DERLEME REVIEW

DOI: 10.5336/medsci.2022-88507

CRISPR-Cas Fonksiyonel Genetik Tarama: Geleneksel Derleme

CRISPR-Cas Functional Genetic Screening: Traditional Review

Hale GÜLER KARA[a,b], Buket KOSOVA[b], Eda DOĞAN[b], Vildan BOZOK ÇETİNTAŞ[b], Şerif ŞENTÜRK[c]

[a]Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ABD, Şanlıurfa, Türkiye
[b]Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ABD, İzmir, Türkiye
[c]Dokuz Eylül Üniversitesi İzmir Uluslararası Biyotıp ve Genom Enstitüsü, İzmir, Türkiye

ÖZET Prokaryotlara ait savunma mekanizması bileşenleri kullanılarak geliştirilen düzenli aralıklarla bölünmüş kısa palindromik tekrar kümeleri [clustered regularly interspaced palindromic repeats (CRISPR)-Cas] sistemi hedefe özgü gen düzenleme aracı olarak in vitro ve in vivo çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. CRISPR-Cas sisteminin kullanım alanları arasında gen silme, gen ekleme, baz düzeltme, gen ifadesi düzenleme, genomik lokusları görüntüleme, epigenetik düzenleme ve diagnostik analizler yer almaktadır. Bu sistemin güçlü özellikleri arasında bulunan esnekliği, çok yönlülüğü ve kolay uygulanabilirliği kullanım alanlarının giderek artmasına yol açmıştır. Son yıllarda, genlerin biyolojik süreçler ve hücresel işlevlerdeki rollerini aydınlatmak için de CRISPR-Cas9 temelli fonksiyonel genetik tarama çalışmaları yapılmaktadır. CRISPR taramaları, başta kanser olmak üzere, hastalığa bağlı olarak hücrelerin hayatta kalabilmeleri için gerekli olan, hastalık gelişiminden sorumlu genetik faktörlerin tanımlanması ve fonksiyonlarının belirlenmesi için kullanılmaktadır. Amaca uygun seçilmiş gRNA kütüphanesinin hazırlanması ve çoğaltılması, ilgili plazmide klonlama, lentivirüslere paketleme ve hücrelere lentiviral transdüksiyon, fenotipik seçilim, yeni nesil DNA dizi analizi ve biyoinformatik analiz aşamalarından oluşan CRISPR-Cas temelli taramalar, fonksiyonel genetik çalışmalarının yüksek verimlilik ve doğrulukta yapılabilmesini mümkün kılmıştır. Patojen-konakçı etkileşimlerinin araştırılması, hastalıkların moleküler mekanizmalarının ortaya konması, yeni tedavi hedeflerinin bulunması ve tedavi direncinde rol oynayan genetik faktörlerin belirlenmesi gibi farklı amaçlara yönelik tarama çalışmaları da yapılabilmektedir. Bu derlemede, farklı CRISPR-Cas sistemleri kısaca özetlendikten sonra genetik tarama çalışmalarının temel mantığı, uygulanışı ve kullanım alanları güncel literatürden seçilen örneklerle tartışılacaktır.

Anahtar Kelimeler: CRISPR-Cas; CRISPR tarama; fonksiyonel genetik tarama; gRNA kütüphanesi

ABSTRACT The clustered regularly interspaced palindromic repeats (CRISPR)-associated Cas system, derived from the defence mechanism components of prokaryotes, is frequently used as a target specific gene editing tool in in vitro and in vivo studies. Uses of the CRISPR-Cas system include gene deletion, gene insertion, base editing, gene expression editing, genomic locus imaging, epigenetic editing, and diagnostic analysis. Due to the strengths of the system such as flexibility, versatility and easy application, its usage areas have gradually increased. In recent years, CRISPR-Cas9 based functional genetic screen studies have been carried out to understand the roles of genes in the biological processes and cellular functions. CRISPR screens are used to identify genetic factors responsible for disease development and determine their functions, which are necessary for the survival of cells due to disease, especially cancer. CRISPR-Cas9 screens consisting of desing and amplification of the selected gRNA library, cloning in the relevant plasmid, packaging into lentiviruses and lentiviral transduction into cells, phenotypic selection, next generation DNA sequence analysis and bioinformatics analysis, has allowed functional genetic studies that can be performed with high-throughput and high-efficiency. Screening studies can be carried out for different purposes such as investigating pathogen-host interactions, revealing the molecular mechanisms of diseases, identifying novel therapeutic targets and revealing factors that play a key role in treatment resistance. In this review, after a short summary of different CRISPR-Cas systems the basic principles of genetic screening studies, their application and areas of usage will be discussed with selected examples from the current literature.

Keywords: CRISPR-Cas; CRISPR screen; functional genetic screen; gRNA library

CRISPR-Cas SİSTEMLERİ VE KULLANIM ALANLARI

Düzenli aralıklarla bölünmüş kısa palindromik tekrar kümeleri [clustered regularly interspaced palindromic repeats (CRISPR)] ve CRISPR-ilişkili (CRISPR-associated) Cas endonükleazlar prokaryotik canlıların virüs ve diğer mobil genetik elementlere karşı bağışıklık kazanmalarını sağlayan savunma mekanizması bileşenleridir.[1] Adaptasyon, ekspresyon ve interferans aşamalarından oluşan bu süreçte istilacı geno-

Correspondence: Hale GÜLER KARA
Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ABD, Şanlıurfa, Türkiye
E-mail: hale.guler@harran.edu.tr

Peer review under responsibility of Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences.

Received: 08 Feb 2022 ***Received in revised form:*** 20 Apr 2022 ***Accepted:*** 15 May 2022 ***Available online:*** 17 Jun 2022

2146-9040 / Copyright © 2022 by Türkiye Klinikleri. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

mun bir bölgesi CRISPR belleğine alınır ve aynı istilacıyla yeniden karşılaşıldığında CRISPR-RNA (crRNA) aracılığıyla tanınarak degrade edilir.[2]

CRISPR-Cas sistemlerinin sınıflandırılması esas olarak içerdikleri Cas endonükleazları, lokusların genomik organizasyonu ve efektör proteinleri esas alınarak yapılmaktadır. Buna göre CRISPR-Cas sistemleri 2 sınıf, 6 tip ve 33 alt tipe ayrılmaktadır.[3] Sınıf-1 CRISPR-Cas sisteminin arkea ve bakteri genomlarında, sınıf-2 sisteminin ise sadece bakteri genomunda bulunduğu belirlenmiştir. Sınıf-1 CRISPR-Cas sistemi Tip-I, -III ve -IV'ten, sınıf-2 sistemi ise Tip-II, -V ve -VI'dan oluşmaktadır. Tip-I, -II, -IV ve -V sistemleri DNA'yı; Tip-VI sistemi RNA'yı ve Tip-III sistemi de hem RNA hem de DNA'yı hedeflemektedir.[4,5]

Tip-II CRISPR-Cas sisteminin endonükleazı olarak işlev gören Cas9, hedefli gen düzenleme amacıyla kullanılan ilk Cas enzimi olmuştur. *Streptococcus pyogenes*'den elde edilen Cas9 (SpCas9) endonükleazı rehber RNA'yla (*guide RNA*, gRNA) yüklendikten sonra aktive olur ve inaktif konformasyonundan DNA tanıma yetkin konformasyonuna geçer.[6] Genellikle Cas9-gRNA kompleksi hedef DNA bölgesine komşu 2-6 baz uzunluğundaki ve guanin (G) nükleotit içeriği açısından zengin bir "protospacer adjacent motif (PAM)" dizisine bağlanır ve o bölgeden DNA çift zincirinin açılmasını sağlar; ardından, gRNA-hedef DNA arasındaki Watson-Crick baz eşleşmesi gerçekleşir.[7] gRNA'nın çekirdek bölgesi *(seed region)* hedef DNA dizisiyle tamamen eşleştiğinde, Cas9'un endonükleaz lobundaki (NUC lob) HNH ve RuvC domainleri hedef DNA'yı keserler. Burada HNH domaini DNA'yı PAM dizisi sonrası gelen 3. bazdan ve gRNA'ya komplementer zincirden keserken, RuvC domaini de komplementer olmayan zincirden keserek küt uçlu (*blunt end*) bir DNA çift zincir kırığı meydana getirirler.[6] DNA çift zincir kırığının homolog olmayan uç birleştirme [non-homolog end joining (NHEJ)] ya da homolog rekombinasyonla [homolog recombination (HR)] onarılmasına bağlı olarak gen silme ya da gen ekleme düzenlemeleri gerçekleşir.[8]

Son birkaç yılda, CRISPR-Cas teknolojisiyle ilgili çalışmalar büyük bir ivme yakalayarak daha da geliştirilmiştir ve gen silme, gen ekleme, baz düzeltme, gen ifadesi düzenleme, epigenetik düzenleme, görüntüleme ve hatta tanı testi geliştirme gibi çok farklı alanlara uyarlanabilmiştir.

