KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

CRISPR PLATFORMU İLE GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARINDA İNFEKSİYOZ PANKREATİK NEKROZİS VİRÜSÜNE KARŞI DİRENÇLİLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

Ayşe CEBECİ

EYLÜL 2025
TRABZON

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

CRISPR PLATFORMU İLE GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARINDA İNFEKSİYOZ PANKREATİK NEKROZİS VİRÜSÜNE KARŞI DİRENÇLİLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Ayşe CEBECİ

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünce
"DOKTOR (BİYOTEKNOLOJİ)"
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 14 / 08 / 2025
Tezin Savunma Tarihi : 12 / 09 / 2025

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ

Trabzon 2025

ÖNSÖZ

"CRISPR Platformu ile Gökkuşağı Alabalıklarında İnfeksiyoz Pankreatik Nekrozis Virüsüne karşı Dirençliliğinin Araştırılması" başlıklı doktora tezi "Alabalık Islah Hatlarının Oluşturulmasında Moleküler Genetik ve Biyoteknolojik Yöntemlerin Kullanımı" projesi (TAGEM/HAYSÜD/G/19/A6/ P2/2448) kapsamında Tarım ve Orman Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü (TAGEM) tarafından desteklenmiştir.

Doktora tez danışmanlığımı üstlenerek, çalışmalarımın yürütülmesinde yardımlarını ve her türlü desteği benden esirgemeyen ve tez süresi boyunca tecrübe, fikir ve bilgilerinden her an yararlandığım, sayın hocam Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Projenin yürütülmesinde öncelikle Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü yönetimine, çalışma arkadaşlarım İlyas KUTLU, Melike ALEMDAĞ, Muhammed Doğan ÖZDEMİR, Esin BATIR, Doç. Dr. Mustafa TÜRE, Dr. Cemil ALTUNTAŞ'a verdikleri destek ve katkı için teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımın çeşitli aşamalarında desteklerini esirgemeyen biyoinformatik alanda edindiğim bilgi birikimini borçlu olduğum Karadeniz Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Halil İbrahim GÜLER'e ve CRISPR/Cas9 alanında tecrübelerini paylaşan Norveç Deniz Araştırma enstitüsünden Dr. Lene KLEPPE'ye ve Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Ozan ATASOY'a teşekkür ederim. Mikroenjeksiyon cihazı için bize laboratuvarının kapılarını açan Atatürk Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, Sucul Biyoteknoloji Laboratuvarı sorumlusu Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN'a proje ekibim adına teşekkür ederim. Ayrıca damızlık stok arayışında bizden desteğini esirgemeyen proje lideri Dr. Recayi ÇİMAGİL ile mesai arkadaşlarım Şirin FİRİDİN ve Eyüp ÇAKMAK'a teşekkür ederim. Tüm bu süreçte iş paketine destek olan SUMAE çalışanlarına ekip arkadaşlarım adına ayrıca teşekkürlerimi sunarım.

Özellikle, maddi ve manevi destekleriyle bana her zaman güç verip yanımda olan ve her konuda bana yardımcı olan değerli aileme ve pek sevgili adaşım olan ilham kaynağım babaanne ve anneanneme, sıkıntılı anlarımda varlığını hissettiren arkadaşlarıma sonsuz minnet ve şükranlarımı sunarım.

Ayşe CEBECİ

Trabzon 2025

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum "CRISPR Platformu ile Gökkuşağı Alabalıklarında İnfeksiyoz Pankreatik Nekrozis Virüsüne Karşı Dirençliliğinin Araştırılması" başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ'ün sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 12/09/2025

Ayşe CEBECİ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ IV
İÇİNDEKİLER V
ÖZET VII
SUMMARY VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ IX
TABLOLAR DİZİNİ X
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ XI
1. GENEL BİLGİLER 1
1.1. İnfeksiyöz Pankreatik Nekrozis Virüsü (IPNV) 1
1.1.1. Tarihçesi 1
1.1.2. Etiyoloji 2
1.1.3. Epidemiyoloji 3
1.1.4. Patogenezi ve Klinik belirtileri 4
1.1.5. Teşhis ve Kontrol 5
1.2. Moleküler Belirteçler 6
1.2.1. DNA Sekanslama Teknolojileri 7
1.3. Genom Düzenleme Araçları 8
1.3.1. CRISPR-Cas9 Sistemi ile Genom Düzenlenmesi 10
1.3.2. İkinci Jenerasyon CRISPR Sistemleri ile Tek Nokta Mutasyonları 11
1.4. Salmonid Türlerinde IPNV Direncinde Genetik Temeller ve Yeni Nesil Genom Düzenleme Yaklaşımları 12
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR 17
2.1. Damızlık Seçimi ve Markalama 17
2.2. Enfeksiyon Deneyinde Kullanılacak Larvaların Üretimi 19
2.3. Enfeksiyon Deneyi 21
2.4. DNA izolasyonu ve Hedef Genlerin Çoğaltılması 22
2.5. Oxford Nanopore Sekanslama İle Polimorfik Bölgelerin Belirlenmesi 23
2.6. Biyoinformatik Analiz 25
2.7. Protein Modelleme 26
2.8. Genom Düzenleme Prosedürü 26

2.9. Mutasyon Analizi 28
2.10. İstatiksel Analiz 30
3. BULGULAR 31
3.1. Damızlık Seçimi ve Markalama 31
3.2. Enfeksiyon Deneyi 31
3.3. DNA izolasyonu ve Hedef Genlerin Çoğaltılması 32
3.4. Polimorfik Bölgelerin Belirlenmesi için Sekanslama ve Biyoinformatik Analiz 35
3.5. Protein Modelleme 43
3.6. CRISPR/Cas9 ile Mutant Oluşturulması 45
4. TARTIŞMA 51
5. SONUÇLAR 58
6. ÖNERİLER 60
7. KAYNAKLAR 62
8. EKLER 70
ÖZGEÇMİŞ

Doktora Tezi

ÖZET

CRISPR PLATFORMU İLE GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARINDA İNFEKSİYOZ PANKREATİK NEKROZİS VİRÜSÜNE KARŞI DİRENÇLİLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Ayşe CEBECİ

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ
2025, 69 Sayfa, 6 Sayfa Ek

Enfeksiyöz pankreatik nekroz virüsü (IPNV), su ürünleri yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara neden olan viral bir patojendir. Etkili antiviral tedavilerin bulunmaması nedeniyle, son dönemdeki araştırmalar, belirli hastalıklara karşı dirençlilikle ilişkili olan gen bölgelerinin belirlenmesine ve bu bölgelerdeki mutasyonlara dayalı seleksiyona odaklanmıştır. Bu çalışmada, Gökkuşağı alabalığında patojen tanıma reseptör genleri ve ubikitinasyonla ilişkili modifikasyon geni üzerinde IPNV dirençliliği ile ilişkili olabilecek tek nükleotid polimorfizmlerin (SNP) belirlenmesi ve bağışıklıkla ilişkili anahtar genlerin hedeflenmesinde CRISPR/Cas9 gen düzenleme teknolojisinin uygulanabilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Deneysel IPNV enfeksiyonu sonrasında, dirençli ve duyarlı gökkuşağı alabalığı bireylerinden elde edilen hedef gen bölgeleri Oxford Nanopore Technologies MinION platformu kullanılarak dizilenmiştir. Karşılaştırmalı SNP analizi iki grup arasında, özellikle Toll-benzeri reseptör 3 (TLR3), melanom farklılaşma ile ilişkili protein 5 (MDA5) ve sentirin-spesifik proteaz 5 (SENP5) genlerinde birçok benzersiz ve ortak polimorfizmi ortaya koymuştur. Ayrıca, TLR3, TLR9 ve MDA5 genlerini hedefleyen kılavuz RNA ve Cas9 karışımları embriyolara mikroenjeksiyon yoluyla aktarılmıştır. Bu genlerde insersiyon/delesyon (indel) mutasyonları taşıyan bireyler elde edilmiş ve mutasyon oranı %10 ile %30 arasında değişmiştir. Bu çalışmada, gökkuşağı alabalığında patojen tanıma reseptörleri üzerinde CRISPR/Cas9 sistemi ilk kez uygulanmış ve aynı anda birden fazla gende mutasyon oluşturulmuştur. Bu çalışma, selektif ıslahla ilişkili genetik belirteçlerin tanımlanmasında uzun-okuma dizilemenin önemini ve su ürünleri yetiştiriciliğinde hedef özelliklerin kısa sürede geliştirilmesinde CRISPR/Cas9 platformunun potansiyelini vurgulayan temel veriler sunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: İnfeksiyöz Pankreatik Nekrozis Virüsü, *Oncorhynchus mykiss*, Oxford Nanopore Sekanslama, CRISPR/Cas9, Hastalık Direnci

PhD. Thesis

SUMMARY

INVESTIGATION OF RESISTANCE TO INFECTIOUS PANCREATIC NECROSIS VIRUS IN RAINBOW TROUT USING THE CRISPR PLATFORM

Ayşe CEBECİ

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biotechnology Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ
2025, 6 Pages, 69 Pages Appendix

Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) is a viral pathogen leading significant economic losses in the aquaculture. Due to the absence of effective antiviral treatments, recent research has focused on determining the regions associated in resistance to certain diseases and selection based on mutations in gene regions associated with resistance. This study aimed to identify single nucleotide polymorphisms (SNPs) on pathogen recognition receptor genes and ubiquitin-related modifier gene potentially linked to IPNV resistance and to explore the feasibility of using CRISPR/Cas9 gene-editing technology to target key immune genes. After experimental IPNV infection on rainbow trout, target gene regions of resistant and susceptible individuals were sequenced by Oxford Nanopore Technologies MinION platform. Comparative SNP analysis showed many unique and common polymorphisms between the two groups, especially in Toll-like receptor 3 (TLR3), melanoma differentiation-associated protein 5 (MDA5) and centrin-specific protease 5 (SENP5) genes. In addition, guide RNA and Cas-9 mixtures targeting TLR3, TLR9 and MDA5 genes were transferred to embryos by microinjection for gene editing. Individuals carrying insertion/deletion mutations in these genes were obtained and the mutation rate was determined as 10-30%. In this study, the CRISPR/Cas9 platform was applied for the first time on pathogen recognition receptors in rainbow trout and simultaneous mutation occurred in more than one gene. This study provides basic data for future genomic selection and breeding strategies emphasizing the importance of long-read sequencing in identifying genetic markers related to selective breeding and importance of the CRISPR/Cas9 platform for developing traits in a short time in aquaculture.

Key Words: *Oncorhynchus mykiss*, Infectious Pancreatic Necrosis Virus, Oxford Nanopore sequencing, CRISPR/Cas9, Disease resistance

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Patojen tanıma reseptörleri aracılığıyla sinyal iletimi 15

Şekil 2. Enfeksiyon denemelerinde kullanılmak üzere seçilen balıklardan DNA izolasyonu 17

Şekil 3. 100 µl doku karışımı ekilmiş EPC hücre hattı içeren 24'lük plate 19

Şekil 4. Gen knock-out işlemi için akış şeması 27

Şekil 5. Ölen balığın hücre kültürü ekimlerinden yapılan RT-PCR jel görüntüsü 32

Şekil 6. 4 ölü ve 4 yaşayan balıktan izole edilen genomic DNA jel görüntüsü 33

Şekil 7. TLR3 (7273 bp), TLR9 (5432 bp), SENP5 (6315 bp) gen bölgelerinin PCR jel görüntüsü 33

Şekil 8. MDA5 gen bölgesinin 4 farklı primer çifti kullanılarak PCR jel görüntüleri 34

Şekil 9. Damızlıklardan izole edilen genomik DNA jel görüntüsü 34

Şekil 10. Damızlıklar için TLR3, TLR9, SENP5 gen bölgelerinin sırasıyla PCR jel görüntüleri 35

Şekil 11. SENP5 proteini homoloji modellenmiş üç boyutlu yapısı 44

Şekil 12. MDA5 proteini homoloji modellenmiş üç boyutlu yapısı 45

Şekil 13. CRISPR/Cas9 uygulaması sonucu elde edilen balıkların fenotipik görüntüsü 46

Şekil 14. ICE program kullanılarak tyr gen bölgesi için farklı bireylerden elde edilen Sanger dizileme kromatogramı ve analizi 47

Şekil 15. CRISPR/Cas9'un mutagenez verimliliğinin analizi 50

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. Bağışıklıktan sorumlu yüzey glikoproteini olan VP2 baz alınarak yapılan sınıflandırma sonucu ortaya konulan 6 genogrup 3

Tablo 2. COI barcod gen bölgesi için PCR şartları 18

Tablo 3. Revers transkriptaz PCR protokolü 18

Tablo 4. Damızlıklara ait sağım ve döllenme sürecindeki boy, ağırlık ve yumurta bilgileri 20

Tablo 5. Revers transkriptaz PCR protokolü 21

Tablo 6. Kullanılan primerler 22

Tablo 7. Hedef gen bölgelerini çoğaltmak için kullanılan PCR reaksiyon içeriği ve miktarları 22

Tablo 8. Hedef gen bölgelerini çoğaltmak için PCR şartları 23

Tablo 9. End-prep aşaması için master mix 23

Tablo 10. Native barkod dizileri 23

Tablo 11. Native barkod ligasyon aşaması için master mix 24

Tablo 12. Sekanslama adaptörlerinin ligasyonu aşaması için master mix 25

Tablo 13. Constant oligo ve gRNA 27

Tablo 14. Cas9 ve farklı gRNA'ların mRNA kombinasyonlarına göre enjekte edilen gruplar 28

Tablo 15. *tyr* gen bölgesi için PCR şartları 29

Tablo 16. Denemelerdeki ölen balık sayısı 32

Tablo 17. Ölen grupta hedef genler üzerinde gözlenen varyasyonlar ve bu varyasyonun kaynağı olan damızlık bireylerin tespiti 37

Tablo 18. Yaşayan grupta hedef genler üzerinde gözlenen varyasyonlar 39

Tablo 19. Ölen ve yaşayan grupta aynı pozisyonlarda referans genoma kıyasla gözlenen polimorfizmler ve polimorfizm farklılıkları 42

Tablo 20. MDA5 geni için 2 ve 8 numaralı örnek ve SENP5 geni için 3 ve 8 numaralı örneklere ait modelleme kalitesi ile ilgili değerler 44

Tablo 21. Her bir grupta örnek alınan balıkların boy ve ağırlıkları. Grupların ortalaması standart sapma ile verilmiştir 49

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABD	:	Adenin Baz Düzenleyicileri
BF-2	:	Bluegill Fry
CRISPR	:	Düzenli Aralıklarla Kümelenmiş Kısa Palindromik Tekrar Dizileri
DNA	:	Deoksiribo Nükleik Asit
ELISA	:	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPC	:	Epithelioma Papulosum Cyprini
FHM	:	Fathead Minnow
gRNA	:	Rehber RNA
GTHB	:	Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı
HR	:	Homolog Rekombinasyon
IFAT	:	İndirekt Floresan Antikor Testi
InDel	:	İnsersiyon/Delesyon
IPN	:	İnfeksiyöz Pankreatik Nekrozis
IPNV	:	İnfeksiyöz Pankreatik Nekrozis Virüsü
OIE	:	Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (World Organisation For Animal Health)
ORF	:	Açık Okuma Çerçevesi
MDA5	:	Melanoma Farklılaşma İlişkili Protein 5
MEM	:	Minimum Essential Medium
NGS	:	Yeni Nesil Dizileme
NHEJ	:	Homolog Olmayan Uç Birleştirme
NT	:	Nötralizasyon Testi
PG	:	Pike Gonad
RLR	:	Retinoik Asit İndüklenebilir (RIG)-I Benzeri Reseptör
RNA	:	Ribonükleik Asit
rRT-PCR	:	Real-Time Reverse Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RTG-2	:	Rainbow Trout Gonad-2 Hücre Hattı
RT-PCR	:	Reverse Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SBD	:	Sitozin Baz Düzenleyicileri
SENP5	:	Sentrin Specific Protease 5
SNPs	:	Tek Nükleotid Polimorfizmi
SUMAE	:	Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü

TBE	:	Tris-Borat-EDTA
TLR	:	Toll Benzeri Reseptör
tyr	:	Tirozinaz
UV	:	Ultra Viyole
QTL	:	Kantitatif Karakter Lokusları
ZFN	:	Çinko Parmak Nükleazlar

1. GENEL BİLGİLER

1.1. İnfeksiyöz Pankreatik Nekrozis Virüsü (IPNV)

1.1.1. Tarihçesi

İnfeksiyöz Pankreatik Nekrozis (IPN) hastalığı ilk olarak Kuzey Amerika'da McGonigle tarafından 1940 yılında yeme başlama dönemindeki yavru balıklarda gözlenmiştir. Ancak, hastalık beslenme hatalarına bağlı bir sendrom olduğu düşünülerek Akut Kataral Enteritis olarak adlandırılmıştır. Wood ve arkadaşları 14 yıl sonra catarrhal enteritine benzeyen bulaşıcı bir hastalığa maruz kalan dere alasını (*Salvelinus fontinalis*) histopatolojik olarak incelemişler ve olgunun infeksiyöz özellikte olduğunu ortaya koyarak hastalığa İnfeksiyöz Pankreatik Nekrozis adını vermiştir (Wood vd., 1955). Balık hücre kültürü metotlarının geliştirilmesiyle birlikte Wolf ve Dunbar (1957) ilk balık virüsü izolasyonunu gerçekleştirmişler ve böylece in vitro olarak üretilen ilk balık virüsü, infeksiyöz pankreatik nekrozis virüsü (IPNV)'nün izolasyonu bildirilmiştir (Wolf vd., 1958). Leetown Ulusal Balık Kuluçkahane'sinde 1960 yılında meydana gelen salgın sonrası izole edilen ve klonlanan virüs, prototip IPNV suşu VR-299 olarak (1963 yılında) Amerikan Tip Kültür Koleksiyonuna (ATCC) dahil edilmiştir. Gökkuşağı alabalıklarından (*Oncorhynchus mykiss*) ise ilk defa 1963 yılında Amerika'da izole edilmiştir (Parisot vd., 1963).

Avrupa'da bilinen ilk IPN salgını 1964 yılında Fransa'da gökkuşağı alabalığı yavrularında meydana gelmiştir. Fransa'da IPNV'nin ortaya çıkmasının ardından Danimarka'da 1968 yılında IPNV tespit edilmiş ve bunu diğer Avrupa ülkeleri (İskoçya, İngiltere, İtalya, İsveç, Almanya ve Norveç) izlemiştir. Asya'da ise ilk IPNV izolasyonu 1971 yılında Japonya'da yapılmış bunu Tayvan (1983) takip etmiş ve 1980'li yıllarda Güney Amerika ve Afrika'da tespit edilmiştir (Dopazo ve Barja, 2002).

Türkiye'de ise Timur ve arkadaşları tarafından 1993 yılında yapılan elektron mikroskopi ve histopatoloji çalışmalarıyla IPN varlığı kanıtlanmıştır (Timur vd., 1993). Moleküler teknikler kullanılarak Türkiye'de IPNV, ilk olarak 2002 yılında Candan tarafından gökkuşağı alabalıklarında (*O. mykiss*) bildirilmiştir (Candan, 2002). Daha sonra

2003-2008 yılları arasında Ege, Marmara, İç ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde işletmelerden alınan hasta yavru gökkuşağı alabalık örneklerinin virolojik muayenesi sonucunda toplam 21 IPNV suşu izole edilmiştir (Değirmenci vd., 2008).

IPN, 2006 yılı sonuna kadar Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü'nde (OIE) bildirimi zorunlu hastalıklar listesinde yer almaktaydı ancak 2007 yılında listeden çıkarılmıştır (OIE, 2006).

Ülkemizde ise 3285 sayılı Hayvan Sağlığı Zabıtası Kanunu'na göre yayımlanan İhbarı Mecburi Hastalıklar tebliğine göre (Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, 2004) Bildirimi Zorunlu Balık Hastalıkları Listesi içinde yer almaktayken 12.07.2007 tarih ve 2007/32 sayılı tebliğ ile İhbarı Mecburi Hastalıklar Listesi'nden çıkarılmıştır (GTHB, 2007).

1.1.2. Etiyoloji

- Virüsün Morfolojisi ve Moleküler Yapısı

IPNV, Birnaviridae familyasına ait Aquabirnavirus genusu içinde yer alan ortalama 60-70 nm çapında olup ikozahedral simetriye sahip, zarfsız bir virüstür. Virüs 2 segmentli (Segment A ve B) çift zincirli ribonükleik asit (RNA) yapısında yaklaşık 6 kbp genoma sahiptir (Dopazo, 2020).

Segment A genomu ~ 3,1 kb uzunluğunda olup büyük ve küçük olmak üzere iki adet açık okuma çerçevesi (ORF) bulundurmaktadır. Büyük ORF "NH2-pVP2-NSprotease-VP3-COOH" poliproteinini kodlamaktadır. Poliprotein, major kapsid proteini olan VP2'nin (Viral Protein) öncül proteini pVP2, yapısal olmayan serin-lizin proteaz aktiviteli VP4 ve minor iç kapsid proteini olan VP3'ü içermektedir. Bu poliprotein translasyon esnasında VP4 aracılığıyla kesilerek pVP2 ve VP3 proteinlerini oluşturmaktadır. Küçük olan ORF ise arginin içeriği bakımından zengin, yapısal olmayan VP5 adlı bir polipeptidi kodlamaktadır (Duncan ve Dobos, 1986; Dopazo, 2020).

Segment B genomu ~2,8 kb uzunluğunda olup VP1 proteinini kodlamaktadır. Bu protein hem RNA bağımlı RNA polimeraz ((RNA dependent RNA-polymerase (RdRp)) olarak görev yapar hem de genomik RNA segmentlerinin 5 uçlarına kovalent bağlarla bağlanmış minör internal proteindir (Duncan vd.,1991).

- Serolojik ve Genotipik Gruplandırma

IPNV suşlarının veya genel olarak suda yaşayan birnavirüslerin sınıflandırılmasıyla ilgili olarak iki yaklaşım uygulanır. Serolojik tiplemeye dayanan sınıflandırma, Hill ve Way

(1995) tarafından yapılan sınıflandırmadır ve bu sınıflandırma serogrup A ve B'yi içermektedir. Serogrup A; A1 (West-Boxton veya WB), A2 (Sp), A3 (Ab), A4 (He), A5 (Tellina veya Te), A6 (Can-1), A7 (Can-2), A8 (Can-3) ve A9 (Jasper veya Ja) serotiplerini içerirken serogrup B sadece B1 (TV-1) serotipini içermektedir. Serogrup A içerisinde salmonlarda enfeksiyon oluşturan akuatik birnavirüslerin çoğunluğu yer almaktadır.

Serogrup A1 Amerika izolatlarını, serotip A6-A9 Kanada izolatlarını, serotip A2-A5 ve B1 Avrupa ve Asya (Blake vd., 2001; Nishizawa vd., 2005; Mutoloki ve Evensen, 2011) izolatlarını içerir. Serogrup B içerisinde ise sadece İngiltere'deki yumuşakçalardan izole edilen B1 (TV-1) serotipi tanımlanmıştır (Hill ve Way, 1995).

Blake et al. (2001) tarafından VP2 genin amino asit benzerliğine dayanılarak yapılan genotipik sınıflandırma sonucu 6 genogrup bildirilmiştir. Sonuçlara göre genogrup I Serotip A1 ve A9, genogrup II serotip A3, genogrup III serotip A5 ve A6, genogrup IV serotip A7 ve A8, genogrup V serotip A2 ve son olarak da genogrup VI serotip A4'ü içermektedir. Bu 6 genogruba ek olarak deniz balıkları, yumuşakçalar ve kabuklu deniz ürünlerinden elde edilen aquabirnavirüsleri temsilen genogrup 7 önerilmiştir.

Tablo 1. Bağışıklıktan sorumlu yüzey glikoproteini olan VP2 baz alınarak yapılan sınıflandırma sonucu ortaya konulan 6 genogrup

Genogrup	Serotip
Genogrup I	Serotip A9 (Ja) ve A1 (WB)
Genogrup II	Serotip A3 (Ab)
Genogrup III	Serotip A2 (Sp) ve serotip B1 (TV-1)
Genogrup IV	Serotip A5 (Te) ve A6 (C1)
Genogrup V	Serotip A7 (C2) ve A8 (C3)
Genogrup VI	Serotip A4 (He)

1.1.3. Epidemiyoloji

IPNV ekonomik açıdan önemli salmonid türlerine ek olarak japon balığında (*Carassius auratus*), diskusta (*Symhysodon discus*), çapak balığında (*Abramis brama*), kalkanda (*Scophthalmus maximus*), sarıkuyrukta (*Seriola quinqueradiata*), yılan balığında (*Anguilla anguilla*), çizgili levrekte (*Morone saxatilis*), halibutta (*Hippoglossus hippoglossus*) ve levrekte (*Dicentrarchus labrax*) hastalığa neden olduğu bilinmektedir (OIE, 2006). IPN salgınlarında konakçı türü, yaşı, virüs izolatı ve çevre koşullarına bağlı olarak mortalite oranının %10 ile %90 arasında değiştiği kaydedilmiştir. Gökkuşağı

alabalıklarına ilişkin akut enfeksiyonlar 1- 4 aylık yavrularda %90 üzeri mortalite oranlarına sebep olurken artan yaşla birlikte bu oran azalmaktadır (Samuelsen vd., 2006). Enfeksiyon sonrası sağ kalan balıklar ömür boyu taşıyıcı olurlar ve virüs taşıyıcı balıkların idrar ve üreme sıvıları ile yayılarak diğer duyarlı balıkları horizontal olarak enfekte etmektedir.

Ayrıca gametler aracılığıyla virüs vertikal olarak sonraki nesillere aktarılmakta ve dezenfeksiyon uygulamalarının etkili olmadığı gösterilmiştir (Dopazo, 2020). Enfeksiyon oluşumda suyun sıcaklığı önemli bir faktördür ve genellikle suyun sıcaklığı 15 °C ve altına düştükçe mortalite oranı artmaktadır (Ogut ve Altuntaş, 2011). Bu nedenle salgınlar ve yüksek mortalite ile seyreden olgular serin bölgelerde ilkbahar sonu ve yaz başlarında, sıcak bölgelerde ise ilkbahar aylarında görülmektedir (Kalaycı vd., 2012).

1.1.4. Patogenezi ve Klinik belirtileri

IPNV'nin vücuda solungaçlar ve sindirim yolu ile girdiği bilinmektedir (Dopazo ve Barja, 2002). Hastalığın inkübasyon süresi; su sıcaklığı, balığın yaşı, türü, virüs miktarı ve etkenin virülensine göre değişmektedir. IPNV ile yapılan deneysel enfeksiyonlarda immersiyon yolu ile virüsün balıklara verilmesinden 6-20 gün sonra ölümlerin başladığı görülmüştür. Virüsün enjeksiyon yoluyla verilmesinden sonra ise 3-10 gün içerisinde balıklarda ölümlerin başladığı gözlemlenmiştir. Su sıcaklığının 10-16 °C arasında olduğu zamanlarda hastalığın inkübasyon periyodunun en kısa olduğu, en fazla ölümlerin ise 10-13 °C arasında gerçekleştiği görülmektedir (Dopazo ve Barja, 2002).

Patogenez ile ilgili yapılan çalışmalar balığın virüs ile karşılaşması sonrası organlarda meydana getirdiği histopatolojik değişiklikler ve organlarda virüs varlığının tespiti üzerinedir. Swanson ve Gillespie (1979)'nin Atlantik somonlarda yaptıkları çalışmada yavru balıklara canlı virüsün yem ile ve 1 yaşındaki balıklara periton içi enjeksiyon yoluyla virüs vermişler ve yavru balıklardan virüsün ilk izolasyonun virüs ile karşılaşmadan 3 gün sonra ancak 1 yaşındaki balıklardan ise 12 saat sonra pankreastan gerçekleştiğini bildirmişler. Bunu sırası ile böbrek, dalak ve karaciğerde virüs varlığının tespiti izlemiştir. Virüs, yavru balıklarda 8. günde maksimum seviyesine (1010 DKİD50 / 0,2 ml) ulaşmıştır.

Hasta balıklarda iştahsızlık, özellikle vücudun arka 1/3'lük kısmında renk koyulaşması, ekzoftalmus, spiral yüzme, asites, solungaçlarda solgunluk, uzamış halde dışkı (pseudofeçes) görülen en tipik semptomlardır. İç organların incelemesinde mide ve bağırsakların boş olduğu, sarı, jelatinimsi bir eksudat ile dolu olduğu, bazı yavru balıkların

dalak, kalp, karaciğer ve böbreklerinin solgun olduğu, pilorik seka ve anterior adipoz dokuda peteşiyel kanamaların olduğu ve karın boşluğunda asites görüldüğü bildirilmiştir (Noga, 1996; Wolf, 1988).

IPNV'nin, salmonid dışındaki balık türlerinden sarı kuyrukların (*Seriola quinqeradiata*) baş bölgesinde hemoraji ve asites, Japon yılan balıklarında (*Anguilla japonica*) nefrit, kalkan balıklarında (*Scophthalmus maximus*) hematopoietik dokuda nekroz, levrek (*Dicentrarchus labrax*) larvalarında spiral şekilde yüzme, hava kesesinde şişkinlik ve ekzoftalmusa neden olduğu bildirilmiştir (Dopazo ve Barja, 2002; Noga, 1996; Wolf, 1988).

1.1.5. Teşhis ve Kontrol

IPNV'nin teşhisi hücre kültüründen virüsün izolasyonunu takiben immünolojik/moleküler testler uygulanarak yapılmaktadır. Bu amaçla nötralizasyon testi (NT) (Julin ve ark., 2013), indirektfloresan antikor testi (IFAT), immunfloresan testi, immunoblot, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), konvansiyonel revers transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ve real-time revers transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) testleri kullanılabilir (Büyükekiz vd., 2018; Pekmez vd., 2020).

