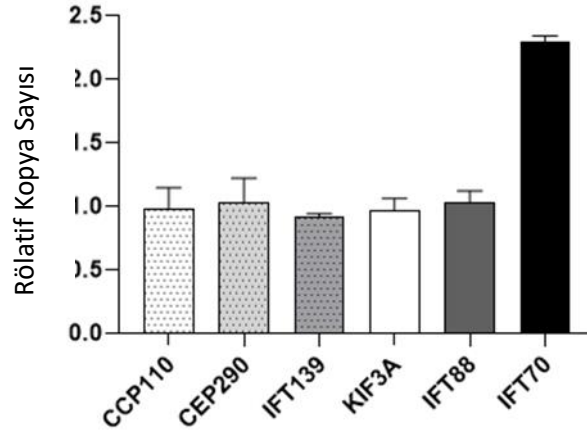


Şekil 20. Siliya Rezorpsiyon Grafiği. CILK1 hasta, kontrol ve RPE hücrelerinde 48 saatlik serumsuz besi yerinde bekletilen hücrelerin farklı saatlerde serumlu besiyerine geçirilerek siliya sayısındaki değişim hesaplanarak yapılmıştır. Deney boyunca serumlu, serumsuz besi yerlerinde bekletilen hücreler dışında ICC öncesinde hücreler, 12 saat, 9 saat, 6 saat ve 3 saat serumlu besi yerinde inkübe edilerek değerlendirildi. Üçüncü saatte siliyer rezorpsiyon farkını gösteren anlamlı sonuç grafikleştirilmiştir.

4.5. Yapısal Siliya Genlerindeki Farklılıklar

CILK1’de meydana gelen mutasyonun diğer siliya ilişkili genleri etkileyip etkilemediklerini incelemek için CCP110, CEP290, IFT139, KIF3A, IFT88 VE IFT70 olmak üzere seçilen 6 gene hem hasta hem de kontrol hücrelerinin cDNA’sında gerçek

zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu kuruldu. Kontrol ile karşılaştırıldığında IFT70 hariç ekspresyon düzeylerinde bir farklılık görülmedi fakat şekil 21’deki grafikte gösterildiği üzere IFT70’in ekspresyon seviyesinin kontrole göre yaklaşık 2 kat arttığı gözlemlendi.



Şekil 21. Hasta ve Kontrol Hücrelerinde Siliya İle İlişkili Olan Genlerinin Kantitatif Ekspresyon Oranları. Grafik CILK1 mutasyonlu hastanın, kontrole göre rölatif kopya sayısını temsil etmektedir. X ekseninde sıralanmış olan CCP110, CEP290, IFT139, KIF3A, IFT88 ve IFT70 genlerine özgü primerler kullanılarak RT-qPCR yapıldı (Tablo 16’da listelenmiştir). Her deney, bağımsız olarak hazırlanmış RNA ve cDNA numuneleri kullanılarak üç kez, üç kopya halinde gerçekleştirildi dolayısıyla her bir veri, üç farklı deneyden elde edilen ortalama değeri temsil etmektedir. Gerçek zamanlı kantitatif PCR, GoTaq® qPCR Master Mix (Kat No: A6001) protokolüne göre, üçlü kopyalar halinde yapıldı. Siliya genlerinin relatif kopya sayıları $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemiyle kontrol ve hasta hücrelerinde bakılarak belirlendi. Veriler GraphPad Prism 7.04 (GraphPad Inc, ABD) ile analiz edilmiş, istatistiksel analizler One Way Anova ile yapılmış ve sonuçlar 0.05 düzeyinde anlamlı kabul edilmiştir.

