

Erdoğan Özgür, Sinem Dinçol Özgür, Erkut Yılmaz ve Adil Denizli

Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü

# Genom Düzenleme Teknolojisi

Canlı organizmaların (insan, hayvan, bitki ya da bakteri vs.) hemen hemen tüm hücreleri, bir nesilden diğerine geçerken aktarılan bir molekül olan DNA'yı içermektedir. DNA, hücrelerin oluşumu, sayı ve türlerinin kontrolü, enerji üretimi, metabolizmanın düzenlenmesi ve hastalıklarla mücadele gibi bir çok temel biyolojik süreçte görev almaktadır.

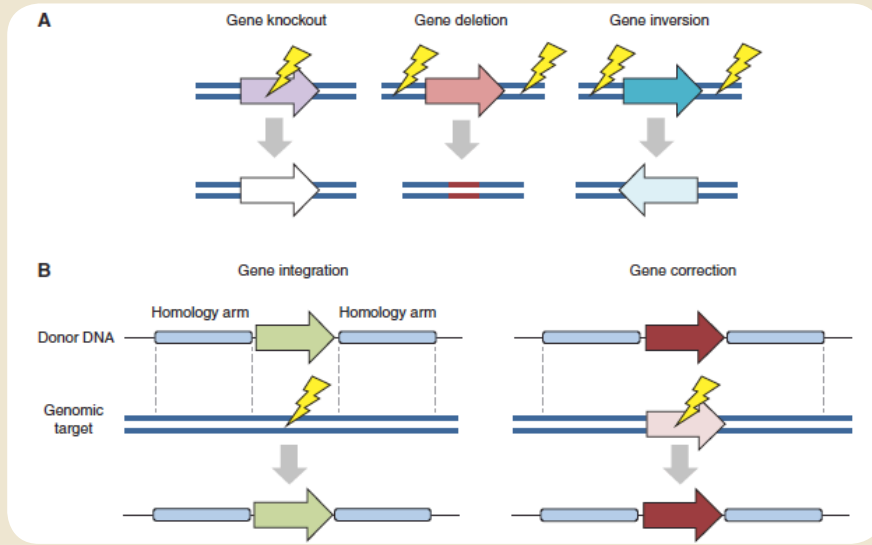
Genom terimi, genel olarak bir organizmanın DNA dizisinin tamamına atıfta bulunmaktadır. Genom, birçok biyolojik aktivitenin gerçekleşmesi için gerekli olan proteinlerin üretiminde rolü olan spesifik DNA sekansları olan genleri ve aynı zamanda gen aktivitesini destekleyen ya da inhibe eden ve protein üretimini ya da görevini etkilemeyen DNA bölgeleri içermektedir.

Genom düzenleme, geniş spektrumda hücre tiplerinin ve organizmaların hedeflenmiş genomik bölgelerinin (seçilmiş bir DNA sekansının) spesifik olarak değiştirilmesi prensibine dayanmaktadır. Genom düzenleme teknikleri, bir organizmanın genomdaki DNA'sında hedeflenmiş değişiklikler yapmak üzere moleküler makas olarak tabir edilen restriksiyon enzimleri gibi işlev gören "tasarlanmış nükleazlar" adı verilen enzimlerin kullanıldığı yöntemlerdir. Tasarlanmış nükleazlar, seçilmiş bir DNA sekansına yönlendirilerek hedeflenen bu bölgede çift zincir kırığı (ing. double-strand breaks (DSBs)) oluşturmaktadır. Onarılmaması halinde ölümcül olan DSBs hücrel DNA onarım mekanizmalarını aktivasyonu yönlendirmekte ve bölgeye spesifik genomik modifikasyonların uygulanmasını kolaylaştırmaktadır. Homolog olmayan rekombinasyon (nonhomologous end joining-(NHEJ)) ve homoloji yönlendirmeli tamir (homology directed repair-(HDR)) tasarlanmış nükleazlar ile oluşturulmuş DSBs'lerin onarımı için ökaryotik hücrelerin izlediği iki onarım mekanizmasıdır. Organizmaların belirlenmiş genomik bölgelerinde hedeflenen mutasyonu oluşturmak için, istenilen DNA dizisinin ilavesini sağlamak veya hatalı olan gen dizilerini düzeltilmek (gen tedavisi) amacıyla, genom düzenleme teknikleri ile hedeflenen bölgede çift sarmal