Hastalığın teşhisi için Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü, böbrek ve gonadlar ile seminal sıvılardan hücre kültürü aracılığıyla virüs izolasyonunu önermektedir. Bluegill fry (BF-2), epithelioma papulosum cyprini (EPC), fathead minnow (FHM), pike gonad (PG) hücreleri IPNV izolasyonunda kullanılmaktadır. IPNV izolasyonu için en duyarlı hücre hatları Rainbow Trout Gonad-2 hücre hattı (RTG-2) ve BF-2'dir (Lorenzen vd., 1999). İzolasyonu takiben teşhisi kısa sürede gerçekleştirmek amacıyla son zamanlarda moleküler testler kullanılmaktadır. Real-time RT-qPCR ile SYBER Green 1 kullanılarak poliprotein geni üzerinde viral protein kodlayan kısım tespit edilmektedir (Büyükekiz vd., 2018). Pozitif sonuçlar viral nükleik asit varlığını kanıtlamakta, ancak virüs enfeksiyonu ile ilgili bilgi vermemektedir.

Salgınların kontrolü hastalıktan korunma ile mümkündür ve yetiştiricilerin uygulayacağı hijyen stratejileri kontrolü sağlayacaktır. Hastalıktan ari işletmelerde yetiştiricilik yapılması önemli bir faktördür ve işletmelere IPNV'den ari sertifikalı yumurtalar ve balıklar alınmalıdır. Yumurtalara iyodoforla (100 ppm 10 dakika süreyle)

dezenfeksiyon yapılması yumurta dışındaki virüsü inaktive etmekte ancak embriyo içerisindeki virüsü etkilememektedir. İşletmedeki ekipmanların dezenfeksiyonunda 200-250 ppm iyodofor, 50 ppm klorin ve %1'lik sodyum hidroksitin kullanılabileceği belirtilmiştir (OIE, 2006). Tankların rutin temizlenmesi amacıyla ozon veya klorin (yaklaşık 1600 ppm) kullanımı tavsiye edilmektedir. İşletmeye giren suyun dezenfeksiyonu için suyun filtrelerden geçirilmesi ve UV (Ultra Viyole) ışınlarına maruz bırakılması önerilmektedir (OIE, 2006).

Hastalıktan korunma amacıyla hazırlanan inaktif IPNV aşıları koruyuculuk sağlar, ancak immünite süresi kısadır. Enjeksiyon yoluyla aşılama enfeksiyonlara karşı daha iyi koruma sağlamasına rağmen, IPN genellikle erken dönemlerde görülen bir enfeksiyon olduğundan dolayı enjeksiyon ile aşılama bu dönemlerde uygulanamamaktadır. Aşıya alternatif olarak PVP-iyot, epsilon amino kaproik asit, tranexanicasit gibi antiviral kemoterapötikler mortaliteyi azaltması beklenmektedir ancak kesin bir tedavi mevcut değildir (Balta, 2016).

Balık popülasyonları içerisinde patojenlere karşı dirence sahip olan genetik varyasyonların bulundukları saptanmıştır. Gökkuşağı alabalıklarında IPNV'ye karşı direnç yapay seleksiyon yolu ile elde edilebilir ve enfeksiyonların kontrolünde alternatif yöntem olarak kullanılabilir (Flores-Mara vd., 2017).

1.2. Moleküler Belirteçler

Tüm organizmalar, normal hücresel işlemler veya çevreyle etkileşimler nedeniyle mutasyonlara maruz kalır ve bu da genetik çeşitliliğe (polimorfizm) yol açar. Bir türdeki genetik çeşitlilik, organizmanın değişen çevreye uyum sağlama yeteneğini artırır ve türün hayatta kalması için gereklidir (Fisher, 1930). Seçilim ve genetik sürüklenme gibi süreçlerle birlikte, genetik çeşitlilik bireyler arasında ortaya çıkar ve popülasyon, tür ve daha yüksek dereceli taksonomik gruplar düzeyinde farklılaşmaya yol açar. Moleküler genetik belirteçler, bireylerin, popülasyonların veya türlerin genetik benzersizliğini tespit etmek için güçlü araçlardır (Hillis vd., 1996). Bu belirteçler, genetik çeşitliliği keşfetmek için gerekli olan analitik gücü devrim niteliğinde değiştirmiştir. Genetik çeşitlilik verilerinden elde edilen sonuç, evrim, doğal kaynakların korunması ve yönetimi ve genetik iyileştirme programları vb. üzerine yapılan araştırmalarda çeşitli uygulamalara sahiptir.

Yaygın olarak kullanılan Deoksiribonükleik Asit (DNA) belirteçleri arasında restriksiyon parça uzunluğu polimorfizmi (RFLP), rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA

(RAPD), çoğaltılmış parça uzunluğu polimorfizmi (AFLP), mikrosatellit, ifade edilmiş dizi etiketi (EST) ve tek nükleotid polimorfizm (SNP) belirteçleri yer almaktadır (Gopikrishna vd., 2013). SNP'ler, herhangi bir organizmanın genomunda (kodlayan ve kodlamayan bölgeler) en yaygın polimorfizmi temsil ettikleri ve diğer belirteçler ve yöntemlerle tespit edilemeyen gizli polimorfizmi ortaya çıkardıkları ve array gibi sistemlerin oluşturulmasında otomasyona adapte olabildikleri için moleküler belirteç geliştirmede odak noktası haline gelmişlerdir. Tek nükleotid polimorfizmi (SNP), bir lokus içindeki belirli bir nükleotid pozisyonunda alternatif bazlar içeren farklı alellere yol açan nokta mutasyonlarının neden olduğu polimorfizmleri tanımlamaktadır.

Teorik olarak, bir lokus içindeki bir SNP, her biri SNP bölgesinde iki olası baz çiftinden birini içeren iki alele kadar üretebilmektedir. Bu nedenle, SNP'ler bi-allelik olarak kabul edilmiştir ve ko-dominant belirteçler olarak kalıtılmaktadır.

Moleküler belirteç destekli seçilim, istenen balık özelliklerine bağlanan DNA belirteçlerinin tanımlanmasına dayanır. İlgi duyulan özellik ile önemli ölçüde ilişkili genetik belirteçlerin tanımlanması, çok sayıda birey için özellik fenotiplerinin toplanmasını, bu bireylerin bir dizi genetik belirteç kullanılarak genotiplenmesini ve daha sonra her iki veri setinin ilişki veya bağlantı tabanlı çalışmalarda kullanılarak niceliksel özellik lokuslarına (QTL) bağlı belirteçlerin keşfedilmesini içerir (Wenne, 2023). Özelliğin genetik mimarisine, yani önemli QTL sayısına ve etkilerinin büyüklüğüne bağlı olarak, bu QTL'lere sıkı bir şekilde bağlı belirteçler üreme programlarında belirteç destekli veya genomik seçilim için kullanılabilir. QTL çalışmalarının sonucuna bağlı olarak aday genler belirlenir ve aday gendeki genetik varyasyonlar ile balıkların performans özellikleri arasındaki korelasyon, su ürünleri yetiştiriciliği verimini artırmak, çiftçilerin gelirlerini iyileştirmek ve gıda güvenliğini geliştirmek için aday gen ilişkili seçilimlerde kullanılabilir. Bunun için öncelikle aday genlerdeki SNP belirteçler tespit edilmelidir. SNP belirteç keşfi için en doğru ve en çok kullanılan yaklaşım DNA sekanslamadır.

1.2.1. DNA Sekanslama Teknolojileri

Başlangıçta, Sanger yöntemi geliştirilen ilk DNA dizileme platformuydu ve 1975 ile 2005 yılları arasında mevcut olan tek teknolojiydi. Nispeten uzun okumalar (500 ila 1000 bp) üretmesine rağmen, bu teknoloji hala kopyalama hataları ve bilgi kaybı gibi dezavantajları olan bir ön amplifikasyon adımı gerektirir (Shendure vd., 2017). Ayrıca, her

bir numunenin jel veya kapiler elektroforez ile ayrı ayrı çözülmesini gerektirir ve bu da maliyet ve emek açısından verim üzerinde büyük bir sınırlamaydı.

“Yeni Nesil Dizileme” (NGS) devrimi, 454 Life Sciences'ın (Branford, CT, ABD) ilk olarak pirosekanslama platformunu yüksek verimli kısa okuma teknolojisi olarak tanıtmasıyla (Margulies vd., 2005) 2005 yılında başladı ve Sanger dizilemeye kıyasla maliyeti ve dizileme süresi düşmüştür. NGS, Sanger dizilemesine birçok yönden üstünlük sağlamaktadır. En önemlisi, karmaşık bir DNA kütüphanesi için reaksiyon başına bir tüp kullanmak yerine tüm şablonların tek bir reaktif hacmiyle erişilebilir olduğu iki boyutlu bir yüzeye sabitlenmesiyle birden fazla örneğin eş zamanlı sekanslanmasıdır. Ulaşılabilir okuma uzunlukları 500 bp'nin altında olduğundan, ikinci nesil dizileme teknolojileri "kısa okuma" dizileme teknolojileri olarak da bilinir (Santos vd., 2020).

Mevcut ikinci nesil yaklaşımlar arasında yaygın olarak kullanılan platform, tipik olarak DNA parçalanması, DNA uç onarımı, adaptör ligasyonu, yüzey bağlanması, DNA parçalarını çoğaltmak için köprü çoğaltımı ve dizileme reaksiyonunu içeren bir sürece dayanan sentez tabanlı dizileme yapan Illumina platformudur. Ancak ikinci nesil teknolojiler büyük kopyalama hataları, diziye bağlı önyargılar, metilasyon gibi bilgi kaybı sorunları devam etmektedir ve birçok çalışma için hala pahalı olabilir.

“Üçüncü nesil” veya “uzun okuma” dizileme teknolojilerinin ortaya çıkışı oyunun kurallarını değiştiren bir gelişme olarak kabul edildi çünkü gerçek zamanlı dizilemede uzun okumalar üretme olanağı sağladılar (Santos vd., 2020; Van Dijk vd., 2018). Üçüncü nesil dizileme teknolojisi 2011 yılında Pacific Biosciences (PacBio) aracılığıyla kullanılabilir hale gelmesine rağmen, DNA dizileme teknolojisi, Oxford Nanopore Technologies (ONT) tarafından 2014 yılında taşınabilir, düşük fiyatlı, hızlı MinION'un piyasaya sürülmesiyle tek molekül nanopor dizilemesinin kolay erişilebilir bir aşamasına geçti.

1.3. Genom Düzenleme Araçları

Biyoteknolojik araçlar ile hedef genlerde istenilen mutasyonları oluşturmak amacıyla geliştirilen ilk sistemlerden biri meganüklezlardır. Meganükleazlar, hedef bölge repertuarlarını genişletmek için çeşitli stratejiler kullanarak yeniden yapılandırılabilen yüksek düzeyde bölge özgü çift zincirli DNA endonükleazlardır (Grizot vd. 2009). Bu enzim sınıfının en önemli dezavantajı, modüler olmayan konfigürasyonudur. DNA tanıma ve kesme fonksiyonları kısmen tek bir protein alanında iç içe olabilir. Bu nedenle,

Meganükleazları gen düzenleme aracı olarak dizayn etmek zordur ve bu problem diğer düzenleme araçlarının gelişmesine yol açmıştır (Guha vd. 2017).

Son zamanlarda geliştirilen genom düzenleme araçları, modüler bir tasarıma sahip olarak daha esnek olmaya çalışmaktadır: DNA kesme domaini ve programlanabilir DNA bağlama domaini (Guha vd. 2017). Bu yaklaşımla ilk geliştirilen gen düzenleme aracı çinko parmak nükleazlar (ZFN)'dır (Akbudak ve Kontbay, 2017). Bu aracın DNA'ya spesifik olarak bağlanan kısmı çinko parmak (ZF) proteinlerden oluşur. Her ZF birimi 30 amino asit içerir ve bu amino asitler bir adet çinko atomuna bağlıdır. α helix yüzeyinde bazı spesifik pozisyonlarda bulunan amino asitler ZF proteinlerin DNA ile spesifik interaksiyonunu sağlamaktadır. Diğer amino asitlerin bir konsensüs iskeleti olarak bırakılıp sadece bu spesifik amino asitlerin değiştirilmesi ile farklı sekanslara bağlanan zinc finger proteinler elde edilebilir. *FokI* endonükleaz ise kesim domainini oluşturur. Zinc finger dizisi ile kombine edilmiş bu enzimin çift iplik kesiği oluşturabilmesi için dimerize (tıpkı bir makas gibi) olması gerekir.

Bu nedenle ZF protein dizisinin bir monomeri çift iplikli DNA'ya üstten bağlanırken diğer monomer aralarında 5-7 bp açıklık olacak şekilde alttan bağlanır ve dimer oluşturur. Böylece bu alt ve üst iplikten bağlanan ZF proteinleri arasında kalan bölgede (ki burası hedef bölge olarak seçilmiştir) *FokI* çift iplik kesiği oluşturabilir. Gerek dizaynlarının zor olması gerekse hedef-dışı etki nedeniyle toksisite oluşturması, ZFN'leri dizi spesifik nükleazlar içinde en az tercih edilen teknik haline getirmiştir (Petolino 2015).

ZFN sistemine bir alternatif olarak geliştirilen TALEN (Transkripsiyon aktivatör benzeri efektör nükleazlar) sistemi de ZFN sistemi gibi bir DNA bağlanma domaini ve *FokI* DNA kesim domaininden oluşmaktadır (Joung ve Sander, 2013). Genom modifikasyonu aracı olarak kullanılan TALEN'ler, her biri farklı bir nükleotidi tanıyıp bağlanan TALE protein dizisi ve *FokI* endonükleazının birleştirilmesiyle oluşturulmuştur. TALE proteinleri çeşitli kopya sayılarında her biri 33-35 amino asitten oluşan tekrarlar içerirler (Kumar vd. 2015). Her tekrarın 12. ve 13. pozisyonunda "repeat variable diresidue (RVDs)" olarak adlandırılan ikili amino asit, hedef DNA sekansıyla baz eşleşmesini sağlar. DNA'nın istenen bölgesinde kesim yapmak için alt ve üst zincirlerden karşılıklı DNA zincirlerine bağlanan bir çift TALEN gereklidir (Akbudak ve Kontbay, 2017). Alt ve üst DNA ya bağlanan TALEN'ler dimerize olmadan (birbirleriyle temas kurmadan) TALEN' in nükleaz aktivitesi gerçekleşemez. Bu dimerize yapı oluştuğunda *FokI* endonükleazları hedeflenen DNA sekansında çift zincir kesikleri oluşturur. TALE protein dizisinin inşaası kolay değildir ve

TALE proteinlerindeki tekrarların sekansı birbirine çok benzer olduğundan PCR stratejisi kullanarak sıralı bir biçimde birleştirmek neredeyse imkânsızdır. Her ne kadar TALEN sisteminin spesifikliği oldukça yüksek olsa da TALEN kullanılarak genom düzenlemede hedef-dışı mutasyonların olabileceği rapor edilmiştir.

Düzenli aralıklarla kümelenmiş kısa palindromik tekrar (CRISPR) ile ilişkili 9 (Cas9) nükleaz, bakteriyel uyarlamalı bir bağışıklık savunma sisteminden türetilen ve yakın zamanda keşfedilen, etkili bir gen düzenleme platformudur (Li et al., 2020). Bu sistem, ökaryotik hücrelerin genomunu bir RNA ile yönlendirilmiş DNA kesme modülü aracılığıyla hedeflenen genetik modifikasyonları indüklemek için ZFN'lere ve TALEN'lere kıyasla ucuz ve kolay uygulanabilir potansiyel bir alternatif olarak ortaya çıkmıştır (Akbudak ve Kontbay, 2017; Li vd. 2020).

1.3.1. CRISPR-Cas9 Sistemi ile Genom Düzenlenmesi

CRISPR/Cas9 aracılığıyla genom düzenleme sisteminin 3 temel bileşeni bulunmaktadır (Bozok vd. 2017);

- Nükleer lokalizasyon sinyali içeren Cas9 proteini,
- gRNA (rehber RNA) molekülü (yaklaşık 20 nükleotidden oluşan 5’ ucu hedef genomik bölgedeki dizi ile eşleşir, 3’ ucu içerdiği sap ilmek ile Cas9’un bağlanması için iskele görevi yapar)
- Hedef genomik dizinin aşağısında (downstreaminde) PAM dizisi olarak isimlendirilen DNA motifidir.

gRNA’nın kılavuzluk ettiği Cas9, PAM dizisinin yaklaşık 3 nt yukarısından DNA’yı keserek çift zincir kırığı oluşturur. Cas9 ile indüklenen DNA kırığı sonucunda DNA tamir mekanizmaları aktive edilir.

Ökaryot hücrelerde DNA çift zincir kırıklarının tamirinde iki mekanizma kullanılmaktadır (Sander ve Joung, 2014);

1) Homolog rekombinasyon (HR: homologous recombination ya da HDR: homology-directed repair)

2) Homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ: non-homologous end-joining)

Cas9 enzimi ile indüklenen çift zincir kırıkları HR ya da NHEJ ile tamir edilebilmektedir. NHEJ ile tamir hataya meyilli olduğundan çerçeve kayması mutasyonları (Frameshift mutations) ve indel mutasyon adı verilen insersiyon/delesyon mutasyonlarına

neden olur. Bu mutasyonların kazanılması ile gen ürünü bozulduğundan, NHEJ gen çıkarma (knock-out, KO) uygulamaları için oldukça uygundur. CRISPR/Cas9 teknolojisinin kullanıldığı uygulamalarda Cas9 ve gRNA'nın transfeksiyonu sırasında hedef DNA dizisiyle homoloji gösteren bir verici (donör) DNA dizisinin de hücreye verilmesiyle HR yoluyla genom içine bu DNA dizisinin eklenmesi (knock-in) sağlanabilmektedir. Farklı çalışma grupları tarafından yapılan uygulamalarda homolog rekombinasyon yoluyla insersiyon, delesyon ya da dizi değişikliği yapabilmek mümkün olmuştur.

Genom düzenleme amacıyla kullanılacak olan deneysel yaklaşımlarda CRISPR-Cas9 sisteminin bileşenleri etkin bir şekilde hücreye verilmelidir (Shui vd. 2016). Bu amaçla sistemin işleyişini sağlayacak olan genetik kod birkaç farklı türdeki vektörle kodlanabilir. Vektörleri CRISPR-Cas9 dizisinin kodlandığı nükleik asit iskelet yapısını temel alarak, viral ve plazmit vektörler olarak iki temel grupta incelemek mümkündür.

1.3.2. İkinci Jenerasyon CRISPR Sistemleri ile Tek Nokta Mutasyonları

CRISPR / Cas9, bir genom mühendisliği aracı olarak hala biyolojik bilimlerde yapılan en güçlü ve etkili keşiflerden biridir. Kullanımı kolaydır ve amaçlanan hedeflerde çift zincir kırıklar oluşturma yeteneği sağlamdır. CRISPR-Cas9 gen düzenleme platformu ile tek nükleotit mutasyonları homoloji yönlendirilmiş tamir mekanizması aracılığıyla yapılabilmektedir (Hess vd. 2017). Cas9 aracılı genom düzenlemesinin önemli optimizasyonu hücre kültürü sistemlerinde homoloji yönlendirilmiş tamir mekanizması aracılığıyla yaklaşık %60'a ulaşan verimlilikte tek nükleotid düzenleme işlemine imkân vermiştir (Richardson vd. 2016). Ancak, bu yöntem çift zincir DNA kırıklarını oluşmasına dayandığı için homoloji yönlendirilmiş tamir mekanizması homolog olmayan uç birleştirme tamir mekanizması ile rekabet etmek zorundadır (Hess vd. 2017). Rekabet sonucunda homolog olmayan uç birleştirme tamir mekanizması aracılığıyla indel mutasyonları oluşabilir ve hedef ürün üzerinde olumsuz etkilere neden olabilirler. Ayrıca verici DNA kalıbının aktarılması da ayrı bir işgücü gerektirmekte ve yeterli miktarda aktarım her zaman gerçekleşmemektedir. DNA hasarına dayalı kısıtlamalar ve verici DNA kalıbına olan ihtiyacı ortadan kaldırmak için CRISPR-Cas aracılı baz düzenleme sistemleri geliştirilmiştir.

CRISPR-Cas aracılı DNA baz düzenleme sistemleri sağlam ve kesin tek bazlı değişiklikler oluşturmak için baz modifikasyon proteinlerini, Cas9 varyantlarını ve DNA onarım yollarında yer alan enzimlerin inhibitörlerini kullanır (Martin, 2018). Bu sistemlerde

çift zincir DNA kırıkları olmadan mutasyonlar yapılabilir, potansiyel olarak zararlı indellerin olasılığını azaltır ve bir donör şablonu olmadan spesifik olmayan birleşme şansını azaltır. Baz düzenleyicileri temel olarak tasarlanmış baz modifikasyon enzimi ve çift zincirli DNA'yı kesme özelliği kaybetmiş Cas9 varyantlarından oluşmaktadır. Bu enzim kompleksi gRNA ile hedef bölgeye yönlendirilir ve tek zincir kırığı oluşturularak mutasyon gerçekleştirilir.

DNA baz editörleri iki gruba ayrılmaktadır:

- ✓ Sitozin baz düzenleyicileri (SBD): C– G'den T – A'ya bir mutasyon
- ✓ Adenin baz düzenleyicileri (ABD): A – T'den G – C'ye bir mutasyon

1.4. Salmonid Türlerinde IPNV Direncinde Genetik Temeller ve Yeni Nesil Genom Düzenleme Yaklaşımları

Su ürünleri yetiştiriciliğinde önemli ticari tür olmaları ve bu türler için genetik araçların bulunmasından dolayı Atlantik somon ve gökkuşağı alabalığı üzerinde çeşitli viral hastalıklara karşı genom düzeyinde ilişkilendirme analizleri yapılmaktadır (Ozaki vd., 2007; Houston vd., 2008). Bu çalışmalar sonucunda belirlenen ana genlere ya da lokuslara dayanarak ticari stoklar oluşturulmakta ve pazara sunulmaktadır. Örneğin, Norveç Atlantik somon endüstrisi tarafından kullanılan somon yumurtalarının %55'inden fazlasını tedarik eden AquaGen firması, yumurta üretiminde IPN direnci için marker destekli seçilim gerçekleştirmiş ve "QTL-innOva® IPN" ticari isimli IPN dirençli yumurtaları 2009 sonbaharında pazara sunmuştur (AquaGen, 2021). Norveç su ürünleri yetiştiriciliği endüstrisinde somon çiftliklerindeki IPN salgınları 2018 yılında % 90'ın üzerinde azaldığı tespit edilmiştir. Marker seçilimine dayalı çalışmalar gelişmiş gen düzenleme tekniklerinden faydalanarak daha kısa sürede IPN, sea lice gibi çeşitli patojenlere karşı dirençli bireyler elde etmek için devam etmektedir (Aqualeap, 2021).

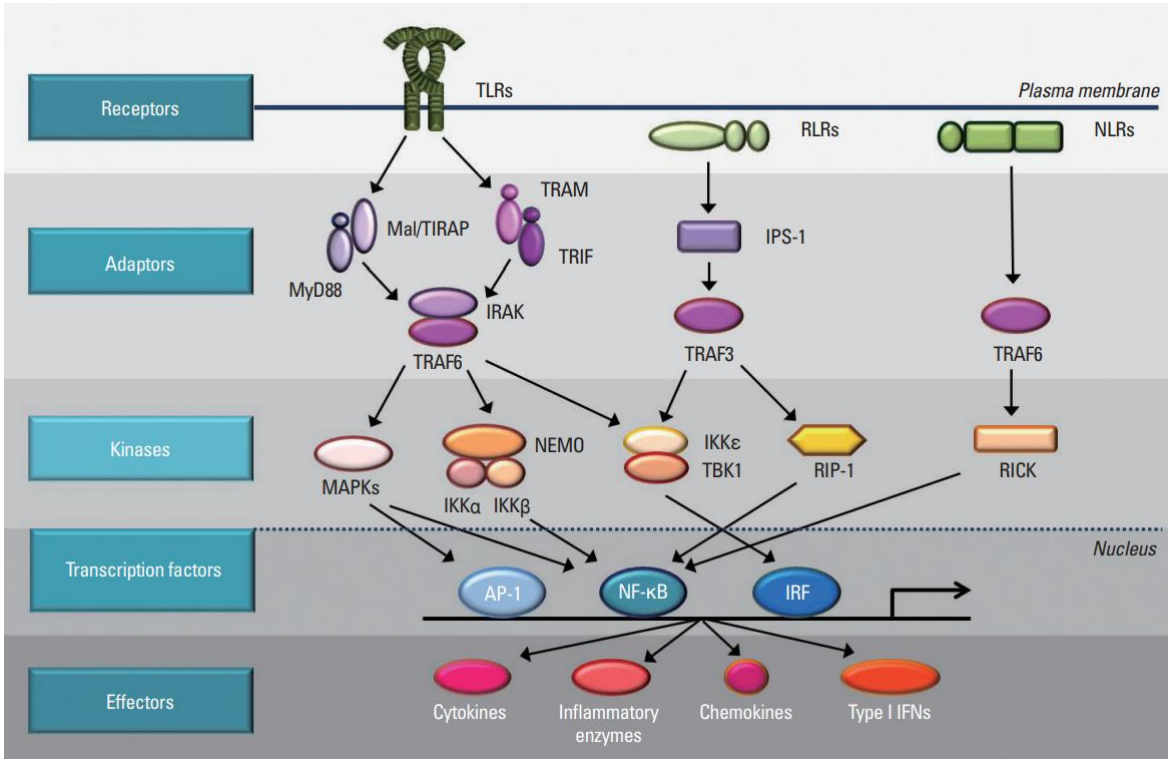
Genom düzeyinde ilişkilendirme analizleri ile IPNV karşı dirençlilikte etkin olan lokuslar önce somon balığı için daha sonra gökkuşağı alabalığı için belirlenmiştir. Çalışmalar gösterdi ki Gökkuşağı alabalığının IPNV dirençliliğinde etkin olan lokusları ve genleri farklıdır. Hatta bu farklılık kullanılan özelliğin genetik yapısı ve kullanılan modeller gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak aileler arasında bile değişebilir. Gökkuşağı alabalığında IPNV dirençliliğinde etkin olan iki majör lokus linkage grup 3 ve 22 üzerinde belirlendi ve bu lokuslar kromozom 14 ve 16 üzerinde yer almaktadır (Hu vd., 2016). Kromozom 16'da patojen tanıma reseptörlerinden Toll benzeri reseptörü (TLR) 9'un yer alması bağışıklık

sistemini işaret etmektedir. Daha sonra SNP markırlara dayanarak genom düzeyinde ilişkilendirme analizi ile IPNV dirençliliğinde etkin olabilecek aday genler belirlenmiştir (Rodríguez vd., 2019). Sentrinspesifik proteaz 5 (SENP5) ve doğal bağışıklık sisteminde rol alan diğer proteinlerdeki tek nükleotit polimorfizmin IPNV karşı dirençlilikte etkili olduğu gözlenmiştir. Sentrin spesifik proteaz 5 small ubiquitin-likemodifier (SUMO) yolağına katılır. Fonksiyonu esas olarak izopeptidaz aktivitesi ve genetik transkripsiyon, hücre döngüsü, apoptoz, hücre içi ve çekirdek içi trafik ve protein stabilitesi dâhil viral replikasyon için anahtar olan biyolojik süreçlerin düzenlenmesiyle ilgilidir. Gen ekpresyon çalışmaları salmonidlerin IPNV ile enfekte edildiğinde interferonların önemli derecede eksprese edildiğini göstermiştir (Skjesol vd., 2011). Bu bilgiler interferon üretiminden önce yer alan patojen tanıma reseptörlerinin dirençlilikte esas faktörler olabileceğini göstermektedir. IPNV, ortalama 60 nm (55-75 nm) boyutunda, zarfsız ikosahedral bir yapıya sahip olmakla birlikte tek bir kapsid tabakasından ve iki segmentli (segment A ve B) çift zincirli RNA genomundan oluşur (Dopazo, 2020).

Virüsün balıklarda enfeksiyon oluşturma mekanizması ana hatlarıyla şu şekildedir; IPNV, balık hücrelerinin yüzeylerinde bulunan yüksek moleküler ağırlıklı polipeptid reseptörlere spesifik ve spesifik olmayan şekilde bağlanmaktadır. Bağlanma sonrası adsorpsiyon gerçekleşir ve bunu takiben virüs endositoz aracılığıyla hücrenin veziküler periferik kompartımanlarına yerleşir. IPNV ile enfekte olmuş hücre transkripsiyonu VP1 ile indüklenir ve virüs için gerekli olan proteinlerin sentezi için transkribe olan poliA kuyruğundan yoksun 5’ şapkaya sahip mRNA’nın translasyonu hücresel translasyon sistemi tarafından gerçekleştirilmektedir. Virüs replikasyonu sitoplazmada gerçekleşmektedir ve bu süreçte replikatif ara maddeler olarak ve genom uzunluklu tek zincirli (ss) RNA ve genom uzunluklu VP1-dsRNA gözlemlenmiştir. Virion bileşenlerinin birleştirilmesi enfekte olmuş hücrelerin sitoplazmasında gerçekleşir ve virüs salınımı ise hücre parçalanması yoluyla gerçekleşir.

