

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TİBBİ GENETİK ANABİLİM DALI  
TİBBİ GENETİK TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**CRISPR/Cas9 SİSTEMİ İLE BCR/ABL GEN FÜZYONUNUN *in vitro*  
KALİTATİF ANALİZİ**

**HAZIRLAYAN**

**FEHİME DENİZ KANAT**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA - 2020**

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TİBBİ GENETİK ANABİLİM DALI  
TİBBİ GENETİK TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**CRISPR/Cas9 SİSTEMİ İLE BCR/ABL GEN FÜZYONUNUN *in vitro*  
KALİTATİF ANALİZİ**

**HAZIRLAYAN**

**FEHİME DENİZ KANAT**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**

**Doç. Dr. YUNUS KASIM TERZİ**

**ANKARA - 2020**

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Tezli Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Fehime Deniz Kanat tarafından hazırlanan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 24 / 08 / 2020

**Tez Adı: CRISPR/Cas9 Sistemi ile BCR/ABL Gen Füzyonunun *in vitro* Kalitatif Analizi**

**Tez Jüri Üyeleri ( Unvanı, Adı - Soyadı, Kurumu )**

**İmza**

**ONAY**

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ ENSTİTÜSÜ**  
**YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU**

Tarih: 16 / 08 / 2020

Öğrencinin Adı, Soyadı:Fehime Deniz, Kanat.

Öğrencinin Numarası:

Anabilim Dalı:Tıbbi Genetik

Programı:Tıbbi Genetik Tezli Yüksek Lisans

Danışmanın Unvanı/Adı, Soyadı:

Tez Başlığı: CRISPR/Cas9 SİSTEMİ İLE BCR/ABL GEN FÜZYONUNUN in vitro KALİTATİF ANALİZİ .

Yukarıda başlığı belirtilen Yüksek Lisans/Doktora tez çalışmamın; Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç Bölümünden oluşan, toplam 67 sayfalık kısmına ilişkin, 16 / 08 / 2020. tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 6'dır. Uygulanan filtrelemeler:

1. Kaynakça hariç
2. Alıntılar hariç
3. Beş (5) kelimededen daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

“Başkent Üniversitesi Enstitüleri Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Usul ve Esaslarını” inceledim ve bu uygulama esaslarında belirtilen azami benzerlik oranlarına tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Öğrenci İmzası:

**ONAY**

Tarih: 16 / 08 / 2020.

Öğrenci Danışmanı Unvan, Ad, Soyad, İmza:

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca danışmanım olmasından büyük gurur duyduğum; sabrı, özverisi ve kıymetli bilgilerinden beni hiçbir zaman yoksun bırakmayan, her an her türlü sıkıntıya çözüm bulmak için elinden gelen her şeyi yapan ve bütün zorlu süreçlerde bana olan güvenini sonuna kadar hissettirip pes etmemem için elinden gelen her şeyi yapan çok değerli hocam Sayın Doç. Dr. Yunus Kasım Terzi'ye sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca tecrübelerini benden hiçbir zaman esirgemeyen hocalarım Sayın Prof. Dr. Feride İffet Şahin, Sayın Prof. Dr. Zerrin Yılmaz Çelik ve Prof. Dr. Özlem Darcansoy İşeri'ye teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Gerek lisans gerek yüksek lisans eğitimim boyunca bende çok fazla emeği olan, fikirlerini çok önemseydiğim ve kullandığı her cümleyi unutmamak için not ettiğim çok kıymetli hocam Doç. Dr. Özgür Kütük'e,

Kan bağı olmadan kardeş olunabileceğini bana gösteren, her an her konuda arkamda olduğundan emin olduğum ve Ankara'yı sevmemi sağlayan canım ablam Dr. Nihal Aktaş'a,

Laboratuvar çalışmalarım ve yüksek lisans eğitimim boyunca bana destek olan tüm Başkent Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı öğrencileri ve çalışanlarına teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım boyunca benden desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen ve her zaman gülümsemem için ellerinden geleni yapıp, motivasyonumu yüksek tutmak için gösterdikleri çabalar için özellikle Alperen Aksu ve Dr. Vildan Şahin Berber başta olmak üzere tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bütün yaşantım boyunca desteklerini, sevgilerini ve güvenlerini her zaman hissettiren canım aileme ve çok kıymetli dayılarıma minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu yüksek lisans tezi Başkent Üniversitesi tarafından KA18/418 proje koduyla desteklenmiştir.

## ÖZET

**Fehime Deniz KANAT, CRISPR/Cas9 Sistemi İle BCR/ABL Gen Füzyonunun in vitro Kalitatif Analizi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Genetik Tezli Yüksek Lisans Programı, Ankara, 2020**

Lösemi, kemik iliği tarafından üretilen beyaz kan hücrelerinin kanseridir. Lösemi akut ve kronik olmak üzere iki gruba ayrılır. Kronik miyeloid lösemi (KML) tüm yetişkin lösemilerin %15'ini oluşturur. Yirmikinci kromozom ile 9. kromozom arasındaki karşılıklı parça değiş tokuşu sonucunda yeni oluşan 22. kromozom *Philadelphia* kromozomu (Ph) olarak adlandırılır. İlk olarak 1960 yılında KML'li bir hastada tanımlanmıştır. *BCR-ABL1* füzyon geni KML patogenezinde önemli rol oynayan tirozin kinaz aktivitesine sahip bir proteindir. Bu onkoprotein ifadenmesi, hücre sağ kalımını ve çoğalmasını arttıran sinyal yolağının daha alt basamaklarında yer alan sinyal proteinlerini aktive ederek hematopoetik progenitor hücreleri dönüştürür.

Bu çalışmanın amacı *BCR-ABL1* füzyon geni varlığını CRISPR/Cas9 sistemini kullanarak saptamaktır. Bu kapsamda *BCR-ABL1* füzyon genine sahip iki KML hastasının komplementer DNA (cDNA)'sı, polimeraz zincir tepkimesi (PZR) yöntemi ile çoğaltıldı. Füzyon bölgesini saptamak amacıyla Sanger dizileme yapıldı ve *BCR-ABL1* füzyon bölgesinin dizisi çıkarıldı. Bu çalışmada, hastalardan birinden elde edilen *BCR-ABL1* füzyon genini hedefleyen kılavuz RNA dizayn edildi. Cas9 endonükleaz ve kılavuz RNA birlikte kullanılarak laboratuvar ortamında *BCR-ABL1* füzyon bölgesinin belirlenip, kesim yapılması sağlandı. Yapılan tez çalışması sonucunda elde edilen verilere göre, füzyon dizisi tanıma hassasiyeti %2 olarak tespit edildi. Bu yöntem CRISPR/Cas9 yönteminin sadece genom düzenleme için değil aynı zamanda translokasyon tipi mutasyonlarının da tespit edilmesi amacıyla kullanılabileceğini göstermektedir.

İleride yapılacak çalışmalarda testin hassasiyeti ve aynı anda tanıyabileceği füzyon noktalarının sayısının arttırabileceği öngörülmektedir.

Anahtar kelimeler: Kronik miyeloid lösemi, CRISPR/ Cas9, mutasyon analizi, füzyon

## ABSTRACT

**Fehme Deniz KANAT, in vitro Qualitative Analysis Of BCR/ABL Gene Fusion With CRISPR/Cas9 System, Institute of Health Sciences, Master in Medical Genetics with Thesis, Ankara, 2020**

Leukemia is a cancer of white blood cells produced by the bone marrow. Leukemia is divided into two main groups: acute and chronic. Chronic myeloid leukemia (CML) accounts for 15% of adult leukemia. The *Philadelphia* chromosome (Ph), was first described in a patient with CML in 1960, had a reciprocal translocation between the proto-oncogene tyrosine-protein kinase (*ABL1*) gene on chromosome 9 to the breakpoint cluster region (*BCR*) gene on chromosome 22. The product of the BCR-ABL1 fusion gene is a protein with tyrosine kinase activity that plays an important role in the pathogenesis of CML. The characteristic expression of this oncoprotein transforms hematopoietic progenitor cells by activating downstream signaling cascades that increase cell survival and proliferation. This study aims to detect patients who have a *BCR-ABL1* fusion gene with the CRISPR / Cas9 system. For this reason, two patients' cDNAs who have the *BCR-ABL1* fusion gene is amplified by polymerase chain reaction (PCR). Sanger sequencing was performed to detect the fusion region and its' sequence. In this study, A guide RNA was designed for targeting the *BCR-ABL1* fusion region of a patient's cDNA. The fusion region detection sensitivity is calculated as 2%. The CRISPR / Cas9 method can be used not only for genome editing but also to detect translocation type gene rearrangement.

In future studies, it is predicted that the sensitivity of the test and the number of fusion regions that can be detected at the same time might be increased.

Keywords: Chronic myeloid leukemia, CRISPR/Cas9, mutation analysis, fusion

# İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT .....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
TABLolar LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ.....	ix
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 <i>Philadelphia</i> Kromozomu.....	4
2.2 BCR-ABL1 Füzyon Proteinini.....	5
2.3 <i>BCR</i> Geni.....	8
2.4 <i>ABL1</i> Geni .....	9
2.5 Genom Düzenleme Teknolojileri.....	9
2.5.1 Düzenli aralıklarla kesişen kısa palindromik tekrarlar (CRISPR) .....	10
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	18
3.1. Etik Kurul Onayı.....	18
3.2. Hasta Seçimi.....	18
3.3. Kullanılan kimyasal malzemeler .....	18
3.4. Kullanılan alet ve cihazlar .....	19
3.5. Yöntem.....	19
3.5.1 PZR yöntemi ve cDNA'nın PZR ile çoğaltılması .....	20
3.5.2 Çoğaltılan cDNA'nın Agaroz jel ile kontrol edilmesi .....	22
3.5.3 Jelden saflaştırma .....	23
3.5.4 PZR ürünü saflaştırılması.....	23
3.5.5 Sanger Dizileme uygulaması .....	24
3.5.6 Sekans reaksiyonu sonrası saflaştırma işlemi .....	25
3.5.7 Dizileme sonucuna göre hedeflenen BCR-ABL füzyonuna uygun gRNA dizaynı .....	25



3.5.8 Tek zincir oligoların çift zincire dönüştürülmesi.....	26
3.5.9 Çift zincir oligoların kontrol edilmesi.....	27
3.5.10 RNA sentez aşaması.....	27
3.5.11 RNA saflaştırılması.....	28
3.5.12 Saflaştırma sonrası RNA'nın kontrol edilmesi .....	28
3.5.13 Cas9 enzim ile kesim:.....	29
3.5.14 Cas9 kesimi fragment analizi.....	30
3.5.16 Fragment analizi .....	31
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>33</b>
4.1 PZR ile çoğaltılan cDNA jel görüntüsü .....	33
4.2 Hedeflenen Hastaya Ait BCR-ABL1 Füzyon Geni Sanger Dizileme Ensembl Verileri.....	33
4.3 Sanger dizileme yapılan hedef hastaya ait Chromas analizi .....	34
4.4 Hedef Dışı Hastaya Ait Sanger Dizileme Ensembl Verileri:.....	34
4.5 Sanger Dizileme Yapılan Hedef Dışı Hastaya Ait Chromas Analizi.....	34
4.6 Çift Zincir Oligo Sentezi .....	35
4.7 Sentezi Yapılan RNA'nın Agaroz Jel ile Kontrolü.....	35
4.8 Kesim Protokolünün Belirlenmesi (Optimizasyon).....	36
4.9 Füzyon Bölge Tanıma Hassasiyetinin Belirlenmesi.....	38
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>41</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>46</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>47</b>

## TABLolar LİSTESİ

	<b>Sayfa</b>
Tablo 3.1. BCR-ABL1 geninin çoğaltılması için kullanılan primer dizileri.....	21
Tablo 3.2. BCR-ABL1 genini çoğaltmak için kullanılan malzeme ve miktarları.....	22
Tablo 3.3. BCR-ABL1 geni için uygulanan ısı döngüsü .....	22
Tablo 3.4. Saflaştırma yapılan jelden elde edilen ürünün kalitesi .....	23
Tablo 3.5. ExoSAP ısı döngüsü .....	24
Tablo 3.6. Dizileme için <i>BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing</i> Kit koşulları .....	24
Tablo 3.7. Big Dye (Dizileme) PZR için uygulanan ısı döngüsü .....	24
Tablo 3.8. Dizayn edilen sgRNA dizileri .....	25
Tablo 3.9. Tek zincirli oligoların çift zincirli hale dönüştürülmesi için uygulanan birinci protokol .....	26
Tablo 3.10. Tek zincir oligoların çift zincir oligoya dönüştürülürken birinci protokole uygulanan ısı döngüsü.....	26
Tablo 3.11. Tek zincirli oligoların çift zincirli hale dönüştürülmesi için uygulanan ikinci protokol .....	26
Tablo 3.12. Tek zincir oligoların çift zincir oligoya dönüştürülürken ikinci protokole uygulanan ısı döngüsü.....	27
Tablo 3.13. RNA sentez protokolü.....	27
Tablo 3.14. Saflaştırılan RNA kesim protokolü.....	29
Tablo 3.15. Kesim Protokolü .....	29
Tablo 3.16. Optimize edilen kesim protokolü.....	30
Tablo 3.17. Yüzdellik konsantrasyonlarına göre hassasiyet belirleme .....	31
Tablo 3.18. Hassasiyet Oranı .....	32
Tablo 4.1. Deney optimizasyonu için jel yükleme kriterleri.....	37
Tablo 4.2. Füzyon bölge tanıma hassasiyeti için A paneline ait jel yükleme kriterleri .....	39
Tablo 4.3. Füzyon bölge tanıma hassasiyeti için B paneline ait jel yükleme kriterleri ile uygulanan protokol ürünü .....	39

## ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1: Dört ana klinik lösemi türü (15).....	3
Şekil 2.2: Hematopoez (kan hücresi bileşenlerinin oluşumu) embriyonik gelişim sırasında ve yetişkinlik boyunca kan sistemini üretmek ve yenilemek için ortaya çıkar (18). .....	4
Şekil 2.3. Kromozom 9 ve kromozom 22'den kopan parçaların birbiriyle yer değiştirmesi. BCR-ABL füzyon geni, kromozom 9 parçasının bağlandığı kromozom 22 üzerinde oluşturulur. Değişen kromozom 22, Philadelphia kromozomu olarak adlandırılır (25) .....	5
Şekil 2.4. BCR-ABL tarafından aktive edilen moleküler yolun şematik gösterimi (30).....	6
Şekil 2.5. BCR-ABL1'e ait üç farklı füzyon proteinine genel bakış (41) .....	7
Şekil 2.6. İmatinibin BCR-ABL füzyonuna etki mekanizması (46). .....	8
Şekil 2.7. BCR geninin 22. kromozomdaki yerleşimi. BCR geni 22q11'de yerleşiktir (53). ....	9
Şekil 2.8. ABL1 geninin 9. kromozomdaki yerleşimi (55). .....	9
Şekil 2.9. Spesifik olarak sgRNA, PAM motifinin, hedef DNA dizisinde Cas9 nükleazı alması koşuluyla, PAM adlı üçlü dizilimin yukarısında yer alan hedef diziyi tanır (70). .....	11
Şekil 2.10. CRISPR sisteminin moleküler mekanizması (76) .....	12
Şekil 2.11. CRISPR-Cas sistemi sınıflandırılması (75) .....	13
Şekil 2.12. crRNA, tracrRNA, Cas9 kompleksinin hedef DNA kesim mekanizması (77). ....	15
Şekil 2.13. CRISPR Cas9 aracılı genom düzenleme mekanizması (83) .....	16
Şekil 4.1. BCR-ABL1 geni amplifikasyonuna ait agaroz jel elektroforez görüntüsü. ....	33
Şekil 4.2. Hedeflenen hasta için füzyon bölgesinin Sanger Dizileme görüntüsü. ....	34
Şekil 4.3. Hedef olmayan hasta için BCR-ABL füzyon bölgesine ait Sanger Dizileme görüntüsü. ....	35
Şekil 4.4. Çift zincir oligoya ait agaroz jel görüntüsü. M1: 50bp marker, S: Stok gRNA, M2: 100bp marker. Görüntü 1s 00ms pozlama zamanında elde edilmiştir. ....	35
Şekil 4.5. RNA Sentezinin agaroz jel ile kontrolü. M: 50bp moleküler ağırlık belirleyicisi, 1. kuyucuk Phusion DNA Polimeraz enzimi uygulanan protokol ürünü, 2. kuyucuk Taq Platinum enzimi uygulanan protokol ürünü .....	36
Şekil 4.6. Deney kesim protokolünün agaroz jel görüntüsü .....	37
Şekil 4.7. Füzyon bölge tanıma hassasiyetini belirlemek amacıyla uygulanan protokole ait jel elektroforez görüntüsü M:100bp moleküler ağırlık belirleyicisi. A panelinde görüntü 35 Voltta 300dk ve sonrasında 50Volta 60dk yürütülmesi sonucunda 2s 000ms pozlama zamanı	

ile elde edilmiştir. B panelinde görüntü, 60Volt, 180 dakika sonunda 1s 500ms pozlama zamanı ile elde edilmiştir. .... 40

## SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ

AML	akut miyeloid lösemi
BCR	Breakpoint Cluster Region
B-ALL	B-lenfoblastik lösemi
Cas9	CRISPR ile ilişkili nükleaz 9
cDNA	tamamlayıcı deoksiribonükleik asit
CRISPR	düzenli aralıklarla bölünmüş kısa palindromik tekrar
crRNA	CRISPR RNA
dNTP	deoksiribonükleotid trifosfat
DEPC	dietil pirokarbonat
EtOH	etil alkol
EtBr	etidyum bromür
FISH	Floresan in Situ Hibridizasyon
HDR	homoloji yönlendirmeli tamir
KML	kronik myeloid lösemi
KML-AP	kronik myeloid lösemi - hızlandırılmış faz
KML-BC	kronik myeloid lösemi - patlama fazı
KML-CP	kronik myeloid lösemi - kronik faz
m-bcr	minör breakpoint cluster region
M-bcr	majör breakpoint cluster region
NHEJ	homolog olmayan uç birleştirme
NTP	nükleotid tri fosfat
PAM	protospacer bitişik motif
Ph	philadelphia kromozomu
PZR	polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	ribonükleik asit
RT-PCR	ters transkripsiyon - polimeraz zincir reaksiyonu
sgRNA	rehber RNA
SpCas9	streptococcus pyogenes'e özgü Cas9
TALEN	transkripsiyon aktivatörü benzeri efektör nükleaz
TBE	tris, borik asit, EDTA çözeltisi
TK	tirozin kinaz
TKI	tirozin kinaz inhibitörü
tracrRNA	transaktif edici CRISPR RNA
ZFN	çinko parmak nükleaz
μ-bcr	mikro breakpoint cluster region

# 1. GİRİŞ

Kronik miyeloid lösemi (KML) tüm yetişkin lösemilerin%15'ini oluşturur (1). Dokuzuncu kromozom üzerinde bulunan *ABL1* (proto-onkogen tirozin-protein kinaz) geni ile 22. kromozom üzerinde bulunan *BCR* (breakpoint cluster region) geni arasında gerçekleşen dengeli translokasyon sonucunda, *Philadelphia* kromozomu üzerinde *BCR-ABL1* füzyon geni oluşur (2, 3). Oluşan bu füzyon gen yapısal tirozin kinaz aktivitesine sahip bir füzyon proteini üretir ve kontrolsüz hücre çoğalmasına sebep olur (4). Aynı zamanda *BCR-ABL1* onkoproteinini ifadelenmesiyle hematopoetik hücrelerin malign dönüşümü indüklenir (5). KML, hastalığın gelişim ve ilerlemesi açısından kronik, hızlandırılmış ve patlama olmak üzere 3 farklı fazda bulunur. Hastalık genellikle kronik fazda teşhis edilmektedir (6). Pek çok hastalıkta olduğu gibi günümüzde KML'nin de erken tanı ve tedavi uygulamaları genom teknolojileri sayesinde ilerleme kaydetmiştir (7).

En son geliştirilen ve kullanılan diğer genom düzenleme teknolojilerine göre nispeten daha ucuz ve hızlı olmasıyla CRISPR/Cas9, bakterilerin adaptif immün sisteminden kaynak alan üçüncü nesil gen düzenleme teknolojisidir (8). Hedef DNA çift zincirinde kırık oluşmasını sağlayan Cas9 endonükleaz enzimi ile doğru yönlendirmeyi sağlayan tek bir rehber RNA molekülü (sgRNA) olmak üzere temel olarak iki bileşenden oluşur. Enzim, kesim yapabilmek için hedef DNA dizisinin 3' ucunda kısa, *protospacer adjacent motif* (PAM) adı verilen bir diziyeye ihtiyaç duyar. Hedef bölgeyi ve 5' ucunda PAM dizisini bulan Cas9 enzimi DNA çift ipliğini keser. Hücre, çift iplik kırığını tamir etmeye çalışır (9). Çift zincir kırıklarının tamiri DNA yapısına rastgele nükleotidlerin girmesine veya eksilmesine neden olan *Non-Homolog End-Joining* (NHEJ) veya daha doğru çalışan homoloji yönlendirmeli tamir (HDR) yöntemlerinden biri ile yapılır. Genom düzenleme çalışmalarında var olan bir bölgede hedeflenmiş değişikliğin yapılması için hücreye, Cas9 ve sgRNA ile birlikte aynı zamanda homoloji kolları içeren tamir zinciri de gönderilir. Cas9 nükleazları sadece DNA zincirinde kırık oluşturmakla kalmamakta, transkripsiyonun baskılanması veya aktive olmasını veya genomda epigenetik değişiklikler yapılmasını sağlayacak şekilde yeniden programlanabilmektedir. Böylelikle genom mühendisliği ile yapılabilecek değişikliklerin sınırları giderek genişlemektedir (10). CRISPR/Cas9 sisteminin farklı deneysel süreçlere kolay uygulanabilmesi ve maliyetinin göreceli olarak daha düşük olması nedeni ile gün geçtikçe kullanım alanı ve amacı genişlemektedir. Başlangıçta gen yeniden düzenlemesi, gen ifadelenmesinin düzenlenmesi, farklı model

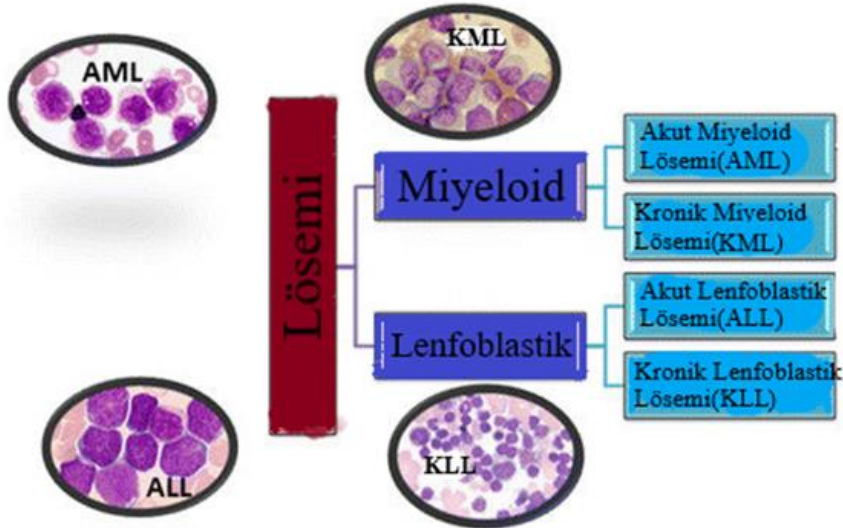
organizmalarda (fare, sıçan, zebrafish, domuz ve maymun) ve hücre düzeyinde genlerin fonksiyonlarının anlaşılmasına yönelik yapılan çalışmalarda kullanılan CRISPR/Cas9 sistemi aynı zamanda *in vitro*'da DNA düzeyinde hedef dizilerin belirlenmesi potansiyeli de taşımaktadır (8). Son dönemde Cas9 nükleazlarının DNA ve RNA düzeyinde oluşan değişikliklerin tespit edilmesinde yararlı bir araç olarak kullanılabilceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Cas9 nükleazın *in vitro* şartlarda DNA'da var olan mutasyonları %1-10 arasında değişen hassasiyet ile saptama kapasitesi olduğu vurgulanmaktadır (8).

Şimdiye kadar yoğunlukla fonksiyonel çalışmalarda kullanılan bu yöntem, yaptığımız tez çalışmasında bir tanı aracı olarak kullanılmıştır. Bu proje kapsamında öncelikle Cas9 enzimi kullanılarak BCR-ABL1 füzyonunun saptanmasını gerçekleştirmiş bulunmaktayız. Böylece, kronik miyeloid lösemi hastalarında, bu yöntemle BCR-ABL füzyon geninin kalitatif analizinin yapılabileceğini göstermiş olduk. Yöntemin geliştirilmesiyle birlikte farklı gen füzyonlarının tespit edilebileceği yeni bir araç haline getirilebileceği düşünülmektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Kanser Enstitüsü'nün yaptığı tanıma göre kanser, hücrelerin kontrolsüz olarak bölündüğü ve çevresindeki dokuları istila ettiği hastalıktır. Kanser hücreleri vücudun diğer bölgelerine kan ve lenf sistemleri yoluyla yayılabilir. Lösemi, kemik iliği gibi kan oluşturan dokularda başlayan ve çok sayıda anormal kan hücresinin üretilmesine ve kana girmesine neden olan bir kanserdir (11). Lösemi bir grup heterojen hematopoietik kök hücre (HSC) malignitesidir (12). Yani, olgunlaşmamış klonal hematopoietik hücrelerin anormal proliferasyonu ve dolaşımı ile karakterize kan veya kemik iliği kanseridir. Lösemi ile ilişkili hastalıklar yaygın olarak hematolojik neoplazmlar olarak adlandırılır (13).

Sağlıklı kan hücrelerinin üretimine müdahale eden, kemik iliğinde sınırsız çoğalma yapabilen farklılaşmamış blastların anormal birikimi ile karakterizedir (12). Lösemi, kan hücrelerinin kanser türleri için geniş bir terim olmakla birlikte hangi çeşit olacağı, kansere dönüşen kan hücresinin tipine ve ne hızla büyüdüğüne bağlıdır. Etkilenen kan hücresinin tipi (lenfoblastik / lenfositik veya miyeloid / miyelojenöz) ve başlangıcına (akut veya kronik) göre sınıflandırılır. Dört ana klinik lösemi türü ve farklı patolojik alt tipler vardır. Yaygın lösemi türleri; akut miyeloid lösemi (AML), akut lenfoblastik lösemi (ALL), kronik miyeloid lösemi (KML), kronik lenfositik lösemi (KLL)'dir (Şekil 1) (14).



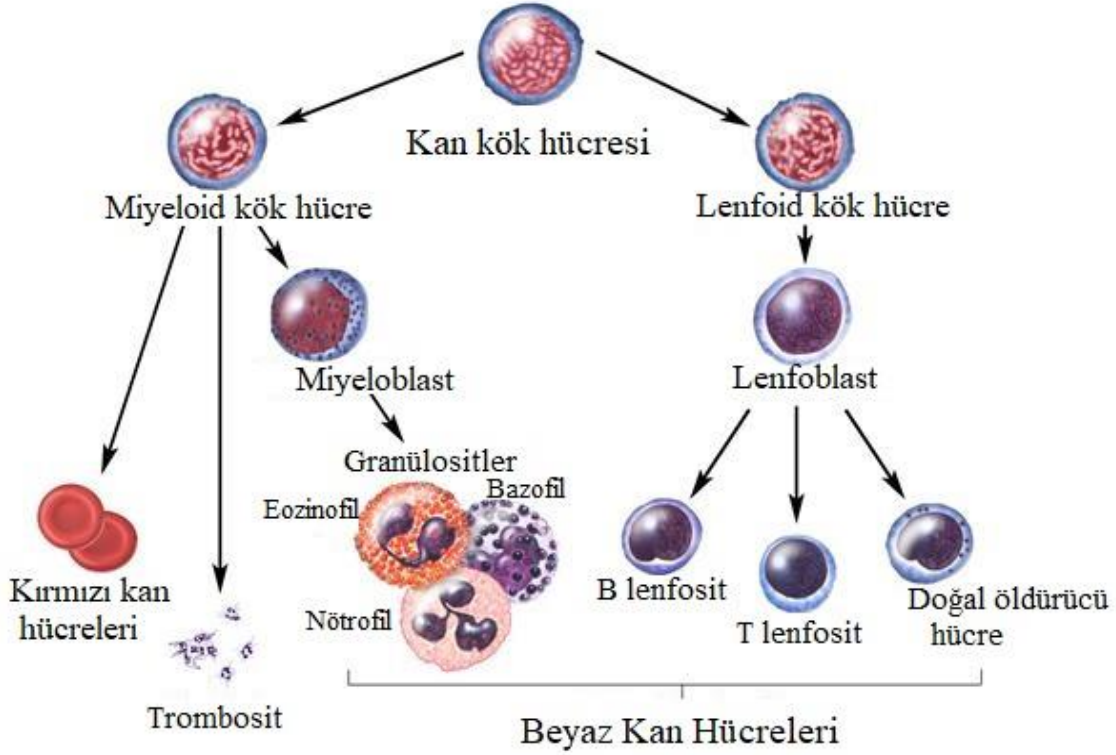
Şekil 2.1: Dört ana klinik lösemi türü (15)

Kronik miyeloid, kronik miyelositik veya kronik granülositik lösemi olarak da adlandırılan KML, dönüştürülmüş, ilkel hematopoietik progenitör hücrelerin dolaşıma



sokulduğu klonal miyeloproliferatif bir hastalıktır. KML, farklılaşma kapasitelerinde kayıp olmadan granülositik hücrelerin çoğalması ile karakterizedir (16).

