



T.C.
ÜSKÜDAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**CRISPR-PE SİSTEMİNİN SPİNAL MUSKÜLER ATROFİ
HASTALIĞININ TİPLERİNE GÖRE *IN VİTRO* VE *EX VİVO*
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Gamze YELGEN

Tez Danışmanı
Dr.Öğr.Üyesi Cihan TAŞTAN

İSTANBUL-2024

T.C.
ÜSKÜDAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**CRISPR-PE SİSTEMİNİN SPİNAL MUSKÜLER ATROFİ
HASTALIĞININ TİPLERİNE GÖRE *IN VİTRO* VE *EX VİVO*
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

GAMZE YELGEN

Tez Danışmanı
Dr.Öğr.Üyesi Cihan TAŞTAN

İSTANBUL-2024

ÖZET

CRISPR-PE Sisteminin Spinal Musküler Atrofi Hastalığının Tiplerine Göre In Vitro ve Ex Vivo Etkinliğinin Araştırılması

SMA hastalığı nöron kaybı ve kas atrofisi ile seyreden nöromusküler bir hastalıktır. SMA hastalığında sorumlu iki gen bölgesi mevcuttur; SMN1 ve SMN2. SMA hastalığının klinik alt tipleri hastalığın başlangıç yaşına ve SMN2 kopya sayısına dayanmaktadır. SMN1 geninde gerçekleşen nokta mutasyonları ve heterozigot delesyonlar sonucu ekzon 7 katılımı engellenerek fonksiyonel olmayan SMN proteinini üretilmektedir. SMN2 geni üzerinden eksprese edilen kesikli yapıdaki SMN proteinini SMN Δ 7 (delta SMN) olarak adlandırılmaktadır. Düşük miktarda SMN protein ekspresyonu SMN2 geni üzerinden gerçekleştirilmektedir. Her bireyde farklı kopya sayısı bulunan SMN2 geninin hastalık seyri ve fenotipik şiddet ile ilişkisine yönelik sonuçlar mevcuttur. Bugüne kadar SMA hastalığı için FDA onaylı; Nusinersen, Zolgensma ve Risdiplam olmak üzere üç ilaç bulunmaktadır. Bu ilaçların tedaviye yönelik ciddi olumlu sonuçları olsa da tedavilerin maliyetleri oldukça yüksektir. CRISPR/Cas9 sistemi genomda meydana gelen gelen değişikliklerin düzeltilmesini mümkün kılmaktadır. Kesilen DNA'nın onarımı için meydana gelebilecek iki farklı onarım mekanizması bulunmaktadır; NHEJ ve HDR. CRISPR-PE sisteminin Cas9 aracılı HDR yöntemine kıyasla yüksek verimlilik, daha az indel oluşum riski ve çift zincir kırılımı oluşturmama gibi avantajları bulunmaktadır. Tez hipotezi; CRISPR Prime Editing yönteminin SMA hastalığı tedavisi için farklı SMN2 kopya sayılarına sahip alt tiplerde çalışarak SMN ekspresyon profilinin artırılabilirdir. Tez kapsamında HDR tabanlı yaklaşımlara oranla pek çok avantaja sahip olan CRISPR-PE sistemi tercih edilerek bir terapötik bir tedavi geliştirilmiştir. SMN2 geni üzerinde c.859G>C ve c.840C-T tek nokta mutasyonunun modifiye edilerek stabil SMN protein ekspresyonunun sağlanması için pegRNA'lar tasarlanmıştır. Primer SMA Tip 1, Tip 2 fibroblast, Jurkat, HEK293T, HeLa, U87 gibi çeşitli hücre hatlarında CRISPR-PE sisteminin etkinliği yaklaşık 3 ay süre ile takip edilmiştir. SMN-düşük Jurkat hücre hattında 3 aya kadar SMN ekspresyonunun stabil şekilde yüksek kaldığı tespit edilmiştir. Primer SMA Tip 2 fibroblast hücrelerinde SMA Tip 1 fibroblast hücrelerine oranla SMN ve GFP ifadesinin uzun dönemde daha yüksek ve stabil bir şekilde sağlandığı tespit edilmiştir. Yapılan deneyler ile CRISPR-PE sisteminin SMN ekspresyonunu farklı SMN2 kopya sayısına sahip hücre hatları üzerinde artırma kapasitesi test edilmiştir. DNA üzerinde çift zincir kırılımına sebep olmadan ve hücre canlılığı üzerinde düşük toksisite gösterdiği tespit edilmiştir. SMA hastalığında farklı alt tiplere yönelik çalışılacak CRISPR-PE sistemi için altyapı oluşturulmuştur.

Anahtar Kelimeler: CRISPR-Prime Editing, SMA, SMN2 geni, SMN proteinini.

ABSTRACT

Investigation of the In Vitro and Ex Vivo Efficacy of the CRISPR-PE System According to the Types of Spinal Muscular Atrophy Disease

SMA disease is a neuromuscular disease that progresses with neuron loss and muscle atrophy. There are two gene regions responsible for SMA disease; SMN1 and SMN2. Clinical subtypes of SMA disease are based on age of disease onset and SMN2 copy number. As a result of point mutations and heterozygous deletions in the SMN1 gene, exon 7 participation is prevented and non-functional SMN protein is produced. The truncated SMN protein expressed through the SMN2 gene is called SMN Δ 7 (delta SMN). Low amounts of SMN protein expression is achieved through the SMN2 gene. There are results regarding the relationship of the SMN2 gene, which has a different copy number in each individual, with the disease course and phenotypic severity. To date, FDA approved for SMA disease; There are three drugs: Nusinersen, Zolgensma and Risdiplam. Although these drugs have serious positive results for treatment, the costs of the treatments are quite high. The CRISPR/Cas9 system makes it possible to correct changes in the genome. There are two different repair mechanisms that can occur for the repair of cut DNA; NHEJ and HDR. The CRISPR-PE system has advantages compared to the Cas9-mediated HDR method, such as high efficiency, less risk of indel formation, and no double-strand breakage. Thesis hypothesis; The CRISPR Prime Editing method can increase the SMN expression profile by working on subtypes with different SMN2 copy numbers for the treatment of SMA disease. Within the scope of the thesis, a therapeutic treatment was developed by choosing the CRISPR-PE system, which has many advantages compared to HDR-based approaches. PegRNAs were designed to ensure stable SMN protein expression by modifying the c.859G>C and c.840C>T single point mutations on the SMN2 gene. The effectiveness of the CRISPR-PE system in various cell lines such as Primary SMA Type 1, Type 2 fibroblast, Jurkat, HEK293T, HeLa, U87 was followed for approximately 3 months. It was found that SMN expression remained stably high for up to 3 months in the SMN-low Jurkat cell line. It has been determined that SMN and GFP expression is higher and more stable in the long term in primary SMA Type 2 fibroblast cells than in SMA Type 1 fibroblast cells. With the experiments, the capacity of the CRISPR-PE system to increase SMN expression on cell lines with different SMN2 copy numbers was tested. It has been determined that it does not cause double strand breaks on DNA and has low toxicity on cell viability. An infrastructure has been created for the CRISPR-PE system to be used to study different subtypes of SMA disease.

Keywords: CRISPR-Prime Editing, SMA, SMN2 gene, SMN protein.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans sürecimde ve tez sürecimde her türlü desteği esirgemeyen, her daim bir adım ileriye gitmemi sağlayan kıymetli danışman hocam Dr.Öğr.Üyesi Cihan TAŞTAN'A,

Hayatımda her konuda arkamda durup bana destek olarak bugünlere gelmemi sağlayan sevgili anneme, babama ve ablama; hayatımda kıymetli bir yere sahip, her konuda yanımda olan Yasin EKİNCİ'ye,

Beraber yer aldığımız pek çok projede hem lisans hem yüksek lisans sürecimde beraber olduğum yol arkadaşım Sibel Pınar ODABAŞ'a; bu süreç içerisinde birlikte çeşitli projelerde yer aldığım sevgili ekip arkadaşlarım, Hale Ahsen BABAR, Özüm KILIÇ, Cemre Can İNCİ, Sıla KULAÇ, Sevgi OLTAN'a,

Yüksek lisansımı yaptığım ÜSKÜDAR ÜNİVERSİTESİ TRGENMER Laboratuvar'ına; Araştırmalarımız için sağlamış olduğu destek için TÜSEB kurumuna; yüksek lisans sürecimde vermiş olduğu BİDEB 2210-A bursu ile destek olan TÜBİTAK kurumuna da sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

BEYAN FORMU

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında zgn olduğunu, tarafımdan üretildiğini ve şkdar niversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna göre yazıldığını beyan ederim



Tarih
Gamze YELGEN
İmzası

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR	iii
BEYAN FORMU	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLOLAR DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Spinal Musküler Atrofi (SMA).....	3
2.1.1. SMA İnsidansı	4
2.1.2. SMN2 Geni ve Kopya Sayısı.....	5
2.1.3. SMA Alt Tipleri.....	7
2.1.4. SMA Moleküler Mekanizması.....	10
2.1.5. SMN1-SMN2 Gen Bölgeleri	12
2.1.6. SMN2 Geni ve Hastalığa Etkisi.....	14
2.1.7. SMA’da Genetik Tedavi Çalışmaları	16
2.2. CRISPR Gen Düzenleme Teknolojisi.....	25
2.2.1. SMA’da CRISPR Çalışmaları	28
2.2.2. CRISPR-Prime Editing Sistemi	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	36
3.1. CISPR Prime Editing Yönteminde Kullanılacak pegRNA Tasarımı	36
3.2. Transformasyon ve Plazmid DNA İzolasyonu	37
3.3. Agaroz Jel Elektroforezi	37

3.4. Lentivirüs Üretimi ve Transfeksiyonu	37
3.5. Lentivirüs Titrasyonu.....	38
3.6. Hücre Kültürü	38
3.7. Blastocidin Seçilimi.....	39
3.8. PBMC İzolasyonu, CD3+ T Hücre İzolasyonu ve Transdüksiyonu.....	40
3.9. Hücre Hatlarından RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi.....	40
3.10. Kantitatif rt-PCR (RT-qPCR) Analizi	41
3.11. DNA İzolasyonu ve Sanger Sekanslama	42
3.12. Floresan Mikroskop Altında Görüntü Alma ve Akım Sitometrisi Analizi.....	43
3.13. Annexin V- propidium iodide (PI) Boyama	43
3.14. Hücre Sağ Kalım Analizi.....	44
3.15. Hücre Canlılığının MTT Deneyi ile Belirlenmesi	44
3.16. CRISPR Cas9 Sistemi ile SMN1 İnaktif Hücre Hattı Üretimi	45
3.17. Puromycin Seçilimi.....	46
3.18. Single Cell Cloning (SCC)	47
3.19. pegRNA Tasarımlarıyla Gerçekleştirilen Genetik Düzenlemenin Olası Off-target Etkilerinin Araştırılması	48
3.20. Multiplex Ligasyona Bağlı Prob Amplifikasyonu (MLPA) Analizi	49
3.21. İstatistiksel Analiz.....	49
4. BULGULAR.....	50
4.1. Plazmitlerin transformasyonu ve izolasyonu sonrası kalite kontrol testleri.	50
4.2. İzole edilen plazmid DNA'ların kalite kontrol kabul kriterlerine göre değerlendirilmesi.	52
4.3. HEK293T hücrelerine pegRNA1, pLenti-PE2-BSD ve kontrol GFP plazmitleri ile transfeksiyon sonrası 24. saatte floresan mikroskop ile görüntülenmesi.....	54
4.4. pegRNA1 ve pegRNA2 virüsü ile jurkat hücre hattında kurulan titrasyon deneyinin 72 saat sonrasında akım sitometri analizi.	56

4.5. Deneylerde kullanılan hücre hatlarının SMN ifadelerinin hücre içi SMN boyama sonucu akım sitometri analizi.	57
4.6. SMN-Düşük Jurkat hücrelerinde CRISPR-PE sisteminin etkinliğinin değerlendirilmesi.	59
4.7. SMN-düşük Jurkat hücre hattında CRISPR-PE sisteminin pegRNA1 transdüksiyon sonrası 3, 7 ve 10. günlerde kontrol GFP ve pegRNA-GFP kodlayan lentivirüslerle karşılaştırılarak test edilmesi.	61
4.8. PE(+) pegRNA1(+) Jurkat ve kontrol PE(+) GFP Jurkat hücrelerinde SMN ve Δ SMN ifadelerinin MFI değerlerinin karşılaştırılması.	62
4.9. Düşük SMN profiline sahip Jurkat hücre hattında CRISPR-PE sisteminin canlılık ve hücre sayısına etkisinin değerlendirilmesi.	64
4.10. pegRNA1 transdükte edilen Jurkat PE(+) hücre hattında PI: 7-12-44-50-57. günlerde GFP ve SMN ekspresyonunun takibi.	65
4.11. pegRNA2 transdükte edilen Jurkat PE(+) hücre hattında PI: 7-12-44-50. günlerde GFP ve SMN ekspresyonunun takibi.	67
4.12. pegRNA1 transdükte edilen Jurkat PE(+) Hücre hattında SCC klonlarında PI: 44-50-64-93. günlerde GFP ve SMN ekspresyonunun takibi.	69
4.13. pegRNA1 ve pegRNA2 transdükte edilen Jurkat PE(+) Hücre hattında PI: 7-12-44-50. günlerde SMN MFI, SMN ekspresyon ve GFP+ SMN+ popülasyonlarına ait bar grafikler.	71
4.14. Primer SMA Tip 1, Tip 2 Fibroblast ve WT Fibroblast hücre hatlarında hücre canlılığının ve apoptoz evrelerinin belirlenmesi için gerçekleştirilen MTT ve Annexin-V analizi.	73
4.15. Primer SMA Tip 1 ve SMA Tip 2 Fibroblast hücre hatlarının zamana bağlı hücre sayısı ve hücre canlılığının grafiksel gösterimi.	75
4.16. Primer SMA Tip 1 Fibroblast hücre hattına pegRNA1 ile transdüksiyon sonrası PI: 24 ve 42. Günlerde SMN ve GFP ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi.	76
4.17. Primer SMA Tip 2 Fibroblast hücre hattına pegRNA1 ile transdüksiyon sonrası PI: 8-21-24-33 ve 42. Günlerde SMN ve GFP ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi.	78

4.18. Primer SMA Tip 1 Fibroblast hücre hattına pegRNA1 ve pegRNA2 ile transdüksiyon sonrası PI: 24 ve 42. Günlerde SMN ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi.	80
4.19. Primer SMA Tip 2 Fibroblast hücre hattına pegRNA1 ve pegRNA2 ile transdüksiyon sonrası PI:8-21-24-33 ve 42. Günlerde SMN ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi.	81
4.20. Primer SMA Tip 1 ve Tip 2 Fibroblast hücre hatlarına pegRNA1 ve pegRNA2 ile transdüksiyon sonra PI:8-19-21-24-33 ve PI:42 günlerde canlılık, GFP+SMN+ hücre popülasyonları ve GFP MFI değerlerine ait bar grafikleri.	83
4.21. Primer SMA Tip 1 ve Tip 2 Fibroblast hücre hatlarına pegRNA1 ile transdüksiyon sonrası ΔGFP MFI değerlerinin bar grafikleri.	85
4.22. CRISPR-PE sisteminin SMA Tip 1 ve SMA Tip 2 fibroblast hücre hatlarında sağkalım analizi.	87
4.23. SMA Tip 3 hastasından elde edilen CD3+T hücrelerde CRISPR-PE sisteminin etkinliğinin değerlendirilmesi.	88
4.24. Primer SMA Tip 2 Fibroblast hücre hattında CRISPR-PE sisteminin apoptotik etkisinin belirlenmesi için gerçekleştirilen Annexin-V-PI ve MTT analizi.	90
4.25. Primer SMA Tip 2 fibroblast hücre hattında CRISPR-PE sistemi aktarıldıktan sonra SMN2 kopya sayısı için MLPA analizi.	92
4.26. HEK293T, HeLa VE U87 SMN1 knockout hücre hattı oluşturulduktan sonra SMN ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi.	94
4.27. HEK293T, HeLa ve U87 SMN1 knockout hücre klonlarında düşük-orta-yüksek SMN ekspresyon seviyeleri ve canlılıkların değerlendirilmesi.	96
4.28. HeLa ve U87 SMN1 knockout hücre klonlarında hücre canlılığının MTT analizi ile belirlenmesi.	98
4.29. HEK293T SMN1 knockout hücre klonlarında SMN2 kopya sayısı için MLPA analizi.	100
4.30. HeLa SMN1 knockout hücre klonlarında SMN2 kopya sayısı için MLPA analizi.	102
4.31. Primer SMA Tip 2 PE(+) pegRNA1(+) ve PE(+) pegRNA2(+) fibroblast hücrelerde full length ve delta primerler ile qPCR analizi sonrası agaroz jel analizi.	104

4.32. CRISPR-PE(+) pegRNA1(+) SMA Tip 2 hücre hattında hedef dışı mutasyon kapasitesinin değerlendirilmesi.....	106
5.TARTIŞMA.....	108
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	117
KAYNAKLAR	119
EKLER	131
Ek 1.	131
Ek 2. Özgeçmiş	132



TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1. SMA alt tipleri (Kolb & Kissel, 2015)	7
Tablo 2. Spinal musküler atrofide yeni terapötik yaklaşımlar: güncel klinik ve preklinik denemeler.....	20
Tablo 3. PegRNA tasarım dizileri.....	36
Tablo 4. pegRNA sentezi için vektör dizileri	36
Tablo 5. Hücre hatlarında belirlenen gün ve blasticidin konsantrasyonları	39
Tablo 6. RT-qPCR için tasarlanan primerler	41
Tablo 7. Sanger sekanslama için tasarlanan primerler	42
Tablo 8. intron 5 ve intron 7 bölgelerini hedefleyen gRNA tasarımları.....	45
Tablo 9. Hücre hatlarında belirlenen gün ve puromycin konsantrasyonları.....	46
Tablo 10. Off-target için tasarlanan primerler	48
Tablo 11. Plazmit DNA Kalite Kontrol Kabul Kriterleri (Taştan vd., 2020).....	52
Tablo 12. İzole edilen Plazmit DNA'ların Kalite Kontrol Sonuçları	53

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1. SMA hastalarının TREAT-NMD aracılı küresel dağılımı (Chong vd., 2021)	5
Şekil 2. SMN2 geninin SMA fenotipi üzerindeki etkisinin spektrumu (Chen, 2020).....	6
Şekil 3: Spinal Musküler Atrofi Tip 1 (Kolb & Kissel, 2015)	8
Şekil 4: Spinal Musküler Atrofi Tip 2 (Kolb & Kissel, 2015)	9
Şekil 5: Spinal Musküler Atrofi Tip 3 (Kolb & Kissel, 2015)	10
Şekil 6. SMN proteinin eksprese olduğu dokuların gösterimi (<i>Tissue expression of SMN1 - Summary - The Human Protein Atlas, t.y.</i>)	11
Şekil 7: SMN1 ve SMN2 genlerinin kromozom üzerindeki lokasyonlarının gösterimi (Rao vd., 2018)	12
Şekil 8. SMN1 ve SMN2 genlerinin mRNA transkriptlerinin şematik gösterimi (Kolb & Kissel, 2015)	13
Şekil 9: SMN2 minigen c.859G>C, doğal tip SMN2 minigene kıyasla pre-mRNA splicing aşamasında ekzon 7 katılımının gösterilmesi (Prior vd., 2009).....	15
Şekil 10. SMA için genom mühendisliği. a SMN2 geninin oligonükleotit aracılı rekombinasyon ile SMN1 genine dönüşümü ile sağ kalımın artışı. b Splicing aşamasında SMN2 ekzon 7 inklüzyonunun indüksiyonu için antisens oligonükleotitlerin kullanımı (Nelson vd., 2017)	17
Şekil 11. SMA hastalığında terapötik yaklaşımlar (Chen, 2020).	18
Şekil 12. Ana terapötik yaklaşım ve mekanizmaları (Messina & Sframeli, 2020)	21
Şekil 13. Geleneksel Gen Terapisi ve CRISPR tabanlı gen düzenleme sisteminin şemasal gösterimi	24
Şekil 14. DNA tamir mekanizmaları (Doudna & Charpentier, 2014)	26
Şekil 15. Prime Editing yönteminin mekanizmasının şematik gösterimi (Marzec vd., 2020)	32
Şekil 16. Prime editing kompleksini oluşturan cas9 nikaz-RT domaini füzyonu (PE proteini) ile etkileşimde olan pegRNA'nın gösterimi (Anzalone vd., 2019).....	33
Şekil 17. SMN1 ve SMN2 genlerinde yapılan BLAST analizinin şemasal gösterimi ...	45
Şekil 18. Cas-OFFinder (Rgenome) yazılımı kullanılarak belirlenen olası mutasyon bölgeleri	48
Şekil 19. SMN2 için final ratio (FR) ve kopya sayısı arasındaki ilişki	49

Şekil 20. İzole edilen plazmid DNA'ların kalite kontrollerini içeren jel elektroforez görüntü ve Biorad Molecular Imager Gel Doc Görüntüleme Sistemi analizi.	51
Şekil 21. pegRNA1, pLenti-PE2-BSD ve GFP ile transfekte edilen HEK293T hücrelerinin transfeksiyonundan 24 saat sonrasında alınan floresan mikroskop görüntüleri.....	55
Şekil 22. pegRNA1 ve pegRNA2 virüsünün üretimi sonrası Jurkat hücre hattında kurulan titrasyon deneyinin akım sitometri analizi.....	56
Şekil 23. Hücre hatlarının SMN profillerinin değerlendirilmesi.	58
Şekil 24. SMN-düşük Jurkat hücre hattında CRISPR-PE+ sistemi ve pegRNA1 ile gen modifikasyonunun SMN ekspresyonu üzerine etkisinin karşılaştırılması.....	60
Şekil 25. CRISPR-PE sisteminin pegRNA1 transdüksiyon sonrası PE pozitif Jurkat hücrelerinde 3, 7 ve 10. günlerde SMN protein ekspresyonunun yukarı regülasyonunun akım sitometri analizi ile gösterilmesi.	61
Şekil 26. pegRNA1(+) PE(+) Jurkat hücrelerinde kontrol GFP PE(+) Jurkat hücrelerine kıyasla SMN ve ΔSMN ekspresyonlarının MFI değerlerini içeren bar grafikler.	63
Şekil 27. Jurkat hücre hattında pegRNA1 ile transdüksiyon sonrası CRISPR-PE sisteminin canlılık hücre sayısı üzerindeki etkisinin belirlenmesi için oluşturulan bar grafikler. pLenti ve GFP kontrol gruba kıyasla Jurkat pegRNA1 transdükte hücre hattında	64
Şekil 28. Jurkat PE(+) hücre hattında pegRNA1 transdüksiyon sonrası 7-12-44-50-57. günlerde anti-SMN-AlexaFlour 647 antikoru (sc-32313 AF647) ile hücre içi boyama sonrası akım sitometri analizi.	66
Şekil 29. Jurkat PE(+) hücre hattında pegRNA2 transdüksiyon sonrası 7-12-44-50. günlerde anti-SMN-AlexaFlour 647 antikoru (sc-32313 AF647) ile hücre içi boyama sonrası akım sitometri analizi.	68
Şekil 30. Jurkat PE(+) pegRNA1 hücre hattında single cell cloning (SCC) sonrası Jurkat PE(+) kontrol ve SCC sonrası Jurkat PE(+) pegRNA1 klonlarının PI44-50-64 ve 93. günlerde anti-SMN-AlexaFlour 647 antikoru (sc-32313 AF647) ile hücre içi boyama sonrası akım sitometri analizi.	70
Şekil 31. Jurkat PE(+) hücre hattında pegRNA1 ve pegRNA2 ile transdüksiyon sonrası PI:7-12-44 ve 50. Günlerde PE(+) pegRNA1, kontrol grubu PE(+) hücrelere ait oluşturulan bar grafikler.....	72

Şekil 32. SMA Tip 1, SMA Tip 2 fibroblast, WT fibroblast ve kontrol HEK293T hücre hatlarında gerçekleştirilen MTT ve Annexin V - PI analizi sonrası oluşturulan bar grafikleri.....	74
Şekil 33. Primer SMA Tip 1 Fibroblast (#GM00232) ve SMA Tip 2 Fibroblast (#GM03813) hücre hattına ait zamana bağlı hücre sayısı ve canlılığını içeren çizgi grafikleri.....	75
Şekil 34. Primer SMA Tip 1 PE(+) fibroblast hücre hattında kontrol grubu PE ve GFP ile pegRNA 1 transdüksiyon sonrası post infection (PI) 24 ve 42. günlerde alınan akım sitometri analizleri. SMA Tip 1 PE(+) pegRNA 1, PE(+) ve GFP kontrolü...	77
Şekil 35. Primer SMA Tip 2 PE(+) fibroblast hücre hattında kontrol grubu PE ve GFP ile pegRNA 1 transdüksiyon sonrası post infection (PI) 8-21-24-33 ve 42. günlerde alınan akım sitometri analizleri.	79
Şekil 36. Primer SMA Tip 1 PE(+) fibroblast hücre hattında kontrol grubu PE ve GFP ile pegRNA 1 ve pegRNA 2 transdüksiyon sonrası post infection (PI) 24 ve 42. günlerde SMN ekspresyon seviyeleri.	80
Şekil 37. Primer SMA Tip 2 PE(+) fibroblast hücre hattında kontrol grubu PE ve GFP ile pegRNA 1 ve pegRNA 2 transdüksiyon sonrası post infection (PI) 8-21-24-33 ve 42. günlerde SMN ekspresyon seviyeleri.	82
Şekil 38. Primer SMA Tip 1 ve SMA Tip 2 PE(+) fibroblast hücre hatlarında pegRNA1 ve pegRNA2 ile transdüksiyon sonrası PI:8-19-21-24-33 ve 42. günlerde PE(+) pegRNA1, pegRNA2 kontrol grubu GFP ve PE hücrelerinde canlılık, GFP + SMN+ popülasyon, SMN ve GFP MFI değerlerini içeren bar grafikler.	84
Şekil 39. Primer SMA Tip 1 ve SMA Tip 2 PE(+) fibroblast hücre hatlarında pegRNA1 ile transdüksiyon sonrası pegRNA1, kontrol grubu GFP ve PE hücrelerinde Δ GFP MFI değerlerini içeren çizgi grafikler.....	86
Şekil 40. Primer SMA Tip 1 ve SMA Tip 2 fibroblast hücre hatlarında pegRNA1 ve pegRNA2 ile transdüksiyon sonrası dönemde PE(+) ve GFP kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığına olan etkisini gösteren bar grafik.....	87
Şekil 41. SMA Tip 3 hastasından izole edilen CD3+T hücrelere pegRNA1 ve pegRNA2 ile transdüksiyon sonrası pLenti ve GFP kontrole kıyasla akım sitometri analizi ve bar grafik.....	89
Şekil 42. SMA Tip 2 fibroblast hücre hattında PE(+), PE(+) GFP kontrol ve pegRNA1 transdükte hücrelerde gerçekleştirilen Annexin V - PI analizi.	91

Şekil 43. SMA Tip 2 fibroblast hücre hattında CRISPR-PE sistemi içeren PE(+) pegRNA1 ve PE(+) kontrol hücrelerde MLPA yöntemi ile belirlenen SMN1-SMN2 kopya sayılarının analizleri.....	93
Şekil 44. SMN1 knockout HEK293T, HeLa ve U87 hücre hatlarında gerçekleştirilen boyamanın akım sitometri analizi.....	95
Şekil 45. SMN1 knockout HEK293T, HeLa ve U87 hücre hatlarında SMN ekspresyonu ve canlılık değerlerini içeren bar grafikleri.....	97
Şekil 46. SMN1 knockout HeLa, ve U87 hücre hatlarında gerçekleştirilen MTT analizi.	99
Şekil 47. SMN1 knockout HEK293T hücre klonlarında MLPA yöntemi ile belirlenen SMN1-SMN2 kopya sayılarının analizleri..	101
Şekil 48. SMN1 knockout HeLa hücre klonlarında MLPA yöntemi ile belirlenen SMN1-SMN2 kopya sayılarının analizleri..	103
Şekil 49. CRISPR-PE sistemi aktarılan SMA Tip 2 fibroblast hücre hattında FL ve Delta primerler ile gerçekleştirilen qPCR sonucu agaroz jel analizi.....	105
Şekil 50. CRISPR-PE(+) pegRNA1(+) SMA Tip 2 fibroblast hücrelerinde off-target (hedef dışı) mutasyon analizi.....	107

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

(Örnek ifadeleri aşağıda bulabilirsiniz)

AAV: Adeno İlişkili Virüs

ASO: Antisens Oligonükleotittir

BOS: Beyin Omurilik Sıvısı

Cas: CRISPR-Associated Protein 9

CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

PE: Prime Editing

crRNA: CRISPR RNA

CNS: Central Nervous System

DSB: Çift Sarmal Kırılımı

ESE: Exon Splicing Enhancer (eksonik birleştirme artırıcılar)

ESS: Exon Splicing Silencer (eksonik birleştirme susturucular)

FDA: Food and Drug Administration

gRNA: Rehber RNA

HDR: Homolojiye Yönelik Onarım

iPSC: İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler

KBB: Kan Beyin Bariyeri

NHEJ: Homolog Olmayan Uç Birleştirme

SMA: Spinal Musküler Atrofi

SMN1: Survival Motor Neuron 1

SMN2: Survival Motor Neuron 2

snRNP'ler: Spliceozomal Küçük Nükleer Ribonükleoproteinler

SRE: Splicing-Regulatory Elements

TALEN: Transkripsiyon Efektör Nükleazlar

tracrRNA: Trans-Activating CRISPR RNA

ZFN: Çinko Parmak Nükleazları

SCC: Single Cell Cloning

PBS: Primer Bağlanma Bölgesi

pegRNA: Prime Editing Rehber RNA

IPSC: indüklenmiş pluripotent kök hücreler

AAV: Adeno-İlişkili Virüs

ASO: Antisens Oligonükleotit

FL: Tam Uzunlukta

RTT: Reverse Transcription Template

1. GİRİŞ

Spinal musküler atrofi (SMA) gen delesyonları gibi mutasyonlar sebebiyle ortaya çıkan nöron kaybı ve kas atrofisi ile seyreden nöromusküler bir hastalıktır (Bowerman vd., 2017). SMA hastalığının merkezinde sorumlu iki gen bölgesi mevcuttur; survival motor neuron 1 ve survival motor neuron 2 (SMN1-SMN2). SMA hastalığının klinik alt tipleri bulunmaktadır. Klinik alt tipler, hastalığın başlangıç yaşına ve SMN2 kopya sayısına dayanmaktadır (Kolb & Kissel, 2015). SMA hastalığı, 10.000 canlı doğumda 1 görülme sıklığına sahiptir (Sugarman vd., 2012). İnsidans SMA tiplerine bağlı olarak da değişkenlik gösterebilmektedir (Verhaart vd., 2017).

SMN1 geni üzerinden hayatta kalma motor nöron (SMN) proteinini eksprese edilmekte ve bu gen üzerinde meydana gelen mutasyonlar sebebiyle SMN protein üretimi etkilenmektedir. Düşük miktarda SMN protein ekspresyonu SMN2 geni üzerinden gerçekleştirilmektedir. Sağlıklı bireyler de dahil olmak üzere her bireyde farklı kopya sayısında bulunan SMN2 geni kopya sayısının hastalık seyri ve fenotipik şiddet ile ilişkisine yönelik sonuçlar ortaya konmuştur (Lefebvre vd., 1997; Shorrock vd., 2018). Vücudun her yerinde eksprese edilen SMN proteinini en fazla spinal motor nöronlarda eksprese edilmektedir (Tissue expression of SMN1 - Summary - The Human Protein Atlas, t.y.). SMN1 geninin her iki aleli üzerinde gerçekleşen nokta mutasyonları ve heterozigot delesyonlar sonucu SMN1 geninde ekzon 7 katılımı gerçekleşmemekte ve fonksiyonel olmayan SMN protein üretimi gerçekleşmektedir. SMN2 geninden meydana gelen mRNA transkriptlerinde düşük oranda fonksiyonel SMN proteinini ekspresyonu gerçekleştirilmektedir. SMN2 geni üzerinden eksprese edilen kesik ve stabil olmayan yapıdaki SMN proteini SMN Δ 7 (delta SMN) olarak adlandırılmaktadır (M. A. Passini vd., 2011; Ross & Kwon, 2019; Schorling vd., 2020).

Bugüne kadar SMA hastalığı için U.S Food and Drug Administration (FDA) onaylı; Biogen Nusinersen (Spinraza®), Novartis Onasemnogene Apeparvovec-xioi (Zolgensma®) ve Risdiplam (Evrysdi™) olmak üzere üç ilaç bulunmaktadır. Bu ilaçların tedaviye yönelik ciddi olumlu sonuçları olsa da tedavilerin maliyetleri oldukça yüksektir. Güncel olarak çeşitli terapötik yaklaşımlar geliştirilmekte olup halen maliyet konusunda genel anlamda bir iyileştirilmeye gidilmemektedir (Chong vd., 2021).

Bakteri, arke gibi pek çok prokaryotik canlıda doğal olarak bulunan bir savunma mekanizması olan CRISPR/Cas9 sistemi genomda meydana gelen gelen değişikliklerin düzeltilmesini mümkün kılmaktadır (Hsu vd., 2014; Jinek vd., 2012). Kesilen DNA'nın onarımı için meydana gelebilecek iki farklı onarım mekanizması bulunmaktadır; non-homolog uç birleşimi (NHEJ) ve homolog rekombinasyon (HDR). NHEJ sisteminde DNA kırığı doğrudan onarılmakta ve kırık hızlı bir şekilde tamir edilmektedir. Ancak dezavantaj olarak bu onarım çeşitinde hatalı onarımlar gerçekleşebilmekle beraber istenmeyen genetik değişiklikler meydana gelebilmektedir.

CRISPR-PE sisteminin Cas9 aracılı HDR yöntemine kıyasla pek çok avantajı bulunmaktadır. Bunlar arasında; yüksek verimlilik, daha az indel oluşum riski gibi faktörler yer almaktadır. Nokta mutasyonları HDR ile de tamir edilebilmekte ancak PE yöntemine oranla hedef dışı (off target) mutasyon riski daha yüksek ve verimlilik yüzdesi daha düşüktür. PE yönteminin en önemli avantajları arasında DNA'da çift zincir kırığı oluşumuna neden olmadan genom üzerinde istenilen düzenlemeleri gerçekleştirebilmesi yer almaktadır (Matsoukas, 2020; Schene vd., 2020).

Yapılan çalışmalarda c.859 G>C dönüşümünün SMA fenotipi üzerindeki olumlu bir modifiye edici olduğu tespit edilmiş ve bildirilmiştir (Reed & Zanolini, 2018; Vezain vd., 2010). SMN proteinin üç boyutlu konformasyonel yapısında değişime sebep olduğu varsayılan bu varyantın ekzon 7 katılımını artırdığı yapılan çalışmalarda yer almaktadır. SMN1 ve SMN2 geni arasındaki en büyük fark 840. Nükleotit üzerinde meydana gelen C-T dönüşümüdür. Meydana gelen bu dönüşüm sonucunda ekzon 7 katılımı engellenmektedir (Kolb & Kissel, 2015). Tez kapsamında HDR tabanlı yaklaşımlara oranla pek çok avantaja sahip olan CRISPR-PE sistemi tercih edilerek bir terapötik bir tedavi geliştirilmiştir. SMA hastalığında SMN2 geni üzerinde c.859 G>C (pegRNA1) ve c.840 C-T (pegRNA2) tek nokta mutasyonunun modifiye edilerek stabil SMN protein ekspresyonunun sağlanması hedeflenmiştir. Bu amaçla SMN2 geni üzerindeki tek nokta mutasyonunu hedefleyen pegRNA tasarımları gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle CRISPR-PE sisteminin SMN2 kopya sayılarına bağlı olarak *in vitro* ve *ex vivo* etkinliğinin araştırılması hedeflenmiştir. Primer SMA Tip 1, Tip 2 fibroblast, Jurkat, HEK293T, HeLa, U87 gibi çeşitli hücre hatlarında CRISPR-PE sisteminin etkinliğinin test edilmesi hedeflenmiştir. Tez hipotezi; CRISPR Prime Editing yönteminin SMA hastalığı tedavisi için farklı SMN2 kopya sayılarına sahip alt tiplerde çalışarak SMN ekspresyon profilinin artırılabilirliği.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Spinal Musküler Atrofi (SMA)

Spinal musküler atrofi (SMA) gen delesyonları gibi mutasyonlar sebebiyle ortaya çıkan nöron kaybı ve kas atrofisi ile seyreden nöromusküler bir hastalıktır. SMA hastalığı, iskelet, solunum kaslarının zayıflığı ile karakterize olmakla birlikte heterojen ve kalıtsal bir hastalıktır (Bowerman vd., 2017). SMA hastalığının merkezinde sorumlu iki gen bölgesi mevcuttur; survival motor neuron 1 ve survival motor neuron 2 (SMN1-SMN2). SMN1 geni 5. Kromozom üzerinde 5q13 pozisyonunda yer alan hayati bir sağ kalım proteindir. SMA hastalığının ortaya çıkmasındaki etkenler ise SMN1 geninin delesyonu veya bu gende meydana gelen mutasyonlardır.

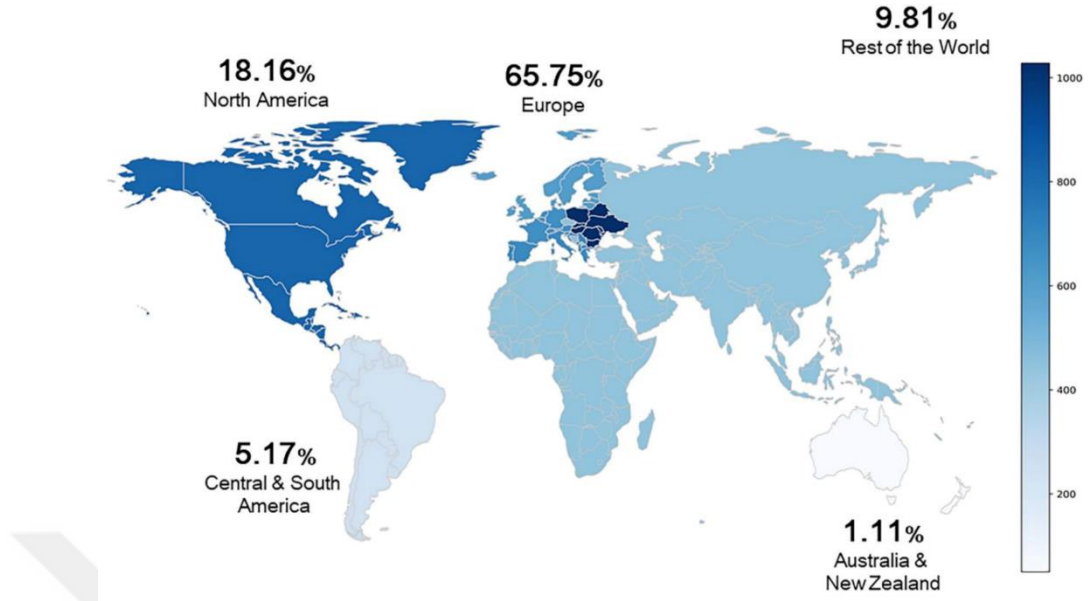
SMA hastalığının kalıtımı otozomal resesif, otozomal dominant veya X'e bağlı resesif kalıtım olmak üzere üç şekilde görülebilmektedir. Bunlar arasında en yaygın olarak görülen kalıtım şekli ise otozomal resesif kalıtım şeklidir. Otozomal resesif kalıtım görülen SMA'ya ise proksimal SMA adı da verilmektedir (M. A. Farrar & Kiernan, 2015). SMA hastalarında oran olarak bakıldığında %96'sından fazlasında 5. kromozomda konumlanan SMN1 geninde mutasyonlar meydana gelmektedir. Proksimal SMA hastalarında yaklaşık %96.4'lük gibi bir kesiminde SMN1 geni üzerinde homozigot ekzon 7 ve 8 delesyonları meydana gelmektedir (Bozorg Qomi vd., 2019; Kolb vd., 2017).

SMN1 geni üzerinden hayatta kalma motor nöron (SMN) proteini eksprese edilmekte ve bu gen üzerinde meydana gelen mutasyonlar, delesyonlar sebebiyle SMN protein üretimi önemli derecede etkilenmektedir. Mutasyonlar sonucu ekspresyonu azalan SMN proteininin eksikliği ise progresif motor nöron ölümüne neden olmakta ve bu durum iskelet kası atrofisini meydana getirmektedir. SMA hastalığının primer belirtileri arasında beyin sapı defektleri, solunum güçlüğü, felç gibi durumlar yer almaktadır (M. a Passini vd., 2011).

2.1.1. SMA İnsidansı

SMA hastalığı, 10.000 canlı doğumda 1 görülme sıklığına sahipken; 40-60 erişkinde 1 taşıyıcı sıklığına sahiptir. SMA, çocukluk döneminde yaygın olarak görülen otozomal resesif hastalıklardan ve ölüm nedenlerinden biridir (Sugarman vd., 2012). National Organization for Rare Disorders (NORD) uluslararası veri tabanında (<https://treat-nmd.org/about-the-treat-nmd-network/>) kayıtlı SMA hastaları verilerinden yola çıkarak SMA insidansı dünya çapında 8.000 ile 10.000 canlı doğumda 1 olarak tanımlanmaktadır (**Şekil 1**). Avrupa'da %65,75'lik bir dilimle SMA insidansı en yüksek orana sahiptir. 1028 hasta sayısı ile %22,71'lik dilimle en büyük oran Doğu bölgesine aittir. Avrupa kıtasında yer alan İzlanda ve Slovakya'da 13,7-17,8/100.000'lik yüksek bir insidans mevcuttur. Bu bulgulara hasta sayısı ve popülasyon hakkındaki bilgilerin eksikliğinden dolayı net bir şey söylemek oldukça güçtür. Genel anlamda her hastalıkta olduğu gibi insidans, coğrafi yapı, etnik köken, yaş olmak üzere çeşitli genetik ve çevresel etkenler tarafından de değişebilmekle beraber SMA tiplerine bağlı olarak da değişkenlik gösterebilmektedir (Verhaart vd., 2017). SMA hastalığı her ırk ve cinsiyetten insanları etkilemektedir. Yapılan araştırmalarda her 50 Amerikalıdan 1'inin SMA taşıyıcısı olduğu ileri sürülmektedir (Feng vd., 2017).

SMA alt tiplerinin her biri farklı bir insidansa sahiptir. En şiddetli form olan Tip 1 1/11.000 orana sahipken; Tip 2 1/25.000; Tip 3 1/50.000; Tip 4 ise 1/300.000 insidans oranına sahiptir (Verhaart vd., 2017). Tüm bu bulguların yanında insidans çalışılan popülasyona göre de bu oran değişiklik gösterebilmektedir. Son yıllardaki çalışmalarda SMA insidansının eskiye göre daha fazla olabileceği düşünülmektedir. Bazı çalışmalar 1/6.000'e yakın bir orana sahip olduğunu göstermektedir. Buradaki değişkenliğin sebebi ise genetik testlerdeki gelişmeler ve hastalık açısından farkındalığın artması ile de ilişkilendirilebilmektedir.



Şekil 1. SMA hastalarının TREAT-NMD aracılı küresel dağılımı (Chong vd., 2021)

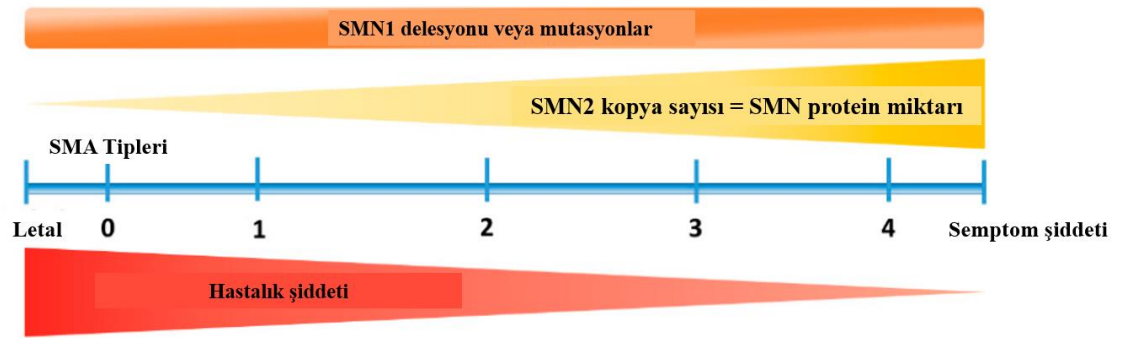
Afrika kökenli Amerikalılara bakıldığında SMA insidansı düşük tespit edilmiştir. Bu popülasyon Kafkaslarla karşılaştırıldığında ise Afrikalı Amerikalıların daha düşük taşıyıcı frekansa sahip olması ile ilişkilendirilebilmektedir. Hastalık insidansından bağımsız olarak SMA hastalığında hastaların yaşam kalitelerinin minimum etkilenmesi için erken teşhis ve doğru tedavi ile gelişen komplikasyonların azaltılması oldukça kritiktir. SMA, hastalık başlangıç yaşı ve motor nöron fonksiyon seviyelerine göre 5 klinik alt tipte değerlendirilmektedir (Russman, 2007).

2.1.2. SMN2 Geni ve Kopya Sayısı

SMA'lı hastalarda fonksiyonel SMN1 geni olmadığından dolayı hayatta kalmak için gerekli SMN protein ekspresyonu gerçekleşememekte olsa da düşük miktarda SMN protein ekspresyonu SMN1 geninden birkaç nükleotitlik farka sahip olan SMN2 geni üzerinden gerçekleştirilmektedir. Sağlıklı bireyler de dahil olmak üzere her bireyde farklı kopya sayısında SMN2 geni mevcuttur. Tip I SMA hastalarının çoğu iki kopya SMN2, tip II SMA hastalarının çoğu üç kopya SMN2 ve tip III SMA hastaları üç veya dört SMN2 kopyasına sahiptir. Bu sebeple her SMA hastasında en az bir kopya SMN2 geni bulunduğundan dolayı. Tam uzunlukta SMN2 mRNA'sının ekspresyonunun artırılmasına

yönelik çeşitli terapötik stratejiler önerilmektedir. Farmakolojik yaklaşımların bazıları; SMN transkripsiyonunu artırarak veya splicing aşamasında ekzon 7'nin inklüzyonunu hedefleyerek tam uzunlukta SMN mRNA miktarını artıran sodyum valproat ve hidroksiüre gibi ilaçlara dayanmaktadır (Sumner, 2006).

SMA hastalarındaki SMN2 kopya sayısının hastalık seyri ve fenotipik şiddet ile ilişkisine yönelik sonuçlar ortaya konmuştur (Lefebvre vd., 1997; Shorrock vd., 2018). SMN2 kopya sayısının artışı ile hastalığın fenotipik şiddetinin düşüş gösterdiği tespit edilmiştir (Feldkötter vd., 2002; Shorrock vd., 2018). SMN2 kopya sayısının hastalık seyrini iyileştirmesinin yanı sıra yaşam süresini uzattığı ve fenotipik şiddetin azalması üzerindeki etkisi de önem taşımaktadır (Wang vd., 2009). Tüm SMA hastalarında SMN1 geninde delesyon veya mutasyon meydana gelerek gen işlevsiz hale gelmektedir. Sağlıklı ve hasta her bireyde farklı kopya sayısında da olsa SMN2 geni tarafından SMN protein ekspresyonu gerçekleştirilmektedir. SMN2 kopya sayısına bağlı olarak bu gen üzerinden eksprese edilen tam uzunlukta (FL) SMN protein miktarı, SMA tip 0 yenidoğanlar ve SMA tip 4 yetişkinler de dahil olmak üzere SMA'da hastalık seyrini olumlu yönde modüle etmektedir (**Şekil 2**) (Chen, 2020).



Şekil 2. SMN2 geninin SMA fenotipi üzerindeki etkisinin spektrumu (Chen, 2020)

2.1.3. SMA Alt Tipleri

SMA hastalığının klinik alt tipleri bulunmaktadır. SMA tip 0, tip 1, tip 2, tip 3 ve tip 4 olmak üzere 5 alt tipe sahiptir. Klinik alt tipler, hastalığın başlangıç yaşına ve SMN2 kopya sayısına dayanmaktadır (**Tablo 1**) (Kolb & Kissel, 2015).

Tablo 1. SMA alt tipleri (Kolb & Kissel, 2015)

Tip	Başlangıç yaşı	Yüksek fonksiyon	Doğal ölüm yaşı	SMN2 Kopya sayısı
0	Prenatal	Solunum desteği	<1 ay	1
1	0-6 ay	Asla oturamaz	< 2 yıl	2
2	<18 ay	Asla ayakta kalamaz	> 2 yıl	3,4
3	>18 ay	Kendi başına ayakta kalabilir	Yetişkin	3,4
4	>21 yıl	Kendi başına ayakta kalabilir	Yetişkin	4-8

SMA tip 0, fetal dönemde kendini gösteren ve en nadir alt tiptir. En şiddetli geçen SMA tip 0 alt tipinde genellikle bu alt tipe canlı doğum görülmemektedir. Şiddetli zayıflık ve hipotoni, fetal hareketlerde azalma ile karakterizedir. Yenidoğan muayenesinde, tip 0 bebeklerde arefleksi, yüz diplejisi, atriyal septal defektler ve eklem kontraktürleri görülebilmektedir. Solunum yetmezliği ciddi bir sorun olmakla beraber çoğu hastanın 6 aydan sonra hayatta kalması zorlaşmaktadır (Dubowitz, 1999; Macleod vd., 1999).

SMA tip 1, Werdnig-Hoffman hastalığı olarak da bilinmekte olan en sık görülen alt tiptir. Doğum sonrası birkaç ay içinde ortaya çıkmakta ve genel olarak yaşamlarının ilk yıllarında solunum kası yetmezliğinden hayatlarını kaybetmektedir. Bu alt tipe sahip SMA'lı bebeklerde hipotoni, zayıf baş kontrolü ve 6 aydan önce tendon reflekslerinde azalma görülmektedir. Şekil 3'te görüldüğü gibi yardımsız oturma kabiliyetine sahip değildirler (**Şekil 3**) (Kolb & Kissel, 2015). SMA Tip 1 bebeklerde dil ve yutkunma zayıflığı gelişmektedir. SMA Tip 1 bebeklerde genellikle 2 yaş öncesinde solunum yetmezliği görülmektedir (Finkel vd., 2014). Tip 1 hasta bireylerin genomlarında bir veya iki SMN2 kopyası bulunmaktadır (Kolb vd., 2017).



