

TEKNOFEST

HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ

BİYOTEKNOLOJİ İNOVASYON YARIŞMASI

PROJE DETAY RAPORU

TAKIM ADI

DROP GENE

PROJE ADI

Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre (uPKH) Kökenli MODY3

Diyabet Modeli Üzerinde Gen Düzenlenmesi ile Hücresel Tedavi

Modelinin Oluşturulması

BAŞVURU ID

76223

KATEGORİ

Biyoteknoloji İnovasyon Yarışması Fikir Kategorisi Üniversite ve

Üzeri Seviyesi

İçindekiler

1. Proje Özeti.....	2
2. Problem/Sorun.....	3
3. Çözüm.....	4
4.Yöntem.....	5
4.1. Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre (uPKH) Kökenli Diyabet Hastalık Modelinin Oluşturulması.....	5
4.2. CRISPR/Cas9 Vektör Sisteminin Oluşturulması.....	6
4.3. Plazmid DNA'ların Hücrelere Transfeksiyonu	6
4.4. HNF-1 α Gen Düzenlenmesinin Doğrulanması.....	7
4.5. Yapılan Ön Çalışma Verileri.....	7
5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü.....	8
6. Uygulanabilirlik.....	9
7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması.....	10
8. Proje Fikrinin Hedef Kitle (Kullanıcılar).....	13
9. Riskler.....	13
10. Proje Ekibi.....	14
11. Kaynaklar.....	14

1. Proje Özeti (Proje Tanımı)

Monojenik Diabetes Mellitus'un en yaygın formu baskın kalıtsal genç başlangıçlı otoimmün olmayan diyabetin bir alt türü olan genç tip 3 (MODY) diyabettir. Dünya nüfusunun 100'de 1'i ila 20'de 1'inin MODY3 diyabet olduğu tahmin edilmektedir.

MODY3 için uygulanan sülfonilüre gliklazid ve metformin kullanımı fayda etse de çoğu hasta insülin tedavisine ihtiyaç duymaktadır. CRISPR/Cas9 ve Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre (uPKH) teknolojilerinin birleştirilmesi ile oluşturulan kombinasyonun hastalık mekanizmalarını inceleme ve yeni hücre tedavileri geliştirme potansiyeli yüksektir.

Kişiye özel uPKH kökenli diyabet hastalık modeli geliştirmek amacıyla MODY3 tipi diyabet hastalarından periferik kan dokuları alınarak, yeniden programlanarak uPKH'ler elde edilecektir. uPKH'lerin kullanılmasının nedeni sonsuz hücre hatlarının oluşturulabilmesi ve allojenik transplantasyon ile immün yanıtın önlenilmesidir.

Diyabetin bir alt türü olan MODY3, kromozom 12'deki hepatosit nükleer faktör-1 α genindeki (HNF-1 α) heterozigot eşanlı olmayan p.S142F mutasyonu sebebiyle pankreastan insülin salgılanması bozukluğu olduğu için meydana gelir.

Glukoz metabolizması ve insülin sentezi ile ilişkileri sonucu en kritik genin HNF-1 α olması nedeniyle gen düzenlemesi yapılırken hedef olarak alındığında hastalığı tedavi etme potansiyeli en yüksek olan genidir.

CRISPR/Cas9 aracılı genom düzenlemesi, spesifik genotiplerin etkisini incelemede ve diyabetik sendromlara sebep olan genetik hastalık modellerinin geliştirilmesi noktasında güçlü olanaklar sağlamaktadır.

Literatür taraması sonucunda incelenen çalışmalar, MODY3 tipi diyabet üzerinde daha önce gen düzenlenmesi stratejisi ile bir tedavi uygulanmamıştır. Mevcut MODY3 tedavileri

hastalığa sebep olan HNF-1 α mutasyonunu ortadan kaldırmaktan çok, hastalığın sebep olduğu kan glikoz seviyesindeki bozuklukları düzeltmek üzere kurgulanmıştır. Burada uygulayacağımız çözüm diğer yaklaşımların aksine hem hastalığın patogenezi doğru bir hastalık modeli ile modellemek hem de hastalığa kesin bir tedavi oluşturmaktır.

CRISPR/Cas9 yönteminden faydalanarak HNF-1 α geninde bulunan p.S142F mutasyonu düzeltildikten sonra transplantasyon ile kuvvetle muhtemel bir tedavi geliştirilecektir.

Yöntem olarak sırasıyla takip edilecek 5 adımımız bulunmaktadır. Bunlar sırasıyla Danışmanımızın hali hazırda devam eden TÜBİTAK 1512 Bireysel Genç Girişim (BİGG) Teknogirişim Sermayesi Destek Programı 2200299 sayılı, "Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre (uPK) Kökenli Diyabet Hastalık Modeli" isimli projesinin çıktısı olan uPKH'lerden diyabet hastalık modelinin oluşturulması, CRISPR/Cas9 vektör sisteminin oluşturulması, plazmid DNA'ların hücrelere transfeksiyonu, HNF-1 α gen düzenlemesinin doğrulanması ve otolog transplantasyondur.

Projemiz için insanda HNF-1 α gen dizisinin çıkarılması, hedef bölgenin belirlenmesi, gRNA'nın tasarlanması ve kullanılacak primerlerin tasarlanması ön verileri toplanıp hazırlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Beta hücresi, CRISPR/Cas9, diyabet, HNF-1 α geni, MODY3, uPKH

2. Problem/Sorun

Kromozom 12 üzerindeki hepatosit nükleer faktör-1 α genindeki (HNF-1 α) heterozigot eşanlı olmayan p.S142F mutasyonu, pankreastan insülin salgılanması kusuru nedeniyle MODY3'ün olgunluk başlangıçlı diyabetine yol açar. MODY3 diyabet, monojenik diabetes mellitus'un en yaygın formudur ve kalıtsal olarak yavru döllere aktarılmaktadır. Mutasyona uğramış HNF-1 α , pankreas gelişimini değiştirebilen gen ekspresyonu kademesini değiştirebilir. HNF-1 α proteini üretimi yetersiz olduğunda insülin salgılanması, besin maddelerine salgı tepkisi, β hücrelerinin proliferasyonunun azalması ve Langerhans adacıklarının anormal yapısı ortaya çıkar. Bozulmuş β hücresindeki azalmış glikoz algılaması, muhtemelen azalmış aerobik glikoliz ve mitokondriyal metabolizmanın sonucudur. β hücrelerindeki düşük ATP konsantrasyonu, insülin salgılanmasını bozar ve HNF-1 α -MODY diyabete yol açar (Valkovicova vd., 2019).

MODY3 Dünya nüfusunun yaklaşık %1-5'ini (Kim, 2015) insüline bağımlı olmayan diyabetin ise %2-6'sını oluşturmaktadır (Hattersley vd., 2018).

HNF-1 α gen mutasyonları olan hastalar genellikle 10 ila 30 yaşları arasında diyabet geliştirir ve yaşla birlikte glisemide hızlı bir bozulma gösterir, ancak hastalığın doğal seyri, özellikle de diyabetle ilişkili kronik komplikasyonların gelişimi hakkında çok az şey bilinmektedir (Frayling vd., 2001).

Diyabetin mikrovasküler komplikasyonları, MODY3'te, geç başlangıçlı Tip 2 diyabet hastalarında olduğu kadar sık görülmektedir. HNF-1 α ayrıca böbrekte ifade edilir ve glikoz, fosfat ve amino asitlerin renal emilimindeki kusurların genellikle MODY3 hastalarında 33 pankreas β hücresi defekti ile ilişkili olduğunu gözlemlenmiştir (Yamagata, 2014). Ayrıca MODY3 hastalarında sıklıkla diyabetik retinopati ve nefropati meydana gelir ve bu da sık takibi zorunlu kılmaktadır (Timsit vd., 2005). Diyabet tedavisi ve komplikasyonları artan bir sağlık bakımı yüküdür.