5. TARTIŞMA

Kranioektodermal displazi, kendine özgü kraniofasiyal görünüm, iskelet, ektodermal, böbrek ve karaciğer anomalileri ile seyreden silyopati hastalıkları içerisinde yer alan, nadir görülen bir çoklu anomali sendromudur. Hastalığın kalıtımı otozomal çekinik olarak aktarılır (9). Bugüne kadar literatürde KED tanısı konulan hasta sayısı 100'den az sayıdadır bu yüzden hastalığın görülme sıklığı kesin olarak bilinmemektedir. Şimdiye kadar IFT43, IFT52, IFT122, IFT140, WDR19 ve WDR35 genlerinde tanımlanan mutasyonların KED'e sebep olduğu gösterilmiştir.

Bize başvuran Irak kökenli ailenin pedigrî analizinde, hastalığın otozomal çekinik olarak aktarıldığı anlaşılmaktadır. Ayrıca ilginç bir şekilde, fenotip gösteren hastalarda yapılan genetik analizde, daha önce KED ile ilişkisi bilinmeyen CILK1 geninde T555C mutasyonu bulunmuştur. Bu mutasyonun moleküler düzeyde gerçekten siliyalarda bir farklılığa yol açtığını göstermek klinik olarak tanısı konulan hastaların moleküler olarak da teyit edilmesine olanak sağlayacaktır. Ayrıca KED etiyopatogenezinde yeni bir mutasyonun varlığı doğrulanmış olacak ve hastalara yapılan panel testlerinde bu yeni mutasyonunda eklenmesi sağlanacaktır. Moleküler olarak bu mutasyonun siliya üzerindeki etkilerini göstermek için hastalardan alınan deri biyopsilerinden fibroblastlar elde edilmiş ve sağlıklı birey fibroblastları ile karşılaştırılmıştır. CILK1 mutasyonu olan fibroblastlarda siliyaların boyu yaklaşık olarak 2 katı kadar daha uzun tespit edilmiştir.

IFT43, IFT122, IFT140, WDR19 ve WDR35 genleri intraflagellar taşımada IFT-A kompleksinde rol oynarken IFT52 geni IFT-B kompleksinde rol oynamaktadır. Bu genlerdeki mutasyonların, bazı klinik bulgularla spesifik olarak ilişkili olabileceği görülmüştür. Bialelik WDR19 mutasyonun retinal distrofi ile, WDR35 mutasyonun gelişimsel gecikme ile, IFT122, WDR35, IFT43 ve WDR19'daki mutasyonların da böbrek yetmezliği ile sonuçlandığı görülmüştür. KED'de böbrek ve karaciğer hastalığı morbiditeye ve mortaliteye yol açan en önemli sebeplerdir dolayısıyla IFT122, WDR35, IFT43 ve WDR19'daki mutasyonlar genel olarak erken embriyonik ölümle sonuçlanmaktadır (9). Ciddi karaciğer yetmezliği çeken hastalar için de geçerli bir tedavi olarak ortotopik karaciğer nakli önerilmektedir (5).

Primer siliyum türler arasında korunan, insan vücudunun hemen hemen tüm hücre tiplerinin yüzeyinden uzanan ve duyuşal bir anten görevi gören bir organeldir (45). Gelişim, morfogenez ve homeostaz sırasında çeşitli dokulara özgü işlevler için çok yönlü

araçlar olarak uyarlanmışlardır bu da siliya ile ilgili bozuklukların neden birçok organ sistemini etkileyebileceğini açıklamaktadır (3). Primer siliya, GPCR, RTK, Hedgehog, PDGFRa, TGFβ ve WNT dahil olmak üzere birçok hücre yüzeyi reseptörü içerdiğinden yüksek ölçüde bir algılama yüzeyi ve verimli bir sinyalizasyon sürecinin gerçekleşmesini sağlamaktadır. Primer siliyada intraflageller taşıma (IFT) siliyogenez ve sinyal yollarının düzenlenmesi için gerekli olan bir süreçtir (50). Bu süreçte meydana gelen defektlerin ve bunun sonucunda siliyer yapıdaki yapısal kusurların, önemli gelişimsel sinyal kaskadlarını bozarak kraniyektodermal displaziye neden olduğu düşünülmektedir (51). CILK1'in bu benzersiz sinyalleşme ortamında nasıl düzenlendiği büyük ölçüde bilinmemektedir.

