

TEKNOFEST

HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ

BİYOTEKNOLOJİ İNOVASYON YARIŞMASI

PROJE DETAY RAPORU

ÜNİVERSİTE VE ÜZERİ SEVİYESİ FİKİR

KATEGORİSİ

TAKIM ADI

KARINCA

PROJE ADI

**Dravet Sendromunda Yeni Bir Tedavi: Geliştirilmiş CRISPR
Nanopartikülleri**

BAŞVURU ID

#427352

İÇİNDEKİLER

1. Proje Özeti	1
2. Problem/Sorun	4
3. Çözüm	4
4. Yöntem	4
4.1. Hayvanlar	
4.2. Scn1a ^{+/-} Dravet Sendromu (DS) fare modelinin oluşturulması	
4.3. Alel spesifik tek kılavuz Ribonükleik Asitlerin (sgRNA) tasarımı ve klonlanması	
4.4. Plazmitlerin hazırlanması	
4.5. Biyo-uyumlu lipit nanopartiküllerin üretimi ve kimyasal protein konjugasyonu	
4.6. Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR)	
4.7. Western-Blot	
4.8. Patolojik Boyama	
4.9. İmmünohistokimya	
4.10. Patch-clamp	
4.11. Febril nöbet testi	
4.12. Beyin aktivitesinin ölçümü	
4.13. Kalp aktivitesinin ölçümü	
4.14. Davranış testleri	
4.15. İstatiksel analiz	
5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü	4
6. Uygulanabilirlik	4
7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması	4
8. Proje Fikrinin Hedef Kitlesi	4
9. Riskler	4
10. Kaynaklar	4

TEKNOFEST
HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ

1. Proje Özeti

Dravet Sendromu (DS), voltaj kapılı sodyum kanalının alfa alt birimini (Nav1.1) kodlayan *SCN1A* geni mutasyonları sonucu ortaya çıkan epileptik bir bozukluktur. DS vakalarında nöbetler nörogelişimsel problemleri ve epilepside ani beklenmedik ölümü (SUDEP) tetiklemektedir. Gen terapi yaklaşımları DS için kritik bir araştırma alanını temsil etmektedir.

Düzenli aralıklarla bölünmüş palindromik tekrar kümeleri-CRISPR ilişkili protein (CRISPR-Cas) sistemi, devrim yaratan bir gen düzenleme teknolojisidir. Ölü Cas (dCas) enzimleri, spesifik gen ifadesini kontrol eden moleküllerdir. Son dönemde CRISPR-dCas sistemi bileşenlerinin *in vivo* aktarımı için hedefe yönelik nanopartiküller ön plana çıkmaktadır.

Tüm bu bilgiler ışığında, 30 adet fare kontrol, DS ve tedavi şeklinde üçe ayrılacaktır. Tedavi farelerine geliştirilmiş CRISPRa/i-dCas12 taşıyan nanopartiküller verilir febril nöbet testiyle yatkınlık incelenecektir. Elektroensefalografi (EEG) ve Elektrokardiyografi (EKG) ile beyin ve kalp aktivitesi değerlendirilecektir. Davranış testleriyle tedavinin bilişsel ve sosyal işlevler üzerine etkileri irdelenecektir. Farelerin beyin ve kalplerinde *SCN1A* mRNA ifadesi ve protein düzeyi sırasıyla Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR) ve Western-Blot ile ölçülecektir. İmmünohistokimya ile proteinlerin hücre zarında lokalize oldukları doğrulanacaktır. Kanalların işlevi patch-clamp ile akım ölçülerek elektrofizyolojik açıdan değerlendirilecektir.

Bu projeye, *SCN1A* ifadesi alel spesifik olarak düzenlenerek işlevsel Nav1.1 kanalı üretilecektir. Verilerin, DS ve benzeri genetik mutasyonların tedavisinde AR-GE çalışmalarına temel oluşturarak ülke ekonomisine katkıda bulunacağı öngörülmektedir.

2. Problem/Sorun

DS, bebeklik dönemi nöbetleriyle başlayan ciddi gelişimsel ve epileptik bir ensefalopatidir. Yaşla birlikte nöbetlere bilişsel, davranışsal ve motor bozukluklar eşlik etmektedir. Vakalarda yürüme ve konuşmada gecikme, otistik davranışlar, ataksi, zeka geriliği ve dikkat eksikliği görülmektedir. (Dravet). DS nöbetleri ilaca dirençli olup çoklu farmakolojik tedaviye rağmen nöbetler kontrol edilememektedir. Düşük hayat kalitesine sahip DS'li bireyler genellikle 10 yaşından önce ölmektedir. Kalp patolojilerinin tetiklediği SUDEP, DS'ye bağlı ölümlerin en yaygın nedenidir (Shmueli et al.). DS nöbetleri ile gelişimsel komorbiditelerin etkin tedavisinin bulunmaması ve SUDEP'i önleyecek yaklaşımların eksikliği projede ele alınan temel sorunu oluşturmaktadır.

3. Çözüm

DS vakaların %80'inde Nav1.1'i kodlayan *SCN1A* geninin tek bir alelindeki işlev kaybı mutasyonlarından kaynaklanmaktadır (Marini et al.). Beyindeki baskılayıcı ara nöronlarda sodyum kanalının yetersiz üretilmesi ve kalpte sodyum akımında telafi edici artışların olması DS'yi ve erken yaşta SUDEP'i tetikleyen kritik mekanizma olarak önerilmektedir (Catterall; Frasier et al.). *SCN1A* mutasyonlarının tedavisi için "gen terapi" kritik önem taşımaktadır.

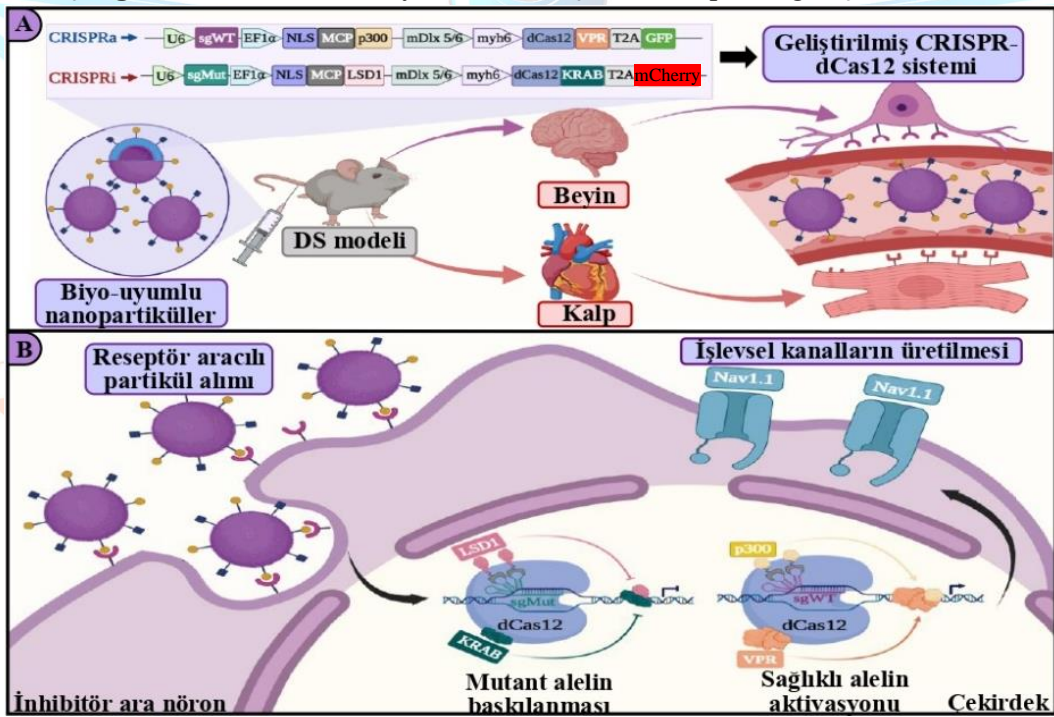
CRISPR-Cas sistemi, son yıllarda tıp ve biyoteknoloji alanında hızla uygulanmaya başlanan inovatif bir gen düzenleme aracıdır. Bu sistem, kılavuz bir Ribonükleik asid (sgRNA) dizisi aracılığıyla genomda istenilen bölgeyi hedeflemekte ve Cas enziminin aktivitesiyle genetik materyali kesmektedir (Manghwani et al.). Geliştirilmiş dCas proteini ise kesme yapmaksızın gen ifadesini transkripsiyonel ve epigenetik açıdan kontrol etmektedir (Xu and Qi). Transkripsiyonel düzenleyicilerle birleştirilmiş dCas moleküllerinin kullanıldığı CRISPRa ve CRISPRi (interferans) teknolojileri, DNA dizisini değiştirmeden mRNA düzeyini sırasıyla artıran ve azaltan yenilikçi yaklaşımlardır (Kazi and Biswas). Bununla birlikte, Cas enzimlerinin kinetik analizleri Cas12'nin Cas9 alt tipine kıyasla yüksek özgüllük gösterdiğini ortaya koymaktadır (Strohkindl et al.).

Böylelikle, **biyoteknoloji ürünü CRISPRa/i-dCas12 sistemiyle SCN1A** ifadesinin artırılmasının nöbetleri önleyerek morbidite ve mortaliteyi azaltacağı düşünülmektedir.