Gen Silme *(knock-out, CRISPRko)*: CRISPR-Cas sisteminin genomdaki hedef bölgeye yönlendirilmesiyle DNA'nın her iki zinciri kesilir ve bir DNA çift zincir kırığı oluşturulur. Bu DNA çift zincir kırığı, HR yoluyla tamirinin gerçekleşmesini sağlayacak kalıp DNA yokluğunda, NHEJ mekanizmasıyla tamir edilir. Bu sırada, kırığın bulunduğu bölgede indel adı verilen insersiyon-delesyon mutasyonları meydana gelir. Bu mutasyonlar, protein fonksiyon kaybıyla sonuçlanan çerçeve kaymalarına ya da anlamsız mRNA yıkımıyla (*nonsense-mediated mRNA decay)* ortadan kaldırılan veya işlevsiz kısa bir proteinin sentezine yol açan erken STOP kodonunun oluşumuyla sonuçlanırlar.[9]

Gen silme çalışmaları in vitro veya in vivo hastalık modellerinin oluşturulmasında, genetik hastalıkların tedavileri için sürdürülen araştırmalarda, çeşitli tür kanser ve fonksiyonel kök hücre çalışmalarında başarıyla kullanılmaktadır.[10-13]

Gen Ekleme *(knock-in)*: HR mekanizmasından yararlanılarak gerçekleştirilen gen ekleme uygulamalarında, hücreye CRISPR-Cas sistemiyle birlikte eklenmek istenen kalıp DNA dizisi verilir. Kalıp DNA'nın her iki ucunda hedeflenen bölgeye özgü homolog diziler bulunur.[14] Bu diziler; bir yandan DNA kırıklarının HR yoluyla tamirini sağlarken, diğer yandan da eklenmek istenilen DNA dizisinin genoma entegrasyonunu sağlarlar.

Gen İfadesinin Düzenlenmesi: CRISPR-Cas sistemiyle hedeflenen bir genin transkripsiyonel aktivasyonu veya inhibisyonu düzenlenebilir. Bunun için genomdaki belirli bir transkripsiyon kontrol bölgesini hedefleyen gRNA ve endonükleaz domaini inaktive edilmiş Cas enzimiyle birleştirilen transkripsiyonel aktivatör veya inhibitör (VP64, VP160 gibi) kullanılır. Bu şekilde HNH ve RuvC domainleri mutasyonla inaktive edilmiş ölü Cas9 *(dead Cas9*; dCas9) endonükleazı, DNA'da kırık oluşturmak yerine hedeflenen bölgeye transkripsiyonel aktivatör veya inhibitörlerin toplanmasını sağlar.[15] Ayrıca Tip-VI CRISPR sisteminde yer alan Cas13a

(C2c2) endonükleazı RNA'ları hedefleyebildiğinden hücre içi transkript yıkımı için programlanabilir.[16]

Epigenetik Düzenleme: Epigenetik düzenlemede CRISPR-Cas sistemi, belirli bir genin lokusundaki epigenetik desenin değiştirilmesi amacıyla kullanılır.[17] Bunun için CRISPR-Cas sistemiyle gen ifadesinin düzenlenmesi protokolüne benzer şekilde, endonükleaz aktivitesi bulunmayan dCas9 enzimi kullanılır. Ancak bu sefer dCas9 ile "kruppel associated box (KRAB)" ve p300 gibi epigenetik düzenleyiciler birleştirilir. Bu şekilde hedeflenen genin metilasyon profili değiştirilebilmekte veya nükleozom yapısındaki histon asetilasyonu veya metilasyonu gibi modifikasyonlar düzenlenebilmektedir.[18]

Baz Düzeltme: Baz düzeltme çalışmaları için sitidin deaminaz (APOBEC1) ve tRNA adenozin deaminaz gibi enzimler, endonükleaz aktivitesi bulunmayan dCas9 proteinleriyle birleştirilir.[19,20] Bu şekilde belirli bir genomik bölge hedeflenerek C → T, G → A, A → G ve T → C mutasyonları düzeltilebilir.[21]

Son yıllarda geliştirilen ve "ara değiştir" *(prime editing)* adıyla bilinen baz düzeltme sisteminde modifiye edilmiş gRNA *(prime editing guide RNA, pegRNA)* ile ters transkriptaz füzyon proteini kullanılmıştır.[22] Bu sistem, kardiyomiyosit hücrelerinde distrofin geninin 51. ekzonunun silinmesine neden olan mutasyonun düzeltilmesinde başarıyla kullanılmıştır ve Duchenne musküler distrofi hastalığının tedavisi için de umut vaat etmektedir.[23] Geliştirilen ara değiştir sistemine ikinci bir pegRNA'nın eklenmesiyle twinPE sistemi oluşturulmuştur. TwinPE sistemiyle gen uzunluğundaki DNA dizilerinin insan hücrelerine entegre edilebildiği, 780 baz çifti (bç) büyüklüğündeki delesyonlar oluşturulabildiği ve 108 bç büyüklüğündeki DNA dizilerinin değiştirilebildiği gösterilmiştir.[24]

Genomik Lokusların Görüntülenmesi: Hücresel davranışın düzenlenmesinden sorumlu olan kromatin organizasyonu ve lokalizasyonunun, genomik fonksiyonun düzenlenmesinde de etkili oldukları bilinmektedir.[25] Hücrede belirli bir genomik lokusun mekânsal-zamansal organizasyonu CRISPR-Cas sistemiyle görüntülenebilmektedir. Bu tür çalışmalarda, endonükleaz aktivitesi bulunmayan dCas9 ve yeşil floresanlı proteinine bağlı gRNA'nın hedeflendirildiği spesifik bir genomik lokusun diziye özgü görüntülemesi gerçekleştirilebilmektedir.[26,27]

Diagnostik Testler: CRISPR-tabanlı diagnostik testler Cas13a'nın RNA rehberliğinde ribonükleaz (RNAaz) aktivite göstermesi özelliğinden faydalanılarak geliştirilmiştir. Tek zincirli RNA virüslerinin genomlarında bulunan potansiyel Cas13a bağlanma bölgelerine hedeflenen sistem, viral genomun varlığını belirlemek üzere optimize edilmiştir.[28] Daha sonra yapılan çalışmalarda, hasta örneklerindeki RNA veya DNA dizilerini hızlı bir şekilde saptayan "specific high-sensitivity enzymatic reporter unlocking" platformu geliştirilmiş ve şiddetli akut solunum sendromu-koronavirüs-2 [severe acute respiratory syndrome-coronavirus-2 (SARS-CoV-2)] tanısında kullanılabilirliği gösterilmiştir.[29]

CRISPR-Cas9 FONKSİYONEL GENETİK TARAMA

DNA dizileme teknolojileri ve biyoinformatik analiz yazılımlarındaki gelişmeler sayesinde artık bir canlının tüm genom ve transkriptom dizisini belirlemek ve analiz etmek daha kolay hâle gelmiştir. Ancak bundan daha önemli olan aşamalar genlerin fonksiyonlarını belirlemek, tanı ve tedavideki kullanılabilirliklerini ortaya koymaktır. Bir genin fonksiyonunu belirlemek amacıyla "fenotipten genotipe" ileri *(forward)* yönlü veya "genotipten fenotipe" tersine *(reverse)* yönlü çalışmalar planlanabilmektedir. İleri yönlü çalışmalarda belirli bir fenotipten sorumlu olan genler tanımlanırken, tersine yönlü çalışmalarda bilinen bir genotipten yola çıkılarak fenotipik etkileri belirlenmeye çalışılmaktadır.

İleri yönlü çalışmalarda genlerin ekspresyon düzeyleri modifiye edilerek, ilgili fenotipe sahip hücreler seçilir ve sonrasında bu değişikliğe neden olan mutasyonlar karakterize edilir. Müdahaleci RNA'ların [RNA interference (RNAi)] keşfi, gen ifadesinin baskılanmasına ve fenotipik sonuçlarının moleküler düzeyde analiz edilmesine olanak vererek fonksiyonel genetik çalışmalara büyük katkılar sağlamıştır.[30] İleri yönlü genetik tarama çalışmalarının ilk sonuçları çok sayıdaki genin RNAi yoluyla susturulmasıyla elde edilmiştir.[31] Küçük müdahale edici RNA (small

interfering RNA) ve küçük saç tokası RNA (short hairpin RNA) kütüphanelerinin kullanıldığı bu çalışmalarda; düşük gen susturma etkinliği ve tekrarlanabilirlik oranları, yalancı pozitif veya negatif sonuçlar gibi dezavantajlar ortaya çıkmıştır. Buna karşılık CRISPR-Cas sisteminin genetik tarama çalışmalarına uyarlanması sonrasında yüksek verimliliğe sahip çıktılar elde edilebilmiştir. CRISPR-Cas sisteminin RNAi temelli genetik taramalara olan üstünlüklerinden bazıları yüksek hassasiyeti; intron, promotor, enhansır gibi tüm genomik bölgelerin hedeflenebilmesi; dCas9 ile kombine edilen aktivatör ve epigenetik modülatörlerle fonksiyon kazanma taramalarının yapılabilmesidir.[32]

