

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**REPAIRv1 [dPspCas13b-ADAR2DD (E488Q)] İLE MEMELİ HÜCRELERİNDE
GEN ÇEŞİTLENDİRİLMESİ**

Mustafa ÖZKAN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2024**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

REPAIRv1 [dPspCas13b-ADAR2DD (E488Q)] İLE MEMELİ HÜCRELERİNDE
GEN ÇEŞİTLENDİRİLMESİ

Mustafa ÖZKAN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Reyhan ÇOLAK

2018 Nobel Kimya Ödülü, protein mühendisliği alanındaki araştırmalara verilmiştir, var olan bir proteinin veya enzimin genlerini yeniden yazarak, daha etkili veya yeni işlevli protein geliştirmeye dayanan yöntemler geliştirmişlerdir. Protein mühendisliği alanındaki çalışmalarda ortam olarak mikroorganizmalar veya in-vitro sistemler kullanılmıştır. Söz konusu memeli proteinleri geliştirmek olunca, bu tür ortamlarda geliştirilmiş proteinler memeli hücrelerinde ifade edildiğinde yanlış katlanma veya kümelenmeler meydana gelmiştir. Mikroorganizmalar veya in-vitro sistemler, memeli hücrelerine özgü karmaşık sinyal yollarının olmaması, moleküller arası etkileşimler, zayıf katlanma, beklenmedik modifikasyonlar, DNA, RNA ve proteinlerin işlenişi, hücresel lokalizasyon sorunları vb. fizyolojik ve biyokimyasal sebeplerden dolayı uygun ortam oluşturmazlar. Bu ve benzeri sorunlar, araştırmacıları memeli hücrelerini doğrudan mühendislik alanı (evrimleşme alanı) olarak kullanmaya itmiştir. Memeli hücrelerinin başlıca zorlukları teknik, ekonomik ve pratik olmayan yöntemleri içerir. Memeli hücrelerindeki en önemli engeller muazzam genom büyüklüğü ve yavaş büyüme hızıdır. Genomun muazzam büyüklüğü bölgeye yönelik stratejilerin gelişmesine yol açmıştır. Bu tekniklerden en önemlilerinden bir tanesi 2020 Nobel Kimya ödülüne konu olan CRISPR teknolojidir. Tezin amacı memeli hücrelerinde çalışmanın zamansal maliyetini ortadan kaldırmaktır. RNA'yı hedef alan CRISPR enzimleri ve lentiviral gen taşıma sistemleri ile memeli hücrelerinde programlanabilen bir yöntem geliştirilmiştir. Bu programlanabilir sistemin en önemli özelliği, memeli hücrelerinin bölünmesinin yavaş olması durumunu ortadan kaldırmasıdır. RNA'yı hedef alan CRISPR enzimleri ile tek bir jenerasyonda (pasajda) hiç durmaksızın sürekli çok çeşitli varyant üretir ve bu varyantları, virüs aracılığı ile paketleyip, (kimerik antijen reseptörü) CAR-T yapıları oluşturur. Mevcut konjonktürde var olan sistemlerden verimli ve geniş varyant aralığına sahip, teknik, pratik ve ekonomik olarak uygun bir hücre içi programlanabilen yöntemi geliştirilmiştir.

Şubat 2024, 168 sayfa

Anahtar Kelimeler: CRISPR, CAR-T, Lentiviral gen taşıma sistemi, Protein mühendisliği, Evrim, Bölgeye yönelik mutagenез

ABSTRACT

Master's Thesis

GENE DIVERSIFICATION IN MAMMALIAN CELLS WITH REPAIR_{v1}
[dPspCas13b-ADAR2DD (E488Q)]

Mustafa ÖZKAN

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Reyhan ÇOLAK

The 2018 Nobel Prize in Chemistry was awarded to research in the field of protein engineering, which developed methods based on developing more effective or new functional proteins by rewriting the genes of an existing protein or enzyme. Microorganisms or in-vitro systems have been used as a platform in studies in the field of protein engineering. When it comes to developing mammalian proteins, misfolding or aggregation occurs when proteins developed in such environments are expressed in mammalian cells. Microorganisms or in vitro systems lack complex signaling pathways specific to mammalian cells, intermolecular interactions, poor folding, unexpected modifications, processing of DNA, RNA and proteins, cellular localization problems, etc. They do not create a suitable platform due to physiological and biochemical reasons. These and similar problems have led researchers to use mammalian cells as a direct engineering platform (evolution platform). Major challenges with mammalian cells include technical, economical, and impractical methods. The major obstacles in mammalian cells are the enormous genome size and slow growth rate. The enormous size of the genome has led to the development of strategies for the site-directed. One of the most important of these techniques is CRISPR technology, which is the subject of the 2020 Nobel Prize in Chemistry. The aim of the thesis is to eliminate the time cost of working in mammalian cells. A programmable methodology was developed using CRISPR enzymes (targeting RNA) and lentiviral gene delivery in mammalian cells. The most important feature of this programmable system is that it eliminates the slow division of mammalian cells. It constantly produces a wide variety of variants in a single generation (passage) with CRISPR enzymes targeting RNA and packages these variants through the virus and creates CAR-T structures (chimeric antigen receptor). A technically, practically and economically suitable in-cell programmable methodology has been developed that is efficient and has a wide range of variants from existing platform in the current conjuncture.

February 2024, 168 pages

Keywords: CRISPR, CAR-T, Lentiviral gene delivery system, Protein engineering, Evolution, Site-directed mutagenesis

TEŞEKKÜR

Çalıőmalarımı yönlendiren, araőtırmalarımın her aőamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek akademik ortamda olduğu kadar güncel hayattaki ilişkilerde de engin fikirleriyle yetişme ve gelişmeme katkıda bulunan danışman hocam sayın Prof. Dr. Reyhan ÇOLAK'a, çalıőmalarım süresince maddi manevi desteklerini esirgemeyen Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Dr. Öğretim üyesi Mutlu ERDOĞAN'a ve Erdoğan labaratuvar ekibine, Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Viroloji BD BSL3 Laboratuvarı ve Prof. Dr. Aykut ÖZKUL'a, çalıőmalarım süresince birçok fedakârlıklar göstererek beni destekleyen ailem ve dostlarıma en derin duygularla teşekkür ederim.

Mustafa ÖZKAN
Ankara, Şubat 2024

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	
ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	6
2.1 RNA Düzenlemeye Giriş	6
2.1.1 Baz değişikliği ile RNA düzenleme	6
2.1.1.1 Sitidin deaminasyonu ile düzenleme	8
2.1.1.1.1 Apolipoprotein B mRNA	9
2.1.2 Adenozin deaminasyonu ile düzenleme	11
2.1.2.1 ADAR proteinleri ve katalitik mekanizmaları.....	11
2.1.2.2 ADAR özgülüğü	13
2.1.2.3 Memeli glutamat reseptörü mRNA'sı.....	15
2.1.2.4 Hepatit delta virüsü antigenomik RNA	16
2.1.3 Ekleme/silme ile RNA düzenlenmesi.....	17
2.1.3.1 Trypanosomatid protozoa'da düzenleme	17
2.1.3.1.1 U ekleme/silme RNA düzenlemesinin katalitik mekanizması.....	18
2.1.4 Bitkilerde RNA düzenleme	20
2.2 Memeli Hücrelerinde Yönlendirilmiş Evrim	21
2.2.1 Memeli hücrelerine dayalı yönlendirilmiş evrimin genel ilkeleri	23
2.2.1.1 Mutajenez	23
2.2.1.2 İfade.....	24
2.2.1.3 Seçim veya eleme.....	25
2.2.2 Memeli hücrelerine yönelik yönlendirilmiş evrim	25
2.2.2.1 Somatik hipermutasyon	26
2.2.2.2 RNA kılavuzlu endonükleazlar tarafından hedeflenen mutajenez.....	27
2.2.2.3 Prosesif hedefli mutajenez	29
2.2.2.4 Memeli hücrelerinde virüs bazlı sürekli yönlendirilmiş evrim.....	30
2.3 RNA Düzenlemenin Bugünü	32
2.3.1 Yapay RNA düzenleme sistemlerine genel bakış	33
2.3.2 Siteye yönelik RNA düzenleme: popüler araçlar	35
2.3.2.1 Siteye yönelik RNA düzenleme (SYRD).....	37
2.3.2.2 RNA düzenlemede Siteye yönelik bazı güncel stratejiler	38
2.3.2.2.1 λ N-füzyonları	38
2.3.2.2.2 SNAP-ADAR	39
2.3.2.2.3 MS2-MCP-ADAR	41
2.3.2.3 SYRD için CRISPR-Cas13 yaklaşımları.....	43
2.3.2.3.1 REPAIR.....	43

2.3.2.3.2 RESCUE	44
2.3.2.3.3 CURE	45
2.3.2.3.4 CIRTS	47
2.3.2.3.5 GluR2-ADAR	48
2.3.2.3.6 RESTORE	49
2.3.2.3.7 LEAPER	50
2.4 Kısaca CRISPR	51
2.4.1 CRISPR	51
2.4.2 CAS ve PAM	52
2.4.3 Programlanabilir bağışıklığın varsayımsal şeması	52
2.4.4 Programlanabilir bağışıklığın deneysel gösterimi	52
2.4.5 Aralayıcı diziler kılavuz RNA'lara kopyalanır	53
2.4.6 CRISPR DNA hedeflerine etki eder	53
2.4.7 Cas9 hedef DNA'yı parçalıyor	53
2.4.8 Cas9 sistemi için tracrRNA'nın keşfi	53
2.4.9 CRISPR sistemleri diğer türlerde heterolog olarak çalışabilir	54
2.4.10 Cas9 aracılı bölünmenin biyokimyasal karakterizasyonu	54
2.4.11 Genom düzenleme için CRISPR-Cas9 kullanılması ve son CRIPSR gelişmeleri.....	55
2.5 Tip VI CRISPR Sistemleri RNA'yı Hedefler	56
2.5.1 Cas13 proteini	57
2.5.1.1 Cas13a proteini.....	58
2.5.1.2 Cas13b proteini	59
2.5.1.3 Cas13c proteini.....	59
2.5.1.4 Cas13d proteini	60
2.5.2 Cas13b RNA editörlerinin in-vitro ve hücre içi programlanması	60
3. MATERYAL ve YÖNTEM	62
3.1 Materyal.....	62
3.1.1 Tez boyunca kullanılan malzemeler ve cihazlar	62
3.1.2 Tez boyunca kullanılan cihazlar	63
3.1.3 Memeli hücreleri	65
3.1.4 Bakteri suşları.....	66
3.1.5 Plazmitler	66
3.1.6 Oligonükleotit ve primerler	66
3.2 Yöntem.....	68
3.2.1 PEG yoğunlaştırıcı	68
3.2.2 Ultra-yetkili E. coli hücrelerinin hazırlanması ve transformasyonu için inoue (Modifiye) yöntemi.....	68
3.2.3 SLICE özü hazırlanması (Bakteriyel Suşu JM109) ve klonlaması	69
3.2.4 SOB (Süper Optimal Broth) ortamının hazırlanması.....	71
3.2.5 Luria-Bertani (LB) medya hazırlanması.....	71
3.2.6 Q5® yüksek kaliteli DNA polimeraz (M0491) ve polimeraz zincir reaksiyonu.....	72
3.2.7 Taq DNA polimeraz, rekombinant (5 U/μL) (EP0401) ve polimeraz zincir reaksiyonu	73

3.2.8 Pozitif kolonilerin çoğaltılması ve saflaştırılması.....	73
3.2.9 Polimeraz zincir reaksiyonu sonucu oluşan ürünlerin temizlenmesi	74
3.2.10 Agaroz jel hazırlanması	75
3.2.11 Klonlamalar	76
3.2.11.1 Flp-In rekombinasyon vektörü ve lentiviral proteinlerinin klonlanması	76
3.2.11.1.1 FRT vektörünün eldesi	77
3.2.11.1.2 GAG-POL dizilerinin polimeraz zincir reaksiyonuyla eldesi.....	78
3.2.11.1.3 FRT vektörü ve GAG-POL proteinlerinin klonlanması	78
3.2.11.1.4 Transformasyon ve ekim	79
3.2.11.1.5 Koloni taraması.....	79
3.2.11.2 FRT-GAG-POL plazmidine VSV-G proteini klonlanması	81
3.2.11.2.1 FRT-GAG-POL vektörünün oluşturulması	81
3.2.11.2.2 Doğrusallaştırılmış ürününün saflaştırılması	81
3.2.11.2.3 VSV-G zarf proteinin eldesi	82
3.2.11.2.4 FRT-GAG-POL vektörü ve VSV-G dizilerinin klonlanması	82
3.2.11.2.5 Transformasyon ve ekim	83
3.2.11.2.6 Koloni taraması.....	83
3.2.11.3 Lentiviral genom tasarımı ve Pspdcas13b hedeflerinin oluşturulması	85
3.2.11.3.1 Lentiviral transgen vektörü eldesi	85
3.2.11.3.2 Ebola virüsü monoklonal antikorundan vH/vL eldesi.....	86
3.2.11.3.3 Lentiviral transgen vektörü, vH ve vL dizilerinin klonlanması	87
3.2.11.3.4 Transformasyon ve ekim	88
3.2.11.3.5 Koloni taraması.....	88
3.2.11.4 Ebov vH/vL 1335992 plasmidi ve mRuby klonlanması	90
3.2.11.4.1 Ebov vH/vL 1335992 vektörün eldesi	90
3.2.11.4.2 mRuby dizisinin eldesi	90
3.2.11.4.3 Ebov vH/vL 1335992 plasmidi ve mRuby klonlanması	91
3.2.12.4.4 Transformasyon ve ekim	92
3.2.12.4.5 Koloni taraması.....	92
3.2.11.5 ebov-vHvL- mRuby-135922 ve FRT-lentiviral proteinler plazmidinin klonlanması	94
3.2.11.5.1 FRT_lentiviral proteinler plazmidinin doğrusallaştırılması	94
3.2.11.5.2 FRT-lentiviral proteinler plazmidini AfeI kesimi ürününün temzilenmesi.....	94
3.2.11.5.3 Ebov_vHvL_ mRuby_135992 plazmidinden lentiviral genomun eldesini	95
3.2.11.5.4 Ebov_vHvL_ mRuby_135992 transgene ve FRT-lentiviral proteinlerin klonlanması	95
3.2.11.5.5 Transformasyon ve ekim	96
3.2.11.5.6 Koloni taraması.....	96
3.2.11.6 NF-κB biyosensörü ve lentiviral transgen klonlaması	98
3.2.11.6.1 Lentiviral transgen vektörünün eldesi	98
3.2.11.6.2 NF-κB biyosensörü dizilerinin eldesi.....	99

3.2.11.6.3 19319 lentiviral vektörü ve NF- κ B biyosensörü dizilerinin klonlaması.....	100
3.2.11.6.4 Transformasyon ve ekim	100
3.2.11.6.5 Koloni taraması.....	100
3.2.12 Aralayıcı RNA ve doğrudan tekrarların tasarlanması ve üretimi	102
3.2.12.1 Aralayıcı RNA ve doğrudan tekrar tasarımı.....	103
3.2.12.2 Aralayıcı RNA ve doğrudan tekrar in-vitro üretimi.....	104
3.2.12.3 Aralayıcı RNA ve doğrudan tekrarların temizlenmesi.....	104
3.2.12.4 Aralayıcı RNA ve doğrudan tekrarların görüntülenmesi	105
3.2.13 Kararlı hücre hatlarının eldesi	106
3.2.13.1 NF- κ B biyosensörünün Jurkat E6 (T hücresi) hattına entegrasyonu	106
3.2.13.1.1 NF- κ B biyosensörü içeren virüslerin eldesi	107
3.2.13.1.2 Saf virüs eldesi.....	108
3.2.13.1.3 NF- κ B biyosensörünün Jurkat (T hücresi) hücre hattına transdüksiyonu	109
3.2.13.1.4 NF- κ B biyosensörü entegre Jurkat (T hücresi) seçilimi.....	109
3.2.13.2 dPspCas13b ve huADAR2 Flp-In TM T-REx TM 293 hücre hattına entegrasyonu	111
3.2.13.2.1 Addgene 103864 plazmidinin PvuI-HF ile yapışkan uçlu doğrusallaştırılması.....	112
3.2.13.2.2 Addgene_103864_PvuI dizilerinin temizlenmesi	112
3.2.13.2.3 Addgene_103864_PvuI dizilerinin Flp-In TM T-REx TM 293 hücre Hattına transfeksiyonu	113
3.2.13.2.4 Addgene_103864_PvuI Flp-In TM T-REx TM 293 Hücre Hattının Seçilimi	113
3.2.13.3 FRT_ebov_vHvL_Lentiviral proteinlerin Flp-In TM T-REx TM 293 hücre hattına entegrasyonu	115
3.2.13.3.1 FRT_ebov_vHvL_Lentiviral proteinleri plazmidi ve pOG44 plazmidinin addgene_103864_PvuI_Flp-In TM T-REx TM 293 hücre hattına transfeksiyonu.....	116
3.2.13.3.2 FRT_ebov_vHvL_Lentiviral proteinleri Addgene_103864_PvuI Flp-In TM T-REx TM 293 hücre hattının seçilimi	117
3.2.13.4 Antijen ifadeleyen hücreler	120
3.2.13.4.1 M_Fall plazmidi, KKKA genomunun M segmentinin Flp-In TM T-REx TM 293 hücre hattına transfeksiyonu	121
3.2.14 dPspCas13 aktivasyonu.....	122
3.2.14.1 dPspCas13 ile düzenlenen hücrelerden RNA izolasyonu	122
3.2.14.2 dPspCas13 ile hücrelerden izole edilmiş düzenlenmiş RNA'lardan cDNA elde edilmesi	123
3.2.14.3 Varyant havuzunu oluşturan cDNA'lar polimeraz zincir reaksiyonuyla çift iplikle DNA elde edilir	125
3.2.14.4 Varyant havuzunun kalitatif tayini (NEB T7 Endonükleaz I)	125
3.2.14.5 Varyant havuzunun kantitatif tayini (sanger dizilemesi).....	128
3.2.15 Tarama.....	131

3.2.15.1 Eş zamanlı RNA düzenlemesi ve virüs paketlemesi ve transdüksiyonu	131
3.2.15.1.1 Virüs titrasyonu	132
3.2.16 Eş zamanlı CAR havuzu ve KKKA M segment inkübasyonu	134
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	138
4.1 Klonlama Verileri.....	138
4.2 Hücre Kültürü Verileri	138
4.3 Dizileme Verileri.....	139
4.4 Tarama Verileri.....	143
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	147
KAYNAKLAR	148

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

CaCl ₂	Kalsiyum klorü
CO ₂	Karbondioksit
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
KCl	Potasyum klorür
KH ₂ OPO ₄	Dipotasyum fosfat
NaCl	Sodyum klorür
NaH ₂ OPO ₄	Disodyum fosfat
NaOH	Sodyum hidroksit
Tris-HCl	Tris-hidroklorür
TAE	Tris Asetikasit EDTA
V	5
C	Karbon
CO ₂	Karbondioksit
HCl	Hidroklorik Asit
NaOH	Sodyumhidroksit
H ₂ SO ₄	Sülfirik Asit
Nm	Nanometre
°C	° Santigrat
Rpm	Dakikada Devir
cm ²	Santimetre Kare
dk	Dakika
g	G kuvveti
kg	Kilogram
M	Molar
mg	Milligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
mm	Milimetre
m ²	Metre kare
ng	Nanogram
nm	Nanometre
pH	Hidrojen potansiyeli
s	Saniye
U	Ünite vb ve benzeri
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
µg/ug	Mikrogram
µL/ul	Mikrolitre
>	Büyüktür
<	Küçüktür
°C	Santigrat (Celsius) derece
%	Yüzde

Kısaltmalar

A	Adenin
AAV	Adeno-ilişkili virüs
ABE	Adenin bazlı düzenleyici
ADAR	Programlanabilir A'dan I'ye Değiştirme için RNA Düzenleme
AID	Aktivasyonun neden olduğu sitidin deaminaz
AMPA	Alfa-amino-3 hidroksil-5-metil-izoksazol-4-propiyonat reseptörleri
ApoB	Apolipoprotein B
APOBEC-1	Apolipoprotein B mRNA düzenleme enzimi, katalitik polipeptit
ARR	ADAR tanıma bölgesi
ArRNA	Sentetik zırhlı RNA
ASO	Antisens oligonükleotidler
ASR	Antisens bölgesi
BCR-AB	Farklılaşmayla ilişkili birçok genin ifadesini düzenleyen transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini modüle eden sekans.
BFP	Mavi flüoresan proteinin
BG	O6-benzil-guanin
BoxB	N proteini (λ N) ve BoxB RNA saç tokası
C	Karbon
C	Sitozin
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
Cas9	CRISPR ile ilişkili yapılar
CasRx	Ruminococcus flavefaciens XPD3002 Cas13d
RfxCas13d	Ruminococcus flavefaciens XPD3002 Cas13d
CBE	Sitidin baz düzenleyicileri
cDNA	Kopya Deoksiribonükleik asit
CIRTS	CRISPR-Cas'tan İlham Alan RNA Hedefleme Sistemi
COA	Siklik oligoadenilatın
CRISPR	Sitozin baz düzenleyicileri
CRISPR	Cüzenli aralıklarla kümelenmiş kısa palindromik tekrarlar
crRNA	CRISPR RNA'sı
CURE	C'den U'ya düzenleme
dCas9	Aktif olmayan Cas9
DMEM	Dulbecco'nun Değiştirilmiş Kartal Ortamı
dPspCas13b	Prevotella sp P5-125 aktif olmayan Cas13b
DSÖ	Dünya sağlık örgütü
dsRBD	Çift sarmallı RNA bağlanma alanını
dsRBM	dsRNA bağlama motifi
dsRNA	Çift zincir RNA
EKA	Ebola Kanamalı Ateşi
EtBr	Ethidium bromide
FBS	Fetal sıgır serumu

FDA	Gıda ve İlaç İdaresi
FpeCas13c	Fusobacterium perfoetens Cas13c
FRT	Flp rekombinaz
G	Guanin
GalNAc	N-asetilgalaktozamin
GAPDH	Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz
GFP	Yeşil floresan proteini
gluR-B	Glutamat reseptörü
gRNA	Kılavuz RNA
HDAg-p24	Hepatit Delta Antijeni p24
HDV	Hepatit delta virüsü
HEPN	Yüksek Ökaryotlar ve Prokaryotlarda Nükleotid bağlama alanı
HNH	Karakteristik histidin ve asparajin kalıntılarından dolayı adlandırılan bir endonükleaz alanı
I	Inositol
KA	Kainate reseptörleri
KKKA	Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi
KRAS	Kirsten sıçan sarkomu virüsü
LB	Luria-Bertani Medya
LwaCas13a	Leptotrichia wadei Cas13a
M	Molar
m6A	N6-metiladenozin
MCP	MS2 kaplama proteini
MEK	Bazal Alt Tip ve MAPK/ERK Kinaz
MgCl2	Magnezyum klorür
miRNA	MikroRNA
MnCl2	Manganez (II) klorür
mPACE	Faj Destekli Sürekli Evrim
mRNA	Mesajcı Ribonükleik asit
MS2	Bakteriyofaj kaplama proteini
msfGFP	Süper katlanmış yeşil floresan proteini
nCas9	Nickase Cas9
NF-kB	Nükleer faktör kapp B
ng	Nanogram
NLS	Nükleer yerelleştirme sinyalleri
NMDA	N-metil-d-aspartat reseptörleri
NUC	Cas9 nükleaz lobu
OD600	Optik yoğunluk 600
ORF	Açık okuma çerçevesini
PACE	Faj destekli sürekli evrim
PAM	Protospacer bitişik motif
PASTE	Siteye Özel Hedefleme Öğeleri Aracılığıyla Programlanabilir Ekleme
PEG	Polietilen glikol
PFS	Protospacer-yan bölge
PguCas13b	Porphyromonas gulae Cas13b
PMA	Phorbol 12-miristat 13-asetat

PspCas13b	Prevotella sp P5-125 Cas13b
PUF	Pumilio RNA bağlayıcı protein ailesi
PZR	Polimeraz zincirleme reaksiyonu
RanCas13b	Riemerella anatipestifer Cas13b
REC	crRNA tanıma lobu
REPAIR	Programlanabilir A'dan I'ye Değişirme için RNA Düzenleme
RESCUE	Spesifik C'den U'ya Değişim için RNA Düzenleme
RESTORE	Oligonükleotid aracılı RNA Düzenlemesi için Endojen ADAR'ın Spesifik Transkriptlere hedeflenmesi
REWIRE	PUF alanını tanıyan RNA çeşitli deaminaz alanı
RNA	Ribonükleik asit
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (RPMI) ortamı
rRNA	Ribozomal Ribonükleik asit
RuvC	DNA onarımında rol oynayan bir endonükleaz alanı
siRNA	Küçük müdahaleci RNA
SLiCE	Seamless Ligation Cloning Extract: Dikişsiz Ligasyon Klonlama Ekstraktı
SNAP	Kendi kendini etiketleyen bir protein
SOB	Süper Optimal Broth
SRSR	Tekrarları kısa düzenli aralıklı tekrarlar
ssRNA	Tek zincir RNA
SV40	Maymun vacuolating virüsü 40
SYRD	Siteye yönelik RNA düzenleme
T	Timin
TAE	Tris-asetat-EDTA
TALE	Transkripsiyon aktivatörü benzeri efektörler
TALLEN	Transkripsiyon aktivatörü benzeri efektör nükleazlar
TAM	Hedefli AID aracılı mutajenez
TM	Erime sıcaklığı
TRACE	Yüksek düzeyde hedeflenmiş bir mutajenik meteo
tracrRNA	Trans-aktive edici CRISPR RNA
Tris-HCl	Tris-Hidroklorür
TRM	Hedefli RNA metilasyon
tRNA	Transfer Ribonükleik asit
TUTase	Terminal üridil transferaz
U	Urasil
ug	Mikrogram
uM	Mikromolar
UMP	Transkriptlerde üridilat modifiye edici enzim
UTP	Üridin-5'-trifosfat
VEGAS	Genetik olarak harekete geçen dizilerin viral evrimi
vH	Ağır zincir
VI	6
vL	Hafif zincir
VSV-G	Vesiküler stomatit virüsü G proteini
ZFN	Çinko parmak nükleazları

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 apoB mRNA'nın RNA düzenlemesi	7
Şekil 2.2 RNA'da adenozinden (A) inosine (I) dönüşüm	8
Şekil 2.3 ADAR1 ve ADAR2'nin açık okuma çerçevesi yapıları	12
Şekil 2.4 ADAR düzenleme sitelerini çevreleyen baz çiftli yapıların örnekleri	14
Şekil 2.5 Hepatit delta virüsü (HDV) antigenomik RNA'sının RNA düzenlemesi için	16
Şekil 2.6 Kinetoplastid mitokondride RNA düzenleme mekanizması için mevcut modeller	19
Şekil 2.7 Tasarlanmış rekombinant RNA'lar olan dört boxB saç tokası ile Lambda N proteini (λ N) ve ADARDD.	39
Şekil 2.8 gRNA-deaminaz konjugatları, BG ile modifiye edilmiş gRNA'nın, SNAP-deaminaz reaksiyonuyla meydana gelir.	41
Şekil 2.9 MS2-MCP-ADAR deneysel tasarımı.	42
Şekil 2.10 A'dan G'ye düzenleme için ADAR2DD(E488Q).....	44
Şekil 2.11 crRNA öncesi kılavuz dizileri ile çoğullanmış C'den U'ya ve A'dan I'ye düzenlemenin şeması.	45
Şekil 2.12 İnsan sitidin nükleoptidine özgül olan APOBEC3A deaminazının dCas13'e füzyonu, CURE kompleksini oluşturur.	46
Şekil 2.13 CIRTS, ssRNA bağlayıcı protein, RNA saç tokası bağlayıcı protein, efektör protein ve kılavuz RNA'dan oluşur.	48
Şekil 2.14 GluR2-ADAR yapısı	49
Şekil 2.15 RESTORE gösterimi	50
Şekil 2.16 LEAPER.....	51
Şekil 2.17 Cas13a genel gösterimi. REC lobu, NUC lobu ve içerdiği diziler, RNA'sının iki boyutlu yapısı ve proteinin üç boyutlu yapısı gösterilmiştir.	58
Şekil 2.18 Cas13 genel yapısı, PFS, crRNA, yardımcı efek ve RNA'nın işlenmesi gösterilmiştir.	59
Şekil 3.1 Klonlama sırasına kullanılan cihazlar	64
Şekil 3.2 Hücre kültüründe kullanılan cihazlar	65

Şekil 3.3 FRT vektörü, FRT_F ve FRT_R Primerleri ile çoğaltılmak istenen dizi. ...	77
Şekil 3.4 GAG-POL, Gagpol_F ve Gagpol_R primerleri ile polimeraz zincir reaksiyonu sonucu elde edilen GAG-POL dizileri.....	78
Şekil 3.5 FRT-GAG-POL jel görüntüsü ve klonlama sonucu	80
Şekil 3.6 VSV-G proteini, PZR sonucu olarak elde edilecek dizi.	82
Şekil 3.7 FRT-GAG-POL plazmidine VSV-G proteini klonlanması	84
Şekil 3.8 135992 Transgen vektörü.....	86
Şekil 3.9 vHvL dizileri, vL için polimeraz zincir reaksiyonu	86
Şekil 3.10 135992_transgene_ebov_vHvL klonlaması.....	89
Şekil 3.11 ebov vH/vL 1335992 vektörü	90
Şekil 3.12 mRuby için polimeraz zincir reaksiyonu	91
Şekil 3.13 ebov vH/vL 1335992_mRuby klonlama.....	93
Şekil 3.14 FRT_lentiviral proteinler_ebov-vHvL- mRuby-135922 klonlaması	97
Şekil 3.15 Addgene 19319 plazmidinden lentiviral transgen vektörü	98
Şekil 3.16 NF- κ B biyosensörü dizisi.....	99
Şekil 3.17 19319 _ NF- κ B biyosensörü klonlaması.....	101
Şekil 3.18 Tip VI-B CRISPR-Cas sistemleri için genel crRNA ve Doğrudan Tekrar yapısı	102
Şekil 3.19 Aralayıcı RNA ve doğrudan tekrarlar	103
Şekil 3.20 Aralayıcı RNA ve doğrudan tekrar dizisinin %2'lik agaroz jel görüntüsü. ...	105
Şekil 3.21 NF- κ B biyosensörü ifadesi, Transfeksiyondan 36 saat sonraki Flp-In TM T-REx TM 293 hücre hattının görüntüsü.....	108
Şekil 3.22 Jurkat hücre hattında NF- κ B biyosensörü ifadesi kararlı ifadesi	111
Şekil 3.23 Flp-In TM T-REx TM 293 Addgene_103864_PvuI kolonisi	114
Şekil 3.24 FRT_ebov_vHvL_Lentiviral proteinleri plazmidinin mRuby ifadesi	117
Şekil 3.25 FRT_ebov_vHvL_Lentiviral proteinleri Addgene_103864_PvuI Flp-In TM T-REx TM 293 kolonisi	119
Şekil 3.26 FRT_ebov_vHvL_Lentiviral proteinleri Addgene_103864_PvuI Flp-In TM T-REx TM 293 hücrelerinin kararlı ifadesi.....	120
Şekil 3.27 Altı oyuklu plakada 2 saat, 8 saat, 16 saat, 24 saat, 48 saat ve 72 saat boyunca düzenlenen RNA'nın düzenleme verimliliği.....	127

Şekil 3.28 Küçük bakteriyel ampisilinli vektör	128
Şekil 3.29 Birinci varyant	129
Şekil 3.30 İkinci varyant	130
Şekil 3.31 Üçün varyant	131
Şekil 3.32 lentiviral titrasyon	133
Şekil 3.33 Altı oyuklu platelerde, 100 gv titreyle yapılan transdüksiyon	134
Şekil 3.34 Tasarlanmış CAR-T ve KKKA M segment eş kültürü	135
Şekil 3.35 Tasarlanmış CAR-T ve KKKA M segment eş kültürün T hücre aktivasyonu	136
Şekil 3.36 Kırmızı ışımalar programlanmış CAR'ları, yeşil ışımalar immün olarak aktifleşmiş CAR'ları gösterir.	137
Şekil 4.1 A) lenvirüs proteinleri B) lenvirüs proteinleri ve Transgen vektörü ve C) Transgene vektörüne klonlanmış nf_Kb biyosensörü	138
Şekil 4.2 Stabil hücre hatları	139
Şekil 4.3 T7E1 sonucu altı oyuklu plakada 2 saat, 8 saat, 16 saat, 24 saat, 48 saat ve 72 saat boyunca düzenlenen RNA'nın düzenleme verimliliği.	140
Şekil 4.4 Birinci varyant	141
Şekil 4.5 ikinci varyant	142
Şekil 4.6 üçüncü varyant	143
Şekil 4.7 Lentivirüs titrasyonu	144
Şekil 4.8 KKKA M segmenti HEK 293 hücreleri ile tasarlanmış CAR-T hücreleri eş inkübasyonu	145
Şekil 4.9 Kırmızı floresan ışımalar, CAR-T programlanmasını gösterir, Yeşil floresan ışımalar ise, T hücre aktivasyonunu yani immün yanıtın takibini sağlar.	145

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Temel düzenleme için çeşitli RNA hedefleme sistemlerinin karşılaştırılması.	34
Çizelge 2.2 CRISPR sınıflandırılması.....	57
Çizelge 3.1 Tez boyunca kullanılan malzemeler	62
Çizelge 3.2 Tez boyunca kullanılan cihazlar	63
Çizelge 3.3 Tez boyunca kullanılan oligonükleotitler ve primerler	67
Çizelge 3.4 Q5® Yüksek Kaliteli DNA Polimeraz içeriği	72
Çizelge 3.5 Q5® Yüksek Kaliteli DNA Polimeraz termal döngü şartları	72
Çizelge 3.6 Taq DNA Polimeraz içeriği	73
Çizelge 3.7 Taq DNA Polimeraz termal döngü şartları	73
Çizelge 3.8 5X TranscriptAid Reaksiyon içeriği.....	104
Çizelge 3.9 cDNA primeri ve düzenlenmiş RNA miktarı	124
Çizelge 3.10 cDNA Kit İçeriği	124
Çizelge 3.11 Heterodimerizasyon içeriği	126
Çizelge 3.12 Heterodimerizasyon şartları	126
Çizelge 3.13 T7E1 inkübasyonu	126

1. GİRİŞ

Biyoteknoloji ve sentetik biyolojinin temel konularından biri biyolojik sistemler, yeni işlevli moleküller veya güçlendirilmiş özellikli moleküller tasarlamaktır. Bu tür çalışmaları başarılı bir şekilde gerçekleştirmenin kolay yolu genleri veya genomda birden fazla yeri hedefleyerek dizilerin yeniden yazılmasıdır. Bu çalışmaların temel çalışma prensibi, fenotipteki farklılıkları araştırmak için genetik çeşitliliğin oluşturulmasına dayanır. Tek bir molekül veya bir organizma tasarlamakta dâhil olmak üzere çok geniş bir yelpazeye sahip bir araştırma alanıdır.

Çeşitlilik, biyolojik dünyanın üzerine inşa edildiği temeldir, yinelenen genetik çeşitlilik ve seçim döngüleri yoluyla Darvinci evrimi mümkün kılar. Bu süreç boyunca doğal seçim aracılığıyla, kataliz (örneğin enzimler), moleküler tanıma (örneğin antikolar), yapısal (örneğin hücre iskeleti proteinleri) ve sinyalleme (örneğin hormonlar) dâhil olmak üzere farklı işlevlere sahip sayısız biyolojik makromolekül geliştirmiştir. Gen çeşitlendirme yöntemiyle, arttırılmış performanslı proteinler ve yeni özellikli proteinlerin geliştirilmesiyle, genetik çeşitlilikten yararlanma için yeni yöntemlerin geliştirilmesinin kapısı aralanmıştır. Özellikle enzim performansının arttırmasındaki başarılı sonuçları nedeniyle yönlendirilmiş evrim tekniği, yaygın kullanılan popüler yöntem haline gelişmiştir.

Doğal evrim sürecini taklit eden yönlendirilmiş evrim, gelişmiş fonksiyona sahip yeni enzim varyantlarını izole etmek için belirli bir genetik hedef üzerinde tekrarlanabilir DNA mutajenezi ve takip eden seçim/tarama döngülerinden oluşmaktadır (Dougherty ve Arnold, 2009; Tracewell ve Arnold, 2009).

Doğal seçim tekil genlerden tüm organizmalara kadar farklı düzeylerde geniş bir hiyerarşi üzerinde etkilidir. Bu nedenle, yönlendirilmiş evrim tipik olarak tek bir gen kodlayan diziyi hedefleyebilirken veya bir organizmadaki yolağı optimize ederken, eşit derecede uygulanabilir olmalıdır. Birden fazla bileşen içeren daha büyük genetik yapıların tasarlanmasıyla, son on yılda sentetik biyoloji ve in-vitro modelleme sayesinde yeni teknikler geliştirilmiştir. Yeni araçların geliştirilmesiyle gen çeşitlendirme

teknolojileri hızlı bir şekilde ilerlemiştir ve yönlendirilmiş evrimin kapsamı daha da iddialı hale gelmiştir.

Herhangi bir gen çeşitlendirme çalışması için araştırmacının karşılaştığı zorluk aynıdır: oluşturulabilecek kodlama dizilerinin ve bunların kombinasyonlarının toplam sayısı, laboratuvarında oluşturulup test edilmesi mümkün olandan çok daha büyüktür. Bu kavram, belirli bir 'n' uzunluğundaki dizinin olası değişkenlerinin toplam sayısını tanımlayan dizi uzayı olarak tanımlanır (Currin vd. 2015, Hayashi vd. 2006, Povolotskaya ve Kondrashov 2010, Wong vd. 2007)

Dizi alanı çok geniştir ve çok küçük protein dizileri için bile deneysel olarak test edilmesi mümkün değildir; örneğin, 100 amino asitlik küçük bir proteinin dizi alanı $\sim 1,3 \times 10^{130}$ dur (olası 20 amino asit göz önüne alındığında bu oran 20^{100} dür) bu olasılık gözlemlenebilir evrendeki atom sayısından daha büyük bir sayıdır (Kondrashov ve Kondrashov, 2015).

Bu olasılık sadece amino asit varyasyonlarını içerir, buna biyokimyasal ve fizyolojik varyasyonlar da eklenince, araştırmacı kombinatoriyal bir patlamayla karşılaşır. Kaçınılmaz olarak bu durum araştırmacıyı, toplam çeşitliliğin laboratuvarında etkili bir şekilde taranabilecek bir alt kümesini baz alacak şekilde sınırlar (Romero ve Arnold, 2009; Romero vd. 2013).

Dizilerin, karakterizasyon verilerinin ve mevcut hesaplama araçlarının zenginliğine rağmen, biyolojik dizilerin davranışı büyük ölçüde tahmin edilemez. Faydalı mutasyonların karakterizasyonu, genellikle mümkün olduğu kadar çok sayıda varyantın taranması yoluyla deneysel olarak belirlenmesi gerekmektedir. Bu nedenle deneyci; ön bilgi, yapısal ve protein karakterizasyon verileri ve hesaplama araçlarıyla desteklenebilecek hedef dizisini (veya dizilerini) nerede ve nasıl değiştireceğini seçmelidir. Bu zorluk, amino asitlerin sekans boyunca (hatta biyolojik bir sistem içindeki farklı diziler arasında) birbirine bağımlılığını tanımlayan epistaz olgusu nedeniyle çarpıcı biçimde daha karmaşık hale gelmektedir. Sonuç olarak, bir

mutasyonun faydalı etkisi başka bir yerdeki başka bir mutasyona bağılı olabilir (Miton ve Tokuriki 2016, Sailer ve Harms 2018, Storz vd. 2018).

Söz konusu memeli hücrelerinde çalışmak olunca aşılması gereken zorluklar da artmaktadır. Mikroorganizmalar ve in-vitro sistemlerde geliştirilen moleküller insan hücrelerinde ifade edildiğinde beklenmedik sonuçlar ortaya çıkabilmektedir. Bunun temel sebebi insan genomunun büyüklüğü, karmaşık fizyolojik ve biyokimyasal süreçlere sahip olmasıdır. Tüm bunların yanında memeli hücrelerinde genlerin çeşitlendirilmesi ve bunun üzerine ürün elde edilebilir sistemlerin gelişmesi elzem ve acil bir durum teşkil etmektedir.

Memeli hücrelerinde gen çeşitliliği, hücre veya organizma popülasyonu içinde genetik çeşitliliğin oluşmasını ifade eder. Bu çeşitlilik, mutasyonlar, rekombinasyon ve genetik varyasyonlarıyla ortaya çıkan durumdur ve diğer süreçler dâhil olmak üzere çeşitli mekanizmalar yoluyla meydana gelir. Memeli hücrelerinde gen çeşitliliğine katkıda bulunan bazı temel mekanizmalar şunlardır:

Mutasyon: Mutasyonlar bir genin DNA dizisindeki değişikliklerdir. DNA replikasyonu sırasında kendiliğinden, radyasyona veya bazı kimyasallara maruz kalma gibi çevresel faktörlere bağılı olarak ortaya çıkabilirler. Mutasyonlar nokta mutasyonları (tek nükleotid değişiklikleri), eklemeler, silmeler veya daha büyük yapısal değişiklikler olabilir. Zamanla biriken mutasyonlar bir popülasyondaki genetik çeşitliliğe katkıda bulunur (Fichter vd. 2023).

Rekombinasyon: Homolog rekombinasyon, hücre bölünmesi sırasında, özellikle mayoz sırasında, homolog kromozomlar arasında genetik materyalin değiştirildiği bir süreçtir. Bu süreç, genetik bilginin ebeveyn kromozomları arasında karıştırılmasına ve yeni alel kombinasyonlarının oluşmasına yol açabilir. Mayoz esas olarak germ hücrelerinde (sperm ve yumurta hücreleri) meydana gelse de somatik hücrelerdeki çift iplikli kırılmaların onarımı sırasında rekombinasyon olayları da meydana gelebilir (Ragu vd. 2021).

Bağışıklık Sisteminde Genetik Rekombinasyon ve Çeşitlilik: Somatik rekombinasyon, bağışıklık sisteminde çeşitlilik yaratmada kritik bir rol oynar. Bu süreç, antijen reseptörlerini kodlayan genlerin bölümlerinin, çok çeşitli patojenleri tanıyabilen geniş bir reseptör repertuarı oluşturmak üzere yeniden düzenlendiği B ve T hücrelerinin gelişimi sırasında meydana gelir (Pecori vd. 2022).

Epigenetik Değişiklikler: DNA metilasyonu ve histon modifikasyonu gibi epigenetik modifikasyonlar, DNA dizisini değiştirmeden gen ekspresyon modellerini etkileyebilir. Epigenetik değişiklikler kalıtsal olabilir ve bir popülasyondaki fenotipik çeşitliliğe katkıda bulunabilir (Peaston vd. 2006).

Yatay Gen Transferi: Memeli hücrelerinde prokaryotlara kıyasla daha az yaygın olsa da yatay gen transferi (genetik materyalin organizmalar arasında transferi) gen çeşitliliğine katkıda bulunabilir. Örneğin retrovirüsler, genetik materyallerini konakçı genomuna entegre edebilir ve potansiyel olarak yeni genetik elementler katabilir (Xu vd. 2022).

Mobil Genetik Unsurlar: "Sıçrayan genler" olarak da bilinen yer değiştirebilen elementler genom içinde hareket edebilir ve genetik çeşitliliğe katkıda bulunabilir. Kendilerini genomun farklı yerlerine yerleştirerek veya çıkararak mutasyonlara neden olabilirler (Kojima vd. 2023).

Mikrosatellit Değişimi: Mikrosatellitler, DNA replikasyonu sırasında kayma nedeniyle uzunlukları değişebilen kısa, tekrarlayan DNA dizileridir. Mikrosatellitlerdeki tekrar sayısındaki değişiklikler genetik çeşitliliğe katkıda bulunur ve popülasyon genetiğini incelemek için moleküler belirteçler olarak hizmet edebilir.

Tüm bunlar gen çeşitliliğini arttıran, organizmayı ve popülasyonu geliştiren doğal süreçlerdir. Bu süreçler oldukça yavaş gelişmektedir. İn-vitro veya in-vivo programlandıklarında genel anlamda verimsiz sistemler oluşmuştur. Bölgeye yönelik geliştirilen yapay sistemlerle kombine edildiklerinde ortaya verimli sistemler çıkmaktadır. En önemli örneği, B ve T hücrelerinde gerçekleşen bağışıklık sisteminde

genetik rekombinasyon ve çeşitlilik süreçleri CRISPR-Cas9 teknolojisiyle birleştirilip hücre kültürü deneylerinde başarılı bir şekilde uygulanmıştır (Pecori vd. 2022).

Memeli hücrelerinde gen çeşitlendirmede, bölgeye yönelik mutajenez güçlü bir araçtır ve genomun muazzam büyük olması sorununun üstesinden gelir. Lakin bu yeterli değildir, memeli hücrelerinde gen çeşitlendirmeye dayalı fonksiyonel ürün elde edilmesi yeni ve gelişmekte olan bir alandır ve aşılması gereken pek çok zorluk vardır. Bu zorlukların üstesinden gelmek, gen düzenleme sürecinin doğruluğunu, verimliliğini ve güvenliğini sağlamak açısından çok önemlidir.

Memeli hücrelerinde gen çeşitlendirilmesinde temel bazı zorlukların başında; teknik, pratik, ekonomik, hücre-doku biyokimyası ve fizyolojisi yer almaktadır. Çalışma bazlı durumu ele alacak olursak; hedeflemenin etkinliği, hedef dışı etkiler, iletim (delivery) yöntemleri, hücre tipi özgüllüğü, homolojiye yönelik onarımın (HYO) zorlukları, büyük DNA eklemeleri veya silmeleri, genetik mozaiklik, immünojenik yanıtlar, etik ve düzenleyici hususlar, uzun vadeli istikrar, CRISPR teknolojilerini optimize etme vb. zorlukların üstesinden gelinmelidir.

Tezde DNA dizilerinde kombinatorial çeşitliliğin yaratılmasına yönelik yaklaşımlarda son zamanlarda kaydedilen kayda değer ilerlemeye rağmen, bilhassa memeli hücrelerinde gen çeşitlendirirken karşılaşılan zorlukların üstesinden gelebilecek bir yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaca hizmet etmek için CRISPR teknolojisinin RNA hedefleyen proteinlerinden yararlanılmıştır. Kontrollü (rastgele yerine hedefe yönelik) teknikler kullanarak memeli hücrelerinde gen çeşitlendirilmesi bu tezin ana hedefidir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 RNA Düzenlemeye Giriş

RNA düzenleme, ilk olarak Benne ve çalışma arkadaşları tarafından bir kinetoplastid tripanozomun mitokondri kodlu mRNA'sında keşfedilmiştir (Benne vd. 1986). RNA düzenleme terimi, başlangıçta yalnızca tripanozomlarda meydana gelen sürece atıfta bulunmuştur, yeni oluşan transkriptlerde üridilatın transkripsiyon sonrası eklenmesini ve silinmesini ifade etmiştir. Bu tür transkripsiyon sonrası dizi değişikliklerinin keşfi, terimin daha geniş bir şekilde kullanılmasına yol açmıştır. RNA düzenleme günümüzde UMP dışındaki nükleotitlerin eklenmesini ve silinmesini, baz deaminasyonunu ve kodlanmamış nükleotidlerin transkripsiyonel eklenmesini açıklamak için kullanılmaktadır. RNA düzenlemesi, mRNA'larda, tRNA'larda ve rRNA'larda, mitokondriyal ve kloroplastla kodlanmış RNA'larda ve ayrıca nükleer olarak kodlanmış RNA'larda gözlemlenir. RNA düzenleme örnekleri, birçok metazoada, tripanozomlar gibi tek hücreli ökaryotlarda ve bitkilerde bulunmuştur. Bugüne kadar, bir prokaryotta RNA düzenlemesi gözlemlenmemiştir. RNA düzenleme reaksiyonları, reaksiyon mekanizmalarına göre iki geniş kategoriye ayrılır. Birinci tip, ekleme/silme RNA düzenlemesi, nükleotitlerin eklenmesini veya silinmesini içerir ve hedef RNA'nın uzunluğunu değiştirir. İkinci tip, baz modifikasyonu ile RNA düzenleme, RNA'nın toplam uzunluğunu değiştirmeden kodlanmış bir nükleotidi farklı bir nükleotit ile değiştirir (Gott ve Emerson 2000, Maas vd. 2003).

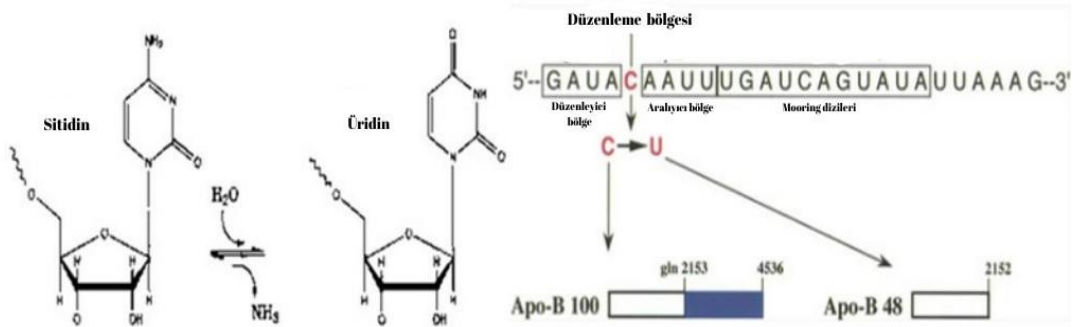
2.1.1 Baz değişikliği ile RNA düzenleme

RNA modifikasyonlarının tRNA'larda, rRNA'larda ve mRNA'larda meydana geldiği uzun zamandır bilinmektedir (McCloskey vd. 1997, Limback vd. 1994). Bu modifikasyonların bazıları basit olup, yalnızca var olan bir nükleotidin metilasyonunu içerirken diğerleri oldukça karmaşıktır ve sentezleri için birden fazla enzim gerektirir.

Ek RNA düzenleme türleri keşfedildikçe, geleneksel olarak RNA modifikasyonu olarak adlandırılan mekanizmalar ile günümüzde RNA düzenlemesi olarak kategorize edilen mekanizmalar arasındaki farkı ayırt etmek zorlaşıyor.

RNA düzenleme terimi, kanonik bazları, yani Watson-Crick nükleotitlerinin eklenmesi veya çıkarılmasını veya bir Watson-Crick nükleotidinin diğerine dönüştürülmesini içeren işlemler için kullanılan terimdir.

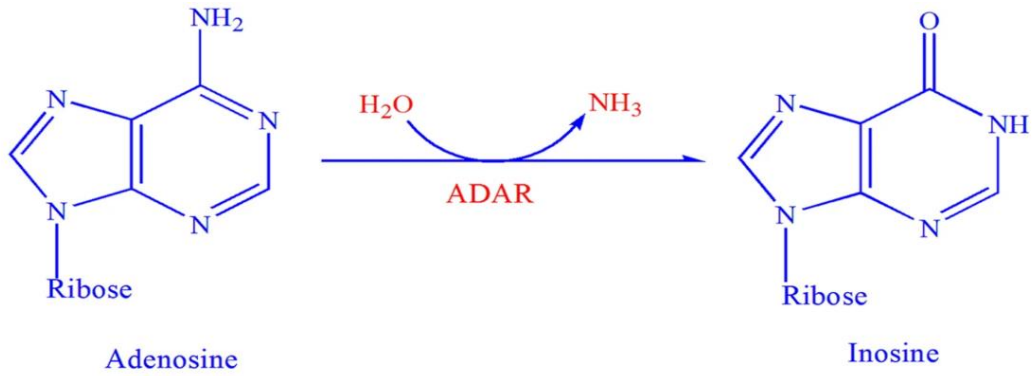
RNA düzenlemesi olarak kategorize edilen iki tip baz modifikasyonunun her ikisi de deaminasyon reaksiyonlarını içerir. Bir durumda sitidinin deaminasyonu üridin üretir (Şekil 2.1), diğer durumda adenosinin deaminasyonu inosin üretir (Şekil 2.2). Baz modifikasyonu ile RNA düzenleme, bir kodonu farklı bir kodona değiştirebilir ve ayrıca durdurma kodonları oluşturabilir (C'den U'ya düzenleme) veya kaldırabilir (A'dan I'ye düzenleme). Çoğu durumda, yeni benzersiz özelliklere sahip bir protein üretilir ve genomik olarak kodlanmış tek bir RNA, çeşitli transkriptlere yol açar. Mekanistik benzerliklerine rağmen, aşağıda tartışıldığı gibi, sitidin ve adenosin deaminasyonu ile RNA düzenlemesi, RNA substratlarını tanımak için çok farklı mekanizmalar içerir.



Şekil 2.1 apoB mRNA'nın RNA düzenlemesi (Bhakta vd. 2022)

apoB mRNA'nın RNA düzenlemesi, tek bir sitidinden (C) üridin'e (U) dönüşümü içerir. Şekil 2.1'de gösterildiği gibi, reaksiyonun, sitidinin N-4 amino grubunun hidrolitik deaminasyonu ile ilerlediği düşünülmektedir. Deaminasyon, APOBEC-1 enzimi tarafından katalize edilir, ancak RNA düzenleme reaksiyonu için ek faktörler gereklidir.

apoB mRNA düzenleme reaksiyonu. Reaksiyon için önemli olan düzenleme bölgesi sitidini (kırmızı) gösterilmektedir. Düzenleme için önemli olduğu belirlenen üç farklı bölge kutu içine alınmıştır (Düzenleyici bölge, ayırıcı ve Mooring dizileri). apoB mRNA'nın düzenlenmesinin sonucunda, tek bir açık okuma çerçevesinden uzun (ApoB 100) ve kısa (ApoB 48) proteinleri sentezlenir. Kısa proteinin (ApoB 48) sentezlenebilmesi için bir glutamin kodonu bir durdurma kodonuna dönüştürülür. Mavi dikdörtgen, ApoB 48'de olmayan ApoB 100'deki dizileri gösterir.



Şekil 2.2 RNA'da adenzinden (A) inosine (I) dönüşüm (Bhakta vd. 2022)

Birçok RNA, adenzinden (A) inosine (I) dönüşümüne göre düzenlenir. Reaksiyonu katalize eden enzimlere ADAR denir ve ADAR1 katalizasyonu, reaksiyonun basit bir hidrolitik deaminasyonla meydana geldiği şekil 2.2 gösterilmiştir. Şekil 2.2'de gösterildiği gibi, amino grubunun C-6'da hidrolitik deaminasyonu inosin verir.

2.1.1.1 Sitidin deaminasyonu ile düzenleme

Kinetoplastid protozoadaki ilk düzenleme örneğinin keşfedilmesinden kısa bir süre sonra, memeli apolipoprotein B (apoB) mRNA'sında düzenleme gözlenmiştir. ApoB mRNA düzenlemesi, baz modifikasyonu yoluyla RNA düzenlemesinin ilk örneği ve aynı zamanda nükleer kodlu bir RNA'nın düzenlenmesinin ilk örneğidir (Chan vd. 1997, Chester vd. 2000). apoB mRNA içinde bir C'nin bir U'ya dönüşümünün, sitidinin C-4 pozisyonunda hidrolitik deaminasyonu içerdiği düşünülmektedir (Şekil 2.1)(Johnson vd.