Şekil 3: Spinal Musküler Atrofi Tip 1 (Kolb & Kissel, 2015)

SMA tip 2, 6-12 aylık çocuklarda kas zayıflığıyla seyretmekte ve bu hastalar bağımsız olarak oturabilmekte ancak bağımsız yürüme fonksiyonlarını gerçekleştirememektedirler (Şekil 4). Bu alt tipe sahip hastalarda eklem kontraktürleri, şiddetli skolyoz ve yetişkinlikten önce non-invaziv ventilasyonun kullanımını gerektiren solunum tutulumu gibi ortopedik komplikasyonlar görülmektedir. Tip 2'li hastalarda kollarda zayıflık ve ilerleyen proksimal bacak zayıflıkları da ortaya çıkmaktadır. Hasta bireyler genomlarında genel olarak 3 SMN2 kopyası içermektedir. SMA I ve II hastaları çoğu zaman hiperkalorik ve hiperproteik oral takviyelerin kullanımına ve gastrostomi gibi daha invaziv müdahaleler ile beslenme desteğine ihtiyaç duymaktadır. Bu alt tipteki komorbiditelerin çoğu kas zayıflığı, kemik ve eklem gelişiminde ortopedik komplikasyonları ile ilişkilendirilmiştir. Bu hastalar, gerekli solunum, ortopedik ve beslenme bakımının sağlanması için multidisipliner bir ekip gerektirmektedir (von Gontard vd., 2002).



Şekil 4: Spinal Musküler Atrofi Tip 2 (Kolb & Kissel, 2015)

SMA tip 3, Kugelberg-Welander hastalığı olarak da bilinmektedir. Bu hastalar hayat boyu belirli bir zaman aralığında yardımsız yürüyebilmektedir (**Şekil 5**). 18 ay ve sonrasındaki dönemde ortaya çıkmaktadır. Koldan daha fazla bacaklarda ilerleyen proksimal güçsüzlük ile karakterizedir. Bacaklardaki zayıflıktan kaynaklı olarak ileriki dönemlerde tekerlekli sandalyeye ihtiyaç duyulabilmektedir. Tip 2 SMA'lı hastalardan farkı ise bu bireyler genel olarak skolyoz komorbiditelerden kurtulmalarının yanı sıra solunum kas zayıflıkları çok azdır. Hasta bireyler genomlarında 3 veya 4 SMN kopyası içermektedir (Zerres & Davies, 1999).

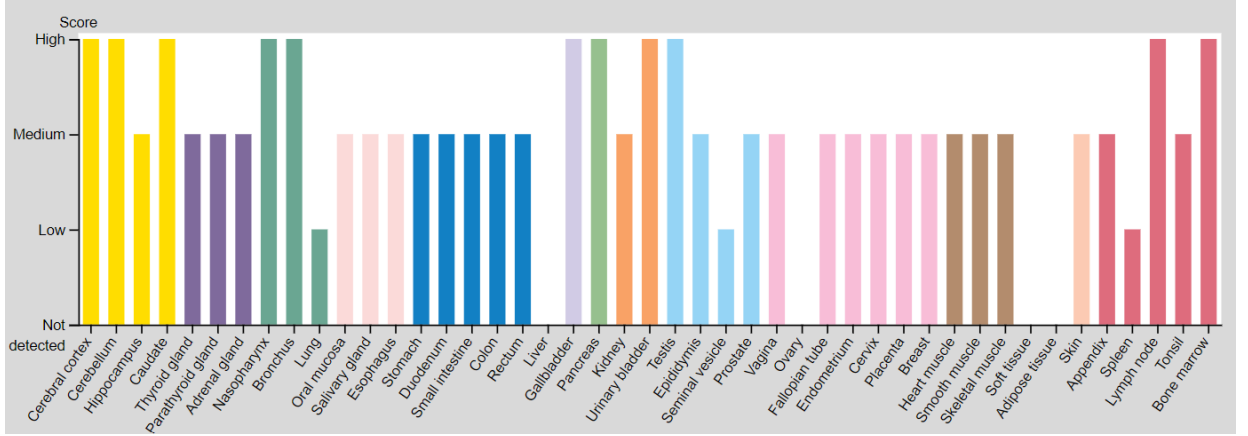
SMA tip 4, alt tiplerin en hafif sınıfıdır. SMA tip 4 ise proksimal yetişkin tip olarak sınıflandırılmakta ve vakaların %5'inden az bir kesimini temsil etmektedir. Hastalık başlangıcı ve seyri yavaş ilerlemektedir. SMA tip 3 ile benzerlik göstermektedir. Hastalık başlangıcı yetişkinlik döneminde ortalama 30 yaş ve üzerinde kendini göstermektedir. Ancak genç yaşlarda da ortaya çıkabilmektedir. SMA Tip 3 ve 4 hastaları bağımsız olarak yürüyebilmekte ve genellikle yetişkinlik öncesi hayati faktörler olmaksızın değişken klinik seyir göstermektedir (Messina, 2018).



Şekil 5: Spinal Musküler Atrofi Tip 3 (Kolb & Kissel, 2015)

2.1.4. SMA Moleküler Mekanizması

SMA hastalığı, SMN proteininin fonksiyonel olmayan ekspresyonu ile meydana gelen genetik bir hastalıktır. Hastalığın moleküler mekanizmasında telomerik SMN1 ve sentromerik SMN2 genleri sorumludur (Aguti vd., 2018; Arnold & Fischbeck, 2018). SMN proteini eksikliğinde motor nöron hücre kaybı gerçekleşmektedir. SMN proteini sitoplazma, nükleoplazma ve nükleer Cajal cisimciklerinde eksprese edilmektedir. RNA metabolizmasının çeşitli aşamalarında görev alan protein vücutta neredeyse her yerde eksprese edilmektedir. SMN proteini, spliceozomal küçük nükleer ribonükleoproteinler (snRNP'ler) ve mRNA metabolizmasında kritik bir göreve sahip SMN kompleksinin temel bileşenidir (Franco-Espin vd., 2022). Hem sitoplazmada hem de nükleusta eksprese edilen SMN proteini **Şekil 6**'da gösterildiği gibi neredeyse vücudun her yerinde ekspresyonu gerçekleştirilmektedir (Tissue expression of SMN1 - Summary - The Human Protein Atlas, t.y.).



Şekil 6. SMN proteinin eksprese olduğu dokuların gösterimi (Tissue expression of SMN1 - Summary - The Human Protein Atlas, t.y.)

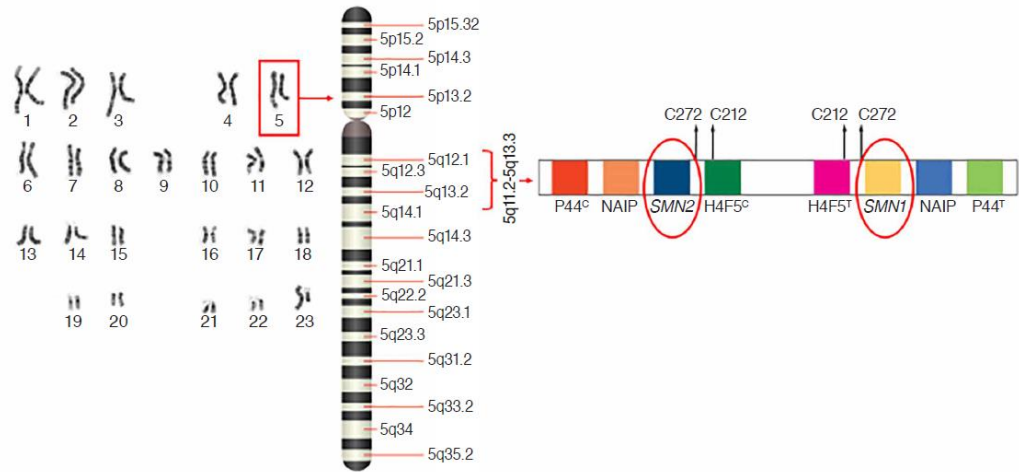
Vücudun her yerinde ekspresyon profiline sahip olan SMN proteini en fazla spinal motor nöronlarda eksprese edilmektedir. SMN proteini 38kDa büyüklüğünde polipeptit yapıdadır. SMN proteininin fonksiyonel olarak işlevi halen araştırılmakta ve henüz detaylıca aydınlatılamamış olsa da RNA bağlayıcı proteinler ile etkileşime girdiği, mRNA'ların ve kodlamayan RNA'ların olgunlaşmasında görevli olan spliceosome kompleksinin oluşumunda moleküler açıdan oldukça önemli olduğu bilinmektedir (Ross & Kwon, 2019; Schorling vd., 2020). SMN proteini bunların yanı sıra snRNP biyogenezi, translasyon, transkripsiyon, hücresel stres granüllerinin oluşumu ve hücresel makromoleküllerin iletimi gibi pek çok hücresel hayati aşamada rol oynamaktadır (Singh ve ark., 2017). SMN proteininin eksprese edilememesi sonucunda, alt motor nöronlarda ön boynuz hücrelerinde ve omurilikte beyin sapı çekirdeğinde geri dönüşü olmayan kayıp meydana gelmekte ve bu durum daha fazla kas atrofisine neden olmaktadır (Prior vd., 2009).

SMN1 geninin her iki aleli üzerinde gerçekleşen nokta mutasyonları ve heterozigot delesyonlar SMA hastalarının yaklaşık %5'lik; homozigot delesyonlar ise hastaların yaklaşık olarak %95'lik yüksek oranda bir kısmını kapsamaktadır. SMN1 geninde ekzon 7 katılımı gerçekleşmemesi sonucunda fonksiyonel olmayan, kesikli yapıda SMN protein üretimi gerçekleşmektedir. SMN1 geninden meydana gelen mRNA transkriptlerinden tam uzunlukta fonksiyonel SMN protein ekspresyonu gerçekleştirilmekte; SMN2 geninden meydana gelen mRNA transkriptlerinde düşük oranda fonksiyonel SMN proteini ekspresyonu gerçekleştirilmektedir. SMN2 geni üzerinden eksprese edilen kesik ve stabil olmayan yapıdaki SMN proteini SMN Δ 7 (delta

SMN) olarak adlandırılmaktadır. SMN proteinin fonksiyonelliğini kaybetmesinin sebebi ise ekzon 7'nin mRNA işlenmesi aşamasında katılamaması ile ilişkilidir (M. A. Passini vd., 2011; Ross & Kwon, 2019; Schorling vd., 2020). Ekzon 7 tarafından kodlanan 16 amino asitlik bir bölge SMN proteinin oligomerizasyonu ve stabilitesi için kritik rol oynamaktadır. Bu bölge sayesinde SMN proteinin katlanması gerçekleşerek işlevsel özellik kazanmaktadır (Lorson ve ark., 1999).

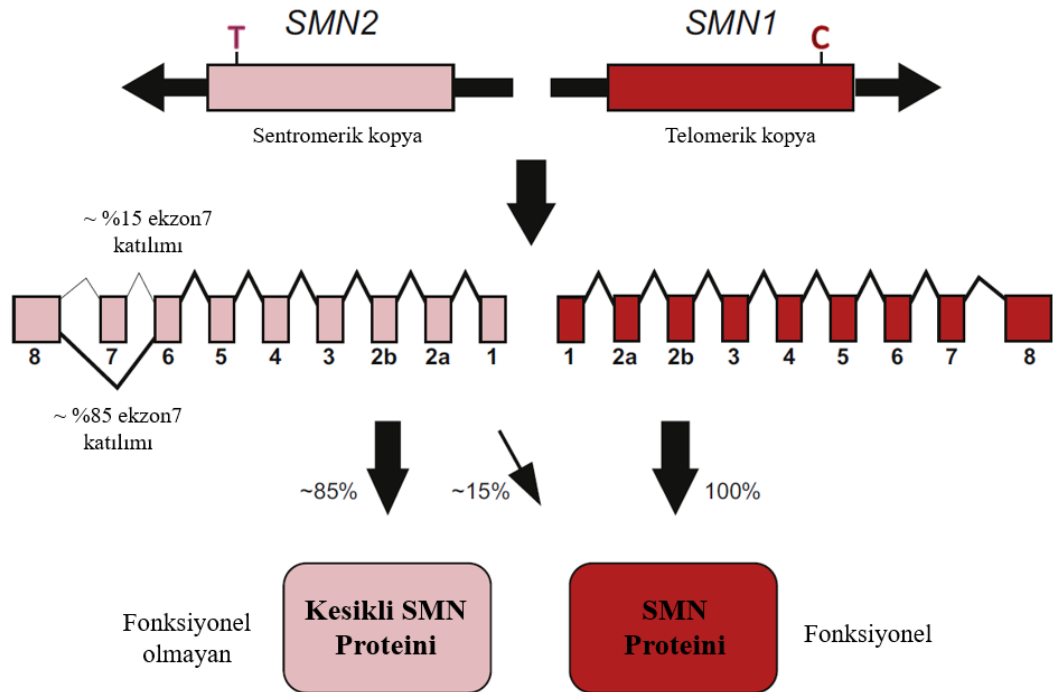
2.1.5. SMN1-SMN2 Gen Bölgeleri

SMN protein üretiminden sorumlu ve SMA hastalığı ile ilişkili SMN1 ve SMN2 olmak üzere iki gen bölgesi mevcuttur. **Şekil 7'**de de gösterildiği gibi her iki gen bölgesi de kromozomun 5q kolunda yer almakta; SMN1 geni 5q11.2; SMN2 geni 5q13.3 pozisyonunda yer almaktadır (Rao vd., 2018). Biyolojik olarak aktif olmayan analog SMN2 geni SMN1 geninden yalnızca 11 nükleotit farklılığa sahiptir (Lorson vd., 1999).



Şekil 7: SMN1 ve SMN2 genlerinin kromozom üzerindeki lokasyonlarının gösterimi (Rao vd., 2018)

SMN1 genine neredeyse identik sayılan SMN2 geninin en büyük farkı ise 840. Nükleotit üzerinde meydana gelen C-T dönüşümüdür. Meydana gelen bu dönüşüm sonucunda ekzon 7 katılımı engellenmektedir. Ekzon 7 katılımının engellenmesi sonucunda ise ekzon 7 üzerinde işlevsel exon splicing enhancer (ESE) bir exon splicing silencer'a (ESS) dönüşmektedir. Bu dönüşüm ile splicing aşamasında görev alan elemanların bağlanma bölgelerine bağlanması engellenmekle beraber fonksiyonel SMN protein ekspresyonu sağlanamamaktadır. Bu süreç sonunda ise kesikli ve stabil olmayan yapıda, işlevsiz SMN proteini eksprese edilmektedir (M. Farrar vd., 2009; Valetdinova vd., 2019). **Şekil 8**'de gösterildiği gibi 840. nükleottide meydana gelen C-T dönüşümü ile SMN2 geninde ekzon 7 katılamaması sonucunda %80-95 oranında fonksiyonel olmayan SMN proteini üretilmektedir. Üretilen transkriptlerde %10-15 oranında fonksiyonel SMN protein ekspresyonu gerçekleşmektedir (Cartegni vd., 2006).



Şekil 8. SMN1 ve SMN2 genlerinin mRNA transkriptlerinin şematik gösterimi (Kolb & Kissel, 2015)

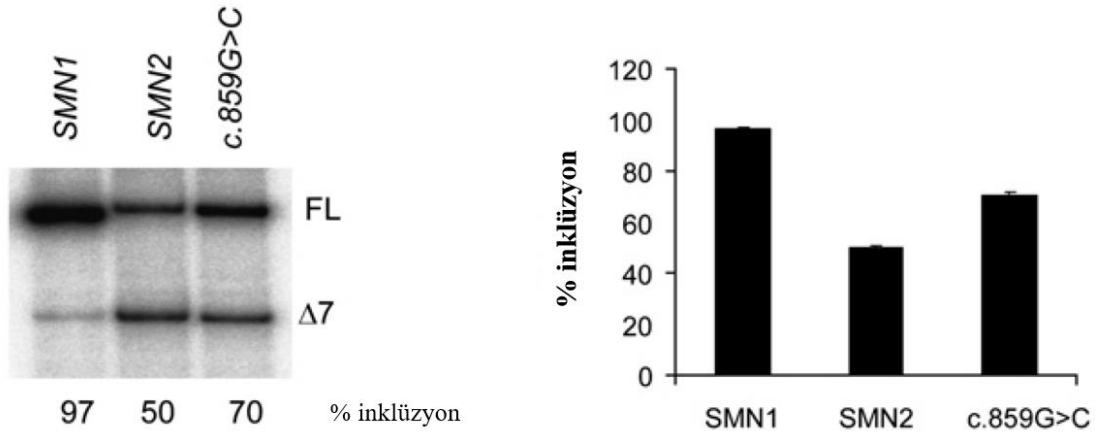
2.1.6. SMN2 Geni ve Hastalığa Etkisi

Yapılan çalışmalardan birinde genotip-fenotip analizleri sonucunda SMN2 kopya sayısı ile hafif fenotip arasında bir ilişki olduğu tespit edilmiştir (Mailman vd., 2002). SMN2 her ne kadar SMA hastalığının şiddeti ile ilişkili olsa da tek fenotipik belirleyici de olmadığı bilinmelidir. 2009 yılında Prior ve arkadaşları hafif 3b fenotipinde ve 2 SMN2 kopya sayısına sahip 3 yetişkin hasta ile bir çalışma yapmıştır (Prior vd., 2009). Bu çalışmada tam uzunlukta SMN proteinin artışı ile hastalığın hafif seyri ve fenotipi arasında bir korelasyon bulunmuştur. Bu korelasyonun ise ekzon 7 üzerinde bir ESE oluşumunu indükleyen c.859 G>C dönüşümü sonucu artan tam uzunlukta SMN protein ekspresyonu ile gerçekleştiği belirlenmiştir (Wirth vd., 2006). c.859 G>C dönüşümünün (p.Gly287Arg varyantı) fenotip üzerinde olumlu bir modifiye edici etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Reed & Zanolini, 2018; Vezain vd., 2010). 859. Nükleotitteki G>C dönüşümü sonucu arjinin amino asitinin glisin amino asidine dönüşmektedir. Bu amino asit değişikliği amino asit yapısı için önem arz etmekte ve SMN proteininin üç boyutlu konformasyonunun değişimine sebep olmaktadır. Yapılan çalışmalarda c.859G>C varyantının ekzon 7 katılımını artırarak SMA klinik seyrini iyileştirdiğine yönelik kanıtlar yer almaktadır. Bu varyantın tespiti, SMA hastalığının klinik şiddetini etkileyebilecek genetik varyasyonların anlaşılmasındaki öneme dikkat çekmektedir. Hem potansiyel hedeflemede hem de teşhis aşamalarında bu ilişkiler oldukça önemlidir. SMA'daki genotip-fenotip korelasyonlara ait değerli bilgiler sağlamakla birlikte hastalığın moleküler mekanizmasının da anlaşılmasına ışık tutmaktadır (Vezain vd., 2010). Hastalık fenotipi ve SMN2 kopya sayısının ilişkisine dair ihtimalin en düşük olacağı hasta popülasyonu SMA tip 1 hastalarıdır. Bu hastalarda yalnızca iki SMN2 kopyası olduğu için hastalığın hafif seyretme ihtimali düşük bir olasılığa sahiptir (Feldkötter vd., 2002).

Ekzonların splicing mekanizması doğru çalışabilmesi için çoklu intronik ve ekzonik cis etkili regülatör elementlere ihtiyaç duymaktadır (Cartegni vd., 2002; Pagani, 2003). Ekzonik splicing düzenleyici elemanlar trans-etkili faktörler tarafından tanınmaktadır. Genel olarak ESE ve ESS olarak isimlendirilmektedir. ESE'ler splicing mekanizmasını uyaran ve intron çıkarılması için gerekli elemanlarken; ESS'ler genel olarak splicing mekanizmasının inhibe edilmesinde rol oynayan elemanlardır. Çoğu ESE, splicing faktörlerinden olan serin/arjinin amino asitleri açısından zengin olan SR proteinleri için bağlanma bölgesi konumundadır. Çeşitli temel spliceosomal bileşenleri toplayarak splicing mekanizmasını desteklemektedir. Splicing aşamasında görevli her bir

SR proteini farklı fonksiyonel dizi motiflerini tanımaktadır. Prior vd. yaptığı çalışmada doğal tip ve c.859 G>C dönüşümü olan ekzon 7 bölgelerinde SR proteinleri için dört farklı motif matrisi (SF2/ASF, SC35, SRp40 ve SRp55) incelenmiştir. Sonuç olarak c.859 G>C dönüşümünün yeni ve yüksek puanlı güçlü bir SF2/ASF motifi oluşturduğunu keşfetmişlerdir (Prior vd., 2009).

SMN2 geninde ekzon 7’de meydana gelen G>C dönüşümü bir SF2/ASF-ESE’yi bozmakta veya bir hnRNP A1-ESS oluşumuna neden olarak SMN ekspresyonu engellenmektedir (Cartegni vd., 2006; Kashima, Rao, David, vd., 2007; Kashima, Rao, & Manley, 2007; Vezain vd., 2010). **Şekil 9’**da gösterildiği gibi doğal tipe kıyasla 859. nükleotitte meydana gelen G>C dönüşümünün tam uzunlukta SMN proteini ekspresyonunu ~%20 oranında artırdığı ve ekzon 7 katılımını önemli derecede geri kazandırabildiği tespit edilmiştir. Mutant dizi tarafından oluşturulan yeni ve güçlü SF2/ASF motifi sayesinde tam uzunlukta SMN protein ekspresyonunun artışa geçtiği ve daha hafif hastalık fenotipi ile seyrettiği tespit edilmiştir. Bunu da bir ESE oluşturarak veya ESS’yi bozarak yapabileceği öne sürülmektedir.



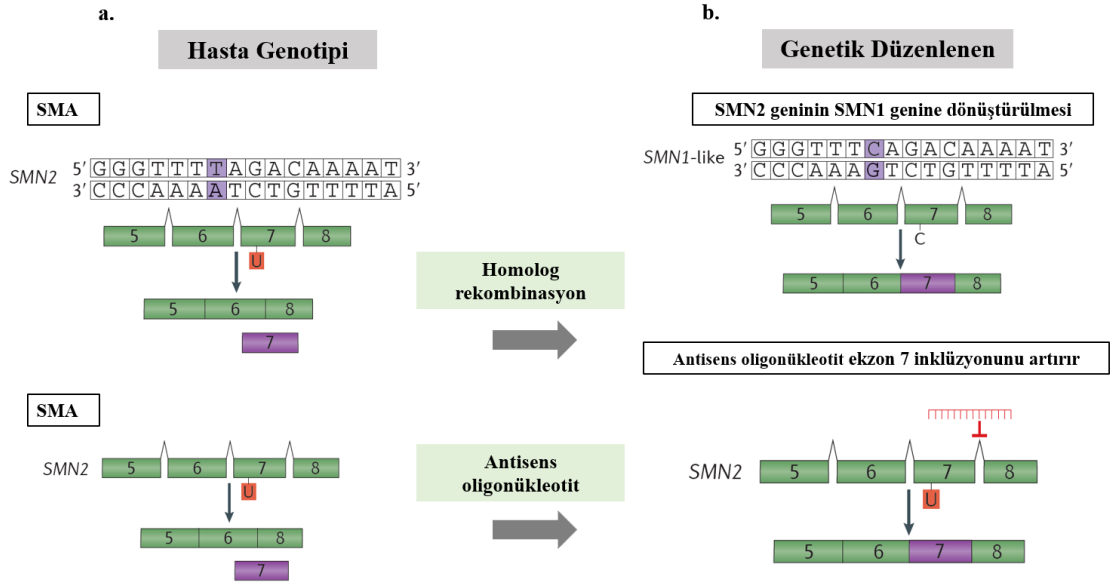
Şekil 9: SMN2 minigen c.859G>C, doğal tip SMN2 minigene kıyasla pre-mRNA splicing aşamasında ekzon 7 katılımının gösterilmesi (Prior vd., 2009)

2.1.7. SMA’da Genetik Tedavi Çalışmaları

SMN1 geninde meydana gelen delesyonlar veya mutasyonlar sebebiyle ortaya çıkan, kas kaybı ve motor nöron kaybı ile karakterize ölümcül bir hastalık olan SMA hastalığı için birkaç farklı alanda gen çalışmaları yapılmış ve halen yapılmaktadır. Adeno İlişkili Virüs (AAV) tabanlı SMN1 geninin aktarımına dayalı gen terapi stratejileri ile SMA’nın bir SMA fare modelinde ve klinik çalışmalarda sonuçları olumlu bulgular elde edilmiştir (Duque vd., 2009; Foust vd., 2009).

Biyolojik olarak aktif olmayan, analog SMN2 geni ekzon 7 silencer (susturucu) bölgesinde tek bir baz çifti değişikliğine sahiptir. Silencer bölgesinde meydana gelen bu değişiklik protein ifadesinde kayba sebep olmaktadır (Faravelli vd., 2015). SMN2 geninde meydana gelen susturucunun SMN1 genindeki diziye çevrilmesinin SMA hastalık fenotipinin iyileştirildiğine işaret etmektedir. DiMatteo ve ark yaptıkları çalışmada oligonükleotitler kullanarak homolog rekombinasyon ile SMN2 geninin sekansını SMN1 sekansına dönüştürmüştür (**Şekil 10a**) (Nelson vd., 2017). Bir diğer çalışmada ise motor nöronlara farklılaştırılan hastadan türetilen iPSC’lerin SMA fare modelinde yaşam döngüsünü ve fenotipi iyileştirdiği gösterilmiştir (Corti vd., 2012).

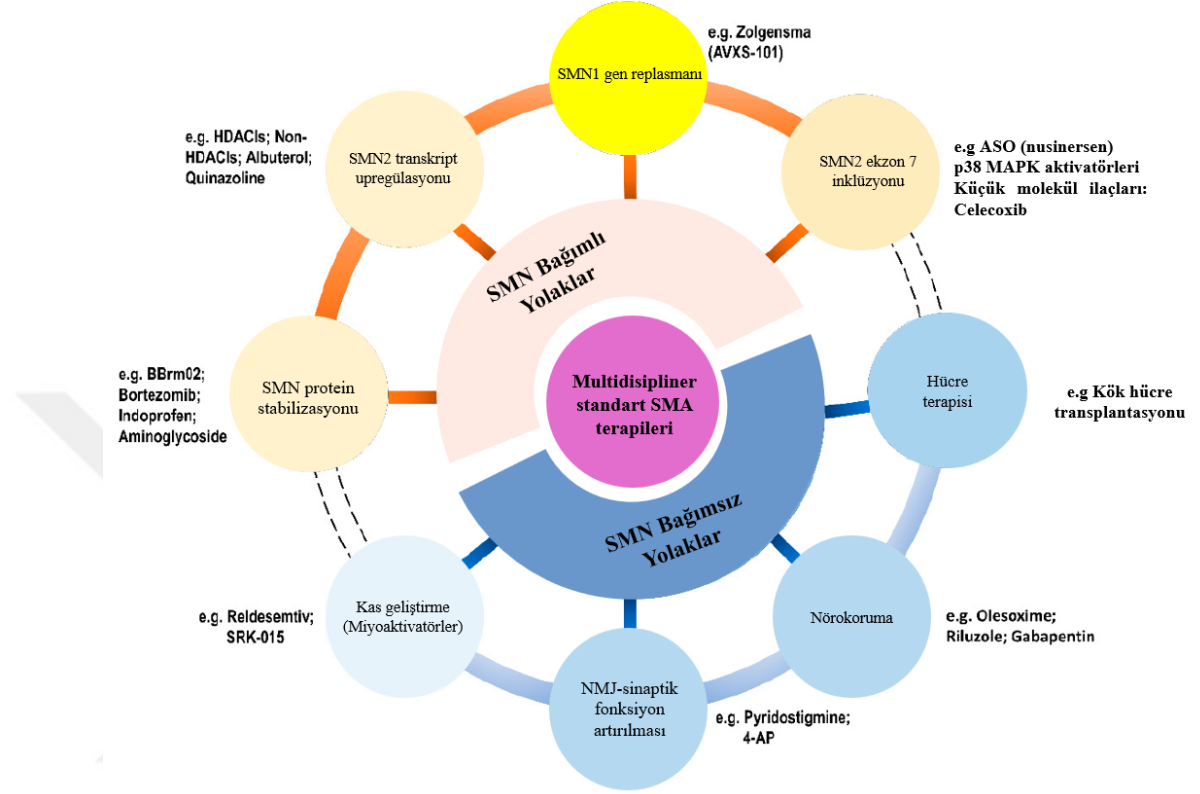
Antisens oligonükleotitler ve morfolinoların kullanıldığı bir başka çalışmada mRNA seviyesinde SMN2 inklüzyonunun sağlanarak farelerin CNS’de (Central nervous system) SMN proteininin artışı sağlanmıştır (**Şekil 10b**) (M. A. Passini vd., 2011; Porensky vd., 2012).



Şekil 10. SMA için genom mühendisliği. a| SMN2 geninin oligonükleotit aracılı rekombinasyon ile SMN1 genine dönüşümü ile sağ kalımın artışı. b| Splicing aşamasında SMN2 ekzon 7 inklüzyonunun indüksiyonu için antisens oligonükleotitlerin kullanımı (Nelson vd., 2017)

Bugüne kadar SMA hastalığı için U.S Food and Drug Administration (FDA) onaylı; Biogen Nusinersen (Spinraza®), Novartis Onasemnogene Abeparvovec-xioi (Zolgensma®) ve Risdiplam (Evrysdi™) olmak üzere üç ilaç bulunmaktadır. Bu ilaçların tedaviye yönelik ciddi olumlu sonuçları olsa da tedavilerin maliyetleri oldukça yüksektir. Bunun yanı sıra uzun vadeli etki ve yan etkileri konusunda net bir kanıya varılamamıştır. Tüm bu bilinmezlikler ve yüksek maliyet sebebi ile SMA tedavisine ihtiyaç duyan hastaların tedavi başarıları olumsuz yönde etkilenmektedir. Yüksek tedavi maliyetinin yanında skolyoz veya omurga deformasyonuna sahip hastalar için ilaç uygulamaları daha güç ve profesyonel bir çalışma ekibi gerektirmektedir. Skolyoz SMA hastalarında genel bir semptom olduğu için çoğu hastada tedaviler yüksek verimde olmamaktadır. Güncel olarak çeşitli terapötik yaklaşımlar geliştirilmekte olup halen maliyet konusunda genel anlamda bir iyileştirilmeye gidilmemektedir (Chong vd., 2021).

Genel anlamda bakıldığında SMA hastalığında mevcut olan terapötik stratejiler SMN-bağımlı terapiler ve SMN-bağımsız terapiler olmak üzere ki kategoriye ayrılmakta ve bu kategoriler daha sonra sekiz farklı dala ayrılmaktadır (Şekil 11).



Şekil 11. SMA hastalığında terapötik yaklaşımlar (Chen, 2020).

Hasta genotipinde meydana gelen SMN1 delesyon veya mutasyonu sonucu SMN2 geni üzerinden üretilen SMN protein ekspresyonu sağlanmaktadır. Bu bağlamda SMA tedavisinde genel olarak yaklaşımlara bakıldığında SMN2 geni terapötik bir hedef haline gelmektedir (Feldkötter vd., 2002). Bunun yanı sıra yapılan çalışmalar ile SMN protein eksikliğinin motor nöronlar, merkezi sinir sistemi içerisinde yer alan hücreler, pek çok sayıda periferik organ ve nöronal olmayan dokuları da kapsayacak boyutta patojenik etkilere sahip olduğu tespit edilmiştir. Bununla ilişkili olarak klinik öncesi modellemelerde ve hastalık sürecindeki patolojik değişimlere bakıldığında kardiyovasküler sistem, bağışıklık sistemi ve gastrointestinal sistem gibi pek çok sisteme değişiklikler tespit edilmiştir. SMA’da klinik öncesi ve klinik çalışmalarda potansiyel terapötik ajanlar özetlendiği bir şekilde gösterilmektedir (Şekil 11). SMA’da terapötik yolların geliştirilmesinde, hastalığın altında yer alan SMN-bağımlı ve SMN-bağımsız

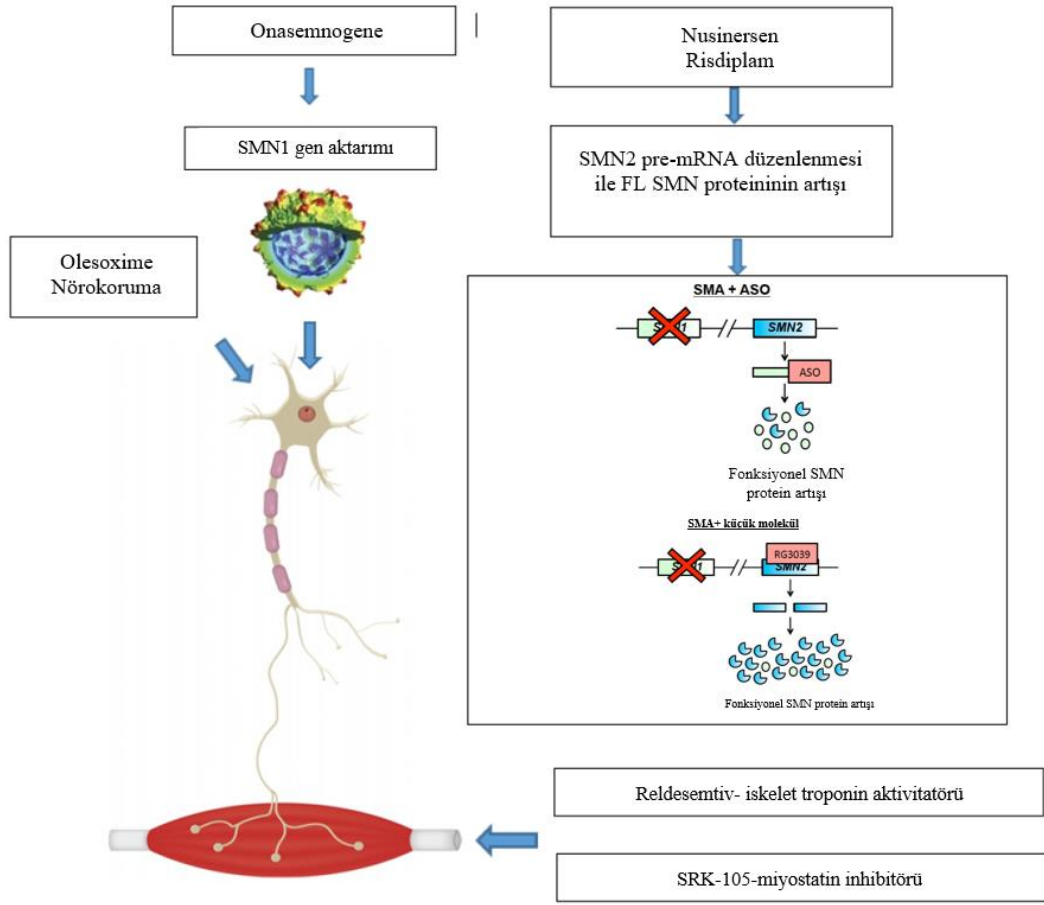
yolakların karakterizasyonu ve açığa çıkarılması kritik rol oynamaktadır. Tüm bu terapötik yaklaşımlar arasında, viral vektörler tarafından splicing veya replacing (yer değiştirme) modüle edilerek fonksiyonel ekzojen FL SMN2 geninin upregüle edilmesinin gerçekleştirilmesi en umut verici klinik verilere sahip strateji olarak yer almaktadır (Mendell vd., 2017). SMN-bağımlı terapilerin yanında nöroprotektif ajanlar, miyostatin inhibitörleri, iskelet kası troponin aktivatörleri ve kök hücre tedavisi gibi tedaviler de bu kategoride yer almaktadır (Wadman vd., 2020). SMA hastalığındaki geliştirilen tedaviler, diğer benzer sınıftaki genetik motor nöron hastalıkları için de altyapı oluşturmaktadır.

SMN-bağımlı terapötik yaklaşımlara bakıldığında zaman SMN1 hedef alan strateji SMN2 hedef alan diğer üç stratejiden ayrılmaktadır. SMN2 geni terapötik stratejiler için oldukça iyi bir hedef konumundadır. SMN2 hedef alan terapötik stratejiler; promotör aktivasyonu ile SMN2 transkripsiyonunun artırılması, ekzon 7 katılımı, SMN protein translasyonunun modüle edilmesi ve SMN protein degradasyonunun engellenmesi gibi yaklaşımları içerirken SMN1 genini hedef alan stratejiler ise SMN1 geninin viral vektörler ile aktarımını içermektedir (**Tablo 2**).

Tablo 2. Spinal musküler atrofide yeni terapötik yaklaşımlar: güncel klinik ve prelinik denemeler

Terapötik Yöntemler	Patolojik	Terapötik Hedefler	Terapötik Ajanlar	Deneme Durumları (Tamamlanmış veya devam eden) /Sonuçlar
SMA-bağımlı	<i>SMN1</i> mutasyonu	<i>SMN1</i> değişimi	Zolgensma (AVXS-101)	FDA-Approved
	<i>SMN2</i> mRNA'sının alternatif splicingi	Ekzon 7 inklüzyonunun indüklenmesi	Nusinersen (Spinraza) Risdiplam (RG7916) Branaplam (LM1070)	Nusinersen: FDA-onaylı Risdiplam: devam eden faz 2/3 placebo-kontrollü; yaklaşan FDA-onay Branaplam: devam eden faz 1/2 açık etiketli
	Tam uzunlukta <i>SMN</i> mRNA artışı	<i>SMN2</i> transkriptlerinin upregülasyonu	HDACIs, e.g., PBA, VPA, Non-HDACIs: Hydroxyurea Celecoxib Quinazoline (RG3039) Albuterol Prolactin	PBA: placebo-kontrol tamamlandı; negatif VPA: placebo-kontrol tamamlandı; negatif Hydroxyurea: placebo-kontrol tamamlandı; negatif Celecoxib: devam eden faz2 açık etiketli Quinazoline: askıya alındı Albuterol: tamamlandı open-label; pozitif ama kontrollü deneme dataları eksik Prolactin: prelinik
	SMN protein degradasyonu	SMN protein stabilize edilmesi	Aminoglycoside Bortezomib BBrm02 Indoprofen polyphenols	Hepsi prelinik aşamada
	Anabolik abnormaliteler	Kas güçlendirici ajan (Miyoaktivatörler)	SRK-015 Reldesemtiv (CK-2127107) BIIB110 (ALG 801) Follistatin	SRK-015: devam eden faz 2 open-label Reldesemtiv: Faz 2 tamamlandı placebo-kontrollü; askıda BIIB110: devam eden faz 1a Follistatin: prelinik
SMA-bağımsız	Nöromusküler bağlantı defektleri	Nörotransmitterlerin geliştirilmesi	Pyridostigmine (Mestinon) 4-aminopyridine (4-AP)	Pyridostigmine: placebo-kontrollü deneme tamamlandı; askıda 4-aminopyridine: completed placebo-kontrollü deneme; askıda
	Motor nöron kaybı	Nörokoruma	Riluzole Gabapentin Olesoxime (TRO19622)	Riluzole: açık-etiketli tamamlandı; negatif Gabapentin: placebo-kontrollü deneme; negatif Olesoxime: askıda

Son dönemlerde FDA onaylı ASO Nusinersen, onasemnogene abeparvovec (ZOLGENSMA) ve oral yolla alınan Risdiplam ilaçları SMA tedavisinde kullanılmaktadır (**Şekil 12**). Faz II ve III klinik çalışmalardaki verilere bakıldığında umut verici sonuçlar elde edilmektedir. Bu bağlamda diğer terapötik yaklaşımların da klinik uygulamalarda önü açılmaktadır (Messina & Sframeli, 2020).



Şekil 12. Ana terapötik yaklaşım ve mekanizmaları (Messina & Sframeli, 2020)

SMA için FDA onaylı ilk ilaç olan Nusinersen, ekzon 7 katılımlarını sağlayan bir çeşit Antisens Oligonükleotittir (ASO). SMN2 intron 7 bölgesinde bir intronik ekleme susturucusu N1 (ISS-N1) dizisi yer almaktadır. Nusinersen ISS-N1'e bağlanarak bu motifi inhibe etmekte ve ekzon 7'nin SMN2-mRNA'sına katılımını desteklemektedir. Bu katılım ile farklı deney modellerinde SMA fenotiplerinin de iyileştirildiği, sağkalım ve patolojide tedavinin ileri gittiği sonuçlar tespit edilmiştir. Bunun yanında fonksiyonel SMN protein translasyonunun da gerçekleştirildiği sonuçlar arasında yer almaktadır (Porensky vd., 2012). Nusinersen faz 1 denemesi SMA hastalarının beyin omurilik sıvısı (BOS) boşluğuna verilerek 2011'de gerçekleştirilmiştir (Chiriboga vd., 2016). Faz 3 çalışması ise plasebo kontrollü olarak yapılmış (ENDEAR) ve tip 1 SMA bebeklerde motor fonksiyonlar, sağkalımda önemli bir ilerleme kaydedilmiştir (Finkel vd., 2017). ASO'lar kan beyin bariyeri (KBB) geçemeyen moleküllerdir. Bu nedenle de tüm klinik çalışmalarda nusinersen, ilk yükleme periyodunda (initial loading period) iki ayda dört

kez, devam periyodunda (maintenance period) ise dört ayda bir intratekal olarak uygulama yapılmıştır. Bugüne kadar dünya çapında pek çok SMA hastası nusinersen tedavisi görmüştür. Ancak 750.000\$ gibi yüksek bir fiyata sahip olması ve uzun vadede etkinliğinin belirsizliği gibi limitasyonlar mevcuttur. Bunun yanında nusinersen ömür boyu tekrarlayan intratekal uygulamaları gerektiren süreklilik isteyen bir tedavidir.

SMN2'nin hedeflendiği yaklaşımların aksine, SMN1 geninin nöral hücrelere aktarılmasını kapsayan bir terapi yaklaşımı da mevcuttur. İlk AAV9-SMN1 gen terapisi olan Zolgensma (AVXS-101 veya onasemnogene abeparvovec), doğal tip SMN1 geninin motor nöron hücrelerine adeno-ilişkili virüs (scAAV9) aracılığı ile aktarımına dayanan SMN1 gen replasman terapisi. SMN1 komplementer rekombinant DNA'sını taşıyan AAV9 vektörü, KBB'ni geçebilmekte ve motor nöronların %60'ını enfekte edebilmektedir. Bunların yanında bu yaklaşımın tek seferlik enjeksiyon gerektirmesi ve bunun sistemik SMN protein ekspresyonunu sağlaması gibi avantajları da mevcuttur. *In vivo* çalışmalarda SMN protein ekspresyonunun sürekli olarak devam ettiği ve tedavi edilen SMA'lı farelerin sağkalım sürelerinin de bu oranda artış gösterdiği tespit edilmiştir (Le vd., 2011). Tüm bu avantajların ve olumlu bulguların yanında insan SMN proteinini eksprese eden AAV vektörlerinin yüksek dozda intravenöz olarak uygulanmasında primat ve domuz yavrularında akut hepatoksisite ve duyuşal nöron toksisitesi gibi bulgular bildirilmiştir. Zolgensma uygulamaları için güvenlik ve tolere edilebilirlik oldukça kontrollü bir şekilde takip edilmelidir (Hinderer vd., 2018). Uygulama sonrası oluşan ve gözlemlenen toksisitenin bir diğer nedeninin ise SMA popülasyonunda önceden sahip olunan AAV9 antikorunun varlığından kaynaklanacağı da çalışmalarda yer almaktadır (Sproule vd., 2017). FDA son dönemdeki güvenlik sorunları sebebiyle 2-5 yaş arasındaki SMA hastalarında intratekal Zolgensma uygulamalarını kısmi olarak durdurmuştur. AAV9 tabanlı gen tedavisinde bir diğer sorun ise SMN protein ekspresyonunun her yerde eksprese edilmesi sonucunda, RNA-protein ve protein-protein etkileşimleri ile esansiyel RNA ve protein yapılarının spesifik olmayan şekilde ayrılmasıdır. Viral partiküllerin vücutta yetersiz aktarımı ve oluşabilecek immün yanıtın kaynaklı olarak SMN1 gen replasman terapisi konusunda endişeler halen devam etmektedir (Colella vd., 2018).

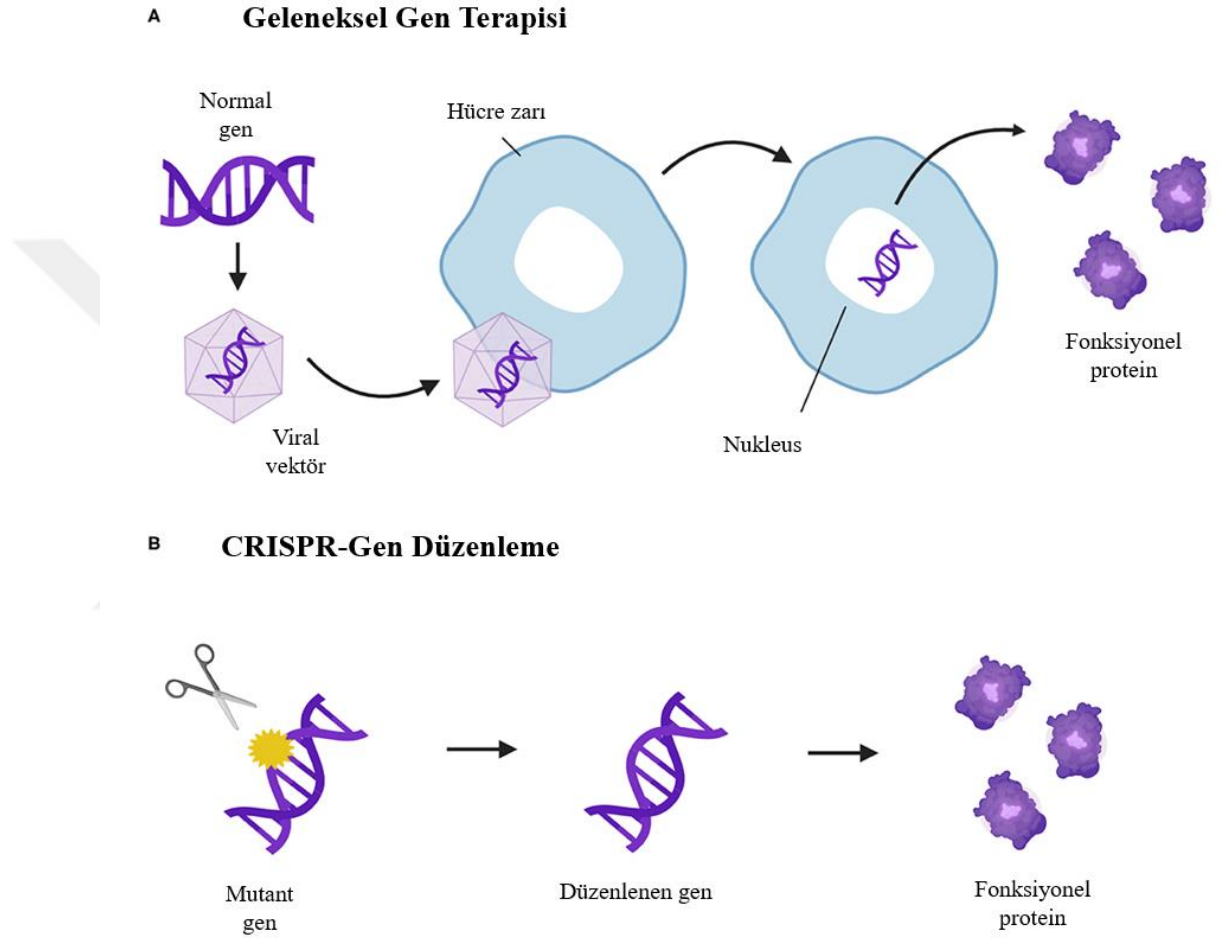
Küçük yapıli molekül bir ajan olan RG7800 yani Risdiplam, oral yolla alınan ilk SMA ilacıdır. Eski adları ile RO703406 ve RG7916, SMN2 pre-mRNA molekülündeki intron 7 5' splice site ve ekzon 7'nin ESE-2 olan iki bölgesine spesifik olarak

bağlanmaktadır. Küçük yapıdaki bu molekül SMN2 splicing mekanizmasına etki ederek SMN protein üretiminde artış meydana getirmektedir. Risdiplam mekanizmasında iki bölgeye bağlanma ile hedef dışı etkiler azaltılarak spesifite artırılmaktadır. Bu sayede tam uzunlukta SMN mRNA ve protein ekspresyon seviyeleri ile devam etmektedir. Yapılan *in vivo* çalışmalarda risdiplamın MSS ve periferik organlara ulaştığı ve SMA fare modellerinde sağkalımı artırarak SMN protein artışını gerçekleştirebildiği gösterilmiştir (Ratni vd., 2018). Tüm bunların aksine maymunlar ile yapılan çalışmalarda hedef dışı retinal etkiler sebebi ile dozlama çalışmaları durdurulmuştur. Bir diğer çalışmada ise *in vivo*, *in vitro* ve insan farmakokinetik verilerinde benzer şekilde hedef dışı etkiler gösterdiği tespit edilmiştir (Kletzl vd., 2019; Ratni vd., 2018).

SMN-bağımlı terapötik yaklaşımlarda üç ana tedaviye ek olarak; branaplam, celecoxib, quinazoline gibi ajanlar ve aminoglikozid antibiyotikler, BBm2, bortezomib gibi SMN protein stabilizatörleri de yer almaktadır (Chen, 2020). SMN-bağımlı terapötik yaklaşımların paralelinde SMN protein ifadesini artırılmasına yönelik SMN-bağımsız terapötik yaklaşımlar da çalışılmaktadır. SMN-bağımlı terapötik yaklaşımlar kronik tip 3 ve tip 4 SMA hastalar için zorluklara sahiptir. Özellikle motor nöron kaybı olan kronik SMA formlarındaki hastalarda SMN protein ifadesinin down regülasyonu söz konusu olduğunda SMN-bağımsız terapötik yaklaşımlar önem kazanmaktadır. SMN-bağımsız terapötik yaklaşımlarda; nöroprotektif ajanlar, miyostatin inhibitörleri, iskelet kası troponin aktivatörü olan Reldesemtiv, nöromüsküler junction, sinaps veya nörotransmitterleri hedefleyen ajanlar ve kök hücre tedavisi gibi çeşitli yaklaşımlar yer almaktadır. Sistemik bir hastalık olan SMA için hem SMN-bağımlı hem de SMN-bağımsız yaklaşımlar önem arz etmektedir (Chen, 2020).