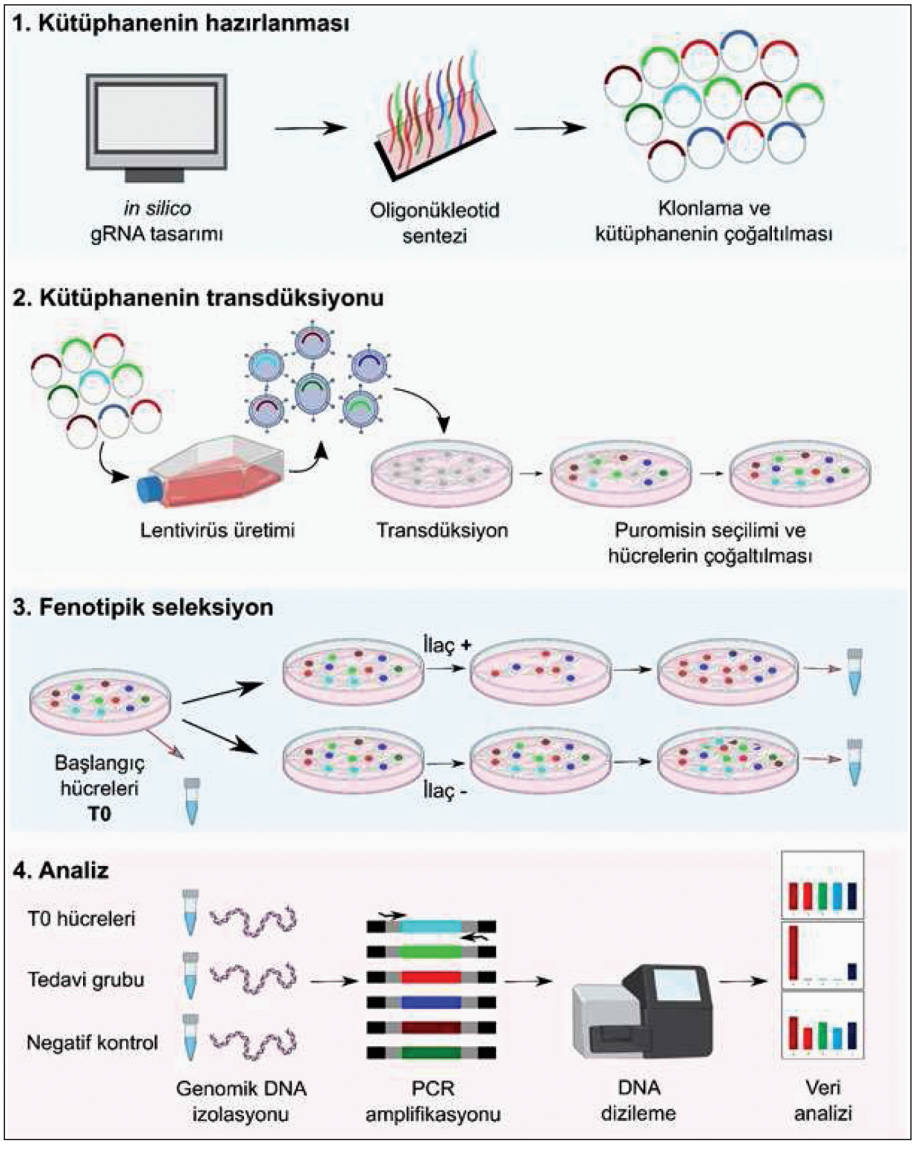
CRISPR temelli tarama çalışmalarında kütüphaneyi oluşturan gRNA'lar bir plaka üzerine (*array*) dağıtılır ya da gen havuzu *(pool)* şeklinde tüpte toplanır. Array formatındaki kütüphanelerde 96- ya da 384-kuyucuklu plakalar kullanılır ve her kuyucukta bir gen ya da genomik lokusu hedefleyen gRNA bulunur.[33] Havuzlanmış kütüphanelerde gRNA'ların tümü tek bir tüpte toplanır, belirli bir hücre popülasyonuna uygulanır ve sonra antibiyotik kullanılarak gRNA'yı alan hücrelerin seçilimi gerçekleştirilir.[34] Array formatındaki kütüphanedeki gRNA'larla transfekte olan hücrelerin seçilimi ise floresan ya da lüminesans yöntemleriyle gerçekleştirilir.[33] Günümüzde tarama çalışmalarında, maliyetleri daha uygun ve kolay uygulanır yöntemi oluşturdukları için havuzlanmış kütüphaneler tercih edilmektedir. Bunun için derlemede, havuzlanmış kütüphaneler kullanılarak yapılan tarama çalışmaları ele alınmıştır.

Havuzlanmış kütüphaneler kullanılarak gerçekleştirilen tarama çalışmalarında belirli bir hücre popülasyonunda gRNA'ların aracılık ettikleri mutasyon aracılı fonksiyon kaybı, transkripsiyon aktivasyonu/inhibisyonu ya da epigenetik düzenlemeler şeklindeki değişiklikler oluşturulur. Bunun öncesinde gRNA'ların viral vektörlere paketlenmeleri ve virüs titrasyonunun, hücre başına bir virüs ya da gRNA transfeksiyonu olacak şekilde optimize edilmesi gerekir. Transfekte edilen hücrelerin seçiliminden sonra genetik olarak heterojen bir hücre popülasyonu elde edilir. Bu hücre popülasyonundaki her hücre bir gRNA tarafından hedeflenmiş bir gene sahiptir. Ardından gRNA'ya ait dizilere bağlanan primerler kullanılarak genomik DNA çoğaltılır ve yeni nesil dizileme [next generation sequencing (NGS)] sonrasında hücre popülasyonundaki gRNA temsil oranlarına bakılır (Şekil 1).[32,35] Örneğin bir kanser hücresinin bağımlı olduğu genleri tanımlanmak için başlangıçtaki hücre popülasyonunun gRNA miktarı (T0) transfeksiyon sonrası için belirlenen günde kalan hücre popülasyonunun gRNA miktarıyla (T1) karşılaştırılır.[36] T1 noktasında tükenen gRNA'lar, kanser hücresinin çoğalması ve/veya hayatta kalması için gerekli olan genleri tanımlar.

CRISPR-Cas temelli genetik tarama çalışmaları yaygın olarak gen silmek (CRISPRko), susturmak (CRISPRi) veya aktive etmek (CRISPRa) amacıyla yapılır. Bunun için çalışmanın başında ve amacına uygun olarak CRISPR-Cas sisteminin ana bileşenlerinden olan Cas endonükleazı, gRNA kütüphanesi ve seçilim koşulları belirlenmelidir.

Gen ekspresyonunun artırıldığı CRISPRa tarama çalışmalarında, transkripsiyonel aktivatörlerle birleştirilmiş dCas9 endonükleazı kullanılmaktadır. Çalışmaların etkinliğini artırmak için farklı aktivatör proteinlerinin bulunduğu sistemler geliştirilmiştir. Örneğin VPR adlı sistemde VP64, nükleer faktör-kappa B transkripsiyon faktörü p65 alt biriminin transkripsiyon aktivasyon domaini ve Epstein-Barr virüsü R transaktivatörünün 3'lü füzyonu kullanılmaktadır.[15,37] SunTag adındaki ve peptid tekrar dizilerinden oluşan protein iskelesi de CRISPRa çalışmalarında kullanılmak üzere modüle edilmiştir. Bu şekilde oluşturulan dCas9-SunTag-VP64 kompleksine çok sayıdaki VP64 bağlanabildiğinden daha efektif transkripsiyon aktivasyonu gerçekleştirilebilir.[38] Sinerjik aktivasyon aracı [synergistic activation mediator (SAM)] kompleksindeki gRNA modifiye edilerek MS2-P65-HSF1 transkripsiyon aktivatörleriyle ve dCas9 proteini de VP64 kompleksiyle birleştirilerek sinerjistik etki sağlanmaya çalışılmıştır. CRISPRa çalışmalarında kullanılan tüm aktivatör proteinler dCas9 ile birleştirilerek ve transkripsiyon başlangıç bölgesinin -300/0 bç yakınına bağlanarak hedef genin ekspresyonunu artırırlar.[37,38]

CRISPRi çalışmalarında dCas9 endonükleazı kullanılarak, transkripsiyon sırasında RNA polimerazın uzaması inhibe edilir ve bu yolla hedef gen ekspresyonu engellenir.