1993). apoB mRNA düzenlemesinde yer alan sitidin deaminaz aktivitesi, APOBEC-1 enziminden (apolipoprotein B mRNA düzenleme enzimi, katalitik polipeptit)(Teng vd. 1993, Davidson vd. 1995) türetilir, ancak apoB mRNA'yı düzenlemek için ek faktörler gerekir. Bununla birlikte, ilginç bir şekilde APOBEC-1, sitidin mononükleosidini diğer faktörlerin yokluğunda deamine edebilir; bu da polipeptitin katalitik aktif bölge içerdiğini göstermektedir (Navaratnam vd. 1993, MacGinnitie vd. 1995).

APOBEC-1 için diğer doğal substratlar aranmıştır, ancak şu ana kadar bulunamamıştır ve enzimin bilinen tek biyolojik hedefi apoB mRNA'dır. Bununla birlikte, APOBEC-1 aşırı eksprese edildiğinde, ek RNA'larda anormal C ile U düzenlemesi gözlemlenir (Yamanaka vd. 1997). Bitkilerin mitokondri ve kloroplastlarında ve ayrıca Physarum polycephalum'un mitokondrilerinde C ile U düzenlemesi gözlemlenmiştir. İlginç bir şekilde, bitki organelleri ayrıca deaminasyon reaksiyonunun tersi olan U ile C düzenlemesi sergiler (mekanizması bilinmemektedir).

2.1.1.1.1 Apolipoprotein B mRNA

Apolipoproteinler, memelilerde karmaşık lipidlerin birleştirilmesi, salgılanması ve taşınması için gereklidir; çeşitli apolipoproteinler arasında apoB özellikle önemlidir (Chan vd. 1997, Chester vd. 2000). B-100 ve B-48 olmak üzere iki apoB proteini vardır ve her birinin lipoprotein metabolizmasında farklı bir biyolojik işlevi vardır. Apo-B mRNA'nın RNA düzenlemesine tabi olduğunun keşfedilmesinden önce, apoB-48'in apoB-100'ün amino-terminal yarısı ile aynı olduğu bulunduğundan, iki proteinin aynı genden ifade edildiği ileri sürülmüştür (Young vd. 1986). Bununla birlikte, iki farklı proteini tek bir genden üretme mekanizması bir muammaydı.

Gizem nihayet cDNA ve genomik diziler karşılaştırıldığında çözüldü. İnsanlarda apoB-100 başlıca karaciğerde sentezlenirken, apoB-48 bağırsakta sentezlenir. ApoB'nin insan genomik dizisinin insan karaciğeri ve bağırsak cDNA'ları ile karşılaştırılması, RNA düzenlemesinin apoB-48 mRNA'nın üretimi için temel olduğu sonucuna varılmıştır. Hem genomik hem de karaciğer cDNA dizileri, kodon 2153'te glutamini (CAA)

kodlarken, bağırsak cDNA'sı bu kodonda bir TAA durdurma kodununa sahiptir (Powell vd. 1987, Chen vd. 1992).

Böylece, 6666 nükleotidinde tek bir C ila U değişikliği (insan dizisine göre numaralandırılmıştır) apoB-100 mRNA'daki glutamin 2153 kodonunu (CAA), apoB-48 mRNA'daki bir çerçeve içi durdurma kodonuna (UAA) dönüştürür (Şekil 2.1). Bu nedenle apoB-48 proteini, apoB-100'ün budanmış halidir.

Apo-B mRNA düzenlemesi çekirdekte gerçekleşir ve transkripsiyon sonrası bir süreçtir. Bu sonuç, çekirdekten izole edilen tamamen işlenmiş bir apoB mRNA'nın, sitoplazmik apoB mRNA ile yaklaşık olarak aynı ölçüde düzenlendiği gözlemlerden kaynaklanmaktadır (Lau vd. 1991).

ApoB mRNA'nın RNA düzenlemesi, 14 kilobazlık olgun mRNA'sının ortasındaki tek bir bölgede gerçekleşir. Mutajenez çalışmaları, düzenleme bölgesini çevreleyen 22–26 nükleotid dizisinin apoB mRNA düzenlemesi için önemli olduğunu göstermektedir (Backus vd. 1992, Shah vd. 1991). Bu 22–26 nükleotid içinde, üç alt alan tanımlanmıştır: 4–6 nükleotidlik bir ayırıcı dizi düzenleme sitesi; ayırıcıyı takip eden 11 nükleotidlik bir "Mooring dizisi" (UGAUCAGUAUA) ve C-6666'nın hemen akış yukarısındaki bir "düzenleyici" bölge vardır (Chan vd. 1997, Chester vd. 2000). Bağlama dizisinin ilgisiz/bağılantısız bir RNA'ya bağlanmasıyla ispatlanmıştır, Mooring dizisi yukarı akış C'nin düzenlenmesi için hem yeterlidir hem de gereklidir (Driscoll vd. 1993).

Düzenleme bölgeye özgüdür, düzenleme enzimi (veya enzim kompleksi) Mooring dizisini bir kez bağladığında, yukarı akışta sabit bir mesafedeki bir sitidin'i tam olarak hedefler. AU açısından zengin düzenleyici bölge, hedef sitenin hemen 5' üstü ucunda düzenlemeyi teşvik eder, bu dizinin olamaması durumunda da düzenleme meydana gelir. Maksimal düzenleme, daha da uzak başka diziler gerektiriyor gibi görünüyor. Örneğin bir çalışma, in-vitro en uygun düzenleme için tavşan apoB mRNA'sını çevreleyen 139 nükleotidin gerekli olduğunu göstermiştir (Hersberger vd. 1998).

2.1.2 Adenozin deaminasyonu ile düzenleme

Baz modifikasyonu ile RNA düzenlemenin ikinci örneği, adenosin deaminasyonudur. Bu tür RNA düzenlemesi, belirli bir diziden ziyade RNA substratında belirli bir yapı gerektirir ve bir dizi farklı RNA'da gözlemlenmiştir. Adenozinden inozine dönüşüm, C-6 amino grubunu adenozinden çıkararak bir hidrolitik deaminasyonla gerçekleşir (Şekil 2.2) (Polson vd. 1991). ADAR (RNA üzerinde etkili olan adenozin deaminaz) adı verilen tek bir enzim, kofaktörlerin eklenmesi olmadan reaksiyonu katalize edebilir.

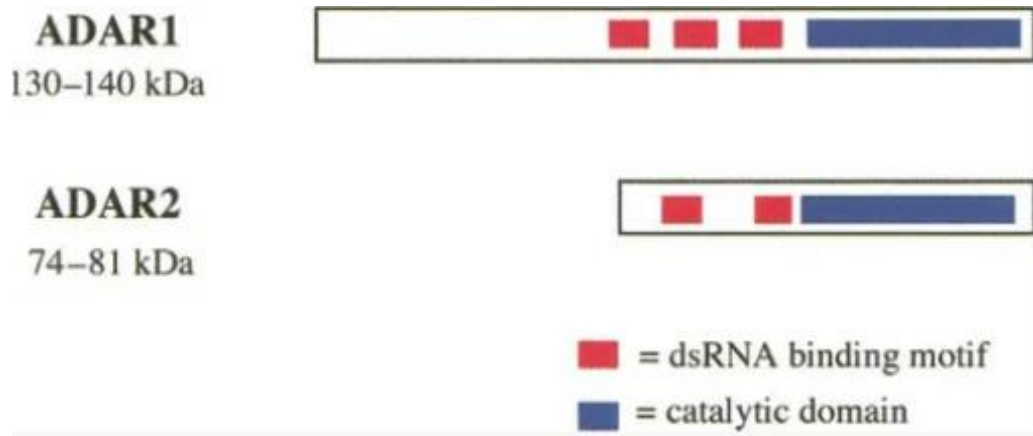
ADAR'lar için doğal RNA substratları, genler ve cDNA'ları arasındaki dizi farklılıkları karşılaştırılarak fark edilmiştir. Guanozin gibi inosin de sitidin ile eşleşmeye eğilimindedir, genomik olarak kodlanmış adenosin cDNA'da guanozin olarak görüldüğünden durum adenosinin guanosine deaminasyondur. A'dan G'ye bu tür değişikliklere dayalı olarak, iki tip ADAR substratı kabul edilmiştir: tek bir cDNA'da %50'ye kadar A'dan G'ye değişiklik içeren hipermutasyona uğramış olanlar ve cDNA'larında %10'dan daha az A'dan G'ye değişiklikler içeren, seçici olarak deamine edilmiş olanlar (Bass vd. 1997). Hipermutasyona uğramış substratların çoğu viral RNA'lardır ve burada adenosin modifikasyonunun işlevi belirsizdir. Bununla birlikte, seçici olarak deamine edilmiş substratlarda, adenozin deaminasyonun bir kodonu diğerine değiştirme işlevi gördüğü açıktır. Bu şekilde ADAR'lar, birden çok proteinin tek bir kodlanmış diziden sentezlenmesine izin vererek gen ifadesini düzenleme görevi görür.

2.1.2.1 ADAR proteinleri ve katalitik mekanizmaları

ADAR aktivitesi ilk olarak *Xenopus laevis* embriyolarına çift sarmallı RNA (dsRNA) mikroenjekte edildiğinde tespit edilmiştir (Rebagliati vd. 1987, Bass vd. 1998).

O zamandan beri test edilen her metazoada bu aktiviteyi göstermiştir (Bass vd. 1997). ADAR aktivitesine sahip iki farklı enzim, ADAR1 ve ADAR2, memelilerde keşfedilmiştir (Gott ve Emerson 2000, Mass vd. 2003). Ayrıca, dizi benzerliklerine dayalı olarak ek ADAR'ları kodladığı düşünülen cDNA'lar keşfedilmiştir.

Daha önce ADAR1, dsRAD veya DRADA olarak adlandırılırken ADAR2, RED1 olarak adlandırılmıştır (Bass vd. 1997). Apo-B mRNA'da meydana gelen C'den U'ya düzenlemenin aksine hem ADAR1 hem de ADAR2, substratları içinde ek faktörler olmadan deaminasyonu katalize edebilir. ADAR1 proteini, ADAR'lar arasında yüksek oranda korunan bir C-terminali katalitik alanının yukarısında üç dsRNA bağlama motifi (dsRBM'ler) içerir (Şekil 2.3); ADAR2, ADAR1'in amino terminal yarısından yoksundur ve yalnızca iki dsRBM içerir (Melcher vd. 1996, Lai vd. 1997, Gerber vd. 1997).



Şekil 2.3 ADAR1 ve ADAR2'nin açık okuma çerçevesi yapıları (Öhman vd. 2021)

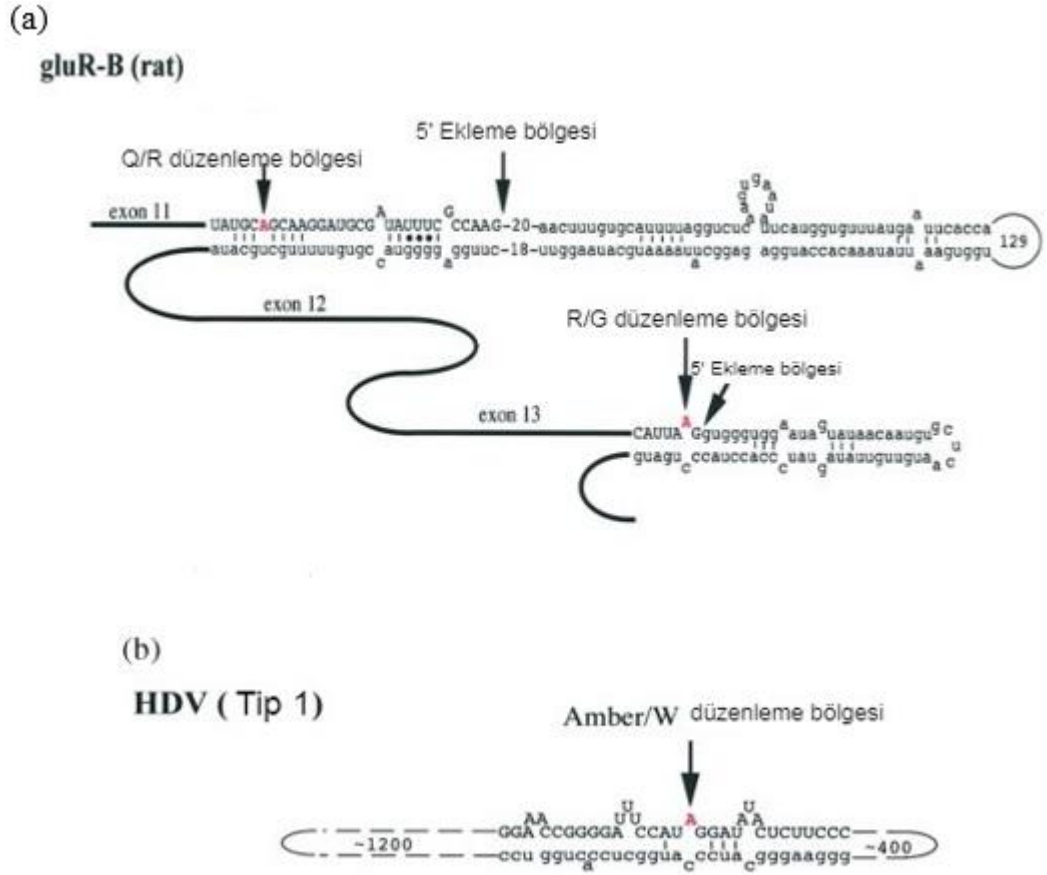
Kırmızı kutular, dsRNA bağlama motiflerini gösterir ve yüksek düzeyde korunmuş katalitik alan, mavi dikdörtgenle gösterilir. ADAR1 ve ADAR2'nin altındaki sayılar, farklı organizmaların proteinleri için gözlemlenen moleküler ağırlık aralığına karşılık gelir.

ADAR'lar, adenin C-6 konumunda bir nükleofilik reaksiyonu katalize eder. C-6 atomu, dsRNA'nın dar ana oluğun derinlerine gömülü olduğundan, ADAR'ın, adenin bazını RNA sarmalının dışına ve aktif bölgeye çevirerek hedefine erişim kazandığı öne sürülmüştür (Polisen vd. 1994, Hough vd. 1995). Bu tür baz dönüştürme mekanizmaları, DNA metiltransferazlarda gözlemlenmiştir (Robert vd. 1995, Cheng vd. 2008).

2.1.2.2 ADAR özgülüğü

ADAR ailesinin kurucu üyesi ADAR1'in deaminasyon özgülüğü in vitro olarak karakterize edilmiştir (Polsen vd. 1994). Enzimin özgül sekans gereklilikleri yoktur ve tek bir RNA'da çoklu adenosinler deamine edilebilir. Bununla birlikte, deaminasyonlar rastgele meydana gelmez. ADAR1'in 5' en yakın nükleotitleri tercih eder, öyle ki A, U veya C'nin 5' komşusuna sahip adozinlerin, 5' G'ye sahip olanlara göre deaminasyon olasılığı daha yüksektir. ADAR1 ayrıca 3' ucuna yakın adozinlere özgülüğü düşüktür (~ 8 nükleotid içinde).

RNA substratının yapısı, ADAR deaminasyon özgülüğü için önemlidir ve RNA'nın gelişigüzel bir şekilde deamine mi yoksa seçici olarak mı deamine edildiğini belirler. Rastgele deamine edilmiş substratlarda, adenosinlerin ~ %50'si tam reaksiyonda deamine edilirken, seçici olarak deamine edilmiş substratlarda, adenosinlerin < %10'u tam reaksiyonda deamine edilir. İn vitro çalışmalar ve ayrıca endojen substrat analizleri, rastgele tipte deaminasyonun uzun ve tamamen baz çiftli (dsRNA) bağlamında meydana geldiğini göstermektedir, baz çiftli bölgelerin periyodik olarak uyumsuzluklar, çıkıntılar ve halkalar tarafından kesintiye uğradığı moleküllerde daha seçici deaminasyon meydana gelir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 ADAR düzenleme sitelerini çevreleyen baz çiftli yapıların örnekleri (Öhman vd. 2021)

(a) gluR-B'nin 11. eksonundaki Q/R sitesinde ve gluR-B'nin 13. eksonundaki R/G sitesinde düzenleme için gerekli yapılar, ekson (büyük harf dizileri) ve aşağı akış intronları (küçük harf dizileri) arasındaki baz eşleşmesiyle oluşturulur. Biyolojik sonuçları olan düzenleme dizileri kırmızı büyük harflerle gösterilir (Bass vd. 1997). Rakamlar, diyagramdan hariç tutulan dizilerin uzunluğunu belirtir, (b) Hepatit delta virüsünün antijenomik RNA'sı içindeki düzenleme bölgesini hemen çevreleyen diziler, (a)'daki gibi semboller ve etiketlerle gösterilir.

ADAR2'nin deaminasyon özgüllüğü, şimdiye kadar toplanan veriler ADAR1'inkine benzer, ancak ondan farklı olduğunu açıkça göstermektedir. ADAR1 gibi, ADAR2 de RNA substratının yapısına bağlı olarak yüksek veya düşük seçicilikle baz değişikliği yapabilir. Örneğin, tamamen baz çiftli dsRNA'daki adenosinlerin ~ %50'si deamine edilirken, glutamat reseptörü (gluR) B mRNA gibi biyolojik substratların baz çiftli

bölgeleri daha seçici bir şekilde deamine eder (Melcher vd. 1996, Lai vd. 1997, Gerber vd. 1997).

Çeşitli laboratuvarlar, ADAR2'nin gluR-B öncü-mRNA'sı içindeki düzenleme bölgelerini deamine etme yeteneğini analiz etmiştir (Melcher vd. 1996, Lai vd. 1997). ADAR2, Q/R sitesini düzenlemede açıkça daha etkilidir. Her iki enzim de R/G sitesini düzenleme de farklılık gözlemlenmemiştir (şekil 4). Bu nedenle, iki enzimin farklı fakat örtüşen özellikleri vardır (Gerber vd. 1997, Mass vd. 1996, Melcher vd. 1996).

2.1.2.3 Memeli glutamat reseptörü mRNA'sı

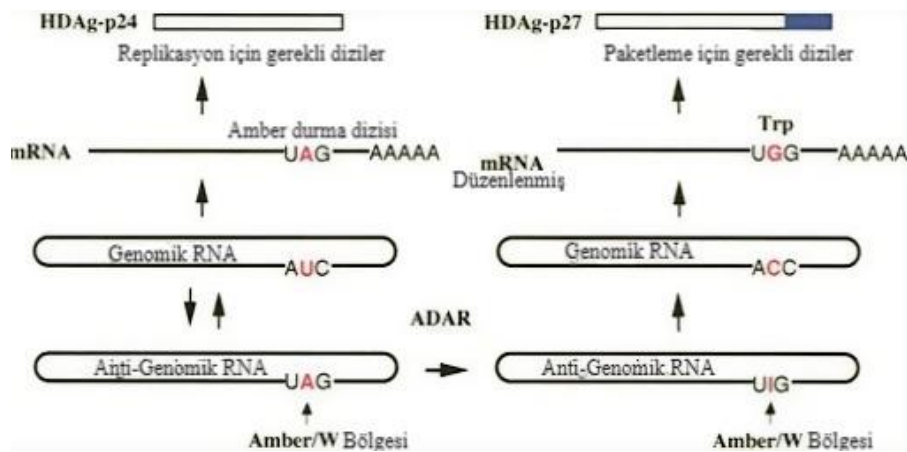
Memeli merkezi sinir sistemindeki glutamat reseptörleri üç farklı sınıfa ayrılır: N-metil-d-aspartat (NMDA) reseptörleri, alfa-amino-3 hidroksil-5-metil-izoksazol-4-propiyonat (AMPA) reseptörleri ve kainate (KA) reseptörleri. Adenosin deaminasyon yoluyla düzenleme, AMPA reseptörleri gluR-B, -C ve -D'nin öncü-mRNA'sında ve ayrıca KA reseptörü alt birimleri gluR-5 ve gluR-6'da gözlemlenmiştir. Beklenebileceği gibi, düzenleme bölgeleri, baz çiftli yapılar oluşturabilen diziler içinde bulunur. Şimdiye kadar, gluR RNA düzenlemesi için gereken tüm yapılar, eksonlar ve intronlar arasında baz eşleşmesini içerir.

gluR-B öncü-mRNA içinde düzenleme kapsamlı bir şekilde incelenmiştir ve kodlama dizisinde biyolojik olarak önemli iki düzenleme olayı tanımlanmıştır. İnozin, guanozin olarak tercüme edildiğinden, A'dan I'e dönüşümler, A'dan G'ye değişimlerle eşanımlıdır (Basilio 1962). gluR-B pre-mRNA'nın 11. eksonunda düzenleme, glutamin kodonunu (CAG) arginin kodonuna (CIG) dönüştürür. ADAR düzenleme siteleri ürettikleri amino asit değişikliğine göre isimlendirilir ve bu nedenle bu site Q/R düzenleme sitesi olarak adlandırılır. Q/R sitesi, gelişirmenin tüm aşamalarında gluR-B öncü-mRNA'ların %99'unda düzenlenir. Buna karşılık, gluR-5 ve gluR-6, yetişkin sıçan beyinde Q/R bölgesinde sırasıyla %50 ve %70'e düzenlenir, ancak bu oran embriyogenezin erken döneminde çok daha düşüktür (Seeburg vd. 1996).

gluR-B, -C ve -D'nin 13. ekzonunda başka bir düzenleme sitesinde, bir arginin kodonunu (AGA) bir glisin kodonuna (IGA) dönüştürür ve buna göre site, R/G düzenleme sitesi olarak adlandırılır. R/G sitesindeki düzenleme de erken gelişim sırasında değişiklik gösterir ve yetişkin beyninde gluR-B ve -C için maksimum %80-90'a ulaşır (Lomeli 1994).

2.1.2.4 Hepatit delta virüsü antigenomik RNA

Hepatit delta virüsü (HDV), yaklaşık 1700 nükleotitten oluşan kapalı, dairesel bir RNA'dır. Genom, RNA ara ürünü olan antigenom aracılığıyla çoğaltılır (Lai vd. 1995). Hem genom hem de antigenom, viroidlerinkine benzer şekilde, oldukça baz çiftli yapılar halinde katlanır. Virüs yalnızca tek bir açık okuma çerçevesini (ORF) ifade etse de, adenosin deaminasyon yoluyla RNA düzenlemesi, bu tek ORF'den iki temel proteinin sentezine sebep olur (Şekil 2.5). Daha kısa protein olan HDAg-p24, ORF'den sentezlenir, durdurma kodonu (UAG) ile sona erer. Daha uzun protein olan HDAg-p27 sentezlenmesi için RNA düzenlemesiyle durdurma kodonunu (UAG) triptofan kodonuna (UGG) dönüştürür, RNA düzenlemesi ile açık okuma çerçevesini 19 amino asit uzatır. Proteinin daha kısa formu olan HDAg-p24, replikasyon için gerekliyken, daha uzun sürümü olan HDAg-p27, virüs paketlemesi için gereklidir (Casey vd. 1995, Polsen vd. 1996).



Şekil 2.5 Hepatit delta virüsü (HDV) antigenomik RNA'sının RNA düzenlemesi için ADAR enzimi, bir adenosini (A) bir inozine (I) dönüştürmek için amber/W bölgesindeki antigenomik RNA üzerinde etki eder (Şekil 2.5 Polson vd. 1998)

Dizi değişikliği, replikasyon sırasında genomik RNA'ya geçirilir. Düzenlenmemiş genomun transkripsiyonu, HDV replikasyonu için gerekli protein olan HDAG-p24' kodlayan mRNA'yı verir. Düzenlenmiş genomun transkripsiyonu, HDV genomunun paketlenmesi için gerekli olan ve 19 ek amino asit (mavi) içeren bir protein olan HDAG-p27'yi kodlayan mRNA'yı verir.

2.1.3 Ekleme/silme ile RNA düzenlenmesi

şimdiye kadar tartişılan düzenleme olayları, kodlanmış bir nükleotidin kovalent modifikasyonunu içerir. Bu kısımda, genomik olarak kodlanmamış nükleotitlerin eklenmesini veya silinmesini içeren ikinci ana düzenleme kategorisini içerir. En iyi karakterize edilen ekleme/silme düzenleme türü, bir protozoan olan tripanozomların mitokondriyal öncü-mRNA'larında meydana gelen UMP'nin (ridin monofosfat) eklenmesini ve silinmesidir. Kılavuz RNA'lar (gRNA'lar) olarak adlandırılan küçük RNA'lar, UMP'lerin nereye ekleneceğini veya çıkarılacağını belirler. Bazı durumlarda üridin dışındaki nükleotitleri içeren diğer ekleme/silme düzenleme türleri, diğer organizmaların mitokondrilerinde de gözlemlenmiştir (Gott ve Emerson 2000).

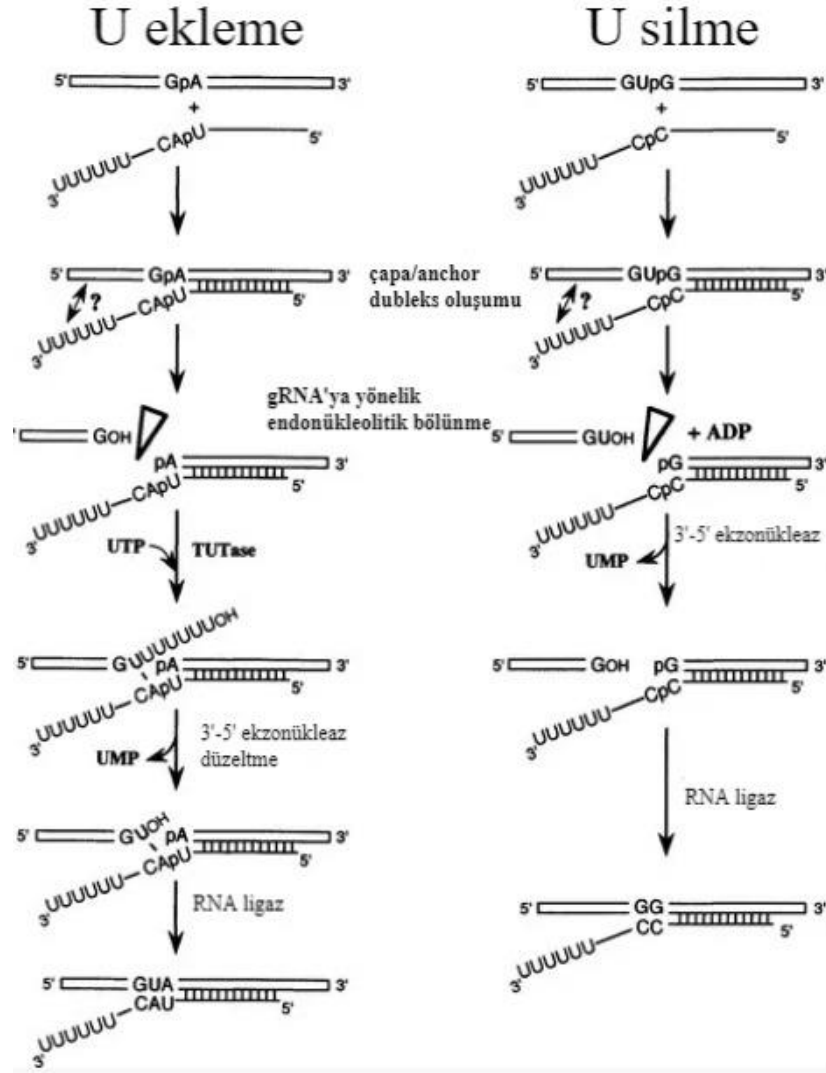
2.1.3.1 Trypanosomatid protozoa'da düzenleme

Kinetoplastid tripanozomların mitokondriyal kodlu mRNA'sı, UMP'lerin eklenmesi veya silinmesiyle düzenlenir (Kable vd. 1997, Estvez vd. 1999).

Düzenleme sitelerinin sayısı belirli RNA'ya bağlıdır, bazı RNA'lar doğru ORF'yi oluşturmak için çok az ekleme veya silme gerektirir ve diğerleri işlevsel ORF'yi oluşturmak için yüzlerce sitede düzenleme gerektirir.

2.1.3.1.1 U ekleme/silme RNA düzenlemesinin katalitik mekanizması

Genel olarak, U ekleme ve silme ile düzenleme, öncü-mRNA boyunca 3' ile 5' yönünde gerçekleşir. gRNA'lar, GU ve kanonik baz çiftleri ile düzenlenmemiş öncü-mRNA ile baz çifti oluşturur ve üridinlerin nereye eklenmesi veya silinmesi gerektiğini belirler (düzenleme çift zincir RNA'da mümkündür). gRNA'lar yaklaşık 70 nükleotit uzunluğundadır ve üç alandan oluşur. Bu üç alan, düzenlenecek bölgenin öncü-mRNA'sını mükemmel bir şekilde tamamlayan bir 5' dizisi olan ankor; düzenlenecek bölgeyi kısmen tamamlayıcı olan merkezi alan ve ilk gRNA-mRNA etkileşimini kararlı hale getiren 5-24 kalıntıdan oluşan 3' U-kuyruğu (Şekil 2.6) (Blum 1990, Kable vd. 1996, Seiwert vd. 1996). Düzenlenmemiş pre-mRNA'yı kısmen tamamlayıcı olan merkezi alan, UMP'lerin nereye ekleneceği veya silineceğini belirler. Şekil 2.6'de gösterildiği gibi, eşleşmeyen bazların konumları, üridinlerin ekleneceği veya çıkarılacağı yerleri işaretler.



Şekil 2.6 Kinetoplastid mitokondride RNA düzenleme mekanizması için mevcut modeller (Madison-Antenucci vd. 2002)

Sol panel U-ekleme için bir model gösterir ve sağ panel U-silme için bir model gösterir. Öncü-mRNA'lar açık kutular olarak gösterilir, kılavuz RNA'lar çizgilerle gösterilir ve dikey çizgiler baz çiftlerini gösterir. Açık ok uçları, bölünme bölgelerini gösterir ve sadece düzenleme bölgelerini çevreleyen diziler gösterilir. Çift ok, gRNA'nın 3' U-kuyruğu ile önceden düzenlenmiş dizi arasındaki olası bir etkileşimi gösterir.

Bölünme-ligasyon modeline dayanan U-ekleme mekanizması, dört farklı enzimatik aktiviteyi içerir: bir RNA endonükleaz, bir üridililtransferaz, bir ekzonükleaz ve bir RNA ligaz (Şekil 2.6 sol panel) (Kable vd. 1996, Bryne vd. 1996, Connell vd. 1997).

Bu enzim aktivitelerinin tümü tripanozomlarda tespit edilmiştir (Piller vd. 1997, Bakalara 1989, Cruz-Reyes 1996, Sabatini vd. 1995).

Başlangıçta, gRNA'nın ankor sekansı, mRNA'ya bağlanır ve bölünme, gRNA-mRNA dupleksinin (mRNA'ya göre) hemen 5'inde gerçekleşir (gRNA'nın merkezi alanı ile düzenlenmemiş öncü-mRNA arasında oluşan uyumsuzluklardan). Nükleaz, mRNA'nın 5' bölünme ürünü üzerinde 3' hidroksil ve 3' bölünme ürünü üzerinde 5' fosfat üretir. Ardından, terminal üridil transferaz (TUTase), 5'-UMP'yi dâhil etmek için UTP kullanarak mRNA'nın 3' ucuna U kalıntıları ekler (Blum vd. 1990, Alfonzo vd. 1997). Son adım, mRNA'nın bir RNA ligaz tarafından yeniden birleştirilmesidir.

2.1.4 Bitkilerde RNA düzenleme

Bitki RNA düzenlemesi ilk olarak 1989'da mitokondriyal transkriptlerde C'den U'ya dönüşüm olarak tanımlandı (Covello vd. 1989, Gualberto vd. 1989, Hiesel vd. 1989). *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Brassica napus* Beta vulgaris, *Vitis vinifera* ve *Nicotiana tabacum* gibi çeşitli bitkilerde sırasıyla mitokondri ve kloroplastlarda yaklaşık 500 RNA düzenleme olayı kaydedilmiştir (Notsu vd. 2002, Handa vd. 2003). Bazı çalışmalar, çok sayıda nükleer transkriptin de diferansiyel olarak düzenlendiğini göstermiştir (Meng vd. 2010).

C'den U'ya ikame değişimi, evrimsel protein kodlayan bölgelerde gerçekleşir. RNA düzenleme olayları, intronlarda ve çevrilmemiş bölgelerde de tanımlanmıştır; bu da ikincil yapı veya düzenleyici öğeler değiştirildiğinden dolayı mRNA kararlılığını veya düzenlemeyi etkileyebilir (Drescher vd. 2002, Farré vd. 2012, Wu vd. 2017). Bazı alt bitki ailelerinde C'den U'ya ek olarak, plastidlerde ve mitokondride "ters" U'dan C'ye RNA düzenlemesi de tanımlanmıştır (Knie vd. 2016, Yoshinaga vd. 1996).

A. thaliana'nın nükleer transkriptomu, muhtemelen memeli RNA düzenlemesine benzer şekilde ADAR'ın bitki homologunun neden olduğu A'dan I'ya RNA düzenleme olaylarının varlığını ortaya koymuştur (Meng vd. 2010).

2.2 Memeli Hücrelerinde Yönlendirilmiş Evrim

Yönlendirilmiş evrim, test tüpündeki biyolojik moleküllerin ve sistemlerin doğal evrim sürecini hızlandırmayı amaçlayan, tekrarlamalı gen çeşitlendirme turları ve kütüphane taraması/seçimi yoluyla gerçekleştirilen bir yöntemdir. Proteinlerde, metabolik yollarda ve hatta tüm genomda gelişmiş veya yeni işlevler kazanmış proteinler tasarlamak için güçlü ve yaygın yöntemlerden biridir.

Yönlendirilmiş evrim deneylerinin amacı, memeli biyolojisini araştırmak veya modüle etmek olduğundan çoğunlukla in vitro sistemler, bakteriler veya maya ortamları kullanılır. Genler, enzimler ve proteinler memeli hücrelerinde etki göstermesi amacıyla tasarlanmak istendiğinde, memeli olmayan ortamlar kullanılıyor, bu durum evrimleşebilecek hedeflerin kapsamını ve işlevselliğini ciddi şekilde sınırlar. Memeli hücrelerinin kendisini yönlendirilmiş evrim ortamı (deney alanı) olarak kullanmayı mümkün kılan yeni platformlar geliştiriliyor.

Yönlendirilmiş evrim, yeni ve geliştirilmiş özelliklere sahip biyomoleküller tasarlamak için güçlü bir yöntemdir. Tipik bir yönlendirilmiş evrim deneyinde, başlangıç dizisinin mutagenezi yoluyla genetik varyantlar kütüphanesi üretilir. İfade edilen biyomoleküller daha sonra seçilir veya arzu edilen aktivite için taranır. Bu sürecin tekrarlanmalı döngüleri, giderek daha fazla optimize edilmiş biyomoleküller üretir. Bu yaklaşım, endüstri ve araştırma için yararlı moleküllerin yanı sıra çok sayıda kritik biyoteknolojik ürünler sağlamıştır ve 2018 Nobel Kimya Ödülü'ne sahip olmuştur (Drummond vd. 2018, Bloom vd. 2019). Pek çok pratik uygulamanın yanı sıra, biyomoleküler yapı, evrimsel biyoloji ve organizma uygunluğu hakkında değerli temel bilgiler genellikle yönlendirilmiş evrim kullanılarak elde edilebilir.

Yönlendirilmiş evrim, belirli bir hücre tipi veya genetik temelde ki işlevi optimize ederek, hedeflenen veya kişiselleştirilmiş tıbbi yöntemler için platform sağlayabilir. Temel bilim perspektifinden, araştırmacılar, yeterince çalışılmamış memeli proteinlerinin veya bilinmeyen yapılara sahip olanların yapısı ve işlevi hakkında yeni bilgiler elde edebilir ve ayrıca memeli evrim biyolojisinin ilkelerini keşfedebilirler.

Yönlendirilmiş evrim çoğunlukla optimize şekilde işlev görmeyen ürünler vermiştir. Bilhassa monoklonal antikolar, floresan proteinler, inteinler, aminoasil-tRNA sentetazları ve membran proteinleri gibi örnekler verilebilir (Visintin 1999, Herwig vd. 2017, Buskirk vd. 2004, Peck 2011, Italia vd. 2020, Armbruster vd. 2007) Bunun en temel nedeni moleküllerin uygulanacağı ortamlarda geliştirilmemiş olmasıdır.

Yönlendirilmiş evrim deneyleri sonucu elde edilen ürünler memeli hücrelerinde kullanılması amaçlandığında veya amaç memeli biyolojisini incelemek olduğunda yaygın olarak in vitro, bakteri veya maya ortamları kullanılmaktadır. Çoğu memeli proteini, bakteriler gibi prokaryotlarda veya maya gibi tek hücreli ökaryotlarda ifade edildiğinde, genellikle yanlış katlanma veya kümelenmeler gerçekleşir. Memeli hücrelerine özgü karmaşık sinyal yollarının olmaması veya diğer farklılıklar nedeniyle memelide ifade ettirildiğinde işlevselliğini tam olarak göstermezler (Kachroo vd. 2015). Sonuç olarak, evrimleşmiş ürünlerin arzu edilen fonksiyonları, memeli hücrelerinde istenmeyen moleküller arası etkileşimler, zayıf katlanma, beklenmedik modifikasyonlar, hücresel lokalizasyon ve diğer birçok ciddi problemle karşılaşır.

Tüm bu sorunların bariz çözümü, yönlendirilmiş evrim için tasarım, mühendislik ve kalite kontrol ortamı olarak memeli hücrelerinin kendisini kullanmaktır. Görünüşte basit olmasına rağmen, bu çözüm sayısız engelle karşı karşıyadır. Teknik (örneğin, memeli hücrelerinin yavaş büyüme hızı, mühendislik zorlukları), ekonomik ve pratik olmayan nedenlerden dolayı, araştırmacılar memeli hücrelerini yönlendirilmiş evrim ortamı olarak kullanmaktan kaçınmaktadır.

Teknolojik ilerlemeler, memeli hücre yönelimli evrim çehresinin kapsamlı bir şekilde yeniden şekillendirilmesini sağlamıştır. Kitaplık oluşturma ve varyant seçimi için gelişen stratejiler de dâhil olmak üzere memeli hücrelerine özgü yeni platformlar, memeli hücrelerine dayalı yönlendirilmiş evrimi cazip hale getiriyor.

2.2.1 Memeli hücrelerine dayalı yönlendirilmiş evrimin genel ilkeleri

Yönlendirilmiş evrim deneyinin her döngüsünün üç ana bileşeni vardır: mutajenez, ifade ve tarama veya seçim. Her bileşen için, memeli hücreleri benzersiz zorluklar sunar.

2.2.1.1 Mutajenez

Yönlendirilmiş evrim deneyinin her döngüsündeki ilk adım, ilgilenilen bir genin genetik varyantlarından oluşan geniş bir kitaplığın oluşturulduğu mutajenezdir. Genel mutajenez yaklaşımları, genom boyunca hedef dışı mutasyonlar ortaya çıkarır. Memeli genomunun muazzam boyutu ve karmaşıklığı göz önüne alındığında, bu tür hedef dışı mutasyonlar, taramayı veya seçilimi verimsizleştirir.

Bu nedenle, memelilere yönelik evrim stratejileri, belirli bir genetik bölgeye yönelik mutajenez anlamına gelen, hedeflenmiş mutajeneze dayanır.

Eskiden yaygın olan memeli hücrelerinin dışında meydana gelen mutajenez çeşitleri, hataya açık PCR ve bakterinin mutator suşları gibi rastgele tekniklerin yanı sıra siteye yönelik mutajenez ve sentetik kütüphane üretimi gibi rastgele olmayan teknikleri içerir (Cirino vd. 2003, Muteeb ve Sen 2010, Badran ve Liu 2015).

Rastgele olmayan mutajenez, hangi genetik varyantların oluşturulduğu üzerinde kesin kontrol sağlar, ancak bu kitaplıkların boyutu genellikle rastgele yöntemler kullanılarak üretilenlerden çok daha küçüktür (Villette vd. 2019). Bu nedenle, eski memeli mutajenez stratejilerinin çoğu rastgele mutajeneze dayanır.

Güncel olarak, memelilerde mutajenez veya memeli hücrelerinin içinde meydana gelen mutajenez, somatik hipermutasyona, CRISPR tabanlı DNA hedeflemeye, yüksek oranda işleyici RNA polimerazlara veya viral replikasyona dayanır (Odegard ve Schatz 2006, Pickar-Oliver ve Gersbach 2019, Moore vd. 2018, Chen vd. 2020). Eski memeli

mutajenez tekniklerinin aksine, yeni teknikler, daha ileri mutajenez turlarını sağlamak için memeli hücre popülasyonundan genetik kütüphaneleri çıkarmaya gerek kalmadan çok sayıda mutajenez turunu mümkün kılar. Bu stratejilerin çoğu, mutajenezi yönlendirmek için DNA'yı genetik hasara uğratan enzimlere dayanması nedeniyle şu anda sınırlı bir mutasyon spektrumuna sahiptir. Tasarlanmış tek sarmallı DNA onarım şablonları kullanılarak Cas9 ile indüklenen homolojiye yönelik onarım gibi memelilerde rastgele olmayan mutajenez yöntemleri, daha geniş bir nokta mutasyonları spektrumunun oluşmasını teşvik edebilir, ancak daha küçük kitaplıklar da oluşturabilir (Sansbury vd. 2019, Erdogan vd. 2020).

2.2.1.2 İfade

Mutajenize edilmiş genetik kütüphane üretildiğinde, protein varyantları, memeli hücreleri içinde ya geçici olarak ya da kararlı bir şekilde ifade edilmektedir. Kimyasal transfeksiyon ve elektroporasyon dâhil olmak üzere geçici ifade yöntemlerinde, hücreler protein varyantlarını genomik olarak kodlamadan veya varyantların genetik bilgilerini kopyalamadan ifade eder. Geçici ekspresyonla ilgili zorluklar arasında transfeksiyon verimliliği, tutarsız ekspresyon seviyeleri, tek bir hücrede çoklu varyantların ekspresyonu ve kullanıcının istediği bir hücre hattıyla uyumluluk yer alır. Ayrıca, geçici olarak eksprese edilen biyomolekül varyantlarını kodlayan genler, memelilerde birden fazla nesil boyunca bir şekilde kopyalanmazsa, bunlar memelide mutajenize edilemez ve tekrarlanabilirliği ortadan kalkar. Bununla birlikte, genetik varyantları kodlamak, çoğaltmak ve geçici olarak ifade etmek için virüsler kullanılırsa, memelilerde mutajenez, geçici ifadenin yanı sıra kullanılabilir.

Retroviral transdüksiyon veya bölgeye özel rekombinasyon gibi yöntemlerle kararlı protein ifade eden hücre hatları, geçici ifadeye göre birçok sorunu çözebilir. Kararlı olarak kodlanmış genler, memelilerde mutasyona uğrayabilir ve protein ekspresyon seviyeleri daha tutarlı olabilir.

2.2.1.3 Seçim veya eleme

Mutajenez sonucu oluşturulan protein varyant kütüphanesi memeli hücrelerinde ifade edilir, eksprese edilen varyantların uygun aktivite açısından değerlendirilmesi ve ardından popülasyonda zenginleştirilmesi gerekir. Bu adım, tarama veya seçim olarak kategorize edilebilir ve ayrıntılar tamamen gelişen belirli biyomoleküler aktiviteye bağlıdır. Tarama, genellikle flüoresan bazlı akış sitometrisi veya hücresel görüntüleme ile belirli bir fenotip temelinde hücrelerin fiziksel olarak ayrılmasını içerir. Taramaya dayalı yöntemler, hücrelerin genellikle her tur öncesinde, sırasında ve sonrasında manuel olarak manipüle edilmesi gerektiğinden emek oldukça yoğun olabilir.

Seçime dayalı stratejiler, genetik varyantları zenginleştirmek için çoğunlukla hücrelerin veya virüslerin hayatta kalmasına ve çoğalmasına dayanır. Genel olarak, seçim, çeşitli genetik değişkenler kitaplığını kodlayan hücrelerin sitotoksik ilaçla tedavi edilmesini içerir. Yalnızca sitotoksik ilaca direnç sağlayan genetik varyantları kodlayan hücreler, popülasyonda çoğaltılır ve zenginleştirilir böylece seçimden sağ çıkan varyantlar karakterize edilir. Minimum araştırmacı müdahalesi gerektirdiğinden, ölçeklenmesi ve yinelenmesi kolaydır ve çok az özel donanım gerektirir, seçim birçok yönden taramadan çok daha fazla tercih edilir.

Bununla birlikte, memeli hücrelerinin yavaş büyüme hızı, sitotoksik bozulmaların etkisini ortadan kaldıran nispeten dar biyomolekül kapsamı ve hücrelerin istenmeyen yolları aracılığıyla pek çok rahatsızlığa karşı kendiliğinden direnç kazanma eğilimi, seçime dayalı yaklaşımların çoğunlukla onkoproteinler üzerine yapılan çalışmalarla sınırlı hale getirir (Emery vd. 2009, Azam vd. 2003, McDermott vd. 2014, Booth vd. 2016, Forment vd 2017).

2.2.2 Memeli hücrelerine yönelik yönlendirilmiş evrim

Memeli hücrelerine dayalı yönlendirilmiş evrim deneylerinde, ilk çalışmalardaki kilit darboğazların çoğu, yalnızca bir mutajenez turunun gerçekleştirilmesi veya yalnızca çok

az varyantın test edilmesi idi. Memelilerde hedeflenen mutajenezi mümkün kılan çığır açan teknikler, çok sayıda evrim turu gerektiren ve çok sayıda varyantı test eden yönlendirilmiş evrim deneylerdir. Eski memeli mutajenezi ve yeniden ifade gibi verimsiz ve hantal kitaplık oluşturma adımlarını ortadan kaldırır.

Memeli genomunun muazzam boyutu, belki de memelilerdeki genleri çeşitlendirmenin önündeki en önemli engel, tarama veya seçim stratejilerini aldatabilen hedef dışı mutasyonlar için pek çok fırsat sağlar. Ne yazık ki, bakterilerde veya mayalarda iyi işlev gören oldukça özgül genomik düzenleme stratejilerinin veya yaygın olarak kullanılan genetik araçların çoğu, memeli hücreleri için mevcut değildir. Örneğin, bakteri veya mayada in vivo mutajenezi kolaylaştıran memeli plazmitleri (SV40 gibi, Mahon vd. 2011) ve memeli yapay kromozomları (mayada yönlendirilmiş evrim için OrthoRep platformu, Brown & Glass 2020, Ravikumar vd. 2018), Memeli hücrelerinde bu platformların yok denecek kadar azdır.

2.2.2.1 Somatik hipermutasyon

AID, sitozin bazının deaminasyonu ile DNA'da mutasyonlar yaratır ve bu da mRNA'da urasile olarak okunmasına neden olur. Başka bir deyişle, C:G baz çiftini U:G uyumsuzluğuna dönüştürür. Hücrenin DNA kopyalama mekanizması U'yu T olarak tanır ve dolayısıyla C:G, T:A baz çiftine dönüştürülür. AID, APOBEC ailesinin bir üyesidir.

AID, lenf nodlarındaki B hücrelerinde antikor çeşitliliği üreten mutasyonlara neden olur, ancak aynı mutasyon süreci B hücreli lenfomaya yol açabilir (Pavri & Nussenzweig 2011).

Birkaç grup, memeli hücrelerinde antikorların ve flüoresan proteinlerin taramaya dayalı yönlendirilmiş evrimini gerçekleştirmek için AID aracılı mutajenezi kullanmıştır (Bowers vd. 2011, Wang vd. 2004). Çoğunlukla, AID'yi doğal olarak eksprese eden B hücreleri, sürekli mutajenez için ilgili genlerin dâhil edildiği konakçı hücre olarak

kullanılır. AID'nin başlangıçta belirli genetik lokusları hedeflediği düşünülse de kültürlenmiş hücrelerde, özellikle yüksek oranda kopyalanmış bölgelerde genom boyunca mutasyonları indüklediği açıktır (Al-Qaisi vd. 2018, Wang vd. 2018).

AID ekspresyonu, yüksek seviyelerde meydana geldiğinde sitotoksiktir ve araştırmacıların yönlendirilmiş evrim deneyleri sırasında ekspresyon seviyelerini yapay olarak ılımlı hale getirmeleri gerekir.

2.2.2.2 RNA kılavuzlu endonükleazlar tarafından hedeflenen mutajenez

Cas9 gibi CRISPR enzimleri, RNA kılavuzu (sgRNA) kullanılarak uygun bir protospacer bitişik motif (PAM) içeren herhangi bir genomik diziye hedeflenebilen bakteri türevli endonükleazlardır. Bir sgRNA-hedefli genomik bölgede, endonükleaz, genellikle ya homolog olmayan uç birleştirme ya da homolojiye yönelik onarım tarafından onarılan çift iplikli kopmaları indükler (Pickar-Oliver & Gersbach 2019).

Ortaya çıkan DNA hasarı, yönlendirilmiş evrim deneylerinde ilgili genleri çeşitlendirmek için kullanılabilir. Hedeflenen onkogenlerde Cas9 ile indüklenen çerçeve içi eklemeler ve silmeler, ilaca dirençli protein varyantları oluşturmak ve zenginleştirmek için kullanılmıştır (Donovan vd. 2017, Ipsaro vd. 2017).

Bununla birlikte, homolog olmayan uç birleştirmenin, çerçeve kaymalarını tetikleme ve potansiyel olarak erken sonlandırmaya neden olma potansiyeli yüksek olan eklemeler ve silmeler yapabilir, homolojiye yönelik onarıma göre işlevsel değişkenler oluşturma olasılığı çok daha düşüktür. Spesifik olarak homolojiye yönelik onarım için Cas9 tabanlı bir yöntem, memeli lizozomlarında işlev gören, kırmızı flüoresan proteini geliştirmek için kullanılmıştır (Erdogan vd. 2020). Griesbeck vd. Flp rekombinaz-FRT sistemini kullanarak mRuby tabanlı floresan proteini kodlayan genin tek bir kopyasını memeli genomlarına yerleştirdiler. Nokta mutasyonlarını kodlayan tek sarmallı oligonükleotitler kullanarak (yaklaşık %20 verimlilikle) beş kodonda istenen homolojiye yönelik onarımı gerçekleştirmek için donör ssDNA şablonları başarıyla

kullanıldı. Bu yaklaşım kullanılarak, mCRISPRed olarak adlandırılan, düşük pH'ta stabilite gösteren ve memeli lizozomlarında bile işlevsel olduğu kanıtlanmış yeni bir mRuby varyantı tanımlanmıştır.

Liu vd.'nin öncülüğünü yaptığı baz editörlerden esinlenerek, Cas9'un DNA hedefleme yeteneğini AID ve APOBEC gibi sitidin deaminazların vahşi tip veya tasarlanmış varyantlarının nokta mutasyonu indükleyici aktivitesi ile birleştiren iki teknoloji geliştirilmiştir.

Hedefli AID aracılı mutajenez (TAM) olarak adlandırılan bir yaklaşımda, Xing vd. AID'yi özgül DNA dizilerini bağlayan ancak kesmeyen devre dışı bırakılmış Cas9 varyantlarıyla (dCas9) kaynaştırmıştır (Ma vd. 2016). dCas9-AID füzyonu K562 hücrelerinde BCR-ABL'ye yönelik nokta mutasyonlarını hedeflemek için kullanılmıştır. İmatinibin mevcudiyetinde hücreler pasajlandıktan sonra ilaca dirençli BCR-ABL varyantlarını kodlayan hücreler hali hazırda zenginleştirilmiştir.

CRISPR-X olarak adlandırılan bir yaklaşımda, sitidin deaminaz, RNA aptamer bağlayıcı protein MS2'ye kaynaştırılmıştır. MS2-AID füzyonu, aynı zamanda bir MS2-bağlayıcı RNA aptamer alanı içeren dCas9-bağlayıcı sgRNA ile etkileşim yoluyla istenen bir genetik lokusa hedefleyebilir (Hess vd. 2016). CRISPR-X, proteazom inhibitörü bortezomib'e dirençli varyantları oluşturmak ve tanımlamak için K562 hücrelerinde bir proteazom alt birimine yönelik mutasyonlar hedeflenmiştir. Bu yöntemler, lokusları kodlayan antikorlar dâhil olmak üzere diğer endojen genleri geliştirmek için de uygulanmıştır (Devilder vd. 2019). Heyecan verici bir şekilde, adenosin deaminazlar gibi DNA'yı deaminasyona uğratan enzimlerin ortaya çıkışı, hedeflenen mutajenez için bu tür yaklaşımlar kullanıldığında erişilebilir mutasyonel spektrumu genişletebilir (Gaudelli vd. 2017).

Gelişmekte olan CRISPR tabanlı araçlar, memeli hücrelerinde DNA'ya yönelik nokta mutasyonlarını hedefleme stratejisi olarak doğal somatik hipermutasyona göre büyük bir gelişme oluşturmaktadır. Bununla birlikte, hala bazı önemli sınırlamalar vardır. TAM ve CRISPR-X, tasarlanmış sgRNA'ları sınırlanan çok küçük (~10–50 bp) DNA

bölgelerine yönelik mutasyonları hedefler (Ma Hess 2016). Bu küçük hedefleme çerçeveleri, birçok farklı sgRNA'nın tüm diziyi mutajenize etmek için gen boyunca döşenmesi gerektiği anlamına gelir. Kritik olarak, Cas9'a özgü PAM'lerin olmaması nedeniyle bazı bölgelere erişilemeyebilir. Ayrıca, tekrarlanan yönlendirilmiş evrim turları mutasyon birikimine yol açtığından, kılavuz tanıma dizileri mutasyona uğradıkça yeni sgRNA'lar gerekir.

2.2.2.3 Prosesif hedefli mutajenez

CRISPR tabanlı teknolojilerin sınırlamaları göz önünde bulundurularak, yakın zamanda memeli mutajenezinde hedeflenen yeni bir strateji geliştirilmiştir. Cas9 gibi, RNA polimerazlar da kesin olarak DNA'nın belirli bölgelerine hedeflenebilir. Cas9'dan farklı olarak, son derece hareketli/işlevsel olabilirler.

Bakteriyofajdan türetilen T7 RNA polimeraz, oldukça özgül T7 promotörü tarafından yönetilen 10.000 bp'den fazla DNA'nın üzerinde gezebilir (Thiel vd. 2001). Escherichia coli tabanlı MutaT7 sisteminde, T7 polimerazı, T7 promotörünün akış aşağısındaki herhangi DNA uzantısında in vivo nokta mutasyonları oluşturan, işleyici, yüksek düzeyde hedeflenmiş bir mutajenik protein oluşturabilir. Bu teknolojiler baz alınarak MutaT7 sistemi sitidin deaminazla kaynaştırılır (Park ve Kim 2021, Moore vd. 2018). Bu platforma TRACE adı verilmiştir. TRACE, MutaT7 konsepti üzerine inşa edilerek doğrudan memeli hücrelerinde ilgilenilen özgül genleri mutajenize edebilmiştir. TRACE, HEK293T hücrelerinde maviye kaydırılmış emisyon spektrumlarına sahip GFP varyantlarını taramak ve A375 hücrelerinde küçük molekül inhibitörlerine dirençli MEK varyantlarını seçmek için kullanılmıştır.