MODY3 için uygulanan sülfonilüre glikliazid ve metformin kullanıma yanıt verse de kontrol yıllarca sürdürülebilmesine rağmen, çoğu hasta sonunda insülin tedavisine gereksinim duymaktadır. Ayrıca hastanın yaşamı boyunca bir diyet uygulaması ve düzenli egzersiz ile bunu desteklemesi gerekmektedir (Urakami, 2019).

Diyabet tedavisinde kullanılan ruhsatlı ilaçların terapötik etkilerinin yanında, karaciğer ve böbrek hasarı gibi yan etkilere de sahiptir. Gen düzenleme üzerine geliştirilmiş tedavi stratejileri, bu bakımdan ruhsatlı ilaçlara göre daha dar bir yan etki oluşturma potansiyeline ve daha yüksek bir terapötik etki potansiyeline sahiptir. Ayrıca CRISPR/Cas9 teknolojisinin uPKH teknolojisi ile birleştirilmesi ile elde edilen kombinasyonun hastalık mekanizmalarını inceleme ve yeni hücre tedavileri geliştirme potansiyeli yüksektir (Shi vd., 2017).

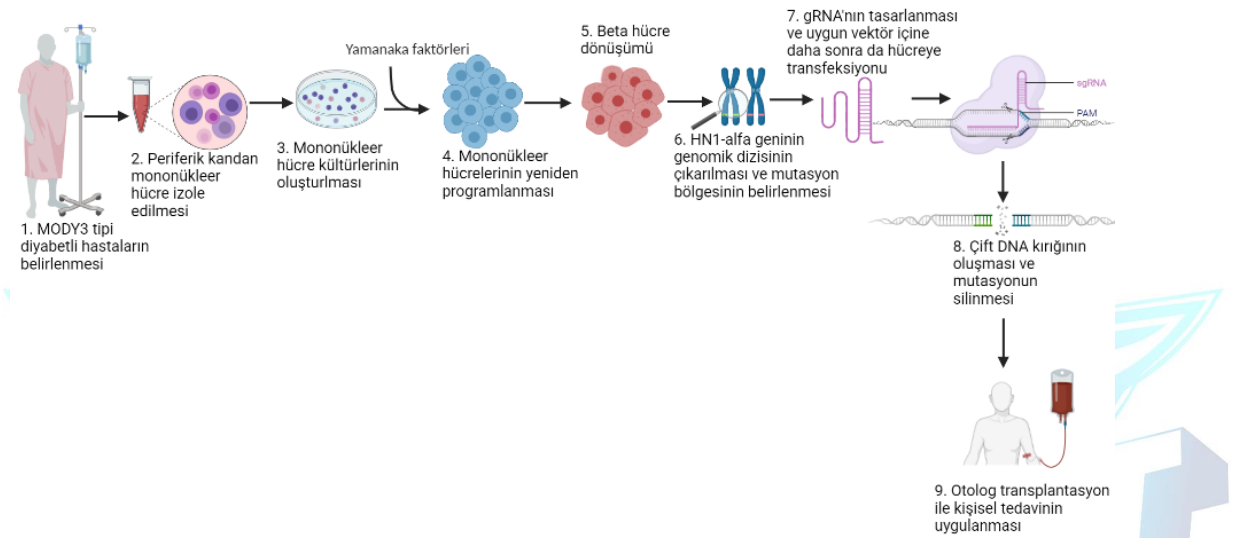
3. Çözüm

uPKH teknolojisi, *in vitro* hastalık modellerinin oluşturulmasını sağlar. uPKH'ler, üretildikleri hastaların genetik bilgilerini barındırdığından, hastadan türetilen uPKH'lerden farklılaşan hastalıktan etkilenen hücre tipleri, *in vitro* hastalık fenotiplerini çoğaltabilir. Bu yaklaşımlar, güvenilir hayvan modellerinin mevcut olmadığı durumlarda özellikle avantajlıdır (Kondo vd., 2017). Bu nedenle MODY tipi diyabet tanısı koyulmuş hastalardan uPKH alınacaktır. Alınan uPKH'lerin sonsuz çoğalabilme (Esken, 2018) ve allojenik transplantasyon ile immün cevabın önlenmesi (Szot vd., 2015) özellikleri ile kişiye özel diyabet hastalık modeli geliştirilecektir. Diyabetin patogenezinde hem genetik hem de çevresel faktörler rol oynadığından, bu faktörlerin yanı sıra terapötik hedeflere bakmak için uygun bir platforma sahip olmak, hastalığı anlamaya ve tedaviye katkıda bulunması açısından faydalı olacaktır (Amirruddin vd., 2020). uPKH, kan şekeri yükseldiği zaman insülin salgılanmasından görevli olan beta hücrelerine (Sipione vd., 2004) dönüştürülecektir. Diyabet patojenesine sebep olan etkenlerden biri olan fonksiyonel beta hücre kitlesinde azalma sorununa çözüm yolu olarak beta (β) hücrelerinin geri kazandırılması noktasında uPKH'lerin doğrudan farklılaşması ile beta hücre eldesinin büyük bir avantajı, alta yatan genetik anormalliklerin daha eksiksiz bir şekilde anlaşılmasını ve dolayısıyla kişiselleştirilmiş terapötikler ve otolog transplantasyon için daha yönlendirilmiş hedefler sağlamasıdır. Otolog kök hücre tedavileri, diyabetli hastalar için gelecekteki klinik uygulamalara kesinlikle dönüştürecek ve insanlığa paha biçilmez bir hediye olacaktır (Dadheech ve James Shapiro, 2019) ve şüphesiz, fonksiyonel insan pankreas β hücrelerinin *in vitro* türetilmesi, diyabet ilaç keşifleri için hastalık modelleme çalışmalarında ve kesinlikle β -hücre transplantasyon tedavisi için büyük bir potansiyele sahiptir (Loo vd., 2018). β hücreleri ile hastalık modeli oluşturulduktan sonra CRISPR/Cas9 yöntemi ile β hücrelerini hedef alan genlerden biri olan HNF-1 α geni üzerinde bulunan p.S142F mutasyonu üzerinde düzeltme yapılacaktır. CRISPR/Cas9 yöntemi yeni bir teknoloji olmasına rağmen duyarlılığı, doğruluğu, güvenilirliği ve verimliliği sayesinde klinik alanda kullanımı ve hakkındaki çalışma sayısı gün geçtikçe artmaktadır (Wang vd., 2019). CRISPR/Cas9 yöntemi sayesinde HNF-1 α geni üzerinde bulunan p.S142F mutasyonu düzeltildikten sonra MODY3 tipi diyabet hastalarına transplantasyonu ile potansiyel bir tedavi geliştirilecektir.

Özellikle insülin geninde yer alan mutasyonlara bağlı olarak insülin yetmezliği gözlenen MODY3'te her ne kadar semptomatik olarak hafif bir hastalık seyri gözlenirse de bu genetik bozukluğa sahip kişilerde ilerleyen yıllarda insülin kullanımına ihtiyaç duymaktadır. Mevcut

tedavi yöntemleriyle tedavi edilmeleri mümkün olmayan bu tür tek gen hastalıkları gen tedavi metotlarıyla etkin ve güvenilir bir şekilde tedavi edilebilir. Burada CRISPR/Cas9 yöntemi ile gen düzenlenmesi MODY3 tedavisi için kalıcı bir çözüm yolu potansiyeline sahiptir. Mevcut MODY3 tedavileri hastalığa sebep olan HNF-1 α mutasyonunu ortadan kaldırmaktan çok, hastalığın sebep olduğu kan glikoz seviyesindeki bozuklukları düzeltmek üzere kurgulanmıştır. Burada uygulayacağımız çözüm diğer yaklaşımların aksine hem hastalığın patogenezi doğru bir hastalık modeli ile modellemek hem de hastalığa kesin bir tedavi oluşturmaktır. Uygulanacak çözümün basamakları Şekil 1’de özetlenmiştir.