ŞEKİL 1: Havuzlanmış kütüphane kullanılarak yapılan CRISPRko tarama çalışmalarındaki örnek iş akışı. **1.** In silico uygulamalar kullanılarak hedeflenen genlere özgü gRNA'lar tasarlandıktan sonra oligonükleotid havuzu sentezlenir. Oluşturulan kütüphane LentiCRISPR V2 ya da LentiGuide Puro plasmidine klonlanarak çoğaltılır. **2.** Kütüphaneyi oluşturan plazmidler HEK293FT hücrelerinde lentivirüslere paketlenir. Fonksiyonel tarama yapılacak hücrelere kütüphanenin transdüksiyonu yapıldıktan sonra, puromisin antibiyotiği ile lentivirüslerle transfekte olan hücreler seçilerek çoğaltılır. **3.** Seçilim sonrası başlangıç hücrelerinden (T0) genomik DNA izolasyonu yapılır. Geri kalan hücrelerin bir grubu fenotipik seçilim için ilaç, toksin veya seçici ortam gibi etkenlere maruz bırakılır. Herhangi bir uygulama yapılmayan grup negatif kontrol olarak işlev görür. Tarama sonunda tüm uygulama gruplarından genomik DNA izole edilir. **4.** Her bir gruptaki gRNA dağılımını belirlemek amacıyla gRNA dizilerinin uçlarındaki bölgeler kullanılarak PCR işlemi yapılır. PCR işleminde ayrıca indeks primerleri de kullanılarak gruplar etiketlenir ve elde edilen amplikonların dizi analizleri gerçekleştirilir. Dizileme sonrasında her gruptaki tükenen ve zenginleşen gRNA'lar ve onların hedefledikleri aday genler belirlenir. (Biorender.com sitesindeki görsellerden faydalanılmıştır.)

Gen ifadesinin daha etkili bir şekilde baskılanması için dCas9 ile KRAB gibi inhibitör proteinlerin birleştirilmesiyle elde edilen füzyon proteinler kullanılır.[39] CRISPRko'nun aksine CRISPRi, letaliteye neden olan esansiyel genlerin ayrıntılı biyolojik işlevlerinin değerlendirilmesi için kullanılır.[40]

gRNA KÜTÜPHANESİNİN OLUŞTURULMASI

Kütüphane tasarımı için öncelikle hedef gen setinin belirlenmesi gereklidir. Kütüphanedeki hedef gen listesi tüm genomdaki genler dâhil edilerek oluşturulabileceği gibi fosfatazlar, kinazlar, transkripsiyon faktörleri, hücre döngüsü, metabolizma, apoptozis gibi herhangi bir biyolojik yolağı hedefleyebilecek

şekilde de tasarlanabilmektedir (Tablo 1, Tablo 2, Tablo 3).[41,42] Tüm genom düzeyinde yapılan tarama çalışmaları, geniş kapsamlı olmaları ve seçilim yanlılığını dışlamaları yönleriyle avantaj sağladıkları gibi fazla hücre gerektirmeleri, gelişmiş teknik ekipmanlara ve yüksek iş gücüne ihtiyaç duymaları açılarından da dezavantajlı olabilmektedirler. Örneğin *GeCKO* ve *Brunello* gibi tüm protein kodlayan genleri hedefleyen gRNA kütüphaneleri kâr amacı gütmeyen Addgene (Watertown, Massachusetts, United States) firmasından temin edilebilmektedir.[32,43]

Bir gRNA kütüphanesinin büyüklüğü, çalışılacak aday genlerin sayısı ve gen başına kullanılması planlanan gRNA sayısıyla belirlenmektedir. Her gRNA'nın fonksiyonel etkinliği ve özgüllüğü farklı olabildiğinden, aynı geni hedefleyen birden fazla gRNA'nın kullanılması önerilmekte ve bu sayede bulguların güvenilirliği artmaktadır.[44] Tutarlı sonuçların elde edilebilmesi için ≥4 gRNA/gen kullanılması gereklidir.[45] Örneğin *Brunello* kütüphanesinde 4 gRNA/gen ve *GeCKO-V2* kütüphanesinde ise 6 gRNA/gen bulunmaktadır.

Uygun gRNA'ların seçiminde birçok çevrim içi veri tabanının ücretsiz olarak sundukları platformlardan yararlanılır. Örnek olarak E-CRISP, CRISPOR, GUIDES, CRISPick, RGEN Cas-Designer, CHOPCHOP, CRISPR.mit, CRISPRseek, CRISPRdirect, CRISPRscan, PROTOSPACER, WU-CRISPR ve CRISPRseek platformları verilebilir. Bu platformların kullanımıyla hedef genlerin PAM dizilerine uygun gRNA'lar dizayn edilebilir.

KONTROLLER

Tarama çalışmalarının etkinliklerini belirlemek ve etkisiz, yani nötr, varyasyonları değerlendirebilmek amacıyla mutlaka negatif ve pozitif kontrol gRNA'larının %5-10 oranında kütüphaneye eklenilmesi önerilmektedir.[46]

TABLO 1: CRISPRko tarama çalışmalarında kullanılan kütüphaneler.

Kütüphane adı	Hedef	Gen sayısı	gRNA sayısı*	Kontrol sayısı	Referans
İnsan ubikuitinasyon ilişkili protein kütüphanesi	Ubikuitinasyon ile ilgili protein genleri	660	6-25	1.000 NC	Bonifacino
DNA hasarı yanıt kütüphanesi	DNA tamir genleri	365	10	443 PC 500 NC	J. Chen
Brunello kütüphanesi	Tüm genom	19.114	4	1.000 NC	Doench ve Root
Brunello insan kinom kütüphanesi	Kinaz genleri	763	4	100 NC	Doench ve Root
Bison gRNA kütüphanesi	Ubikuitin ligazlar ve de-ubikuitinazlar	713	4	10 PC 10 NC	Ebert
İnsan interferonla uyarılan gen kütüphanesi	İnterferonla uyarılan genler	1.902	8	200 NC	Emerman OhAinle
İnsan MinLibCas9 kütüphanesi	Tüm genom	18.761	2	200 NC	Garnett
İnsan UBDUB CRISPR Knockout kütüphanesi	Ubikuitinasyon ve deubikuitinasyon genleri	1.500	~6	1.000 NC	Li
İnsan miRNA CRISPR Knockout kütüphanesi	miRNA genleri	1.594	~5	1.000 NC	Lin
Tüm genom Toronto knockout kütüphanesi	Tüm genom	18.053	4	142 NC	Moffat
İnsan metabolik gen CRISPR knockout kütüphanesi	Metabolik genler	2.981	~10	500 NC	Sabatini
İnsan ras sentetik lethal CRISPR knockout kütüphanesi	Ras ile sentetik lethal genler	132	50	499 NC	Sabatini ve Lander
Zenginleştirilmiş insan alt havuzlu kütüphaneler	Çeşitli yolakları hedefleyen 6 alt kütüphane	7.305	10	100 NC	Sabatini ve Lander
İnsan SLC knockout kütüphanesi	SLC protein genleri	390	6-7	120 NC	Superti-Furga
İnsan Mesajcı-RBP sgRNA kütüphanesi	mRNA bağlayan protein genleri	725	10	500 NC	Turner
İnsan kinaz domain hedefli CRISPR knockout kütüphanesi	Protein kinazların sadece kinaz domain	482	~6	36 PC 51 NC	Vakoc
İnsan DNA bağlama domain hedefli CRISPR knockout kütüphanesi	Transkripsiyon faktörlerinin DNA bağlama alanını kodlayan genler	1.427	~6	36 PC 50 NC	Vakoc
İnsan tüm genom gRNA iBAR kütüphanesi	Tüm genom	19.210	3	1.000 NC	Wei
BARBEKO gRNA kütüphanesi	Tüm genom baz editing	17.501	3	999 NC	Wei
GeCKO v2 kütüphanesi	Tüm genom	19.052	6	1.000 PC	Zhang

* : Her gene özgü kullanılan gRNA sayısı. PC: Pozitif kontrol; NC: Negatif kontrol; miRNA: Mikro RNA; mRNA: Mesajcı RNA.

TABLO 2: CRISPRa tarama çalışmalarında kullanılan kütüphaneler.

Kütüphane adı	Hedef	Gen sayısı	gRNA sayısı*	Kontrol sayısı	Referans
Calabrese p65-HSF insan aktivasyon kütüphanesi	Tüm genom	18.885 (SetA) 18.843 (SetB)	3-6	500 NC	Doench ve Root
İnsan SLC aktivasyon kütüphanesi	SLC protein genleri	388	6-7	120 NC	Superti-Furga
İnsan tüm genom CRISPRa-v2 kütüphanesi	Tüm genom	18.915	10	1.895 NC 3.790 NC	Weissman
İnsan alt havuzlu CRISPRa-v2 kütüphaneleri	Çeşitli biyolojik yolakları hedefleyen 7 alt kütüphane	2.320 2.921 3.093 2.220 2.288 2.405 3.668	5	250 NC 280 NC 290 NC 250 NC 250 NC 250 NC 325 NC	Weissman
CRISPRa genom çaplı kütüphane	Tüm genom	15.977	10	5.968 NC	Weissman
İnsan membran protein aktivasyon kütüphanesi	Membran protein genleri	6.213	7-14	500 NC	Wright
İnsan tüm genom SAM kütüphanesi (2-plazmid sistemi)	Tüm genom	23.430	3		Zhang
İnsan tüm genom SAM kütüphanesi (3-plazmid sistemi)	Tüm genom	23.430	3		Zhang
İnsan SAM lncRNA aktivasyon kütüphanesi (3-plazmid sistemi)	lncRNA'lar	10.504	10	500 NC	Zhang

* : Her gene özgü kullanılan gRNA sayısı. PC: Pozitif kontrol; NC: Negatif kontrol; SAM: Sinerjik aktivasyon aracı; lncRNA: Uzun kodlamayan RNA.