RCK familyası kinazı olan CILK1 siliyogenez ve siliyanın uzunluğunun kısıtlanmasında oldukça önemli bir rol oynamaktadır. CILK1 geninin C-terminal katalitik olmayan bölgesi yoluyla IFT-B kompleksine doğrudan bağlanabilmektedir bu nedenle IFT mekanizmasının bir kargosu olarak uca taşınabileceğini düşündürmüştür, bundan yola çıkarak siliyer uca iletildiği ve bu şekilde siliyer uçta lokalize olduğu gösterilmiştir (45). Yaptığımız çalışmada da immünohistokimyasal deneyler sonucunda kraniyektodermal displaziye sebep olan CILK1 genindeki mutasyon sonucu hasta hücrelerindeki siliyanın uzadığı gösterilmiştir (Şekil 16). Ayrıca önceki çalışmalarda gösterildiği gibi uzayan siliyalar genellikle bükülüyor veya kıvrılıyor gibi görünmekteydi, bu da bu kirpiklerin ventral hücre yüzeyinde büyüyebileceğini düşündürmektedir. Katalitik olmayan CTD (C-terminal domain)'deki bazı CILK1 mutasyonlarının katalitik aktiviteyi tehlikeye atmadığını, ancak siliyogenezin inhibisyonunu ortadan kaldırdığı bulunmuştur. Mutasyonlarının bu ayrımı, tek başına CILK1 kinaz aktivitesinin siliyer fonksiyonlar için yeterli olmadığını göstermektedir (11).

ARL13B ve IFT88 siliya çalışmalarında sıkça kullanılan siliyanın önemli belirteçlerindendir. ARL13B, ADP-ribosilasyon faktörü ailesi ve GTPazların Ras süper ailesi içindeki bir siliyer proteindir. ARL13B siliyer yapı için gereklidir ve siliyer membran için bir belirteçtir. Ayrıca Shh sinyal yolağıyla ilişkilendirilmiştir (52). IFT88, IFTB kompleks proteinlerinden biridir. Hücre döngüsü boyunca sentrozom ile ilişkilidir ve mitozda iğ oryantasyonunda iğ kutuplarına yerleşir (53). IFT88'in aşırı ekspresyonu G1-S geçişini önler ve apoptotik hücre ölümüne neden olurken, IFT88'in knockdown'ı hücre döngüsü ilerlemesini destekler (53, 54, 55). CILK1 mutasyonunun siliyanın

uzamasına sebep olduğu belirlendikten sonra bu siliya belirteçleri ARL13B ve IFT88'in lokalizasyonunun etkilenmediği gösterilmiştir (Şekil 17, 18).

CILK1'in knock-out edildiği hücrelerde hem siliyaların uzadığı hem de şişkin siliyer uçta IFT-A ve IFT-B komplekslerinin anormal birikimini de gösterilmiştir (41). IFT-A ile birlikte dynein-2 kompleksinin, IFT mekanizmasının retrograde iletme aracılık ettiğinden CILK1'in yokluğunda IFT mekanizması tabandan uca anterograd iletme maruz kalır, hızlandırılır ve siliyer uçtan geriye doğru hareket edemez bu nedenle CILK1 de dynein-2 ve IFT-A alt birimlerinin genlerinde oluşan mutasyonların yol açtığı aynı iskelet siliyopatisine yani SRTD'ye yol açabilmektedir (41). İncelediğimiz hastada da CILK1 genindeki mutasyon da proteinin bir bölümünün silinmesine neden olmuştur ve bu da siliyanın ortalama siliya boyundan ve kontrol hücrelerinden daha uzun olmasına neden olmuştur (Şekil 16). Hastadaki mutasyonun da kliniğe yansımalarının da buradaki gibi benzer olabileceği beklenmektedir. Heterotrimerik kinesin-II'nin motor alt birimi olan KIF3A'nın in vitro ICK tarafından fosforillendiği gösterilmiştir (11). CILK1'in knock out edildiği hücrelerde şişkin siliyer uçta IFT bileşenlerinin anormal birikimi göz önüne alındığında, CILK1'in kinesin-II alt birimlerini veya IFT mekanizmasının diğer bileşenlerini fosforile ederek intraflageller taşımada geri dönüş (turnaround) olayını düzenlediği düşünülmektedir (11). ICK knock out edilmiş hücrelerin çevresinde siliyer bileşenler içeren ekstraselüler veziküller bulunup bunların siliyer uç tarafından kısıtılarak salındığı gösterilmiştir dolayısıyla siliyalar belirli bir uzunluğa eriştikten sonra biriken proteinler çıkıntılı uçtan elimine edilir. Şekil 17'de (Özellikle ARL13B belirtecinde) CILK1 mutasyonlu hasta ICC'sinde oldukça uzayan bir siliyada ekstraselüler veziküller görünüm gözlenmektedir. Bu nedenle, siliyer bileşenleri içeren ekstra salınmasının, kirpiklerin aşırı uzamasını önleyen bir mekanizma olabileceği mümkündür (11).