## "CRISPR, TALEN Ve ZNF Teknikleri İle Genom Düzenleme!"

kırık oluşturulmasını takiben (in vitro ve in vivo) hücreye dışarıdan gönderilen donör DNA parçası aracılığı ile tamir sürecinde, homolog rekombinasyon (HR) gerçekleştirilmektedir. Hücreye dışarıdan verilen donör DNA parçasının bulunmadığı durumlarda, hataya çok daha açık bir çift zincir DNA hasarı tamiri seçeneği olan NHEJ mekanizması izlenir. NHEJ, nükleaz aktivitesi ile kırılan fosfodiester bağlarını (kırılan kromozom sonlarını) tekrar bir araya getirecek kırık DNA parçalarını birleştirir (Şekil 1).





**Şekil 1.** Genom düzenleme mekanizmaları. homolog olmayan rekombinasyon (NHEJ) ve homoloji yönlendirmeli tamir (HDR).

Genom düzenleme tekniklerinin gelişimi Şekil 2’de kısaca özetlenmiştir. Günümüzde en yaygın kullanılan genom düzenleme teknikleri kümelenmiş düzenli aralıklı kısa palindromik yinelemeler (ing. clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-CRISPR-associated protein 9 (Cas9)), transkripsiyon aktivatörü benzeri efektör nükleaz (ing. transcription activator-like effector nucleases (TALENs)), çinko parmak nükleazlar (ing. zinc-finger nucleases (ZFNs)), ve meganükleazlardan (ing. homing endonucleases or meganucleases) (Şekil 3) yararlanmaktadır.

Meganükleazlar, ZFNs ve TALENs’ların sekans tanıma özgünlükleri protein-DNA etkileşimleri ile oluşmaktadır. Meganükleazlar çeşitli sekansları hedef alsalarda, yeni sekansları hedef alan ve ayrılmamış DNA-bağlama ve bölünme alanlarını gerektiren mühendislik, bu nükleazların geniş uygulamalarını sınırlamaktadır.

#### ZFN’ler ve TALEN’ler ile Hedef Özgünlüğünün Mühendisliği

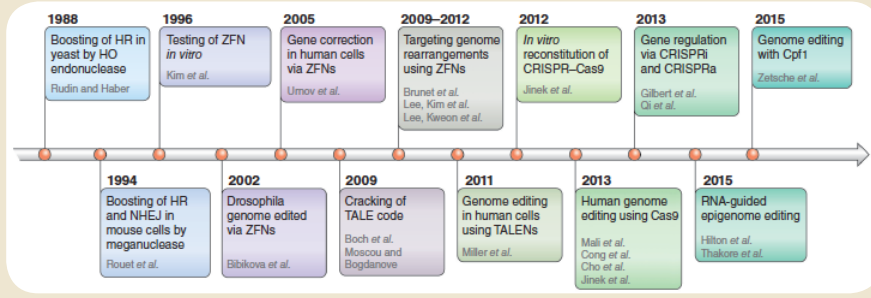
FokI restriksiyon enziminin DNA’ya bağlanan bölgesinin ve DNA kesim nükleaz bölgelerinin birbirinden ayrımının başarılması akıllarda yeni bir sekans spesifik nükleaz elde edilebilir mi sorusunu canlandırmış ve FokI nükleaz bölgesine çinko parmak proteinleri bağlanmasıyla oluşturulan ZFNs’ler ile