TABLO 3: CRISPRi tarama çalışmalarında kullanılan kütüphaneler.

Kütüphane adı	Hedef	Gen sayısı	gRNA sayısı*	Kontrol sayısı	Referans
Dolcetto insan inhibisyon kütüphanesi	Tüm genom	18.901 (SetA) 18.899 (SetB)	3-6	500 NC	Doench ve Root
CRiNCL-insan kodlamayan CRISPRi kütüphanesi (hücre spesifik 13 alt kütüphane)	LncRNA'lar	1.329 675 2.965 4.103 2.307 2.253 2.831 2.337 2.913 1.443 875 1.051 1.269	~10	258 NC 153 NC 326 NC 481 NC 247 NC 339 NC 191 NC 323 NC 487 NC 264 NC 194 NC 284 NC 260 NC	Weissman
İnsan tüm genom CRISPRi-v2 kütüphanesi	Tüm genom	18.905	5	1.895 NC	Weissman
Alt havuzlu CRISPRi-v2 insan kütüphaneleri	Çeşitli biyolojik yolakları hedefleyen 7 alt kütüphane	2.318 2.916 3.093 2.219 2.292 2.418 3.649	5	250 NC 280 NC 290 NC 250 NC 250 NC 250 NC 325 NC	Weissman
İnsan CRISPRi titrasyon kütüphaneleri	Temel biyolojik yolakları hedefleyen 2 alt kütüphane	2.449 2.405	23-24 1-9	2.500 NC 1.202 NC	Weissman
Tüm genom CRISPRi kütüphanesi	Tüm genom	15.977	10	11.219	Weissman

* : Her gene özgü kullanılan gRNA sayısı. PC: Pozitif kontrol; NC: Negatif kontrol; lncRNA: Uzun kodlamayan RNA.

Genellikle negatif kontrol olarak herhangi genomik bir bölgeyle eşleşmeyen ya da intergenik bölgelere bağlanan, fakat protein kodlayan genleri etkilemeyen gRNA'lar seçilir. İntergenik kontrol kullanımının diğer amacı ise gRNA/Cas9 ile indüklenen DNA hasarı yanıtının fenotipe bir etkisinin olup olmadığını değerlendirmektir.[47] Teorik olarak deneylerin sonunda gruplar birbirleriyle karşılaştırıldıklarında negatif kontrol gRNA'larının zenginleşmeleri ya da tükenmeleri beklenmemektedir.

Pozitif kontrol olarak ribozom ve proteazom gibi hücre içi organel ya da protein komplekslerin yapılarında yer alan proteinleri kodlayan, yaşam için vazgeçilmez, yani esansiyel olan genleri hedefleyen gRNA'lar seçilir ve analizlerin güvenilirliğini değerlendirmek amacıyla kullanılır. Yapılan deneylerin sonunda tükenmiş olmaları beklenmektedir.[44]

Cas9 ENDONÜKLEAZI

Cas9 endonükleazı kodlayan transkriptin ~4.1 kilobaz (kb) uzunluğunda olması nedeniyle gRNA ile aynı vektöre klonlandığında, düşük lentiviral titreye ve transfeksiyon sonrası hücrelerde farklı Cas9 ekspresyon seviyelerine neden olmaktadır.[48] Bu nedenle hücreler öncelikle Cas9 vektörüyle, stabil Cas9 ifadesi sağlanması sonrasında gRNA kütüphanesiyle transfekte edilirler. Bu yöntem, kanser gibi hızlı ve sonsuz bölünen hücrelere kolay uygulanabilmekle birlikte, primer hücre serileri gibi yavaş ve sınırlı bölünen hücrelere daha zor uyarlanabilmektedir. Böyle durumlarda, Cas9 endonükleaz ve gRNA'nın aynı plazmide klonlandığı kütüphaneler ya da Cas9 endonükleazın stabil olarak ifade edildiği hücre serileri kullanılır.

TRANSDÜKSİYON

Bir hücreye virüs ya da viral vektörler aracılığıyla yabancı DNA'nın sokulması olayına transfeksiyon ya da transdüksiyon denir. CRISPR-Cas temelli genetik tarama çalışmaları için oluşturulmuş olan gRNA kütüphanesinin de viral bir vektör içine paketlenmesi gereklidir ve bunun için genellikle lentivirüsler tercih edilir.[49] Lentivirüslerin tercih edilme sebepleri taşıma kapasitelerinin büyük olması, kütüphanedeki genlerin uzun süreli ekspresyonlarının sağlanabilmesi, bölünen ve bölünmeyen hücrelerin transfekte edilebilmesi ve immünojenitelerinin düşük olmasıdır.[50] LentiCRISPR-V2 plazmidine hem Cas9 geni hem de gRNA dizisi klonlandığından oluşturulan kütüphanenin bir kerede lentivirüslere paketlenmesi mümkündür. Buna karşılık, Cas9'u eksprese eden lentiCas9-blast ve gRNA'yı eksprese eden lentiguide-puro gibi 2'li plazmid sistemlerinde her birinin ayrı ayrı lentivirüslere paketlenmesi gerekir.[51]

HÜCRE TİPİ VE SAYISI

CRISPR-Cas temelli genetik tarama çalışmalarında, fibroblast ve melanosit gibi primer ya da HeLa gibi kanser hücre serileri kullanılabilir.[52] Ancak primer hücre serilerin düşük çoğalma kapasiteleri ve transfeksiyonlarındaki zorluklar geniş çaplı tarama çalışmalarında kullanımlarını sınırlamaktadır.[53] Ayrıca çalışma için uygun hücre seçiminde, özellikle CRISPRko tarama çalışmalarında, NHEJ tamir yolağının aktif olmasına dikkat edilmelidir.[54]

Yanlış pozitif sonuçların elimine edilebilmesi için hücrelere aktarılan kütüphanedeki her bir gRNA'nın ekspresyonu önemlidir. Havuzlanmış kütüphaneyle gerçekleştirilen gen silme çalışmalarında her hücrenin bir gRNA alabilmesi için lentiviral transdüksiyonun %20-60 oranında, yani düşük enfeksiyon verimliliğinde yapılması önerilmektedir.[52] Güvenilir bir tarama için hücre popülasyonunda her bir gRNA'nın 500x-1.000x temsil edilmesi hedeflenmektedir. Buna göre 100.000 gRNA'lı bir kütüphanenin 1.000x ve %40 transfeksiyon etkinliğine ulaşabilmesi, yani güvenilir oranlarda temsil edilebilmesi için deneye 250 milyon hücreyle başlanması gerekir. Tekrar gruplarının da ekleneceği göz önünde bulundurulduğunda, bu sayıdaki hücrenin aynı anda kültürleri ve bakımlarının yapılabileceği yer, teknik ekipman, sarf malzemesi ve insan gücüne sahip olunması gereklidir.

POZİTİF VE NEGATİF SELEKSİYON

Hücreler gRNA kütüphanesiyle transfekte edildikten sonra, hücre popülasyonunun pozitif ya da negatif seleksiyonu yapılmalıdır. Pozitif seleksiyon ilaç direnci ile ilişkili genetik değişikliklerin belirlenmesini, negatif seleksiyon ise hücrelerin bağımlı oldukları esansiyel genlerin keşfedilmesi için gerçekleştirilir.