Cas enzimi ve sgRNA'ların hedeflenen hücelere verimli bir şekilde aktarımı, CRISPR-Cas tabanlı genom mühendisliği için **temel adımı** oluşturmaktadır. Üretim kolaylığı, spesifik hedefleme ve verimli dağılım CRISPR-Cas tedavisinde nanopartikül teknolojisini ön plana çıkarmaktadır (Xu et al.). Projede, CRISPR-Cas bileşenlerinin spesifik olarak beyin ve kalp hücrelerine ulaştırılması için **protein konjuge edilmiş nanopartiküllerin** kullanılması tedavinin başarısını artırabilir.

Tüm bu bilgiler ışığında, projede **geliştirilmiş CRISPR nanopartikülleri** aracılığıyla DS modeli farelerin inhibitör ara nöronları ve kalp kası hücrelerine özgü bir şekilde *SCN1A* geninin mutant alelinin ifadesinin baskılanıp sağlıklı alelin ifadesinin artırılması **cözüm yaklaşımı** olarak belirlenmiştir (**Şekil 1**). CRISPR tedavisi sonrası beyinde Nav1.1 proteininin artmasıyla **nöbetlerin ve nörogelişimsel komorbitelerin engellenmesi** beklenmektedir. Ayrıca, kalpte normal düzeye ulaşan Nav1.1 proteininin, kardiyak patolojilere karşı koruma sağlayarak **SUDEP'i önlemesi** hedeflenmektedir.

SCN1A gen mutasyonları, West Sendromu, Lennox-Gastaut Sendromu, Rett Sendromu ve otizm spektrum bozukluğuna yol açabilmektedir (Scheffer and Nabbout). Bu bağlamda, CRISPR nanopartikülleri epileptik ensefalopatiler için **temel bir çözüm** sunarak yaygın hale gelebilir. Ayrıca, herediter sferositoz, Huntington Hastalığı gibi heterozigot otozomal dominant kalıtılan hastalıklar için **genetik temelli tedavi yaklaşımı** oluşturarak kapsamı genişletebilir.



Şekil 1. A) Geliştirilmiş CRISPR kaseti ve uygulanması. Alel spesifik sgMut ve sgWT kullanılarak mutant alelin CRISPRi (U6-sgMut-EF1 α -NLS-MCP-LSD1-mDlx 5/6- myh6-dCas12-KRAB-T2A-mCherry) ile baskılanması ve sağlıklı alelin CRISPRa (U6-sgWT-EF1 α -NLS-MCP-p300-mDlx 5/6- myh6-dCas12-VPR-T2A-GFP) ile aktivasyonu sağlanacaktır. Plazmitler içerisindeki LSD1-KRAB gen bölgesi SCN1A ifadesini azaltıp p300-VPR ise artıracaktır. mDlx 5/6 ve myh6 enhancerleri CRISPR sisteminin nöron ve kalp kası hücrelerinde aktifleşmesine olanak tanıyacaktır. mCherry ve GFP bölgeleri kırmızı ve yeşil renk oluşturarak CRISPR bileşenlerini başarılı bir şekilde alan hücreleri gösterecektir. Beyin (Angiopep-2) ve kalbe (CTP-Lamp2b) özgü iki farklı protein taşıyan lipit nanopartiküllerin kuyruk veninden sistemik uygulanmasıyla hedefe özgü tedavi sağlanacaktır. **B) Nanopartiküllerin alımı.** Protein konjuge edilmiş lipit

nanopartiküller spesifik hücrelerle etkileştiklerinde reseptör aracılı taşıma ile hücre içine alınarak çekirdeğe materyali taşıyacaktır. Aktifleşen CRISPR-dCas12 sistemi alele spesifik düzenleme yaparak Nav1.1 üretimini sağlayacaktır. Böylece, Dravet Sendromu ve SUDEP'i önleyecektir.

4. Yöntem

4.1. Hayvanlar

Mevcut deneyde, DS modelinin oluşturulması için 129S6/SvEvTac ve C57BL/6 fareleri kullanılacaktır. Hayvanlar, 12 saatlik aydınlık/karanlık döngüsü altında 24 ± 2 °C sıcaklıkta ve %60 nemde kontrollü bir ortamda barındırılacaktır. Hayvanların musluk suyuna ve standart yiyeceklere serbest erişimi sağlanacaktır. Tüm prosedürler, Ulusal Sağlık Enstitüleri (ABD) ve Helsinki Bildirgesi tarafından kabul edilen Laboratuvar Hayvanlarının Bakımı ve Kullanımı Kılavuzundaki önerilere uygun olarak gerçekleştirilecektir. Farelere ketamin/ksilazin (90/10 mg/kg, intraperitoneal, i.p.) ile anestezi uygulanacaktır. Hayvanların acı çekmesini en aza indirmek için tüm çabalar gösterilecektir. Hayvan grupları;

- Kontrol grubu (n=10): F1 dölünün (C57BL/6J x 129S-Scn1a^{+/-}) mutasyonsuz fareleri (wild type)
- DS fare modeli (n=10): F1 dölünün Scn1a^{+/-} heterozigot fareleri
- DS tedavi grubu (n=10): F1 dölünün Scn1a^{+/-} heterozigot fareleri + CRISPR nanopartikül tedavisi olarak belirlenmiştir.

4.2. Scn1a^{+/-} DS fare modelinin oluşturulması

C57BL/6J fareleriyle çaprazlanan ve Scn1a aleli nakavt heterozigot fareler, spontan nöbetler, erken ölüm ve kognitif/davranışsal problemler sergilemesi bakımından ideal DS modeli olarak kabul edilmektedir. Çalışmada, Scn1a^{TmKoa} hedefli boş alel, TL1 embriyonik kök hücrelerinde (129S6/SvEvTac) homolog rekombinasyon ile üretilecektir. Fare Scn1a geninin Ekson 1'i neomisin direnç kasetiyle değiştirilecektir. Ortaya çıkan 129S-Scn1a^{+/-} fare hattı sürekli olarak 129S6/SvEvTac fareleriyle (n=15) (Taconic Biosciences, Hudson, New York) geri çaprazlanarak ko-izojenik suş olarak korunacaktır. C57BL/6J suşu (n=30) (000664, Jackson Laboratory, ABD) 129S-Scn1a^{+/-} fare hattıyla çaprazlanarak F1 dölü oluşturulacaktır (Miller et al.). Genotipleme için farelere doğum sonrası 12. günde kuyruk biyopsisi yapıp kuyruk kiti (Azura™, AZ-1851, ABD) kullanılarak DNA izole edilecektir. Scn1a genotipi PCR ile belirlenecektir (Mistry et al.). F1 dölünün heterozigot nakavt fareleri DS modeli ve mutasyonsuz fareleri kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edilecektir.

4.3. Alel spesifik tek kılavuz ribonükleik asitlerin (sgRNA) tasarımı ve klonlanması

SCN1A geninin CRISPR teknolojisiyle alele özgü genom mühendisliğinin gerçekleştirilebilmesi için ücretsiz olarak erişim sağlanabilen AsCRISPR web sunucusu (<http://www.genemed.tech/ascrispr>) kullanılacaktır. AsCRISPR sunucusu mutasyonlar ve tek nükleotit değişiklikleri gibi varyasyonları baz alarak iki alel için farklı protospacer bitişik motifi (PAM) sitelerini saptamaktadır (Zhao, Li and Tang). Cas12 için PAM siteleri genellikle TTTA, TTTC ve TTTG dizilerinden oluşmaktadır. Cas12 için önerilen gRNA dizisi PAM sitesinin yaklaşık 18-20 nükleotit yukarısı olarak belirlenmiştir. AsCRISPR sunucusunun sağladığı biyoinformatik analizlerle sağlıklı aleli hedefleyen sgRNA (sgWT) ve mutant aleli hedefleyen sgRNA (sgMut) belirlenecektir. sgWT ve sgMut sırasıyla LV-U6-EF1 α -GFP (Addgene, Plasmid #17448) ve LV-U6-EF1 α -mCherry (Addgene, Plasmid #114199) vektörlerinde klonlanacaktır.

4.4. Plazmitlerin hazırlanması

Mutant aleli baskılayıp sağlıklı alelin ifadesini artıracak CRISPRa/i-dCas12 sistemi iki plazmit üzerinde farelere aktarılacaktır. dCas12-VPR-p300 ekspresyon plazmitinin oluşturulması için p300 çekirdek alanı, pcDNA-dCas9-p300-Core vektöründen (Addgene, Plasmid #61357) PCR ile çoğaltılacaktır. Ardından MluI/BstXI restriksiyon enzimleriyle kesilmiş dCas12-VPR kasetine (Addgene, Plasmid #104567) klonlanacaktır (Kempton et al.). VPR-p300 bölgesi sağlıklı SCN1A geninin ifadesinin belirgin olarak artmasını sağlayacaktır. İnhibitör ara nöron ve kardiyomyosit (kalp kası hücresi) spesifik tedavinin gerçekleştirilmesi için sırasıyla mDlx 5/6 ve myh6

güçlendiricileri (enhancer) **Tablo 1** 'teki primerler kullanılarak fare genomik DNA'sından PCR ile çoğaltılacaktır (Tsai et al.; Dimidschstein et al.). Üretici firmanın talimatlarına göre Golden Gate klonlama kiti (NEBridg@, BsmBI-v2 #E1602S) kullanılarak enhancerler ve sgWT vektörü birleştirilip dCas12-VPR-p300 kasedine klonlanacaktır. Böylece hedeflenen hücrelerde sağlıklı alelin ifadesini artıran CRISPRa plazmiti (yeşil renk) oluşturulmuş olacaktır (Li et al.). dCas12-KRAB-LSD1 plazmitinin oluşturulması için LSD1 alanı, p-dCas9-LSD1 vektöründen (Addgene, Plasmid #104406) PCR ile çoğaltılıp dCas12-KRAB kasetine klonlanacaktır. mDlx 5/6 ve myh6 enhancerleri sgMut vektörüyle birleştirilip dCas12-KRAB-LSD1 kasedine klonlanmasıyla CRISPRi plazmiti (kırmızı renk) oluşturulacaktır. KRAB-LSD1 bölgesi mutant SCN1A proteininin üretilmesini baskılayacaktır. mDlx 5/6 ve myh6 enhancerleri CRISPR bileşenlerinin sadece hedeflenen hücrelerde üretilmesini sağlayacaktır. CRISPRa/i bileşenlerinin her ikisini de başarılı bir şekilde alan hücrelerin mikroskop altında (kırmızı+yeşil) sarı gözükmesi beklenmektedir.