hedef DNA sekansın spesifik olarak kesimi 1996 yılında Chandrasegaran ve ekibi tarafından başarılmıştır. Bu gelişmeler sonrasında oluşturulan ZFN’ler Drosophila embriyolarına enjekte edilmiş ve böylelikle bir canlıda in vivo ortamda genom düzenlenmesi başarılmıştır. Bundan sonraki birbirinden bağımsız farklı çalışmalarda bitki, hayvan ve insanlarda hedeflenen genlerin modifikasyonunda ZFN’lar kullanılmıştır. Başarılı bir genom düzenleme tekniği olan ZFNs kullanılarak HIV virüsü taşıyan 12 hastada yapılan düzenleme ile hastaların etkin ve güvenilir bir şekilde HIV virüsüne dirençli hale getirildiği, 2014 yılında The New England Journal of Medicine’da yayınlanan bir makalede insanlarda ilk defa gen düzenleme tekniği kullanıldığı rapor edilmiştir. Ancak, hücre düzeyinde in vivo olarak ZFN aracılı başarılı genom düzenlemeleri yapıldıysa da ZFN’ların hedef özgünlüğü hakkında şüphelerin giderilememesi ve önceden belirlenmiş çinko bölgeleri kullanarak oluşturulan ZFNs’ler hedef hücrelerde sekans benzerliği gösteren hedef dışı sekansları kestüğinden dolayı sitotoksik bir etki göstermesi araştırmacıları ZFNs’lerin özgünlüğünün ve aktivitesinin geliştirilmesine yönlendirmiştir.

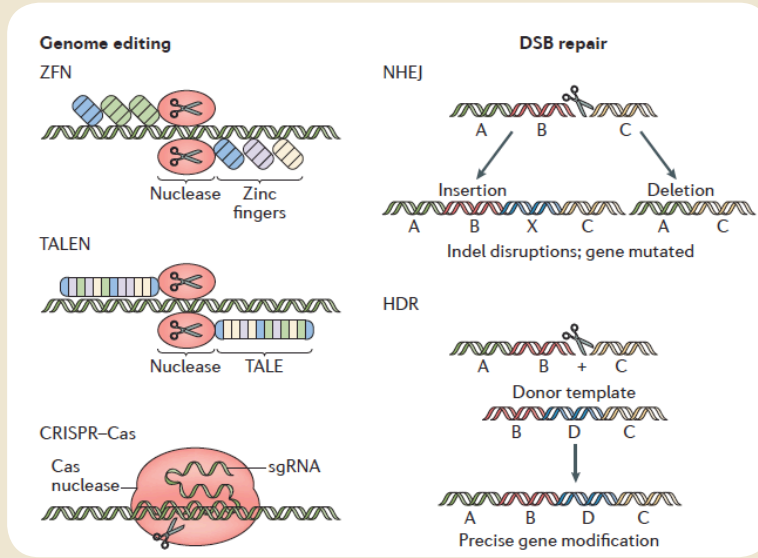
Nitekim sitotoksosite probleminin çözümü hiç beklenmedik bir kaynaktan gelmiştir, Xanthomonas’dan (bakteriyel bitki

patojeni). Iowa State Üniversitesi’nden Adam Bogdanove’nin yönettiği ve Martin Luther Üniversitesi’nden Ulla Bonas and Jens Boch’un yönettiği birbirinden bağımsız iki araştırma grubu 2009 yılında Xanthomonas türetilmiş transkripsiyon aktivatör benzeri efektör proteinlerin (TALE) DNA ile etkileşim mekanizmasını aydınlatmışlardır. Çinko parmak proteinlerinin aksine, TALE proteinlerindeki her bir tekrarlayan bölüm tek bir bazı ayırt edebilmektedir. Dört farklı tekrarlayan bölge, FokI bölgesine bağlanarak TALENs isimli DNA’ya bağlanan yeni bir programlanabilen nükleaz protein grubunun oluşturulması için birbiriyle eşleştirilmiştir. TALENs’ler insan hücrelerinde minimal sitotoksosite göstermiştir. Çeşitli gruplar, TALEN kodlayan plazmidlerin birleştirilmesini kolaylaştırmak için yöntemler geliştirmeleri, TALENs’leri genom düzenleme teknolojisinde ön sıralara yerleştirmiştir. Ancak, CRISPR-Cas9’un gelişimi, hakimiyetlerinin kısa ömürlü olmasını sağlamıştır.