Patojen tanıma reseptörlerinin bir grubu olan hücre zarı ya da endoplazmik retikulum zarına tutunmuş Toll benzeri reseptörler (TLR) patojen üzerindeki belli yapıları tanıyarak doğal bağışıklık sistemini aktive ederler (Aoki vd., 2013). Endoplazmik retikulum zarına tutunmuş TLR3, gökkuşağı alabalığında çift zincirli RNA’nın tanınmasında görev alırken TLR7 and TLR8 tek zincirli RNA’yı tanımaktadır. Hücre zarı üzerinde bulunan TLR22’nin TLR3 gibi çift zincirli RNA’yı tanıdığı gösterilmiştir. DNA virüslerini ve CpG içeren oligo deoksi nükleotitleri (CpG-ODN'ler) TLR9 tanımaktadır ve IPNV dirençliliği ile ilişkili olan

kromozomda bulunması dikkat çekmektedir. Patojen tanıma reseptörlerinin diğer bir grubu olan retinoik asit indüklenebilir (RIG)-I benzeri reseptörler (RLR'ler) birçok hücrenin sitoplazmasında bulunup viral yapıları tanımaktadır. Gökkuşağı alabalığında bu reseptör ailesinin iki üyesi tanımlandı ve bu üyelerden Melanoma Farklılaşma İlişkili Protein 5 (MDA5) çift zincirli RNA'yı tanırken LGP2 aktivasyon düzenleyici göreve sahiptir (Chang vd., 2011). Viral döngü sırasında, Toll benzeri reseptörler replikasyon ara ürünlerini tanıyabilir ve Myd88 bağımlı ya da bağımsız sinyal yolağının aktivasyonu ile IRF bağımlı interferon üretimini uyarabilirler (Şekil 1). Benzer şekilde retinoik asit indüklenebilir (RIG)-I benzeri reseptörler replikasyon ara ürünlerini tanıyabilir ve IPS-1 (Interferon-beta promoter stimulator 1) aracılığıyla ile IRF bağımlı interferon üretimini uyarabilirler (Şekil 1). Üretilen interferonların ilgili reseptörlere bağlanması sonucunda JAK/STAT kanonik yolakları ve daha sonra MX, ISG15 veya Vıg-1/viperin gibi bilinen bir anti-viral aktiviteye sahip olan birçok interferon uyarılmış genler (ISG'ler) aktive edilir. IPNV'ye karşı dirençli birey elde etmek için bu genlerdeki tek nükleotit mutasyonları şu ana kadar incelenmemiştir.



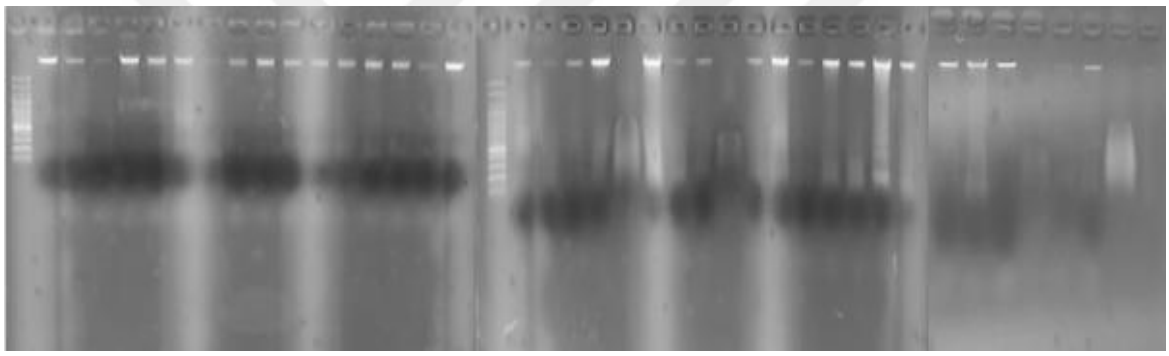
Şekil 1. Patojen tanıma reseptörleri aracılığıyla sinyal iletimi. Patojen tanıma reseptörleri (PRR'ler), hücre içi sinyal iletiminde farklı lokalizasyonlarda konumlanarak özgün işlevler üstlenmektedir. Toll-benzeri reseptörler (TLR'ler) çoğunlukla plazma membranında yer alırken, retinoik asit indüklenebilir gen I-benzeri reseptörler (RLR'ler) ve nod-benzeri reseptörler (NLR'ler) sitoplazmada bulunur. TLR'ler, Mal/TIRAP ve MyD88 ya da TRAM/TRIF adaptör proteinleri aracılığıyla IRAK ve TRAF6'ya sinyal ileterek aşağı akıştaki kinaz kaskadlarını aktive eder. RLR'ler, sinyal iletiminde IPS-1 ve TRAF3'ü kullanırken, NLR'ler aktivasyonu TRAF6 üzerinden gerçekleştirir. Bu reseptörlerden türeyen sinyaller, MAPK, IKK, TBK1, RIP-1 ve RICK gibi kinazları harekete geçirerek AP-1, NF-κB ve IRF transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna yol açar. Aktive edilen transkripsiyon faktörleri, spesifik promotör bölgelerine bağlanarak sitokinler, kemokinler, inflamatuvar enzimler ve tip I interferonlar gibi efektör moleküllerin transkripsiyonunu indükler (Jeong ve Lee, 2011).

Gökkuşağı alabalığını da içeren birçok balık türünün tüm genom verisinin mevcut olması ve CRISPR gibi etkin yöntemlerin gelişmesi genetik manipülasyonların farklı uygulama amaçları için yapılmasına imkân vermektedir. Şu ana kadar balık renginin, et kalitesinin, üremenin geliştirilmesi için CRIPR-Cas9 ile Zebrafish, Atlantik somon ve Gökkuşağı alabalığı gibi çeşitli türler üzerinde gen manipülasyonları yapılmıştır (Zhu and Ge, 2017). Model organizma elde etmek amacıyla teleost patojen tanıma reseptörlerinden sadece Rohu balığının (Labeo rohita) TLR22 gen bölgesine CRISPR-Cas9 uygulanmıştır (Chakrapani vd., 2016). Ancak bu sistem şu ana kadar gökkuşağı alabalığı bağışıklık sistemi ile ilgili genler üzerinde test edilmemiştir ve balık patojenlerine karşı dirençli bireylerin elde edilmesi için CRISPR-Cas9 sisteminden faydalanılmamıştır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Damızlık Seçimi ve Markalama

IPNV ari olduğu belirlenen Gürpınar alabalık çiftliğinde enfeksiyon deneyinde damızlık olarak kullanılacak gökkuşağı alabalıkları seçilmiş ve markalanmıştır. Aynı zamanda damızlıklardan tür belirleme ve gelecek iş paketlerinde kullanmak üzere kuyruk dokuları alınmıştır. Kuyruk dokularından QIAamp 96 DNA QIAcube HT Kit ile DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 2) ve sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -20 °C de muhafaza edilmektedir.



Şekil 2**.** Enfeksiyon denemelerinde kullanılmak üzere seçilen balıklardan DNA izolasyonu

Seçilen balıkların gökkuşağı alabalığı olduğunu genetik olarak göstermek için COI-Fish primer çifti (COI-Fish-F 5`-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3`, COI-Fish-R 5`-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3`) (Ward vd., 2005) kullanılarak COI barcod gen bölgesi çoğaltılmıştır (Firidin vd., 2020). Bu gen bölgelesi için PCR karışımı, 5 µl 2X Master Mix (Qiagen), her primer çiftinden (Forward ve Reverse) 0,5 µl, 1µl DNA ve 3 µl ultra saf su ile toplam 10 µl hacimden oluşturulmuştur ve aşağıdaki PCR şartlarında amplifikasyon gerçekleştirilmiştir (Tablo 2).

Tablo 2. COI barcod gen bölgesi için PCR şartları

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	94 °C	3 dakika	1
Denatürasyon	94 °C	30 saniye	35
Hibridizasyon	55 °C	45 saniye	
Polimerizasyon	72 °C	45 saniye	
Son polimerizasyon	72 °C	7 dakika	1

PCR ürünlerinin 6 µl'si %1,5'lik agaroz jel üzerinde 1X TBE tampon sisteminde yürütülüp etidyum bromür (0,5 µg/ml) ile boyanan fragment bantları jel görüntüleme sistemi ile görüntülenmiştir. PCR ürünleri alkol purifikasyonu yapıldıktan sonra BigDye Terminator Cycle Sequencing Kiti (Applied Biosystems) kullanılarak ABI 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystem) ile dizi analizi yapılmıştır (Firidin vd., 2020).

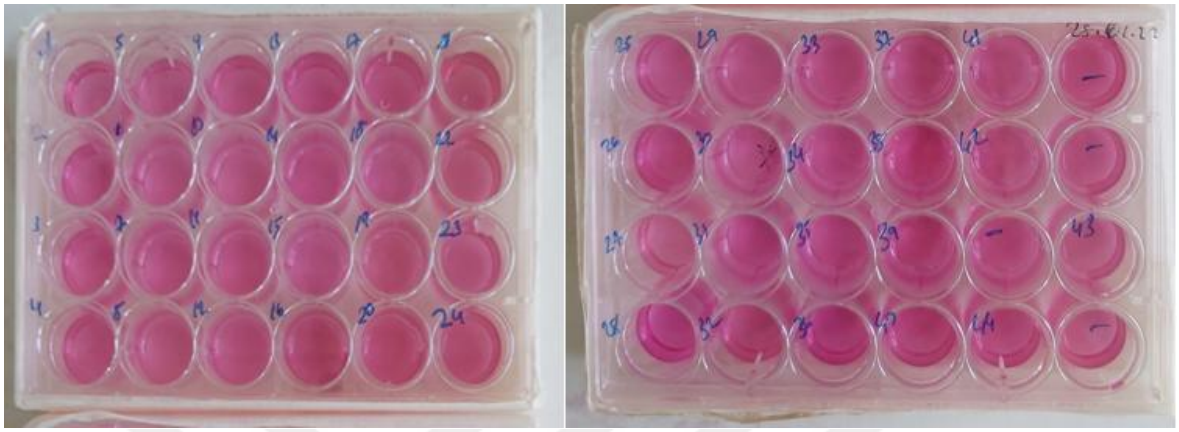
Sağımdan bir hafta önce damızlıkların IPNV taşıyıcı olmadıklarını kanıtlamak amacıyla 2 ml'lik santrifüj tüplerine her bir damızlıktan sperm ya da yumurta dokusu alınmıştır. Her bir damızlığa ait doku 5 ml MEM (Minmum Essential Medium) solusyonu ile karıştırılıp ezildikten sonra doku karışımdan QIAGEN RNeasy Mini Kiti ile RNA izole edilmiş ve kalitatif analiz %1,5 agaroz jelde yapılırken kantitatif analiz NanoDrop™ 8000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) ile yapılmıştır. Ardından IPNV spesifik primer çifti (IPNV_VP2_512_F 5'-GGTGGAGAGCCTGACCTACAA-3', IPNV_VP2_1244_R 5'-GGATCAGCTCGTAGTTGGACACT-3') ile QIAGEN OneStep RT-PCR Kiti kullanılarak RT-PCR yapılmıştır (Büyükekiz vd., 2018). Reaksiyon karışımı 3 µl RNA, 5 µl QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer (5x), 1 µl dNTP mix, 1 µl Primer F, 1 µl Primer R, 1 µl QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix ve 1 µl RNase-free water olacak şekilde hazırlanmıştır ve Tablo 3'de belirtilen şartlarda RT-PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3. Revers transkriptaz PCR protokolü

Aşama	**Sıcaklık**	**Süre**	**Döngü Sayısı**
Ters transkripsiyon	50 °C	30 dakika	1
İlk Denatürasyon	95 °C	15 dakika	1
Denatürasyon	94 °C	1 dakika	40
Hibridizasyon	59 °C	30 saniye	
Polimerizasyon	72 °C	1 dakika	
Son polimerizasyon	72 °C	10 dakika	1

IPNV taşıyıcı olmadıklarını hücre kültürüyle de göstermek için EPC hücre hattı içeren 25 ml flask 1:2 pasajlanıp her bir kuyucuğa 1 ml hücre ekilerek 24'lük plate

hazırlanmıştır ve hücrelerin zemini tamamen kaplaması için 23 °C de 24 saat inkübe edilmiştir (Şekil 2). Ertesi gün 100 µl doku karışımından ekilmiştir ve 15 °C'de 7 gün boyunca inkübe edilmiştir.



Şekil 3. 100 µl doku karışımı ekilmiş EPC hücre hattı içeren 24'lük plate

2.2. Enfeksiyon Deneyinde Kullanılacak Larvaların Üretimi

Ocak ayında enfeksiyon deneyinde kullanılacak larvaları elde etmek için 10 dişi X 10 erkek birebir döllenmiştir. Suni dölleme işlemi sırasında damızlıkların verimlilikleri hakkında bilgi edinmek için damızlık boy, ağırlık, toplam yumurta ağırlığı bilgileri not edilmiştir (Tablo 4). Sağım sonrası döllenmiş yumurtalar Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü kuluçkahanesinde dikey kuluçka dolabındaki tablalara yerleştirilmiş ve bakımlarına devam edilmiştir. Yaklaşık bir ay boyunca 10 °C havalandırılmış suda inkübe edilmiştir ve yaklaşık bir ay sonra larva çıkışı gözlenmiştir. Larvalar 4 bölmeli kare tanka (1*40*40*40=64 litre) aktarılmıştır ve deney başlangıcına kadar günde üç kez standart toz yem ile beslenilmiştir.

Tablo 4. Damızlıklara ait sağım ve döllenme sürecindeki boy, ağırlık ve yumurta bilgileri

Cinsiyet	Sağım Tarihi	Boy (cm)	Sağım Öncesi Ağırlık (gr)	Sağım Sonrası Ağırlık	Toplam Yumurta Ağırlığı (gr)	Ortalama Yumurta Çapı (mm)	20 Yumurta Ağırlığı (gr)	1 Yumurta Ağırlığı (gr)	Toplam Yumurta Sayısı	Gözlenme Tarihi	Çıkış Tarihi
Dişi	4.01.2023	50,5	2,316	1,820	310	5,43	1,96	0,10	3158	24.01.2023	12.02.2023
Erkek	4.01.2023	52,7	1,978								
Dişi	4.01.2023	52,5	2,228	1,863	380	5,21	1,665	0,08	4565	24.01.2023	12.02.2023
Erkek	4.01.2023	48,5	1,968								
Dişi	4.01.2023	57,4	2,796	2,3	406	5,21	1,743	0,09	4659	24.01.2023	12.02.2023
Erkek	4.01.2023	56,3	2,654								
Dişi	4.01.2023	60,1	3,52	2,954	434	5,00	1,618	0,08	5365	24.01.2023	12.02.2023
Erkek	4.01.2023	42,6	1,234								
Dişi	4.01.2023	60,2	3,38	2,826	446	5,56	2,177	0,11	4097	24.01.2023	12.02.2023
Erkek	4.01.2023	49,1	1,814								
Dişi	4.01.2023	51,5	2,004	1,674	244	5,00	1,72	0,09	2837	24.01.2023	12.02.2023
Erkek	4.01.2023	42,7	1,122								
Dişi	4.01.2023	54,4	2,266	1,818	320	5,55	1,936	0,10	3306	24.01.2023	12.02.2023
Erkek	4.01.2023	44,2	1,346								
Dişi	4.01.2023	57,5	2,692	2,314	314	5,56	2,209	0,11	2843	24.01.2023	12.02.2023
Erkek	4.01.2023	45,2	1,438								
Dişi	4.01.2023	48,0	1,852	1,558	356	4,90	1,598	0,08	4456	24.01.2023	12.02.2023
Erkek	4.01.2023	44,2	1,15								
Dişi	4.01.2023	57,5	3,034	2,464	500	5,32	2,149	0,11	4653	24.01.2023	12.02.2023
Erkek	4.01.2023	41,6	1,034								

2.3. Enfeksiyon Deneyi

Bu kapsamda dört farklı izolat (YD4, A4G1, Bornova, Samsun) EPC hücre hattı içeren 24 kuyucuklu plate de aktifleştirilmiş ve daha sonra enfeksiyon çalışmalarında kullanılmak üzere 25 ml'lik flaskta çoğaltılmıştır (Ogut ve Altuntaş, 2011). Ayrıca her bir tankta 10 adet balık olup kontrol grubuyla birlikte toplamda 5 akvaryum içeren deney düzeneği hazırlanmıştır. Deneyden bir gün önce balıklar aç bırakılmış ve ertesi gün anestezi uygulanan balıklara intraperitoneal (karın altına) yolla 100 µl virus (virüs + %10 serum ve %1 antibiyotik içeren MEM) enjekte edilmiştir ancak kontrol grubuna virus içermeyen MEM enjekte edilmiştir. Balıklar uygulamanın yapıldığı ertesi günü itibariyle günde üç defa yemlenmiştir. Ayrıca günde bir defa ölü balıklar toplanmıştır ve balıklardan karaciğer, dalak, böbrek dokuları alınıp MEM içeren numune poşetinde homojenize edilmiş ve 3000xg'de 20 dakika santrifüj edilip 0,22 filtreden geçirildikten sonra EPC hücre hattı içeren plate'lere ekim yapılmıştır.

Sitopatik etki gösteren kuyucuklardan QIAGEN RNeasy Mini kiti ile RNA izolasyonu yapılmış ve IPNV spesifik primerler (IPNV_VP2_512_F: GGTGGAGAGCCTGACCTACAA, IPNV_VP2_1244_R: GGATCAGCTCGTAGTTGGACACT) ile RT-PCR yapılmıştır (Tablo 5) (Büyükekiz vd., 2018). Ölümler 20 gün boyunca gözlemlenmiştir.

Tablo 5. Revers transkriptaz PCR protokolü

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Ters transkripsiyon	50 °C	30 dakika	1
İlk Denatürasyon	95 °C	15 dakika	1
Denatürasyon	94 °C	1 dakika	40
Hibridizasyon	59 °C	30 saniye	
Polimerizasyon	72 °C	1 dakika	
Son polimerizasyon	72 °C	10 dakika	1

PCR ürünleri alkol purifikasyonu yapıldıktan sonra BigDye Terminator Cycle Sequencing kiti (Applied Biosystems) kullanılarak ABI 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystem) ile dizi analizi yapılmıştır.

$TCID_{50}$ deneyi her bir grupta 50 balık kullanılarak tekrarlanmıştır. Ancak sistemdeki klor nedeniyle verimli sonuçlar alınamamıştır. Bu nedenle ilk deney sonucunda elde edilen 4 ölü balık dirençsiz grup ve 6 yaşayan balık dirençli grup olarak değerlendirilerek

çalışmalara devam edilmiştir. Dirençli ve dirençsiz gruplardaki balıklardan kuyruk dokuları alınmış ve DNA izolasyonu için saklanmıştır.

2.4. DNA İzolasyonu ve Hedef Genlerin Çoğaltılması

İlk enfeksiyon deneyinde elde edilen 4 ölü ve 4 yaşayan balıktan alınan kuyruk örneklerinden DNeasy Blood & Tissue (Qıagen) kiti kullanılarak DNA izole edilmiştir.

TLR3, TLR9, MDA5 ve SENP5 gen bölgeleri için NCBI'daki veri kullanılarak FASTPCR programı ile genomik diziyi çoğaltmak amacıyla primerler dizayn edilmiştir (Tablo 6) (Kalendar vd., 2009). Hem damızlıklardan hem de dirençli ve dirençsiz bireylerden izole edilen DNA'lardan hedef gen bölgeleri çoğaltılmıştır. Üretici firmanın (MobiomX) talimatlarını takip ederek hedef gen bölgeleri (TLR3, TLR9, MDA5, SENP5) Tablo 7'da belirtilen protokol ile Tablo 8'deki PCR şartlarında çoğaltılmıştır.

Tablo 6. Kullanılan primerler

Gen Bölgesi	Primer adı	Dizilimi
TRL3	TLR3-F	GATCCAAATGTACCCACAAACTTTG
	TLR3-R	TTACTGTCAGGTTCCCATAGTTCC
TLR9	TLR9-F	TTTGGAATAAAGCATCGGCCTATTC
	TLR9-R	CATAACAGGGTTGACCTTAAACACG
SENP5	SENP5-F	GTGCTCTGAAATCAGAATAGCCATAG
	SENP5-R	ACTAACTCCCTGATAACAAACTGC
MDA5	MDA5-F1	TGGAAGTTTAGTAGTCAACAGCTCG
	MDA5-R1	TACCTGACATTGAGAGATCCAAGC
	MDA5-F2	AAGTAGAGTGCTAGAGGAAGATGC
	MDA5-R2	CAACAATCTAAAACCGTCTGACCC
	MDA5-F3	GCCAAATATTGTTCCTAAGAGCCC
	MDA5-R3	AATCACATGGCAAGCTTTTACTCC
	MDA5-F4	TGTGTTCCAGTTCCCAGAATATCC
	MDA5-R4	TCCGCTAGTGGAATGACAAGTCAAC

Tablo 7. Hedef gen bölgelerini çoğaltmak için kullanılan PCR reaksiyon içeriği ve miktarları

Reaktif	Hacim(1X)
HiFi Taq Master Mix	5,0
Forward Primer (10 uM)	0,5
Reverse Primer (10 uM)	0,5
DNA (50 ng/ µl)	x
Nükleaz-ari Su	4-x
Total	10

Tablo 8. Hedef gen bölgelerini çoğaltmak için PCR şartları

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	95 °C	3 dakika	1
Denatürasyon	95 °C	30 saniye	35
Hibridizasyon	58-60 °C	30 saniye	
Polimerizasyon	72 °C	7 saniye	
Son polimerizasyon	72 °C	10 dakika	1

2.5. Oxford Nanopore Sekanslama ile Polimorfik Bölgelerin Belirlenmesi

Toplamda 24 örnek (4 ölü+ 4 yaşayan+ 16 damızlık) Oxford nanopore MinION flow cell sistemi kullanılarak sekanslanmıştır. Öncelikle PCR ürünlerinin kaliteleri Qubit dsDNA HS Assay Kiti ile kontrol edilmiştir. Her bir PCR örneğinin konsantrasyonu ~80 ng/µL'dir. Her örnek için hedef gen bölgelerini temsil eden PCR ürünlerinden 1 µL alınarak her bir örnek için ayrı ayrı havuzlar oluşturulmuştur. Daha sonra End preparation aşamasında amplikon uçları hazırlanmıştır (Tablo 9).

Tablo 9. End-prep aşaması için master mix

Reagent	Hacim
Amplicon Havuzu	11,5 µl
Diluted DNA Control Sample (DCS)	1 µl
Ultra II End-prep Reaction Buffer	1,75 µl
Ultra II End-prep Enzyme Mix	0,75 µl
Total	15 µl

Yukarıda belirtilen enzim karşımı ile amplikon havuzu önce 20 °C'de 5 dakika ve daha sonra 65 °C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Bu işlemden sonra "ligation of barcodes" aşamasına geçilmiştir. Bu aşamada her bir örnek farklı barkodlar takılarak tanımlanmıştır (Tablo 10 ve 11).

Tablo 10. Native barkod dizileri

Component	Forward sequence	Reverse sequence
NB01	CACAAAGACACCGACAACTTTCTT	AAGAAAGTTGTCGGTGTCTTTGTG
NB02	ACAGACGACTACAAACGGAATCGA	TCGATTCCGTTTGTAGTCGTCTGT
NB03	CCTGGTAACTGGGACACAAGACTC	GAGTCTTGTGTCCCAGTTACCAGG
NB04	TAGGGAAACACGATAGAATCCGAA	TTCGGATTCTATCGTGTTTCCCTA
NB05	AAGGTTACACAAACCCTGGACAAG	CTTGTCCAGGGTTTGTGTAACCTT

Tablo 10'un devamı

Component	Forward sequence	Reverse sequence
NB06	GACTACTTTCTGCCTTTGCGAGAA	TTCTCGCAAAGGCAGAAAGTAGTC
NB07	AAGGATTCATTCCCACGGTAACAC	GTGTTACCGTGGGAATGAATCCTT
NB08	ACGTAACTTGGTTTGTTCCCTGAA	TTCAGGGAACAAACCAAGTTACGT
NB09	AACCAAGACTCGCTGTGCCTAGTT	AACTAGGCACAGCGAGTCTTGGTT
NB10	GAGAGGACAAAGGTTTCAACGCTT	AAGCGTTGAAACCTTTGTCCTCTC
NB11	TCCATTCCCTCCGATAGATGAAAC	GTTTCATCTATCGGAGGGAATGGA
NB12	TCCGATTCTGCTTCTTTCTACCTG	CAGGTAGAAAGAAGCAGAATCGGA
NB13	AGAACGACTTCCATACTCGTGTGA	TCACACGAGTATGGAAGTCGTTCT
NB14	AACGAGTCTCTTGGGACCCATAGA	TCTATGGGTCCCAAGAGACTCGTT
NB15	AGGTCTACCTCGCTAACACCACTG	CAGTGGTGTTAGCGAGGTAGACCT
NB16	CGTCAACTGACAGTGGTTCGTACT	AGTACGAACCACTGTCAGTTGACG
NB17	ACCCTCCAGGAAAGTACCTCTGAT	ATCAGAGGTACTTTCCTGGAGGGT
NB18	CCAAACCCAACAACCTAGATAGGC	GCCTATCTAGGTTGTTGGGTTTGG
NB19	GTTCCTCGTGCAGTGTCAAGAGAT	ATCTCTTGACACTGCACGAGGAAC
NB20	TTGCGTCCTGTTACGAGAACTCAT	ATGAGTTCTCGTAACAGGACGCAA
NB21	GAGCCTCTCATTGTCCGTTCTCTA	TAGAGAACGGACAATGAGAGGCTC
NB22	ACCACTGCCATGTATCAAAGTACG	CGTACTTTGATACATGGCAGTGGT
NB23	CTTACTACCCAGTGAACCTCCTCG	CGAGGAGGTTCACTGGGTAGTAAG
NB24	GCATAGTTCTGCATGATGGGTTAG	CTAACCCATCATGCAGAACTATGC

Tablo 11. Native barkod ligasyon aşaması için master mix

Reagent	Hacim
End-prepped DNA	7.5 µl
Native Barcode (NB01-24)	2.5 µl
Blunt/TA Ligase Master Mix	10 µl
Total	20 µl

Her bir örnek ilgili barkod ve enzim karşımı ile oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilmiştir. Farklı barkodlar takılarak tanımlanan örnekler bir tüpte toplanarak havuz oluşturulmuştur. Üretici firmanın talimatlarını takip ederek AMPure XP Beads ile pürifikasyon yapılmıştır. Daha sonra "ligation of sequencing adaptors" aşamasında sekanslama işleminde cihazın tanıması için sekanslama adaptörleri uçlara ligasyon ile bağlanmıştır (Tablo 12).

Tablo 12. Sekanslama adaptörlerinin ligasyonu aşaması için master mix

Reagent	Hacim
Pooled barcoded sample	30 µl
Native Adapter (NA)	5 µl
NEBNext Quick Ligation Reaction Buffer (5X)	10 µl
Quick T4 DNA Ligase	5 µl
Total	50 µl

Adaptör ve ilgili enzimleri içeren tüpe, pooled barcoded sample eklenmiş ve oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilmiştir. Üretici firmanın talimatlarını takip ederek AMPure XP Beads ile pürifikasyon yapılmış ve böylece kütüphane hazırlığı tamamlanmıştır. Son olarak 75 µl kütüphane MinION flow cell yüklenmiş ve sekans ham verileri alınmıştır.

2.6. Biyoinformatik Analiz

Çalışmanın ilk aşamasında, ölen ve yaşayan grubu olan örnekler Minimap2 algoritması kullanılarak belirtilen genlere hizalanmıştır. Bu hizalama işleminin ardından, Geneious (https://www.geneious.com) yazılımının 'Find Variations/SNPs' modülü aracılığıyla genetik varyasyonlar ve tek nükleotid polimorfizmleri detaylı bir şekilde tespit edilmiştir. Elde edilen varyasyonlar, yaşayanlar (Y) ve ölenler (Ö) olmak üzere iki farklı grup altında sınıflandırılmıştır. Ardından, VCFtools kullanılarak bu iki grup arasındaki varyasyonlar karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Karşılaştırma sonuçları, Y grubuna spesifik varyasyonlar, Ö grubuna spesifik varyasyonlar ve iki grupta da bulunan fakat farklı şekilde görülen varyasyonlar olmak üzere 3 farklı tablo oluşturulmuştur. Her bir örnek incelenerek polimorfizmle ilgili barkod numarası “Barkod” isimli kolonda belirtilmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında damızlık grubu olan örnekler belirtilen genlere Minimap2 (Heng vd., 2018) algoritması kullanılarak hizalanmıştır. Bu hizalama işleminin ardından, Geneious yazılımının 'Find Variations/SNPs' modülü aracılığıyla genetik varyasyonlar ve tek nükleotid polimorfizmleri detaylı bir şekilde tespit edilmiştir. Elde edilen varyasyonlar, damızlıklar olmak üzere gruplandı. Polimorfizm sonuçları baz alınarak ölen grup ile damızlık grubu karşılaştırılarak, sadece ölen gruba ait olan polimorfizmlerin hangi damızlıktan geldiği incelenmiştir.

2.7. Protein Modelleme

Biyoinformatik analiz sonucunda SENP5 geninde gözlenen substitüsyon mutasyonların protein katlanması ile ilgili etkilerini değerlendirmek için homoloji modelleme ve hizalama yapılmıştır. Öncelikle homologlar taranmış ve *Coregonus sp.* Ubiquitin benzeri proteaz ailesi profil domaini içeren proteinin AlphaFold modeli *(*A0A6F9AJ83.1.A), Gökkuşağı alabalığı SENP5'in 3B yapısını otomatik modelleme programı SWISS-Model homoloji modüler sistemi (https://swissmodel.expasy.org; Schwede vd., 2003) ile modellemek için şablon olarak kullanılmıştır. Tahmin edilen model kalitesi SWISS-Model aracılığıyla MolProbity (Chen vd., 2010) web servisi kullanılarak Ramachandran plot (real data), Clash scores MolProbity Score değerlerine ve SAVES (v6.1) (https://saves.mbi.ucla.edu/) web servisi aracılığıyla ERRAT (Colovos & Yeates, 1993) ile kontrol edilmiştir. BIOVIA Discovery Studio Visualizer (BIOVIA, 2020) ile görselleştirme ve yapı hizalama yapılmıştır.