Tablo 1: Hücre spesifik enhancer primerleri

Primer dizileri		
mDlx	Forward Primer	5'-TATACACTCACAGTGGTTTGGC-3'
	Reverse Primer	5'-CTTCCTACTGTGAAACTTTGGG-3'
myh6	Forward Primer	5'-CGGTGCTTTCAACCTCAAGG-3'
	Reverse Primer	5'-GGACTGGTCTCCCGATCTGT-3'

4.5. Biyo-uyumlu lipit nanopartiküllerin üretimi ve kimyasal protein konjugasyonu

CRISPR-dCas12 sistemi bileşenlerinin farelere aktarımı için etanol seyreltme yöntemiyle ribonükleik asit (RNA) yüklü lipit nanopartiküller oluşturulacaktır. Amino-lipitler (KC2), yardımcı lipitler (SOPC), kolesterol (Chol) ve PEG-DMG sırasıyla 50:10:39:1 molar oranında etanol içinde çözülecektir. Lipitler NanoAssemblr Benchtop mikrokışkan makinesi (Precision NanoSystems; Vancouver, BC, Canada) kullanılarak lipit:DNA mol oranı 6:1 olacak şekilde 100 mM sodyum sitratta hazırlanan plazmit (mRNA/gRNA) ile karıştırılacaktır. 12 mL/dk akış hızında kontrollü karıştırma işlemiyle homojen nanopartiküller üretilmektedir. Solüsyon içerisindeki etanol PBS ile seyreltilip 10 kDa Amicon ultra-15 filtresi (Millipore; Burlington, MA, ABD) kullanılarak santrifüjleme yoluyla konsantre edilecektir (Finn et al.). CRISPR bileşenleri yüklenmiş lipit nanopartiküllerin beyin ve kalp dokusuna spesifik hale getirilmesi için protein konjugasyonu yapılacaktır. Angiopep-2 proteini (Hsu et al.) kullanılarak reseptör aracılı taşıma ile kan beyin bariyerinin aşılması nöronlara özgü tedavi sağlanacaktır. Protein konjugasyonunu kolaylaştırmak için Angiopep-2 peptid dizisinin (TFFYGGSRGKRNNFKTEEYC) N-terminal bölgesine sistein amino asidi eklenip sentezlenecektir. CTP-Lamp2b (Kalbi hedefleyen peptid- lizozomla ilişkili membran proteini 2b) proteini (Kim et al.) ise kalp kası hücrelerinin spesifik tedavisini sağlayacaktır. CTP protein dizisine (APWHLSSQYSRT) sistein eklenip pcDNA Flag Lamp2b-HA (Addgene, Plasmid #71292) vektöründen PCR ile çoğaltılan Lamp2b proteiniyle birleştirilecek ve modifiye edilmiş protein sentezlenecektir. Nanopartiküller ile peptitlerin kimyasal konjugasyonu kovalent bağlarla sağlanacaktır. Nanopartikül solüsyonu oda sıcaklığında 20 dakika boyunca 100 uL Aktivasyon Tamponu, 50 ug 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid, (EDC) ve 25 ug N-Hidroksisüksinimid (NHS) ile karıştırılacaktır. Ardından Nanopartikül: Angiopep-2: CTP-Lamp2b oranı 80:10:10 olacak şekilde proteinler ve 1 mL Coupling Buffer eklenip 2 saat oda sıcaklığında sürekli çalkalanarak inkübe edilecektir (Cheng et al.). Peptitlerle konjuge edilen lipit nanopartiküller 4°C'de 24 saat boyunca PBS içinde Float-A-Lyzer G2 (Spectra Por G235059) diyaliz aletiyle saflaştırılacaktır. Formülasyonların partikül boyutu, ZetaPALS DLS makinesi (Brookhaven Instruments) kullanılarak dinamik ışık saçılması ile ölçülecektir (Guo et al.). CRISPR bileşenlerini taşıyan lipit nanopartiküller tedavi grubundaki DS modeli farelere 300 ul fosfat tamponlu salin bolusu kaudal venden intravenöz olarak uygulanacaktır.

4.6. Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR)

CRISPR nanopartikülü ile tedavinin farelerin beyin ve kalplerinde SCN1A mRNA düzeylerini başarılı bir şekilde artırdığının gösterilmesi için RT-qPCR yapılacaktır. Beyin ve kalp için toplam RNA ekstresyonu, üretici firmanın talimatlarına göre TRIzol™ reaktifi (ThermoFisher Scientific)

kullanılarak yapılacaktır. cDNA sentezi, ImProm-II Ters Transkripsiyon Sistemiyle gerçekleştirilecektir. qRT-PCR **Tablo 2'de** verilen primerler ile üç kopya halinde gerçekleştirilip ortalaması alınacaktır. *SCN1A* geninin ifadesinin göreceli analizi, $\Delta\Delta Ct$ yöntemiyle yapılacaktır (Frasier et al.).

Tablo 2: *SCN1A* genine ait primerler.

<i>SCN1A</i> Primerleri	
Forward Primer	5'-ATG GCC ATG GAG CAC TAT CC-3'
Reverse Primer	5'-CTA CCA GGC TAA GCG TCA CA-3'

4.7. Western-Blot

DS fare modeline CRISPR nanopartikülleri verildikten sonra artan *SCN1A* mRNA transkriptlerinin membrana yerleşecek Nav1.1 proteinlerine dönüşeceğinin doğrulanması için membran protein ekstraksiyonu yapıp immün blotlama gerçekleştirilecektir. Farelerden alınan beyin ve kalp dokuları üretici firmanın membrana bağlı proteinleri zenginleştirme talimatlarına göre Mem-PER Plus Membran Protein Ekstraksiyon Kitini (Thermo Fisher Scientific) kullanarak homojenize edilecektir. Pierce BCA Protein Test Kiti (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak protein ekstraktları ölçülecektir. Western blot analizi Nupage %4-12 gradyan jelleri (Thermo Fisher Scientific) üzerinde anti-Nav1.1 (1:200, Alomone Labs) ve anti-Calnexin (1:5000, Alomone Labs) proteinlerine karşı birincil antikolar kullanılarak yapılacaktır. Nav1.1 protein seviyesi kalneksin sinyaline göre normalleştirilecektir. Blot yoğunlukları, Image J yazılımı kullanılarak dansitometrik olarak analiz edilecektir.

4.8. Patolojik Boyama

Beyin ve kalp dokuları histolojik inceleme için izole edilecek ve %4 formaldehit solüsyonu ile tespit edilecektir. Tespit edilen dokular, dereceli alkol serisinden geçirilerek kurutulacaktır. Ksilol ile şeffaf olan dokular parafine gömülecektir. Parafin bloklardan alınan 5-6 μm kalınlığındaki kesitlerde hematoksilin-eozin (HE) boyaması yapılacaktır. Dokulardaki histopatolojik değişiklikler ışık mikroskobu ile belirlenecektir (Akyuz et al.).

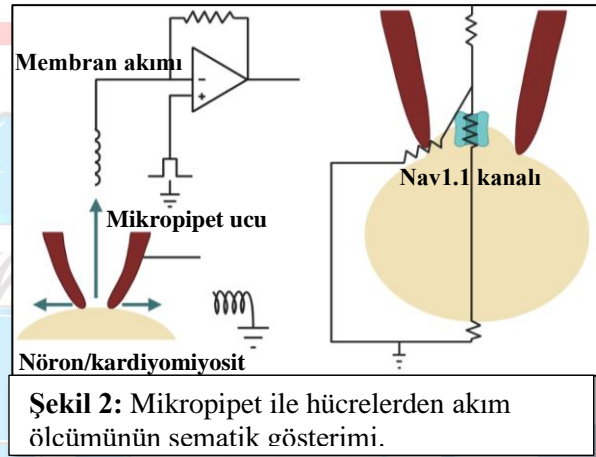
4.9. İmmünohistokimya

Farelerin beyin ve kalp dokularında *SCN1A* ifadesinin değişimi immünohistokimyasal boyama ile değerlendirilecektir. Tedavi sonrası üretilecek Nav1.1 kanallarının düzgün bir şekilde hücre membranına lokalize olduğunun doğrulanması yapılacaktır. Dokularda *SCN1A* etiketlemesi avidin-biotin-peroksidaz yöntemi ile yapılacaktır. 5-6 μm kalınlığındaki doku örneklerine *SCN1A* primer antikoları damlatılarak bir gece +4 °C'de tutulacaktır. Olympus BX51 model ışık mikroskobu altında DP71 dijital kamera ile doku kesitlerinden elde edilen görüntüler, Image-J yazılım programında ifade farklılıkları açısından incelenecektir (Doğanyığıt et al.). DS fare modelinde kontrol grubuna kıyasla *SCN1A* immünreaktivitesinin azalması beklenmektedir. Bununla birlikte, CRISPR nanopartikülleri verilen tedavi grubunda sağlıklı kanal üretiminin sağlanmasıyla *SCN1A* immünreaktivitesinin artacağı öngörülmektedir.