Geleneksel gen terapileri, kistik fibroz ve müsküler distrofi gibi çok çeşitli kalıtsal hastalıkları tedavi etme potansiyeline sahip olmakla birlikte hatalı genlerin doğru versiyonları ile değiştirerek veya bir vektör yardımı ile fonksiyonel proteinler üretilmesini sağlamaktadır (Colella vd., 2018). Ancak gen ekspresyon sisteminin bir boyut sınırı olmasından dolayı tüm gen çeşitleri vektörlere sığamamakta ve büyük genlerin paketlenip hücrelere iletiminde limitasyonlar bulunmaktadır (Niibori vd., 2020). Gen terapilerinde terapötik etkinliği sürdürülmesi için devamlı tekrar dozlarının gerekliliği söz konusudur. Bu durumda CRISPR tarafından oluşturulan gen düzenlemelerine ihtiyaç duyulmaktadır (**Şekil 13**). Gen terapileri kaynaklı bildirilen ölümler bu yöntemin güvenliği konusunda şüphelere sebep olmuştur. Örneğin, iki hasta, X'e bağlı miyotübüler miyopati için gen

terapisi sağlayan yüksek dozda AAV aldıktan sonra iki hastada karaciğer fonksiyon bozukluğu görülmesinin ardından hastalar hayatlarını kaybetmiştir. (“High-Dose AAV Gene Therapy Deaths”, 2020). Ornitin transkarbamilaz eksikliği için tasarlanmış bir gen terapisinin arter içi dozunun verilmesinden 4 gün sonra 18 yaşındaki bir hasta vefat etmiştir. Ölüm nedeninin ise geni taşıyan AAV vektörüne karşı gelişen şiddetli immün reaksiyon olduğu olarak raporlanmıştır (Sibbald, 2001).



Şekil 13. Geleneksel Gen Terapisi ve CRISPR tabanlı gen düzenleme sisteminin şemasal gösterimi

Genel anlamda SMA hastalığının tedavisine yönelik yaklaşımlara bakıldığında hedef dışı etkilerin varlığı oldukça yaygın görülmektedir. Tüm bu tedavilerin içerisinde kalıcı ve stabil bir tedavi henüz yoktur. Mevcut uygulanan ve FDA onaylı Zolgensma ilacında yer alan AAV bazlı stratejide AAV genoma entegre olmadığı için kalıcı bir tedavi olmamakla birlikte uzun yıllar süren stabil bir etkiye de sahip değildir. Tüm bunlar göz önünde bulundurulduğunda ise hem spesifik hem de genome entegre olmadan kalıcı ve stabil bir tedavi sürecini içeren CRISPR gen düzenleme sistemi ön plana çıkmaktadır.

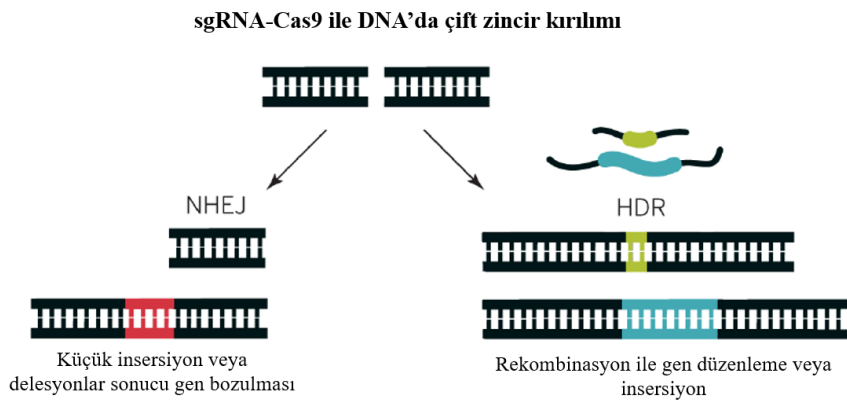
2.2. CRISPR Gen Düzenleme Teknolojisi

CRISPR sistemi çeşitli hücre ve organizmalarda tek veya çoklu hedef genlerin düzenlenmesi için kullanılmaktadır (Gupta & Musunuru, 2014). Dünyada pek çok genetik hastalığın temelinde genomda meydana gelen delesyon, insersiyon ve baz değişimleri yer almaktadır. Son dönemlerde yaygın olarak tercih edilen ve üzerine fazlaca araştırma yapılan yeni bir gen düzenleme teknolojisi "Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats" (Düzenli Aralıklarla Kümelenmiş Kısa Ters Palindromik Tekrarlar) ve "CRISPR-associated protein 9" (CRISPR ile İlişkili Protein 9) birleşiminden gelen CRISPR/Cas9 sistemi genomda meydana gelen değişikliklerin düzeltilmesini mümkün kılmaktadır (Hsu vd., 2014; Jinek vd., 2012). Bakteri, arke gibi pek çok prokaryotik canlı bakteriyofaj enfeksiyonuna ve plazmit transferine karşı CRISPR lokusları ve CRISPR ilişkili (cas) genleri tarafınca kodlanan RNA-aracılı adaptif bağışıklık sistemleri geliştirmiştir. CRISPR/Cas sistemi ilk olarak bakteri ve arkelerdeki adaptif bağışıklık sistemi olarak ortaya çıkan prokaryotik bir sistemin parçasıdır. Bu sistem C,G-T,A ve A,T-G,C transisyonlarının düzeltilmesinde kullanılabilmele beraber klinik çalışmalarda da uygulanmaktadır. CRISPR/Cas9 sisteminde prokaryotik canlılardaki bileşenler kullanılarak DNA üzerinde çift zincir kırılımı gerçekleşmekte ve kırık meydana gelen DNA bölgelerine cas9, cas12a gibi çeşitli cas nükleazlar ve rehber RNA (gRNA) aracılı olacak şekilde yönlendirilme gerçekleştirilmektedir (Yang vd., 2019).

CRISPR/Cas9 sisteminin temel bileşenlerine bakıldığında üç ana bileşen bulunmaktadır. Bunlar; CRISPR RNA (crRNA), Trans-activating CRISPR RNA (tracrRNA) ve Cas9 enzimidir. crRNA; CRISPR dizisinin üzerindeki hedef genetik bilginin taşınmasından sorumlu RNA molekülü olarak görev almaktadır. Bu RNA molekülü hedef DNA dizisine spesifik olarak bağlanmakta ve Cas9 enziminin doğru ve spesifik şekilde kesimi gerçekleştirmesine yardımcı olmaktadır. tracrRNA; CRISPR/Cas9 sisteminin çalışmasındaki verimin yüksek olmasını sağlayan bir RNA molekülüdür. tracrRNA crRNA ile birleşmekte ve Cas9 enzimi ile interaksiyon kurup hedef DNA'ya yönlendirmenin gerçekleştirilmesini sağlamaktadır. Bu yönlendirme ile kesim işlemi gerçekleştirilmektedir. Cas9 enzimi; bu sistemin ana bileşeni görevindedir. Bu enzim ile hedef DNA dizisinde kesim gerçekleştirilmektedir. Cas9 enzimi crRNA ve tracrRNA tarafınca yönlendirilmektedir. Hedef DNA dizisinde kesim bölgesine bağlanma gerçekleştirdikten sonra çift zincir kırığı (DSB) gerçekleştirerek kesim

meydana getirmektedir. Bu kesim sonrasında ise DNA tamir mekanizmaları devreye girerek istenilen genetik değişiklik de DNA'ya tanıtılmakta ve gerçekleştirilmektedir.

Bir genin fonksiyon, özelliklerinin gün yüzüne çıkartılması, hayvan ve bitki türlerinde çeşitli özelliklerin iyileştirilmesi ve hastalıklar için gerekli hayvan modellerinin oluşturulması için ilgili bir gen üzerindeki belirli bölgelerin değiştirilmesi yaklaşımı ideal bir standart olarak görülmektedir. Hedef bölgede meydana getirilen gen modifikasyonu terapötik uygulamalar için iyi bir potansiyele sahiptir. Belirli bir zaman önce homolog rekombinasyon aracılı embriyonik kök hücre (ES) modifikasyonunu içeren stratejiler sınırlı çeşitte organizmalarla yapılabilmekteydi. Çinko parmak nükleazları (ZFN), transkripsiyon efektör nükleazlar (TALEN) ve CRISPR ilişkili Cas gibi çeşitli nükleazlar genomdaki modifikasyonlar için daha basit ve ekonomik açıdan daha uygun bir seçenek sunmuştur (Kim & Kim, 2014). ZFN ve TALEN'lerin aksine CRISPR/Cas9 sistemi her bir hedef bölge için ayrı protein çifti mühendisliğini gerektirmemektedir. Bununla beraber RNA:DNA baz eşleşmelerine göre hedef diziye Cas9 nükleazı tanımlamaktadır. Bu nükleazlar hedeflenen genom bölgesinde bir DNA DBS neden olmaktadır. Kırıkların oluşumu rehber RNA (gRNA) üzerinde bulunan genellikle 18-20 nükleotitlik uzunluktaki dizi sayesinde gerçekleştirilmektedir. Bu kırılım ise homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) veya homolojiye yönelik onarım (HDR) yolundan birinin etkinleştirilmesi ile onarılmaktadır (Ma vd., 2014) (**Şekil 14**). Kırıklar tamir edilirken delesyon ve insersiyonlar gibi çeşitli modifikasyonlar da DNA'ya tanıtılarak gerçekleştirilmektedir (Marzec vd., 2020). Bu sistemin basitliği ve sadeliği ise çeşitli hücre, organizmalarda genom mühendisliği alanında devrim niteliğinde oluşundan gelmektedir.



Şekil 14. DNA tamir mekanizmaları (Doudna & Charpentier, 2014)

CRISPR/Cas9 sisteminin çalışma mekanizmasının adımları; hedef DNA'nın tanınması, hedef DNA'ya bağlanma, DNA kesimi, DNA onarımı ve genetik modifikasyonun gerçekleştirilmesi şeklindedir. İlk olarak genetik modifikasyonun yapılacak hedef DNA bölgesi gRNA tarafından tanınmaktadır. gRNA hedef DNA dizisinin komplementlerini içermekte ve Cas9 enzimi ile birleşerek bir kompleks meydana getirmektedir. Rehber RNA'nın Cas9 ile oluşturduğu kompleks hedef DNA'yı tanımaktadır. gRNA-Cas9 kompleksi hedef DNA üzerindeki protospacer bölgesine bağlanmayı gerçekleştirmektedir. Protospacer dizisinde hedef gen üzerinde kesimin gerçekleştirilmesini sağlayan alanları barındırmaktadır. Faj ve plazmitlerden gelen invaziv genetik elementlerin maruziyeti sonrasında yabancı DNA'ya ait kısa fragmentlerin konakçı DNA'sındaki CRISPR repeat-spacer bölgelerine entegrasyonu sağlanmaktadır. Bu entegrasyon ile konakçının bir sonraki zaman diliminde aynı istilaya uğraması bağışıklık sistemi tarafından engellenmektedir. Bağlanma sonrasında Cas9 enzimi hedef DNA üzerinde çift zincir kırılımı gerçekleştirerek çift sarmal yapısını bozmakta ve kesimleri gerçekleştirmektedir. Bu kesim hedef gen bölgesinde kırılıma yol açmaktadır. DNA üzerindeki kırılımın onarılması için tamir mekanizmaları devreye girmektedir. Kesilen DNA'nın onarımı için meydana gelebilecek iki farklı onarım mekanizması bulunmaktadır; non-homolog uç birleşimi (NHEJ) ve homolog rekombinasyon (HDR). NHEJ sisteminde DNA kırığı doğrudan onarılmakta ve kırık hızlı bir şekilde tamir edilmektedir. Ancak dezavantaj olarak bu onarım çeşidinde hatalı onarımlar gerçekleşebilmekle beraber baz çifti eklenmesi ve çıkarılması sebebiyle istenmeyen genetik değişiklikler meydana gelebilmektedir. HDR sistemi kırığın tamiri için kalıp DNA dizisi kullanımını gerektirmektedir. Kalıp DNA dizisi hücrenin içerisinde bulunan ve yapılmak istenen genetik değişikliği barındıran bir dizi olabilmektedir. HDR, NHEJ'e oranla daha doğru bir DNA onarımı gerçekleştirmektedir. Ancak NHEJ'e kıyasla daha kompleks bir süreçte sahiptir. DNA tamir mekanizmaları NHEJ ve HDR ile genetik olarak kalıcı değişiklikler meydana gelmektedir (Chatterjee & Walker, 2017).

2.2.1. SMA'da CRISPR Çalışmaları

CRISPR/Cas sistemlerinin kullanıldığı pek çok klinik öncesi gen düzenleme yaklaşımı literatürde yer almaktadır (Bjursell vd., 2018; Long vd., 2016; Maeder vd., 2019; Tabebordbar vd., 2016; Wu vd., 2019; Yin vd., 2016). Genetik mühendisliğine ve gen terapilerine yeni bir bakış açısı kazandıran CRISPR teknolojisi birçok genetik hastalığın tedavisine olanak sağlamaktadır. Literatürde yer alan bazı çalışmalar, SMA hastalığının CRISPR teknolojisi ile tedavisinin mümkün olduğunu kanıtlayıcı niteliktedir. CRISPR sisteminin kullanıldığı çalışmalarda SMN2 geni üzerinde yapılan bazı modifikasyonlarının SMN2 geni üzerinde ekzon 7 katılımını indüklediği gösterilmektedir. Bu yöndeki çalışmalar ile SMA hastalığının optimize edilen tedavi modelleri oluşturularak CRISPR sistemi ile çalışılabileceğini göstermektedir. SMA hastalığının tedavisinde CRISPR gen düzenleme teknolojisinin kullanıldığına dair umut verici pek çok çalışma yer almaktadır. CRISPR teknolojisini içeren klinik öncesi ve daha erken aşamadaki araştırmalar bulunmaktadır. Bu araştırmalar SMA hastalığında terapötik bir yaklaşım olarak CRISPR/cas9 teknolojisinin potansiyellerinin ve etkilerinin ortaya koyulmasını hedeflemektedir.

Son dönemlerde SMN2 katılımını amaçlayan genom düzenleme yaklaşımları sıkça çalışılmaktadır. SMN2 ekzon 7 üzerinde yer alan C-T mutasyonunun geriye düzeltilmesi için farklı ekipler araştırma yapmıştır. Fonksiyonel ekzon 7 içeren ssODN SMA hastalarından elde edilen uyarılmış pluripotent kök hücrelere (iPSC'ler) ve SMA deri fibroblast hücre hattına transfekte edilmiştir. Genetiği değiştirilen bu hücre hatlarından üretilen motor nöronlar tarafından SMN ekspresyonunun arttığı ve patolojik fenotipin de aynı zamanda *in vitro*da iyileştiği tespit edilmiştir. Bunun yanında editlenen motor nöronların SMA modeli transgenik farelere transplantasyonu sonucunda da iyileşen fenotip takip edilmiştir (Corti vd., 2012). Zhou ve arkadaşları gen editlemenin etkinliğini artırmak için CRISPR/Cpf1 nükleaz sistemi ssODN donörü ile birlikte SMA iPSC'lere aktarmıştır. Sonucunda ise fonksiyonel SMN ekspresyonunda artış ve fenotipte iyileşme tespit edilmiştir (Zhou vd., 2018).

2017 yılına ait bir *in vivo* çalışma CRISPR/cas9 sisteminin SMA fare modellerinde SMN2 geninin modifikasyonunu gerçekleştirebildiğini göstermektedir. SMN2 geni hedeflenerek bu modifikasyon sonucu fonksiyonel SMN protein üretiminin artırılması asıl terapötik olarak hedeflenmiş ve protein artışı gerçekleştirilmiştir. Sonuçta tedavi edilen farelerdeki motor nöron fonksiyonlarının iyileştiği ve sağ kalımın önemli ölçüde artışa geçtiği gösterilmektedir (Li vd., 2020; Lin vd., 2020; Zhou vd., 2018).

Literatüre bakıldığında 2021 yılında yapılan bir çalışmada insan ipsc'ler ve farelerde SMA tedavisi için CRISPR/cas9 teknolojisi kullanılmıştır (Li vd., 2020). Bu *in vivo* çalışmada CRISPR sistemi kullanılarak SMA hastalarındaki defekte SMN1 geninin identik yapıda benzer SMN2 genindeki ekleme düzenleyici bölgelerin (splicing-regulatory elements) (SRE) bozulması hedeflenmiştir. Bu düzenleyici bölgelerin bozulmasının insan kaynaklı indüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPSC'ler) ve farelerde SMA hastalık fenotipinin iyiye gitmesine sebep olan tam uzunluktaki SMN proteininin üretimini indüklediği tespit edilmiştir (Li vd., 2020).

2023 yılındaki bir çalışmada insan iPSC'lerde SMN2 geninde en yaygın meydana gelen mutasyonun düzeltilmesi için yeni ve hassas bir CRISPR gen düzenleme tekniği olan base editing teknolojisi kullanılmıştır. Çalışma sonucunda baz editlemenin mutasyonun etkin bir şekilde düzeltilmesiyle SMN protein ekspresyonunun artırılacağı tespit edilmiştir (Alves vd., 2023).

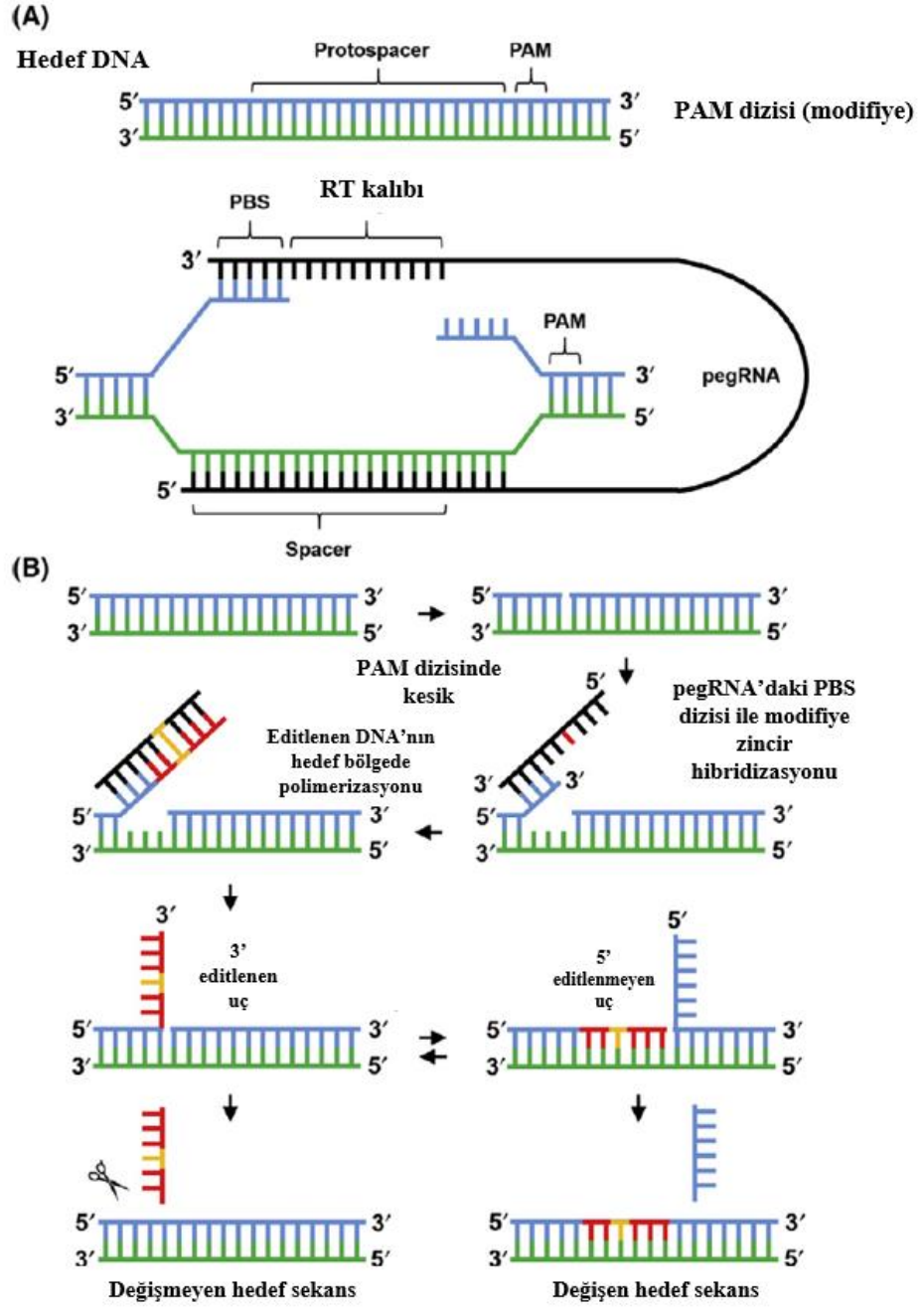
Bu çalışmalar SMA hastalığında yürütülmekte olan pek çok CRISPR çalışmasından birkaç örnek olmakla beraber CRISPR, SMA ve diğer nadir hastalıklar için de yeni ve etkili terapötik tedavilerin geliştirilmesinde potansiyel bir gen düzenleme teknolojisidir. Pek çok nadir hastalık için CRISPR/cas9 sistemi ile çalışma yapılmış olsa da hızla gelişen bir teknoloji olan CRISPR tabanlı tedavilerin yaygınlaşabilmesi için çözülmesi gereken birkaç zorluk bulunmaktadır. Zorlukların en başında iletim gelmektedir. CRISPR sisteminin editleme yapılacak hücrelere iletilmesi gerekmektedir. Bu iletimin de güvenli ve etkili bir şekilde yapılması kritik bir noktadır. Diğer zorluk ise CRISPR sisteminin genomda ciddi yan etkilere sebep olabilecek DNA'nın istenmeyen bölgeden kesilmesi ile genomda mutasyonlara sebep olabilmesinden kaynaklanmaktadır. Bir diğer nokta ise CRISPR/cas9 sistemi bazen hücrelere Zarar vererek hücre ölümüne yol açabilmektedir. Bunun yanında ise sistemin bileşenleri immünojenik olabilmekte ve bağışıklık tepkisini indükleyebilmektedir.

Bunlarla beraber HDR tabanlı yaklaşımlarda başarısızlık, NHEJ tarafından genin bozulmasına yol açabilmekle beraber SMN2 mutasyonunu düzeltmek yerine var olan SMN fenotipinin de kötüleşmesine sebep olabilmektedir. Halen off target etkisinin yüksekliği, immünojenik etkisi, çift zincir kırılımı sonucu genetik mutasyonlara yatkınlığı gibi pek çok dezavantaj sebebi ile klinik olarak daha verimli ve uygulanabilir bir yöntem arayışına girilmiştir. SMA hastalığındaki genetik tedavi planında; kalıp DNA'ya ihtiyaç duymayan ve DNA'da çift zincir kırılımına sebep olmayarak istenilen genetik değişiklikleri esnek bir şekilde gerçekleştiren, HDR'ye kıyasla daha düşük off target ve olası mutasyon kapasitesine sahip CRISPR-PE sistemi gibi bir sisteme ihtiyaç duyulmuştur. Hastalıklara neden olan mutasyonların ~%50'si küçük indellerden ziyade tek nükleotid değişimlerden oluştuğu için hassas tek bazlı düzenleme klinik açıdan anlamlı ve önemli bir yöntem niteliğindedir. Prime Editing sisteminin, insan hastalıklarıyla ilişkili bilinen genetik varyantların %89'unu düzenleme potansiyelinden kaynaklı olarak terapötik fayda açısından önemli bir konumda olduğu düşünülmektedir (Anzalone vd., 2019).

2.2.2. CRISPR-Prime Editing Sistemi

Birçok alanda ve pek çok tür canlıda genomik düzenlemelere ihtiyacın artması ile birlikte spesifik modifikasyonlara imkan veren bir gen düzenleme sistemine gereksinim artmaktadır. RNA aracılı endonükleazlar genom modifikasyon sistemlerinde kullanılmaktadır. Yapılan çeşitli araştırmalarla yeni Cas endonükleazlar keşfedilmekte ve eski Cas endonükleazların mutant versiyonları geliştirilmektedir. Geliştirilen Cas endonükleazlar ile tekniğin spesifiklik ve etkinliği artış göstermektedir (Marzec & Hensel, 2019, s.).

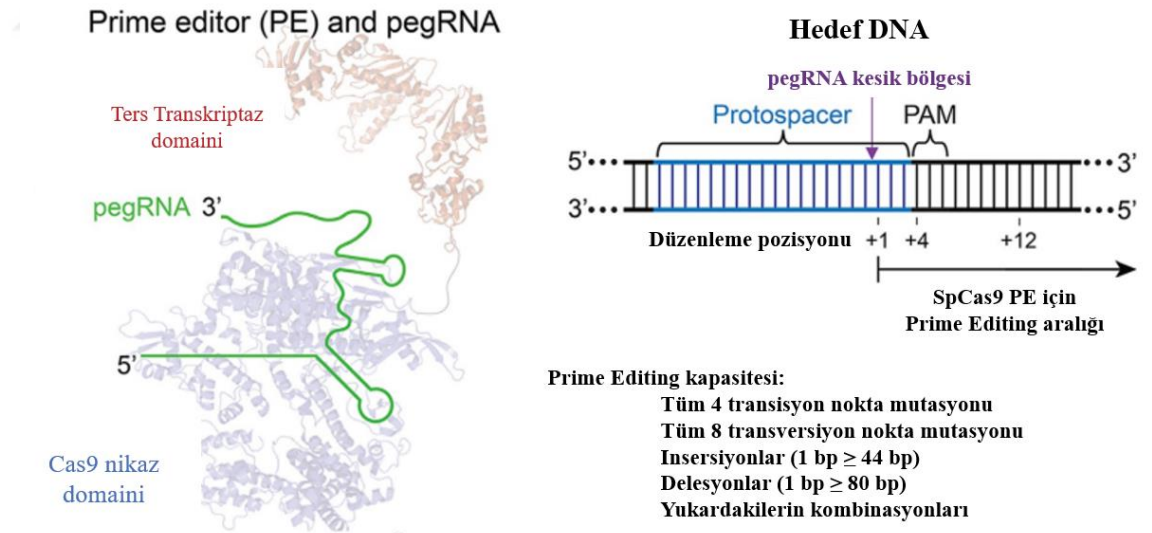
Yapılmakta olan genom düzenleme teknolojilerinin limitasyonları mevcuttur. Bu limitasyonların üstesinden gelebilen Prime Editing (PE) sistemi isimli yeni bir teknoloji Anzalone ve diğerleri tarafından Nature’da yayınlanmıştır. CRISPR/Cas9 aksine Prime Editing çift zincirli DNA’da kırılıma neden olmadan C→T, T→C, A→G ve G→A dahil olmak üzere delesyon, insersiyon ve 12 baz dönüşümünün gerçekleştirilmesine olanak sağlamaktadır (Anzalone vd., 2019). Yeni bir CRISPR türü olan Prime Editing sistemi genome zarar vermeden düşük ikincil hedef dışı mutasyon oranına sahip olan ve temel değişimlerin tümünde kullanıma sahip bir gen düzenleme tekniğidir (Cohen, 2019; Liu vd., 2020). Prime Editing Rehber RNA (pegRNA), Cas9 endonükleazına öncülük etmektedir. sgRNA’nın aksine pegRNA sadece DNA zincirine komplementer olarak spacer dizisi değil; primer bağlanma bölgesi (PBS) dizisi ve hedef gene tanıtılacak olan diziyi de içermektedir. PBS dizisi ikinci DNA dizisine komplementerdir ve revers transkriptaz (RT) için primer oluşturulmasını sağlamaktadır. RT enzimi kalıp olarak pegRNA içerisinde yer alan dizi kullanan bir çeşit RNA bağımlı DNA polimerazdır. Ardından bilgi pegRNA molekülünden hedef DNA dizisine kopyalanmaktadır. Bu yöntem ile hedef dizi üzerinde spesifik olarak değişim gerçekleştirilebilmektedir. Sürecin sonunda ise orijinal 5’ DNA ve pegRNA’dan kopyalanmış olan modifiye edilen 3’ DNA zinciri olmak üzere iki adet tek zincirli DNA kalmaktadır. Bu diziler daha sonra stabilize edilerek hücrelerde yer alan DNA tamir mekanizmaları ile tamamlanarak genoma entegrasyonları gerçekleştirilmektedir (**Şekil 15**).



Şekil 15. Prime Editing yönteminin mekanizmasının şematik gösterimi (Marzec vd., 2020)

CRISPR-PE sisteminin Cas9 aracılı HDR yöntemine kıyasla pek çok avantajı bulunmaktadır. Bunlar arasında; yüksek verimlilik, daha az indel oluşum riski gibi faktörler yer almaktadır. Nokta mutasyonları HDR ile de tamir edilebilmekte ancak PE yöntemine oranla hedef dışı (off target) mutasyon riski daha yüksek ve verimlilik yüzdesi daha düşüktür. Cas9 aracılı HDR yöntemi bu dezavantajlarından dolayı klinik çalışmalarda tercih edilmemektedir. PE yönteminin en önemli avantajları arasında DNA’da çift zincir kırığı oluşumuna neden olmadan genom üzerinde istenilen düzenlemeleri gerçekleştirebilmesi yer almaktadır. Bunun yanında kalıp olarak DNA’ya ihtiyaç duymamaktadır (Matsoukas, 2020; Schene vd., 2020).

Hassas ve çok yönlü bir gen düzenleme yöntemi olan PE sistemi, Cas9 nikaz ve revers transkriptaz (RT) birleşimine dayanmaktadır (**Şekil 16**) (Anzalone vd., 2019). Cas9-Revers transkriptaz proteininin RT bölgesi pegRNA dizisindeki 18-20 nükleotitlik bir bölümü primer olarak kullanmakta; kesilen DNA’yı ise kalıp olarak kullanarak sentezlenecek yeni DNA dizisi üzerinde gen değişiklikleri meydana getirmektedir (Anzalone vd., 2019; Lin vd., 2020).



Şekil 16. Prime editing kompleksini oluşturan cas9 nikaz-RT domaini füzyonu (PE proteini) ile etkileşimde olan pegRNA'nın gösterimi (Anzalone vd., 2019)

CRISPR-PE sistemi orak hücre anemisi, Tay-Sachs gibi çeşitli nadir hastalıklarda çalışılmıştır. Bu bağlamda çeşitli patojenik mutasyonların düzenlenmesi sağlanarak verimli sonuçlar elde edilmiştir (Anzalone vd., 2019). Ancak daha fazla avantaja sahip olan CRISPR-PE sisteminde gen tedavi çalışmalarının güvenilirliği artırılarak insanlarda bilinen 75.000'den fazla genetik hastalıkta var olan genetik varyantların %50'si gibi büyük bir oranı kapsayacak nokta mutasyon sebepli hastalıkların (ClinVar) tedavisi mümkün kılınabilmektedir.

CRISPR-PE sisteminin mekanizmasına baktığımızda üç nesil Prime Editor (PE) insan hücrelerinde test edilmiş bulunmaktadır. İlk nesil PE yani PE1'de; RNA bağımlı bir DNA polimeraz olan Moloney murin lösemi virüsü ters transkriptaz (M-MLV RT) ve bir inaktif domaine sahip endonükleaz olan Cas9 nikaz H840A'nın C terminaline bağlanmaktadır. Bu kompleks ikinci plazmitte eksprese edilen pegRNA'lar tarafından kontrol edilmektedir. PegRNA dizisi 8-15 baz çifti uzunluktaki PBS, RT için kalıp dizi ve hedef DNA'yı bağlayacak olan spacer sekansı içermektedir. PE1'in verimliliği ise PBS uzunluğuna bağlı olarak değişmekte ve bu uzunluk farklı genler için farklı uzunluklarda belirlenmektedir (Anzalone vd., 2019). PE'nin etkinliğinin artırılması için termostabiliteyi, DNA-RNA substrat afinitesini ve RNaz-H aktivitesini etkileyen mutasyonlar içeren farklı M-MLV RT varyantları kullanılmaktadır.

PE2, Cas9-nikaz ve ters transkriptazdan oluşmaktadır. Genomik delesyon ve insersiyonların küçük ölçekte etkili bir şekilde düzenlenmesini sağlamaktadır (Tao vd., 2022). Bunun yanı sıra PE2, geliştirilen verimlilik ve stabiliteye sahip tasarlanmış bir MMLV RT'yi kullanmaktadır. PE3 ise zigot mikroenjeksiyon yoluyla spesifik düzenlemelere sahip fareler oluşturulması için kullanılmaktadır. Bu sistemin genetik modifikasyonlar oluşturulmasındaki kullanabilirliğini göstermektedir (Adikusuma vd., 2021). Kısaca PE1, PE2 ve PE3 her bir editörler farklı özelliklere sahip olmakla birlikte geliştirilen düzenleme verimliliği ve spesifik DNA bağlama alanlarının eklenmesi ile model organizmalarda hassas düzenlemelerin oluşturulmasına imkan sağlanmaktadır.

c.859 G>C dönüşümünün yapılan çalışmalarda SMA fenotipi üzerindeki olumlu bir modifiye edici olduğu tespit edilmiş ve bildirilmiştir (Reed & Zanolini, 2018; Vezain vd., 2010). Bu dönüşüm SMN proteinin üç boyutlu konformasyonel yapısında değişime sebep olmaktadır. Bu varyantın ekzon 7 katılımını artırdığı yapılan çalışmalarda yer almaktadır. Neredeyse identik olan SMN1 ve SMN2 geni arasındaki en büyük fark 840. Nükleotit üzerinde meydana gelen C-T dönüşümüdür. Meydana gelen bu dönüşüm sonucunda ekzon 7 katılımı engellendiği bilinmektedir (Kolb & Kissel, 2015). Tez kapsamında HDR tabanlı yaklaşımlara oranla pek çok avantaja sahip olan CRISPR-PE sistemi tercih edilerek bir terapötik bir tedavi geliştirildi. SMA hastalığında SMN2 geni üzerinde c.859 G>C (pegRNA1) ve c.840 C-T (pegRNA2) tek nokta mutasyonunun modifiye edilerek stabil SMN protein ekspresyonunun sağlanması hedeflenmiştir. Bu amaçla SMN2 geni üzerindeki tek nokta mutasyonunu hedefleyen pegRNA tasarımları gerçekleştirilmiştir. SMN2 kopya sayısının SMA hastalığının seyri ve fenotipi açısından önemi bilinmektedir. Bu nedenle CRISPR-PE sisteminin SMN2 kopya sayılarına bağlı olarak *in vitro* ve *ex vivo* etkinliğinin araştırılması hedeflenmiştir. Tez hipotezi; CRISPR Prime Editing yönteminin SMA hastalığı tedavisi için farklı SMN2 kopya sayılarına sahip alt tiplerde çalışarak SMN ekspresyon profilinin artırılabilirliği.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. CISPR Prime Editing Yönteminde Kullanılacak pegRNA Tasarımı

SMN2 geni üzerindeki pegRNA tasarımı için <https://primeedit.nygenome.org/> veri tabanı kullanılmıştır. Hedef bölgelerin modifikasyonu için ters transkriptaz (Reverse transcription template, RTT) ve primer bağlanma dizileri (Primer Binding Site, PBS) ile birlikte c.859 G-C dönüşümü ve c.841 T-C transisyonu için pegRNA tasarlanmıştır (**Tablo 3**). pU6 promotör dizisi ile başlayan, RTT ve PBS dizisi dahil pegRNA sentez dizisi gösterilmiştir (**Tablo 3**). Tasarlanan pegRNA dizileri pU6 promotör ile GenScript firması tarafından sentezlendikten sonra pHIV-EGFP (Addgene, #21373) plazmitine klonlanmıştır.

Tablo 3. PegRNA tasarım dizileri

	sgRNA sekansı	sgRNA iskele dizisi	PBS sekansı	RTT sekansı	PAM	sgRNA ipliği (+/-)	PBS GC içeriği
pegRNA1 c.859 G-C	TTAAGGA ATGTGAG CACCTT	GTTTGTAGAGCTAGAAATAGCA AGTTAAAATAAGGCTAGTCCG TTATCAACTTGAAAAAGTGGC ACCGAGTCGGTGC	AGGTGCT CACATTC C	ATCAAAA AGAACGA	AG	-	0.57
pegRNA2 c.840 C-T	TCGTTCT TTTTGAT TTTG	GTTTGTAGAGCTAGAAATAGCA AGTTAAAATAAGGCTAGTCCG TTATCAACTTGAAAAAGTGGC ACCGAGTCGGTGC	AAAATCA AAAAGA ACGAAG GTG	TTCCTTA CAGGGTT TCAGAC	AG	-	0.32

Tablo 4. pegRNA sentezi için vektör dizileri

U6 Promoter- PegRNA1- sgRNA Scaffold1- RTT- PBS- Extenti on	Gagggcctatttcccatgattcctcatatttgcataacgatacagaaggctgttagagagataattagaattaatttgactgtaaac acaaagatattagtacaaaacgtgacgtagaagtaataatttctgggtagttgcagtttaaaattatgtttaaatggact atcatatgcttaccgtaactgaaagtattcgtttctggcttatatatctgtgaaaggacTTAAGGAATGTGA GCACCTTGTTTGTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTT ATCAACTTGAAAAAGTGGCACCAGTCGGTGCATCAAAAAGAACGAAGGT GCTCACATTCCTTTTT
U6 Promoter- PegRNA2- sgRNA Scaffold1- RTT- PBS- Extenti on	Gagggcctatttcccatgattcctcatatttgcataacgatacagaaggctgttagagagataattagaattaatttgactgtaaac acaaagatattagtacaaaacgtgacgtagaagtaataatttctgggtagttgcagtttaaaattatgtttaaatggact atcatatgcttaccgtaactgaaagtattcgtttctggcttatatatctgtgaaaggacTCGTTCTTTTGTAT TTTGTTTGTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATC AACTTGAAAAAGTGGCACCAGTCGGTGCCTTCCTTACAGGGTTTCAGACAA AATCAAAAAGAACGAAGGTGTTTTT

3.2. Transformasyon ve Plazmid DNA İzolasyonu

Kompetent *E. coli* DH5 α suşuna ait bakteriler (NEB® 5-alpha Competent *E. coli* (High Efficiency) NEB C2987H) sıvı LB besiyeri içerisinde ve 37°C’de kültüre edilmiştir. Bakteriler üreticinin talimatlarına göre ısı şoku yöntemi kullanılarak plazmit DNA’lar ile transforme edilmiştir. Bakteriler ampisilinli LB agar petrilere ekilerek 37°C’de gece boyu inkübe edilmiştir. Seçilen kolonilerinden ZymoPURE II Plazmid Maxiprep Kit (#D4203, ZYMO) ile plazmid izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

3.3. Agaroz Jel Elektroforezi

İzolasyon sonucunda elde edilen plazmid DNA’lar agaroz jel ile görüntülenmiştir. İlk olarak %1 agaroz jel hazırlanmıştır. Jel ethidium bromide muadili olan EzView Stain Red Safe Solution ile (100mL için 5 μ L standartlanmış) hazırlanmıştır. Her bir plazmit DNA 1 μ g olarak hesaplandıktan sonra jele yüklenmiştir. Ardından elde edilen sonuçlar görüntü ve analiz olarak alınmıştır.

3.4. Lentivirüs Üretimi ve Transfeksiyonu

Tasarlanan pegRNA dizileri pU6 promotör ile GenScript firması tarafından sentezlendikten sonra lentiviral pHIV-EGFP (Addgene, #21373) plazmitine klonlanmıştır. Lentivirüs üretimi için, pU6-pegRNA kodlamayan GFP kodlayan kontrol pHIV-EGFP, pU6-pegRNA1, pU6-pegRNA2, pHIV-EGFP ve CRISPR-PE kodlayan lentiviral pLenti-PE2-BSD (Addgene, #161514) plazmid DNA’ları ayrı ayrı pSPAX2 (Addgene #12260) ve pVSV-G (Addgene #138479) zarf ve paketlenme plazmit DNA’lar ile konak HEK293T hücrelerine transfekte edilmiştir. Tüm plazmitler (2:1 pSPAX2: 1 pVSV-G), P-PEI (Polyethylenimine) transfeksiyon reaktifi (Merten vd., 2016) ile muamele edildikten sonra konakçı hücreler olan HEK293T kullanılarak yayınladığımız öncül raporda olduğu gibi lentivirüs üretimi gerçekleştirilmiştir (Sibel Pinar Odabas vd., 2022). Transfeksiyon sonrası 72. Saatte HEK293T hücre süpernatantları toplanarak paketlenmiş rekombinant lentivirüsler elde edilmiştir. Üretilen lentivirüsler virüs konsantrasyonunun artırılması amacıyla Lenti-X Concentrator (#631232, Takara) ile 100x konsantre edilmiştir (Cooper vd., 2011).

3.5. Lentivirüs Titrasyonu

Lentivirüslerin titrasyonu için daha önce yayınladığımız bir makalede olduğu gibi titrasyon aşamaları gerçekleştirilmiştir (Sibel Pinar Odabas vd., 2022). Jurkat (%10 fetal sığır serumu, 200 U/ml penisilin/streptomisin antibiyotiği, 2 mM L-glutamin, 1X MEM vitamin solüsyonu ve 1X NEAA içeren RPMI besiyeri) hücreleri 100 µL besiyeri içerisinde olacak şekilde 96 kuyucuklu petrilere ekim gerçekleştirilmiştir. Kuyucuklara 100x-konsantrasyonda lentivirüs içerecek şekilde 10µL, 3µL, 1µL, 0.3µL, 0.1µL ve 0.03µL hacimlerinde lentivirüsler eklenmiştir. Sonrasında hücreler 72 saat 37°C, %5 CO₂'de inkübe edilmiştir. Hücreler 96 kuyucuklu petrilere aktarıldıktan sonra blasticidine seçilimi için pLenti-PE2-BSD (Addgene, #161514) içeren Jurkat hücrelerine 10 µg/ml blasticidin uygulanmış ve 96 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ardından hücre canlılıkları BIO-RAD TC20 Automated Cell Counter cihazı kullanılarak test edilmiştir. Son olarak >%99 oranda blastisidin dirençli CRISPR-PE kodlayan hücreler seçilerek kültüre edilmiştir. pegRNA-GFP ve kontrol GFP lentivirüslerin titrasyonu aynı koşullarda gerçekleştirildikten sonra GFP ekspresyon seviyeleri akım sitometride ölçülerek analiz gerçekleştirilmiştir.

3.6. Hücre Kültürü

Primer SMA Tip 1 (#GM00232) ve SMA Tip 2 (#GM03814) fibroblast hücre hatları Coriell Institute'den temin edilmiştir. SMA Tip 1 ve SMA Tip 2 fibroblast (%10 fetal sığır serumu, 200 U/ml penisilin/streptomisin antibiyotiği, 2 mM L-glutamin ve 1X NEAA içeren EMEM besiyeri); HEK293T, HeLa, WT fibroblast, SH-SY5Y (%10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin, L-Glutamin ortamı ile Gibco DMEM); U87, A172 (%15 fetal sığır serumu, 200 U/ml penisilin/streptomisin antibiyotiği, 2 mM L-glutamin içeren DMEM besiyeri) hücre hatları uygun besiyerlerinde kültüre edilmiştir. Hücreler 37°C, %5 CO₂'de inkübe edilmiştir. Hücrelerin yoğunlukları %90 seviyelerine çıktığında pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Besiyeri ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra PBS solüsyonu ile yıkama yapılmıştır. Ardından uygun miktarda EDTA-Tripsin eklendikten sonra 37°C'de 3 dakika bekletilmiştir. Üzerine 1:1 oranda besiyeri eklenmiş ve hücreler toplanmıştır. Santrifüj sonrası hücreler sayılmış ve petrilere geri ekilmiştir. Hücrelerin dondurulması aşaması için ise hücreler kaldırıldıktan ve çöktürüldükten sonra dondurma solüsyonu eklenmiş ve süspansiyon kriviyol tüpe aktarılmış ve -80'e kaldırılmıştır. Ardından sıvı azota alınarak hücreler burada saklanmıştır.

3.7. Blastacidin Seçilimi

Blasticidin S, HCL, (400-190 EM, WISENT) temin edildikten sonra hücrelerde antibiyotik seçilimi için deney kurulmuştur. Hücreler 200 µL besiyeri içerisinde 96 kuyucuklu petriye 10.000/kuyu olacak şekilde ekilmiştir. Hücrelere çift tekrar olacak şekilde 1-3-5-10-20-30-50 µg/ml konsantrasyonlarda blasticidin uygulanmıştır. Hücreler 37°C’de ve %5 CO₂’de inkübe edilmiştir. Ardından 24-48-72-96 ve 168 saat sonrasında ışık mikroskopunda morfolojik görüntüleri incelenmiştir. Canlılıklar ve hücre popülasyonları akım sitometrisi (Beckman Coulter, CytoFlex) ile analiz edilmiştir. Sonrasında her hücre hattına spesifik antibiyotik konsantrasyonu ve saatler belirlenmiştir (**Tablo 5**). Akım sitometrisi ile virüs transdüksiyonu sonucunda blastisidin direnç genini içeren >%99 oranda dirençli hücreler seçilerek ortamdan antibiyotikli besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra kültüre edilmiştir. Virüs transdükte edilmeyen sağlıklı hücrelere belirlenen dozlarda antibiyotik uygulaması yapılarak pozitif kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

Tablo 5. Hücre hatlarında belirlenen gün ve blasticidin konsantrasyonları

Hücre Hattı	Blasticidin Konsantrasyonu	Saat
Jurkat	10 µg /ml	96h
HEK293T	20 µg /ml	168h
U87	10 µg /ml	96h
WT fibroblast	10 µg /ml	72h
CD3+T Cell	10 µg /ml	120h
SMA Type 1 fibroblast	20 µg /ml	72h
SMA Type 2 fibroblast	20 µg /ml	72h

3.8. PBMC İzolasyonu, CD3+ T Hücre İzolasyonu ve Transdüksiyonu

61351342/ Ağustos 2022-28 sayılı Girişimsel Olmayan Etik Kurulu izni Üsküdar Üniversitesi'nden alındıktan sonra SMA Tip 3 hastasından kan alımı gerçekleştirilmiştir. Sağlıklı ve hasta donörden alınan kan örneklerinden periferik mononükleer hücrelerin (MNH) izolasyonu için örnekler Ficoll ile birleştirilip density-gradient santrifüj yöntemi ile MNH'lerin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Anti-CD3 mikro boncukları (Miltenyi, Dynabead) ile T hücre izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Sonrasında T Cell TransAct™, human kullanılarak T hücre aktivasyonu yapılmıştır. Lentivirüs transdüksiyon işlemi, Vectofusin 1 (10 ug/mL, Miltenyi), protamin sülfat (40 ug/mL, Sigma) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hücreler, T hücre besiyerinde (50IU/ml IL-2, 10 ng/ml IL-7, 5 ng/ml IL-15, %3 Human AB Serum ve %1 pen/strep) 14 gün kültüre edilmiştir.

3.9. Hücre Hatlarından RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

Hücrelerden total RNA ekstraksiyonu, PureLink RNA Mini Kit (#12183018A) RNA pürifikasyon kiti kullanılarak satıcı firmanın talimatlarına göre gerçekleştirilmiştir. Total RNA konsantrasyonunu belirlemek için Microplate Reader (OmegaStar, ELISA) analizi üzerinden (230 nm, 260 nm ve 280 nm) absorbans ölçümleri yapılmıştır. cDNA sentezi Applied Biosystems™ High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (#4358814) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. SMA Tip 1, SMA Tip 2 ve Jurkat hücre hatlarından SMA Tip 1, SMA Tip 2, WT fibroblast ve jurkat hücre hatlarından izole edilen RNA örneklerinden 10 µl (2 µg) ve 10 µL 2X RT miksinden alınarak PCR tüpüne eklenmiştir. Reaksiyon, 25°C'de 10 dakika, sonra 37°C'de 2 saat ve son olarak 85°C'de 5 dakika olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.10. Kantitatif rt-PCR (RT-qPCR) Analizi

rt-qPCR analizi PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (#A25742) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PCR analizi tam uzunlukta SMN transkriptlerinin (Full length, FL) ve ekzon 7 kesik SMN transkriptlerinin ($\Delta 7$ SMN mRNA) ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. SMN mRNA ve $\Delta 7$ SMN mRNA için primerler belirlenmiş (Zheleznyakova vd., 2011) ve Sentromer şirketi tarafından sentezlenmiştir. Kantitatif analiz, Roche Lightcycler 96 cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. FL ve $\Delta 7$ SMN SMN transkript seviyelerinin belirlenmesi için sentezlenen primer dizileri aşağıda belirtilmiştir (**Tablo 6**) (Zheleznyakova vd., 2011). Reaksiyonun gerçekleşmesi için final hacmi 20 μ l olacak şekilde her bir kuyuya; 5 μ l cDNA (20 ng/ μ l) ve 15 μ l SYBR Green miksinden eklenmiştir. Döngü koşulları ise; 95°C’de 2 dakika polimeraz aktivasyonu, 95°C’de 15 saniye denatürasyon, 60°C’de 1 dakika annealing/ extension aşaması olacak şekilde termal cycler’da ayarlanmıştır. Döngü sonucunda elde edilen veriler analiz edilmiştir.

Tablo 6. RT-qPCR için tasarlanan primerler

Oligo Adı	Baz sekansı 5'-3'	Baz çifti	Konsantrasyon
5forward RT-qPCR (FL)	CTG ATG CTT TGG GAA GTA T	19	200 nmol
5reverse RT-qPCR (FL)	GCC AGC ATT TCT CCT TAA	18	200 nmol
5reverse RT-qPCR ($\Delta 7$ SMN)	GCC AGC ATT TCC ATA TAA TAG	21	200 nmol
5forward RT-qPCR ($\Delta 7$ SMN)	GTC CAG ATT CTC TTG ATG AT	20	200 nmol

3.11. DNA İzolasyonu ve Sanger Sekanslama

HEK293T, HeLa, U87, Jurkat, CRISPR-PE modifiye SMA Tip 1, Tip 2 hücre hatlarından genomik DNA PureLink Genomic DNA Mini Kit (#K182001) ile izole edilmiştir. Sanger dizileme yöntemi; CRISPR-PE sisteminin hücre genomunda hedefe yönelik (on-target effect) SMN2 modifikasyonu gerçekleştirme etkinliğini doğrulamak amacıyla gerçekleştirilmiştir. Sanger sekanslama İntergen Genetik Hastalıklar Tanı Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir. Sanger sekanslama için SMN2 genine spesifik primerler tasarlanmıştır (**Tablo 7**).