Diğer hücre organellerinin aksine, siliyalar genellikle hücreler durağan (stationary), hareketsiz (quiescent) veya farklı bir duruma (differentiated state) ulaştığında birleşirler ve hücre döngüsüne yeniden girişten önce siliyer rezorpsiyon gelir. Bu nedenle, siliyaların birleştirilmesi-ayrışması, hücre döngüsü düzenlemesi ile yakından bağlantılı gibi görünmektedir ve bu süreçlerin arızalanması onkogeneizde yer almaktadır (3). Besi yeri yetersizliğinde hücrelerin durağan fazda kalıp siliya oluşturması, serumlu besi yerinde ise büyüme sinyalleri ile tekrar döngüye devam edip siliyaların kaybolması beklenmektedir. Bunu gözlemek adına yaptığımız çalışmada (Şekil 20). CILK1 mutasyonlu hasta

hücrelerinin rezorpsiyonunun daha hızlı bir şekilde gerçekleştiği gösterilmiştir. Bu hızlı rezorpsiyonun moleküler temellerini ortaya koymak için daha detaylı deneyler yapılmalıdır.

Siliya ile ilişkili genlerde oluşan bozukluklar bazen tek başlarına siliyopatilere yol açarken bazı genlerin bozuklukları diğer siliya genlerini de etkilemektedir. Bu çalışmada CILK1'deki mutasyon sonucunda CCP110, CEP290, IFT70, IFT139, KIF3A ve IFT88 olmak üzere seçilen siliya genlerinin ekspresyonlarında değişimleri incelenmiştir. Genlerin siliyadaki rollerine bakıldığında; KIF3A'nın, silya oluşumu ve büyümesi için kritik olan anterograd IFT üzerindeki downstream etkisine aracılık eden CILK1 substratı olabileceği söylenmiştir fakat yapılan bir çalışmada C terminal bölgede KIF3A-Thr672'yi fosforile etme yeteneğini koruyan CILK1 varyantlarının hem siliya oluşumunda hem de siliya uzunluğunda kusurlar ürettiği görülmüştür bu da KIF3A'nın siliyer fenotip üzerindeki etkilerden sorumlu tek CILK1 substratı olmadığını göstermektedir (45, 56). CP110, sentrozom döngüsünün düzenlenmesinde yer alan, sentriollerin distal ucuna yerleşen sentrozomal bir proteindir. CP110'un eksikliği insan siliyer hastalığında görülen bir protein olan ve öncelikle sentriollere ve bazal cisimlere lokalize olan CEP290 ile etkileşime girdiği gösterilmiştir. CEP290'ın ablasyonu, sentrozom fonksiyonunu veya hücre döngüsü ilerlemesini etkilemeden siliyogenezi önler. CP110'un birincil siliya oluşumunu baskılayabilmesi için CEP290 ile etkileşim kesinlikle gereklidir. CP110, büyüyen hücrelerde silyanın büyümesini ve oluşumunu baskılamak, CEP290 primer silyaların birleşimini destekler (57). IFT139, IFTA alt kompleks proteinlerinden biridir fakat IFT-A'nın birleşimi için gerekli değildir. IFT-A, IFT-B ve GPCR'lerin retrograd taşınması için gereklidir bu sebeple knock out durumunda şişkin siliyer uçlarında IFT-A, IFT-B ve GPCR'lerin birikimine yol açmaktadır (58). Siliya ile ilişkili olan bu genlerin hiçbirinde ekspresyon değişiklikleri gözlemlenmemiştir (Şekil 21).

