

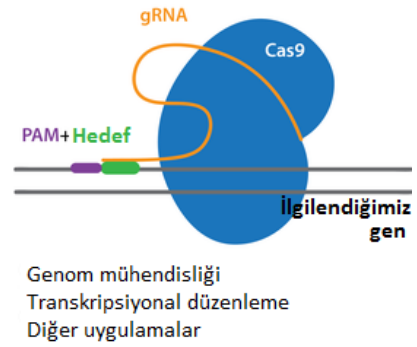
CRISPR-Cas9 Genom Düzenleme Rehberi

Enes Gültekin, Ay enur Saygılı, Ezgi Karaaslan, Sevim Gürbüz, Atife Nida Onur, Hikmet Geçkil
İnönü Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 44280 Malatya

Genel BakıŐ

Bakterilerde kazanılmıŐ bir baŐıŐıklık sistemi oluşturan Sınıf 2 KümelenmiŐ Düzenli Aralıklı Kısa Palindromik Tekrar (CRISPR) sistemleri, genom mühendisliği için modifiye edilmiŐtir. CRISPR'den önce, çinko parmak n kleazları (ZFN'ler) veya transkripsiyon aktivatör benzeri efektör nükleazlar (TALEN'ler) gibi genom mühendisliği yaklaŐımları, bilim insanlarının her genomik hedef için yeni bir nükleaz çifti tasarlamasını ve üretmesini gerektiriyordu. KarŐılaŐtırmalı, sadeliği ve uyarlanabilirliği sayesinde CRISPR hızla en popüler genom mühendisliği yaklaŐımını haline gelmiştir.

Tasarlanmış CRISPR sistemleri iki bileşen içerir: bir kılavuz (rehber) RNA (**gRNA veya sgRNA**) ve CRISPR ile ilişkili bir endonükleaz (**Cas proteini**). gRNA, bir iskele dizisinden oluşan kısa sentetik bir RNA'dır. Bu RNA'ya , kullanıcı tanımlı ~20 nükleotid uzunluğundaki bir **aralayıcı** eklenir ve aynı zamanda Cas enziminin bağlanması için gereklidir. Aralayıcı deĐiŐtirilecek genomik hedefi tanımlar. Böylece, gRNA'da mevcut olan hedef sekans (dizi) deĐiŐtirilerek, Cas proteininin genomik hedefi deĐiŐtirilebilir.



CRISPR baŐlangıçta çeşitli hücre tiplerinde ve organizmalarda hedef genleri çıkarmak için kullanıldı. Daha sonra CRISPR Cas9 sistemi, çeşitli Cas enzimlerindeki modifikasyonlarla hedef genleri seçici olarak aktive etmek / bastırmak, DNA'nın spesifik bölgelerini ve canlı hücrelerdeki DNA'yı görüntülemek ve saflaştırmak, DNA ve RNA'yı hassas bir Şekilde düzenlemek için geniŐletmiŐtir. Ayrıca, gRNA üretme kolaylığı CRISPR'ı en ölçeklenebilir genom düzenleme teknolojilerinden biri yapmıŐtır. Bu avantaj, CRISPR'ı genomu geniş çaplı taramalar için m kemmek kılar.

Bu rehber, temel CRISPR biyolojisinin anlaŐılmasını sağlayacak, CRISPR'ın çeşitli uygulamalarını tanıtacak ve kendi araştırmanızda CRISPR'ı kullanmaya baŐlamanıza yardımcı olacaktır.

CRISPR Kullanarak Nakavt Oluşturma

Cas9 veya Cas12a gibi bir endonükleaz ve hedeflenen gene özgü bir gRNA'yı birlikte eksprese ederek nakavt hücreler veya hayvanlar oluşturmak için CRISPR kullanabilirsiniz. Genomik hedef, iki durumu karŐılaması koŐuluyla herhangi bir ~20 nükleotidlik DNA dizisi olabilir:

Cas9 veya Cas12a (Cpf1 olarak da bilinir) gibi endonükleazları hedeflenen gene özgü bir gRNA ile birlikte ifade ederek nakavt hücreler veya hayvanlar oluŐturulabilir. Genomik hedef, iki koŐulu karŐılaması koŐuluyla herhangi bir ~20 nükleotid DNA dizisi olabilir:

1. Genomun geri kalanına kıyasla benzersiz bir ~20 nükleotid DNA dizisi

2. Hedef, bir Protospacer Adjacent Motifine (PAM, 2-6 bazlı bir çift DNA sekansı olan protospacer bitişik motif) hemen bitişik bulunur

PAM sekansı, Cas9 için bir bağlayıcı sinyal görevi görür, ancak kesin sekans, kullandığınız Cas9 proteinine bağlıdır. Burada, popüler olan *S. pyogenes* Cas9'u (SpCas9) örnek olarak kullanacağız. Ancak başka Cas9 proteinleri ve PAM dizileri de vardır. Bir kez ifade edildikten sonra, gRNA iskelesi ile Cas9 üzerinde yüzeye bakan pozitif yüklü oluklar arasındaki etkileşimler yoluyla Cas9 proteini ve gRNA bir ribonükleoprotein kompleksi oluşturur. gRNA bağlanması ile Cas9 yapısal bir değişikliğe uğrayarak, molekülü DNA'ya bağlanmayan inaktif formundan, aktif DNA bağlama formuna dönüşür. gRNA'nın aralayıcı bölgesi, DNA ile etkileşime girecek biçimde serbest halde bulunur.

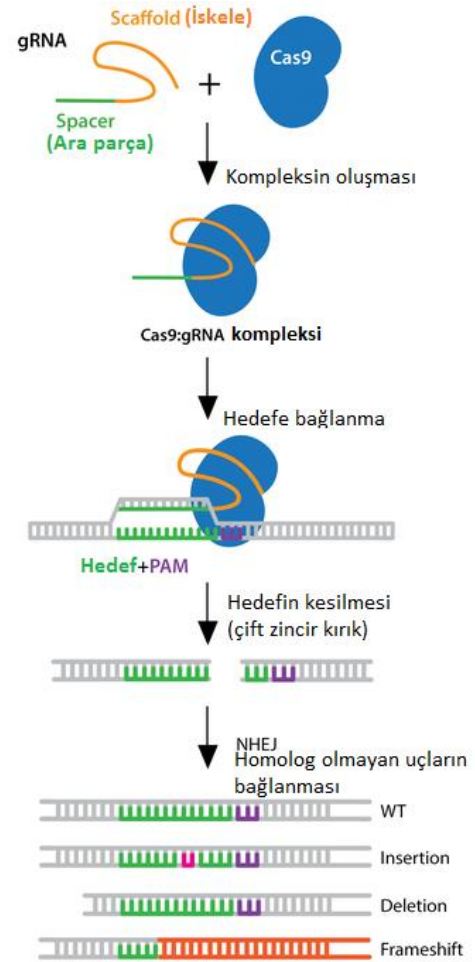
Cas9'un gRNA aralayıcı dizisi hedef DNA ile yeterli homoloji paylaşıyorsa belirli bir lokusu (bölgeyi) kesecektir. Cas9-gRNA kompleksi varsayılan bir DNA hedefini bağladıktan sonra, asıl dizi (gRNA hedefleme dizisinin 3 ucundaki 8-10 baz) hedef DNA ile eşleşir. Asıl dizi ve hedef DNA dizileri komplementerss, gRNA hedef DNA'ya 3' - 5' yönde birleşmeye devam edecektir. Bu nedenle, asıl dizinin 3' ucundaki hedef sekansındaki uyumsuzluklar hedefin kesilmesini ortadan kaldırırken, PAM'ın 5' ucuna doğru olan uyumsuzluklar hedefin kesilmesine izin verir.

Cas9 hedefe bağlandığında ikinci bir konformasyonel değişikliğe uğrar. Bu durum, RuvC ve HNH adı verilen nükleaz domaynlerinin hedef DNA'yı zıt zincirlerinden ayırmasına neden olur. Cas9 aracılı DNA ayırmanın nihai sonucu, hedef DNA içinde (PAM sekansının yukarısındaki ~3-4 nükleotidler) çift zincirli bir kırılmaya (DSB) sebep olur.

Elde edilen DSB daha sonra iki genel onarım yolundan biri ile onarılır:

1. Etkili fakat hataya meyilli "homolog olmayan uç birleştirme" (NHEJ) yolu
2. Daha az verimli ancak aslına uygun "homoloji odaklı onarım" (HDR) yolu

NHEJ onarım yolu en aktif onarım mekanizmasıdır ve sıklıkla DSB bölgesinde küçük nükleotid sokmalarına veya silmelerine (indeller) neden olur. NHEJ aracılı DSB onarımının rastgele olmasının önemli pratik sonuçları vardır. Çünkü Cas9 ve gRNA'yı ifade eden bir hücre popülasyonu çeşitli mutasyonlara neden olacaktır. Çoğu durumda NHEJ hedef DNA'da, hedeflenen genin açık okuma çerçevesi (ORF) içinde "erken stop kodonlarına", eklemelere veya çerçeve kayması mutasyonlarına ile sonuçlanan küçük indellere yol açarak amino asit delesyonlarına neden olur. İdeal sonuç, hedeflenen gen içindeki fonksiyon kaybına sebep olacak mutasyondur. Bununla birlikte, belirli bir mutant hücre için nakavt fenotipin gücü deneysel olarak doğrulanmalıdır.



Çentik Enzimleri (Nickaz) ve Yüksek Duyarlılıkta Enzimler ile Özgünlüğü Artırma

CRISPR spesifisitesi, gRNA hedefleme sekansının genomun geri kalanına kıyasla genomik hedef için ne kadar spesifik olduğuna göre belirlenir. İdeal olan, bir gRNA hedefleme dizisinin hedef DNA ile mükemmel bir homolojiye sahip olmasıdır. Bu homolojinin genomun başka bir yerinde olmaması gerekir. Ancak gerçekte belirli bir gRNA hedefleme dizisine genom boyunca kısmi homoloji gösteren hedef diziler de olacaktır. Bu bölgeler hedef dışı (off-target) olarak adlandırılır ve gRNA tasarlarken göz önünde bulundurulması gerekir.

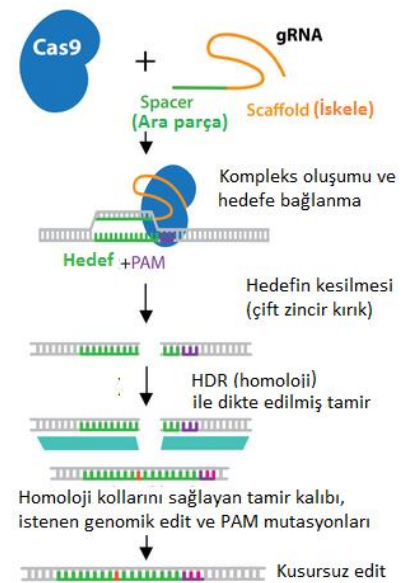
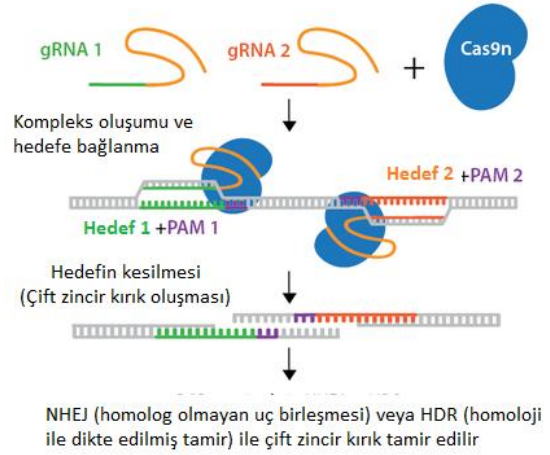
gRNA tasarımını optimize etmeye ek olarak, CRISPR özgüllüğü Cas9'daki modifikasyonlarla da artırılabilir. Daha önce tartışıldığı gibi, Cas9 iki nükleaz domeyninin (RuvC ve HNH) kombine aktivitesi yoluyla çift zincir kırar. SpCas9'un bir D10A mutanlığı olan Cas9 çentik atma enzimi, bir nükleaz domeynini muhafaza eder ve çift zincir kırık yerine bir DNA çentiği üretir.

Bu nedenle, hedef DNA içinde "çift zincir kırık" (DSB) oluşturmak için karşıt DNA ipliklerini hedefleyen iki çentik enzimi gereklidir. Çift çentik veya iki fonksiyonlu çentik enzimi CRISPR sistemi için gerekli hedef özgüllüğünü önemli ölçüde artırır. Çünkü, hedef dışı (off-target) iki hedefin çift zincir kırığına neden olacak kadar yakın olması olası değildir. Çentik atan enzim sistemi ayrıca spesifik gen düzenlemeleri için HDR aracılı gen düzenleme ile birleştirilebilir.