Tablo 7. Sanger sekanslama için tasarlanan primerler

Oligo Adı	Baz sekansı 5'-3'	Baz çifti	Konsantrasyon
5forward Sanger	GGG ATT GTA GGC ATG AGC CAC TG	23	200 nmol
5reverse Sanger	GTC TGC TGG TCT GCC TAC TAG TG	23	200 nmol

3.12. Floresan Mikroskop Altında Görüntü Alma ve Akım Sitometrisi Analizi

Farklı hücre hatlarında artması hedeflenen fonksiyonel SMN protein seviyesinin belirlenmesi ve uzun dönemde stabilitesi, hücre içindeki lokalizyonu ve hücre morfolojisine etkilerinin belirlenmesi için floresan mikroskopta kayıt altına alınmıştır. SMA Tip 1, SMA Tip 2 fibroblast, WT fibroblast, Jurkat, HEK293T ve HeLa hücre hatlarında SMN ekspresyon seviyelerini belirlemek amacıyla anti-SMN-AlexaFlour 647 antikoru (sc-32313, AF647, Santa Cruz Biotechnology) ile intrasellüler boyama gerçekleştirilerek SMN ekspresyonları akım sitometri ile analiz edilmiştir. BDCytofix/Cytoperm™Fixation/Permeabilization Kit (#554714) kullanılarak fiksasyon/permeabilizasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. 100.000 hücre olacak şekilde hücreler toplandıktan sonra 400g 5 dk +4°C’de santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pelet üzerine 200 µl Fixation/Permeabilization solution (BD) eklenerek +4 °C’de 20 dk inkübe edilmiştir. Fiksasyonun ardından hücreler iki kez BD Perm/Wash™ Buffer (BD) ile yıkanmıştır. Ardından 1:50 dilüsyon oranı olacak şekilde anti-SMN-AlexaFlour 647 hücrelere eklendikten sonra örnekler hafifçe vortekslenmiş ve 30 dk +4 °C’de inkübe edilmiştir. Hücreler iki kez BD Perm/Wash™ Buffer (BD) ile yıkanmış 300 g 5 dk santrifüj edilmiştir. Pelet 200 µl BD Perm/Wash™ Buffer (BD) ile çözüldükten sonra akım sitometrisi (Beckman Coulter, CytoFlex) ile analiz edilerek SMN protein ekspresyon yüzdesi ve Mean Fluorescence Intensity (MFI) değeri üzerinden değerlendirilmiştir.

3.13. Annexin V- propidium iodide (PI) Boyama

Hücre popülasyonlarında hücrelerin apoptoz evrelerinin ve canlılıklarının belirlenmesi için Annexin V-PI analizi için Annexin V-FITC Apoptosis Detection Assay (Grisp, #GTC21.0100) ile boyama gerçekleştirilmiştir. Hücreler 1×10^5 olacak şekilde ependorfta toplandıktan sonra santrifüje atılmıştır. Ardından hücreler 500 µl soğuk medya içerisinde çözdürülmüştür. Tekrar çöktürüldükten sonra 100 µL 1x Binding buffer ile çözülmüştür. 2.5 µL Annexin V-FITC ve 5 µL PI eklenmiş ve 15 dk karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası çöktürülmüş ve 200 µL Binding buffer içerisinde çözülmüştür. Son olarak boyanan hücrelerin, akım sitometri analizi yapılmış ve apoptoz evreleri değerlendirilmiştir.

3.14. Hücre Sağ Kalım Analizi

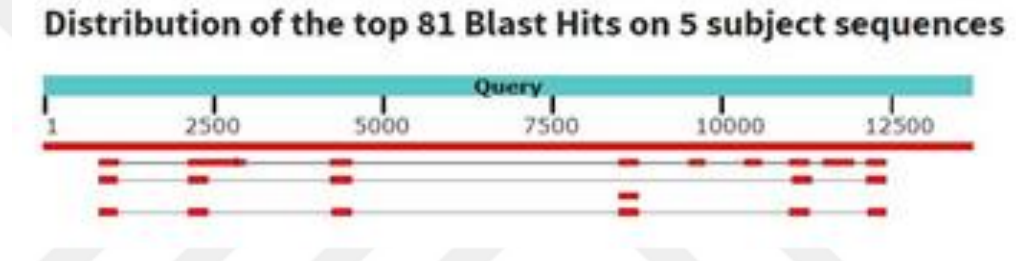
CRISPR PE modifiye SMA Tip 1, SMA Tip 2 ve Jurkat hücre hatlarının hücre canlılığının kontrol edilmesi ve CRISPR-PE sisteminin hücre hatlarında canlılığa olan etkisinin gösterilmesi amacıyla sağ kalım analizi gerçekleştirilmiştir. Sağ kalan hücre popülasyonunun belirlenmesi ve hücre sayımı için tripan mavisi (Biological Industries, #03-102-1B) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. BIO-RAD TC20 Automated Cell Counter cihazı ile hücre sayım ve canlılık analizi gerçekleştirilmiş ve analizleri yapılmıştır.

3.15. Hücre Canlılığının MTT Deneyi ile Belirlenmesi

CRISPR Prime Editing kodlayan lentivirüs aktarımı sonucu oluşabilecek tüm toksisite ihtimalinin değerlendirilmesi ve hücre canlılığının kontrol edilmesi amacıyla MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-Diphenyltetrazolium Bromit] ajanı kullanılmıştır. MTT ajanının, canlı hücre içerisinde mor renkli formazan tuzu oluşturması sonucu kolorimetrik yöntem ile hücre canlılığı belirlenmiştir. Primer SMA Tip 1, SMA Tip 2 fibroblast, WT fibroblast ve Jurkat hücreleri 10.000 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu petrinin her kuyucuğuna ekilmiştir. 24 saat boyunca hücrelerin yapışması ve morfoloji almaları için beklenmiştir. Ardından her bir kuyuya 10 µl MTT ajanı eklenmiş ve hücreler 4 saat boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir. MTT ajanı eklenen besiyeri ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra her kuyucuğa 100 µl DMSO eklenmiş ve 5 dakika karanlıkta bekletilmiştir. Son olarak DMSO ile formazan tuzları çözündürüldükten sonra absorbans değerleri 570nm ve 655nm dalga boylarında ELISA (FLUOstar, OMEGA) cihazında ölçülmüş ve analiz edilmiştir.

3.16. CRISPR Cas9 Sistemi ile SMN1 İnaktif Hücre Hattı Üretimi

HEK293T, HeLa ve U87 hücre hatlarında SMN1 inaktif hale getirilip SMN1-knockout hücre modeli oluşturmak amacıyla SMN1 ve SMN2 genleri BLAST edilerek inaktif hale getirme stratejisi için uygun gen lokasyonları araştırılmış ve farklı bölgeler tespit edilmiştir (**Şekil 17**). BLAST analizi sonucunda intron 5 ve intron 7 bölgelerinin SMN1 ve SMN2 genlerinde farklı olan bölgelerinin hedefleneceği gRNA tasarımları yapılmıştır (**Tablo 8**). İtron 5 ve intron 7 bölgelerinde spesifik tek nokta mutasyonu sağlayabilecek gRNA tasarımları tasarım süreci sonrasında Addgene firmasından temin edilmiş olup lentiCRISPR v2 (Plasmid #52961) plazmitine klonlanmıştır. Bu sayede CRISPR/Cas9 sistemi ile SMN1 inaktif hale getirilmiştir. Sonrasında gen manipülasyonu başarılı bir şekilde yapılmış hücreler Puromycin antibiyotik seleksiyonuyla seçilmiştir.



Şekil 17. SMN1 ve SMN2 genlerinde yapılan BLAST analizinin şemasal gösterimi

Tablo 8. intron 5 ve intron 7 bölgelerini hedefleyen gRNA tasarımları

Pozisyon	İplik	gRNA sekansı	PAM sekansı (nGG)	On-target skoru	Off-target skoru
SMN1 upstream cut					
1325	-	TCACTTGACCCTGGAGGCGG	AGG	51.5*	63.8
SMN1 downstream cut					
217	+	CAGGAAGGCACCACCATGCG	TGG	61.3*	67.4

3.17. Puromycin Seçilimi

Puromycin-HCl (33835.01, Serva) temin edildikten sonra hücrelerde antibiyotik seleksiyon deneyi kurulmuştur. Hücreler 200 µL besiyeri içerisinde 96 kuyucuklu petriye 10.000/kuyu olacak şekilde ekilmiştir. Hücrelere çift tekrar olacak şekilde 0,5, 1, 2, ve 4 µg/ml konsantrasyonlarda puromycin uygulanmıştır. Hücreler 37°C’de ve %5 CO₂’de inkübe edilmiştir. Ardından 24-48-72-96 ve 120 saat sonunda ışık mikroskopunda morfolojik görüntüleri kayıt altına alınmış ve akım sitometrisi (Beckman Coulter, CytoFlex) ile canlılıkları analiz edilmiştir. Sonrasında her hücre hattına spesifik antibiyotik konsantrasyonu ve saatler belirlenmiştir (**Tablo 9**). Akım sitometrisi ile virüs transdüksiyonu sonucunda puromisin direnç genini içeren >%99 oranda dirençli hücreler seçilerek kültüre devam edilmiştir. Virüs transdükte edilmeyen sağlıklı hücrelere belirlenen dozlarda antibiyotik uygulaması yapılarak pozitif kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

Tablo 9. Hücre hatlarında belirlenen gün ve puromycin konsantrasyonları

Hücre Hattı	Puromycin Konsantrasyonu	Saat
Jurkat	2 µg /ml	120h
HEK293T	2 µg /ml	120h
U87	2 µg /ml	120h
Doğal tip (WT) fibroblast	2 µg /ml	72h
HeLa	2 µg /ml	72h

3.18. Single Cell Cloning (SCC)

CRISPR-cas9 sistemi içeren Hek293T, HeLa ve U87 hücre hatlarında SMN1 knockout hücre hattının başarılı oluşturulup oluşturulmadığını tespit etmek ve daha homojen bir popülasyon oluşturmak için single cell cloning gerçekleştirilmiştir. Hücreler tripsin ile kaldırıldıktan sonra TC20 Automated Cell Counter ile hücre sayımı gerçekleştirildi. 1 ml tam besiyeri içerisinde 50.000 hücre ependorfta toplanmıştır. Aynı bir falkon içerisinde 9990 μ L tam besiyeri eklendi ve 1 ml hücre karışımı içerisinde 10 μ L alınarak falkondaki besiyerinin içerisine eklenmiştir. Burada 1:100 dilüe edilmiş ve 500 hücre/ml hücre elde edilmiştir. Aynı bir falkona 10ml medya eklendikten sonra 10 ml hücre karışımı içerisinde 5 ml alınarak falkondaki besiyerine eklenmiştir. Burada 1:10 dilüe edilmiş ve 50 hücre/ml hücre elde edilmiştir. Total karışım pipetaj yapılarak 96 kuyucuklu petride kuyu başına 150 μ L olacak şekilde bölüştürülmüştür. Her bir kuyuda tek hücre düşürülmesi ve saf kolonilerin eldesi hedeflenmiştir.

3.19. pegRNA Tasarımlarıyla Gerçekleştirilen Genetik Düzenlemenin Olası Off-target Etkilerinin Araştırılması

Tasarlanan pegRNA'ların hücrelere uygulanması ve elde edilen SMN ekspresyonun analizi sonrası genomda oluşabilecek olası off-target mutasyonlarının belirlenmesi hedeflenmiştir. Cas-OFFinder (Rgenome) yazılımı kullanılarak mismatch skorları değerlendirilmiş ve genom üzerinde mutasyon görülebilmesi en yüksek olasılıkla olan lokasyonlar bölgeler belirlenmiştir (**Şekil 20**). Belirlenen bu bölgelerde Sanger dizileme yapılarak herhangi bir mutasyon oluşturup oluşturmadığı (off-target effect) tespit edilmiştir. Belirlenen bölgelere spesifik primerler tasarlanmış (**Tablo 10**) ve sekanslama gerçekleştirilmiştir.

Bulge Type	Target	Chromosome	Position
DNA	crRNA: T-TAAGGAATGTGAGCACCTTNGG DNA: TGTAAGGAATGTGAGCtCaTTTGG	chr5	24738608
DNA	crRNA: TTAAGGAATGTGA-GCACCTTNGG DNA: TTAAaGAATGTGAGGcCCTTGGG	chr1	233037774

Bulge Type	Target	Chromosome	Position
DNA	crRNA: TCGTTCTT-TTTGATTTTGNNG DNA: TCtTTCTTCTTTGATTTTGTGG	chr22	45690805
DNA	crRNA: T-CGTTCTTTTGTATTTTGNNG DNA: TACGTgTTTTTGTATTTTGTGG	chr4	125044967

Şekil 18. Cas-OFFinder (Rgenome) yazılımı kullanılarak belirlenen olası mutasyon bölgeleri

Tablo 10. Off-target için tasarlanan primerler

5forward_chr5_offtarget	CCC ACA AGG CAC AAA AGG TGG	21	Std	200 nmol	227.72
5reverse_chr5_offtarget	GAT TAG CTG GCT TTC CAC CC	20	Std	200 nmol	216.88
5forward_chr1_offtarget	GAG AAT CAG TGC CCT GGA AAC	21	Std	200 nmol	227.72
5reverse_chr1_offtarget	GTT TCA CTA TGT TGC CCA GGC	21	Std	200 nmol	227.72
5forward_chr4_offtarget	GGC AAG TGG GTA TGA GTT GAA C	22	Std	200 nmol	238.56
5reverse_chr4_offtarget	AAC TGT GAT CTA AAG ATC CTG CC	23	Std	200 nmol	249.41
5reverse_chr22_offtarget	CTA GCC TTC TGG CCA GAT GC	20	Std	200 nmol	216.88
5forward_chr22_offtarget	GTT CCA AGC TCT GCT TCC AC	20	Std	200 nmol	216.88

3.20. Multiplex Ligasyona Bağlı Prob Amplifikasyonu (MLPA) Analizi

SALSA® MLPA® Probemix P021-B1 SMA, SMA tanısında ve izlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Pane vd., 2018). Bu teknik, hastalığın ciddiyetinin değerlendirilmesinde çok önemli olan SMN2 kopya sayılarını belirlemek için kullanılmaktadır (Müller-Felber vd., t.y.). Ek olarak bu probe karışımının kullanılması, hastalarda SMA'nın ayırt edici özelliği olan SMN1 fonksiyonunun homozigot kaybının belirlenmesini sağlamaktadır (Veldhoen vd., 2022). MLPA tekniği ile örneklerin değerlendirilmesi hizmet alım ile Genetik Hastalıklar Tanı Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir. SALSA MLPA Probemix P021-B1 SMA, 175-445 nükleotit arasında amplifikasyon ürünlerine sahip 32 MLPA probu içermektedir. SMN1 ve SMN2 genlerinin kopya sayısını tespit edebilen 7 adet SMN ekson 7 ve 8 probu vardır. İki kopya SMN1 ve iki kopya SMN2 taşıyan normal bireylerde bu problemler toplamda dört gen kopyasını tespit etmektedir. Homozigot SMN1 delesyonu durumunda ise bu problemler SMN2 kopya sayısını daha doğru bir şekilde belirlemek için kullanılmaktadır.

Copy number status	Final ratio (FR)
Normal	0.80 < FR < 1.20
Homozygous deletion	FR = 0*
Heterozygous deletion	0.40 < FR < 0.65
Heterozygous duplication	1.30 < FR < 1.65
Heterozygous triplication/homozygous duplication	1.75 < FR < 2.15
Ambiguous copy number	All other values

Final ratio of the 281 nt SMN2-specific probe for exon 7 (range)	SMN2 copy number
0 - 0.10	0
0.40 - 0.65	1
0.80 - 1.20	2
1.30 - 1.65	3
1.75 - 2.15	4
2.20 - 2.65	5
All other values	Ambiguous*

Şekil 19. SMN2 için final ratio (FR) ve kopya sayısı arasındaki ilişki

3.21. İstatistiksel Analiz

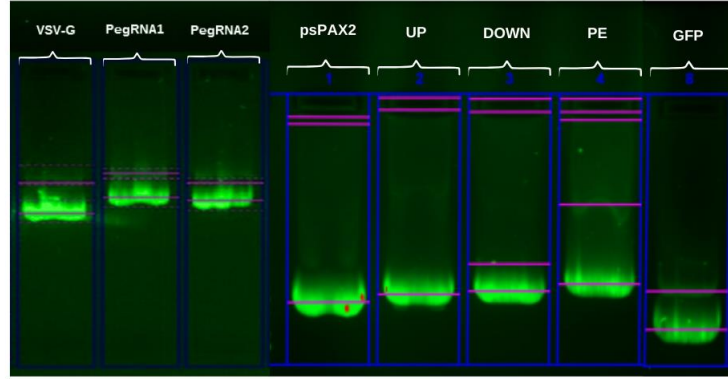
Tüm deneylerden elde edilen sonuçlar GraphPad Prism 8.0.1 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) programı kullanılarak veri sayısı ile uyumlu istatistiksel yöntemlerle incelenerek ve grafik/tablo olarak sunulmuştur. Two-tailed t-test ile veriler analiz edilmiş ve bar grafiği ile ortalamanın standart sapması (Standard Error of Means (SEM)) belirlenmiştir. Tüm deneyler için anlam $p < 0.05$ ve anlamsız (NS=Non-Significant) olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

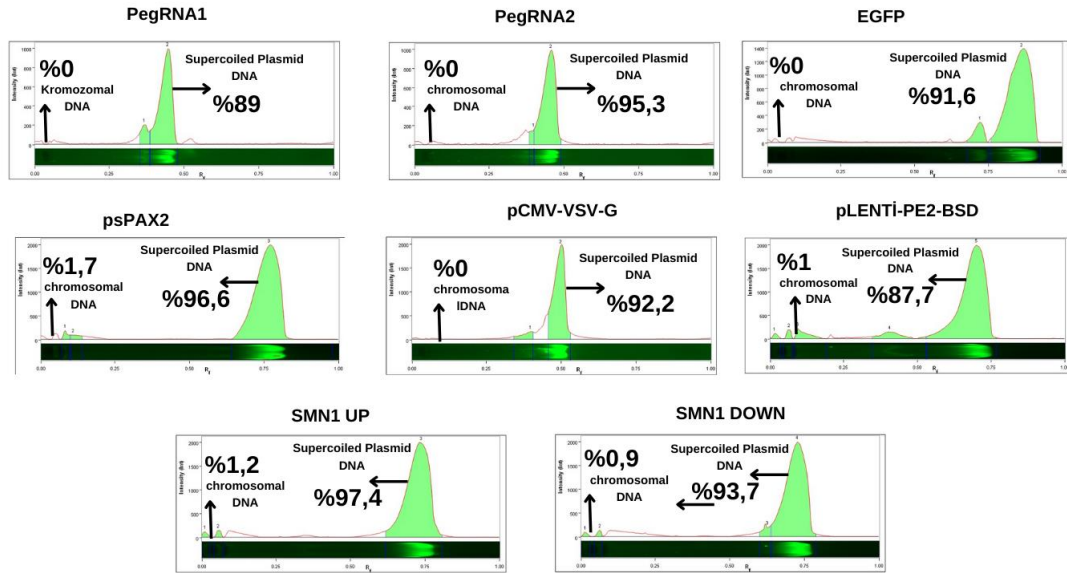
4.1. Plazmitlerin transformasyonu ve izolasyonu sonrası kalite kontrol testleri.

Plazmitlerin transformasyonunun ardından ilk olarak ZymoPURE II Plasmid Maxiprep Kit (#D4203, Zymo) ile plazmid DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. İzole edilen plazmitler kalite kontrol kapsamında agaroz jelde görüntülenmiştir (**Şekil 10A**). Jel görüntülerine bakıldığında bantlar net olarak görülmüştür. Bakteriyel kromozomal DNA kontaminasyonu ve Supercoiled plazmit DNA jel elektroforezi Biorad Molecular Imager Gel Doc Görüntüleme Sistemi ile analiz edilmiştir. Jel görüntülerinin analiz raporlarına yer verilmiştir (**Şekil 10B**).

A.



B.



Şekil 20. İzole edilen plazmid DNA'ların kalite kontrollerini içeren jel elektroforez görüntü ve Biorad Molecular Imager Gel Doc Görüntüleme Sistemi analizi. A) pCMV- VSV-G Plazmit (Addgene, #8454), pegRNA1, psPAX2 Plazmit (Addgene #12260), SMN1_UP, SMN1_DOWN, pLenti-PE2-BSD (Addgene, #161514), pHIV-EGFP (Addgene,#21373) Plazmit Agaroz Jel Görüntüsü. B) Plazmit Kromozomal DNA Kontaminasyonu ve Supercoiled Plazmid DNA Analiz Raporu.

4.2. İzole edilen plazmid DNA'ların kalite kontrol kabul kriterlerine göre değerlendirilmesi.

İzole edilen plazmid DNA'lar belirtilen kalite kontrol kabul kriterlerine göre değerlendirilmiştir (**Tablo 11**) (Taştan vd., 2020). İzole edilen plazmitlerin (pCMV-VSV-G, psPAX2, pHIV-EGFP, pegRNA1, pegRNA2, Plenti-PE2-BSD, SMN1_UP, SMN1_DOWN) A260/A280 değerlerine bakıldığında her plazmitin değerleri beklenen aralıkta olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen plazmitlerin saf olarak izole edildiği doğrulanmıştır. Ardından izole edilen plazmit DNA konsantrasyonlarının ölçümü Microplate Reader (FLUOSTAR OMEGA) kullanılarak tespit edilmiştir (**Tablo 12**). Sonuç olarak tüm plazmitlerin kalite kontrollerinde başarılı olduğu görülmüştür ve ilerdeki deneylerde kullanılması uygun bulunmuştur.

Tablo 11. Plazmit DNA Kalite Kontrol Kabul Kriterleri (Taştan vd., 2020)

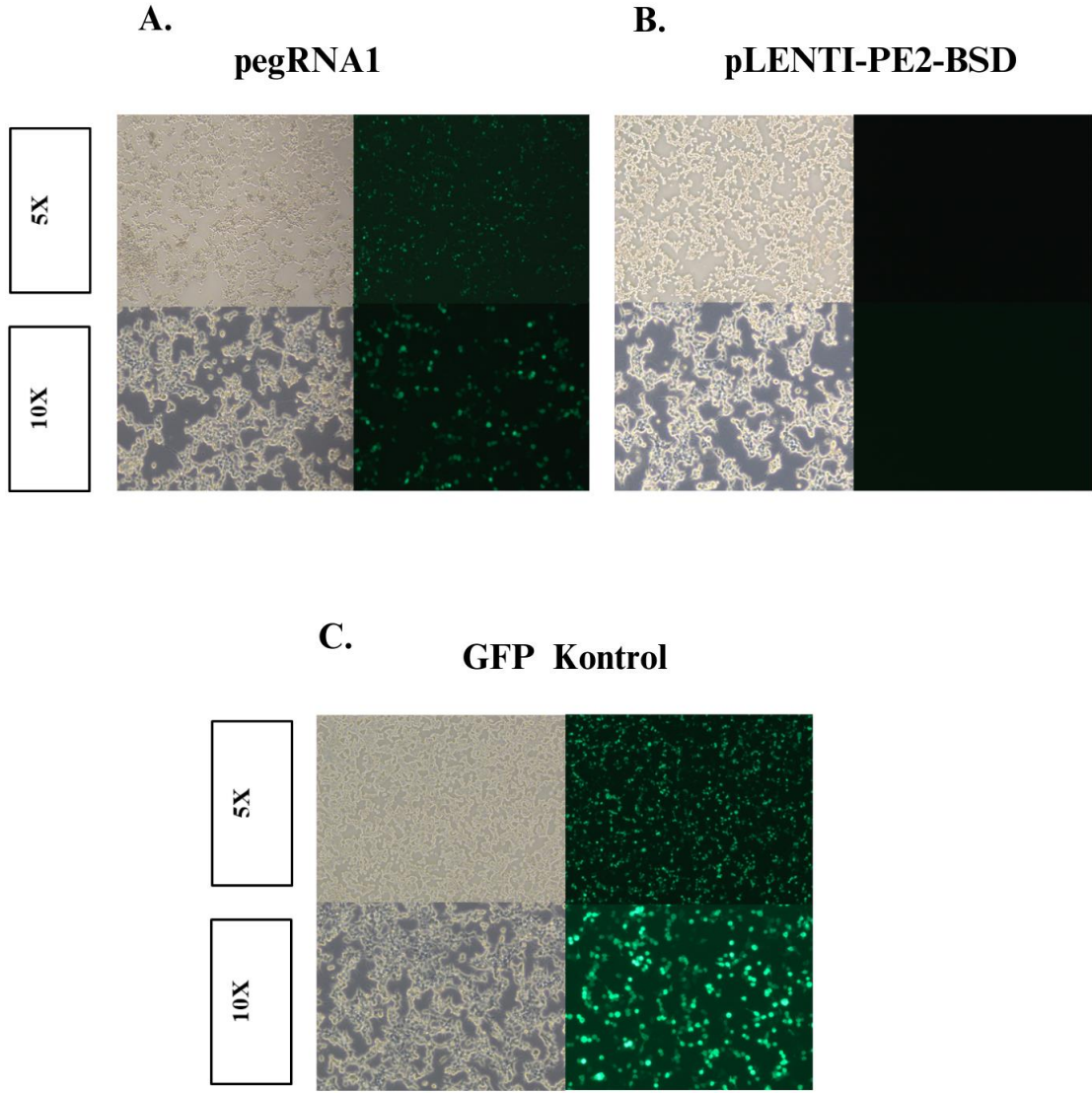
Plazmitler için analizler	Metotlar	Beklenen değer
DNA Konsantrasyonu	Microplate Reader (FLUOSTAR OMEGA)	>0.1 µg/µl
DNA Saflığı	Microplate Reader (FLUOSTAR OMEGA)	1.8 < A260/A280 < 2.0
Bakteriyel Kromozomal DNA Kontaminasyonu	Jel Elektrofrez ve Görüntüleme Sistemi	<%1 (w/w)
Supercoiled Plazmit DNA	Jel Elektrofrez ve Görüntüleme Sistemi	>%80

Tablo 12. İzole edilen Plazmit DNA'ların Kalite Kontrol Sonuçları

Plazmitler için analizler				
	DNA Konsantrasyonu	DNA Saflığı	Bakteriyel Kromozomal DNA Kontaminasyonu	Supercoiled Plazmit DNA
VSV-G	2,13 µg/µl	1,74	%0	%92,2
PSPAX2	1,77 µg/µl	1,75	%1,7	%96,6
EGFP	1,83 µg/µl	1,77	%0	%91,6
pegRNA1	2,18 µg/µl	1,74	%0	%89
pegRNA2	2,62 µg/µl	1,73	%0	%95,3
Plenti-PE2-BSD	2,48 µg/µl	1,73	%1	%87,7
SMN1_UP	1,07 µg/µl	1,75	%1,2	%97,4
SMN1_DOWN	1,05 µg/µl	1,75	%0,9	%93,7

4.3. HEK293T hücrelerine pegRNA1, pLenti-PE2-BSD ve kontrol GFP plazmitleri ile transfeksiyon sonrası 24. saatte floresan mikroskop ile görüntülenmesi.

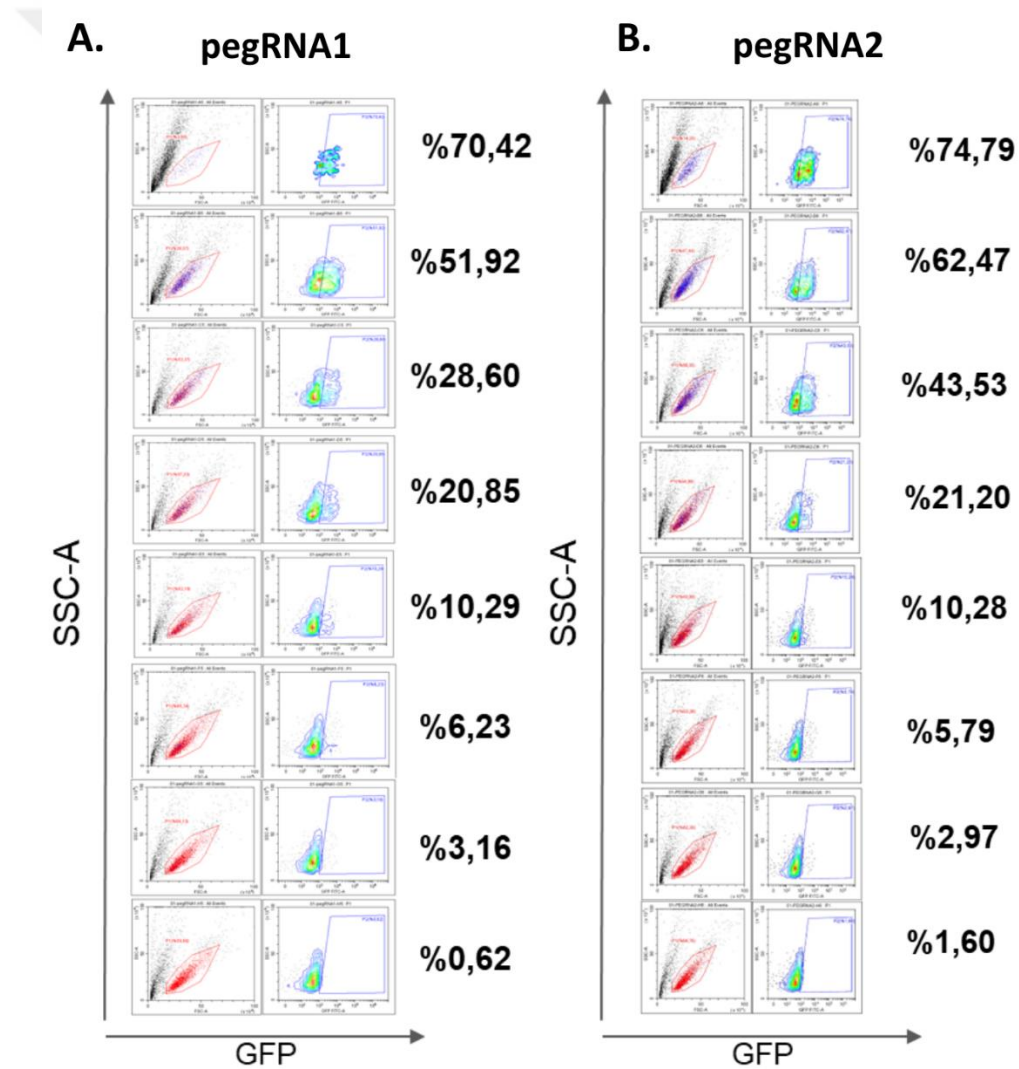
PegRNA virüsü üretmek amacı ile konak HEK293T hücrelerine transfeksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Transfeksiyondan 24 saat sonrasında hücrelerdeki GFP ekspresyonunun gösterilmesi için 512nm dalga boyundaki kanalda floresan mikroskopta görüntü alınmıştır. Virüsün üretiminin doğrulanması için kontrol grubu olarak GFP plazmiti ile transfeksiyon gerçekleştirilmiştir. **Şekil 21**'de floresan mikroskopunda çekilen faz ve GFP 5x-10x görüntüleri yer almaktadır. Faz görüntülerinde pegRNA1, pLenti-PE2-BSD ve GFP için de transfeksiyon sonrası hücrelerin morfolojik olarak sağlıklı oldukları görülmektedir (**Şekil 21**). pegRNA1 ile transfekte edilen hücrelerde (**Şekil 21A**) GFP parlaması görülürken pLenti-PE2-BSD ile transfekte edilen hücrelerde (**Şekil 21B**), herhangi bir parlama görülmemiştir. En belirgin GFP parlamasının kontrol grubu GFP plazmiti ile transfekte edilen hücrelerde olduğu görülmektedir (**Şekil 21C**). Bu sonuçlar doğrultusunda plazmit DNA'ların hücrelere aktarımının başarılı bir şekilde gerçekleştiği ve virüs üretimi doğrulandığı için ileri aşamalarındaki virüs titrasyonu ve transdüksiyon deneylerine devam edilmiştir.



Şekil 21. pegRNA1, pLenti-PE2-BSD ve GFP ile transfekte edilen HEK293T hücrelerinin transfeksiyonundan 24 saat sonrasında alınan floresan mikroskop görüntüleri. **A)** pegRNA1 ile **B)** pLenti-PE2-BSD ile **C)** kontrol GFP ile transfeksiyon sonrası hücrelerin 5x-10x faz ve floresan mikroskop görüntüsü.

4.4. pegRNA1 ve pegRNA2 virüsü ile jurkat hücre hattında kurulan titrasyon deneyinin 72 saat sonrasında akım sitometri analizi.

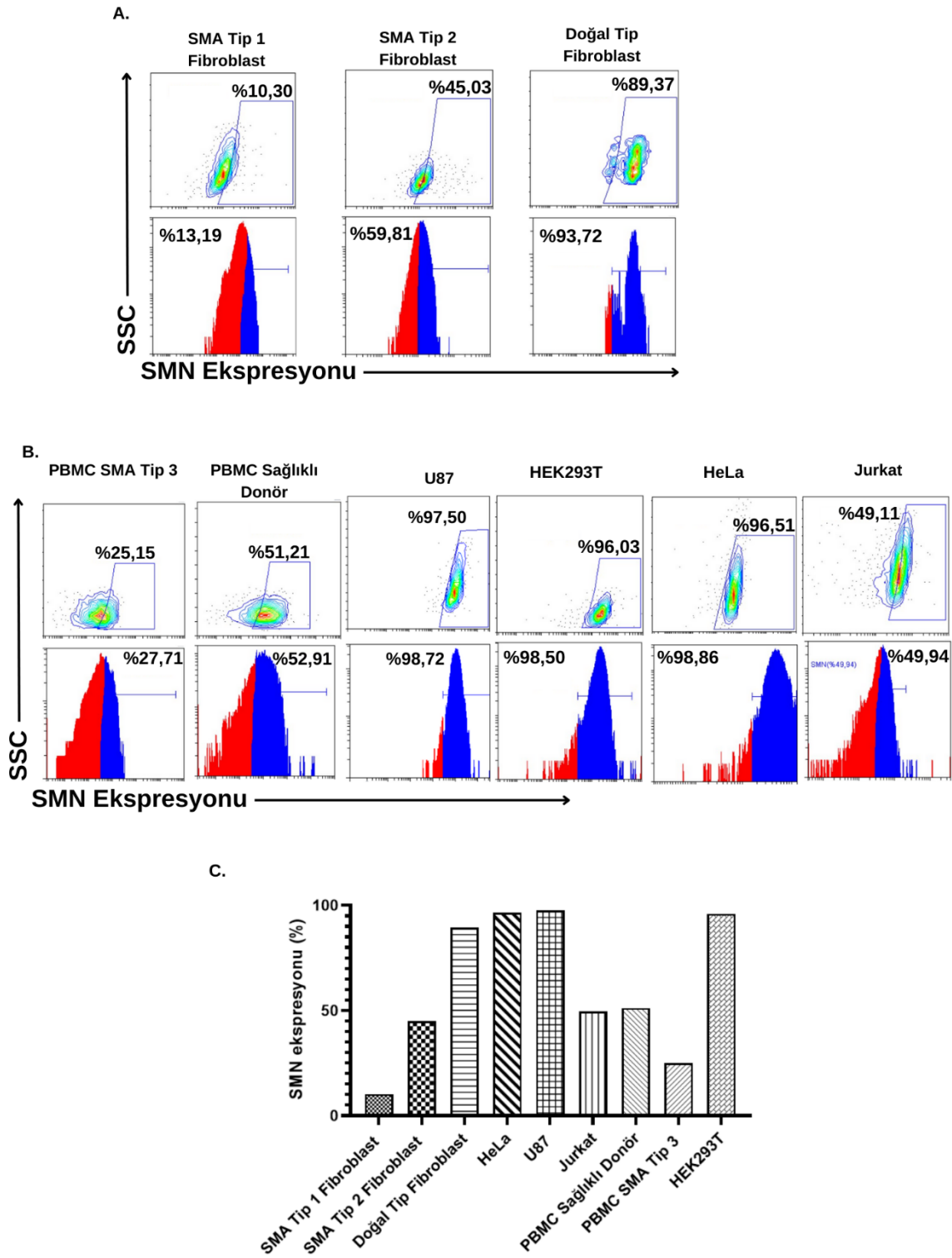
Virüs üretiminin ardından pegRNA1 ve pegRNA2 virüslerinin IFU hesaplanması amacıyla Jurkat hücre hattında titrasyon deneyi kurulmuştur. Her iki virüs için de azalan konsantrasyonlarda virüsler hücrelerin üzerine eklenmiş ve 72 saat inkübasyon ardından akım sitometride analiz edilmiştir (**Şekil 22**). Sonuçlara bakıldığında her iki virüs için de azalan konsantrasyonlarla orantılı olarak GFP ekspresyonunun da azaldığı tespit edilmiştir. Sonraki deneyler için virüsler kullanılmıştır.



Şekil 22. pegRNA1 ve pegRNA2 virüsünün üretimi sonrası Jurkat hücre hattında kurulan titrasyon deneyinin akım sitometri analizi. **A)** pegRNA1 **B)** pegRNA2 ile titrasyon 72 saat sonrasında akım sitometri analizi.

4.5. Deneylerde kullanılan hücre hatlarının SMN ifadelerinin hücre içi SMN boyama sonucu akım sitometri analizi.

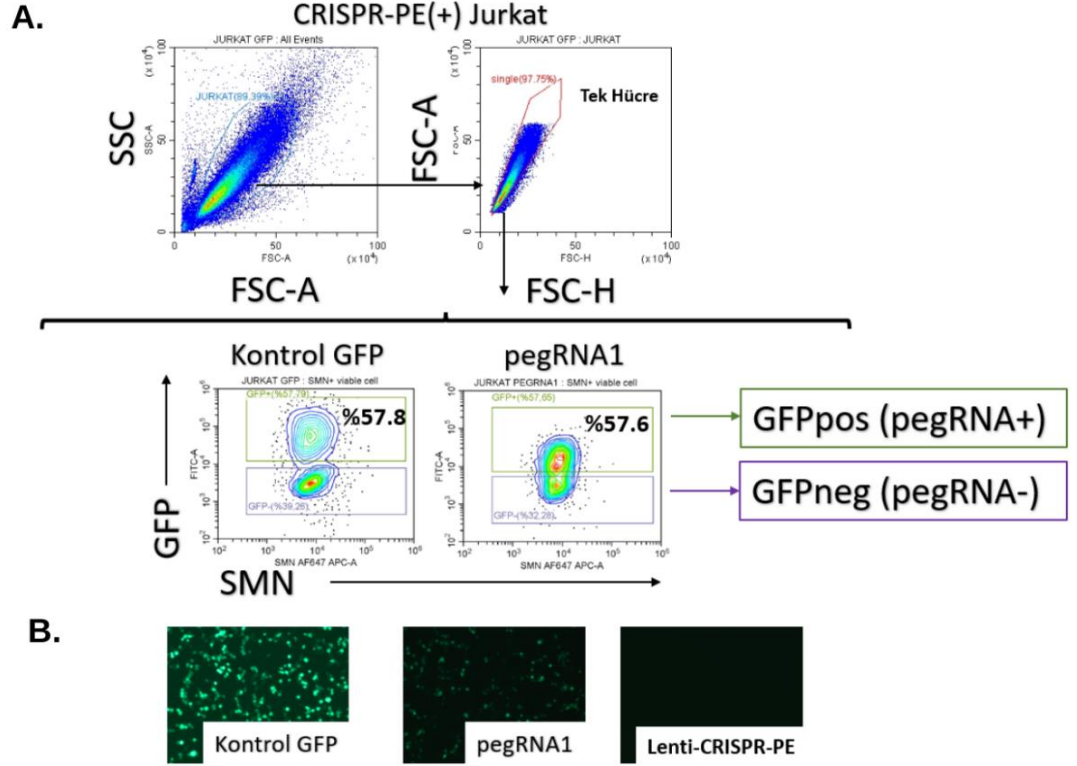
Tip 3 SMA hastasından elde edilen hücrelerde protein düzeyinde SMN ekspresyonlarına bakmak için anti-SMN-AlexaFlour 647 antikoru (sc-32313, AF647, Santa Cruz Biotechnology) ile intrasellüler boyama gerçekleştirilmiş ve sağlıklı kontrol PBMC grubu ile karşılaştırma yapılmıştır. Hastadan alınan PBMC hücreleri ile kontrol grubu sağlıklı donörden alınan PBMC ve deneylerde kullanılan SMA Tip1 fibroblast, SMA Tip 2 fibroblast, sağlıklı fibroblast WT fibroblast, Jurkat, HEK293T, HeLa ve U87 hücre hatlarının anti-SMN-AlexaFlour 647 antikoru (sc-32313 AF647) ile intrasellüler boyama sonrası SMN profilleri **Şekil 23**'te yer almaktadır. **Şekil 23A**'da SMA Tip 1 ve Tip 2 fibroblastların SMN ekspresyonları sırasıyla % 10,21 ve %54,37 seviyesinde olduğu tespit edilmiştir. Burada sağlıklı olarak kontrolü olması açısından ise WT fibroblast hücre hattının profili anlamlı bir karşılaştırma yapılmasını sağlamaktadır. WT fibroblast hücre hattının SMN ekspresyonu %81,88 seviyesinde olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanında Jurkat hücre hattının ise SMN ekspresyonunun yaklaşık %50 olduğu tespit edilmiştir. SMA tip 3 hastasına ait PBMC, sağlıklı donöre ait PBMC ve jurkat hücre hattına ait SMN boyamanın akım sitometri sonucu **Şekil 23B**'de yer almaktadır. Dört adet SMN2 kopya sayısına sahip olan SMA Tip 3 hastasının SMN profili %25,15 olarak tespit edilmiştir. Deneyde kontrol olarak sağlıklı donörden izole edilen PBMC hücrelerinin SMN profili %51,21 şeklindedir. Sağlıklı donörde ve hasta PBMC hücrelerinde SMN ekspresyonunun beklenenin altında çıktığı görülmektedir. U87, HEK293T ve HeLa hücre hatlarının SMN ekspresyon seviyelerinin %96 gibi yüksek bir ekspresyon profiline sahip olduğu görülmektedir. Hücre hatlarının SMN ekspresyon seviyelerine dayalı oluşturulan bar grafik ise **Şekil 23C**'de yer almaktadır.



Şekil 23. Hücre hatlarının SMN profillerinin değerlendirilmesi. **A)** SMA Tip 1 ve SMA Tip 2 fibroblast, WT Fibroblast hücre hattı **B)** SMA Tip 3 hastasından izole edilen PBMC, sağlıklı donör PBMC, U87, HEK293T, HeLa ve Jurkat hücre hatlarında SMN ifadesinin anti-SMN monoklonal antikor AF647 ile hücre içi boyama sonrası akım sitometri analizi. **C)** Hücre hatlarında SMN ekspresyon profillerine bağlı oluşturulan bar grafik.

4.6. SMN-Düşük Jurkat hücrelerinde CRISPR-PE sisteminin etkinliğinin değerlendirilmesi.

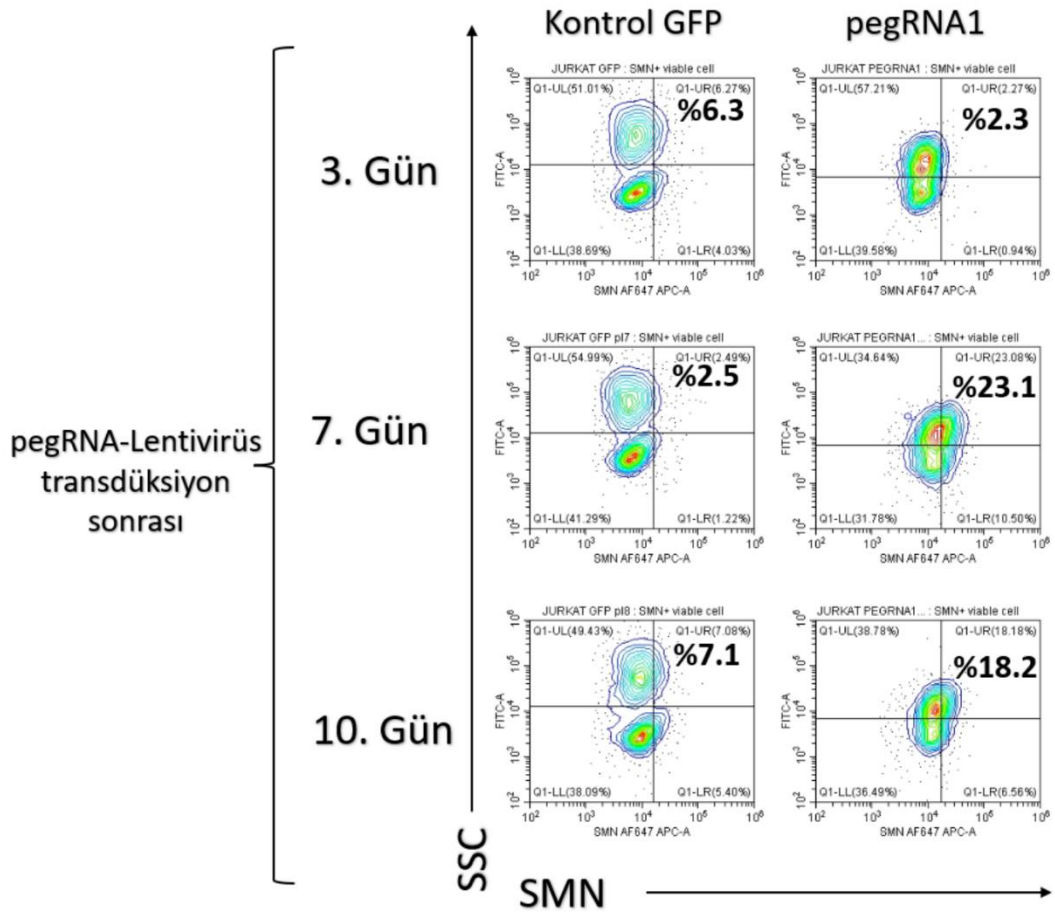
CRISPR PE(+) Jurkat hücrelerinin geliştirilmesi için hücre hattına ilk olarak CRISPR PE sistemini kodlayan pLenti-PE2-BSD Lentivirüs transdükte edilmiştir. Ardından Lentivirüs Blastisine seçim geni içerdği için vektörü alan hücrelerin seçilimi için Blastisine uygulaması yapıp hücreler seçilmiştir. Blastisin ile seçilimi tamamlanarak %99 pozitif Prime Editing kodlayan Jurkat hücre hatları oluşturulmuştur. Ardından pHIV-EGFP lentivirüslerinde pU6 promotöre sahip pegRNA1, PE(+) Jurkat hücrelerine transdükte edilmiştir. Transdüksiyon sonrası 72. Saatte hücreler akım sitometri ile analiz edilmiştir (**Şekil 24A**). Konak HEK293T hücre hattına transfeksiyon sonrası floresan mikroskop altında görüntüleme yapılmıştır (**Şekil 24B**). pegRNA1 eksprese eden PE(+) Jurkat hücrelerin GFP pozitif olduğu flow sitometri analizi ve floresan mikroskobu ile tespit edilmiştir.



Şekil 24. SMN-düşük Jurkat hücre hattında CRISPR-PE+ sistemi ve pegRNA1 ile gen modifikasyonunun SMN ekspresyonu üzerine etkisinin karşılaştırılması. **A)** Jurkat hücrelerinde SMN Alexa Flour 647 monoklonal antikoru ile hücre içi boyama sonrası akım sitometri analizi **B)** HEK293T hücrelerinde kontrol GFP pozitif lentiviral vektörün ve pegRNA-GFP kodlayan lentiviral vektörlerin transfeksiyondan 24 saat sonrası floresan mikroskop 5X görüntüsü.

4.7. SMN-düşük Jurkat hücre hattında CRISPR-PE sisteminin pegRNA1 transdüksiyon sonrası 3, 7 ve 10. günlerde kontrol GFP ve pegRNA-GFP kodlayan lentivirüslerle karşılaştırılarak test edilmesi.

pegRNA1(+) PE(+) Jurkat hücrelerinde transdüksiyondan sonraki 3,7 ve 10. günlerde anti-SMN monoklonal antikor ile gerçekleştirilen hücre içi boyama ile SMN ifadeleri tespit edilmiştir (**Şekil 25**). 7 ve 10. günlerde gerçekleştirilen bağımsız boyamalarda pegRNA pozitif Jurkat hücrelerinde kontrol GFP pozitif pegRNA-negatif Jurkat hücrelerine kıyasla GFP ve SMN pozitif hücre popülasyonunun %2.5'tan %23.1 e kadar yükseldiği gösterilmiştir. Kontrol GFP(+) PE(+) Jurkat hücrelerinde GFP+ SMN+ popülasyonun sabit kaldığı tespit edilmiştir.

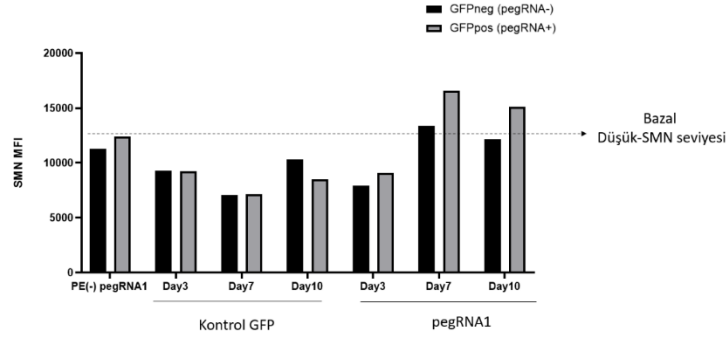


Şekil 25. CRISPR-PE sisteminin pegRNA1 transdüksiyon sonrası PE pozitif Jurkat hücrelerinde 3, 7 ve 10. günlerde SMN protein ekspresyonunun yukarı regülasyonunun akım sitometri analizi ile gösterilmesi.