Şekil 1. Uyarılmış pluripotent kök hücre (uPKH) kökenli MODY3 diyabet modeli üzerinde gen düzenlenmesi ile hücresel tedavi modelinin oluşturulması



4. Yöntem

İP1. Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre (uPKH) Kökenli Diyabet Hastalık Modelinin Oluşturulması

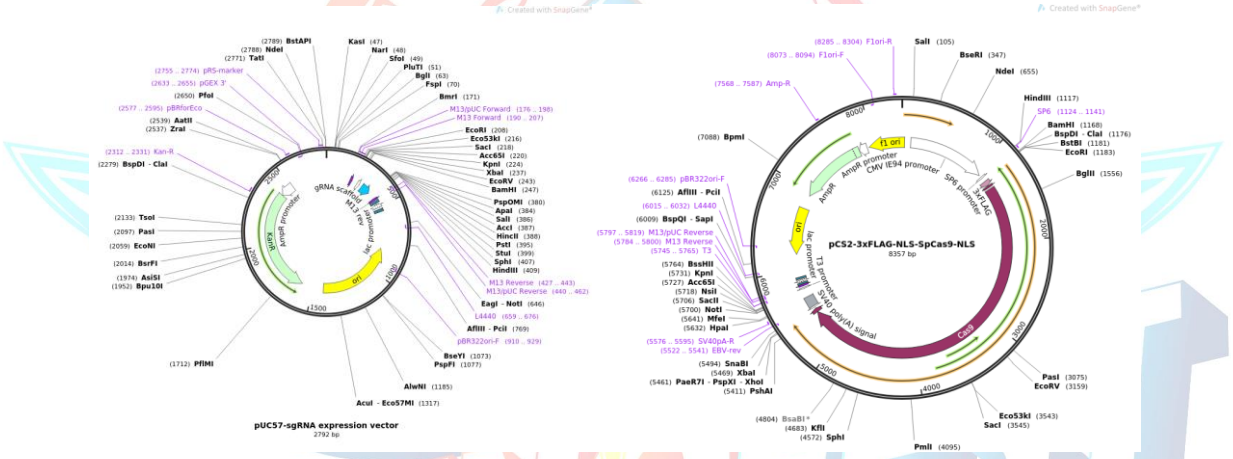
Ön hazırlık aşamasında, ürünün geliştirilmesi için gerekli etik kurul izni için başvurular gerçekleştirilecek, malzeme ve ekipmanlar temin edilecektir. Ürün geliştirme iş paketinin ilk aşamasında sağlıklı ve diyabetli olan iki ayrı grup insan donörlerden alınan periferik kandan mononükleer hücreler elde edilecek, hastalardan alınan kan bileşenleri farklılaşma medyalarında kültür edilecek, dört retroviral transkripsiyon faktörüyle (Oct4, Sox2, Klf4 ve Myc) hücrelere, embriyonik kök hücre benzeri pluripotent özellik kazandırılacaktır (Jang et vd., 2012; Wei vd., 2019). Mononükleer hücreler, hTERT ve SV40 LT ile veya bunlar olmadan transkripsiyon faktörlerini ifade eden retroviral vektörlerle yeniden programlanacaktır. uPKH'leri daha sonra kullanım için toplanacak ve çoğaltılacaktır (Yakubov vd., 2010). Proliferasyon ve diferansiyasyon kapasitelerinin tespiti için invert mikroskop görüntüleri alınacak ve qRT-PCR tekniğiyle gen ekspresyon düzeyleri ölçülecektir (Christoforou vd., 2013). *In vitro* diferansiyasyonla, sağlıklı pankreas hücreleri oluşturulacaktır (Gunaseeli vd., 2010). Diyabet modeli için, düşük glukozlu medya kullanılarak, hipertrofi markırları NPPB ve NPPA'nın ve insülin bağımlı glukoz taşıyıcısı GLUT1 ve GLUT4'ün gen ekspresyon düzeylerine bakılarak hücrelerdeki glukoz geri alım kapasitesi değerlendirilecektir (Granéli vd., 2019). İskemik ortamın taklidi için, %2 oksijen, 10 mg/ml glukoz ve %10 fetal sığır serumu (FBS) kullanıldıktan sonra, propidyum iyodürle boyama yapılarak membran hasarı ve azalan hücre canlılığı oranı tespit edilecektir. IL-8'in mRNA ekspresyonundaki

artışı ne kadar etkilediğine bakılarak ise iskemik koşullamanın *in vivo* koşullara uygunluğu incelenecektir. İki model birbiriyle birleştirilerek, bu aşamada kalite kontrol çalışmalarıyla geliştirilen yöntemle ait doğrulama çalışmaları yapılarakuPKH kökenli diyabet hastalık modeli elde edilecektir

İP2. CRISPR/Cas9 Vektör Sisteminin Oluşturulması

Veri tabanlarından insana ait HNF-1 α genom dizisine ulaşarak veri tabanı verileri ve *in silico* biyoinformatik araçlar yardımıyla gen kaseti için mutasyon bölgesi belirlenecektir (Medical School, t.y.). HNF-1 α geninin 5' ucu için 20 nt'lik sgRNA ve buna uygun spesifik primerler tasarlanacaktır. Primer tasarımında "off-target" bölgeler minimize edilecektir. Gen kaseti uPKH hücreleri için kullanılan Cas9 gen dizisi içeren vektöre klonlanmak üzere tasarlanacaktır (Şekil 2). Vektör AddGene firmasından temin edilecektir.

Şekil 2. T7 promotöründen sgRNA ekspresyon vektörü (Shen vd., 2014) ve CRISPR/Cas9 vektörü (Guo et vd., 2014)



HNF-1 α gen bölgesine özgül sgRNA polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılacaktır. Vektör ve PZR ürünü BsaI enzimi ile kesilerek T4 ligaz ile kullanıcı protokolüne uygun olarak birleştirilecektir. Vektör CaCl₂ ile kompetan hale getirilmiş *E. coli* Dh5 α suşuna elektroporasyon yolu ile transforme edilecektir. Transformasyon sonrası hücreler ampisilin içeren katı besiyerine (LB-agar) ekilerek gen kaseti içeren vektör aktarılan koloniler seçilecektir. Özgül primerler ile insert için koloni taraması yapılacaktır. İnsert doğrulanan kolonilerden MiniPrep Plazmid kiti (Thermo Fisher Scientific) ile plazmid izolasyonu gerçekleştirilecektir. Plazmidlerdeki insert yönü doğrulaması Sanger dizileme ile yapılacaktır.

İP3. Plazmid DNA'ların Hücrelere Transfeksiyonu

İP2'de elde edilen plazmidler uPKH hücrelerine elektroporasyon yolu ile transfekte edilecektir. Elektroporasyondan iki gün önce, ortama pen/strep eklenerek insan mezenkimal kök hücre (MKH) kültür tabakası oluşturulacaktır. Elektroporasyondan bir gün önce, besiyeri tazeleneyecektir. Elektroporasyon gününde, kök hücre kültürü 60 mm kap başına taze insülin benzeri büyüme faktörü (4 ng/ml) ile değiştirilecektir. Her nükleofeksiyon reaksiyonu için DNA karışımı hazırlanacaktır. Hazırlanan DNA karışımı gece boyunca 25°C'de inkübe edilecektir ve fenol ekstraksiyonu ile saflaştırılacaktır. Spektrofotometre'de 260 nm'de DNA konsantrasyonu kontrol edilecektir (Liu vd., 2011). Transfeksiyon için hücreler (5×10^4),

deney grubu veya tek başına pT-neo için pT-neo + pTrans (her biri 0.5 µg) içeren R-tampon çözeltisi (100 uL; Invitrogen, Carlsbad, CA, ABD) içinde elektroporasyona tabi tutulacaktır. Hücreler sayılacaktır ve DNA içeren 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne 1×10^7 hücre eklenecek ve karışım bir elektroporasyon küvetine (0,4 cm boşluklu) aktarılacaktır. Biorad Xcell sistemi kullanılarak hücrelerin elektroporasyonu gerçekleştirilecektir (Inada vd., 2015).