Pozitif seleksiyon için hücreler bir ilaç, toksin veya patojen gibi etkene maruz bırakılarak güçlü seçici bir ortam oluşturulur.[55] Bu ortamda hayatta kalabilen hücreler, koruyucu bir mutasyon oluşumuna bağlı olarak büyüme avantajı kazanmış olan hücrelerdir. Örneğin büyüme avantajı kazanan dirençli kanser hücrelerinde genellikle az sayıdaki gRNA'nın zenginleşmesi beklenir.[56]

Negatif seleksiyondaki amaç, hayatta kalma veya çoğalma olaylarını etkileyerek, hücrelerin tükenmesine neden olan genetik değişiklikleri belirlemektir. Bu yaklaşımda, 2 hücre popülasyonundan biri seçilime tabi tutulurken, diğeri tutulmaz ve çalışmanın kontrol grubunu oluşturur. Çalışmanın sonunda, her iki hücre popülasyonundaki gRNA miktarları karşılaştırılarak seleksiyonla tükenen gRNA'lar tanımlanmaya çalışılır. Negatif seleksiyonun önemli uygulama alanlarından biri kanser hücrelerinin bağımlı oldukları onkojenik mutasyonları tanımlamaktır.[32,57]

DİZİLEME VE BİYOİNFORMATİK ANALİZLER

Bir tarama çalışmasının en son aşaması amplikonun dizilenmesi ve sonrasında fenotip gelişimine neden olan genetik faktörlerin tanımlanması amacıyla biyoinformatik analizlerinin yapılmasıdır.[58] Bu aşamada, farklı CRISPR tabanlı tarama çalışmalara özgü algoritmalar kullanılmaktadır. CRISPRko sonuçlarının analizi için MAGeCK başta olmak üzere BAGEL, RIGER, ScreenBEAM, casTLE, HiTSelect, CERES ve JACKS algoritmaları kullanılmaktadır.[58,59] MAGeCK algoritmasında ham FASTQ verileri kullanılarak gRNA bölgeleriyle eşleştirme yapılır ve negatif bir binom dağılımı uygulanarak her bir gruptaki gRNA okuma sayıları belirlenir.[58,60] Tedavi ve kontrol gruplarındaki gRNA okuma sayıları T0 hücre grubuna göre normalize edilir. Her bir gRNA için *p* değeri ve kat değişimi hesaplandıktan sonra kontrol grubuyla karşılaştırılarak, beta skorlarına göre tükenen ve zenginleşen gRNA'lar ile hedefledikleri aday genler listelenir.[60] Ayrıca bu algoritmanın MAGeCKFlute gibi farklı versiyonlarında taramanın kalite kontrolü, kopya sayısı varyasyon analizi, işlevsel zenginleştirme ve hedef dışı etki analizi de yapılabilmektedir.[58] Esansiyel olan ve olmayan genleri belirlemek için kullanılan BAGEL algoritması, gRNA dağılımlarını kullanarak her bir gen için Bayes faktörü hesaplar. Bayes faktörü sıralamasına göre de fenotipten sorumlu esansiyel genler sıralanır.[61] JACKS algoritması aynı gRNA kütüphanesini kullanan çoklu taramalarda gRNA etkinliklerini belirleyen bir Bayes yöntemi olarak kullanılır.[62] Kanser hücrelerinin bağımlı oldukları genleri belirlemek için kullanılan CERES algoritmasında tükenen gRNA'lar ve kopya sayısı varyasyonları değerlendirilir.[63]

CRISPRa ve CRISPRi tarama çalışmalarının sonunda elde edilen NGS verileri CRISPhieRmix algoritması ile analiz edilir. Bu algoritmada, DESeq2 yazılımı ile negatif kontrol gRNA'ları kullanılarak boş bir dağılım oluşturulur. Genlere özgü gRNA dağılımları $\log_2$ kat değişimlerine göre hesaplanarak karışım dağılımı yapılır ve bu dağılıma göre aday genler belirlenir.[64]

CRISPR-Cas9 FONKSİYONEL GENETİK TARAMA UYGULAMALARI

CRISPR-Cas9 temelli fonksiyonel genetik tarama çalışmaları, enfeksiyon hastalıklarında virüs-konakçı etkileşimlerinin araştırılmasını ve yeni antiviral hedeflerin ortaya konmasını sağlamaktadır.[65] Örneğin koronavirüs enfeksiyonu için gerekli konak faktörlerini belirlemek amacıyla *Brunello* kütüphanesi kullanılarak yapılan tüm genom CRISPRko tarama çalışmasında, SARS-CoV-2 virüsünün insan hücrelerini enfekte edebilmesi için hücrelerin lizozomal bir proteini kodlayan *TMEM106B* genini eksprese etmeleri gerektiği gösterilmiştir.[66]

CRISPR taramaları, başta kanser olmak üzere, hastalığa bağlı olarak hücrelerin hayatta kalabilmeleri için gerekli olan, hastalık gelişiminden sorumlu genetik faktörlerin tanımlanması ve fonksiyonlarının belirlenmesi için kullanılmaktadır.[67] Tarama çalışmalarının sonunda genotip-fenotip ilişkinin belirlenmesiyle hastalığın progresyonundan sorumlu genetik faktörler ve yeni ilaç hedefleri ortaya çıkarılır. Örneğin lösemi hücreleriyle yapılan tüm genom CRISPRi tarama çalışmasında, immün kontrol noktası reseptörlerinden Siglec-7'nin yeni bir ligandı belirlenmiş ve bunun kanser immünoterapisi için potansiyel bir hedef olabileceği bildirilmiştir.[68] Prostat kanseri hücrelerinde GeCKO v2 kütüphanesi kullanılarak yapı-

lan bir CRISPRko tarama çalışmasında ise RNA "splaysing" faktörlerinden heterojen nükleer ribonükleoprotein L'nin kanser büyümesinde etkili olduğu ve ilaç hedefi olarak kullanılabileceği bildirilmiştir.[69] Potansiyel terapötik hedef olarak tanımlanan bu faktörlere özgü yeni ilaçların geliştirilmesi, kişiselleştirilmiş tedavilerin yaygınlaşmasına da katkı sağlayacaktır.

Yeni terapötik hedeflerin belirlenmesinin yanında, kanser tedavisi sırasında gelişen kemoterapi direncine neden olan faktörlerin tanımlanması da fonksiyonel tarama çalışmalarının kullanım alanlarından birini oluşturmuştur.[70] Bu taramalar, dirençli hücreleri yeniden tedaviye duyarlı hâle getiren hedeflerin belirlenmesi ve kemoterapi sırasında gelişen ilaç direncinin biyolojik mekanizmasının aydınlatılmasında faydalıdırlar. Ayrıca bir bileşiğin etki mekanizmasını ve moleküler hedeflerini belirlemek için de kullanılabilmektedir.[71] Örneğin mesane kanseri hücrelerinde *GeCKO* kütüphanesi kullanılarak yapılan bir tarama çalışmasında; *MSH2, MLH1, FAM89B, XPC* ve *PMS2* aday genleri belirlenmiş ve validasyon çalışmalarında *MSH2* geninin sisplatin direnci gelişiminde etkili olduğu gösterilmiştir.[72] Glioblastoma hücrelerinde sırasıyla GeCKO-V2 ve "human CRISPR activation (SAM)" kütüphaneleri kullanılarak yapılan CRISPRko ve CRISPRa tarama çalışmalarında; *MSH2, PTCH2*, *CLCA2* genleri ile nükleer faktör eritroid 2 ve Wnt yolaklarının temozolomid direnciyle ilişkili oldukları belirlenmiştir.[73]

CRISPR temelli tarama çalışmalarının kullanıldığı bir diğer alan da yine başta kanser olmak üzere, in vivo hastalık modellerinin oluşturulmasıdır. Bir hastanın tümör dokusundaki genomik bilgi kullanılarak oluşturulan CRISPR kütüphanesiyle o hastaya özgü kanser modellemesi yapılabilmektedir. Bu şekilde oluşturulan kişiselleştirilmiş kanser modelleriyle ilgili tümörün profili belirlenebilmekte ve bireysel tedavi seçenekleri araştırılabilmektedir.[74]

İn vitro koşullarda gerçekleştirilen çok sayıdaki CRISPR-Cas9 temelli tarama çalışmasında, başarılı sonuçların elde edilmiş olunmasıyla birlikte immünmikroçevre-kanser gibi daha karmaşık etkileşimlerin henüz araştırılamıyor olması sistemin kısıtlayıcı yönünü oluşturmaktadır. Bunun için gRNA kütüphanelerinin in vivo hayvan modelleri ve Cas9 endonükleazını ifade eden doku organoidlere transfekte edilebildiği daha gelişmiş sistemlerin geliştirilmesi gerekmektedir.[75]

Finansal Kaynak

Bu çalışma, TÜBİTAK Kurulu tarafından onaylanmış (Proje no: 119Z280/1001) ve TÜBİTAK araştırma fonunca desteklenmiştir.

Çıkar Çatışması

Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyeliği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.