HIV taşıyan hastalar üzerinde yapılan ilk genom düzenleme çalışmasının liderlerinden immünoterapi uzmanı Carl June 2017 yılının başlarında farklı kanser türlerinde genom düzenleme tekniği ile ABD’de klinik denemelere başlayacaklarını ifade etmektedir.



Şekil 2. Genom düzenleme tekniklerinin gelişimin zaman tüneli.



Şekil 3. Genom düzenleme teknolojileri, çinko parmak nükleazlar (ZFNs) (i), transkripsiyon aktivatörü benzeri efektör nükleaz (TALENs) (ii), kümelenmiş düzenli aralıklı kısa palindromik yinelemeler (CRISPR-Cas 9) (iii).

Buna paralel olarak 2017 yılının Mart ayında Çin'in Pekin Üniversitesinde genom düzenleme tekniği ile mesane, prostat ve renal-hücreli kanserlere yönelik klinik uygulamalara geçileceği bildirilmiştir.

### CRISPR-Cas9 ile RNA Temelli Genom Düzenleme

Geçtiğimiz günlerde, farelerdeki HIV virüsünün yok edilmesi ve yine kanser tedavisi çalışmalarında kullanılarak adından söz ettiren CRISPR, mümkün bir tedavi yöntemi olarak nitelemek çok şu an için çok erken olsa da, pek çok bilim insanı için son zamanlarda gerçekleştirilen en önemli buluşlardan biridir.

Haziran 2012'de CRISPR-Cas9'un *in vitro* olarak yeniden oluşturulması ve Ocak 2013'te insan hücrelerinde Cas9'un aracılık ettiği genom düzenlemelerinin elde edilen veriler, genom düzenlemede

yeni bir başlangıcı işaret etmiştir. ZNFs ve TALENs'lerin aksine, yeni tasarlanmış RNA güdümlü endonükleazlar (RGENs) ayrıntılı protein mühendisliğine olan gereksinimi ortadan kaldırmıştır. Böylelikle, RGENs hızlıca en tercih edilen genom düzenleme aracı olmuştur, ZNFs ve TALENs'leri geride bırakarak. CRISPR tekniği; genomun çeşitli kısımlarına ekleme, çıkarma ya da DNA diziliminde değişim yapmaya imkân sağlayan özgün bir tekniktir.

Rochester Tıp Merkezi Üniversitesi'nden bir grup araştırmacı, CRISPR genom düzenleme tekniğini kullanarak, kanser hücrelerinin kontrolsüz bir şekilde yayılmasında anahtar rol oynayan bir proteinin etkisini bertaraf etmek için kullandılar. Çalışma kendi türünde bir ilk olsa da araştırmacılar, hastalığı tedavi etmek için kullanılacak terapilere entegre edilebilir.

Kanser oluşumunu pek çok farklı etken (genellikle çevresel ve genetik etkenlerin kombinasyonu) tetiklese de bütün kanser çeşitleri kontrol edilemez hücre büyümesiyle yayılırlar. Bunun önüne geçmek için araştırmacılar, bu bölünme işleminde önemli rol oynayan Tudor-SN adı verilen bir proteini hücreden çıkartmayı başardılar. İşlem sonucunda, hücrelerin artık daha önceki hızlarında bölünmeyi başaramadıkları görüldü. Araştırmacılar çalışma sonuçlarını Science dergisinde yayınlanan bir makale ile açıkladılar.