Biyoinformatik analiz sonucunda MDA5 geninde substitüsyon mutasyon gözlenmemiştir. Kontrol amaçlı homoloji modelleme ve hizalama yapılmıştır. Öncelikle homologlar taranmış ve *Oncorhynchus mykiss*, Interferon-induced helicase C domain-containing protein 1'in AlphaFold modeli (D7F7W8.1.A), Gökkuşağı alabalığı MDA5'in 3B yapısını otomatik modelleme programı SWISS-Model homoloji modüler sistemi (https://swissmodel.expasy.org; Schwede vd., 2003) ile modellemek için şablon olarak kullanılmıştır. Kalite kontrolü yukarıda bahsedildiği şekilde yapılmıştır.

2.8. Genom Düzenleme Prosedürü

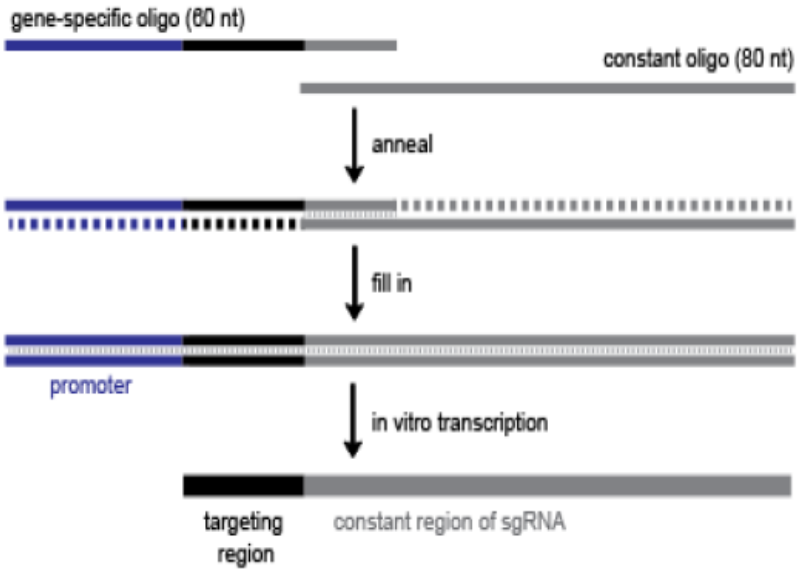
B planı olarak hedef genlerde (TLR3, TLR9, MDA5 ve SENP5) baz düzenleme yerine gen knock-out yapılması planlanmıştır. Bu kapsamda hedef genlerin (TLR3, TLR9, MDA5, SENP5) immune cevapta etkili olan bölgeleri hedef alınmış ve Geneious Prime programı kullanılarak gRNA'lar dizayn edilmiştir (Tablo 13). Hedef genlere ek olarak tirozinaz (*tyr*) geni içinde önceki yayınlardan gRNA dizisi alınmış ve fenotipik gösterge olarak kullanılmıştır (Cleveland vd., 2020). Constant oligo ve gRNA (rehber RNA/gen spesifik oligo) sipariş edilmiştir.

Gene spesifik oligo'dan 1 µl, Constant oligo'dan 1 µl ve Nuclease free sudan 8 µl içeren karışım hazırlanmış ve 95 °C 'de 5 dakika ve 37 °C'de bir saat inkübe edilmiştir (Edvardsen vd., 2014). Üretici firmanın talimatlar ile T4 DNA polimeraz (New Englands

Biolabs) kullanılarak boşluklar doldurulmuştur. Constant oligo ile gen spesifik oligo birleşimi %1,5 agaroz jelde görüntülenmiştir. MEGAshortscript™ T7 Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak DNA formundaki birleşim mRNA'ya dönüştürülmüştür (Şekil 4).

Tablo 13. Constant oligo ve gRNA

gRNA	Dizilim
TLR 9-gRNA1	TAATACGACTCACTATAGTCCTGTAATCTGAGTGCCCGTTTTAGAGCT AGAAATAGCAAG
TLR 9-gRNA2	TAATACGACTCACTATACACGTTGGACTGAGTAGAGAGTTTTAGAGCT AGAAATAGCAAG
TLR3-gRNA1	TAATACGACTCACTATAAAGGTTGGTTAATCCATGAAGTTTTAGAGCT AGAAATAGCAAG
TLR 3-gRNA2	TAATACGACTCACTATAGAAGGTTGGTTAATCCATGAGTTTTAGAGCT AGAAATAGCAAG
SENP5-gRNA1	TAATACGACTCACTATAGAGCTGCGTATCAGAAAGGCGTTTTAGAGCT AGAAATAGCAAG
SENP5-gRNA2	TAATACGACTCACTATAGTATTTGAAGACGATGCCCTGTTTTAGAGCT AGAAATAGCAAG
MDA5-gRNA1	TAATACGACTCACTATAACGTCGATTTCTTCCTGCAGAGGGTTTTAGA GCTAGAAATAGCAAG
Tyr2-gRNA	TAATACGACTCACTATATGCTGCCCGGTGTGGGAGGGTTTTAGAGCTA GAAATAGCAAG
Scalfold-gRNA	AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCC TTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC



Şekil 4. Gen knock-out işlemi için akış şeması

pT3TS-nCas9n (Addgene) plazmiti sipariş edilmiş ve compotent Top10 *Escherichia coli*'de çoğaltıldıktan sonra QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) kullanılarak plazmit izole edilmiştir (Edvardsen vd., 2014). Plazmit, *XbaI* (10 U/µL-Thermo Fisher Scientific) enzimi kullanılarak lineer hale getirilmiştir. Lineer hale getirilmiş plazmitte T3 promotorün altinda olan Cas9 proteini mMESSAGE mMACHINE™ T3 Transcription kiti (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak mRNA olarak üretilmiştir.

Yumurta ve sperm, Erzurum, Dumlu Baba alabalık çiftliğinden temin edilmiştir. Sağım yapıldıktan hemen sonra yumurta sperm ile döllenmiştir ve döllenmiş yumurtalar aktivasyon solüsyonuyla (102,8 mM NaCl, 10 mM Tris, 20 mM glisin, pH 9,0, 1 mM indirgenmiş glutatyon) yıkanmıştır (Cleveland vd., 2020). Döllenmiş yumurtalar 10 °C'de aktivasyon solüsyonunda bekletilmiş ve döllenmeden 4 saat sonra mikroenjeksiyon işlemine başlanılmıştır. Embriyolar 10 °C izotonik su içeren (%0,9 NaCl) bir Petri kabında sabitlenmiştir. Cas9 mRNA'sı ve farklı gRNA mRNA kombinasyonlarını içeren karışımlar Narishige (Japon) mikroenjeksiyon sistemi kullanılarak döllenmiş yumurtalara enjekte edilmiştir (Tablo 14).

Tablo 14. Cas9 ve farklı gRNA'ların mRNA kombinasyonlarına göre enjekte edilen gruplar

Gruplar	**Grup 1**	**Grup 2**	**Grup 3**	**Negatif Grup**
gRNA Kombinasyonu	(TLR3-gRNA1 /TLR9-gRNA1)	(TLR3-gRNA2 /TLR9-gRNA2 /MDA5-gRNA1)	(TLR3-gRNA1 /TLR9-gRNA2 /MDA5-gRNA1)	-
Mikroenjeksiyon Uygulanan Yumurta Sayısı	300	300	300	300

Enjeksiyon işleminden sonra döllenmiş yumurtalar, kaynak suyu içerisinde Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü Kuluçkahanesine transfer edilmiştir.

2.9. Mutasyon Analizi

Her bir grupta yaşayan balıklardan (8 aylık) kuyruk dokusu alınmış ve DNeasy Blood & Tissue (Qıagen) kiti kullanılarak DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Fenotipik gösterge bazı balıklarda kısmi albinizme neden olmuştur ancak örnek sayısı az olduğu için sadece albinizm gözlenen balıklar değil tüm balıklar için mutasyon analizi yapılmıştır. Hedef gen

bölgeleri yukarıda anlatıldığı gibi PCR ile çoğaltılmış ve Oxford nanopore MinION flow cell sistemi ile sekanslanmıştır. Sekans sonuçları için veri analizi Geneious Prime ile gerçekleştirilmiş ve gRNA'nın hedeflediği bölgelerde mutasyon olup olmadığı kontrol edilmiştir.

Fenotipik gösterge olan *tyr* geni için mutasyon analizi Sanger sekanslama ile yapılmıştır. *tyr* gen bölgesi NM_001124222.1 verisine dayanarak dizayn edilmiş primerler (TYR2-F 5`-TGGGTACCGGGTCTACTTTG, TYR2-R 5`-TTCTTCTGGGTGTGTTGGGT) (Cleveland vd., 2020) ile çoğaltılmıştır. Bu gen bölgeleri için PCR karışımı, 5 µl 2X Master Mix (Qiagen), her primer çiftinden (Forward ve Reverse) 0,5 µl, 1µl DNA ve 3 µl ultra saf su ile toplam 10 µl hacimden oluşturulmuştur ve aşağıdaki PCR şartlarında amplifikasyon gerçekleştirilmiştir (Tablo 15).

Tablo 15. *tyr* gen bölgesi için PCR şartları

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	94 °C	3 dakika	1
Denatürasyon	94 °C	30 saniye	35
Hibridizasyon	58 °C	30 saniye	
Polimerizasyon	72 °C	45 saniye	
Son polimerizasyon	72 °C	7 dakika	1

PCR ürünlerinin 6 µl'si %1,5'lik agaroz jel üzerinde 1X TBE tampon sisteminde yürütülüp etidyum bromür (0,5 µg/ml) ile boyanan fragment bantları jel görüntüleme sistemi ile görüntülenmiştir. PCR ürünleri, alkol purifikasyonu yapıldıktan sonra BigDye Terminator Cycle Sequencing Kiti (Applied Biosystems) kullanılarak ABI 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystem) ile dizi analizi (sekanslama) yapılmıştır (Firidin vd., 2020). Sanger sekans ham verileri kullanılarak *tyr* geni için indel yüzdesi ICE biyoinformatik programı (https://ice.editco.bio/#/) ile tahmin edilmiştir. Kısaca, bu program gRNA dizisinin kontrol dizisindeki kesme yerini tahmin etmek, örnek dizisini bu referansa eşlemek, her pozisyondaki tüm baz okumalarını dekonvolüsyona uğratarak indelleri belirlemek ve indel spektrumunun bir frekansını sağlamak için kullanır (Conant vd., 2022).

2.10. İstatiksel Analiz

Mutant gruplar ve negatif kontrol grubu arasında, vücut ağırlığı ve vücut uzunluğunu (büyüme parametreleri) karşılaştırmak için R programı (v.4.4.2) kullanılarak istatiksel analizler yapılmıştır. Öncelikle verilen dağılımı Shapiro-Wilk normalite testi ile incelenmiş ve varyansların homojenliği Bartlett testi ile kontrol edilmiştir. One-Way ANOVA testi ile gruplar arasında istatiksel olarak anlamlı fark olup olmadığı analiz edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Damızlık Seçimi ve Markalama

IPNV ari olduğu belirlenen Gürpınar alabalık çiftliğinde challenge deneyinde damızlık olarak kullanılacak gökkuşağı alabalıkları seçilmiş ve markalanmıştır. Seçilen balıklardan DNA izolasyonu başarıyla gerçekleştirilmiş ve tür belirlemek amacıyla COI gen bölgesi çoğaltılımış ve sekanslanmıştır. Dizi analizi elde edilen *.ab1 formatındaki ham dizi verilerinin elektroferogramları BioEdit 7.2.6 (Hall, 1999) programı ile kontrol edildikten sonra Blastn programı kullanılarak diziler GeneBank'ta mevcut olan veriler ile karşılaştırılmış ve Gökkuşağı alabalığı COI gen bölgesi dizileri ile %99 ve üzeri benzerlik göstermiştir. Böylece çalışmada kullanmak üzere seçilen alabalıkların gökkuşağı alabalığı olduğu netleştirilmiştir.

Sağımdan bir hafta önce damızlıkların IPNV taşıyıcı olmadıklarını kanıtlamak amacıyla sperm ve yumurta dokuları alınmış ve bu dokulardan RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. IPNV spesifik primerler ile yapılan RT-PCR sonucunda PCR ürünleri %1,5 agaroz jelde TBE tamponunda yürütülmüş ve bant gözlenmemiştir. Ayrıca alınan dokular ile EPC hücre hattına ekim yapılmış ve yedi gün boyunca hücrelerde sitopatik etki gözlenmemiştir. Böylece hem hücre kültürü hem de RT-PCR ile damızlıkların IPNV taşıyıcı olmadıkları kanıtlanmıştır.

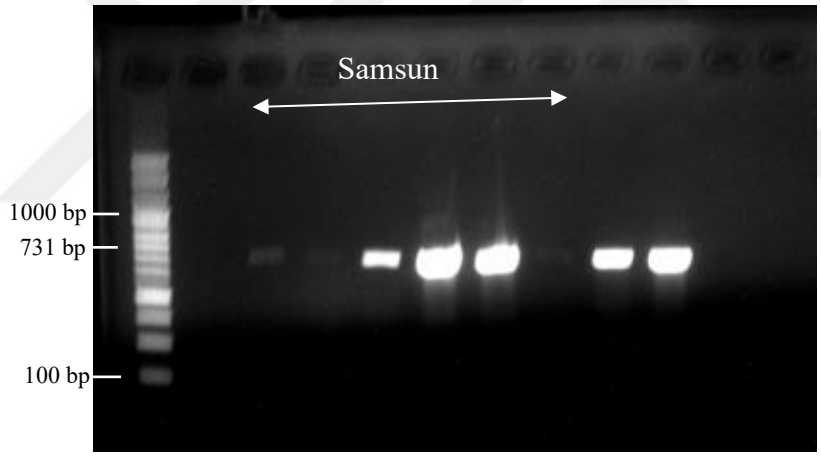
3.2. Enfeksiyon Deneyi

Enfeksiyon deneyi için dört farklı izolat (YD4, A4G1, Bornova, Samsun) EPC hücre hattı kullanılarak başarıyla çoğaltılmıştır ve enjeksiyon ile kontrol dahil 5 farklı gruplardaki balıklara verilmiştir. Ölümler devam etmediği için deney 20. günde bitirilmiş ve yoğun ölüm Samsun izolatında gözlenmiştir (Tablo 16).

Tablo 16. Denemelerdeki ölen balık sayısı

Gün	YD4	A4G1	Bornova	Samsun
4. Gün	-	-	1 ölü	1 ölü
5. Gün	1 ölü	1 ölü	-	1 ölü
6. Gün	-	-	1 ölü	2 ölü
7. Gün	1 ölü	1 ölü	1 ölü	1 ölü
8. Gün	-	-	-	1 ölü

Ölen balıklardan dokular alınmış ve EPC hücre hattına ekim yapılmıştır. Her bir gruptan yapılan ekimlerde sitopatik etki gözlenmiştir. Sitopatik etki gösteren kuyucuklardan RNA izolasyonu yapılmış ve IPNV spesifik primer ile RT-PCR yapılmıştır. Samsun ve Bornova gruplarının örneklerinde ölümlerin IPNV kaynaklı olduğu kanıtlanmıştır (Şekil 5). Ayrıca bu gruplardan birer örnek sekanslanmıştır ve blast yapıldığı zaman %99 benzerlik göstermiştir.

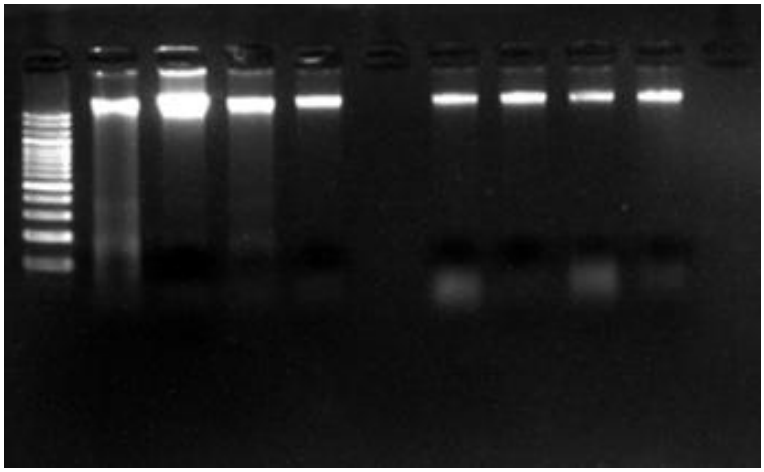


Şekil 5. Ölen balığın hücre kültürü ekimlerinden yapılan RT-PCR jel görüntüsü

Sitopatik etkinin daha belirgin olması ve ölüm oranın fazla olması nedeniyle Samsun izolatı grubundaki balıklardan alınan kuyruk dokuları ile SNP çalışmasına devam edilmiştir.

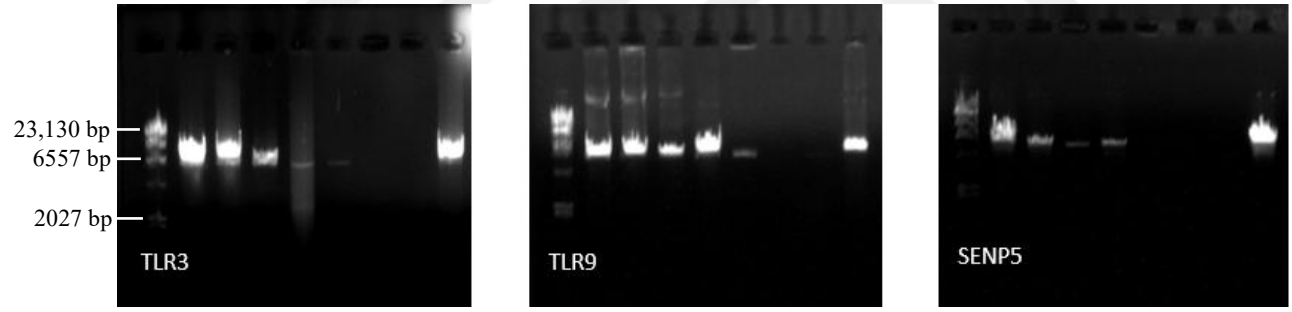
3.3. DNA İzolasyonu ve Hedef Genlerin Çoğaltılması

Samsun grubundan 4 ölü ve 4 yaşayan balıktan alınan kuyruk dokularında DNA izolasyonu başarıyla gerçekleştirilmiştir. Tüm örnekler için DNA izolasyonu başarı ile gerçekleşmiş ve DNA yoğunluğu 50-150 ng/µl arasındadır (Şekil 6).

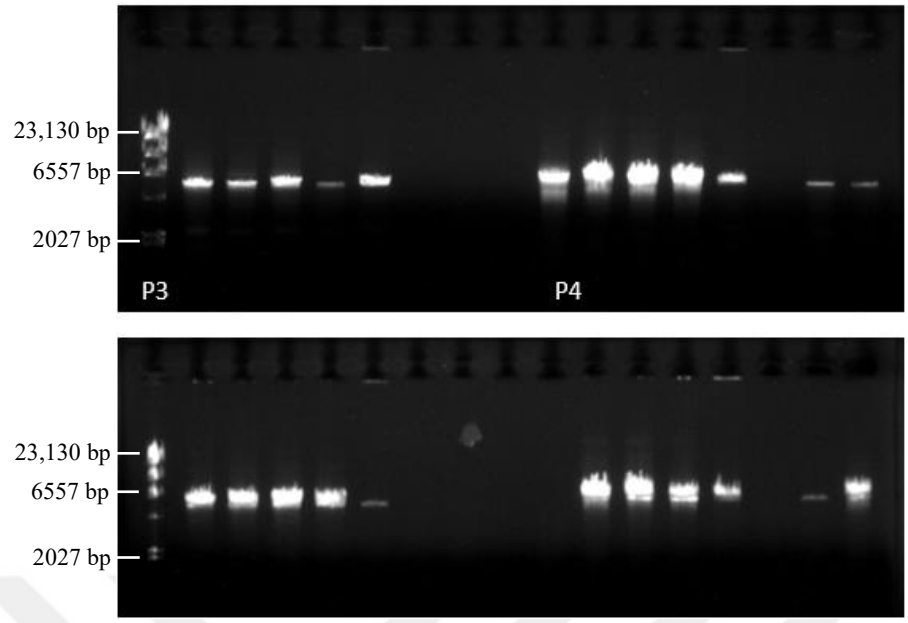


Şekil 6. 4 ölü ve 4 yaşayan balıktan izole edilen genomic DNA jel görüntüsü

Hedef gen bölgeleri (TLR3, TLR9, MDA5, SENP5) PCR ile çoğaltılmıştır. İki ve üç numaralı ölen balıklar hariç hedef gen bölgeleri başarılı bir şekilde çoğaltılmıştır (Şekil 7 ve 8). Bu iki örnek için optimizasyon çalışmaları yapılmış ve sekanslama için yeterli miktarda ürün elde edilmiştir.

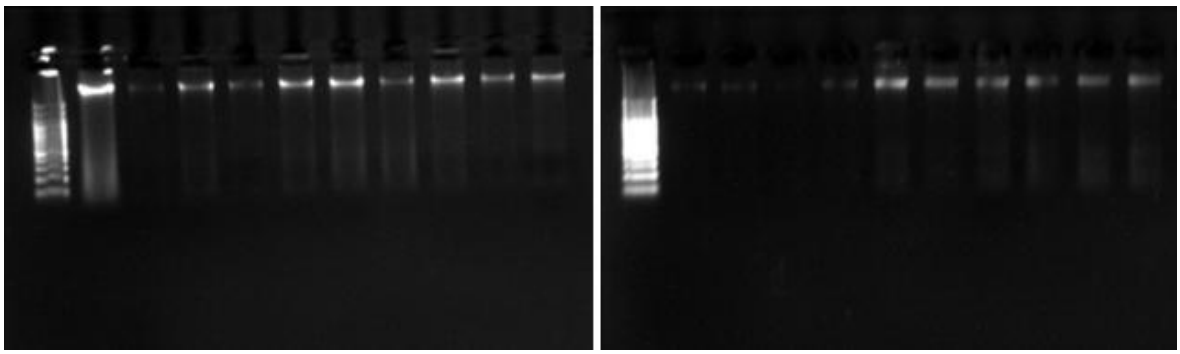


Şekil 7. TLR3 (7273 bp), TLR9 (5432 bp), SENP5 (6315 bp) gen bölgelerinin PCR jel görüntüsü

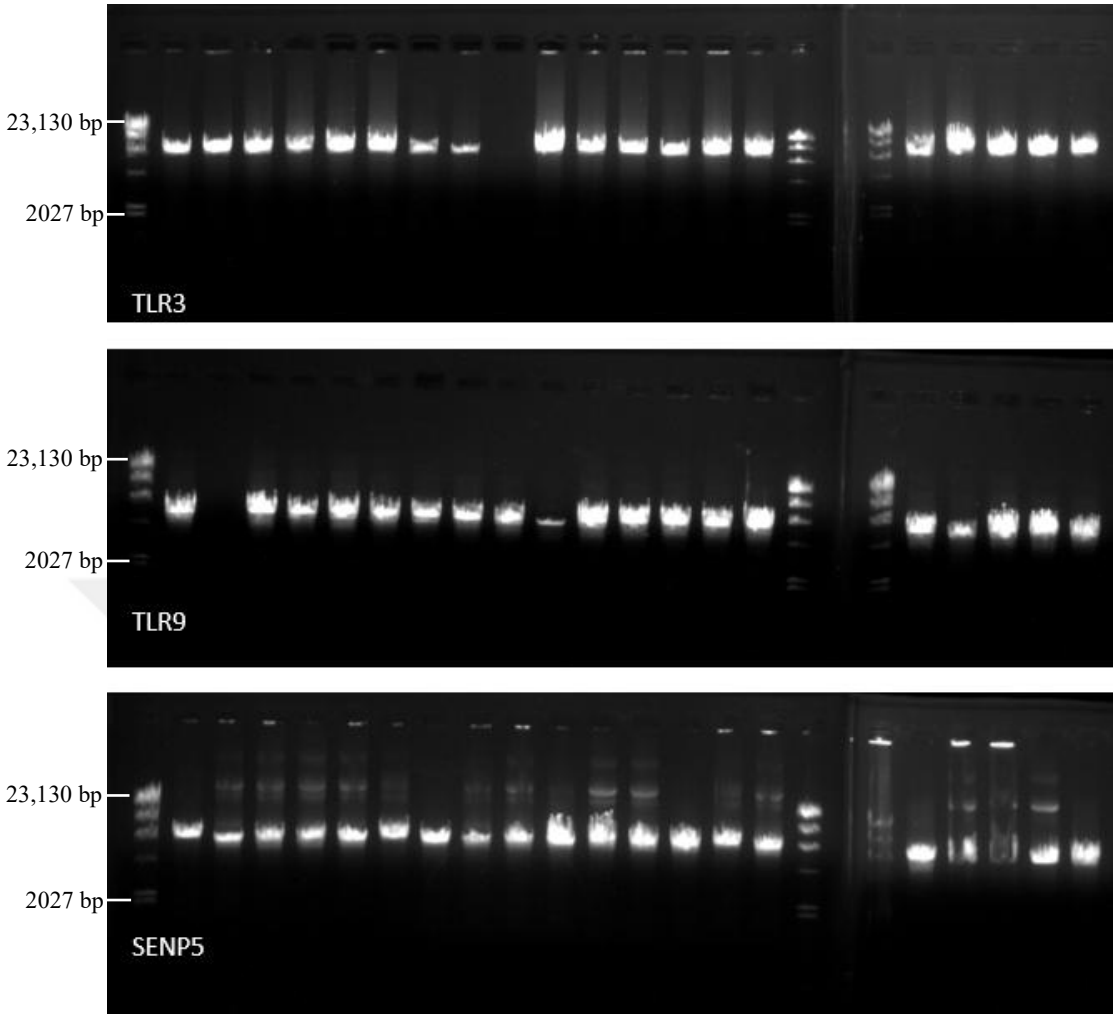


Şekil 8. MDA5 gen bölgesinin 4 farklı primer çifti kullanılarak PCR jel görüntüleri

Ayrıca ölen ve yaşayan balıklarda bulunan mutasyonları içeren damızlıkları tespit etmek için 10 dişi X 10 erkek içeren damızlık grubundaki tüm bireylerden DNA izole edilmiştir ve hedef gen bölgeleri (TLR3, TLR9, MDA5, SENP5) çoğaltılmıştır (Şekil 9 ve 10).



Şekil 9. Damızlıklardan izole edilen genomik DNA jel görüntüsü



Şekil 10. Damızlıklar için TLR3, TLR9, SENP5 gen bölgelerinin sırasıyla PCR ürünleri.

3.4. Polimorfik Bölgelerin Belirlenmesi İçin Sekans ve Biyoinformatik Analizi

Toplamda 24 örnek (4 ölü+ 4 yaşayan+ 16 damızlık) Oxford nanopore MinION flow cell sistemi kullanılarak başarıyla sekanslanmıştır. Ölen ve yaşayan gruplarda genetik varyasyonlar ve tek nükleotid polimorfizmleri, polimorfizmlerin konumları, sıklığı, amino asit ve protein etkisi detaylı bir şekilde tespit edilmiştir (Tablo 17 ve 18). Her bir örnek ayrı ayrı incelenerek polimorfizmle ilgili barkod numarası "Barkod" isimli kolonda belirtilmiştir.

Ayrıca iki grupta da bulunan fakat farklı şekilde görülen varyasyonlar incelenmiştir (Tablo 19). Damızlık grubu için ayrıca genetik varyasyonlar ve tek nükleotid polimorfizmleri tespit edilmiştir. Polimorfizm sonuçlarına göre ölen grup damızlık grubu ile karşılaştırılmış ve sadece ölen gruba ait olan polimorfizmlerin hangi damızlıktan geldiği gösterilmiştir (Tablo 17).

Ölen grupta TLR3 geninde 10 farklı pozisyonda SNP tespit edilirken yaşayan grupta TLR3 geninde 15 farklı pozisyonda SNP tespit edilmiştir (Tablo 17 ve 18). Ölen grupta SENP5 geninde 47 farklı pozisyonda SNP gözlenirken yaşayan grupta SENP5 geninde 58 farklı pozisyonda SNP gözlenmiştir. Ölen grupta MDA5 geninde 13 farklı pozisyonda SNP tespit edilirken yaşayan grupta MDA5 geninde 45 farklı pozisyonda SNP tespit edilmiştir.

Ölen gruba spesifik olup birden fazla ölen bireyde gözlenen mutasyonlar TLR3 (Pozisyon:1263, Ölen birey:5,6,7,8) ve MDA5 (Pozisyon: 15648, Ölen birey:5,6; Pozisyon: 19878, Ölen birey:5,6,8; Pozisyon: 20744, Ölen birey:5,8) genleri üzerinde bulunmaktadır (Tablo 17). Bu mutasyonların dirençsizlik ile ilişkisini araştırmak için aynı mutasyonların tespit edildiği damızlıklardan (10, 12, 13, 14, 15, 17,19, 20, 21, 22, 23) bir havuz oluşturulabilir ve gelecek nesil embriyolar elde edilip mikroinjeksiyon işlemiyle CRISPR uygulaması yapılabilir. Ölen grup ile yaşayan grup karşılaştırıldığı zaman TLR3, SENP5 ve MDA5 genlerinde aynı pozisyonlarda farklı formlarda polimorfizmler tespit edilmiştir (Tablo 19). Bu mutasyonlar IPNV dirençlilik ile ilişkili olabilir. Oluşturulacak damızlık havuzundan elde edilen yavrularda bu bölgelerde CRISPR uygulaması yapılarak dirençsiz bireyler dirençli hale getirilebilir.