Yazar Katkıları

Fikir/Kavram: *Hale Güler Kara;* ***Tasarım:*** *Vildan Bozok Çetintaş;* ***Denetleme/Danışmanlık:*** *Şerif Şentürk;* ***Veri Toplama ve/veya İşleme:*** *Eda Doğan;* ***Analiz ve/veya Yorum:*** *Buket Kosova;* ***Kaynak Taraması:*** *Hale Güler Kara;* ***Makalenin Yazımı:*** *Hale Güler Kara;* ***Eleştirel İnceleme:*** *Vildan Bozok Çetintaş, Buket Kosova, Şerif Şentürk;* ***Kaynaklar ve Fon Sağlama:*** *Buket Kosova, Vildan Bozok Çetintaş.*

KAYNAKLAR

1. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. Science. 2007;315(5819):1709-12. [Crossref] [PubMed]
2. Barrangou R, Marraffini LA. CRISPR-Cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. Mol Cell. 2014;54(2):234-44. [Crossref] [PubMed] [PMC]
3. Makarova KS, Wolf YI, Iranzo J, Shmakov SA, Alkhnbashi OS, Brouns SJJ, et al. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. Nat Rev Microbiol. 2020;18(2):67-83. [Crossref] [PubMed] [PMC]
4. Taylor HN, Laderman E, Armbrust M, Hallmark T, Keiser D, Bondy-Denomy J, et al. Positioning diverse Type IV structures and functions within class 1 CRISPR-cas systems. Front Microbiol. 2021;12:671522. [Crossref] [PubMed] [PMC]
5. East-Seletsky A, O'Connell MR, Burstein D, Knott GJ, Doudna JA. RNA targeting by functionally orthogonal type VI-A CRISPR-cas enzymes. Mol Cell. 2017;66(3):373-83.e3. [Crossref] [PubMed] [PMC]
6. Jiang F, Doudna JA. CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. Annu Rev Biophys. 2017;46:505-29. [Crossref] [PubMed]
7. Szczelkun MD, Tikhomirova MS, Sinkunas T, Gasiunas G, Karvelis T, Pschera P, et al. Direct observation of R-loop formation by single RNA-guided Cas9 and Cascade effector complexes. Proc Natl Acad Sci US A. 2014;111(27):9798-803. [Crossref] [PubMed] [PMC]

8. Doudna JA. The promise and challenge of therapeutic genome editing. Nature. 2020;578(7794):229-36. [Crossref] [PubMed] [PMC]
9. Paquet D, Kwart D, Chen A, Sproul A, Jacob S, Teo S, et al. Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9. Nature. 2016;533(7601):125-9. [Crossref] [PubMed]
10. Janz A, Zink M, Cirnu A, Hartleb A, Albrecht C, Rost S, et al. CRISPR/Cas9-edited PKP2 knock-out (JMUi001-A-2) and DSG2 knock-out (JMUi001-A-3) iPSC lines as an isogenic human model system for arrhythmogenic cardiomyopathy (ACM). Stem Cell Res. 2021;53: 102256. [Crossref] [PubMed]
11. Detsika MG, Goudevenou K, Geurts AM, Gakiopoulou H, Grapsa E, Lianos EA. Generation of a novel decay accelerating factor (DAF) knock-out rat model using clustered regularly-interspaced short palindromic repeats, (CRISPR)/associated protein 9 (Cas9), genome editing. Transgenic Res. 2021;30(1):11-21. [Crossref] [PubMed]
12. Dara M, Razban V, Talebzadeh M, Moradi S, Dianatpour M. Using CRISPR/Cas9 system to knock out exon 48 in DMD gene. Avicenna J Med Biotechnol. 2021;13(2):54-7. [Crossref] [PubMed] [PMC]
13. Schlager S, Salomon C, Olt S, Albrecht C, Ebert A, Bergner O, et al. Inducible knock-out of BCL6 in lymphoma cells results in tumor stasis. Oncotarget. 2020;11(9):875-90. [Crossref] [PubMed] [PMC]
14. Skvarova Kramarzova K, Osborn MJ, Webber BR, DeFeo AP, McElroy AN, Kim CJ, et al. CRISPR/Cas9-Mediated Correction of the FANCD1 Gene in Primary Patient Cells. Int J Mol Sci. 2017;18(6):1269. [Crossref] [PubMed] [PMC]
15. Chavez A, Scheiman J, Vora S, Pruitt BW, Tuttle M, P R Iyer E, et al. Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. Nat Methods. 2015;12(4):326-8. [Crossref] [PubMed] [PMC]
16. Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Essletzbichler P, Han S, Joung J, Belanto JJ, Verdine V, Cox DBT, Kellner MJ, Regev A, Lander ES, Voytas DF, Ting AY, Zhang F. RNA targeting with CRISPR-Cas13. Nature. 2017;550(7675):280-4. [Crossref] [PubMed] [PMC]
17. Xie N, Zhou Y, Sun Q, Tang B. Novel epigenetic techniques provided by the CRISPR/Cas9 system. Stem Cells Int. 2018;2018:7834175. [Crossref] [PubMed] [PMC]
18. Kang JG, Park JS, Ko JH, Kim YS. Regulation of gene expression by altered promoter methylation using a CRISPR/Cas9-mediated epigenetic editing system. Sci Rep. 2019;9(1):11960. [Crossref] [PubMed] [PMC]
19. Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, Packer MS, Badran AH, Bryson DI, et al. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. Nature. 2017;551(7681):464-71. Erratum in: Nature. 2018. [Crossref] [PubMed] [PMC]
20. Koblan LW, Doman JL, Wilson C, Levy JM, Tay T, Newby GA, et al. Improving cytidine and adenine base editors by expression optimization and ancestral reconstruction. Nat Biotechnol. 2018;36(9):843-6. [Crossref] [PubMed] [PMC]
21. Anzalone AV, Koblan LW, Liu DR. Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. Nat Biotechnol. 2020;38(7):824-44. [Crossref] [PubMed]
22. Anzalone AV, Randolph PB, Davis JR, Sousa AA, Koblan LW, Levy JM, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. Nature. 2019;576(7785):149-57. [Crossref] [PubMed] [PMC]
23. Chemello F, Chai AC, Li H, Rodriguez-Caycedo C, Sanchez-Ortiz E, Atmanli A, et al. Precise correction of Duchenne muscular dystrophy exon deletion mutations by base and prime editing. Sci Adv. 2021;7(18):eabg4910. [Crossref] [PubMed] [PMC]
24. Anzalone AV, Gao XD, Podracky CJ, Nelson AT, Koblan LW, Raguram A, et al. Programmable deletion, replacement, integration and inversion of large DNA sequences with twin prime editing. Nat Biotechnol. 2022;40(5):731-40. [Crossref] [PubMed] [PMC]
25. Wu X, Mao S, Ying Y, Krueger CJ, Chen AK. Progress and challenges for live-cell imaging of genomic loci using CRISPR-based platforms. Genomics Proteomics Bioinformatics. 2019;17(2):119-28. [Crossref] [PubMed] [PMC]
26. Chen B, Deng S, Ge T, Ye M, Yu J, Lin S, et al. Live cell imaging and proteomic profiling of endogenous NEAT1 lncRNA by CRISPR/Cas9-mediated knock-in. Protein Cell. 2020;11(9):641-60. [Crossref] [PubMed] [PMC]
27. Chen B, Gilbert LA, Cimini BA, Schnitzbauer J, Zhang W, Li GW, et al. Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system. Cell. 2013;155(7):1479-91. Erratum in: Cell. 2014;156(1-2):373. [Crossref] [PubMed] [PMC]
28. Freije CA, Myhrvold C, Boehm CK, Lin AE, Welch NL, Carter A, et al. Programmable inhibition and detection of RNA viruses using Cas13. Mol Cell. 2019;76(5):826-37.e11. [Crossref] [PubMed] [PMC]
29. Joung J, Ladha A, Saito M, Kim NG, Woolley AE, Segel M, et al. Detection of SARS-CoV-2 with SHERLOCK one-pot testing. N Engl J Med. 2020;383(15):1492-4. [Crossref] [PubMed] [PMC]
30. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. Nature. 1998;391(6669):806-11. [Crossref] [PubMed]
31. Moffat J, Sabatini DM. Building mammalian signalling pathways with RNAi screens. Nat Rev Mol Cell Biol. 2006;7(3):177-87. [Crossref] [PubMed]
32. Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, Shi X, Scott DA, Mikkelson T, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. Science. 2014;343(6166):84-7. [Crossref] [PubMed] [PMC]
33. Agrotis A, Ketteler R. A new age in functional genomics using CRISPR/Cas9 in arrayed library screening. Front Genet. 2015;6:300. [Crossref] [PubMed] [PMC]
34. Datlinger P, Rendeiro AF, Schmidl C, Krausgruber T, Traxler P, Klughammer J, et al. Pooled CRISPR screening with single-cell transcriptome readout. Nat Methods. 2017;14(3):297-301. [Crossref] [PubMed] [PMC]
35. Joung J, Konermann S, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Platt RJ, Brigham MD, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout and transcriptional activation screening. Nat Protoc. 2017;12(4):828-63. Erratum in: Nat Protoc. 2019;14(7):2259. [Crossref] [PubMed] [PMC]
36. Hart T, Chandrashekhar M, Aregger M, Steinhart Z, Brown KR, MacLeod G, et al. High-resolution CRISPR screens reveal fitness genes and genotype-specific cancer liabilities. Cell. 2015;163(6):1515-26. [Crossref] [PubMed]
37. Kampmann M. CRISPRi and CRISPRa screens in mammalian cells for precision biology and medicine. ACS Chem Biol. 2018;13(2):406-16. [Crossref] [PubMed] [PMC]
38. Tanenbaum ME, Gilbert LA, Qi LS, Weissman JS, Vale RD. A protein-tagging system for signal amplification in gene expression and fluorescence imaging. Cell. 2014;159(3):635-46. [Crossref] [PubMed] [PMC]
39. Klann TS, Black JB, Chellappan M, Safi A, Song L, Hilton IB, et al. CRISPR-Cas9 epigenome editing enables high-throughput screening for functional regulatory elements in the human genome. Nat Biotechnol. 2017;35(6):561-8. [Crossref] [PubMed] [PMC]
40. Radzisheuskaya A, Shlyueva D, Müller I, Helin K. Optimizing sgRNA position markedly improves the efficiency of CRISPR/dCas9-mediated transcriptional repression. Nucleic Acids Res. 2016;44(18):e141. [Crossref] [PubMed] [PMC]
41. Horlbeck MA, Gilbert LA, Villalta JE, Adamson B, Pak RA, Chen Y, et al. Compact and highly active next-generation libraries for CRISPR-mediated gene repression and activation. Elife. 2016;5:e19760. [Crossref] [PubMed] [PMC]