Yine de, CRISPR-Cas9'un yüksek ökaryotik hücrelerdeki özgünlüğü, insan hücrelerinde ciddi hedef dışı etkilerin bulunmadığını destekleyen ilk kanıtlara rağmen tartışmalıdır. ZNFs ve TALENs'lerdeki FokI nükleaz bölgeleri yalnızca bu dimerize olduğunda hedef DNA'yı kesmesi artan hedef özgünlüğü

ile sonuçlanmaktayken, Cas9 monomerik formda işlev görmektedir. Ayrıca, CRISPR-Cas9 prokaryot orijinli olup, fajlar gibi hiper değişken istilacı genetik elementlere karşı uyarlanabilir bir bağışıklık sistemi olarak işlev görmektedir. ZFNs ve TALENs'ların aksine Cas9 proteininin yüksek ökaryotik hücrelerde bilinen fonksiyonlarının olmaması ve ökaryotik hücrelerin genomun devasa büyüklüğü Cas9 nükleazların düşük sekans özgünlüğünün bu hücrelerde hedef dışı dizileri kesebilme ihtimali, araştırmacıları Cas9 proteininin genom üzerindeki hedef bölgeleri belirlerken özgünlüğünü arttıracak yöntemlere yöneltmiştir.

### CRISPR-Cas9 Tekniğinde Hedef Dışı Etkilerle Mücadele

Çift zincirli DNA kırıkları oluşturan nükleazların yerine tek zincirli DNA kırıkları oluşturan (SSBs) nikazların ile hedef dışı DNA bölünmeleri önlenebilmektedir. Bir çinko parmak nikazı (ZFNickase) biri vahşi tip FokI bölgesi ve diğeri kataklitik olarak inaktif olan FokI mutant bölgesi içeren iki alt birimden oluşmaktadır. Benzer şekilde, her biri ya Watson ya da Crick DNA zincirini parçalayan iki aktif bölge içeren Cas9, aktif bölgesindeki anahtar aminoasit kalıntısının alanin kalıntısı ile yer değiştirilmesi ile bir nikaza dönüştürülebilir. SSBs'ler, hata yapmaya açık NHEJ tarafından tamir edilemez, ancak HR'ler tarafından tamir edilebilir olması hassas genom modifikasyonlarına olanak vermektedir. Bununla birlikte, SSB tamir etkinliği DSB onarımından daha düşük bir oranda olması genom düzenleme teknolojisinde nikazların kullanımını sınırlamaktadır. Bu kısıtlamanın üstesinden gelmek için her biri iki DNA zincirinden birini iki bitişik yerde kesen bir çift nikaz genom düzenleme etkinliğini ve özgünlüğünü artırmak için birleşik DSB üretebilir. Hedef dışı SSB'ler endojen SSB tamir enzimleri tarafından verimli ve başarılı bir şekilde onarılmasıyla, Cas9 nükleazlar tarafından indüklenen hedef dışı mutasyonları Cas9 nikazlar tarafından oluşturulmazlar. Önemli olan, hedef dışı etkilerin azaltılması için geliştirilen bu

yöntem programlanabilir nükleazların gen tedavisinde kullanımını önünü açmıştır.

### Programlanabilir Nükleazlar ve Gensiz Gen Tedavisi

2012 yılında Barbas grubu, saflaştırılmış rekombinant ZFN proteinlerinin intrinsik hücre penetrasyon yeteneklerine sahip olduğunu ve ZFN proteinlerinin doğrudan hücrelere verilmesinin hedef dışı etkileri ZFN proteinlerinin hücre içerisinde sahip oldukları kısa yarı ömre sahip olmasından dolayı azalttığı saptanmıştır. Bu çalışmadan esinlenen araştırmacılar, rekombinant Cas9 rehber-RNA ribonükleoproteinleri (RNP) olduğu gibi hayvan embriyolarına, bitkilere ve memeli hücrelerine aktarmışlardır. Cas9 RNPLerin hücrelerde çabucak parçalanması ve bu hedef dışı etkilerinin azalmasını sağlamıştır.