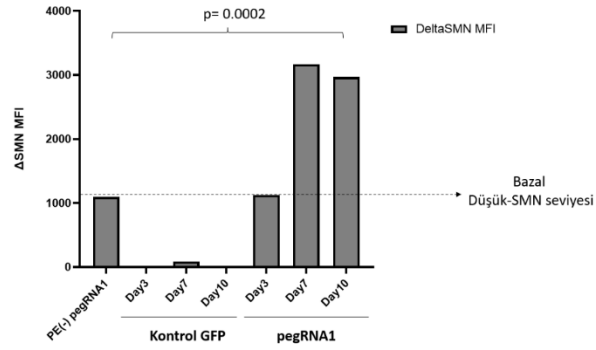
4.8. PE(+) pegRNA1(+) Jurkat ve kontrol PE(+) GFP Jurkat hücrelerinde SMN ve ΔSMN ifadelerinin MFI değerlerinin karşılaştırılması.

pegRNA1 transdüksiyonundan sonra MFI değerleri ölçülerek SMN ifadesindeki artış değerlendirilmiştir. İlk olarak GFP ifade eden ve GFP ifade etmeyen hücrelerin SMN MFI değerleri ayrı ayrı analiz edilerek bar grafikler oluşturulmuştur (**Şekil 26A**). Jurkat hücrelerindeki bazal SMN-düşük ifadeleri, PE kodlamayan pegRNA1 transdüksiyonlu Jurkat hücrelerindeki SMN MFI seviyesine göre belirlenmiştir. Ardından GFP eksprese eden ve GFP eksprese etmeyen hücrelerdeki SMN MFI değerleri birbirinden çıkartılmıştır. Bunun sonucunda pegRNA1 transdüksiyonlu PE(+) Jurkat hücrelerde SMN MFI değerlerindeki artış CRISPR-PE sisteminin etkisi olarak kabul edilmiştir (**Şekil 26B**). ΔSMN MFI değerlerine bakıldığında pegRNA1(+) GFP(+) PE(+) hücrelerin pegRNA1(+) GFP(+) PE(-) hücre popülasyonuna oranla istatistiksel olarak anlamlı şekilde yükseldiği tespit edilmiştir (**Şekil 26B**). PegRNA (+) GFP (+) PE (-) Jurkat hücrelerindeki SMN MFI değerleri, bazal SMN MFI farkı olarak seçilmiştir. Bu temel fark seviyesi ise daha sonrasında pegRNA (+) GFP(+) PE(+) SMN MFI değerinden çıkartılmıştır (**Şekil xC**). PegRNA ve PE kodlayan Jurkat hücreleri CRISPR-PE sisteminin etkisinin tespit edileceği hücre popülasyonu olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre 7. gün sonrasında pegRNA1 PE(+) Jurkat hücrelerinde SMN ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir (**Şekil 26C**).

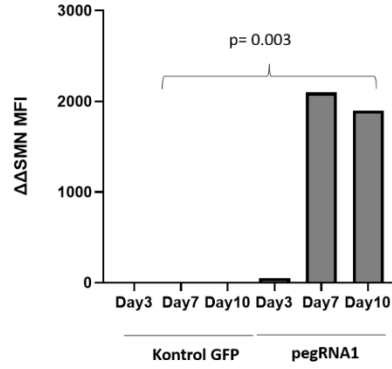
A.



B.



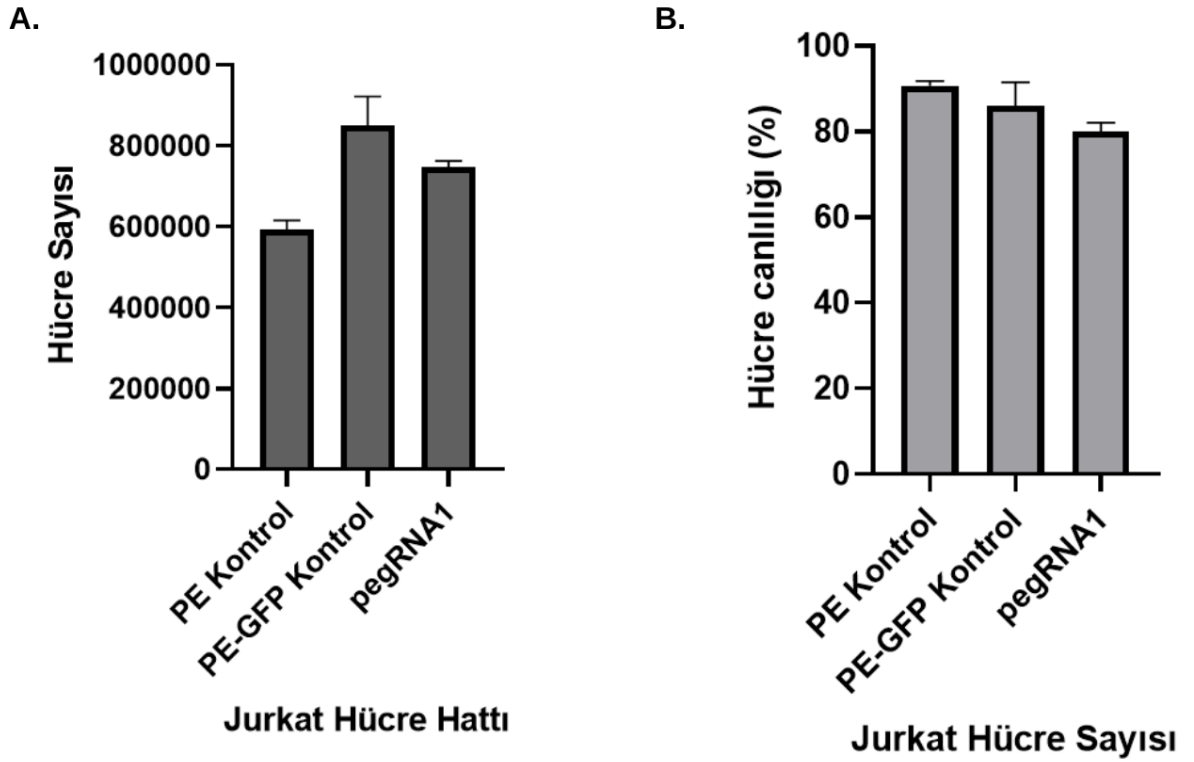
C.



Şekil 26. pegRNA1(+) PE(+) Jurkat hücrelerinde kontrol GFP PE(+) Jurkat hücrelerine kıyasla SMN ve Δ SMN ekspresyonlarının MFI değerlerini içeren bar grafikler. **A)** pegRNA (+) GFP (+) PE (-), pegRNA (-) GFP (+) PE (+) ve pegRNA (+) GFP (+) PE (+) kontrolleri de içeren Jurkat hücrelerindeki GFP ifade eden ve GFP ifade etmeyen hücrelerin SMN MFI değerlerinin gösterildiği bar grafik. Kesikli kırmızı ok, PE kodlamayan pegRNA transdüksiyonlu Jurkat hücrelerinin SMN MFI seviyesine dayalı olarak Jurkat hücrelerinde arka plan düşük-SMN seviyesini göstermektedir. **B)** GFP ifade eden ve GFP ifade etmeyen hücre popülasyonunun SMN MFI değerlerinin çıkarılması ile oluşturulan bar grafikler. Kesikli kırmızı ok, PE (-) pegRNA (+) Jurkat hücrelerinin SMN MFI düzeyine dayalı olarak pegRNA (+/-) GFP (+) Jurkat hücrelerinden çıkarılmış Δ SMN MFI düzeyini göstermektedir. **C)** pegRNA (+) GFP (+) PE (-) hücrelerinin MFI değerlerinin pegRNA (+) GFP (+) PE (+) hücrelerden çıkarılmasının ardından pegRNA (+) and PE (+) hücrelerdeki SMN ifadelerindeki artışı gösteren bar grafikler. $p < 0,05$. NS= Anlamlı Değil.

4.9. Düşük SMN profiline sahip Jurkat hücre hattında CRISPR-PE sisteminin canlılık ve hücre sayısına etkisinin değerlendirilmesi.

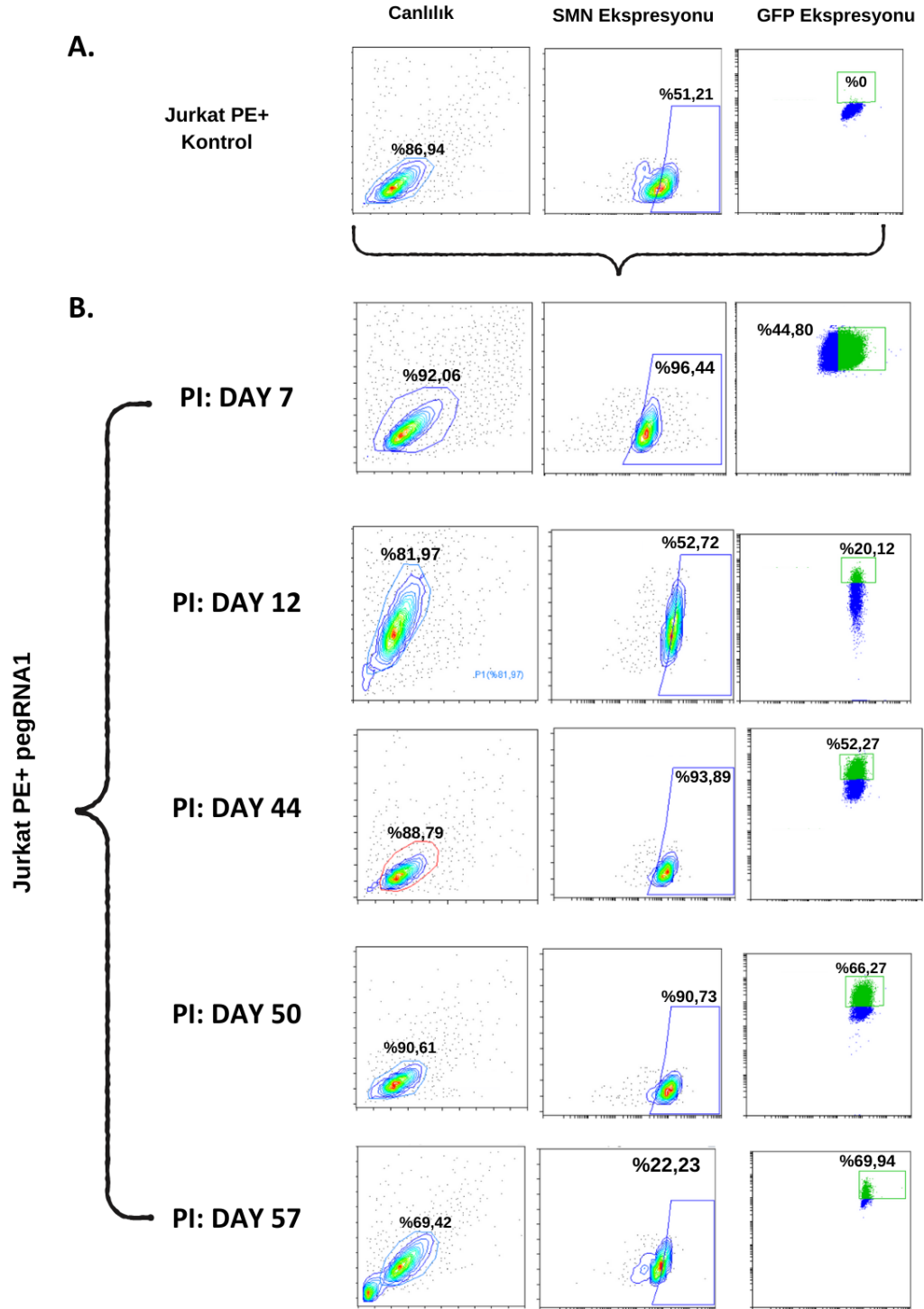
Jurkat hücre hattında CRISPR-PE sisteminin canlılık ve hücre sayısı üzerinde etkisinin test edilmesi için pLenti ve GFP kontrol grupların kıyasla hücre sayısı (**Şekil 27A**) ve hücre canlılıkları (**Şekil 27B**) için grafikler oluşturulmuştur. **Şekil 27A**'da yer alan hücre sayısının PE(+) kontrol grubuna kıyasla PE(+) GFP ve PE(+) pegRNA1 transdükte hücre hattında daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. **Şekil 27B**'de yer alan hücre canlılıklarına bakıldığında PE(+) kontrol, PE(+) GFP ve PE(+) pegRNA1 transdükte hücre gruplarının her üçünün de hücre canlılıklarının %80 civarında olduğu görülmüştür.



Şekil 27. Jurkat hücre hattında pegRNA1 ile transdüksiyon sonrası CRISPR-PE sisteminin canlılık hücre sayısı üzerindeki etkisinin belirlenmesi için oluşturulan bar grafikler. pLenti ve GFP kontrol gruba kıyasla Jurkat pegRNA1 transdükte hücre hattında **A)** hücre sayılarının **B)** hücre canlılığının karşılaştırılması için oluşturulan bar grafikler.

4.10. pegRNA1 transdükte edilen Jurkat PE(+) hücre hattında PI: 7-12-44-50-57. günlerde GFP ve SMN ekspresyonunun takibi.

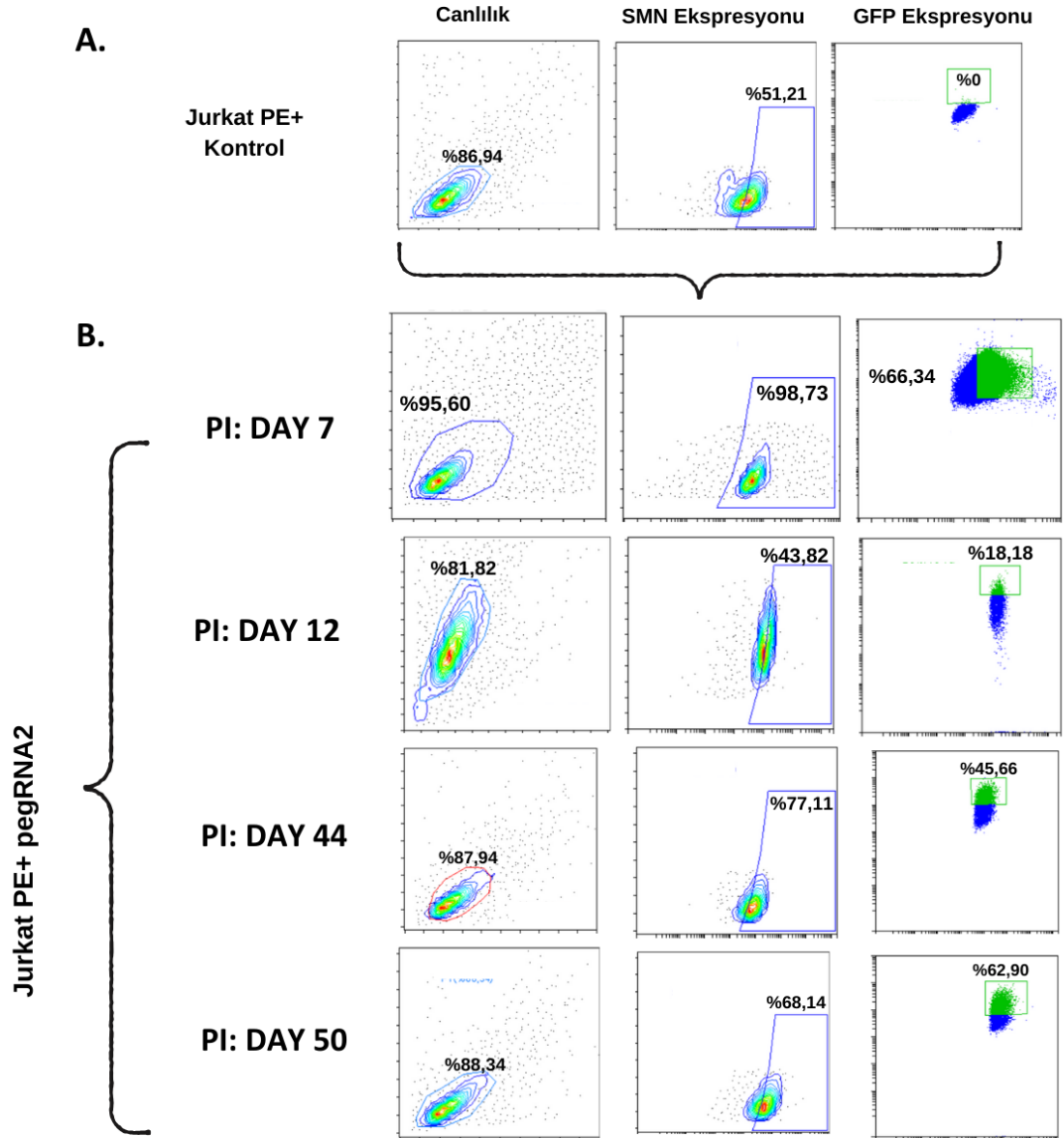
PE(+) Jurkat hücre hatları pegRNA1 ifade eden GFP biyobelirteçli lentiviral vektörler ile transdükte edilmesini takiben hücre popülasyonu içerisindeki SMN ekspresyon seviyeleri 2 ay süre boyunca takip edilmiştir. **Şekil 28**'de PI: 7. günden 57. güne kadar pegRNA(+) GFP(+) PE(+) Jurkat hücre hatlarındaki canlılıklar, GFP ve SMN ekspresyon seviyelerine ait akım sitometri analizleri yer almaktadır. Bu analizlerde GFP(+) SMN(+) hücre oranları gözükmemektedir. SMN ekspresyonunun PE(+) Jurkat kontrol grubuna (**Şekil 28A**) kıyasla PE(+) pegRNA1 Jurkat hücrelerinde (**Şekil 28B**) takip edilen diğer PI günlerinde artış gösterdiği tespit edilmiştir.



Şekil 28. Jurkat PE(+) hücre hattında pegRNA1 transdüksiyon sonrası 7-12-44-50-57. günlerde anti-SMN-AlexaFlour 647 antikor (sc-32313 AF647) ile hücre içi boyama sonrası akım sitometri analizi. SMN boyama sonrası **A)** Jurkat PE(+) hücrelerinde **B)** PE(+) pegRNA1 hücrelerinde hücre canlılığı, SMN ekspresyonu ve SMN+ GFP+ hücre popülasyonları. (PI: post infection, transdüksiyon sonrası gün sayısı)

4.11. pegRNA2 transdükte edilen Jurkat PE(+) hücre hattında PI: 7-12-44-50. günlerde GFP ve SMN ekspresyonunun takibi.

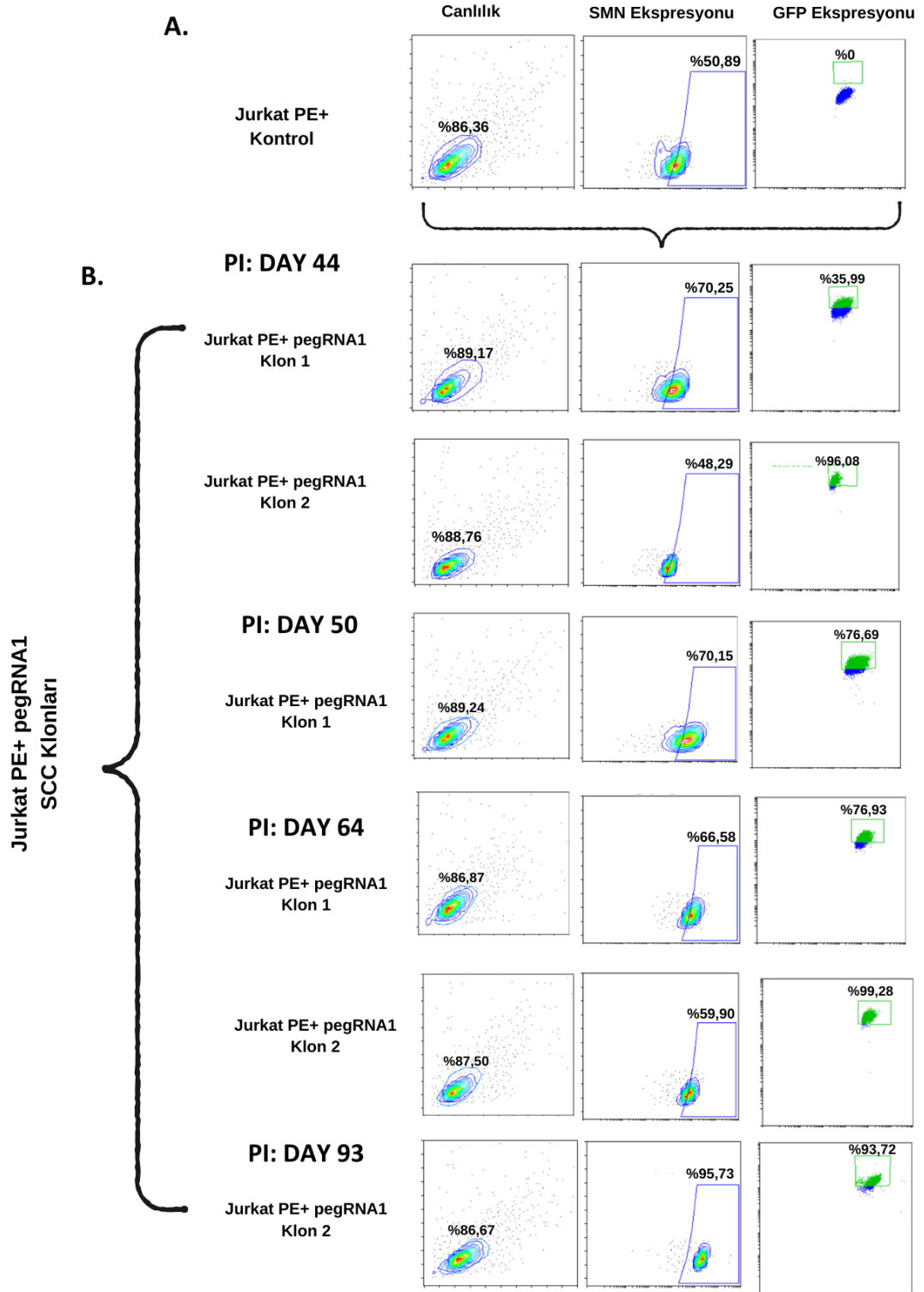
PE(+) Jurkat hücre hatları pegRNA2 ifade eden GFP biyobelirteçli lentiviral vektörler ile transdükte edilmesini takiben hücre popülasyonu içerisindeki SMN ekspresyon seviyeleri 2 ay süre boyunca takip edilmiştir. **Şekil 29**'da PI: 7. günden 50. güne kadar pegRNA(+) GFP(+) PE(+) Jurkat hücre hatlarındaki canlılıklar, GFP ve SMN ekspresyon seviyelerine ait akım sitometri analizleri yer almaktadır. Bu analizlerde GFP(+) SMN(+) hücre oranları gözükmemektedir. SMN ekspresyonunun PE(+) Jurkat kontrol grubuna (**Şekil 30A**) kıyasla PE(+) pegRNA1 Jurkat hücrelerinde (**Şekil 30B**) takip edilen diğer PI günlerinde artış gösterdiği tespit edilmiştir. Özellikle GFP+ SMN+ popülasyonun kontrol grubuna kıyasla artış gösterdiği tespit edilmiştir.



Şekil 29. Jurkat PE(+) hücre hattında pegRNA2 transdüksiyon sonrası 7-12-44-50. günlerde anti-SMN-AlexaFlour 647 antikor (sc-32313 AF647) ile hücre içi boyama sonrası akım sitometri analizi. SMN boyama sonrası A) Jurkat PE(+) hücrelerinde B) PE(+) pegRNA2 hücrelerinde hücre canlılığı, SMN ekspresyonu ve SMN+ GFP+ hücre popülasyonları. (PI: post infection, transdüksiyon sonrası gün sayısı)

4.12. pegRNA1 transdükte edilen Jurkat PE(+) Hücre hattında SCC klonlarında PI: 44-50-64-93. günlerde GFP ve SMN ekspresyonunun takibi.

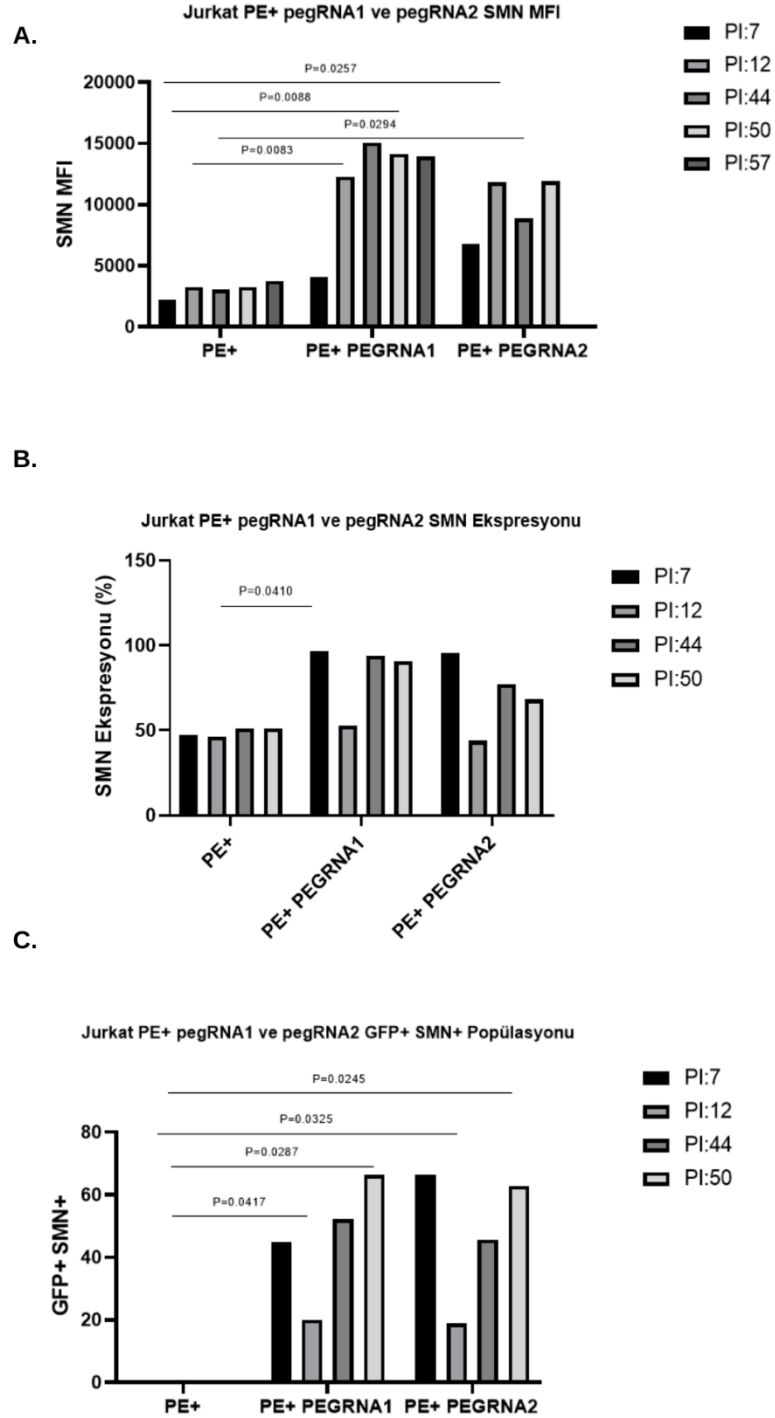
Jurkat PE(+) pegRNA1(+) hücrelerde single cell cloning (SCC) uygulaması gerçekleştirilmiş olup yüksek GFP oranına sahip koloniler seçilip kültüre edilmiştir. SCC sonrası pegRNA1 (+) PE(+) Jurkat hücre hattında PI 44-50-64 ve 93. Günlerde yaklaşık 3 aylık süre ile SMN ekspresyon seviyelerindeki değişimler farklı hücre klonlarında takip edilmiştir. **Şekil 30**'da farklı SCC klonlarına ait Jurkat PE(+) kontrol grubuna kıyasla (**Şekil 30A**) Jurkat PE(+) pegRNA1(+) hücre klonlarına ait (**Şekil 30B**) SMN ifadesindeki değişimi gösteren akım sitometri ölçüm sonuçları yer almaktadır. 7. günden 93. güne kadar SMN ifadesindeki düzey farklı hücre klonlarında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek kaldığı değerlendirilmiştir.



Şekil 30. Jurkat PE(+) pegRNA1 hücre hattında single cell cloning (SCC) sonrası Jurkat PE(+) kontrol ve SCC sonrası Jurkat PE(+) pegRNA1 klonlarının PI44-50-64 ve 93. günlerde anti-SMN-AlexaFluor 647 antikoru (sc-32313 AF647) ile hücre içi boyama sonrası akım sitometri analizi. **A)** Jurkat PE(+) kontrol **B)** Jurkat PE(+) pegRNA1 SCC klonlarında hücre canlılığı, SMN ekspresyonu ve SMN+ GFP+ hücre popülasyonları. (PI: post infection, transdüksiyon sonrası gün sayısı)

4.13. pegRNA1 ve pegRNA2 transdükte edilen Jurkat PE(+) Hücre hattında PI: 7-12-44-50. günlerde SMN MFI, SMN ekspresyon ve GFP+ SMN+ popülasyonlarına ait bar grafikler.

Jurkat PE(+) pegRNA1(+) ve Jurkat PE(+) pegRNA2(+) transdükte hücrelerin PI: 7-12-44-50 ve 57. Günlerde akım sitometri analizlerinden elde edilen GFP MFI ve SMN ekspresyon seviyelerine ait verilerden bar grafikler oluşturulmuştur (**Şekil 31**). **Şekil 31A**'da Jurkat PE(+) kontrol grubuna kıyasla Jurkat PE(+) pegRNA1(+) ve Jurkat PE(+) pegRNA2(+) hücre grubunda SMN MFI değerlerinin artış gösterdiği tespit edilmiştir. **Şekil 31B**'de ise özellikle pegRNA1'de anlamlı olarak SMN ekspresyonlarının artışı tespit edilmiştir. **Şekil 31C**'de değişen PI günlerine bağlı olarak GFP+ SMN+ hücre popülasyonunun anlamlı oranda PE(+) kontrol grubuna kıyasla artış gösterdiği tespit edilmiştir.



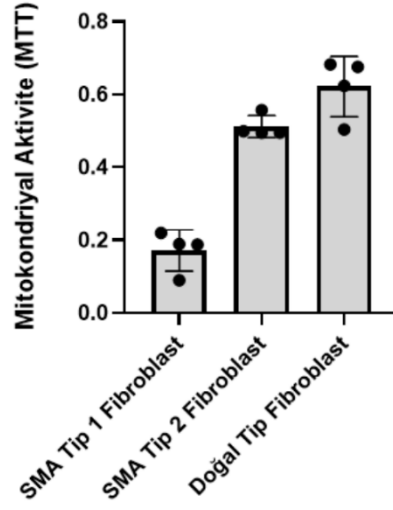
Şekil 31. Jurkat PE(+) hücre hattında pegRNA1 ve pegRNA2 ile transdüksiyon sonrası PI:7-12-44 ve 50. Günlerde PE(+) pegRNA1, pegRNA2, kontrol grubu PE(+) hücelere ait oluşturulan bar grafikler. Jurkat PE(+) kontrol ve PE(+) pegRNA1 hücrelerde PI:7-12-44 ve 50. günlerdeki **A)** SMN MFI **B)** SMN ekspresyon değerlerine **C)** GFP+ SMN+ popülasyon değerlerine ait bar grafikler. (PI: post infection, transdüksiyon sonrası gün sayısı). $p < 0,05$. NS= Anlamlı Değil.

4.14. Primer SMA Tip 1, Tip 2 Fibroblast ve WT Fibroblast hücre hatlarında hücre canlılığının ve apoptoz evrelerinin belirlenmesi için gerçekleştirilen MTT ve Annexin-V analizi.

SMN ekspresyon profilleri karşılaştırılan SMA Tip 1, SMA Tip 2 Fibroblast ve WT Fibroblast hücre hatlarında mitokondriyal aktivitelerin karşılaştırılması için MTT analizi gerçekleştirilmiştir. MTT analizi sonucunda oluşturulan bar grafikler **Şekil 32A**'da yer almaktadır. SMA Tip 1 fibroblastın mitokondriyal aktivitesinin SMA Tip 2 fibroblastın mitokondriyal aktivitesinden anlamlı oranda daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanında kontrol olarak sağlıklı olan WT fibroblast hücre hattının ise her iki SMA fibroblast hücre hatlarından daha yüksek mitokondriyal aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Bu durum da üç hücre hattı arasındaki SMN2 kopya sayısının hücre canlılığına olan etkisini göstermektedir. Annexin V- propidium iodide (PI) boyama hücre popülasyonlarında hücrelerin apoptoz evrelerinin ve canlılıklarının belirlenmesi için kullanılan bir boyama yöntemidir. Deneylerde kullanılan SMA Tip 1 ve SMA Tip 2 fibroblast hücre hatlarında Annexin-V-PI boyama gerçekleştirilerek bar grafikler oluşturulmuştur (**Şekil 32B**). Canlılıklara bakıldığında SMA Tip 2 fibroblast hücre hattının canlılığının SMA Tip 1 fibroblast hücre hattından daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Buna paralel olarak erken apoptoz ve geç apoptoz evrelerindeki hücrelerin oranı her iki hücre hattında da düşük olmakla beraber SMA Tip 2 fibroblast hücre hattında daha düşük olduğu görülmektedir.

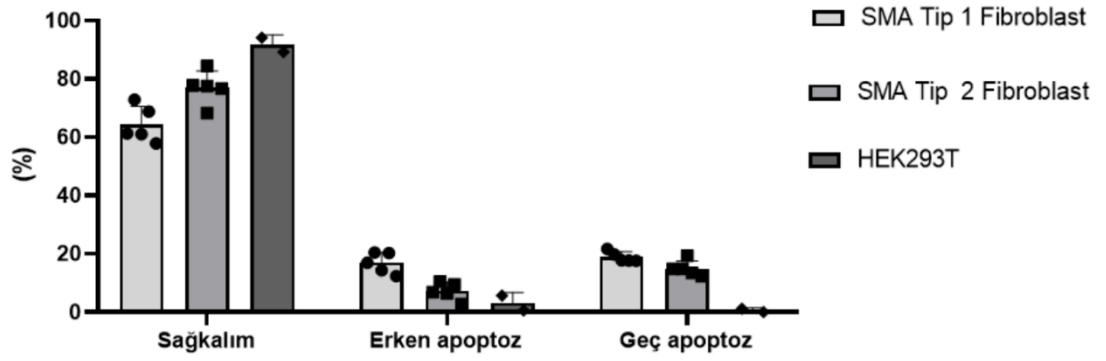
A.

SMA Fibroblast ve Doğal Tip Fibroblast



B.

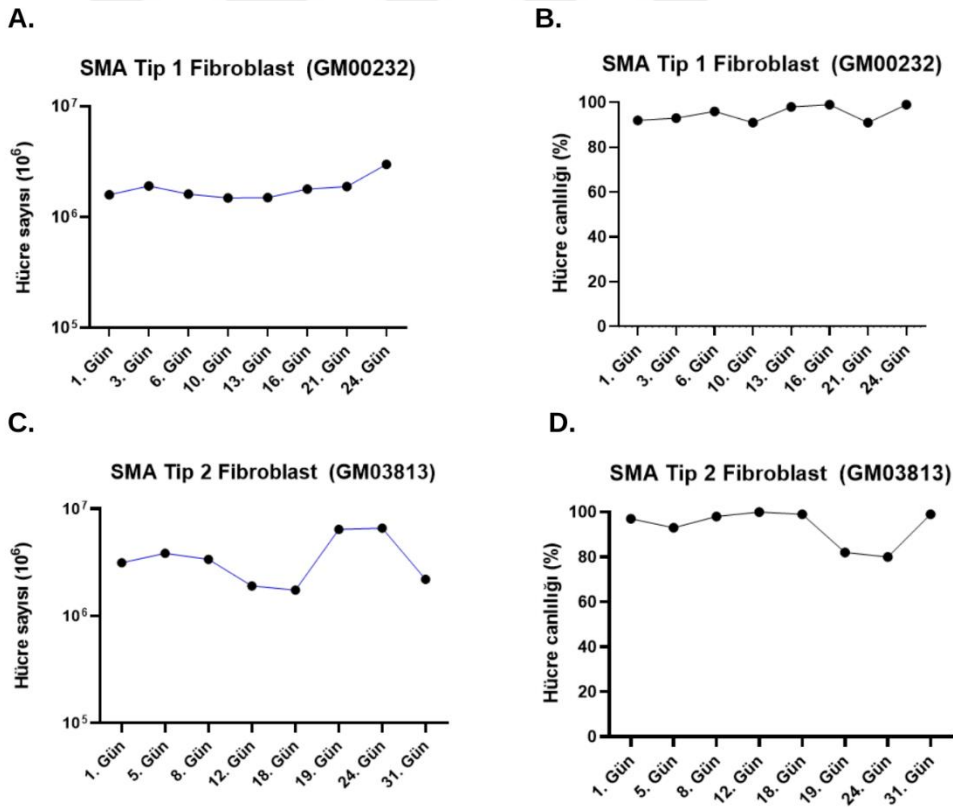
SMA Tip 1- Tip 2 Fibroblast ve HEK293T Annexin-V



Şekil 32. SMA Tip 1, SMA Tip 2 fibroblast, WT fibroblast ve kontrol HEK293T hücre hatlarında gerçekleştirilen MTT ve Annexin V - PI analizi sonrası oluşturulan bar grafikleri. **A)** SMA Tip 1, SMA Tip 2 ve WT fibroblast hücre hatlarında gerçekleştirilen MTT sonucu oluşturulan bar grafik. **B)** SMA Tip 1, SMA Tip 2 fibroblast ve HEK293T hücre hatlarında gerçekleştirilen Annexin-V-PI boyama sonucu oluşturulan bar grafik.

4.15. Primer SMA Tip 1 ve SMA Tip 2 Fibroblast hücre hatlarının zamana bağlı hücre sayısı ve hücre canlılığının grafiksel gösterimi.

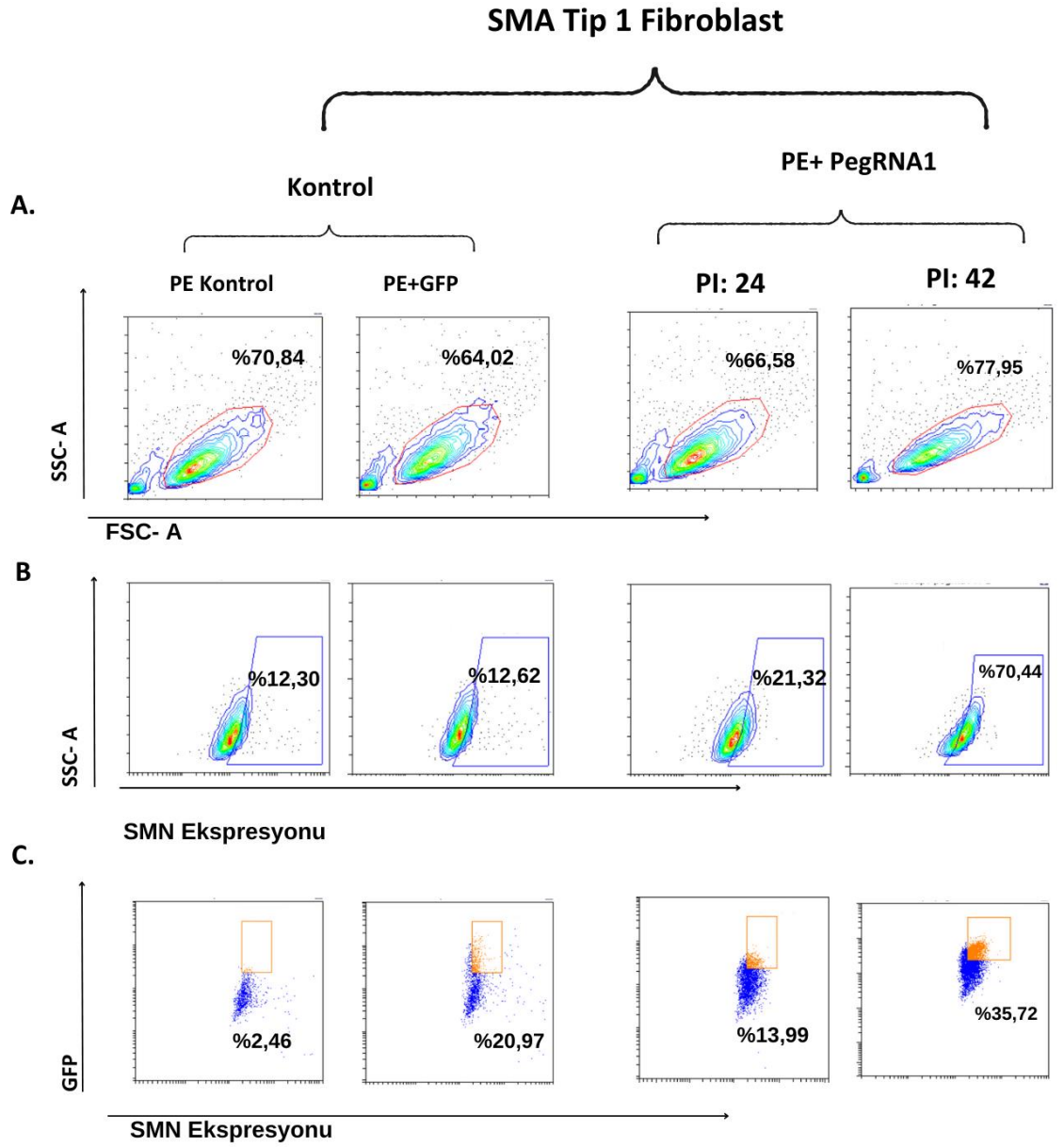
Hastalardan izole edilerek kültüre edilmiş Primer SMA Tip 1 ve SMA tip 2 fibroblast hücre hatlarının deneylerde zamana bağlı olarak hücre sayısı ve canlılıklarının değerlendirildiği verilerden çizgi grafikleri oluşturulmuştur (**Şekil 33**). 2 adet SMN2 kopya sayısına sahip SMA Tip 1 fibroblast hücre hattına bakıldığında hücre sayısının (**Şekil 33A**) stabil şekilde seyrettiği görülmekte, hücre canlılığının da (**Şekil 33B**) sabit %90 seviyelerinde kalarak devam ettiği görülmektedir. Bunun yanında 3 adet SMN2 kopya sayısına sahip olan SMA Tip 2 hücre hattına bakıldığında hücre sayısının (**Şekil 33C**) Tip 1 fibroblasta oranla daha fazla olduğu görülürken buna paralel olarak hücre canlılığının da (**Şekil 33D**) neredeyse 20. güne kadar daha yüksek ve stabil bir şekilde seyrettiği görülmektedir.



Şekil 33. Primer SMA Tip 1 Fibroblast (#GM00232) ve SMA Tip 2 Fibroblast (#GM03813) hücre hattına ait zamana bağlı hücre sayısı ve canlılığını içeren çizgi grafikleri. Primer SMA Tip 1 Fibroblast hücre hattına ait **A)** hücre sayısı çizgi grafiği **B)** canlılık çizgi grafiği. Primer SMA Tip 2 Fibroblast hücre hattına ait **C)** hücre sayısı çizgi grafiği **D)** canlılık çizgi grafiği.

4.16. Primer SMA Tip 1 Fibroblast hücre hattına pegRNA1 ile transdüksiyon sonrası PI: 24 ve 42. Günlerde SMN ve GFP ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi.

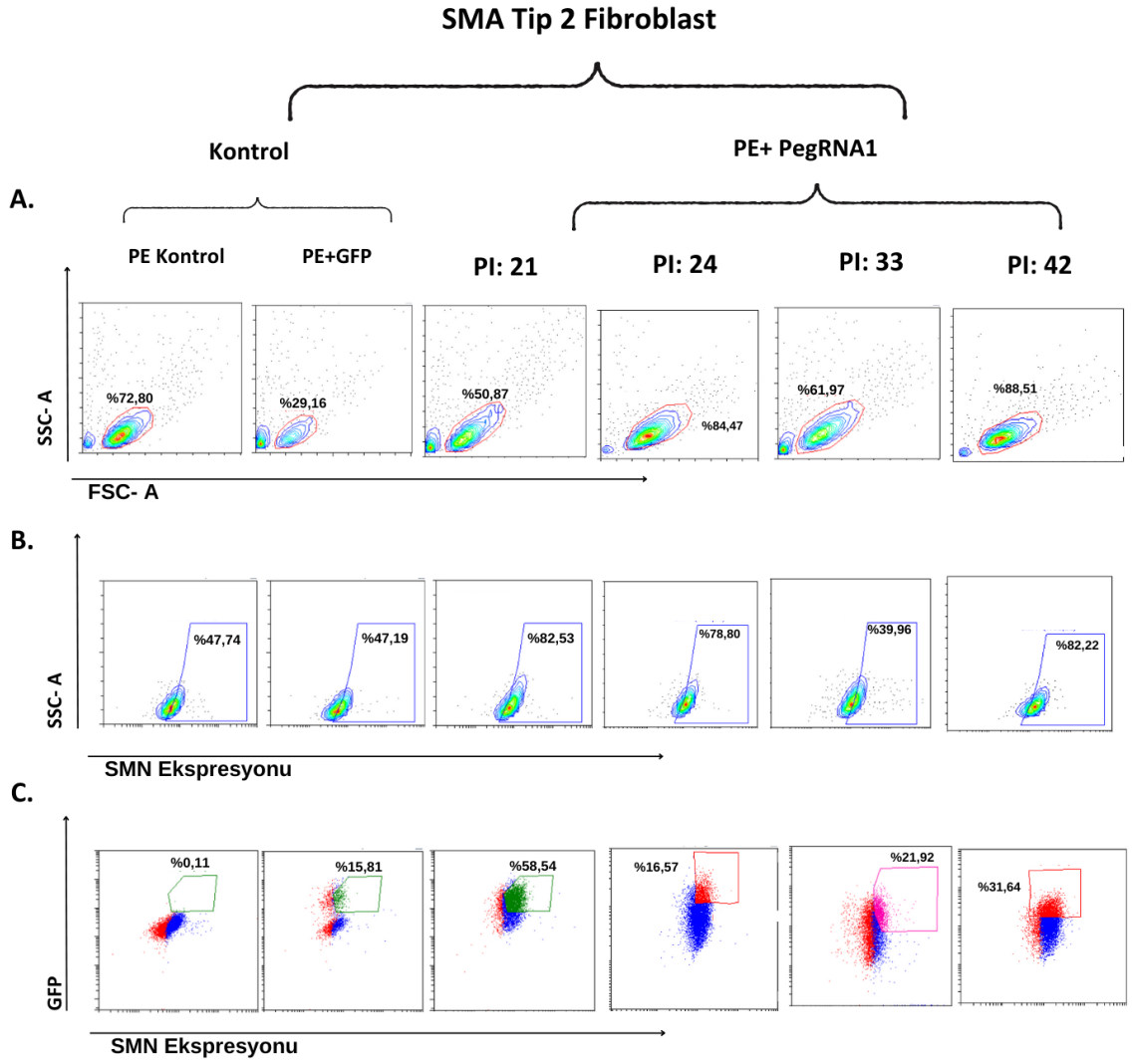
CRISPR-PE sistemi Primer SMA Tip 1 fibroblast hücre hattına aktarıldıktan sonra intrasellüler SMN boyama gerçekleştirerek SMN protein ekspresyonunun stabilitesi farklı post-infection günlerde takip edilmiştir. Blasticidin seçilimi gerçekleştirildikten sonra %99 pozitif Prime Editing kodlayan fibroblastlar pegRNA1 kodlayan GFP biyobelirteçli lentivirüsler ile transdükte edilmiştir. **Şekil 34**'te gösterildiği gibi GFP(+) pegRNA(+) hücre hatlarında zamana bağlı canlı hücre popülasyonlarının yüzde oranlarının arttığı, pegRNA ifade etmeyen veya sadece GFP ifadesi sağlayan kontrol grupları ile kıyaslanarak değerlendirilmiştir. **Şekil 34A**'da yer alan hücre canlılıklarına ait analizlerde pegRNA1 transdüksiyonunun PE(+) ve PE(+) GFP kontrol gruplarına kıyasla hücre canlılığını değiştirmedeği gösterilmiştir. **Şekil 34B**'de yer alan SMN ekspresyon analizlerine bakıldığında ise PE(+) pegRNA(+) hücrelerin PI:24. Günden 42. Güne doğru kontrol gruplarına oranla SMN profillerinin artış gösterdiği tespit edilmiştir. **Şekil 34C**'de yer alan GFP+ SMN+ hücre popülasyonlarında PE(+) pegRNA(+) hücrelerin özellikle PI:42. Günde kontrol PE(+) grubuna kıyasla artış gösterdiği tespit edilmiştir.



Şekil 34. Primer SMA Tip 1 PE(+) fibroblast hücre hattında kontrol grubu PE ve GFP ile pegRNA 1 transdüksiyon sonrası post infection (PI) 24 ve 42. günlerde alınan akım sitometri analizleri. SMA Tip 1 PE(+) pegRNA 1, PE(+) ve GFP kontrolü **A)** hücre canlılığı **B)** SMN ifadesini gösteren akış sitometrisi sonuçları **C)** GFP ve SMN pozitif hücre popülasyonlarının gösterildiği akım sitometrisi sonuçları.(PI: post infection, transdüksiyon sonrası gün sayısı)

4.17. Primer SMA Tip 2 Fibroblast hücre hattına pegRNA1 ile transdüksiyon sonrası PI: 8-21-24-33 ve 42. Günlerde SMN ve GFP ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi.