IFT70 periferik olarak IFT52 – IFT88 dimer aracılığıyla IFT-B kompleksi ve IFT70'in yokluğunda siliyer bazında toplanan diğer IFT-B alt birimleri ile ilişkili olmasına rağmen, IFT70'in knock out edilmesi, silya oluşumuna engel olmaktadır (59). CILK1 gibi, başka bir CDK benzeri kinazın (FLS2) IFT70 tarafından siliyalara taşındığı ve bu taşınmanın kesilmesinin siliyer ayrışmayı bozduğu bulunmuştur (60). Bununla beraber bu kinazdaki mutasyonun IFT70'in ekspresyonunu artırdığı da gösterilmiştir. Bu bilgiler göz önüne alındığında CILK1 hastalarındaki gerçek zamanlı PCR sonucunda IFT70'te gözlemlenen ekspresyon artışı da anlam kazanmaktadır (Şekil 21).

Sonuç olarak, CILK1 geninin 1664-1665. nükleik asitlerinde meydana gelen çerçeve kayması mutasyonunun bir siliyopati olan kraniyoektodermal displaziye sebep olduğu ve bu mutasyonun siliyanın uzamasına yol açtığı gösterilmiştir. CILK1 mutasyonun siliya rezorpsiyonunun daha çabuk gerçekleşmesine yol açtığı ve IFT70'in ekspresyonunu arttırdığı görülmüştür.

Sonraki aşamalarda kurtarma (rescue) deneylerini gerçekleştirebilmek için CILK1-WT genini içeren plazmitlerin hasta hücrelere transfekte edilerek siliyadaki değişiminin incelenmesi planlanmaktadır bu amaçla da gerekli klonlama aşamaları tamamlanmıştır. Kurtarma deneyleri sayesinde hem CILK1 geninin etkisini doğrulamış olacağız hem de siliya ile olan ilişkisini daha net ortaya koyabileceğimizi planlıyoruz.



6. KAYNAKÇA

1. James R. Davenport, Bradley K. Yoder. An Incredible Decade For The Primary Cilium: A Look At A Once-Forgotten Organelle. American Physiological Society 2005 Dec;289(6):F1159-69.
2. Jeremy F. Reiter, Michel R. Leroux. Genes and Molecular Pathways Underpinning Ciliopathies. Springer Nature 2017;533–547 (2017).
3. Manfred Fliegauf, Thomas Benzing, Heymut Omran. When Cilia Go Bad: Cilia Defects and Ciliopathies. Nature Publishing Group, 2007; 880–893.
4. Hanan E. Shamseldin, Ranad Shaheen, Nour Ewida, vd. The Morbid Genome of Ciliopathies: An Update. Genetics in Medicine, 2020 Jun;22(6):1051-1060.
5. Ruth Linda Ackah, Dor Yoeli, Michael Kueht vd. Orthotopic Liver Transplantation For Sensenbrenner Syndrome. John Wiley & Sons. Pediatric Transplantation 2018;22:e13077.
6. Weizhen Tan, Angela Lin, ve Kim Keppler-Noreuil. GeneReviews. 2022
7. Machteld M. Oud, Carine Bonnard, Dorus A. Mans vd. A Novel ICK mutation causes ciliary disruption and lethal endocrine-cerebro osteodysplasia syndrome. BioMed Central, 2016;5:8.
8. S. Paige Taylor, Michaela Kunova Bosakova, Miroslav Varecha vd. An inactivating mutation in intestinal cell kinase, ICK, impairs hedgehog signalling and causes short rib-polydactyly syndrome. Molecular Genetics, 2016, Vol. 25, No. 18 3998–4011.
9. Angela E. Lin, Avram Z. Traum, Inderneel Sahai vd. Sensenbrenner Syndrome (Cranioectodermal Dysplasia): Clinical and Molecular Analyses of 39 Patients Including Two New Patients. Wiley Online Library 2013 Nov;161A(11):2762-76.
10. Jeremy F Reiter, Oliver E Blacque, Michel R Leroux. The base of the cilium: roles for transition fibres and the transition zone in ciliary formation, maintenance and compartmentalization. EMBO Reports 2012 Jun 29;13(7):608-18.
11. Kentaro Nakamura, Tatsuro Noguchi, Mariko Takahara vd. Anterograde trafficking of ciliary MAP kinase–like ICK/CILK1 by the intraflagellar transport machinery is required for intraciliary retrograde protein trafficking. J. Biol. Chem 2020 Sep 18;295(38):13363-13376.
12. Robyn J. Quinlan, Jonathan L. Tobin, ve Philip L. Beales. Modeling Ciliopathies: Primary Cilia in Development and Disease. Current Topics in Developmental Biology 2008;84:249-310.