2015 yılında araştırmacılar yüksek hassasiyette iki Cas9 geliştirmek için rasyonel bir mutajenez kullandılar: eSpCas9 (1.1) ve SpCas9-HF1. eSpCas9 (1.1), HNH / RuvC oluğu ile hedef olmayan DNA ipliği arasındaki etkileşimi zayıflatan, iplik ayrılmasını ve hedef dışı bölgelerde kesmeyi önleyen alanın ikamelerini içerir. Benzer şekilde SpCas9-HF1, yapılan alanın ikameleriyle Cas9'un DNA fosfat omurgası ile etkileşimlerini bozar. Başka yüksek doğrulukta bir Cas9 olan HypaCas9, 2017'de geliştirildi. Bu Cas9 REC3 domeyninde hata düzeltme ve hedef ayrımcılığı arttıran mutasyonlar içeriyor. Üç yüksek doğrulukta enzimlerin tümü, yabancı tip Cas9'dan daha az hedef dışı (off-target) düzenlemelere sebep olur.

Homoloji Hedefli Tamir (HDR) Kullanarak Hassas Değişiklikler Yapma

NHEJ aracılı DSB onarımı genellikle genin açık okuma çerçevesini bozarken, homolojiye yönelik onarım (HDR) tek bir nükleotit değişikliğinden bir florofor veya etiket eklenmesi gibi büyük eklemelere kadar spesifik nükleotit değişiklikleri üretebilir.



Gen düzenlemede HDR'yi kullanmak için, istenen diziyi içeren bir DNA onarım şablonu, gRNA (lar) ve Cas9 veya Cas9 nikaz ile ilgilenilen hücre tipine iletilmelidir. Onarım şablonu, istenen düzenlemenin yanı sıra hedefin hemen yukarısında ve aşağısında ek homolog sekans içermelidir (sol ve sağ homoloji kolları olarak adlandırılır.) Her bir homoloji kolunun uzunluğu, eklenen değişikliğin boyutuna bağlıdır.

Uygulamaya bağlı olarak, onarım şablonu tek sarmallı bir oligonükleotit, çift sarmallı oligonükleotit veya çift sarmallı bir DNA plazmidi olabilir. Onarım şablonunu tasarlarken, genomik DNA'da bulunan PAM dizisini dahil etmeyin. Bu adım, onarım şablonunun Cas9 bölünmesi için uygun bir hedef olmasını önler. Örneğin, HDR şablonunuzdaki PAM sekansını, amino asit sekansını değiştirmeyen sessiz bir mutasyonla değiştirebilirsiniz.

HDR'nin verimliliği genellikle düşüktür (değiştirilmiş alellerin <math>< \% 10^1 </math>). Bu nedenle, birçok laboratuvar hücreleri senkronize ederek HDR'yi geliştirmeye çalışır, çünkü HDR hücre döngüsünün S ve G2 aşamalarında gerçekleşir. NHEJ'de yer alan kimyasal veya genetik olarak inhibe edici genler de HDR frekansını artırabilir. Ek olarak, çift zincirli kopmaları sağlayan bir protein olan ve Cas9 ve CtIP füzyonu olan Cas9-CtIP, HDR verimliliğinin artmasına katkıda bulunabilir.

Cas9 kesmesinin etkinliği nispeten yüksek olduğundan ve HDR'nin etkinliği nispeten düşük olduğundan, Cas9 ile indüklenen DSB'lerin büyük bir kısmı NHEJ yoluyla onarılacaktır. Başka bir deyişle, sonuçta elde edilen hücre popülasyonu, yabancı tip alellerin, NHEJ tamirli alellerin ve / veya arzu edilen HDR tarafından düzenlenen alelin bir kombinasyonunu içerecektir. Bu nedenle, istenen düzenlemenin varlığını deneysel olarak doğrulamak ve istenen düzenlemeyi içeren klonları izole etmek önemlidir.

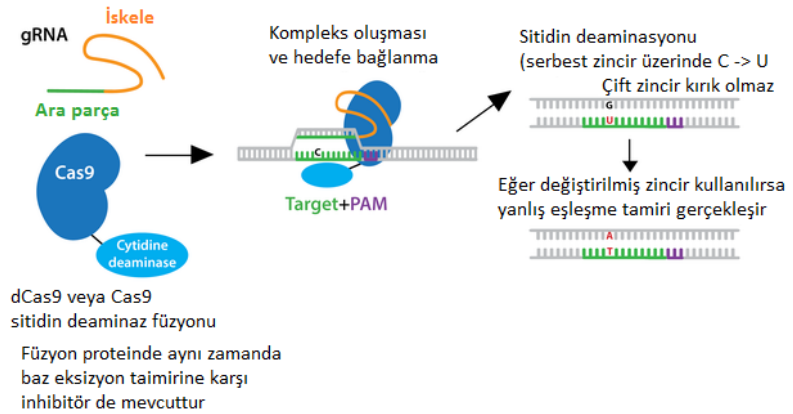
Çift Zincir Kırık Olmadan CRISPR Temel Düzenlemesi

Düşük HDR verimliliğinin üstesinden gelmek için, araştırmacılar iki sınıf temel düzenleyici geliştirdiler (sitozin baz editörleri CBE'ler ve adenin baz editörleri ABE'ler).

Sitozin baz editörleri, Cas9 nikazının veya katalitik olarak inaktif Cas9'un

(dCas9) APOBEC gibi bir sitidin deaminaza birleştirilmesi ile oluşturulur. Baz editörleri, bir gRNA tarafından belirli bir lokusa hedeflenir ve sitidin, PAM sitesinin yakınındaki küçük bir düzenleme penceresi içinde ürüdine dönüştürebilir. Üridin daha sonra baz eksizyon onarımı yoluyla timidine dönüştürülür ve C'den T'ye değişiklik (veya karşı zincirde bir G'den A'ya) oluşturulur.

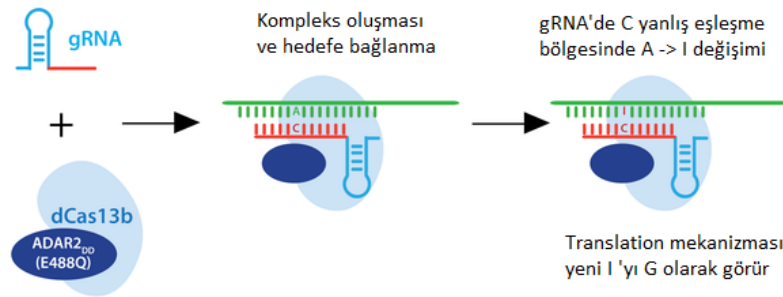
Benzer şekilde, adenosin baz editörleri, adenosini hücre tarafından guanozin gibi muamele edilen ve A'dan G'ye (veya T'den C'ye) bir değişiklik yaratan inozine dönüştürmek üzere tasarlanmıştır. Adenin DNA deaminazları doğada mevcut değildir, ancak bir tRNA adenin deaminaz olan *Escherichia coli* TadaA'nın yönlendirilmiş evrimi ile yaratılmıştır. Sitozin bazı editörleri gibi, gelişmiş TadaA alanı da adenin baz düzenleyicisini oluşturmak için bir Cas9 proteinine kaynaştırılır.



Her iki temel düzenleyici de yüksek kaliteli Cas9'lar da dahil olmak üzere birden çok Cas9 varyantı ile kullanılabilir. Füzyonların ekspresyonunu optimize ederek, düzenleme penceresini ayarlamak için Cas varyantı ve deaminaz arasındaki bağlayıcı bölgeyi modifiye ederek veya DNA glikosilaz inhibitörü (UGI) veya bakteriyofaj Mutasyonlu Gam gibi ürün saflığını arttıran füzyonlar ekleyerek başka ilerlemeler kaydedilmiştir.

Birçok baz editörü, PAM sekansının proksimalinde çok dar bir pencerede çalışacak şekilde tasarlanmış olsa da, baz düzenleme sistemlerinin bazıları daha geniş bir düzenleme penceresinde geniş bir tek nükleotid varyantı (somatik hipermutasyon) spektrumu oluşturur ve bu nedenle yönlendirilmiş evrim için çok uygundur uygulamalardır. Bu baz düzenleme sistemlerinin örnekleri arasında, Cas9'un aktivasyona bağlı sitidin deaminaz (AID) ile kaynaştırıldığı AID aracılı mutajenez (TAM) ve CRISPR-X yer alır.

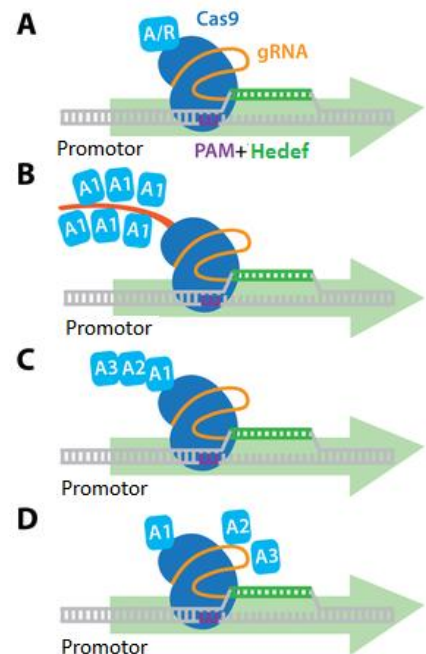
Diğer CRISPR sistemleri, özellikle Tip VI CRISPR enzimleri Cas13a / C2c2 ve Cas13b, DNA yerine RNA'yı hedef alır. RNA, ADAR2 (E488Q) üzerinde etkili olan bir adenosin deaminazın katalitik olarak inaktif Cas13b ile birleştirilmesi, adenosini RNA'da (REPAIR olarak adlandırılır) inozine dönüştüren programlanabilir bir RNA baz düzenleyicisi oluşturur. İnozin fonksiyonel olarak guanozine eşdeğer olduğundan, sonuç RNA'daki A-> G değişikliğidir. İkinci bir ADAR varyantı olan ADAR2'ye (E488Q / T375G) daylı editörler, gelişmiş özgüllük gösterir ve delta-984-1090 ADAR kesmesini taşıyan editörler, RNA düzenleme yeteneklerini korur ve AAV parçacıklarına paketlenen kadar küçüktürler.



CRISPR Kullanılarak Hedef Genlerin Aktivasyonu veya Bastırılması

CRISPR, genom değişikliği için oldukça tercih edilen yöntemlerden biridir, çünkü Cas enzimleri hedef DNA'yı parçalama işlemini bağımsız olarak gerçekleştirir. Özellikle hem RuvC hem de HNH nükleaz enzimleri, nokta mutasyonları (SpCas9'da D10A ve H840A) ile inaktif hale getirilebilir ve bu da hedef DNA'yı parçalayamayan inaktif bir nükleaz Cas9 (dCas9) molekülünü ortaya çıkarır. gRNA'yı hedeflenmiş DNA'ya bağlanma özelliğinden dCas9 molekülü korur.

İlk yapılan denemelerde, dCas9'un transkripsiyon başlangıç bölgelerine hedeflenmesiyle, o bölgeyi bloke ederek transkripsiyonu engellediği bilgisine ulaşıldı. dCas9, transkripsiyonel baskılayıcılar veya aktivatörler ile karıştırılabilirler. dCas9 füzyon proteinlerinin promotor



bölgesine hedeflenmesi, transkripsiyonel baskılayıcılara (CRISPR etkileşimi veya CRISPRi) karşı hedef genlerin aktivasyonu (CRISPRa) sonuçlanır. En basit dCas9 tabanlı aktivatörler ve baskılayıcılar, doğrudan tek bir transkripsiyonel aktivatöre (örn. VP64) veya baskılayıcıya (örn. KRAB; sağdaki panel A'ya) bağlanmış dCas9'dan oluşur.

dCas9, düzenli olarak birkaç farklı aktivasyon bölgesine eklenmiştir. dCas9 ayrıca, genom genelindeki taramalar için farelerde ve insan hücrelerinde gen ekspresyonunu aktive etmek veya genomu inaktif hale getirmek için kullanılmıştır.

