

## Crispr Cas-9

Mimar Sinan Güzel Sanatlar Üniversitesi

Supervisor: PhD.Ozan KOCADAĞLI



**CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats):** *“Düzenli Aralıklarla Bölünmüş Palindromik Tekrar Kümeleri”*

- DNA dizisi üzerinde, Crispr lokosu (Bir genin kromozonda düştüğü yerdir) tanımlayan gen dizilimidir. Tekrar diziler bir canlı için tamamen aynı olmakla beraber tekrarların arasındaki dizileri birbirinden farklılık göstermektedir.

**Cas:** Bu, bağışıklılık sisteminde görev alan proteinlerin genel adıdır.

# Crispr Cas-9

## Comparison of DNA and RNA Structure

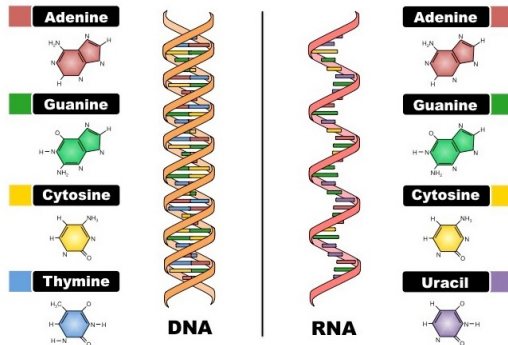


Figure 1: DNA vs RNA.

Bakteri ve virüsler bütün yaşam boyunca birbirleri ile savaş halindedir. Bakteriyel fajlar (fajlar-*Bakterileri enjekte eden virüslerdir*) bakterileri avlıyorlardır. Özellikle Okyanusta fajlar bakterilerin %40'ını öldürüyordur. Fajlar kendi kodlarını bakterilerin içine ekleyip onları kendi kodları gibi kullanmaktadır. Diğer taraftan Bakteriler güvenlik duvarları ile fajlara karşı koymasına rağmen genellikle başarısız olmaktadır, fakat bazen bakteri saldırıdan kurtulabilir. Bu durumda bakteriler en güçlü antivirus sistemini çalıştırmaktadır.

# Crispr Cas-9

Virüs DNA'sını Crispr denilen DNA arşivinde saklıyor. Burada, ihtiyaç olunana dek saklanıyor. Virüs tekrar saldırdığında, Bakteri DNA arşivinden hemen bir RNA kopyası çıkartıyor(gRNA), ve gizli bir silah kuşanıyor(Buna CAS-9 proteini deniyor). Protein bakterinin içini istilacıdan bir iz bulmak için tarıyor. Her parçayı arşivdeki örneklerle karşılaştırarak mükemmel uyuşmayı bulduğunda aktive oluyor ve virüs DNA'sını kesiyor. Saldırıya karşı bakterinin kendisini korumasını yararsız yapıyor. Bu yüzden Cas-9'u özel yapan şey tamamen kusursuz olması, ve neredeyse DNA içinde bir cerrah edası yaratmasıdır. Asıl önemli olan olay, Crispr'ın programabilir olduğu zaman başlıyor. “Düzenlemek istediğin DNA'nın kopyasını ver ve sisteme yaşayan bir hücreye koy.”

Eğer genetik manipulasyonu bir harita olarak düşünürsek burada Crispr GPS gibidir. Kusursuz, ucuz ve kolay olmasının yanı sıra, Crispr yaşayan hücreleri düzenleme imkanı sunuyor, genleri açıp kapatmaya ve hedef belirleyip özel DNA'ları çalıştırmaya çalışıyor. Ayrıca her türlü hücrede çalışabilir (Mikroorganizma, bitki, hayvan ya da insan). Crispr bu anlamda DNA yapısını değiştiren bir yapıdır, yalnız buradaki önemli husus ise bu haritada en iyi modelleme yaparak en iyi DNA üzerindeki zarar görmüş hücre yapılarını en iyi şekilde düzenlemektir.

# Crispr Cas-9

**Cas-9:** *CS.pyogenes* Cas9 geniş(1368 aminoasit) çoklu alanlara sahip ve multifonksiyonel DNA endonükleazdır.

**gRNA:** Cas bağlanması için gerekli olan iskele dizisinden ve değiştirilecek genomik hedefi tanımlayan 20 aralıklı nükleotidden oluşan kısa sentetik bir RNA dır

**PAM:** Pam dizilimi Cas9 için bağlayıcı bir sinyal görevinde bulunan bir dizilimdir, ancak bu tam dizilim kullanılan Cas proteinine bağlıdır. Böylece hedef dizilimi bulmada PAM'ın tanımlanmasının büyük rolü vardır. Burada PAM dizilimin sistematik 3'lü nükleotid dizilimi göz önünde bulundurularak hedef dizilimi hakkında eşleme yapılır. Böylece Crispr çalışmalarında Cas9 kullanılarak, PAM dizilimi üzerinden işlem yapılacak(mutasyon/ekleme/çıkarma) hedef dizilimi eşlemesi yapılır.