Hematopetik kök hücrelerden (HSC) embriyonik gelişim sırasında ve yetişkinlik boyunca kan sistemine ait hücreler üretilir ve yenilenir (Şekil 2) (17).

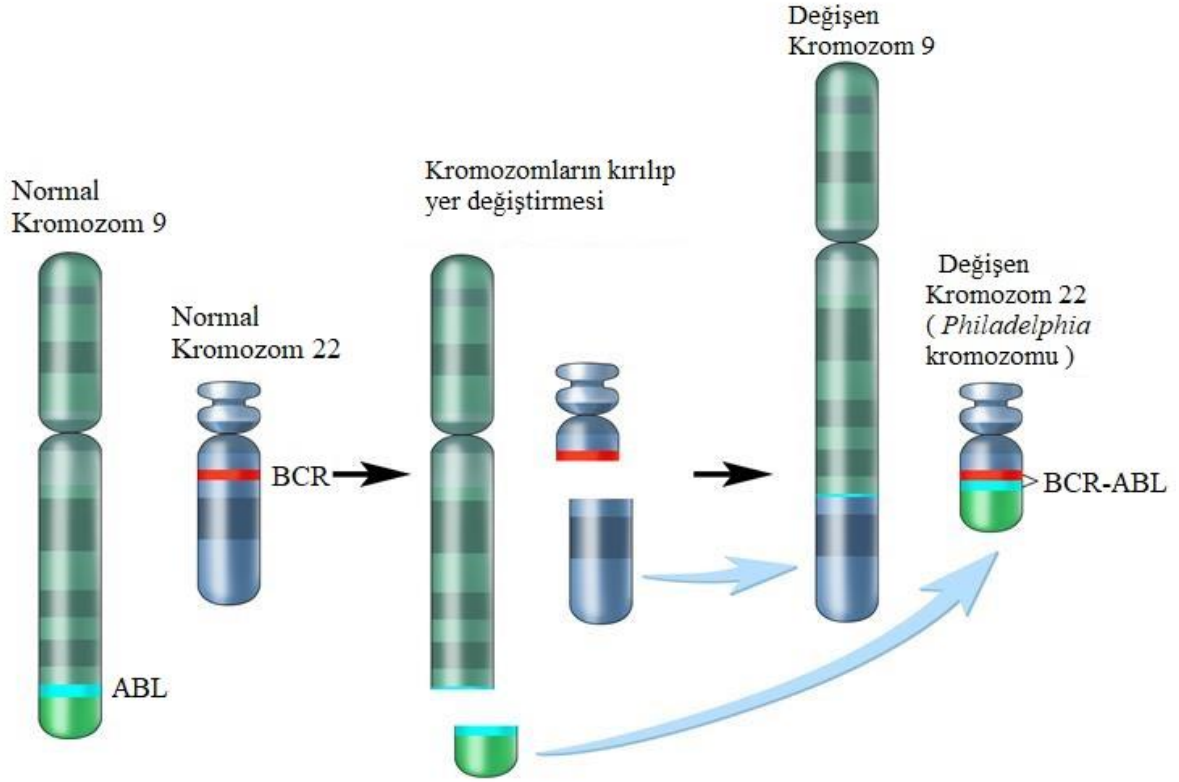


Şekil 2.2: Hematopoez (kan hücresi bileşenlerinin oluşumu) embriyonik gelişim sırasında ve yetişkinlik boyunca kan sistemini üretmek ve yenilemek için ortaya çıkar (18).

## 2.1 Philadelphia Kromozomu

Kanser hücrelerinin belirleyici özelliklerinden birisi kromozom anomalileridir. Translokasyonlar gibi kromozom düzenlenmeleri, çeşitli tümör tiplerinde sıklıkla bulunur ve bunların tümörigenezin temel yönlendiricileri olduğuna dair güçlü kanıtlar vardır (19). Gen füzyonları, dengeli kromozom translokasyonları sonucunda oluşur. Translokasyonlar bir genin aktivasyonuna veya aşırı ifadenmesine yol açabilir. Bu nedenle gen füzyonları, tümör tipi ile güçlü bir şekilde ilişkilidir ve kanser teşhisi veya tedavisi için hedef biyobelirteç olarak kullanılmaktadır (20). Kromozomal düzenlemelerden kaynaklanan füzyon proteinlerinin kronik miyeloid lösemi (KML) gibi çeşitli hematolojik neoplazmaların patogenezini tetiklediği bilinmektedir (21-23). İlk olarak 1960 yılında KML'li bir hastada tanımlanan *Philadelphia* kromozomu (Ph), 9 ve 22. kromozomların karşılıklı parça değiş

tokuşu sonucu oluşan yeni 22. kromozoma verilen addır. KML için bir biyobelirteçtir (24). Bu yer değiştirme, yapısal tirozin kinaz aktivitesini barındıran BCR-ABL1 onkogenik füzyon proteininin ortaya çıkmasına neden olur. Bu onkoproteinin ifadenmesi ile hücre sağkalımı ve bölünmesini artıran sinyal yolakları aktive edilir. Sonuçta hematopoetik hücrelerin malign dönüşümü indüklenir (5). Kısaca oluşan bu füzyon geni Tirozin Kinaz'ın (TK) fazla üretilmesine, dolayısıyla da kontrolsüz çoğalmasına sebep olur (4).

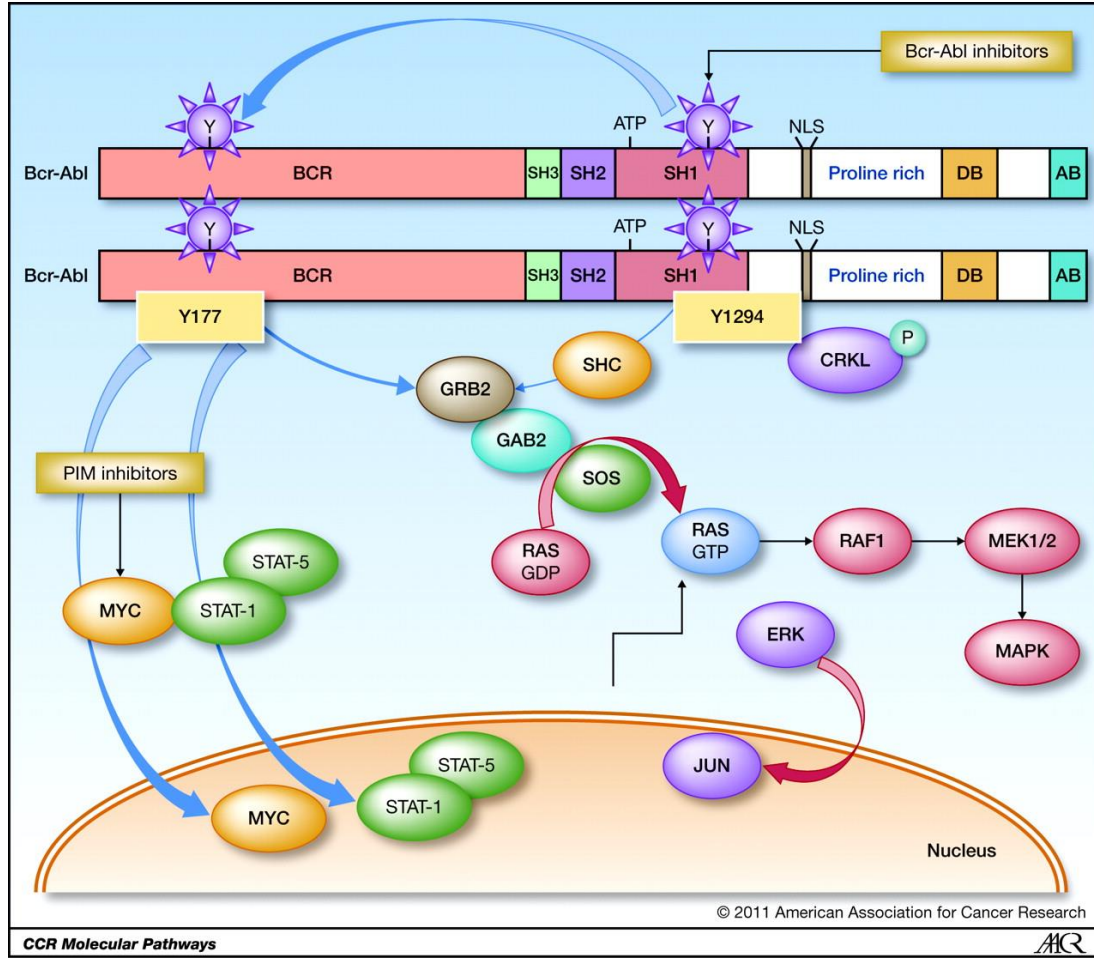


Şekil 2.3. Kromozom 9 ve kromozom 22'den kopan parçaların birbiriyle yer değiştirme. BCR-ABL füzyon geni, kromozom 9 parçasının bağlandığı kromozom 22 üzerinde oluşturulur. Değişen kromozom 22, Philadelphia kromozomu olarak adlandırılır (25)

## 2.2 BCR-ABL1 Füzyon Proteini

*Philadelphia* kromozomunun ürünü olan bu füzyon protein, transformasyona yol açan çeşitli sinyal yollarını aktive ederek bir onkoprotein gibi davranır (26). BCR-ABL ifadenmesi olan hücrelerde birçok sinyal proteininin BCR-ABL1 ile etkileşime girdiği gösterilmiştir (27). Bcr-Abl1 füzyon proteini RAS/MAPK, PI-3 kinaz, c-ABL yolakları ve CRKL yolakları ve JAK-STAT gibi ana sinyal yollarını aktive eder ve Src yolağı da transformasyon ve proliferasyonda önemli bir rol oynar (Şekil 4) (28). BCR genindeki farklı

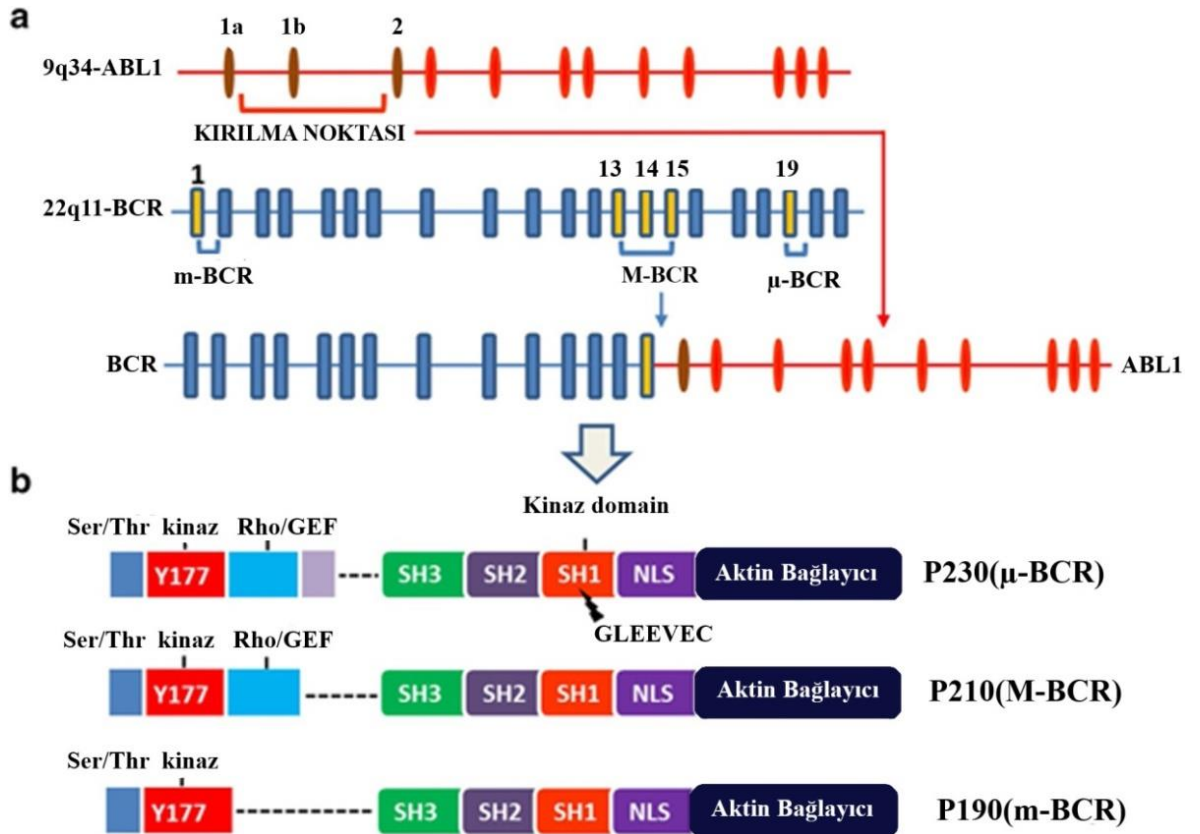
kırık noktalarından kaynaklanan heterojenlik, sitogenetik olarak ayırt edilemedikleri için bu farklılıklar moleküler testlerle tespit edilebilir (29).