4.10. Patch-clamp

Geliştirilmiş CRISPR nanopartikülleriyle tedavi sonrasında üretilecek Nav1.1 kanallarının elektrofizyolojik açıdan sağlıklı bir şekilde işlev gördüğünün ortaya koyulması ve yeterli elektriksel aktivitenin sağlandığının doğrulanması için akım ölçümleri yapılacaktır (**Şekil 2**). Fareler doğum sonrası 45-54. günlerde derin izofluran anestezisinden sonra sonlandırılıp beyin ve kalp dokuları çıkarılacaktır. Elde edilen beyin ve kalpler; 234 g/mM sükröz, 28 g/mM NaHCO₃, 7 g/mM dekstroz, 7 g/mM MgCl₂, 0,5 g/mM CaCl₂, 1 g/mM sodyum askorbat, 3 g/mM sodyum pürivat ve 1,25 mM NaH₂PO₄ içeren soğuk kesme solüsyona aktarılacaktır. Canlı beyin ve kalp dokularından, %95 O₂ ve %5 CO₂ ile havalandırılan kesme solüsyonu içinde vibratom (VT1000S, Leica) ile 350 mikron kalınlığında koronal hipokampal ve kardiyak kesitler alınacaktır. Ardından beyin kesitleri 119 g/mM NaCl, 25 g/mM NaHCO₃, 7 g/mM dekstroz, 2,5 g/mM KCl, 7 g/mM MgCl₂, 0,5 g/mM CaCl₂, 1 g/mM sodyum askorbat, 3 g/mM sodyum pürivat ve 1,25 mM NaH₂PO₄ içeren, ve %95 O₂/ %5 CO₂ ile havalandırılan yapay beyin omurilik sıvısı (aCSF) içerisine konulacaktır. Kalp

kesitleri ise 25 mM NaHCO₃, 124 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.24 mM NaH₂P0₄, 1.0 mM CaCl₂, 1.0 mM MgCl₂, 10.0 mM glikoz içeren ve %95 O₂/ %5 CO₂ ile havalandırılan yıkama solüsyonunda tutulacaktır. Kalp kası hücreleri kolajenaz A ve proteinaz XXIV içeren enzimatik izolasyon yöntemleriyle ayrıştırılacaktır. Ölçümlerden önce beyin kesitleri 34 °C'de en az 30 dk ve kalp kesitleri 1 saatten fazla inkübe edilecektir. Tüm kayıtlar oda sıcaklığında (23–26°C) yapılacaktır. Hücre odasına yerleştirilen beyin ve kalp kesitlerindeki hücreler mikroskop (Zeiss LSM 780) ile görülecektir. Kayıt esnasında hücrelere temas etmek için 4-6 MΩ dirence sahip cam uçlu mikropipet (Harvard Apparatus, ABD) kullanılacaktır. Hücreyle temas eden mikropipet içerisindeki solüsyon 125 mM CsCl, 5 mM NaCl, 10 mM HEPES, 0.6 mM EGTA, 4 mM Mg-ATP, 0.3 mM Na₂GTP, 10 mM lidokain N-etil bromid (pH 7.35 and 290 mOsm) içerecektir. Patch-clamp tekniğinin tüm hücre konfigürasyonunda kayıt alımı için tutma potansiyeli +10 mV olarak belirlenecek ve hücre kırıldığında akım kaydı alınacaktır. Akım kısaç kayıtları, pCLAMP Clampfit10.6 yazılımı (Molecular Devices, San Jose, CA) ve bir MultiClamp 700B amplifikatörü (Molecular Devices, San Jose, CA) kullanılarak yapılacaktır. Kayıtlar için 125 potasyum glukonat, 6,7 KCl, 10 HEPES, 1EGTA, 4 Mg-ATP, 10 sodyum fosfokreatin (pH 7,25; 290 mOsm/L) içeren hücre içi solüsyon kullanılacaktır. Sinyaller, 10 kHz'de düşük geçişli filtreden geçirilecek ve 50–100 kHz'de örneklenecektir (Aklan et al.; Huang and Li).



4.11. Febril nöbet testi

Hayvanların nöbetlere yatkınlığı doğum sonrası 21-28. günlerde termal olarak tetiklenen nöbet aktivitesinin ölçümüyle değerlendirilecektir. Fareler hava geçirmeyecek şekilde kapatılmış pleksiglas bir kutu içinde delikli yatay bir bölmeye yerleştirilecektir. Hayvanlar en az 3 dakika boyunca 37°C'de bekletilip ardından kızılötesi ısı lambasıyla (Phisitemp, ABD) ısıtılacaktır. Vücut ısısı, jeneralize tonik-klonik bir nöbet oluşana kadar veya vücut sıcaklığı 41 °C'ye ulaşana kadar bir dakikalık aralıklarla 0,5 °C'lik adımlarla artırılacaktır. Çekirdek vücut sıcaklığı rektal sıcaklık probu (Phisitemp, ABD) kullanılarak sürekli kontrol edilip kaydedilecektir. Nöbet başladığında, fare normal vücut sıcaklığına ulaşana kadar hemen çok soğuk bir kutuya alınacaktır (Tatsukawa et al.). Nöbetler EEG, EKG ve video analizleriyle takip edilecektir. Farelerin davranışları 30 dakika boyunca izlenip Racine Skorlamasına göre (**Tablo 3**) evrelendirilecektir. Jeneralize tonik-klonik nöbetler (Racine Evre 5) başlayana kadar geçen zaman ve nöbet süresi nöbet duyarlılığının göstergesi olarak kabul edilecektir.

Tablo 3: Racine Skorlama Sistemi.

Evre 1	Ağız ve ön ayak seğirmesi
Evre 2	Baş sallama
Evre 3	Ön ayak klonusu
Evre 4	Ön ayak klonusuyla beraber şahlanma
Evre 5	Klonus ve postural kontrol kaybı

4.12. Beyin Aktivitesinin Ölçümü

Spontan nöbetlerin başlangıcı, sıklığı, süresi ve şiddeti hakkında bilgi edinilmesi sürekli video kaydı yoluyla sağlanacaktır. Beyin ve kalp aktivitesini gösteren biyopotansiyeller, elektrotlara sabitlenmiş kablosuz telemetri sistemiyle aktarılıp kaydedilecektir. %1.5 izofluran anestezisi altında farelerin skapula bölgesinin dorsokaudal kısmında cilt açılıp deri altına kablosuz bir radyofrekans vericisi

(ETA-F10, Data Science International (DSI)) yerleştirilecektir. Fareler stereotaktik çerçeveye sabitlenip EEG kayıt elektrotları iki taraflı olarak prefrontal kortekse (Bregma noktasından anteroposterior: -1 mm ve mediolateral ± 1) implante edilecektir. Kafatası derisi emilebilir dikişle, sırt kesisi doku yapıştırıcısıyla (SurgiSeal Stylus™, VM00029) kapatılacaktır. EEG sinyali kablosuz olarak iletilip Ponemah (DSI) kullanılarak sürekli kaydedilecek ve Neuroscore yazılımı ile analiz edilecektir. EEG 500 Hz frekansında örneklenecektir. Spontan nöbetlerin tespiti için, EEG izleri ilk önce 5 ile 70 Hz arasında bant geçiren filtreden geçirilecektir (Miljanovic et al.). Elektrografik nöbetler ≥ 15 s süren, arka plandan en az iki kat daha büyük amplitüdü, yüksek frekanslı, yüksek voltajlı senkronize çok dikenli dalgalar olarak kabul edilecektir.

4.13. Kalp aktivitesinin Ölçümü

Farelerde nöbetlerle ilişkili kalp aktivitesi telemetri sistemiyle kaydedilen EKG biyopotansiyelleriyle değerlendirilecektir. %1.5 izofluran anestezisi altında negatif EKG elektrodu farelerin sağ göğüs kasına intramüsküler olarak sabitlenecektir. Pozitif EKG elektrodu ise ksifoid çıkıntının soluna yerleştirilip deri emilebilir dikişle kapatılacaktır. Kayıtlar gerçekleştirilmeden önce hayvanların iyileşmeleri için 5 gün beklenecektir (Auerbach et al.). Veri toplama ve analizi Ponemah (DSI) yazılımı kullanılarak yapılacaktır. EKG verileri için 3.0 Hz yüksek geçiren filtre kullanılacaktır. EKG 500 Hz frekansında örneklenecektir. Kablosuz veri aktarımı sayesinde kardiyak aktivitedeki değişimler nöbet öncesi dönemden nöbet sonrası döneme kadar incelenebilecektir. Telemetri biyopotansiyel vericileriyle EEG ve EKG verilerinin eş zamanlı olarak ölçümü yapılacaktır. Böylece, **ileri teknolojilerin kullanımıyla** mutasyondan etkilenen beyin ve kalp dokularının işlevlerinin bir arada değerlendirilmesi sağlanacaktır.

4.14. Davranış testleri

DS modeli oluşturulan farelerde CRISPR nanopartiküllerinin kognitif ve davranışsal etkilerinin değerlendirilebilmesi adına üç farklı test yapılacaktır.