42. Addgene [Internet]. [Cited: December 12, 2021]. Pooled libraries. Available from: [Link]
43. Doench JG, Fusi N, Sullender M, Hegde M, Vaimberg EW, Donovan KF, et al. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. Nat Biotechnol. 2016;34(2):184-91. [Crossref] [PubMed] [PMC]
44. Otten ABC, Sun BK. Research Techniques made simple: CRISPR genetic screens. J Invest Dermatol. 2020;140(4):723-8.e1. [Crossref] [PubMed] [PMC]
45. Gonçalves E, Thomas M, Behan FM, Picco G, Pacini C, Allen F, et al. Minimal genome-wide human CRISPR-Cas9 library. Genome Biol. 2021;22(1):40. [Crossref] [PubMed] [PMC]
46. Iyer VS, Jiang L, Shen Y, Boddul SV, Panda SK, Kasza Z, et al. Designing custom CRISPR libraries for hypothesis-driven drug target discovery. Comput Struct Biotechnol J. 2020;18:2237-46. [Crossref] [PubMed] [PMC]
47. Haapaniemi E, Botla S, Persson J, Schmierer B, Taipale J. CRISPR-Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. Nat Med. 2018;24(7):927-30. [Crossref] [PubMed]
48. Doench JG. Am I ready for CRISPR? A user's guide to genetic screens. Nat Rev Genet. 2018;19(2):67-80. [Crossref] [PubMed]
49. Luther DC, Lee YW, Nagaraj H, Scaletti F, Rotello VM. Delivery approaches for CRISPR/Cas9 therapeutics in vivo: advances and challenges. Expert Opin Drug Deliv. 2018;15(9):905-13. [Crossref] [PubMed] [PMC]
50. Liu C, Zhang L, Liu H, Cheng K. Delivery strategies of the CRISPR-Cas9 gene-editing system for therapeutic applications. J Control Release. 2017;266:17-26. [Crossref] [PubMed] [PMC]
51. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. Nat Protoc. 2013;8(11):2281-308. [Crossref] [PubMed] [PMC]
52. Sun BK, Boxer LD, Ransohoff JD, Siprashvili Z, Qu K, Lopez-Pajares V, et al. CALML5 is a ZNF750- and TINCR-induced protein that binds stratifin to regulate epidermal differentiation. Genes Dev. 2015;29(21):2225-30. [Crossref] [PubMed] [PMC]
53. Schumann K, Lin S, Boyer E, Simeonov DR, Subramaniam M, Gate RE, et al. Generation of knock-in primary human T cells using Cas9 ribonucleoproteins. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112(33):10437-42. [Crossref] [PubMed] [PMC]
54. Shang W, Wang F, Fan G, Wang H. Key elements for designing and performing a CRISPR/Cas9-based genetic screen. J Genet Genomics. 2017;44(9):439-49. [Crossref] [PubMed]
55. Donovan KF, Hegde M, Sullender M, Vaimberg EW, Johannessen CM, Root DE, et al. Creation of novel protein variants with CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis: turning a screening by-product into a discovery tool. PLoS One. 2017;12(1):e0170445. [Crossref] [PubMed] [PMC]
56. Sharma S, Petsalaki E. Application of CRISPR-Cas9 based genome-wide screening approaches to study cellular signalling mechanisms. Int J Mol Sci. 2018;19(4):933. [Crossref] [PubMed] [PMC]
57. Wang T, Birsoy K, Hughes NW, Krupczak KM, Post Y, Wei JJ, et al. Identification and characterization of essential genes in the human genome. Science. 2015;350(6264):1096-101. [Crossref] [PubMed] [PMC]
58. Wang B, Wang M, Zhang W, Xiao T, Chen CH, Wu A, et al. Integrative analysis of pooled CRISPR genetic screens using MAGeCKFlute. Nat Protoc. 2019;14(3):756-80. [Crossref] [PubMed] [PMC]
59. Bodapati S, Daley TP, Lin X, Zou J, Qi LS. A benchmark of algorithms for the analysis of pooled CRISPR screens. Genome Biol. 2020;21(1):62. [Crossref] [PubMed] [PMC]
60. Hanna RE, Doench JG. Design and analysis of CRISPR-Cas experiments. Nat Biotechnol. 2020;38(7):813-23. [Crossref] [PubMed]
61. Hart T, Moffat J. BAGEL: a computational framework for identifying essential genes from pooled library screens. BMC Bioinformatics. 2016;17:164. [Crossref] [PubMed] [PMC]
62. Allen F, Behan F, Khodak A, Iorio F, Yusa K, Garnett M, et al. JACKS: joint analysis of CRISPR/Cas9 knockout screens. Genome Res. 2019;29(3):464-71. [Crossref] [PubMed] [PMC]
63. Meyers RM, Bryan JG, McFarland JM, Weir BA, Sizemore AE, Xu H, et al. Computational correction of copy number effect improves specificity of CRISPR-Cas9 essentiality screens in cancer cells. Nat Genet. 2017;49(12):1779-84. [Crossref] [PubMed] [PMC]
64. Daley TP, Lin Z, Lin X, Liu Y, Wong WH, Qi LS. CRISPhieRmix: a hierarchical mixture model for CRISPR pooled screens. Genome Biol. 2018;19(1):159. [Crossref] [PubMed] [PMC]
65. Chulanov V, Kostyusheva A, Brezgin S, Ponomareva N, Gegechkori V, Volchkova E, et al. CRISPR screening: molecular tools for studying virus-host interactions. Viruses. 2021;13(11):2258. [Crossref] [PubMed] [PMC]
66. Baggen J, Persoons L, Vanstreels E, Jansen S, Van Looveren D, Boeckx B, et al. Genome-wide CRISPR screening identifies TMEM106B as a proviral host factor for SARS-CoV-2. Nat Genet. 2021;53(4):435-44. [Crossref] [PubMed]
67. Xue HY, Ji LJ, Gao AM, Liu P, He JD, Lu XJ. CRISPR-Cas9 for medical genetic screens: applications and future perspectives. J Med Genet. 2016;53(2):91-7. [Crossref] [PubMed]
68. Wisnovsky S, Möckl L, Malaker SA, Pedram K, Hess GT, Riley NM, et al. Genome-wide CRISPR screens reveal a specific ligand for the glycan-binding immune checkpoint receptor Siglec-7. Proc Natl Acad Sci U S A. 2021;118(5):e2015024118. [PubMed] [PMC]
69. Fei T, Chen Y, Xiao T, Li W, Cato L, Zhang P, et al. Genome-wide CRISPR screen identifies HNRNPL as a prostate cancer dependency regulating RNA splicing. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017;114(26):E5207-E15. [Crossref] [PubMed] [PMC]
70. Kurata M, Yamamoto K, Moriarity BS, Kitagawa M, Largaespada DA. CRISPR/Cas9 library screening for drug target discovery. J Hum Genet. 2018;63(2):179-86. [Crossref] [PubMed]
71. Adelmann CH, Wang T, Sabatini DM, Lander ES. Genome-wide CRISPR/Cas9 screening for identification of cancer genes in cell lines. Methods Mol Biol. 2019;1907:125-36. [Crossref] [PubMed]
72. Goodspeed A, Jean A, Costello JC. A whole-genome CRISPR screen identifies a Role of MSH2 in cisplatin-mediated cell death in muscle-invasive bladder cancer. Eur Urol. 2019;75(2):242-50. [Crossref] [PubMed] [PMC]
73. Rocha CRR, Reily Rocha A, Molina Silva M, Rodrigues Gomes L, Teatin Latancia M, Andrade Tomaz M, et al. Revealing temozolomide resistance mechanisms via genome-wide CRISPR libraries. Cells. 2020;9(12):2573. [Crossref] [PubMed] [PMC]
74. Chow RD, Chen S. Cancer CRISPR screens in vivo. Trends Cancer. 2018;4(5):349-58. [Crossref] [PubMed] [PMC]
75. Ungricht R, Guibbal L, Lasbennes MC, Orsini V, Beibel M, Waldt A, et al. Genome-wide screening in human kidney organoids identifies developmental and disease-related aspects of nephrogenesis. Cell Stem Cell. 2022;29(1):160-75.e7. [Crossref] [PubMed]