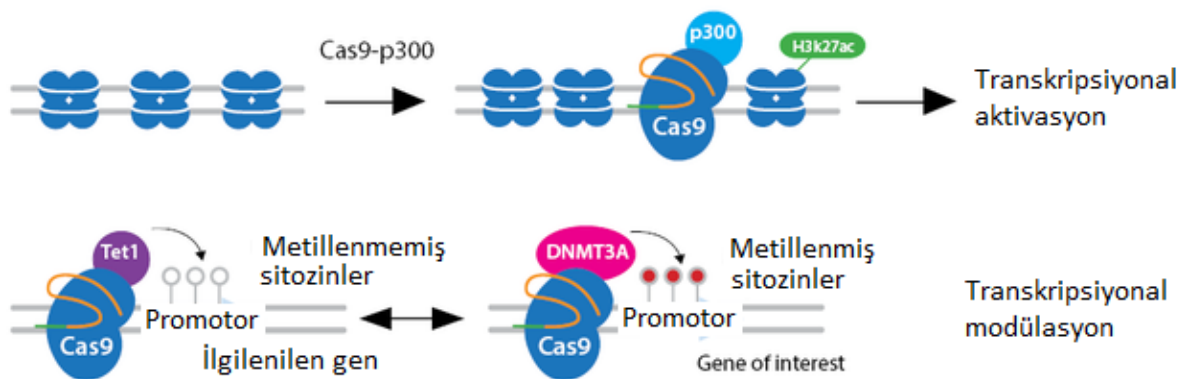
Bakteriyel çalışmada, dCas9 gibi moleküler DNA bağlanma bölgeleri birleştirildiğinde, etkili gen aktivatörlerinin bulunmaması nedeniyle gen ekspresyonunu aktive etmek oldukça zordur. Son zamanlarda, aktivasyon proteinlerini toplamak için gRNA ve bir RNA saç tokası içeren bir iskele RNA kullanılarak bakteriler için sentetik CRISPR-Cas gen aktivatörleri geliştirilmiştir.

CRISPRi, Mobile-CRISPRi adlı modüler bir sistem kullanılarak çeşitli bakteriyel türler için de uyarlanmıştır. Bu sistemde, CRISPRi'de konjugasyon kullanılarak bakterilerin içine ve kromozoma stabil bir şekilde entegre edilmesi sağlanır.

CRISPR Kullanarak Epigenetik Değişiklikler

İnaktif Cas enzimleri ile epigenetik, programlanabilir epigenom mühendislik araçları oluşturmak için p300, LSD1, MQ1 ve TET1 gibi değiştiricilerle birleştirilebilir. Bu araçlar, bir genin promotoründeki sitozinlerin metilasyon durumunu değiştirerek veya histon asetilasyonunu veya dimetilasyonu indükleyerek çift iplik kopmalarını indüklemeden gen ekspresyonunu değiştirir. CRISPR epigenetik araçları, araştırmacıların tek bir epigenetik işaretin etkilerini izole etmelerine izin veren belirli kromatin ve DNA modifikasyonları için spesifiktir.

CRISPR epigenetik değişimleri bir başka avantajı ise, kalıcı ve kalıtılır olmalarıdır. CRISPR aktivatörleri ve inaktivatörler, efektörü etkisiz hale getirilse veya sistemden çıkarılsa dahi tersinir olduğu düşünülmektedir. Buna karşılık, hedeflenen epigenetik modifiye ediciler tarafından bırakılan epigenetik işaretler, bu hücreler tarafından daha sık kalıtsal olabilir. Bazı durumlarda, oluşan epigenetik modifikasyon, modülasyon transkripsiyonunda aktivatörlerden veya baskılayıcılardan daha iyi çalışabilir. Ancak, bu işlemin etkileri büyük olasılıkla hücre türüne ve bağlama bağlıdır. Deney sisteminizi kurarken birden çok CRISPR stratejisi denemeniz yararlı olabilir.



CRISPR ile Multipleks Genom Mühendisliği

Aynı plazmidten birkaç gRNA eksprese edilmesi, plazmid içeren her hücrenin istenen gRNA'ların tümünü eksprese etmesini sağlar, böylece istenen tüm genomik düzenlemelerin Cas9 tarafından gerçekleştirilme olasılığını artırır. Bu tür multipleks CRISPR uygulamaları şunları içerir:

- Nakavt veya gen düzenlemesi oluşturmak için çift nickazların kullanımı
- İki gRNA hedef bölgesi arasındaki genomu silmek için Cas9 kullanma
- Aynı anda birden fazla geni değiştirme

Mevcut multipleks CRISPR sistemleri, araştırmacıların birden fazla gRNA'yı tek bir plazmide klonlayarak 2 ila 7 genetik lokusun herhangi bir yerini hedeflemelerini sağlar. Bu multipleks gRNA vektörleri, hedef genleri nakavt etmek, aktive etmek veya bastırmak için yukarıda belirtilen CRISPR türevlerinden herhangi biriyle birleştirilebilir ve yapılabilir. Cas9 ve Cas12a (Cpf1) çoğaltma hakkında daha fazla bilgi edinmekte fayda vardır.

CRISPR Kullanarak Genomu Görüntülemek

GRNA tasarımı ve sentezinin kolaylığı ve hemen hemen her genomik lokusu hedefleme özelliği, CRISPR'ı büyük ölçekli ileri genetik tarama için ideal bir genom mühendislik sistemi haline getirir. İleri genetik taramalar için, genetik nedenin bilinmediği hastalıkları veya fenotipleri incelemekte önemli bir adımdır. Genel olarak, genetik bir taramanın amacı, çok çeşitli genlerde mutasyon veya aktivasyon / inaktivasyon ile büyük bir hücre popülasyonu oluşturmak ve daha sonra bu hücreleri, istenilen bir fenotip ile sonuçlanan genetikteki değişimleri karşılaştırmak için kullanmaktır.

CRISPR'den önce, genetik taramalar hedef genlerin eksik parçalanması nedeniyle hedef dışı etkilere ve yanlışa eğilimi olan shRNA teknolojisine büyük ölçüde güveniyordu. Buna karşılık, CRISPR, hedef gen fonksiyonunu azaltma olasılığı daha yüksek olan oldukça spesifik, kalıcı genetik modifikasyonlar yapabilir. CRISPR, kemoterapi ilaçlarına ve toksinlere direnç, hücre canlılığı ve tümör metastazı dahil olmak üzere bilinen fenotipleri düzenleyen yeni genleri taramak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Şu anda, CRISPR kullanarak genomun tamamında taramalar yapmak için en popüler yöntem, havuzlanmış lentiviral CRISPR kütüphanelerinin kullanımınıdır.

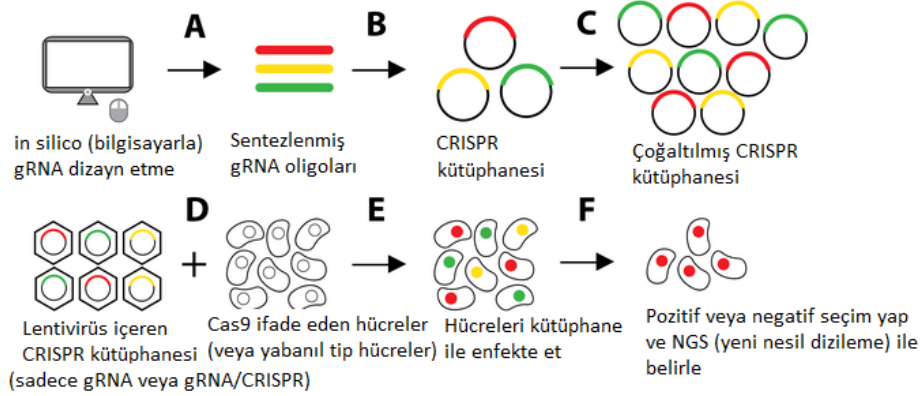
Biriktirilmiş lentiviral CRISPR kütüphaneleri nelerdir?

Biriktirilmiş lentiviral CRISPR kütüphaneleri (genellikle CRISPR kütüphaneleri olarak adlandırılır), her biri belirli bir genomda tek bir geni hedefleyen ayrı bir gRNA içeren heterojen bir lentiviral transfer vektörleri popülasyonudur.

Kılavuz RNA'lar siliko olarak tasarlanır ve sentezlenir (aşağıdaki panel A'ya bakınız), daha sonra havuzlanmış bir şekilde lentiviral transfer vektörlerine (panel B) klonlanır. CRISPR kütüphaneleri, genetik nakavt, aktivasyon, inaktivasyon ile insan ve fare genleri için dahil olmak üzere yaygın CRISPR uygulamaları için tasarlanmıştır.

Her CRISPR kütüphanesi farklıdır ve bir gen ailesinden, genomdaki herhangi bir gene kadar hedef belirleyebilir. Ancak, çoğu CRISPR kütüphanesinde ortak olan birkaç özellik vardır. İlk olarak, her kütüphanede genel olarak her hedef genin modifikasyonunu sağlamak için gen başına ~3-6 gRNA içerir, bu nedenle CRISPR kütüphaneleri çok çeşitli genleri hedefleyen binlerce benzersiz gRNA içerir.

CRISPR kütüphaneleri için yüksek hedefli aktiviteye ve düşük hedef dışı aktiviteye sahip gRNA'ları seçmek ve gRNA tasarımının optimize edilmesi gerekir. Kütüphaneler gRNA tasarımı için farklı algoritmalar kullanabilir.



Hedeflenecek genin tam bölgesinin spesifik uygulamaya bağlı olarak değiştiğini unutmayın. Örneğin, nakavt kütüphaneleri genellikle 5 ut yapısal olarak ifade edilen eksonları hedefler, ancak aktivasyon / inaktivasyon promotörü veya arttırıcı bölgeleri hedefler. Bir kütüphaneyi denemeden önce uygun olup olmadığını görmek için kütüphane bilgilerini / orijinal yayını kontrol ettiğinizden emin olun. Kütüphaneler;

1-cas9'un gRNA içeren plazmid üzerine dahil edildiği plazmid sistemi,

2-cas9'un ayrı olarak teslim edilmesi gereken plazmid sistemi içeren bilgilerin kullanımı kolay olması gerekir.

Cas9 içeren lentiviral kütüphaneler CRISPR taraması için en popüler yöntem olsa da, tüm hücre tipleri veya deneyleri için uygun değildir. Ayrıca, in vivo deneyler için AAV omurgalarında ve lentivirüs tarafından zayıf bir şekilde transdükte edilen hücrelere iletilmek üzere bir retroviral omurgada da memeli CRISPR kütüphaneleri oluşturulmuştur. Memeli olmayan CRISPR kütüphaneleri de mevcuttur. Buna ek olarak, CRISPR teknik zorluklar nedeniyle bakterilerde daha az yaygın olarak kullanılmasına rağmen, dCas9 kullanarak inhibisyon için birkaç bakteriyel CRISPR kütüphanesi geliştirilmiştir.

CRISPR kütüphanesini nasıl kullanıyorsunuz?

CRISPR kütüphaneleri , Addgene'de iki şekilde bulunur: DNA kütüphaneleri ve belirli durumlarda önceden hazırlanmış olan lentivirüs kütüphaneleri.

DNA kütüphaneleri kullanılmak istendiğinde; CRISPR kütüphanesi, deneyler için yetersiz kalabilir. Bu nedenle, kütüphanenizi kullanmanın ilk adımı, önerilen protokolü kullanarak toplam DNA miktarını artırmak için kütüphanenizi (panel C) 'ye yükseltmektir. Kütüphaneyi yükseltirken, gRNA örneklerini korumak önemlidir, böylece genişleyerek bir araya gelen kütüphaneniz, orijinal kütüphanenin bütünlüğü ile eşleşir. Bu durumu doğrulamak için yeni nesil sekanslamayı (NGS) kullanacaksınız.

Güçlendirilen ve doğrulanan kütüphaneniz için sonraki adım, tüm CRISPR kütüphanesini (panel D) 'yi içeren lentivirüs oluşturmaktır. Daha sonra, lentiviral kütüphane (panel E) ile hücreler üreteceksiniz. Unutmayın - 2 vektörlü bir sistem kullanıyorsanız, Cas9'u içeren hücreleri üretmeniz gerekir. Tarama

koşullarınızı uyguladıktan sonra, NGS (Yeni Nesil Sekanslama) teknolojisini kullanarak ilgili genlerinizi işaretleme yaptıktan sonra arayacaksınız.

Taramalar bize ne anlatıyor?

Yukarıda belirtildiği gibi, ileri genetik taramalar, belirli bir fenotip veya hastalığın arkasındaki fizyoloji veya hücre biyolojisinin iyi anlaşıldığı, ancak altta yatan genetik nedenlerin bilinmediği durumlar için en faydalı olanıdır. Bu nedenle, CRISPR kütüphanelerini kullanan genom çapındaki ekranlar, belirli bir fenotipte hangi genlerin nedensel bir rol oynadığına ilişkin tarafsız bilgi toplamak için harika bir yoldur. Herhangi bir denemede, belirlediğiniz işaretlerin ilgi alanınız için gerçekten önemli olup olmadığını doğrulamak önemlidir. İstenilen fenotipi yeniden ürettiklerinden emin olmak için ekranınızda belirtilen gRNA'ları ayrı ayrı test edebilirsiniz.

Bir araya gelmiş kütüphanenizi denemeye başlamadan önce dikkate alınması gereken faktörler hakkında daha fazla bilgi almak istiyorsanız “Havuzlanmış Lentiviral CRISPR Kütüphanelerini Kullanmayla İlgili Pratik Hususlar” bölümünde bulabilirsiniz (McDade ve ark., 2016).