A. Açık Alan (Open Field) Testi

Açık alan testi, farelerin lokomotor aktivite ve spontan keşif davranışını değerlendirmek için kullanılacaktır. Fareler, 150 cm çapında, plastik beyaz zeminle kaplı ve üç bölgeden oluşan (iç bölge, ara geçiş bölgesi ve duvar bölgesi) yuvarlak bir alana serbest bir şekilde bırakılacaktır. 30 dk boyunca spontan aktiviteleri, elektronik görüntüleme sistemiyle (Ethovision XT6; Noldus Bilgi Teknolojisi, Wageningen, Hollanda) kaydedilecektir (Kilic et al.). Her üç bölgede alınan yol ve harcanan zaman yüzdesi parametrelerine göre değerlendirme yapılacaktır.

B. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi (Elevated Plus Maze Test)

Hayvanlardaki kaygı düzeyini değerlendirmek için yükseltilmiş artı labirent testi kullanılacaktır. Test, zeminden 80 cm yükseklikte iki açık ve iki kapalı kolu olan artı şeklinde bir deney düzeneğinde uygulanacaktır. Fareler açık kollardan birine serbest bir şekilde bırakılıp 10 dk boyunca görüntüleme sistemiyle (Ethovision XT6) izlenecektir (Elibol-Can et al.). Açık ve kapalı alanlarda geçirilen süreye göre karşılaştırma yapılacaktır.

C. 3 Odalı Sosyal Davranış Testi (Three-Chambered Social Behavior Test)

Farelerin sosyallik ve sosyal yenilik tercihini ölçmek için 3 odalı test kullanılacaktır. Test, üç odalı, şeffaf, üstü açık ve kapılarla odalar arası geçiş sağlanabilen bir deney düzeneğinde gerçekleştirilecektir. İlk aşamada deney faresi her iki yan bölmenin boş olduğu durumda orta bölmeye bırakılarak 10 dk hareketleri görüntüleme sistemiyle kaydedilecektir (Ethovision XT6). İkinci aşamada, yan bölmelerden birine ters çevrilmiş tel kap içerisinde bir fare yerleştirilerek deney hayvanının bilinmeyen bir özneye karşı sosyalliği değerlendirilmesi için 10 dk serbest bırakılacaktır. Son aşamada ise boş kalan yan bölmeye de yeni bir fare yerleştirilip orta bölmeye bırakılan deney faresinin sosyal yenilik tercihlerini değerlendirmek için 10 dk'lık bir keşif süresi daha verilecektir. Deney hayvanlarının her aşamada aldığı mesafe, odalara giriş sayısı, her bölmede geçirilen süre ve kafeslerin koklanma süresini içeren parametrelere göre gruplar arasında karşılaştırma yapılacaktır (Lo, Scarce-Levie and Sheng).

4.15. İstatistiksel analiz

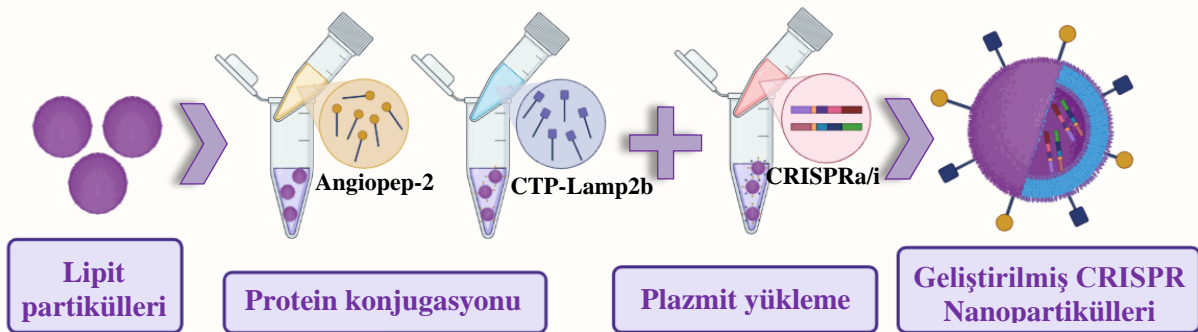
Verilerin istatistiksel analizi için SPSS programı kullanılacaktır. Elde edilen sonuçlar, ortalama

standart hata payı olarak gösterilecektir. Gruplar arası karşılaştırma tek yönlü ANOVA testi ile yapılacak ve ikili karşılaştırmalar için post-hoc Tukey testi kullanılacaktır. Analizler sonucunda $p < 0.05$ değerine sahip parametreler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilecektir.

5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü

SCN1A mutasyonlarının tedavisi için spesifik olarak sağlıklı/mutant aleli hedefleyebilen sgRNA'lar tasarlanarak **yenilikçi bir yaklaşım** sunulacaktır (*Şekil 3*). Nav1.1 ifadesinin etkili bir şekilde artırılabilmesi için **ilk kez** aynı gen üzerinde CRISPRa/CRISPRi eş zamanlı uygulaması gerçekleştirilecektir. Bununla birlikte, mevcut CRISPR kasetlerinin **inovatif modifikasyonu** p300/LDS1 molekülleri eklenecek ve SCN1A ifadesinin hem transkripsiyonel hem de epigenetik kontrolü sağlanacaktır. Spesifik enhancerler (mDlx 5/6 ve myh6) aracılığıyla CRISPR bileşenleri yalnızca inhibitör ara nöronlar ve kalp kası hücrelerinde üretilerek DS'nin hedefe yönelik tedavisine **yeni bir bakış açısı** getirilecektir. Ayrıca, CRISPR sisteminin *in vivo* etkilerinin incelenebilmesi için **yeni teknoloji ürünü olan** nanopartiküller kullanılacaktır. **Beyin ve kalp dokusuna özgü** proteinlerle (Angiopep-2 ve CTP-Lamp2b) konjuge edilecek nanopartiküller yan etkilerin azaltılmasına ve düşük dozda başarılı tedaviye olanak tanıyabilir.

Geliştirilmiş CRISPR nanopartiküllerinin, DS tedavisini hedefleyen mevcut çalışmaların sınırlılıklarının üstesinden geleceği öngörülmektedir. DS'li farelerde CRISPR-dCas9 moleküllerinin virüslerle yalnızca hücrelerin yarısına aktarıldığı ve tedavi sonrasında Nav1.1'in sadece %30'unun membrana ulaşabildiği gözlemlenmiştir (Colasante et al.). Benzer bir çalışmada, mutant SCN1A birikiminin Nav1.1 üretimini engelleyebileceği bildirilmiştir (Yamagata et al.). Projede, CRISPRi içeren nanopartiküllerle mutant alel baskılanarak protein üretimi üzerindeki negatif etki önlenip **yüksek verimlilik** sağlanacaktır. Nanopartiküllerin yüzey modifikasyonu viral vektörlerin düşük transfeksiyon verimliliği ve küçük taşıma boyutu gibi problemler önlenecektir. DS modeli farelerde, STK-001 uygulaması ise SCN1A'nın işlev kaybı mutasyonlarının tedavisinde olumlu etkiler sergilemiştir. Ancak, kısıtlı mutasyonları hedeflemesi, intraserebroventriküler enjeksiyon yapılması, işlev kazancı mutasyonlarını kötüleştirilmesi gibi faktörler klinik çalışmaların ilerlemesini engellemektedir (Wengert et al.). Bu bağlamda, CRISPR nanopartiküllerinin tüm mutasyonları hedefleyebilmesi ve sistemik olarak uygulanması klinik uygulama açısından **yenilikçi avantajlar** sağlamaktadır. Ayrıca, SUDEP vakalarından elde edilen pluripotent kök hücre kaynaklı kalp kası hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla artmış sodyum akımı ve spontan kasılmalar gözlemlenmiştir (Frasier et al.). Bu durum mutant Nav1.1 kanallarının kalpte de fenotipik etkisinin olduğuna ve artmış SUDEP riskine işaret etmektedir. DS tedavisi için yoğun bir şekilde gen terapi çalışmaları gerçekleştirilmesine rağmen kalpteki mutant kanalların da iyileştirilmesini hedefleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Bu projeye DS vakalarının kalp dokusundaki Nav1.1 kanalının mutasyonu **ilk kez hedeflenerek** SUDEP açısından **inovatif bir koruma yaklaşımı** sunulacaktır.



Şekil 3: İleri teknoloji ürünü CRISPR nanopartiküllerin tasarımı. Nöron spesifik Angiopep-2 proteinleri ile kalp kası hücrelerine özgü CTP-Lamp2b proteinleri kovalent bağlarla lipit

nanopartiküllere konjuge edilecektir. Bununla birlikte CRISPRa/i yüklemesi yapılacaktır. Böylece, inhibitör ara nöronlarda ve kalp kası hücrelerinde Nav1.1 protein ifadesini artırabilecek modifiye edilmiş CRISPR nanopartiküllerinin üretimi sağlanacaktır.