Şekil 2.4. BCR-ABL tarafından aktive edilen moleküler yolun şematik gösterimi (30)

İnsanda üç farklı BCR-ABL formunun farklı lösemi formlarıyla ilişkili olduğuna dair kanıtlar vardır (31). Kromozom 22'de yerleşik BCR geninde farklı noktalarda oluşan kırıklar sonucunda molekül kütlelerine göre 190, 210 ve 230 kD olarak üç farklı füzyon proteini üretilir (Şekil 5) (32, 33). Bunlar oluşan füzyon proteininin boyutlarına göre sırasıyla küçük kırılma noktası küme bölgesi (m-bcr), büyük kırılma noktası küme bölgesi (M-bcr) ve mikro kırılma noktası küme bölgesi ( $\mu$  bcr) olarak adlandırılır (34-37). M-bcr kırılma noktaları BCR geninde ekzon 13'ten (e13 veya b2) veya ekzon 14'ten (e14 veya b3) sonra ortaya çıkar. KML hastalarının çok büyük bir kısmında (%99) p210 füzyon proteini üretilmektedir. Bu füzyon proteini t(9;22) pozitif öncül B-lenfoblastik lösemili (B-ALL) pediatrik hastaların %10'unda ve yetişkinlerin % 40'ında saptanmaktadır (35). m-BCR kırılma noktaları, BCR geninde ekzon 1'den (e1) sonra ortaya çıkar ve daha büyük transformasyon potansiyeline sahip p190 füzyon transkriptinin oluşmasına sebep olur (35,

36, 38). Bu m-bcr kırılma noktaları ve füzyon transkriptleri, t(9;22) pozitif B-ALL'li pediatrik hastaların %90'ında, yetişkin hastaların % 60'ında saptanırken (35) KML hastalarında çok nadir gözlenir (29). BCR geninde ekzon 19 (e19) ve ekzon 20 arasında oluşan kırık  $\mu$ -bcr olarak adlandırılır (39). Oluşan füzyon geni, daha büyük bir transkript olan p230 füzyon proteini ile sonuçlanır (34, 37, 40). Anormal şekilde aktive olan bu kinazlar, sinyal yollarının devamlı aktive olmasına neden olur. Bu da hücrelerin kontrolsüz çoğalmasına, farklılaşmanın durmasına ve hücre ölümüne karşı direncin oluşmasına neden olur (32, 33).



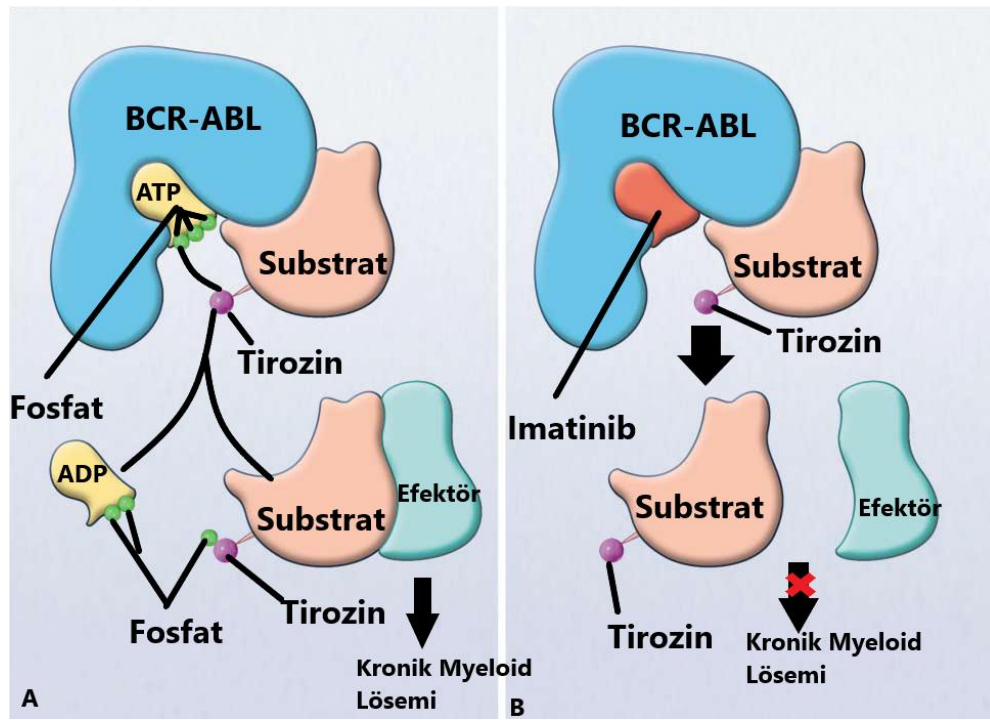
Şekil 2.5. BCR-ABL1'e ait üç farklı füzyon proteinine genel bakış (41)

Kronik (KML-CP), hızlandırılmış (KML-AP) ve patlama fazı (KML-BC) (42) olmak üzere üç ayrı klinik aşamada tanımlanan KML'de tanı genellikle kronik fazda konulur (29). Tedavi edilemez ise, hastalık nispeten iyi huylu KML-CP'den KML-AP'ye, KML-BC'ye doğal bir ilerleme izler (42).

BCR-ABL1 gen füzyonu, tanı ve tedavi için klinik bir biyobelirteç olarak görev yapar (5, 20). Daha önce STI571(Signal Transduction inhibitör 547 ) olarak anılan Imatinib (Gleevec, Novartis, Basel, İsviçre), *Philadelphia* kromozomu pozitif (Ph+) lösemide BCR-ABL1 hedefleyen bir tirozin kinaz inhibitörü olarak kullanılır. (4). Imatinib, hücre döngüsünün kontrolü, hücre yapışması, hücre iskeleti organizasyonu ve son olarak *Ph* (+)

hücrelerinin apoptotik ölümünde yer alan çeşitli genlerin işlevinin değiştirilmesine yol açan konstitütif tirozin kinaz aktivitesini doğrudan inhibe eder (43).

Onkogenik BCR-ABL tirozin kinaz proteininin aktivitesi, ATP üzerindeki fosfat grubunun çeşitli substratlar üzerinde ABL1'in aktif bölgesindeki tirozin kalıntılara aktarması ile sağlanır (Şekil 6). Bu devamlı aktif tirozin kinaz proteini daha aşağıda yerleşik sinyal yollarının aktive olmasına ve miyeloid serisi hücrelerin aşırı çoğalmasına neden olur. İmatinib, ATP'nin BCR-ABL1'in kinaz domainine bağlanmasını engeller ve aktivitesini inhibe eder. ABL1 tirozin kinaz aktivitesi olmadan, substratlar artık fosforile edilemez ve düzensiz çoğalmaya yol açan hücrel olaylar kesintiye uğrar (Şekil 6) (44, 45).



Şekil 2.6. İmatinibin BCR-ABL füzyonuna etki mekanizması (46).

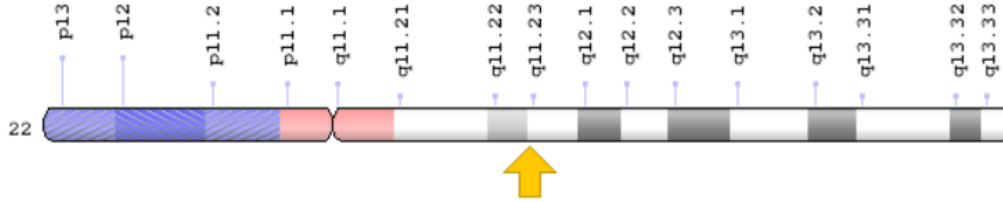
Birçok kanserde olduğu gibi KML'de de somatik mutasyonlar ilaca direnç sağlar. İmatinibin dikkat çekici başarısına rağmen, BCR-ABL1 kinaz domainindeki nokta mutasyonları nedeniyle direnç tespit edilmiştir (4). Güncel kılavuzlar direnç gelişmesi durumunda ikinci ve üçüncü nesil tirozin kinaz inhibitörlerinin kullanılmasını önermektedir (47-49).

### 2.3 BCR Geni

22q11'de lokalize olan *BCR* geni (Şekil 7), 23 ekzondan oluşur. *BCR* geni, serin/treonin kinaz aktivitesi gösteren 160kDa'luk bir fosfoproteini kodlar (31, 50). *BCR* geni



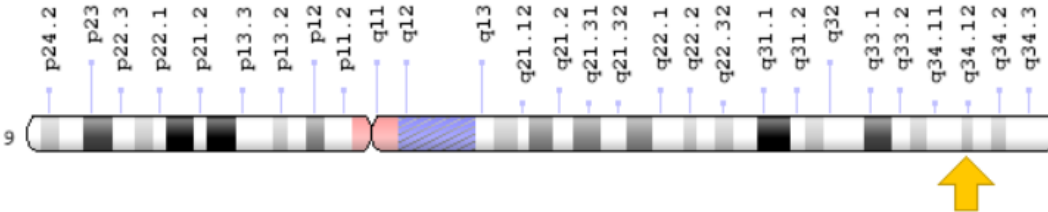
öncelikle miyeloid farklılaşmasının erken evrelerinde ifade edilir. Miyeloid farklılaşmasının ilerleyen evrelerinde *BCR* geninin ifadenin seviyesi düşer. Çalışmalarda *BCR* proteininin sitoplazmik bir protein olduğu gösterilmiştir. Ayrıca *BCR* proteininin mitotik DNA'ya bağlandığı da gösterilmiştir (22, 51) *BCR* geninin ilk ekzonunda serin/treonin kinaz domaini ve en az 2 SH2 bağlanma domaini kodlayan dizi yer alır (52).



Şekil 2.7. *BCR* geninin 22. kromozomdaki yerleşimi. *BCR* geni 22q11.1'de yerleşiktir (53).

## 2.4 *ABL1* Geni

9q34'de lokalize olan *ABL1* geni (Şekil 8), 12 ekzondan oluşur. *ABL1*, Abelson murin lösemi virüs onkogeninin insandaki homoloğu olan bir proto-onkogendir. *Philadelphia* kromozomunun oluşumu sırasında *ABL* geni intron 1'den kırılır (22). *ABL1* geni hücre bölünmesi, farklılaşma ve strese yanıt dâhil olmak üzere çeşitli hücre işlemlerde yer alır (54).



Şekil 2.8. *ABL1* geninin 9. kromozomdaki yerleşimi (55).

## 2.5 Genom Düzenleme Teknolojileri

Son yıllarda büyük ilerleme kaydeden gen düzenleme teknolojisi, sağlık ve tıp başta olmak üzere biyoteknoloji, tarım ve hayvancılık gibi çok çeşitli alanlarda çalışma imkânı sunmuştur. Bu teknoloji organizmaların hedef genom dizisinde genetik değişiklikleri oluşturmak için belirlenmiş noktadaki nükleotidleri nükleazlar aracılığıyla değiştirmek için kullanılır (56, 57). Nükleazlar sayesinde düzenlenecek hedef bölgede çift iplik kırığı oluşur. Tamir sırasında yapıya rastgele nükleotidlerin girmesine veya eksilmesine neden olan *Non-Homolog End-Joining* (NHEJ) veya Homoloji yönlendirmeli tamir (HDR)

mekanizmaları ile oluşan kırık tamir edilir (10). İlk olarak 1995 yılında çinko parmak nükleazların (ZFN'ların) keşfiyle genom düzenleme teknolojileri kullanılmaya başlandı. Daha sonra 2011 yılında ikinci genom düzenleme teknolojisi olan transkripsiyon aktivatörü benzeri efektör nükleazları (TALEN'ler) keşfedildi (57). Son olarak 2012 yılında prokaryotlarda adaptif immün sistem olarak çalışan ve hücreyi virüs ve plazmid gibi yabancı DNA işgalinden koruyan savunma mekanizması düzenli aralıklarla kesişen kısa palindromik tekrarlar (CRISPR'ler) kullanıma sunuldu (8, 58)

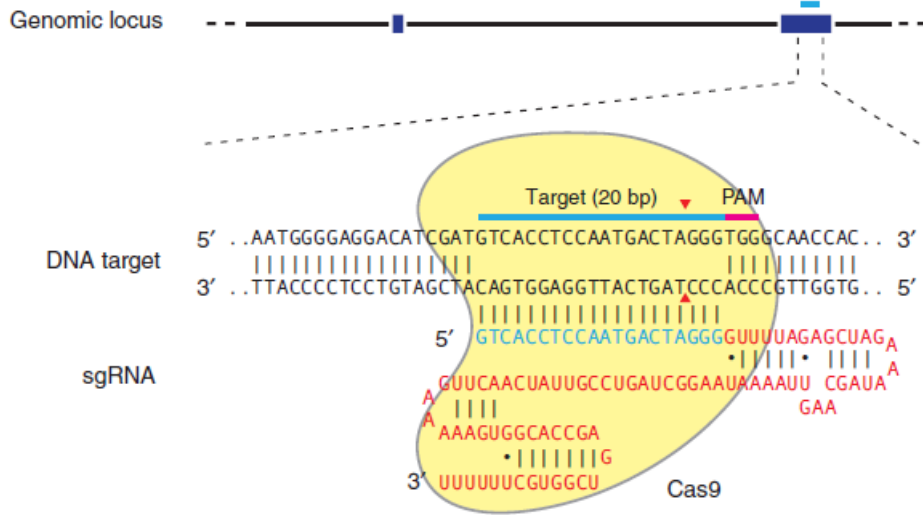
### **2.5.1 Düzenli aralıklarla kesişen kısa palindromik tekrarlar (CRISPR)**

1987 yılında *E.coli*'de alkalinden sorumlu iap geninin nükleotid dizisi ile ilgili yapılan çalışmada ilk kez prokaryotlardan başka hiçbir yerde homolog dizisi bulunmayan 29 nükleotidli çok iyi korunan tekrar dizisi olduğu ve bu tekrar bölgelerinin biyolojik öneminin bilinmediği belirtilmiştir (59). 2002 yılında tekrar dizileriyle ilgili yapılan *in silico* çalışmada ilk kez ökaryotlarda bulunmayan, sadece arkea ve bakterilerde bulunan yeni bir tekrarlayan DNA dizi ailesi incelenmiştir. Bu tekrarlayan dizi ailesinin boyutlarının 21bp ile 37bp arasında değiştiği bulunmuştur. Karakteristik yapısını incelemek amacıyla bu aile, düzenli aralıklı kısa palindromik tekrarlar (CRISPR) olarak adlandırılmıştır. Bu tekrar dizilerin tür içinde çok iyi korunduğu gözlemlenmiştir (60). Aynı şekilde CRISPR sisteminde korunan diğer bir dizi olan PAM dizisinin istilacı DNA üzerinde hedefleme aracısına karşılık gelen bölge olduğu 2009 yılında yapılan çalışma ile keşfedilmiştir (61). Çoklu kromozomal CRISPR lokuslarının varlığı, CRISPR'ların mobil elementler olduğunu düşündürmektedir. CRISPR ile ilişkili (Cas) genler, CRISPR içeren prokaryotlarda tanımlanmıştır. Cas genleri her zaman bir CRISPR lokasyonuna bitişik olarak konumlanmıştır. Bu da Cas genlerinin ve CRISPR lokuslarının fonksiyonel bir ilişkiye sahip olduğunu göstermiştir (60).