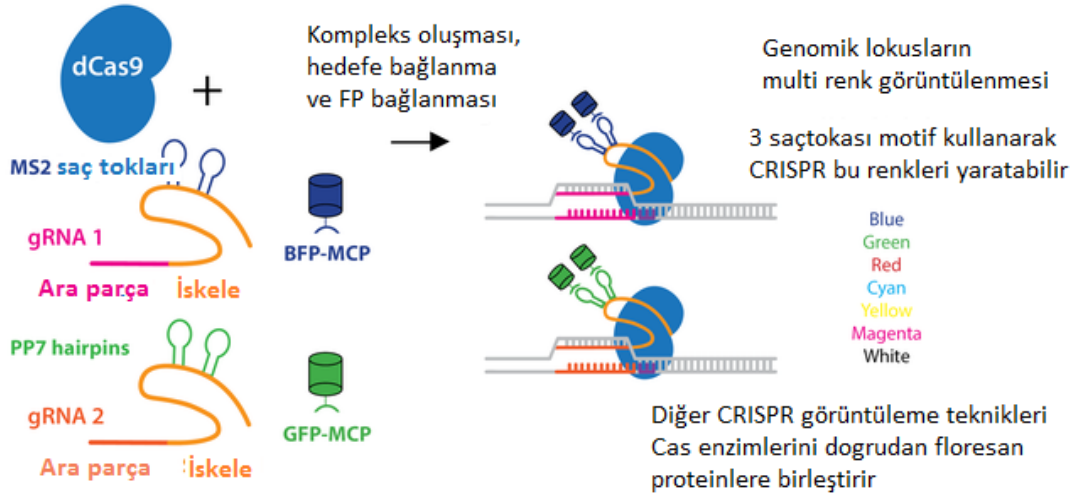
Floroforlar Kullanarak Genomik Konum

Araştırmacılar , GFP gibi bir floresan belirteç ile etkileşmiş katalitik olan inaktif dCas9 kullanırken onu canlı hücrelerde floresan mikroskopisi ile uyumlu, özelleştirilebilir bir DNA etiketleyicisine dönüştürdüler. Ek olarak, gRNA'lar; hedeflenen genomik lokusları görselleştirmek için floresan proteinlerle etiketlenmiş spesifik RNA bağlayıcı proteinleri (RBP) toplayan ve proteinle etkileşen RNA aptamerlerine füzyonla birleştirilebilir.

CRISPR görüntülemenin, gRNA tasarımının basitliği, farklı genomik lokuslar için programlanabilir olması, çoklu genomik lokusları tespit edebilen ve canlı hücre görüntülemeyle uyumlu olması nedeniyle diğer görüntüleme tekniklerine göre sayısız avantajı vardır. CRISPR görüntüleme floresan yerine hibridizasyon (FISH) gibi tekniklerle karşılaştırıldığında, canlı hücrelerdeki kromatin dinamikliklerini tespit etmek için eşsiz bir yöntemdir.

Renkli CRISPR görüntüleme, canlı hücrelerdeki çoklu genomik lokusların eşzamanlı olarak izlenmesini sağlar. Bu yöntem, farklı floresan proteinlerle etiketlenmiş dik dCas9'ları (örn., *S. pyogenes* dCas9 ve *S. aureus* dCas9) kullanır. Başka bir yöntemle, farklı floresan proteinleri ile etiketlenmiş spesifik ortogonal RBP'leri (CRISPRainbow kiti) toplayan ortogonal protein etkileşimli RNA aptamerlerine etkileşmiş gRNA'ları kullanır. 8 aptamer (CRISPR-Sirius) taşıyan gRNA'ların daha iyi bir kararlılık ve genomik lokusların daha iyi görüntülenmesi için bir sinyal artışı sağladığı gösterilmiştir.

Floresan CRISPR sistemi, canlı hücrelerde tekrarlanan ve tekrarlanmayan genomik lokusların yanı sıra kromozom boyamanın dinamik takibi için kullanılmıştır. Spesifik bir genomik lokusu görselleştirmek, etiketli proteinlerin birçok kopyasının verilen bölgeye alınmasını gerektirir. Örneğin, kromozoma özgü tekrarlanan lokuslar, yakın hücrede çok sayıda hedeflenmiş sekansa sahip tek bir gRNA kullanılarak canlı hücrelerde verimli bir şekilde görselleştirilebilir. Tekrarlanmayan bir genomik lokus, lokusu kapsayan birden fazla gRNA'nın birlikte verilmesi ile de etiketlenebilir. Kromozom boyama, kromozom boyunca yüzlerce gRNA'nın hedef bölgelerle birlikte verilmesini gerektirir.

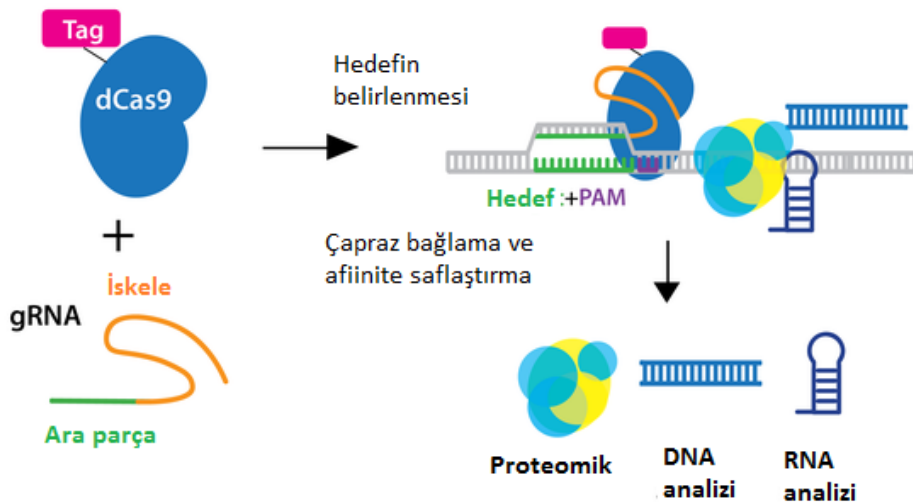


DCas9 Kullanarak Genomik Bölgeleri Saflaştırın

İstenilen bir genomik bölge ile ilişkili moleküllerin in vivo olarak tanımlanması, lokus fonksiyonunun anlaşılması için gereklidir. Araştırmacılar, CRISPR 'ı kullanarak belirli bir gRNA tarafından belirtilen herhangi bir genomik sekansın saflaştırılmasını sağlamak için kromatin immünpresipitasyonunu (ChIP) genişletti.

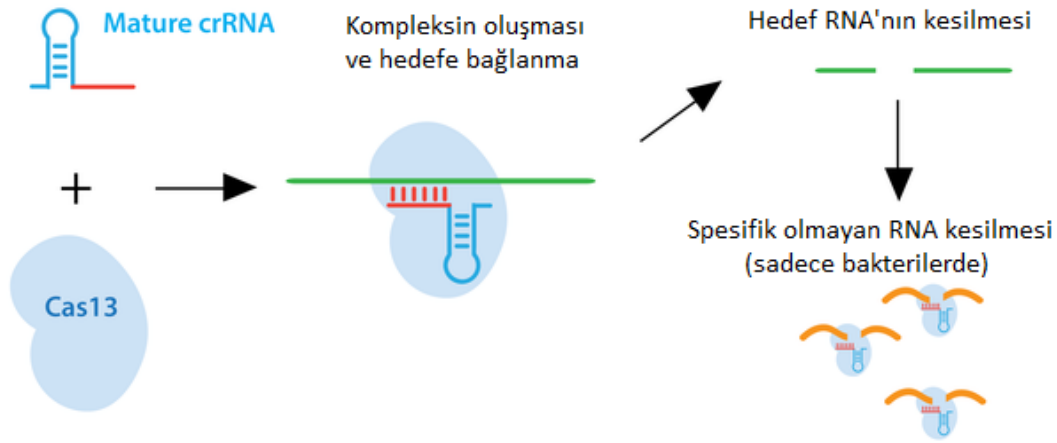
EnChIP (tasarlanmış DNA bağlayıcı molekül aracılı ChIP) sisteminde, gRNA tarafından bağlanmış genomik DNA'yı saflaştırmak için katalitik olarak inaktif dCas9 kullanılır. Etkili saflaştırma için bir epitop etiketi / etiketleri dCas9 veya gRNA ile birleştirilebilir. 3xFLAG-etiketi, PA ve biyotin etiketleri dahil olmak üzere çeşitli epitop etiketleri, enChIP ve bir anti-Cas9 antikoruna için kullanılabilir. DCas9'un biyotin etiketlemesi, bir biyotin alıcı bölgesinin dCas9'a birleştirilmesi ve CAPTURE sisteminde görüldüğü gibi BirA biyotin ligazının birlikte eksprese edilmesi yoluyla gerçekleştirilebilir. Lokus daha sonra epitop etiketine karşı bağ saflaştırması ile izole edilir.

Lokusun saflaştırılmasından sonra, lokusla ilişkili moleküller kütle spektrometrisi (proteinler), RNA dizileme (RNA'lar) ve NGS (diğer genomik bölgeler) ile tanımlanabilir. CRISPR saflaştırma yöntemleri geleneksel yöntemlerle karşılaştırıldığında, genomik saflaştırma için daha basittir ve istenilen bir genomik bölge ile ilişkili moleküllerin in vivo ile doğrudan tanımlanmasını sağlar.



RNA Hedefleme

Tip VI CRISPR enzimleri Cas13 gibi, dsDNA yerine ssRNA'yı tanır. Bu enzimlerin birçoğu ayrıca crRNA öncülerini olgun crRNA'lara işleme yeteneğine sahiptir. CRRNA tarafından ssRNA tanınması üzerine, hedef RNA bozulur. Bakterilerde, Cas13 enzimleri ayrıca başlangıçtaki ayarlanan crRNA ayrılmadan sonra RNA'ları spesifik olmayan bir şekilde parçalayabilir. Bu karışık bölünme aktivitesi bakteriyel hücre büyümesini yavaşlatır ve bakterileri viral patojenlerden daha fazla koruyabilir. Bu özelliğe dayanarak, SHERLOCK olarak adlandırılan bir Cas13a bazlı moleküler tespit etmek, Zika virüsünün suşlarını ayırt etmek, insan DNA'sını genotipleme ve hücresiz genomik DNA içindeki tümör mutasyonlarını tanımlamak için kullanılmıştır. Bu spesifik olmayan bölünme, memeli hücrelerinde meydana gelmez. Cas9 ve Cas12'ye benzer şekilde Cas13, katalitik bölgesinin mutasyonu yoluyla bir RNA bağlayıcı proteine dönüştürülebilir. Katalitik olarak inaktif Cas13 füzyonları, RNA düzenlemesini modüle etmek, in vivo RNA görüntüleme veya alternatif birleştirme işlemini kontrol etmek için de kullanılabilir.



CRISPR Genom Mühendisliği için Cas9 Alternatifleri

S. pyogenes Cas9 (SpCas9) kesinlikle genom mühendisliği için en yaygın kullanılan CRISPR endonükleaz olsa da, her uygulama için en iyi endonükleaz olmayabilir. Örneğin, SpCas9 (5p-NGG-3p) için PAM dizisi, insan genomu boyunca bol miktarda bulunur, ancak bir NGG dizisi, modifikasyon için istediğiniz genleri hedefleyecek şekilde doğru konumlandırılmayabilir. Bu sınırlama, düzenlenecek bölgeye çok yakın PAM sekansları gerektiren homolojiye yönelik onarımı (HDR) kullanarak bir geni düzenlemeye çalışırken özellikle endişe vericidir.

Araştırmacılar bu sınırlamaları ele almak için çeşitli yaklaşımlar kullanarak, faj destekli evrim ve yönlendirilmiş mutajenez dahil olmak üzere değiştirilmiş PAM spesifikliğine sahip SpCas9 enzimlerini tasarladılar. Bu, NGG olmayan PAM sekansları ile birkaç SpCas9 türevi varyantın geliştirilmesine yol açtı. Başka bir Cas9 alternatifi, NG, GAA ve GAT gibi geniş bir PAM dizisini hedeflerken, aynı zamanda minimum hedef dışı etkinlik gösteren xCas9'dur. NG PAM'ı tanıyan bir varyant olan SpCas9-NG, in vitro olarak diğer Cas9 endonükleazlarına göre aktivitesini arttırmıştır. (Cas9 varyantları hakkında daha fazla bilgi edinin.)