Genom düzenleme uygulamalarının çoğu insan hastalıklarının modellerini araştırmak gibi bilimsel araştırmaları kapsamakla birlikte, bu tekniğin potansiyel uygulamaları sadece bir araştırmadan çok ileridir. Bakteri, bitki, hayvan ya da insanda olsun, genom düzenlemesi herhangi bir DNA sekansını değiştirme potansiyeline sahip olduğu göz önüne alındığında, canlılarda neredeyse sınırsız olası uygulama alanları vardır. Çeşitli türlerin genomlarında hedefli ve özel değişiklikler yapabilme kabiliyeti, daha kesin biyolojik sorular sormaya uygun hale getirmiştir ve "Genom Düzenleme" Nature Methods dergisi tarafından 2011 yılının tekniği seçilmiştir. Belki de bir genin veya proteinin fonksiyonu hakkında bilgi edinmenin en güvenilir yolu, spesifik olarak yapılarını bozmak ve onların izlemek olabileceği ifade edilmiştir.

Genom düzenleme tekniklerinin araştırma alanları ve muhtemel uygulamaları;

-Bitki ve hayvancılık (verimi arttırmak, hastalıklara ve zararlılara karşı direnç geliştirmek, farklı çevre koşullarına tolerans sağlamak)  
-Endüstriyel biyoteknoloji ("üçüncü kuşak" biyoyakıtlar geliştirmek ve kimyasallar,

malzemeler ve ilaçlar üretmek)

-Biyotıp (farmasötik gelişme, xenotransplantasyon, gen ve hücre bazlı tedaviler, böcek kaynaklı hastalıkların kontrolü)

-Reprodüksiyon (hastalık özelliklerinin kalıtsallığını önleme)

Birkaç yıl öncesine kadar sadece sınırlı sayıda laboratuvarında uygulanan ve geliştirilen genom düzenleme çalışmaları, günümüzde biyomedikal alanındaki araştırmalarda rutin bir yöntem haline almıştır. Tıp ve biyoteknoloji alanındaki araştırmalarda büyük vaatler sunan genom düzenleme teknolojisi toplumda büyük ilgi uyandırmasının yanında bazı endişeleri de beraberinde getirmektedir. Gelecekte bitkiler, hayvanlar ve insanlar da dahil olmak üzere birçok canlı genomunda düzenlemeler ile hastalıklara yatkınlık gibi istenmeyen özelliklerin giderilebileceği ayrıca istenilen özelliklerin ise geliştirildiği bir dünyaya doğru ilerlememiz kaçınılmaz görünmektedir. Akademik araştırmalarda CRISPR-Cas9 tekniği daha fazla tercih edileceği ön görülse de, ZFNs ve TALENs de gelecek uygulama ve yeniliklerde rol alacaktır. Bugüne kadar, ZFNs ve TALENs insan klinik uygulamalarında başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Cas9 temelli deaminazlar veya Cpf1 nükleazları gibi yeni araçlar geliştirilmesi ile genom düzenleme teknolojisinin daha ileri boyutlara taşınması sağlanabilecektir.

### Kaynaklar

- [1] Cho, S.W. et al. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. Nat. Biotechnol. 31, 230-232 (2013).
- [2] Beumer. K.J. et al. Efficient gene targeting in Drosophila by direct embryo injection with zinc-finger nucleases, PNAS 105, 19821-19826 (2008).
- [3] Gaj, T. et al., Genome-Editing Technologies: Principles and Applications, Cold Spring Harb Perspect Biol 8, a023754 (2016).
- [4] Cong, L. et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science 339, 819-823 (2013).
- [5] Method of the Year 2011, Nature Methods, 9(1), editorial, (2012).