6. Uygulanabilirlik

Proje temel olarak “CRISPR nanopartikülleri ile SCN1A geninin mutant alelinin baskılanıp sağlıklı alelinin aktive edilmesi, Nav1.1 kanalının üretilmesiyle DS fenotipini iyileştirip SUDEP riskini azaltabilir” **hipotezi** üzerine kurulmuştur. Hipotezin doğrulanması ve CRISPR aracılı gen tedavisinin insan yaşamına entegre edilebilmesi için öncelikle deneysel hücre ve hayvan modellerinde çalışılması gerekmektedir. Bu kapsamda, genetik düzenlemeyle oluşturulacak SCN1A^{+/-} DS modeli, insandakine benzer patolojik/davranışsal değişiklikler gösteren ve moleküler tedavi denemeleri için yaygın olarak kullanılan **ideal bir yaklaşım** olarak kabul edilmektedir. DS modelinin oluşturulması, febril nöbet testinin uygulanması, EEG/EKG ölçümü ve davranış testlerinin gerçekleştirilmesi için Erciyes Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi (DEKAM) veya Medipol Rejeneratif ve Restoratif Tıp Araştırma Merkezi (REMER) ile iletişime geçilebileceği düşünülmektedir. Her iki merkezde de hayvan deneylerinin gerçekleştirilmesi için **gerekli cihaz/teçhizat mevcut** olup aktif olarak çalışmalar yürütülmektedir. Bununla birlikte, Türkiye’de nanopartiküllerin üretimiyle hedefe yönelik ilaç uygulaması yapan laboratuvarlar bulunmaktadır. Erciyes Üniversitesi Nanoteknoloji Araştırma Merkezi’nin (ERNAM) nanobilim ve nanoteknoloji alanlarında yürütülen çalışmalar için **uygun bir altyapıya** sahip olduğu bilinmektedir. Bu merkezde nanopartiküllerle ilaç salınımı üzerine yoğun olarak çalışılmaktadır. Bu doğrultuda, lipit nanopartiküllerin üretiminin sağlanması için yetkili hocalardan danışmalık desteği/hizmet alımı talep edilebilir. Ek olarak, yeni geliştirilen CRISPR-dCas12 plazmitlerinin oluşturulması ve patch-clamp yöntemiyle elektrofizyolojik ölçümlerin yapılması sürecinde hem teknik hem de donanımsal destek için REMER’deki araştırmacı hocalarla bağlantı sağlanabileceği öngörülmektedir. Patolojik değerlendirme, immünohistokimyasal boyama, RT-qPCR ve Western-Blot çalışmaları Yozgat Bozok Üniversitesi’nde Doç. Dr. Züleyha Doğanıyğit (Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı) öncülüğünde takım lideri Betül Köklü tarafından gerçekleştirilebilir. Bu bağlamda, ulusal düzeydeki laboratuvarların cihaz ve teçhizat açısından projenin gerçekleştirilmesi için **yeterli donanıma sahip** olduğu görülmektedir. Proje hipotezi kategorisinde yer alan bu çalışmanın desteklenmesi durumunda önerilen kurumların yardımıyla **uygulanabileceği** öngörülmektedir. Ek olarak, araştırmacı öğrencinin 2247 - C Stajyer Araştırmacı Burs Programı (STAR) kapsamında REMER’de Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi (LC-MS) ile proteomik, Western-Blot, gerçek zamanlı zincir reaksiyonu, hücresel çalışmalar, genetik düzenleme gibi çok çeşitli moleküler teknikler ve deneysel hayvan modelleri üzerine teorik ve pratik gelişim sağlamıştır. Edindiği laboratuvar kültürünün projenin gerçekleştirilmesi esnasında önemi olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, öğrenci 2020 yılında “*Genetik Hastalıklarda Yeni Bir Tedavi: Yenilenmiş Taşıyıcı RNA*” adlı projeye TÜBİTAK 2242 kapsamında Ankara Bölge Birinciliği, Türkiye Üçüncülüğü ödülünü almıştır. 2021 yılında ise “*Epilepside Ani Beklenmedik Ölüm (SUDEP)’in Önlenmesine Yeni Bir Yaklaşım: Serotonin Seviyesinin Nanopartikül Aracılı Kontrolü*” adlı projeye TEKNOFEST Biyoteknoloji ve İnovasyon Yarışması Fikir Kategorisi Dördüncüsü seçilmiştir. Ayrıca, epilepsi ve SUDEP üzerinde yürütücülüğünü yaptığı 2209-A projeleri ve derleme/orijinal araştırma makaleleri bulunmaktadır. Bu kapsamda, araştırmacı öğrencinin kişisel donanımının **proje hipotezinin belirlenmesi ve uygulanması** açısından kritik önemi olduğu ileri sürülebilir.

Proje hipotezi, ön değerlendirme aşamasında teknolojik hazırlık seviyesi (TSH) 1’de olup genel bir taslak olarak sunulmuştur. Detay raporu aşamasına kadar geçen dönemde, hipotezin deneysel olarak

doğrulanması için gerekli tüm metodolojiler belirlenip teorik ve bilimsel prensipleri **yöntem** kısmında sunulmuştur. Tedaviden yüksek verim elde edilebilmesi için kullanılacak AsCRISPR gibi **biyoinformatik analiz sistemleri** belirlenmiştir. Projede ihtiyaç duyulan temel malzeme, cihaz ve hizmet alımları tespit edilip temin edilebilecek kurumların analizi ve bütçe/zaman planlaması yapılmıştır. Fikir kategorisinde yer alan projenin laboratuvar çalışmaları henüz başlamamış olup TSH 2 seviyesinde bulunmaktadır. Bununla birlikte, hayvan deneylerin başarıyla tamamlanmasını takiben **klirik Faz çalışmalarının** gerçekleştirilmesi için öğrencinin devam ettiği Tıp Fakültesinde takipli DS hastalarıyla iletişime geçilebilir. Proje kapsamında geliştirilmesi hedeflenen CRISPR nanopartikülleri DS vakaları için umut ışığı olup desteklenmesi durumunda seri üretime geçebilir. Yoğun araştırmalar sonucunda TSH 9 seviyesine erişerek **uluslararası pazara sunulma potansiyeli** taşıyabilir. Güncel yaklaşımlar değerlendirildiğinde, Spinal Musküler Atrofi (SMA) hastalarının etkin tedavisinin gen terapi yöntemleriyle sağlandığı ve ülke ekonomisi açısından ciddi maddi yükü temsil ettiği bilinmektedir. Benzer şekilde, güncel klinik bir çalışmada kalp ve sinirlerde yanlış katlanmış protein birikiminin görüldüğü transtiretin amiloidozu vakalarında CRISPR aracılı gen düzenleme tedavisiyle (NTLA-2001) iyileşme sağlandığı bildirilmiştir (Gillmore et al.). Bu kapsamda, DS tedavisinde CRISPR nanopartiküllerinin klinik uygulamasının mümkün olduğu ve ülkenin bilimsel/ekonomik gelişimine kritik katkı sağlayacağı ileri sürülmektedir.

CRISPR düzenlemesiyle DS nöbetlerinin, eşlik eden bilişsel/davranışsal komorbiditelerin ve SUDEP'in önlenmesinin gösterilmesi durumunda;

- CRISPR partiküllerinin insanlar üzerindeki tedavi potansiyeli, yan etki profili, ideal doz ve kullanım süresinin belirlenmesi adına **klirik çalışmalar** yürütülebilir.
- SCN1A mutasyonunun görüldüğü Lennox–Gastaut syndrome, West Sendromu, Rett Sendromu ve Doose Sendromu gibi epileptik ensefalopatiler için **kapsamlı bir tedavi yaklaşımı** geliştirilebilir.
- İnsanlarda kullanılmak üzere **CRISPR bazlı yeni ticari ilaçların üretimi** yapılabilir.
- SCN1A mutasyonlarıyla ilişkili yüksek SUDEP riski ve ani bebek ölümü riskine karşı **genetik temelli koruma yaklaşımı** sunulabilir.
- DS gibi heterozigot dominant kalıtım paterni gösteren Huntington Hastalığı, Retinitis Pigmentoza ve korneal distrofi gibi çeşitli hastalıklar için **sistemik olarak** alel spesifik gen terapi uygulamaları başlatılabilir.
- Geliştirilen CRISPR nanopartiküllerinin insan vücudundaki farmakokinetik ve farmakodinamiği üzerinde çalışmalar yapılarak **ileri teknoloji metotların klinik tıbbi entegrasyonu** sağlanabilir.

Böylece genetik tedavi üretmeye yönelik AR-GE faaliyetlerine katkı yapılarak ulusal düzeyde ekonomik kalkınma sağlanabilir. Tıp ve teknolojiyi birleştiren yeni araştırma alanları oluşturulabilir. Epileptik nöbetlerle seyreden zihinsel bozuklukların ve SUDEP 'in önlenmesine ve genetik hastalıkların tedavisine yönelik çalışmalara öncülük edebilecek genç araştırmacı bir nesil yetiştirilebilir.

7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması

Hedeflenen projenin uygulanması için gerekli iş paketleri kapsamında yaklaşık olarak 100.000₺ genel bir bütçeye ihtiyaç olduğu öngörülmektedir. Bu kapsamda hazırlanan 70.220 ₺ maliyetindeki temel malzeme listesi **Tablo 4'**de gösterilmiştir. Malzeme ve cihazların projede gerekli olduğu dönemler **"kullanım gerekçesi"** başlığı altında ele alınmıştır. 30.000 ₺ bütçenin ise deneysel çalışmaların yürütülmesinde rol alacak araştırmacılara, görevli personele, çalışmanın

gerçekleştirileceği kuruma, ulaşım masraflarına, ön verilerin sunulacağı kongrelere ödenecek ücretler için gerekebileceği düşünülmektedir. Ancak, projenin hipotez aşamasında olması, tahmin edilemeyen ek masraflara yol açabilir. Bununla birlikte, deneysel işlemler için gerekli teçhizat ve cihazların çalışmanın yapılacağı kurum tarafından sağlanması projenin maliyetinin azalmasını sağlayabilir. Bu kapsamda, çalışmaların deney tasarımında kullanılacak ekipmanların bulunduğu merkezlerde yürütülmesi hedeflenmektedir. Ek olarak, deneysel aşamalarda hizmet alımı yerine öğrencinin aktif olarak metodu öğrenebileceği ve uygulayabileceği desteklerin sağlanması amaçlanmaktadır. Böylece hem maliyetin azaltılacağı hem de öğrencinin araştırma becerilerini geliştirebileceği düşünülmektedir.