Çeşitli türlerden ilave edilen Cas9 ortologları, çeşitli PAM dizilerini bağlar. Bu enzimler, spesifik uygulamalar için onları SpCas9'dan daha kullanışlı hale getiren başka özelliklere sahip olabilir. Örneğin, onlardan nispeten büyük boyutta SpCas9 (-4 kb kodlama dizisi), SpCas9 cDNA'sını taşıyan

plazmidlerin adeno-ilişkili virüs (AAV) içine etkili bir şekilde paketlenemediği anlamına gelir. *Staphylococcus aureus* Cas9 (SaCas9) için kodlama sekansı, SpCas9'dan ~1 kb daha kısa olduğundan SaCas9, AAV'ye verimli bir şekilde paketlenabilir. SpCas9'a benzer şekilde SaCas9 endonükleaz, memeli hücrelerinde in vitro ve farelerde in vivo hedef genleri değiştirebilir.

SpCas9'un bir başka sınırlaması, HDR yoluyla spesifik genetik düzenlemeler yapmak için az verimli olmasıdır. Belirli nokta düzenlemeleri için CRISPR temel düzenleme, HDR'ye yararlı bir alternatiftir. Daha büyük düzenlemeler için Cas12a (Cpf1) daha iyi bir seçenek olabilir. Kör DSB'ler oluşturan Cas9 nükleazlarının aksine, Cas12a aracılı DNA bölünmesi, kısa bir 3' çıkıntıya sahip DSB'ler oluşturur. Cas12a'nın kademeli klevaj paterni, gen düzenleme etkinliğini artırabilecek geleneksel kısıtlama enzimi klonlamasına benzeyen yönlü gen aktarımı olasılığını ortaya çıkarır. Yukarıda tarif edilen Cas9 varyantları ve ortologlar gibi Cas12a da CRISPR tarafından hedeflenebilen sahaların aralığını AT açısından zengin bölgelere veya SpCas9 tarafından tercih edilen NGG PAM bölgelerinden yoksun AT bakımından zengin genomlara genişletir. Cas9'a benzer şekilde Cas12a da farklı PAM varyantlarını tanıyacak şekilde tasarlanmıştır.

RNA Hedefleme

Cas13 gibi Tip VI CRISPR enzimleri, dsDNA yerine ssRNA'yı tanır. Bu enzimlerin birçoğu ayrıca crRNA öncülerini olgun crRNA'lara işleme yeteneğine sahiptir. CRRNA tarafından ssRNA tanınması üzerine, hedef RNA bozulur. Bakterilerde, Cas13 enzimleri ayrıca başlangıçtaki ayarlanan crRNA ayrılmadan sonra RNA'ları spesifik olmayan bir şekilde parçalayabilir. Bu karışık bölünme aktivitesi bakteriyel hücre büyümesini yavaşlatır ve bakterileri viral patojenlerden daha fazla koruyabilir. Bu özelliğe dayanarak, SHERLOCK olarak adlandırılan bir Cas13a bazlı moleküler tespit platformu, Zika virüsünün suşlarını ayırt etmek, insan DNA'sını genotipleme ve hücresiz genomik DNA içindeki tümör mutasyonlarını tanımlamak için kullanılmıştır. Bu spesifik olmayan bölünme, memeli hücrelerinde meydana gelmez. Cas9 ve Cas12'ye benzer şekilde Cas13, katalitik bölgesinin mutasyonu yoluyla bir RNA bağlayıcı proteine dönüştürülebilir. Katalitik olarak inaktif Cas13 füzyonları, RNA düzenlemesini düzenlemek, in vivo RNA görüntüleme veya alternatif birleştirme işlemini kontrol etmek için de kullanılabilir. (Cas13a veya Cas13d hakkında daha fazla bilgi edinin.)

CRISPR Genom Mühendisliği için Cas9 Alternatifleri

S. pyogenes Cas9 (SpCas9) kesinlikle genom mühendisliği için en yaygın kullanılan CRISPR endonükleaz olsa da, her uygulama için en iyi endonükleaz olmayabilir. Örneğin, SpCas9 (5p-NGG-3p) için PAM dizisi, insan genomu boyunca bol miktarda bulunur, ancak bir NGG dizisi, modifikasyon için istediğiniz genleri hedefleyecek şekilde doğru konumlandırılmayabilir. Bu sınırlama, düzenlenecek bölgeye çok yakın PAM sekansları gerektiren homolojiye yönelik onarım (HDR) kullanarak bir geni düzenlemeye çalışırken özellikle endişe vericidir.

Bu sınırlamaları ele almak için araştırmacılar, faj destekli evrim ve yönlendirilmiş mutajenez dahil olmak üzere çeşitli yaklaşımlar kullanarak değiştirilmiş PAM spesifikliklerine sahip SpCas9 enzimlerini tasarladılar. Bu, NGG olmayan PAM sekansları ile birkaç SpCas9 türevi varyantın geliştirilmesine yol açtı. Başka bir Cas9 alternatifi, NG, GAA ve GAT gibi geniş bir PAM dizisini hedeflerken, aynı zamanda minimum hedef dışı etkinlik sergileyen xCas9'dur. NG PAM'ı tanıyan bir varyant olan SpCas9-NG, in vitro olarak diğer Cas9 endonükleazlarına göre aktivitesini arttırmıştır.

Çeşitli türlerden ilave edilen Cas9 ortologları, çeşitli PAM dizilerini bağlar. Bu enzimler, spesifik uygulamalar için onları SpCas9'dan daha kullanışlı hale getiren başka özelliklere sahip olabilir. Örneğin, onlardan nispeten büyük boyutta SpCas9 (-4 kb kodlama dizisi), SpCas9 cDNA'sını taşıyan plazmidlerin adeno-ilişkili virüs (AAV) içine etkili bir şekilde paketlenemediği anlamına gelir. Staphylococcus aureus Cas9 (SaCas9) için kodlama sekansı, SpCas9'dan ~1 kb daha kısa olduğundan SaCas9, AAV'ye verimli bir şekilde paketlenir. SpCas9'a benzer şekilde SaCas9 endonükleaz, memeli hücrelerindeki in vitro ve farelerde in vivo hedef genleri değiştirebilir.

SpCas9'un bir başka sınırlaması, HDR yoluyla spesifik genetik düzenlemeler yapmanın düşük verimliliğidir. Belirli nokta düzenlemeleri için CRISPR temel düzenleme, HDR'ye yararlı bir alternatiftir. Daha büyük düzenlemeler için Cas12a (Cpf1) daha iyi bir seçenek olabilir. Künt DSB'ler oluşturan Cas9 nükleazlarının aksine, Cas12a aracılı DNA bölünmesi, kısa bir 3' çıkıntıya sahip DSB'ler oluşturur. Cas12a'nın kademeli klevaj paterni, gen düzenleme etkinliğini artırabilecek geleneksel kısıtlama enzimi klonlamasına benzeyen yönlü gen aktarımı olasılığını ortaya çıkarır.

Yukarıda tarif edilen Cas9 varyantları ve ortologlar gibi Cas12a da CRISPR tarafından hedeflenebilen sahaların aralığını AT açısından zengin bölgelere veya SpCas9 tarafından tercih edilen NGG PAM bölgelerinden yoksun AT bakımından zengin genomlara genişletir. Cas9'a benzer şekilde Cas12a da farklı PAM varyantlarını tanıyacak şekilde tasarlanmıştır.

Anti-CRISPR

Araştırmacılar CRISPR-Cas9'un hedef dışı etkilerini sınırlamak için, Acr (Anti-CRISPR) proteinleri adı verilen küçük bir protein sınıfı ile CRISPR aktivitesini kontrol ederler.

Acr proteinleri fajlarda bulunup, bakteri ve arkeler tarafından kullanılan endojen CRISPR sistemlerinin yabancı (faj) DNA'sını parçalamadan korur. Acr protein ailesi üyeleri bu çeşitlilik nedeniyle, CRISPR'ı çeşitli mekanizmalarla inhibe eder. Acr proteinleri PAM bölgesinde DNA bağlanmasını etkilerken, diğerleri Cas9 HNH endonükleaz alanını etkiler. Ayrıca, Acr proteinleri belirli bir Cas9 türüne özgü olabilir veya birden fazla bakteri türünde CRISPR enzimlerini inhibe edebilir. Örneğin, *Listeria monocytogenes* 'ten izole edilen AcrIIA2 ve AcrIIA4, hem LmoCas9 hem de SpCas9'un CRISPR aktivitesini inhibe edebilir.

Genom düzenlemesinin ne zaman gerçekleşebileceğini kontrol etmede Acr proteinleri önemli bir rol oynar.

CRISPR Deneyinizi Planlayın

Başlangıç

CRISPR, araştırmacıların genomu daha önce hiç olmadığı gibi manipüle etmelerini sağlayan güçlü bir sistemdir. Bu bölüm, araştırmanızda CRISPR sistemini kullanmaya başlamanız için genel bir bilgi çerçevesi sağlayacaktır.

Memeli hücrelerinde CRISPR / Cas9 örneğini kullanacak olsak da, bu prensiplerin birçoğu CRISPR'ın diğer organizmalarda kullanılması için geçerlidir.

Ne istiyorsun?

- Gen ekspresyonu veya fonksiyonunda tamamlayıcı ve kalıcı kayıp (knockout) üretilsin mi?

- Bir genin spesifik bir mutant alelini (nokta mutasyonu) oluşturuyor mu?
- Hedef genin ekspresyonunu artırıyor veya azaltıyor mu?

Deneyel hedefinizi belirledikten sonra, deneyiniz için mevcut olan farklı reaktiflerde gezinmeye hazırsınız.

İstedığınız Genetik Manipülasyonunuzu Seçin

Farklı genetik manipülasyonlar farklı CRISPR bileşenleri gerektirir. Belirli bir genetik manipülasyon seçmek, belirli bir deney için hangi reaktiflerin uygun olduğunu seçmenin iyi bir yolu olabilir. Deneyinizi özel model organizmanızda gerçekleştirmek için reaktiflerin mevcut olup olmadığını kontrol ettiğinizden emin olun. Belirlediğiniz uygulamanız için uygun bir plazmid olmayabilir ve bu gibi durumlarda mevcut bir reaktifi ihtiyaçlarınıza uyacak şekilde tasarlamak gerekebilir.

Genetik Manipülasyon	Uygulama	Cas9	gRNA	Ek Konular
Nakavt	Seçilen belirli bir mutasyon olmadan, belirli bir hücre tipinde veya organizmada gen fonksiyonunu kalıcı olarak bozar	Cas9 (veya Cas9 nickase)	5 ' eksonunu veya esansiyel protein alanlarını hedefleyen tek (veya çift) gRNA	Çift-nikaz yaklaşımı özgülüğü artırır, ancak daha az verimlidir. Her varsayılan nakavt alleli deneysel olarak doğrulanmalıdır.
Düzenlemek	Nokta mutasyonu oluşturma veya etiket ekleme gibi belirli bir gende kullanıcı tanımlı özel bir dizi değişikliği oluşturma	Cas9 (veya Cas9 nickaz); Temel düzenleyici	Düzenlemenin yapılması gereken bölgeyi hedefleyen tek (veya çift) gRNA	HDR bir onarım şablonu gerektirir ve NHEJ nakavtına kıyasla daha düşük verimlilik gösterir. Temel düzenleyiciler sınırlı sayıda mutasyon yapabilir.
Baskılayın veya Müdahale edin (CRISPRi)	Genomu kalıcı olarak değiştirmeden belirli bir gen (ler) in ekspresyonunu azaltın	dCas9-baskılayıcı (dCas9-KRAB gibi) veya dCas9	Hedef genin hedefleyici promotör elemanlarını hedefleyen gRNA (lar)	Cas9-KRAB, memeli hücre dizileri için tek başına dCas9'dan daha etkilidir.
Aktifleştirmek (CRISPRa)	Genomu kalıcı olarak değiştirmeden endojen gen(ler)in ekspresyonunu arttırın	dCas9-aktivatörü (dCas9-VP64 gibi)	Hedef genin hedefleyici promotör elemanlarını hedefleyen gRNA (lar)	Çoklu plazmid SAM sistemi dahil olmak üzere birçok farklı aktivatör vardır.

İfade Sistemini Seçin

CRISPR kullanmak için, hem Cas9'a hem de hedef hücrelerinizde ifade edilen bir gRNA'ya ihtiyacınız olacaktır. Kolay tranfeksiyon olabilen hücre tipleri (örn. HEK293 hücreleri) için standart transfeksiyon reaktifleri ile transfeksiyon, CRISPR makinesini eksprese etmek için yeterli olabilir. Tranfeksiyonu daha zor olan hücreler (örneğin, birincil hücreler) için, CRISPR reaktiflerinin viral olarak verilmesi daha uygun olabilir. Hedef dışı düzenlemenin riskli olduğu durumlarda, Cas9-gRNA ribonükleoprotein (RNP) kompleksleri, geçici Cas9 ekspresyonu nedeniyle daha avantajlıdır.