Tablo 17. Ölen (dirençsiz) grupta hedef genler üzerinde gözlenen varyasyonlar ve bu varyasyonun kaynağı olan damızlık bireylerin tespiti

Gen	Pozisyon	Ekzon/ Intron	Ölen-Barcode	Damızlık-Barcode	Referans	Alternatif	Coverage	Varyasyon Sıklığı	Amino Asit Değişimi	Protein etkisi
TLR3	6665	Evet	5,6,7,8	9,10,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23	T	TAA	973	47,9		
TLR3	4861	Evet	6	10,13,18,19	G	A	602	51,8		
TLR3	4241	Hayır	6	10,13,18,19	C	A	597	53,9		
TLR3	4235	Hayır	6	10,13,18,19,24	A	T	597	55,1		
TLR3	4207	Hayır	6	10,13,18,19	G	T	597	51,8		
TLR3	4049	Hayır	6	10,13,18,19,24	C	A	598	59		
TLR3	4001	Hayır	6	10,13,19,24	A	C	598	45,8		
TLR3	1964	Hayır	6	10,13,18,19,21,23	GA	G	596	64,8		
TLR3	1570	Hayır	6	10,13,18,19,24	C	A	600	54,3		
TLR3	1140	Hayır	7	16,17	AA	A	467	42,6		
TLR9	1702	Evet	7	*	AG	A	480	30,2		Frame Shift
MDA5	18574	Hayır	7	9,15,17,19,20	A	T	489	32,3		
MDA5	16659	Hayır	7	9,17,19,20	C	T	500	30,2		
MDA5	14803	Hayır	8	9,10,12,15,16,17,18,19,20,21,23,24	T	G	349	33,5		
MDA5	12020	Hayır	6	14,16	CT	C	1030	47,7		
MDA5	5386	Hayır	6	10,12,14,15,21,22,23	A	C	3365	39,7		
MDA5	5222	Hayır	5,6	10,12,14,15,21,22,23	T	G	3360	40,5		
MDA5	3492	Hayır	6	10,12,14,16,21,22	G	T	3526	33		
MDA5	992	Hayır	5,6,8	10,11,14,15,17,19,22,23	C	T	1045	31,7		
MDA5	576	Evet	8	13	A	C	1823	33,2		
MDA5	131	Evet	8	13	AT	A	1783	31,4		
MDA5	126	Evet	5,8	12,13,20	TTC	T	1656,5	33,45		
SENP5	6005	Evet	6	13	T	A	2280	42,5		
SENP5	5747	Evet	8	14,22	G	GA	1106	31,3		
SENP5	5740	Evet	6	13,19	CA	C	2281	48,6		

Tablo 17'nin devamı

Gen	Pozisyon	Ekzon/ Intron	Ölen-Barcode	Damızlık-Barcode	Referans	Alternatif	Coverage	Varyasyon Sıklığı	Amino Asit Değişimi	Protein etkisi
SENP5	5739	Evet	6	19	AG	A	2282	46		
SENP5	5248	Hayır	8	13	TG	T	1096	55,3		
SENP5	4344	Hayır	6	15	G	C	2276	31		
SENP5	4278	Hayır	6	*	C	G	2280	30,8		
SENP5	4127	Hayır	6	15	AT	A	2271	30,3		
SENP5	4126	Hayır	8	*	T	G	1092	64,3		
SENP5	4096	Hayır	8	*	A	G	1066	49,2		
SENP5	3801	Hayır	8	14	G	GA	1052	34,9		
SENP5	3596	Hayır	8	*	G	A	1047	39,4		
SENP5	2808	Evet	8	14,22	G	C	1051	34,5		
SENP5	2805	Evet	8	*	G	A	1051	31		
SENP5	2800	Evet	8	14,22	C	A	1051	58,9	A->S	Substitution
SENP5	2724	Evet	8	13,16,22	G	A	1050	83,3		
SENP5	367	Hayır	8	9,14	G	A	1045	35,9		
SENP5	-157	Hayır	8	9	A	G	1047	33,5		
SENP5	-162	Hayır	8	9	AA	A	1044	30,8		
SENP5	-163	Hayır	8	9,14	AGCAAC	A	1042	33,7		
SENP5	-179	Hayır	8	9,14	TC	T	1039	38,4		

Tablo 18. Yaşayan (dirençli) grupta hedef genler üzerinde gözlenen varyasyonlar

Gen	Pozisyon	Ekzon/ Intron	Yaşayan-Barcode	Referans	Alternatif	Coverage	Varyasyon Sıklığı	Amino Asit Değişimi	Protein etkisi
TLR3	7048	Hayır	1,2,3,4	TTTTTTA		1004	60,35		
TLR3	7043	Hayır	3	TA	T	325	37,2		
TLR3	6255	Evet	3	GT	G	321	41,7		
TLR3	4794	Hayır	2	AG	A	2445	36,5		
TLR3	4657	Hayır	1,2,4	TAC	T	1443	37,8		
TLR3	4367	Hayır	3,4	CA	C	385	58,15		
TLR3	3600	Evet	2	TC	T	2438	37,2		
TLR3	1884	Hayır	1	GT	G	639	46		
TLR3	1881	Hayır	1	TC	T	639	59,5		
TLR3	1879	Hayır	1,2	CATG	C	2474	30,4		
TLR3	1876	Hayır	1	GTAA	G	639	70,1		
TLR3	564	Evet	3	C	T	313	46	D->N	Substitution
TLR3	543	Evet	3	G	T	313	47,6	L->I	Substitution
TLR3	458	Hayır	3	A	T	315	50,2		
TLR3	139	Evet	3	C	T	325	48,3		
TLR9	5445	Hayır	1	G	T	705	33,9		
MDA5	18625	Hayır	3	AG	GC	378	30,7		
MDA5	18620	Hayır	3	A	T	378	31,2		
MDA5	17809	Hayır	2,4	GA	G	1245,5	47,8		
MDA5	17480	Hayır	2	G	A	1930	30,6		
MDA5	16181	Hayır	3	A	T	374	40,6		
MDA5	13430	Hayır	1	TA	T	1431	40,5		
MDA5	11864	Evet	3	C	T	1083	32,3		
MDA5	11167	Evet	3	TTCA	T	1068	43		
MDA5	11166	Evet	2	TC	T	7696	30,1		
MDA5	11164	Evet	3	ACTG	A	1068	45,2		
MDA5	11069	Hayır	3	A	G	1066	30,4		
MDA5	10905	Hayır	3	A	T	1072	33		
MDA5	10896	Hayır	3	G	T	1072	31,1		
MDA5	10536	Hayır	3	TTGTAACACACTGTAGCAAG	T	1099	31,9		
MDA5	10509	Hayır	3	G	A	1103	31,3		
MDA5	10415	Hayır	3	C	A	1106	32,7		

Tablo 18'in devamı

Gen	Pozisyon	Ekzon/ Intron	Yaşayan-Barcode	Referans	Alternatif	Coverage	Varyasyon Sıklığı	Amino Asit Değişimi	Protein etkisi
MDA5	10354	Hayır	3	A	C	1111	30,5		
MDA5	10144	Hayır	3	G	A	1103	38,7		
MDA5	10096	Hayır	3	C	A	1100	32,1		
MDA5	9992	Evet	3	C	A	1107	30,2		
MDA5	9987	Evet	3	A	G	1106	31,7		
MDA5	8768	Hayır	3	T	A	1131	46,2		
MDA5	8116	Hayır	2	CT	C	11363	31,5		
MDA5	3767	Hayır	4	A	T	5433	32,2		
MDA5	3493	Hayır	4	T	G	5521	32,1		
MDA5	2455	Hayır	2	TG	T	5079	54,5		
MDA5	2157	Hayır	1,3	GA	G	781	66,6		
MDA5	1900	Hayır	2	AT	A	5089	31		
MDA5	1898	Hayır	1,2,3	AC	A	2217,3	46,53		
MDA5	1890	Hayır	2,3,4	CCCC		1832	39		
MDA5	1794	Hayır	1	CT	C	644	33,9		
MDA5	1115	Hayır	1,3	T	G	649	61,3		
MDA5	924	Hayır	2,3,4	T	G	2600,6	36,16		
MDA5	496	Evet	2,3,4	A	G	2589,3	32,43		
MDA5	-1635	Hayır	4	T	C	6	83,3		
MDA5	-1662	Hayır	4	G	C	6	100		
MDA5	-1672	Hayır	4	A	G	6	83,3		
MDA5	-1675	Hayır	4	T	A	6	100		
MDA5	-1695	Hayır	4	T	G	6	83,3		
MDA5	-1784	Hayır	4	A	T	6	83,3		
MDA5	-1797	Hayır	4	T	C	6	83,3		
MDA5	-1977	Hayır	4	C	T	5	100		
SENP5	5256	Hayır	1	TGTG	T	742	32,7		
SENP5	5253	Hayır	1	GTG	G	742	38		
SENP5	4712	Hayır	3	T	G	793	53,1		
SENP5	4657	Hayır	3	CA	C	792	60		
SENP5	4654	Hayır	3	CA	C	792	65,8		
SENP5	4653	Hayır	3	AA	A	792	59,1		

Tablo 18'in devamı

Gen	Pozisyon	Ekzon/ Intron	Yaşayan-Barcode	Referans	Alternatif	Coverage	Varyasyon Sıklığı	Amino Asit Değişimi	Protein etkisi
SENP5	3116	Hayır	1,2	C	A	3186,5	37,5		
SENP5	2926	Evet	3	G	T	766	61,5	L->I	Substitution
SENP5	2925	Evet	3	A	G	766	65,3		
SENP5	2859	Evet	3	G	A	766	71,3		
SENP5	2669	Evet	3	G	T	763	67,4	P->H	Substitution
SENP5	2507	Evet	3	A	G	760	69,7	V->A	Substitution
SENP5	2344	Evet	3	T	C	757	66,7	T->A	Substitution
SENP5	1809	Hayır	3	C	A	752	70,1		
SENP5	1793	Hayır	3	A	G	752	69,7		
SENP5	1791	Hayır	3	A	T	752	64,8		
SENP5	1294	Hayır	3	C	T	745	66,4		
SENP5	1257	Hayır	3	A	T	744	66,7		
SENP5	1242	Hayır	3	T	C	744	62,2		
SENP5	1227	Hayır	3	C	A	744	63		
SENP5	372	Hayır	1,2,4	AG	A	3168,6	44,1		
SENP5	302	Hayır	2,4	TA	T	4408,5	45,45		

Tablo 19. Ölen ve yaşayan grupta aynı pozisyonlarda referans genoma kıyasla gözlenen polimorfizmler ve polimorfizm farklılıkları

Grup	Gen	Barkod	Pozisyon	Ekzon/Intron	Referans	Alternatif	Coverage	Varyasyon Sıklığı
Y	MDA5	3	5381	Hayır	TTG	T	3493	30,7
Y	MDA5	2,3	1899	Hayır	TA	T	3002,5	39,15
Y	MDA5	2,3,4	1897	Hayır	CCCCAAA	C	2613	33,36
Y	MDA5	2,4	129	Evet	TA	T	3401,5	32,5
Y	MDA5	2,4	128	Evet	AC	A	3401	33
Y	MDA5	2,4	127	Evet	CT	C	3401,5	40,3
Y	MDA5	4	126	Evet	TTC	T	1811	31,5
Y	SENP5	1	3667	Hayır	CACAC	C	718	40
Y	SENP5	2	-172	Hayır	TAA	T	5524	30,1
Y	SENP5	2	-179	Hayır	TC	T	5519	33,6
Y	TLR3	1	3860	Hayır	A	G	631	39,5
Y	TLR3	1	1883	Hayır	TTT	T	639	52,1
Y	TLR3	1	1880	Hayır	CCATG	C	639	61,7
Ö	MDA5	6,7	5380	Hayır	TG	T	3363	31,2
Ö	MDA5	6,7	1898	Hayır	AC	A	1075	39,7
Ö	MDA5	6	1891	Hayır	AC	A	1074	31,8
Ö	MDA5	5,8	130	Hayır	TT	T	1529	31,3
Ö	MDA5	5,8	129	Evet	TA	T	1529	34,5
Ö	MDA5	5,8	128	Evet	AC	A	1529	35,4
Ö	MDA5	5,8	127	Evet	CT	C	1529	41,8
Ö	SENP5	6	3663	Evet	CAC	C	2238	59,3
Ö	SENP5	8	-168	Hayır	CTAATAA	C	1039	32,6
Ö	SENP5	8	-174	Hayır	ACGCCT	A	1039	34,4
Ö	TLR3	6	3861	Hayır	GA	G	598	55,5
Ö	TLR3	8	1881	Hayır	TC	T	928	32,3
Ö	TLR3	8	1876	Hayır	GT	G	928	39,4

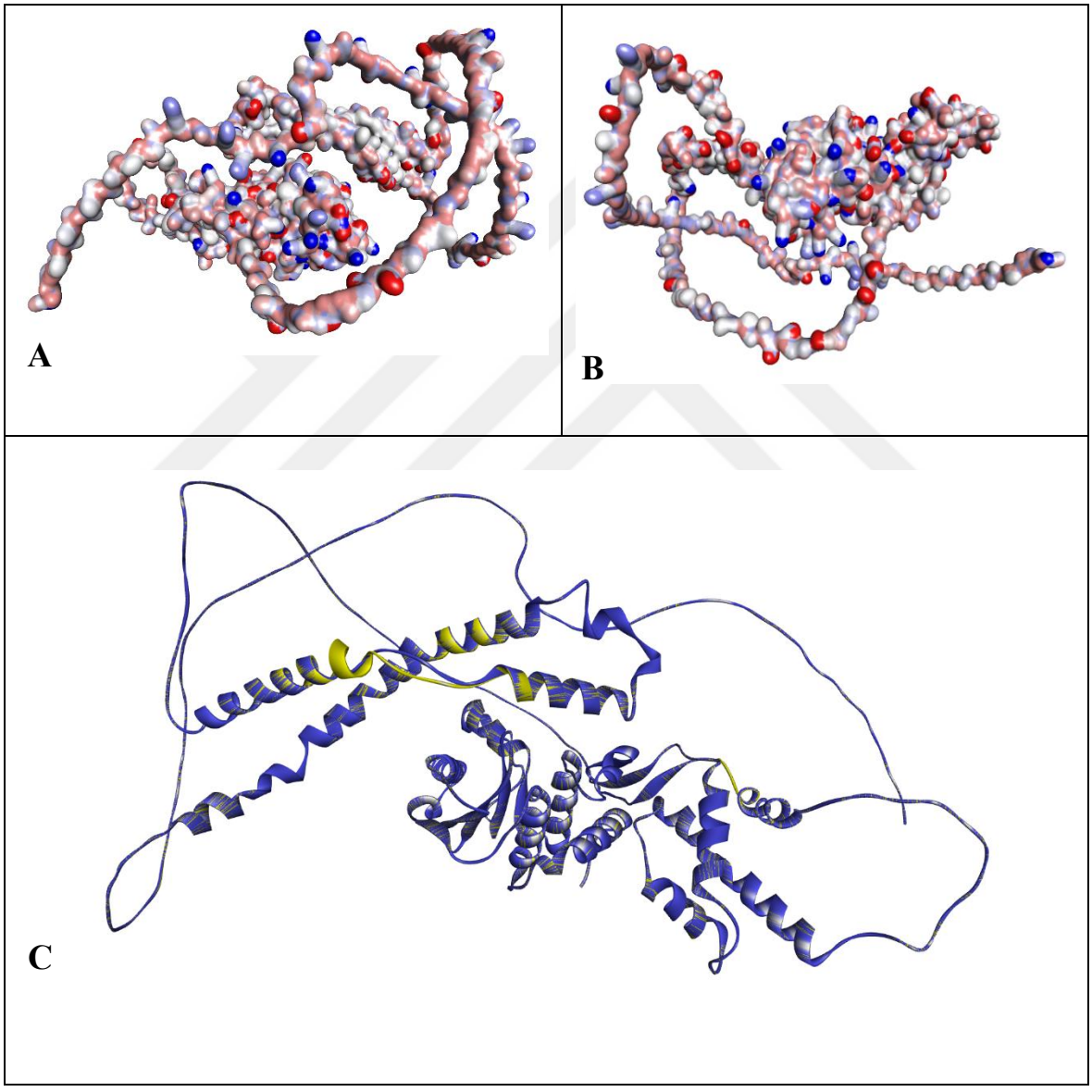
3.5. Protein Modelleme

SENP5 geninde gözlenen substitüsyon mutasyonların protein katlanması ile ilgili etkilerini değerlendirmek için dirençsiz (8 numaralı örnek) ve dirençli (3 numaralı örnek) bireylerin SENP5 geninde elde edilen protein dizilerini karşılaştırmak için modelleme ve hizalama yapılmıştır. Modelleme kalitesi kontrol edildiğinde Clash skoru ve MolProbity skoru, olağanüstü atomik konumlandırma ve geometriye sahip, iyi optimize edilmiş bir modeli yansıtmaktadır. Her iki örneğe ait modelleme için %91'in üzerindeki bir ERRAT puanı, modelin bağlanmamış atomik etkileşimlerinin iyi rafine edilmiş deneysel protein yapılarıyla büyük ölçüde uyumlu olduğunu doğrulamaktadır. QMEANDisCo puanı, bazı bölgelerin daha az güvenilir olmasıyla birlikte orta düzeyde yapısal güveni önermektedir. Her iki örneğe ait modelleme için Ramachandran Favoured, ideal kıyaslama noktasının biraz altındadır (> %90), bu da tercih edilmeyen bölgelerde bazı kalıntıları gösterir. Bunlar genellikle esnek döngülerde veya uçlardadır ve çekirdek işlevini önemli ölçüde etkilemeyebilir. Hizalama sonucu iki SENP5 protein modeli arasındaki RMSD (Kök-Ortalama-Kare Sapma) 0,25 Å ve bu değere göre iki protein modeli çok yüksek yapısal benzerlik göstermektedir. Yaşayan gruba ait örnekle ölen gruba ait örnek neredeyse aynı 3B yapılara sahiptir ancak substitüsyon mutasyonun olduğu bölgelerde küçük yerel eşleşmeyen bölgeler tespit edilmiştir. Bu bölgeler enzimin aktif bölgesinde yer almamaktadır.

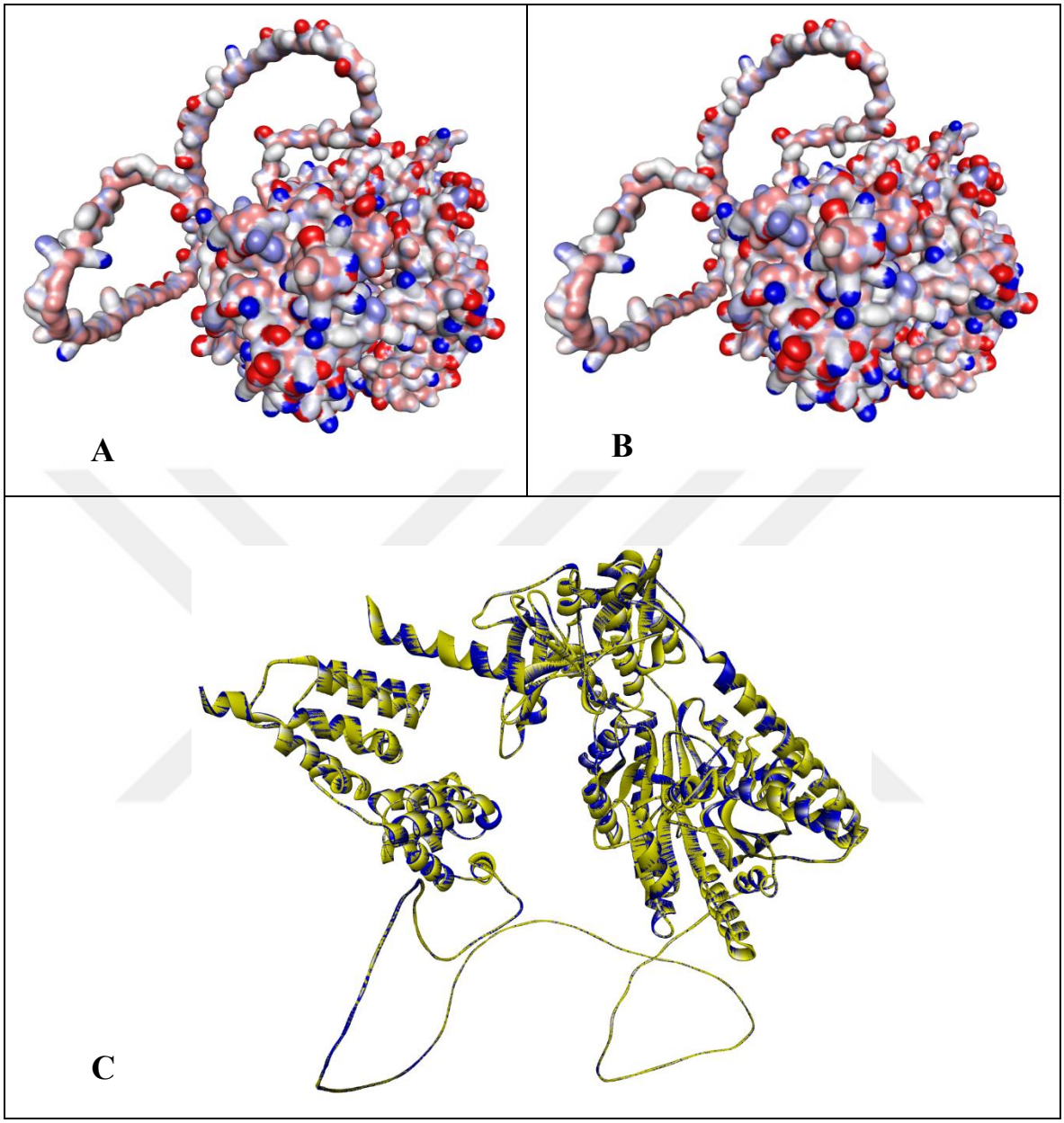
Mutasyonların çoğunlukla gözlendiği dirençsiz (8 numaralı örnek) ve dirençli (2 numaralı örnek) bireylerin MDA5 geninden elde edilen protein dizilerini karşılaştırmak için modelleme ve hizalama yapılmıştır. Modelleme kalitesi kontrol edildiğinde MolProbity Puanı, Clash Puanı ve ERRAT puanı mutasyonel analiz veya işlevsel açıklama gibi alt akış uygulamaları için uygun, iyi rafine edilmiş ve güvenilir bir model olduğunu göstermektedir. QMEANDisCo puanı, modelin çoğunun iyi desteklendiğini, ancak birkaç rezidünün daha az güvenilir olabileceğini göstermektedir. Her iki modelleme için Ramachandran Favoured %91'den fazla olduğu için omurga geometrisi güçlüdür. Hizalama sonucu protein katlanmalarında farklılık olmadığını göstermiştir.

Tablo 20. MDA5 geni için 2 ve 8 numaralı örnek ve SENP5 geni için 3 ve 8 numaralı örneklere ait modelleme kalitesi ile ilgili değerler

	2(MDA5)	*8(MDA5)*	*3(SENP5)*	*8(SENP5)*
MolProbity Score	1,57	1,42	1,60	1,34
Clash Score	2,90	1,95	0,90	0,45
Ramachandran Favoured	91,75%	92,78%	86,24%	86,57%
QMEANDisCo Global	0,67±0.05	0,66±0.05	0,52±0.05	0,50±0.05
ERRAT (Overall Quality Factor)	99,0588	98,9349	93,7824	91,5212



Şekil 11. SENP5 proteini homoloji modellenmiş üç boyutlu yapısı. **A)** 3 numaralı örneğe ait SENP5 proteinin monomer yapısı. **B)** 8 numaralı örneğe ait SENP5 proteinin monomer yapısı. **C)** 3 numaralı örneğe (sarı) ve 8 numaralı örneğe (mavi) ait SENP5 proteinlerinin üst üste hizalanması sonucu

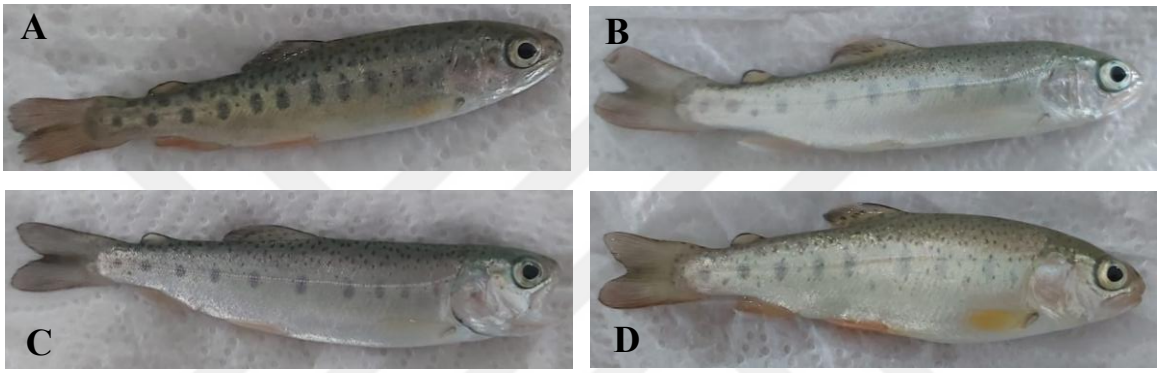


Şekil 12. MDA5 proteini homoloji modellenmiş üç boyutlu yapısı. **A)** 2 numaralı örneğe ait MDA5 proteinin monomer yapısı. **B)** 8 numaralı örneğe ait MDA5 proteinin monomer yapısı. **C)** 2 numaralı örneğe (sarı) ve 8 numaralı örneğe (mavi) ait MDA5 proteinlerinin üst üste hizalaması sonucu.

3.6. CRISPR/Cas9 ile Mutant Oluşturulması

Bir, iki ve üç numaralı gruplardaki 8 aylık balıklarda farklı oranlarda albinoluk gözlenmiştir (Şekil 13). Bu durum *tyr* geninde CRISPR/Cas9 kullanılarak mutasyon gerçekleştirildiğini fenotipik olarak kanıtlamaktadır. Her bir grupta 300 embriyoya enjeksiyon yapılmıştır ancak 1 numaralı gruptan 4 balık, 2 numaralı gruptan 1 balık, 3

numaralı gruptan 4 balık ve negatif grubundan 6 balık hayatta kalmıştır (Tablo 14). Bu balıklarda *tyr* geninde mutasyonun varlığını genotipik olarak göstermek için Sanger sekanslama yapılmış ve ICE ile analiz edilmiştir. Negatif grubunda beklendiği gibi herhangi bir mutasyon tespit edilmemiş ancak uygulama yapılan 9 balıktan sadece ikisinde *tyr* geninde indel mutasyon tespit edilmiştir (Şekil 14). Veri kalitesi ve enjeksiyon miktarından kaynaklı sorunlardan dolayı *tyr* geni üzerindeki mutasyonların tespit edilememe olasılığını göz önünde bulundurarak 15 örnek üzerinde hedef genlerde mutasyonun varlığını genotipik olarak göstermek için Oxford nanopore MinION platformu ile sekanslama yapılmıştır.



Şekil 13. CRISPR/Cas9 uygulaması sonucu elde edilen balıkların fenotipik görüntüsü. **A)** 1. gruptan hem *tyr* geninde hem de hedef genlerde mutasyon tespit edilmemiş balık, **B)** 2. gruptan *tyr* geninde mutasyon tespit edilmemiş ancak diğer genlerde mutasyon tespit edilmiş balık, **C)** 3. gruptan hem *tyr* geninde hem de hedef genlerde mutasyon tespit edilmiş balık **D)** Negatif kontrol.



Şekil 14. ICE program kullanılarak tyr gen bölgesi için farklı bireylerden elde edilen Sanger dizileme kromatogramı ve analizi. gRNA dizisinin etrafındaki bölgede düzenlenmiş ve yaban tip (kontrol) dizileri gösteren Sanger dizisi kromatogramıdır. Bu, karışık baz çağrıları içerecek olan hem kontrol hem de deneysel örnek *.ab1 dosyalarından gelen dizi bazlı çağrıları (base-call) gösterir. Yatay siyah altı çizili bölge gRNA dizisini temsil eder. Yatay kırmızı altı çizili PAM bölgesidir. Dikey siyah noktalı çizgi gerçek kesim noktasını temsil eder.

TLR3 geni için iki farklı gRNA dizayn edilmiş ve test edilmiştir ancak veri analizi aşamasında TLR3-gRNA1 için dizayn ederken PAM dizisinin yanlış seçildiği tespit edilmiştir ve bu gRNA çalışmamıştır. İki numaralı grupta TLR3-gRNA2 test edilmiş ve

ekzon 3 bölgesinde mutasyonlar tespit edilmiştir. Negatif grup ile karşılaştırıldığında bir örnek üzerinde 5 farklı indel mutasyonu tespit edilmiştir (Şekil 15).

TLR9 geni için iki farklı gRNA dizayn edilmiş edilmiş ve TLR9-gRNA1 grup 1'de test edilirken TLR9-gRNA2 grup 2 ve 3'de test edilmiştir. Grup 1'de üç balıkta TLR9-gRNA1'in hedeflediği ekzon 1 üzerinde 6 farklı indel mutasyon tespit edilmiştir. Grup 2'de bir balıkta ve Grup 3'de üç balıkta TLR9-gRNA2'nin hedeflediği ekzon 1 üzerinde 6 farklı indel mutasyon tespit edilmiştir (Şekil 15).