İP4. HNF-1α Gen Düzenlenmesinin Doğrulanması

HNF-1α gen bölgesinin düzenlenmesinin doğrulanması için Sanger dizileme yöntemi kullanılacaktır. Transgenik hücrelerde gen bölgesinin düzenlenmesi doğrulanacaktır. Genomik En az 1 saat -80°C 'de dondurulmuş hücreler Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM EDTA, %0,1 SDS ve 5 µg RNaseA içerisinde homojenize edilecek ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilecektir. Daha sonra Proteinaz K (20 mg/mL) ve %10 SDS eklenecek ve homojenat 65°C'de 1 saat, ardından 95 °C'de 5 dakika inkübe edilecektir. Amonyum asetat ilave edildikten sonra tüpler, buz üzerinde 10 dakika inkübe edilecek ve 10 dakikalık santrifüj sonrası süpernatant toplanarak bir kez fenol: kloroform: izoamil alkol (25: 24: 1) ve bir kez kloroform ile ekstrakte edilecektir. DNA, 2X soğuk etanol ilavesiyle çökelti haline getirilecek ve pelet bir kez %70 etanol ile durulanacaktır. Pelet 10 mM Tris-HCl, pH 8,5 içinde yeniden süspanse edilecektir. Genomik DNA kalıp olarak kullanılarak özgül primerler ile sgRNA ile hedeflenmiş HNF-1α gen bölgesi PZR ile çoğaltılacaktır. Dizileme için hizmet alımı yapılacaktır.

Yapılan Ön Çalışma Verileri

1) İnsanda HNF-1α gen dizisinin çıkarılması

NCBI veri tabanı kullanılarak insanda HNF-1α geninin genomik dizisi çıkarılmıştır.

2) Hedef Bölgenin Belirlenmesi

20 nükleotid + 3 nükleotidlik PAM (NGG) dizisi içeren hedef bölge CHOPCHOP veri tabanı kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 3).

Şekil 3. CHOPCHOP veri tabanı kullanılarak oluşturulan hedef bölge önerileri ve özellikleri

Rank	Target sequence	Genomic location	Strand	GC content (%)	Self-complementarity	MM0	MM1	MM2	MM3	Efficiency
1	AGACACGCACCTCCGTGACGAGG	chr12:120994221	-	65	4	0	0	0	0	69.13
2	GCGGACGTACCAGGTGTACAGGG	chr12:120988988	-	60	1	0	0	0	0	65.05
3	GTACGTCCGCAAGCAGCGAGAGG	chr12:120989001	+	65	0	0	0	0	0	61.88
4	AAGGGACCGCCGCTGTGAGGG	chr12:120996306	-	65	0	0	0	0	0	50.87
5	TGCGGACGTACCAGGTGTACAGG	chr12:120988989	-	60	1	0	0	0	0	47.21
6	ACGTACAGCGGGCCCCCAGG	chr12:120994303	+	80	0	0	0	0	0	43.43
7	GGCTTCTCTTTGCGCCGTTGG	chr12:120994256	-	60	0	0	0	0	0	36.09
8	GAGTGCAATAGGTACACGGCGG	chr12:120993696	+	50	0	0	0	0	1	75.96
9	CAGCTTACCGATGACAGGTTGG	chr12:120996728	-	60	0	0	0	0	1	73.68
10	GTCCCGTCAACAGCATGGG	chr12:120997500	+	55	0	0	0	0	1	63.44

Hedef Bölge: GTACGTCCGCAAGCAGCGAGAGG / Chr12:120989001

3) gRNA'nın tasarlanması

gRNA bir DNA dupleksi oluşturulacak şekilde hedef bölge forward primer, hedef bölgenin tam komplementeri reverse primer olacak şekilde tasarlanmıştır.

gRNA forward primer: GTACGTCCGCAAGCAGCGAG

gRNA reverse primer: CTCGCTGCTTGCGGACGTAC

4) Kullanılacak primerlerin tasarlanması

Deney protokolünde çeşitli aşamalarda kullanılacak primerler CHOPCHOP veri tabanı kullanılarak tasarlanmıştır (Şekil 4).

Şekil 4. CHOPCHOP veri tabanı kullanılarak oluşturulan primer önerileri ve özellikleri

Pair	Left primer coordinates	Left primer	Left primer Tm	Left primer off-targets	Right primer coordinates	Right primer	Right primer Tm	Right primer off-targets	Pair off-targets	Product size
1	chr12:120988853-120988875	CGAAGATGGTCAAGTCCTACCT	59.6	0	chr12:120989072-120989094	ATGAGTTAGGGGAGAGTCCTGG	60.9	0	0	241
2	chr12:120988855-120988877	AAGATGGTCAAGTCCTACCTGC	59.6	0	chr12:120989072-120989094	ATGAGTTAGGGGAGAGTCCTGG	60.9	0	0	239
3	chr12:120988853-120988875	CGAAGATGGTCAAGTCCTACCT	59.6	0	chr12:120989078-120989100	CCACCTATGAGTTAGGGGAGAG	59.1	0	0	247
4	chr12:120988855-120988877	AAGATGGTCAAGTCCTACCTGC	59.6	0	chr12:120989078-120989100	CCACCTATGAGTTAGGGGAGAG	59.1	0	0	245
5	chr12:120988855-120988877	AAGATGGTCAAGTCCTACCTGC	59.6	0	chr12:120989118-120989140	CTACCTGTCTGTAAATGGGGA	59.0	0	0	285

Off-targets		
Location	Number of mismatches	Sequence (including mismatches)
There are no off-targets.		

Sağ primer: CGAAGATGGTCAAGTCCTACCT

Sol primer: ATGAGTTAGGGGAGAGTCCTGG

5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü

MODY3'te görülen HNF-1 α mutasyonu, pankreas β hücre fonksiyonu üzerinde etkilerini göstermektedir (Valkovicova vd., 2019). Diyabet sırasında β hücre kitlesinde azalma ve fonksiyonunda bozulma sonucu β hücrelerinin geri kazandırılması noktasında üç farklı strateji üzerinde durulmuştur: i) var olan β hücrelerinin proliferasyonunun indüklenmesi, ii) farklı tür hücrelerin yeniden programlanarak β hücre haline getirilmesi ve iii) pluripotent hücrelerin doğrudan farklılaşması ile β hücre eldesi. Bu yollarda beta hücre özelliklerine sahip en yakın hücre profili, uPKH'lerin doğrudan farklılaştırılması ile elde edilmiştir. Bu amaç doğrultusunda etik sebepler nedeniyle kullanımları kısıtlanan insan embriyonik kök hücreler yerine uPKH'ler kullanılmıştır. CRISPR/Cas9 sistemi sahip olduğu avantajlar ve kök hücrelerde yüksek etkinliğe sahip olması nedeniyle sıklıkla bu sorun için kullanılmaktadır (Bar-Nur vd., 2011; Raikwar vd., 2015; Zhang et vd., 2009). CRISPR/Cas9 teknolojisi aracılı genom düzenlemesi, spesifik genotiplerin etkisini incelemek ve diyabetik sendromlara sebebiyet veren genetik değişimlere sahip hastalık modellerin geliştirilmesi noktasında güçlü olanaklar sağlamaktadır. Lin ve arkadaşları tip 1 diyabet gelişiminde rol aldığı öngörülen PTPN22 geni R619W mutasyonunu CRISPR/Cas9 aracılığıyla obez olmayan diyabetik fareler (NOD) üzerinde oluşturmuşlardır (Lin vd., 2016). Bao ve arkadaşları diyabet ve obezite ile yakından ilişkili leptin reseptörü genini farelerde CRISPR/Cas9 sistemi ile susturarak, halihazırda yer alan leptin reseptör eksikliğine sahip fare ve Zucker sıçan hayvan modellerinde diyabet ve obeziteyi taklit etmede yetersiz kalan sürekli hiperglisemi ve glukoz tolerans bozukluğunun geç gelişimi gibi bir dizi sorunun da üstesinden gelmeyi başarmışlardır (Bao vd., 2015). Kemirgen modelleri her ne kadar kullanışlı olsa da insan metabolizmasına daha yakın hayvan modellerinin kullanımı hastalıkların insandaki gelişimini ve patogenezini