RNA polimerazların yüksek işlenebilirliği, CRISPR'da ki gibi PAM dizilerinin mevcudiyeti veya evrimin her turu sırasında ilgilenilen her gen için birden fazla, özel sgRNA'ların sentezlenmesi ve tanıtılması gibi önemli dizi sınırlamaları olmadan DNA'nın kilobazlarca mutasyonuna uğratar.

Hedeflenen bölgenin aşağı akışında istenmeyen mutajenezi önlemek için T7 polimerazı sonlandırmak için birden fazla strateji kullanılabilir. T7 polimerazın, protein kodlama dizisinin ters yönüne bakan ikinci bir T7 promotörünün yerleştirilmesi hem C'den T'ye hem de G'den A'ya mutasyonların dâhil edilmesine olanak tanır (Moore vd. 2018, Álvarez vd. 2020). Adenosin deaminazların geliştirilmiş varyantları diğer DNA'yı hedefleyen enzimlere füzyonu C'den G'ye transversiyonlarını indüklemeye yönelik ilgili bir yaklaşım geliştirmiştir, CRISPR sistemlerinde de olduğu gibi, bu teknolojilerin mutasyon spektrumunun genişlemesine olanak tanır (Gaudelli vd. 2020, Álvarez vd. 2020, Kurt vd. 2021).

TRACE gibi MutaT7 bazlı sistemlerin önemli bir sınırlaması, ilgilenilen genin yukarı akışında bir T7 promotörünün kurulumunu gerektirmeleridir.

2.2.2.4 Memeli hücrelerinde virüs bazlı sürekli yönlendirilmiş evrim

Memeli mutajenezindeki gelişmelere rağmen, tipik hücre tabanlı platformlarla ilgili bir dizi sorun, geniş uygulamayı kısıtlamaya devam ediyor. İlk olarak, fonksiyonel varyantların zenginleştirilmesi, bireysel evrim turlarının genellikle bir hafta veya daha uzun süre gerektirdiği memeli hücrelerinin yavaş replikasyon hızı ile sınırlandırılabilir. İkincisi, değerlendirme teknikleri evrimleşebilecek biyomolekül türlerini sınırlar. Seçime dayalı yöntemler, yalnızca hücre canlılığını etkileyen işlevleri geliştirebilirken, taramaya dayalı yöntemler, taranabilen gözlemlenebilir fenotip gerektirir. Yönlendirilmiş evrimin birçok değerli hedefi, her iki kategoriye de uymayabilir.

Memeli hücrelerinde virüs tabanlı sürekli yönlendirilmiş evrimin yeni uygulamaları, bu engelleri ele almak için hazırlanmıştır ve bu alanda devrim yaratma potansiyeline sahiptir. Virüs tabanlı yönlendirilmiş evrim kavramı basittir: ilgilenilen geni hataya eğilimli çoğalan bir memeli virüsünün genomuna sokulur ve ardından virüsün memeli hücrelerinde yayılma kabiliyetini yönlendirilmiş evrim hedefinin işlevine bağlayan seçim çifti uygulanır. Böylece, virüsün basitçe yayılması, istenen gen varyantlarının üretilmesi ve zenginleştirilmesiyle sonuçlanır. Bakteriye dayalı yönlendirilmiş evrim

alanında, faj destekli sürekli evrim (PACE), istenen protein fonksiyonunu basitçe M13 fajının E. coli'de çoğalma kabiliyetine bağlayarak birçok farklı protein fonksiyonunun hızlı ve verimli evrimini sağlamıştır (Esvelt vd. 2011).

Virüs tabanlı sistemler geniş ölçüde kullanışlıdır, memelilere yönelik evrim platformu tasarlanırken bir dizi genel ilke dikkate alınmalıdır. İlk olarak, viral replikasyon oranı önemlidir. Bazı memeli virüsleri diğerlerinden daha hızlı çoğalır veya hücreden salınımı çok daha kuvvetlidir. Bununla birlikte, viral replikasyon, ilgilenilen proteinin ekspresyon, olgunlaşma ve fonksiyon hızını geçmemelidir. İkincisi, platformlar mümkün olduğu kadar çok sayıda farklı memeli hücre tipinde ilgili genleri geliştirebilmelidir. Büyük paketleme kapasiteleri ve geniş yönelimleri olan virüsler tercih edilir (Dai vd. 2020). Üçüncüsü, platformlar uygulanabilirlik göz önünde bulundurularak tasarlanmalıdır. Virüs üretimi, paketleme verimliliği ve viral yayılımı izlemek için görsel yardımcıları gibi diğer tasarım özellikleri dikkate alınmalıdır. Son olarak, en önemli husus güvenlidir. Birçok laboratuvar viral suşu, vahşi tip konakçılarda replikasyonlarını önlemek için yerleşik güvenlik stratejilerine sahip olmalıdır. Bu stratejiler arasında hücre kültüründe gerekli olmayan genlerin silinmesi, kapsamlı trans-tamamlama kullanılması veya organizmalarda replikatif enfeksiyon üretmeyen laboratuvara uyarlanmış suşlar geliştirilmelidir (Danthinne ve Imperiale 2020, Chira vd. 2015).

Memeli hücrelerinde viral evrime dair bazı ilgi çekici çalışmalar vardır. İlk çalışma yöntemleri çok çeşitli substratlar için yetersiz donanıma sahiptir ve çoğu zaman ciddi güvenlik yükümlülükleri vardır (Mullick vd. 2006, Uil vd. 2011, Das vd. 2004). Memeli hücreleri için iki uyarlanabilir virüs tabanlı yönlendirilmiş evrim platformu tasarlanmıştır (Berman vd. 2018, English vd. 2019). Memeli PACE (mPACE) tarzı platformlar evrim deneyi boyunca eş zamanlı ve sürekli olarak mutajenez, seçim ve amplifikasyonun gerçekleşmesini sağlamak için virüsün ve konakçı hücrenin özel tasarımına dayanır. İlk olarak, temel viral genler, viral genomdan silinir. İkinci olarak, çalışılmak istenen gen, viral genoma sokulur. Virüs oluşması ve salınımı için gerekli proteinlerle birlikte transkripsiyonu yapılır, böylece çalışılan gen popülasyonda

çoğalacaktır (Esvelt vd. 2011, Richter vd. 2020, Wang vd. 2018, Dickinson vd. 2014, Miller vd. 2020).

mPACE tarzı sistemler, memeli hücrelerinde sürekli yönlendirilmiş evrim platformu oluşturmak için çift sarmallı DNA virüsü olan adenovirüsünü kullanır. Mutatör olarak adenoviral DNA polimeraz'ın yüksek oranda hataya eğilimli tasarlanmış versiyonu kullanılır, sistem viral replikasyon sırasında ortaya çıkan mutasyonlara dayanır. Genetik olarak harekete geçen dizilerin viral evrimi (VEGAS) olarak adlandırılan ikinci mPACE tarzı sistem, aynı prensipler üzerinde çalışır ancak endojen Sindbis replikaz tarafından sunulan mutasyonlarla tek sarmallı RNA virüsü olan alfavirüsü Sindbis'i kullanır (Berman vd. 2018, English 2019)

Memeli hücre tabanlı yönlendirilmiş evrim platformları arasında, virüs tabanlı sürekli yönlendirilmiş evrim platformları, büyük kitaplık boyutları ve hızları bakımından en uygun platformları sağlar ve prensip olarak, en geniş biyomolekül yelpazesinin evrimleşmesine olanak sağlar.

2.3 RNA Düzenlemenin Bugünü

Memeli hücrelerinde popüler hale gelen DNA'da nükleotid sayısını değiştirmeden, düzenleme yapıp dolaylı yoldan RNA düzenlemesi yapılmaktadır. TALE, dCRISPR-Cas9 (dCas9) ve prime editor gibi gelişmiş gen düzenleme teknikleri, çift sarmallı DNA'yı kırmadan hedef genomik dizide baz çifti değişikliği yapar. Baz çifti değişikliği geri döndürülemez şekilde meydana gelir. Bu yaklaşımlar, çok sayıda organizmada nokta mutasyonları oluşturmak için popüler hale gelmiştir ve hastalık tedavisinde uygulamaları olması bekleniyor, klinik denemeler yapılmaktadır (Hsu vd. 2014, Zhang vd. 2011, Franguol vd. 2021).

Bununla birlikte, genomik DNA'da yanlış ve beklenmedik baz düzenlemesi potansiyel kanser riskine, fetal anormalliklere veya diğer beklenmedik bozukluklara yol açar. RNA ise genellikle yalnızca belirli hücre tiplerinde veya belirli zamanlarda ifade edilir. Bu nedenle, RNA'yı hedefleyen düzenleme sistemi kullanıldığında genom dizisi düzenlemesine göre daha az hedef dışı düzenleme yan etkisi beklenir. Ayrıca yanlış

RNA düzenlemesi fetal gelişimi etkilemez çünkü genom dizisini etkilenmez ve tedavi kesilirse mutasyona uğramış RNA'lar hızla bozulur (Gott ve Emerson 2000, Keegan vd. 2001). Bu nedenle RNA düzenleme, klinik kullanımlar için genom düzenlemeden daha esnek ve daha güvenlidir

2.3.1 Yapay RNA düzenleme sistemlerine genel bakış

Tip VI (Cas13) sistemleri, prokaryotlarda RNA'yı hedeflemek ve nihayetinde parçalamak için kullanılır. Cas13a ve Cas13b gibi sistemler, CRISPR RNA (crRNA)'lerin rehberlik ettiği, RNA'yı bölme özelliklerine sahiptir. Cas13a ve Cas13b proteinlerine çeşitli düzenleme yapıları (genellikle protein) dâhil edilmiştir. Örneğin, REPAIRv2, inaktif Cas13b (dCas13) ve mutant ADAR2 deaminaz alanından oluşan Programlanabilir A'dan I'ye Değişikliği katalize eden RNA düzenleme sistemini oluşturur, A'den G'ya mutasyonlardan türetilen hastalıkların tedavisinde potansiyel olarak faydalı hale getirilmesi amaçlanır (Cox vd. 2018). APOBEC alanına sahip dCas13, sitidinden üridin düzenler, RESCUE ise REPAIRv2'nin daha fazla geliştirilmiş sürümüdür ve C'den U'ya düzenleme yapar ancak orijinal ADAR2 deaminaz aktivitesini de olduğu gibi korur (Cox 2018, Abudayyeh vd. 2019).

Stafforst, ADAR2 ve ADARDD2 proteinlerini bağlayan SNAP etiketiyle programlamıştır, Montiel-Gonzalez, Lambda-N proteini ve BoxB elementiyle RNA'yı hedeflemiştir ve Tsukahara, MS2 sistemini kullanarak ek sistemler geliştirmiştir (Stafforst 2012, Vogel 2014, Vogel 2017).

Son zamanlarda, apolipoprotein B mRNA düzenleme (APOBEC) ailesinin üyelerini kullanarak A'den I'ya dönüşüm editazına benzer C'den U'ya RNA düzenlemesi için MS2 sistemini içeren başka bir sistem geliştirilmiştir (Cox vd. 2017, Bhakta vd. 2020)

REPAIR sistemleri, dCas13'ün hedeflemede Cas9 gibi PAM dizisi kısıtlamalarına sahip olmaması nedeniyle tam hedef bölgeyi kılavuzuna kodlayabilir, transkriptomdaki herhangi bir adenozini hedefleme kapasitesi vardır. Bu sistemlerde verimlilik yüksek olmasına rağmen REPAIRv2 için %30'a ve RESCUE için yaklaşık %70'e kadar

düzenleme verimliği vardır en uygun şartlarda, hedef dışı düzenlemeler hala büyük ölçüde mevcuttur (Abudayyeh vd. 2019). Rasyonel mutajenezle dCas13b-ADARDD kompleksleriyle özgüllüğünü 900 kattan fazla artırmayı başarmıştır. Bilinen Cas13b proteinlerinin bir alt sınıfı olan Cas13bt, RNA düzenleme için REPAIR ve RESCUE düzenleyicilerinin ADAR'larından oluşturulmuştur. Cas13bt'nin daha küçük boyutu olması, düzenleyicinin teslimat için adeno-ilişkili virüse verimli paketlenmesine olanak sağlar (Kannan vd. 2021).

Çizelge 2.1 Baz düzenleme için çeşitli RNA hedefleme sistemlerinin karşılaştırılması

	İçerik	İşlev	Avantaj	Yaklaşık etkinlik	Hedef dışı etkinlik	Kaynak
REPAIRv2	dCas13b+mutant ADAR2DD	A'dan I'ya Dönüşüm	AVV paketleme ile teslimat	Yaklaşık %30	Yüksek	Perculija vd. 2021
RESCUE	dCas13b+ADAR2dd	C'den U'ya dönüşüm	Orijinal ADAR2DD aktivitesini korur.	Yaklaşık %70	Yüksek	Cox vd. 2018
Cas13bt	Cas13bt1 ve Cas13bt3 + ADAR2DD	A'dan I'ya ve C'den U'ya dönüşüm	AVV teslimat için küçük boyutlu	Yaklaşık %40-50	Orta	Kannan vd. 2021
CasRx	DCasX.1+ADAR2DD	A'dan I'ya ve C'den U'ya dönüşüm	İn-vivo teslimatta kolaylık sağlar.	Yüksek	Düşük	Konermann vd. 2018
CIRTS	Efektör protein+RNA hairpin Bağlama proteini+ssRNA bağlama protein	Esnek	Küçük boyutlu ve düşük immün yanıt	Yüksek	Düşük	Rauch vd. 2019
REWIRE	PUF alanını tanıyan RNA+ çeşitli deaminaz alanı	A'dan I'ya ve C'den U'ya dönüşüm		Yaklaşık %60-80	Düşük	Han vd.
λN-BoxB	ASO grNA + λN-BoxB + ADAR2DD	A'dan I'ya	A*C yanlış eşleşmesiyle in-vitro düzenleme	Orta	Yüksek	Montiel-Gonzalez vd. 2013
RESTORE	İçsel (endogenous)	A'dan I'ya	Oligonükleotit uygulamasını gerektirir	Yaklaşık %75-85	Düşük	Merke vd. 2019
Cas7-11	4Xcas7 ve cas11	A'dan I'ya	AVV paketleme ile teslimat / Sitotoksitesisi düşüktür.	RNA yıkımı yaklaşık %85 RNA düzenlemesi=?	Çok düşük	Özcan A. Vd 2021
PASTE	BxbI integras, M-MLV RT Cas9, atgRNA, nicking guide RNA		AVV paketleme ile teslimat HİTİ ve HDR dan daha etkili.	%10-55		Yamall vd. 2021

Çeşitli Cas efektör komplekslerinin, diğer birkaç RNA modifikasyonunu hedeflemede yeterli olduğu gösterilmiştir. CasRx gibi CRISPR-Cas13d varyantları, endojen RNA'yı yok etmek ve ayrıca RNA alternatif eklemeyi kontrol etmek için tasarlanmıştır. Spesifik olarak, dCasRx üzerindeki HEPN aracılı RNaz aktivitesinin etkisizleştirilmesi, esnek RNA bağlanmasına ve RNA öğelerinin özgül hedeflenmesine izin verir (Konermann vd.

2018). Ayrıca, prokaryotlarda iki kompakt Cas13 ribonükleaz ailesi (Cas13X ve Cas13Y) tanımlandı. Bu sistemlerden Cas13X.1, memeli hücrelerinde yüksek düzeyde verimlilikle RNA etkileşimi gerçekleştirmek üzere tasarlanmıştır (Xu vd. 2021). Ayrıca dCas13X.1, çeşitli memeli lokuslarında düzenleme yapabilen çeşitli RNA baz editörleri, yani A'dan I'ya (ABE'ler) ve C'den U'ya (CBE'ler) baz editörleri oluşturmak için ADAR2DD ile birleştirilmiştir (Xu vd. 2021).

Programlanabilir CRISPR/Cas RNA Metilasyon Araçlarının Ortaya Çıkışı, mRNA, translasyona girmeden önce birkaç transkripsiyon sonrası modifikasyona (örneğin, kapatma (capping), adenilasyon) tabidir. Bugüne kadar, m6A modifikasyonlarının ökaryotlarda en bol bulunan endojen mRNA modifikasyonu türü olduğu gözlemlenmiştir (Wilson vd. 2020). Birçok m6A modifikasyonu genellikle fizyolojik süreçlerde hayati bir rol oynar ve insan kanserleri gibi malignitelerin ilerlemesinde sorumlu olabilir (Jiang vd. 2021).

Metiltransferaz alanı ile kaynaşmış katalitik olarak aktif olmayan Cas13'ten (dCas13) oluşan hedefli RNA metilasyon (TRM) sistemleri, transkriptler üzerinde oldukça özgül olarak m6A kurulumu yapabilir ve bu tür değişiklikler yoluyla alternatif ekleme, transkript bolluğu ve translasyon verimliliği gibi moleküler sistemlere etki eder, m6A modifikasyonları RNA'dan çıkarılabilir (silinebilir) ve kurulabilir (yazılabilirler).

2.3.2 Hedef bölgeye yönelik RNA düzenleme: popüler araçlar

RNA düzenleme, genomik DNA'yı kalıcı olarak değiştirmeden, RNA nükleotitlerinin sayısı, sıra ve dizilişinin düzeltilmesine denir. Teorik olarak herhangi bir RNA tipine ve bölgesine hedeflenebilmesi, esnekliği ve tersine çevrilebilirliği RNA düzenlemeyi potansiyel olarak güçlü bir gen düzenleme aracı haline getiriyor. RNA düzenlemesi, RNA ve protein çeşitliliği üretir ve özgül amino asit ikameleri, silinmeleri ve gen ekspresyon seviyelerinde değişikliklerle sonuçlanır. Adenozinden inozine RNA düzenlemesi, insandaki en önemli düzenleme sınıfını temsil eder ve birçok genin işlevini etkiler.

Doğa da yaygın olarak bulunan RNA düzenleme araçları Sitozin ve adenosin deaminazdır, RNA'da ki düzenlenen bazların kimliğini değiştirir. Sitozinler urasillere dönüştürülürken, adeninler inozinlere dönüştürülür. mRNA'ların kodlama bölgeleri etkilenirse, etkilenen kodona bağlı olarak RNA'nın kodlama potansiyeli değişebilir. Nükleotit deaminazların yeniden kodlanmış transkriptler elde etme potansiyeli, mutasyonları geri döndürerek veya RNA ekleme gibi işleme adımlarını manipüle ederek genetik mutasyonları düzeltme yetenekleri öne çıkmıştır. DNA düzenleme yaklaşımlarının aksine, RNA düzenleme doğası gereği geçicidir, bu nedenle uzun süreli istenmeyen yan etki riskini azaltır.

RNA düzenleme genellikle nokta mutasyonlarının RNA'da düzeltilmesi için kullanılırken, bazı gruplar ise RNA düzenlemesi ile fonksiyonel ürünler elde etmeyi amaçlar. Nokta mutasyonlarının çoğu fonksiyon mutasyonlarının kaybına yol açarken, fonksiyon kazanımı mutasyonları da gözlemlenebilir. Nokta mutasyonları tüm protein sınıflarında bulunabilir.

1990'larda gen düzenlemeye öncülük edilmeye başlanmıştır ve kusurlu genetik materyali manipüle etmek veya değiştirmek için yöntemler aranmıştır (Woolf 1998). Gen düzenlemede kullanılan yaygın teknolojiler, tasarlanmış çinko parmak nükleazları (ZFN'ler), transkripsiyon aktivatörü benzeri efektör nükleazlar (TALEN'ler) ve tasarlanmış meganükleazlardır. En yeni ve çok yönlü araç, CRISPR-Cas tabanlı RNA programlı nükleazlar ve bunların sayısız türevleridir (Jinek 1998-2012).

RNA düzenleme terapötik ve araştırma amaçları için kullanılabilen, geçici olarak hedefleyen ve düzenleyen materyaller üretir (Vogel 2014-2018-2019 Fry vd. 2020). Programlanabilirlik ve RNA'ya getirilen değişikliklerin geçici doğası, bu stratejiyi genom düzenleme için daha güvenli ve potansiyel olarak daha uygulanabilir bir araca dönüştürür (Merkle vd. 2019, Gulei vd. 2019).

2.3.2.1 Hedef bölgeye yönelik RNA düzenleme (SYRD)

RNA'ların yönlendirilmiş hedeflenmesi, siRNA'ların ve miRNA'ların keşfedilmesinden bu yana önde gelen çalışma alanlarından biridir, aynı zamanda gen ekspresyonunu baskılamak için endojen siRNA ve miRNA mekanizmalarından yararlanmak üzere birçok terapötik yaklaşımın uygulandığı yoğun bir alandır (Chakraborty vd. 2017, Fu vd. 2021,). Benzer şekilde, mRNA seviyelerini düzenlemek veya uç birleştirme (splicing) kusurlarını düzeltmek için antisens temelli yaklaşımlar geliştirilmiştir (Scharner vd. 2021).

RNA düzenlemesini kullanan RNA'ları yeniden kodlama girişimleri nispeten yeni bir alandır. RNA düzenleme, bir RNA dizisinden nükleotitlerin eklenmesi, çıkarılması yoluyla veya deaminasyon yoluyla nükleobazın karakterinin değiştirilmesini tarif eder. Terapötik amaçlar için, sitidini üridin'e ve adenosini inozine dönüştüren iki tür deaminasyon reaksiyonu yaygın olarak kullanılan yöntemlerdir. Translasyon sırasında inosinlerin kodu guanozinler olarak okunduğundan hem C'den U'ya hem de A'dan I'ya değişiklikler doğrudan amino asit ikamelerini değiştirebilir ve RNA'ları yeniden kodlayabilir.

A'dan I'ya düzenleme ilk olarak 1980'lerin sonlarında tanımlanmıştır (Bass vd. 1988). A'dan I'ya düzenlemeye, RNA üzerinde etkili olan adenosin deaminazlar (ADAR'lar) aracılık eder. Bu enzimler, çift sarmallı RNA bağlama alanları yoluyla RNA'lardaki çift sarmallı veya yapılandırılmış bölgeleri bağlar (Nishikura vd. 2010). Substrat bağlama ve deaminasyon, nispeten düşük özgüllükle gerçekleşir, bundan dolayı özgül olmayan şekilde in vivo olarak bol miktarda ve yaygın düzenlemeye yol açar (Bazak vd. 2014). Yinede, bazı siteler çok yüksek özgüllükle düzenlenir.

Memelilerde katalitik olarak aktif iki ADAR bulunur, ADAR1 ve ADAR2. ADAR1, üç çift sarmallı RNA bağlanma alanını (dsRBD'ler) barındırırken, ADAR2 yalnızca iki çift sarmallı RNA bağlanma alanını (dsRBD) içerir (Bajad vd. 2017). ADAR2 öncelikle sinir sisteminde, damar sisteminde ve bağırsakta eksprese edilir (Jain vd. 2018). Nükleer lokalizasyon sinyali nedeniyle, protein çekirdeğe lokalizedir. mRNA yeniden

kodlamasına yol açan doğal olarak meydana gelen düzenleme olaylarının çoğuna bu enzim aracılık eder. ADAR1, iki promotörden ifade edilir. İnterferon ile uyarılabilir bir promotor, nükleer dışı aktarma sinyali içeren, esas olarak sitoplazmada lokalize olan 150 kDa'lık bir proteindir (George vd. 2005). Sitoplazmik ADAR1 p150, antiviral savunmada yer alır, ancak aynı zamanda endojen tekrardan türetilen RNA'ları da düzenler. Daha kısa bir ADAR1 izoformu yapısal olarak eksprese edilir ve üçüncü çift sarmallı RNA bağlama alanıyla örtüşen nükleer lokalizasyon sinyali nedeniyle esas olarak çekirdeğe lokalize olan 110kDa proteinini meydana getirir (Fritz 2009). ADAR'ların terapötik potansiyeli, 1990'ların ortalarında, Ribozyme Pharmaceuticals tarafından, distrofinde erken bir durdurma kodonunun düzeltilmesinde ve dolayısıyla kas distrofininin tedavisinde kullanımları için araştırılmıştır (Woolf vd. 1988).

C'den U'ya düzenlemeye doğal ortamda Apobec enzimleri aracılık eder (Anant vd. 1995). RNA'yı hedeflemek için Apobec1, DNA'yı düzenlemek için Apobec3'ten türetilen katalitik alanlar kullanılmaktadır.

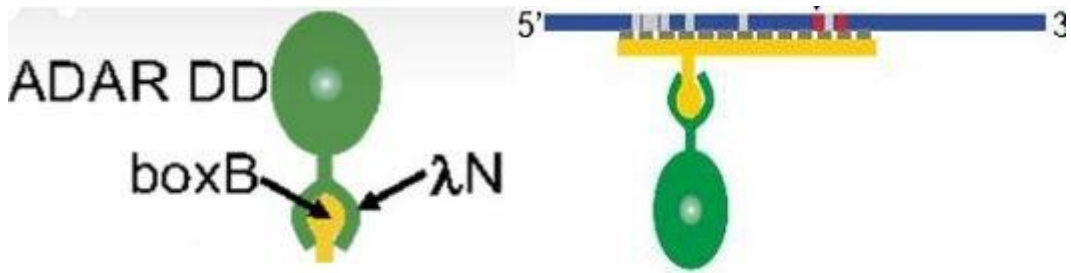
2.3.2.2 RNA düzenlemede hedef bölgeye yönelik bazı güncel stratejiler

2.3.2.2.1 λ N-füzyonları

Siteye yönelik RNA düzenlemesi ilk stratejilerden biri λ N-BoxB-ADAR' füzyonlarıdır. Rosenthal grubunun öncülüğünde geliştirilen bu teknoloji, Lambda N proteini (λ N) ve BoxB RNA saç tokası arasındaki iyi bilinen etkileşime dayanmaktadır (Montiel-Gonzalez vd. 2013) (şekil 2.7). Alana özgü hedeflemek için, ADAR2'nin deaminaz alanı, λ N proteininin RNA bağlama alanına kaynaştırılır. λ N proteini doğal olarak BoxB'ler adı verilen kısa kök döngülü RNA yapılarına bağlanır. Bir BoxB sekansı barındıran ve düzenlenecek bölge için antisens olan bir kılavuz RNA'nın (gRNA) birlikte transfeksiyonu, λ N-ADAR füzyonunun modifikasyon için hedef sekansa güdümlenmesine aracılık eder (Montiel-Gonzalez vd. 2019). λ N-BoxB yönteminin ana avantajı, düzenleme kompleksinin küçük boyutudur. Bu durum, düzenleme

kompleksinin ve gRNA'nın birkaç kopyasının tek bir virüste paketlenmesini sağlar (Sinnamon vd. 2017).

Çoğu SYRD yaklaşımı gibi, λ N-BoxB de mRNA/gRNA dupleksinde hedef dışı düzenleme meydana gelir (Vallecillo-Viejo vd. 2018). Ayrıca, transkriptom çapında hedef dışı düzenleme gözlemlenebilir, bu durum ya düzenleyicinin aşırı ekspresyonu ya da gRNA'nın mRNA ile uzun eşleşmesiyle (dubleks) ile açıklanabilir (Vallecillo-Viejo vd. 2018, Jo vd. 2019). Hedef dışı düzenleme seviyeleri, enzime bir NLS eklenerek ve kılavuz RNA yoğunluğunu azaltılarak daha düşük bir orana düşürülebilir (Fry vd. 2020). λ N-sistemi, Rett sendromunun nedeni olan MeCP2'deki mutasyonları düzeltmek için kültürlenmiş nöronlarda ve aynı zamanda tüm fare beyinlerinde başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Sinnamon vd. 2020).



Şekil 2.7 Tasarlanmış rekombinant RNA'lar olan dört boxB saç tokası ile Lambda N proteini (λ N) ve ADARDD (Montiel-Gonzalez vd. 2013)

2.3.2.2.2 SNAP-ADAR

Stafforst tarafından geliştirilen SNAP-ADAR teknolojisi, hücrelerde ve aynı zamanda embriyolarda da kullanılan, iyi programlanabilir SYRD stratejisidir (Vogel vd. 2014-2018-2019, Stafforst vd. 2012, Hanswillemenke vd. 2015).

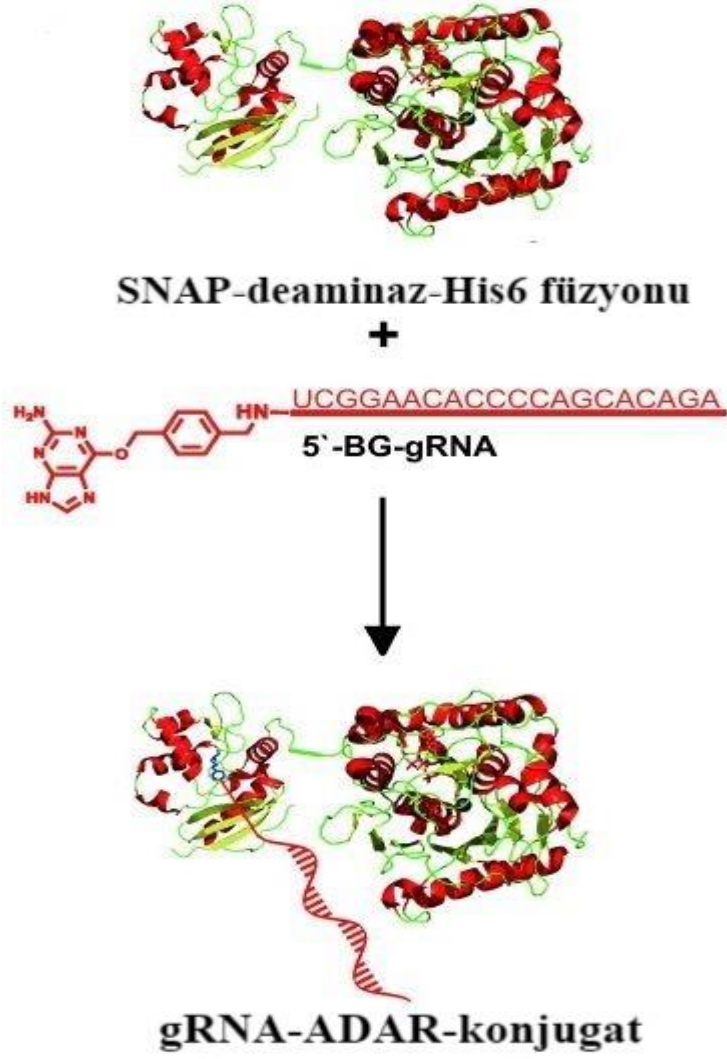
Sistem, ADAR'ın deaminaz bölgesini SNAP enzimiyle birleştirir ve O6-benzil-guanin'e (BG) konjüge edilmiş kılavuz RNA'larla (gRNA) programlanır (Stafforst vd. 2012) (şekil 2.8). SNAP etiketi, substrat olarak O6-benzil-guanin (BG) ile kovalent bir

bağlantı oluşturmak üzere tasarlanmıştır. SNAP-ADAR, ADAR2'nin hiperaktif bir mutant sürümü kullanıldığında %90'lık bir düzenleme verimliliğine ulaşabilir.

SNAP etiketi ayrıca murin APOBEC1'in katalitik C-terminaline birleştirilir, böylece RNA kılavuzlu bir şekilde C'den U'ya düzenlemesi için programlanır. SNAP-APOBEC1 füzyonu uygulanarak, saptanabilir A'den I'ya RNA düzenlemesi olmayan GAPDH transkriptinde %20 verimlilikle bölgeye özgü C'den U'ya düzenlemesi saptanmıştır (Stroppel vd. 2021).

Son zamanlarda gRNA'nın BG modifikasyonunun yanı sıra, tasarlanmış APOBEC enzimleri tarafından RNA'ların ortogonal hedeflenmesi için bir HALO etiketi tanımlanmıştır. HALO etiketi, kılavuz RNA'ların 1-kloroalkan kısmıyla etiketlenmesini gerektirir (Los vd. 2008). İlgili kimyasal yapı bir BG ve 1-kloroalkan parçasının çift bağlanmasını sağlar, bu nedenle iki füzyon proteininin (örn. ADAR1 & ADAR2 veya ADAR2 & APOBEC1 füzyonları) aynı anda programlanmasını sağlayabilir. Bu sistemin verimliliği A'dan I'e düzenleme için ~%70'e ve C'den U'ya düzenleme için ~%50'ye ulaşır. Bu sistem, RESCUE yaklaşımından daha yüksektir (Abudayyeh vd. 2019).

BG ile modifiye edilmiş gRNA genetik olarak kodlanabilir değildir ve toksik yan etkileri olabilir. Tekrarlanan tedavilerin gerekli olduğu senaryolarda, doku veya hücreye özgü bir şekilde çok fazla bileşenin iletilmesi gerekeceğinden SNAP-ADAR klinik denemelerde iyi bir seçenek olmaya bilir (Vogel vd 2014-2018-2019, Fry vd. 2020).



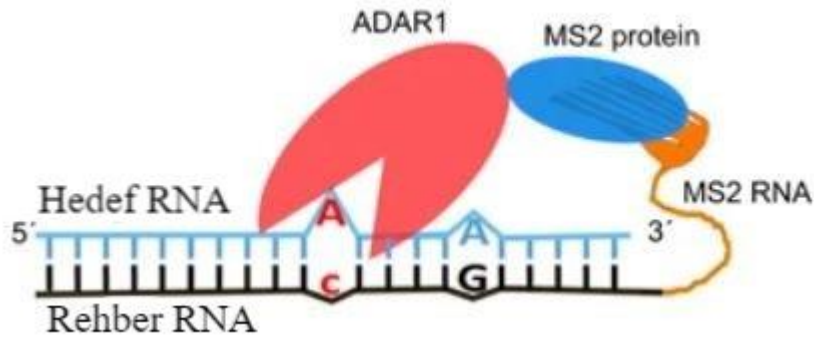
Şekil 2.8 gRNA-deaminaz konjugatları, BG ile modifiye edilmiş gRNA'nın, SNAP-deaminaz reaksiyonuyla meydana gelir (Stafforst vd. 2012)

2.3.2.2.3 MS2-MCP-ADAR

ADAR'ı programlamanın başka bir yolu, ADAR'ın deaminaz alanını bakteriyofaj MS2 kaplama proteini (MCP) ile birleştiren MS2-MCP-ADAR yaklaşımıdır. MCP, MS2 stem-loop RNA'sını bağlar. Hedef adenosinin bulunduğu çift sarmallı bölgeyi belirleyen antisens gRNA daha sonra MS2 stem-loop'una kaynaştırılır. MS2 döngü (stem) bölgesi daha sonra MCP-ADAR veya ADARDD füzyon proteinini düzenleme bölgesiyle etkileşime girip kompleks oluşturur (Bhakta vd. 2018, Azad vd. 2017) (şekil 2.9).

Yüksek düzenleme verimliliği, bu sistemin açık bir avantajıdır. Ancak, dikkate alınması gereken dikkate değer hedef dışı düzenleme vardır (Bhakta vd. 2018, Azad vd. 2017). Bunun nedeni, MCP'nin RNA'lardaki kısa yapıları rastgele bağlanmasıdır (Helgstrand vd. 2002). Ayrıca sistem, hücrelere tanıtılması gereken birçok bileşen gerektirir (Tohama vd. 2020.).

MS2 aracılı RNA düzenlemesi ayrıca bir MS2 APOBEC1 füzyonu üreterek C'den U'ya düzenleme için kullanılır (Bhakta vd. 2020). Sistem, mavi flüoresan proteinin (BFP) gen ekspresyonunu, %21 verimlilik ve düşük hedef dışı düzenleme göstermiştir, BFP eklenen bir sonlandırma kodonunda T ile C mutasyonunun düzeltilmesi yoluyla eski haline getirmek için kullanılmıştır (Bhakta vd. 2020). Bu sistemin iyileştirilmesi, MS2 kök döngüsünü değiştirerek ve farklı uzunluklarda gRNA'lar kullanarak elde edilebilir.



Şekil 2.9 MS2-MCP-ADAR deneysel tasarımı (Azad vd. 2017)

Kılavuz RNA'ya bağlı tasarlanmış ADAR1 (kırmızı), MS2 proteini (mavi) ve MS2 RNA'nın (turuncu) deneysel tasarımı. Hedef RNA'da hedeflenen adenosin (kırmızı), çeviri sırasında guanozin olarak okunacak olan inozine dönüştürülür. Hedeflenen adenosin, sitozin ile uyumsuzluk yaratacak şekilde gRNA tasarlanır, bu da hem daha özgül hem de kolay deaminasyona neden olur.

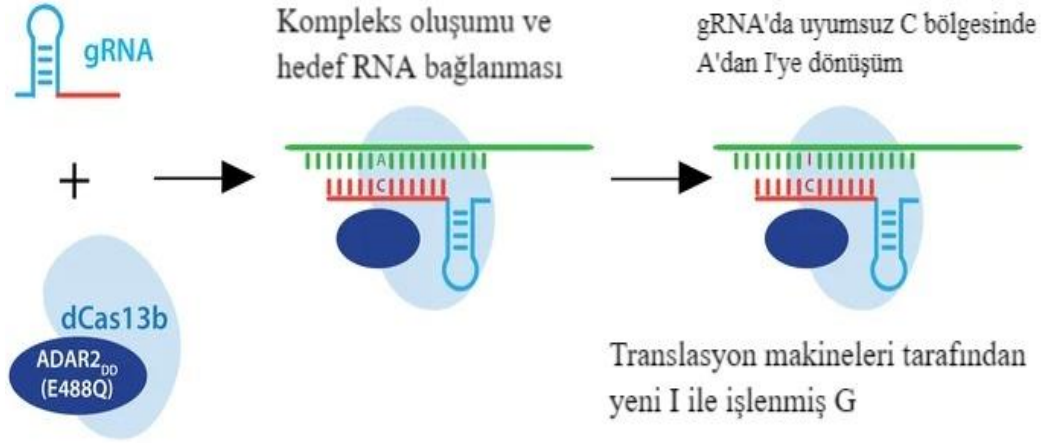
2.3.2.3 SYRD için CRISPR-Cas13 yaklaşımları

Son zamanlarda, CRISPR tabanlı genom düzenleme yaklaşımları, öncelikle programlanabilir yapıları ve geniş uygulanabilirlikleri nedeniyle büyük ilgi görmüştür. Programlanabilir CRISPR, RNA (crRNA) kılavuzu tarafından yönlendirilen tek sarmallı RNA'ya bağlanan tip VI CRISPR nükleaz olan Cas13'ün keşfi, CRISPR-Cas sistemlerinin kullanımını DNA hedeflemeden RNA hedeflemeye genişletmiştir (Abudayyeh vd. 2016, East-Seletsky vd. 2016, Konermann vd. 2018, Shmakov vd. 2017). Cas13'ün RNaz aktivitesi, iki kritik katalitik rezidünün mutasyona uğramasıyla devre dışı bırakılabilir, böylece diğer alanların programlanması için yeniden kullanılabilir (Abudayyeh vd. 2017, East-Seletsky vd. 2016, Shmakov vd. 2017, Smargon vd. 2017). Cas13, protospacer bitişik motif (PAM) dizisi gerektirmediğinden, Cas13 füzyonlarının hedefleme alanı neredeyse sınırsızdır (Abudayyeh vd. 2017, Gootenberg vd. 2017).

2.3.2.3.1 REPAIR

REPAIR (Programlanabilir A'dan I'ye Değiştirme için RNA Düzenleme), rapor edilen ilk Cas13 tabanlı RNA düzenleme sistemidir. Bu sistemde ADAR2DD, programlanabilir bir RNA editörü oluşturmak için *Prevotella sp*'den türetilen bir Cas13b ortologuna kaynaştırılır. Bu sistemde kullanılan gRNA, hedef RNA'da ki adenezine, A-C uyumsuzluğu oluşturacak şekilde tasarlanır. gRNA, substrat(RNA) ile hibridize olan 30 ila 84 nükleotitlik bir 5' homoloji bölgesine sahiptir, daha sonra bir aralayıcı sekans, dCas13b'yi ilgilendirilen sekansa dâhil etmek için kullanılan 3' ucunda doğrudan tekrar bölgesini içerir (Cox vd. 2017). Bu sistem kullanılarak, farklı alt substratlarda rutin olarak ~%30'luk düzenleme seviyeleri elde edilebilir. REPAIRv1 (şekil 2.10) için bulunan önemli hedef dışı etkiler, katalitik alanın (ADAR2DD-E488Q/T375G) bölgeye yönelik mutajenezi ile azaltılabilir. Cas13 parçasının boyutunun küçültülmesi, sistemin genetik dağıtımını kolaylaştırır. REPAIRv2 olarak adlandırılan gelişmiş platform, endojen Kras ve Ppib transkriptlerinde %27 ve %13'lük yüksek verimli düzenleme meydana getirmiştir, önemli ölçüde daha düşük hedef dışı düzenleme sağlar (Cox vd. 2017). Geliştirilmiş sistemin daha düşük hedef dışı etkilerinin yanı sıra, hedef adenezini

çevreleyen motif tercihlerinin olmaması, REPAIRv2 kullanılarak transkriptomdaki herhangi bir adenozinin onarılmasına olanak tanır.



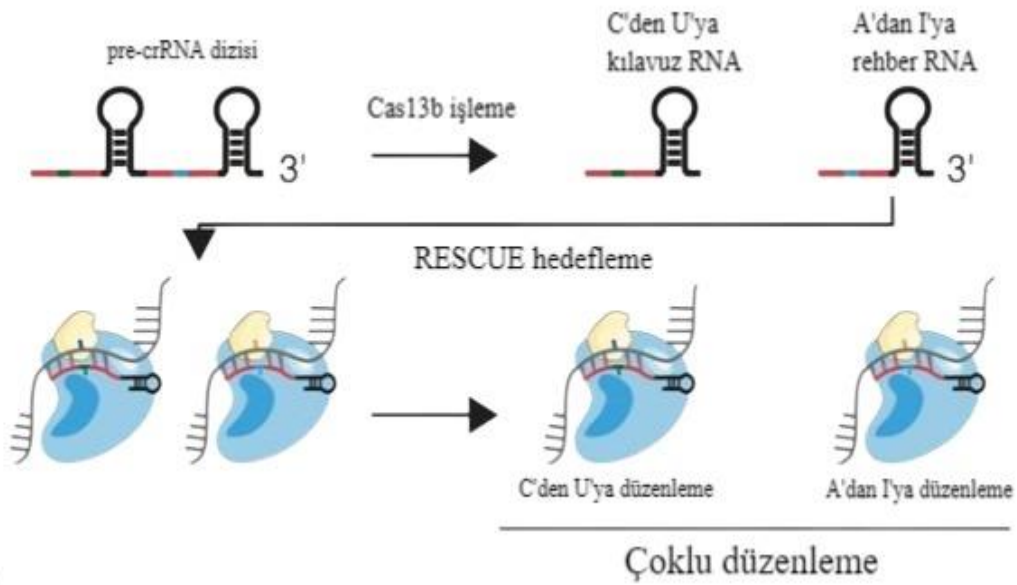
Şekil 2.10 A'dan G'ye düzenleme için dCas13b-ADAR2DD(E488Q) (Gearing 2020)

A'dan G'ye düzenleme için ADAR2DD(E488Q) gibi hiperaktif ADAR, PspCas13b ve birleştirilmiş doğrudan tekrar gRNA yapıları PspCas13b-ADAR2DD(E488Q) kompleksini oluşturur. Kılavuz RNA'nın yapısına düzenlenecek hedef A'nın karşısına C eklenebilir, ADAR sitozin uyumsuzluğunda daha iyi düzenleme yapar, ya da uyumsuzlukla hedeflemeden rastgele adenozin düzenlemesi yapar (gRNA'da ki ortalama 30-33 genelde 32. baz düzenlenir).

2.3.2.3.2 RESCUE

C'den U'ya RNA düzenlemesi için kurulan ilk platform RESCUE (Spesifik C'den U'ya Değişim için RNA Düzenleme) olarak adlandırılmıştır (Abudayyeh vd. 2019) (şekil 2.11). ADARDD'den sitozinlerin deaminasyonuna sağlayan enzim tasarlanmıştır. Sonuç olarak, mutant enzim hem A'dan I'ye hem de C'den U'ya modifikasyonlar verir, böylece düzeltilebilecek mutasyonların sayısı iki katına çıkar. Tasarlanan enzim, REPAIR'e benzer şekilde devre dışı bırakılmış bir Cas13 ortologuna birleştirilir.

Hem A'dan I'e hem de C'den U'ya düzenleme yapmanın yanı sıra, RESCUE sistemi AAV paketleme ve iletim (delivery) için küçük boyuta indirgenmiştir (Aquino-Jarquin vd. 2020). Ancak, RESCUE'nin ikili işlevselliği sorunlu olabilir, genişletilmiş deaminasyon spektrumu, istenmeyen transkriptomik değişiklikler riskini artırır. Bu sorunun üstesinden gelmek için RESCUE-S geliştirilmiştir, ADARDD'nin S375A'sının rasyonel mutajenezi ile geliştirilmiştir. Bu mutasyon, özgüllüğü korurken, C'den U'ya hedef dışı bölgelerde yaklaşık 1,8 kat azalma ve A'dan I'ya hedef dışı yaklaşık 12 kat azalma sağlamıştır (Fry vd 2020).



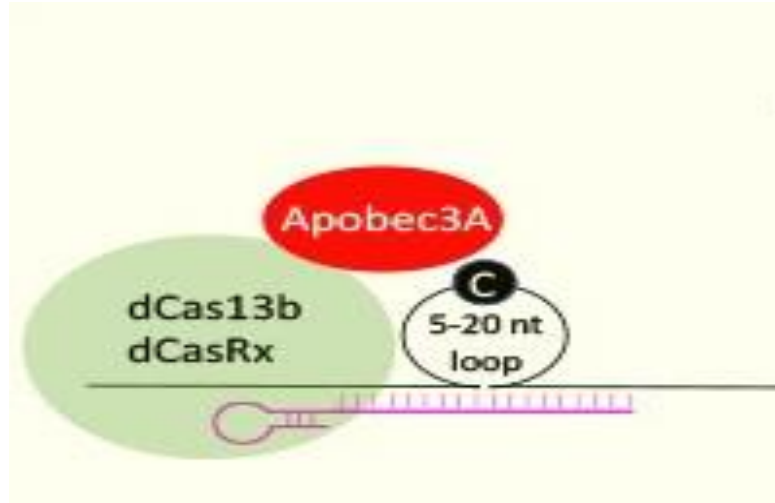
Şekil 2.11 crRNA öncesi kılavuz dizileri ile çoğullanmış C'den U'ya ve A'dan I'ye düzenlemenin şeması (Gearing 2020)

2.3.2.3.3 CURE

Son dönemlerde C'den U'ya düzenleme için CURE (C'den U'ya RNA Editörü) tasarlanmıştır (Huang vd. 2020). CURE, APOBEC3A (A3A) sitidin deaminazını dCas13'e birleştirir (şekil 2.12). RESCUE'den farklı olarak CURE, yalnızca sitozinleri deamine eder. Bu sistem ilk sitidin-özgül C'den U'ya RNA editörüdür. A3A, UC dinükleotitleri için yüksek bir özgüllüğe sahip olduğundan, hedef dışı düzenleme çok

düşüktür. CURE, C'den U'ya düzenlemeye için yüksek bir özgüllüğe sahiptir ve RESCUE'den önemli ölçüde daha az beklenmeyen mutasyon gösterir.

CURE'nin özgüllüğü, hedef dışı düzenlemeyi daha da azaltmak için nükleer lokalizasyon sinyalinin eklenmesiyle hücre içi lokalizasyonu sıkı bir şekilde kontrol ederek daha da optimize edilmiştir (Huang vd. 2020). CURE-X, Cas13 yerine CasRx'i kullanır. CasRx, A3A'nın eklendiği dâhili esnek döngüleri barındırır, bu nedenle hedef dışı düzenlemeyi daha da azaltır. CURE içsel hedeflerde %60'a varan düzenlemeye ulaşabilir. CURE'de kullanılan füzyonun lokalizasyonu ve tipine bağlı olarak, Hedef dışı düzenlemeler, sitoplazmik olarak lokalize versiyonlarda daha yüksek hedef dışı düzenlemeler gözlemlenir, nükleer veya CURE-X füzyonlarında daha düşük düzeyde Hedef dışı düzenlemeler gözlemlenir. Bu nedenle, belirli bölgelerde CURE, RESCUE'dan üstündür. Ancak UC dinükleotidlerinin tercih edilmesi, hedeflenebilir C kalıntılarının sayısını azaltır.



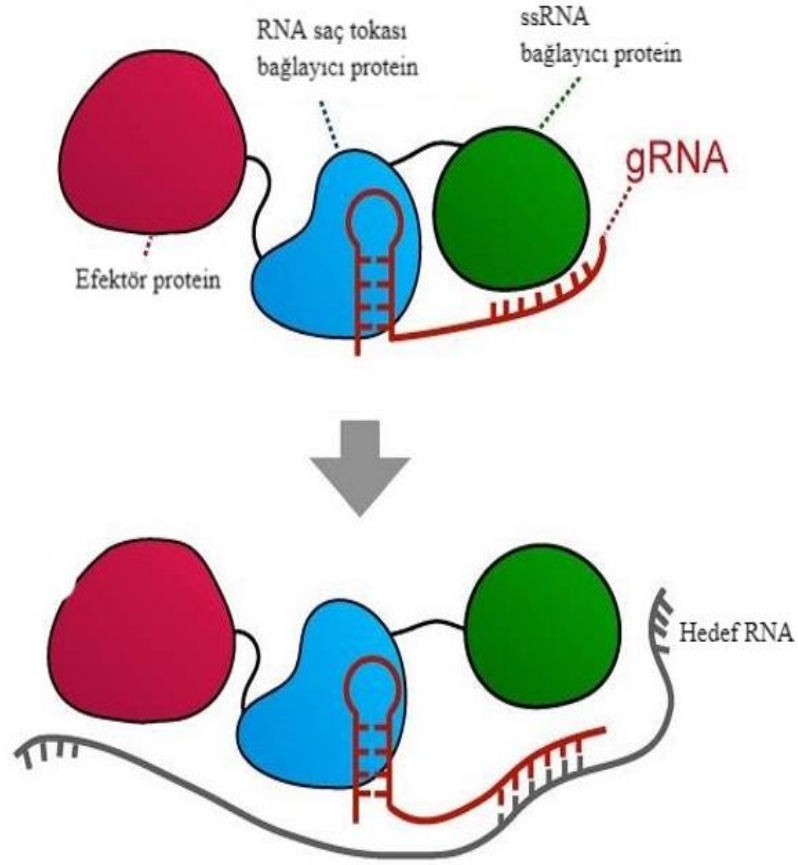
Şekil 2.12 İnsan sitidin nükleoptidine özgül olan APOBEC3A deaminazının dCas13'e füzyonu, CURE kompleksini oluşturur (Xinxin Huang 2020)

CURE, C'den U'ya RNA düzenleyicisidir. CURE sistemi, APOBEC3A'nın doğal substratını taklit etmek için hedef bölgelerde döngüler oluşturabilecek kılavuz RNA'larla programlanır.

2.3.2.3.4 CIRTS

CRISPR-Cas'tan İlham Alan RNA Hedefleme Sistemi (CIRTS) adı verilen sentetik bir RNA hedefleme stratejisi geliştirilmiştir. Bu sistem tamamen insan proteinlerinin parçalarından yapılmıştır (Rauch vd. 2019). Bu programlanabilir RNA hedefleme platformu aşağıdakilerden oluşur:(1) ilgilenilen hedef RNA'ya tamamlayıcı diziye sahip gRNA. gRNA ayrıca tasarlanmış saç tokası bağlama proteini ile etkileşime giren özgül bir RNA yapısını da barındırır; (2) tasarlanmış gRNA üzerinde seçici, yüksek afiniteli protein bağlayıcı görevi gören bu sistemin çekirdeği olarak RNA saç tokası bağlama protein; (3) gRNA'ya bağlanan, hedef etkileşimi stabilize eden ve koruyan bir ssRNA bağlayıcı protein; Ve (4) hedeflenen diziye etki eden efektör protein (Aquino-Jarquin vd. 2020, Rauch vd. 2019) (şekil 2.13).

Diğer yapay düzenleme sistemleriyle karşılaştırıldığında CIRTS, adeno-ilişkili virüs (AAV) gibi sistemler tarafından iletimi kolaylaştırabilen daha küçük bileşenlerden oluşur (Fry vd. 2020, Rauch vd. 2019). CIRTS, birden fazla protein alanını barındırabilen çok yönlü programlanabilir bir platformdur. Bu alanlar, ilgilenilen herhangi bir transkripti etkili bir şekilde hedeflemek için "yazarlar", "okuyucular" veya "silgiler" olarak hareket edebilir ve bu nedenle birçok RNA modifikasyonunun eklenmesi veya çıkarılması için kullanılabilir. CIRTS bileşenlerinin insan kaynaklı doğası, bu stratejinin in vivo uygulaması için immünojenisite endişelerini ortadan kaldırmaktadır. Bu nedenle, CIRTS terapötik müdahaleler ve araştırma amaçları için değerli olabilir (Aquino-Jarquin vd. 2020).

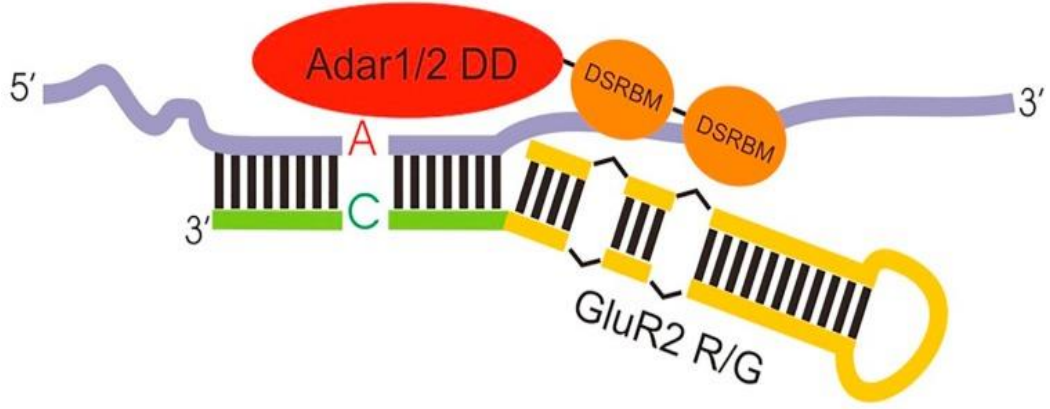


Şekil 2.13 CIRT, ssRNA bağlayıcı protein, RNA saç tokası bağlayıcı protein, efektör protein ve kılavuz RNA'dan oluşur (Rauch vd. 2019)

2.3.2.3.5 GluR2-ADAR

Endojen substratları hedefleyen, endojen ADAR'ların programlamasına dayanır (Wettengel vd. 2017, Fukuda vd. 2017). Gria2 (GluRB) RG kök döngüsünün iyi anlaşılması yapılarından yararlanır. ADAR'lar için uygun bir bağlanma alanı ve aynı zamanda çift iplik oluşturmak için, Gria2 kök döngüsüne benzeyen ancak hedef RNA ile hibritleşmek için 5'- veya 3'-ucunda uzanan bir dizi oluşturulur. Bu nedenle gRNA iki bölüm içerir; 1) hADAR2 ile etkileşime giren ve kompleksi programlayan ADAR tanıma bölgesi (ARR), 2) hedef RNA'yı tamamlayıcı olan ve hedef bölgeyi belirleyen antisens bölgesi (ASR) (şekil 2.14).