MDA5 geni için PAM dizisi yetersizliğinden ve off-target etkisinden dolayı bir gRNA dizayn edilmiş ve grup 2 ve 3'de test edilmiştir. Grup-2'de bir balıkta ve grup-3'de üç balıkta MDA5-gRNA1'in hedeflediği ekzon 16 üzerinde 7 farklı mutasyon tespit edilmiştir (Şekil 15).

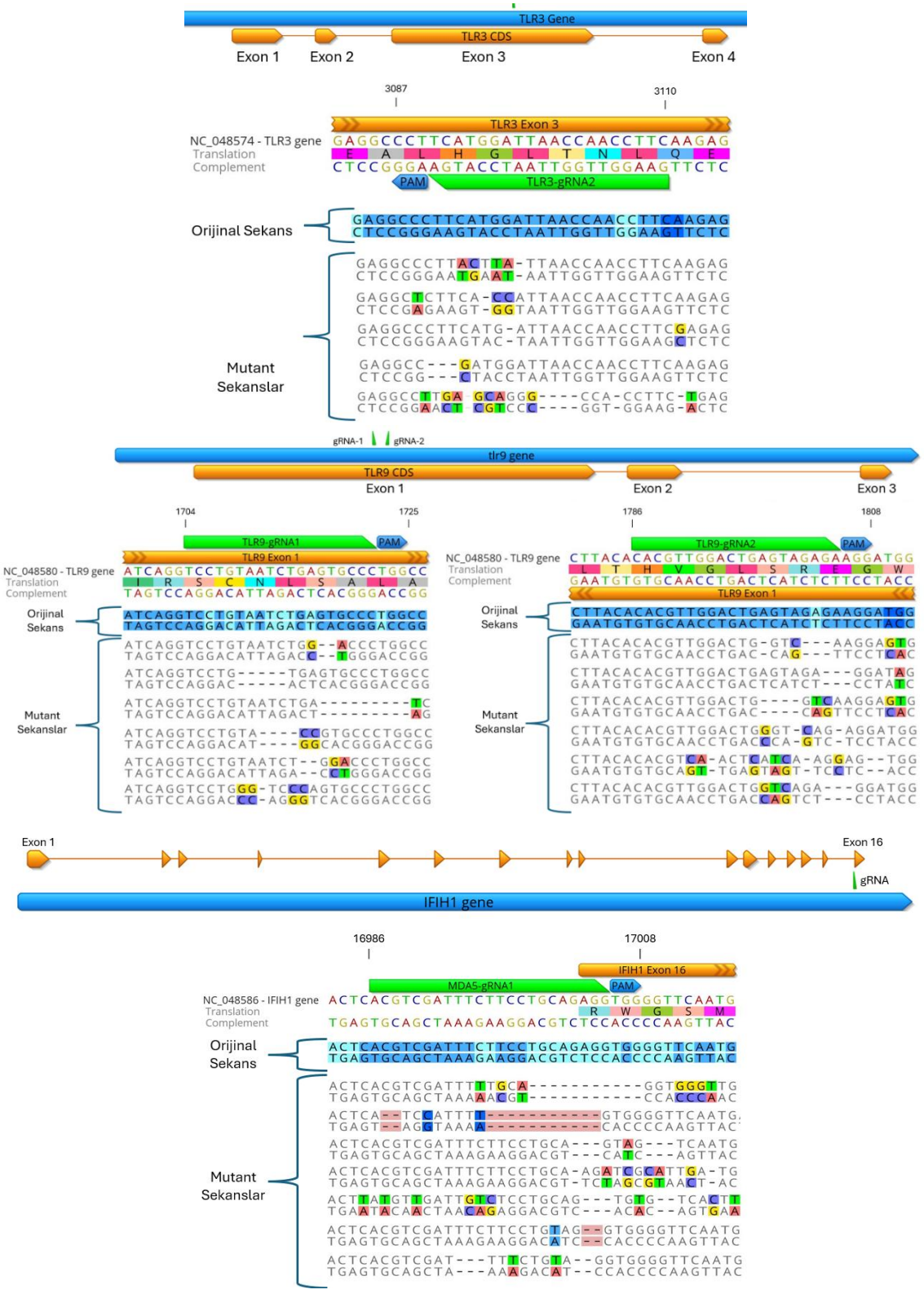
Gruplarda mutasyon başarı oranlarını incelediğimiz zaman grup birde iki gen hedeflenmiştir ancak TLR3-gRNA1 dizayn hatasından dolayı çalışmamıştır ve hesaplamalarda dikkate alınmamıştır. Bu nedenle grup-1'de %75 oranında bir gen (TLR9) üzerinde mutasyon gerçekleşmiştir. Grup-2'de üç gen hedeflenmiştir ve %100 oranında 3 gende (TLR3, TLR9, MDA5) eş zamanlı mutasyon gerçekleşmiştir. Grup-3'de üç gen hedeflenmiştir ancak TLR3-gRNA1 dizayn hatasından dolayı çalışmamıştır ve hesaplamalarda dikkate alınmamıştır. Bu nedenle Grup-3'de %75 oranında iki gende (TLR9, MDA5) eş zamanlı mutasyon gerçekleşmiştir.

Gen üzerinde hedef dışı mutasyon olup olmadığını kanıtlamak için Oxford nanopore MinION platformu ile amplikon sekanslama yapılarak mutasyonlar tespit edilmiştir. Analizler sonucunda sadece PAM dizisi etrafında indel mutasyonlar olduğu gözlenmiştir ve gen dizisi üzerinde hedef dışı mutasyonlar tespit edilmemiştir. Bu durum gRNA'ların spesifikliğini göstermektedir ancak analiz edilen gen bölgeleri dışında diğer bölgelerde hedef dışı mutasyon olup olmadığını kanıtlamak için tüm genom sekansı yapılmalıdır.

Her bir grupta örnekleme yapılan balıkların boy ve ağırlık ölçüleri alınmış ve Shapiro–Wilk normalite testine göre değerlerin normal dağılım gösterdiği tespit edilmiştir. One-way ANOVA test sonuçlarına dayanarak mutant gruplar ile kontrol grubu arasında boy ve ağırlık açısından istatiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Tablo 21). İstatistiksel önem $p < 0,05$ olarak belirlenmiş ve tüm veriler ortalama ± standart sapma olarak sunulmuştur.

Tablo 21. Her bir grupta örnek alınan balıkların boy ve ağırlıkları. Grupların ortalaması standart sapma ile verilmiştir.

	1. Grup		**2. Grup**		**3. Grup**		**Negatif Kontrol**	
Örnek No	**Boy (cm)**	**Ağırlık (gr)**	**Boy (cm)**	**Ağırlık (gr)**	**Boy (cm)**	**Ağırlık (gr)**	**Boy (cm)**	**Ağırlık (gr)**
1	7,2	3,850	9,3	7,134	6,6	2,962	6,2	7,13
2	6,5	3,860			7,7	3,515	8,5	6,965
3	8,4	5,872			10,3	9,135	4,6	1,58
4	8,5	6,074			8,1	4,443	6,4	2,678
5							7,3	4,191
6							9,5	8,899
Ortalama	**7,65±0,838**	**4,914±1,061**	**9,30**	**7,134**	**8,17±1,344**	**5,013±2,437**	**7,08±1,597**	**5,241±2,614**



Şekil 15. CRISPR/Cas9'un mutagenez verimliliğinin analizi. A) TLR3 geni üzerinde gRNA'nın hedeflediği bölge ve bu bölgede yaban tipe kıyasla uygulama yapılan örneklerde tespit edilen mutasyon tipleri. B) TLR9 geni üzerinde gRNA'ların hedeflediği bölgeler ve bu bölgelerde yaban tipe kıyasla uygulama yapılan örneklerde tespit edilen mutasyon tipleri. C) MDA5 geni üzerinde gRNA'ların hedeflediği bölgeler ve bu bölgelerde yaban tipe kıyasla uygulama yapılan örneklerde tespit edilen mutasyon tipleri.

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada gökkuşağı alabalığının patojen tanıma reseptör genleri üzerinde IPNV dirençliliği ile ilişkili olabilecek SNP'ler belirlenmiştir. Bu kapsamda enfeksiyon deneyi sonunda ölen ve yaşayan balıklarda TLR3, TLR9, MDA5 ve SENP5 genleri incelenmiştir. SENP5 ek olarak TLR3 ve MDA5 genleri üzerinde birden fazla mutasyon tespit edilmiştir. Sonuçlar patojen tanıma reseptörlerinden toll benzeri reseptör grubu üyesinin (TLR3) ve retinoik asit indüklenebilir (RIG)-I benzeri reseptör grubu üyesinin (MDA5) IPNV dirençliliği ile ilişkili olabileceğini göstermiştir. Bu veriler daha önceki mevcut literatür ile karşılaştırılarak gökkuşağı alabalığında IPNV dirençliliğinde etkisi olan aday genlerin incelenmesinde ve markır destekli seçilim çalışmalarında kullanılabilir.

Houston ve ekibi tarafından yapılan çalışmada bağlantı grupları 21 (LG21) ve 26 (LG26) majör etkiye sahip bağlantı grupları olarak tespit edilirken, bağlantı grubu 19 da minör etkiye sahip QTL olarak belirlenmiştir (Houston vd., 2008). Moen ve ekibi tarafından yapılan çalışmada benzer şekilde bağlantı grubu 21 ve 26'nın majör etkiye sahip olduğu tespit edilirken ek olarak bağlantı grubu 4'ünde majör etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Moen vd., 2009). Bu farklılıklar, incelenen popülasyonlar arasındaki farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir; bazı polimorfizmler bir popülasyonda ayrılırken diğerlerinde ayrılmayabilir veya her popülasyon genom taramalarında yalnızca sınırlı sayıda ebeveyn tarafından temsil edildiğinden örneklemeyle ilgili olabilir. Bu çalışmalarda gözlendiği gibi türler ve hatta popülasyonlar arasında dirençlilikte rol alan faktörler değişiklik gösterebilmektedir ve bu durum gökkuşağı alabalığının IPN dirençliliği için ayrı olarak incelenmesini ön plana çıkarmaktadır.

Gökkuşağı alabalığı için ilk QTL çalışması Ozaki ve ekibi tarafından 51 mikrosatellit markır kullanılarak yapılmıştır ve hastalık direncini etkileyen iki olası QTL, sırasıyla A (IPN R S-1) ve C (IPN R/S-2) kromozomlarında tespit edilmiştir (Ozaki vd., 2001). Bu sonuç, IPN dirençliliğinin gökkuşağı alabalığında poligenik bir özellik olduğunu düşündürmüştür. Daha sonra 226 markır kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada üçü (RT-3, RT-12 (iki bağlantı grubu daha önceki çalışmada da tespit edilmiştir.), RT-22) majör etkiye sahip toplamda 7 bağlantı grubu tespit edilmiştir (Ozaki vd., 2007). Atlantic somon ve gökkuşağı alabalığı için elde edilen veriler karşılaştırıldığı zaman gökkuşağı alabalığında tespit edilen iki bağlantı grubu RTLG3 (IPNR/S1) ve RTLG22 (IPNR/S2)'nin Atlantik somon QTL

bağlantı gruplarıyla açıkça tanımlanmış bir homolog yoktur (Houston vd., 2008). Ancak OmyRGT44TUF lokusu, RT LG 22'nin IPN R/S 2 QTL'sinin zıt ucuna eşlenir (Ozaki vd., 2001; 2007) ve OmyRGT44TUF da mevcut çalışmada tanımlanan QTL'nin Atlantik somonu (AS) LG 21'in zıt ucuna eşlenir. Bu durum, bu QTL'lerin iki türdeki aynı genin etkisinden kaynaklanabileceği ihtimalini gündeme getiriyor ancak bu olasılığı değerlendirmek için RTLG22 ve ASLG21 arasındaki homolojiye dair daha fazla kanıta ihtiyaç duyuluyor.

Gökkuşağı alabalığında belirlenen majör etkiye sahip bağlantı gruplarının bağışıklık sistemi ile ilgili genleri içerdiği tahmin edilmiştir. Atlantik somon çalışmalarında hem post-smoltlarda hem de yavru balıklarda IPN direnci için bağlantı grubu 21 major etkiye sahip olarak belirlenmiştir (Moen vd., 2009). Yavru balıkların tatlı suda, post-smoltların ise tuzlu suda yaşadığı göz önüne alındığında, bunlar çok belirgin yaşam evreleridir. QTL pozisyonu için örtüşen güven aralıkları ve QTL genotiplerinin ve yavru balıklar ile post-smolt evreleri arasındaki bağlantı evrelerinin çakışması, aynı genin her iki yaşam evresinde de IPN direncini kontrol ettiğini güçlü bir şekilde göstermektedir. Bu durum majör etkiye sahip QTL'in altında yatan genin doğuştan gelen doğal bağışıklık sistemiyle ilgili olma olasılığına işaret etmektedir. Bu çalışma da doğal bağışıklık sisteminin parçaları olan patojen tanıma reseptörlerindeki mutasyonların etkisini incelemeye yöneltmektedir.

Kantitatif özellik lokuslarının (QTL) tespiti, kantitatif özelliklerde yer alan işlevsel varyantları belirlemenin başlangıç noktasıdır. Ek olarak, bu bilgi, markır destekli seçilim (MAS) veya genomik seçilim (GS) uygulaması yoluyla özelliklerin iyileştirilmesini hızlandırmak için kullanılabilir (Rodríguez vd., 2019). QTL'nin altında yatan genlerin tanımlanması, balıklarda hastalık direnci ve konak-virüs etkileşimleri için genetik düzenlemenin temel bilgisine yol açabilir.

Gökkuşağı alabalığında IPNV dirençliliğinde etkin olan iki majör lokus linkage grup 3 ve 22 üzerinde belirlendi ve bu lokuslar kromozom 14 ve 16 üzerinde yer almaktadır (Hu vd., 2016). Kromozom 16'da patojen tanıma reseptörlerinden TLR9'un yer alması bağışıklık sistemini işaret etmektedir. Balıklarda TLR9 geni bakteriyel ve viral genomda bulunan CpG motifini tanır (Aoki vd., 2013). Bu çalışmada TLR9 geninde hem yaşayan (pozisyon:673) hem ölen (pozisyon:5215) grupta sadece bir SNP tespit edilmiştir ve ortak pozisyonda SNP bulunmamıştır. Yaşayan grupta TLR9 genindeki mutasyon patojen tanıma bölgesi ile ilişkili olduğu için dikkat çekmektedir ancak SNP etkisini aydınlatmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Kromozom 16 üzerinde SENP1 geninin yer alması SUMO yolağı ile ilgili genlerin viral tepkideki önemini göstermektedir. Yakın zamanda yapılan çalışmada SNP panel kullanılarak ölen grupta kromozom 5 üzerinde yer alan bir SNP'nin IPNV dirençliliğinde önemli etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Rodríguez vd., 2019). Sentrin-spesifik proteaz 5'in (SENP5) bu SNP'ye yakınlığı, onu IPNV'ye karşı direnç için aday bir gen yapmıştır. SENP5 'in işlevi esas olarak izopeptidaz aktivitesi ve genetik transkripsiyon, hücre döngüsü, apoptoz, hücre içi ve çekirdek içi trafik ve protein stabilitesi dahil olmak üzere viral replikasyon için önemli olan biyolojik süreçlerin düzenlenmesiyle ilgilidir (Pinto vd., 2012).

Bu çalışmada yaşayan ve ölen gruplarda SENP5 geninde birden fazla SNP tespit edilmiştir ve her iki grup için üç ortak pozisyonda farklı formda SNP'ler tespit edilmiştir. Bu üç SNP'nin etkisi CRISPR uygulamaları ya da seçilmiş damızlıklardan elde edilen yavruların in vivo çalışmaları ile test edilebilir.

Major etkiye sahip bağlantı grupları ile ilişki kurulamasa da patojenlere ait çift zincirli RNA'ları tanıdığı için bu çalışmada toll benzeri reseptörlerin bir üyesi olan TLR3 genindeki tek nükleoit polimorfizmleri incelenmiştir (Aoki vd., 2013). Ölen grupta TLR3 geninde 10 farklı pozisyonda SNP tespit edilirken yaşayan grupta TLR3 geninde 15 farklı pozisyonda SNP tespit edilmiştir. Ayrıca bu mutasyonların üç tanesi iki grupta aynı pozisyondadır ancak iki mutasyon gen sonunda yer aldığı için sekanslama ya da veri analizi kaynaklı olabilir ve dirençlilik ile ilişkili olmayabilir. TLR3 genindeki yüksek sayıda mutasyon ileride bu gen bölgesinin yeni çalışmalarla tekrar değerlendirilmesi önem arzetmektedir.

Retinoik asit indüklenebilir (RIG)-I benzeri reseptörlerin bir helikaz enzim üyesi olan MDA5, viral enfeksiyon sırasında uzun çift zincirli RNA moleküllerine bağlanır ve antiviral yanıtı düzenleyen tip I interferon (IFN1) üretimini başlatır (Aoki vd., 2013). Bu proteini üreten gen bölgesini bu çalışmada incelediğimizde birden fazla mutasyon tespit edilmiştir ancak sekans analizinden kaynaklı hata olabileceğini düşündüğümüz için gen sonu bölgesinde yer alan mutasyonlar göz ardı edilebilir. Ölen grupta ve yaşayan grupta aynı pozisyonlarda farklı formda gen sonunda olmayan 6 mutasyon tespit edilmiştir ve IPNV dirençliliği ile ilişkili olabilir.

Ayrıca bu çalışmada SNP'lerin belirlenmesine ek olarak patojen tanıma reseptörlerinin üyesi olan hedef genlerde CRISPR-Cas9 platformu kullanılarak hedefli mutasyonlar yapılmış ve bu platformun gökkuşağı alabalığında bağışıklık sisteminin çalışılmasında ve model organizma geliştirilmesinde kullanılabileceği gösterilmiştir. Böylece Gökkuşağı alabalığında ilk kez CRISPR-Cas9 platformu kullanılarak bağışıklık sistemi ile ilişkili

genlerde in vivo mutasyonlar oluşturulmuştur. Ayrıca su ürünlerinde ilk defa patojen tanıma reseptörlerinde eş zamanlı birden fazla gende mutasyon yapılmıştır.

CRISPR-Cas9 ile genom düzenleme işleminin etkinliğini (başarı oranını) etkileyen temel faktörlerden biri gRNA‘dır ve gRNA tasarımını optimize etmek için araçlar geliştirilmiş olsa da (örn. CHOPCHOP veya CRISPick) in vivo verimliliğini tahmin etmek hala zordur. Zebra balığı üzerinde yapılan bir çalışmada 14 geni hedef alan 50 gRNA'nın in vivo düzenleme verimliliğini yaygın olarak kullanılan yedi farklı gRNA tasarım aracından elde edilen tahminlerle karşılaştırmışlar ve gerçek sonuçlar arasında önemli tutarsızlıklar olduğunu ortaya koymuştur (Uribe-Salazar vd., 2022). Bu nedenle birçok çalışmada birden fazla gRNA dizayn edilip in vivo test edilmektedir (Khalil vd., 2017). Bu çalışmada da her gen için iki farklı gRNA dizayn edilmiş ancak PAM dizisi yaygın olmaması ve hedef dışı mutasyon oranı gibi sorunlar nedeniyle MDA5 geni için sadece bir gRNA dizayn edilmiştir. Tüm gRNA in vivo olarak test edilmiş ve TLR3-gRNA1 hariç dizayn edilen tüm gRNA’lar hedeflenen bölgelerde mutasyon oluşturmuştur. TLR3-gRNA1 dizayn edilirken PAM bölgesi seçimi ile ilgili hata yapılmıştır ve Cas9 için uygun PAM olmadığından dolayı kesme işlemi gerçekleşmemiştir.

gRNA aracılığıyla PAM dizisi etrafı hedeflenir ve Cas9 kesme işlemini PAM dizisini tanıyarak gerçekleştirir. Diğer çalışmalarda olduğu gibi bu çalışmada da mutasyonlar PAM dizisi etrafında gerçekleşmiştir (Edvardsen vd. 2014; Cleveland vd., 2018). Hedeflenen bölgelerde her bir örnekte insersiyon ve delesyon dâhil olmak üzere birden fazla farklı mutasyon gözlenmiştir. Kırmızı çipura, dil balığı, somon ve gökkuşağı alabalığı gibi diğer gen nakavt edilmiş balık türlerinde de farklı mutasyonlar tespit edilmiştir (Edvardsen vd. 2014; Cui vd., 2017; Kishimoto vd., 2018; Cleveland vd., 2018). Bunun nedeni, genom düzenlemesinin aslında bölünmeyi takiben erken embriyoda gerçekleşmesi ve bunun farklı hücrelerde farklı mutasyonlara sahip bir kimera üretebilmesidir (Li vd., 2021).

Enjeksiyon karışımının hücre içine aktarılmasının başarılı olduğunu ve gen düzenlemesinin etkili bir şekilde gerçekleştiğinin göstergesi olarak farklı balıklar üzerinde pigmentasyon ile ilişkili farklı genler test edilmiştir (Edvardsen vd., 2014; Cleveland vd., 2020; Li vd., 2021). Somon balığı için tirozinaz (*tyr*) ve slc45a2 gen bölgeleri CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak test edilmiş ve slc45a2 ve *tyr* geni için mutasyon oranı sırasıyla %40 ve %22 olarak tespit edilmiştir (Edvardsen vd., 2014). Enjeksiyon işlemi uygulanan yumurtalardan elde edilen balıklar pigmentasyonun tamamen yokluğundan kısmi kayba ve normal pigmentasyona kadar değişen dereceli bir fenotip göstermiştir. Pigmentasyonun

tamamen yok olduğu veya sadece birkaç pigment noktasını gösteren CRISPRslc45a2/Cas9 enjekte edilmiş embriyolardan 80'den fazla (slc45a2) dizi klonu test edildiğinde doğal tip dizilerinin olmadığı gözlenmiştir. Gökkuşağı alabalığı üzerinde yapılan bir çalışmada melanin üretiminin kaybı nedeniyle kısmi ya da tam albinizm oluşturacağı için gen düzenlemesinin etkili bir şekilde gerçekleştiğinin fenotipik göstergesi olarak *tyr2* geni seçilmiştir (Cleveland vd., 2020). Gen mutagenezi, PCR işleminin ardından amplikonlar kapiler elektroforezi ile tespit edilmiştir. Mutant olmayan bireylerde ~268 bp'de (*tyr2*) tek pik tespit edilirken mutant olan bireylerde birden fazla pik gözlenmiştir ve 209 kontrol balığında (toplamın %26'sı) *tyr2* geninde mutasyon tespit edilmiştir. Gökkuşağı alabalığı üzerinde yapılan çalışmaya dayanarak bu çalışmada da fenotipik gösterge olarak *tyr* geni seçilmiş ve aynı gRNA kullanılmıştır. Ancak bu çalışmada aynı primerler kullanılarak kapiler elektroforezi yerine Sanger sekanslama ile mutasyon analizi yapılmıştır. Bu çalışmada CRISPR/Cas9 sistemi uygulanan toplam 9 balıkta sadece 2 örnekte indel mutasyon tespit edilmiştir. Somon balığı üzerinde yapılan çalışmada ayrıca yaban tip dizilerinin mutagenezi tarafından üretilen fenotipi ne ölçüde geri dönüştürebileceği incelenmiş ve *tyr* knock-out F0'da pigmentasyon kaybına neden olmuş ancak bu fenotip genç ve yetişkin balıklarda korunmamıştır (Edvardsen vd., 2014). Gökkuşağı alabalığı üzerinde yapılan çalışmada başlangıçta enjeksiyon yapılan döllenmiş yumurta sayısı 1350 iken 5 aylığa ulaşan balık sayısı 459 ve bu balıklardan sadece 209 bireyde mutasyon tespit edilmiştir (Cleveland vd., 2020). Bu sonuçlar *tyr* geninin mutantların tanımlanması için fenotipik gösterge olarak yeterli olmadığına işaret etmektedir.

Bu çalışmada deney süreci sonunda her bir grupta test edilen örnek sayısı maalesef 1 ya da 4'tür. Bu şekilde hesaplamaları yaptığımız zaman mutasyon oranı %75-100'dür ancak hesaplamaları örneklemi 10 olarak farz edip yeniden yaptığımız zaman diğer çalışmalarla benzer sonuçlar gözlenmektedir. Somon balığı üzerinde pigmentasyon genleri ile ilgili yapılan deneylerde mutasyon oranı %22-40 ve gökkuşağı alabalığında insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-2b genleri üzerinde yapılan çalışmada mutasyon oranı %12,5 olarak elde edilmiştir (Edvardsen vd. 2014; Cleveland vd., 2018). Bu çalışmada örneklemi 10 olarak farz edersek mutasyon oranı salmon grubunda gerçekleştirilen diğer çalışmalara benzer şekilde %10-30 arasındadır ancak mutasyon oranı zebra balığında gözlemlenen orandan (75-90%) daha düşüktür (Jao vd. 2013). Zebra balığı ile yapılan deneylere kıyasla bu çalışmada mutasyon oranının düşük olması Cas9 enziminin daha az etkili olmasına neden olan daha düşük kuluçka sıcaklığı (8-10 °C) olabilir. Ayrıca mutasyon

oranının düşük olması mikroenjeksiyon prosedürüyle ilgili olabilir. Yeni döllenmiş gökkuşağı alabalığı yumurtalarının opak karakteri ve koryonun sertliği nedeniyle doğrudan ilk hücrenin sitoplazmasına enjeksiyon yapmak zordur. Bu nedenle, mutasyon gösteren nispeten düşük sayıda embriyonun başarısız enjeksiyonlardan kaynaklanması mümkündür. Ancak, başarılı enjeksiyonların yüksek oranda mutasyona yol açtığını varsayarsak bu da mutasyon verimliliğinin zebra balığı için daha önce gözlemlendiği kadar yüksek olduğu anlamına gelir. Bunlara ek olarak Cas9 proteinin mRNA olarak verilmesi ve düşük translasyon verimliliğinden dolayı olabilir. Erken mutasyon sıklığının artması, Cas9 proteininin doğrudan enjekte edilmesiyle veya döllenmeden sonra enjeksiyon zamanlamasının iyileştirilmesiyle de elde edilebilir. Kanal yayın balığında yapılan bir çalışmada plazmit yerine Cas9 proteininin kullanılması, Cas9 plazmidinin ekspresyonu için gereken süreyi ortadan kaldırarak, embriyonik gelişimin tek hücreli aşamasında genom hedeflemesini daha olası hale getirmiş ve mutasyon oranı artmıştır (Khalil vd., 2017).

CRISPR/Cas9 sistemi, sadece bir gende değil, aynı zamanda iki veya daha fazla sgRNA çiftini bir arada vererek Cas9 nükleazının aynı anda farklı genomik bölgeleri hedeflemesiyle birden fazla gende eş zamanlı mutasyonlar elde etmek için kullanılabilir. Bu sistem kullanılarak kanal yayın balığı, somon ve gökkuşağı alabalığında birden fazla gen hedeflenerek eş zamanlı mutasyonlar oluşturulmuştur (Wargelius vd., 2016; Khalil vd., 2017; Cleveland vd., 2018). Bu çalışmada grup 1'de sadece TLR9 geninde, grup 2'de TLR9 ve MDA5 ve grup 3'de TLR3, TLR9 ve MDA5 genlerinde eş zamanlı mutasyon meydana gelmiştir. Böylece CRISPR-Cas9 sistemi ile tek bir adımda gökkuşağı alabalığında birden fazla gende eş zamanlı mutasyon oluşturulabileceği bu çalışmada da kanıtlanmıştır. Teleostların üçüncü genom duplikasyonuna ve hatta salmonidlerin dördüncü genom duplikasyonuna maruz kalması nedeniyle memeli ortologlarına kıyasla bazı genlerin birden fazla kopyası bulunmaktadır (Christensen & Davidson, 2017). Bu sistem ile salmonid ailesinde bir genin birden fazla kopyası eş zamanlı veya gruplara ayırarak seçilip knock-out yapılabilir ve bu kopyaların fonksiyonları tanımlanabilir.

Genom duplikasyonuna nedeniyle patojen tanıma reseptörlerinden bazılarının bazı balıklarda birden fazla kopyası bulunduğu düşünülmektedir. Örneğin patojen tanıma reseptörlerinden TLR22 şu ana kadar gökkuşağı alabalığı dahil 13 balıkta duplike olarak bulunmuştur (Qi vd., 2019). Önceki çalışmalara dayanarak TLR22'nin hücre yüzeyindeki uzun dsRNA'ları tanıyarak antiviral bağışıklık tepkisinin bir parçası olarak balık hücrelerinde IFN ekspresyonunu indüklediği ve polyI:C ile aktive edildiğinde TLR22'nin

TICAM-1'i aktive ettiği önerilmektedir. Ancak Gökkuşağı alabalığında sadece *Aeromonas salmonicida* ile yapılan enfeksiyon deneylerinde TLR22 genlerinin ekpresyonunun arttığı tespit edilmiş ancak bu genlerin işlevleri yeterince anlaşılmamıştır (Rebl vd., 2007). CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak gökkuşağı alabalığında duplike olarak bulunan TLR22 genlerine ek olarak antiviral etkiye sahip olduğu düşünülen TLR8 genlerinin fonksiyonları tanımlanabilir ve antiviral yolaktaki etkileri belirlenebilir.