İlk olarak 2012 yılında dört farklı araştırma grubu Mali ve arkadaşları (62), Wright ve arkadaşları (63), Jinek ve arkadaşları (58), Swiech ve arkadaşları (64) tarafından aynı anda, prokaryotik bağışıklık sisteminin bir gen düzenleme aracı olarak memeli hücrelerinde kullanılması rapor edilmiştir. Bakteride, kendi kendine CRISPR ile Cas proteininin kombinasyon halinde enfeksiyonlara karşı bağışıklık sağladığı bulunmuştur.

CRISPR / Cas9 sisteminde yaygın olarak *Streptococcus pyogenes* (*Sp*) tarafından geliştirilmiş Cas9 (*SpCas9*) kullanılır. Enzimlerin kökenlerine bağlı olarak çok çeşitli PAM dizileri vardır. *SpCas9*'dan türetilmiş Cas9 enzimi kullanılması durumunda hedeflenebilir

bölgeyi sınırlandırmak amacıyla kullanılan tanıma motifi PAM 5'-NGG-3' üçlü dizisidir (65, 66). Bunun dışında PAM dizisinin motifi iki ilave guanin bazından oluşabilir (67). Cas proteinleri, istenen DNA dizisini tanımak için diğer genom teknolojilerinde olduğu gibi proteinler tarafından değil, onlardan farklı olarak RNA tarafından uyarılır (63, 68, 69).



Şekil 2.9. Spesifik olarak sgRNA, PAM motifinin, hedef DNA dizisinde Cas9 nükleazı alması koşuluyla, PAM adlı üçlü dizilimin yukarısında yer alan hedef diziyi tanır (70).

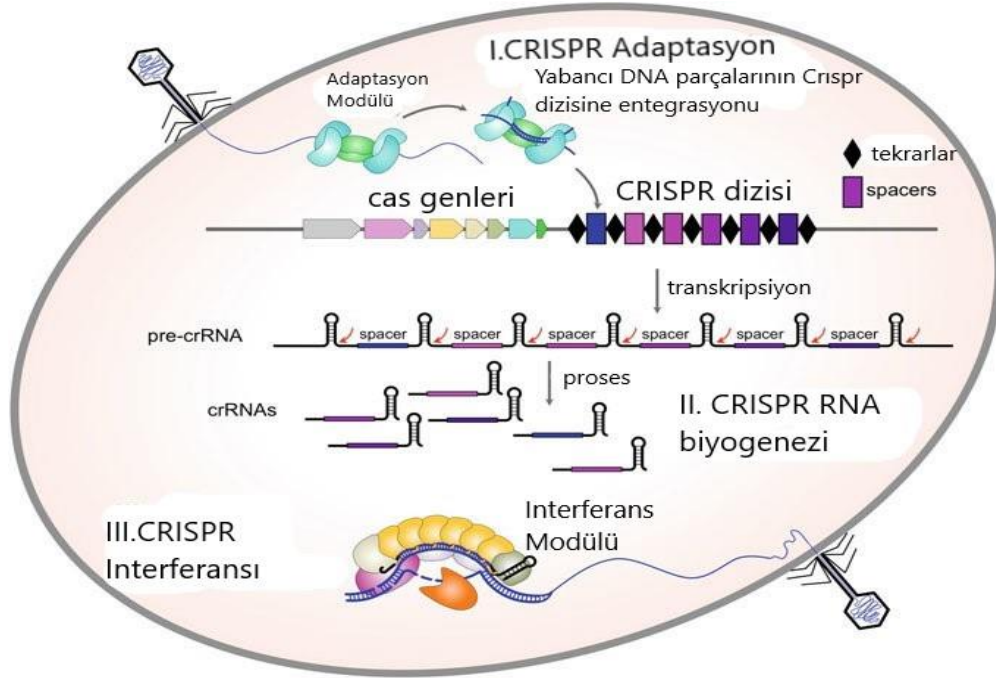
RNA kılavuzlu Cas9 nükleazının şeması. *S. pyogenes*'den (sarı) Cas9 nükleazı, 20 nt'lik bir kılavuz sekansı (mavi) ve bir iskele (kırmızı) içeren bir sgRNA tarafından genomik DNA'ya yöneliktir (Şekil 9). Spesifik olarak kılavuz RNA dizisi, hedef DNA dizisinde Cas9 nükleazı alması koşuluyla, bitişik motifinin (PAM; pembe) üçlü dizilimin yukarısında yer alan hedef DNA dizisini (üst iplikçikte mavi çubuk) tanır ve eşleşir. Cas9, PAM'ın (kırmızı üçgen) 3 baz çifti uzağında bir çift zincir kırığı oluşturur (70, 71).

Üçüncü nesil genom düzenleme teknolojisi olan kümelenmiş düzenli aralıklarla kesişen kısa palindromik tekrarlar (CRISPR) ile ilişkili protein 9 (Cas9) sistemi olarak adlandırılan yeni bir RNA kılavuzlu endonükleaz, genomik mühendisliğinde yeni bir strateji sağladı (72, 73).

CRISPR Cas9 sistemi bir bakteri ve archea'nın bağışıklık sisteminin, viral enfeksiyona karşı verdiği cevabı düzenler. Bu cevap genel olarak üç aşamadan oluşur. Adaptasyon olarak bilinen ilk aşamada, Cas1-Cas2 protein kompleksi, hedef DNA'nın bir segmentini çıkarır ve yeni bir boşluk oluşturarak bir CRISPR dizisinin 5' ucundaki tekrarlar arasına yerleştirir. İfadeleme aşamasında, bir CRISPR dizisi, preCRISPR RNA (precrRNA) olarak bilinen



uzun bir transkript içine kopyalanır ve ayrı Cas proteinleri veya Cas olmayan konakçı RNazlar kompleksi tarafından olgun küçük CRISPR RNA (crRNA)'lara işlenir (74). Son olarak interferans aşamasında, Cas protein kompleksi, hedef DNA veya RNA'yı ayırmak amacıyla virüs veya plazmidin genomundaki “protospacer” dizisini tanıması için kılavuz olarak crRNA'yı kullanır. Daha sonra efektörün bir parçası olan veya girişim aşamasında işe alınan bir Cas nükleaz (veya nükleazlar) tarafından inaktive edilir (Şekil 10) (75).



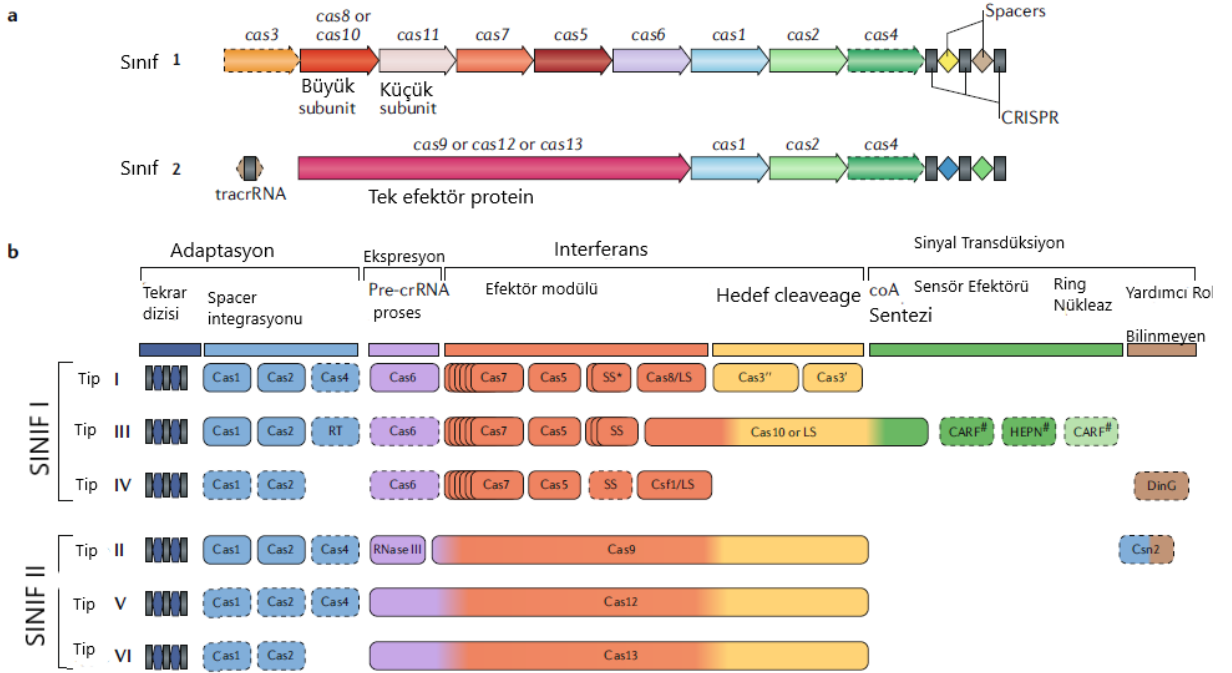
Şekil 2.10. CRISPR sisteminin moleküler mekanizması (76)

CRISPR/Cas sistemlerinin, mobil genetik elemanlarla geliştiği ve Cas protein dizilerinin çok fazla çeşitlenmesine ve CRISPR/Cas lokuslarının belirlenmesine sebep olduğu düşünülmektedir (74). CRISPR-Cas sistemi, Sınıf 1 (Tip I, III ve IV) ve Sınıf 2 (Tip II, V, VI) olarak toplam altı tür (74) ve 19 alt türe ayrılmaktadır. Sınıf 1 CRISPR/Cas sistemleri, tanımlanmış tüm CRISPR-Cas lokuslarının yaklaşık % 90'ını içeren bakterilerde ve arkealarda (tüm hipertermofiller dahil) yaygındır. Geri kalan yaklaşık % 10 CRISPR/Cas lokusları, sınıf 2 CRISPR/Cas sistemlerine (tip II, tip V veya tip VI efektör protein kullanan) aittir; bu sistemler sadece bakterilerde bulunur ve hipertermofiliklerde tanımlanmamıştır (74).

CRISPR tipleri, kendine özgü proteinlerin varlığı sayesinde kolayca ayırt edilebilir. Tip I için Cas3, tip II için Cas9, tip III için Cas10, tip V için Cas12 (Cas12a (Cpf1), Cas12b

(C2c1)) ve tip VI için Cas13'tür. Ayrıca Cas9, Cas10, Cas12 ve Cas13 proteinleri CRISPR Cas yanıtında farklı aşamalarda katkıda bulunduğunu gerçeğini yansıtmaktadır (75, 77).

Sınıf 1 CRISPR sistemleri birkaç Cas proteini ve crRNA ile bir efektör kompleksi oluşturur (78). Sınıf 1 sistemleri, daha çok arkeada bulunan, bakterilerde daha az görülen bir CRISPR sınıfıdır. Yaygın olarak tip I ve tip III ile nadir bulunan tip IV'ü içerir. Tip I ve tip III'e ait efektör kompleksleri, büyük ve küçük alt birimden oluşan RRM (RNA Recognition Motif)'i içerir (Şekil 11). Ayrıca bu kompleksler bir Cas5 ve birkaç Cas7 alt birimi içerir. Kompleks, spacer ve tekrar bölgesinin bir kısmını içeren kılavuz RNA'yı barındırır. Cas5 alt birimi, crRNA'ya bağlanır ve büyük alt birimle (tip I'de Cas8 ve tip III'te Cas10) etkileşir. Küçük alt birim tipik olarak birkaç kopya halinde bulunur ve Cas7'ye bağlı crRNA ile etkileşime girer. Her ne kadar tip I ve tip III efektör komplekslerindeki protein alt birimlerinin dizileri birbirine benzerlik gösterse de, her iki kompleks tipi de *cryo*-elektron mikroskopisi altında yapısı farklıdır. Cas6, efektör kompleksi ile ilişkilidir ve tipik olarak crRNA öncesi işlemlerde tekrar spesifik RNaz olarak işlev görür (79).



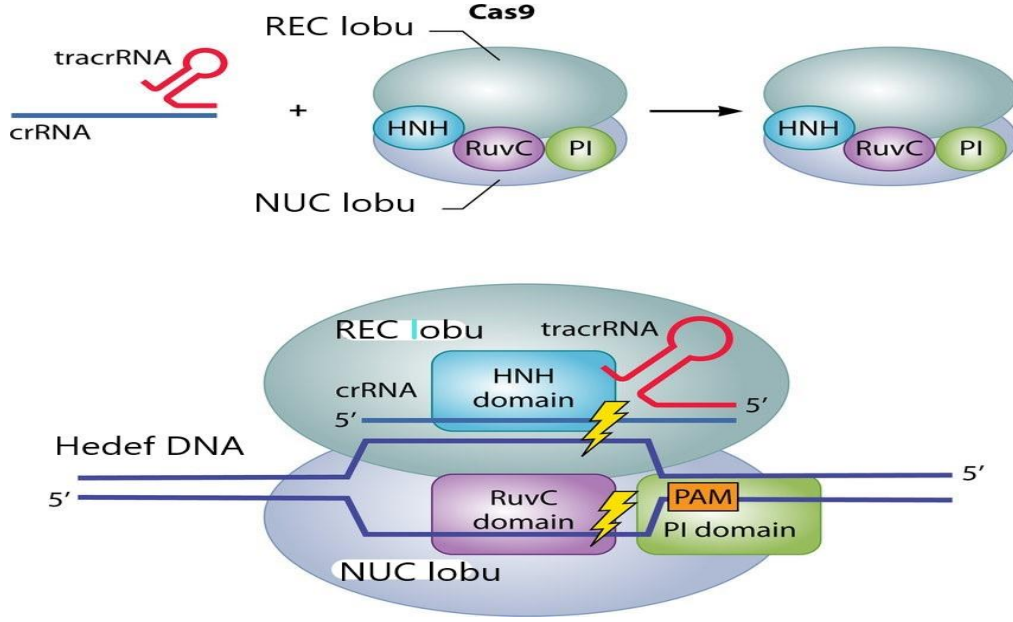
Şekil 2.11. CRISPR-Cas sistemi sınıflandırılması (75)

Sınıf 2 CRISPR sistemleri, etkileşime aracılık etmek için crRNA'lar ile birlikte büyük tek bileşenli Cas proteini kullanır (78). Üç tipten oluşur. Bunlar; Tip II, Tip V ve Tip VI 'dir (74).

Tip V için ayırt edici olan protein Cas12'dir (75). Bakteri ve arkeanın genomunda bulunan cpfl1, Cas1, Cas2 ve CRISPR dizisine bitişik konumlanmıştır. Tip V efektörlerin prototipi olan Cas12a (Cpf1), iki RuvC benzeri nükleaz domaini içerir, ancak HNH domaini bulundurmaz. Ancak, Cas12a-crRNA-hedef DNA kompleksinin yapısal analizi, Cas9'un HNH alanına işlevsel olarak benzer olduğunu, kendine özgü katlanma ile ikinci bir nükleaz domaini ortaya çıkarmıştır. Cas12a, Cas9 aktivitesi için vazgeçilmez olan bir tracrRNA gerektirmeyen tek RNA kılavuzlu bir nükleazdır. Ayrıca Cas12a, Cas9'un kesim paterninden ve PAM tanınmasından farklıdır (77).