Hiperaktif veya diğere ADAR sürümlerinin gerekli olması durumunda, bunlar da GluR2-adRNA dizileriyle birlikte bir AAV'de paketlenilebilir. Bununla birlikte, birincil fayda, endojen ADAR'ları programlayabilme imkânı yaratmaktadır (Nose vd. 2020).

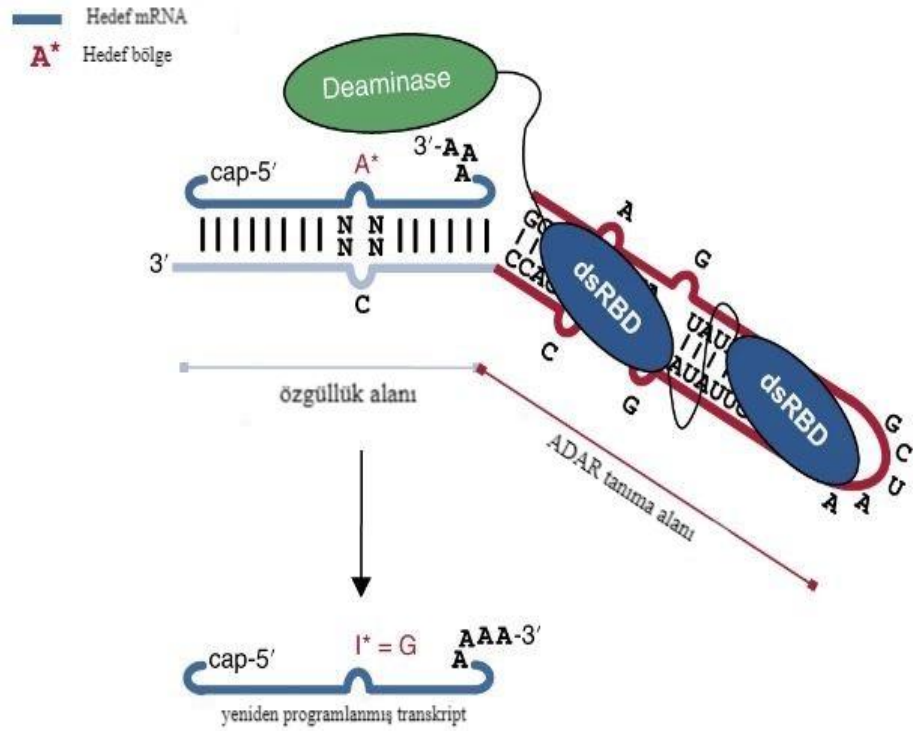


Şekil 2.14 GluR2-ADAR yapısı (Montiel-Gonzalez vd. 2019)

2.3.2.3.6 RESTORE

RESTORE, Oligonükleotid aracılı RNA Düzenlemesi için Endojen ADAR'ın Spesifik Transkriptlere hedeflenmesi, olarak adlandırılan sistemdir, kısa (20-40 nükleotid) kimyasal olarak değiştirilmiş antisens oligonükleotidler kullanır. Modifiye gRNA, endojen ADAR'ı hedef konuma yönlendirir ve iki alandan oluşuyor; 1) endojen ADAR'ı gRNA-mRNA hibritine yönlendirmek için değışmez bir R/G ADAR tanıma alanı ve 2) hedef mRNA bağlanmasını belirleyen programlanabilir özgülük alanı (Merkle vd. 2019, Aquino-Jarquín 2020) (şekil 2.15).

RESTORE'un terapötik uygulama açısından yüksek potansiyeli, hastalıkla ilgili transkriptlerdeki mutasyonların düzeltilmesiyle gösterilmiştir. İletimi, lipozomal nanopartiküller yoluyla veya hepatositleri hedef alan N-asetilgalaktozamin (GalNAc) gibi hücre alımı kolaylaştıran kısımlara bağlantı yoluyla gerçekleştirilebilir (Nair vd. 2014).



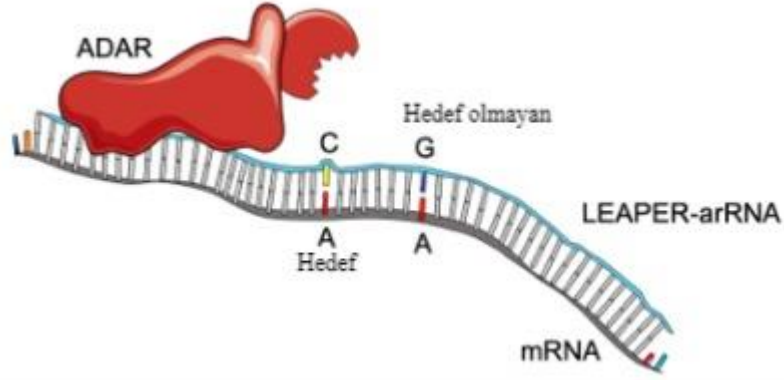
Şekil 2.15 RESTORE gösterimi (Merkle vd. 2019)

ASO'lar (Antisens oligonükleotidler), hedef mRNA bağlanmasını belirleyen programlanabilir özgüllük alanı ve endojen ADAR'ı ASO:mRNA hibritine yönlendirmek için ADAR kompleksinin oluşmasını sağlayan alanları içerir. mRNA'da bölgeye yönelik RNA düzenlemesi, kimyasal olarak değiştirilmiş ASO tarafından kontrol edilir ve özgül bir adozin-inozin değişimi (işlevsel olarak adozin-guanozin değişimine eşdeğer) gerçekleştirir.

2.3.2.3.7 LEAPER

LEAPER (RNA'nın Programlanabilir Düzenlenmesi için Endojen ADAR'dan Yararlanma), ADAR'ları programlamak için çift sarmallı bölgeler oluşturmak üzere uzun antisens RNA'lar (71–191 nükleotit) kullanılır (şekil 2.16). LEAPER, içsel hedeflerde ve sınırlı hedef dışı düzenlemeyle %50'ye varan bir verimlilik gösterir. Diğer yaklaşımlarda olduğu gibi, gRNA düzenlemeyi yönlendirmek için hedef bölgede tek bir A-C uyumsuzluğu eklenir (Qu vd. 2019). Ayrıca LEAPER, farklı yerlerde eş zamanlı

olarak düzenlemeyi hedeflemek için kullanılmıştır ve birkaç gRNA'nın kullanımı yoluyla çoklu düzenleme yapabilmıştır. RNA'da özgül kimyasal modifikasyonların bulunmaması, viral vektörler, transkripsiyonel olarak aktif plazmitler veya sentetik bir oligonükleotid olarak çoklu insan birincil hücre tipleri dâhil olmak üzere farklı hücre tiplerine dağıtımına olanak sağlar (Aquino-Jarquin vd. 2020).



Şekil 2.16 LEAPER (Aquino-Jarquin vd. 2020)

Hedef dışı düzenlemeyi azaltmak için kılavuz bölge içindeki uzun LEAPER-arRNA'ları ve G-A uyumsuzluklarını kullanan endojen ADAR tabanlı RNA düzenleme (arRNA: Sentetik zırhlı RNA).

2.4 Kısaca CRISPR

2.4.1 CRISPR

CRISPR ilk kez 1987 yılında Japon bilim adamı Yoshizumi Ishino tarafından *E. coli*'de tesadüfen keşfedildi ancak DNA dizilim verilerinin yetersiz olması nedeniyle tekrarlanan bu dizilerin işlevini açıklayamadılar (Ishino 2018). 1993 yılında Francisco Mojica, halofilik arkea yani *Haloferax mediterranei* genomunda düzenli aralıklarla tekrarlanan 30 bp uzunluğundaki DNA dizilerini karakterize eden ve tanımlayan ilk kişi oldu ve bu tekrarları kısa düzenli aralıklı tekrarlar (SRSR) olarak adlandırmıştır (Mojica 1993). 2002 yılında Mojica ve Ruud Jansen SRSR'lere "CRISPR" adını vermiştir:

düzenli aralıklarla kümelenmiş kısa palindromik tekrarlar (Mojica 2000, Jansen 2002, Mojica 2005, Pourcel 2005, Mojica ve Rodriguez-Valera 2016).

2.4.2 CAS ve PAM

Bolotin, yeni dizilenen *Streptococcus thermophilus* bakterisi üzerinde çalışırken, olağandışı CRISPR lokusu ortaya çıkarmıştır (Bolotin 2005). Bu CRISPR dizisi daha önce rapor edilen sistemlere benzer olmasına rağmen, bilinen Cas genlerinin bir kısmından yoksundu ve bunun yerine yeni cas genleri içeriyordu; bunlardan biri, nükleaz aktivitesine sahip olduğu tahmin edilen ve şu anda Cas9 olarak bilinen büyük bir proteindi. Ayrıca viral genlere homoloji gösteren aralayıcıların hepsinin bir uçta ortak bir diziyi paylaştığını ortaya çıkarmıştır. Protospacer bitişik motifi (PAM) olan bu dizi, hedef tanıma için gereklidir (Bolotin 2005, Barrangou 2007, Brouns 2008, Garneau 2010).

2.4.3 Programlanabilir bağışıklığın varsayımsal şeması

2006 Eugene Koonin, hesaplamalı analiz yoluyla proteinlerin ortolog grup kümelerini incelerken, doğal aralayıcı dizisindeki faj DNA'sına homolog eklentilere dayanan bakteriyel bağışıklık sistemi olarak CRISPR basamakları için varsayımsal bir şema geliştirmiştir. Cas proteinlerinin yeni bir DNA onarım sistemi içerebileceği öne sürmüştür (Makarova 2006).

2.4.4 Programlanabilir bağışıklığın deneysel gösterimi

S. thermophilus bakterisinde Horvath vd. deneysel olarak CRISPR sistemlerinin adaptif bir bağışıklık sistemi olduğunu gösterdiler (Barrangou 2007).

2.4.5 Aralayıcı diziler kılavuz RNA'lara kopyalanır

Bilim insanları çok geçmeden CRISPR-Cas sistemlerinin istilacı fajlara tam olarak nasıl “müdahale ettiğine” dair bazı bulgulara eriştiler. Kritik bilgilerin ilk parçası John van der Oost vd tarafından anlaşılmıştır, E. coli’de fajdan türetilen ayırıcı dizilerin Cas proteinlerini hedef DNA'ya yönlendiren küçük RNA'larda (crRNA'lar) kopyalandığını göstermişlerdir.

2.4.6 CRISPR DNA hedeflerine etki eder

Marraffini ve Sontheimer, hedef molekülün RNA değil DNA olduğunu göstermişlerdir. Bunun için floresan dizisine bir intron yerleştirmişlerdir, CRISPR-Cas9 bu introna hedeflenmiştir (Marraffini ve Sontheimer 2008).

2.4.7 Cas9 hedef DNA'yı parçalıyor

Moineau vd, CRISPR-Cas9'un, hedef DNA'da PAM'ın 3 nükleotid yukarısında kesin konumlarda çift sarmallı kırılmalar oluşturduğunu göstermiştir (Garneau 2010). Ayrıca Cas9'un CRISPR-Cas9 sisteminde bölünme için gereken tek protein olduğunu doğrulamışlardır. Bu, crRNA'larla birlikte tek bir büyük proteinin (burada Cas9) aracılık ettiği Tip II CRISPR sistemlerinin ayırt edici bir özelliğidir.

2.4.8 Cas9 sistemi için tracrRNA'nın keşfi

Doğal CRISPR-Cas9 güdümlü müdahale mekanizmasındaki bulmacanın son parçası Emmanuelle Charpentier'in grubundan gelmiştir. Cas9 içeren CRISPR-Cas sistemine sahip Streptococcus pyogenes üzerinde küçük RNA dizilimi ile crRNA'ya ek olarak, trans-aktive edici CRISPR RNA (tracrRNA) adını verdikleri ikinci bir küçük RNA'nın varlığını keşfettiler (Deltcheva 2011). tracrRNA'nın crRNA ile bir eşleşmesiyle

(dubleks) oluşturduğunu ve Cas9'u hedeflerine yönlendirenin de bu dubleks olduğunu gösterdiler.

2.4.9 CRISPR sistemleri diğer türlerde heterolog olarak çalışabilir

Siksnys vd, CRISPR-Cas lokusunun tamamını *S. thermophilus*'tan (bir Tip II sistem) klonladılar ve bunu *E. coli*'de (Tip II sistemi içermeyen) ifade ettirdiler ve plazmid direnci sağlayabildiğini gösterdiler (Sapranauskas 2011). CRISPR sistemlerinin bağımsız birimler olduğunu öne sürdü ve Tip II sistemin gerekli tüm bileşenlerinin bilindiğini doğrulamıştır.

2.4.10 Cas9 aracılı bölünmenin biyokimyasal karakterizasyonu

Siksnys vd, Bölünme bölgesini ve PAM gereksinimini doğrulamıştır ve nokta mutasyonları kullanarak RuvC alanının tamamlayıcı olmayan ipliği böldüğünü, HNH alanının ise tamamlayıcı ipliği böldüğünü göstermiştir. Ayrıca crRNA'nın verimli bölünme için yeterli olan 20 nükleotidlik bir diziyeye kadar kısaltılabileceğini de belirtilmiştir. En etkileyici olanı, crRNA dizisini değiştirerek Cas9'u seçtikleri bir bölgeyi hedef alacak şekilde yeniden programlayabileceklerini göstermişlerdir (Gasiunas 2012).

Emmanuelle Charpentier ve Jennifer Doudna ile iş birliği içinde hemen hemen aynı zamanda benzer bulguları rapor ettiler (Jinek 2012). Charpentier ve Doudna ayrıca crRNA ve tracrRNA'nın tek bir sentetik kılavuz oluşturmak için bir araya getirdiğini ve sistemi daha da basitleştirdiğini bildirmişlerdir. crRNA ve tracrRNA'nın birleştirilmesi sonucunda sgRNA oluşur, bu CRISPR-Cas9'un sentetik olarak tasarlamayı daha da kolaylaştırmıştır.

2.4.11 Genom düzenleme için CRISPR-Cas9 kullanılması ve son CRISPR gelişmeleri

Zhang, ökaryotik hücrelerde genom düzenleme için CRISPR-Cas9'u başarıyla uyarlayan ilk kişidir (Cong vd. 2013). Zhang, iki farklı Cas9 ortoloğundan (*S. thermophilus* ve *S. pyogenes*'ten) CRISPR tasarlamıştır, insan ve fare hücrelerinde hedeflenen genom parçalama deneylerini başarıyla gerçekleştirmiştir. Ayrıca sistemin (i) çoklu genomik lokusları hedef alacak şekilde programlanabileceğini ve (ii) homolojiye yönelik onarımı gerçekleştirebileceğini deneylerce ispatlanmıştır. George Church'ün Harvard Üniversitesi'ndeki laboratuvarından araştırmacılar, *Science*'ın aynı sayısında benzer bulgular bildirmiştir (Mali vd. 2013).

2014 yılında iki bağımsız grup, memeli hücrelerinde ve fare modellerinde kanserden sorumlu olabilecek genlerin nakavtını gerçekleştirdiler ve CRISPR-Cas9'un genom çapında tarama gerçekleştirmek için güçlü bir araç olduğu kanıtlamışlardır (Shalem vd. 2014; Wang vd. 2014). Aynı yıl Nishimasu vd, Cas9-sgRNA ikili kompleksinin kristal yapısını hedef DNA ile çözmüşlerdir ve hedef DNA'da bölünmeden sorumlu olan HNH ve RuvC alanı olmak üzere iki bağımsız nükleaz alanı olduğunu göstermişlerdir (Nishimasu vd. 2014). Bu yapısal bilgiler, Nickase (nCas9) ve dead-Cas9 (dCas9) gibi tasarlanmış Cas9 proteinlerini kullanmalarına olanak sağlamıştır (Ran vd. 2013, Brocken vd. 2018).

2015 yılında Cpf1'in (Cas12a) keşfi, sıtma parazitinde ve bazen insanlarda Cas9 ile hedeflenemeyen bölgelere yönlendirme konusunda esneklik sağlamıştır (Zetsche vd. 2015).

2016 yılında yeni bir CRISPR sistemi keşfedilmiştir. Bu sistem genomu değiştirmeden RNA'yı tespit edip parçalayabilen Cas13 endonükleaza sahip tip VI CRISPR Cas sistemidir (Abudayyeh vd. 2016). Daha sonra bu sistem baz düzenleyicilerle birleştirilmiştir, RNA'yı kesmeden baz düzenlenmesine olanak sağlayan araçlar geliştirilmiştir (Abudayyeh 2016 vd. Özcan vd. 2021, Cox vd. 2017).

2020'de Jennifer Doudna ve Emmanuelle Charpentier, DNA'yı düzenlemek için CRISPR Cas9 yöntemini tanıttıkları ve kullandıkları için Nobel Ödülü'nü kazanmışlardır.

SARS-CoV2 (COVID-19) için SHERLOCK ve DETECTR habercileri geliştirilmiştir (Kellner vd. 2020, Chen vd. 2018).

2.5 Tip VI CRISPR Sistemleri RNA'yı Hedefler

Tüm organizmaların virüsler veya transpozonlar gibi zararlı genetik elementlerin neden olduğu enfeksiyonlara karşı savunma yapması gerekir. Prokaryotlar, faj adı verilen virüslerle savaşmak için çok sayıda farklı strateji kullanırlar. Bunlar, adsorpsiyon ve enfeksiyon bloke etme, abortif enfeksiyon, toksin-antitoksin, kısıtlama-modifikasyonu ve CRISPR-Cas (düzenli aralıklarla kümelenmiş kısa palindromik tekrarlar) sistemlerini içerir (Dy vd. 2014). CRISPR-Cas lokusları bakteri ve arkelerde bilinen tek adaptif bağışıklık sistemini oluşturur. Bunlar tipik olarak, virüslerden veya diğer mobil genetik elementlerden gelen DNA veya RNA'yı işleyerek, araya giren "aralayıcılar" adı verilen elementler şeklinde CRISPR lokusuna alınır, böylece bilinen en ilkel adaptif bağışıklık sistemi meydana gelmiş olur. CRISPR-Cas lokusları bakteri ve arkelerde bilinen tek adaptif bağışıklık sistemini oluşturur. Bu dizilere günümüzde crRNA denilir. CRISPR kasetinden transkripsiyonu sonucu öncü-mRNA oluşur, bu mRNA nükleazlar tarafından küçük, kodlamayan CRISPR RNA'lara (crRNA'lar) dönüştürülür. Her crRNA molekülü, bir veya daha fazla Cas proteini ile yabancı DNA veya RNA'daki crRNA tamamlayıcı bölgeleri bağlayan efektör kompleksi halinde programlanır. Efektör kompleksi daha sonra ya içsel bir nükleaz aktivitesi ya da transta ayrı bir nükleaz kullanarak hedeflenen DNA veya RNA'yı keser.

CRISPR-Cas sistemleri, her biri üç tipten oluşan iki gruba ayrılmıştır. Sınıf 1, Tip I, III ve IV'ü; Sınıf 2, Tip II, V ve VI'yı içerir. Sınıf 1 sistemler birden fazla farklı Cas proteini içeren çoklu alt birim kompleksleri kullanırken Sınıf 2 efektörler yalnızca tek bir efektör protein içerir (Makarova vd. 2020). Bugüne kadar, genom düzenleme ve

manipülasyondaki pratik uygulamaları göz önüne alındığında, Cas9, Cas12 ve Cas13 gibi Sınıf 2 efektörlerin mekanizmasına uygulanabilirliği daha kolay olduğundan çalışmalar bunlar üzerine yoğunlaşmıştır (Knott vd. 2018, Murugan vd. 2017). Sınıf 1 sistemler, daha az çalışılmış olmasına rağmen doğada çok daha fazla miktarda bulunur, bakteri ve arkelerdeki CRISPR-Cas sistemlerinin yaklaşık %90'ını oluşturur (Burstein vd. 2016). Bunlar aynı zamanda çeşitli bakteri ve arke filumlarında da mevcuttur ve muhtemelen Sınıf 2 sistemlerden daha önce evrimleşmişlerdir (Makarova vd. 2020). Sınıf 1 CRISPR-Cas sistemleri, dsDNA, ssDNA ve RNA'nın bölünmesi ve ikinci bir haberci molekül olan siklik oligoadenilatın (cOA) sentezi dâhil olmak üzere bir dizi farklı enzimatik aktivite gösterir. Bu işlevler, genom veya transkriptom manipülasyonu ve fizyolojik hücrel süreçlerin kontrolü için kullanılabilir.

Çizelge 2.2 CRISPR sınıflandırılması

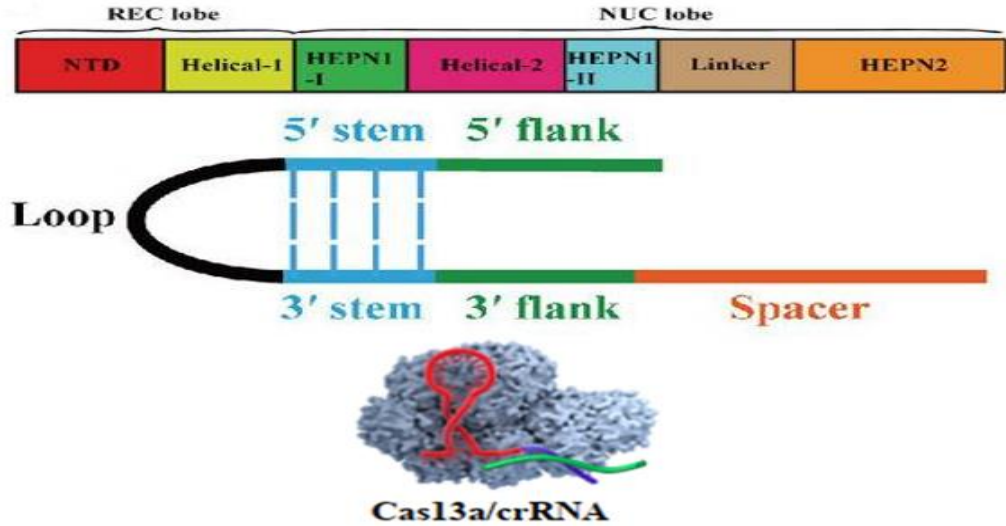
Özellikler	Tip I	Tip II	Tip III	Tip IV	Tip V	Tip VI
Efektör kompleksi	Çoklu alt birim (sınıf 1)	Tekli birim (sınıf 2)	Çoklu alt birim (sınıf 1)	Çoklu alt birim (sınıf 1)	Tekli birim (sınıf 2)	Tekli birim (sınıf 2)
Protein	Cas3	Cas9	Cas10	Csf1	Cas12	Cas13
Hedef molekül	DNA	DNA	DNA/RNA	?	DNA	RNA
İşlev	ssDNA zincirini keser	Küt çift sarmallı kırılma	Yeni oluşan RNA moleküllerine bağlanır	bilinmeyen Crispr sistemi	Kademeli çift sarmallı kırılmalara neden olur	RNA-rehberli RNaz

2.5.1 Cas13 proteini

CRISPR/Cas13 sistemi, arkelerde ve bakterilerde istilacı RNA hedeflerine karşı savunma yapmak için 'adaptif' bir bağışıklık sistemi olarak işlev görür (Smargon vd. 2020). Şu anda Cas13 ailesinde Cas13a (diğer adıyla C2c2), Cas13b, Cas13c ve Cas13d dâhil olmak üzere tanımlanmış dört alt tip bulunmaktadır. Cas13 ailesinin tüm üyeleri Cas9'dan daha küçüktür ve Cas13d en küçük proteindir (Nhan Huynvh vd. 2020, Hille vd. 2018).

2.5.1.1 Cas13a proteini

Cas13a (eski adıyla C2c2 olarak bilinir) ve VI-A CRISPR-Cas sistemleri ilk olarak Shmakov tarafından mikrobiyal genomik ve metagenomik veriler arasında aday CRISPR-Cas lokuslarının hesaplamalı biyolojisi aracılığıyla keşfedilmiştir. CRISPR-Cas lokuslarına ilişkin önceki bilgilerin aksine, tanımlanan tip VI-A lokuslarının bir kısmı cas1 ve cas2 genlerinden yoksundur ve yalnızca bir CRISPR dizisi ve bir Cas13 efektör gen dizisi içerir. Cas1 ve Cas2, kümelenmiş düzenli aralıklı kısa palindromik tekrar kasetinde yüksek oranda korunmuş proteinlerdir ve protospacer (adaptif kazanım) kazanımında önemli bir rol oynarlar. gRNA ve Cas13 protein etkileşimini doğrudan tekrar adı verilen dizilerle tanır, bu dizilerin uzunluğu genelde 35 bp – 39 bp arasındadır (Shmakov 2017). Cas13a proteini, iki lobtan oluşur, crRNA tanıma (REC) lobu ve nükleaz (NUC) lobu ve RNA'yı kesmek için iki bağlayıcı (HEPN) RNaz alanını içerir. LshCas13a' crRNA 22-28 bp uzunluğundadır, hedef RNA'ya tamamlayıcı dizilerdir (şekil 2.17). PAM dizisine benzer görevleri üstlenen protospacer-yan bölge (PFS) dizilerinden RNA'yı hedefler, bu diziler genelde (A), urasil (U) ve sitozin (C) eğilimlidir (Zhou vd. 2021, Zhao vd. 2022). Cas13a, ssRNA'yı hedef alır.



Şekil 2.17 Cas13a genel gösterimi. REC lobu, NUC lobu ve içerdiği diziler, RNA'sının iki boyutlu yapısı ve proteinin üç boyutlu yapısı gösterilmiştir (Zhao 2022)

bilinen özellikleri vardır, PFS kısıtlaması yoktur. Cas13c, Cas13a, b ve d verimlilikleriyle karşılaştırıldığında RNA hedeflemede daha az etkilidir (Shmakov vd. 2017, Huynh vd. 2020).

2.5.1.4 Cas13d proteini

Cas13d, Cas13'lerin en küçüğüdür ve RNA hedeflemesi için en etkili tip VI sistemlerden biridir (Yan vd. 2018, Konermann vd. 2018). Cas13d kaynağı *Ruminococcus flavefaciens* XPD3002'dir (CasRx/RfxCas13d) (He vd. 2020, Mahas vd. 2019, Bi vd. 2021). Tip VI-D, Cas13d efektör proteinine ek olarak, kollateral RNaz aktivitesini modüle edebilen aksesuar proteinlerden oluşan WYL alanı içerir (Konermann vd. 2018). Tip VI-D, diğer Cas13 enzimleri gibi PFS sınırlaması olmadığından çok yönlülüğüyle bilinir.

2.5.2 Cas13b RNA editörlerinin in-vitro ve hücre içi programlanması

CRISPR, RNA veya DNA'yı hedef aldığıda parçalar, bu durum organizmaya bağışıklık sağlar. Lakin bu durum CRISPR kullanımını sınırlayan bir faktördür. Bu durumun üstesinden gelmek için, Cas proteinin nükleaz aktivitesi bölgeleri mutasyona uğratarak, inaktif hale getirilir. Bu şekil yeniden tasarlanmış Cas proteinler dead-Cas olarak adlandırılır, dCas9 ve dCas13b'yi örnek olarak verilebilir. Bu proteinler DNA veya RNA'da nükleotit değişiklikleri yapamaz, amacı DNA veya RNA'nın istenilen bölgesine yüksek özgüllükte yönlendirmektir. Hedeflenen DNA veya RNA bölgesine yüksek özgüllükte yönlenebilmek, yukarıda değinilen, baz editörlerinin kullanımını kolaylaştırır.

Güçlü RNA yıkım yeteneğine sahip olsan Cas13b ortoloğunun (RNA-RNA hibridizasyonuna dayanmaktadır), katalitik olarak aktif olmayan Cas13 (dCas13) ile adenosini inozin deamine eden ADAR2 ile kaynaştırıldığında A'dan G'ye değişimi meydana getiren araçlar oluşur.

Cas13b *Prevotella* sp. ortoloğu, katalitik olarak aktif olmayan Cas13b'yi oluşturmak için yeniden tasarlanır ve dPspCas13b ile adenosini inozin deamine eden ADAR2DD(E488Q) hiperaktif ADAR yapıları kaynaştırılır, bunun sonucunda REPAIRvI (Programlanabilir A'dan I'ye (G) değiştirme için RNA dzenleme) aracı oluşur.

PspCas13b-ADAR2DD(E488Q) yani REPAIRvI içerik olarak, dPspCas13b, ADAR2DD(E488Q), crRNA, doğrudan tekrardan oluşur. Buradaki Cas proteinin görevi RNA'yı özgül olarak hedeflemektir, ADAR'ın görevi A'dan G'ye değişiklikleri dzenlemektir, crRNA nerede değişik yapılacağına rehberlik etmektir, doğrudan tekrardan ise crRNA ve Cas proteinin programlanması için Cas tanıma yapılarını oluşturur.

Cas9'da ki PAM sekansı gibi, REPAIRvI'm programlanması için dizi kısıtlamaları yoktur. Tam uzunluktaki transkriptleri dzenlemek için kullanılır. Memeli hücrelerinde RNA yıkımı veya RNA dzenlemesi için PFS kısıtlaması yoktur.

Prevotella sp P5-125'ten (PspCas13b) Cas13b, *Porphyromonas gulae*'den (PguCas13b) Cas13b, *Riemerella anatipestifer* (RanCas13b) Cas13b ile kıyaslandığında en yüksek RNA işleme aktivitesine sahiptir. Bu oran ortalama devre dışı bırakma %62,9, KRAS-msfGFP füzyonuyla ölçülmüştür. PspCas13b, LwaCas13a ve shRNA ile kıyaslandığında da ortalama %92,3 RNA yıkımı ile en verimli RNA hedefleme sistemidir. Bu oran hem Gluc hem de Cluc transkriptleriyle füzyonlanmış lüiferaz habercileri ile ölçülmüştür.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Tez boyunca kullanılan malzemeler ve cihazlar

Çizelge 3.1 Tez boyunca kullanılan malzemeler

MALZEMELER	MARKA
0.2ml PCR 8-Strip Tüpü (kendinden düz kapaklı) PC6643 NB-P08A	Sarstedt
10 uL Non steril pipet Tips (1000 Adet/Paket)	Sarstedt
150mm Cell Culture Dish, TC, Sterile, (100 Adet/Pk) Cat No:3903-100	Sarstedt
15ml Centrifuge Tube, Bulk, T.Culture,Sterile(50 Adet/Pk) Cat No: 554502	Sarstedt
1X Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, 500mL	Gıbcı
2 mL steril Cryovial Tubes etekli (50 Adet/Paket) Cat No:379/378	Sarstedt
200 uL Non steril pipet Tips (1000 Adet/Paket)	Sarstedt
50ml Centrifuge Tube, Bulk, T.Culture,Sterile(25 Adet/Pk) Cat No: 547254	Sarstedt
ADENOSINE-5-TRIPHOSPHATE, Disodium Trihydrate PC4156 ATP007	BioShop Canada
AGAR, Bacteriological Grade PC58 AGR001.R	BioShop Canada
aquaguard-2 solution 100 ml	Biological Industries
BIO-VIEW, Red Nucleic Acid Stain for the visualization of double/single-stranded DNA and RNA in agarose gels. PC5481 EBR001.R	Red Nucleic
DMEM High Glucose With L-Glutamine, 500 mL Cat No:41966029	Gıbcı
EDTA, Disodium Dihydrate, Biotechnology Grade (Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate) PC6475 EDT001.R	BioShop Canada
Fetal Bovine Serum, qualified, Brazil 500 ml Thermo Fisher PC17634 10270106	Gıbcı
GEL/PCR Purification Mini Kit (100prep) Cat No: FAGCK 001	Favorgen
GLYCEROL, Biotechnology Grade PC1633 GLY001.R	BioShop Canada
MANGANESE(II) CHLORIDE TETRAHYDRATE, REAGENTPLUS TM, >= 99.0% PC22217 M3634- 100G	BioShop Canada
Opti-MEMTM I Reduced Serum Medium, no phenol red,500 mL Cat No:11058021	Gıbcı

Çizelge 3.1 Tez boyunca kullanılan malzemeler (devam)

PCR WATER Sterile-filtered. Dnase/Rnase/Protease free PC6388 WAT333.R	BioShop Canada
Plasmid DNA Extraction Mini Kit (100prep) Cat No: FAPDE 100	Favorgen
POLYETHYLENE GLYCOL 8000 PC2334 PEG800	BioShop Canada
POLYETHYLENIMINE HYDROCHLORIDE, LINEAR,& PC22214 764965-1G	BioShop Canada
PvuI PC4413 E2320-02	NEB
Q5® High-Fidelity DNA Polymerase - 100 units Cat No:M0491S	NEB
SODIUM CHLORIDE, Biotechnology Grade PC3308 SOD001.R	BioShop Canada
T4 DNA Ligase PC4735 E1060-01	NEB
T7 Endonuclease I - 250 units Cat No: M0302S	NEB
TC 6 Well Cell Cultured Plate, Sterile (10 Adet/Paket) Cat No:3920-10	Sarstedt
TRYPsin-EDTA (0.25%) phenol red 100 ml	Gıbcı
Tryptic Soy Broth Casein-peptone soymealpeptone broth (TSB) PC5325 M105459.0500	BioShop Canada
RPMI High Glucose With L-Glutamine , 500 mL	Gıbcı
Taq DNA Polimeraz, rekombinant (5 U/μL)	Thermo Scientific™

3.1.2 Tez boyunca kullanılan cihazlar

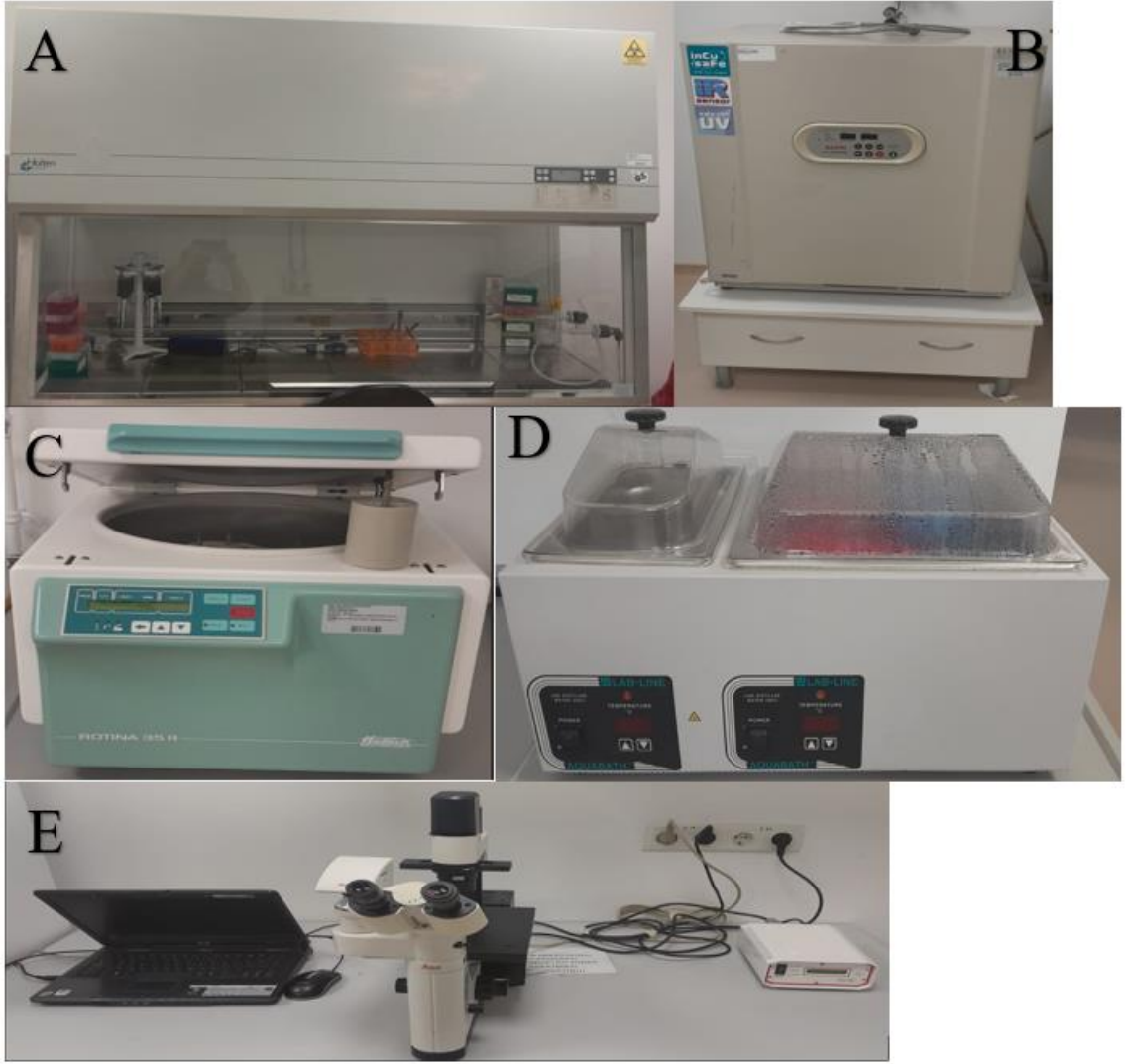
Çizelge 3.2 Tez boyunca kullanılan cihazlar

CİHAZLAR	MARKA
Manyetik karıştırıcı	BenchTop Lab Systems, ABD
Santrifüj	Nüve, Türkiye
Çalkalayıcı	MIU Lab, Çin
CO2'li inkübatör	Nüve, Türkiye
Kuru ısı bloğu	MIU Lab, Çin
Spektrofotometre	Bio-Rad
Işık mikroskobu	Leica, Almanya
Floresan mikroskobu	Leica, Almanya
Inverted mikroskop	Leica, Almanya
Nanodrop	Thermo Scientific
Elektroforez tankı	Cleaver



Şekil 3.1 Klonlama sırasına kullanılan cihazlar

A- +4 ve -20 derin dondurucu (vestel), B- Elektropherez cihazı (Clever S.) ve güç kaynağı (labnet), C- UV Transilüminatörler (biometra), D- Mikrodalga, E- Nanodrop, F- PZR cihazı (Bio-Rad Laboratories), G- Agaroz jel görüntüleme cihazı, H- Soğutmalı santrifüj, I- Santrifüj, J- Sabit ve çalkalayıcı inkübatör



Şekil 3.2 Hücre kültüründe kullanılan cihazlar

A- Laminar kabin, B- CO₂ İnkübatörü, C- 50 ml Falkon için soğutmalı santrifüj, D- Su banyosu, E- Leica Ters Mikroskop ve Floresan Güç Kaynağı

3.1.3 Memeli hücreleri

Bu tez çalışmasında, ticari olarak temin edilmiş hücre hatları kullanılmıştır. Flp-In™ T-REx™ 293 Hücre Hattı (thermo scientific) ve jurkat Hücreleri (thermo scientific) ticari olarak temin edilip, modifiye edilmiştir. Jurkat Hücreleri, nf_Kb jurkat hücrelerine dönüştürülmüştür. Flp-In™ T-REx™ 293 Hücre Hattı iki hücreye dönüştürülmüştür, birincisi varyant oluşturma hattı (103864_PvuI_ Flp-In™ T-REx™ 293 Hücre Hattı) ve

ikinci olarak varyant toplama hattına (FRT_ebov_vHvL_Lentiviral proteinleri_103864_PvuI Flp-In™ T-REx™ 293 Hücre Hattı) dönüştürülmüştür.

3.1.4 Bakteri suşları

Klonlama çalışmalarında bakteri konağı olarak, Escherichia coli türü olan DH5-Alpha suşu (ATCC), Klonlama çalışmalarında klonlama özütü için JM109 suşu (ATCC) kullanılmıştır.

3.1.5 Plazmitler

Tez boyunca kullanılan plazmitler Addgene firmasından ticari olarak temin edilmiştir. KKKA genomunun M segment dizileri Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Viroloji BD BSL3 Laboratuvarından temin edilmiştir.

Genleri tek kopya olarak hücre hatlarına sokabilmek için, addgene 87828 plazmidi kullanılmıştır. Lentivirüs proteinleri olarak addgene 12260 ve 8454 plazmidi kullanılmıştır. Lentivirüs genomu (transgene) için 135992 ve 19319 plazmidi kullanılmıştır. RNA düzenlemesi için 103864 ve 103854 plazmitleri kullanılmıştır. nf_Kb biyosensörü için 118094 plasmidi kullanılmıştır.

3.1.6 Oligonükleotit ve primerler

Klonlama boyunca kullanılan, polimeraz zincir tepkimesi (PZT) deneyleri ve dizi analizlerinde kullanılan oligonükleotit primerler Çizelge 3.3'de verilmiştir. Çizelgede sgRNA-doğrudan tekrarlarda mevcuttur.

Çizelge 3.3 Tez boyunca kullanılan oligonükleotitler ve primerler

Oligonükleotitler ve primerler	3'→5'
FRT_F	5'AGCGCTcttctgagcggaaaga3'
FRT_R	5'taatactgacgctctgcacccatGGTGGCgtttaaagctagatgcc3'
Gagpol_F	5'GCCACCatgggtgcgagagcgtc3'
Gagpol_R	5'agctggttcttccgcctcagaagAGCGCTcccatatgtccttccgag3'
seqENV_R	5'aagtgtagcggtcacgc3'
seqFRT_F	5'ccgcttgagagacttac3'
VSV-G_F	5'aggcgttttgcgctgcttctgtccaacattaccgcc3'
VSV-G_R	5'tatatctggccgtacatgcctcccatatgtccttccg3'
Amp_seqF	5'acaataggggttccgcg3'
seq_VSVG_R	5'cccattgatgtactgcaaacC3
fullCAR_F	5'accacaacgccgctcctcg3'
fullCAR_R	5'tttgtcgtcgtcatctttg3'
fullCAR_vH_F	5'ggatccggcaagcccggatctggcggatccaccaaggcggacgattgaccagttc3'
fullCAR_vH_R	5'cgtcggggccgaggagcggcggtgtggttactgggggtcagttgg3'
fullCAR_vL_F	5'gatattgattacaaagatgacgacgacaaaaggatcaagatgaagttcc3'
fullCAR_vL_R	5'tcctcggcagatccgggctgccggatccagaggtggagcctcgtaatctagcttagtacc3'
seqvHvL_F	5'ggctctcaactattccc3'
seqvHvL_R	5'ccctcgtgtcactgcg3'
CAR_rby_hpgk_F	5'taacgcgttaagtcgaca3'
CAR_rubyp2a_R	5'cacgggaccggggttt3'
car_mRuby_F	5'ggcgacgtggaagaaacccggctcctgTCTAAGGGCGAAGAGC3'
car_mRuby_R	5'ccagaggttgattgtcgaactaacgcgttactgtacagctcgtccatgc3'
seq_mRuby_F	5'cggcatggacgagctg3'
seqRuby_R	5'aaggcattaagcagcg3'
FRT_CMV_C4_F	5'ggaggcaaatcatttaAGCacgggccagatatacgcg3'
FRT_LTR_C4_R	5'tcttccgcctcagaagAGCgacatgaactactatactactgc3'
seqENV_F	5'cttggttctccgagttgg3'
seq_C4_psiR	5'tcgcgatctaattctccc3'
cPPT/CTC_F2	5'ctgtgccttctagttccagatggcagattatccac3'
CMV_PROMOTOR_R2	5'acggtatatctggccgtactgcaaacaccgcatcac3'
nfkB_3F	5'tacgggccagatatacgcgttctagactgccggatcc3'
nfkB_2R	5'ctggcaactagaaggcagaccactgtgctggcggcc3'
1F_U6H3_Spe	5'ttattgactagtagggcctatttcca3'
nfkB_3R	5'cccttgctaccatggtggctgaagctcaagatgagcg3'
sgRNA_doğrudan tekrar Oligonükleotiti_I	5'gcTAATACGACTCACTATAggaaaYagatagtYgtgacYYcaaagaaggaYYaYagYacYYgYGTGTGGAAGGTCCAGTTTTGAGGGGCTATTACAAC3'
sgRNA_doğrudan tekrar Oligonükleotiti_II	5'gcTAATACGACTCACTATAggYtactgatgYtcccYgaccccaaYaaccYtagcgYYaYcaYGTGTGGAAGGTCCAGTTTTGAGGGGCTATTACAAC3'
sgRNA_Doğrudan tekrar RNA'si_I	5'aaaYagatagtYgtgacYYcaaagaaggaYYaYagYacYYgYGTGTGGAAGGTCCAGTTTTGAGGGGCTATTACAAC3'
sgRNA_Doğrudan tekrar RNA'si_II	5'YtactgatgYtcccYgaccccaaYaaccYtagcgYYaYcaYGTGTGGAAGGTCCAGTTTTGAGGGGCTATTACAAC3'
T7 promoter	5'TAATACGACTCACTATAgg3'

3.2 Yöntem

3.2.1 PEG yoğunlaştırıcı

1. 2,8g NaCl, içinde 13 ml saf su olan 50ml falkona aktarılıp, çözündürülür 65 ul 1 M NaOH eklenir, homojen su görüntüsü oluşuktan sonra 12g PEG8000 eklenir.
2. Falkon bir behere yerleştirilir, beherin içine 60-80 derecede su eklenir.
[60-80 derecelik su hazırlanışı, behere su eklenir kaynayana kadar mikrodalgada bekletilir, kaynayınca çeşme aç kapa şeklinde su eklenir 1 saniye tek seferde, folkon ve şişesinde girmesiyle su 60-80 derece arasına gelecektir]
3. Solüsyon hazır olunca ph ölçülür 7 ila 7,4 arası olmalıdır.
4. Sonradan da 0,2'lik filtreden geçirilir.

3.2.2 Ultra-yetkili Escherichia coli Hücrelerinin Hazırlanması ve Transformasyonu için Inoue (Modifiye) Yöntemi

A. Inoue transformasyon tamponu aşağıdaki gibi hazırlanır.

0,5M HEPES tamponunda Inoue hazırlanır.

MnCl ₂	CaCl ₂	MgCl ₂
25mM	25mM	50mM

Son olarak pH'ı 6,7'ye ayarlanır ve ardından filtreyle sterilize edilir.

Inoue transformasyon tamponu: Yukardaki tablodaki gibi hazırlanır.

Not: Mangan okside olur ve ciddi anlamda transformasyon verimliliğini düşürür hatta sıfırlar. Bundan dolayı konsantre mangan çözeltisi hazırlamayınız, ne kadar kullanılacaksa o kadar hazırlanır.

B. Ultra-yetkili Escherichia coli Hücrelerinin Hazırlanması

1. -80'den çıkarılmış bakteri kültürü öncelikle aktifleştirilir.
2. 5 ml SOB 50 ml falkonda inoküle edilir, 37 derecede 180 rpm çalkalıyıcıda inkübe edilir. OD600 iki veya üçe gelince, durdurulur.
3. Aktifleşen kültür 1/1000 olacak şekilde SOB'a inokule edilir yani 500 ul aktifleşen kültürden 50 ml SOB'a inoküle edilir.
4. Bu kültür 18-22 derecede 180 rpm'de OD600 0,5-0,6'ya gelene kadar çalkalanır, ardından kültür 10 dakika boyunca buzda tutulur.
5. Hücreleri 4°C'de 10 dakika boyunca 2500 xg'de santrifüjleme yoluyla hasat edilir, süpernatant dökülür ve ardından hücreleri 10 ml buz soğukluğunda Inoue transformasyon tamponunda yavaşça yeniden süspanse edilir.
6. Hücreleri 4°C'de 10 dakika boyunca 2500 g'de santrifüjleme yoluyla hasat edilir, süpernatant dökülür, hücreleri 4 ml buz soğukluğunda Inoue transformasyon tamponunda yavaşça yeniden süspanse edilir.
7. 300 ul DMSO eklenir ve bakteri süspanسیونunu ters-düz edilerek iyice karıştırılır ve ardından 15 dakika boyunca buz içinde bekletilir.
8. Hızla çalışarak, süspanسیونların 100 ul'lik alıquotlar şeklinde steril mikrofüj tüplerine dağıtılır. Sıkıca kapatılmış tüpleri sıvı nitrojen banyosuna batırılır, sonrasında -80 derin dondurucuya alınır.

3.2.3 SLiCE özü hazırlanması (Bakteriyel Suşu JM109) ve klonlaması

DNA klonlamaları; ticari olmayan ve lab-içi üretilmiş DNA klonlama stratejisi ile gerçekleştirilmiştir ve bu amaca yönelik olarak da SLiCE (Seamless Ligation Cloning Extract) adı verilen bir yöntemden faydalanılmıştır. SLiCE yönteminde, klonlama izi bırakmayan (seamless) DNA klonlaması amacıyla E. coli suşu (JM109) özütlerinden faydalanılır; bu ekstraktlar laboratuvarında hazırlanır ve DNA manipülasyonu ile ilişkili maliyetleri büyük ölçüde azaltır. SLiCE, E. coli hücre ekstraktlarının in vitro homolog rekombinasyon aktivitesini kullanan bir bakteri hücresi ekstraktı bazlı DNA klonlama yöntemi olarak geliştirilmiştir (Zhang vd. 2012).

Slice sisteminde insert ürünleri PZR ile çoğaltılırken primer uçlarına 20 nukleotitik homoloji bölgeleri eklenmiştir (vektörde klonlama yapılacak bölgelere homoloji gösteren) ve bu bölgeler aracılığıyla rekombinasyon-tabanlı Slice klonlama işlemleri gerçekleştirilmiştir.

A. SLICE özü hazırlanması

1. JM109 gliserol stoku eritilmeden öze ile LB agar plakasına (amp^ragar) ekilir ve gece boyunca 37 °C'de inkübe edin.
2. Tek bir koloniyi 5 mL SOB (amp^r) içeren 50 mL'lik bir santrifüj tüpüne inoküle edilir ve gece boyunca 37 °C'de ve 330 rpm'de çalkalanır.
3. Gece boyu üretilen kültür 1/1000 olacak şekilde SOB'a inoküle edilir yani 500 ul aktifleşen kültürden 50 ml SOB'a inoküle edilir.50 mL SOB ortamı ampisilin içermez.
4. Kültür OD600 değeri 3-3,5 ulaşana kadar 37 °C'de ve 220 rpm'de çalkalanır.
5. 50 mL'lik falkona aktarılır.
6. Bakteriler 4 °C'de 10 dakika boyunca 5.000 x g'de santrifüjleme yoluyla çöktürülür.
7. Bakteriler daha sonra 50 mL sterilize edilmiş suyla (ELGA ultra safsu) (buz soğukluğunda) yıkanır.
8. Bakteriler 4 °C'de 10 dakika boyunca 5.000 x g'de santrifüjleme yoluyla çöktürülür.
9. Islak ağırlığı ölçülür.
10. Yıkanan hücreler, 0,40 g verimle toplanır ve 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) içindeki 1,2 mL %3 (a/h) Triton X-100 ile yavaşça yeniden süspanse edilir ve oda sıcaklığında 10 dakika süreyle inkübe edilir.
11. Hücre lizatları daha sonra 4 °C'de 2 dakika boyunca 20.000 g'de santrifüjlenir.
12. Ortaya çıkan süpernatantı hücre döküntüsünden (pellet) aspire edilir, yeni falkona alınır.
13. Hücre ekstraktlarını eşit hacimde %100 gliserol ile karıştırılır ve 0,5 mL tüplere 100 ul'lik porsiyonlara bölünür.
14. -80 derin dondurucuda saklanır.

B. Klonlama içeriği ve şartları

Klonlama vektörü:insert oranı 1:2 olacak şekilde yapılır, oranlar kütle değil molar oranlardır.

Vektörü	50 ng
İnsert	X ng
T4 DNA Ligaz Buffer	1 ul
SLICE özütü	1 ul

Nukleaz içermeyen suyla 10 ul tamamlanır, termal döngü cihazında 37 derecede 20 dk inkübe edilir.

3.2.4 SOB (Süper Optimal Broth) ortamının hazırlanması

1. Öncelikle cam şişeye 300 ml elga safsu eklenir. Su üzerine 2,5 gram Sodyum klorür, 10 gram Tripton Soya Suyu, 2,5 gram maya özü eklenir ve homejen görüntü alana kadar çalkalanır.
2. Sonrasında çözelti üzerine 1 molar Potasyum klorürden 1,25 ml ve 1 molar Magnezyum klorürden 5 ml eklenir.
3. Şişe 500 mililitreye elga safsuyla tamamlanır.
4. 121 derece, 1 atmosfer basınç altında 18 dakika otoklavlanır.

3.2.5 Luria-Bertani (LB) medya hazırlanması

1. Öncelikle cam şişeye 300 mililitre elga safsu eklenir. Sonrasında üzerine 5 gram Tripton Soya Suyu, 2,5 gram maya özü ve 5 gram Sodyum klorür eklenir ve iyi karıştırılır.
2. Çözeltiye 7,5 gram agar eklenir.
3. 121 derece, 1 atmosfer basınç altında 18 dakika otoklavlanır.

3.2.6 Q5® yüksek kaliteli DNA polimeraz (M0491) ve polimeraz zincir reaksiyonu

Örnek hazırlanması, 0,2 mililitrelik tüplerde hazırlanır.

Çizelge 3.4 Q5® Yüksek Kaliteli DNA Polimeraz içeriği

BİLEŞEN	50 µl REAKSİYON için	NİHAİ KONSANTRASYON
5X Q5 Reaksiyon Tamponu	10 ul	1X
10 mM dNTP'ler	1 ul	200 µM
10 µM İleri Primeri	2,5 ul	0.5 µM
10 µM Ters Primeri	2,5 ul	0.5 µM
Şablon DNA'sı	1-1000 ng	< 1,000 ng
Q5 Yüksek Doğruluklu DNA Polimeraz	0,5 ul	0,02 U/µl
5X Q5 Yüksek GC Güçlendirici (isteğe bağlı)	10 ul	(1X)
Nükleaz İçermeyen Su	50 ul'ye tamamlanır	

Çizelge 3.5 Q5® Yüksek Kaliteli DNA Polimeraz termal döngü şartları

Basamak	Sıcaklık	Zaman
İlk Denatürasyon	98°C	2 dakika
25–35 Döngü	98°C *50–72°C 72°C	5–10 saniye 10–30 saniye 20–30 saniye/kb
Son Uzatma	72°C	2 dakika
Muhafaza	4–10°C	

3.2.7 Taq DNA polimeraz, rekombinant (5 U/ μ L) (EP0401) ve polimeraz zincir reaksiyonu

Örnek hazırlanması, 0,2 mililitrelik tüplerde hazırlanır.

Çizelge 3.6 Taq DNA Polimeraz içeriği

BİLEŞEN	50 μ l REAKSİYON için
10X Taq Tamponu	5 μ L
dNTP Karışımı (her biri için 2 mM)	5 μ L
İleri primer 0,1-1,0 μ M	1 ul
Ters primer 0,1-1,0 μ M	1 ul
Şablon DNA'sı	1-1000 ng
Taq DNA Polimeraz	1.25 U (0,25 ul)
Nükleaz İçermeyen Su	50 ul'ye tamamlanır

Çizelge 3.7 Taq DNA Polimeraz termal döngü şartları

Basamak	Sıcaklık	Zaman
İlk Denatürasyon	95°C	1-3 dakika
25-35 Döngü	95°C *50-72°C 72°C	30 saniye 30 saniye 60 saniye/kb
Son Uzatma	72°C	5-15 dakika
Muhafaza	4-10°C	

3.2.8 Pozitif kolonilerin çoğaltılması ve saflaştırılması

Klonlama sonucu oluşan koloniler taranır (polimeraz zincir reaksiyonuyla), agaroz jelde pozitif bant veren kolonilerin inokulasyonu 5 ml amfisinli SOB (100 μ g/ml) ortamında 16 saat ve 20 saat arasında 37 derecede çalkalanır.