Aşağıdaki tablo, memeli hücrelerinde CRISPR kullanımı için ana ekspresyon sistemlerini ve değişkenlerini özetlemektedir. Değişkenlerden bazıları şunlardır:

- Cas enzimi ve gRNA türleri
- Destekleyici türler ve Cas enzimi ve gRNA için destekleyicinin ekspresyon modeli
- Seçilebilir bir işaretleyicinin varlığı (ilaç veya florofor)
- Teslimat Yöntemi

Ekspresyon Sistemi	Sistem Bileşenleri	Uygulama
Memeli ifade vektörü	<ul style="list-style-type: none"> • Cas enzim promoteri konstitütif (CMV, EF1alfa, CBh) veya indüklenebilir (Tet-ON); U6 promotörü tipik olarak gRNA için kullanılır • Pozitif hücreleri tanımlamak ve zenginleştirmek için raportör gen (örn. GFP) veya stabil hücre çizgileri oluşturmak için seçim belirteci içerebilir (ayrıntılar için bkz. Plazmidler 101: Memeli Vektörleri) 	Yüksek verimlilikte transfekte edilebilen bir memeli hücre hattında Cas9 ve / veya gRNA'nın geçici veya stabil ekspresyonu
Lentiviral transdüksiyon	<ul style="list-style-type: none"> • Cas9 ve gRNA, tek bir lentiviral transfer vektörü veya ayrı transfer vektörleri içinde mevcut olabilir • Pozitif hücreleri tanımlamak ve zenginleştirmek için raportör gen (örn. GFP) veya seçim belirteci içerebilir • Paket ve kılıf plazmidleri, lentiviral partiküller yapmak için gerekli bileşenleri sağlar (lentivirüs hakkında ayrıntılar için, Lentivirüs Kılavuzumuza bakın) 	<ul style="list-style-type: none"> • Çok çeşitli memeli hücre dizilerinde stabil, ayarlanabilir Cas9 ve / veya gRNA ekspresyonu • Transfeksiyonu zor hücre tipleri için yararlıdır, in vivo olarak da kullanılabilir • CRISPR kullanarak genom çapında ekranlar yapmak için ortak bir seçim
AAV transdüksiyonu	<ul style="list-style-type: none"> • CRISPR elemanları bir AAV transfer vektörüne yerleştirilir ve AAV parçacıkları oluşturmak için kullanılır (ayrıntılar için AAV Kılavuzumuza bakın) • ~ 4,5 kb paketleme limiti (sadece daha küçük Cas enzimleri ile uyumlu) 	<ul style="list-style-type: none"> • SaCas9 ve / veya gRNA'nın geçici veya stabil ekspresyonu • Bölünen ve bölünmeyen hücreleri enfekte eder • AAV, in vivo viral uygulama için en az toksik yöntemdir
Cas9 ve gRNA'nın RNA taşınması	İn vitro transkripsiyon reaksiyonları, daha sonra mikroenjeksiyon veya elektroporasyon yoluyla hedef hücrelere iletilen olgun Cas9 mRNA ve	<ul style="list-style-type: none"> • CRISPR bileşenlerinin geçici ifadesi • RNA hücre içinde

Ekspresyon Sistemi	Sistem Bileşenleri	Uygulama
	gRNA üretir.	parçalandığında ekspresyon azalır <ul style="list-style-type: none"> • CRISPR bileşen ifadesinin kısa çerçevesi hedef dışı etkilerini azaltabilir. • Transgenik embriyolar oluşturmak için kullanılabilir
Cas9-gRNA ribonükleoprotein (RNP) kompleksleri	Saflaştırılmış Cas9 proteini ve in vitro ortamda kopyalanmış gRNA, katyonik lipitler kullanılarak hücelere verilen bir Cas9-gRNA kompleksi oluşturmak için birleştirilir.	<ul style="list-style-type: none"> • CRISPR bileşenlerinin geçici olarak ifade edilmesi • CRISPR aktivitesinin kısa penceresi hedef dışı etkilerini azaltabilir

Ek kaynaklar

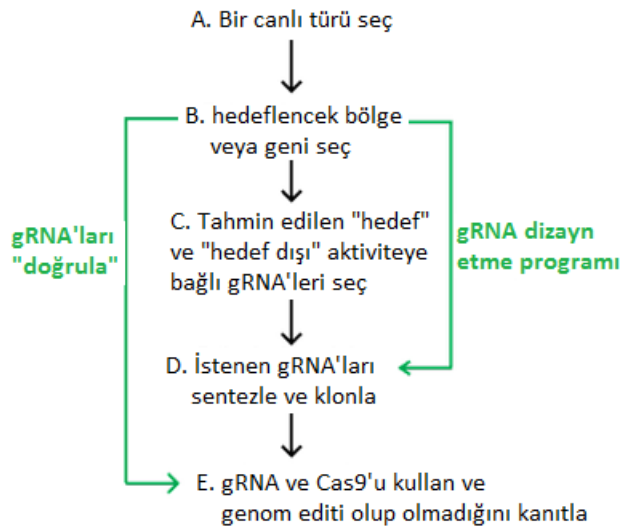
Addgene depositorylerinden CRISPR protokolleri
 JOVE Video Reprint: Memeli hücre soylarında genomik silme protokolü

Hedef Dizinizi Seçin ve gRNA'nızı Tasarlayın

CRISPR bileşenlerini ve gönderim yolunu seçtikten sonra, şimdi hedef sekansı seçmeye ve gRNA'nızı tasarlamaya hazırsınız.

A. Hücre hattınızı/organizmayı ve genomik sekansını biliniz

Mümkün olduğunda, gRNA'yı tasarlamadan önce, değiştirmeyi planladığınız bölgeyi sekanslamamız gerekmektedir, gRNA'nın hedef sekansı ve hedef DNA dizisi arasındaki varyasyonlar bölünmede azalmaya neden olabilir. Her gen için alel sayısı, spesifik hücre hattına veya organizmaya bağlı olarak değişebilir, ki bu durum CRISPR knockout ve knockin verimliliğini etkileyebilir.



B. Manipüle edilecek geni ve genetik elementi seçin

Verilen bir geni CRISPR ile manipüle etmek için, hedeflemeye çalıştığınız genin genomik dizisini tanımlamanız gerekecektir. Bununla birlikte, hedeflediğiniz genin tam bölgesi, spesifik uygulamanıza bağlı olacaktır.

Örneğin;

- DCas9-aktivatörleri veya dCas9-baskılayıcıları kullanarak bir hedef geni aktive etmek veya bastırmak için, gRNA'lar ilgilenilen geninizin ekspresyonunu sağlayan promotere hedeflenmelidir.

- Genetik nakavtlar için, gRNA'lar genellikle 5 'yapısal olarak ifade edilen eksonları hedefler, bu da hedeflenen bölgenin alternatif splicing ile mRNA'dan çıkarılma şansını azaltır. Buradaki çerçeve kayması mutasyonları, fonksiyonel olmayan bir protein ürünü üretme olasılığını arttırdığından, N terminaline yakın eksonlar hedeflenir.
- Alternatif olarak, gRNA'lar, bilinen temel protein alanlarını kodlayan eksonları hedefleyecek şekilde tasarlanabilir. Bu yaklaşımın yararı, çerçevesiz olmayan alellerin bile önemli protein domainlerinde meydana geldiklerinde protein fonksiyonunu değiştirebilmesidir.
- HDR kullanan gen düzenleme deneyleri için, hedef dizinin istenen düzenlemenin konumuna çok yakın olması, ideal olarak 10 bp'den daha az olması esastır. Bu durumda, düzenlemenin yapılacağı yeri tam olarak belirlemek ve yakınlarda bir hedef sekans seçmek gerekir.

C. Tahmin edilen hedef içi ve hedef dışı etkinliğe dayalı olarak gRNA'ları seçme

Cas9'un hedef DNA'yı bağlaması için bir PAM sekansı kesinlikle gereklidir. Bu haliyle, hedeflenecek olan genetik bölge içindeki tüm PAM dizilerinin tanımlanmasıyla başlanabilmektedir. İstedığınız sekans içinde seçtiğiniz enzim için PAM sekansı yoksa, alternatif Cas enzimlerini göz önünde bulundurmak isteyebilirsiniz (bkz. Cas9 varyantları ve PAM sekansları).

Mümkün olan PAM dizileri ve varsayılan hedef bölgeler belirlendikten sonra, hangi sitenin en etkili hedef-içi bölünmeye yol açacağını seçme zamanı gelmiştir. gRNA hedef sekansının hedef lokusla eşleşmesi gerekir, ancak gRNA hedef sekansının genom içindeki ilave bölgelerle eşleşmediğinden emin olmak da önemlidir. Mükemmel bir dünyada, gRNA hedef diziniz, genomun başka hiçbir yerinde homoloji olmadan hedefinize mükemmel bir homolojiye sahip olurdu. Gerçekçi olarak, belirli bir gRNA hedef sekansı, genom boyunca ilave bölgelere kısmi homolojiye sahip olacaktır.

Bu sahalar hedef dışı olarak adlandırılır ve gRNA tasarımı sırasında incelenmelidir. Genel olarak, hedef dışı sahalar PAM sekansının yakınında uyumsuzluklar meydana geldiğinde verimli bir şekilde bölünmez, bu nedenle homolojisi olmayan veya PAM sekansına yakın uyumsuzlukları olan gRNA'lar en yüksek özgüllüğe sahip olacaktır. Spesifiteyi arttırmak için, yüksek uygunluklu bir Cas enzimi kullanmayı da düşünebilirsiniz.

Hedef dışı aktiviteye ek olarak, istenen hedef sekansın veya hedef içi aktivitenin bölünmesini en üst düzeye çıkararak faktörleri de dikkate almak önemlidir. DNA hedeflerine% 100 homolojisi olan iki gRNA hedefleme dizisi, eşdeğer yarıma etkinliğine yol açmayabilir. Aslında, yarıma etkinliği, seçilen hedef sekans içindeki spesifik nükleotitlere bağlı olarak artabilir veya azalabilir. Örneğin, 20 pozisyonunda bir G nükleotit (PAM'ın yukarı akışında 1 bp) içeren gRNA hedefleme sekansları, hedef sekans için mükemmel bir eşleşme olmasına rağmen aynı pozisyonda bir C nükleotit içeren gRNA'lardan daha etkili olabilir. Birçok gRNA tasarım programı potansiyel PAM ve hedef sekansların yerini saptayabilir ve ilişkili gRNA'yı tahmin edilen hedef içi ve hedef dışı etkinliklerine göre sıralayabilir (bkz. gRNA tasarım yazılımı). Ek olarak, valide edilmiş gRNA'lar içeren birçok plazmid artık Addgene'den temin edilebilir. Bu plazmidler, genom mühendisliği deneylerinde başarıyla kullanılan gRNA'lar içerir. Valide edilmiş gRNA'ları kullanmak CRISPR deneylerini gerçekleştirirken laboratuvarınıza değerli zaman ve kaynaklardan tasarruf sağlayabilir. GRNA'nızı nasıl tasarlayacağınız hakkında daha fazla bilgi edinin.

D. İstenen gRNA'ları sentezleyin ve klonlayın

Hedef dizilerinizi seçtikten sonra, gRNA oligolarınızı tasarlamadan ve bu oligoları istediğiniz vektöre klonlama zamanı gelmiştir. Birçok durumda, hedef oligolar sentezlenir, tavlânır ve standart kısıtlama ligasyonu klonlaması kullanılarak gRNA iskelesini içeren plazmidlere sokulur. Bununla birlikte, kesin klonlama stratejisi seçtiğiniz gRNA vektörüne bağlı olacaktır, bu nedenle söz konusu spesifik plazmid ile ilişkili protokolü gözden geçirmek en iyisidir (Addgene depozitörlerinden CRISPR protokollerine bakınız).

E. Cas9 ve gRNA'yı gönderin

Deney sisteminizle uyumlu bir gönderi yöntemi seçin. CRISPR verimliliği, uygulama yöntemine ve hücre tipine göre değişecektir. Deneye devam etmeden önce, gönderi koşullarınızı optimize etmeniz gerekebilir. Memeli sistemlerinde CRISPR uygulaması hakkında daha fazla bilgi edinin.

F. Genetik modifikasyonu doğrulayın

Hedef hücrelerine gRNA ve Cas enzimini başarıyla verdikten sonra, genom düzenlemenizi doğrulamanın zamanı gelir. CRISPR düzenlemesi, elde edilen hücre popülasyonu içinde birkaç olası genotip üretir. Bazı hücreler ya (1) gRNA ve / veya Cas9 ekspresyonu eksikliği ya da (2) hem Cas9 hem de gRNA'yı eksprese eden hücrelerde etkili bir hedef yarılmasının olmaması nedeniyle vahşi tipte olabilir.