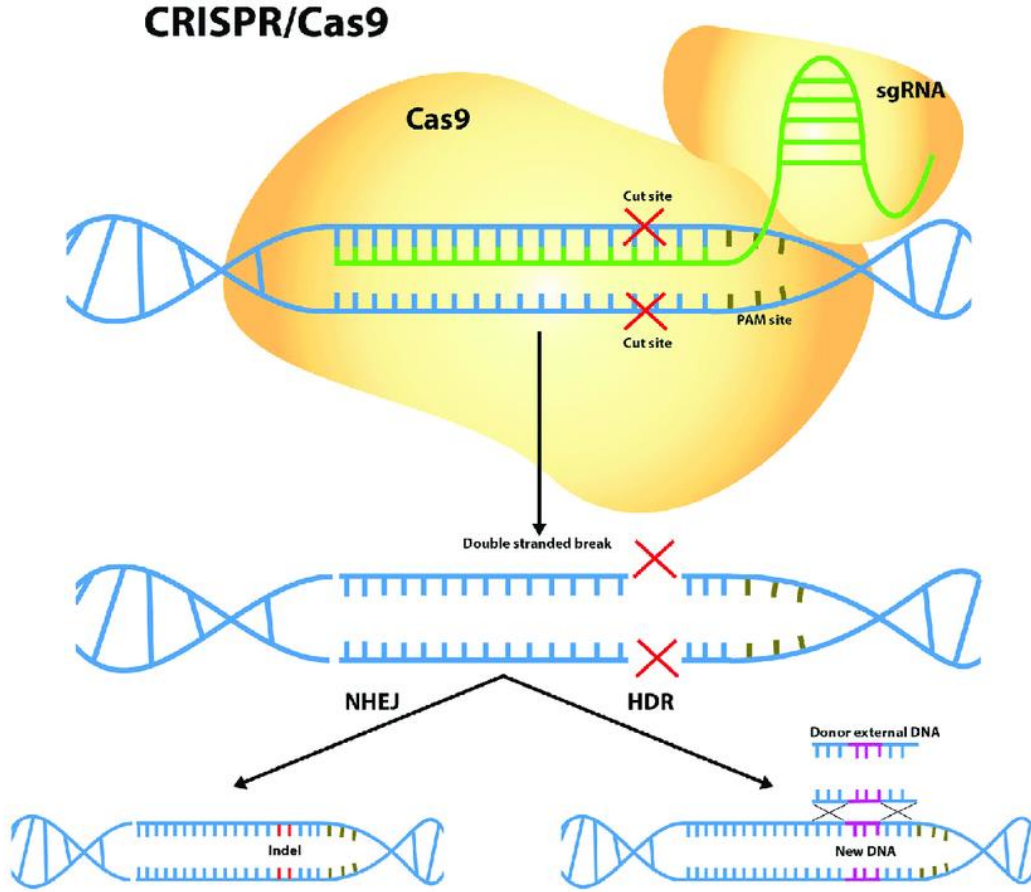
Tip VI efektörler Cas13a ve Cas13b spesifik olarak RNA'yı hedef alır, böylece RNA interferansına aracılık eder. Cas13a ve Cas13b, Tip II ve tip V efektörlerinden farklı olarak RuvC benzeri nükleaz domainine sahip değildir ve bunun yerine HEPN domain olarak adlandırılan nükleotid bağlanma bölgesine sahiptir (77).

En yaygın ve en iyi anlaşılabilir Sınıf II sistemleri, Cas9 proteinini efektör olarak kullanan tip II'dir (80). Cas9, iki nükleaz domaininden oluşur. Bunlar, DNA kesiminden sorumlu RuvC ve HNH'dir (77). Cas9, REC (tanıma) lob ve NUC (nükleaz) lob olarak adlandırılan iki bölgeden oluşur (81). REC lob, nükleik asit tanınmasından sorumludur. NUC lobunda HNH ve RuvC nükleaz domainleri ve PAM ile etkileşen (PI) bir domain içeren C-terminal bölgesi bulunur. HNH ve RuvC domainleri, crRNA ve diğer DNA ipliği ile bir dubleks oluşturarak DNA zincirini ayırır, böylece hedef DNA'da çift zincir kırığı meydana gelir. Cas9-crRNA-tracrRNA kompleksi, PAM içeren yabancı DNA'ya bağlanır. Burada Cas9, crRNA ve yabancı DNA'nın dubleks oluşumunu indüklemek için yabancı DNA'nın çift zincirine bağlanır ve zinciri gevşetmeye başlar (Şekil 12) (77).



Şekil 2.12. crRNA, tracrRNA, Cas9 kompleksinin hedef DNA kesim mekanizması (77)

Cas9, crRNA ve bir trans-aktive edici crRNA (tracrRNA) ile bir ribonükleoprotein (RNP) kompleksi oluşturur ve bu kompleks DNA'yı parçalar (82). TracrRNA molekülü, tip II sistemlerde crRNA öncesi işlem ve hedef tanıma için de gereklidir (77). sgRNA, programlanabilir CRISPR RNA'dan (crRNA) ve işlem yapan bir RNA'dan (tracrRNA) oluşan kimerik bir RNA molekülüdür. Bu sgRNA, DNA hedef bölgesini belirleyen 20 nükleotid dizisi içermektedir (Şekil 13) (58).



Şekil 2.13. CRISPR Cas9 aracılı genom düzenleme mekanizması (83)

Bu sistemin çalışma mekanizması temel olarak Cas9-gRNA kompleksinin, DNA üzerinde belirli bir bölge olan protospacer bitişik motif (PAM) dizisini tanıyıp o bölgede çift iplik kopmasının (DSB) indüklemesiyle gerçekleşir. Yani PAM dizisi, doğru DNA dizisinin tanınmasında ve RNA'nın kendi kendine hedeflere ve spesifik olmayan dizilere yönelmesinin önlenmede belirleyici rol oynar (84). Genomda oluşan çift iplik kırıkları genomun bütünlüğünü bozduğu için onarım mekanizmaları devreye girer. Homolog olmayan son birleştirme (NHEJ) tamiri gerçekleştirilirken bazen ekleme veya silme (indel) mutasyonları oluşturularak tamir gerçekleştirilir. Hücrenin, hücre döngüsünde bulunduğu aşamaya bağlı olarak homoloji odaklı onarım (HDR) mekanizması da kullanılabilir (85).

CRISPR/Cas9 sisteminin farklı deneysel süreçlere kolay adapte edilmesi ve maliyetinin daha düşük olması nedeni ile gün geçtikçe kullanım alanı ve amacı genişlemektedir. Başlangıçta gen yeniden düzenlemesi, gen ifadenin düzenlenmesi, farklı model organizmalarda ve hücre düzeyinde genlerin fonksiyonlarının anlaşılmasına yönelik yapılan çalışmalarda kullanılan CRISPR/Cas9 sistemi aynı zamanda *in vitro*'da

DNA düzeyinde hedef dizilerin belirlenmesi potansiyeli de taşımaktadır (8). Yaptığımız çalışmada CRISPR sistemini tedavi alanı dışında, bir tanı aracı olarak kullanmayı hedefledik. Bununla birlikte ileride yapılacak çalışmalarda, çeşitli translokasyonlardan kaynaklanan hastalıkların, hızlı ve ucuz tespitinin mümkün olduğunu öngörmekteyiz.

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Etik Kurul Onayı

Yapılan çalışma (Proje No: KA 18/418) Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu ve Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 09/01/2019 tarih ve 19/09 sayılı karar ile onaylanmış ve Başkent Üniversitesi Araştırma fonunca desteklenmiştir.

#### 3.2. Hasta Seçimi

Başkent Üniversitesi Hematoloji Anabilim Dalına başvuran ve Başkent Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda genetik test yapılarak kronik myeloid lösemi (KML) tanısı almış hastalardan arşivlenen cDNA örnekleri kullanıldı. Bu kapsamda beş hastanın PZR yöntemi ile füzyon geninin çoğaltılması sağlandı. Yapılan PZR ürünlerinin kalitesine göre en iyi üç hasta örneğine Sanger dizileme yapıldı. İki hastaya ait dizilemede füzyon bölgesi açık bir şekilde belirlenebilirken, diğer üçüncü hastaya ait füzyon bölgesi net şekilde belirlenemedi. Füzyon bölgesi anlaşılır olan iki hasta deneysel süreçlerde kullanıldı. Bu iki hasta "Hedef Hasta" ve "Hedef Dışı Hasta" olarak nitelendirilmiştir. Farklı kesim noktalarıyla oluşan füzyon proteinlerine göre dizayn edilen gRNA Hedef Hastaya aittir. Dolayısıyla bu gRNA ve Cas9 kombinasyonunun Hedef Hastayı tanıyıp sadece onda kesim yapması beklenirken, Hedef Dışı Hastada herhangi bir kesim yapmaması beklendi.

#### 3.3. Kullanılan kimyasal malzemeler

- Agaroz (Serva Katalog No: :11404)
- 0,5X Tris-borik asit EDTA (TBE) 40 mM Tris-HCl, pH 8.3. 45 mM borik asit. 1 mM EDTA
- Orange G
- EtBr (Etidyum Bromur)
- DNA molekül ağırlık belirteci 100bp (Thermo Scientific™ Katalog No: SM0242)
- 100bp DNA Ladder (Geneaid Katalog No: DL007)
- Neşter
- Çamaşır suyu

- Omega Bio-Tek E.Z.N.A Gel Extraction Kit, Katalog No: D2500-00
- ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent Applied Biosystems™, Thermo Scientific Katalog No: 78201
- BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Applied Biosystems™, Thermo Scientific Katalog No: 4337455
- Low Melting Agaroz Sigma Katalog No: A9414
- Sephadex G-50, Sigma Aldrich
- Platinum Taq Polimeraz ,Invitrogen Katalog No: 10966034
- Hot Start Taq Polimeraz NEB Katalog No: M0495L
- HiScribe T7 Quick High Yield RNA Synthesis Kit, NEB Katalog No E2050S
- In vitro digestion of DNA with Cas9 Nuclease, S.pyogenes , Katalog No NEB M0386
- DNase I recombinant, RNase-free – Roche- Katalog No: 04 716 728 001

### 3.4. Kullanılan alet ve cihazlar

- PZR Cihazı (Veriti™ 96-Well Thermal Cycler)
- Yatay elektroforez tankı (Cleaver Scientific)
- Elektroforez güç kaynağı (Consort)
- Jel görüntüleme sistemi (Syngene InGenius LHR)
- Mikro Pipet takımı (Eppendorf)
- Buz makinesi (Elektrolux)
- Mini santrifüj (Biosan combispin FVL-2400N)
- Hassas Terazi
- Nanodrop 2000c (Thermo Scientific, USA)
- Santrifüj
- ABI-Prism 3500 (Applied Biosystems, USA)

### 3.5. Yöntem

Yapılan tez çalışmasında; tanısı konulmuş KML hastalarında *BCR-ABL* füzyon geni varlığının tespit edilmesi amacıyla aşağıda belirtilen deney planı yapılmıştır.



Füzyon bölgesi net olan iki hastaya ait -20°C’de saklanan cDNA’lar PZR yöntemiyle çoğaltıldı. Elde edilen PZR ürünleri Agaroz Jel Elektroforez ile kontrol edildikten sonra dizilemenin temiz olması amacıyla Omega E.Z.N.A Gel Extraction Kitine uygun protokol uygulanarak %1’lik Agaroz jelden saflaştırma yapıldı. Saflaştırılan jelden ürünler kalıp olarak kullanılarak yeniden PZR yapıldı. Çoğaltılan PZR ürünleri %2’lik agaroz jel elektroforeziyle kontrol edildikten sonra, ExoSAP kullanılarak saflaştırıldı. Saflaştırılan ExoSap ürünlerine Sanger dizileme yapıldı. Bu kapsamda BigDye v3.1 uygulama koşuluna göre işlemler gerçekleştirildikten sonra Sephadex protokolüne göre dizileme sonrası saflaştırma yapıldı. Sanger dizileme sonrasında Chromas programı ile analiz edilen dizileme sonuçlarına göre BCR-ABL füzyon bölgeleri tespit edildi. Bu füzyon genlerinden birine göre Yale Üniversitesine ait CRISPRScan (<https://www.crisprscan.org>) yardımcı programıyla gRNA dizayn edildi. Dizayn edilen tek zincir gRNA’lar çift zincirli hale getirildikten sonra boyları agaroz jel ile kontrol edildi. HiScribe T7 Quick High Yield RNA Synthesis Kit (NEB #E2050S) kullanılarak çift zincirli oligolardan RNA sentezi gerçekleştirildi. RNA saflaştırılıp *bleach* jel ile kontrol edildi ve sonrasında Cas9 enzimi ile kesildi. Deney planı iki aşamada gerçekleştirildi. İlk olarak deney planının oluşturulması ve değişkenlerin işlevlerini doğru yaptığını göstermek amacıyla protokol uygulandı. İkinci kısımda ise kesim hassasiyetini belirleme amacıyla gRNA dizayn edilen PZR ürünü ile BCR-ABL füzyon geni içeren ancak kesim yapmaması beklenen ikinci hastaya ait PZR ürünü belirli oranlarda karıştırılarak deney planı uygulandı.

### **3.5.1 PZR yöntemi ve cDNA’nın PZR ile çoğaltılması**

Başkent Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı’nda BCR-ABL füzyon geni içeren KML tanısı almış iki hastaya ait arşivlenen cDNA örnekleri PZR yöntemi ile çoğaltılmıştır.

#### **Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)**

Kary Mullis tarafından geliştirilen bir yöntem olan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), belirli bir DNA parçasının istenilen miktar kadar çoğaltılmasına olanak sağlar (86). 1980 yılında geliştirilen bu yöntem ile Kary Mullis, 1994 yılında Nobel Ödülü almıştır (87). Bir PZR reaksiyonunda DNA Polimeraz, çoğaltılmak istenilen bölgeye özgü primerler, nükleotidler ve kalıp DNA bulunması gerekir (88). Üç aşamadan oluşur. Bunlar; denatürasyon, yeniden birleşme ve uzamadır. Bu üç faz farklı sıcaklıklarda meydana gelir ve bu nedenle hızlı sıcaklık döngüsü gereklidir (89). Denatürasyon, iki DNA dizisindeki

tamamlayıcı baz çiftleri arasındaki hidrojen bağının ayrılmasını sağlayan 95°C'ye ısıtılmayı içerir (90). Daha sonra sıcaklık, spesifik primerlerin, hibridizasyon veya yeniden birleşme olarak bilinen bir işlem olan hedef DNA segmentlerine bağlanmasına izin verecek şekilde düşürülür. Son aşamada ise sıcaklık tekrar yükseltilir, bu sırada DNA polimeraz, primerlerin 3'OH uçlarına yeni nükleotidler ekleyerek yeni zincirin uzamasını sağlar (88).