Tablo 4: Projenin temel malzemelerin kullanılacağı dönemi ve fiyatını gösteren liste.

Adı (marka, sayı, özellik vb. bilgiler)	Kullanım gerekçesi	Tahmini Bedeli (₺)
C57BL/6J suşu (30 adet) (000664, Jackson Laboratory, ABD) ve 129S6/SvEvTac faresi (15 adet) (Taconic Biosciences, ABD)	Hayvanlar genetik modifikasyonla DS modeli (SCN1A ^{+/-}) oluşturulması için kullanılacaktır.	13.500
Fare genotipleme kiti (Azura™, AZ-1851)	F1 dölünün genotiplerinin belirlenip DS modeli/sağlıklı fare ayırımı için kullanılacaktır.	1420
LV-U6-EF1 α -GFP ve LV-U6-EF1 α -mCherry (Addgene)	sgWT ve sgMUT klonlaması için kullanılacaktır.	2200
pcDNA-dCas9-p300-Core, dCas12-VPR, p-dCas9-LSD1 ve dCas12-KRAB (Addgene)	CRISPRa ve CRISPRi plazmitlerinin oluşturulması için kullanılacaktır.	3300
Golden Gate klonlama kiti (NEBbridge®, BsmBI-v2 #E1602S)	Enhancer, sgRNA ve CRISPR kasetlerinin birleştirilmesi için gerekmektedir.	2100
NanoAssemblr Benchtop mikroakışkan makinesi (Precision NanoSystems; Vancouver, BC, Canada)	Lipitler ve plazmitlerin belli bir hızda karıştırılarak CRISPRa/i-dCas12 bileşenlerini taşıyan nanopartiküllerin oluşturulması için ihtiyaç duyulmaktadır.	5000
10 kDa Amicon® Ultra-15 Santrifüj Filtresi (Millipore)	Nanopartiküllerin solüsyon içerisinde konsantrasyonunu bir şekilde elde edilmesi için kullanılacaktır.	1500
pcDNA Flag Lamp2b-HA (Plasmid #71292)	Kalp kası hücrelerine spesifik peptidin üretilmesi için gerekmektedir.	1100
Spectra-Por® Float-A-Lyzer® G2 Diyaliz aleti	Antikorlarla kaplanmış lipit nanopartiküllerin diyalizle elde edilmesinde kullanılacaktır.	2600
ZetaPALS DLS makinesi (Brookhaven Instruments)	Lipit nanopartiküllerin boyut gibi fiziksel özelliklerinin belirlenmesi için gerekmektedir.	6800
TRIzol™ reaktifi (ThermoFisher) ve ImProm-II Ters Transkripsiyon Kiti (Promega, PR-A3802)	Farelerin beyin ve kalp dokularında yapılacak RT-qPCR'nin sırasıyla RNA ekstraksiyonu ve cDNA sentezi aşamalarında kullanılacaktır.	6700
Mem-PER™ Plus Membrane Protein Ekstraksiyon Kit (Thermo Scientific™, 89842)	Beyin ve kalp dokularındaki hücrelerin membran proteinlerinin eldesi için kullanılacaktır.	5600
Invitrogen™ NuPAGE™ 4 to 12%, Midi Protein Gels	Western-Blot analizi için proteinlerin yürütülmesi aşamasında ihtiyaç duyulmaktadır.	3600
Anti-SCN1A (Nav1.1) Antibody (Alomone Labs,	Membrana lokalize, sağlıklı Nav1.1 düzeyinin Western-Blot ile ölçülmesini sağlayacaktır.	5600

#AGP-043) ve anti-Calnexin (Alomone Labs, #ACS-009)		
Cam uçlu patch-clamp pipeti (Harvard Apparatus, ABD)	Beyin ve kalbe ait hücrelerden elektrofizyolojik ölçümlerin yapılmasında kullanılacaktır.	5500
RET-3 rektal fare probu ve HL-1 kızılötesi ısı lambası (Phisitemp, ABD)	Febril nöbet testinde farelerin vücut sıcaklıklarının ölçülmesi ve ısıtma işleminin gerçekleştirilmesine olanak tanıyacaktır.	3200
(ETA-F10, Data Science International (DSI))	EEG ve EKG biyopotansiyellerinin uzun süreli ve kablosuz olarak iletilmesinde kullanılacaktır.	
Doku yapıştırıcısı (SurgiSeal Stylus™) ve Cerrahi PGLA (Emilebilir) İplik	EEG ve EKG elektrotları yerleştirilmesi için kesilen dokuların kapatılması/birleştirilmesinde kullanılacaktır.	500
Toplam	70.220 ₺	

Deneyel aşamaların gerçekleştirilmesinden elde edilen verilerin yayınlanmasına kadar olan sürecin zamansal dağılımı **Tablo 5**'de verilmiştir. Hayvanlar temin edildikten sonra yaklaşık 470 gün içerisinde çalışmanın verilerinin elde edileceği ve Q1 çeyreğinde yer alan yüksek etki değerine sahip bir dergi için yayın hazırlanacağı öngörülmektedir.

Tablo 5: İş-zaman çizelgesi.



Projenin iş paketlerinin tahmini sürelerine göre dağılımı belirtilmiştir.

8. Proje Fikrinin Hedef Kitle (Kullanıcılar)

Projenin, **ana hedef kitlesini** bebeklik döneminde itibaren nöbetleri ve ciddi bilişsel problemleri olan **DS vakaları** oluşturmaktadır. CRISPR partiküllerinin alel spesifik tedavi mekanizması sayesinde değişen şiddette fenotipik etkiye yol açan **farklı DS mutasyonu spektrumunun tümü için** terapötik potansiyel taşıyacağı öngörülmektedir. DS vakalarında görülen ilaca dirençli kontrolsüz nöbetlerin beyin sapındaki solunum ve dolaşım merkezlerini etkileyerek SUDEP'e yatkınlık oluşturduğu bilinmektedir. Bu kapsamda, SCN1A ilişkili **yüksek SUDEP riski taşıyan hastalar** için ölüm insidansının azaltılmasını sağlayacak temel yaklaşım haline dönüşebilir. Bununla birlikte, CRISPR aracılı düzenleme farklı SCN1A mutasyonlarıyla ilişkili Lennox–Gastaut syndrome, Rett Sendromu, West Sendromu ve Doose Sendromu gibi **geniş spektrumdaki çocukluk çağı epilepsilerinin** tedavisini sağlayabilir. Otizm spektrum bozukluğu ve hemiplejik migrenin dahil olduğu epileptik olmayan SCN1A mutasyonları için de terapötik pencere sunabilir. Ek olarak, Huntington Hastalığı, kalıtsal görme problemleri ve ailesel eritrosit membran defektleri gibi **otozomal dominant kalıtım şekli gösteren hastalıklara** uygun alele özgü CRISPR kasetleri

tasarlanarak sistematik bir bakış açısı geliştirilebilir. Ayrıca, projede CRISPR sistemi, lipit nanopartiküller, telemetri sistemi, protein konjugasyonu ile hücreye özgü hedefleme stratejisi gibi ileri seviye biyoteknolojik inovasyonların kullanımı önerilmektedir. Bu kapsamda, yeni teknolojilerin bilimsel çalışmalara entegre edilmesi noktasında yol gösterici olması bakımından **araştırmacı kitlesini** de hedefleyebilir.

9. Riskler

Projeyi olumsuz yönde etkileyebilecek risk unsurları ve ortaya çıkabilecek problemler **Tablo 6**'te açıklanmıştır. Bu unsurlara yönelik önerilen tedbirler/çözüm önerileri (B planı), risklerin etkisi, gerçekleşme olasılığı ve risk skoru başlıklar altında tek tek değerlendirilmiştir.

Tablo 6: Risk faktörleri ve yönetimi.

İP No	En önemli risk unsurları/problemler	Risk yönetimi (B planı)	Etki (5)	Olasılık (5)	Risk skoru (25)
1	Alel spesifik düzenlemeyi sağlayacak sgWT ve sgMut diziler düşük verimlilik veya hedef dışı etkiler gösterebilir.	Sağlıklı ve mutant alelin ayırımının yapılması proje hipotezinin doğrulanması için temel bir adımdır. En ideal sgRNA'ların tespiti için AsCRISPR kullanılarak biyoinformatik analizler yapılacaktır.	4	1	4 (Düşük)
2	Lipit nanopartiküllerin Angiopep-2 ve CTP-Lamp2b proteinleriyle konjugasyon verimi düşük olabilir.	Nanopartiküllerin terapötik etki göstermesi için hedeflenen hücrelere ulaşması kritik önem taşımaktadır. Yüksek verimin sağlanması için nanopartikül/Angiopep-2 / CTP-Lamp2b oranı (80:10:10 yerine 60:20:20 veya 40:30:30) değiştirilerek ön çalışmalar yapılacaktır. İdeal oran belirlenip konjugasyon işlemi gerçekleştirilecektir.	3	2	6 (Düşük)
3	Boyamada kullanılacak anti-SCN1A antikorunun istenilen afinitede çalışmaması risk oluşturabilir.	Antikorların istenildiği gibi çalıştığı gösterilmesi için optimizasyonlar yapılacaktır. Antikorda sorun çıkması durumunda farklı markalardaki antikorların kullanımı sağlanacaktır.	1	2	2 (Düşük)
4	CRISPRa ve CRISPRi plazmitlerinin hücrede eş zamanlı olarak aktivasyon göstermemesi hipotez açısından risk oluşturabilir.	CRISPRa/i sisteminin yeterli yapısal ve davranışsal/bilişsel iyileşmeyi sağlamadığı durumda yalnızca CRISPRa aktivasyonu uygulanacaktır. CRISPR kasetinde yer alan transkripsiyonu artıracak	3	1	3 (Düşük)

proteinlerin aktivasyon gücü, hücre spesifikliği, dCas12 alt tipi, lipit nanopartiküllerin hedefe yönelik yapısı ve kalp tedavisinin de yapılacağı değerlendirildiğinde proje özgünlüğünü koruyacaktır.