Düzenlenen hücreler, hedef konumunuzdaki düzenlemeler için homozigot veya heterozigot olabilir. Ayrıca, iki mutasyona uğramış alel içeren hücrelerde, mutasyona uğramış her alel, NHEJ'nin hataya eğilimli doğası nedeniyle farklı olabilir. HDR gen düzenleme deneylerinde, mutasyona uğramış alellerin çoğu istenen düzenlemeyi içermeyecektir, çünkü DSB'lerin büyük bir kısmı hala NHEJ tarafından onarılmaktadır.

İstedığınız düzenlemenin gerçekleştiğini nasıl belirliyorsunuz? Düzenlemenizi doğrulamak için gereken kesin yöntem, uygulamanıza bağlı olacaktır. Bununla birlikte, hücrelerinizin istediğiniz düzenlemeyi içerdiğini doğrulamanın birkaç yaygın yolu vardır, bunlarla sınırlı olmamak üzere:

1. Uyuşmazlık-yarılma deneyi (NHEJ onarılmış DSB'ler için): Karışık hücre popülasyonu içinde mutasyona uğramış alellerin yüzdesinin yarı kantitatif bir okumasını sağlar. İlgilenilen bölge PCR ile amplifiye edilir, PCR ürünleri denatüre-renatüre edilir, DNA heteroduplekslerini parçalayan bir nükleaz ile muamele edilir ve DNA fragmanlarını tanımlamak için bir agaroz jel üzerinde çalışır.
2. PCR ve kesme sindirimi (HDR onarılmış DSB'ler için): Yeni bir kesim bölgesi oluşturan küçük nükleotit düzenlemeleri için, ilgilenilen bölge PCR ile amplifiye edilir, uygun kesme enzimi ile sindirilir ve DNA fragmanlarını tanımlamak için bir agaroz jel üzerinde çalıştırılır.
3. PCR amplifikasyonu ve jel elektroforezi (HDR veya NHEJ için): Büyük insersiyon veya delesyon için, ilgilenilen bölge; (A) ilgili bölgeyi çevreleyen (delesyon veya küçük insersiyon) veya (B) genom ekleme sınırı (sadece insersiyon); primerler kullanılarak PCR ile amplifiye edilebilir. PCR ürünü daha sonra düzenlemenin başarılı olup olmadığını belirlemek için bir agaroz jel üzerinde yürütülür.
4. PCR amplifikasyonu, alt klonlama ve Sanger sekanslama (HDR veya NHEJ için): Hedefleme frekansının ve hedeflenen allellerin tam sekansının yarı kantitatif değerlendirmesini sağlar. Hedeflenen bölgenin DNA'dan PCR amplifikasyonu, bir plazmid içine alt klonlama ve tek tek klonların taranmasını içerir.
5. PCR amplifikasyonu ve yeni nesil sekanslama (HDR veya NHEJ için): Hedef sekansınızdaki genom düzenlemelerinin kantitatif değerlendirmesini sağlar ve hedef dışı etkileri incelemek için de kullanılabilir.

Cas Enzimleri ve PAM Dizileri

Cas9 tür/varyant	PAM dizisi
<i>Streptococcus pyogenes</i> (SP); SpCas9	3' NGG
SpCas9 D1135E variant	3' NGG (reduced NAG binding)
SpCas9 VRER variant	3' NGCG
SpCas9 EQR variant	3' NGAG
SpCas9 VQR variant	3' NGAN or NGNG
xCas9	3' NG, GAA, or GAT
SpCas9-NG	3' NG
<i>Staphylococcus aureus</i> (SA); SaCas9	3' NNGRRT or NNGRR(N)
<i>Acidaminococcus</i> sp. (AsCpf1) and <i>Lachnospiraceae</i> bacterium (LbCpf1)	5' TTTV
AsCpf1 RR variant	5' TYCV
LbCpf1 RR variant	5' TYCV
AsCpf1 RVR variant	5' TATV
<i>Campylobacter jejuni</i> (CJ)	3' NNNNRYAC
<i>Neisseria meningitidis</i> (NM)	3' NNNNGATT
<i>Streptococcus thermophilus</i> (ST)	3' NNAGAAW
<i>Treponema denticola</i> (TD)	3' NAAAAC
Additional Cas9s from various species	PAM sequence may not be characterized

*Yukarıdaki tabloda, 3 've 5', PAM'ın hedeflenen sekansın hangi ucuna yerleştirildiğini gösterir. Addgene koleksiyonundaki CRISPR plazmidinin büyük kısmı, aksi belirtilmedikçe *S. pyogenes*'tir.

Referanslar

2019

- Enabling genetic analysis of diverse bacteria with Mobile-CRISPRi. 2019. Peters JM, Koo BM, Patino R, Heussler GE, Hearne CC, Qu J, Inclan YF, Hawkins JS, Lu CHS, Silvis MR, Harden MM, Osadnik H, Peters JE, Engel JN, Dutton RJ, Grossman AD, Gross CA, Rosenberg OS. *Nat Microbiol.* Feb;4(2):244-250. [PMID: 30617347](#)

2018

- A highly specific SpCas9 variant is identified by in vivo screening in yeast. 2018. Casini A, Olivieri M, Petris G, Montagna C, Reginato G, Maule G, Lorenzin F, Prandi D, Romanel A, Demichelis F, Inga A, Cereseto A. *Nat Biotechnol.* Mar;36(3):265-271. [PMID: 29431739](#)
- Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells. 2018. Rees HA, Liu DR. *Nat Rev Genet.* Dec;19(12):770-788. [PMID: 30323312](#)
- CRISPR base editors: genome editing without double-stranded breaks. 2018. Eid A, Alshareef S, Mahfouz MM. *Biochem J.* Jun 11;475(11):1955-1964. [PMID: 29891532](#)
- CRISPR-Based Technologies: Impact of RNA-Targeting Systems. 2018. Terns MP. *Mol Cell.* Nov 1;72(3):404-412. [PMID: 30388409](#)
- CRISPR-Sirius: RNA scaffolds for signal amplification in genome imaging.. 2018. Ma H, Tu LC, Naseri A, Chung YC, Grunwald D, Zhang S, Pederson T.. *Nat Methods.* Nov;15(11):928-931. [PMID: 30377374](#)

- CtIP fusion to Cas9 enhances transgene integration by homology-dependent repair. 2018. Charpentier M, Khedher AHY, Menoret S, Brion A, Lamribet K, Dardillac E, Boix C, Perrouault L, Tesson L, Geny S, De Cian A, Itier JM, Anegon I, Lopez B, Giovannangeli C, Concordet JP. *Nat Commun.* Mar 19;9(1):1133. [PMID: 29556040](#)
- Directed evolution of CRISPR-Cas9 to increase its specificity. 2018. Lee JK, Jeong E, Lee J, Jung M, Shin E, Kim YH, Lee K, Jung I, Kim D, Kim S, Kim JS. *Nat Commun.* Aug 6;9(1):3048. [PMID: 30082838](#)
- Engineered anti-CRISPR proteins for optogenetic control of CRISPR-Cas9. 2018. Bubeck F, Hoffmann MD, Harteveld Z, Aschenbrenner S, Bietz A, Waldhauer MC, Börner K, Fakhiri J, Schmelas C, Dietz L, Grimm D, Correia BE, Eils R, Niopek D. *Nat Methods.* Nov;15(11):924-927. [PMID: 30377362](#)
- Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space. 2018. Nishimasu H, Shi X, Ishiguro S, Gao L, Hirano S, Okazaki S, Noda T, Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Mori H, Oura S, Holmes B, Tanaka M, Seki M, Hirano H, Aburatani H, Ishitani R, Ikawa M, Yachie N, Zhang F, Nureki O. *Science.* Sep 21;361(6408):1259-1262. [PMID: 30166441](#)
- Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity.. 2018. Hu JH, Miller SM, Geurts MH, Tang W, Chen L, Sun N, Zeina CM, Gao X, Rees HA, Lin Z, Liu DR. *Nature.* Apr 5;556(7699):57-63. [PMID: 29512652](#)
- Genome-wide CRISPR-dCas9 screens in E. coli identify essential genes and phage host factors. 2018. Rousset F, Cui L, Siouve E, Becavin C, Depardieu F, Bikard D. *PLoS Genet.* Nov 7;14(11):e1007749. [PMID: 30403660](#)
- Optimized libraries for CRISPR-Cas9 genetic screens with multiple modalities. 2018. Sanson KR, Hanna RE, Hegde M, Donovan KF, Strand C, Sullender ME, Vaimberg EW, Goodale A, Root DE, Piccioni F, Doench JG. *Nat Commun.* Dec 21;9(1):5416. [PMID: 30575746](#)
- Synthetic CRISPR-Cas gene activators for transcriptional reprogramming in bacteria. 2018. Dong C, Fontana J, Patel A, Carothers JM, Zalatan JG. *Nat Commun.* Jun 27;9(1):2489. [PMID: 29950558](#)

2017

- A Broad-Spectrum Inhibitor of CRISPR-Cas9. 2017. Harrington LB, Doxzen KW, Ma E, Liu JJ, Knott GJ, Edraki A, Garcia B, Amrani N, Chen JS, Cofsky JC, Kranzusch PJ, Sontheimer EJ, Davidson AR, Maxwell KL, Doudna JA. *Cell.* Sep 7;170(6):1224-1233.e15. [PMID: 28844692](#)
- Engineered Cpf1 variants with altered PAM specificities. 2017. Gao L, Cox DBT, Yan WX, Manteiga JC, Schneider MW, Yamano T, Nishimasu H, Nureki O, Crosetto N, Zhang F. *Nat Biotechnol.* 35(8):789-792. [PMID: 28581492](#)
- Enhanced proofreading governs CRISPR-Cas9 targeting accuracy. 2017. Chen JS, Dagdas YS, Kleinstiver BP, Welch MM, Sousa AA, Harrington LB, Sternberg SH, Joung JK, Yildiz A, Doudna JA. *Nature.* 550(7676):407-410. [PMID: 28931002](#)
- Improved base excision repair inhibition and bacteriophage Mu Gam protein yields C:G-to-T:A base editors with higher efficiency and product purity. 2017. Komor AC, Zhao KT, Packer MS, Gaudelli NM, Waterbury AL, Koblan LW, Kim YB, Badran AH, Liu DR. *Sci Adv.* 3(8):eaao4774. [PMID: 28875174](#)
- Improving the DNA specificity and applicability of base editing through protein engineering and protein delivery. 2017. Rees HA, Komor AC, Yeh WH, Caetano-Lopes J, Warman M, Edge ASB, Liu DR. *Nat Commun.* 8:15790. [PMID: 28585549](#)

- In Situ Capture of Chromatin Interactions by Biotinylated dCas9. 2017. Liu X, Zhang Y, Chen Y, Li M, Zhou F, Li K, Cao H, Ni M, Liu Y, Gu Z, Dickerson KE, Xie S, Hon GC, Xuan Z, Zhang MQ, Shao Z, Xu J. *Cell*. Aug 24;170(5):1028-1043.e19. [PMID: 28841410](#)
- Increasing the genome-targeting scope and precision of base editing with engineered Cas9-cytidine deaminase fusions. 2017. Kim YB, Komor AC, Levy JM, Packer MS, Zhao KT, Liu DR. *Nat Biotechnol*. 35(4):371-376. [PMID: 28191901](#)
- Inhibition of CRISPR-Cas9 with Bacteriophage Proteins. 2017. Rauch BJ, Silvis MR, Hultquist JF, Waters CS, McGregor MJ, Krogan NJ, Bondy-Denomy J. *Cell*. Jan 12;168(1-2):150-158.e10. [PMID: 28041849](#)
- Multiplex gene editing by CRISPR-Cpf1 using a single crRNA array. 2017. Zetsche B, Heidenreich M, Mohanraju P, Fedorova I, Kneppers J, DeGennaro EM, Winblad N, Choudhury SR, Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Wu WY, Scott DA, Severinov K, van der Oost J, Zhang F. *Nat Biotechnol*. 35(1):31-34. [PMID: 27918548](#)
- Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. 2017. Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, Essletzbichler P, Dy AJ, Joung J, Verdine V, Donghia N, Daringer NM, Freije CA, Myhrvold C, Bhattacharyya RP, Livny J, Regev A, Koonin EV, Hung DT, Sabeti PC, Collins JJ, Zhang F. *Science*. 356(6336):438-442. [PMID: 28408723](#)
- Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. 2017. Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, Packer MS, Badran AH, Bryson DI, Liu DR. *Nature*. 551(7681):464-471. [PMID: 29160308](#)
- RNA editing with CRISPR-Cas13. 2017. Cox DBT, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Franklin B, Kellner MJ, Joung J, Zhang F. *Science*. 358(6366):1019-1027. [PMID: 29070703](#)
- RNA targeting with CRISPR-Cas13. 2017. Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Essletzbichler P, Han S, Joung J, Belanto JJ, Verdine V, Cox DBT, Kellner MJ, Regev A, Lander ES, Voytas DF, Ting AY, Zhang F. *Nature*. 550(7675):280-284. [PMID: 28976959](#)