Kullanılan primer dizileri, malzeme miktarları ve ısı döngüsü Tablo 1'de belirtilmiştir.

Tablo 3.1. BCR-ABL1 geninin çoğaltılması için kullanılan primer dizileri

<b>Gen Adı</b>	<b>Primer Dizisi</b>
BCR ( F )	5' GAG CAG CAG AAG AAG TGT TTC AGA 3'
ABL1 (R)	5' CTC TAG CAG CTC ATA CAC CTG GG 3'

Tablo 3.2. BCR-ABL1 genini çoğaltmak için kullanılan malzeme ve miktarları

Bileşenler	50 µl reaksiyon	Son konsantrasyon
10X Standart Taq Reaksiyon Tamponu	5µl	1X
Q Tampon (5X)	10µl	1X
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1µl	0,5mM
20pmol/µl Forward Primer (BCR)	1µl	0,4pmol/µl
20pmol/µl Reverse Primer (ABL1)	1µl	0,4pmol/µl
10 mM dNTPs	1µl	0,2mM
Hot Start Taq DNA Polymerase (5U/µl)	0,2µl	1U
cDNA	2µl	
dH <sub>2</sub> O	28,8µl	

Tablo 3.3. BCR-ABL1 geni için uygulanan ısı döngüsü

95 °C	15 dakika	
95 °C	40 saniye	
60 °C	1 dakika	35 tekrar
72 °C	2 dakika	
72 °C	7 dakika	
4 °C	∞	

**3.5.2**

#### **Çoğaltılan cDNA'nın Agaroz jel ile kontrol edilmesi**

PZR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. Bu işlem sırasıyla şu şekilde gerçekleştirildi.

2 gram agaroz hassas terazi ile tartıldı. 100ml 0.5X konsantrasyonlu TBE tampon çözeltisi içerisinde mikrodalga fırın yardımıyla çözüldü. Çözelti oda sıcaklığına geldiğinde 2µl EtBr (10mg/mL) eklendi, karışımın homojen hale gelmesi sağlandı. Tabakta polimerleşen jelin ilk kuyucuğuna 2µl 100bp DNA belirteç konuldu, daha sonra kuyucuklara 5µl PZR ürünü ile 5µl orange G karıştırılıp yüklendikten sonra 100V ve 60 dakika yürütüldü.

Beklenen bant boyu dışında kirliliklerin uzaklaştırılması amacıyla agaroz jelden saflaştırma işlemi gerçekleştirildi.

### 3.5.3 Jelden saflaştırma

Hastaya ait 95µl PZR ürünü 15 µl Orange G ile karıştırıldı. Ürünler 1% *Low Melting* Agaroz jelde 40V'da, 4 saat yürütüldü. UV altında bakılarak neşter yardımıyla beklenen yerdeki bant kesildi, daha önce boş halde tartılan (1,01gr) 1,5ml eppendorf tüpe konuldu. E.Z.N.A kit protokolüne göre aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulandı.

1. Isı bloğu 60°C'ye ısıtıldı.
2. Jel konulan eppendorf tüp hassas teraziyle tartıldı.
3. Jel miktarı kadar bağlanma tamponu eklendi.
4. 60°C, 7 dakika ısı bloğunda jelin erimesi beklenirken 2 dakikada bir vorteks yapıldı.
5. Süre sonunda eriyen jel mini kolon ve buna uygun tüpe konularak 10,000g, 1dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi.
6. Filtrenin altındaki (tüpteki) jel kalıntısı atıldıktan sonra filtrenin üzerine 300µl bağlanma tamponu eklendi.
7. 14,000 rpm 1 dakika, oda sıcaklığında santrifüj edildi.
8. 700µl yıkama tamponu filtreye eklendi ve 14,000 rpm 1 dakika, oda sıcaklığında santrifüj edildi. Bu işlem iki kez tekrarlandı. Filtrenin altındaki atık döküldü.
9. Filtreye bir solüsyon eklenmeden boş şekilde 14,000 rpm 2 dakika santrifüj edildi.
10. Filtre temiz 1,5ml eppendorf tüpe konuldu ve 30µl elüsyon tamponu eklendi. Oda sıcaklığında iki dakika beklendi.
11. 14,000 rpm'de 1 dakika, oda sıcaklığında santrifüj edildi ve ürünler elde edildi.

Saflaştırılan fragmentler Nanodrop kullanılarak ölçüldü.

Tablo 3.4. Saflaştırma yapılan jelden elde edilen ürünün kalitesi

	Konsantrasyon (ng/µl)	260/280	260/230
Örnek	9,4	2,0	0,73

### 3.5.4 PZR ürünü saflaştırılması

PZR reaksiyonu sırasında kullanılmayan primerlerin ve nükleotitlerin uzaklaştırılması amacıyla ExoSAP-IT™ kullanıldı. Kit içeriğinde belirtildiği gibi -20°C'de saklanan

ExoSAP'tan 2µl ile 5µl PZR ürünü 0,2ml'lik PZR tüpünde karıştırıldı. Buz üzerinde gerçekleştirilen bu işlemin ısı döngüsü aşağıdaki Tablo 5'de belirtildiği gibidir.

Tablo 3.5. ExoSAP ısı döngüsü

37°C	15 dakika
80°C	15 dakika
4°C	∞

### 3.5.5 Sanger Dizileme uygulaması

Sanger dizileme yapmak için *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* kullanılarak aşağıdaki tabloda verilen reaksiyon gerçekleştirildi.

Tablo 3.6. Dizileme için *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* koşulları

	F zinciri	R zinciri
BigDye™ Terminator v3.1 Reaksiyon karışımı	0,5µl	0,5µl
BigDye™ Terminator v3.1 Sekans tamponu	1,75µl	1,75µl
F Primer (5pmol/µl)	1µl	-
R Primer (5pmol/µl)	-	1µl
DNaz- RNaz distile su	4,75µl	4,75µl
Saflaştırılan PZR ürünü	2µl	2µl
Toplam hacim	10µl	10µl

Tablo 3.7. Big Dye (Dizileme) PZR için uygulanan ısı döngüsü

Sıcaklık	Süre	Tekrar Sayısı
94°C	5dakika	1
94°C	10saniye	45
50°C	5 saniye	
60°C	170saniye	
60°C	1 dakika	1
4 °C	∞	

İşlem sonrasında PZR tüpleri -20°C'de karanlıkta bekletilir.

### 3.5.6 Sekans reaksiyonu sonrası saflaştırma işlemi

1. Hassas terazide tartılan 1 gr Sephadex G50 *medium* ile 14 ml distile su 50ml'lik steril tüpte 45 dakika çalkalayıcıda çalkalanır.
2. Hazırlanan ve homojen hale getirilen Sephadex G50 600µl filtreli kolon taşıyan tüpe konulur ve 2 dakika boyunca 5500 rpm'de santrifüj edilir.
3. Daha sonra Sephadex G50 taşıyan kolon, temiz bir eppendorf tüpe saktarılır.
4. Big Dye V3.1 ürünleri Sephadexli filtrenin ortasına aktarılır ve 5500 rpm'de 2 dakika boyunca santrifüj edilir.
5. Süzülen yaklaşık 10µl ürün sekans cihazına yüklenir.

### 3.5.7 Dizileme sonucuna göre hedeflenen BCR-ABL füzyonuna uygun gRNA

#### dizaynı

Yapılan dizileme reaksiyonu Chromas programı (Technelysium Pty Ltd) ile analiz edildi. BCR-ABL1 füzyon bölgesi tespit edildi. Hedeflenen hastaya ait diziye uygun gRNA dizayn edildi. Bu amaçla CRISPRScan programı kullanıldı.

Tablo 3.8. Dizayn edilen sgRNA dizileri

Oligo dizisi	
<b>Sabit</b>	5'AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACG
<b>Bölge</b>	GACTAGCCTTATTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC3'
<b>gRNA</b>	5'TTCTAATACGACTCACTATAGGGAGTTCAAAGCCCTTCA GGTTTTAGAGCTAGA3'

### 3.5.8 Tek zincir oligoların çift zincire dönüştürülmesi

Dizayn edilen tek zincirli oligoların çift zincirli hale gelmesi için iki protokol uygulandı. Bunlardan birincisi Phusion DNA Polimeraz kullanılarak yapıldı (91). İkinci protokolde ise Invitrogen™ Platinum™ Taq DNA Polimeraz kullanılarak yapıldı.

Tablo 3.9. Tek zincirli oligoların çift zincirli hale dönüştürülmesi için uygulanan birinci protokol

<b>Bileşenler</b>	
dH <sub>2</sub> O	17,75µl
5X Phusion Tampon	2,5µl
10mM dNTPs	0,5µl
Oligolar (10µM sabit bölge /10µM gRNA)	0,5µl / 0,5µl
Phusion DNA Polimeraz	0,25µl
Toplam	25µl

Tablo 3.10. Tek zincir oligoların çift zincir oligoya dönüştürülürken birinci protokole uygulanan ısı döngüsü

<b>Sıcaklık</b>	<b>Süre</b>
98°C	2dk
50°C	10dk
72°C	10dk
4°C	∞

Tablo 3.11. Tek zincirli oligoların çift zincirli hale dönüştürülmesi için uygulanan ikinci protokol

<b>Bileşenler</b>	
dH <sub>2</sub> O	20,15µl
10X PCR Tampon	2,5µl
50mM MgCl <sub>2</sub>	0,75µl
10mM dNTPs	0,5µl
Oligolar (10µM sabit bölge /10µM gRNA)	0,5µl / 0,5µl
Platinum Taq Polymeraz	0,1µl
Total	25µl

Tablo 3.12. Tek zincir oligoların çift zincir oligoya dönüştürülürken ikinci protokole uygulanan ısı döngüsü

Sıcaklık	Süre	Tekrar Sayısı
94°C	2dk	1
94°C	30sn	
45°C	30sn	35
72°C	20sn	
72°C	2dk	1
4°C	∞	1

### 3.5.9 Çift zincir oligoların kontrol edilmesi

Çift zincirli oligoların varlığı ve boyutu %2'lik Agaroz jel kullanılarak analiz edildi. Bu amaçla 4µl oligo ve 4µl Orange G ile karıştırıldı ve jele yüklendi. Sonucunda yaklaşık 120 baz çifti uzuluğunda bant elde edildi.

### 3.5.10 RNA sentez aşaması

NEB *HiScribe T7 Quick High Yield RNA Synthesis Kit* (NEB #E2050S) kullanılarak in vitro transkripsiyon işlemi gerçekleştirildi.

Tablo 3.13. RNA sentez protokolü

Kullanılan malzeme	Reaksiyon başına konulacak miktar (µl)
dH2O	14µl
NTP Tampon Karışımı	10µl
Kalıp DNA	4µl
T7 RNA Polimeraz	2µl
Toplam	30µl

Hazırlanan karışım 37°C'de 16 saat inkübe edildi.

İnkübasyon sonrasında enzimin inhibe edilmesi için ürünler 1µl DNaz I (Roche Katalog No: 04716728001) ve 3,5µl 10X tampon eklenerek 37°C'de 20 dakika inkübe edildi.



### 3.5.11 RNA saflaştırılması

Bir önceki basamakta elde edilen ürünler aşağıdaki protokol uygulanarak saflaştırıldı.

1. 145,5 µl DEPC'li su ve 20µl 3M Sodyum Asetat karışımına eklendi.
2. Karışım dikkatlice pipetaj ile karıştırıldı.
3. 200µl Fenol/Kloroform eklendi, çok iyi bir şekilde vortex yapıldı.
4. 4°C'de 5 dakika en yüksek hızda santrifüj yapıldı.
5. Santrifüj sonrası oluşan fazlardan üst faz alınıp yeni tüpe aktarıldı.
6. Yeni tüp 4°C en yüksek hızda ve 5 dakika boyunca santrifüj yapıldı.
7. Santrifüj sonrası oluşan fazın üst kısmı tekrar farklı bir yeni tüpe aktarılırken miktarı 183µl olarak ölçüldü.
8. Elimizdeki fazın iki katı kadar (366µl) -20°C'de bekletilen %100 EtOH eklendi ve ürünler 2 saat -20°C'de bekletildi.
9. Bu bekletilme işlemi gerçekleştirildikten sonra, 4°C'de 10 dakika boyunca maksimum hızda santrifüj yapıldı ve santrifüjden sonra oluşan fazın üst kısmı atıldı.
10. Kalan pellete 500µl -20°C'de bekletilmiş %70'lik EtOH eklendi.
11. 4°C'de 10 dakika boyunca maksimum hızda santrifüj yapıldı ve fazın üst kısmı atıldı.
12. Bu işlemden sonra tüpün ağzı açık bırakılarak pelletin hafifçe kurumaması sağlandı.
13. Pellet hafifçe kuruduktan sonra üzerine 25µl DEPC'li su eklendikten sonra konsantrasyon ölçümüne hazır hale getirildi.
14. Hazırlanan RNA, DEPC'li su ile dala alınarak spektrofotometre ile ölçüldü. Konsantrasyonu ölçülen RNA farklı tüplere eşit şekilde paylaştırıldıktan sonra -20°C'de saklandı.

### 3.5.12 Saflaştırma sonrası RNA'nın kontrol edilmesi

1. %1'lik *bleach* jel; 1ml çamaşır suyu ve 2gr agaroz tartılarak 99 ml TBE içinde çözülerek hazırlandı (92).
2. 10 dakika oda ısısında bekletildikten sonra 5µl EtBr eklendi ve homojen hale geldikten sonra polimerleşmesi beklendi.
3. 50 baz çiftlik moleküler ağırlık belirteci kullanıldı.
4. 6X Loading Dye ile RNA, 2:1 oranında (toplam 3 µl) karıştırıldıktan sonra jele yüklendi.
5. Jel yürütülürken tankın çevresi buz aküleriyle kapatıldı. Jel 40 Voltta 2 saat yürütüldü.

### 3.5.13 Cas9 enzim ile kesim:

Saflaştırılan RNA ve Cas9 enzimi kullanılarak hedef DNA dizileri laboratuvar şartlarında kesildi.