Ek olarak, projenin gerçekleştirilmesi aşamasında projede belirtilen kurumların desteğinin sağlanamaması durumunda alternatif merkezlerle iletişim kurulması veya uluslararası işbirlikleri hedeflenebilir.

10. Kaynaklar

- Akkan, Iltan, et al. "Nts Catecholamine Neurons Mediate Hypoglycemic Hunger Via Medial Hypothalamic Feeding Pathways." *Cell metabolism* 31.2 (2020): 313-26.e5. Print.
- Akyuz, Enes, et al. "Immunoreactivity of Muscarinic Acetylcholine M2 and Serotonin 5-Ht2b Receptors, Norepinephrine Transporter and Kir Channels in a Model of Epilepsy." *Life (Basel, Switzerland)* 11.4 (2021): 276. Print.
- Auerbach, David S., et al. "Altered Cardiac Electrophysiology and Sudep in a Model of Dravet Syndrome." *PloS one* 8.10 (2013): e77843-e43. Print.
- Catterall, William A. "Dravet Syndrome: A Sodium Channel Interneuronopathy." *Current opinion in physiology* 2 (2018): 42-50. Print.
- Cheng, Xinwei, et al. "T7 Peptide-Conjugated Lipid Nanoparticles for Dual Modulation of Bcl-2 and Akt-1 in Lung and Cervical Carcinomas." *Molecular Pharmaceutics* 15.10 (2018): 4722-32. Print.
- Colasante, Gaia, et al. "Dcas9-Based Scn1a Gene Activation Restores Inhibitory Interneuron Excitability and Attenuates Seizures in Dravet Syndrome Mice." *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 28.1 (2020): 235-53. Print.
- Dimidschstein, Jordane, et al. "A Viral Strategy for Targeting and Manipulating Interneurons across Vertebrate Species." *Nature neuroscience* 19.12 (2016): 1743-49. Print.
- Doğanyığıt, Züleyha, et al. "Investigation of Protective Effects of Apilarnil against Lipopolysaccharide Induced Liver Injury in Rats Via Tlr 4/ Hmgb-1/ Nf-Kb Pathway." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 125 (2020): 109967. Print.
- Dravet, Charlotte. "The Core Dravet Syndrome Phenotype." *52.s2* (2011): 3-9. Print.
- Elibol-Can, B., et al. "Examination of Age-Dependent Effects of Fetal Ethanol Exposure on Behavior, Hippocampal Cell Counts, and Doublecortin Immunoreactivity in Rats." *Dev Neurobiol* 74.5 (2014): 498-513. Print.
- Finn, Jonathan D., et al. "A Single Administration of Crispr/Cas9 Lipid Nanoparticles Achieves Robust and Persistent *In Vivo* Genome Editing." *Cell Reports* 22.9 (2018): 2227-35. Print.
- Frasier, C. R., et al. "Channelopathy as a Sudep Biomarker in Dravet Syndrome Patient-Derived Cardiac Myocytes." *Stem Cell Reports* 11.3 (2018): 626-34. Print.
- Gillmore, J. D., et al. "Crispr-Cas9 *In Vivo* Gene Editing for Transthyretin Amyloidosis." *N Engl J Med* 385.6 (2021): 493-502. Print.
- Guo, P., et al. "Therapeutic Genome Editing of Triple-Negative Breast Tumors Using a Noncationic and Deformable Nanolipogel." *Proc Natl Acad Sci U S A* 116.37 (2019): 18295-303. Print.
- Hsu, Sanford P. C., et al. "Glioma-Sensitive Delivery of Angiopep-2 Conjugated Iron Gold Alloy Nanoparticles Ensuring Simultaneous Tumor Imaging and Hyperthermia Mediated Cancer Theranostics." *Applied Materials Today* 18 (2020): 100510. Print.
- Huang, D., and J. Li. "The Feasibility and Limitation of Patch-Clamp Recordings from Neonatal Rat Cardiac Ventricular Slices." *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 47.4 (2011): 269-72. Print.
- Kazi, Tawsif Ahmed, and Swadesh Ranjan Biswas. "Chapter Four - Crispr/Dcas System as the Modulator of Gene Expression." *Progress in Molecular Biology and Translational Science*.

- Ed. Ghosh, Dipanjan. Vol. 178: Academic Press, 2021. 99-122. Print.
- Kempton, Hannah R., et al. "Multiple Input Sensing and Signal Integration Using a Split Cas12a System." *Molecular Cell* 78.1 (2020): 184-91.e3. Print.
- Kilic, Ertugrul, et al. "Hmg-Coa Reductase Inhibition Promotes Neurological Recovery, Peri-Lesional Tissue Remodeling, and Contralesional Pyramidal Tract Plasticity after Focal Cerebral Ischemia." *Frontiers in cellular neuroscience* 8 (2014): 422-22. Print.
- Kim, Hyoeun, et al. "Improved Cardiac-Specific Delivery of Rage Sirna within Small Extracellular Vesicles Engineered to Express Intense Cardiac Targeting Peptide Attenuates Myocarditis." *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 24 (2021): 1024-32. Print.
- Li, Kailong, et al. "Interrogation of Enhancer Function by Enhancer-Targeting Crispr Epigenetic Editing." *Nature communications* 11.1 (2020): 485-85. Print.
- Lo, Shih-Ching, Kimberly Scarce-Levie, and Morgan Sheng. "Characterization of Social Behaviors in Caspase-3 Deficient Mice." *Scientific Reports* 6.1 (2016): 18335. Print.
- Manghwar, Hakim, et al. "Crispr/Cas System: Recent Advances and Future Prospects for Genome Editing." *Trends in Plant Science* 24.12 (2019): 1102-25. Print.
- Marini, Carla, et al. "The Genetics of Dravet Syndrome." 52.s2 (2011): 24-29. Print.
- Miljanovic, Nina, et al. "Proteomic Signature of the Dravet Syndrome in the Genetic *Scn1a*-A1783v Mouse Model." (2021): 2021.04.27.441099. Print.
- Miller, A. R., et al. "Mapping Genetic Modifiers of Survival in a Mouse Model of Dravet Syndrome." 13.2 (2014): 163-72. Print.
- Mistry, Akshikumar M., et al. "Strain- and Age-Dependent Hippocampal Neuron Sodium Currents Correlate with Epilepsy Severity in Dravet Syndrome Mice." *Neurobiology of disease* 65 (2014): 1-11. Print.
- Scheffer, Ingrid E., and Rima Nabbout. "Scn1a-Related Phenotypes: Epilepsy and Beyond." 60.S3 (2019): S17-S24. Print.
- Shmueli, Sharon, et al. "Mortality in Dravet Syndrome: A Review." *Epilepsy & Behavior* 64 (2016): 69-74. Print.
- Strohkendl, Isabel, et al. "Kinetic Basis for DNA Target Specificity of Crispr-Cas12a." *Molecular cell* 71.5 (2018): 816-24.e3. Print.
- Tatsukawa, Tetsuya, et al. "Impairments in Social Novelty Recognition and Spatial Memory in Mice with Conditional Deletion of *Scn1a* in Parvalbumin-Expressing Cells." *Neurobiology of Disease* 112 (2018): 24-34. Print.
- Tsai, Su-Yi, et al. "A Human Embryonic Stem Cell Reporter Line for Monitoring Chemical-Induced Cardiotoxicity." *Cardiovascular research* 116.3 (2020): 658-70. Print.
- Wengert, E. R., et al. "Targeted Augmentation of Nuclear Gene Output (Tango) of *Scn1a* Rescues Parvalbumin Interneuron Excitability and Reduces Seizures in a Mouse Model of Dravet Syndrome." *Brain Res* 1775 (2022): 147743. Print.
- Xu, Xiaojie, et al. "Delivery of Crispr/Cas9 for Therapeutic Genome Editing." 21.7 (2019): e3107. Print.
- Xu, Xiaoshu, and Lei S. Qi. "A Crispr-Dcas Toolbox for Genetic Engineering and Synthetic Biology." *Journal of Molecular Biology* 431.1 (2019): 34-47. Print.
- Yamagata, Tetsushi, et al. "Crispr/Dcas9-Based *Scn1a* Gene Activation in Inhibitory Neurons Ameliorates Epileptic and Behavioral Phenotypes of Dravet Syndrome Model Mice." *Neurobiology of Disease* 141 (2020): 104954. Print.
- Zhao, G., J. Li, and Y. Tang. "Ascrispr: A Web Server for Allele-Specific Single Guide Rna Design in Precision Medicine." *Crispr j* 3.6 (2020): 512-22. Print.