2016

- High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. 2016. Kleinstiver BP, Pattanayak V, Prew MS, Tsai SQ, Nguyen NT, Zheng Z, Joung JK. *Nature*. 529(7587):490-5. [PMID: 26735016](#)
- Multiplexed labeling of genomic loci with dCas9 and engineered sgRNAs using CRISPRainbow. 2016. Ma H, Tu LC, Naseri A, Huisman M, Zhang S, Grunwald D, Pederson T. *Nat Biotechnol*. May;34(5):528-30. [PMID: 27088723](#)
- Naturally occurring off-switches for CRISPR-Cas9. 2016. Pawluk A, Amrani N, Zhang Y, Garcia B, Hidalgo-Reyes Y, Lee J, Edraki A, Shah M, Sontheimer EJ, Maxwell KL, Davidson AR. *Cell*. 167(7):1829-1838. [PMID: 27984730](#)
- Practical Considerations for Using Pooled Lentiviral CRISPR Libraries. 2016. McDade JR, Waxmonsky NC, Swanson LE, Fan M. *Curr Protoc Mol Biol*. 115:31.5.1-31.5.13. [PMID: 27366891](#)
- Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. 2016. Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, Liu DR. *Nature*. 533(7603):420-4. [PMID: 27096365](#)
- Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. 2016. Slaymaker IM, Gao L, Zetsche B, Scott DA, Yan WX, Zhang F. *Science*. 351(6268):84-8. [PMID: 26628643](#)

2015

- A Scalable Genome-Editing-Based Approach for Mapping Multiprotein Complexes in Human Cells. 2015. Dalvai M, Loehr J, Jacquet K, Huard CC, Roques C, Herst P, Côté J, Doyon Y. *Cell Rep.* 13(3):621-33. [PMID: 26456817](#)
- An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. 2015. Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Haft DH, Horvath P, Moineau S, Mojica FJ, Terns RM, Terns MP, White MF, Yakunin AF, Garrett RA, van der Oost J, Backofen R, Koonin EV. *Nat Rev Microbiol.* 13(11):722-36. [PMID: 26411297](#)
- Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing in vitro and in vivo. 2015. Zuris JA, Thompson DB, Shu Y, Guilinger JP, Bessen JL, Hu JH, Maeder ML, Joung JK, Chen ZY, Liu DR. *Nat Biotechnol.* 33(1):73-80. [PMID: 25357182](#)
- CETCh-seq: CRISPR epitope tagging ChIP-seq of DNA-binding proteins. 2015. Savic D, Partridge EC, Newberry KM, Smith SB, Meadows SK, Roberts BS, Mackiewicz M, Mendenhall EM, Myers RM. *Genome Res.* 25(10):1581-9. [PMID: 26355004](#)
- Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System. 2015. Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, Makarova KS, Essletzbichler P, Volz SE, Joung J, van der Oost J, Regev A, Koonin EV, Zhang F. *Cell.* 163(3):759-71. [PMID: 26422227](#)
- CRISPR-Cas9-Mediated Genetic Screening in Mice with Haploid Embryonic Stem Cells Carrying a Guide RNA Library. 2015. Zhong C, Yin Q, Xie Z, Bai M, Dong R, Tang W, Xing YH, Zhang H, Yang S, Chen LL, Bartolomei MS, Ferguson-Smith A, Li D, Yang L, Wu Y, Li J. *Cell Stem Cell.* 17(2):221-32. [PMID: 26165924](#)
- Discovery of cancer drug targets by CRISPR-Cas9 screening of protein domains. 2015. Shi J, Wang E, Milazzo JP, Wang Z, Kinney JB, Vakoc CR. *Nat Biotechnol.* 33(6):661-7. [PMID: 25961408](#)
- Electroporation enables the efficient mRNA delivery into the mouse zygotes and facilitates CRISPR/Cas9-based genome editing. 2015. Hashimoto M, Takemoto T. *Sci Rep.* 5:11315. [PMID: 26066060](#)
- Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. 2015. Kleinstiver BP, Prew MS, Tsai SQ, Topkar VV, Nguyen NT, Zheng Z, Gonzales AP, Li Z, Peterson RT, Yeh JR, Aryee MJ, Joung JK. *Nature.* 523(7561):481-5. [PMID: 26098369](#)
- Engineering complex synthetic transcriptional programs with CRISPR RNA scaffolds. 2015. Zalatan JG, Lee ME, Almeida R, Gilbert LA, Whitehead EH, La Russa M, Tsai JC, Weissman JS, Dueber JE, Qi LS, Lim WA. *Cell.* 160(1-2):339-50. [PMID: 25533786](#)
- Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. 2015. Hilton IB, D'Ippolito AM, Vockley CM, Thakore PI, Crawford GE, Reddy TE, Gersbach CA. *Nat Biotechnol.* 33(5):510-7. [PMID: 25849900](#)
- Genome engineering using CRISPR-Cas9 system. 2015. Cong L, Zhang F. *Methods Mol Biol.* 1239:197-217. [PMID: 25408407](#)
- Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. 2015. Konermann S, Brigham MD, Trevino AE, Joung J, Abudayyeh OO, Barcena C, Hsu PD, Habib N, Gootenberg JS, Nishimasu H, Nureki O, Zhang. *Nature.* 517(7536):583-8. [PMID: 25494202](#)
- High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9. 2015. Shalem O, Sanjana NE, Zhang F. *Nat Rev Genetics.* 16(5):299-311. [PMID: 25854182](#)
- Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. 2015. Chavez A, Scheiman J, Vora S, Pruitt BW, Tuttle M, P R Iyer E, Lin S, Kiani S, Guzman CD, Wiegand DJ, Ter-Ovanesyan

D, Braff JL, Davidsohn N, Housden BE, Perrimon N, Weiss R, Aach J, Collins JJ, Church GM. *Nat Methods*. 12(4):326-8. [PMID: 25730490](#)

- In vivo genome editing using Staphylococcus aureus Cas9. 2015. Ran FA, Cong L, Yan WX, Scott DA, Gootenberg JS, Kriz AJ, Zetsche B, Shalem O, Wu X, Makarova KS, Koonin EV, Sharp PA, Zhang F. *Nature*. 520(7546):186-91. [PMID: 25830891](#)
- Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. 2015. Chu VT, Weber T, Wefers B, Wurst W, Sander S, Rajewsky K, Kühn R. *Nat Biotechnol*. 33(5):543-8. [PMID: 25803306](#)
- Multicolor CRISPR labeling of chromosomal loci in human cells. 2015. Ma H, Naseri A, Reyes-Gutierrez P, Wolfe SA, Zhang S, Pederson T. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 112(10):3002-7. [PMID: 25713381](#)
- Multiple mechanisms for CRISPR-Cas inhibition by anti-CRISPR proteins. 2015. Bondy-Denomy J, Garcia B, Strum S, Du M, Rollins MF, Hidalgo-Reyes Y, Wiedenheft B, Maxwell KL, Davidson AR. *Nature*. 526(7571):136-9. [PMID: 26416740](#)
- Multiplexable, locus-specific targeting of long RNAs with CRISPR-Display. 2015. Shechner DM, Hacısuleyman E, Younger ST, Rinn JL. *Nat Methods*. 12(7):664-70. [PMID: 26030444](#)

2014

- A protein-tagging system for signal amplification in gene expression and fluorescence imaging. 2014. Tanenbaum ME, Gilbert LA, Qi LS, Weissman JS, Vale RD. *Cell*. 159(3):635-46. [PMID: 25307933](#)
- Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. 2014. Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, Dohmae N, Ishitani R, Zhang F, Nureki O. *Cell*. 156(5):935-49. [PMID: 24529477](#)
- Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. 2014. Lin S, Staahl BT, Alla RK, Doudna JA. *eLife*. 3:e04766. [PMID: 25497837](#)
- Genetic Screens in Human Cells Using the CRISPR/Cas9 System. 2014. Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, Lander ES. *Science*. 343(6166):80-4. [PMID: 24336569](#)
- Genome editing using Cas9 nickases. 2014. Trevino AE, Zhang F. *Methods Enzymol*. 546:161-74. [PMID: 25398340](#)
- Genome-Scale CRISPR-Cas9 Knockout Screening in Human Cells. 2014. Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, Shi X, Scott DA, Mikkelsen T, Heckl D, Ebert BL, Root DE, Doench JG, Zhang F. *Science*. 343(6166):84-7. [PMID: 24336571](#)
- Genome-Scale CRISPR-Mediated Control of Gene Repression and Activation. 2014. Gilbert LA, Horlbeck MA, Adamson B, Villalta JE, Chen Y, Whitehead EH, Guimaraes C, Panning B, Ploegh HL, Bassik MC, Qi LS, Kampmann M, Weissman JS. *Cell*. 159(3):647-6. [PMID: 25307932](#)
- Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. 2014. Fu Y, Sander JD, Reyon D, Cascio VM, Joung JK. *Nat Biotechnol*. 32(3):279-84. [PMID: 24463574](#)
- In vivo engineering of oncogenic chromosomal rearrangements with the CRISPR/Cas9 system. 2014. Maddalo D, Manchado E, Concepcion CP, Bonetti C, Vidigal JA, Han YC, Ogrodowski P, Crippa A, Rekhman N, de Stanchina E, Lowe SW, Ventura A. *Nature*. 516(7531):423-7. [PMID: 25337876](#)

- Multiplex CRISPR/Cas9-based genome engineering from a single lentiviral vector. 2014. Kabadi AM, Ousterout DG, Hilton IB, Gersbach CA. *Nucleic Acids Res.* 42(19):e147. [PMID: 25122746](#)
- Multiplex genome engineering in human cells using all-in-one CRISPR/Cas9 vector system. 2014. Sakuma T, Nishikawa A, Kume S, Chayama K, Yamamoto T.. *Sci Rep.* 4:5400. [PMID: 24954249](#)
- Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation. 2014. Doench JG, Hartenian E, Graham DB, Tothova Z, Hegde M, Smith I, Sullender M, Ebert BL, Xavier RJ, Root DE. *Nat Biotechnol.* 32(12):1262-7. [PMID: 25184501](#)
- Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. 2014. Anders C, Niewoehner O, Duerst A, Jinek M. *Nature.* 513(7519):569-73. [PMID: 25079318](#)

2013

- Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system. 2013. Bondy-Denomy J, Pawluk A, Maxwell KL, Davidson AR. *Nature.* 493(7432):429-32. [PMID: 23242138](#)
- CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. 2013. Mali P, Aach J, Stranges PB, Esvelt KM, Moosburner M, Kosuri S, Yang L, Church GM. *Nat Biotechnol.* 31(9):833-8. [PMID: 23907171](#)
- CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. 2013. Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, Liu Z, Brar GA, Torres SE, Stern-Ginossar N, Brandman O, Whitehead EH, Doudna JA, Lim WA, Weissman JS, Qi LS. *Cell.* 154(2):442-51. [PMID: 23849981](#)
- DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. 2013. Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, Li Y, Fine EJ, Wu X, Shalem O, Cradick TJ, Marraffini LA, Bao G, Zhang F. *Nat Biotechnol.* 31(9):827-32. [PMID: 23873081](#)
- Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system. 2013. Chen B, Gilbert LA, Cimini BA, Schnitzbauer J, Zhang W, Li GW, Park J, Blackburn EH, Weissman JS, Qi LS, Huang B. *Cell.* 155(7):1479-91. [PMID: 24360272](#)
- Efficient isolation of specific genomic regions and identification of associated proteins by engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP) using CRISPR. 2013. Fujita T, Fujii H. *Biochem Biophys Res Commun.* 439(1):132-6. [PMID: 23942116](#)
- Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. 2013. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. *Nat Protoc.* 8(11):2281-308. [PMID: 24157548](#)
- High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. 2013. Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, Sander JD. *Nat Biotechnol.* 31(9):822-6. [PMID: 23792628](#)
- Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. 2013. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. *Science.* 339 (6121): 819–23. [PMID: 23287718](#)
- Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system. 2013. Cheng AW, Wang H, Yang H, Shi L, Katz Y, Theunissen TW, Rangarajan S, Shivalila CS, Dadon DB, Jaenisch R. *Cell Res.* 23(10):1163-71. [PMID: 23979020](#)
- One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. 2013. Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, Jaenisch R. *Cell.* 153(4):910-8. [PMID: 23643243](#)

- Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. 2013. Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, Lim WA. *Cell*. 152(5):1173-83. [PMID: 23452860](#)
- RNA-guided human genome engineering via Cas9. 2013. Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. *Science*. 339(6121):823-6. [PMID: 23287722](#)

Kaynak: <https://www.addgene.org/guides/crispr/>