# Crispr Cas-9

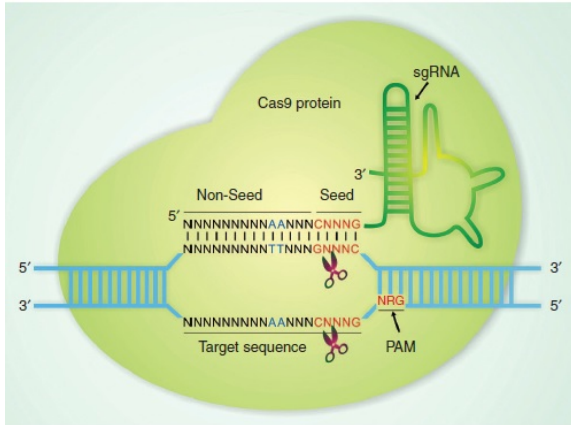


Figure 2: Crispr Cas-9 Sistemi.



# Crispr Cas-9

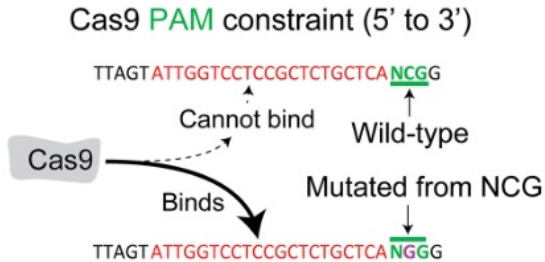


Figure 3: PAM dizilimi.

# Crispr Cas-9



The Cas9 enzyme (red, artist's impression) snips DNA (orange). Improved versions of Cas9 promise to expand the usefulness of the CRISPR-Cas9 genome-editing technique. Credit: Alamy

---

Figure 4: Cas-9.

# Crispr Cas-9

Species/Variant of Cas9	PAM Sequence*
<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

Figure 5: Cas proteinine göre PAM dizilimi.

**Target On:** gRNA hedef dizisi tarafından belirtilen istenen bir konumda Cas9 bölünmesi aktivitesine “Target On” denir.

**Target Off:** Cas9’u istenmeyen genomik konumlara almak için yeterli homolojiye sahip gRNA hedefleme dizisi nedeniyle istenmeyen yerlerdeki Cas9 bölünmesine “Target Off” denir.

**Gene Knockout:** Son zamanlarda Gen inaktivasyonu olarak nitelendirilen, yaygın olarak *Gene knockout* olarak bilinen ifade, fonksiyonel önemli spesifik genlerin ve kompleksli metabolik süreçler üzerindeki nihai olarak çeşitli hastalıklara neden olan genler silinebilir veya değiştirilebilir. Burada homologik olmayan bir yaklaşım vardır.

## Homoloji olmayan modelleme

(NHEJ) homolog olmayan uç birleştirmedir. Genellikle bu birleştirme yöntemiyle dominant alleli bozmak için kullanılır. Eğer hastalık bir genin işlev kaybetmesi ile oluşuyorsa, HDR ile donör kalıp üzerinde genin düzgün işleve sahip olanının kopyası kullanılarak düzeltilebilir

**Gene Knockin:** Genetik anlamda hücreyi onarmanın bir diğer yolu ise **Gene Knockin** metotudur. Bu yöntem ile gen modifikasyonu ya da eklemesi yapılabilir. Burada homologik bir yaklaşım vardır.

## Homoloji modelleme

(HDR) Homoloji modelleme yöntemi x-ray crystallograph ya da MR çalışmalarıyla deneysel olarak yapısı belirlenmiş bir proteinin kalıp olarak kullanıldığı, benzerliklerden yola çıkılarak hedef proteinin 3 boyutlu yapısının belirlendiği bir yaklaşımdır. DNA donörüyle birlikte verildiğinde Beta katenin kodlayan gende spesifik nokta mutasyonu olduğu ve bu stratejinin daha kesin genom düzenleme süreçlerinde kullanabileceği yöntemlerden biridir.

# Crispr Cas-9

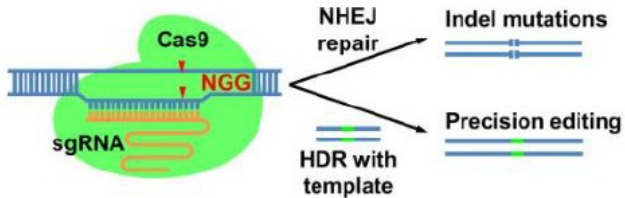


Figure 6: Knockout-Knockin.