anlamada daha etkin bir yoldur. Bu noktada da CRISPR/Cas9 sisteminin kullanımı yaygınlaşmaktadır. Cho ve arkadaşları bu amaç doğrultusunda CRISPR/Cas9 sistemi ile domuz insülin geninde mutasyon oluşturarak insülin yetmezliğine sahip, hiperglisemi gösteren ilaç geliştirme ve adacık transplantasyonu çalışmaları için kullanımları kemirgenlere göre daha uygun olabilecek yeni bir hayvan modeli oluşturmuşlardır (Cho vd., 2018). Buna ek olarak özellikle tip 1 diyabetin tedavisine yönelik olarak da CRISPR/Cas9 kullanımı avantajlar sağlayabilir ve monogenik diyabet hastalık modellerinin geliştirilmesinde de etkin bir yol olabilir.

MODY3 tipi diyabet MODY tipi diyabet çeşitleri arasında en sık görülen tiptir ve literatür taraması yapıldığında ve çalışmalar incelendiğinde MODY3 tipi diyabet üzerinde daha önce gen düzenlenmesi stratejisi ile bir tedavi uygulanmamıştır. Glukoz metabolizması ve insülin sentezi ile doğrudan ilişkileri sonucu MODY3 riskini doğrudan arttıran en kritik genin HNF-1 α olması nedeniyle gen düzenleme ile tedavi yaklaşımlarında hedef olarak alındığında hastalığı tedavi etme potansiyeli en yüksek olan genidir. Bu nedenle yukarıda anlatılan çalışmalar referans alınarak HNF-1 α geni üzerindeki heterozigot eş anlamlı olmayan p.S142F mutasyonu düzenlenecektir. Daha önce hiç çalışılmaması sebebiyle hem literatüre katkı sağlanacak hem de MODY3 tipi diyabet için bir tedavi potansiyeli oluşturacaktır. Ayrıca projemizde uPKH ile oluşturulmuş hastalık modeli kullanılarak CRISPR/Cas9 yöntemi ile HNF-1 α genini düzenlemeye yönelik yapacağımız çalışmada CRISPR/Cas9 teknolojisinin uPKH teknolojisi ile birleştirilmesinden elde edilen kombinasyonun hastalık mekanizmalarını inceleme ve yeni hücre tedavileri geliştirme açısından da literatürde önemli bir yere sahip olacaktır.

Proje çıktısı, MODY3 hastalığına sebep olan HNF-1 α geninin düzenlenmesine ışık tutarak uPKH'lerden çıkışla, gen düzenlenmesi yoluyla elde edilecek, MODY3'e karşı geliştirilmesi hedeflenen kök hücre kökenli transplantasyon ürünlerinin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır.

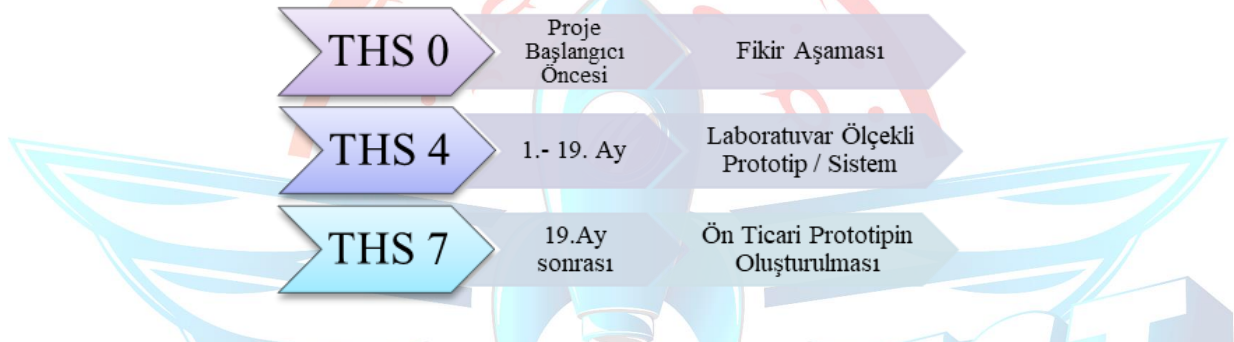
6. Uygulanabilirlik

Proje fikrinin hayata geçirilmesi diyabet hastalarının bulunduğu klinikler, hastaneler ve diyabet hastalık modeli çalışan ilgili kuruluşlar ile yürütülecektir. Diyabet hastalarından hasta onamları alınacaktır ve numuneler toplanarak, ilgili laboratuvarlarda çalışmalarımız için kullanılacaktır. Projemiz etik kurul izinleri doğrultusunda yürütülecek olup, ilgili kişiler ile çalışılacaktır. Projemizin iki çıktısı bulunmaktadır: Birinci dönem çalışmalarımız sonucunda diyabet hastalık modeli geliştirilecektir ve hücre replasman terapisi için sonsuz hücre hatları oluşturulabilecektir ve hastalık modelimiz ticari ürüne dönüştürülmek üzere çalışılacaktır. Böylece hedefin daha doğru seçilmesi ile hayvan deneylerindeki gereksiz tekrarların önlenmesi sağlanarak, mevcut tedavi yöntemlerinin uygulama süresi kısaltılmasıyla hem kişiye hem de devlete olan maliyet azalacaktır. Projenin otomasyon sistemine uygun ve değiştirilebilir olmasıyla da diyabet hastalığı ile başladığımız modelleme ilerleyen dönemlerde farklı hastalık modellerinin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır. İkinci dönem çalışmalarımız sonucunda ise diyabet hastalık modeli üzerinde CRISPR/Cas9 ile gen düzenlenmesi yapıp sonrasında uygun görülürse otolog transplantasyon gerçekleştirilecektir. Böylece MODY3 alt tipi diyabet hastalarına kişisel bir tedavi sunulacaktır. Fikir projesi olarak başladığımız çalışmanın çeşitli destekler ile uygulamaya geçilmesi ve projenin

istenilen beklentileri karşılaması sonucu patenti alınacak olup, ticarileştirmek adına faaliyetlerde bulunulacaktır. Proje kapsamında malzeme ve veriler için ön çalışmalar yapılmış olup, fikrin gerçekleşmesi ve proje haline getirilmesi olanağının güçlü olduğu gözlemlenmiştir.

Grafik 1’de görüldüğü gibi proje süreci 3 döneme ayrılmıştır ve toplamda 19 ay sürmesi planlanmaktadır. 0. Teknoloji Hazırlık Seviyesinden (THS) yola çıkılıp, ilk 19 ay boyunca birinci ve ikinci dönem çalışmalarımız ile 4. THS’ye çıkılması planlanmaktadır. Projemizin laboratuvar çalışmaları sonrası 7. THS’ye çıkılması planlanmaktadır. Proje önerimiz, şu an teknoloji olgunluk seviyesi olarak 3. seviyeyi tamamlamış bulunmaktadır. Laboratuvar ortamına geçilerek deneylere başlanması durumunda teknoloji olgunluk seviyesi 4’e çıkacaktır. Seviye 4 ve sonrası için deney aşamaları gerçekleştirilecektir.