Pozitif kolonilerin izolasyonu (MACHEREY-NAGEL/NucleoSpin® Plasmid kiti)

1. Bakteri kültürü 2 ml santrifüj tüpünde 11.000 x g'de 1 dakika boyunca çöktürülür ve süpernatant atılır.
2. 250 ul A1 tamponu ile pellet resüspanse edilir. A1 tamponu RNaz içerir. Pellet tamamen homojen hale gelmelidir.
3. Çözeltiyeye 250 ul A2 tamponu eklenir. A2 tamponu bakterileri lize eder. Tüpü 6-8 kez ters-düz edilip yavaşça karıştırılır, çözelti mavi renge bürünür. Genomik DNA'nın parçalanmasını önlemek için vortekslenmez. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletilir.
4. Çözeltiyeye 300 µL A3 tamponu eklenir. Mavi çözelti tamamen renksiz hale gelinceye kadar tüp 6-8 kez ters-düz edilip karıştırılır. Genomik DNA'nın parçalanmasını önlemek için vortekslenmez. Tüm protein ve kromozomal DNA'nın çökmesi için tamamen nötralize edildiğinden emin olmak lazım.
5. Lizat oda sıcaklığında santrifüjün en yüksek RPM'inde çöktürülür. Süpernatantın berrak olması gereklidir.
6. Süpernatant kısmında plazmidler (DNA) bulunur, DNA'yı NucleoSpin® Plasmid kolonuna bağlamak için süpernatant kolona aktarılır ve 11.000 xg'de 30 saniye çöktürülür. Aşağı akış atılır.
7. Slika membran üzerine 500 ul AW tamponundan eklenir ve 11.000 xg'de 30 saniye çöktürülür. Aşağı akış atılır.
8. Slika membranı yıkamak için A4 tamponundan 750 ul eklenir ve 11.000 xg'de 30 saniye çöktürülür. Aşağı akış atılır.
9. Silika membranın kurutulması için 11.000 x g'de 2 dakika boyunca santrifüjlenir.
10. Kolon 1,5 ml'lik santrifüj tüpüne (nukleaz içermeyen tüp) aktarılır ve 70 derecede ısıtılmış 50 ul nukleaz içermeyen su kolonun üzerine damla damla verilir. Kolon 3 dakika oda sıcaklığında bekletilir, sonra 11.000 xg'de 1 dakika çöktürülür. Nanodropta plazmid miktarı tayin edilir.

3.2.9 Polimeraz zincir reaksiyonu sonucu oluşan ürünlerin temizlenmesi

Macherey-Nagel NucleoSpin PCR Temizleme, PCR temizliği için mini kit:

1. Polimeraz zincir reaksiyon örneğinin üstüne 200 µL NTI buffer (kolona yükleme çözeltisi) eklenir. Pipetaj yapılır, çözelti homojen görüntü alır.

2. Homojen çözelti, NucleoSpin® Jel ve PCR Temizleme Kolonuna tüm örnek yüklenir. Gerekirse kalan örnek tekrardan kolona yüklenir. 11.000 x g'de 30 saniye boyunca santrifüjlenir. Aşağı akışta kalan sıvı atılır.
3. Silika membran 700 µL NT3 buffer eklenir (ykanır). 11.000 x g'de 30 saniye boyunca santrifüjlenir. Aşağı akışta kalan sıvı atılır.
4. Silika membranı kurutmak için 11.000 x g'de 2 dakika santrifüjlenir.
5. Silika membran kurutulduktan sonra, temiz 1,5 mililitrelik santrifüj tüpüne konur, 25 ul 70 derecede ısıtılmış nukleaz içermeyen su kolon üzerine damlatılır. 4 dakika oda sıcaklığında bekletilir sonra 11.000 x g'de 1 dakika boyunca santrifüjlenir.
6. Nanodropla ölçümü yapılır.

3.2.10 Agaroz jel hazırlanması

0,5 M EDTA stok çözeltisinin hazırlanması: 500ml için, 93,05 gram EDTA disodyum tuzunu tartılır (MW=372,24 g/mol) 400 mililitre ELGA ultra saf suda çözünür ve pH'ı katı sodyum hidroksitla (NaOH), yaklaşık 8,0'a ayarlanır, pH 8.0 olunca EDTA tamamen çözelecektir. Solüsyonun son hacmi 500 mililitre tamamlanır, 121 derece 1 atmosfer basınç altında 18 dakika otoklavlanır.

50x TAE: 242 gram Tris-bazı (MW = 121,14 g/mol) tartılır ve yaklaşık 700 mililitre ELGA ultra saf suda çözünür. Dikkatlice 57,1 mililitre %100 glacial asit (veya asetik asit) ve 100 mililitre 0,5 M EDTA (pH 8,0) eklenir. Solüsyonu 1 litrelik son hacme ayarlayınız. Tamponun pH'ı yaklaşık 8,5 olmalıdır. Stok solüsyonunu oda sıcaklığında saklayın.

1x TAE: 1x TAE çalışma ortamını oluşturur. 50x TAE'den 20 ml, 980 ml ELGA ultra saf suyla karıştırılarak hazırlanır.

Yüzde birlik agaroz jelin hazırlanması: 1 gran agar tartılır, 100 ml 1x TAE içinde çalkalanır. Mikro dalgaya koyulup kaynatılır (eritilir). Kaynadıktan sonra su altına 55-60 dereceye kadar soğutulur. 0.5 µg/ml EtBr (Ethidium bromide) eklenir, karıştırılır ve hazneye (tray) dökülüp polimerize olması beklenir. DNA deneyleri için hazırlanmıştır.

Yüzde ikilik agaroz jelin hazırlanması: 2 gran agar tartılır, 100 ml 1x TAE içinde çalkalanır. Mikro dalgaya koyulup kaynatılır (eritilir). Kaynadıktan sonra su altına 55-60 dereceye kadar soğutulur. 0.5 µg/ml EtBr (Ethidium bromide) eklenir, karıştırılır ve hazneye (tray) dökülüp polimerize olması beklenir. RNA deneyleri için hazırlanmıştır.

3.2.11 Klonlamalar

Tez çalışması kapsamında kullanılan genler, Addgene'den ve Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Viroloji BD BSL3 Laboratuvarından temin edilmiştir. Klonlama vektörü, Flp-In™ T-REx™ 293 Hücre Hattına tek kopya, homoloji yönelik rekombinasyon metoduyla genomu yerleştirilecek şekilde IN-SLICO olarak tasarlanmıştır.

3.2.11.1 Flp-In rekombinasyon vektörü ve lentiviral proteinlerinin klonlanması

Flp-In rekombinasyon vektörü, *Saccharomyces cerevisiae*'den türetilmiş DNA rekombinasyon sisteminde yararlanarak memeli hücre hatlarında kararlı ekspresyon oluşturmak için programlanmış bir sistemdir. İlgilenilen gen(ler)in memeli hücrelerinin genomundaki belirli bir bölgeye entegrasyonunu sağlamak için rekombinaz (Flp) ve bölgeye özgü rekombinasyondan yararlanır (Craig vd. 1988, Sauer vd. 1994).

Lentiviral vektörler birinci nesil, ikinci nesil, üçüncü nesil ve dördüncü nesil setler halinde ticari olarak temin edilebilir, lakin bu sistemlerin hepsi biyogüvenlik açısından dizayn edilmiştir. Bu çalışma ürün elde etmeye yönelik olduğundan tüm proteinler ve diziler tek plazmit yapısına klonlanmıştır. Biyogüvenlik açısından tehlike yaratmaması için GAG-POL proteinin promotörü uyarılabilir olarak dizaynedilmiştir, genomundaki

silmelere dokunulmamıştır. Lentivirüsler temel olarak 3 kısımdan oluşur, genom olarak RNA, RNA'yı kaplayan proteinler ve konakçıyı tanımak için yüzey glikoproteinlerinden oluşur.

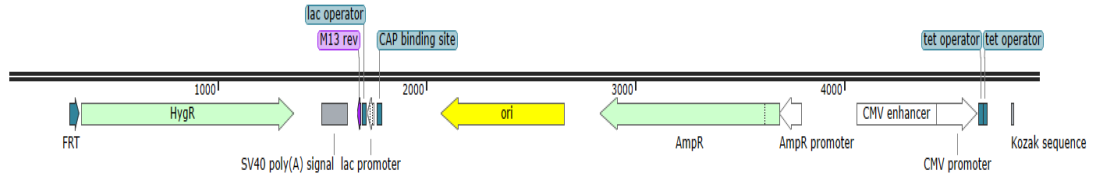
3.2.11.1.1 FRT vektörünün eldesi

ADDGENE 87828 plazmitinden FRT_F ve FRT_R primerleri ile çoğaltılır. Polimeraz zincir reaksiyonu şartları ve içeriği aşağıdaki gibidir.

FRT_F: 5' **AGCGCT**cttctgaggcggaagaa3'

FRT_R: 5' **taatactgacgctctcgcacccatGGTGGC**gtttaaacgctagagtc3'

Not: Primerlerin 5'üstü ucunda kırmızı ile işaretli diziler, klonlanacak GAG-POL dizisiyle homoloji bölgesini tasvir eder.



Şekil 3.3 FRT vektörü, FRT_F ve FRT_R Primerleri ile çoğaltılmak istenen dizi

Polimeraz zincir reaksiyonu 3.2.6. basamakta anlatıldığı gibi Q5® Yüksek Hassasiyetli DNA Polimeraz ile çoğaltılır. FRT_F ve FRT_R primerleri ile TM 60,1 derece ve uzama sıcaklığı 2,20 saniye olacak şekilde 35 döngü boyunca termal döngü cihazında çoğaltılır.

PZR ürünleri 3.2.9. basamakta anlatıldığı gibi temizlenir.

3.2.11.1.2 GAG-POL dizilerinin polimeraz zincir reaksiyonuyla eldesi

ADDGENE 12060 plazmidinden Gagpol_F ve Gagpol_R primerleri ile GAG-POL dizileri elde edilir. Bu diziler, Matrix, Capsid ve Nükleokapsid bileşenlerini, Ters Transkriptaz, İntegraz bileşenlerini ve Rev Response Element'i (RRE) içeren lentiviral partikülün öncü yapısal proteini ve bunları işleyen enzimleri kodlar.

Gagpol_F: 5'GCCACCCatgggtgcgagagcgc3'

Gagpol_R: 5'agctggttctttccgcctcagaagAGCGCTcccatatgccttccgag3'



Şekil 3.4 GAG-POL, Gagpol_F ve Gagpol_R primerleri ile polimeraz zincir reaksiyonu sonucu elde edilen GAG-POL dizileri

Polimeraz zincir reaksiyonu 3.2.6. basamakta anlatıldığı gibi Q5® Yüksek Hassasiyetli DNA Polimeraz ile çoğaltılır. Gagpol_F ve Gagpol_R primerleri ile TM 64 derece ve uzama sıcaklığı 3 dakika olacak şekilde 35 döngü boyunca termal döngü cihazında çoğaltılır.

PZR ürünleri 3.2.9. basamakta anlatıldığı gibi temizlenir.

3.2.11.1.3 FRT vektörü ve GAG-POL proteinlerinin klonlanması

3.2.11.1.1 ve 3.2.11.1.2 basamaklarında elde edilen, FRT vektörü ve GAG-POL protein dizileri SLİCE klonlaması ile birleştirilir.

Klonlama içeriği ve şartları: Klonlama FRT vektörü: GAG-POL dizileri oranı 1:2 olacak şekilde yapılır, oranlar kütle değil molar oranlardır.

FRT vektörü	50 ng
GAG-POL dizileri	79 ng
T4 DNA Ligaz Buffer	1 ul
SLICE özütü	1 ul

Nukleaz içermeyen suyla 10 ul tamamlanır, termal döngü cihazında 37 derecede 20 dk inkübe edilir.

3.2.11.1.4 Transformasyon ve ekim

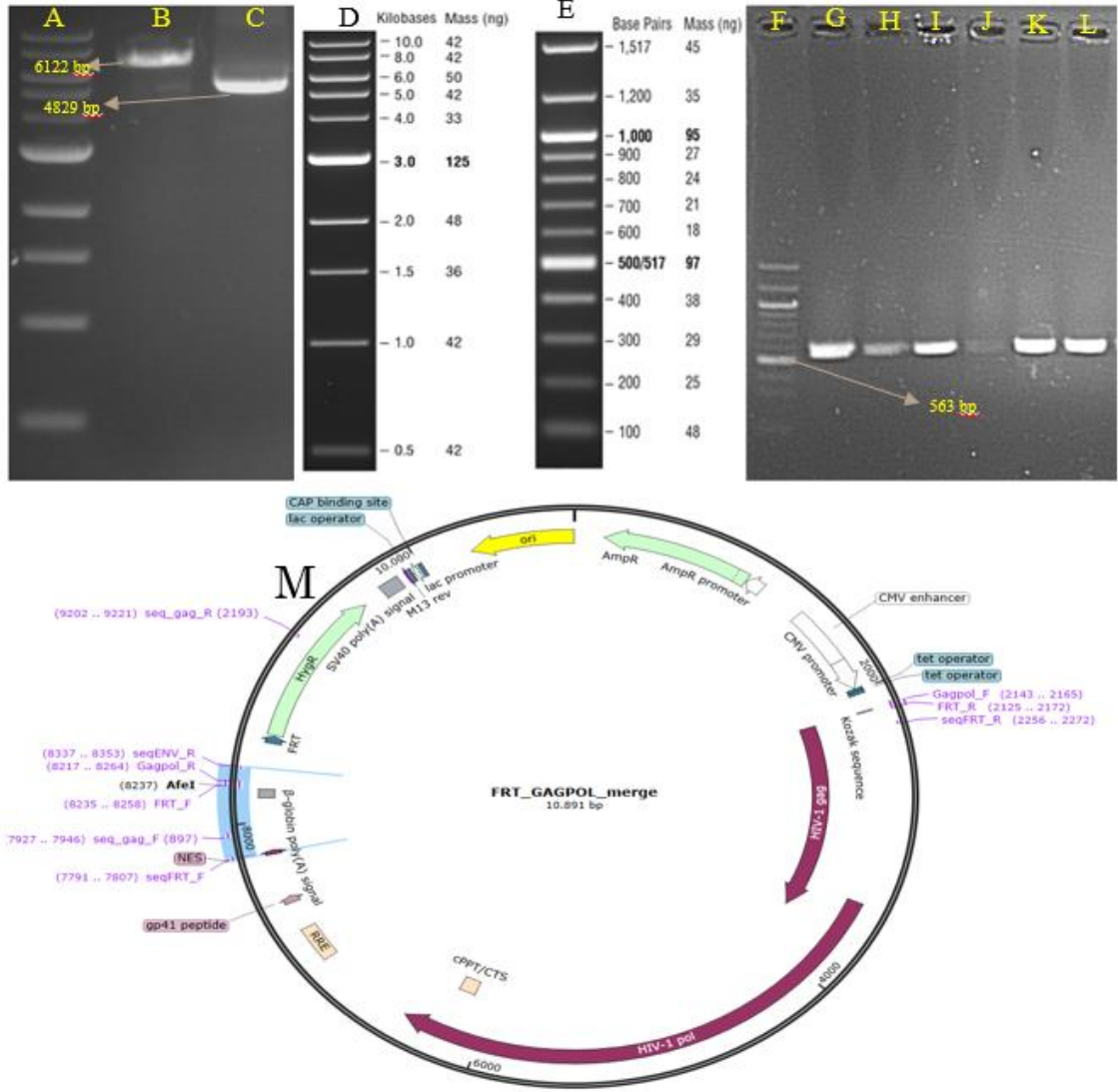
Inoue Ultra-Competent E. coli hücreleri -80'den buza alınır. 5-10 dakika çözünmesi beklenir, çözününce 2 ul SLICE özütlerine eklenir ve buz üzerinde 30 dakika bekletilir.

Transformasyondan sonra tüm hücreler amfisilinli agarlara ekilir.

3.2.11.1.5 Koloni taraması

Flp-In vektörü ve GAG-POL Klonlanması sonucu oluşan koloniler, seqENV_R: 5'aagtgtagcggtcacgc3' ve seqFRT_F: 5'ccgcttgagagacttac3' primerleri ile taranır. seqENV_R Flp-In vektörüne, seqFRT_F GAG-POL dizilerine bağlanır. Taramalar Standart Taq polimeraz enzimi ile yapılır, agaroz jelde 563 bp bant veren koloniler pozitif kabul edilir. PZR şartları 3.2.7. basamakta verilmiştir, özel şartları ise TM 52 derece, uzama sıcaklığı 30 saniye olacak şekilde 35 döngü termal döngü cihazında çoğaltılır.

3.2.8. basamakta anlatıldığı gibi pozitif koloniler izole edilip, -20 de saklanır.



Şekil 3.5 FRT-GAG-POL jel görüntüsü ve klonlama sonucu

FRT vektörü ve GAG-POL proteinlerinin klonlanmasının vektör, insert, klonlama taraması ve sonuçlarının agaroz jel çıktıları ve klonlama sonucu oluşan plazmit. A- NEB 1 kb DNA merdiveni, B- GAGPOL dizileri beklenen 6122 baz çifti, C- FRT vektörü beklenen 4829 baz çifti, D- NEB 1 kb DNA merdiveni gösterimi, E- NEB 100 bp DNA merdiveni gösterimi, F- NEB 100 bp DNA merdiveni G-H-I-J-K-L- koloni taramasının pozitif sonuçları, M- klonlama sonucu oluşan plazmit şekildeki gibi gösterilmiştir.

3.2.11.2 FRT-GAG-POL plazmidine VSV-G proteini klonlanması

VSV-G proteini, veziküler stomatit virüsü G glikoproteini kodlar; çoğu lentiviral vektörün psuedotiplenmesinde kullanılan geniş tropizm zarf proteinidir.

3.2.11.2.1 FRT-GAG-POL vektörünün oluşturulması

FRT-GAG-POL plazmidi NEB NruI-HF enzimi ile doğrusallaştırılır. Doğrusallaştırma aşağıdaki gibidir. 10.891 bp dizi elde edilir.

İçerik	Miktar
FRT-GAG-POL plazmidi	10 ug
rCutSmart tamponu	5 ul
NEB NruI-HF	1 ul
	50 ul'ye nukleaz içermeyen suyla tamamlanır.

37 derecede gece boyu inkübe edilir.

3.2.11.2.2 Doğrusallaştırılmış ürününün saflaştırılması

1. Ürünün üstüne 300 mM NaCl (20 ul) eklenir ve pipetaj yapılır. Pipetajdan sonra 2,5 volum saf etanol (125 ul) eklenir.
2. Bir saat boyunca -20 bekletilir.
3. Soğutmalı santrifüjde 12000 rpm'de 20 dakika santrifüjlenir.
4. Süpernatant aspire edilir, pellet %70'lik etanolle yıkanır.
5. 12000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenir.
6. 3 dakika oda koşullarında kurutulur.
7. 20 ul Nukleaz içermeyen suyla çözündürülür.
8. Nanodropla ölçülür. -20 derecede saklanır.

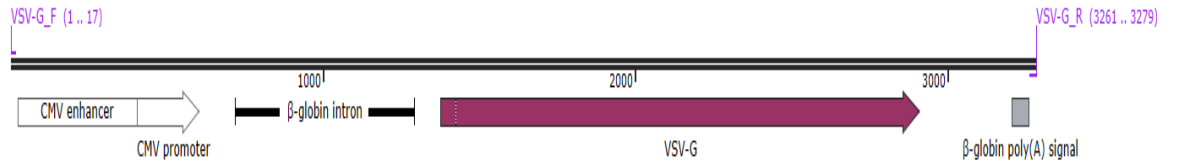
3.2.11.2.3 VSV-G zarf proteininin eldesi

Addgene 8454 plazmidinden VSV-G_F ve VSV-G_R primerleri ile VSV-G zarf proteinini polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılır.

VSV-G_F: 5'aggcgttttgcgctgcttcgtgtccaacattaccgcc3'

VSV-G_R: 5'tatatctggcccgtacatgcctcccatatgccttccg3'

Kırmızı işaretli diziler FRT-GAG-POL NruI kesimi ile homoloji oluşturur.



Şekil 3.6 VSV-G proteini, PZR sonucu olarak elde edilecek dizi

3.2.6. basamakta anlatıldığı gibi PZR, Q5® Yüksek Hassasiyetli DNA Polimeraz ile yapılır. PZR özel şartları ise TM:64, uzama sıcaklığı 1,40 saniye olacak şekilde 35 döngü termal döngü cihazında çoğaltılır. 3279 bp uzunluğunda VSV-G dizileri elde edilir.

VSV-G dizilerinin temizlenmesi, 3.2.9. basamakta ki protokole göre yapılır ve -20'de depolanır.

3.2.11.2.4 FRT-GAG-POL vektörü ve VSV-G dizilerinin klonlanması

3.2.11.2.2 ve 3.2.11.2.3 basamaklarında elde edilen FRT-GAG-POL vektörü ve VSV-G dizileri SLİCE klonlaması ile birleştirilir.

Klonlama içeriği ve şartları: Klonlama FRT-GAG-POL vektörü:VSV-G dizileri oranı 1:3 olacak şekilde yapılır, oranlar kütle değil molar oranlardır.

FRT-GAG-POL vektörü	50 ng
VSV-G dizileri	34 ng
T4 DNA Ligaz Buffer	1 ul
SLICE özütü	1 ul

Nukleaz içermeyen suyla 10 ul tamamlanır, termal döngü cihazında 37 derecede 20 dk inkübe edilir.

3.2.11.2.5 Transformasyon ve ekim

Inoue Ultra-Competent E. coli hücreleri -80'den buza alınır. 5-10 dakika çözünmesi beklenir, çözününce 2 ul SLICE özütlerine eklenir ve buz üzerinde 30 dakika bekletilir.

Tranformasyondan sonra tüm hücreler amfisilinli agarlara ekilir.

3.2.11.2.6 Koloni taraması

Flp-In vektörü ve GAG-POL Klonlanması sonucu oluşan koloniler, Amp_seqF: 5'acaaataggggtccg3' ve seq_VSVG_R: 5'ccattgatgtactgccccaaacC3' primerleri ile taranır. Amp_seqF FRT-GAG-POL vektörüne, seq_VSVG_R VSV-G dizilerine bağlanır. Taramalar Standart Taq polimeraz enzimi ile yapılır, agaroz jelde 1017 bp bant veren koloniler pozitif kabul edilir. PZR özel şartları, TM: 57.6, uzana sıcaklığı 1 dakika olacak şekilde 35 döngü termal döngü cihazında çoğaltılır.

Pozitif kolonilerin çoğaltılması ve saflaştırılması, 3.2.8. basamaktaki protokole göre yapılır ve plazmitler -20 derece de saklanır.

3.2.11.3 Lentiviral genom tasarımı ve Pspdcas13b hedeflerinin oluşturulması

3.2.11.2.6’de FRT_Lentiviral proteinler klonlanmıştır, bu basamakta, Lentiviral transfer/genomunun klonlanması yapılmıştır. Lentiviral transgen/genomu lentiviral proteinlerin içine topladığı ve konakçıya aktardığı ssRNA dizileridir. Bu diziler Addgene 135992 plazmidinden temin edilir, fonksiyonu transgeni içerir, Nucleokapsid ile paketleme için RNA tanıma bölgesini içerir, 3’LTR ve 5’LTR bölgelerini içerir. Transgen olarak anti-CD19 kimerik antijen reseptörünü taşır, bu yapının vHvL dizileri yerine klonlama ile ebov_vHvL dizileri yerleştirilir.

Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) virüsüne “Asya Ebola Virüsü” olarakta bilinir; KKKA ve Ebola Kanamalı Ateşi (EKA) arasındaki yakın klinik benzerlik vardır ve aynı zamanda iki hastalığın benzer temel mekanizmaları paylaşmaktadır (Sanchez A. 2004).

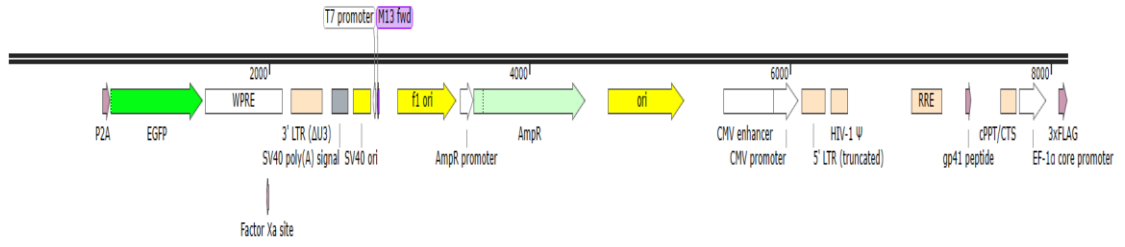
Bu sebeplerden kaynaklı Ebola Virüsü için tasarlanmış, monoklonal antikoların vH ve vL dizileri transgen olarak Addgene-135992 plazmidine klonlanmıştır. Bu sekanslar PspdCas13b tarafından hedeflenmiştir.

3.2.11.3.1 Lentiviral transgen vektörü eldesi

Addgene 135992 plazmidinden fullCAR_F ve fullCAR_R primerleri ile transgen vektörü elde edilir

fullCAR_F: 5’accacaacgcccgcctcctcg3’

fullCAR_R: 5’tttgctgctgcatctttg3’



Şekil 3.8 135992 Transgen vektörü

3.2.6. basamaktaki protokole uygun olarak fullCAR_F ve fullCAR_R Q5® Yüksek Hassasiyetli DNA Polimerazla çoğaltılır. Özel şartları ise TM: 61 derece, uzama sıcaklığının süresi 3,20 saniyedir, 35 döngü termal döngü cihazında çoğaltılır. %1'lik Agaroz jelde 8120 bp büyüklüğünde bant verir.

PZR ürünü, 3.2.9 basamaktaki protokole uygun temizlenir ve -20'de saklanır.

3.2.11.3.2 Ebola virüsü monoklonal antikorundan vH/vL eldesi

Addgene 85935 plazmidinden vH için fullCAR_vH_F ve fullCAR_vH_R primerleri, vL için fullCAR_vL_F ve fullCAR_vL_R primerleri kullanılarak elde edilmiştir. %1'lik Agaroz jelde vH 444 bp, vL 390 bp büyüklüğünde bant verir.

fullCAR_vH_F: 5' **ggatccggcaagcccggatctggcgagggatccaccaaggc**ggacgattgaccagttc3'

fullCAR_vH_R: 5' **cgtcgtggccgaggagcgggcgttggt**tactgggggtgcagtgg3'

fullCAR_vL_F: 5' **gatattgattacaaagatgacgacgacaaa**ggatcaagatgaagtcc3'

fullCAR_vL_R: 5' **tcctcgccagatccgggcttgccggatccagagtgga**gcctcgttaattctagcttagtacc3'

Not: kırmızı renkli diziler SLICE için homoloji bölgesidir.



Şekil 3.9 vHvL dizileri

vL için polimeraz zincir reaksiyonu 3.2.6.basamaktaki protokole göre yapılmıştır, Q5® Yüksek Hassasiyetli DNA Polimeraz ile fullCAR_vL_F ve fullCAR_vL_R primerleri ile TM: 57 derece, uzama sıcaklığı 13 saniye olacak şekilde, termal döngü cihazında 35 döngü boyunca üretilir.

vH için polimeraz zincir reaksiyonu, 3.2.6.basamaktaki protokole göre yapılmıştır, Q5® Yüksek Hassasiyetli DNA Polimeraz ile fullCAR_vH_F ve fullCAR_vH_R primerleri ile TM: 59 derece, uzama sıcaklığı 13 saniye olacak şekilde, termal döngü cihazında 35 döngü boyunca üretilir.

PZR ürünleri, 3.2.9 basamaktaki protokole uygun temizlenir ve -20'de saklanır.

3.2.11.3.3 Lentiviral transgen vektörü, vH ve vL dizilerinin klonlanması

3.2.11.3.1 ve 3.2.11.3.2'de hazırlanan lentiviral transgen vektörü ve vH ve vL dizilerinin SLICE klonlaması ile birleştirilir.

Klonlama içeriği ve şartları: Klonlama lentiviral transgen vektörü ve vH ve vL dizilerinin oranı 1:3:3 olacak şekilde yapılır, oranlar kütle değil molar oranlardır.

lentiviral transgen vektörü	50 ng
vH dizileri	9 ng
vL dizileri	9 ng
T4 DNA Ligaz Buffer	1 ul
SLICE özütü	1 ul

Nukleaz içermeyen suyla 10 ul tamamlanır, termal döngü cihazında 37 derecede 20 dk inkübe edilir.

3.2.11.3.4 Transformasyon ve ekim

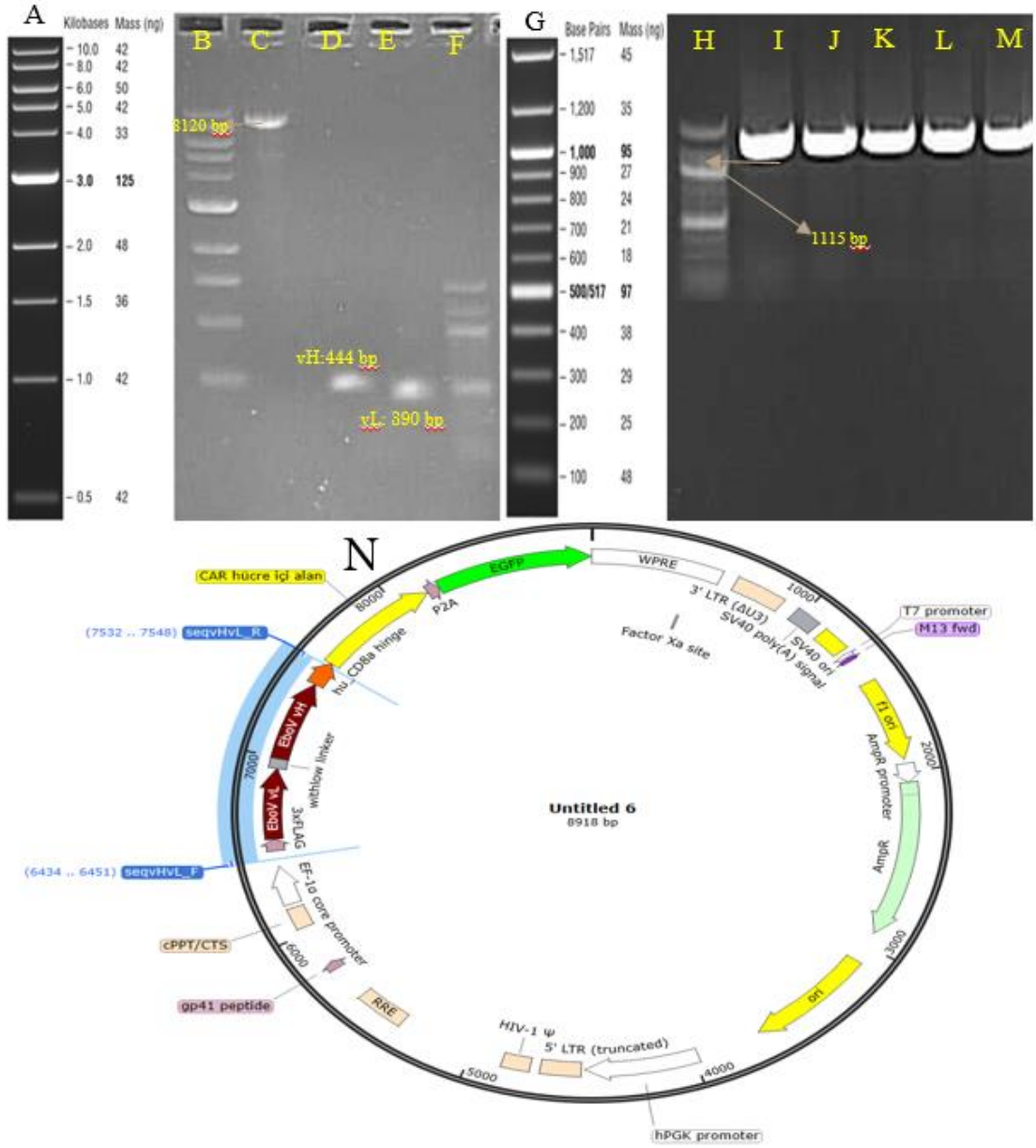
Inoue Ultra-Competent E. coli hücreleri -80'den buza alınır. 5-10 dakika çözünmesi beklenir, çözününce 2 ul SLICE özütlerine eklenir ve buz üzerinde 30 dakika bekletilir.

Tranformasyondan sonra tüm hücreler amfisilinli agarlara ekilir.

3.2.11.3.5 Koloni taraması

Flp-In vektörü ve GAG-POL Klonlanması sonucu oluşan koloniler, seqvHvL_F: 5'ggctctcaactattccc3' ve seqvHvL_R: 5'ccctcgtgtgcactgcg3' primerleri ile taranır. Primerlerden biri vektöre diğeri inserte bağlanır, vH ve vL'i içine alacak şekilde çoğaltır. Taramalar Standart Taq polimeraz enzimi ile yapılır, agaroz jelde 1115 bp bant veren koloniler pozitif kabul edilir. PZR, özel şartları TM: 53 derece, uzama sıcaklığının süresi ise 1,10 saniyedir.

Pozitif koloniler, 3.2.8. basamaktaki protokole uygun izole edilir ve -20'de saklanır.



Şekil 3.10 135992_transgene_ebol_vHvL klonlaması

135992_transgene_ebol_vHvL klonlamasında elde edilen, transgen vektörü, vH, vL ve klonlama sonucu elde edilen plamid. A- NEB 1 kb merdiveni gösterimi, B- NEB 1 kb merdiveni, C- 135992 transgen vektörü beklenen uzunluk 8120 bp, D- vH dizisi beklenen uzunluk 444 bp, E- vL dizisi beklenen uzunluk 390 bp, F- NEB 100 bp merdiveni, G- NEB 100 bp merdiveni gösterimi, H- NEB 100 bp merdiveni, I-J-K-L-M- koloni taramasının pozitif sonuçları, N- 135992_transgene_ebol_vHvL klonlaması sonucu oluşan plazmid yapısı.

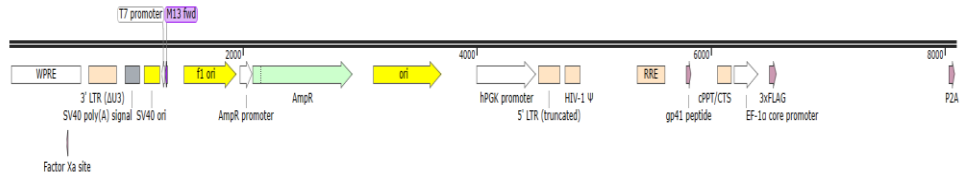
3.2.11.4 Ebov vH/vL 1335992 plasmidi ve mRuby klonlanması

3.2.11.4.1 Ebov vH/vL 1335992 vektörün eldesi

ebov vH/vL 1335992 plasmidinden CAR_rby_hpgk_F ve car_rubyp2a_R primerleri ile vektör elde edilir ve Addgene 87828 plazmidinden car_Ruby_F ve car_Ruby_R primerleri ile mRuby dizisi elde edilir.

CAR_rby_hpgk_F: 5'taacgcgттаagtcgaca3'

CAR_rubyp2a_R: 5'cacgggaccggggtttt3'



Şekil 3.11 ebov vH/vL 1335992 vektörü

ebov vH/vL 1335992 vektörü için polimeraz zincir reaksiyonu, Q5® Yüksek Hassasiyetli DNA Polimeraz ile elde edilir. PZR özel şartları, CAR_rby_hpgk_F ve car_rubyp2a_R primerleri ile TM:65, uzama sıcaklığı süresi 3,20 saniyedir, termal döngü cihazında 35 döngü boyunca çoğaltılır.

PZR sonucu oluşan, ebov vH/vL 1335992 vektörü 3.2.9 basamaktaki protokole uygun temizlenir.

3.2.11.4.2 mRuby dizisinin eldesi

mRuby dizisi addgene_87828 plazmidinden car_Cherry_F ve car_Cherry_R primerleri ile elde edilir.

car_ mRuby_F 5' **ggcgacgtggaagaaaaccccggtcc**gtgTCTAAGGGCGAAGAGC3'

car_ mRuby_R: 5' **ccagaggttgattgtcgacttaacgcg**ttaactgtacagctcgtccatgc3'

Kırmızı diziler SLICE için homoloji bölgesini sağlar.



Şekil 3.12 mRuby için polimeraz zincir reaksiyonu

mRuby için polimeraz zincir reaksiyonu, Q5® Yüksek Hassasiyetli DNA Polimeraz ile çoğaltılır. PZR özel şartları, car_ mRuby_F ve car_ mRuby_R ile TM: 59 derecede, uzama sıcaklığı 15 saniye olacak şekilde, termal döngü cihazında, 35 döngü boyunca çoğaltılır. mRuby uzunluğu 708 bp'dir.

PZR sonucu oluşan, mRuby dizisinin 3.2.9. basamaktaki protokole uygun temizlenir.

3.2.11.4.3 Ebov vH/vL 1335992 plasmidi ve mRuby klonlanması

3.2.11.4.1 ve 3.2.11.4.2 de hazırlanan ebov vH/vL 1335992 vektörü ve mRuby dizilerinin SLICE klonlaması ile birleştirilir.

Klonlama içeriği ve şartları : Klonlama ebov vH/vL 1335992 vektörü:mRuby dizilerinin oranı 1:3 olacak şekilde yapılır, oranlar kütle değil molar oranlardır.

lentiviral transgen vektörü	50 ng
mRuby dizileri	16 ng
T4 DNA Ligaz Buffer	1 ul
SLICE özütü	1 ul

Nukleaz içermeyen suyla 10 ul tamamlanır, termal döngü cihazında 37 derecede 20 dk inkübe edilir.

3.2.12.4.4 Transformasyon ve ekim

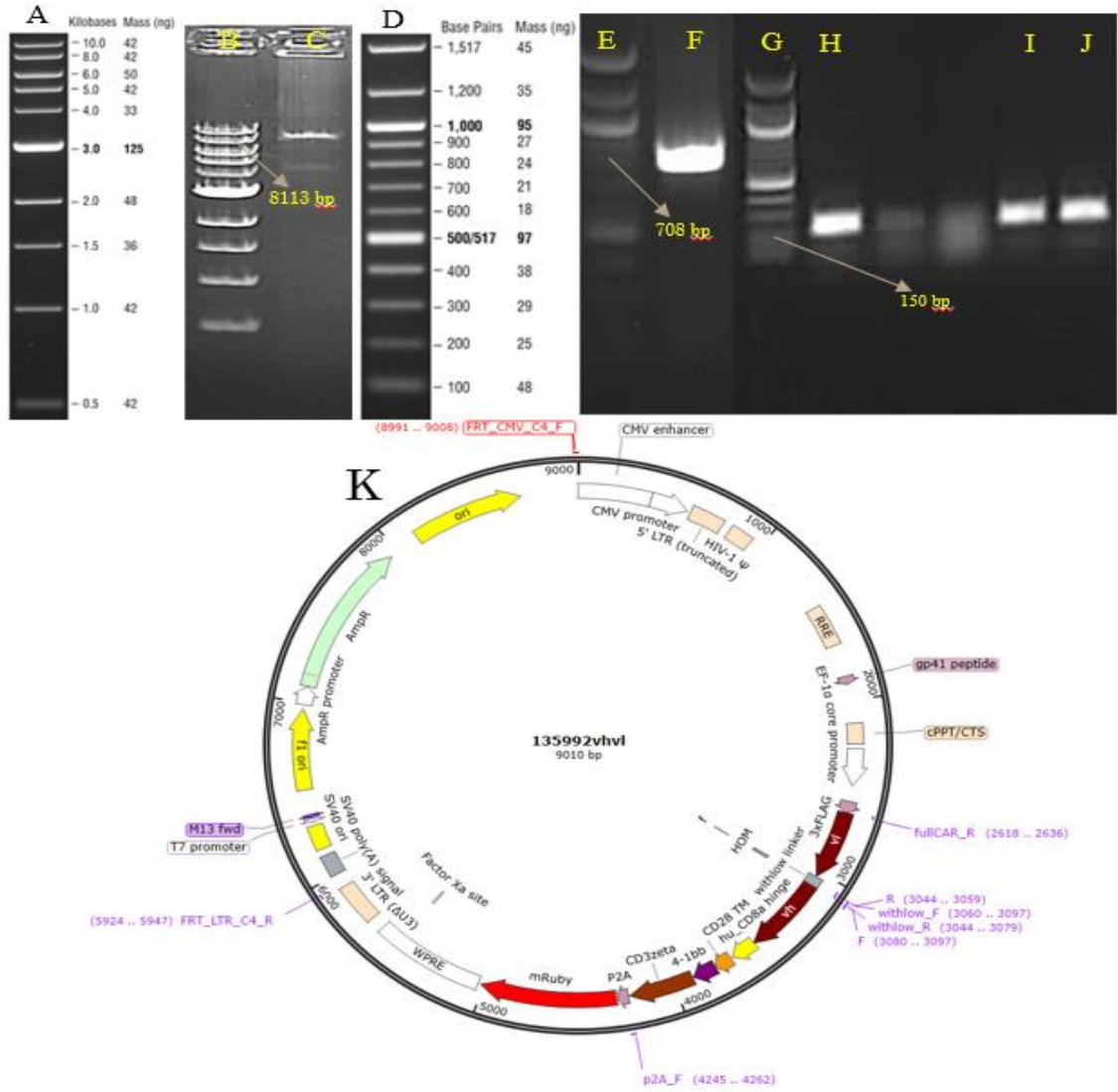
Inoue Ultra-Competent E. coli hücreleri -80'den buza alınır. 5-10 dakika çözünmesi beklenir, çözününce 2 ul SLICE özütlerine eklenir ve buz üzerinde 30 dakika bekletilir.

Tranformasyondan sonra tüm hücreler amfisilinli agarlara ekilir.

3.2.12.4.5 Koloni taraması

Ebov_vHvL_1335992_ mRuby Klonlanması sonucu oluşan koloniler, seq_ mRuby_F: 5'cggcattggacgagctg3' ve seqRuby_R: 5'aaggcattaaagcagcg3' primerleri ile taranır. Primerlerden biri vektöre diğeri inserte bağlanır, böylelikle sadece pozitif koloniler çoğaltılır. Taramalar Standart Taq polimeraz enzimi ile yapılır, agaroz jelde 150 bp bant veren koloniler pozitif kabul edilir. Standart Taq polimeraz ile yapılan tarama 3.2.7. basamaktaki protokole göre yapılmıştır, özel şartları TM:55 derece, uzama sıcaklığı süresi 10 saniyedir, termal döngüde 35 döngü boyunca çoğaltılmıştır.

Pozitif kolonilerin çoğaltılması ve saflaştırılması 3.2.8. basamaktaki protokole uygun şekilde elde edilir ve -20'de saklanır.



Şekil 3.13 ebov vH/vL 1335992_mRuby klonlanması

ebov vH/vL 1335992_mRuby klonlanma sonuçları, A- NEB 1 kb DNA merdiveni gösterimi, B- NEB 1 kb DNA merdiveni, C- ebov vH/vL 1335992 vektörü, D- NEB 100 bp DNA merdiveni gösterimi, E- NEB 100 bp DNA merdiveni, F- mRuby dizileri, G- NEB 100 bp DNA merdiveni, H-I-J- ebov vH/vL 1335992_mRuby klonlanması sonucu oluşan pozitif klonlar, K- ebov vH/vL 1335992_mRuby klonlanması sonucu oluşan plazmid yapısı şekildeki gibidir.

3.2.11.5 Ebov-vHvL- mRuby-135922 ve FRT-lentiviral proteinler plazmidinin klonlanması

3.2.11.2.6 ve 3.2.11.4.5'te elde edilen lentiviral transgen ve FRT-lentiviral proteinler, en uygun varyant aktarımı için birleştirilmelidir.

3.2.11.5.1 FRT_lentiviral proteinler plazmidinin doğrusallaştırılması

FRT-lentiviral proteinler plazmidi NEB AfeI enzimi ile doğrusallaştırılır. Doğrusallaştırma aşağıdaki gibidir. Kesim sonucu 14.170 bp uzunluğundadır.

İçerik	Miktar
FRT-lentiviral proteinler plazmidi	10 ug
rCutSmart tamponu	5 ul
NEB AfeI	1 ul
	50 ul'ye nukleaz içermeyen suyla tamamlanır.

37 derecede gece boyu inkübe edilir.

3.2.11.5.2 FRT-lentiviral proteinler plazmidi AfeI kesimi ürününün temzilenmesi

1. Ürünün üstüne 300 mM NaCl (20 ul) eklenir ve pipetaj yapılır. Pipetajdan sonra 2,5 volum saf etanol (125 ul) eklenir.
2. Bir saat boyunca -20 bekletilir.
3. Soğutmalı santrifüjde 12000 rpm'de 20 dakika santrifüjlenir.
4. Süpernatant aspire edilir, pellet %70'lik etanolle yıkanır.
5. 12000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenir.
6. 3 dakika oda koşullarında kurutulur.
7. 20 ul Nukleaz içermeyen suyla çözündürülür.
8. Nanodropla ölçülür. -20'de saklanır.

3.2.11.5.3 Ebov_vHvL_ mRuby_135992 plazmidinden lentiviral genomun eldesi

ebov_vHvL_mRuby_135992 plazmidinden FRT_CMV_C4_F ve FRT_LTR_C4_R primerleri ile polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle hedeflenen transgen elde edilir.

FRT_CMV_C4_F: 5' **ggagggcaaatcattaAGC**acgggccagatatacgcg3'

FRT_LTR_C4_R: 5' **tcttccgcctcagaagAGC**gacatgaactactatacgctactgc3'

Kırmızı renkli diziler homoloji bölgesidir.

ebov_vHvL_ mRuby_135992 plazmidinden transgen için polimeraz zincir reaksiyonu, 3.2.6. basamaktaki Q5® Yüksek Hassasiyetli DNA Polimeraz ile elde edilir. PZR özel şartları, TM:63, uzama sıcaklığı süresi 3,30 saniyedir. Termal döngü cihazında 35 döngü boyunca çoğaltılır.

ebov_vHvL_ mRuby_135992 transgen PZR ürünü, 3.2.9 basamaktaki protokolle temizlenir ve -20'de saklanır.

3.2.11.5.4 Ebov_vHvL_ mRuby_135992 transgene ve FRT-lentiviral proteinlerin klonlanması

3.2.11.5.2 ve 3.2.11.5.3'de hazırlanan ebov_vH/vL_1335992 transgen ve FRT-lentiviral proteinlerinin SLİCE klonlaması ile birleştirilir.

Klonlama içeriği ve şartları: Klonlama ebov_vH/vL_1335992 transgen:FRT-lentiviral proteinlerinin oranı 1:3 olacak şekilde yapılır, oranlar kütle değil molar oranlardır.

FRT-lentiviral proteinleri	50 ng
Klonlama ebov_vH/vL_1335992 transgen	66 ng
T4 DNA Ligaz Buffer	1 ul
SLICE özütü	1 ul

Nukleaz içermeyen suyla 10 ul tamamlanır, termal döngü cihazında 37 derecede 20 dk inkübe edilir.

3.2.11.5.5 Transformasyon ve ekim

Inoue Ultra-Competent E. coli hücreleri -80'den buza alınır. 5-10 dakika çözünmesi beklenir, çözününce 2 ul SLICE özütlerine eklenir ve buz üzerinde 30 dakika bekletilir.

Transformasyondan sonra tüm hücreler amfisilinli agarlara ekilir.

3.2.11.5.6 Koloni taraması

Ebov_vHvL_1335992_ mRuby Klonlanması sonucu oluşan koloniler, seqENV_F: 5'cttggttctccgagttgg3' ve seq_C4_psiR: 5'tcggatctaatctccc3' primerleri ile taranır. Primerlerden biri vektöre diğeri inserte bağlanır, böylelikle sadece pozitif koloniler çoğaltılır. Taramalar Standart Taq polimeraz enzimi ile yapılır, agaroz jelde 1482 bp bant veren koloniler pozitif kabul edilir. Standart Taq polimeraz ile yapılan tarama 3.2.7. basamaktaki protokole göre yapılmıştır, özel şartları TM:56 derece, uzama sıcaklığı süresi 1,30 dakikadır, termal döngüde 35 döngü boyunca çoğaltılmıştır.

Pozitif koloniler 3.2.8. basamaktaki protokole göre izole edilir ve -20'de saklanır.

3.2.11.6 NF-κB biyosensörü ve lentiviral transgen klonlaması

Nükleer faktör-κB (NF-κB), hücreSEL görevi immün yanıt, inflamasyon, hücre büyümesi, hayatta kalması ve gelişimi gibi çeşitli biyolojik süreçlerde önemli rol oynayan transkripsiyon faktörüdür. NF-κB, büyüme faktörleri ve bulaşıcı mikroplar gibi çeşitli inflamatuvar uyaranlar tarafından aktive edilir (Karin M. 2002, Nakajima S. 2013). Bu basamaktaki klonlamanın amacı, Flp-In™ T-REx™ 293 Hücre hatlarında düzenlenmiş CAR'lar, lentivirüslere paketlenir, sonra T hücrelerine transdüksiyonu yapılır. Transdüksiyonu yapılmış bu T hücrelerinde immün yanıt alabilmek için NF-κB biyosensörü kullanılır. Çeşitlendirilmiş CAR varyant havuzunda antijeni tanıyan varyant durumunda, CAR hücre içi alanı aktifleşecektir ve NF-κB biyosensörü devreye girecektir.

Klonlama aşağıdaki gibidir.

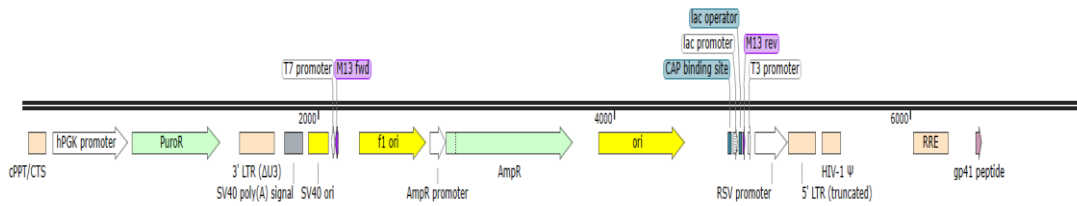
3.2.11.6.1 Lentiviral transgen vektörünün eldesi

Addgene 19319 plazmidinden cPPT/CTC_F2 ve CMV_PROMOTOR_R2 primerleri ile lentiviral transgen vektörü elde edilir. Bu işlem polimeraz zincir reaksiyonu ile gerçekleştirilir.

cPPT/CTC_F2: 5'ctgtgccttctagttgccagatggcagattatccac3'

CMV_PROMOTOR_R2: 5'acgcgtatatctggcccgtactgccaaccgcatcac3'

Kırmızı diziler SLICE için homoloji bölgesini oluşturur.



Şekil 3.15 Addgene 19319 plazmidinden lentiviral transgen vektörü

Addgene 19319 plazmidinden lentiviral transgen vektörü elde etmek için polimeraz zincir reaksiyonu, Q5® Yüksek Hassasiyetli DNA Polimerazla cPPT/CTC_F2 ve CMV_PROMOTOR_R2 primerleriyle çoğaltılır. PZR 3.2.6. basamaktaki protokole göre yapılır özel şartları TM: 61 derece, uzama sıcaklığı süresi 3,30 saniye 35 döngü boyunca termal döngü cihazında çoğaltılır.

Lentiviral transgen vektörünün PZR ürünü, 3.2.9. basamaktaki protokole göre temizlenir.

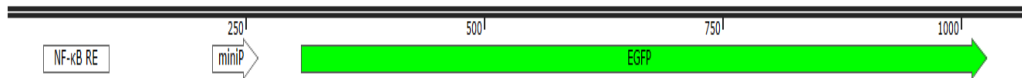
3.2.11.6.2 NF-κB biyosensörü dizilerinin eldesi

Laboratuvarda daha önceden tasarlanmış olan nf_kb_son plazmidinden nfkB_3F ve nfkB_2R primerleri ile polimeraz zincir reaksiyonu ile NF-κB biyosensörü dizileri elde edilir.

nfkB_3F: 5'tacgggccagatatacgcgttctagactgccgatcc3'

nfkB_2R: 5'ctggcaactagaaggcacagccactgtgctggcgccc3'

Kırmızı diziler SLICE klonlaması için homoloji bölgesini oluşturur.



Şekil 3.16 NF-κB biyosensörü dizisi

Şekil 3.16 NF-κB biyosensörü dizisi, nf_kb_son plazmidinden NF-κB biyosensörü dizileri elde etmek için polimeraz zincir reaksiyonu, nfkB_3F, nfkB_2R primerleriyle ve Q5® Yüksek Hassasiyetli DNA Polimerazla çoğaltılır. PZR 6.2.6. basamaktaki protokole göre yapılır özel şartları TM: 64 derece, uzama sıcaklığı süresi 15 saniye 35 döngü boyunca termal döngü cihazında çoğaltılır.

NF-κB biyosensörü dizileri PZR ürünü, 6.2.9. basamaktaki protokole göre temizlenir.

3.2.11.6.3 19319 lentiviral vektörü ve NF-κB biyosensörü dizilerinin klonlaması

Klonlama 19319 lentiviral vektörü:NF-κB biyosensörü oranı 1:3 olacak şekilde yapılır, oranlar kütle değil molar oranlardır.

19319 lentiviral vektörü	50 ng
NF-κB biyosensörü	24 ng
T4 DNA Ligaz Buffer	1 ul
SLICE özütü	1 ul

Nukleaz içermeyen suyla 10 ul tamamlanır, termal döngü cihazında 37 derecede 20 dk inkübe edilir.

3.2.11.6.4 Transformasyon ve ekim

Inoue Ultra-Competent E. coli hücreleri -80'den buza alınır. 5-10 dakika çözünmesi beklenir, çözününce 2 ul SLICE özütlerine eklenir ve buz üzerinde 30 dakika bekletilir.

Tranformasyondan sonra tüm hücreler amfisilinli agarlara ekilir.