- [6] Mali, P. et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339, 823–826 (2013).
- [7] Maldarelli C. Scientists are using gene editing to try to slow cancer growth, *Popular Science*, (2017).
- Li, L. et al. S. Functional domains in Fok I restriction endonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 4275–4279 (1992).
- [8] Kim, Y.G. & Chandrasegaran, S. Chimeric restriction endonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 883–887 (1994).
- [9] Kim, H.J. et al. Targeted genome editing in human cells with zinc finger nucleases constructed via modular assembly. *Genome Res.* 19, 1279–1288 (2009).
- [10] Ramirez, C.L. et al. Unexpected failure rates for modular assembly of engineered zinc fingers. *Nat. Methods* 5, 374–375 (2008).
- [11] Kim, J.S. et al. Genome editing with modularly assembled zinc-finger nucleases. *Nat. Methods* 7, 91 (2010).
- [12] Kim, S. et al. Preassembled zinc-finger arrays for rapid construction of ZFNs. *Nat. Methods* 8, 7 (2011).
- [13] Miller, J.C. et al. An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nat. Biotechnol.* 25, 778–785 (2007).
- [14] Bhakta, M.S. et al. Highly active zinc-finger nucleases by extended modular assembly. *Genome Res.* 23, 530–538 (2013).
- [15] Sander, J.D. et al. Selection-free zinc-finger-nuclease engineering by context-dependent assembly (CoDA). *Nat. Methods* 8, 67–69 (2011).
- [16] Szczepek, M. et al. Structure-based redesign of the dimerization interface reduces the toxicity of zinc-finger nucleases. *Nat. Biotechnol.* 25, 786–793 (2007).
- [17] Gupta, A. et al. An optimized two-finger archive for ZFN-mediated gene targeting. *Nat. Methods* 9, 588–590 (2012).
- [18] Moscou, M.J. et al. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science* 326, 1501 (2009).
- [19] Boch, J. et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* 326, 1509–1512 (2009).
- [20] Miller, J.C. et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat. Biotechnol.* 29, 143–148 (2011).
- [21] Tebas, P. et al. Gene Editing of CCR5 in Autologous CD4 T Cells of Persons Infected with HIV, *The N Engl J Med*, 370, 901-910 (2014).
- [22] Cermak, T. et al. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res.* 39, e82 (2011).
- [23] Briggs, A.W. et al. Iterative capped assembly: rapid and scalable synthesis of repeat-module DNA such as TAL effectors from individual monomers. *Nucleic Acids Res.* 40, e117 (2012).
- [24] Reyon, D. et al. FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. *Nat. Biotechnol.* 30, 460–465 (2012).
- [[26] 25] Kim, Y. et al. A library of TAL effector nucleases spanning the human genome. *Nat. Biotechnol.* 31, 251–258 (2013).
- [27] Jinek, M. et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816–821 (2012).
- [28] Cho, S.W. et al. Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res.* 24, 132–141 (2014).
- [29] Mali, P. et al. CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nat. Biotechnol.* 31, 833–838 (2013).
- [30] Ramirez, C.L. et al. Engineered zinc finger nickases induce homology-directed repair with reduced mutagenic effects. *Nucleic Acids Res.* 40, 5560–5568 (2012).
- [31] Ran, F.A. et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell* 154, 1380–1389 (2013).
- [32] Kim, E. et al. Precision genome engineering with programmable DNA-nicking enzymes. *Genome Res.* 22, 1327–1333 (2012).
- [33] Gaj, T. et al. III. Targeted gene knockout by direct delivery of zinc-finger nuclease proteins. *Nat. Methods* 9, 805–807 (2012).
- [34] Cyranoski, D. CRISPR gene-editing tested in a person for the first time, *Nature*, (2016).
- [35] Elbarbary, R.A. et al. Tudor-SN-mediated endonucleolytic decay of human cell microRNAs promotes G1/S phase transition, *Science* 356, 859–862 (2017).