13. Thomas W Ferkol, Margaret W Leigh. Ciliopathies: the central role of cilia in a spectrum of pediatric disorders. *J Pediatr*; 2012 Mar; 160(3): 366–371.
14. Leigh MW, Pittman JE, Carson JL vd. Clinical and genetic aspects of primary ciliary dyskinesia and Kartagener syndrome. *Genet Med*. 2009 Jul;11(7):473-87.
15. Basu B, Brueckner M. Cilia multifunctional organelles at the center of vertebrate left-right asymmetry. *Curr Top Dev Biol* 2008;85:151-74.
16. Satir P, Pedersen LB, Christensen ST. The primary cilium at a glance. *J Cell Sci*. 2010 Feb 15;123(Pt 4):499-503.
17. Tobin JL, Beales PL. The nonmotile ciliopathies. *Genet Med*. 2009 Jun;11(6):386-402.
18. Waters, A. M. & Beales, P. L. Ciliopathies: an expanding disease spectrum. *Pediatr. Nephrol.* 26, 1039–1056, 2011.
19. Mona Alsolami, Stefanie Kuhns, Manal Alsulami, Oliver E. Blacque. ERICH3 in Primary Cilia Regulates Cilium Formation and the Localisations of Ciliary Transport and Sonic Hedgehog Signaling Proteins. *Scientific Reports*, (2019) 9:16519.
20. Ichiro Izawa, Hidemasa Goto, Kousuke Kasahara, Masaki Inagaki. Current topics of functional links between primary cilia and cell cycle. *Biomed Central*, 2015.
21. Joel L. Rosenbaum & George B. Witman. Intraflagellar transport. *Nature, Molecular Cell Biology*, 813–825, 2002.
22. Abraham Andreu-Cervera, Martin Catala, Sylvie Schneider-Maunoury. Cilia, ciliopathies and hedgehog-related forebrain developmental disorders. Elsevier Inc, 0969-9961, 2020.
23. Christensen ST, Pedersen LB, Schneider L, Satir P. Sensory cilia and integration of signal transduction in human health and disease. *Traffic* 2007; 8: 97–109
24. Iben R. Veland, Aashir Awan, Lotte B. Pedersen a Bradley K. Yoder, Søren T. Christensen. Primary Cilia and Signaling Pathways in Mammalian Development, Health and Disease. S. Karger AG, Basel, 2009.
25. Insinna C, Besharse JC. Intraflagellar transport and the sensory outer segment of vertebrate photoreceptors. *Dev Dyn* 2008; 237: 1982–1992.
26. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev* 2008; 22: 1276–1312.