Grafik 1. Proje sürecinde ulaşılabilecek olan Teknoloji Hazırlık Seviyeleri (THS), süreleri ve çıktıları



7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması

Tablo 1. İş planı çıktılarının ulusal ve uluslararası rekabet potansiyeli, ürün/hizmet bazında rakiplerin güçlü ve zayıf yönleri

Özellik/Firma	Applied StemCell Inc.	BlueRock Therapeutics	Lonza Group Ltd	Petri kap modellemeleri	Proje çıktısı
Ülke Menşei	ABD	ABD	İsviçre	Küresel	Türkiye
Ürün Formatı	uPK	+gene platformu	uPK	uPK	uPK
Kalite	◆◆◆◆	◆◆◆◆◆	◆◆◆◆	◆	◆◆◆◆
Maliyet	◆◆◆◆	◆◆◆◆◆	◆◆◆◆◆	◆	◆◆
Donör tipi	Kordon kanı, biyopsi vb.	Biyopsi	Biyopsi	Kordon kanı, biyopsi vb.	Biyopsi
Hastalık türü	Nörolojik hastalıklar	Nörolojik hastalıklar, kardiyojoloji ve immünoloji	Birçok hastalık türü	-	Diyabet
Kullanım amacı	Hastalık modellemesi	Hastalık modellemesi, etkinlik taraması vb.	Hastalık modellemesi, etkinlik taraması vb.	Kök hücre ve türevlerinin üretimi	Hastalık modellemesi

Kullanılacak Malzemeler

İP1. uPKH Kökenli Diyabet Hastalık Modeli

Kolejenaz tip I, Dizspaz çözeltisi, FBS, Askorbik asit-2-fosfat, Jelatin kaplı tabakalar, Qiagen Plasmid Midi kiti, R-tamponu, Neon Transfeksiyon Sistemi, 24 kuyucuklu plakalar, Hemositometre bazlı bir tripan mavi boya, PBS içinde %4 paraformaldehit, Giemsa Boyama Kiti, TrypLE Reaktif, PB transpozon vektörü, Transfeksiyon ajanı, Neon Transfeksiyon tamponu E2 ve tampon R, DMEM / % 20 FBS, Ampisilin/kanamisin, PFA, Fenol, Kloroform, İzomil alkol, NaCl, Etanol, İnsülin benzeri büyüme faktörü, OptiPro SFM, Jelatin kaplı 24 kuyucuklu plaka, Ficoll-Hypaque (1.077 g/ml), Accutase (Tripsin), SCF, IL-3, EPO, IGF-1, Dexamethasone, M 1-thioglycerol (MTG), Anti-BrdU immünofloresan boyama kiti, Bromodesoksi üridin (BrdU), DAPI, MTT test kiti, Asitlendirilmiş (HCl) β -izopropanol, Spektrofotometre, Tripsin, 96 kuyucuklu plaka, LG-DMEM, 6 oyuklu plaka, Rekombinant galektin-3 protein, DMSO, Mikroplaka okuyucu, Trisodyum sitrat, Triton-X-100, PI, Rnase, Glukoz Krb, Glikoz, KCl, TrypLE Express, Vi-Cell, Polibren, MEF kaplı kap, MEF kültür ortamı, MSCM, Konik tüp, HESCM besi ortamı, Bunsen brülörü, Pastör pipeti, P1000 pipetörü, % 1 gerekli olmayan iMEF kaplı kuyucuklarda büyüyen fare iPSC'leri, Yeniden programlanmış insan hücreleri amino asitler, 2-merkaptetanol, KnockOut Serum Replasmanı, KnockOut DMEM, Penisilin, Streptomisin, Esansiyel olmayan amino asitler, İnsan EB'leri, Jelatin kaplı 48 oyuklu plakalar, Matrigel kaplı tabaklar, Activin A, CHIR99021, Rock Inhibitor, KGF, S2 ortamı, LDN193189, Sant1, Retinoik asit, PBDU, S3 ortamında, Betacellulin, XXI, Alk5i-II, T3, BE5 ortamı, STEMdiff Kardiyomiyosit Farklılaştırma Kiti, Perm/Wash Buffer, Primer Antikorlar, Sekonder Antikorlar, Konjuge Antikorlar, RNasin, RecoverAll Toplam Nükleik Asit İzolasyon Kiti, Illumina TotalPrep RNA Amplifikasyon Kiti, Tüm Genom İfade Direkt Hibridizasyon kiti, İnsan HT-12 İfade Boncuk Yongaları, EMA programlama paketleri, R istatistiksel hesaplama platformu, Sodyum kokodilat, Glutaraldehit, % 0.03 pikrik asit, OsO₄, KFeCN₆, Uranil asetat, Propilenoksit, TAAB Epon, Kurşun sitrat, BCIP / NBT sıvı substrat sistemi, Metanol, HEPEStampon, Salin, GFP, DNase I, M-MuLV Ters Transkriptaz, Oligo (dT) primerleri, Taq polimeraz, Agaroz jel, StepOne Plus döngüleyici, SYBR® Green JumpStart™, Taq ReadyMix™, DNA polimeraz, Parafine, Hematoksilin ve eosin, 1 ug/mL Hoechst 33342, CDy1.

İP2. CRISPR/CAS9 Sistemi ile Gen Düzenlemesinin Yapılması

pUC57-sgRNA, pCS2-3xFLAG-NLS-SpCas9-NLS, gRNA primerleri, sağ ve sol primerler, Distile su, Taq Buffer, MgCl₂, dNTP, Primerler, Template, Taq polimeraz, 10X NEBuffer 3.1, BspI enzimi, 10X T4 DNA Ligaz buffer, T4 DNA Ligaz, Nükleaz içermeyen su, E. coli Dh5 α , Sıvı besiyeri (LB), CaCl₂, Gliserol, SOC besiyeri, Tryptone (%2 w/v), Yeast extract (%0,5 w/v), 1M NaCl (0,01M NaCl), KCl, Distile su, MgCl₂, MgSO₄.7H₂O, Glikoz (0,2 M), Transformant E. coli, Antibiyotik (Ampisilin 100 μ g/mL), Tris, EDTA, Glukoz, NaOH, SDS, KOAc, TrypLE Reaktif, PB transpozon vektörü, Transfeksiyon ajanı, Neon Transfeksiyon tamponu E2 ve tampon R, DMEM /%20 FBS, Pen/strep, Ampisilin/kanamisin, PBS, PFA, Giemsa boyama kiti, Fenol, Kloroform, İzomil, alkol, NaCl, Etanol, İnsülin benzeri büyüme faktörü, Accutase çözeltisi, PBS, OptiPro SFM Jelatin kaplı 24 kuyucuklu plaka, Tris-HCl, SDS, RNaseA, Proteinaz K, Amonyum asetat, Fenol-kloroform, İzomil alkol.

Tablo 4. Dönemsel Harcama Planı

	Dönem 1 (1-14. ay)	Dönem 2 (15-19. ay)	Toplam (TL)
Maliyet Kalemi			
Alet/Teçhizat	40.000	20.000	70.000
Hizmet Alımı	5.000	5.000	10.000
Malzeme	60.000	70.000	130.000
Toplam Maliyet	105.000	95.000	200.000

8. Proje Fikrinin Hedef Kitle (Kullanıcılar)

İnsan sağlığını tehdit eden kronik bir hastalık olması yanında, diyabetin hem bireye hem de ülkelerin sağlık sistemlerine maliyeti oldukça yüksektir. Tüm dünyada diyabet ve ilişkili hastalıklar için maliyet 2019 yılında 760 milyar dolar olarak belirlenmiştir. Ülkemizde SGK 2012 yılı rakamlarına göre diyabetin toplam tedavi maliyetleri 5.865,98 milyon TL ve ilaç maliyetleri 4.126,90 milyon TL olmak üzere toplamda yaklaşık 10 milyon TL olmuştur. Toplam sağlık harcamaları içindeki diyabet maliyetinin payı ise %22,6 olarak bulunmuştur. Dolayısıyla, geliştirdiğimiz bu ürün sayesinde ülkemiz ekonomisine olumlu yönde bir katkı sağlayacağımızı tahmin etmekteyiz.