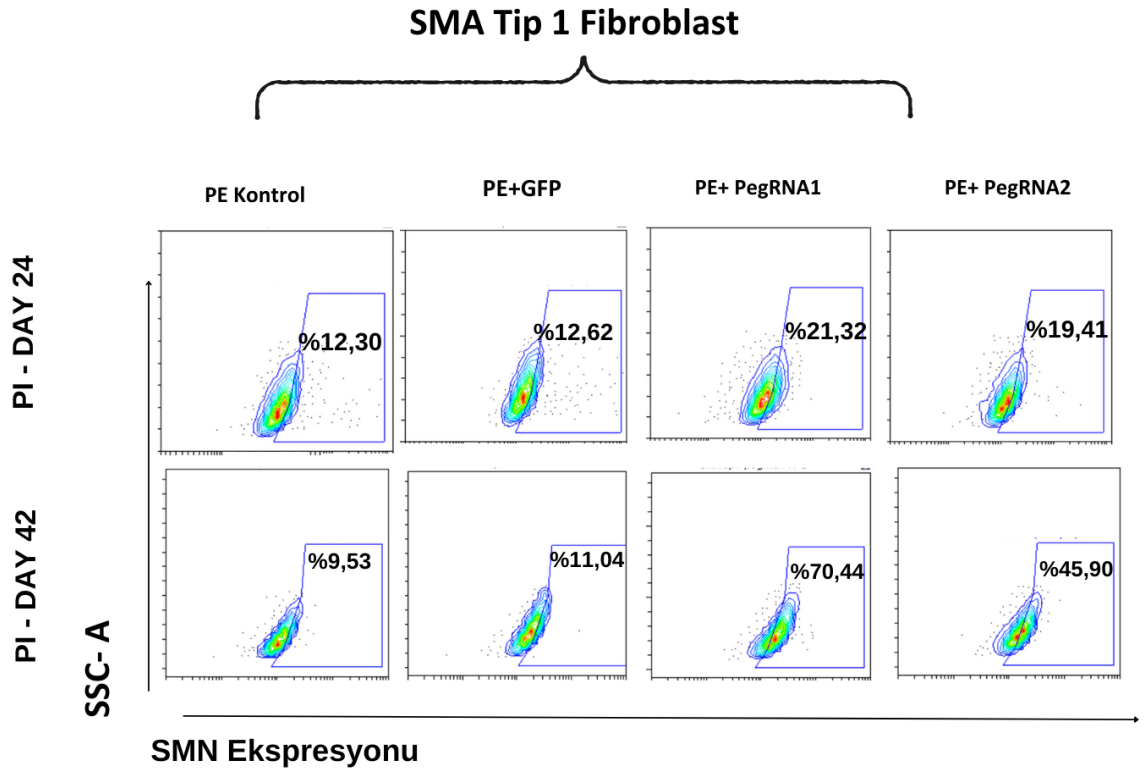
CRISPR-PE sistemi Primer SMA Tip 1 fibroblast hücre hattında olduğu gibi SMA Tip 2 fibroblast hücre hattına da aktarılmıştır. Ardından bu hücre grubunda da intrasellüler SMN boyama gerçekleştirerek SMN protein ekspresyonunun stabilitesi farklı post-infection günlerde takip edilmiştir. **Şekil 35**'te PI:8-21-24-33 ve 42. Günlerde takip edilen hücre canlılığı, SMN ve GFP ekspresyon seviyeleri görülmektedir. Primer SMA Tip 2 fibroblast hücre hattında **Şekil 35A**'da yer alan hücre canlılıklarına ait analizlerde pegRNA1 transdüksiyonunun pegRNA ifade etmeyen veya sadece GFP ifadesi sağlayan kontrol grupları ile kıyaslandığında hücre canlılığını değiştirmediği gösterilmiştir. **Şekil 35B**'de yer alan SMN ekspresyon analizlerine bakıldığında ise PE(+) pegRNA(+) hücrelerin PI:21-24 ve 42. günlerde kontrol gruplarına oranla SMN profillerinin artış gösterdiği tespit edilmiştir. **Şekil 35C**'de yer alan GFP+ SMN+ hücre popülasyonlarında değişen PI günlerinde PE(+) pegRNA(+) hücrelerin kontrol PE(+) grubuna kıyasla artış gösterdiği tespit edilmiştir.



Şekil 35. Primer SMA Tip 2 PE(+) fibroblast hücre hattında kontrol grubu PE ve GFP ile pegRNA 1 transdüksiyon sonrası post infection (PI) 8-21-24-33 ve 42. günlerde alınan akış sitometri sitometri analizleri. SMA Tip 2 PE(+) pegRNA 1, PE(+) ve GFP kontrolü **A)** hücre canlılığı **B)** SMN ifadesini gösteren akış sitometrisi sonuçları **C)** GFP ve SMN pozitif hücre popülasyonlarının gösterildiği akış sitometrisi sonuçları. (PI: post infection, transdüksiyon sonrası gün sayısı)

4.18. Primer SMA Tip 1 Fibroblast hücre hattına pegRNA1 ve pegRNA2 ile transdüksiyon sonrası PI: 24 ve 42. Günlerde SMN ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi.

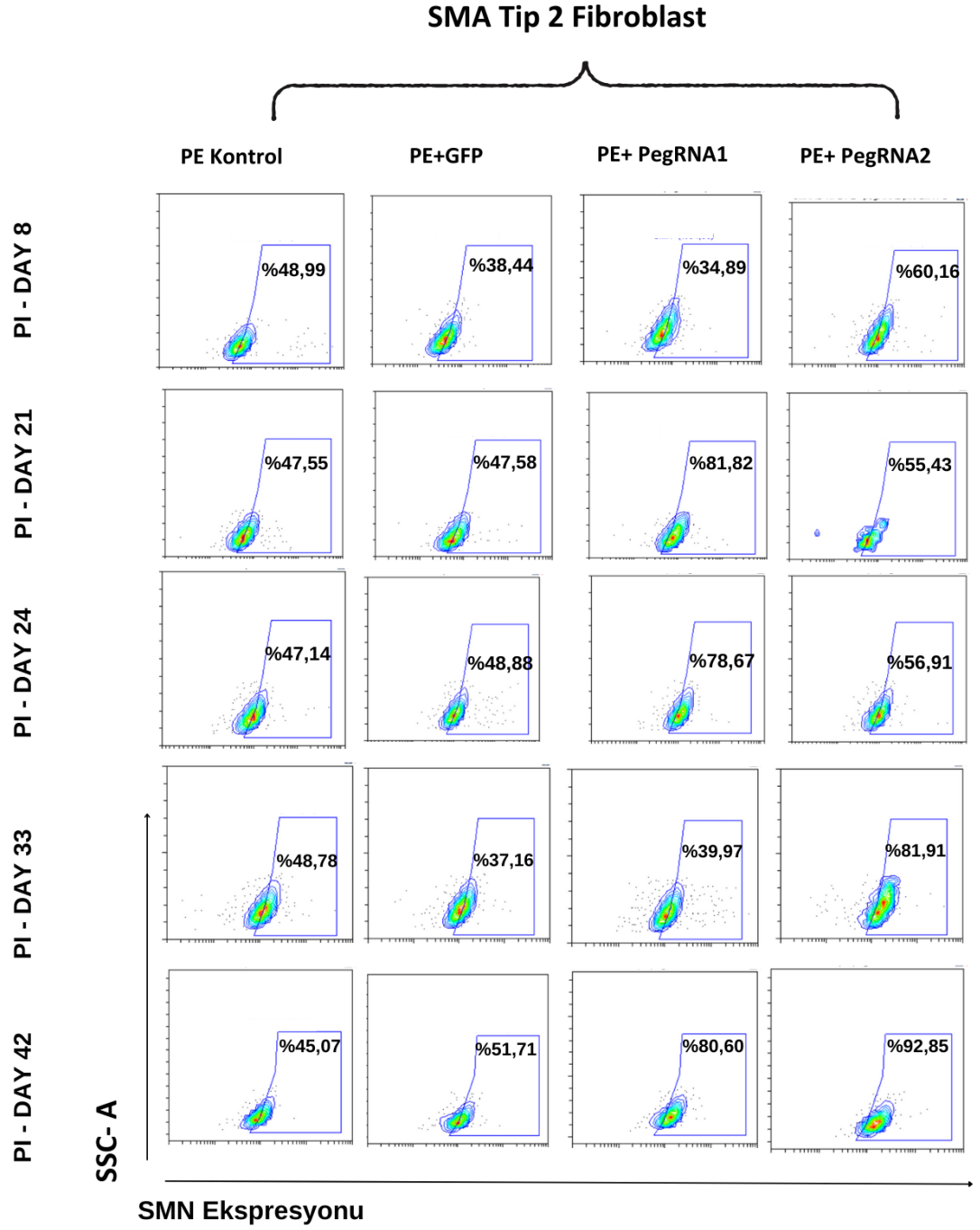
Blasticidin seçilimi sonrası %99 pozitif Prime Editing kodlayan SMA Tip 1 fibroblastlar pegRNA1 kodlayan GFP belirteçli lentivirüsün yanında pegRNA2 kodlayan GFP biyobelirteçli lentivirüsler ile transdükte edilmiştir. **Şekil 36**'da SMA Tip 1 fibroblast PE(+) pegRNA1(+) ve PE(+) pegRNA2(+) hücrelerin PE(+) kontrol grubuna kıyasla PI:24 ve PI:42. Günlerde gerçekleştirilen intrasellüler SMN boyama sonrası akım sitometri analizleri yer almaktadır. SMN ekspresyonları kontrol grubuna oranla karşılaştırıldığında %10 SMN ekspresyonuna sahip SMA Tip 1 hücre hattında SMN ekspresyonunun pegRNA1 transdüksiyonu sonrası PI:42. günde %71,80'e; pegRNA2 sonrası 47,59'a çıktığı tespit edilmiştir.



Şekil 36. Primer SMA Tip 1 PE(+) fibroblast hücre hattında kontrol grubu PE ve GFP ile pegRNA 1 ve pegRNA 2 transdüksiyon sonrası post infection (PI) 24 ve 42. günlerde SMN ekspresyon seviyeleri. (PI: post infection, transdüksiyon sonrası gün sayısı)

4.19. Primer SMA Tip 2 Fibroblast hücre hattına pegRNA1 ve pegRNA2 ile transdüksiyon sonrası PI:8-21-24-33 ve 42. Günlerde SMN ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi.

Blasticidin seçilimi sonrası %99 pozitif Prime Editing kodlayan SMA Tip 2 fibroblastlar pegRNA1 kodlayan GFP belirteçli lentivirüsün yanında pegRNA2 kodlayan GFP biyobelirteçli lentivirüsler ile transdükte edilmiştir. **Şekil 37**'de SMA Tip 2 fibroblast PE(+) pegRNA1(+) ve PE(+) pegRNA2(+) hücrelerin PE(+) kontrol grubuna kıyasla PI:8-21-24-33 ve 42. Günlerde gerçekleştirilen intrasellüler SMN boyama sonrası akım sitometri analizleri yer almaktadır. SMN ekspresyonları kontrol grubuna oranla karşılaştırıldığında %45-47 arasında SMN ekspresyonuna sahip SMA Tip 2 hücre hattında SMN ekspresyonunun hem pegRNA1 hem pegRNA2 transdüksiyonu sonrası %80 ile %90'a kadar çıktığı tespit edilmiştir.

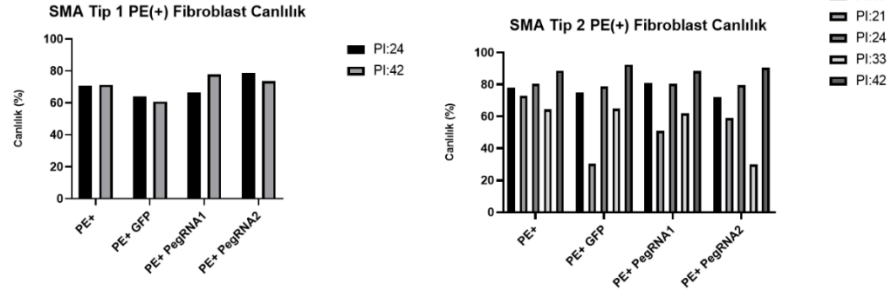


Şekil 37. Primer SMA Tip 2 PE(+) fibroblast hücre hattında kontrol grubu PE ve GFP ile pegRNA 1 ve pegRNA 2 transdüksiyon sonrası post infection (PI) 8-21-24-33 ve 42. günlerde SMN ekspresyon seviyeleri. (PI: post infection, transdüksiyon sonrası gün sayısı)

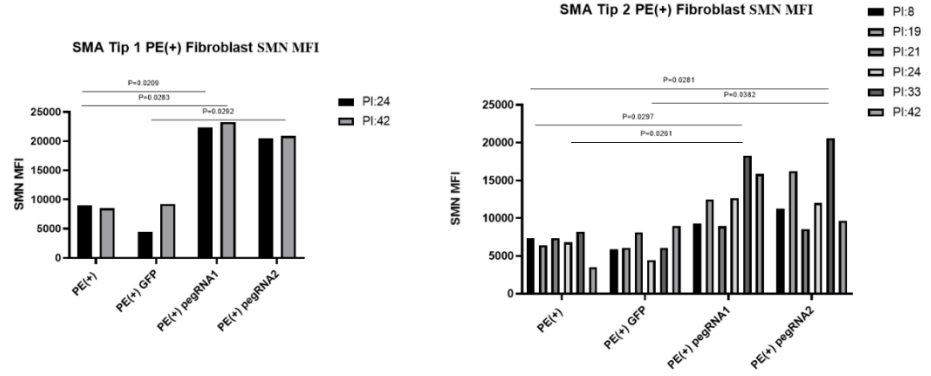
4.20. Primer SMA Tip 1 ve Tip 2 Fibroblast hücre hatlarına pegRNA1 ve pegRNA2 ile transdüksiyon sonra PI:8-19-21-24-33 ve PI:42 günlerde canlılık, GFP+SMN+ hücre popülasyonları ve GFP MFI değerlerine ait bar grafikleri.

Primer SMA Tip 1 ve Tip 2 fibroblast hücre hatlarında CRISPR-PE aktarımı sonrası pegRNA1 ve pegRNA2 transdüksiyonunun ardından hücrelerde belirli PI günlerinde intrasellüler SMN boyama gerçekleştirilmiştir. Belirli aralıklarla gerçekleştirilen boyamalar sonucu elde edilen verilerden bar grafikler oluşturulmuştur (**Şekil 38**). Farklı SMN2 kopya sayılarına sahip Primer SMA Tip 1 ve Tip 2 fibroblast hücre hatlarında pegRNA1, pegRNA2 ve CRISPR-PE sisteminin hücre canlılığına etkileri (**Şekil 38A**), GFP+ SMN+ popülasyonun kontrol grubuna kıyasla artışının (**Şekil 38B**) ve boyama sonucu GFP MFI değerlerinin karşılaştırılması için (**Şekil 38C**) bar grafikler oluşturulmuştur. Her iki primer hücre hattında da pegRNA'lar sonrası hücre canlılığının değişmediği tespit edilmiştir (**Şekil 38A**). PegRNA1 ve pegRNA2 transdüksiyonu sonrası takip edilen günlerde GFP+ SMN+ hücre popülasyonunun zamanla kontrol grubuna oranla artış gösterdiği tespit edilmiştir (**Şekil 38B**). GFP MFI değerlerine bakıldığında ise SMA Tip 2 hücre hattında kontrole kıyasla yüksek oranda artış olduğu tespit edilmiştir (**Şekil 38C**).

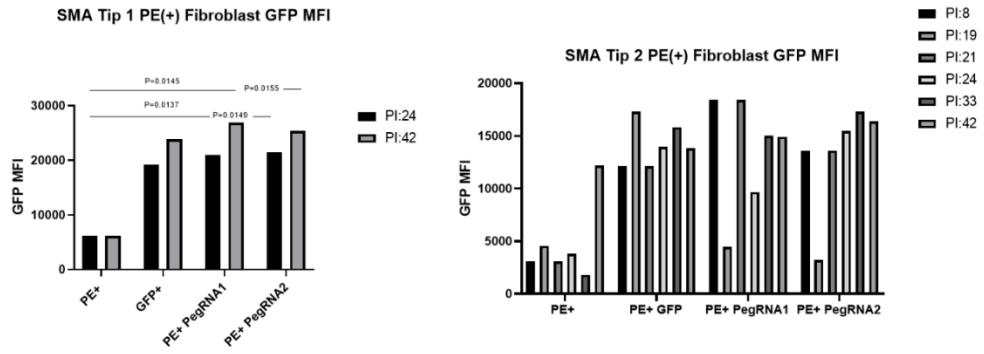
A.



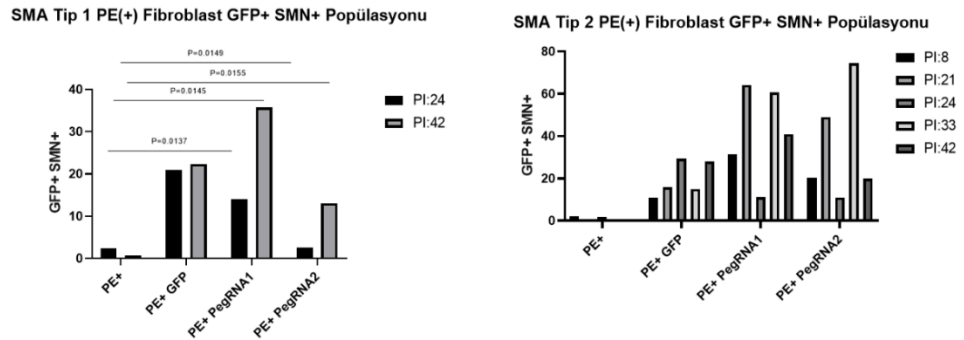
B.



C.



D.



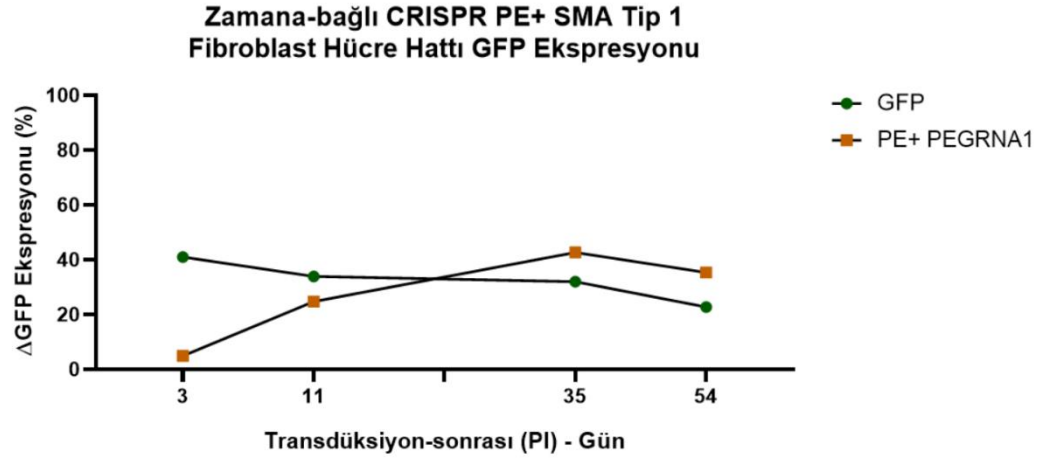
Şekil 38. Primer SMA Tip 1 ve SMA Tip 2 PE(+) fibroblast hücre hatlarında pegRNA1 ve pegRNA2 ile transdüksiyon sonrası PI:8-19-21-24-33 ve 42. günlerde PE(+) pegRNA1, pegRNA2 kontrol grubu GFP ve PE hücrelerinde canlılık, GFP + SMN+ popülasyonu, SMN ve GFP MFI değerlerini içeren bar grafikler. SMA Tip 1 ve Tip 2 PE(+) pegRNA 1, pegRNA2, PE(+) ve GFP kontrolü **A)** hücre canlılığı **B)** SMN MFI değerleri **C)** GFP MFI değerleri **D)** GFP+ SMN+ popülasyon için oluşturulan bar grafikler. (PI: post infection, transdüksiyon sonrası gün sayısı). $p < 0,05$. NS= Anlamlı Değil.

4.21. Primer SMA Tip 1 ve Tip 2 Fibroblast hücre hatlarına pegRNA1 ile transdüksiyon sonrası Δ GFP MFI değerlerinin bar grafikleri.

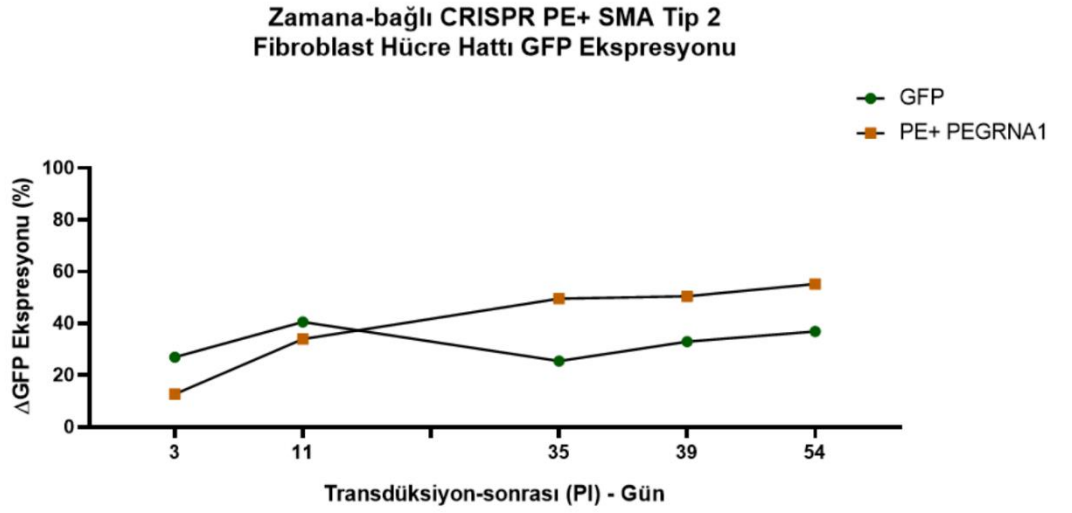
CRISPR-PE sisteminin etkinliğinin ve uzun dönemde stabilitesinin tespiti için pegRNA1 transdüksiyonunun ardından PI: 54. Güne kadar GFP ekspresyonları tespit edilmiştir. SMA Tip 1 fibroblast hücre hattında PE(+) pegRNA1 hücrelerin GFP ekspresyonunun GFP kontrol grubuna oranla daha yüksek ve stabil şekilde devam ettiği tespit edilmiştir (**Şekil 39A**). SMA Tip 2 fibroblast hücre hattına bakıldığında GFP kontrol grubuna kıyasla stabil ve yüksek GFP ekspresyonu ile seyrettiği tespit edilmiştir (**Şekil 39B**).



A.



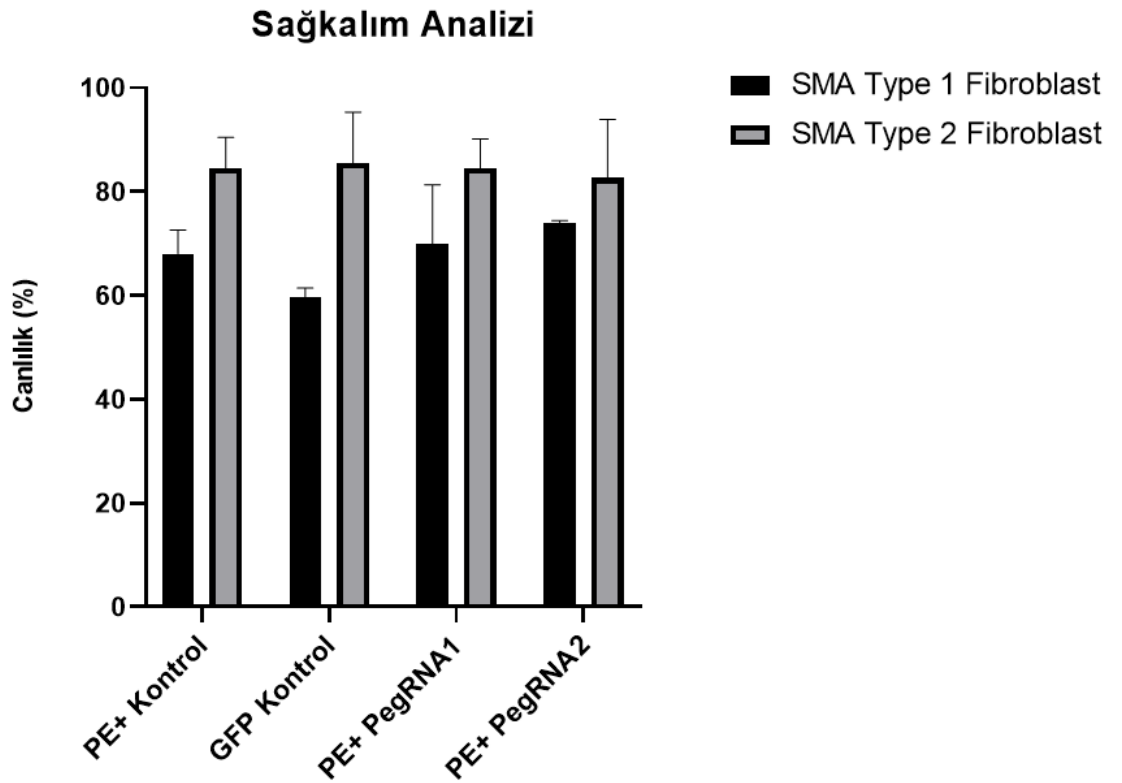
B.



Şekil 39. Primer SMA Tip 1 ve SMA Tip 2 PE(+) fibroblast hücre hatlarında pegRNA1 ile transdüksiyon sonrası pegRNA1, kontrol grubu GFP ve PE hücrelerinde Δ GFP MFI değerlerini içeren çizgi grafikler. **A)** SMA Tip 1 hücre hattında **B)** SMA Tip 2 hücre hattında Δ GFP MFI değerlerine ait oluşturulan çizgi grafikler. (PI: post infection, transdüksiyon sonrası gün sayısı)

4.22. CRISPR-PE sisteminin SMA Tip 1 ve SMA Tip 2 fibroblast hücre hatlarında sağkalım analizi.

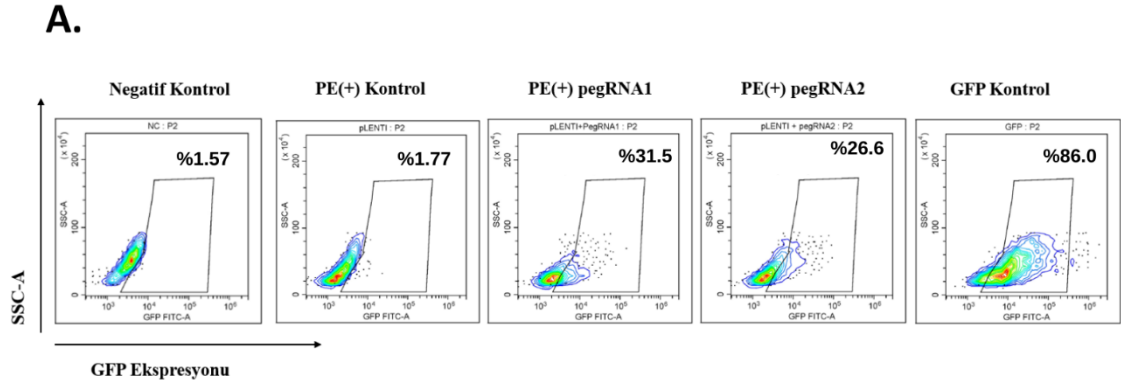
Primer SMA Tip 1 ve Tip 2 fibroblast hücrelerine CRISPR-PE sistemi ile birlikte pegRNA1 ve pegRNA2 aktarımı sonrası hücre canlılıkları takip edilmiştir. Farklı günlerde alınan hücre canlılıklarına dayalı bar grafik oluşturulmuştur (**Şekil 40**). Oluşturulan bar grafiğe bakıldığında pegRNA1 ve pegRNA2 transdüksiyondan sonra PE(+) ve GFP kontrol gruplarına kıyasla hem SMA tip 1 hem de SMA Tip 2 fibroblast hücre hattında hücre canlılığının benzer seyrettiği tespit edilmiştir.



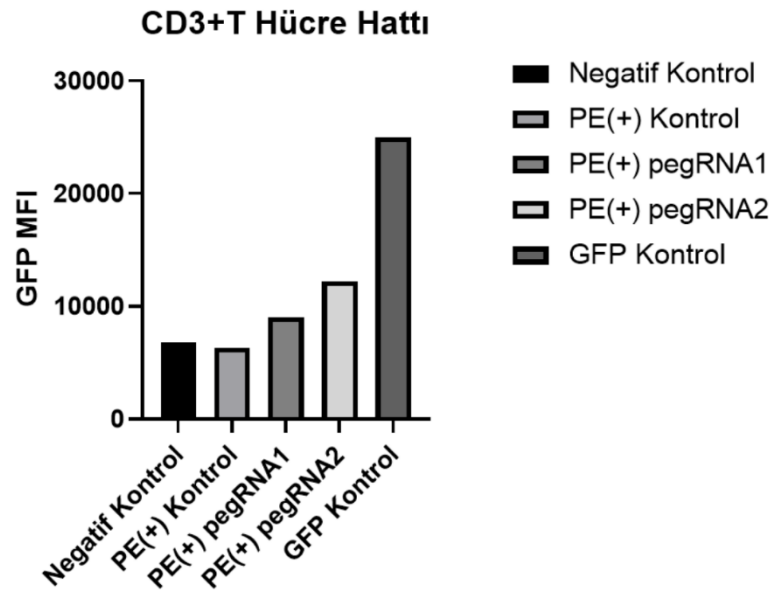
Şekil 40. Primer SMA Tip 1 ve SMA Tip 2 fibroblast hücre hatlarında pegRNA1 ve pegRNA2 ile transdüksiyon sonrası dönemde PE(+) ve GFP kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığına olan etkisini gösteren bar grafik.

4.23. SMA Tip 3 hastasından elde edilen CD3+T hücrelerde CRISPR-PE sisteminin etkinliğinin değerlendirilmesi.

Tip 3 SMA hastasından alınan kan sonrası PBMC izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu hücrelerden CD3+T hücre izolasyonu ve aktivasyonu sonrası hücreler kültüre edilmiştir. Ardından hücrelerde CRISPR-PE sisteminin etkinliğinin değerlendirilmesi için pegRNA1 ve pegRNA2 transdüksiyonu gerçekleştirilmiştir. Transdüksiyondan 72 saat sonra hücrelerin GFP ekspresyonları akım sitometri ile analiz edilmiştir. **Şekil 41A**'da akım sitometri analizi ile GFP ekspresyonları değerlendirilmiştir. Negatif kontrol ve PE(+) kontrol grubunda GFP ekspresyonu %1.5 seviyelerindeyken PE(+) pegRNA1 ve PE(+) pegRNA2 aktarımı sonrası bu oran %30'a kadar yükselmiştir. Pozitif kontrol olarak GFP ile transdükte edilen CD3+T hücre kullanılmıştır. **Şekil 41B**'de GFP MFI değerlerinden oluşturulan bar grafikte ise kontrol grubuna kıyasla pegRNA1 ve pegRNA2 ile transdüksiyonun CD3+T hücrelerinde başarılı şekilde sağlandığı gösterilmiştir.



B.



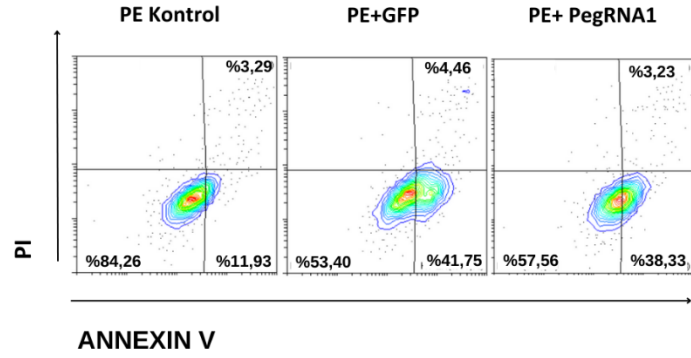
Şekil 41. SMA Tip 3 hastasından izole edilen CD3+T hücelere pegRNA1 ve pegRNA2 ile transdüksiyon sonrası pLenti ve GFP kontrole kıyasla akım sitometri analizi ve bar grafik. CD3+T cell hücelerinde NC, GFP kontrol ve PE(+) kontrole kıyasla pegRNA1 (+) ve pegRNA2 (+) hücelerde SMN boyama sonucunda elde edilen **A)** akım sitometri analizi **B)** GFP MFI değerleri ile oluşturulan bar grafik.

4.24. Primer SMA Tip 2 Fibroblast hücre hattında CRISPR-PE sisteminin apoptotik etkisinin belirlenmesi için gerçekleştirilen Annexin-V-PI ve MTT analizi.

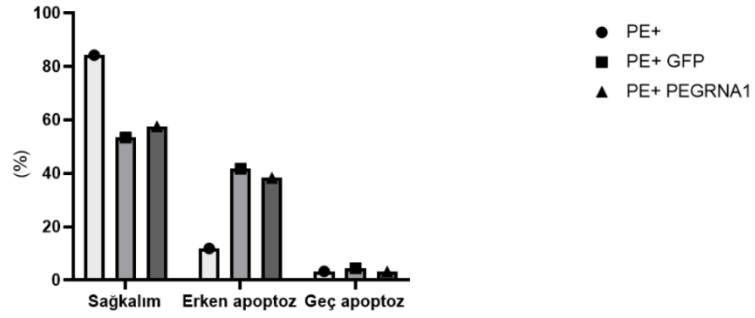
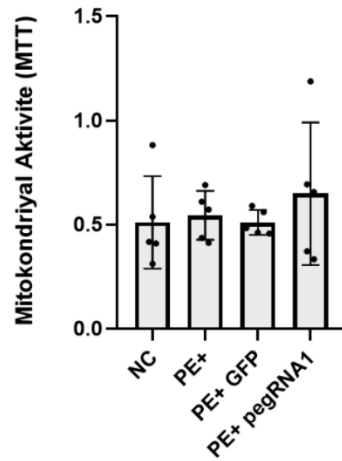
SMA Tip 2 fibroblast hücre hattında pegRNA1 ile transdüksiyon gerçekleştirildikten sonra CRISPR-PE sisteminin hücre canlılığına ve apoptotik evrelere etkilerinin tespiti için Annexin V-PI boyama ve MTT analizi gerçekleştirilmiştir (**Şekil 42**). 33 günde PE (+) kontrol ve PE(+) GFP kontrole kıyasla CRISPR-PE sisteminin toksisitesi karşılaştırılmıştır (**Şekil 42A**). pegRNA1’de canlı popülasyon ortalama %60 civarındadır. Erken apoptoz popülasyonu için durum PE (+) kontrolde %11 iken her pegRNA1 için %38.33 seviyesindedir (**Şekil 42A**). Kontrol grubuna kıyasla canlı popülasyon, erken apoptoz ve geç apoptoz popülasyonlarına ait değerlerden bar grafikler oluşturulmuştur (**Şekil 42B**). PegRNA1(+) hücre grubunda geç apoptoz popülasyonunun kontrole yakın seviyede benzer bazal seviyede olduğu tespit edilmiştir. CRISPR-PE sisteminin hücre canlılığına etkisinin belirlenmesi için gerçekleştirilen MTT analizinde pegRNA 1 transdükte hücrelerde kontrole kıyasla herhangi bir toksisite görülmemiştir (**Şekil 42C**). Hücre canlılığı açısından pegRNA’ların ve CRISPR-PE sisteminin toksik olmadığı görülmüştür.

A.

PI:33 SMA Tip 2 Fibroblast ANNEXIN V- PI

**B.**

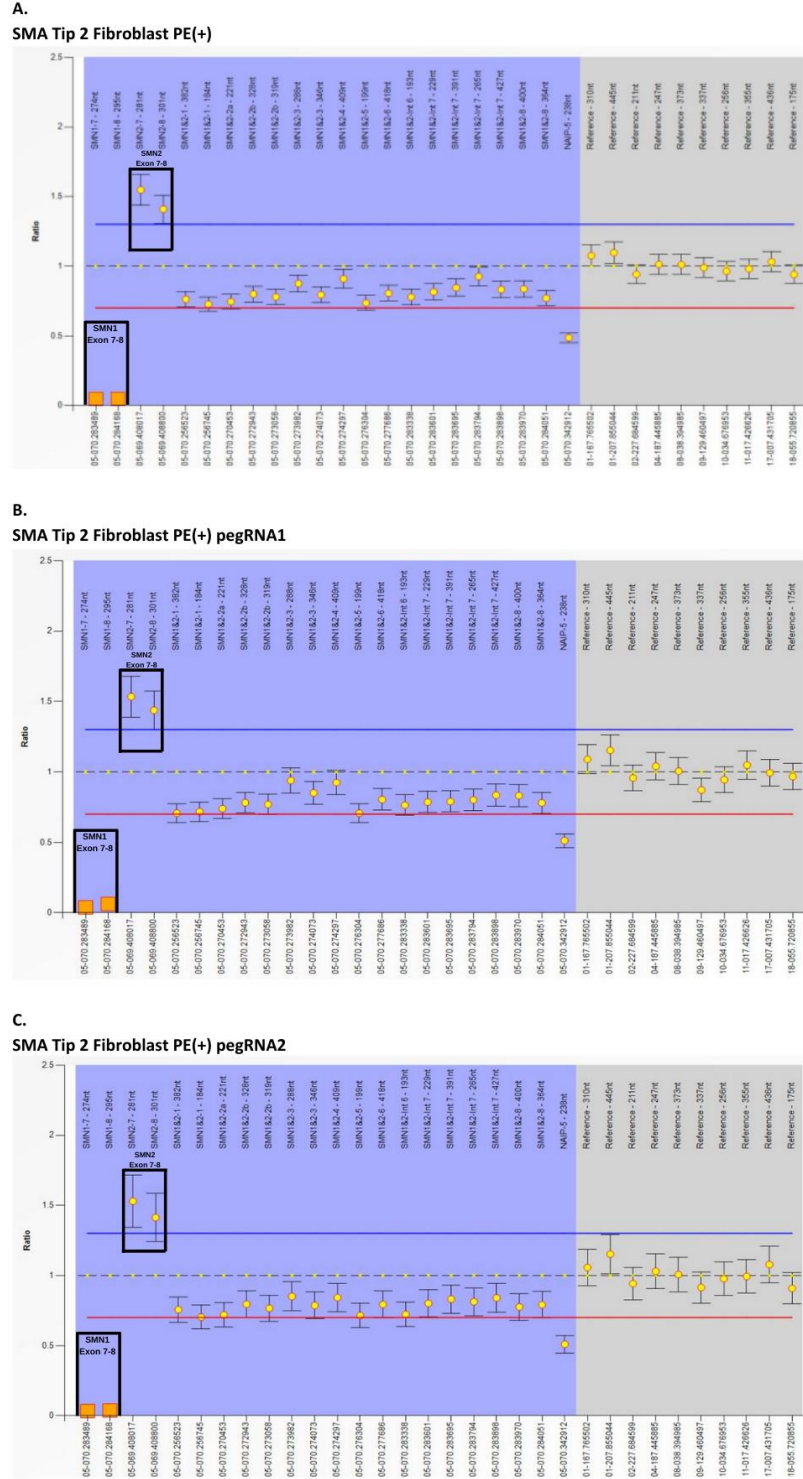
PI:33 SMA Tip 2 Fibroblast ANNEXIN V-PI

**C.**

Şekil 42. SMA Tip 2 fibroblast hücre hattında PE(+), PE(+) GFP kontrol ve pegRNA1 transdükte hücrelerde gerçekleştirilen Annexin V - PI analizi. **A)** SMA Tip 2 fibroblast hücre hattında Annexin V - PI boyaması sonrasında akım sitometri analizi. **B)** SMA Tip 2 fibroblast hücre hattında Annexin V - PI boyaması **C)** MTT analizi sonrası oluşturulan bar grafik.

4.25. Primer SMA Tip 2 fibroblast hücre hattında CRISPR-PE sistemi aktarıldıktan sonra SMN2 kopya sayısı için MLPA analizi.

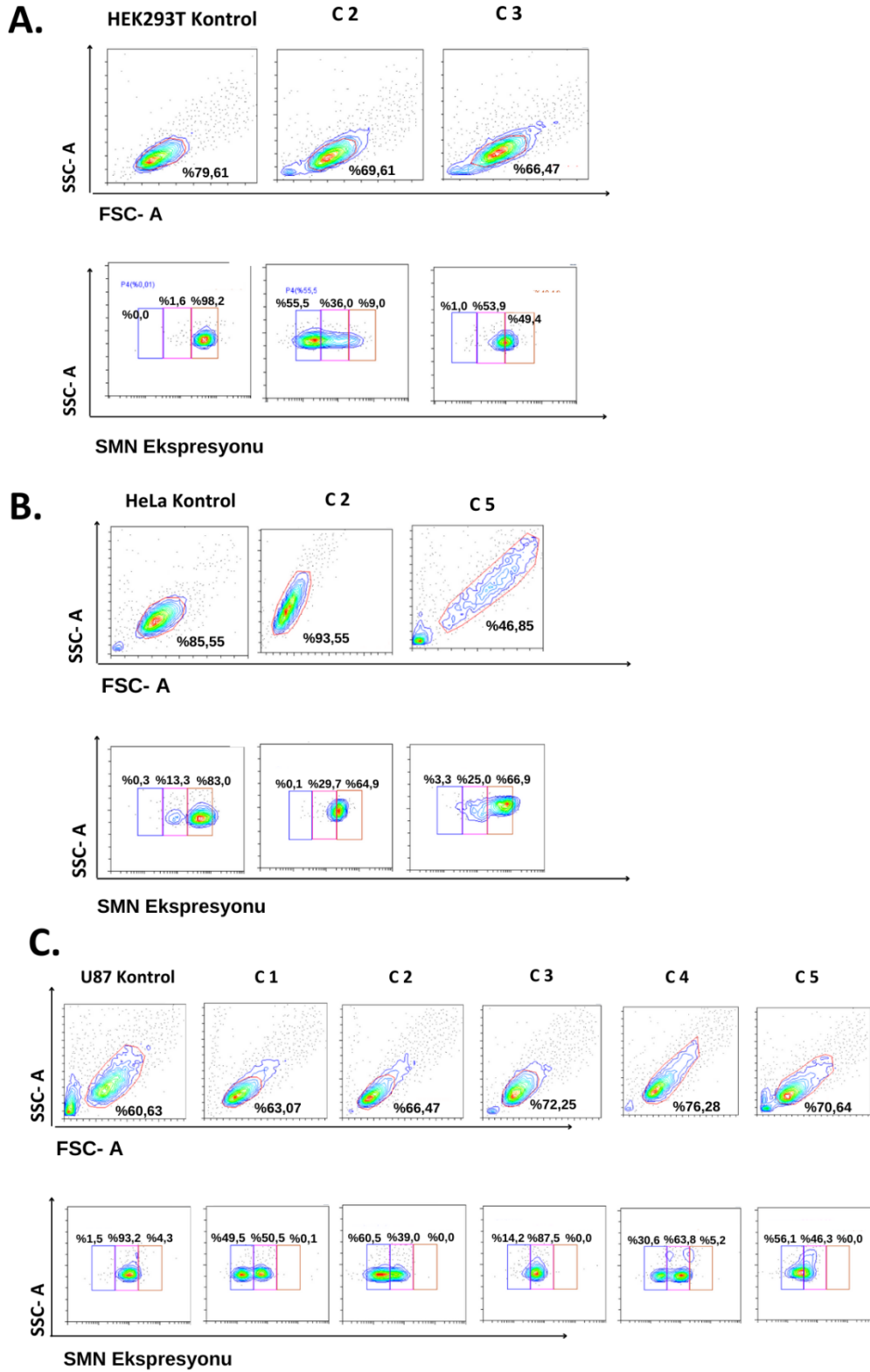
CRISPR-PE ve pegRNA ifadesi sağlanan SMA Tip 2 fibroblast hücre hatlarında ekzon 7 ve kontrol olarak ekzon 8 hedefli MLPA analizi gerçekleştirilmiştir. **Şekil 43**'te modifikasyonu hedeflenen ekzon 7 duplikasyonlarının artıp atmayacağını tespit edebilmek için gerçekleştirilen MLPA analiz sonuçları yer almaktadır. Primer SMA Tip 2 hücre hattına CRISPR-PE sistemi aktarıldıktan sonra intrasellüler SMN boyamaları yapılmış olup daha sonra genomik DNA (gDNA) izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Ardından örneklerin SMN1 ve SMN2 kopya sayılarının tespiti İntergen Genetik Hastalıklar Tanı Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde MLPA analizi ile gerçekleştirilmiştir (**Şekil 43**). SMA Tip 2 hücre hattının SMN1 geni bulunmamaktadır. Bunun yanında 3 adet SMN2 kopya sayısına sahip olan SMA Tip 2 hücre hattında PE(+) kontrole (**Şekil 43A**) kıyasla pegRNA1 (**Şekil 43B**) ve pegRNA2 (**Şekil 43C**) transdükte edilen hücrelerde SMN2 kopya sayısının değişmediği veya tespit edilemediği görülmüştür.



Şekil 43. SMA Tip 2 fibroblast hücre hattında CRISPR-PE sistemi içeren PE(+) pegRNA1 ve PE(+) kontrol hücrelerde MLPA yöntemi ile belirlenen SMN1-SMN2 kopya sayılarının analizleri. SMA Tip 2 fibroblast A) PE(+) kontrol B) PE(+) pegRNA1 C) pegRNA2 transdükte hücrelere ait analiz sonuçları.

4.26. HEK293T, HeLa VE U87 SMN1 knockout hücre hattı oluşturulduktan sonra SMN ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi.

SMN1 geninin knockout edilmesi için üretilen SMN1 hedefli CRISPR/cas9 sistemi kodlayan lentivirüsler HEK293T, HeLa ve U87 hücre hatlarına 3 MOI oranında transdükte edilmiştir. Transdüksiyondan 72 saat sonra hücrelere uygun konsantrasyonlarda puromycin antibiyotiği uygulandıktan sonra %99> hücre canlılığına sahip hücre popülasyonu kültüre edilmeye devam edilmiştir. Hücreler daha sonra SCC yapılarak genom açısından saf klonlar elde edilmiştir. Kontrol ve klonlar için SMN boyama sonrası düşük-orta-yüksek SMN ekspresyonunu temsil eden 3 tane kapı ayarlanmıştır. Gerçekleştirilen SMN boyamada (**Şekil 23**) yüksek SMN profiline sahip HEK293T hücre hattında yüksek SMN ekspresyonu seviyesi %96,73 olarak tespit edilirken; SCC yapılarak çoğaltılan SMN1 knockout HEK293T hücre klonlarında (C2-C3), SMN seviyelerinin anlamlı bir oranda gerilediği bağımsız klonlarda tespit edilmiştir (**Şekil 44A**). C2 klonunda en yüksek SMN ekspresyon seviyesi %8,96 seviyesine kadar gerileyerek SMN ekspresyonunda anlamlı bir şekilde düşüş sergilemiştir. Hücrelerin canlılıklarına akım sitometri analizinde bakıldığında klonların canlılıkları kontrol gruplarında ortalama %80 seviyelerindeyken bağımsız klon popülasyonunda ortalama %66'lara gerilediği tespit edilmiştir (**Şekil 44A**). HeLa hücre hattı normal şartlarda yüksek SMN ekspresyonuna sahip bir hücre hattıdır (**Şekil 23**). SMN1 knockout HeLa hücre hattı klonlarında gerçekleştirilen hücre içi SMN boyamanın akım sitometrisi sonucu **Şekil 44B**'de yer almaktadır. Bağımsız klon popülasyonlarında yüksek SMN ekspresyon seviyesinin giderek azaldığı tespit edilmiştir. SMN1 knockout U87 hücre hattında gerçekleştirilen hücre içi SMN boyamanın akım sitometrisi sonucu **Şekil 44C**'de yer almaktadır. C1-C2 ve C5 klonları başta olmak üzere SMN ekspresyon seviyeleri bağımsız klon popülasyonlarında düşük ekspresyona doğru bir kayma eğilimi göstermiştir. Bağımsız klon popülasyonlarında kontrol U87 popülasyonuna kıyasla orta seviye SMN ekspresyonlarına bakıldığında C1 klonunda %50,49; C2 klonunda %38,94; C4 klonunda %63,75 ve son olarak C5 klonunda %46,32 kadar gerilediği tespit edilmiştir. Bu da U87 hücre hattındaki klonlarda başarılı şekilde SMN ekspresyonu düşük hücreler üretildiğini göstermektedir. Hücrelerin canlılıklarına bakıldığında düşük SMN ekspresyon seviyesi ile doğru orantılı olarak düşük canlılık ile seyrettiği tespit edildi (**Şekil 44C**).

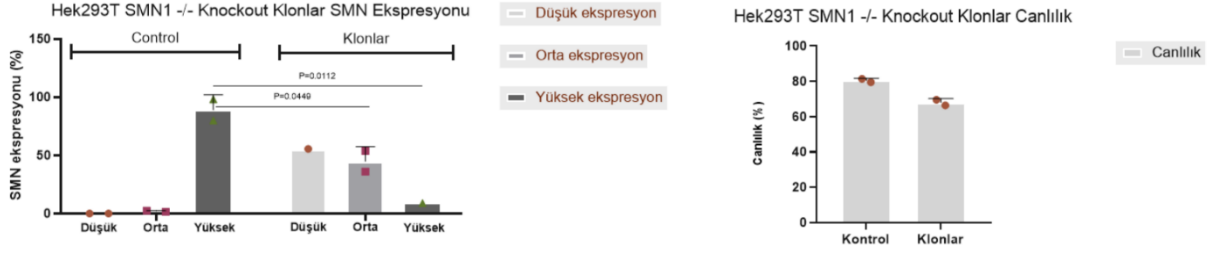


Şekil 44. SMN1 knockout HEK293T, HeLa ve U87 hücre hatlarında gerçekleştirilen boyamanın akım sitometri analizi. **A)** HEK293T **B)** HeLa **C)** U87 hücre hattı klonlarında (C1-C2-C3-C4-C5) SMN ifadesinin SMN monoklonal antikor ile hücre içi boyama sonrası akım sitometri analizi.

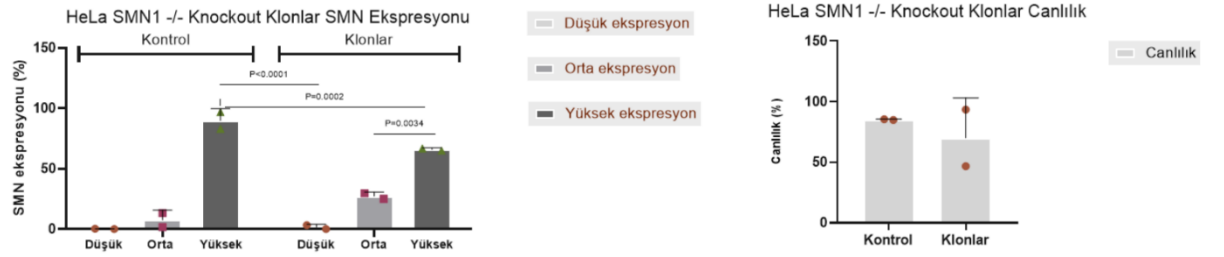
4.27. HEK293T, HeLa ve U87 SMN1 knockout hücre klonlarında düşük-orta-yüksek SMN ekspresyon seviyeleri ve canlılıkların değerlendirilmesi.