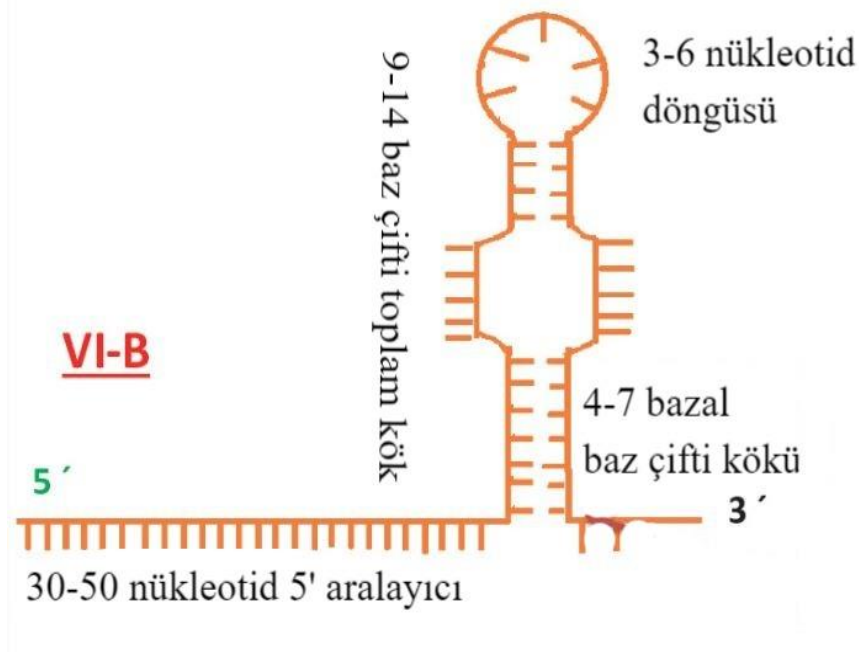
3.2.11.6.5 Koloni taraması

19319_ NF-κB biyosensörü Klonlanması sonucu oluşan koloniler, 1F_U6H3_Spe: 5'ttattgactagtggaggcctatttcca3' ve nfkB_3R: 5'cccttgctcaccatggtggetgaagcttcaagatgagc3' primerleri ile taranır. Primerlerden biri vektöre diğeri inserte bağlanır, böylelikle sadece pozitif koloniler çoğaltılır. Taramalar Standart Taq polimeraz enzimi ile yapılır, agaroz jelde 648 bp bant veren koloniler

19319 _ NF- κ B biyosensörü klonlama sonuçları, A- NEB 100 bp DNA merdiveni, B- nf_Kb biyosensörü dizileri, C- NEB 100 bp DNA merdiven gösterimi, D- NEB 100 bp DNA merdiveni, E-F-G- klonlama sonrası koloni taramasıyla elde edilen pozitif klonlar, H- NEB 1 kb DNA merdiveni gösterimi, J- 19319 transgen vektörü, K- 19319 _ NF- κ B biyosensörü klonlaması sonucu oluşan plazmid yapısı şekildeki gibidir.

3.2.12 Aralayıcı RNA ve doğrudan tekrarların tasarlanması ve üretimi

FRT_Ebov_vHvL_Lv plazmidi ve addgene 10864 plazmidi, Flp-In™ T-REx™ 293 hücre hatlarının genomuna bütünleşmiş ve sürekli ifadenmesi sağlanır. Lakin burada kurulan sistemde tüm proteinler ifade verirken GAG-POL tetrasiklinle uyarılabilir promotorle çalışmaktadır, biyogüvenlik açısından ve varyant toplama açısından önemlidir. Yani hücrelerde hali hazırda CAR, dPspCas13b ve ADAR2 ifade edecek şekilde tasarlanmıştır. Dışarıdan sadece gRNA ve doğrudan tekrar transfeksiyonla hücreye aktarılır.

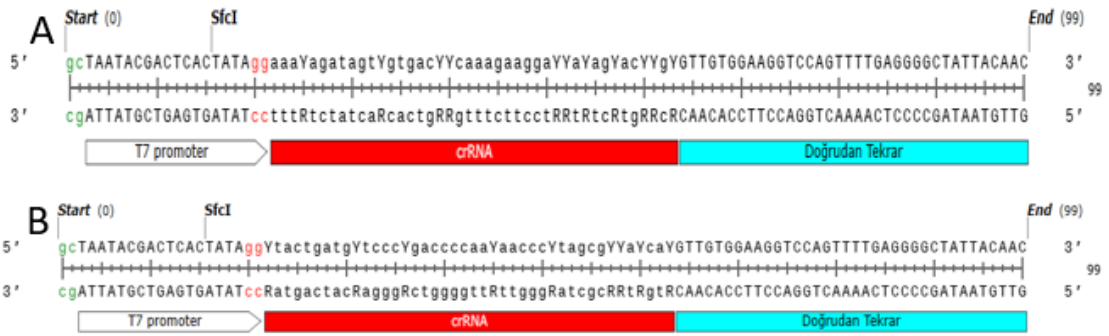


Şekil 3.18 Tip VI-B CRISPR-Cas sistemleri için genel crRNA ve Doğrudan Tekrar yapısı (Pandita vd 2021)

3.2.12.1 Aralayıcı RNA ve doğrudan tekrar tasarımı

Bu çalışmada aralayıcı RNA ve doğrudan tekrar in-vitro olarak üretilmiştir, çünkü hücreye transfeksiyonu yapıldığında hali hazırda kompleks kuracağı dCas13b proteini, huADAR2 ve hedef CAR'lar ifadelenmiş ve protein olarak bulunuyor olacaktır.

Bakteriyofaj T7 RNA Polimeraz, T7 faj promotörleri için oldukça özgüldür, DNA'ya bağımlı bir RNA polimerazdır. Çok düşük hata oranına sahiptir. T7 polimerazın moleküler ağırlığı 99 kDa'dır. T7 promotörleri aşağı akışında ki DNA dizisinden in vitro RNA sentezini katalize eder. T7 RNA Polimeraz kullanılarak üretilen RNA, araştırma ve biyoteknolojideki birçok uygulamada kullanılır.



Şekil 3.19 Aralayıcı RNA ve doğrudan tekrarlar, A- ebov_vH 5' dizilerini hedefler, B- ebov_vH 5' dizilerini hedefler. A ve B crRNA dizileri farklılıklar gösterir, bu da çeşitliliğe katkıda bulunur

Şekil 3.18 Aralayıcı RNA ve doğrudan tekrarlar önce oligonükleotid olarak tasarlanırlar. Bu tasarımda oligonükleotidin 5' ucuna 5'GC3' gece nükleotiti eklenir. 5'GC3' dizisinin amacı T7 promotörünün dizilere daha iyi oturmasıdır. Sonrasında T7 polimeraz promotör dizileri eklenir, 3' ucuna 5'GG3' dizileri eklenir, in-vitro RNA üretimi için en uygun koşulları böylelikle sağlamış olur. Sonrasında dejenere aralayıcı diziler tasarlanmıştır, dejenere olmasının sebebi varyant sayısını olabildiğince arttırmaktır. Oligonükleotidin 3' ucuna doğrudan tekrar dizileri eklenir, bu diziler dCas13b için özgüldür.

3.2.12.2 Aralayıcı RNA ve doğrudan tekrar in-vitro üretimi

İn-vitro sentez, Thermo Scientific TranscriptAid T7 Yüksek Verimli Transkripsiyon Kiti (#K0441) ile yapılır.

- Tüm donmuş reaksiyon bileşenlerini çözünür, vortekslenir ve tüm bileşenler kısa süre santrifüjlenir.
- TranscriptAid Enzim Karışımını ve nükleotidleri buz üzerinde tutulur.
- 5X TranscriptAid Reaksiyon Tamponunu oda sıcaklığında tutulur.

1. Aşağıdaki reaksiyon bileşenlerini oda sıcaklığında verilen sıraya göre birleştirilir:

Çizelge 3.8 5X TranscriptAid Reaksiyon içeriği

Bileşenler	Miktar
DEPC ile arıtılmış su	20 mikrolitreye tamamlanır.
5X TranscriptAid Reaksiyon Tamponu	4 mikrolitre
ATP/CTP/GTP/UTP Karışımı	8 mikrolitre
Oligonükleotid	1 mikrogram DNA
TranscriptAid Enzim Karışımı	2 mikrolitre

2. İyice pipetlenir, çözelti kısa süre santrifüjlenir ve 37 derecede gece boyu inkübe edilir.
3. Çözeltinin üzerine 30 mikrolitre DEPC ile arıtılmış su eklenir, üzerine 2 mikrolitre DNase I eklenir ve 37 derecede 15 dakika inkübe edilir, çözeltideki oligonükleotidler/DNA'lar ortadan kaldırılır.

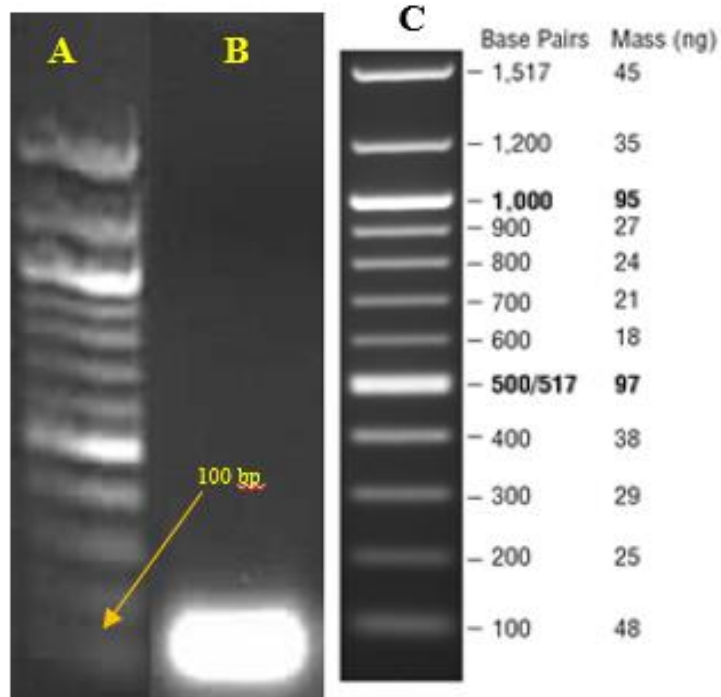
3.2.12.3 Aralayıcı RNA ve doğrudan tekrarların temizlenmesi

1. Ürünün üstüne 300 mM NaCl (20 ul) eklenir ve pipetaj yapılır. Pipetajdan sonra 2,5 volum saf etanol (125 ul) eklenir.
2. Bir saat boyunca -20 bekletilir.
3. Soğutmalı santrifüjde 12000 rpm'de 20 dakika santrifüjlenir.

4. Süpernatant aspire edilir, pellet %70'lik etanolle yıkanır.
5. 12000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenir.
6. 3 dakika oda koşullarında kurutulur.
7. 20 ul DEPC ile arıtılmış suyla çözündürülür.
8. Nanodropla ölçülür. Yarısı -80 derin dondurucuya alınır, diğer yarısı -20 derin dondurucuda kullanıma hazır halde bekletilir.

3.2.12.4 Aralayıcı RNA ve doğrudan tekrarların görüntülenmesi

1. 3.2.12.3'te ki basamakta elde edilen RNA'dan 500 ng gRNA ve doğrudan tekrardan 10 ul DEPC ile arıtılmış suda dilüe edilir.
2. 10 ul 2X RNA Yükleme Boyası Solüsyonu eklenir ve 70°C'de 10 dakika ısıtılır.
3. Örnek buz üzerinde 3 dakika soğutulur ve kısa bir süre santrifüjlenir.
4. %2'lik agaroz jeldeki kuyuya yüklenir, başka bir kuyuya merdiven örneği yüklenir.
5. 45 dakika 120 voltta yürütülür. Jel görüntüleme cihazında görüntülenir.



Şekil 3.20 Aralayıcı RNA ve doğrudan tekrar dizisinin %2'lik agaroz jel görüntüsü

Şekilde gösterildiği gibi aralayıcı RNA ve doğrudan tekrar dizileri %2'lik agaroz jelde görüntülenmiştir. A- NEB 100 bp merdiven, B- 99 baz uzunluğundaki aralayıcı RNA ve doğrudan tekrar dizileri, C- NEB 100 bp merdivenin gösterimi.

3.2.13 Kararlı hücre hatlarının eldesi

Çalışmada kullanılan genler hücre hatlarına geçici transfeksiyondan ziyade sürekli ifadelenmesi sağlamak için genoma entegre edilir, özellikle dPspCas13b tarafından hedeflenen FRT_ebov_vHvL_lentiviral proteinler plazmidi tek kopya olarak Flp-In™ T-REx™ 293 hücre hattının genomuna Flp-in rekombinaz metoduyla yerleştirilir. NF-kB biyosensörü Jurkat E6 (T hücresi) hattının genomuna lentiviral yöntemle bütünleştirilmiştir. dPspCas13b, huADARDD2 ise Flp-In™ T-REx™ 293 hücre hattının genomuna tamamen rastgele entegre edilir.

Kararlı hücre hatlarının oluşturulması aşağıdaki gibidir

3.2.13.1 NF-kB biyosensörünün Jurkat E6 (T hücresi) hattına entegrasyonu

Lentivirüsler, DNA'yı konakçı hücrelerinin genomuna yerleştirerek enfekte eden, AIDS gibi hastalıklardan sorumlu olan bir virüs ailesidir. Konakçı hücreye bağlandıktan sonra, lentivirüs tek sarmallı viral RNA, transkripsiyona ve yeniden entegrasyona uğrayarak viral RNA'sını konakçı hücrenin DNA'sına entegre eder. Lentiviral vektörler, birincil hücreler, süspanse hücreler, bölünmeyen ve yavaş bölünen hücrelere gen aktarma yetenekleri nedeniyle gen aktarımı için oldukça çekici araçlardır. Gen terapisinde, lentivirüsler kullanılarak organizmalara genlerin eklenebildiği, değiştirilebildiği veya silinebildiği etkili bir yöntemdir.

Bu basamakta Lentivirüslerin tercih edilmesi, Jurkat (T hücresi) hatlarının zor doğasından kaynaklanmaktadır. T hücrelerine transfeksiyon başarısı oldukça düşüktür, elektroporasyon yönteminin ciddi toksik dezavantajı vardır. Bu noktada lentiviral gen transferi oldukça cezbedicidir.

3.2.13.1.1 NF-kB biyosensörü içeren virüslerin eldesi

3.2.11.2.6 ve 3.2.11.6.6 basamaklarında sırasıyla elde edilen FRT_lentiviral proteinler plazmidi ve 19319_NF-kB biyosensörü transgen plazmidi aşağıdaki gibi Flp-In™ T-REx™ 293 hücre hattına Thermo Fisher Scientific Lipofectamine™ 3000 Transfeksiyon Reaktifi ile transfeksiyonu yapılır.

0. Gün: Hücre ekimi

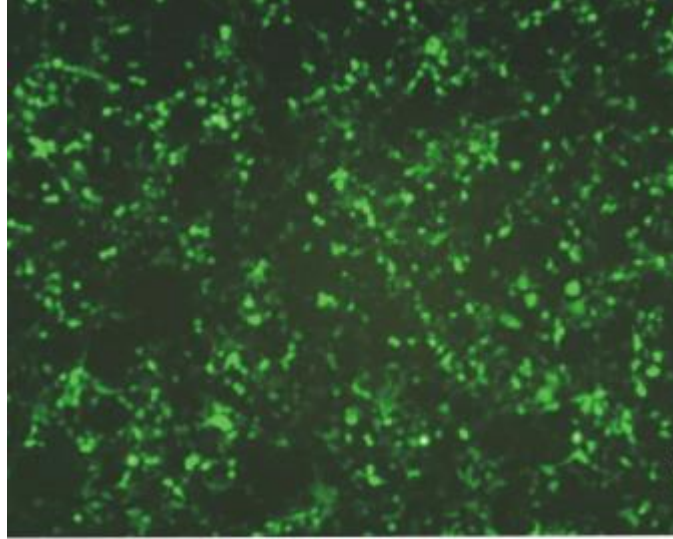
2 milyon Flp-In™ T-REx™ 293 hücresi 75 cm² Hücre Kültürü Şişesine ekilir, DMEM ortamında (10% v/v FBS and 4 mM L-alanyl-L-glutamine, %1 Penicillin/Streptomycin).

16. Saat: Transfeksiyon

1. Opti-MEM™ Azaltılmış Serum Ortamından iki tane steril santrifüj tüpüne 250 mikrolitre eklenir. İlk tüp Lipofectamine™ 3000 Reaktifi, ikinci tüp P3000™ Reaktifi olarak etiketlenir.
2. Lipofectamine™ 3000 Reaktif etiketli tüpe 10 mikrolitre Lipofectamin eklenir ve iyice vortekslenir.
3. P3000™ Reaktifi etiketli tüpe FRT_lentiviral proteinler plazmidinden 7,5 mikrogram, NF-kB biyosensörü transgen plazmidinden 10 mikrogram eklenir ve iyice vortekslenir.
4. DNA eklenmiş P3000™ Reaktifi etiketli tüpe 15 mikrolitre P3000™ Reaktifi eklenir ve iyice vortekslenir.
5. P3000™ Reaktifi etiketli tüp, Lipofectamine™ 3000 Reaktif etiketli tüpe eklenir ve iyice vortekslenir.
6. Oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilir.
7. Flp-In™ T-REx™ 293 hücrelerine damla damla verilir.

24. Saat: DMEM ortamı değiştirilir, taze DMEM verilir. Bu basamakta 1 mililitreye DMEM' me 1 mikrogram doksisiklin olacak şekilde 10 mililitreye DMEM' me 100 mikrogram doksisiklin eklenir.

48. saat: Medyum değiştirmeden DMEM' me 100 mikrogram doksisiklin daha eklenir.



Şekil 3.21 NF-kB biyosensörü ifadesi, Transfeksiyondan 36 saat sonraki Flp-In™ T-REx™ 293 hücre hattının görüntüsü

88.saat: Lentivirüs içeren medyum toplanır, hücre kalıntılarından kurtulmak için 500 rpm' de 10 dk santrifüjlenir.

3.2.13.1.2 Saf virüs eldesi

1. 88 saat sonrasında elde edilmiş 10 mililitre virüslü medyuma, 3.5 mililitre PEG konsantreedici eklenir, pipetleme yapıp, homojen bir görüntü elde edilir.
2. Virüs çözeltisi gece boyunca soğuk odada 100 rpm' de çalkalanır.
3. Ertesi gün 1,500 x' de 1 saat santrifüjlenir, üst kısım atılır, sadece pellet kalmasına özen gösterilir.
4. Pellet 200 mikrolitre Opti-MEM™ Azaltılmış Serum Ortamıyla resüspanse edilir. Konsantre virüs ya DMSO' lu ortamda -80' de saklanır, ya da hızlıca akıştaki deneylerde kullanılır.

3.2.13.1.3 NF-kB biyosensörünün Jurkat (T hücresi) hücre hattına transdüksiyonu

3.2.11.1.2 basamakta elde edilmiş yoğunlaştırılmış virüsler, altı oyuklu hücre kültürü plakalarına spinokülasyon tekniği ile transdüksiyon yapılır.

Spinokülasyon: 200 mikrolitre Opti-MEM™ Azaltılmış Serum Ortamındaki virüse 20 mikrogram Polybrene eklenir ve pipetaj yapılır. Yaklaşık 500 bin jurkat hücresi, virüs çözeltisine eklenir, nazikçe ve iyice pipetaj yapılır. Virüs çözeltisi, 2 ml RPMI (10% v/v FBS and 4 mM L-alanyl-L-glutamine, %1 Penicillin/Streptomycin) ortamında altı oyuklu plakaya ekilir. 1950 xg'de 1 saat spinoküle edilir, sonrasında plaka 37 derece CO₂ inkübatörüne alınır. 16 saat sonra virüslü medyum taze RPMI medyumunu ile değiştirilir.

3.2.13.1.4 NF-kB biyosensörü entegre Jurkat (T hücresi) seçilimi

0. Gün: Transdüksiyon

6.3.3.1.3. Basamakta anlatılmıştır.

16. Saat: 16 saat sonra virüslü medyum taze RPMI medyumunu ile değiştirilir.

48. Saat: Medyum taze RPMI medyumunu ile değiştirilir.

72.saat: İlk seçim.

Antibiyotik seçilimi uygulanmıştır. Addgene 19319 plazmidi puromisin antibiyotikine karşı dirençlidir. Düşük kopya seçilimi olduğundan düşük miktarda antibiyotikle seçim, uygulanır. 1 mililitre RPMI ortamına 1 mikrogram olacak şekilde ortama puromisin eklenir.

5. Gün: Medyum, puromisin içeren RPMI ile değiştirilir.

7. Gün: Medyum, puromisin içeren RPMI ile değiştirilir.

9. Gün: Medyum, puromisin içeren RPMI ile değiştirilir.

11. Gün: Medyum, puromisin içeren RPMI ile değiştirilir.

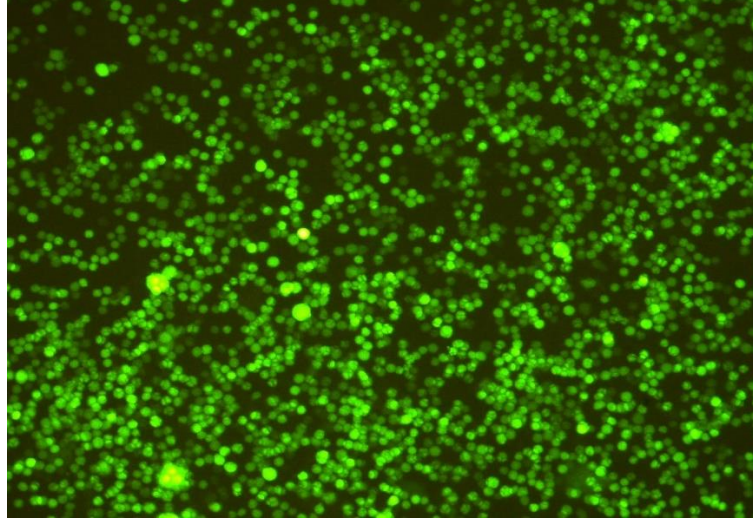
13.Gün: Medyum, taze RPMI ile değiştirilir ve yaklaşık 10 gün beklenir, bu süre zarfında sadece 2 ya da 3 kez medyum taze RPMI ile değiştirilir.

25. Gün: Yaklaşık 10 gün sonra hücreler kendini toparlar ama tamamen kararlı şekilde nf_Kb ifade etmezler. O yüzde 2 gün arayla tekrardan puromisin seçilimi başlatılır. Medyum, puromisin içeren RPMI ile değiştirilir.

27.Gün: Medyum, puromisin içeren RPMI ile değiştirilir.

29.Gün: Medyum, puromisin içeren RPMI ile değiştirilir.

31.Gün: Medyum, taze RPMI ile değiştirilir. 10-15 gün, 2-3 gün arayla medyumunu değiştirilir ve sonunda kararlı nf_Kb jurkat hücre hatları elde edilir.



Şekil 3.22 Jurkat hücre hattında NF-kB biyosensörü ifadesi kararlı ifadesi

NF-kB biyosensörü ifadesi kararlı ifadesi, Yaklaşık 45 Günlük seçilimden sonra oluşturulmuş nf_Kb hücre hattı. Promotor nf_Kb minimal promotörüdür, normal şartlar altında ifade vermez, bir antijen varlığında ya da kimyasal uyarımla ifade verir. Görselde stabilizasyonun başarısını test etmek için, nf_Kb jurkatlar 8 saat süreyle 100 nanogram Phorbol 12-miristat 13-asetat (PMA)'la uyarılmıştır.

3.2.13.2 dPspCas13b ve huADAR2 Flp-In™ T-REx™ 293 hücre hattına entegrasyonu

Flp-In™ T-REx™ 293 Hücre Hattında hem lentiviral proteinler, hemde dPspCas13b, huADAR2 proteinleri kararlı olarak ifade verecek şekilde tasarlanmıştır. dPspCas13b ve huADAR2 proteinleri rastgele kararlı hale getirilecektir, lakin FRT_egov_vHvL_ lentiviral proteinler plazmidi tek kopya olarak genoma bütünleştirilmiştir.

3.2.13.2.1 Addgene 103864 plazmidinin PvuI-HF ile yapışkan uçlu doğrusallaştırılması

Addgene 103864 plazmidi, dPspCas13b ve huADAR2 proteinlerinin dizilerini içerir, PvuI ile kesimi sonucu yapışkan uç oluşturur. Burada yapışkan ucun önemi, kararlı hücre hattını oluştururken tamamen rastgele şans eseri durumundan kurtarmaktır, çünkü PvuI, ifadesi istenen proteinlerin dışındaki bir diziden kesim yapar, aynı zamanda yapışkan uç, entegrasyonu kısmende olsa yönlendirir.

Addgene 103864 plazmidi PvuI kesimi,

İçerik	Miktar
Addgene 103864 plazmidi	20 mikrogram
rCurSmart tamponu	5 mikrolitre
NEB PvuI-HF enzimi	1 mikrolitre

Nukleaz içermeyen suyla 0.2 mililitre polimeraz zincir reaksiyonu tüpünde 50 mikrolitreye tamamlanır.

37 derecede gece boyu inkübe edilir.

3.2.13.2.2 Addgene_103864_PvuI dizilerinin temizlenmesi

1. Ürünün üstüne 300 mM NaCl (20 ul) eklenir ve pipetaj yapılır. Pipetajdan sonra 2,5 volum saf etanol (125 ul) eklenir.
2. Bir saat boyunca -20 bekletilir.
3. Soğutmalı santrifüjde 12000 rpm'de 20 dakika santrifüjlenir.
4. Süpernatant aspire edilir, pellet %70'lik etanolle yıkanır.
5. 12000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenir.
6. 3 dakika oda koşullarında kurutulur.
7. 20 ul nukleazfree suyla çözündürülür.
8. Nanodropla ölçülür.

3.2.13.2.3 Addgene_103864_PvuI dizilerinin Flp-In™ T-REx™ 293 hücre hattına transfeksiyonu

1. Opti-MEM™ Azaltılmış Serum Ortamından iki tane steril santrifüj tüpüne 250 mikrolitre eklenir. İlk tüp Lipofectamine™ 3000 Reaktifi, ikinci tüp P3000™ Reaktifi olarak etiketlenir.
2. Lipofectamine™ 3000 Reaktif etiketli tüpe 10 mikrolitre Lipofectamin eklenir ve iyice vortekslenir.
3. P3000™ Reaktifi etiketli tüpe Addgene_103864_PvuI dizilerinden 15 mikrogram eklenir ve iyice vortekslenir.
4. DNA eklenmiş P3000™ Reaktifi etiketli tüpe 15 mikrolitre P3000™ Reaktifi eklenir ve iyice vortekslenir.
5. P3000™ Reaktifi etiketli tüp, Lipofectamine™ 3000 Reaktif etiketli tüpe eklenir ve iyice vortekslenir.
6. Oda sıcaklarında 15 dakika inkübe edilir.
7. Flp-In™ T-REx™ 293 hücrelerine damla damla verilir.

3.2.13.2.4 Addgene_103864_PvuI Flp-In™ T-REx™ 293 Hücre Hattının Seçilimi

0. Gün: Hücre ekimi

1 milyon Flp-In™ T-REx™ 293 hücresi 75 cm² Hücre Kültürü Şişesine ekilir, DMEM ortamında (10% v/v FBS and 4 mM L-alanyl-L-glutamine, %1 Penicillin/Streptomycin).

16. Saat: Transfeksiyon

6.3.3.2.3. Basamağında anlatılmıştır.

48. Saat: Medyum taze DMEM medyumu ile değiştirilir.

72.saat: İlk seçim.

Antibiyotik seçilimi uygulanmıştır. Addgene 103864 plazmidi NeoR/KanR dizilerini içermektedir, bundan kaynaklı G418 antibiyotiğine karşı dirençlidir. Düşük kopya seçilimi olduğundan düşük miktarda antibiyotikle seçim, uygulanır. 1 mililitre DMEM ortamına 1 mikrogram olacak şekilde ortama G418 eklenir.

5. Gün: Medyum, G418 içeren DMEM ile değiştirilir.

7. Gün: Medyum, G418 içeren DMEM ile değiştirilir.

9. Gün: Medyum, G418 içeren DMEM ile değiştirilir.

11. Gün: Medyum, G418 içeren DMEM ile değiştirilir.

13.Gün: Medyum, taze DMEM ile değiştirilir ve yaklaşık 10 gün beklenir, bu süre zarfında sadece 2 ya da 3 kez medyum taze DMEM ile değiştirilir.



Şekil 3.23 Flp-In™ T-REx™ 293 Addgene_103864_PvuI kolonisi

Flp-In™ T-REx™ 293 Addgene_103864_PvuI kolonisi, Flp-In™ T-REx™ 293 Hücreleri tutunan hücrelerdir. 23.günün sonunda görseldeki gibi kararlı koloniler oluşur. Sarı halka içine alınmış koloni seçilmiştir.

35. Gün: Yaklaşık 10 gün sonra hücreler kendini toparlar ama tamamen kararlı şekilde Addgene_103864_PvuI ifade etmezler. Bundan dolayı 2 gün arayla tekrardan G418 seçilimi tekrardan başlatılır. Medyum, G418 içeren DMEM ile değiştirilir.

37.Gün: Medyum, G418 içeren DMEM ile değiştirilir.

39.Gün: Medyum, G418 içeren DMEM ile değiştirilir.

41.Gün: Medyum, taze DMEM ile değiştirilir. 10-15 gün, 2-3 gün arayla medyumunu değiştirilir ve sonunda kararlı Addgene_103864_PvuI hücre hatları elde edilir.

3.2.13.3 FRT_ebov_vHvL_Lentiviral proteinlerin Flp-In™ T-REx™ 293 hücre hattına entegrasyonu

3.2.11.5.6 Basamakta SLICE klonlaması sonucu elde edilen FRT_ebov_vHvL_Lentiviral proteinleri plazmidi FRT homoloji dizilerini içerir (Flp-In Sisteminin üç ana bileşeninden biridir), Flp-In™ T-REx™ 293 hücre hattı da FRT homoloji dizilerini içerir (Flp-In Sisteminin üç ana bileşeninden biridir). Bu diziler, plazmidi tek kopya olarak Flp-In™ T-REx™ 293 hücre hattına rekombinasyon yoluyla özgül bir bölgeye entegrasyonu sağlar (Craig vd. 1988, Sauer vd. 1994),

Flp-In Sisteminin üçüncü ana bileşeninden diğeri, insan CMV promotörünün kontrolü altında Flp rekombinazını ifade eden pOG44 plazmididir (Broach vd. 1982, Broach ve Hicks 1980, Buchholz vd. 1996).

İlgili geni içeren FRT vektörü, pOG44 plazmidi ve Flp-In™ T-REx™ 293 hücre hattına birlikte transfekte edilir. Birlikte transfeksiyon üzerine, pOG44'ten eksprese edilen Flp

rekombinaz, FRT bölgeleri (Flp-In™ T-REx™ 293 hücre hattında genom içinde ve FRT vektöründe) arasında homolog rekombinasyon olayına aracılık eder, böylece FRT yapısı, Flp-In™ T-REx™ 293 hücre hattında ki entegre FRT bölgesine yerleşir.

Bu sistemin sağladığı en önemli avantajlardan bir tanesi tek kopya olarak genleri ifade ettirebilmektir, bunun için zarif bir strateji işlenmiştir. Flp-In™ T-REx™ 293 hücre hattında FRT homoloji bölgesinin 5' ucunda SV40 promotörü ve bağlanıç kodonun dizisi olan ATG vardır, FRT_ebov_vHvL_Lentiviral proteinleri plazmidinde ise FRT rekombinasyon bölgesinin 3' ucunda higromisin dizisi vardır ve 5' ucunda bir promotor yoktur. FRT_ebov_vHvL_Lentiviral proteinleri sadece rekombinasyonla genoma entegre olursa higromisin dizisi ifade edilecek ve higromisin antibiyotiğini parçalayacaktır. FRT_ebov_vHvL_Lentiviral proteinleri rekombinasyondan farklı bir yöntemle genoma entegre olsa dahi higromisini dizisini ifade edemez ve higromisin varlığında direnç gösteremeyip elimine olurlar.

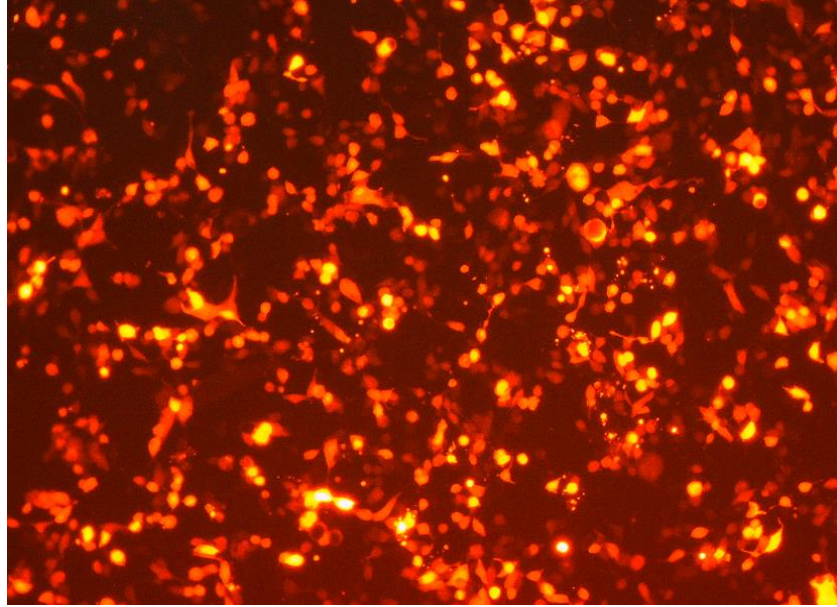
3.2.13.3.1 FRT_ebov_vHvL_Lentiviral proteinleri plazmidi ve pOG44 plazmidinin addgene_103864_PvuI_Flp-In™ T-REx™ 293 hücre hattına transfeksiyonu

3.2.13.2.4 basamağında dPspCas13b ve huADAR2 proteinlerini kararlı ifade eden Addgene_103864_PvuI Flp-In™ T-REx™ 293 hücre hattı elde edilmiştir. Bu hücre hattına tek kopya olarak FRT_ebov_vHvL_Lentiviral proteinleri entegre edilir.

1. Opti-MEM™ Azaltılmış Serum Ortamından iki tane steril santrifüj tüpüne 250 mikrolitre eklenir. İlk tüp Lipofectamine™ 3000 Reaktifi, ikinci tüp P3000™ Reaktifi olarak etiketlenir.
2. Lipofectamine™ 3000 Reaktif etiketli tüpe 3 mikrolitre Lipofectamin eklenir ve iyice vortekslenir.
3. P3000™ Reaktif etiketli tüpe FRT_ebov_vHvL_Lentiviral proteinleri plazmidinden 1,800 nanogram eklenir, pOG44 plazmidinin 300 nanogram eklenir ve iyice vortekslenir.
4. DNA eklenmiş P3000™ Reaktif etiketli tüpe 5 mikrolitre P3000™ Reaktif eklenir ve iyice vortekslenir.

5. P3000™ Reaktif etiketli tüp, Lipofectamine™ 3000 Reaktif etiketli tüpe eklenir ve iyice vortekslenir.
6. Oda sıcaklarında 15 dakika inkübe edilir.
7. Flp-In™ T-REx™ 293 hücrelerine damla damla verilir.

Not: pOG44 plazmidi oldukça toksiktir, bundan dolayı oldukça düşük miktarda transfeksiyonu yapılır. FRT_ebov_vHvL_Lentiviral proteinleri plazmidi: pOG44 plazmidi oranı 6:1 aşmamasına özen gösterilmiştir (tek kopya girmesi için bu oran önemlidir).



Şekil 3.24 FRT_ebov_vHvL_Lentiviral proteinleri plazmidinin mRuby ifadesi

3.2.13.3.2 FRT_ebov_vHvL_Lentiviral proteinleri Addgene_103864_PvuI Flp-In™ T-REx™ 293 hücre hattının seçilimi

0. Gün: Hücre ekimi

1 milyon Addgene_103864_PvuI Flp-In™ T-REx™ 293 Hücre Hattı 75 cm² Hücre Kültürü Şişesine ekilir, DMEM ortamında (10% v/v FBS and 4 mM L-alanyl-L-glutamine, %1 Penicillin/Streptomycin).

16. Saat: Transfeksiyon

6.3.3.3.1. basamağında anlatılmıştır.

48. Saat: Medyum taze DMEM medyumu ile değiştirilir.

72.saat: İlk seçilim.

Antibiyotik seçilimi uygulanmıştır. FRT vektörü higromisin dizisi içerir ve higromisin antibiyotiğine karşı dirençlidir. Düşük kopya seçilimi olduğundan düşük miktarda antibiyotikle seçilim, uygulanır. 1 mililitre DMEM ortamına 1 mikrogram olacak şekilde ortama higromisin eklenir.

5. Gün: Medyum, higromisin içeren DMEM ile değiştirilir.

7. Gün: Medyum, higromisin içeren DMEM ile değiştirilir.

9. Gün: Medyum, higromisin içeren DMEM ile değiştirilir.

11. Gün: Medyum, higromisin içeren DMEM ile değiştirilir.

13.Gün: Medyum, taze DMEM ile değiştirilir ve yaklaşık 10 gün beklenir, bu süre zarfında sadece 2 ya da 3 kez medyum taze DMEM ile değiştirilir.



Şekil 3.25 FRT_ebov_vHvL_Lentiviral proteinleri Addgene_103864_PvuI Flp-In™ T-REx™ 293 kolonisi

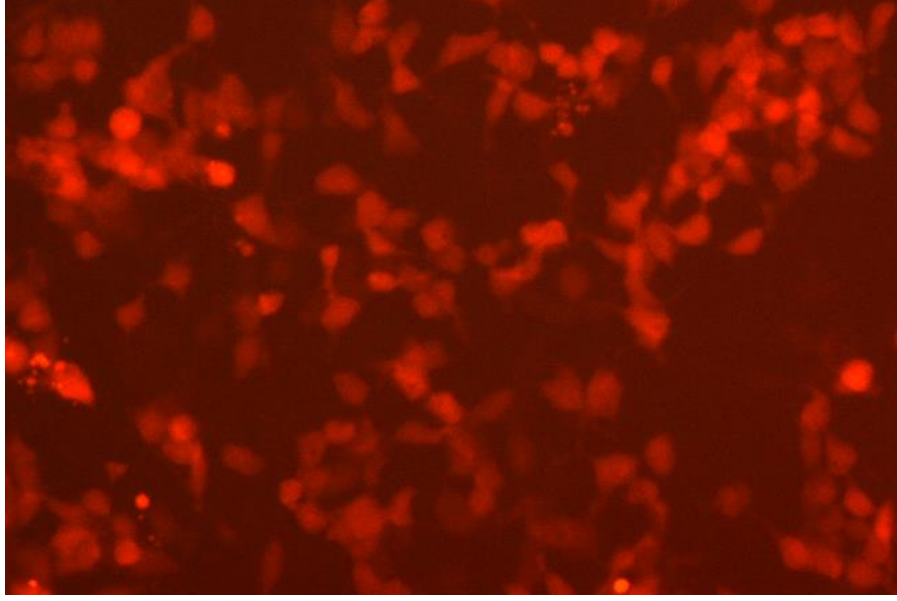
FRT_ebov_vHvL_Lentiviral proteinleri Addgene_103864_PvuI Flp-In™ T-REx™ 293 kolonisi, Flp-In™ T-REx™ 293 Hücreleri tutunan hücrelerdir. 23.günün sonunda görseldeki gibi kararlı koloniler oluşur. Sarı halka içine alınmış koloni seçilmiştir.

35. Gün: Yaklaşık 10 gün sonra hücreler kendini toparlar ama tamamen kararlı şekilde FRT_ebov_vHvL_Lentiviral proteinleri ifade etmezler. O yüzde 2 gün arayla tekrardan higromisin seçilimi başlatılır. Medyum, higromisin içeren DMEM ile değiştirilir.

37.Gün: Medyum, higromisin içeren DMEM ile değiştirilir.

39.Gün: Medyum, higromisin içeren DMEM ile değiştirilir.

41.Gün: Medyum, taze DMEM ile değiştirilir. 10-15 gün, 2-3 gün arayla medyumu değiştirilir ve sonunda kararlı FRT_ebov_vHvL_Lentiviral proteinleri_Addgene_103864_PvuI Flp-In™ T-REx™ 293 Hücre hattı elde edilir.



Şekil 3.26 FRT_ebov_vHvL_Lentiviral proteinleri Addgene_103864_PvuI Flp-In™ T-REx™ 293 hücrelerinin kararlı ifadesi

3.2.13.4 Antijen ifadeleyen hücreler

Kırım-Kongo kanamalı ateşi (KKKA) glikoproteinleri hedeflenmiştir. Kırım-Kongo kanamalı ateşi (KKKA) vakaları Afrika, Rusya, Balkanlar, Orta Doğu ve Asya'yı kapsayan geniş bir coğrafyada görülmektedir. Kırım-Kongo kanamalı ateşi (KKKA) viral bir hastalıktır. KKKA belirtileri ateş, kas ağrıları, baş ağrısı, kusma, ishal ve deride kanamayı içerebilir. KKKA virüsü tipik olarak kene ısırıkları veya enfekte kişi veya hayvanların kanı, salgıları, organları veya diğer vücut sıvıları ile yakın temas yoluyla yayılır. Enfeksiyon riski yüksek olan gruplar çiftçiler ve mezbahalarda çalışanlardır. Virüs ayrıca insanlar arasında vücut sıvıları yoluyla da yayılabilir. Tipik olarak virüsün endemik olduğu bölgelerde küçük salgınlar görülebiliyor. 2013 yılında İran, Rusya, Türkiye ve Özbekistan 50'den fazla vakayı belgelendi. Ölüm oranı tipik olarak %10 ile %40 arasındadır, ancak bazı salgınlarda %80'e varan ölüm oranları gözlemlenmiştir. Antikorların, virüsün RNA'sının veya viral proteinlerin (antijenlerin) saptanmasıyla tanı konulabilir. KKKA için FDA veya DSÖ onaylı tedaviler mevcut değildir ve ticari olarak bir aşı da mevcut değildir (Berger vd 2017).

Genom üç parçadan oluşan dairesel, negatif anlamlı RNA'dır: Küçük (S), Orta (M) ve Büyük (L). L segmenti RNA polimerazı kodlar, M segmenti zarf glikoproteinlerini (Gc ve Gn) kodlar ve S segmenti nükleokapsid proteinini kodlar (Carter vd. 2012).

dPspCas13b ile CAR yapısına yerleştirilmiş ebov_vHvL dizisinin vH kısmını hedef alır. Düzenleme ile oluşturulan varyantlar Kırım-Kongo kanamalı ateşi (KKKA) genomunun M segmentinden ifade edilen zarf glikoproteinlerini (Gc ve Gn) hedef alınır.

M_Fall plazmidinde kodlu olan, KKKA genomunun M segmenti Flp-In™ T-REx™ 293 Hücre Hattında ifade edilir. (M_Fall Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Viroloji BD BSL3 Laboratuvarından temin edilmiştir).

3.2.13.4.1 M_Fall plazmidi, KKKA genomunun M segmentinin Flp-In™ T-REx™ 293 hücre hattına transfeksiyonu

1. Opti-MEM™ Azaltılmış Serum Ortamından iki tane steril santrifüj tüpüne 250 mikrolitre eklenir. İlk tüp Lipofectamine™ 3000 Reaktif, ikinci tüp P3000™ Reaktif olarak etiketlenir.
2. Lipofectamine™ 3000 Reaktif etiketli tüpe 10 mikrolitre Lipofectamin eklenir ve iyice vortekslenir.
3. P3000™ Reaktif etiketli tüpe M_Fall plazmitinden 12 mikrogram eklenir ve iyice vortekslenir.
4. DNA eklenmiş P3000™ Reaktif etiketli tüpe 15 mikrolitre P3000™ Reaktif eklenir ve iyice vortekslenir.
5. P3000™ Reaktif etiketli tüp, Lipofectamine™ 3000 Reaktif etiketli tüpe eklenir ve iyice vortekslenir.
6. Oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilir.
7. Flp-In™ T-REx™ 293 hücrelerine damla damla verilir.

3.2.14 dPspCas13 aktivasyonu

3.2.13.2.4 basamağında elde edilen FRT_ebov_vHvL_Lentiviral proteinleri_Addgene_103864_PvuI Flp-In™ T-REx™ 293 Hücre Hattında dPspCas13 aktivasyonu test edilmiştir. Testin ana amacı, varyantların en iyi geri kazanımını irdelemektir. Altı oyuklu plakaya 400 bin FRT_ebov_vHvL_Lentiviral proteinleri_Addgene_103864_PvuI Flp-In™ T-REx™ 293 Hücrelerinden ekilir, DMEM ortamında. 16 saat sonra 4 ul lipofektamin3000 (Invitrogen) ile 4 mikrogram dejenere crRNA ve doğrudan tekrar RNA'sı Opti-MEM™ Azaltılmış Serum Ortamında 15 dakika inkübe edilip hücelere verilir.

Altı oyuklu plakanın her oyuğuna 400 bin gücre eklenir, her oyuğa 4 mikrogram dejenere crRNA ve doğrudan tekrar RNA verilir, transfeksiyondan 2 saat, 8 saat, 16 saat, 24 saat, 48 saat ve 72 saat boyunca düzenlenen hücreler toplanmıştır ve düzenlenen RNA izole edilmiştir.

3.2.14.1 dPspCas13 ile düzenlenen hücrelerden RNA izolasyonu

1. 6 oyuklu plakadan hücreler toplanır ve Monarch® Toplam DNA/RNA Ekstraksiyonu (NEB #T2011) kitiyle izole edilir.
2. 600 ul ile RNA Lizis Tamponu eklenir ve pipetleme yapılır, hücreler resüspanse edilir. Örnekleri buza koymayınız.
3. Kit iki tane kolon içerir, biri DNA'yı tutar (açık mavi kolon), diğeri ise RNA'yı tutar (koyu mavi).
4. Tüm örnek açık mavi kolondan geçirilir, DNA kolonda kalır, RNA aşağı akışta kalır.
5. Aşağı akışta kalan RNA'ya eşit hacimde saf etanol eklenir, 30 dakika -20 derecede inkübe edilir.
6. Bu çözelti koyu mavi kolona yüklenir ve 16,0000 xg'de 30 saniye boyunca santrifüjlenir.

7. Sonra 500 µl Wash Buffer ile yıkanır, 16,0000 xg'de 1 dakika boyunca.
8. RNase içermeyen bir mikrosantrifüj tüpünde, 5 µl DNase I'i 75 µl DNase I Reaksiyon Tamponu ile birleştirilir ve doğrudan kolona damlatılır oda koşullarında 15 dakika inkübe edilir.
9. 500 µl Priming Buffer eklenir ve 16,0000 xg'de 1 dakika boyunca.
10. 500 µl RNA Yıkama Tamponu eklenir ve 16,0000 xg'de 30 saniye boyunca santrifüjlenir.
11. 500 µl RNA Yıkama Tamponu eklenir ve 16,0000 xg'de 2 dakika boyunca santrifüjlenir.
12. Koyu mavi kolona 100 mikrolitre DEPC ile artılmış su eklenir, 16,0000 xg'de 30 saniye boyunca santrifüjlenir.
13. Nanodropla RNA kalitesi ve miktarı kontrol edilir.

3.2.14.2 dPspCas13 ile hücrelerden izole edilmiş düzenlenmiş RNA'lardan cDNA elde edilmesi

Tasarlanan CRISPR'ın hedefi mRNA (vH kısmı) molekülüdür, bundan dolayı düzenleme verimliliğini test etmek için RNA önce cDNA'ya, cDNA ise polimeraz zincir reaksiyonu ile çift zincirli DNA molekülü haline getirilir.

cDNA, Thermo Scientific RevertAid İlk zincir cDNA Sentez Kitiyle elde edilir.

cDNA sentezi: Kitin bileşenlerini çözündürün kısaca vorteksleyin sonra, kısaca santrifüjleyiniz. Buz üzerinde tutunuz.

1. Aşağıdaki gibi reaktifleri buz üzerindeki steril, nükleaz içermeyen bir tüpe belirtilen sırayla ekleyiniz:

Çizelge 3.9 cDNA primeri ve düzenlenmiş RNA miktarı

Şablon RNA'sı	Total RNA	1 mikrogran
seq ruby R: 5'aaggcattaaagcagcg3'	Gene özgü primer	20 pikamol

Nükleaz içermeyen suyla 13 miktolitreye tamamlanır.

RNA şablonu GC açısından zenginse veya ikincil yapılarını bozmak adına, 65°C'de 5 dakika inkübe edilir. Buz üzerinde soğutulur, kısa bir santrifüj.

2. Soğutulan çözeltinin üzerine aşağıdaki bileşenleri belirtilen sıraya göre ekleyiniz:

Çizelge 3.10 cDNA Kit İçeriği

5X Reaksiyon Tamponu	4 mikrolitre
10 mM dNTP Karışımı	2 mikrolitre
RevertAid M-MuLV RT (200 U/μL)	1 mikrolitre
Total hacim	20 mikrolitre

Yavaşça karıştırın ve kısa süre santrifüjleyiniz.

Gene özgü cDNA sentezi için 42°C'de 60 dakika inkübe edilir.

Çözeltiyeye RNaseH ve RNaseA ekleyin, sırasıyla 0,3 mikrolitre 37 derecede 30 dakika inkübe edilir.

Çözelti içindeki enzimler 70 derecede 5 dakika inkübe edilip aktiviteleri kaybettirilir.

3.2.14.3 Varyant havuzunu oluşturan cDNA'lar polimeraz zincir reaksiyonuyla çift iplikli DNA elde edilir

3.2.6 protokole uygun Q5® Yüksek Kaliteli DNA Polimeraz (M0491) ile Polimeraz zincir reaksiyonu yöntemini kullanılarak RNA'nın düzenlenmiş bölgeleri çoğaltılır. Reaksiyon seqvHvL_F: 5'ggctetcaacttattccc' seqvHvL_R: 5'ccctcgtgtgcactgcg3' primerleri ile yapışma sıcaklığı (TM) 64 derece olan, uzama süresi 30 saniyeyle olan şartlarda 10 döngü boyunca termal döngü cihazında çoğaltılır.

Bu basamaktaki önemli notlardan bir tanesi tüm cDNA ürünün kullanılması ve düşük döngüde ürün elde edilmesidir, bu şartlar popülasyondaki varyant durumunun muhafaza etmek için önemlidir.

3.2.14.4 Varyant havuzunun niteleyici tayini (NEB T7 Endonükleaz I)

T7 Endonükleaz I, DNA'da ki yanlış baz eşleşmelerini tanır ve keser, hedef alınan RNA bölgesinde baz düzenlemeleri olacaktır. Bu RNA'ları DNA'ya çevirip, heterodimerize ettiğimizde, baz düzenlenmesi olan bölgelerde şablonla yanlış baz eşleşmesi olacaktır, bu bölgeleri hedef alarak T7 Endonükleaz I sayesinde düzenleme verimliliği kalitatif olarak tayin edilir.

Aşağıda ki işlemler 7. basamaktaki belirlenen tüm saatler için yapılmıştır.

1. Heterodimerizasyon: Heterodimerizasyon termal döngüde enzimsiz bir şekilde yapılır. İçeriği aşağıdaki gibidir.

Çizelge 3.11 Heterodimerizasyon içeriği

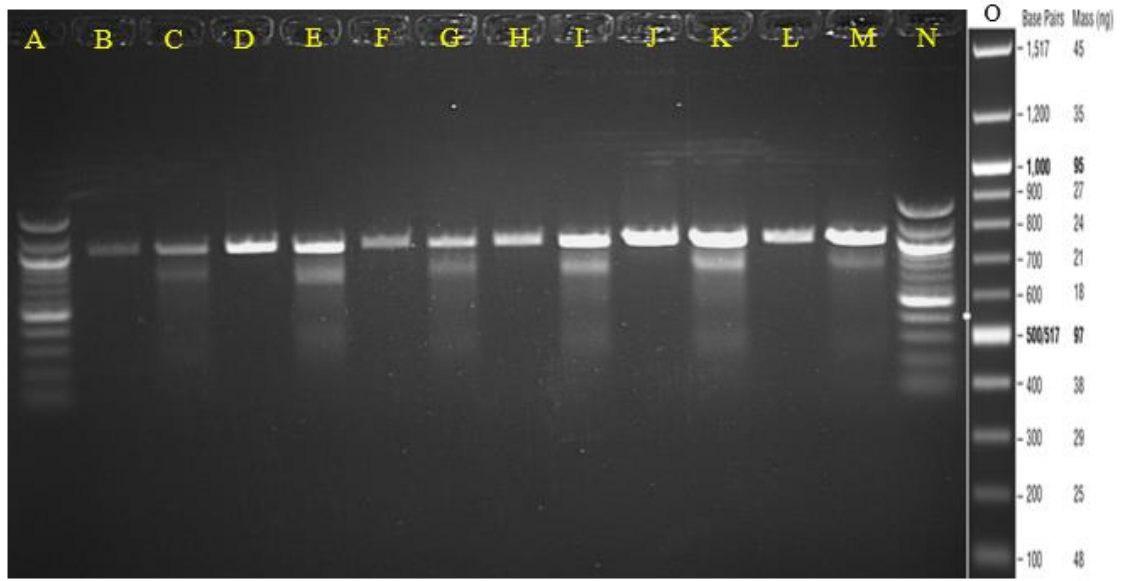
İçerik	Miktar
Düzenlenmiş DNA	200 ng
10X NEBuffer 2	2 ul
Nükleaz içermeyen Su	19 ul'lik reaksiyon

Çizelge 3.12 Heterodimerizasyon şartları

Basamaklar	Sıcaklık	RAMPA ORANI (RAMP RATE)	Zaman
Başlangıç denatürasyonu	95°C		5 dk
Bağlanma	95-85°C	-2°C/second	
Bağlanma	85-25°C	-0.1°C/second	
∞	4°C		∞

Çizelge 3.13 T7E1 inkübasyonu

İçerik	Reaksiyon
Heterodimerize edilmiş ürün	19 ul
T7E1	1 ul
İnkübasyon süresi	25 dk
İnkübasyon sıcaklığı	37°C

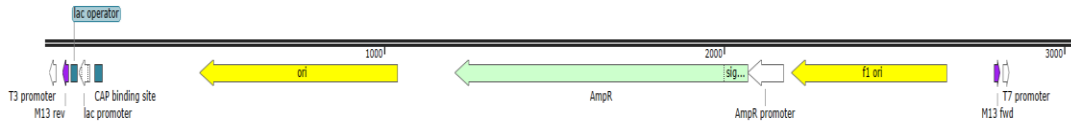


Şekil 3.27 Altı oyuklu plakada 2 saat, 8 saat, 16 saat, 24 saat, 48 saat ve 72 saat boyunca düzenlenen RNA'nın düzenleme verimliliği

Altı oyuklu plakada 2 saat, 8 saat, 16 saat, 24 saat, 48 saat ve 72 saat boyunca düzenlenen RNA'nın düzenleme verimliliği. Beklenildiği gibi bağlanıçta ve son saatlere doğru düzenleme verimliliği düşmektedir. A-N-O- NEB 100 bp DNA merdivenidir. B- 2 saat sonucundaki düzenlemenin negatif kontrolü, C- 2 saat sonucundaki düzenleme verimliliği sonucudur. D- 8 saat sonucundaki düzenlemenin negatif kontrolü, E- 8 saat sonucundaki düzenleme verimliliği sonucudur. F- 16 saat sonucundaki düzenlemenin negatif kontrolü, G- 16 saat sonucundaki düzenleme verimliliği sonucudur. H- 24 saat sonucundaki düzenlemenin negatif kontrolü, I- 24 saat sonucundaki düzenleme verimliliği sonucudur. J- 48 saat sonucundaki düzenlemenin negatif kontrolü, K- 48 saat sonucundaki düzenleme verimliliği sonucudur. L- 72 saat sonucundaki düzenlemenin negatif kontrolü, M- 72 saat sonucundaki düzenleme verimliliği sonucudur.