27. Jensen CG, Poole CA, McGlashan SR, Marko M, Issa ZI ve diğerleri. Ultrastructural, tomographic and confocal imaging of the chondrocyte primary cilium in situ. *Cell Biol Int* 2004; 28: 101–110.
28. McGlashan SR, Jensen CG, Poole CA. Localization of extracellular matrix receptors on the chondrocyte primary cilium. *J Histochem Cytochem* 2006; 54: 1005–1014
29. McMahon, A. P., Ingham, P. W. & Tabin, C. J. Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling. *Curr. Top. Dev. Biol.* 53, 1–114, 2003.
30. Torban, E., Kor, C., Gros, P. Van Gogh-like2 (Strabismus) and its role in planar cell polarity and convergent extension in vertebrates. *Trends Genet.* 20, 570–577, 2004.
31. Klein, T. J, Mlodzik, M. Planar cell polarization: an emerging model points in the right direction. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 155–176, 2005.
32. Sophie Thomas, Lucile Boutaud, Madeline Louise Reilly, Alexandre Benmerah. Cilia in hereditary cerebral anomalies. John Wiley & Sons. 2019
33. João Gonçalves ve Laurence Pelletier. The Ciliary Transition Zone: Finding the Pieces and Assembling the Gate. *Mol Cells.* 2017 Apr 30; 40(4): 243–253.
34. Peter Satir ve Søren Tvorup Christensen. Overview of Structure and Function of Mammalian Cilia. *Annual Review of Physiology*, 2016
35. Aoife M. Waters, Philip L. Beales. Ciliopathies: an expanding disease spectrum. *Pediatric Nephrology* volume 26, pages1039–1056, 2011
36. Sarah C. Goetz & Kathryn V. Anderson. The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nature Reviews Genetics* volume 11, pages331–344, 2010
37. Kate Baker, Philip L. Beales. Making Sense of Cilia in Disease: The Human Ciliopathies. *American Journal of Medical Genetics Part C (Seminars in Medical Genetics)* 151C:281–295, 2009
38. Carla A. M. Lopes, Suzanna L. Prosser, Leila Romio, Robert A. Hirst, Chris O'Callaghan ve diğerleri. Centriolar satellites are assembly points for proteins implicated in human ciliopathies, including oral-facial-digital syndrome 1. *Cell Sci* (2011) 124 (4): 600–612.
39. LiyunSang, Julie J.Miller, Kevin C.Corbit, Rachel H.Giles, Matthew J.Brauer ve diğerleri. Mapping the NPHP-JBTS-MKS Protein Network Reveals Ciliopathy Disease Genes and Pathways. *Cell* 145, 513–528, May 13, Elsevier Inc, 2011