SMN1 knockout HEK293T, HeLa ve U87 hücre hücre hatlarında saf klonlar elde edildikten sonra düşük-orta-yüksek olacak şekilde SMN ekspresyonlarının ve kontrol grubuna kıyasla canlılık seviyelerinin karşılaştırılması için bar grafikleri oluşturulmuştur. HEK293T klonlarının SMN ekspresyonları ve canlılıkları için oluşturulan bar grafikleri **Şekil 45A**'da yer almaktadır. Kontrol grubu HEK293T hücre hattında yüksek SMN ekspresyon seviyesinin, klon popülasyonlarında anlamlı bir oranda azaldığı görülmektedir. Aynı şekilde kontrol grubuna kıyasla orta ve düşük SMN ekspresyonlarının da giderek artış gösterdiği yani yüksek ekspresyondan düşük ekspresyona doğru bir geçişin varlığı söz konusudur. SMN1 knockout HeLa klonlarının SMN ekspresyonları ve canlılıkları için oluşturulan bar grafikleri **Şekil 45B**'de yer almaktadır. Kontrol grubuna bakıldığında yine aynı şekilde SMN ekspresyonu yüksektir. Klon popülasyonlarında ise bu durum yine geçişli olarak azalarak seyretmekle beraber düşük seviyelere doğru bir yönelim olduğu tespit edilmiştir. U87 klon popülasyonlarının SMN ekspresyonları ve canlılıkları için oluşturulan bar grafikleri **Şekil 45C**'de yer almaktadır. Kontrol grubunun daha çok orta seviye SMN ekspresyonuna sahip olduğu görülmektedir. Klonlardaki orta SMN ekspresyon seviyesinin zamanla azalarak düşük SMN ekspresyonunun artışı geçmesi ile seyrettiği tespit edilmiştir.

A.



B.



C.

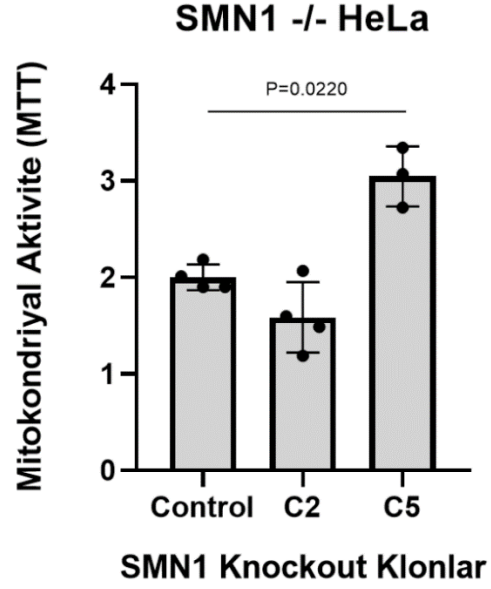


Şekil 45. SMN1 knockout HEK293T, HeLa ve U87 hücre hatlarında SMN ekspresyonu ve canlılık değerlerini içeren bar grafikleri. SMN1 knockout **A)** HEK293T **B)** HeLa **C)** U87 hücre hattı klonlarında SMN ekspresyonu ve canlılık seviyelerinin bar grafikleri. $p < 0.05$. NS= Anlamlı değil.

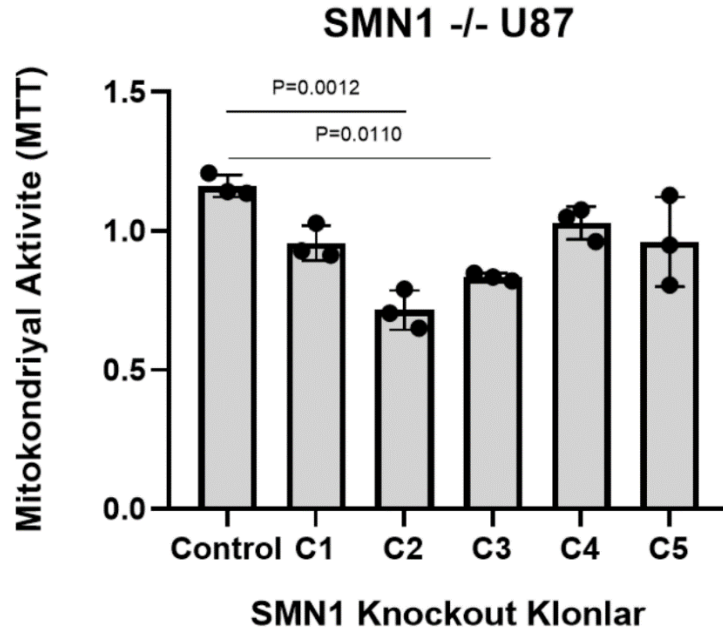
4.28. HeLa ve U87 SMN1 knockout hücre klonlarında hücre canlılığının MTT analizi ile belirlenmesi

Bağımsız klon popülasyonlarında canlılık seviyelerindeki düşüşün SMN ekspresyonu ve canlılık arasındaki ilişkinin doğrudan gösterilebilmesi mitokondriyal aktivite seviyesini ölçmeye yarayan MTT analizi gerçekleştirilmiştir. MTT analizi sonucu elde edilen verilerin bar grafikleri **Şekil 46**'da gösterilmektedir. HeLa SMN1 knockout klonlarına ait MTT analizi sonucu oluşturulan bar grafik **Şekil 46A**'da yer almaktadır. Genom profili heterojen yapıdaki kontrol grubuna kıyasla C2 klonunun mitokondriyal aktivitesinde azalma tespit edilmiştir. . HeLa SMN1 knockout klonlarına ait MTT analizi sonucu oluşturulan bar grafik **Şekil 46B**'de yer almaktadır. U87 hücre hattı klonlarında sırasıyla C4-C1-C5-C3 ve en yüksek oranda C2 klonunda olmak üzere tüm klon popülasyonlarında kontrole kıyasla canlılığın giderek azaldığı görülmektedir. Bu sonuç SMN1 knockout U87 bağımsız klonlara ait **Şekil 44C**'de yer alan SMN boyama akım sitometri sonuçlarındaki azalan SMN ekspresyonunun canlılığı olumsuz yönde etkilediği sonucunu desteklemektedir.

A.



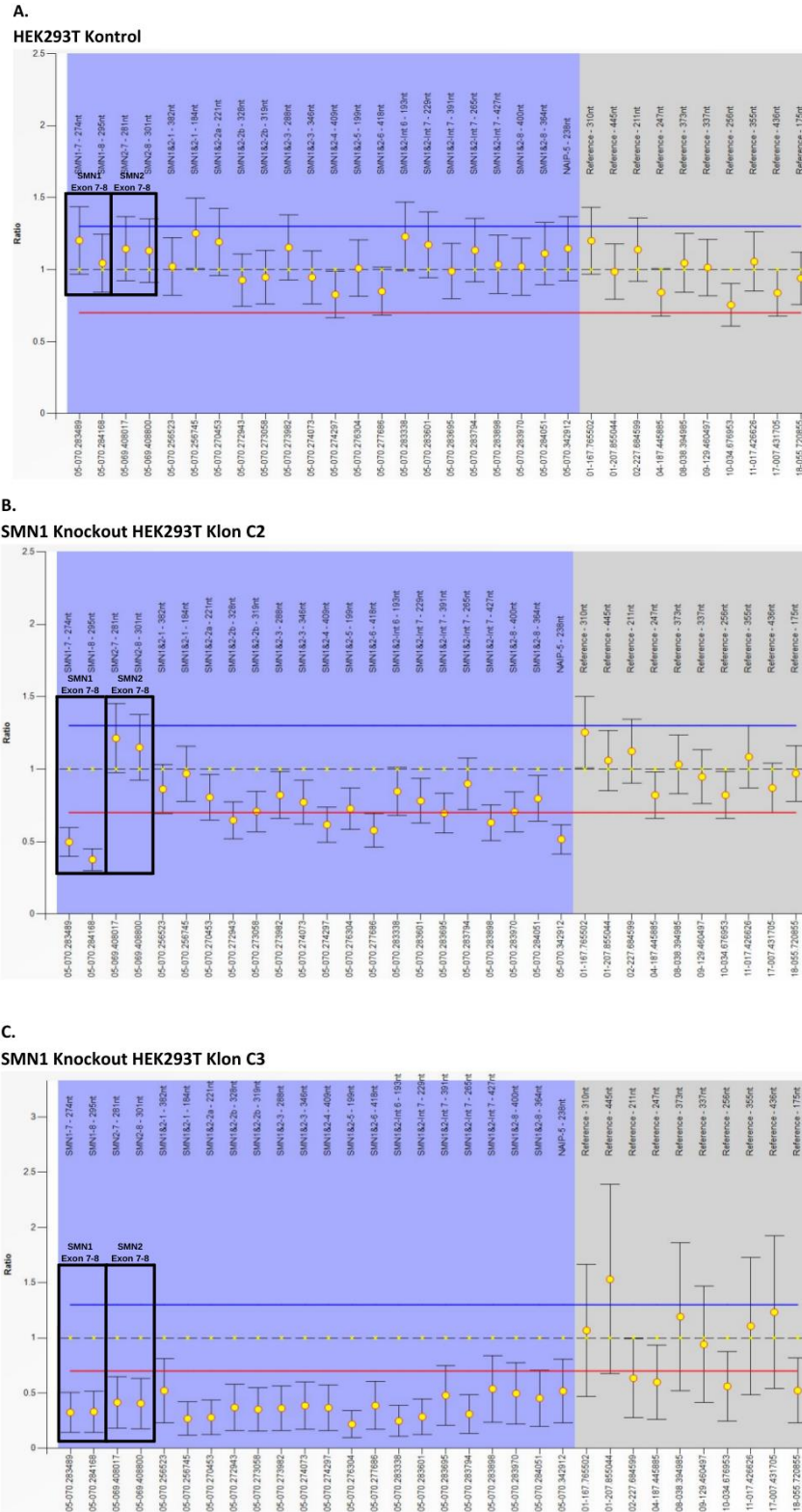
B.



Şekil 46. SMN1 knockout HeLa, ve U87 hücre hatlarında gerçekleştirilen MTT analizi. **A)** HeLa **B)** U87 SMN1 knockout hücre hattında single cell sorting (SCC) deneyi sonrası MTT sonrası oluşturulan bar grafikleri. C: cloning. $p < 0,05$. NS= Anlamlı Değil.

4.29. HEK293T SMN1 knockout hücre klonlarında SMN2 kopya sayısı için MLPA analizi.

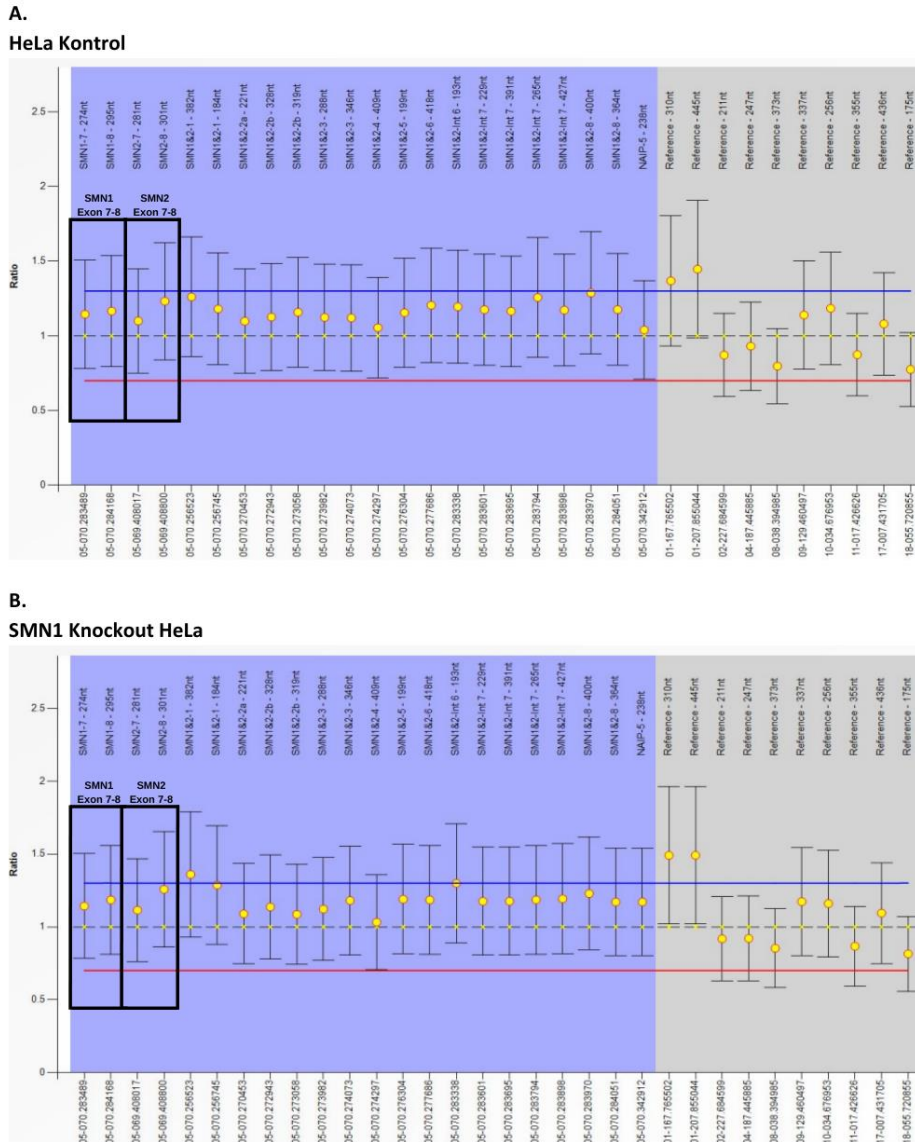
Oluşturulan SMA modeli SMN1 knockout HEK293T hücre hattında hedeflendiği gibi SMN1 geninin silinip silinmediğini tespit etmek için İntergen Genetik Hastalıklar Tanı Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden hizmet alım ile MLPA yöntemi kullanılarak SMN1 ve SMN2 kopya sayıları tespit edilmiştir. SMN1 knockout HEK293T hücre hattı klonlarına ait MLPA analiz sonucu **Şekil 47'**de yer almaktadır. **Şekil 47A'**da yer alan kontrol HEK293T hücrelerinin analiz sonuçlarına bakıldığında işaretli kutucuklardaki SMN1 ekzon7-8 ve SMN2 ekzon7-8 gen bölgelerinin diğer gen bölgeleri ile aynı yerde olduğu görülmektedir (**Şekil 47A**). **Şekil 47B'**de yer alan C2 klonunda ve **Şekil 47C'**de yer alan C3 klonunda SMN1 ekzon7-8 bölgesinin negatife doğru kaydığı tespit edilmiştir.



Şekil 47. SMN1 knockout HEK293T hücre klonlarında MLPA yöntemi ile belirlenen SMN1-SMN2 kopya sayılarının analizleri. **A)** HEK293T kontrol **B)** C2 klonu **C)** C3 klonuna ait analiz sonuçları.

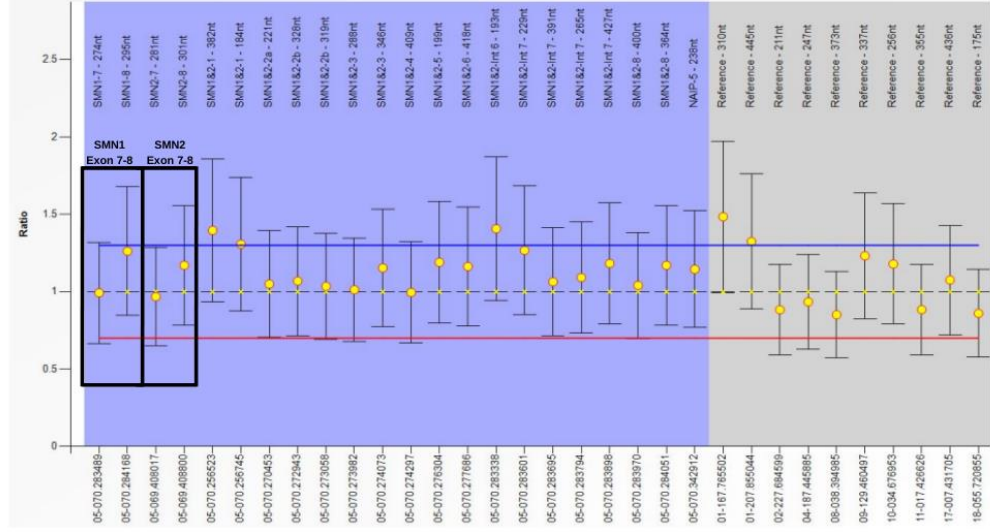
4.30. HeLa SMN1 knockout hücre klonlarında SMN2 kopya sayısı için MLPA analizi.

SMN1 knockout HEK293T hücre hattı klonlarına ait MLPA analiz sonucu **Şekil 48**'de yer almaktadır. Şekil 47A'da yer alan kontrol HeLa hücresine ait MLPA analizinde ekzon 7-8 bölgesinin diğer gen bölgeleri ile aynı konumda olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanında genom açısından heterojen olan SCC klonu olmayan SMN1 knockout kontrol HeLa hücresine ait analizde de ekzon 7-8 bölgesinin kontrol HeLa ile benzer olduğu görülmektedir (**Şekil 48B**). **Şekil 48C**'de yer alan HeLa SMN1 knockout C2 klonunda bu bölgenin yarım puan aşağıya kaydığı tespit edilmiştir.



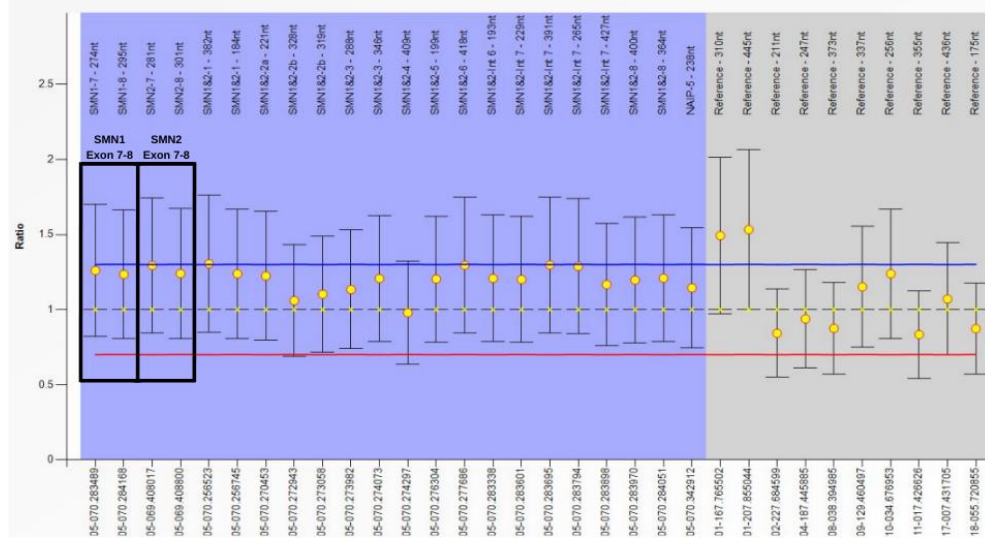
C.

SMN1 Knockout HeLa Klon C2



D.

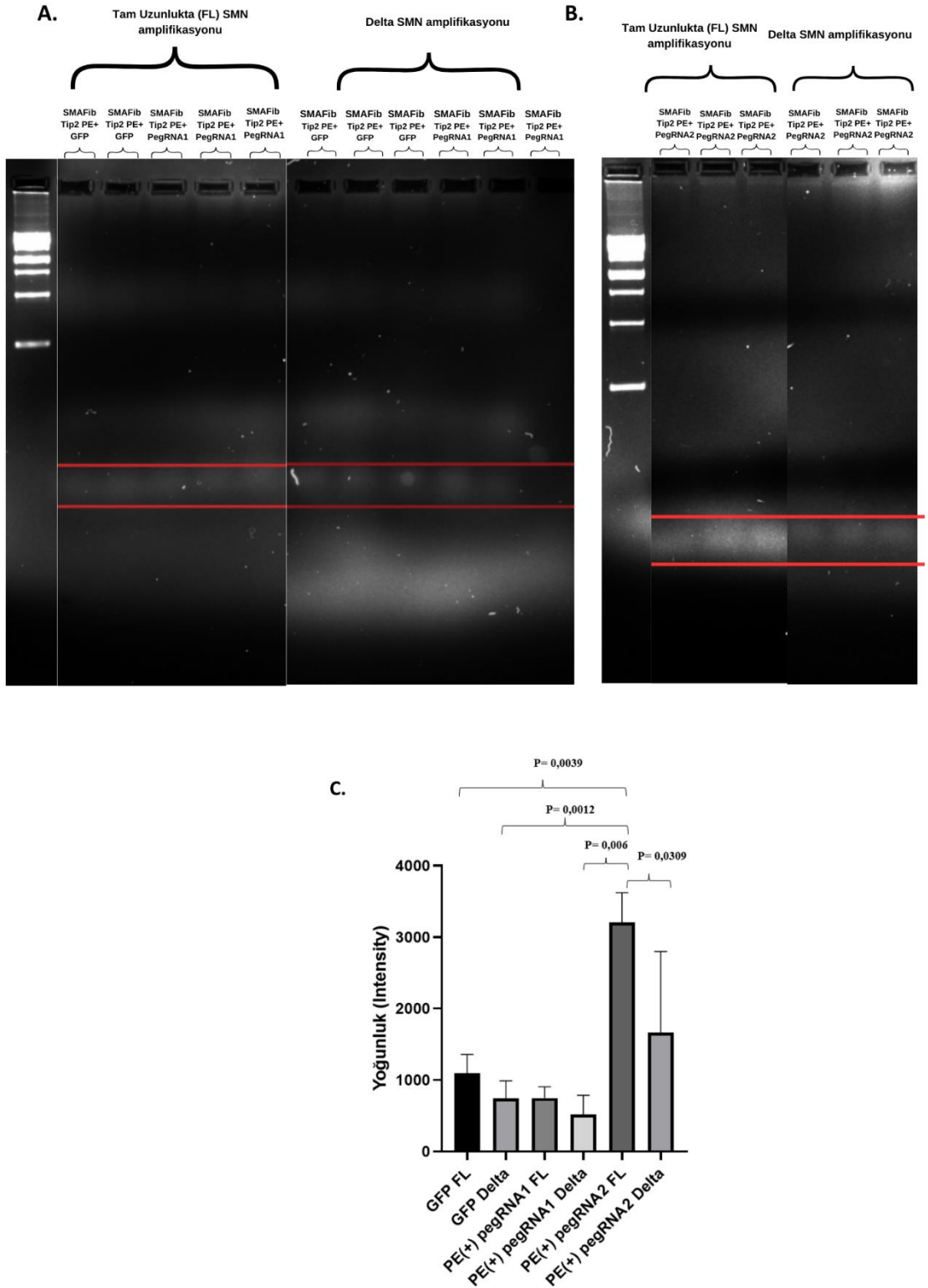
SMN1 Knockout HeLa Klon C5



Şekil 48. SMN1 knockout HeLa hücre klonlarında MLPA yöntemi ile belirlenen SMN1-SMN2 kopya sayılarının analizleri. **A)** HeLa kontrol **B)** SMN1 knockout HeLa **C)** C2 klonu **D)** C5 klonuna ait analiz sonuçları.

4.31. Primer SMA Tip 2 PE(+) pegRNA1(+) ve PE(+) pegRNA2(+) fibroblast hücrelerde full length ve delta primerler ile qPCR analizi sonrası agaroz jel analizi.

PE(+) SMA Tip 2 ve PE(+) Jurkat hücre hatlarında pegRNA1 ve pegRNA 2 ile transdüksiyon sonrası hücrelerden RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş olup ardından cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. cDNA örneklerinden full length (FL) ve kesikli SMN proteininin tespiti için delta SMN primerleri ile qPCR gerçekleştirilerek hedeflenen bölgeler amplifiye edilmiştir. Ardından PCR amplikonları %2'lik agaroz jel dökülerek örnekler yürütülmüştür. **Şekil 49A**'da agaroz jel görüntüsündeki bantlar yer almaktadır. Biorad Molecular Imager Gel Doc Görüntüleme Sistemi ile analiz edilen bantlardan bar grafikler oluşturulmuştur (**Şekil 49B**). Bar grafiklerde yapılan istatistiksel analizlere bakıldığında SMA Tip 2 PE(+) GFP delta ve GFP FL örneğine oranla pegRNA2 FL örneğinde anlamlı olarak artış tespit edilmiştir.



Şekil 49. CRISPR-PE sistemi aktarılan SMA Tip 2 fibroblast hücre hattında FL ve Delta primerler ile gerçekleştirilen qPCR sonucu agaroz jel analizi. **A)** pegRNA1 ve GFP kontrol için **B)** pegRNA2 için FL ve Delta SMN amplifikasyonu sonucu agaroz jel sonucu. **C)** Amplikonların agaroz jel analizi sonrası oluşturulan bar grafik. $p < 0,05$. NS= Anlamlı Değil.

4.32. CRISPR-PE(+) pegRNA1(+) SMA Tip 2 hücre hattında hedef dışı mutasyon kapasitesinin değerlendirilmesi.

SMN2 ekzon 7 hedefli pegRNA1, pegRNA2 ve pegRNA3 rehber RNA'larının CRISPR-PE enzimi ile beraber genom içerisinde bağlanabileceği hedef dışı bölgeler tespit edilmiş olup bu bölgelerde oluşabilecek indel mutasyonlar (ekleme çıkartma mutasyonları) analiz edilmiştir. **Şekil 50**'de gösterilen Sanger sekanslama sonuçlarının göre kromozom 4 ve kromozom 22 üzerinde belirlenen hedef dışı genetik bölge analizlerinde %99 oranında herhangi bir mutasyonel indel değişimi tespit edilmemiştir.

A.

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

SMA_Tip2_PE_SF_chr4_03_2024-01-11-04-53-08  ----CMCAGTTCACTGCATGAGAGTAGCCAGCAATTCAGGTTTTTTTCATCAAGACAATA 56
PE_PEG1_chr4_F_05_2024-01-12-11-21-13      --CMCATTTCAACTGAATGAGAGTAAGCCAGCAATTCAGGTTTTTTTCATCAAGACAATA 58
*****

SMA_Tip2_PE_SF_chr4_03_2024-01-11-04-53-08  GAAAGAATTTTWCCTTTCTACAGAACTGGTTATGTTTAATTACATATCATGTGTAAG 116
PE_PEG1_chr4_F_05_2024-01-12-11-21-13      GAAAGAATTTTWCCTTTCTACAGAACTGGTTATGTTTAATTACATATCATGTGTAAG 118
*****

SMA_Tip2_PE_SF_chr4_03_2024-01-11-04-53-08  AAATTGTCAAGTAGCGAATCTTATTTAACTCTCCTAAGCCTCATATAAGGAAAAACAA 176
PE_PEG1_chr4_F_05_2024-01-12-11-21-13      AAATTGTCAAGTAGCGAATCTTATTTAACTCTCCTAAGCCTCATATAAGGAAAAACAA 178
*****

SMA_Tip2_PE_SF_chr4_03_2024-01-11-04-53-08  AACTATCCTTCTCTAATCATCTTAGTACCTCAGAATGTCTGGAATACGTTGTTTGTGATT 236
PE_PEG1_chr4_F_05_2024-01-12-11-21-13      AACTATCCTTCTCTAATCATCTTAGTACCTCAGAATGTCTGGAATACGTTGTTTGTGATT 238
*****

SMA_Tip2_PE_SF_chr4_03_2024-01-11-04-53-08  TTGTGGGGATGATTTATATTGCCATGATTGTTTTGGATGGTTTTCTGGCAGCACAGCT 296
PE_PEG1_chr4_F_05_2024-01-12-11-21-13      TTGTGGGGATGATTTATATTGCCATGATTGTTTTGGATGGTTTTCTGGCAGCACAGCT 298
*****

SMA_Tip2_PE_SF_chr4_03_2024-01-11-04-53-08  AGGCCAAAGCAGCATAATGGCCACAATGGTATAATTTATCTTGCAACATATCAAGCAC 356
PE_PEG1_chr4_F_05_2024-01-12-11-21-13      AGGCCAAAGCAGCATAATGGCCACAATGGTATAATTTATCTTGCAACATATCAAGCAC 358
*****

SMA_Tip2_PE_SF_chr4_03_2024-01-11-04-53-08  ATCTAGAGAAAACAGAGATAAGAAAAATGGATCCTTTTTCTGCAACACGAATCTTATGTA 416
PE_PEG1_chr4_F_05_2024-01-12-11-21-13      ATCTAGAGAAAACARAGATAAARAAAAATGGATCCTTTTTCTGCAACACGAATCTTATGTA 418
*****

SMA_Tip2_PE_SF_chr4_03_2024-01-11-04-53-08  AATTAGGATAAAAAATGGACACATTCA-AAACGCTGAATTAATGAACAGTAGATGGCAGGA 475
PE_PEG1_chr4_F_05_2024-01-12-11-21-13      AATTAGGATAAAAAATGGACACATTCAAAAAACGCTGAATTAATGAACAGTAGATGGCAGGA 478
*****

SMA_Tip2_PE_SF_chr4_03_2024-01-11-04-53-08  TCTTTARATCACAGTAAA 493
PE_PEG1_chr4_F_05_2024-01-12-11-21-13      TCTTTAGATCACAGTA-- 494
*****

```


B.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

SMA_Tip2_PE_5R_chr4_04_2024-01-11-04-53-08  CSAMHAKTTWATTMGCGTTTTTAATGKTCATTTTTTATCCTAATTTACATAARATTCG  60
PE_PEG1_chr4_R_05_2024-01-12-11-21-13      --CHAAHTTAATTGCGTTTTTAATGTCCTATTTTTTATCCTAATTTACATAARATTCG  58
      * * *****
SMA_Tip2_PE_5R_chr4_04_2024-01-11-04-53-08  TGTGCAAAAAAGGATCCATTTTCTTATCTGTTTCTCTARATGTGCTGATATGT  120
PE_PEG1_chr4_R_05_2024-01-12-11-21-13      TGTGCAAAAAAGGATCCATTTTCTTATCTGTTTCTCTARATGTGCTGATATGT  118
      *****
SMA_Tip2_PE_5R_chr4_04_2024-01-11-04-53-08  TCTGCAARATAAATATACCATGKGCCATTATGCTTTTGGCTAGCTGTGCTGCCA  180
PE_PEG1_chr4_R_05_2024-01-12-11-21-13      TCTGCAARATAAATATACCATGKGCCATTATGCTTTTGGCTAGCTGTGCTGCCA  178
      *****
SMA_Tip2_PE_5R_chr4_04_2024-01-11-04-53-08  RAAAAACCATCCAAAAACAATCAKGGCAATATAAATCAYCCCNCAAAATCAAAAAACAAC  240
PE_PEG1_chr4_R_05_2024-01-12-11-21-13      RAAAAACCATCCAAAAACAATCAKGGCAATATAAATCAYCCCNCAAAATCAAAAAACAAC  238
      *****
SMA_Tip2_PE_5R_chr4_04_2024-01-11-04-53-08  GTATTCCATACATTCTGAGTACTAAAKGATTARARAAGGATAKTTTGTTCCTTT  300
PE_PEG1_chr4_R_05_2024-01-12-11-21-13      GTATTCCARACHTTCTGAGTACTAAATGATTARARAAGGATAKTTTGTTCCTTT  298
      *****
SMA_Tip2_PE_5R_chr4_04_2024-01-11-04-53-08  ATATGAGGCTTAGGARAGTTAAATAARAATTCGCTACTTGACAATTTCTTTACACATGAW  360
PE_PEG1_chr4_R_05_2024-01-12-11-21-13      ATATGAGGCTTAGGARAGTTAAATAARAATTCGCTACTTGACAATTTCTTTACACATGAT  358
      *****
SMA_Tip2_PE_5R_chr4_04_2024-01-11-04-53-08  TTATAATTAACATAACCAAGTTTCTGTAARGAAGGTAATAATCTTTCTATTGCTGTGATG  420
PE_PEG1_chr4_R_05_2024-01-12-11-21-13      ATGTAATTAACATAACCAAGTTTCTGTAARGAAGGTAATAATCTTTCTATTGCTGTGATR  418
      *****
SMA_Tip2_PE_5R_chr4_04_2024-01-11-04-53-08  AAAAAACCTGAATTGCTGCTT--ACTCTCATTGAGTTTGAAGTAAGTAAGAGAGTT  478
PE_PEG1_chr4_R_05_2024-01-12-11-21-13      AAAAAACCTGAATTGCTGCTT--ACTCTCATTGAGTTTGAAGTAAGTAAGAGAGTT  476
      *****
SMA_Tip2_PE_5R_chr4_04_2024-01-11-04-53-08  CAACTCATACCCATTGCAAA  500
PE_PEG1_chr4_R_05_2024-01-12-11-21-13      CAACTCATACCCATTGCA--  495
      CAACTCATACCCATTGCG--  497
      * * * * *