Bu kapsamda tıbbi cihaz sektörü içindeki uPKH segmenti ve CRISPR/CaS9 teknolojisi segmenti projenin hedef pazarıdır. Diyabet üzerine yeni tedavi yaklaşımları geliştirmeyi planlayan üniversiteler, hastaneler, araştırma merkezleri ve şirketler ürünümüzün hedef kitlesini oluşturmaktadırlar.

Diyabet tedavisine yönelik olarak ülkemizde bugün 203 klinik araştırma çalışması yürütülmektedir. Yapılan bu çalışmalar, diyabetin ülkemizde klinikte en çok araştırılan ilk 10 hastalık arasında yer almasına yol açmıştır.

Hedef kitlemize; yüz yüze görüşme, konferanslar ve fuarlar aracılığıyla ulaşmayı hedefliyoruz. Ürünümüzün seri üretim ve satış için gerekli izinleri Sağlık Bakanlığından alınacaktır.

9. Riskler

No	En Büyük Riskler	Risk Yönetimi (B Planı)
1	uPKH kökenli diyabet hastalık modelinin oluşturulamaması	Hastalık modeli oluşturulmuş hücre hattının satın alınması
2	qRT-PCR ile ölçülen gen ekspresyon düzeylerinin yetersiz çıkması	Transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını arttırmak için inhibitörler ekleyerek İP1'in tekrarlanması
3	CRISPR/Cas9 vektör sisteminin oluşturulamaması	Tasarı aşamasında en az iki sgRNA tasarlanması Alternatif CRISPR/Cas9 vektörleri ile klonlama yapılması
4	Hastalık modeli üzerinde hedeflenen genin düzenlenmemesi ve/veya off-target etki gözlenmesi	Gen üzerinde farklı hedef bölgelerin seçilmesi

10. Proje Ekibi

Takım Lideri: Begüm COŞAR

Adı Soyadı	Projedeki Görevi	Okul	Projeyle veya problemle ilgili tecrübesi
Begüm COŞAR	Pankreas beta adacık hücreleri üzerinde etkili olan genleri araştırarak düzenleme yapılacak en uygun genin seçilmesi üzerine araştırmaları ve CRISPR/CAS9 iş paketinde bulunan ön çalışmaları yapmıştır.	Başkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik 3. Sınıf	TÜBİTAK destekli projelerde literatür çalışmalarında görev almıştır ve laboratuvar tecrübesi bulunmaktadır. TÜBİTAK 2209-B Programı kapsamında “ <i>Drosophila melanogaster</i> ’de Diyabetik Hastalık Modelinin Oluşturulması ve CRISPR/CAS9 Yöntemi ile Gen Düzenlemesi Yapılması Sonucu Oluşan İfade Değişikliğinin Araştırılması ve Değerlendirilmesi” başlıklı projenin yürütücülüğünü yapmaktadır.
Ahmet Turan İNCE	Diyabet hastalığının oluşum nedenlerini araştırarak uPKH kökenli diyabet hastalık modeli üzerinde pankreas beta adacık hücrelere dönüşümü ile ilgili araştırmaları yapmıştır.	Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp 3. Sınıf	TÜBİTAK, IKSAD International, Newton-Katip Çelebi fonu gibi desteklerle projelerde yürütücü, bursiyer ve araştırmacı olarak görev almıştır. Laboratuvar ve literatür tarama deneyimi bulunmaktadır.
Cansu TEKELİ	Düzenleme yapılacak gen belirlendikten sonra gen düzenlemeleri için stratejileri araştırmış ve uygun strateji olarak belirlenen CRISPR/Cas9 ile ilgili araştırmaları yapmıştır.	TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği 4. Sınıf	Yaptığı stajlar ve lisans eğitimi ile laboratuvar deneyimi kazanmıştır ve bursiyer olarak bulunduğu TÜBİTAK destekli STAR programında literatür çalışmalarında görev almıştır.
Selin KURTER	Gen düzenleme işlemi yapıldıktan sonra otolog transplantasyon uygulanması ile ilgili araştırmaları	Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Üç buçuk yıllık laboratuvar deneyimi ve tez yazımı, literatür

	yapmıştır.	Farmasötik Biyoteknoloji tezli yüksek lisans	tarama, derleme yazma yetkinlikleri bulunmaktadır.
Pelin KILIÇ	Proje danışmanı	Ankara Üniversitesi Kök Hücre Enstitüsü HücreCELL Biyoteknoloji Geliştirme ve Ticaret A.Ş.	TÜBİTAK 1512 BİGG Programı, kapsamında “Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre (uPK) Kökenli Diyabet Hastalık Modeli” isimli projenin yürütücülüğünü yapmaktadır. Varolan İlaç Etken Maddelerinin COVID- 19’a Karşı Etkinliklerinin In- Siliko, In-Vitro ve In- Vivo Olarak İncelenmesi (Tübitak- 1004 Araştırmacı)

11. Kaynaklar

- Amirruddin, N. S., Low, B. S. J., Lee, K. O., Tai, E. S., & Teo, A. K. K. (2020). New insights into human beta cell biology using human pluripotent stem cells. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 103(October), 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.11.004>
- Bao, D., Ma, Y., Zhang, X., Guan, F., Chen, W., Gao, K., Qin, C., & Zhang, L. (2015). Preliminary Characterization of a Leptin Receptor Knockout Rat Created by CRISPR/Cas9 System. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/srep15942>
- Bar-Nur, O., Russ, H. A., Efrat, S., & Benvenisty, N. (2011). Epigenetic memory and preferential lineage-specific differentiation in induced pluripotent stem cells derived from human pancreatic islet beta cells. *Cell Stem Cell*, 9(1), 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.06.007>
- Cho, B., Kim, S. J., Lee, E. J., Ahn, S. M., Lee, J. S., Ji, D. Y., Lee, K., & Kang, J. T. (2018). Generation of insulin-deficient piglets by disrupting INS gene using CRISPR/Cas9 system. *Transgenic Research*, 27(3), 289–300. <https://doi.org/10.1007/s11248-018-0074-1>
- Christoforou, N., Liao, B., Chakraborty, S., Chellapan, M., Bursac, N., & Leong, K. W. (2013). Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiac Progenitors Differentiate to Cardiomyocytes and Form Biosynthetic Tissues. *PLoS ONE*, 8(6), 65963. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065963>
- Dadheech, N., & James Shapiro, A. M. (2019). Human Induced Pluripotent Stem Cells in the Curative Treatment of Diabetes and Potential Impediments Ahead. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1144(December 2018), 25–35. https://doi.org/10.1007/5584_2018_305
- Frayling, T. M., Evans, J. C., Bulman, M. P., Pearson, E., Allen, L., Owen, K., Bingham, C., Hannemann, M., Shepherd, M., Ellard, S., & Hattersley, A. T. (2001). β -cell genes and diabetes: Molecular and clinical characterization of mutations in transcription factors. *Diabetes*, 50(SUPPL. 1), S94. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.2007.s94>
- Granéli, C., Hicks, R., Brolén, G., Synnergren, J., & Sartipy, P. (2019). Diabetic Cardiomyopathy Modelling Using Induced Pluripotent Stem Cell Derived