Balığa minimum hasar verdikleri ve rejenerasyon gösterdikleri için yüzgeç kısımları test edilmesi en çok tercih edilen dokudur. Bu çalışmada mutasyon analizleri için diğer çalışmalarda olduğu gibi kuyruk dokuları alınmış ve DNA izolasyonundan sonra mutasyon analizi yapılmıştır. Mutasyon analiz sonuçları bir örnekte birden fazla mutasyon tipi olduğunu göstermiştir. Bu nedenle diğer çalışmalarda olduğu gibi bu çalışmada yüzgeç kesiminin belirli bir dereceye kadar nakavt balıklardaki mozaikliği yansıttığını ve bu nedenle nakavt fenotiplerini değerlendirmek için bir araç olarak kullanılabileceğini göstermektedir (Edvardsen vd., 2014; Khalil vd., 2017).

Yeni genom düzenleme araçlarıyla ilgili bir endişe, yakın zamanda CRISPR/Cas9 sistemi için vurgulandığı gibi hedef dışı bölgelerde mutasyonların oluşma potansiyelidir (Bozok Çetintaş vd., 2017). Zebra balığında, tavşanlarda ve insan hücrelerinde de bildirildiği gibi olası hedef dışı aktiviteler (Ota vd., 2014; Yang vd., 2014; Zou vd., 2009) göz ardı edilemez. Bu nedenle bu çalışmada gen üzerinde olası hedef dışı mutasyonları tespit etmek için tüm gen Oxford nanopore MinION platformu ile sekanslama yapılmış ve gen üzerinde sadece gRNA'nın hedeflediği bölgelerde mutasyon tespit edilmiştir. Illumina sistemlerde amplikon sekanslama ile kısa bölgeler okunarak mutasyonlar teyit edilirken bu çalışmada Oxford nanopore MinION platformu ile tüm gen bütün olarak okunmuştur ve hedef dışı mutasyon tespit edilmemiştir. Her ne kadar hedef bölgede hedef dışı mutasyonlar tespit edilememiş olsa da, hedef bölge dışındaki bir genom dizisinde hedef dışı mutasyonların meydana gelmiş olma olasılığı ihtimal dahilinde olabileceğinden, çalışmanın devamında genom dizilemesinin yapılmasınının uygun olacağı değerlendirilmektedir.

5. SONUÇLAR

Bu çalışmada gökkuşağı alabalığının patojen tanıma reseptör genleri ve SENP5 geni üzerinde IPNV dirençliliği ile ilişkili olabilecek SNP'ler üçüncü nesil sekanslama ile belirlenmiştir. Ayrıca, patojen tanıma reseptörlerinin üyesi olan hedef genlerde CRISPR-Cas9 platformu kullanılarak hedefli mutasyonlar yapılmış ve bu platformun gökkuşağı alabalığında bağışıklık sisteminin analizinde kullanılabileceği gösterilmiştir. Böylece Gökkuşağı alabalığında ilk kez CRISPR-Cas9 platformu kullanılarak bağışıklık sistemi ile ilişkili genlerde in vivo mutasyonlar oluşturulmuştur. Ayrıca su ürünlerinde ilk defa patojen tanıma reseptörlerinde eş zamanlı birden fazla gende mutasyon yapılmıştır.

- Enfeksiyon deneyi sonucunda dirençsiz ve dirençli grubu temsil edecek 4 ölü ve 6 yaşayan balık elde edilmiştir.
- Öncelikle hedef genler (TLR3, TLR9, MDA5 ve SENP5) için dizayn edilen primerler kullanılarak PCR ile sekanslama için yeterli ürün elde edilmiştir.
- Oxford Nanopore MinION flow cell sistemi kullanılarak 4 ölü, 4 yaşayan ve 16 damızlığın hedef gen bölgelerine ait amplikonlar başarıyla sekanslanmıştır.
- Geneios prime ile SNP analizi yapılmış ve dirençsiz grupta TLR3 geninde 10 farklı pozisyonda SNP tespit edilirken dirençli grupta TLR3 geninde 15 farklı pozisyonda SNP tespit edilmiştir. Dirençsiz grupta SENP5 geninde 47 farklı pozisyonda SNP gözlenirken dirençli grupta SENP5 geninde 58 farklı pozisyonda SNP gözlenmiştir. Dirençsiz grupta MDA5 geninde 13 farklı pozisyonda SNP tespit edilirken dirençli grupta MDA5 geninde 45 farklı pozisyonda SNP tespit edilmiştir.
- Ölen grup ile yaşayan grup karşılaştırıldığı zaman TLR3, SENP5 ve MDA5 genlerinde aynı pozisyonlarda farklı polimorfizmler tespit edilmiştir.
- CRISPR/Cas9 uygulamasında her bir grupta 300 embriyoya mikroenjeksiyon yapılmıştır ancak 1 numaralı gruptan 4 balık, 2 numaralı gruptan 1 balık, 3 numaralı gruptan 4 balık ve negatif grubundan 6 balık hayatta kalmıştır.
- CRISPR/Cas9 uygulamasında *tyr* geni fenotipik gösterge olarak seçilmiş ancak uygulama yapılan 9 balıktan sadece ikisinde *tyr* geninde indel mutasyon tespit edilmiştir. Bu nedenle *tyr* geni gökkuşağı alabalığında CRISPR/Cas9 uygulamaları için uygun fenotipik gösterge olmadığı değerlendirilmektedir.

- CRISPR/Cas9 uygulaması sonucu hayatta kalan 15 örnek üzerinde hedef genlerde mutasyonun varlığını genotipik olarak göstermek için Oxford nanopore MinION platformu ile sekanslama yapılmıştır.
- TLR3 geni için iki numaralı grupta TLR3-gRNA2 test edilmiş ve ekzon 3 bölgesinde mutasyonlar tespit edilmiştir. Negatif grup ile karşılaştırıldığında bir örnek üzerinde 5 farklı indel mutasyonu tespit edilmiştir.
- TLR9geni için Grup 1'de üç balıkta TLR9-gRNA1'in hedeflediği ekzon 1 üzerinde 6 farklı indel mutasyon tespit edilmiştir. Grup 2'de bir balıkta ve grup 3 de üç balıkta TLR9-gRNA2'nin hedeflediği ekzon 1 üzerinde 6 farklı indel mutasyon tespit edilmiştir.
- MDA5 geni için grup 2'de bir balıkta ve grup 3'de üç balıkta MDA5-gRNA1'in hedeflediği ekzon 16 üzerinde 7 farklı mutasyon tespit edilmiştir.
- Oxford Nanopore MinION platformu kullanılarak tüm gen bölgesinin dizilenmesi sayesinde, yalnızca PAM dizisi çevresinde indel mutasyonların bulunduğu ve genin diğer bölgelerinde hedef dışı mutasyonlara rastlanmadığı belirlenmiştir.

6. ÖNERİLER

Bu çalışma sonucunda Oxford nanopore MinION platformunun SNP analizi için kullanılabilir olduğu gözlenmiştir. Ölen gruba spesifik olup birden fazla ölen bireyde gözlenen mutasyonların dirençsizlik ile ilişkisini araştırmak için aynı mutasyonların tespit edildiği damızlıklardan bir havuz oluşturulabilir ve bu havuzdaki bireylerin döllenmesi sonucu elde edilen F1 jenerasyonu embriyolara mikroinjeksiyon işlemiyle CRISPR uygulaması yapılabilir. Ölen grup ile yaşayan grup karşılaştırıldığı zaman TLR3, SENP5 ve MDA5 genlerinde aynı pozisyonlarda farklı formlarda polimorfizmler tespit edilmiştir. Bu mutasyonlar IPNV dirençlilik ile ilişkili olabilir. Oluşturulacak damızlık havuzundan elde edilen yavrularda bu bölgelerde CRISPR uygulaması yapılarak dirençsiz bireyler dirençli hale getirilebileceği değerlendirilmektedir.

Gelecek çalışmalarda amplikon yerine Oxford nanopore MinION ya da promethION platformu kullanılarak full genom sekanslama ile genom düzeyinde ilişkili SNP'ler tespit edilebilir.

Bu çalışmaya kıyasla gelecek çalışmalarda mutasyon başarı oranını artırmak için mRNA yerine Cas9 protein olarak doğrudan enjekte edilebilir. Ayrıca mikroenjeksiyon işleminin optimize edilerek enjeksiyon zamanlamasının optimizasyonu ile de mutasyon oranı artırılabilir. Mikroenjeksiyon işlemi uygulanan her bir grupta örneklem sayısı artırılarak mutasyon taraması yapılabilecek boyuta gelen balık sayısı artırılabilir.

Bu çalışmada fenotipik gösterge olarak *tyr* geni seçilmiş ve uygulama sonrası albinizm beklenmiştir. Ancak sadece 2 örnekte *tyr* geninde mutasyon tespit edilmiş ve albinizm yaygın gözlenmemiştir. *tyr* geni için mutasyon analizi Sanger sekanslama ile yapılmış ancak sekans sonuçlarındaki maskelemeden (doğal tipin altında gizli kalmış mutant varyantlar) dolayı mutasyon tespit edilememiş olabilir. Gelecek çalışmalarda Sanger sekanslama yerine daha hassas olan ikinci nesil ya da üçüncü nesil sekanslama ile mutasyon analizi yapılabilir. Ayrıca gelecek çalışmalarda bu gen için farklı gRNA'lar denenerek knock-out başarı oranı artırılabilir. Ayrıca bu gen yerine pigmentasyonla ilgili diğer genler denenebilir. Örneğin diğer balıklarda denenen *solute carrier family 45 member 2 (slc45a2)* geni fenotipik gösterge olarak test edilebilir.

Bu çalışma sonucunda gökkuşağı alabalığında patojen tanıma reseptör genlerinde CRISPR-Cas9 platformu kullanılarak mutasyon yapılabildiği gösterilmiştir. Bu çalışmada

dizayn edilen gRNA'lar kullanılarak gelecek çalışmalarda hedef genlerde yapılan mutasyonların viral enfeksiyonlara verilen bağışıklık sistemi yanıtına etkisi in vivo olarak incelenebilir. Bu gRNA'lara ek olarak yeni gRNA'lar denenebilir ve CRISPR-Cas9 platformu yerine baz editörleri test edilebilir. Genom düzeyinde hedef dışı mutasyon olmadığından emin olmak için bazı örnekler için tüm genom dizilemesi yapılabilir.

7. KAYNAKLAR

Akbudak, M., & Kontbay, K., (2017). Yeni Nesil Genom Düzenleme Teknikleri: ZFN, TALEN, CRISPR'lar ve Bitkilerde Kullanımı. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 111-126. https://doi.org/10.21566/tarbitderg.323614

Aoki, T., Hikima, J. A., Hwang, S. D., & Jung, T. S. (2013). Innate immunity of finfish: Primordial conservation and function of viral RNA sensors in teleosts. *Fish & Shellfish Immunology*, *35*(6), 1689–1702. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.02.005

AquaGen-Salmon eggs (Salmo salar L.). (2021). Retrieved 7 February 2021, from https://aquagen.no/en/products/salmon-eggs/.

AquaLeap: innovation in genetics & breeding to advance UK aquaculture production.

Sustainableaquaculture.com. (2021). Retrieved 7 February 2021, from https://www.sustainableaquaculture.com/projects/industry-capacity/details/aqualeap-innovation-in-genetics-breeding-to-advance-uk-aquaculture-production/.

Balta, F. (2016). Balık Hastalıkları Ders Kitabı, 68-74, Rize.

BIOVIA, Dassault Systèmes, Discovery studio visualizer, v20.1.0.19295. San Diego: Dassault Systèmes, 2020. San diego.

Blake, S., Ma, J., Caporale, D., Jairath, S., & Nicholson, B. (2001). Phylogenetic relationships of aquatic birnaviruses based on deduced amino acid sequences of genome segment A cDNA. *Diseases of Aquatic Organisms*, *45*, 89–102. https://doi.org/10.3354/dao045089

Büyükekiz, A. G., Altun, S., Hansen, E. F., Satıcıoğlu, I. B., Duman, M., Markussen, T., & Rimstad, E. (2018). Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) serotype Sp is prevalent in Turkish rainbow trout farms. *J. Fish Dis.*, 1(1), 95-104. doi: 10.1111/jfd.12675.

Bozok Çetintaş, V., Kotmakçı, M., & Tezcanlı kaymaz, B. (2017). From the Immune Response to the Genome Design; CRISPR-Cas9 System: Review. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, *37*(1), 27–42. https://doi.org/10.5336/medsci.2016-54153

Candan, A. (2002). First report on the diagnosis of infectious pancreatic necrosis (IPN) based on reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in Turkey. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 22(1), 45-48.

Chakrapani, V., Patra, S. K., Panda, R. P., Rasal, K. D., Jayasankar, P., & Barman, H. K. (2016). Establishing targeted carp TLR22 gene disruption via homologous recombination using CRISPR/Cas9. *Dev. Comp. Immunol.,* 61, 242-247. doi: 10.1016/j.dci.2016.04.009.

Chang, M., Collet, B., Nie, P., Lester, K., Campbell, S., Secombes, C. J., & Zou, J. (2011). Expression and Functional Characterization of the RIG-I-Like Receptors MDA5 and LGP2 in Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss). *Journal of Virology*, *85*(16), 8403–8412. https://doi.org/10.1128/jvi.00445-10

Chen, V. B., Arendall, W. B., Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., ... & Richardson, D. C. (2010). MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Biological crystallography*, *66*(1), 12-21.

Cleveland, B. M., Habara, S., Oikawa, J., Radler, L. M., & Shimizu, M. (2020). Compensatory Response of the Somatotropic Axis from IGFBP-2b Gene Editing in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Genes*, 11(12), 1488. https://doi.org/10.3390/genes11121488

Cleveland, B. M., Yamaguchi, G., Radler, L. M., & Shimizu, M. (2018). Editing the duplicated insulin-like growth factor binding protein-2b gene in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). *Scientific Reports*, *8*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-018-34326-6

Christensen, K. A., & Davidson, W. S. (2017). Autopolyploidy genome duplication preserves other ancient genome duplications in Atlantic salmon (Salmo salar). *PLOS ONE*, *12*(2), e0173053. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173053

Colovos, C., & Yeates, T. O. (1993). Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein science : a publication of the Protein Society*, *2*(9), 1511–1519. https://doi.org/10.1002/pro.5560020916

Conant, D., Hsiau, T., Rossi, N., Oki, J., Maures, T., Waite, K., Yang, J., Joshi, S., Kelso, R., Holden, K., Enzmann, B. L., & Stoner, R. (2022). Inference of CRISPR Edits from Sanger Trace Data. *The CRISPR Journal*, *5*(1), 123–130. https://doi.org/10.1089/crispr.2021.0113

Değirmenci, U., Nemli, E., & Çağırgan, H. (2008). Türkiye'nin değişik bölgelerinden infeksiyöz pankreatik necrozis virüsü izolasyonu. *I. Ulusal Alabalık Sempozyumu*, 14-16 Ekim, Isparta, 35.

Dopazo, C. P., & Barja, J. L. (2002). Diagnosis and identification of IPNV in salmonids by molecular methods. *Molecular Diagnosis of Salmonid Diseases*, 2348.

Dopazo, C. P. (2020). The Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) and its Virulence Determinants: What is Known and What Should be Known. *Pathogens*, *9*(2), 94. https://doi.org/10.3390/pathogens9020094

Duncan, R., & Dobos, P. (1986). The nucleotide sequence of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) dsRNA segment A reveals one large ORF encoding a precursor polyprotein. *Nucleic Acids Res.,* 14, 5934.

Duncan, R., Mason, C. L., & Nagy, E. (1991). Sequence analysis of infectious pancreatic necrosis virus genome segment B and its encoded VP1 protein: a putative RNA dependent RNA polymerase lacking the Gly-Asp-Asp motif. *Virology*, 181(2), 541-552.

Edvardsen, R. B., Leininger, S., Kleppe, L., Skaftnesmo, K. O., & Wargelius, A. (2014). Targeted mutagenesis in Atlantic salmon (Salmo salar L.) using the CRISPR/Cas9 system induces complete knockout individuals in the F0 generation. *PLoS One,* 9(9), e108622. doi: 10.1371/journal.pone.0108622.

Firidin, S., Ozturk, R. C., & Alemdag, M., et al. (2020). Population genetic structure of turbot (*Scophthalmus maximus* L., 1758) in the Black Sea. *J Fish Biol*., 97, 1154–1164. https://doi.org/10.1111/jfb.14487

Fisher, R.A., 1930. The Genetical Theory of Natural Selection. Oxford University Press, UK

Flores-Mara, R., Rodriquez, H. F., Bangerab, R., Lhorente, P. J., Neira, R., Newman, S., & Yáñez, M. J. (2017). Resistance against infectious pancreatic necrosis exhibits significant genetic variation and is not genetically correlated with harvest weight in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). *Aquaculture,* 479, 155-160. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.05.042

Gopikrishna, G., Shabani, A., & Kolangi Miandare, H. (2013). Application of molecular markers in Aquaculture. *Frontiers in Aquaculture Biotechnology*, 47–53. https://doi.org/10.1016/b978-0-323-91240-2.00014-2

Grizot, S., Epinat, J., Thomas, S., Duclert, A., Rolland, S., Pâques, F., & Duchateau, P. (2009). Generation of redesigned homing endonucleases comprising DNA-binding domains derived from two different scaffolds. *Nucleic Acids Research*, 38, 2006-2018. https://doi.org/10.1093/nar/gkp1171

Guha, T., Wai, A., & Hausner, G., (2017). Programmable Genome Editing Tools and their Regulation for Efficient Genome Engineering. *Computational And Structural Biotechnology Journal*, 15, 146-160. https://doi.org/10.1016/j.csbj.2016.12.006

Heng, L. (2018). Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 34(18), 3094–3100. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty191

Hess, G. T., Tycko, J., Yao, D., & Bassik, M. C. (2017). Methods and Applications of CRISPR-Mediated Base Editing in Eukaryotic Genomes. *Mol. Cell*, 68, 1, 26-43. doi: 10.1016/j.molcel.2017.09.029.

Hill, B. J., & Way, K. (1995). Serological Classification Of Infectious Pancreatic Necrosis (IPN) Virus And Other Aquatic Birnaviruses. *Annual Review of Fish Diseases*, 5, 55- 77.

Hillis, D.M., Mable, B.K., Moritz, C., (1996). Applications of molecular systematics: The state of the field and a look to the future. In: Hillis, D.M., Moritz, C. and Mable, B.K. Eds., Molecular systematics, Sinauer Associates, Massachusetts, 515-543.

Houston, R. D., Haley, C. S., Hamilton, A., Guy, D. R., Tinch, A. E., Taggart, J. B., McAndrew, B. J., & Bishop, S. C. (2008). Major quantitative trait loci affect resistance to infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (Salmo salar). Genetics, 178(2), 1109–1115. https://doi.org/10.1534/genetics.107.082974

Hu, Z. L., Park, C. A., & Reecy, J. M. (2016). "Developmental progress and current status of the Animal QTLdb". *Nucleic Acids Res*, 44, 827–833. https://doi.org/10.1093/nar/gkv1233

Kalaycı, G., İnançoğlu, Ş., Özyer, Ö. B., & Küçükali, Y. (2012). Türkiye"de infeksiyöz pankreatik nekrozis ve viral hemorajik septisemi hastalıklarının durumu. *Bornova Vet Bil Derg*, 34 (48), 31-38.

Kalendar, R., Lee, D., & Schulman, A. (2009). FastPCR software for PCR primer and probe design and repeat search. *Genes, Genomes and Genomics*, 3, 1-14.

Khalil, K., Elayat, M., Khalifa, E., Daghash, S., Elaswad, A., Miller, M., Abdelrahman, H., Ye, Z., Odin, R., Drescher, D., Vo, K., Gosh, K., Bugg, W., Robinson, D., & Dunham, R. (2017). Generation of Myostatin Gene-Edited Channel Catfish (Ictalurus punctatus) via Zygote Injection of CRISPR/Cas9 System. *Scientific Reports*, *7*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-017-07223-7

Li, H., Yang, Y., Hong, W., Huang, M., Wu, M., & Zhao, X., (2020). Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects. *Signal Transduction And Targeted Therapy*, 5, 1. https://doi.org/10.1038/s41392-019-0089-y

Li, Q., Shao, G., Ding, Y., Xu, L., Shao, J., Ao, J., & Chen, X. (2021). Effective CRISPR/Cas9-based genome editing in large yellow croaker (Larimichthys crocea). *Aquaculture and Fisheries*, *8*(1), 26–32. https://doi.org/10.1016/j.aaf.2021.04.008

Lorenzen, E., Carstensen, B., & Olesen, N. J. (1999). Interlaboratory comparison of cell lines for cusceptibility to three viruses: VHSV, IHNV and IPNV. *Dis Aquat Org*, 37, 81-88.

Jao, L.-E., Wente, S. R., & Chen, W. (2013). Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(34), 13904–13909. https://doi.org/10.1073/pnas.1308335110

Jeong, E., & Lee, J. Y. (2011). Intrinsic and extrinsic regulation of innate immüne receptors. *Yonsei medical journal*, *52*(3), 379–392. https://doi.org/10.3349/ymj.2011.52.3.379

Joung, J. K., & Sander, J. D. (2013). TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14, 1, 49-55.

Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E., Attiya, S., Bader, J. S., Bemben, L. A., Berka, J., Braverman, M. S., Chen, Y. J., Chen, Z., Dewell, S. B., Du, L., Fierro, J. M., Gomes, X. V., Godwin, B. C., He, W., Helgesen, S., Ho, C. H., Irzyk, G. P., … & Rothberg, J. M. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437(7057), 376–380. https://doi.org/10.1038/nature03959

Martin, A. (2018). Improved Base Editing Technologies With Novel Editors and Assays (PhD.). Unıversıty of Mınnesota.

Moen, T., Baranski, M., Sonesson, A. K., & Kjøglum, S. (2009). Confirmation and fine-mapping of a major QTL for resistance to infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (Salmo salar): population-level associations between markers and trait. *BMC Genomics*, *10*(1), 368. https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-368

Mutoloki, S., & Evensen, Ø. (2011). Sequence similarities of the capsid gene of Chilean and European isolates of Infectious Pancreatic Necrosis Virus point towards a common origin. *J. Gen. Virol.,* 92, 1721–1726.

Nishizawa, T., Kinoshita, S., & Yoshimizu, M. (2005). An approach for genogrouping of Japanese isolates of aquabirnaviruses in a new genogroup, VII, based on the VP2/NS junction region. *J. Gen. Virol.,* 86, 1973-1978.

Noga, E. J. (1996). Fish Disease Diagnosis and Treatment. MosbyYear Book, Inc. 11830 Westline Industrial Drive St. Louis, Missouri, 208-211.

OIE (World Organisation for Animal Health) (2006). Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases.

Ogut, H., & Altuntas, C. (2011). Occurrence and prevalence of infectious pancreatic necrosis virus in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) cultured in cages in the Black Sea. *Aquacult Res.*, 43, 1-7.

Ota, S., Hisano, Y., Ikawa, Y., & Kawahara, A. (2014). Multiple genome modifications by the CRISPR/Cas9 system in zebrafish. *Genes to Cells*, *19*(7), 555–564. https://doi.org/10.1111/gtc.12154

Ozaki, A., Khoo, S. K., Yoshiura, Y., Ototake, M., Sakamoto, T., Dijkstra, J. M., & Okamoto, N. (2007). Identification of additional quantitative trait loci (QTL) responsible for susceptibility to infectious pancreatic necrosis virus in rainbow trout. *Fish Pathology*, 42(3), 131-140. https://doi.org/10.3147/jsfp.42.131

Ozaki, A., Sakamoto, T., Khoo, S., Nakamura, K., Coimbra, M. R., Akutsu, T., & Okamoto, N. (2001). Quantitative trait loci (QTLs) associated with resistance/susceptibility to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). *Mol Genet Genomics*, 265(1), 23-31. doi: 10.1007/s004380000392.

Parisot, T. J., Yasutake, W. T., & Bresler. V. (1963). A new geographic and host record for infectious pancreatic necrosis. *Trans American Fisheries Society*, 91, 63-6.

Pekmez, K., Kalaycı, G., Gürhan, S. İ., & Tuna, E. E. (2020). Preparation and optimization of rapid and sensitive coagglutination test for detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Turkısh Journal of Veterınary and Anımal Scıences*, *44*(5), 1003–1009. https://doi.org/10.3906/vet-2002-61

Petolino, J. F. (2015). Genome editing in plants via designed zinc finger nucleases. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 51, 1, 1-8.

Pinto, M. P., Carvalho, A. F., Grou, C. P., Rodríguez-Borges, J. E., Sá-Miranda, C., & Azevedo, J. E. (2012). Heat shock induces a massive but differential inactivation of

SUMO-specific proteases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Molecular Cell Research*, *1823*(10), 1958–1966. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.07.010

Rebl, A., Siegl, E., Köllner, B., Fischer, U., & Seyfert, H.-M. (2007). Characterization of twin toll-like receptors from rainbow trout (Oncorhynchus mykiss): Evolutionary relationship and induced expression by Aeromonas salmonicida salmonicida. *Developmental & Comparative Immunology*, *31*(5), 499–510. https://doi.org/10.1016/j.dci.2006.08.007

Richardson, C. D., Ray, G. J., Bray, N. L., & Corn, J. E., (2016). Non-homologous DNA increases gene disruption efficiency by altering DNA repair outcomes. *Nat. Commun*, 7, 12463.

Rodríguez, F. H., Flores-Mara, R., Yoshida, G. M., Barría, A., Jedlicki, A. M., Lhorente, J. P., Reyes-López, F., & Yáñez, J. M. (2019). Genome-Wide Association Analysis for Resistance to Infectious Pancreatic Necrosis Virus Identifies Candidate Genes Involved in Viral Replication and Immune Response in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *G3 Genes|Genomes|Genetics*, *9*(9), 2897–2904. https://doi.org/10.1534/g3.119.400463

Samuelsen, O. B., Nerland, A. H., Jorgensen, T., Schroder, M. B., Svasand, T., & Bergh, O. Viral and bacterial diseases ofAtlantic cod Gadus morhua, their prophylaxis and treatment: a rewiew. *Dis Aquat Org.*, 71, 239-254.

Sander, J. D., & Joung, J. K. (2014). CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature Biotechnology*, *32*(4), 347–355. https://doi.org/10.1038/nbt.2842

Santos, A., van Aerle, R., Barrientos, L., & Martinez-Urtaza, J. (2020). Computational methods for 16S metabarcoding studies using Nanopore sequencing data. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 296-305. https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.01.005

Schwede T., Kopp J., Guex N., & Peitsch M. C. (2003). Swiss-model: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research*. 31(13), 3381-3385. doi:10.1093/nar/gkg520. PMC 168927.

Shendure, J., Balasubramanian, S., Church, G. M., Gilbert, W., Rogers, J., Schloss, J. A., & Waterston, R. H. (2017). DNA sequencing at: Past, present and future. *In Nature*, 550(7676). https://doi.org/10.1038/nature24286

Shui, B., Hernandez Matias, L., Guo, Y., & Peng, Y. (2016). The Rise of CRISPR/Cas for Genome Editing in Stem Cells. *Stem Cells Int*, 8140168.

Skjesol, A., Skjæveland, I., Elnæs, M., Timmerhaus, G., Fredriksen, B. N., Jørgensen, S. M., Krasnov, A., & Jørgensen, J. B. (2011). IPNV with high and low virulence: host immune responses and viral mutations during infection. *Virol J.*, 8, 396. doi: 10.1186/1743-422X-8-396.

Swanson, R.N. & Gillespie, J.H. (1979). Pathogenesis of infectious pancreatic necrosis in Atlantic Salmon (Salmo salar). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 36, 587-591.

Timur, G., Timur, M., & Kubilay, A, et al (1993). Bazı Alabalık İşletmelerinde Görülen Pankreatik Nekrozis Hastalığı Üzerine Histopatolojik ve Elektron Mikroskobik Çalışmalar. *Doğu Anadolu Bölgesi I. Su Ürünleri Sempozyumu*, Erzurum.

Uribe-Salazar, J. M., Kaya, G., Sekar, A., Weyenberg, K., Ingamells, C., & Dennis, M. Y. (2022). Evaluation of CRISPR gene-editing tools in zebrafish. *BMC Genomics*, *23*(1), 1–16. https://doi.org/10.1186/s12864-021-08238-1

Van Dijk, E. L., Jaszczyszyn, Y., Naquin, D., & Thermes, C. (2018). The Third Revolution in Sequencing Technology. *Trends in Genetics*, 34(9), 666-681. https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.05.008

Qi, D., Chao, Y., Zhang, C., Wang, Z., Wang, W., Chen, Q., Zheng, Z., & Zhang, Z. (2019). Duplication of toll-like receptor 22 in teleost fishes. *Fish & Shellfish Immunology*, *94*, 752–760. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.09.067

Qin, W., Lu, X., Liu, Y., Bai, H., Li, S., & Lin, S. (2018). "Precise A•T to G•C base editing in the zebrafish genome". *BMC Biology*, 16(1), 2-8.

Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R., & Hebert, P. D. (2005). DNA barcoding Australia's fish species.

Wargelius, A., Leininger, S., Skaftnesmo, K. O., Kleppe, L., Andersson, E., Taranger, G. L., Schulz, R. W., & Edvardsen, R. B. (2016). Dnd knockout ablates germ cells and demonstrates germ cell independent sex differentiation in Atlantic salmon. *Scientific Reports*, *6*(1), 21284. https://doi.org/10.1038/srep21284

Wenne R. (2023). Single Nucleotide Polymorphism Markers with Applications in Conservation and Exploitation of Aquatic Natural Populations. *Animals (Basel)*, 13(6), 1089. doi: 10.3390/ani13061089.

Wood, E. M., Snieszko, S. F., Yasutake, W. T. (1955). Infectious pancreatic necrosis in brook trout. *AMA Arch Pathol.*, 60(1), 26–28.