```

C.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

SMA_Tip2_PE_5F_chr22_05_2024-01-11-04-53-08  -----CGSSGACASTTTTTAAAGTAGTTTAAACATGAGCAGGCGAGCTGTCAGTGCTCT  55
PE_PEG1_chr22_F_05_2024-01-12-11-21-13      -----CSSSCSGCHTTTTAAAGTAGTTTAAACATGAGCAGGCGAGCTGTCAGTGCTCT  53
      *****
SMA_Tip2_PE_5F_chr22_05_2024-01-11-04-53-08  TCTTTGCTTTTTCGTGKACCGTCTCTCCAGAACAHAGCATCTTTCTTTGATTTT  115
PE_PEG1_chr22_F_05_2024-01-12-11-21-13      TCTTTGCTTTTTCGTGTTACCGTCTCTCCAGAACACAGCATCTTTCTTTGATTTT  113
      *****
SMA_Tip2_PE_5F_chr22_05_2024-01-11-04-53-08  GTGGAACCTGCTTTTATTAAAAATTTTACTTGAAGTCAAGGACACAAACAGGATGCT  175
PE_PEG1_chr22_F_05_2024-01-12-11-21-13      GTGGAACCTGCTTTTATTAAAAATTTTACTTGAAGTCAAGGACACAAACAGGATGCT  173
      *****
SMA_Tip2_PE_5F_chr22_05_2024-01-11-04-53-08  CACTTTCCTTCTGACTTGGATGTAGACAGAGCTCCAGGCTTCCCTGTACCACTGTG  235
PE_PEG1_chr22_F_05_2024-01-12-11-21-13      CACTTTCCTTCTGACTTGGATGTAGACAGAGCTCCAGGCTTCCCTGTACCACTGTG  233
      *****
SMA_Tip2_PE_5F_chr22_05_2024-01-11-04-53-08  ACGGTAAGCTTGGGCTGGTCCAGAAGCCACTTGAGGGACTCCTTCTGGTTAGACACATA  295
PE_PEG1_chr22_F_05_2024-01-12-11-21-13      ACGGTAAGCTTGGGCTGGTCCAGAAGCCACTTGAGGGACTCCTTCTGGTTAGACACATA  293
      *****
SMA_Tip2_PE_5F_chr22_05_2024-01-11-04-53-08  TACCCGAGGCTTTGATATGATTAATGAGATTTTAAAGTCAAGGAGAGAGGGTAAAAAG  355
PE_PEG1_chr22_F_05_2024-01-12-11-21-13      TACCCGAGGCTTTGATATGATTAATGAGATTTTAAAGTCAAGGAGAGAGGGTAAAAAG  353
      *****
SMA_Tip2_PE_5F_chr22_05_2024-01-11-04-53-08  TGAGTCGTGTAACTTCAATACTAAACCAACCTGCCATCCATTGAGGATAAAA-TGGATA  414
PE_PEG1_chr22_F_05_2024-01-12-11-21-13      TGAGTCGTGTAACTTCAATACTAAACCAACCTGCCATCCATTGAGGATAAAA-TGGATA  412
      *****
SMA_Tip2_PE_5F_chr22_05_2024-01-11-04-53-08  GAAACAACAATAATCTTGATAATAATAGTCTACATTTAAACATAACTAGTTATATGCT  474
PE_PEG1_chr22_F_05_2024-01-12-11-21-13      GAAACAACAATAATCTTGATAATAATAGTCTACATTTAAACATAACTAGTTATATGCT  472
      *****
SMA_Tip2_PE_5F_chr22_05_2024-01-11-04-53-08  AGRRGCATCTGCCAGAAAGCTARA--  499
PE_PEG1_chr22_F_05_2024-01-12-11-21-13      AGAAGCATCTGCCARAAGGCHAGA--  497
      * * * * *

```

Şekil 50. CRISPR-PE(+) pegRNA1(+) SMA Tip 2 fibroblast hücrelerinde off-target (hedef dışı) mutasyon analizi. **A)** Kromozom 4 (forward) **B)** Kromozom 4 (reverse) **C)** Kromozom 22 bölgelerinde belirlenen hedeflere ait hedef dışı mutasyon analizi.

5.TARTIŞMA

SMA hastalığı SMN proteinini üretilmemesi sonucu motor nöron kaybı ile seyreden nadir genetik bir hastalıktır. SMN1 ve SMN2 olmak üzere SMA hastalığının merkezinde sorumlu iki gen rol oynamaktadır. 5. Kromozom üzerinde bulunan SMN1 geninin delesyonu veya bu gende meydana gelen mutasyonlar sonucu SMA hastalığı ortaya çıkmaktadır (Bowerman vd., 2017). SMA hastalarında oran olarak bakıldığında %96'sından fazlasında 5. kromozomda konumlanan SMN1 geninde mutasyonlar meydana gelmektedir. Proksimal SMA hastalarında yaklaşık %96.4'lük gibi bir kesiminde SMN1 geni üzerinde homozigot ekzon 7 ve 8 delesyonları meydana gelmektedir (Bozorg Qomi vd., 2019; Kolb vd., 2017). SMN1 geni üzerinden hayatta kalma motor nöron (SMN) proteinini eksprese edilmekte ve bu gen üzerinde meydana gelen mutasyonlar sebebiyle SMN protein üretimi etkilenmektedir. Düşük miktarda SMN protein ekspresyonu SMN2 geni üzerinden gerçekleştirilmektedir. Sağlıklı bireyler de dahil olmak üzere her bireyde farklı kopya sayıda bulunan SMN2 geni kopya sayısının hastalık seyri ve fenotipik şiddet ile ilişkisine yönelik sonuçlar ortaya konmuştur (Lefebvre vd., 1997; Shorrock vd., 2018). Bugüne kadar SMA hastalığı için U.S Food and Drug Administration (FDA) onaylı; Biogen Nusinersen (Spinraza®), Novartis Onasemnogene Apeparvovec-xioi (Zolgensma®) ve Risdiplam (Evrysdi™) olmak üzere üç ilaç bulunmaktadır. Günümüzde çeşitli terapötik yaklaşımlar geliştirilmekte ancak ilaçların maaliyeti konusunda ciddi sıkıntılar yaşanmaktadır (Chong vd., 2021). CRISPR/Cas9 sistemi genomda meydana gelen gelen değişikliklerin düzeltilmesini mümkün kılmaktadır (Hsu vd., 2014; Jinek vd., 2012). HDR'ye kıyasla daha düşük off target ve olası mutasyon kapasitesine sahip CRISPR-PE sistemi gibi bir sisteme ihtiyaç duyulmuştur. Hastalıklara neden olan mutasyonların ~%50'si küçük indellerden ziyade tek nükleotid değişimlerden oluştuğu için hassas tek bazlı düzenleme klinik açıdan anlamlı ve önemli bir yöntem niteliğindedir. Prime Editing sisteminin, insan hastalıklarıyla ilişkili bilinen genetik varyantların %89'unu düzenleme potansiyelinden kaynaklı olarak terapötik fayda açısından önemli bir konumda olduğu düşünülmektedir (Anzalone vd., 2019).

Elde edilen literatür verilerinde c.859 G>C dönüşümünün SMA fenotipi üzerindeki olumlu bir modifiye edici olduğu tespit edilmiştir. Bu dönüşüm sonucu SMN proteinin üç boyutlu konformasyonel yapısında değişim meydana geldiği varsayılmaktadır. Bu varyantın ekzon 7 katılımını artırdığı yapılan çalışmalarda yer almaktadır (Reed & Zanolini, 2018; Vezain vd., 2010). Neredeyse identik olan SMN1 ve SMN2 geni arasındaki en büyük fark 840. Nükleotit üzerinde meydana gelen C-T dönüşümüdür. Meydana gelen bu dönüşüm sonucunda ekzon 7 katılımı engellenmektedir (Kolb & Kissel, 2015). Tez kapsamında HDR tabanlı yaklaşımlara oranla pek çok avantaja sahip olan CRISPR-PE sistemi tercih edilerek bir terapötik bir tedavi geliştirilmiştir. SMA hastalığında SMN2 geni üzerinde c.859 G>C (pegRNA1) ve c.840 C-T (pegRNA2) tek nokta mutasyonunun modifiye edilerek stabil SMN protein ekspresyonunun sağlanması hedeflenmiştir. Bu amaçla SMN2 geni üzerindeki tek nokta mutasyonunu hedefleyen pegRNA tasarımları gerçekleştirilmiştir. Primer SMA Tip 1, Tip 2 fibroblast, Jurkat, HEK293T, HeLa, U87 gibi çeşitli hücre hatlarında CRISPR-PE sisteminin etkinliğinin test edilmesi hedeflenmiştir. Tez hipotezi; CRISPR Prime Editing yönteminin SMA hastalığı tedavisi için farklı SMN2 kopya sayılarına sahip alt tiplerde çalışarak SMN ekspresyon profilinin artırılabilirliği. Tez çıktılarından elde edilen bilgiler Spinal Musküler Atrofi (SMA) hastalığında genetik araştırmalar için önemli bir altyapı sağlamaktadır.

Tez kapsamında CRISPR-PE sistemi kullanılarak SMN ekspresyonunun farklı SMN2 kopya sayısına sahip hücrelerde artırılması hedeflenmiştir. Gerçekleştirilen çalışmalarda, SMA hastalığındaki farklı SMN2 kopya sayılarına sahip alt tiplerdeki primer fibroblast hücre hatlarında SMN gen ifadesi ve SMN2 kopya sayıları arasındaki ilişki incelenmiştir. Primer SMA Tip 2 fibroblast hücrelerinde SMN2 kopya sayısı 3 SMN2 kopya iken; Primer SMA Tip 1 fibroblast hücrelerinde 2 adet SMN2 kopya sayısı bulunmaktadır. SMA Tip 1, Tip 2 ve yanında sağlıklı kontrol grubu olan WT fibroblast hücre hattında gerçekleştirilen intrasellüler boyama sonucunda SMN2 kopya sayısı daha yüksek SMA Tip 2 fibroblast hücre hattında SMA Tip 1 fibroblast hücre hattına oranla daha yüksek SMN ekspresyon profiline sahip olduğu görülmüş olup; her iki hücre hattının da işlevsel SMN1 gen kopyasına sahip doğal fenotip sağlıklı WT fibroblast hücrelerinden anlamlı bir oranda düşük SMN ifadesine sahip olduğu tespit edilmiştir (**Şekil 23**).

SMN boyama sonucunda düşük-SMN profiline sahip olduğu gösterilen Jurkat PE(+) hücrelerde c.859 G>C dönüşümü hedeflenerek verilen pegRNA1 ve CRISPR-PE sistemi sonrası yapılan intrasellüler boyamalarda pegRNA ifadesini 2 ay süre ile stabil olarak sağladığı gösterilmiştir (**Şekil 28**). Bunun yanında c.840 C-T nokta mutasyonunu tersine çevirmeyi hedefleyen pegRNA2 ve CRISPR-PE sistemi sonrası da Jurkat hücre hattında SMN ifadesinin stabil şekilde sağlandığı tespit edilmiştir (**Şekil 29**). Ancak hücreler genomik açıdan heterojen ve karma bir yapıda olduğundan dolayı saf kolonilerden daha kesin sonuçlar alınması için SCC deneyleri planlanmış olup belirlenen klonlardan daha uzun süre kapsamında SMN ekspresyonunun seviyeleri ve stabilitesi değerlendirilmiştir (**Şekil 30**).

Kan içerisindeki mononükleer hücrelerde SMN ifadesi oranlarını tespit etmek için 4 adet SMN2 kopya sayısına sahip SMA Tip 3 hastasından elde edilen mononükleer hücrelerdeki SMN protein ekspresyonu değerlendirilmiştir (**Şekil 31**). Elde edilen hücrelerde CRISPR-PE sistemi aktarımı sonrası hücre spesifik SMN protein ekspresyonunun mononükleer hücrelerde daha düşük olduğu, sağlıklı mononükleer hücreler ile karşılaştırıldığında gösterilmiştir. Vücuttaki farklı hücre tiplerinde SMN ifadesinin de farklılık gösterdiği literatürde rapor edilmiştir (Tissue expression of SMN1 - Summary - The Human Protein Atlas, t.y.). Bir CD4+T hücre lenfoma olan Jurkat hücre hattının da sağlıklı mononükleer hücrelere benzer oranda düşük SMN ifadesini sağlaması takip eden tüm deneylerde Jurkat hücre hattının negatif kontrol olarak kullanabileceğine karar verilmiştir. Bu sonuçlar bağlamında mononükleer hücrelerde SMN ekspresyonunun genel oranda düşük olduğu ve özellikle SMA Tip 3 hastasından elde edilen mononükleer hücrelerde anlamlı oranda daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlarda SMN ekspresyonunun hücre tiplerine göre değişebileceği gösterilmiş olup bu noktada SMA hastalığının etkilerinin anlaşılması için önemli bir referans niteliği taşıyacağını göstermektedir.

Tez kapsamında CRISPR-PE sisteminin çalıştığı ilk olarak lenfoma hücre hattı olan Jurkat hücrelerinde gösterilmiştir. SMN ifadesi PBMC hücrelerinde daha düşük olduğu tespit edilmiştir. CRISPR-PE sisteminin Primer T hücrelerde de modifikasyon gerçekleştirip gerçekleştirmediği test edilmiştir. Bu noktada PBMC CRISPR-PE çok az çalışılmış bir sistemdir. Tez kapsamında lentiviral aktarım metoduyla primer T hücrelerde CRISPR-PE sisteminin aktarımı optimize edilmeye çalışılmıştır. CD3+T hücrelerin blastidicin ile seçilebildiği ve pegRNA ifade edebildiği gösterilmiş olup optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ancak CRISPR-PE sisteminin primer lenfositlerde modifikasyon sistemi olarak kullanılabilmesi için devamında çalışmalar gerçekleştirilmelidir.

Primer SMA Tip 1, Tip 2 ve WT fibroblast hücre hatlarında mitokondriyal aktivitelerin testi için MTT analizi ve apoptoz değerleri için Annexin V-PI boyama gerçekleştirilmiştir (**Şekil 32**). SMN2 kopya sayılarına ve SMN ekspresyonlarına paralel olacak şekilde canlılık ve apoptoz evreleri değerlendirilmiştir. Bunun yanında SMA Tip 1 ve Tip 2 fibroblastların proliferasyon kapasiteleri ve hücre canlılıklarından da bar grafikler oluşturularak değerlendirilmiştir (**Şekil 33**). Sonuç olarak her iki hücre hattının da kültüre edilebildiği kontrol hücre hatlarına kıyasla proliferasyon ve mitokondriyal aktivite kapasitesinin anlamlı bir oranda düşük olsa da yüksek oranda hücre canlılığına sahip olduğu apoptoz özelliklerini düşük oranda gösterdiği ve devam eden testlerde kullanılabileceği değerlendirilmiştir.

Literatürde SMN2 kopya sayısının artışı ile hastalığın fenotipik şiddetinin düşüş gösterdiğine yönelik çalışmalar yer almaktadır (Feldkötter vd., 2002; Shorrock vd., 2018). Buna dayalı olarak gerçekleştirilen tedavilerde SMN2 kopya sayısının yüksek olduğu hücre hattında daha fazla SMN protein ekspresyonunun artırılabilmesi hipotezinde bulunuldu. Böylece SMN2 geni hedefli tasarlanan pegRNA'ların uygulanması ile SMN2 kopya sayısı yüksek olan hücrelerde tedavi şansının daha yüksek olacağı varsayıldı. Düşük SMN profiline sahip Jurkat hücrelerinin yanında farklı SMN2 kopya sayısına sahip Primer SMA Tip 1 ve Tip 2 fibroblast hücre hatlarında, CRISPR-PE kodlayan lentivirüsler ile blastidicin seçilimi gerçekleştirilmiş olup uzun dönemde SMN ifadeleri takip edilmiştir. SMA Tip 1 hücre hattında pegRNA1 transdüksiyonu sonrası 24 ve 42. PI günlerinde (**Şekil 34**); SMA Tip 2 hücre hattında pegRNA1 transdüksiyonu sonrası 8-21-24-33 ve 42. PI günlerinde (**Şekil 35**) akım sitometri ile analiz gerçekleştirilmiştir. Buradaki sonuçlardan her iki hücre hattında da SMN

ifadelerinin aynı zamanda SMN+ GFP+ popülasyonunun da 42. Güne kadar yüksek kaldığı tespit edilmiştir. Aynı şekilde her iki SMA fibroblast hücre hattında pegRNA2 transdüksiyonu sonrası günlerde SMN ekspresyonları takip edilmiş olup yine SMN ifadesinin değişen PI günlerinde yüksek seyrettiği tespit edilmiştir (**Şekil 36 ve 37**). Ortalama Floresan Yoğunluğu (MFI), akış sitometrisinde örnek/hücre popülasyonları arasında target of interest (TOI) değerlerinin karşılaştırılması için kullanılan bir parametredir. Bu sebeple GFP ifadesinin % oran yerine hücreler içerisindeki floresan ışığa katsayısı baz alınarak transgen ifade oranının hesaplanması planlanmıştır. SMA Tip 1 ve SMA Tip 2 PE(+) pegRNA(+) hücrelerde değişen post infection günlerdeki GFP MFI değerleri kontrol grubuna göre karşılaştırılmıştır (**Şekil 38**). Elde edilen sonuçlarda PE(+) kontrol grubuna kıyasla her iki hücre hattı ve hem pegRNA1 hem pegRNA2 için uzun süre stabil ve yüksek GFP MFI değerlerine sahip olduğu değerlendirilmiştir. Çalışma çıktıları farklı SMN2 kopya sayısına sahip primer fibroblast hücre hatlarında CRISPR-PE sisteminin etkin bir şekilde kullanılabileceğini işaret etmektedir. SMN2 kopya sayısı yüksek olan Primer SMA Tip 2 fibroblast hücrelerinde SMA Tip 1 fibroblast hücrelerine oranla Δ GFP ifadesinin uzun dönemde daha yüksek ve stabil bir şekilde sağlandığı tespit edilmiştir (**Şekil 39**).

SMN proteini, spliceozomal küçük nükleer ribonükleoproteinler (snRNP'ler) ve mRNA metabolizmasında kritik bir göreve sahip SMN kompleksinin temel bileşenidir (Franco-Espin vd., 2022). SMN proteini doğrudan hücre canlılığı ile ilişkili bir protein olduğundan SMN ifadesindeki artışıyla birlikte hücrelerin canlılıkları da takip edilmiştir. pegRNA(+) GFP(+) PE(+) Primer SMA Tip 1 veya Tip 2 fibroblast hücre hatlarında SMN ifadesinin artışı ile yüksek canlılığın varlığı tespit edilmiştir. Bu bağlamda, CRISPR-PE sisteminin SMN ifadesindeki artış ile hücre canlılık ve proliferasyonu üzerinde pozitif bir etkiye sahip olduğu kanısını desteklemektedir (**Şekil 40**).

SMA Tip 3 hastasından elde edilen CD3+T hücreler üzerinde CRISPR-PE sistemi ve SMN2 geninde nokta mutasyonlarını hedefleyen pegRNA1 ve pegRNA2 transdüksiyonu sonrası akım sitometride GFP ekspresyonları test edilmiştir (**Şekil 41**). Elde edilen sonuçlarda negatif kontrole kıyasla GFP ekspresyonunun pegRNA aktarılan hücrelerde yükseldiği GFP MFI grafikleri ile de desteklenmiştir. Mononükleer hücrelerde CRISPR-PE sisteminin daha fazla araştırılması gerekmektedir. Bu konunun SMA hastalığının mekanizmalarının aydınlatılmasına katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

Diğer hücrelerden bağımsız olarak motor nöronlar düşük SMN ekspresyonunda canlılıkları olumsuz olarak etkilenmektedir. Bununla bağlantılı olan hücre ölümünün mekanizması belirsizliğini korumaktadır. SMA hastalığında motor nöronların apoptoza uğraması sonucunda kas güçsüzlüğü ve zayıflığına uğradığı literatürde yer almaktadır. Literatürde bununla ilgili yapılan çalışmada *in vitro* SMA modelinde azalan SMN ekspresyonunun doğrudan apoptozu indüklediği ve aynı zamanda SMN ekspresyonundaki artışın doğrudan nöron hasarını koruyucu etki gösterdiği yer almaktadır (Parker vd., 2008). CRISPR-PE sisteminin toksisitesi ve hücre canlılığı üzerindeki etkisi de değerlendirilmiş olup aynı zamanda apoptotik etkisinin üzerinde de durulmuştur (**Şekil 42**). Elde edilen verilerden apoptoz kapasitesinde bir miktar da olsa artışın varlığı tespit edilmiştir. Bu durumun ise rehber RNA over ekspresyonunun hücre içerisindeki toksisiteyi tetiklemesi ile oluşabileceği varsayılmıştır. CRISPR-PE sisteminin apoptozu indükleyebileceği sonucuna varılmıştır. Bu açıdan CRISPR-PE sisteminin apoptotik yönünün hassas ve dikkatli araştırılmasının ardından kullanılması gerektiği hususuna varılmıştır.

SALSA® MLPA® Probemix P021-B1 SMA, SMA tanısında ve izlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Pane vd., 2018). Bu teknik, hastalığın ciddiyetinin değerlendirilmesinde çok önemli olan SMN2 kopya sayılarını belirlemek için kullanılmaktadır (Müller-Felber vd., t.y.). Ek olarak bu probe karışımının kullanılması, hastalarda SMA'nın ayırt edici özelliği olan SMN1 fonksiyonunun homozigot kaybının belirlenmesini sağlamaktadır (Veldhoen vd., 2022). CRISPR-PE ve pegRNA ifadesi sağlanan SMA Tip 2 fibroblast hücre hattında ekzon 7 ve kontrol olarak ekzon 8 hedefli MLPA analizi gerçekleştirilmiştir (**Şekil 43**). Modifikasyonu hedeflenen ekzon 7 duplikasyonlarındaki değişiklik tespit edilmiştir. SMA Tip 2 fibroblast hücre hattında SMN1 geni bulunmamakla birlikte 3 adet SMN2 kopya sayısına sahiptir. SMA Tip 2 hücre hattında PE(+) kontrole kıyasla pegRNA1 ve pegRNA2 transdükte edilen hücrelerde SMN2 kopya sayısının değişmediği veya tespit edilemediği görülmüştür. Buradan çıkarılacak sonuçta hücrelerin genomik açıdan heterojan olması sebebiyle SCC işlemi sonrası MLPA analizinin daha etkin olacağı düşünülmektedir. Bunun yanında Primer SMA Tip 2 fibroblast hücre hattında CRISPR-PE sistemi ile gerçekleştirilen tek baz değişimlerinin tespiti için sekanslamanın bu noktada daha kesin sonuçlar vereceği varsayılmıştır.

Kendi in vitro SMA modelimizin oluşturulması için CRISPR-cas9 sistem ile SMN1 geninin inaktif hale getirilmesi hedeflenmiştir. Bunun için SMN ekspresyonları yüksek olduğu bilinen hücreler olan HEK293T, HeLa ve nöron hücre hattı olan U87 hücre hatlarında SMN1 knockout hücre hatları oluşturuldu ve ardından saf klonlar elde etmek için SCC işlemi uygulandı (**Şekil 44**). SMN proteini doğrudan hayatta kalma ile ilişkili bir protein olduğu için kontrol gruplarının SMN ifadeleri ve canlılıkları klonlarla karşılaştırılmıştır. SCC SMN1 knockout klonlarının kontrol grubu olan genom profili heterojen yapıdaki kontrol knockout hücrelerine kıyasla SMN ekspresyonlarının düşüş gösterdiği tespit edilmiştir. SMN proteini ekspresyonlarına paralel olarak hücre canlılıklarının da giderek azaldığı tespit edilmiştir. Bu durumun detaylandırılması için klon ve kontrollerde MTT analizi ile mitokondriyal aktivite değerlendirilmiştir (**Şekil 46**). Genel anlamda kontrol grubuna kıyasla azalan SMN ekspresyonları ile doğru orantılı olarak hücre ve mitokondriyal aktivitenin de azaldığı tespit edilmiştir. Klonlar arasında HeLa SMN1 knockout C5 klonunda canlılığında azalma saptanamadı. Bu durumun ise SMN1 içeren hücre popülasyonunun over popülasyona dönüşmesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

SMN1 knockout hücre klonlarının oluşturulmasının ardından HEK293T ve HeLa hücre gruplarının SMN1 kopya sayılarının tespiti için MLPA analizi gerçekleştirilmiştir (**Şekil 47 ve Şekil 48**). Kontrol grubuna kıyasla hem C2 hem C3 klonunda SMN1 genine ait skorun alta düştüğü tespit edilmiştir. SMN1 knockout HeLa klonlarında hem SCC olmayan sağlıklı kontrol hem SMN1 knockout HeLa kontrol grubu klonlar ile birlikte MLPA analizine gönderilmiştir. SCC olmayan SMN1 knockout hücrelerine ait MLPA analizinde SMN1 genine ait skorun normal kontrole yakın olduğu görülürken C2 klonuna ait skorun bir miktar alta doğru kayma eğiliminde olduğu tespit edilmiştir. Bu da SCC yapılmadan heterojen hücre gruplarında modifikasyon veya genetik dönüşümlerin tespitinin zorlaştığı fikrini desteklemektedir. Bu hücrelerin yanında SMN1 knockout U87 hücre hattı klonları ve kontrol grubu U87 hücre hattı da MLPA analizine gönderilmiş olup örneklerin tekrarlar sonucunda çalışmaması sebebiyle MLPA yöntemiyle kopya sayısı belirlenemediği için data eklenmemiştir.

SMN2 geni üzerinden eksprese edilen kesik ve stabil olmayan yapıdaki SMN proteini SMN Δ 7 (delta SMN) olarak adlandırılmaktadır (Parker vd., 2008). Düşük oranda tam uzunlukta (FL) SMN proteini üreten SMN2 geni hedefli modifikasyonlar sonucu SMN ekspresyonlarının tespiti için kantitatif RT-PCR primerleri belirlenmiş olup SMA Tip 2 fibroblast hücre hatlarından qPCR ile protein seviyeleri değerlendirilmiştir (**Şekil 49**). PCR ampliconları agaroz jele yüklenmiş ve ardından analiz edilen bant değerlerinden bar grafikler oluşturulmuştur. pegRNA1 ve pegRNA2 transdükte PE(+) SMA Tip 2 hücrelere ait ampliconlarda tam uzunlukta ve kesikli (delta) SMN proteinleri değerlendirilmiştir. GFP kontrol FL kıyasla pegRNA2 FL oranının anlamlı şekilde artış sergilediği tespit edilmiştir. Bunun yanında pegRNA2 delta SMN seviyesinin FL SMN seviyesinden anlamlı oranda düşük olması da gerçekleştirilen SMN2 geni hedefli nokta mutasyonu ile FL SMN proteininin artırıldığını göstermiştir.

CRISPR-PE sisteminin genome zarar vermeden düşük ikincil hedef dışı mutasyon oranına sahip olduğu literatürde yer almaktadır (Cohen, 2019; Liu vd., 2020). PE yönteminin en önemli avantajlarından biri DNA'da çift zincir kırığı oluşturmamasıdır (Matsoukas, 2020; Schene vd., 2020). CRISPR-PE sisteminin hedef dışı mutasyon kapasitesinin araştırılması için genomda oluşabilecek olası off-target mutasyonlarının belirlenmesi amacıyla pegRNA1 tasarımının sekansı baz alınarak genom üzerinde mutasyon görülebilmesi en yüksek olasılıkta olan lokasyonlar Cas-OFFinder (Rgenome) yazılımı kullanılarak belirlenmiştir. Ardından hedef dışı mutasyon analizi için tasarlanan primerler ile sanger dizileme gerçekleştirilmiştir (**Şekil 50**). Buradan elde edilen verilerden CRISPR-PE sisteminin nikaz aktivitesi sonucunda sadece tek zincir kırılımına dayalı bir genetik modifikasyon gerçekleştirerek çift zincir kırılımı ve indel mutasyonlara sebep olmadığını göstermektedir. Tez kapsamında elde edilen veriler literatürle karşılaştırıldığında HDR sistemine oranla daha güvenilir bir yöntem olduğu hipotezini desteklemektedir. Tez kapsamında gerçekleştirilen gen modifikasyonu çalışmaları için kullanılan ve elde edilen çıktılar CRISPR-PE sisteminin SMA çalışmalarında kullanımı için önemli niteliktedir. CRISPR-PE sisteminin tek zincir kırılımı ile genetik modifikasyon gerçekleştirmesi, hedef genlerde istenilen modifikasyonun yapılması açısından oldukça avantajlıdır (Anzalone vd., 2019). Tez kapsamında çift zincir kırımı sonucunda indel mutasyon ve istenilmeyen genetik değişiklere sebep olan CRISPR HDR sistemine kıyasla CRISPR-PE sisteminin bu yan etkileri en aza indirgeyerek genetik modifikasyonu daha güvenilir bir hale getireceği hipotezi sunulmuştur.

Yapılan tez kapsamında CRISPR-PE sisteminin güvenilirliği konusunda farklı SMA alt tipleri için yeni bir perspektif sunulacaktır. Bu bulguların doğruluk ve geçerliliği için daha fazla araştırma ve farklı SMN2 kopya sayısına sahip çeşitli hücre hatlarında araştırmaların ve deneylerin gerçekleştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmanın CRISPR-PE sisteminin SMA hastalığı dahil olmak üzere genetik ve nadir hastalıklarda devamlı olarak geliştirilmesi ve çalışılması adına önemli bir konumda olacağı düşünülmektedir.

Tüm bu çalışmaların yanında pegRNA1 ve pegRNA2'ye ek olarak 12065 kodlu TÜSEB B-Grubu Araştırma Projemiz kapsamında SMN1-EGFP için Hb9-mCMV, CMV, Hb9, PGK, CAG, hSYN, EF1 alfa olmak üzere 7 farklı nöron spesifik promotör dizisi belirlenmiş olup bu promotörleri içeren 2 farklı zarf proteini ile paketlenecek SMN2 geni hedefli 14 farklı pegRNA tasarımı gerçekleştirmiş bulunmaktayız. Böylece CRISPR-PE sistemi daha geniş bir skalada nöronal hücrelerde etkinliği test edilecek geniş kapsamlı çalışmalara devam edilecektir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez kapsamında elde edilen sonuçların SMA hastalığında CRISPR-PE sistemi kullanılarak gerçekleştirilecek gelecek çalışmalar ve araştırmalar için katkı sağlayabileceği ve temel oluşturabileceği düşünülmektedir. Gerçekleştirilen çalışmalar SMA hastalığının genetik altyapısının anlaşılması ve bu hastalığa karşı geliştirilecek tedavilerin sklasının artırılması için önem taşımaktadır. CRISPR-PE sisteminin SMN ekspresyon kapasitesinin artırılmasında ve potansiyel bir tedavi olarak değerlendirilmesinin yanında genetik modifikasyonlar için önemli bir yere sahip olduğu gösterilmiştir. Bunların yanında CRISPR-PE sisteminin apoptoz, hücrel toksisite gibi yan etkilerinin hassas bir şekilde takip edilmesi, sürecin değerlendirilmesi ve yönetilmesi noktaları ileriye yönelik olarak kritik bir noktadır. Çalışma ile SMA alt tiplerinde CRISPR-PE Sistemi etkinliği tespit edilmiş olup aynı zamanda SMN ekspresyonunu farklı SMN2 kopya sayısına sahip hücre hatları üzerinde artırma kapasitesi test edilmiştir. CRISPR-PE, DNA üzerinde çift zincir kırılımına sebep olmadan ve hücre canlılığı üzerinde düşük toksisite gösterse de bu yan etkiler dikkate alınarak daha detaylıca incelenmesi üzerine çalışmalar gerçekleştirilmelidir. Farklı SMN2 kopya sayılarına sahip SMA alt tiplerdeki hücre hatlarında SMN ekspresyonu ve SMN2 kopya sayısı arasındaki ilişki tespit edilmiş olup CRISPR-PE sistemi sonrası da bu dengenin ilişkisi üzerinde durulmuştur. Bu bağlamda fenotipik şiddeti etkileyen SMN2 kopya sayısının hastalık seyri üzerindeki etkileri de bilinmekteyken SMN2 geni üzerindeki terapötik tedavi yaklaşımlarının önemi üzerinde durulması ve incelenmesi gerekmektedir. Mononükleer hücrelerde test edilen SMN ekspresyon seviyelerinin düşük oluşu SMA hastalığının mekanizmalarının anlaşılması ve çalışılması için önem arz etmektedir. Bu konu üzerinde çalışılarak mononükleer hücrelerde SMN ekspresyon seviyelerinin düşük olmasının altındaki mekanizma aydınlatılmalıdır. Böylece SMA hastalığının seyri üzerindeki etkilerin araştırılmasına katkıda bulunulabilecektir.

Geleceğe yönelik SMA hastalığı için CRISPR-PE sisteminin apoptoz kapasitesi ve hücrel toksisitenin tetiklediği mekanizmaların daha detaylı çalışılması gerekmektedir. Böylece CRISPR-PE sistemi hücrelere olan etkileri aydınlatıldığında hücrelere yönelik daha spesifik, kontrollü ve güvenilir çalışmaların gerçekleştirilebilmesi sağlanacaktır. Farklı hücre hatları ve hatta dokular arasındaki SMN ekspresyonlarının literatürde yer aldığı gibi değişkenlik gösterdiği bilindiği için bu farklı skalanın sebepleri ve altyapılarının araştırılması gerekmektedir. Hücreler CRISPR-PE sisteminin aktarımından sonra da genomik heterojeniteye sahip olduğu için SCC ile saf klonların eldesi sonrası çalışmaların devamlılığı gerekmektedir. Böylece SMN ekspresyonunun uzun süreli takibinin yapılması ve hastalığa yönelik geliştirilecek tedavilerin anlaşılması için kolaylık sağlanacaktır.

Gerçekleştirilen çalışmalar SMA hastalığındaki tedavi stratejileri arasında CRISPR-PE sisteminin potansiyel olarak kullanılabilirlik kapasitesini göz önünde bulundurmaktadır. Fakat, CRISPR-PE sisteminin klinik uygulanabilirliği, etkinliği ve en önemlisi güvenilirliği noktasında pek çok prelinik- klinik çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Tüm bu öneriler doğrultusunda SMA hastalığındaki CRISPR-PE sistemini içeren genetik çalışmaların daha derinlemesine araştırılması, ilerdeki tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından altyapı oluşturacaktır.

KAYNAKLAR

- Adikusuma, F., Lushington, C., Arudkumar, J., Godahewa, G. I., Chey, Y. C. J., Gierus, L., Piltz, S., Reti, D., Wilson, L. O., Bauer, D. C., & Thomas, P. Q. (2021). *Optimized nickase- and nuclease-based prime editing in human and mouse cells* (s. 2021.07.01.450810). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2021.07.01.450810>
- Aguti, S., Malerba, A., & Zhou, H. (2018). The progress of AAV-mediated gene therapy in neuromuscular disorders. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 18(6), 681-693. <https://doi.org/10.1080/14712598.2018.1479739>
- Alves, C. R. R., Ha, L. L., Yaworski, R., Lazzarotto, C. R., Christie, K. A., Reilly, A., Beauvais, A., Doll, R. M., Cruz, D. de la, Maguire, C. A., Swoboda, K. J., Tsai, S. Q., Kothary, R., & Kleinstiver, B. P. (2023). *Base editing as a genetic treatment for spinal muscular atrophy* (s. 2023.01.20.524978). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2023.01.20.524978>
- Anzalone, A. V., Randolph, P. B., Davis, J. R., Sousa, A. A., Koblan, L. W., Levy, J. M., Chen, P. J., Wilson, C., Newby, G. A., Raguram, A., & Liu, D. R. (2019). Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*, 576(7785), Article 7785. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1711-4>
- Arnold, E. S., & Fischbeck, K. H. (2018). Spinal muscular atrophy. İçinde *Handbook of Clinical Neurology* (1. bs, C. 148). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64076-5.00038-7>
- Bjursell, M., Porritt, M. J., Ericson, E., Taheri-Ghahfarokhi, A., Clausen, M., Magnusson, L., Admyre, T., Nitsch, R., Mayr, L., Aasehaug, L., Seeliger, F., Maresca, M., Bohlooly-Y, M., & Wiseman, J. (2018). Therapeutic Genome Editing With CRISPR/Cas9 in a Humanized Mouse Model Ameliorates α 1-antitrypsin Deficiency Phenotype. *EBioMedicine*, 29, 104-111. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.02.015>
- Bowerman, M., Becker, C. G., Yáñez-Muñoz, R. J., Ning, K., Wood, M. J. A., Gillingwater, T. H., Talbot, K., & The UK SMA Research Consortium. (2017). Therapeutic strategies for spinal muscular atrophy: SMN and beyond. *Disease Models & Mechanisms*, 10(8), 943-954. <https://doi.org/10.1242/dmm.030148>
- Bozorg Qomi, S., Asghari, A., Salmaninejad, A., & Mojarad, M. (2019). Spinal Muscular Atrophy and Common Therapeutic Advances. *Fetal and Pediatric Pathology*, 38(3), 226-238. <https://doi.org/10.1080/15513815.2018.1520374>

- Cartegni, L., Chew, S. L., & Krainer, A. R. (2002). Listening to silence and understanding nonsense: Exonic mutations that affect splicing. *Nature Reviews. Genetics*, 3(4), 285-298. <https://doi.org/10.1038/nrg775>
- Cartegni, L., Hastings, M. L., Calarco, J. A., De Stanchina, E., & Krainer, A. R. (2006). Determinants of exon 7 splicing in the spinal muscular atrophy genes, SMN1 and SMN2. *American Journal of Human Genetics*, 78(1), 63-77. <https://doi.org/10.1086/498853>
- Chatterjee, N., & Walker, G. C. (2017). Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 58(5), 235-263. <https://doi.org/10.1002/em.22087>
- Chen, T.-H. (2020). New and Developing Therapies in Spinal Muscular Atrophy: From Genotype to Phenotype to Treatment and Where Do We Stand? *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9), 3297. <https://doi.org/10.3390/ijms21093297>
- Chiriboga, C. A., Swoboda, K. J., Darras, B. T., Iannaccone, S. T., Montes, J., De Vivo, D. C., Norris, D. A., Bennett, C. F., & Bishop, K. M. (2016). Results from a phase 1 study of nusinersen (ISIS-SMNRx) in children with spinal muscular atrophy. *Neurology*, 86(10), 890-897. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002445>
- Chong, L. C., Gandhi, G., Lee, J. M., Yeo, W. W. Y., & Choi, S.-B. (2021). Drug Discovery of Spinal Muscular Atrophy (SMA) from the Computational Perspective: A Comprehensive Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 8962. <https://doi.org/10.3390/ijms22168962>
- Cohen, J. (2019). Prime editing promises to be a cut above CRISPR. *Science (New York, N.Y.)*, 366(6464), 406. <https://doi.org/10.1126/science.366.6464.406>
- Colella, P., Ronzitti, G., & Mingozzi, F. (2018). Emerging Issues in AAV-Mediated In Vivo Gene Therapy. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, 8, 87-104. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2017.11.007>
- Cooper, A. R., Patel, S., Senadheera, S., Plath, K., Kohn, D. B., & Hollis, R. P. (2011). Highly efficient large-scale lentiviral vector concentration by tandem tangential flow filtration. *Journal of Virological Methods*, 177(1), 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.06.019>
- Corti, S., Nizzardo, M., Simone, C., Falcone, M., Nardini, M., Ronchi, D., Donadoni, C., Salani, S., Riboldi, G., Magri, F., Menozzi, G., Bonaglia, C., Rizzo, F., Bresolin, N., & Comi, G. P. (2012). Genetic correction of human induced pluripotent stem cells from patients with spinal muscular atrophy. *Science Translational Medicine*, 4(165), 165ra162. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004108>

- Dubowitz, V. (1999). Very severe spinal muscular atrophy (SMA type 0): An expanding clinical phenotype. *European Journal of Paediatric Neurology*, 3(2), 49-51.
[https://doi.org/10.1016/S1090-3798\(99\)80012-9](https://doi.org/10.1016/S1090-3798(99)80012-9)
- Duque, S., Joussemet, B., Riviere, C., Marais, T., Dubreil, L., Douar, A.-M., Fyfe, J., Moullier, P., Colle, M.-A., & Barkats, M. (2009). Intravenous administration of self-complementary AAV9 enables transgene delivery to adult motor neurons. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 17(7), 1187-1196.
<https://doi.org/10.1038/mt.2009.71>
- Faravelli, I., Nizzardo, M., Comi, G. P., & Corti, S. (2015). Spinal muscular atrophy—Recent therapeutic advances for an old challenge. *Nature Reviews. Neurology*, 11(6), 351-359.
<https://doi.org/10.1038/nrneurol.2015.77>
- Farrar, M. A., & Kiernan, M. C. (2015). The Genetics of Spinal Muscular Atrophy: Progress and Challenges. *Neurotherapeutics*, 12(2), 290-302. <https://doi.org/10.1007/s13311-014-0314-x>
- Farrar, M., Johnston, H., Grattan-Smith, P., Turner, A., & Kiernan, M. (2009). Spinal Muscular Atrophy: Molecular Mechanisms. *Current Molecular Medicine*, 9(7), 851-862.
<https://doi.org/10.2174/156652409789105516>
- Feldkötter, M., Schwarzer, V., Wirth, R., Wienker, T. F., & Wirth, B. (2002). Quantitative Analyses of SMN1 and SMN2 Based on Real-Time LightCycler PCR: Fast and Highly Reliable Carrier Testing and Prediction of Severity of Spinal Muscular Atrophy. *The American Journal of Human Genetics*, 70(2), 358-368. <https://doi.org/10.1086/338627>
- Feng, Y., Ge, X., Meng, L., Scull, J., Li, J., Tian, X., Zhang, T., Jin, W., Cheng, H., Wang, X., Tokita, M., Liu, P., Mei, H., Wang, Y., Li, F., Schmitt, E. S., Zhang, W. V., Muzny, D., Wen, S., ... Zhang, J. (2017). The next generation of population-based spinal muscular atrophy carrier screening: Comprehensive pan-ethnic SMN1 copy-number and sequence variant analysis by massively parallel sequencing. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 19(8), 936-944.
<https://doi.org/10.1038/gim.2016.215>
- Finkel, R. S., McDermott, M. P., Kaufmann, P., Darras, B. T., Chung, W. K., Sproule, D. M., Kang, P. B., Foley, A. R., Yang, M. L., Martens, W. B., Oskoui, M., Glanzman, A. M., Flickinger, J., Montes, J., Dunaway, S., O'Hagen, J., Quigley, J., Riley, S., Benton, M., ... De Vivo, D. C. (2014). Observational study of spinal muscular atrophy type I and implications for clinical trials. *Neurology*, 83(9), 810-817.
<https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000741>

- Finkel, R. S., Mercuri, E., Darras, B. T., Connolly, A. M., Kuntz, N. L., Kirschner, J., Chiriboga, C. A., Saito, K., Servais, L., Tizzano, E., Topaloglu, H., Tulinius, M., Montes, J., Glanzman, A. M., Bishop, K., Zhong, Z. J., Gheuens, S., Bennett, C. F., Schneider, E., ... ENDEAR Study Group. (2017). Nusinersen versus Sham Control in Infantile-Onset Spinal Muscular Atrophy. *The New England Journal of Medicine*, 377(18), 1723-1732.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1702752>
- Foust, K. D., Nurre, E., Montgomery, C. L., Hernandez, A., Chan, C. M., & Kaspar, B. K. (2009). Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. *Nature Biotechnology*, 27(1), 59-65. <https://doi.org/10.1038/nbt.1515>
- Franco-Espin, J., Gatus, A., Armengol, J. Á., Arumugam, S., Moradi, M., Sendtner, M., Calderó, J., & Tabares, L. (2022). SMN Is Physiologically Downregulated at Wild-Type Motor Nerve Terminals but Aggregates Together with Neurofilaments in SMA Mouse Models. *Biomolecules*, 12(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/biom12101524>
- Gupta, R. M., & Musunuru, K. (2014). Expanding the genetic editing tool kit: ZFNs, TALENs, and CRISPR-Cas9. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(10), 4154-4161.
<https://doi.org/10.1172/JCI72992>
- High-dose AAV gene therapy deaths. (2020). *Nature Biotechnology*, 38(8), Article 8.
<https://doi.org/10.1038/s41587-020-0642-9>
- Hinderer, C., Katz, N., Buza, E. L., Dyer, C., Goode, T., Bell, P., Richman, L. K., & Wilson, J. M. (2018). Severe Toxicity in Nonhuman Primates and Piglets Following High-Dose Intravenous Administration of an Adeno-Associated Virus Vector Expressing Human SMN. *Human Gene Therapy*, 29(3), 285-298. <https://doi.org/10.1089/hum.2018.015>
- Hsu, P. D., Lander, E. S., & Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 157(6), 1262-1278.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6096), 816-821.
<https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Kashima, T., Rao, N., David, C. J., & Manley, J. L. (2007). HnRNP A1 functions with specificity in repression of SMN2 exon 7 splicing. *Human Molecular Genetics*, 16(24), 3149-3159.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddm276>
- Kashima, T., Rao, N., & Manley, J. L. (2007). An intronic element contributes to splicing repression in spinal muscular atrophy. *Proceedings of the National Academy of*

- Sciences of the United States of America*, 104(9), 3426-3431.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0700343104>
- Kim, H., & Kim, J.-S. (2014). A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nature Reviews. Genetics*, 15(5), 321-334. <https://doi.org/10.1038/nrg3686>
- Kletzl, H., Marquet, A., Günther, A., Tang, W., Heuberger, J., Groeneveld, G. J., Birkhoff, W., Mercuri, E., Lochmüller, H., Wood, C., Fischer, D., Gerlach, I., Heinig, K., Bugawan, T., Dziadek, S., Kinch, R., Czech, C., & Khwaja, O. (2019). The oral splicing modifier RG7800 increases full length survival of motor neuron 2 mRNA and survival of motor neuron protein: Results from trials in healthy adults and patients with spinal muscular atrophy. *Neuromuscular Disorders*, 29(1), 21-29. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2018.10.001>
- Kolb, S. J., Coffey, C. S., Yankey, J. W., Krosschell, K., Arnold, W. D., Rutkove, S. B., Swoboda, K. J., Reyna, S. P., Sakonju, A., Darras, B. T., Shell, R., Kuntz, N., Castro, D., Parsons, J., Connolly, A. M., Chiriboga, C. A., McDonald, C., Burnette, W. B., Werner, K., ... Kissel, J. T. (2017). Natural History of Infantile-Onset Spinal Muscular Atrophy. *Annals of neurology*, 82(6), 883-891. <https://doi.org/10.1002/ana.25101>
- Kolb, S. J., & Kissel, J. T. (2015). Spinal Muscular Atrophy. *Neurologic clinics*, 33(4), 831-846. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2015.07.004>
- Le, T. T., McGovern, V. L., Alwine, I. E., Wang, X., Massoni-Laporte, A., Rich, M. M., & Burghes, A. H. M. (2011). Temporal requirement for high SMN expression in SMA mice. *Human Molecular Genetics*, 20(18), 3578-3591. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr275>
- Lefebvre, S., Burlet, P., Liu, Q., Bertrand, S., Clermont, O., Munnich, A., Dreyfuss, G., & Melki, J. (1997). Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy. *Nature Genetics*, 16(3), 265-269. <https://doi.org/10.1038/ng0797-265>
- Li, J.-J., Lin, X., Tang, C., Lu, Y.-Q., Hu, X., Zuo, E., Li, H., Ying, W., Sun, Y., Lai, L.-L., Chen, H.-Z., Guo, X.-X., Zhang, Q.-J., Wu, S., Zhou, C., Shen, X., Wang, Q., Lin, M.-T., Ma, L.-X., ... Chen, W.-J. (2020). Disruption of splicing-regulatory elements using CRISPR/Cas9 to rescue spinal muscular atrophy in human iPSCs and mice. *National Science Review*, 7(1), 92-101. <https://doi.org/10.1093/nsr/nwz131>
- Lin, X., Chen, H., Lu, Y.-Q., Hong, S., Hu, X., Gao, Y., Lai, L.-L., Li, J.-J., Wang, Z., Ying, W., Ma, L., Wang, N., Zuo, E., Yang, H., & Chen, W.-J. (2020). Base editing-mediated splicing correction therapy for spinal muscular atrophy. *Cell Research*, 30(6), Article 6. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0304-y>
- Liu, Y., Li, X., He, S., Huang, S., Li, C., Chen, Y., Liu, Z., Huang, X., & Wang, X. (2020). Efficient generation of mouse models with the prime editing system. *Cell Discovery*, 6, 27. <https://doi.org/10.1038/s41421-020-0165-z>

- Long, C., Amoasii, L., Mireault, A. A., McAnally, J. R., Li, H., Sanchez-Ortiz, E., Bhattacharyya, S., Shelton, J. M., Bassel-Duby, R., & Olson, E. N. (2016). Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy. *Science (New York, N.Y.)*, 351(6271), 400-403.
<https://doi.org/10.1126/science.aad5725>
- Lorson, C. L., Hahnen, E., Androphy, E. J., & Wirth, B. (1999). A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(11), 6307-6311.
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.11.6307>
- Ma, Y., Zhang, L., & Huang, X. (2014). Genome modification by CRISPR/Cas9. *FEBS Journal*, 281(23), 5186-5193. <https://doi.org/10.1111/febs.13110>
- Macleod, M. J., Taylor, J. E., Lunt, P. W., Mathew, C. G., & Robb, S. A. (1999). Prenatal onset spinal muscular atrophy. *European Journal of Paediatric Neurology*, 3(2), 65-72.
[https://doi.org/10.1016/S1090-3798\(99\)80015-4](https://doi.org/10.1016/S1090-3798(99)80015-4)
- Maeder, M. L., Stefanidakis, M., Wilson, C. J., Baral, R., Barrera, L. A., Bounoutas, G. S., Bumcrot, D., Chao, H., Ciulla, D. M., DaSilva, J. A., Dass, A., Dhanapal, V., Fennell, T. J., Friedland, A. E., Giannoukos, G., Gloskowski, S. W., Glucksmann, A., Gotta, G. M., Jayaram, H., ... Jiang, H. (2019). Development of a gene-editing approach to restore vision loss in Leber congenital amaurosis type 10. *Nature Medicine*, 25(2), Article 2.
<https://doi.org/10.1038/s41591-018-0327-9>
- Mailman, M. D., Heinz, J. W., Papp, A. C., Snyder, P. J., Sedra, M. S., Wirth, B., Burghes, A. H. M., & Prior, T. W. (2002). Molecular analysis of spinal muscular atrophy and modification of the phenotype by SMN2. *Genetics in Medicine*, 4(1), 20-26.
<https://doi.org/10.1097/00125817-200201000-00004>
- Marzec, M., Brąszewska-Zalewska, A., & Hensel, G. (2020). Prime Editing: A New Way for Genome Editing. *Trends in Cell Biology*, 30(4), 257-259.
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.01.004>
- Marzec, M., & Hensel, G. (2019). More precise, more universal and more specific – the next generation of RNA-guided endonucleases for genome editing. *The FEBS Journal*, 286(23), 4657-4660. <https://doi.org/10.1111/febs.15079>
- Matsoukas, I. G. (2020). Prime Editing: Genome Editing for Rare Genetic Diseases Without Double-Strand Breaks or Donor DNA. *Frontiers in Genetics*, 11.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2020.00528>
- Mendell, J. R., Al-Zaidy, S., Shell, R., Arnold, W. D., Rodino-Klapac, L. R., Prior, T. W., Lowes, L., Alfano, L., Berry, K., Church, K., Kissel, J. T., Nagendran, S., L'Italien, J., Sproule, D. M.,

- Wells, C., Cardenas, J. A., Heitzer, M. D., Kaspar, A., Corcoran, S., ... Kaspar, B. K. (2017). Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy. *New England Journal of Medicine*, 377(18), 1713-1722. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1706198>
- Merten, O.-W., Hebben, M., & Bovolenta, C. (2016). Production of lentiviral vectors. *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development*, 3, 16017. <https://doi.org/10.1038/mtm.2016.17>
- Messina, S. (2018). New Directions for SMA Therapy. *Journal of Clinical Medicine*, 7(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/jcm7090251>
- Messina, S., & Sframeli, M. (2020). New Treatments in Spinal Muscular Atrophy: Positive Results and New Challenges. *Journal of Clinical Medicine*, 9(7), 2222. <https://doi.org/10.3390/jcm9072222>
- Müller-Felber, W., Vill, K., Schwartz, O., Gläser, D., Nennstiel, U., Wirth, B., Burggraf, S., Röschinger, W., Becker, M., Durner, J., Eggermann, K., Müller, C., Hannibal, I., Olgemöller, B., Schara, U., Blaschek, A., & Kölbel, H. (t.y.). Infants Diagnosed with Spinal Muscular Atrophy and 4 SMN2 Copies through Newborn Screening – Opportunity or Burden?1. *Journal of Neuromuscular Diseases*, 7(2), 109-117. <https://doi.org/10.3233/JND-200475>
- Nelson, C. E., Robinson-Hamm, J. N., & Gersbach, C. A. (2017). Genome engineering: A new approach to gene therapy for neuromuscular disorders. *Nature Reviews Neurology*, 13(11), 647-661. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.126>
- Niibori, Y., Lee, S. J., Minassian, B. A., & Hampson, D. R. (2020). Sexually Divergent Mortality and Partial Phenotypic Rescue After Gene Therapy in a Mouse Model of Dravet Syndrome. *Human Gene Therapy*, 31(5-6), 339-351. <https://doi.org/10.1089/hum.2019.225>
- Pagani, F. (2003). New type of disease causing mutations: The example of the composite exonic regulatory elements of splicing in CFTR exon 12. *Human Molecular Genetics*, 12(10), 1111-1120. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg131>
- Pane, M., Palermo, C., Messina, S., Sansone, V. A., Bruno, C., Catteruccia, M., Sframeli, M., Albamonte, E., Pedemonte, M., D'Amico, A., Brigati, G., de Sanctis, R., Coratti, G., Lucibello, S., Bertini, E., Vita, G., Tiziano, F. D., Mercuri, E., & Italian EAP working group. (2018). Nusinersen in type 1 SMA infants, children and young adults: Preliminary results on motor function. *Neuromuscular Disorders: NMD*, 28(7), 582-585. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2018.05.010>

- Parker, G. C., Li, X., Anguelov, R. A., Toth, G., Cristescu, A., & Acsadi, G. (2008). Survival motor neuron protein regulates apoptosis in an in vitro model of spinal muscular atrophy. *Neurotoxicity Research*, 13(1), 39-48. <https://doi.org/10.1007/BF03033366>
- Passini, M. A., Bu, J., Richards, A. M., Kinnecom, C., Sardi, S. P., Stanek, L. M., Hua, Y., Rigo, F., Matson, J., Hung, G., Kaye, E. M., Shihabuddin, L. S., Krainer, A. R., Bennett, C. F., & Cheng, S. H. (2011). Antisense oligonucleotides delivered to the mouse CNS ameliorate symptoms of severe spinal muscular atrophy. *Science Translational Medicine*, 3(72), 1-11. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001777>
- Passini, M. a, Bu, J., Richards, A. M., Kinnecom, C., Sardi, S. P., Stanek, M., Hua, Y., Rigo, F., Matson, J., Hung, G., Kaye, E. M., Shihabuddin, L. S., Krainer, A. R., Bennett, C. F., & Cheng, S. H. (2011). Ameliorate Symptoms of Severe Spinal Muscular Atrophy. *Science Translational Medicine*, 3(72). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001777>.Antisense
- Porensky, P. N., Mitrpant, C., McGovern, V. L., Bevan, A. K., Foust, K. D., Kaspar, B. K., Wilton, S. D., & Burghes, A. H. M. (2012). A single administration of morpholino antisense oligomer rescues spinal muscular atrophy in mouse. *Human Molecular Genetics*, 21(7), 1625-1638. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr600>
- Prior, T. W., Krainer, A. R., Hua, Y., Swoboda, K. J., Snyder, P. C., Bridgeman, S. J., Burghes, A. H. M., & Kissel, J. T. (2009). A Positive Modifier of Spinal Muscular Atrophy in the SMN2 Gene. *The American Journal of Human Genetics*, 85(3), 408-413. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.08.002>
- Rao, V. K., Kapp, D., & Schroth, M. (2018). J ournal of Managed Care & speCialty pharMaCy Gene Therapy for Spinal Muscular Atrophy: An Emerging Treatment Option for a Devastating Disease. *Journal of Managed Care & Specialty Pharmacy* ® Previously published as JMCP, the Journal of Managed Care Pharmacy ® A Peer-Reviewed Journal of the Academy of Managed Care Pharmacy ■, 24.
- Ratni, H., Ebeling, M., Baird, J., Bendels, S., Bylund, J., Chen, K. S., Denk, N., Feng, Z., Green, L., Guerard, M., Jablonski, P., Jacobsen, B., Khwaja, O., Kletzl, H., Ko, C.-P., Kustermann, S., Marquet, A., Metzger, F., Mueller, B., ... Mueller, L. (2018). Discovery of Risdiplam, a Selective Survival of Motor Neuron-2 (SMN2) Gene Splicing Modifier for the Treatment of Spinal Muscular Atrophy (SMA). *Journal of Medicinal Chemistry*, 61(15), 6501-6517. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00741>
- Reed, U. C., & Zanolati, E. (2018). Therapeutic advances in 5q-linked spinal muscular atrophy. *Arquivos De Neuro-Psiquiatria*, 76(4), 265-272. <https://doi.org/10.1590/0004-282x20180011>

- Ross, L. F., & Kwon, J. M. (2019). *Spinal Muscular Atrophy: Past , Present , and Future*. 20(8).
- Russman, B. S. (2007). Spinal muscular atrophy: Clinical classification and disease heterogeneity. *Journal of Child Neurology*, 22(8), 946-951.
<https://doi.org/10.1177/0883073807305673>
- Schene, I. F., Joore, I. P., Oka, R., Mokry, M., van Vugt, A. H. M., van Boxtel, R., van der Doef, H. P. J., van der Laan, L. J. W., Verstegen, M. M. A., van Hasselt, P. M., Nieuwenhuis, E. E. S., & Fuchs, S. A. (2020). Prime editing for functional repair in patient-derived disease models. *Nature Communications*, 11(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19136-7>
- Schorling, D. C., Pechmann, A., & Kirschner, J. (2020). Advances in Treatment of Spinal Muscular Atrophy—New Phenotypes, New Challenges, New Implications for Care. *Journal of Neuromuscular Diseases*, 7(1), 1-13. <https://doi.org/10.3233/JND-190424>
- Shorrock, H. K., Gillingwater, T. H., & Groen, E. J. N. (2018). Overview of Current Drugs and Molecules in Development for Spinal Muscular Atrophy Therapy. *Drugs*, 78(3), 293-305. <https://doi.org/10.1007/s40265-018-0868-8>
- Sibbald, B. (2001). Death but one unintended consequence of gene-therapy trial. *CMAJ: Canadian Medical Association Journal*, 164(11), 1612.
- Sibel Pinar Odabas, Enes Bal, Gamze Yelgen, Ayse Simay Metin, Ebrar Karakaya, Gamze Gulden, Berranur Sert, Tarik Teymur, Yasin Ay, Nulifer Neslihan Tiryaki, Hasret Araz, Ilayda Cavarar, & Cihan Tastan. (2022). Exon7 Targeted CRISPR-Prime Editing Approaches for SMN2 Gene Editing in Spinal Muscular Atrophy (SMA) Disease Can Increase In Vitro SMN Expression. *bioRxiv*, 2022.03.21.484406.
<https://doi.org/10.1101/2022.03.21.484406>
- Sproule, D. M., Al-Zaidy, S. A., Shell, R., Arnold, W. D., Rodino-Klapac, L. R., Prior, T. W., Lowes, L., Alfano, L. N., Berry, K., Church, K., Kissel, J. T., Nagendran, S., L'Italien, J., Du, M., Cardenas, J. A., Burghes, A. H. M., Foust, K. D., Meyer, K., Likhite, S., ... Mendell, J. R. (2017). AVXS-101 Phase 1 Gene Therapy Clinical Trial in SMA Type 1: Experience with pre-existing anti-AAV9 antibody in the SMA1 population (S13.001). *Neurology*, 88(16 Supplement). https://n.neurology.org/content/88/16_Supplement/S13.001
- Sugarman, E. A., Nagan, N., Zhu, H., Akmaev, V. R., Zhou, Z., Rohlf, E. M., Flynn, K., Hendrickson, B. C., Scholl, T., Sirko-Osadsa, D. A., & Allitto, B. A. (2012). Pan-ethnic carrier screening and prenatal diagnosis for spinal muscular atrophy: Clinical laboratory analysis of >72 400 specimens. *European Journal of Human Genetics*, 20(1), 27-32. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2011.134>

- Sumner, C. J. (2006). Therapeutics development for spinal muscular atrophy. *NeuroRx: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 3(2), 235-245. <https://doi.org/10.1016/j.nurx.2006.01.010>
- Tabebordbar, M., Zhu, K., Cheng, J. K. W., Chew, W. L., Widrick, J. J., Yan, W. X., Maesner, C., Wu, E. Y., Xiao, R., Ran, F. A., Cong, L., Zhang, F., Vandenberghe, L. H., Church, G. M., & Wagers, A. J. (2016). In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. *Science (New York, N.Y.)*, 351(6271), 407-411. <https://doi.org/10.1126/science.aad5177>
- Tao, R., Wang, Y., Hu, Y., Jiao, Y., Zhou, L., Jiang, L., Li, L., He, X., Li, M., Yu, Y., Chen, Q., & Yao, S. (2022). WT-PE: Prime editing with nuclease wild-type Cas9 enables versatile large-scale genome editing. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00936-w>
- Taştan, C., Kançağı, D. D., Turan, R. D., Yurtsever, B., Çakırsoy, D., Abanuz, S., Yılcı, M., Seyis, U., Özer, S., Mert, S., Kayhan, C. K., Tokat, F., Açık Elmas, M., Birdoğan, S., Arbak, S., Yalçın, K., Sezgin, A., Kızılkılıç, E., Hemşinlioğlu, C., ... Ovalı, E. (2020). Preclinical Assessment of Efficacy and Safety Analysis of CAR-T Cells (ISIKOK-19) Targeting CD19-Expressing B-Cells for the First Turkish Academic Clinical Trial with Relapsed/Refractory ALL and NHL Patients. *Turkish Journal of Hematology*, 37(4), 234-247. <https://doi.org/10.4274/tjh.galenos.2020.2020.0070>
- Tissue expression of SMN1—Summary—The Human Protein Atlas*. (t.y.). Geliş tarihi 12 Aralık 2023, gönderen <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000172062-SMN1/tissue>
- Valetdinova, K. R., Ovechkina, V. S., & Zakian, S. M. (2019). Methods for Correction of the Single-Nucleotide Substitution c.840C>T in Exon 7 of the SMN2 Gene. *Biochemistry (Moscow)*, 84(9), 1074-1084. <https://doi.org/10.1134/S0006297919090104>
- Veldhoen, E. S., Wijngaarde, C. A., Hulzebos, E. H. J., Wösten-van Asperen, R. M., Wadman, R. I., van Eijk, R. P. A., Asselman, F. L., Stam, M., Otto, L. A. M., Cuppen, I., Scheijmans, F. E. V., den Oudenrijn, L. P. V., Bartels, B., Gaytant, M. A., van der Ent, C. K., & van der Pol, W. L. (2022). Natural history of respiratory muscle strength in spinal muscular atrophy: A prospective national cohort study. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 17(1), 70. <https://doi.org/10.1186/s13023-022-02227-7>
- Verhaart, I. E. C., Robertson, A., Wilson, I. J., Aartsma-Rus, A., Cameron, S., Jones, C. C., Cook, S. F., & Lochmüller, H. (2017). Prevalence, incidence and carrier frequency of 5q-linked spinal muscular atrophy—A literature review. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 12(1), 124. <https://doi.org/10.1186/s13023-017-0671-8>

- Vezain, M., Saugier-veber, P., Goina, E., Touraine, R., Manel, V., Toutain, A., Fehrenbach, S., Frébourg, T., Pagani, F., Tosi, M., & Martins, A. (2010). A rare SMN2 variant in a previously unrecognized composite splicing regulatory element induces exon 7 inclusion and reduces the clinical severity of spinal muscular atrophy. *Human Mutation*, 31(1), E1110-1125. <https://doi.org/10.1002/humu.21173>
- von Gontard, A., Zerres, K., Backes, M., Laufersweiler-Plass, C., Wendland, C., Melchers, P., Lehmkuhl, G., & Rudnik-Schöneborn, S. (2002). Intelligence and cognitive function in children and adolescents with spinal muscular atrophy. *Neuromuscular Disorders*, 12(2), 130-136. [https://doi.org/10.1016/S0960-8966\(01\)00274-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8966(01)00274-7)
- Wadman, R. I., Pol, W. L. van der, Bosboom, W. M., Asselman, F.-L., Berg, L. H. van den, Iannaccone, S. T., & Vrancken, A. F. (2020). Drug treatment for spinal muscular atrophy types II and III. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 1. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006282.pub5>
- Wang, C.-C., Chang, J.-G., Jong, Y.-J., & Wu, S.-M. (2009). Universal multiplex PCR and CE for quantification of SMN1/SMN2 genes in spinal muscular atrophy. *Electrophoresis*, 30(7), 1102-1110. <https://doi.org/10.1002/elps.200800375>
- Wirth, B., Brichta, L., Schrank, B., Lochmüller, H., Blick, S., Baasner, A., & Heller, R. (2006). Mildly affected patients with spinal muscular atrophy are partially protected by an increased SMN2 copy number. *Human Genetics*, 119(4), 422-428. <https://doi.org/10.1007/s00439-006-0156-7>
- Wu, Y., Zeng, J., Roscoe, B. P., Liu, P., Yao, Q., Lazzarotto, C. R., Clement, K., Cole, M. A., Luk, K., Baricordi, C., Shen, A. H., Ren, C., Esrick, E. B., Manis, J. P., Dorfman, D. M., Williams, D. A., Biffi, A., Brugnara, C., Biasco, L., ... Bauer, D. E. (2019). Highly efficient therapeutic gene editing of human hematopoietic stem cells. *Nature Medicine*, 25(5), 776-783. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0401-y>
- Yang, L., Yang, B., & Chen, J. (2019). One Prime for All Editing. *Cell*, 179(7), 1448-1450. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.11.030>
- Yin, H., Song, C.-Q., Dorkin, J. R., Zhu, L. J., Li, Y., Wu, Q., Park, A., Yang, J., Suresh, S., Bizhanova, A., Gupta, A., Bolukbasi, M. F., Walsh, S., Bogorad, R. L., Gao, G., Weng, Z., Dong, Y., Koteliansky, V., Wolfe, S. A., ... Anderson, D. G. (2016). Therapeutic genome editing by combined viral and non-viral delivery of CRISPR system components in vivo. *Nature Biotechnology*, 34(3), 328-333. <https://doi.org/10.1038/nbt.3471>
- Zerres, K., & Davies, K. E. (1999). 59th ENMC International Workshop: Spinal Muscular Atrophies: recent progress and revised diagnostic criteria 17–19 April 1998,

Soestduinen, The Netherlands. *Neuromuscular Disorders*, 9(4), 272-278.

[https://doi.org/10.1016/S0960-8966\(99\)00016-4](https://doi.org/10.1016/S0960-8966(99)00016-4)

- Zheleznyakova, G. Y., Kiselev, A. V., Vakharlovsky, V. G., Rask-Andersen, M., Chavan, R., Egorova, A. A., Schiöth, H. B., & Baranov, V. S. (2011). Genetic and expression studies of SMN2 gene in Russian patients with spinal muscular atrophy type II and III. *BMC Medical Genetics*, 12, 96. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-12-96>
- Zhou, M., Hu, Z., Qiu, L., Zhou, T., Feng, M., Hu, Q., Zeng, B., Li, Z., Sun, Q., Wu, Y., Liu, X., Wu, L., & Liang, D. (2018). Seamless Genetic Conversion of SMN2 to SMN1 via CRISPR/Cpf1 and Single-Stranded Oligodeoxynucleotides in Spinal Muscular Atrophy Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Human Gene Therapy*, 29(11), 1252-1263. <https://doi.org/10.1089/hum.2017.255>



EKLER

Ek 1.