3.2.14.5 Varyant havuzunun niceleyici tayini (Sanger dizilemesi)

3.2.14.3. basamağında elde edilen düzenlenmiş cDNA'lar düşük döngüde polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılır. Polimeraz zincir reaksiyonu şartları 3.2.6. basamaktaki Q5® Yüksek Kaliteli DNA Polimerazla, seq_editF: 5'ACAAGGCAAGGCTTGACCGACggtatcaagatgaagtccc3', seq_editR: 5'ACTAAAGGGAACAAAAGCTGGtactgggggtgcagtgg3' TM: 55 derece ve uzama sıcaklığı süresi 8 saniye olacak şekilde çoğaltılır (kırmızı diziler homoloji bölgesidir). Varyant havuzunu korumak amacıyla ürünler düşük döngüde elde edilmiştir. Varyant havuzu, 3.2.8. basamağında anlatılan SLICE özü protokolü ile küçük bakteriyel ampisilinli vektöre klonlanır.

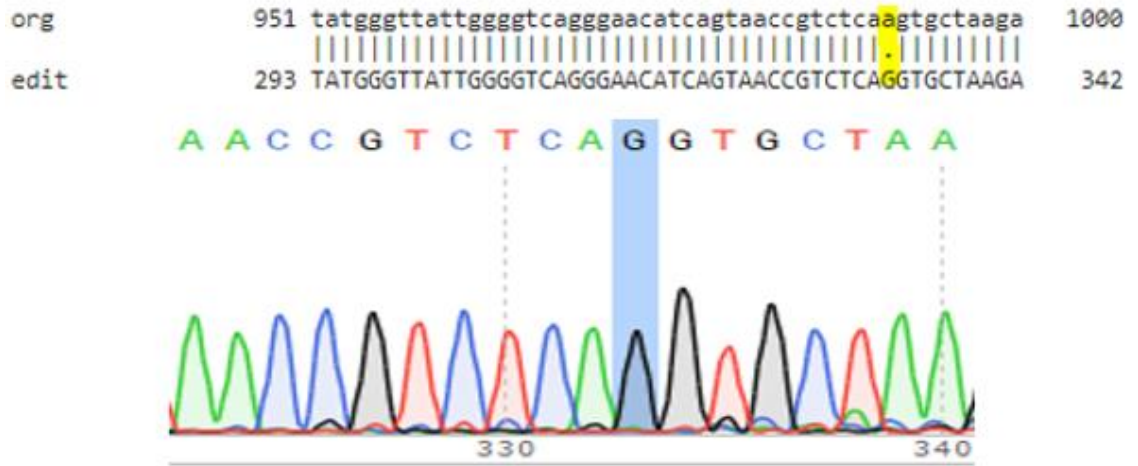


Şekil 3.28 Küçük bakteriyel ampisilinli vektör

Bu klonlardan 20 tanesi rastgele seçilir ve Sanger dizilemeye gönderilir. 10 uM Sekans_PrimeriF: 5'cctctgactttcgggtgccg3' primeri ile 3000 ng DNA olacak şekilde dizilenir.

Sanger sonuçları:

1. Varyant: CAR (vH) yapısındaki 140. aminoasit, 5'AGT3' kodlu serin aminoasitinden, 5'GGT3' kodlu glisine dönüşmüştür.



Şekil 3.29 Birinci varyant

2.Varyant: CAR (vH) yapısındaki,

68. aminoasit, 5'CTA3' kodlu lösin aminoasitinden, 5'CTG3' kodlu lösine dönüşmüştür.

86. aminoasit, 5'CAA3' kodlu glutamin aminoasitinden, 5'CAG3' kodlu glutamine dönüşmüştür.

94. aminoasit, 5'TCA3' kodlu serin aminoasitinden, 5'TCG3' kodlu glisine dönüşmüştür.

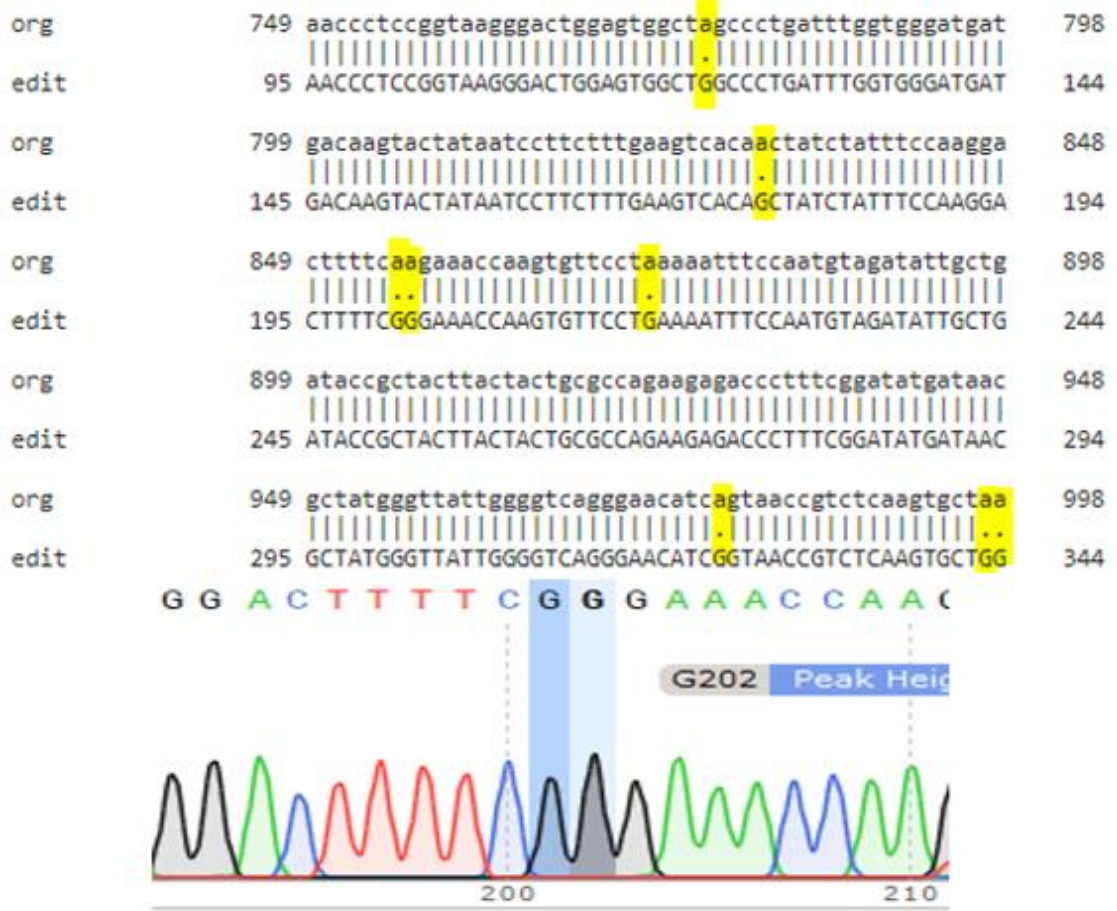
95. aminoasit, 5'AGA3' kodlu arjinin aminoasitinden, 5'GGA3' kodlu glisine dönüşmüştür.

100. aminoasit, 5'CTA3' kodlu lösin aminoasitinden, 5'CTG3' kodlu lösine dönüşmüştür.

135. aminoasit, 5'TCA3' kodlu serin aminoasitinden, 5'TCG3' kodlu serine dönüşmüştür.

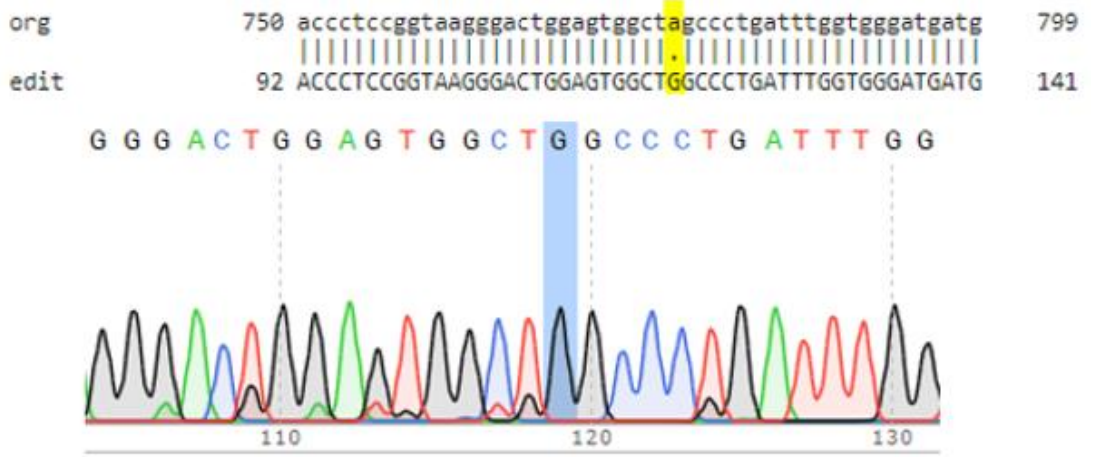
140. aminoasit, 5'AAG3' kodlu lizin aminoasitinden, 5'GGG3' kodlu glisine dönüşmüştür.

Not: 2.varyantın 140. aminoasitindeki 2 Adenosin nükleotiti birden düzenlenmiştir, enteresan ve nadir bi sonuçtur.



Şekil 3.30 ikinci varyant

3.Varyant: CAR (vH) yapısındaki 68. aminoasit, 5'CTA3' kodlu lösün aminoasitinden, 5'CTG3' kodlu lösine dönüşmüştür.



Şekil 3.31 için varyant

3.2.15 Tarama

Flp-In™ T-REx™ 293 Hücre Hattında kararlı olarak; lentiviral proteinler, dPspCas13b, huADAR2 ve CAR_ebov_vHvL ifade edilir. Aralayıcı ve doğrudan tekrar dizileri varyant toplama hattına transfekte edilir, böylece hücre içinde tek bir jenerasyonda durmaksızın insan hücresinde varyant elde eden bir makine dizayn edilmiştir. Bu makine durmaksızın varyant üretirken, hücre içi mRNA heterojenitesini gidermek için lentivirüslerden yararlanır. dPspCas13b düzenlemesi sonucu oluşan mRNA varyantları ve düzenlenmemiş mRNA'lar virüs içine paketlenir. Sonrasında virüsler kararlı NF-kB biyosensörü entegre Jurkatlara (T hücresi) tek kopya transdüksiyonu yapılır. 1 hücre 1 varyant olacak şekilde dizany edilir.

3.2.15.1 Eş zamanlı RNA düzenlemesi ve virüs paketlemesi ve transdüksiyonu

3.2.13.3.2 basamakta elde edilen FRT_ebov_vHvL_Lentiviral proteinleri_Addgene_103864_PvuI Flp-In™ T-REx™ 293 Hücre Hattına, 3.2.12.3 basamakta elde edilen aralayıcı ve doğrudan tekrar dizileri lipofektamin300 ile transfekte edilir.

3.2.14.4 basamağında yapılan dPspCas13b mRNA düzenlenmesi optimize edilmiştir ve 8 saat sonra ortamda uygun miktarda düzenlemiş mRNA varlığı tespit edilmiştir. Bundan dolayı transfeksiyondan 8 saat sonra medyuma 20 ug/ml doksisisiklin eklenir (200 ug/10ml DMEM). Yani virüs üretimi başlatılır.

Transfeksiyondan 88 saat sonra, medyum 50 ml falkona alınır ve 500 xg'de 5 dakika santrifüjlenir.

Medyum, hücre pelleti bozulmadan temiz falkona alınır, 10 ml medyuma 3,5 ml PEG yoğunlaştırıcı eklenir. Soğuk oda da gece boyu 100 RPM'de çalkalanır.

Ertesi gün 1500 xg'de 1 saat boyunca virüsler, çöktürülür, yoğunlaştırılır.

Virüs çökeltisi, 200 mikrolitre Opti-MEM™ Azaltılmış Serum Ortamında yeniden çözündürülür. Bu virüs çözeltilisine 10 ug/ml polibren eklenir. 6.3.3.1.4. basamağında elde edilmiş 500.000 NF-kB biyosensörü entegre Jurkat (T hücresi) hücresi altı oyuklu plakalara, virüs çözeltilisi ile ekilir (RPMI ortamında).

Spinokülasyon: Hücreler ve virüs çözeltilisi 1950 xg'de 1 saat boyunca 35 derecede santrifüj edilir.

16-24 saat sonra virüslü medyum, taze medyumla değiştirilir (RPMI ortamında).

48-72 saat 37 derecede CO₂ inkübatöründe bekletilir. Bu süre virüs girişi, jurkat genomuna entegrasyon ve varyantların ifadesini içerir. Bu süre sonunda CAR-T varyantları programlanmış olur.

3.2.15.1.1 Virüs titrasyonu

CAR yapıları düzenlenirken bir yandan virüslere paketlenir, varyantlar virüsler aracılığı ile jurkat hatlarına aktarılır. Virüs aracılığı ile aktarım yaparken dikkat edilmesi gereken

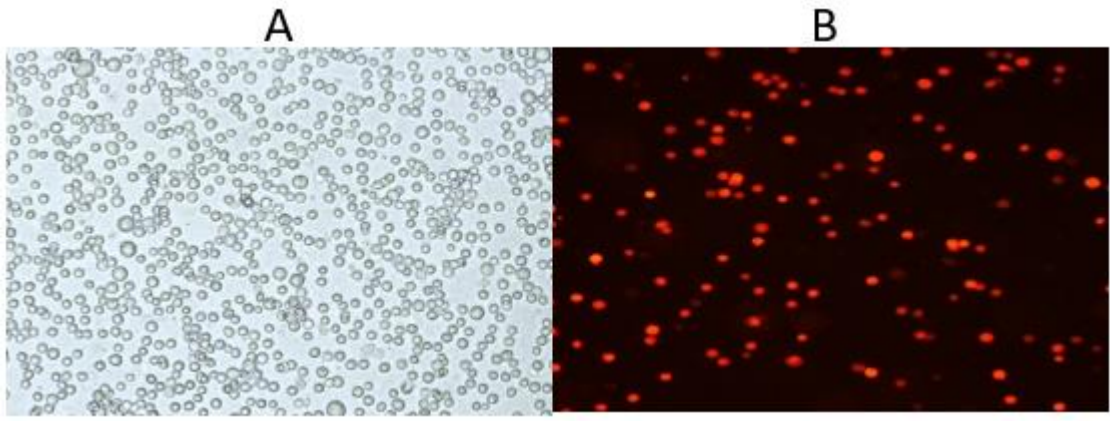
önemli bir husus, çoklu virüs enfeksiyonudur. Bundan dolayı virüs titre edilmelidir. Takara şirketinin geliştirdiği basit bir şekilde lentivirüs titrasyonu yapan Lenti-X™ GoStix™ Plus yan şeritlerden (lateral strip) yararlanılmıştır. GoStix Plus uygulamasını App Store veya Google Play'den indirilir. Uygulama içindeki talimatlarla ilerlenir lentiviral süpernatandan 20 µl ve 80 µl Takip Tamponu önce birleştirilir sonra kuyucuğa eklenir. Uygulamadan zamanlayıcıyı etkinleştirilir. Yanal akış testinin 10 dakikalık inkübasyon süresi vardır. İki tane yan şerit vardır biri test bandı (T), diğeri ise kontrol bandı (C). Test düzgün çalıştığında kontrol bandı (C) her zaman görünürdür. 10 dakika sonra uygulama sizi kasetin fotoğrafını çekmeniz konusunda uyaracaktır. Görüntüleme için uygun hizalama ve odak uzaklığı, tarama penceresindeki kasetin dış hatları kullanılarak elde edilir. Numune adınız kasetin çerçevesinin altında görünecektir. Doğru hizalama sağlandığında taslak yeşile dönecek ve kaset otomatik olarak taranacaktır. Çıkan sonuç mutlaka hem telefonda hem de deftere kaydedilir.



Şekil 3.32 lentiviral titrasyon

Şekil 3.32 de görselde A- lentiviral titrasyonu yapan yanıl akış aracı ve sonucu, B- Takara GoStix™ Plus uygulaması sonucu

17. Denemede elde edilen virüs titrasyonu (varyant titrasyonu). Takara optimizasyonu bir milyon hücre için yapılmıştır, tezde spinokülasyon yöntemi ile ilerlendiğinden altı oyuklu plate kullanılmıştır, en fazla beşyüzbin hücre ile ilerlenmektedir. 17. Denemede GV: 1043 çıkmıştır, tek oyuk için 100 gv olacak şekilde optimize edilmiştir.



Şekil 3.33 Altı oyuklu plâtelere, 100 gv titreyile yapılan transdüksiyon

Jurkat hücreleri ve CAR ile dönüştürülmüş jurkat hücreleri. GV oranı; ışık miktarının, total hücre sayısının yarısından biraz fazla olacak şekilde seçilmiştir, jurkat hücrelerine çoklu kopya girmesini engellemek adına böyle bir strateji izlenmiştir. Şekil 3.33'teki görselde gösterildiği gibi A- titrasyon sonucu yapılan transdüksiyonun sonucunun ışık mikroskobu görüntüsü, B- titrasyon sonucu yapılan transdüksiyonun sonucunun ters mikroskop görüntüsüdür.

3.2.16 Eş zamanlı CAR havuzu ve KKKA M segment inkübasyonu

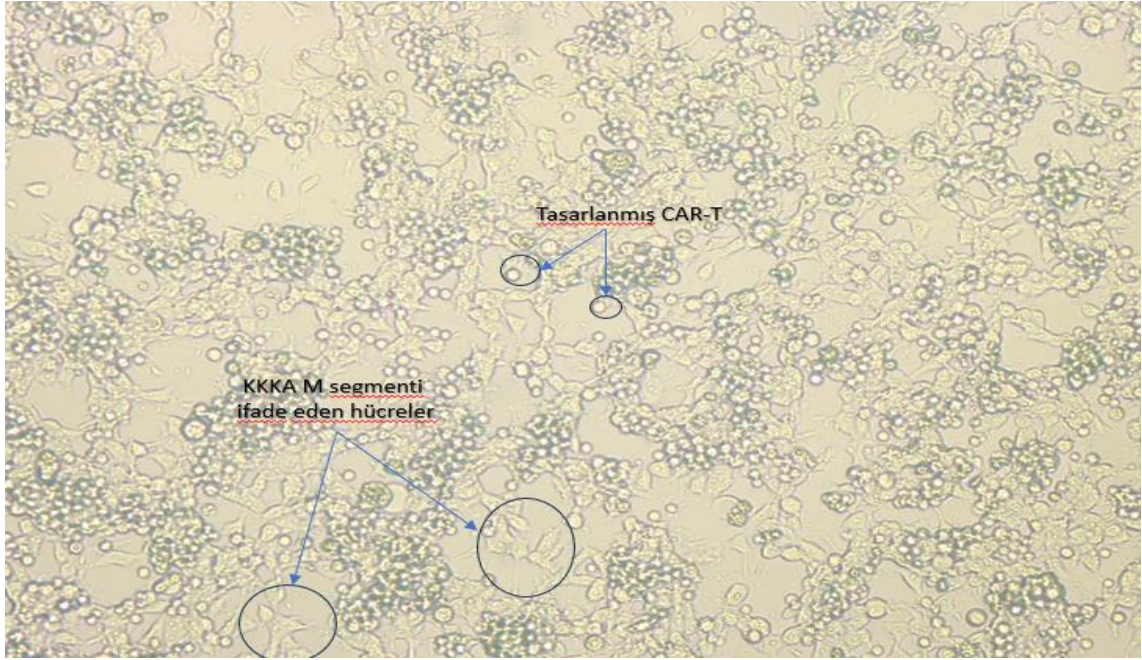
Programlanan CAR-T varyantları, KKKA antijenleri taşıyan hücrelerle eş inkübasyonu yapılır.

6 oyuklu platelerde 200.000 bin CAR varyantı ve 200.000 KKKA M segment ifade eden hücreler eş olarak 37 derece CO₂ inkübatöründe inkübe edilir.

0. Saat: 200.000 bin KKKA M segment ifade eden hücreler, 6 oyuklu platelerde ekilir. DMEM ortamında.

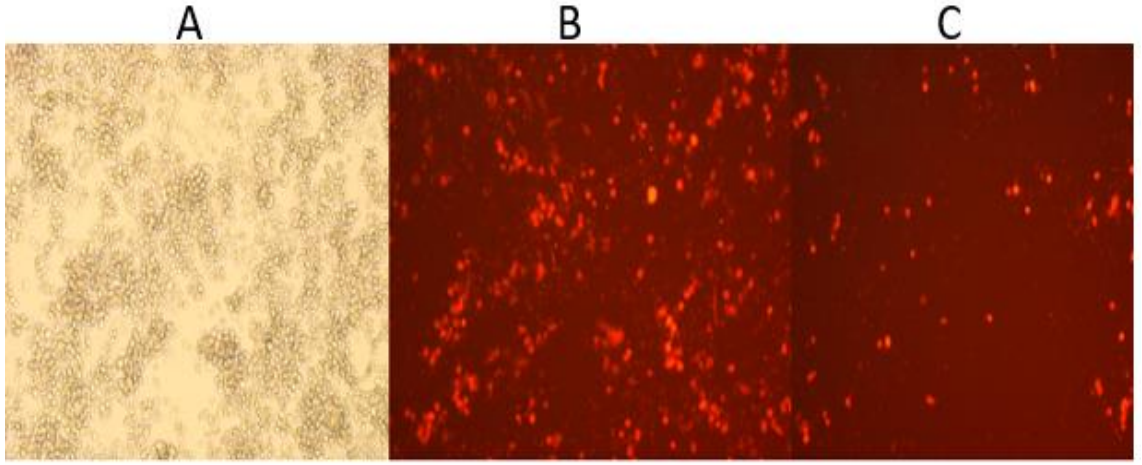
16. Saat: DMEM ortamı aspire edilir, hücreler yıkanır, sonrasında 200.000 bin CAR varyantı RPMI ortamında oyuğa ekilir.

CAR-Jurkat hücreleri kısa sürede aktive olur.



Şekil 3.34 Tasarlanmış CAR-T ve KKKA M segment eş kültürü

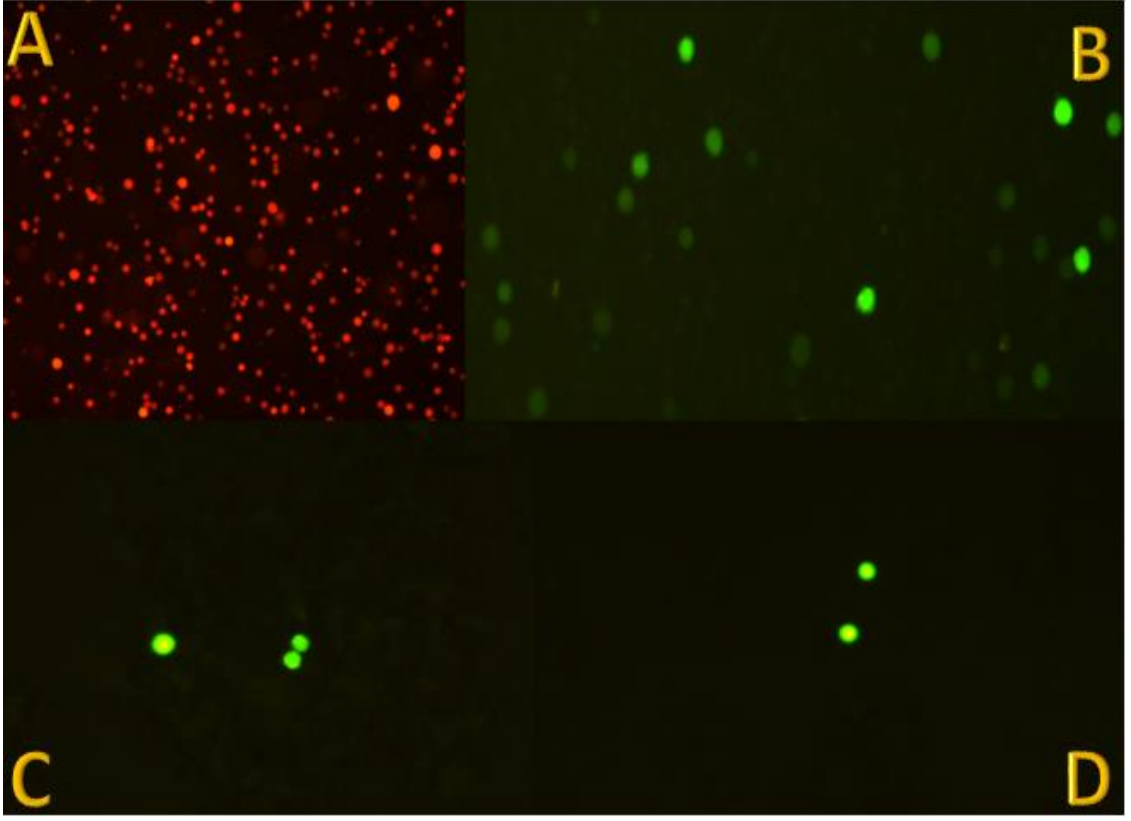
Tasarlanmış CAR-T ve KKKA M segment eş kültürü, 16. Saatte eş inkübasyonun başlangıcı, tutunan hücreler (fibroblastik tarzı) HEK hücreleridir (antijen taşıyıcı), antijene bağlanmış küçük yuvarlak hücreler jurkat hücreleridir.



Şekil 3.35 Tasarlanmış CAR-T ve KKKA M segment eş kültürün T hücre aktivasyonu

A- Tasarlanmış CAR-T ve KKKA M segment eş kültürünün 24 saat sonraki ışık mikroskobu görüntüsü, B- A'nın ters mikroskop görüntüsü (ölü HEK hücreleri ve T hücreleri), C- A'nın ters mikroskop görüntüsü (T hücrelerinin yoğunlukta olduğu alandan alınmış görüntü).

Jurkat hücreleri 1-4 saat gibi kısa sürede aktifleşir ve M segmenti taşıyan hücelere saldırır, sol görselde görüldüğü gibi kısa sürede HEK hücrelerin parçalandığı görülüyor, ortadaki görselde ışımaları görüyoruz, görselden yorum yapmak zordur, parçalanan HEK hücreleri görsel açıdan kirlilik yaratır. Sağ görselde görece HEK ölümünün düşük olduğu bölgeden alınan görseldir.



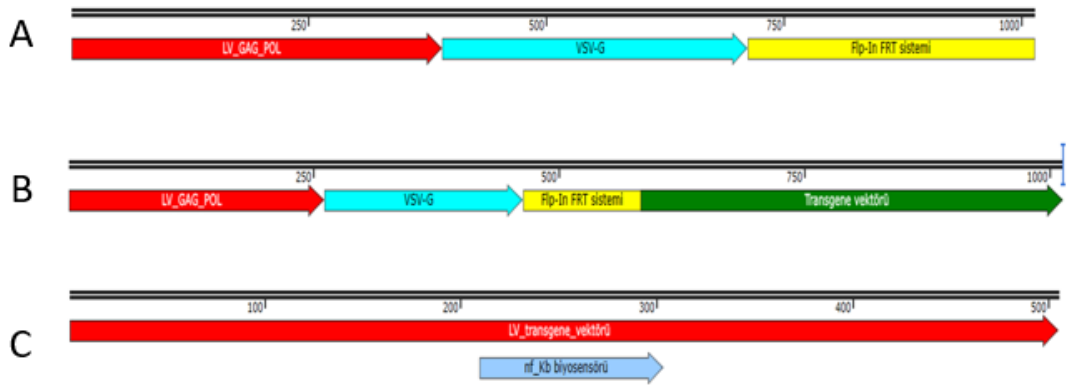
Şekil 3.36 Kırmızı ışımlar programlanmış CAR'ları, yeşil ışımlar immün olarak aktifleşmiş CAR'ları gösterir

20 defa RNA çeşitlendirme (varyant oluşturma) ve tarama (varyatlar ve antijen eş inkübasyonu) yapılmıştır, A) mRuby ifadesini gösterir, CAR ve varyant takibini sağlar, B-C-D) NF-kB biyosensörü ifadesini gösterir, immünolojik yanıtın takibini sağlar. Tarama sonuçlarında immünolojik yanıt oluşturan hücreler tespit edilmiştir, C-D) görsellerinde görüldüğü üzere tasarlanan metodoloji %1-0,5 oranında çalışmaktadır, yüzdeler göz önüne alındığında düşük bir oran gibi görünebilir, lakin sıfırdan bir molekül tasarladığımızı var sayarsak (insan hücresinde) bu muazzam bir orandır. B görselinde görüldüğü gibi 2 taramada sırasıyla %8 ve %15'lik verim gözlemlendi, lakin bu bir istisnadır, insan el becerisi hatasından kaynaklı da olabilir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Klonlama Verileri

Klonlamalar snapgene uygulamasında In-SLICO olarak tasarlanmıştır. Klonlamalar sonucunda üç tane plazmit yapısı elde edilmiştir. İlk olarak verimli virüs elde etmek için lentiviral tüm proteinler, cis ve trans etkili dizileriyle bir plazmide klonlanmıştır. İkincil olarak PspCas13b ile hedeflenecek diziler transgene olarak, lentiviral proteinlere klonlanmıştır, bu klonlamanın amacı varyantları verimli şekilde virüslere paketlemektir. Üçüncül olarak nf_Kb biyosensörü klonlamasıdır, T hücre aktivasyonunun izlenmesi için genomuna entegre edilir.

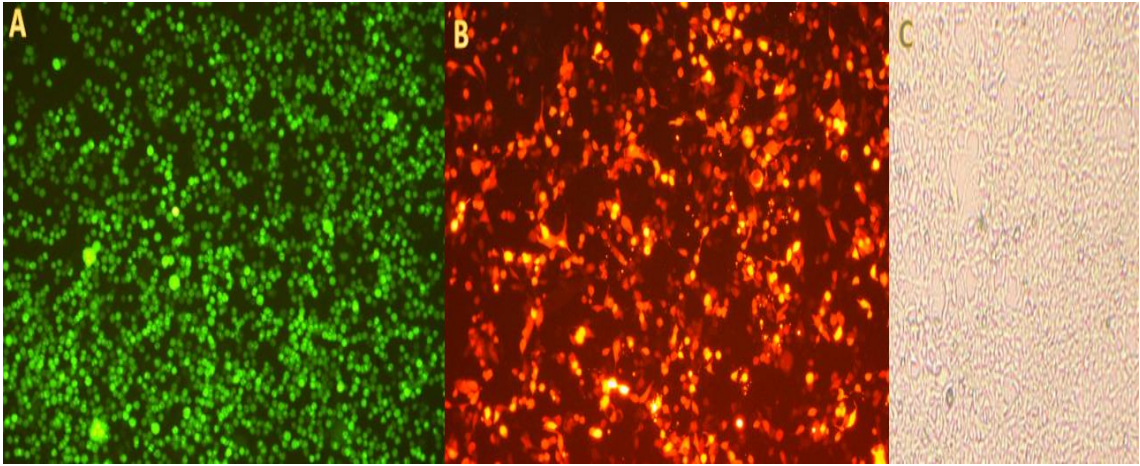


Şekil 4.1 A) lenvirüs proteinleri B) lenvirüs proteinleri ve Transgen vektörü ve C) Transgene vektörüne klonlanmış nf_Kb biyosensörü

4.2 Hücre Kültürü Verileri

Hücre kültürü deneylerinde modifiye edilmiş Jurkat E6 ve Flp-In™ T-REx™ 293 Hücre Hatları kullanılmıştır. Jurkat hücre hattında nf_Kb biyosensörüyle kararlı hale getirilmiştir. nf_Kb biyosensörü, antijen varlığında T hücresi sinyalizasyonundan kaynaklı yeşil floresan ışımalar yapacak şekilde tasarlanmıştır. Flp-In™ T-REx™ 293 Hücre Hattından üç modifiye hat elde edilmiştir. İlk olarak PspCas13b ve huADAR2

kararlı olarak ifade edilecek şekilde modifiye edilmiştir, bu modifiye hücre hattına transgen, lentiviral proteinler, Flp-In sistemi tek kopya olarak ifade verecek şekilde kararlı hale getirilmiştir. Bu hücre hatları sırasıyla RNA düzenlenmesinin optimizasyonu ve varyant havuzunun lentivirüse paketlenmesi için tasarlanmıştır. Son olarak KKKA M segmenti Flp-In™ T-REx™ 293 Hücre Hattında ifade ettirilmiştir. M segmentin ifade ettirilmesinin amacı CAR-T varyant havuzuna hedef antijen sunmaktır.



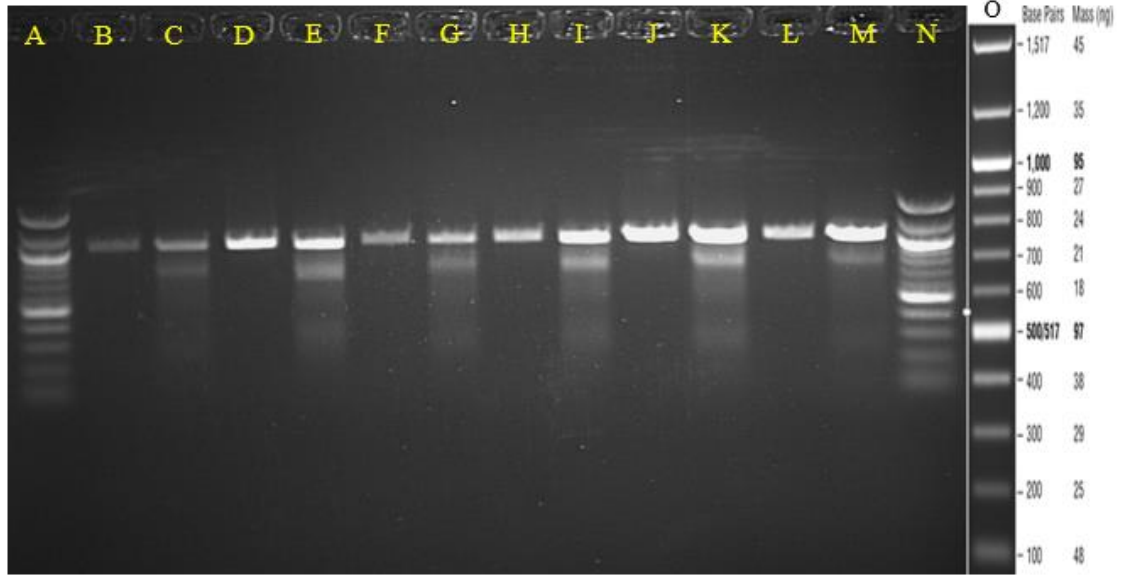
Şekil 4.2 Stabil hücre hatları

A) nf_Kb Jurkat hattı, B) FRT_Lentiviral proteinler_Transgen HEK293 hücre hattı ve C) PspCas13b ve huADAR2 (addgene 103864) HEK293 hücre hattı

4.3 Dizileme Verileri

PspCas13b aktivitesi PspCas13b ve huADAR2 (addgene 103864) HEK293 hücre hattında optimize edilmiştir.

A- Düzenlenmiş RNA'ların T7E1 sonucu



Şekil 4.3 T7E1 sonucu altı oyuklu plakada 2 saat, 8 saat, 16 saat, 24 saat, 48 saat ve 72 saat boyunca düzenlenen RNA'nın düzenleme verimliliği

Altı oyuklu plakada 2 saat, 8 saat, 16 saat, 24 saat, 48 saat ve 72 saat boyunca düzenlenen RNA'nın düzenleme verimliliği. Beklenildiği gibi bağlanıçta ve son saatlere doğru düzenleme verimliliği düşmektedir. A-N-O- NEB 100 bp DNA merdivenidir. B- 2 saat sonucundaki düzenlemenin negatif kontrolü, C- 2 saat sonucundaki düzenleme verimliliği sonucudur. D- 8 saat sonucundaki düzenlemenin negatif kontrolü, E- 8 saat sonucundaki düzenleme verimliliği sonucudur. F- 16 saat sonucundaki düzenlemenin negatif kontrolü, G- 16 saat sonucundaki düzenleme verimliliği sonucudur. H- 24 saat sonucundaki düzenlemenin negatif kontrolü, I- 24 saat sonucundaki düzenleme verimliliği sonucudur. J- 48 saat sonucundaki düzenlemenin negatif kontrolü, K- 48 saat sonucundaki düzenleme verimliliği sonucudur. L- 72 saat sonucundaki düzenlemenin negatif kontrolü, M- 72 saat sonucundaki düzenleme verimliliği sonucudur.

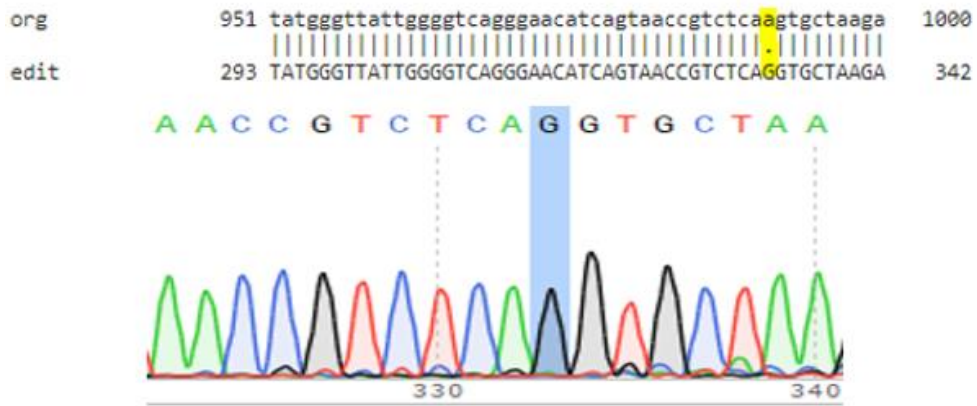
Düzenlenen RNA'nın düzenleme verimliliği, beklenildiği gibi bağlanıçta ve son saatlere doğru düzenleme verimliliği düşmektedir. Bundan dolayı varyant toplarken 48 saatte ikinci kez crRNA ve doğrudan tekrar transfeksiyonu yapılır.

B- Düzenlenmiş RNA'ların, düzenleme verimliliğinin Sanger sonuçları

Varyant havuzundan rastgele 20 tanesi seçilir ve Sanger dizilemeye gönderilir. 10 uM Sekans_PrimeriF: 5'cctctgactttcgggtgccg3' primeri ile 3000 ng DNA olacak şekilde dizilenir.

Sanger sonuçları:

1. Varyant: CAR (vH) yapısındaki 140. aminoasit, 5'AGT3' kodlu serin aminoasitinden, 5'GGT3' kodlu glisine dönüşmüştür.



Şekil 4.4 Birinci varyant.

2.Varyant: CAR (vH) yapısındaki,

68. aminoasit, 5'CTA3' kodlu lösin aminoasitinden, 5'CTG3' kodlu lösine dönüşmüştür.

86. aminoasit, 5'CAA3' kodlu glutamin aminoasitinden, 5'CAG3' kodlu glutamine dönüşmüştür.

94. aminoasit, 5'TCA3' kodlu serin aminoasitinden, 5'TCG3' kodlu glisine dönüşmüştür.

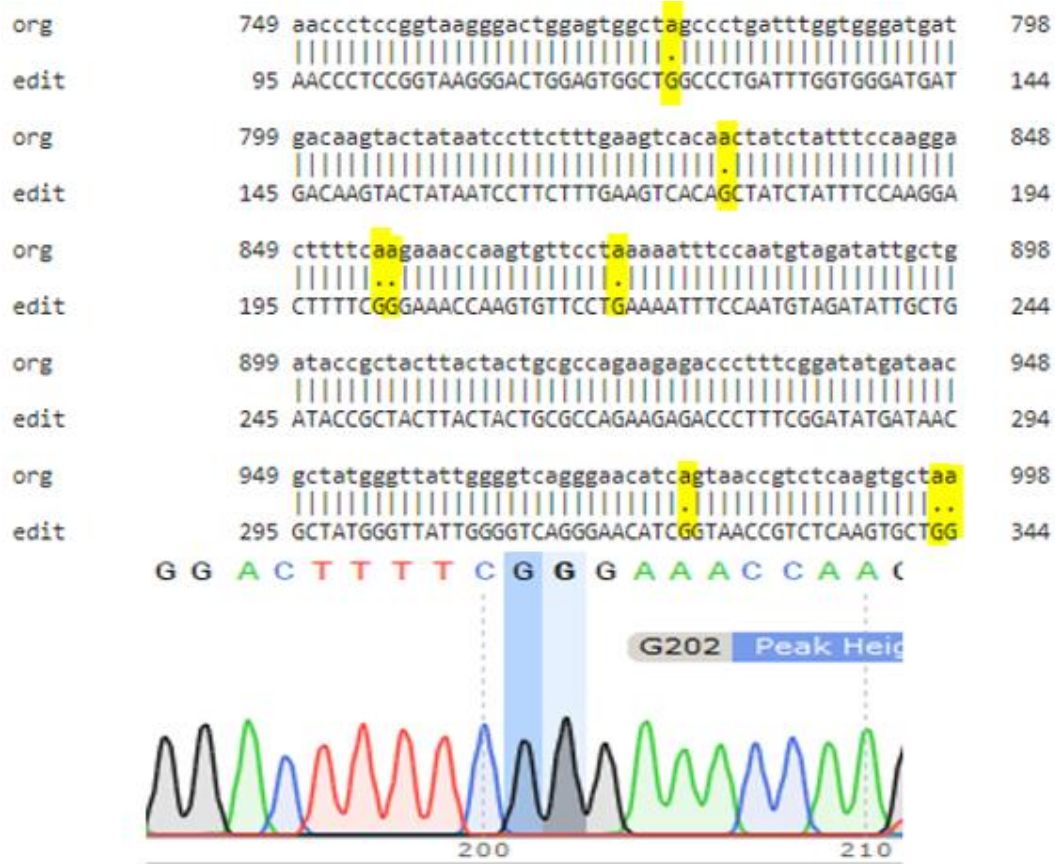
95. aminoasit, 5'AGA3' kodlu arjinin aminoasitinden, 5'GGA3' kodlu glisine dönüşmüştür.

100. aminoasit, 5'CTA3' kodlu lösine aminoasitinden, 5'CTG3' kodlu lösine dönüşmüştür.

135. aminoasit, 5'TCA3' kodlu serin aminoasitinden, 5'TCG3' kodlu serine dönüşmüştür.

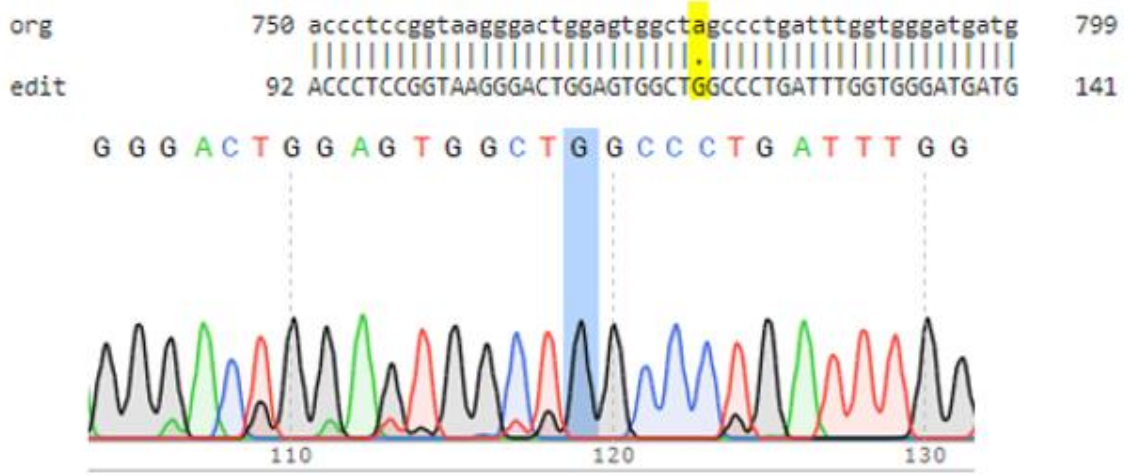
140. aminoasit, 5'AAG3' kodlu lizin aminoasitinden, 5'GGG3' kodlu glisine dönüşmüştür.

Not: 2.varyantın 140 aminoasitindeki 2 Adenosin nükleotiti birden düzenlenmiştir, enteresan ve nadir bi sonuçtur.



Şekil 4.5 ikinci varyant

3.Varyant: CAR (vH) yapısındaki 68. aminoasit, 5'CTA3' kodlu lösin aminoasitinden, 5'CTG3' kodlu lösine dönüşmüştür.



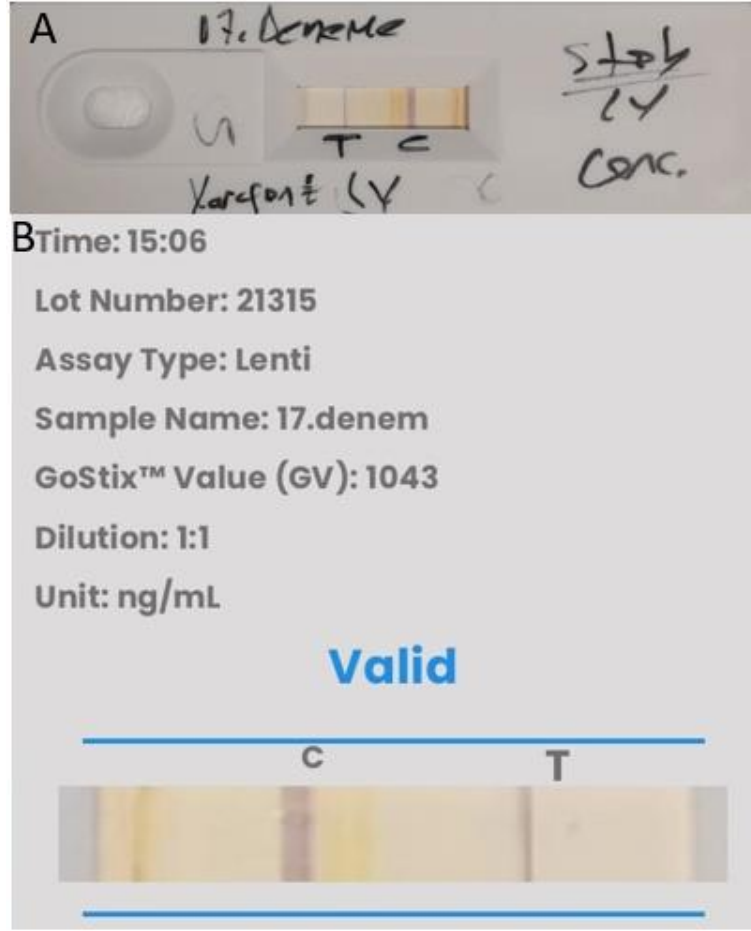
Şekil 4.6 Üçüncü varyant

Bilhassa 2. varyant güçlü düzenlemenin kanıtıdır. Tek bir varyantta çoklu düzenleme ve çoklu aminoasit değişikliği yapılmıştır. Göze çarpan bir diğer durum düzenleme yapılan aminoasitler sinonim dizilerine dönüşmüştür, böylelikle aminoasit değişikliği olmamıştır, bu istenmeyen bir durumdur lakin ADAR'ın fizyolojisinden kaynaklıdır.

4.4 Tarama Verileri

A- Lentiviral titrasyon

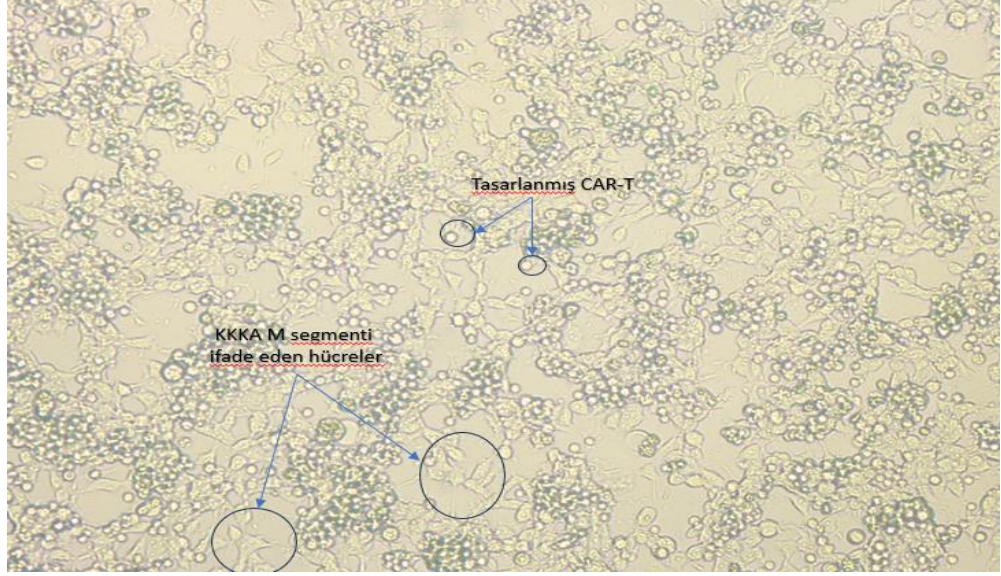
PspCas13b aktivasyonu sonrası mRNA'lar düzenlenir. Böylece tek bir mRNA'da hücre içinde heterojenitesi meydana gelir. Bu durumun üstesinden gelmek için, mRNA'lar lentivirüse paketlenir ve jurkatlara transdüksiyonları yapılır. Transdüksiyon bir hücreye bir mRNA girecek şekilde optimize edilir. Böyle bir titrasyon için Takara Lenti-X™ GoStix™ Plustan yararlanılır. Altı oyuklu hücre kültürü plate için 100 Gv olarak optimize edilmiştir.



Şekil 4.7 Lentivirüs titrasyonu, Şekil 3.32 de görselde A- lentiviral titrasyonu yapan yanal akış aracı ve sonucu, B- Takara GoStix™ Plus uygulaması sonucu

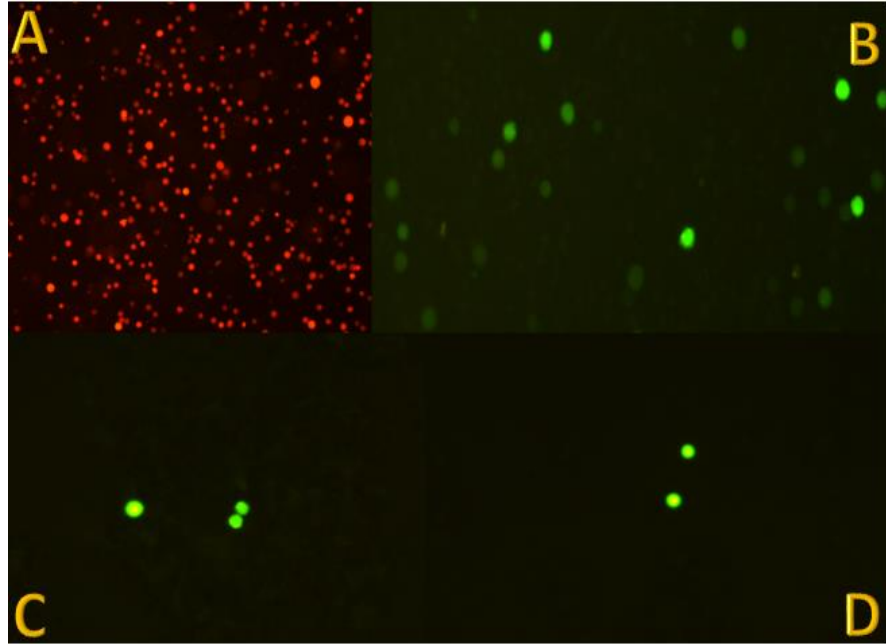
C- Eş kültür

KKKA M segmenti ifade eden HEK 293 hücreleri ile tasarlanmış CAR-T hücreleri eş inkübe edilir ve aşağıda ki gibi bir görüntü elde edilir.



Şekil 4.8 KKKA M segmenti HEK 293 hücreleri ile tasarlanmış CAR-T hücreleri eş inkübasyonu

CAR-T hücreleri tasarlanırken mRUBY'yi (kırmızı floresan ışımaya) kararlı olarak ifade edecek şekilde tasarlanmıştır. Böylelikle CAR'ın programlanması izlenmektedir. Yine tasarımda nf_Kb minimal promotorünü 5' ucuna GFP (yeşil floresan protein) eklenmiştir.



Şekil 4.9 Kırmızı floresan ışımalar, CAR-T programlanmasını gösterir, Yeşil floresan ışımalar ise, T hücre aktivasyonunu yani immün yanıtın takibini sağlar

20 defa çeşitlendirme ve tarama yapılmıştır, A) mRuby ifadesini gösterir, CAR ve varyant takibini sağlar, B-C-D) NF-kB biyosensörü ifadesini gösterir, immünolojik yanıtın takibini sağlar. Tarama sonuçlarında immünolojik yanıt oluşturan hücreler tespit edilmiştir, C-D) görsellerinde görüldüğü üzere tasarlanan metodoloji %1-0,5 oranında çalışmaktadır, yüzdeler göz önüne alındığında düşük bir oran gibi görünebilir, lakin sıfırdan bir molekül tasarladığımızı var sayarsak (insan hücresinde) bu muazzam bir orandır. B görselinde görüldüğü gibi 2 taramada sırasıyla %8 ve %15'lik verim gözlemlendi, lakin bu bir istisnadır, insan el becerisi hatasından kaynaklı da olabilir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

RNA düzenleme, tipik olarak nükleotidlerin eklenmesi, silinmesi veya değiştirilmesi yoluyla RNA dizilerinin modifikasyonunu içeren moleküler bir işlemdir. Modifikasyon hususu önemlidir, RNA'da meydana gelen değişiklikler geçicidir, mutasyon sınıfında değerlendirilmez, bu durum RNA çalışmalarını oldukça cazip hale getiriyor. RNA çalışma alanlarını, genetik araştırmalar, nöronal fonksiyon, nörolojik bozukluklar, gen terapisi, antiviral yaklaşımlar, biyoteknoloji ve sentetik biyoloji, protein mühendisliği, metabolik mühendislik, biyolojik süreçler, biyobelirteçler (bilhassa kanserin erken tanısı), terapötik amaçlı RNA düzenleme ve evrimsel dinamikler olarak genellenebilir (Birgaoanu vd 2023, Booth vd 2023). Söz konusu biyoteknoloji ve sentetik biyoloji olduğunda çalışmalar kısıtlı, literatür bilgisi oldukça azdır, lakin hızla gelişmekte olan bir alandır. RNA düzenlemesiyle memeli hücrelerinde fonksiyonel ürün elde etme çalışmaları oldukça az bir grup tarafından yürütülmektedir, maddi ve pratik bir teknik değildir. Bunun başlıca sebepleri mRNA'nın hücre içinde çoklu kopyası olması, kararsız yapıda olmasının yanı sıra RNA; protein ve DNA arasındaki etkileşimi sağlar, bundan dolayı oldukça karmaşık biyokimyası, fizyolojisi ve metabolizması vardır. Memeli hücrelerinde ürün geliştirmenin kendi içinde de zorlukları vardır, başlıca zorlukları muazzam genom boyutu, karmaşık metabolizması, fizyoloji ve biyokimyasıdır. Tüm bu zorlukların üstesinden gelmek için, CRISPR ve Lentiviral gen taşıma sistemi kullanılmıştır. RNA'yı hedef alan CRISPR enzimleri ile Flp-In™ T-REx™ 293 Hücre Hattında mRNA kütüphanesi oluşturulur, sonra bu kütüphane Lentivirüslere paketlenir, bir hücre bir varyant olacak şekilde varyant kütüphanesi jurkat hücrelerine transdüksiyonu yapılır. Varyantlar, jurkat (T hücresi) hücre hattında ifade edilir ve CAR-T 'ler programlanmış olur. İmmün biyosensörü olarak nf_Kb kullanılır, antijen varlığında yeşil ışığa yapar ve hangi varyantın aktifleştiğini belirtir. Bu sistem RNA'nın çoklu kopya olması ve karmaşık doğasından kaynaklı problemi ortadan kaldırırken, kararlılığı hakkında olumlu bir etkisi yoktur. Aynı zamanda memeli hücrelerinin muazzam genom boyutu ve yavaş büyüme (üreme) sorununu ortadan kaldırmıştır. Tek bir jenerasyonda (pasajda) çoklu ve etkili varyantlar üretip kolay bir şekilde tarama imkânı veren bu yeni yöntemi, immünoloji gibi karmaşık bir alanda dahi fonksiyonel ürün vermesi, güncel konjektördeki birçok sisteme çok göre ciddi avantajlar sağlar. Bu yeni yöntemi teknik, pratik ve ekonomik olarak uygun bir hücre içi programlanabilen yöntem olarak tanımlanır.