Wolf, K. (1988). Fish Viruses and Fish Viral Diseases. Cornell University Press; Ithaca, NY, USA.

Wolf, K., Dunbar, C. E., & Snieszko, S. F. (1958). Infectious pancreatic necrosis of trout. I. A tissue-culture study. *Prog. Fish-cult.,* 22, 63-68.

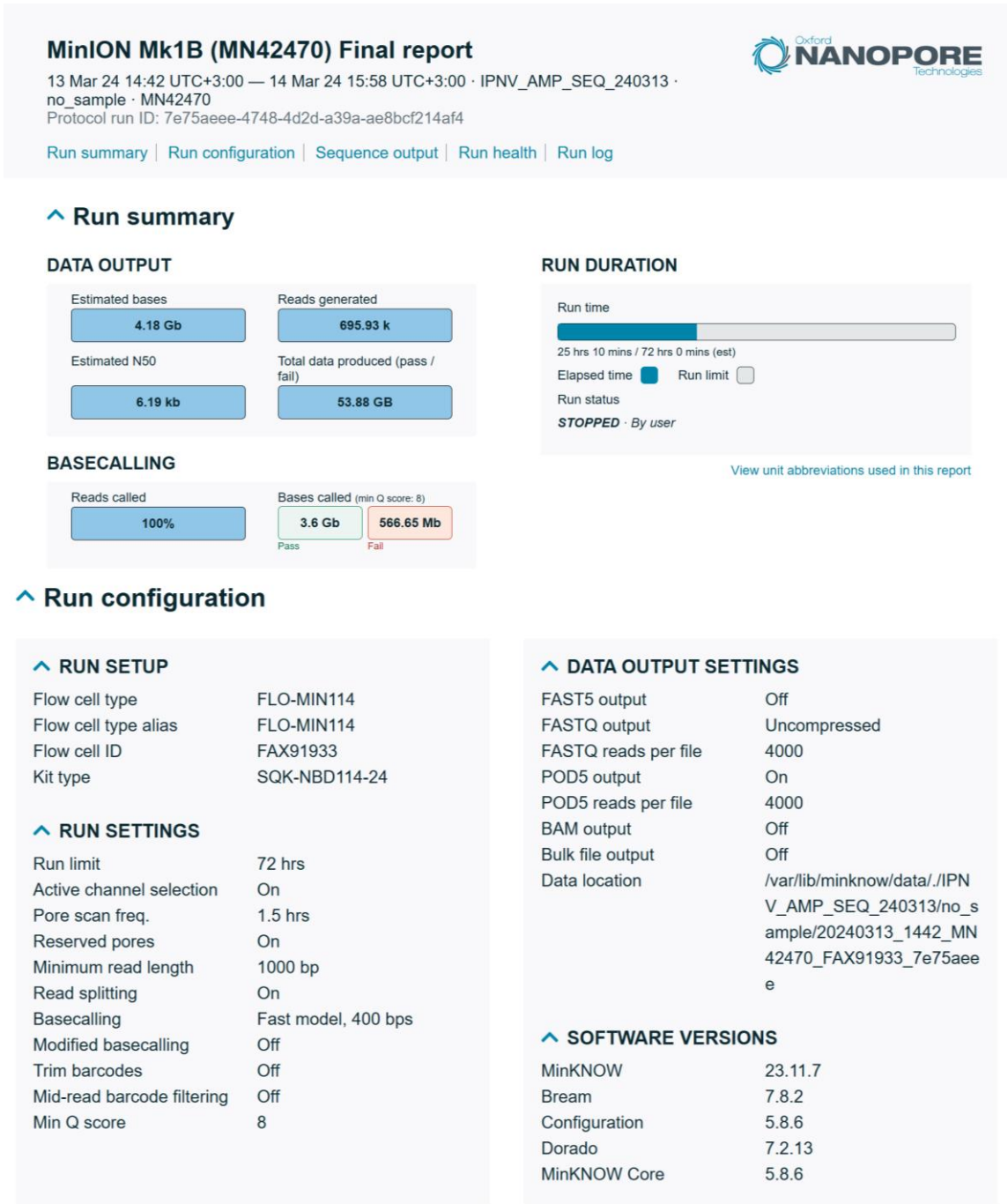
Yang, D., Xu, J., Zhu, T., Fan, J., Lai, L., Zhang, J., & Chen, Y. E. (2014). Effective gene targeting in rabbits using RNA-guided Cas9 nucleases. *Journal of Molecular Cell Biology*, *6*(1), 97–99. https://doi.org/10.1093/jmcb/mjt047

Zhu, B., & Ge, W. (2017). Genome Editing in Fishes and Their Applications. *General and Comparative Endocrinology,* 257, 3-12.

Zou, J., Maeder, M. L., Mali, P., Pruett-Miller, S. M., Thibodeau-Beganny, S., Chou, B.-K., Chen, G., Ye, Z., Park, I.-H., Daley, G. Q., Porteus, M. H., Joung, J. K., & Cheng, L. (2009). Gene Targeting of a Disease-Related Gene in Human Induced Pluripotent Stem and Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell*, *5*(1), 97–110. https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.05.023

8. EKLER

Ek 1. MinION Platformunda 24 Örnek İçin Gerçekleştirilen Sekanslama Raporu



MinION Mk1B (MN42470) Final report

13 Mar 24 14:42 UTC+3:00 — 14 Mar 24 15:58 UTC+3:00 · IPNV_AMP_SEQ_240313 · no_sample · MN42470

Protocol run ID: 7e75aeee-4748-4d2d-a39a-ae8bcf214af4

Run summary | Run configuration | Sequence output | Run health | Run log

Run summary

DATA OUTPUT

Estimated bases	Reads generated
4.18 Gb	695.93 k
Estimated N50	**Total data produced (pass / fail)**
6.19 kb	53.88 GB

BASECALLING

Reads called	Bases called (min Q score: 8)	
100%	3.6 Gb	566.65 Mb
	Pass	Fail

RUN DURATION

Run time

25 hrs 10 mins / 72 hrs 0 mins (est)

Elapsed time · Run limit

Run status

STOPPED · *By user*

View unit abbreviations used in this report

Run configuration

RUN SETUP

Flow cell type	FLO-MIN114
Flow cell type alias	FLO-MIN114
Flow cell ID	FAX91933
Kit type	SQK-NBD114-24

RUN SETTINGS

Run limit	72 hrs
Active channel selection	On
Pore scan freq.	1.5 hrs
Reserved pores	On
Minimum read length	1000 bp
Read splitting	On
Basecalling	Fast model, 400 bps
Modified basecalling	Off
Trim barcodes	Off
Mid-read barcode filtering	Off
Min Q score	8

DATA OUTPUT SETTINGS

FAST5 output	Off
FASTQ output	Uncompressed
FASTQ reads per file	4000
POD5 output	On
POD5 reads per file	4000
BAM output	Off
Bulk file output	Off
Data location	/var/lib/minknow/data/./IPNV_AMP_SEQ_240313/no_sample/20240313_1442_MN42470_FAX91933_7e75aeee

SOFTWARE VERSIONS

MinKNOW	23.11.7
Bream	7.8.2
Configuration	5.8.6
Dorado	7.2.13
MinKNOW Core	5.8.6

Ek 1'in devamı

Sequence output

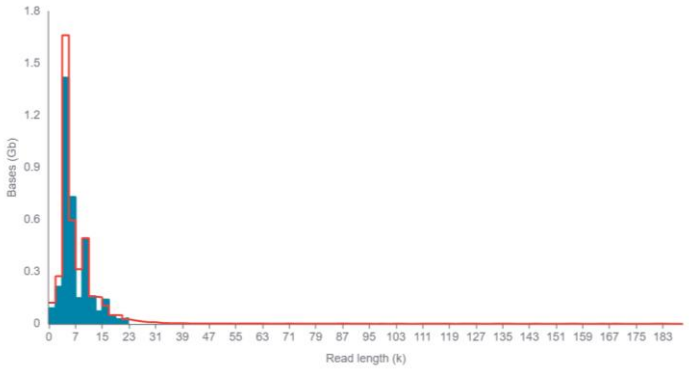
READ LENGTHS · OUTLIERS REMOVED

The read length graph shows the total number of bases vs the read length. The longest 1% of strands are classified as outliers, and excluded to allow focus on the main body of data.

Legend

Basecalled — Estimated

Estimated N50	% Basecalled
6.19 kb	100%



OUTLIERS

The longest 1% of strands are classified as outliers, and aggregated into groups to show their relative amounts.

Read length (kb)	Aggregated reads (Mb)
24 - 88	34.58
88 - 152	0.13
152 - 216	0.77
216 - 240	0.48

BARCODES

Detected barcodes | Bases graph | Reads graph

Detected barcodes

The total number of bases and reads for each barcode detected are displayed in table below.
Reads/bases must have a quality score above 9 to pass.

Unclassified data

66.28 k (11.2%)	429.63 Mb (11.9%)
Passed reads	Passed bases

Search barcodes

Export CSV

Barcode	Total bases (Mb)	Passed bases (%)	Total reads (k)	Passed reads (%)
barcode01	45	92.6	7.34	91.2
barcode02	244.97	92.1	40.28	91.6
barcode03	40.71	92.6	6.4	91.7
barcode04	77.86	92	12.52	90.6
barcode05	51.76	90.2	8.16	89.5
barcode06	54.6	92.1	9.21	91.4
barcode07	51.45	91.9	8.45	91.2
barcode08	52.25	91.1	8.17	90.5
barcode09	103.88	91.7	17.46	91.1
barcode10	69.03	92.8	11.28	92
barcode11	284.26	90.6	46.7	89.7
barcode12	87.12	91.5	14.76	90.8

First Prev 1 2 Next Last

Ek 1’in devamı

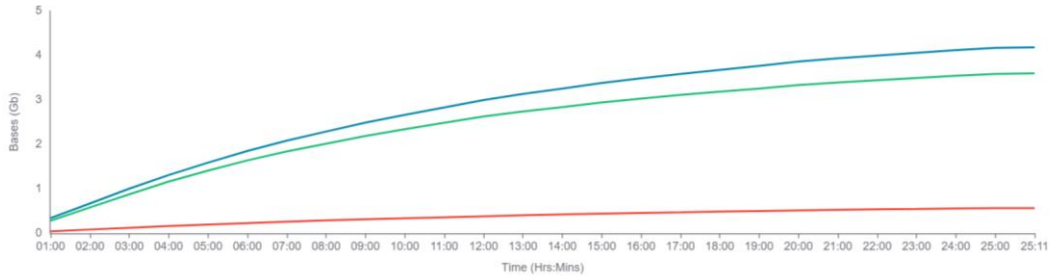
CUMULATIVE OUTPUT

The cumulative output shows the total amount of bases or reads sequenced over time by your device.

Bases

Legend

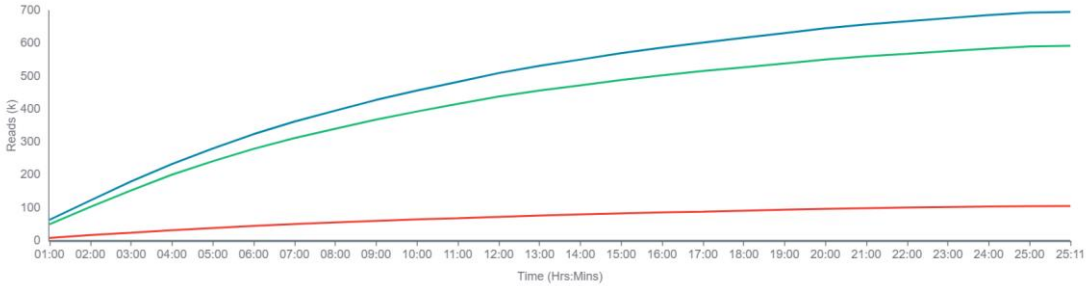
- Estimated — Predicted total number of bases, prior to basecalling
- Passed — Bases equal to or above the quality score threshold.
- Failed — Bases below the quality score threshold.



Reads

Legend

- Total — Total number of reads, including passed, failed and skipped.
- Passed — Reads equal to or above the quality score threshold.
- Failed — Reads below the quality score threshold.
- Skipped — Reads that will not be basecalled. Post run basecalling is possible.

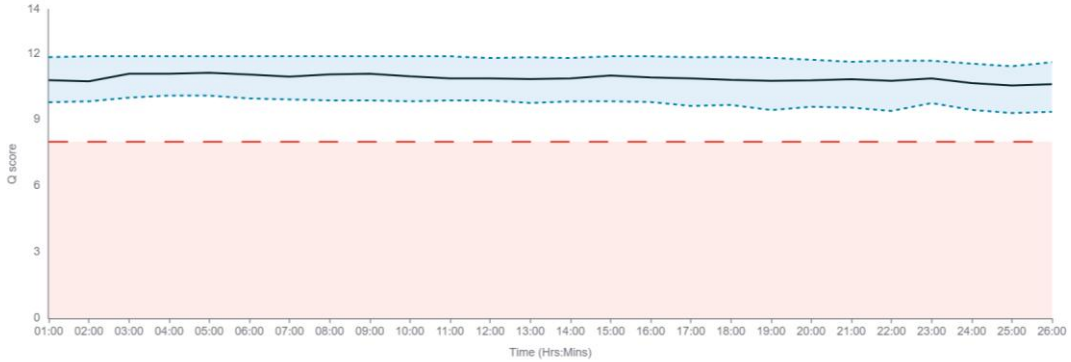


QUALITY SCORE

The quality score is calculated as basecalling is performed on your device. Reads that fall below the minimum value of 8 will be classified as failed reads. You can alter the accepted minimum quality score in MinKNOW.

Legend

- Mode — The most frequent quality score of reads in the run.
- Spread — The spread of quality scores, found by calculating full width half maximum.
- Min. quality score — Minimum quality score to be accepted as a passed read.



Ek 1'in devamı

Run health

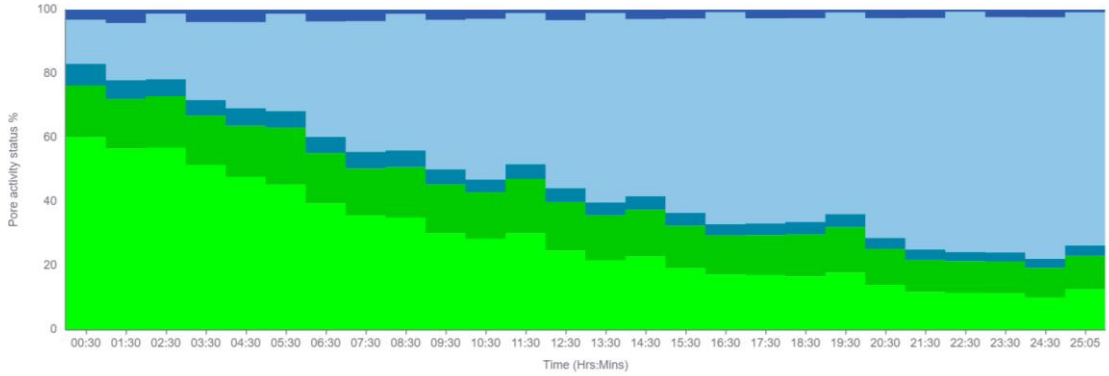
PORE ACTIVITY

The Pore activity graph shows the performance of your sample as it is being sequenced during a run.

Show grouped

Legend

Sequencing	Pore available	Unavailable	Inactive	Unclassified
Pore currently sequencing	Pore available for sequencing	Pore currently unavailable for sequencing	Pore no longer suitable for further sequencing	Pore status unknown

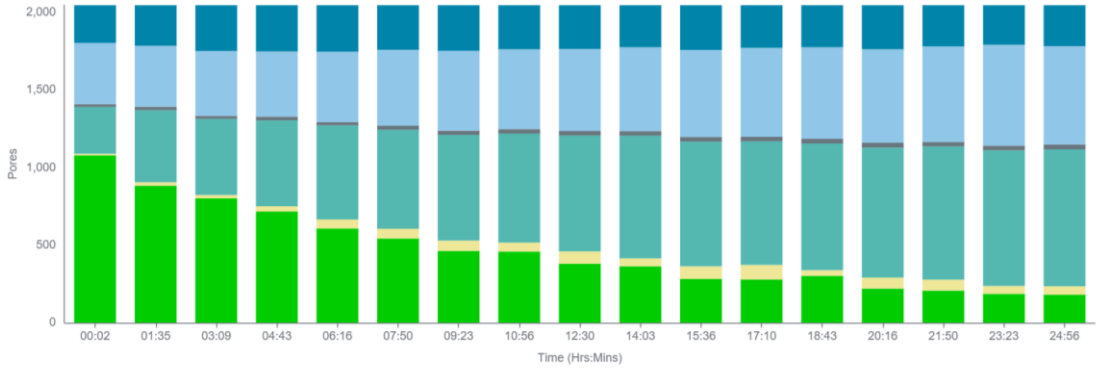


PORE SCAN

A Pore scan is performed at configurable time intervals to determine the current status of pores within channels on a Flow Cell. For this run a Pore scan is performed every 1.5 hrs.

Legend

Pore available	Reserved pore	Unavailable	Saturated	Zero	Inactive
Pore in channel available for sequencing	Pore in reserve, will return to available when required	Pore inhibited from sequencing	Possible contamination in the sample	No current is passing through this pore, possibly due to bubbles on the membrane	Pore no longer suitable for further sequencing



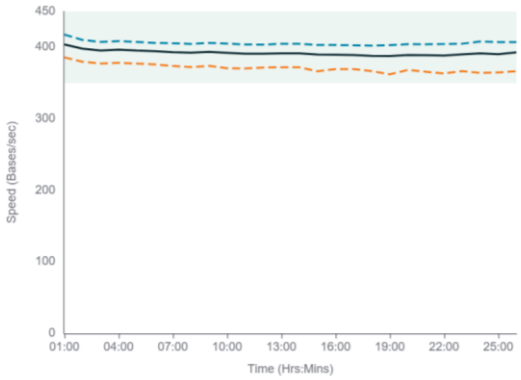
Ek 1'in devamı

TRANSLOCATION SPEED

The translocation speed is the rate at which DNA/RNA travels through pores as it is being sequenced.

Legend

Median — 75% quartile — 25% quartile — Accepted range

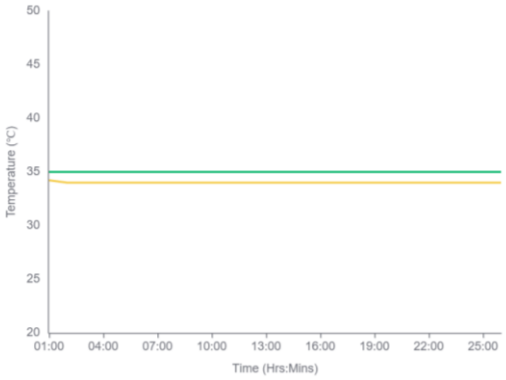


TEMPERATURE

The temperature of the Flow Cell over the run time.

Legend

Measured — Target



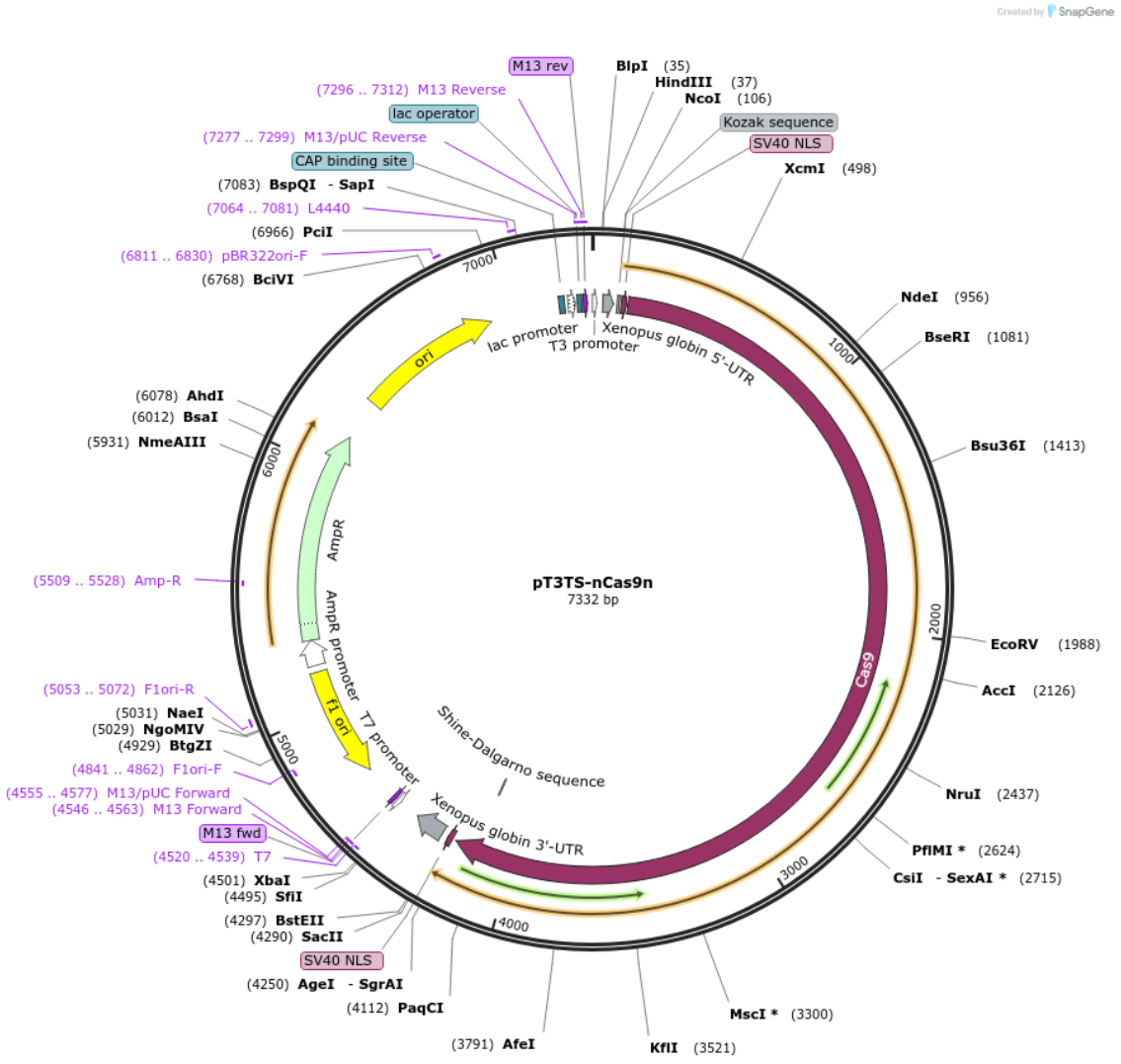
UNIT ABBREVIATIONS

Byte	B
Kilobyte	KB
Megabyte	MB
Gigabyte	GB
Terabyte	TB

Base	b
Kilobase	kb
Megabase	Mb
Gigabase	Gb
Terabase	Tb

Minutes	mins
Hours	hrs

Ek 2. Cas9 mRNA'sının Elde Edilmesinde Kullanılan pT3TS-nCas9n Plazmiti SNAP



ÖZGEÇMİŞ

2011-2015 yılları arasında Atatürk Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünde lisans eğitimini aldı. Milli Eğitim Bakanlığı "Yurt Dışına Lisansüstü Öğrenim Görmek Üzere Gönderilecek Öğrencileri Seçme ve Yerleştirme" programı bursu kapsamında Birleşik Krallık'ta Stirling Üniversitesi'nde "Nil Tilapya'sında (*Oreochromis niloticus*) TLR ve RLR genlerinin dağılımı" başlıklı teziyle Deniz Biyoteknolojisi alanında yüksek lisans eğitimi tamamladı. 2018'den beri Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nde Uzman biyolog olarak çalışmaktadır. 2019 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim dalında doktora programına başladı. Orta düzeyde İngilizceye (IELTS: 6) sahiptir ve 2022 yılında Erasmus kapsamında iki ay boyunca İspanya Ulusal Araştırma konseyine (Spanish National Research Council) bağlı enstitüde su ürünleri bağışıklık sistemi ve hücre kültürü alanında staj yaptı. Bu süreçte CRISPR-Cas9, Biyoinformatik, Deney hayvanları kullanımı ile ilgili eğitimlere katılmış ve yetkinlik belgelerine sahiptir. Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğüne ait birçok projede araştırmacı olarak yer aldı ve Avrupa Birliği ve Dünya Gıda Örgütü vb. tarafından desteklenen uluslararası projelere katıldı.

Yayınlar

1. Cebeci, A., Saltan, A.N., & Sahayaraju, K. (2019). Prediction of Toll-Like Receptor Gene Family in Asian Sea Bass. *Genetics of Aquatic Organisms*, 3, 79-91. http://doi.org/10.4194/2459-1831-v3_2_05
2. Cebeci, A., Aydın, İ., & Goddard, A. (2020). Bigger, stronger, better: Fish transgenesis applications and methods. *Biotech Studies*, 29, 85-97. http://doi.org/10.38042/biost.2020.29.02.05
3. Ture, M., Altinok, I., Cebeci, A., & Caliskan, N. (2022). Characterization of novel bacteriophage HP-T19 that targets *Hafnia alvei*. *Aquaculture Research*, 53, 694–699. https://doi.org/10.1111/are.15592
4. Dağtekin, M., Genç, Y., Kasapoğlu, N., Erik, G., Mısır, D., S., İlhan, S., Ok, M., Altuntaş, M., Özsandıkçı, U., Büyükdeveci, F., Kaya, T., Cebeci, A., Saltan, A., S., Haşimoğlu, A., Firidin, Ş., Özdemir, M., D. (2022). Length-weight relationships of

28 fish species caught from demersal trawl survey in the Middle Black Sea, Turkey. *Turkish Journal of Zoology*, 46, 67-73. doi:10.3906/zoo-2109-21

5. Türe, M., Cebeci, A., Aygür, E., Balcı, F., Çalışkan, N. & Polat, E. K. (2022). Effect of Antibiotics and Glycerol on Improving Bacteriophage Detection and Enumeration. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. 41. 10.48045/001c.37068.
6. Türe, M., Cebeci, A., Altinok, I., Aygür, E. & Çalışkan, N. (2022). Isolation and characterization of *Aeromonas hydrophila*-specific lytic bacteriophages. *Aquaculture*, 558, 738371. 10.1016/j.aquaculture.2022.738371.
7. Türe, M., Cebeci, A., & Özcelep, T. (2022). The first outbreak of citrobacteriosis caused by *Citrobacter gillenii* in reared Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) in Turkiye. *Veterinary research forum: an international quarterly journal*, 13, 323-329. 10.30466/vrf.2021.137808.3076.
8. Dağtekin, M., Dalgiç, G., Erbay, M., Akpınar, İ., Aydin, M., Özdemir, S., Cebeci, A. & Karayücel, S. (2023). Population abundance and growth parameters of an exotic bivalve species, *Anadara kagoshimensis*, in the Southwestern Black Sea. *Turkish Journal of Zoology*, 47, 20-32. 10.55730/1300-0179.3109.
9. Cebeci, A., Türe, M., Alemdağ, M., & Altinok, I. (2023). Whole Genome Sequence of a Novel Bacteriophage APT65 Infecting *Aeromonas hydrophila*. *PHAGE*, 4. 10.1089/phage.2022.0037.
10. Kutlu, İ., Cebeci, A., Alemdağ, M., Firidin, S. & Düzgüneş, Z. (2024). Genetic Diversity of Bluefish Population in Türkiye Coastal. *Genetics of Aquatic Organisms*, 8. 10.4194/GA786.
11. Kutlu, İ., Düzgüneş, Z., Firidin, S., Alemdağ, M., Cebeci, Ayse & Turan, İ. (2025). Population genetics of *Pomatomus saltatrix* (Linnaeus, 1766) in the seas of Türkiye based on microsatellite DNA. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 42, 138-147. 10.12714/egejfas.42.2.06.

Projeler

1. TAGEM - Doğu Karadeniz'deki Demersal Balık Stoklarının İzlenmesi - Araştırmacı (2017-2020)
2. TAGEM - Alabalık Islah Hatlarının Oluşturulmasında Moleküler Genetik ve Biyoteknolojik Yöntemlerin Kullanımı - Araştırmacı (2019-2025)

3. TAGEM - Türkiye Kıyılarındaki Lüfer Balığının (Pomatomus Saltatrix) Genetik Çeşitliliği ve Popülasyon Yapısının Belirlenmesi - Araştırmacı (2020-2024)
4. TAGEM - Bakteriyel Balık Hastalıklarının Kontrolünde Faj Terapisi - Araştırmacı (2021-2022)
5. TAGEM - Su Ürünleri Genetik Veri Tabanı Oluşturulması - Araştırmacı (2024-2029)
6. Tübitak-1004 - Tr.Aqua: Gıda Arzı Güvenliği Çerçevesinde Su Ürünlerinde Yenilikçi Ve Sürdürülebilir Uygulamalar – Araştırmacı (2023-2027)
7. Tübitak-1002 - Aeromonas Hydrophila Bakteriyofaj Kokteylinin In-Vivo Etkinliğinin Belirlenmesi – Araştırmacı (2023-2024)
8. KTÜ-BAP FBA-2022-10413 - Ticari olarak önemli bakteriyel balık hastalıklarının biyolojik kontrolü: bakteriyofaj tedavisi – Araştırmacı (2022-2025)
9. FAO - Cataloguing of Aquatic Genetic Resourcesfrom Central Asian and Caucasus Region Using Morphological Characters, and Molecular Markers- Araştırmacı (2022-2024)
10. AB/Biodiversa+ - Toward a European Rocky Reef Fish Monitoring Network – Araştırmacı (2024- 2027)