40. Heleen H. Arts, Nine V. A. M. Knoers. Current insights into renal ciliopathies: what can genetics teach us?. *Pediatr Nephrol* (2013) 28:863–874
41. Zheng Fu¹, Casey D. Gailey, Eric J. Wang, David L. Brautigan Ciliogenesis associated kinase 1 (CILK1): targets and functions in various organ systems. *FEBS Lett.* 2019 November ; 593(21): 2990–3002
42. Togawa K, Yan YX, Inomoto T, Slaugenhaupt S, ve Rustgi AK. Intestinal cell kinase (ICK) localizes to the crypt region and requires a dual phosphorylation site found in map kinases. *J Cell Physiol* 183, 129–139, 2000.
43. Kunova Bosakova M, Nita A, Gregor T, Varecha M, Gudernova I ve diğerleri. Fibroblast growth factor receptor influences primary cilium length through an interaction with intestinal cell kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2019.
44. Bosakova M.K, Nita A, Gregor T, Varecha M, Gudernova I, Faflek B, ve diğerleri. Fibroblast growth factor receptor influences primary cilium length through an interaction with intestinal cell kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2019, 116, 4316–4325.
45. Eric J.Wang, Casey D. Gailey, David L. Brautigan ve Zheng Fu. Functional Alterations in Ciliogenesis-Associated Kinase 1 (CILK1) that Result from Mutations Linked to Juvenile Myoclonic Epilepsy. *Cells* 2020, 9, 694
46. Bailey J.N, De Nijs L, Bai N, Suzuki T, Miyamoto H ve diğerleri. Variant Intestinal-Cell Kinase in Juvenile Myoclonic Epilepsy. *New Engl. J. Med.* 2018, 378, 1018–1028.
47. Ishikawa H., ve Marshall W. F. Ciliogenesis: building the cell's antenna. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 222–234, 2011.
48. Mijalkovic J., Van Krugten J., Oswald F., Acar S., ve Peterman,E. J. G. Single-molecule turnarounds of intraflagellar transport at the *C. elegans* ciliary tip. *Cell Rep.* 25, 1701–1707, 2018
49. Fu Z., Gailey C. D., Wang E. J., ve Brautigan, D. L. Ciliogenesis associated kinase 1: targets and functions in various organ systems. *FEBS Lett.* 593, 2990–3002, 2019
50. Isabelle Perrault, Jan Halbritter, Jonathan D Porath, Xavier Gérard , Daniela A Braun ve diğerleri. IFT81, encoding an IFT-B core protein, as a very rare cause of a ciliopathy phenotype. Perrault I, et al. *J Med Genet* 2015;52:657–665
51. Tan W, Lin A, Keppler-Noreuil, Book from University of Washington, Seattle, Seattle (WA), 2021

52. Christine E. Larkins, Gladys D. Gonzalez Aviles, Michael P. East, Richard A. Kahn, ve Tamara Casparya. Arl13b regulates ciliogenesis and the dynamic localization of Shh signaling proteins. *Mol Biol Cell*. 2011 Dec 1; 22(23): 4694–4703.
53. Aude Robert, Germain Margall-Ducos, Jacques-Emmanuel Guidotti, Olivier Brégerie, Claude Celati ve diğerleri. The intraflagellar transport component IFT88/polaris is a centrosomal protein regulating G1-S transition in non-ciliated cells. *J Cell Sci*. (2007) 120 (4): 628–637.
54. Clarissa R. Coveney, Isabella Collins, Megan Mc Fie, Anastasios Chanalaris, Kazuhiro Yamamoto ve diğerleri. Cilia protein IFT88 regulates extracellular protease activity by optimizing LRP-1-mediated endocytosis. *FASEB J*. 2018 Dec; 32(12): 6771–6782.
55. Benedicte Delaval, Alison Bright, Nathan Lawson, ve Stephen Doxsey. The cilia protein IFT88 is required for spindle orientation in mitosis
56. Carlie L. Cullen, Megan O'Rourke, Shannon J. Beasley, Loic Auderset, Yilan Zhen. Kif3a deletion prevents primary cilia assembly on oligodendrocyte progenitor cells, reduces oligodendrogenesis and impairs fine motor function. *Glia*. 2021;69:1184–1203
57. William Y. Tsang, Carine Bossard, Hemant Khanna, Johan Peranen, An ve Swaroop. CP110 Suppresses Primary Cilia Formation through its Interaction with CEP290, a Protein Deficient in Human Ciliary Disease. *Dev Cell*. 2008 August ; 15(2): 187–197
58. Tomoaki Hirano, Yohei Katoh, ve Kazuhisa Nakayama. Intraflagellar transport- A complex mediates ciliary entry and retrograde trafficking of ciliary G protein-coupled receptors. The American Society for Cell Biology, 2017.
59. Ryota Takei, Yohei Katoh ve Kazuhisa Nakayama. Robust interaction of IFT70 with IFT52-IFT88 in the IFT-B complex is required for ciliogenesis. The Company of Biologists Ltd | Biology Open, 2018
60. Qin Zhao, Shufen Li, Shangjin Shao, Zhengmao Wang, Junmin Pan. FLS2 is a CDK-like kinase that directly binds IFT70 and is required for proper ciliary disassembly in *Chlamydomonas*. *PLOS Genetics*, 2020