KAYNAKLAR

- Abudayyeh, O. O., Gootenberg, J. S., Franklin, B., Koob, J., Kellner, M. J., Ladha, A. 2019. A Cytosine Deaminase for Programmable Single-Base RNA Editing. *Science* 365, 382–386. doi:10.1126/science.aax7063
- Abudayyeh, O.O., Gootenberg, J.S., Franklin, B., 2019. A cytosine deaminase for programmable single-base RNA editing. *Science* 365(6451):382–386.
- Abudayyeh, O.O., Gootenberg, J.S., Konermann, S. 2016. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science* 353(6299):aaf5573–aaf.
- Abudayyeh, O.O., Gootenberg, J.S., Essletzbichler, P. 2017. RNA targeting with CRISPR-Cas13. *Nature* 550(7675):280–284.
- Alfonzo, J.D., Thiemann, O., Simpson, L. 1997. The mechanism of U insertion/deletion RNA editing in kinetoplastid mitochondria *Nucleic Acids Res.*
- Al-Qaisi, T. S., Su, Y.C. and Roffler, S. R. 2018. Transient AID expression for in situ mutagenesis with improved cellular fitness. *Sci. Rep.* 8, 9413.
- Álvarez, B., Mencía, M., de Lorenzo, V. and Fernández, L. A. 2020. In vivo diversification of target genomic sites using processive base deaminase fusions blocked by dCas9. *Nat. Commun.* 11, e6436.
- Anant, S., MacGinnitie, A.J., Davidson, N.O. 1995. apobec-1, the catalytic subunit of the mammalian apolipoprotein B mRNA editing enzyme, is a novel RNA-binding protein. *J Biol Chem.* 270(24):14762–14767.
- Ann, R.F., Hsu, P.D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D.A. and Zhang, F. 2013. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system *Nature Protocols* volume 8, pages2281–2308.
- Aquino-Jarquín, G. Novel 2020. engineered programmable systems for ADAR-mediated RNA editing. *Mol Ther Nucleic Acids* 19:1065–1072.
- Armbruster, B. N., Li, X., Pausch, M. H., Herlitze, S. and Roth, B. L. 2007. Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potentially activated by an inert ligand. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104, 5163–5168.
- Arter, S.D., Surtees, R., Walter, C.T., Ariza, A., Bergeron, É., Nichol, S.T. 2012. "Structure, function, and evolution of the Crimean-Congo hemorrhagic fever virus nucleocapsid protein". *Journal of Virology.* 86 (20): 10914–23. doi:10.1128/JVI.01555-12. PMC 3457148. PMID 22875964.
- Azad, M.T.A., Bhakta, S., Tsukahara, T. 2017. Site-directed RNA editing by adenosine deaminase acting on RNA for correction of the genetic code in gene therapy. *Gene Ther.* 24(12):779–786.

- Azam, M., Latek, R. R. and Daley, G. Q. 2003. Mechanisms of autoinhibition and STI-571/imatinib resistance revealed by mutagenesis of BCR-ABL. *Cell* 112, 831–843.
- Backus, J.W., Smith, H.C. 1991. Apolipoprotein B mRNA sequences 3' of the editing site are necessary and sufficient for editing and editosome assembly *Nucleic Acids Res.*19(24):6781-6.
- Badran, A. H. and Liu, D. R. 2015. Development of potent in vivo mutagenesis plasmids with broad mutational spectra. *Nat. Commun.* 6, 8425.
- Bajad, P., Jantsch, M.F., Keegan, L. 2017. A to I editing in disease is not fake news. *RNA Biol.* 14(9):1223–1231.
- Bakalara, N., Simpson, A.M., Simpson, L. 1996. Guide RNA-directed uridine insertion RNA editing in vitro. *EMBO J.* 15(23): 6758–6765.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D.A., and Horvath, P. 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315, 1709–1712.
- Basilio, C., Wahba, A.J., Lenyel, P., Speyer, J.F., Ochoa, S. 1962. Synthetic polynucleotides and the amino acid code. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Apr 15;48(4):613-6.
- Bass, B.L. 1997. RNA editing and hypermutation by adenosine deamination *Trends Biochem Sci.* 22(5):157-62.
- Bass, B.L., Nishikura, K., Keller, W., Seeburg, P.H., Emeson, R.B., O'Connell, N.A., Samuel, C.E., Herbert, A. 1997. A standardized nomenclature for adenosine deaminases that act on RNA. *RNA* 3(9):947-9.
- Bass, B.L., Weintraub, H. 1988. An unwinding activity that covalently modifies its double-stranded RNA substrate. *Cell.* 55(6):1089–1098.
- Bazak, L., Haviv, A., Barak, M., 2014. A-to-I RNA editing occurs at over a hundred million genomic sites, located in a majority of human genes. *Genome Res.* 24(3):365–376.
- Benne, R., Vandenburg, J., Brakenhoff, J.P.J., Sloof, P., van Boom, J.H., Tromp, M.C. 1986. Major transcript of the frameshifted *coxII* gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA *Cell.* 12;46(6):819-26.
- Berger, S. 2017. *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever: Global Status: 2017 edition.* GIDEON Informatics Inc. p. 7. ISBN 9781498815567. Archived from the original on 2017-09-10.
- Berman, C. M. et al. 2018. An adaptable platform for directed evolution in human cells. *J. Am. Chem. Soc.* 140, 18093–18103.

- Bernd, Z. Gootenberg, J.S., Abudayyeh, O.O., Slaymaker, I.M., Makarova, K.S., Essletzbichler, P., Volz, S.E., Joung, J., Oost, J.V.D., Regev, A., Koonin, E.V., Zhang F. 2015. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system *Cell* 163(3):759-71. doi: 10.1016/j.cell.2015.09.038. Epub.
- Bhakta, S., Azad, M.T.A., Tsukahara, T. 2018. Genetic code restoration by artificial RNA editing of Ochre stop codon with ADAR1 deaminase. *Protein Eng Des Sel.* 31(12):471–478.
- Bhakta, S., Sakari, M. Tsukahara T. 2020. RNA editing of BFP, a point mutant of GFP, using artificial APOBEC1 deaminase to restore the genetic code *Sci Rep.*
- Bhakta, S., Sakari, M., Tsukahara, T. 2020. RNA editing of BFP, a point mutant of GFP, using artificial APOBEC1 deaminase to restore the genetic code. *Sci Rep.* 10(1):17304.
- Bhakta., Sonali and Tsukahara Toshifumi 2022. C-to-U RNA Editing: A Site-Directed RNA Editing Tool for Restoration of Genetic Code Genes, 13(9), 1636; <https://doi.org/10.3390/genes13091636>
- Bi, D., Yao, J., Wang, Y., Qin, G., Zhang, Y., Wang, Y., Zhao, J. 2021. CRISPR/Cas13d mediated efficient KDM5B mRNA knockdown in porcine cells and parthenogenetic embryos. *Reproduction.* 162:149–160. doi: 10.1530/REP-21-0053.
- Birgaoanu, M., Sachse, M. and Gatsiou, A. 2023. RNA Editing Therapeutics: Advances, Challenges and Perspectives on Combating Cardiovascular Drugs and Therapy Heart Disease Volume 37, pages 401–411.
- Blum, B., Bakalara, N., Simpson, L. 1990. A model for RNA editing in kinetoplastid mitochondria: "guide" RNA molecules transcribed from maxicircle DNA provide the edited information *Cell*
- Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A. and Ehrlich, S.D. 2005. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology* 151, 2551–2561.
- Booth, B.J., Nourreddine, S., Katrekar, D., Savva, Y., Bose, D., Long, T.J., Huss, D.J., Mali, P. 2023. RNA editing: Expanding the potential of RNA therapeutics Published: DOI:<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2023.01.005>
- Booth, L. et al. 2016. The afatinib resistance of in vivo generated H1975 lung cancer cell clones is mediated by SRC/ERBB3/c-KIT/c-MET compensatory survival signaling. *Oncotarget* 7, 19620–19630.
- Bowers, P. M. et al. 2011. Coupling mammalian cell surface display with somatic hypermutation for the discovery and maturation of human antibodies. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 108, 20455–20460.

- Brocken Daan, J.W., Mariliis Tark-Dame, Remus, T.D. 2017. dCas9: A Versatile Tool for Epigenome Editing *Curr Issues Mol Biol* 26:15-32. doi: 10.21775/cimb.026.015. Epub 2017 Sep 7.
- Brouns, S.J., Jore, M.M., Lundgren, M., Westra, E.R., Slijkhuis, R.J., Snijders, A.P., Dickman, M.J., Makarova, K.S., Koonin, E.V., van der Oost, J. 2008. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science* 321, 960-964.
- Brown, D.M. and Glass, J.I. 2020. Technology used to build and transfer mammalian chromosomes. *Exp. Cell Res.* 388, 111851.
- Burstein, C.L., Sun, C.T., Brown, I., Sharon, K., Anantharaman, A.J., Probst, B.C., Thomas, J.F., Banfield 2016. Major bacterial lineages are essentially devoid of CRISPR-Cas viral defence systems, *Nat. Commun*, 7, p. 10613
- Buskirk, A. R., Ong, Y.C., Gartner, Z. J. and Liu, D. R. 2004. Directed evolution of ligand dependence: small-molecule-activated protein splicing. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101, 10505–10510.
- Byrne, E.M., Connell, G.J., Simpson, L. 1996. Guide RNA-directed uridine insertion RNA editing in vitro *EMBOJ*.
- Chakraborty, C., Sharma, A.R., Sharma, G. 2017. Therapeutic miRNA and siRNA: moving from Bench to Clinic as Next Generation Medicine. *Mol Ther Nucleic Acids*.8:132–143.
- Chan, L., Chang, B.H., Nakamuta, M., Li, W.H., Smith, L.C. 1997. Apobec-1 and apolipoprotein B mRNA editing *Biochim Biophys Acta*. 1345(1):11-26.
- Chen, H. et al. 2020. Efficient, continuous mutagenesis in human cells using a pseudo-random DNA editor. *Nat. Biotechnol.* 38, 165–168.
- Chen, J.S., Ma, E., Harrington, L.B., Da Costa, M., Tian, X., Palefsky, J.M., Doudna, J.A. 2018. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science* 360:436–439.
- Chen, S.H., Habib, G., Yang, C.Y., Gu, Z.W., Lee, B.R., Weng, S.A., Silberman, S.R., Cai, S.J., Deslypere, J.P., Rosseneu, M. 1987. Apolipoprotein B-48 is the product of a messenger RNA with an organ-specific in-frame stop codon *Science*. 238(4825):363-6.
- Cheng, X., Blumenthal, R.M. 2008. Mammalian DNA methyltransferases: a structural perspective *Structure*. (3):341-50.
- Chester, A., Scott, J., Anant S., Navaratnam, N. 2000. RNA editing: cytidine to uridine conversion in apolipoprotein B mRNA *Biochim Biophys Acta*.1494(1-2):1-13.
- Chira, S. et al. 2015. Progresses towards safe and efficient gene therapy vectors. *Oncotarget* 6, 30675–30703.
- Cirino, P.C., Mayer, K.M. and Umeno, D. 2003. Generating mutant libraries using error-prone PCR. *Methods Mol. Biol.* 231, 3–9.

- Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A. 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339, 819–823.
- Connell, G.J., Byrne, E.M., Simpson L. 1997. Guide RNA-independent and guide RNA-dependent uridine insertion into cytochrome b mRNA in a mitochondrial lysate from *Leishmania tarentolae*. Role of RNA secondary structure *J Biol Chem.* 272(7):4212-8.
- Covello, P.S., Gray M.W. 1989. RNA editing in plant mitochondria *Nature*
- Cox, D.B.T., Gootenberg, J.S., Abudayyeh, O.O. 2013. RNA editing with CRISPR-Cas13 *Science*.
- Cox, D.B.T., Gootenberg, J.S., Abudayyeh, O.O. 2017. RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science*;358(6366):1019.
- Cox, D.B.T., Gootenberg, J.S., Abudayyeh, O.O., Franklin, B., Kellner, M.J., Joung, J., 2018. RNA Editing with CRISPR-Cas13. *Espe* 358, 1019–1027. doi:10.1530/ey.15.14.11
- Crimean-Congo Haemorrhagic Fever". World Health Organization. May 23, 2022. Retrieved January 29, 2023.
- Cruz-Reyes, J. and Sollner-Webb, B. 1996. Trypanosome U-deletional RNA editing involves guide RNA-directed endonuclease cleavage, terminal U exonuclease, and RNA ligase activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Cruz-Reyes, J., Rusche, L.N., Piller, K.J., Sollner-Webb, B. 1998. *T. brucei* RNA Editing: Adenosine Nucleotides Inversely Affect U-Deletion and U-Insertion Reactions at mRNA Cleavage *Molecular Cell*, Vol. 1, 401–409.
- Currin, A., Swainston, N., Day, P.J., Kell D.B. 2015. Synthetic biology for the directed evolution of protein biocatalysts: navigating sequence space intelligently. *Chem. Soc. Rev.*N44:1172–1239. doi: 10.1039/C4CS00351A.
- Dai, X., Zhang, X., Ostrikov, K. and Abrahamyan, L. 2020. Host receptors: the key to establishing cells with broad viral tropism for vaccine production. *Crit. Rev. Microbiol.* 46, 147–168.
- Danthinne, X. and Imperiale, M.J. 2000. Production of first generation adenovirus vectors: a review. *Gene Ther.* 7, 1707–1714.
- Das, A.T. et al. 2004. Viral evolution as a tool to improve the tetracycline-regulated gene expression system. *J. Biol. Chem.* 279, 18776–18782.
- Davidson, N.O., Innerarity, T.L., Scott, J., Smith, H., Driscoll, D.M., Teng, B., Chan, L. 1995. Proposed nomenclature for the catalytic subunit of the mammalian apolipoprotein B mRNA editing enzyme: APOBEC-1 *RNA* (1):3.

- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C.M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z.A., Eckert, M.R., Vogel, J., and Charpentier, E. 2011. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* 471, 602–607.
- Devilder, M.C. et al. 2019. Ex vivo evolution of human antibodies by CRISPR-X: from a naive B cell repertoire to affinity matured antibodies. *BMC Biotechnol.* 19, 14.
- Dickinson, B.C., Packer, M.S., Badran, A.H. and Liu, D.R. 2014. A system for the continuous directed evolution of proteases rapidly reveals drug-resistance mutations. *Nat. Commun.* 5, 5352.
- Donovan, K.F. et al. 2017. Creation of novel protein variants with CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis: turning a screening by-product into a discovery tool. *PLoS ONE* 12, e0170445.
- Dougherty, M.J., Arnold, F.H. 2009. Directed evolution: new parts and optimized function. *Curr. Opin. Biotechnol.* 491. doi: 10.1016/j.copbio.2009.08.005.
- Drescher, A., Hupfer, H. Nickel, C. 2002. C-to-U conversion in the intercistronic *ndhI/ndhG* RNA of plastids from monocot plants: conventional editing in an unconventional small reading frame? *Mol Genet Genom.*
- Driscoll, D.M., Lakhe-Reddy, S., Oleksa, L.M., Martinez, D. 1993. Induction of RNA editing at heterologous sites by sequences in apolipoprotein B mRNA *Mol Cell Biol* (12):7288-94.
- Drummond, D.A. and Bloom, J.D. 2019. A Nobel Prize for evolution. *Evolution* 73, 630–631.
- Dy, R.L., Richter, C. Salmond, G.P.C., Fineran, P.C. 2014. Remarkable mechanisms in microbes to resist phage infections, *Annu. Rev. Virol*, 1, pp. 307-331
- East-Seletsky, A., O’Connell, M.R., Knight, S.C. 2016. Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2 enable guide-RNA processing and RNA detection. *Nature*.538(7624):270–273.
- Emery, C.M. et al. 2009. MEK1 mutations confer resistance to MEK and B-RAF inhibition. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 106, 20411–20416.
- English, J.G. et al. 2019. VEGAS as a platform for facile-directed evolution in mammalian cells. *Cell* 178, 748–761.
- Erdogan, M., Fabritius, A., Basquin, J. and Griesbeck, O. 2020. Targeted in situ protein diversification and intra-organelle validation in mammalian cells. *Cell Chem. Biol.* 27, 610–621.
- Esvelt, K.M., Carlson, J.C. and Liu, D.R. 2011. A system for the continuous directed evolution of biomolecules. *Nature* 472, 499–503.
- Farré, J.C., Akin, C., Araya, A., Castandet, B. 2012. RNA editing in mitochondrial trans-introns is required for splicing, *PLoS One*.

- Fichter, K.M., Setayesh, T., Malik, P. 2023. Strategies for precise gene edits in mammalian cells, molecular therapy nucleic acids.
- Forment, J.V. et al. 2017. Genome-wide genetic screening with chemically mutagenized haploid embryonic stem cells. *Nat. Chem. Biol.* 13.
- Francisco, J., Mojica, M., Rodriguez-Valera, F. 2016. The discovery of CRISPR in archaea and bacteria *FEBS J.* 283(17):3162-9. doi: 10.1111/febs.13766. Epub.
- Frangoul, H., Selim Corbacioglu 2021. CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and β -Thalassemia *New England Journal of Medicine*,
- Fritz, J., Strehblow, A., Taschner, A. 2009. RNA-regulated interaction of transportin-1 and exportin-5 with the double-stranded RNA-binding domain regulates nucleocytoplasmic shuttling of ADAR1. *Mol Cell Biol.* 1487–1497.
- Fry, L.E., Peddle, C.F., Barnard, A.R. 2020. RNA editing as a therapeutic approach for retinal gene therapy requiring long coding sequences. *Int J Mol Sci.* 777.
- Fu, Z., Zhang, X., Zhou, X. 2021. In vivo self-assembled small RNAs as a new generation of RNAi therapeutics. *Cell Res.* 631–648.
- Fukuda, M., Umeno, H., Nose, K. 2017. Construction of a guide-RNA for site-directed RNA mutagenesis utilising intracellular A-to-I RNA editing. *Sci Rep.* 41478.
- Garneau Josiane, E., Marie-Ève Dupuis, Manuela Villion, Dennis A. Romero, Rodolphe Barrangou, Patrick Boyaval, Christophe Fremaux, Philippe Horvath, Alfonso H. Magadán and Sylvain Moineau 2010. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA *Nature* volume 468, pages67–71.
- Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., and Siksnys, V. 2012. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Pnas* 109, E2579–E2586.
- Gaudelli, N. M. et al. 2017. Programmable base editing of A*T to G*C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature* 551, 464–471.
- Gaudelli, N. M. et al. 2020. Directed evolution of adenine base editors with increased activity and therapeutic application. *Nat. Biotechnol.* 38, 892–900.
- Gearing, M. 2020. CRISPR 101: RNA Editing with Cas13 July 31, addgene
- Georg,e C.X., Wagner, M.V., Samuel, C.E. 2005. Expression of interferon-inducible RNA adenosine deaminase ADAR1 during pathogen infection and mouse embryo development involves tissue-selective promoter utilization and alternative splicing. *J Biol Chem.* 280(15):15020–15028.
- Gerber, A., O'Connell, M.A., Keller, W. 1997. Two forms of human double-stranded RNA-specific editase 1 (hRED1) generated by the insertion of an Alu cassette RNA (5):453-63.

- Gott, J.M., Emeson, R.B. 2000. Functions and mechanisms of RNA editing *Annu Rev Genet.* 34:499-531.
- Gualberto, J.M., Lamattina, L. Bonnard, G. Weil, J.H. Grienenberger J.M. 1989. RNA editing in wheat mitochondria results in the conservation of protein sequences *Nature.*
- Gulei, D., Raduly, L., Berindan-Neagoie, I. 2019. CRISPR-based RNA editing: diagnostic applications and therapeutic options. *Expert Rev Mol Diagn.* 83–88.
- Handa, H. 2003. The complete nucleotide sequence and RNA editing content of the mitochondrial genome of rapeseed (*Brassica napus* L.): comparative analysis of the mitochondrial genomes of rapeseed and *Arabidopsis thaliana*, *Nucleic Acids Res.*
- Hanswillemenke, A., Kuzdere, T., Vogel, P. 2015. Site-directed rna editing in vivo can be triggered by the light-driven assembly of an artificial riboprotein. *J Am Chem Soc.*137(50):15875–15881.
- Hayashi, Y., Aita, T., Toyota, H., Husimi, Y., Urabe, I., Yomo, T. 2006. Experimental rugged fitness landscape in protein sequence space. *PLoS One.* doi: 10.1371/journal.pone.0000096.
- He, B., Peng, W., Huang, J., Zhang, H., Zhou, Y., Yang, X., Liu, J., Li, Z., Xu, C., Xue, M. 2020. Modulation of metabolic functions through Cas13d-mediated gene knockdown in liver. *Protein Cell.* doi: 10.1007/s13238-020-00700-2.
- Helgstrand, C., Grahn, E., Moss, T. 2002. Investigating the structural basis of purine specificity in the structures of MS2 coat protein RNA translational operator hairpins. *Nucleic Acids Res.*(12):2678–2685.
- Herwig, L. et al. 2017. Directed evolution of a bright near-infrared fluorescent rhodopsin using a synthetic chromophore. *Cell Chem. Biol.* 24, 415–425.
- Hess, G.T. et al. 2016. Directed evolution using dCas9-targeted somatic hypermutation in mammalian cells. *Nat. Methods* 13, 1036–1042.
- Hiesel, R., Wissinger, B. Schuster, W. 1989. Brennicke RNA editing in plant mitochondria *Science.*
- Hille, H., Richter, S.P., Wong, M., Bratovič, S., Ressel, Charpentier, E. 2018. The biology of CRISPR-Cas: backward and forward *Cell.*
- Hough, R.F., Bass, B.L. 1997. Analysis of *Xenopus* dsRNA adenosine deaminase cDNAs reveals similarities to DNA methyltransferases *RNA.*(4):356-70.
- Hsu, P.D., Lander, E.S. Zhang F. 2014. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering *Cell.*
- Huang, X., Lv, J., Li, Y. 2020. Programmable C-to-U RNA editing using the human APOBEC 3A deaminase. *EMBO J.*(22):e104741.

- Huynh, N., Depner, N., Larson, R., King-Jones, K. 2020. A versatile toolkit for CRISPR-Cas13-based RNA manipulation in *Drosophila*. *Genome Biol.*;21:279. doi: 10.1186/s13059-020-02193-y.
- Ipsaro, J.J. et al. 2017. Rapid generation of drug-resistance alleles at endogenous loci using CRISPR–Cas9 indel mutagenesis. *PLoS ONE* 12, e0172177.
- Italia, J. S. et al. 2020. Genetically encoded protein sulfation in mammalian cells. *Nat. Chem. Biol.* 16, 379–382.
- Jain, M., Mann, T.D., Stulic, M. 2018. RNA editing of Filamin A pre-mRNA regulates vascular contraction and diastolic blood pressure. *EMBO J.*(19):e94813.
- Jiang, X., Liu, B., Nie, Z., Duan, L., Xiong, Q., Jin, Z. 2021. The Role of m6A Modification in the Biological Functions and Diseases. *Sig Transduct Target. Ther.* 6, 74. doi:10.1038/s41392-020-00450-x
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*.337(6096):816–821.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., and Charpentier, E. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816–821.
- Jo, D.H., Koo, T., Cho, C.S., 2019. Long-term effects of in vivo genome editing in the mouse retina using campylobacter jejuni cas9 expressed via adeno-associated virus. *Mol Ther.*(1):130–136.
- Johnson, D.F., Poksay, K.S., Innerarity, T.L. 1993. The mechanism for apo-B mRNA editing is deamination *Biochem Biophys Res Commun.* 30;195(3):1204-10.
- Kable, M.L., Heidmann, S., Stuart, K.D. 2000. Sequence bias in edited kinetoplastid RNAs. *RNA.*; 6(11): 1492–1497.
- Kable, M.L., Seiwert, S.D., Heidmann, S., Stuart, K. 1996. RNA editing: a mechanism for gRNA-specified uridylyate insertion into precursor mRNA *Science.* 30;273(5279):1189-95.
- Kachroo, A.H. et al. 2015. Systematic humanization of yeast genes reveals conserved functions and genetic modularity. *Science* 348, 921–925.
- Kannan, S., Altae-Tran, H., Jin, X., Madigan, V. J., Oshiro, R., Makarova, K. S., et al. 2021. Compact RNA Editors with Small Cas13 Proteins. *Nat. Biotechnol.* doi:10.1038/s41587-021-01030-2
- Karin, M., Cao, Y., Greten, F.R., Li, Z.W. 2002. NF- κ B in cancer: From innocent bystander to major culprit. *Nat. Rev. Cancer.*301–310. doi: 10.1038/nrc780.
- Keegan, L.P., Gallo, A., O'Connell M.A. 2001. The many roles of an RNA editor *Nat Rev Genet*, 2001

- Kellner, M.J., Koob, J.G., Gootenberg, J.S., Abudayyeh, O.O., Zhang, F. 2020. SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases. *Nat Protoc* 15:1311.
- Knie, N., Grewe F., Fischer S., Knoop V. 2016. Reverse U-to-C editing exceeds C-to-U RNA editing in some ferns – a monilophyte-wide comparison of chloroplast and mitochondrial RNA editing suggests independent evolution of the two processes in both organelles, *BMC Evol Biol*.
- Knott, G.J., J.A. Doudna, 2018. CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering, *Science*, 361, pp. 866-869
- Kojima, S., Koyama, S., Ka, M., Saito, Y., Parrish, E.H., Endo, M., Takata, S., Momozawa, Y. and Parrish, N.F. 2023. Mobile element variation contributes to population-specific genome diversification, gene regulation and disease risk *Nature Genetics* volume 55, pages939–951.
- Kondrashov, D.A., Kondrashov, F.A. 2016. Topological features of rugged fitness landscapes in sequence space. *Trends Genet.*31:24–33. doi: 10.1016/j.tig.2014.09.009.
- Konermann, S., Lotfy, P., Brideau, N. J., Oki, J., Shokhirev, M. N., and Hsu, P. D. 2018. Transcriptome Engineering with RNA-Targeting Type VI-D CRISPR Effectors. *Cell* 173, 665–676. doi:10.1016/j.cell.
- Konermann, S., Lotfy, P., Brideau, N.J. 2018. Transcriptome Engineering with RNA-Targeting Type VI-D CRISPR Effectors. *Cell*.173(3):665–76.e14.
- Konermann, S., Lotfy, P., Brideau, N.J., Oki, J., Shokhirev, M.N., Hsu, P.D. 2018. Transcriptome engineering with RNA-targeting type VI-D CRISPR effectors. *Cell*.173:665–676. doi: 10.1016/j.cell.
- Kurt, I.C. et al. 2021. CRISPR C-to-G base editors for inducing targeted DNA transversions in human cells. *Nat. Biotechnol.* 39, 41–46.
- Lai, F, Chen CX, Carter KC, Nishikura K. 1997. Editing of glutamate receptor B subunit ion channel RNAs by four alternatively spliced DRADA2 double-stranded RNA adenosine deaminases *Mol Cell Biol*. 1997 May;17(5):2413-24.
- Lau, P.P., Xiong, W.J., Zhu, H.J., Chen, S.H., Chan, L. 1991. Apolipoprotein B mRNA editing is an intranuclear event that occurs posttranscriptionally coincident with splicing and polyadenylation. *Journal of Biological Chemistry* Volume 266, Issue 30, Pages 20550-20554
- Lau, P.P., Zhu, H.J., Baldini, A., Charnsangavej, C., Chan, L. 1994. Dimeric structure of a human apolipoprotein B mRNA editing protein and cloning and chromosomal localization of its gene. *PNAS* August 30, 91 (18) 8522-8526
- Limback, P.A., Crain, P.F., McCloskey, J.A. 1994. Summary: the modified nucleosides of RNA *Nucleic Acids Res.* 22(12):2183-96.

- Lomeli, H., Mosbacher, J., Melcher, T., Höger, T., Geiger, JR., Kuner, T., Monyer, N., Higuchi, M., Bach, A., Seeburg, P.H. 1994. Control of kinetic properties of AMPA receptor channels by nuclear RNA editing *Science* 266(5191):1709-13.
- Los, G.V., Encell, L.P., McDougall, M.G. 2008. HaloTag: a novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis. *ACS Chem Biol.*3(6):373–382.
- Ma, Y. et al. 2016. Targeted AID-mediated mutagenesis (TAM) enables efficient genomic diversification in mammalian cells. *Nat. Methods* 13, 1029–1035.
- Maas, S., Melcher, T., Herb, A., Seeburg, P.H., Keller, W., Krause, S., Higuchi, M., O'Connell, M.A. 1996. Structural requirements for RNA editing in glutamate receptor pre-mRNAs by recombinant double-stranded RNA adenosine deaminase *J Biol Chem.* 271(21):12221-6.
- Maas, S., Rich, A., Nishikura K. 2003. A-to-I RNA editing: recent news and residual mysteries *J Biol Chem.*
- MacGinnitie, A.J., Anant, S., Davidson N.O. 1995. Mutagenesis of apobec-1, the Catalytic Subunit of the Mammalian Apolipoprotein B mRNA Editing Enzyme, Reveals Distinct Domains That Mediate Cytosine Nucleoside Deaminase, RNA Binding, and RNA Editing Activity *Journal of Biological Chemistry* VOLUME 270, ISSUE 24, P14768-14775.
- Madison-Antenucci, S., Grams, J., Hajduk, S.L. 2002. The Complexities of Trypanosome RNA Editing *VOLUME 108, ISSUE 4, P435-438.*
- Mahas, A., Aman, R., Mahfouz, M. 2019. CRISPR-Cas13d mediates robust RNA virus interference in plants. *Genome Biol.*20:263. doi: 10.1186/s13059-019-1881-2.
- Mahon, M. J. 2011. Vectors bicistronically linking a gene of interest to the SV40 large T antigen in combination with the SV40 origin of replication enhance transient protein expression and luciferase reporter activity. *Biotechniques* 51, 119–128.
- Makarova, K.S., Grishin, N.V., Shabalina, S.A., Wolf, Y.I., Koonin, E.V. 2006. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biology Direct*, 1:7.
- Makarova, K.S., Y.I. Wolf, J. Iranzo, S.A. Shmakov, O.S. Alkhnbashi, S.J.J. Brouns, E. Charpentier, D. Cheng, D.H. Haft, P. Horvath, S. Moineau, F.J.M. Mojica, D. Scott, S.A. Shah, V. Siksny, 2020. Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of Class 2 and derived variants, *Nat. Rev. Microbiol*, 18, pp. 67-83
- Makarova, Y.I. Wolf, O.S. Alkhnbashi, F. Costa, S.A. Shah, S.J. Saunders, R. Barrangou, S.J.J. Brouns, E. Charpentier, D.H. Haft, P. Horvath, S. Moineau, F.J.M. Mojica, R.M. Terns, Terns 2015. An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems, *Nat. Rev. Microbiol*, 13, pp. 722-736

- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E., Norville, J.E., and Church, G.M. 2013. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339, 823–826.
- Marraffini, L.A., and Sontheimer, E.J. 2008. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science* 322, 1843–1845.
- McCloskey, J.A., Crain, P.F. 1998. The RNA modification database—*Nucleic Acids Research*, Volume 26, Issue 1, Pages 196–197
- McDermott, M. et al. 2014. In vitro development of chemotherapy and targeted therapy drug-resistant cancer cell lines: a practical guide with case studies. *Front. Oncol.* 4, 40.
- Melcher, T., Maas, S., Herb, A., Sprengel, R., Higuchi, M., Seeburg, P.H. 1996. RED2, a brain-specific member of the RNA-specific adenosine deaminase family *J Biol Chem.*271(50):31795-8.
- Melcher, T., Maas, S., Herb, A., Sprengel, R., Seeburg, P.H., Higuchi, M.A. 1996. mammalian RNA editing enzyme *Nature* volume 379, pages460–464.
- Meng, Y., Chen, D., Jin, Y., Mao, C., Wu, P., Chen, M. 2010. RNA editing of nuclear transcripts in *Arabidopsis thaliana*, *BMC Genomics*, 2010
- Merkle, T., Merz, S., Reautschnig, P. 2019. Precise RNA editing by recruiting endogenous ADARs with antisense oligonucleotides. *Nat Biotechnol.*;37(2):133–138.
- Miller, S.M. et al. 2020. Continuous evolution of SpCas9 variants compatible with non-G PAMs. *Nat. Biotechnol.* 38, 471–481.
- Miton, C.M., Tokuriki, N. 2016. How mutational epistasis impairs predictability in protein evolution and design. *Protein Sci.* 1260–1272. doi: 10.1002/pro.2876.
- Mojica, F.J., Díez-Villaseñor, C. Soria, E., Juez, G. 2000. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria *Mol Microbiol.*36(1):244-6. doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.01838.x.
- Mojica, F.J.M., ez-Villase D., García-Martínez, J.S. and Soria, E. 2005. Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. *J Mol Evol* 60, 174–182.
- Montiel-Gonzalez, M.F., Quiroz, J.F.D., Rosenthal, J.J.C. 2018. Current strategies for Site-Directed RNA Editing using ADARs. *Cell*
- Montiel-Gonzalez, M.F., Vallecillo-Viejo, I., Yudowski, G.A. 2013. Correction of mutations within the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by site-directed RNA editing. *Proc Natl Acad Sci U S A.*110(45):18285–18290.

- Moore, C.L., Papa, L.J. and Shoulders, M.D.A. 2018. processive protein chimera introduces mutations across defined DNA regions in vivo. *J. Am. Chem. Soc.* 140, 11560–11564.
- Mullick, A. et al. 2006. The cumate gene-switch: a system for regulated expression in mammalian cells. *BMC Biotechnol.* 6, 43.
- Murugan, K., Babu, R., Sundaresan, R., Rajan, D.G. 2017. The revolution continues: newly discovered systems expand the CRISPR-Cas toolkit, *Mol. Cell*, 68 2017, pp. 15-25
- Muteeb, G. and Sen, R. 2010. Random mutagenesis using a mutator strain. *Methods Mol. Biol.* 634, 411–419.
- Nair, J.K., Willoughby, J.L., Chan, A. 2014. Multivalent N-acetylgalactosamine-conjugated siRNA localizes in hepatocytes and elicits robust RNAi-mediated gene silencing. *J Am Chem Soc.*136(49):16958–16961.
- Nakajima, S., Kitamura, M. 2013. Bidirectional regulation of NF- κ B by reactive oxygen species: A role of unfolded protein response. *Free Radic. Biol. Med.*65:162–174. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.
- Navaratnam, N., Fujino, T., Bayliss, J., Jarmuz, A., How, A., Richardson, N., Somasekaram, A., Bhattacharya, S., Carter, C., Scott, J. 1998. Escherichia coli cytidine deaminase provides a molecular model for ApoB RNA editing and a mechanism for RNA substrate recognition 1 Edited by A. R. Fersht *Journal of Molecular Biology* 275 695 - 714
- Navaratnam, N., Morrison, J.R., Bhattacharya, S., Patel, D., Funihashi, T., Giannoni, F., Teng, B.B., Davidson, N.O., Scott, J. 1993. The p27 catalytic subunit of the apolipoprotein B mRNA editing enzyme is a cytidine deaminase. *Journal of Biological Chemistry* Volume 268, Issue 28, Pages 20709-20712
- Nhan Huynh, Noah Depner, Raegan Larson, Kirst King-Jones 2020. A versatile toolkit for CRISPR-Cas13-based RNA manipulation in Drosophila *Genome Biology* volume 21, Article number: 279.
- Nishikura, K. 2010. Functions and regulation of RNA editing by ADAR deaminases. *Annu Rev Biochem.*79(1):321–349.
- Nishimasu Hiroshi, F Ann Ran, Patrick D Hsu, Silvana Konermann, Soraya I Shehata, Naoshi Dohmae, Ryuichiro Ishitani, Feng Zhang, Osamu Nureki 2014. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA *Cell*;156(5):935-49. doi: 10.1016/j.cell.2014.02.001. Epub.
- Nose, K., Hidaka, K., Yano, T. 2020. Short-chain guide RNA for site-directed A-to-I RNA editing. *Nucleic Acid Ther.*31(1):58–67.
- Notsu, Y., Masood, S., Nishikawa, T. 2002. The complete sequence of the rice (*Oryza sativa* L.) mitochondrial genome: frequent DNA sequence acquisition and loss during the evolution of flowering plants *Mol Genet Genom.*

- Odegard, V.H. and Schatz, D.G. 2006. Targeting of somatic hypermutation. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 573–583.
- Öhman Marie, Bass Brenda L. 2001. RNA editing, *RNA*.
- Özcan, A., Krajewski, R., Ioannidi, E., Lee, B., Gardner, A., Makarova, K.S., Koonin, E.V., Abudayyeh, O.O., Gootenberg, J.S. 2021. Programmable RNA targeting with the single-protein CRISPR effector Cas7-11 *Nature*. Sep;597(7878):720-725. doi: 10.1038/s41586-021-03886-5. Epub. PMID: 34489594.
- Pandita, D., Puli, C.O.R. and Palakolanu, S.R. 2021. CRISPR/Cas13: A Novel and Emerging Tool for RNA Editing in Plants *RNA-Based Technologies for Functional Genomics in Plants*.
- Park, H. and Kim, S. 2021. Gene-specific mutagenesis enables rapid continuous evolution of enzymes in vivo. *Nucleic Acids Res.*
- Pavri, R. and Nussenzweig, M.C. 2011. AID targeting in antibody diversity. *Adv. Immunol.* 110, 1–26.
- Peaston, A.E. and Whitelaw, E. 2006. Epigenetics and phenotypic variation in mammals *Mamm Genome*.17(5): 365–374.
- Peck, S.H., Chen, I. and Liu, D.R. 2011. Directed evolution of a small-molecule-triggered intein with improved splicing properties in mammalian cells. *Chem. Biol.* 18, 619–630.
- Pecori, R., Di Giorgio, S., Lorenzo, J.P. and Papavasiliou, F.N. 2022. Functions and consequences of AID/APOBEC-mediated DNA and RNA deamination *Nature Reviews Genetics* volume 23, pages505–518.
- Pickar-Oliver, A. and Gersbach, C.A. 2019. The next generation of CRISPR–Cas technologies and applications. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20, 490–507.
- Piller, K.J., Rusche, L.N., Cruz-Reyes, J., Sollner-Webb, B. 1997. Resolution of the RNA editing gRNA-directed endonuclease from two other endonucleases of *Trypanosoma brucei* mitochondria *RNA*.3(3):279-90.
- Polson, A.G., Crain, P.F., Pomerantz, S.C., McCloskey, J.A., Bass, B.L. 1991. The mechanism of adenosine to inosine conversion by the double-stranded RNA unwinding/modifying activity: a high-performance liquid chromatography-mass spectrometry analysis *Biochemistry*.30(49):11507-14
- Polson, A.G., Bass, B.L. 1994. Preferential selection of adenosines for modification by double-stranded RNA adenosine deaminase *EMBO J.* ;13(23):5701-11.
- Polson, A.G., Bass, L.B., Casey, J.L. 1996. RNA editing of hepatitis delta virus antigenome by dsRNA-adenosine deaminase *Nature* 380(6573):454-6. doi: 10.1038/380454a0.
- Polson, A.G., Ley, H.L., Bass, B.L., Casey, J.L. 1998. Hepatitis delta virus RNA editing is highly specific for the amber/W site and is suppressed by

hepatitis delta antigen *Mol Cell Biol.*18(4):1919-26. doi: 10.1128/MCB.18.4.1919.

- Pourcel, C., Salvignol, G., and Vergnaud, G. 2005. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology* 151, 653–663.
- Povolotskaya, I.S., Kondrashov, F.A. 2010. Sequence space and the ongoing expansion of the protein universe. *Nature.*465:922–926. doi: 10.1038/nature09105.
- Powell, L.X.I., Wallis, S.C., Pease, R.J., Edwards, Y.H., Knott, T.J., Scott, J. 1987. A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine *Cell* 50(6):831-40. doi: 10.1016/0092-8674(87)90510-1.
- Qu, L., Yi, Z., Zhu, S. 2019. Programmable RNA editing by recruiting endogenous ADAR using engineered RNAs. *Nat Biotechnol.*37(9):1059–1069.
- Ragu, S., Matos-Rodrigues, G., Thomas, M., Lopez, B.S. 2021. Homologous recombination in mammalian cells: From molecular mechanisms to pathology *Genome Stability Volume 26 in Translational Epigenetics*, Pages 367-392
- Rauch, S., He, E., Srienc, M. 2019. Programmable RNA-guided RNA effector proteins built from human parts. *Cell.*178(1):122–34.e12.
- Ravikumar, A., Arzumanyan, G.A., Obadi, M.K.A., Javanpour, A.A. and Liu, C.C. Scalable 2018. Continuous evolution of genes at mutation rates above genomic error thresholds. *Cell* 175, 1946–1957.
- Rebagliati, M.R., Melton, D.A. 1987. Antisense RNA injections in fertilized frog eggs reveal an RNA duplex unwinding activity *Cell* 48(4):599-605. doi: 10.1016/0092-8674(87)90238-8.
- Richter, M.F. et al. 2020. Phage-assisted evolution of an adenine base editor with improved Cas domain compatibility and activity. *Nat. Biotechnol.* 38, 883–891.
- Romero, P.A., Arnold. F.H. 2009. Exploring protein fitness landscapes by directed evolution. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*10:866–876. doi: 10.1038/nrm2805.
- Romero, P.A., Krause, A., Arnold, F.H. 2013. Navigating the protein fitness landscape with Gaussian processes. *PNAS.* 110:E193–E201. doi: 10.1073/pnas.1215251110.
- Ruud Jansen, Jan D A van Embden, Wim Gaastra, Leo M. 2002. Schouls Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes *Mol Microbiol.* 43(6):1565-75. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x.
- Sabatini, R., Hajduk, S.L. 1995. RNA ligase and its involvement in guide RNA/mRNA chimera formation. Evidence for a cleavage-ligation mechanism of *Trypanosoma brucei* mRNA editing *J Biol Chem.* 270(13):7233-40. doi: 10.1074/jbc.270.13.7233.

- Sailer, Z.R., Harms, M.J. 2018. Uninterpretable Interact. Epistasis Uncertainty.:78489. doi: 10.1101/378489.
- Sanchez, A., Lukwiya, M., Bausch, D., Mahanty, S., Sanchez, A.J., Wagoner, K.D., Rollin, P.E. 2004. Analysis of human peripheral blood samples from fatal and nonfatal cases of Ebola (Sudan) hemorrhagic fever: cellular responses, virus load, and nitric oxide levels. *J Virol* 78:10370–10377.
- Sansbury, B.M., Hewes, A.M. and Kmiec, E.B. 2019. Understanding the diversity of genetic outcomes from CRISPR–Cas generated homology-directed repair. *Commun. Biol.* 2, 458.
- Sapranaukas, R., Gasiunas, G., Fremaux, C., Barrangou, R., Horvath, P., and Siksnys, V. 2011. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucl. Acids Res.* 39, gkr606–gkr9282.
- Scharner, J., Aznarez, I. 2021. Clinical applications of single-stranded oligonucleotides: current landscape of approved and in-development therapeutics. *Mol Ther.*29(2):540–554.
- Seeburg, P.H.J. 1996. The role of RNA editing in controlling glutamate receptor channel properties *J Neurochem.*66(1):1-5. doi: 10.1046/j.1471-4159.1996.66010001.x.
- Seiwert, S.D., Heidmann, S., Stuart, K. 1996. Direct visualization of uridylyate deletion in vitro suggests a mechanism for kinetoplastid RNA editing *Cell* 22;84(6):831-41. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81062-4.
- Seiwert, S.D., Heidmann, S., Stuart, K. 1996. Direct Visualization of Uridylyate Deletion In Vitro Suggests a Mechanism for Kinetoplastid RNA Editing Cell.
- Shah, R.R., Knott, T.J., Legros, J.E., Navaratnum, N., Greeve, J.C., Scott, J. 1991. Sequence requirements for the editing of apolipoprotein B mRNA. *Journal of Biological Chemistry* Volume 266, Issue 25, Pages 16301-16304
- Shalem Ophir, Neville E Sanjana, Ella Hartenian, Xi Shi, David A Scott, Tarjei Mikkelsen, Dirk Heckl, Benjamin L Ebert, David E Root, John G Doench, Feng Zhang 2014. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells *Science* 343(6166):84-87. doi: 10.1126/science.1247005. Epub..
- Shmakov, S., Abudayyeh, O.O., Makarova, K.S., Wolf, Y.I., Gootenberg, J.S., Semenova, E., Minakhin, L., Joung, J., Konermann, S., Severinov, K., Zhang, F., Koonin, E.V. 2015. Discovery and functional characterization of diverse class 2 CRISPR-Cas systems *Mol. Cell* 60, 385.
- Shmakov, S., Smargon, A., Scott, D. 2017. Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol.*(3):169–182.
- Shmakov, S., Smargon, A., Scott, D., Cox, D., Pyzocha, N., Yan, W., Abudayyeh, O.O., Gootenberg, J.S., Makarova, K.S., Wolf, Y.I. 2017. Diversity and evolution of class 2 CRISPR–Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.*15:169–182. doi: 10.1038/nrmicro.2016.184.

- Sinnamon, J.R., Kim, S.Y., Corson, G.M. 2017. Site-directed RNA repair of endogenous Mecp2 RNA in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 114(44):E9395–E402.
- Sinnamon, J.R., Kim, S.Y., Fisk, J.R. 2020. In vivo repair of a protein underlying a neurological disorder by programmable RNA editing. *Cell Rep.* 32(2):107878.
- Smargon, A.A., Cox, D.B.T., Pyzocha, N.K. 2017. Cas13b Is a Type VI-B CRISPR-Associated RNA-Guided RNase Differentially Regulated by Accessory Proteins Csx27 and Csx28. *Mol Cell.*65(618–30.e7):618–630.e7.
- Smargon, A.A., Shi, Y.J., Yeo, G.W. 2020. RNA-targeting CRISPR systems from metagenomic discovery to transcriptomic engineering *Nat. Cell Biol.* 143.
- Stafforst, T., Schneider, M.F. 2012. An RNA–desaminase conjugate selectively repairs point mutations. *Angew Chem.*51(44):11166–11169.
- Storz, J.F. 2018. *Current Opinion in Structural Biology, Carbohydrates Sequences and Topology.* Vol. 50. Compensatory mutations and epistasis for protein function; pp. 18–25.
- Stroppe, A.S., Latifi, N., Hanswillemenke, A., 2021. Harnessing self-labeling enzymes for selective and concurrent A-to-I and C-to-U RNA base editing. *Nucleic Acids Res.*49(16):e95–e95.
- Teng, B., Burant, C.F., Davidson, N.O. 2013. Molecular cloning of an apolipoprotein B messenger RNA editing protein *Science* 260(5115):1816-9. doi: 10.1126/science.8511591.
- Thiel, V., Herold, J., Schelle, B. and Siddell, S. G. 2001. Infectious RNA transcribed in vitro from a cDNA copy of the human coronavirus genome cloned in vaccinia virus. *J. Gen. Virol.* 82, 1273–1281.
- Tim, W., Wei, J.J., Sabatini, D.M., Lander, E.S. 2014. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system *Science* 343(6166):80-4. doi: 10.1126/science.1246981. Epub 2013 Dec 12.
- Ting Zhou, Mengqi Huang, Jinqiong Lin, Ru Huang, and Da Xing 2021. High-Fidelity CRISPR/Cas13a trans-Cleavage-Triggered Rolling Circle Amplified DNAzyme for Visual Profiling of MicroRNA, *Anal. Chem.*93, 4, 2038–2044
- Tohama, T., Sakari, M., Tsukahara, T. 2020. Development of a single construct system for site-directed RNA editing using MS2-ADAR. *Int J Mol Sci.*21(14):4943.
- Tracewell, C.A., Arnold, F.H. 2009. Directed enzyme evolution: climbing fitness peaks one amino acid at a time. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13:3–9. doi: 10.1016/j.cbpa.2009.01.017.
- Uil, T.G. et al. 2011. Directed adenovirus evolution using engineered mutator viral polymerases. *Nucleic Acids Res.* 39, e30.

- Vallecillo-Viejo, I.C., Liscovitch-Brauer, N., Montiel-Gonzalez, M.F. 2018. Abundant off-target edits from site-directed RNA editing can be reduced by nuclear localization of the editing enzyme. *RNA Biol.* 15(1):104–114.
- Villette, V. et al. 2019. Ultrafast two-photon imaging of a high-gain voltage indicator in awake behaving mice. *Cell* 179, 1590–1608.
- Visintin, M., Tse, E., Axelson, H., Rabbitts, T. H. and Cattaneo, A. 1999. Selection of antibodies for intracellular function using a two-hybrid in vivo system. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96, 11723–11728.
- Vogel, P., Stafforst, T. 2019. Critical review on engineering deaminases for site-directed RNA editing. *Curr Opin Biotechnol.* 55:74–80.
- Vogel, P., Hanswillemenke, A. Stafforst T. 2017. Switching protein localization by site-directed RNA editing under control of light *ACS Synth Biol.*
- Vogel, P., Moschref, M., Li, Q. 2018. Efficient and precise editing of endogenous transcripts with SNAP-tagged ADARs. *Nat Methods.* 15(7):535–538.
- Vogel, P., Schneider, M.F., Wettengel, J. 2014. Improving site-directed rna editing in vitro and in cell culture by chemical modification of the guiderna. *Angew Chem.*;53(24):6267–6271.
- Vogel, P., Stafforst T. 2014. Site-directed RNA editing with Antagomir Deaminases - a tool to study protein and RNA function *Chem Med Chem.*
- Wang, C.L., Harper, R. A. and Wabl, M. 2004. Genome-wide somatic hypermutation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101, 7352–7356.
- Wang, L., Jackson, W.C., Steinbach, P.A. and Tsien, R.Y. 2004. Evolution of new nonantibody proteins via iterative somatic hypermutation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101, 16745–16749.
- Wang, T., Badran, A.H., Huang, T.P. and Liu, D.R. 2018. Continuous directed evolution of proteins with improved soluble expression. *Nat. Chem. Biol.* 14, 972–980.
- Wettengel, J., Reautschnig, P., Geisler, S. 2017 Harnessing human ADAR2 for RNA repair - Recoding a PINK1 mutation rescues mitophagy. *Nucleic Acids Res.* 45:2797–2808.
- Wilson, C., Chen, P.J., Miao, Z., and Liu, D.R. 2020. Programmable m6A Modification of Cellular RNAs with a Cas13-Directed Methyltransferase. *Nat. Biotechnol.* 38, 1431–1440. doi:10.1038/s41587-020-0572-6
- Wong, T.S., Wong, T.S., Roccatano, D., Schwaneberg, U. 2007. Challenges of the genetic code for exploring sequence space in directed protein evolution. *Biocatal Biotransformation.* 25:229–241. doi: 10.1080/10242420701444280.
- Woolf, T.M. 1998. Therapeutic repair of mutated nucleic acid sequences. *Nat Biotechnol.* 16(4):341–344.

- Woolf, T.M., Chase, J.M., Stinchcomb, D.T. 1995. Toward the therapeutic editing of mutated RNA sequences. *Proc Nat Acad Sci*.92(18):8298.
- Wu, B., Chen, H., Shao, J., Zhang, H., Wu, K., Liu, C. 2017. Identification of symmetrical RNA editing events in the mitochondria of *Salvia miltiorrhiza* by strand-specific RNA sequencing, *Sci Rep*.
- Xinxin Huang, Junjun Lv, Yongqin Li, Shaoshuai Mao, Zhifang Li, Zhengyu Jing, Yidi Sun, Xiaoming Zhang, Shengxi Shen, Xinxin Wang, Minghui Di, Jianyang Ge, Xingxu Huang, Erwei Zuo, Tian Chi. 2020. Programmable C-to-U RNA editing using the human APOBEC3A deaminase, *The EMBO Journal* 39:e104741
- Xu, C., Zhou, Y., Xiao, Q., He, B., Geng, G., Wang, Z., 2021. Programmable RNA Editing with Compact CRISPR-Cas13 Systems from Uncultivated Microbes. *Nat. Methods* 18, 499–506. doi:10.1038/s41592-021-01124-4
- Xu, P., Liu, Z., Liu, Y., Ma, H., Xu, Y., Bao, Y. 2021. Genome-wide Interrogation of Gene Functions through Base Editor Screens Empowered by Barcoded sgRNAs. *Nat. Biotechnol.* 39, 1403–1413. doi:10.1038/s41587-021-00944-1
- Xu, Q., Zhang, X., Sanchez, G.J., Ramirez, A.T. and Liu, X. 2022. Cell type-specific intercellular gene transfer in mammalian cells via transient cell entrapment *Cell Discovery* volume 8, Article number: 20.
- Yamanaka, S., Poksay, K.S., Arnold, K.S., Innerarity, T.L. 1997. A novel translational repressor mRNA is edited extensively in livers containing tumors caused by the transgene expression of the apoB mRNA-editing enzyme *Genes Dev* 11(3):321-33. doi: 10.1101/gad.11.3.321.
- Yan, W.X., Chong, S., Zhang, H., Makarova, K.S., Koonin, E.V., Cheng, D.R., Scott, D.A. 2018. Cas13d is a compact RNA-targeting type VI CRISPR effector positively modulated by a WYL-domain-containing accessory protein. *Mol. Cell.* 70:327–339. doi: 10.1016/j.molcel.2018.02.028.
- Yoshinaga, K. 1996. Extensive RNA editing of U to C in addition to C to U substitution in the *rbcL* transcripts of hornwort chloroplasts and the origin of RNA editing in green plants, *Nucleic Acids Res*.
- Yoshizumi, I., Krupovic, M., Forterre, P. 2018. History of CRISPR-Cas from Encounter with a Mysterious Repeated Sequence to Genome Editing Technology *J Bacteriol.* ;200(7):e00580-17. doi: 10.1128/JB.00580-17. Print.
- Young, S.G., Bertics, S.J., Scott, T.M., Dubois, B.W., Curtiss, L.K., Witztum, J.L. 1986. Parallel expression of the MB19 genetic polymorphism in apoprotein B-100 and apoprotein B-48. Evidence that both apoproteins are products of the same gene *J Biol Chem* 261(7):2995-8.
- Zhang, F., Cong, L., Lodato, S., Kosuri, G.M., Church, P. 2011. Arlotta Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription *Nat Biotechnol*.

Zhao, L., Qiu, M., Li, X., Yang, J. and Licorresponding, J. 2022. CRISPR-Cas13a system: A novel tool for molecular diagnostics, *Front Microbiol.* 13: 1060947.