# Crispr Cas-9

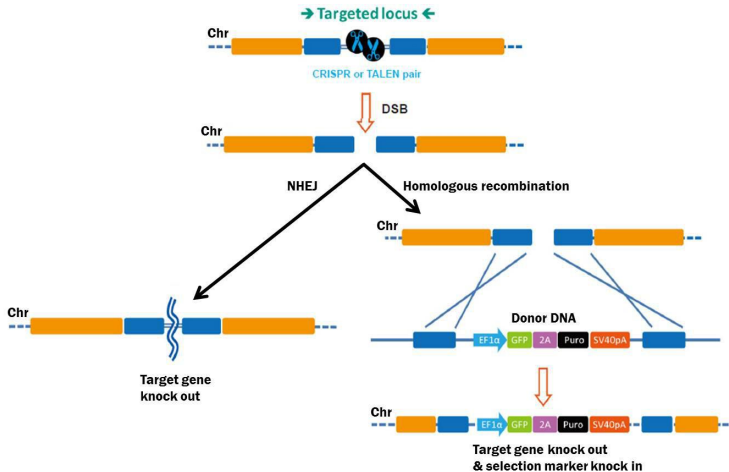


Figure 7: Knockout vs Knockin.



- Domain-Specific introduction to machine learning terminology, pitfalls and opportunities in Crispr-based gene editing
  - Amaç: Machine learning algoritmaları ile gende hedeflenen pozisyonu ve hedeflenen akson gibi özelliklerini içeren pozisyonlar ile belirlenen modeller ile Crispr Ve Azimuth yaklaşımlarıyla geliştirmektir. Böylece Cas-9'un istenmeyen nükleaz lokusu üzerindeki lokasyonu tahmin edilebilir. (**Features:** Cell line, SgRNA, Chromosome, Start, End, Target Gene, SgRNA Sequence, Direction, PubMed ID, Read Count final replicate1, Read Count final replicate2, Read count initial replicate, Gene score, Experiment Type, Hit)

- A machine learning approach for predicting Crispr-Cas9 cleavage efficiencies and patterns underlying its mechanism of action
  - Amaç: Crispr-Cas9'un bölünme etkinliğini potansiyel olarak etkileyen özellikleri incelemektir. DNA ve RNA dizilimi göz önünde bulundurularak off-target diziliminin Machine learning algoritmalarıyla tahmin edilmesidir. (**Features:** Study, Ontarget title, SgRNA sequence, DNA site strand, strand, coordinate(start-end), chromosone, mismatch, nuckeotide-position, etc. )

# Crispr Cas-9

On target Software	Model	PAM
DeepCRISPR	CNN <sup>1</sup>	NGG
DeepCpf1	CNN	TTTN
DeepCas9	CNN	NGG
CRISPRater	L1-reg <sup>2</sup>	NGG
WU-CRISPR	SVM <sup>3</sup>	NGG
SgRNAScorer	SVM(C) <sup>4</sup>	NGG,NAGNNAGAAW,NNNNGMTT
TUSCAN	RF <sup>5</sup>	NGG
SSC	Elastic Net	NGG
CRISPRScan	Linear reg	NGG
Azimuth1.0	Logistic reg	NGG
Azimuth2.0	GBRT <sup>6</sup>	NGG
CRISPRpred	SVM	NGG
ge-CRISPR	SVM	NGG
CRISTA	RF	NGG
BAGEL	Bayesian Classifier	NGG

<sup>1</sup>Convolution Neural Network

<sup>2</sup>L-1 Regression

<sup>3</sup>Support Vektor Machine

<sup>4</sup>using SVM to classify (+1 represent high activity,-1 represent low-activity)

<sup>5</sup>Random Forest

<sup>6</sup>Gradient Boost Regression Tree

# Crispr Cas-9

Crispr cas-9 tanıtım videosu link<sup>7</sup>

---

<sup>7</sup><https://www.youtube.com/watch?v=4YKFw2KZA5o>

- Jiang, F., Doudna J.A.(2017).Crispr-Cas9 Structures and Mechanisms, *Annual Review Biophys*, 46:505-29.
- <https://www.nature.com/articles/d41586-020-00903-x>
- <https://www.addgene.org/guides/crispr/>
- Hui, D.Y. (1998). Utility and Importance of Gene Knockout Animals For Nutritional and Metabolic Research, *The Journal of Nutrition*, 128(11),2052-2057.
- Roebroek, A.J.M, Gordts, P.L.S, Reekmans, S. (2011).Transgenic Mouse Methods and Protocols, Humana Press, New York. pp.257-275.