- Cardiomyocytes: Recent Advances and Emerging Models. In *Stem Cell Reviews and Reports* (Vol. 15, Issue 1, pp. 13–22). Humana Press Inc. <https://doi.org/10.1007/s12015-018-9858-1>
- Gunaseeli, I., Doss, M., Antzelevitch, C., Hescheler, J., & Sachinidis, A. (2010). Induced Pluripotent Stem Cells as a Model for Accelerated Patient- and Disease-specific Drug Discovery. *Current Medicinal Chemistry*, *17*(8), 759–766. <https://doi.org/10.2174/092986710790514480>
- Guo, X., Zhang, T., Hu, Z., Zhang, Y., Shi, Z., Wang, Q., Cui, Y., Wang, F., Zhao, H., & Chen, Y. (2014). Efficient RNA/Cas9-mediated genome editing in *Xenopus tropicalis*. *Development (Cambridge)*, *141*(3), 707–714. <https://doi.org/10.1242/dev.099853>
- Hattersley, A. T., Greeley, S. A. W., Polak, M., Rubio-Cabezas, O., Njølstad, P. R., Mlynarski, W., Castano, L., Carlsson, A., Raile, K., Chi, D. V., Ellard, S., & Craig, M. E. (2018). ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2018: The diagnosis and management of monogenic diabetes in children and adolescents. *Pediatric Diabetes*, *19*, 47–63. <https://doi.org/10.1111/pedi.12772>
- Inada, E., Saitoh, I., Watanabe, S., Aoki, R., Miura, H., Ohtsuka, M., Murakami, T., Sawami, T., Yamasaki, Y., & Sato, M. (2015). Piggy Bac transposon-mediated gene delivery efficiently generates stable transfectants derived from cultured primary human deciduous tooth dental pulp cells (HDDPCs) and HDDPC-derived iPS cells. *International Journal of Oral Science*, *7*(3), 144–154. <https://doi.org/10.1038/ijos.2015.18>
- Jang, J., Yoo, J. E., Lee, J. A., Lee, D. R., Kim, J. Y., Huh, Y. J., Kim, D. S., Park, C. Y., Hwang, D. Y., Kim, H. S., Kang, H. C., & Kim, D. W. (2012). Disease-specific induced pluripotent stem cells: A platform for human disease modeling and drug discovery. *Experimental and Molecular Medicine*, *44*(3), 202–213. <https://doi.org/10.3858/emm.2012.44.3.015>
- Kim, S. H. (2015). Maturity-onset diabetes of the young: What do clinicians need to know? In *Diabetes and Metabolism Journal* (Vol. 39, Issue 6, pp. 468–477). Korean Diabetes Association. <https://doi.org/10.4093/dmj.2015.39.6.468>
- Kondo, Y., Toyoda, T., Ito, R., Funato, M., Hosokawa, Y., Matsui, S., Sudo, T., Nakamura, M., Okada, C., Zhuang, X., Watanabe, A., Ohta, A., Inagaki, N., & Osafune, K. (2017). Identification of a small molecule that facilitates the differentiation of human iPSCs/ESCs and mouse embryonic pancreatic explants into pancreatic endocrine cells. *Diabetologia*, *60*(8), 1454–1466. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4302-7>
- Lin, X., Pelletier, S., Gingras, S., Rigaud, S., Maine, C. J., Marquardt, K., Dai, Y. D., Sauer, K., Rodriguez, A. R., Martin, G., Kupriyanov, S., Jiang, L., Yu, L., Green, D. R., & Sherman, L. A. (2016). CRISPR-Cas9-mediated modification of the NOD mouse genome with Ptpn22R619W mutation increases autoimmune diabetes. *Diabetes*, *65*(8), 2134–2138. <https://doi.org/10.2337/db16-0061>
- Liu, Y., Jiang, P., & Deng, W. (2011). OLIG gene targeting in human pluripotent stem cells for motor neuron and oligodendrocyte differentiation. *Nature Protocols*, *6*(5), 640–655. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.310>
- Loo, L. S. W., Lau, H. H., Jasmen, J. B., Lim, C. S., & Teo, A. K. K. (2018). An arduous journey from human pluripotent stem cells to functional pancreatic β cells. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, *20*(1), 3–13. <https://doi.org/10.1111/dom.12996>
- Raikwar, S. P., Kim, E. M., Sivitz, W. I., Allamargot, C., Thedens, D. R., & Zavazava, N. (2015). Human iPS cell-derived insulin producing cells form vascularized organoids under the kidney capsules of diabetic mice. *PLoS ONE*, *10*(1), e0116582. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116582>
- Shen, B., Zhang, W., Zhang, J., Zhou, J., Wang, J., Chen, L., Wang, L., Hodgkins, A., Iyer, V., Huang, X., & Skarnes, W. C. (2014). Efficient genome modification by CRISPR-

- Cas9 nickase with minimal off-target effects. *Nature Methods*, 11(4), 399–402. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2857>
- Shi, Y., Inoue, H., Wu, J. C., & Yamanaka, S. (2017). Induced pluripotent stem cell technology: A decade of progress. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(2), 115–130. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.245>
- Sipione, S., Eshpeter, A., Lyon, J. G., Korbitt, G. S., & Bleackley, R. C. (2004). Insulin expressing cells from differentiated embryonic stem cells are not beta cells. *Diabetologia*, 47(3), 499–508. <https://doi.org/10.1007/s00125-004-1349-z>
- Szot, G. L., Yadav, M., Lang, J., Kroon, E., Kerr, J., Kadoya, K., Brandon, E. P., Baetge, E. E., Bour-Jordan, H., & Bluestone, J. A. (2015). Tolerance induction and reversal of diabetes in mice transplanted with human embryonic stem cell-derived pancreatic endoderm. *Cell Stem Cell*, 16(2), 148–157. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.12.001>
- Timsit, J., Bellanné-Chantelot, C., Dubois-Laforgue, D., & Velho, G. (2005). Diagnosis and management of maturity-onset diabetes of the young. In *Treatments in Endocrinology* (Vol. 4, Issue 1, pp. 9–18). Springer. <https://doi.org/10.2165/00024677-200504010-00002>
- Urakami, T. (2019). Maturity-onset diabetes of the young (MODY): Current perspectives on diagnosis and treatment. In *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* (Vol. 12, pp. 1047–1056). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S179793>
- Valkovicova, T., Skopkova, M., Stanik, J., & Gasperikova, D. (2019). Novel insights into genetics and clinics of the HNF1A-MODY. *Endocrine Regulations*, 53(2), 110–134. <https://doi.org/10.2478/enr-2019-0013>
- Wang, W., Hou, J., Zheng, N., Wang, X., & Zhang, J. (2019). Keeping our eyes on CRISPR: the “Atlas” of gene editing. *Cell Biology and Toxicology*, 35(4), 285–288. <https://doi.org/10.1007/s10565-019-09480-w>
- Wei, H., Wang, C., Guo, R., Takahashi, K., & Naruse, K. (2019). Development of a model of ischemic heart disease using cardiomyocytes differentiated from human induced pluripotent stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 520(3), 600–605. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.09.119>
- Yakubov, E., Rechavi, G., Rozenblatt, S., & Givol, D. (2010). Reprogramming of human fibroblasts to pluripotent stem cells using mRNA of four transcription factors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 394(1), 189–193. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.02.150>
- Yamagata, K. (2014). Roles of HNF1 α and HNF4 α in pancreatic β -cells: Lessons from a monogenic form of diabetes (MODY). In *Vitamins and Hormones* (Vol. 95, pp. 407–423). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800174-5.00016-8>
- Zhang, D., Jiang, W., Liu, M., Sui, X., Yin, X., Chen, S., Shi, Y., & Deng, H. (2009). Highly efficient differentiation of human ES cells and iPS cells into mature pancreatic insulin-producing cells. *Cell Research*, 19(4), 429–438. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.28>