Tablo 3.14. Saflaştırılan RNA kesim protokolü

Bileşenler	Miktar
Steril Su	21.5µl
NEBuffer 3.1	3µl
Stok sgRNA	2µl
Stok Cas9 Nuclease, <i>S. pyogenes</i>	0.5µl
Reaksiyon hacmi	27µl
10 dakika, 25°C inkübasyon	
Kalıp DNA	6 µl
17 saat, 37°C inkübasyon	
Toplam reaksiyon hacmi	33µl
Proteinaz K	1µl
30 dakika, 37°C inkübasyon	
Toplam reaksiyon hacmi	34µl

Bu düzene göre deney planının ilk kısmı için düzenlenen protokol aşağıda belirtildiği gibi düzenlenmiştir.

Tablo 3.15. Kesim Protokolü

Deney şartları	A	B	C	D	E-F
<b>Bileşenler</b>					
Steril su	21,5µl	21,5µl	21,5µl	21,5µl	21,5µl
NEBuffer	3µl	3µl	3µl	3µl	3µl
Stok gRNA	2µl	2µl	-	2µl	2µl
Stok Cas9	0,5µl	0,5µl	0,5µl	-	0,5µl
25°C’de 10 dakika inkübasyon (toplam 27µl)					

PZR Ürünü	-	-	6µl	6µl	6µl
37°C’de 17 saat inkübasyon (toplam 33µl)					
Proteinaz K	-	1µl	1µl	1µl	1µl
37°C’de 30 dakika inkübasyon (toplam 34µl)					

Oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra agaroz jel elektroforez ile fragment analizi yapılır.

### 3.5.14 Cas9 kesimi fragment analizi

Kesim ürünleri %2,5 agaroz jel elektroforez ile kontrol edildi. Toplam 9 kuyucuğa sırası ile aşağıda belirtilen şekilde yükleme yapıldı.

1. kuyucuk: 1,5 µl 100bp marker
2. kuyucuk: 2µl Orange G + 2µl PCR ürünü (Hedeflenen hastaya ait)
3. kuyucuk: 5µl Orange G + 15µl kesim ürünü (A)
4. kuyucuk: 5µl Orange G + 15µl kesim ürünü (B)
5. kuyucuk: 5µl Orange G + 15µl kesim ürünü (C)
6. kuyucuk: 5µl Orange G + 15µl kesim ürünü (D)
7. kuyucuk: 5µl Orange G + 15µl kesim ürünü (E)
8. kuyucuk: 5µl Orange G + 15µl kesim ürünü (F)
9. kuyucuk: 1,5 µl 100bp marker

### 3.5.15 Cas9 enzimi ile kesim hassasiyetinin belirlenmesi

Deney planı birinci bölümde elde edilen verilere göre en uygun koşulların E-F (Tablo 15) olduğuna karar verildi.

Tablo 3.16. Optimize edilen kesim protokolü

Bileşenler	Miktar
Steril su	21,5µl
NEBuffer	3µl
Stok gRNA	2µl
Stok Cas9	0,5µl

25°C’de 10 dakika inkübasyon (toplam 27µl)	
PCR Product	6µl
37°C’de 17 saat inkübasyon (toplam 33µl)	
Proteinaz K	1µl
37°C’de 30 dakika inkübasyon (toplam 34µl)	

Tabloda uygulanan protokole göre, kesim hassasiyetinin belirlenmesi amacıyla kullanılacak hedef ve hedef dışı PZR ürün miktarları aşağıdaki tabloda belirtildiği şekilde uygulandı.

Tablo 3.17. Yüzdeler konsantrasyonlarına göre hassasiyet belirleme

Yüzde Konsantrasyon	Hedef Hasta PZR Miktarı	Hedef dışı Hasta PZR Miktarı	Toplam miktar	Adlandırma
%100	10µl	-	10µl	A - 1
%90	9µl	1µl	10µl	A - 2
%80	8µl	2µl	10µl	A - 3
%70	7µl	3µl	10µl	A - 4
%60	6µl	4µl	10µl	A - 5
%50	5µl	5µl	10µl	A - 6
%40	4µl	6µl	10µl	A - 7
%30	3µl	7µl	10µl	A - 8
%20	2µl	8µl	10µl	A - 9
%10	1µl	9µl	10µl	A - 10
%0	-	10µl	10µl	A - 11

### 3.5.16 Fragment analizi

Kesim ürünleri % 2,5 agaroz jel elektroforez ile kontrol edildi. Toplam 14 kuyucuğa sırası ile aşağıda belirtilen şekilde yükleme yapılarak 30 Voltta yaklaşık 10 saat yürütüldü.

1. kuyucuk: 1,5 µl 100bp marker

2. kuyucuk: 5µl Orange G + 15µl kesim ürünü (A1)
3. kuyucuk: 5µl Orange G + 15µl kesim ürünü (A2)
4. kuyucuk: 5µl Orange G + 15µl kesim ürünü (A3)
5. kuyucuk: 5µl Orange G + 15µl kesim ürünü (A 4)
6. kuyucuk: 5µl Orange G + 15µl kesim ürünü (A 5)
7. kuyucuk: 5µl Orange G + 15µl kesim ürünü (A 6)
8. kuyucuk: 5µl Orange G + 15µl kesim ürünü (A 7)
9. kuyucuk: 5µl Orange G + 15µl kesim ürünü (A 8)
10. kuyucuk: 5µl Orange G + 15µl kesim ürünü (A 9)
11. kuyucuk: 5µl Orange G + 15µl kesim ürünü (A 10)
12. kuyucuk: 5µl Orange G + 15µl kesim ürünü (A11)
13. kuyucuk: 2µl Orange G + 2µl hedeflenen pcr ürünü
14. kuyucuk: 2µl Orange G + 2µl hedef dışı pcr ürünü

Kesim sonrası hassasiyet %10'luk konsantrasyonda dahi belirgin bir şekilde gözlenebildiği için, hassasiyet oranı %8, %6, %4 ve %2 şeklinde tekrar düzenlenmiştir.

Tablo 3.18. Hassasiyet Oranı

<b>Yüzde Konsantrasyon</b>	<b>Hedef PCR</b>	<b>Hedef dışı PCR</b>	<b>Toplam miktar</b>	<b>Adlandırma</b>
%8	0,8µl	9,2µl	10µl	Cut12
%6	0,6µl	9,4µl	10µl	Cut13
%4	0,4µl	9,6µl	10µl	Cut14
%2	0,2µl	9,8µl	10µl	Cut15

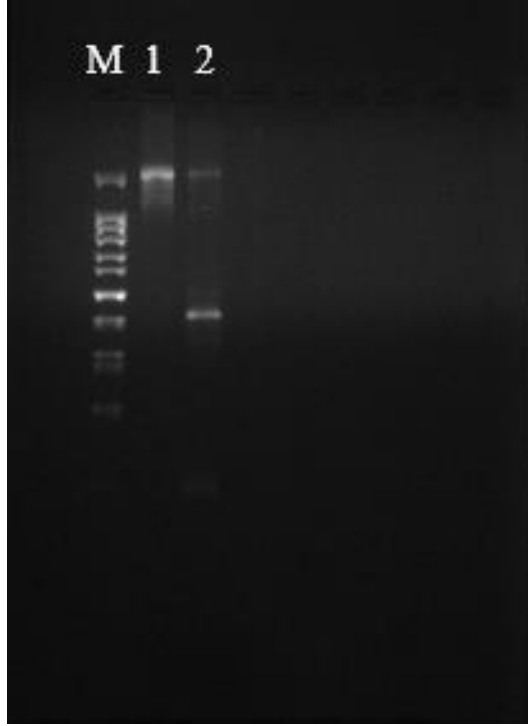
% 2,5 agaroz jel elektroforez ile kontrol edildi. Toplam 7 kuyucuğa sırası ile aşağıda belirtilen şekilde yükleme yapılarak 30 Voltta yaklaşık 10 saat yürütüldü.

1. kuyucuk: 1,5 µl 100bp marker
2. kuyucuk: 5µl Orange G + 15µl kesim ürünü (Cut12)
3. kuyucuk: 5µl Orange G + 15µl kesim ürünü (Cut13)
4. kuyucuk: 5µl Orange G + 15µl kesim ürünü (Cut14)
5. kuyucuk: 5µl Orange G + 15µl kesim ürünü (Cut 15)
6. kuyucuk: 2µl Orange G + 2µl hedeflenen pcr ürünü
7. kuyucuk: 2µl Orange G + 2µl hedef dışı pcr ürünü

## 4. BULGULAR

### 4.1 PZR ile çoğaltılan cDNA jel görüntüsü

İlk aşamada gerçekleştirilen BCR-ABL1 genine ait PZR ürününün agaroz jel elektroforez ile kontrolü şekilde gösterildiği gibidir.



Şekil 4.1. BCR-ABL1 geni amplifikasyonuna ait agaroz jel elektroforez görüntüsü.

Görüntüye ait M: 100bp marker, 1 numaralı kuyucuk hedeflenen hastaya ait PZR ürünü, 2 numaralı kuyucuk hedef dışındaki hastaya ait PZR ürünü belirtmektedir. %2'lik hazırlanan agaroz jel elektroforezinde 40.dakikada, 500ms ışımaya ile görüntü elde edilmiştir.

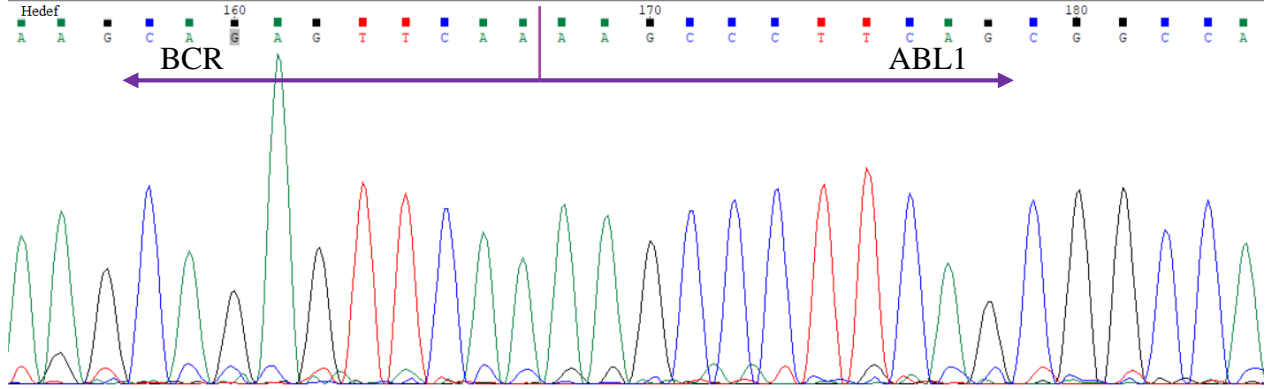
### 4.2 Hedeflenen Hastaya Ait BCR-ABL1 Füzyon Geni Sanger Dizileme Ensembl

#### Verileri

Hastalara ait füzyon geninin tespiti amacıyla Sanger dizileme yapıldı. *BCR* ve *ABL1* genlerine ait dizi ayrı ayrı gösterildi. Bu amaçla ENSEMBL verilerine göre hastadaki füzyon bölgesinin *BCR* geni ile başladığı Şekil 15'te ve *ABL1* geni ile başladığı Şekil 16'da gösterilmiştir. Aynı hastaya ait dizileme Chromas (Technelysium Pty Ltd) ile analiz edildi. Şekil 15'de *BCR* geni ile biten ve *ABL1* geni ile başlayan füzyon bölgesi gösterildi.

### 4.3 Sanger dizileme yapılan hedef hastaya ait Chromas analizi

Hastaya ait analizi yapılan dizileme sonucunda 167-168. bazlar arasında kalan mor çizgi füzyon bölgesini ifade etmektedir. Bu çizginin öncesi BCR genine ait, sonrası ise ABL1 genine aittir. Bu verilere göre dizayn edilen gRNA 5'-GAGTTCAAAAGCCCTTCAGCGG-3' (CGG = PAM dizisi) şeklindedir.



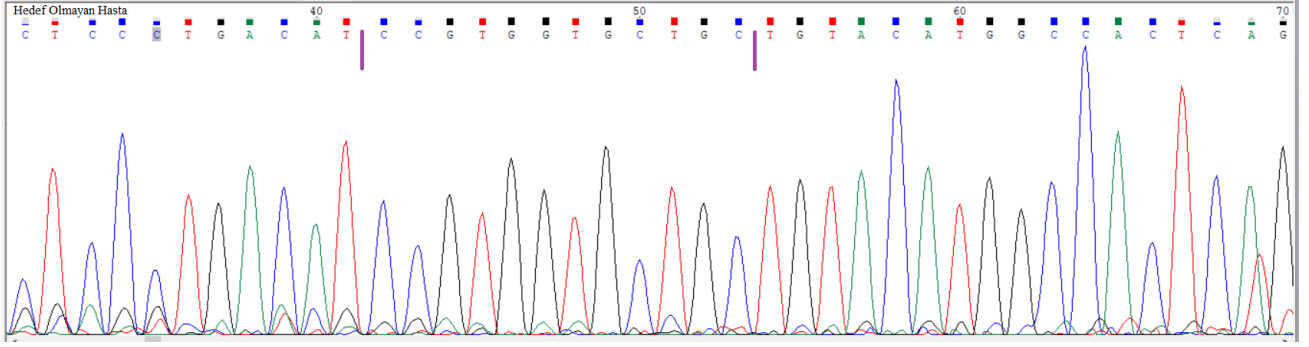
Şekil 4.2. Hedeflenen hasta için füzyon bölgesinin Sanger Dizileme görüntüsü.

### 4.4 Hedef Dışı Hastaya Ait Sanger Dizileme Ensembl Verileri:

Hedef dışı hasta olarak tanımlanan hastanın BCR-ABL1 füzyon bölgesi dizilendi. Bu dizileme sayesinde hastaya ait BCR geni Şekil 18'de ve ABL1 geni Şekil 19'da ayrı ayrı gösterildi. Oluşan füzyon bölgesinde her iki gen ile benzerlik gösterdiği Şekil 20'de belirtildi. gRNA'nın tanıma bölgesi olan *protospacer* olarak nitelendirilen 5'-NGG-3' (PAM) dizisi bu füzyon bölgesinde bulunmamaktadır. Bu hastanın füzyon bölge dizisinde gRNA'nın herhangi bir tanıma yapamamasından dolayı hasta, Hedef Dışı Hasta olarak nitelendirilmiştir.

### 4.5 Sanger Dizileme Yapılan Hedef Dışı Hastaya Ait Chromas Analizi

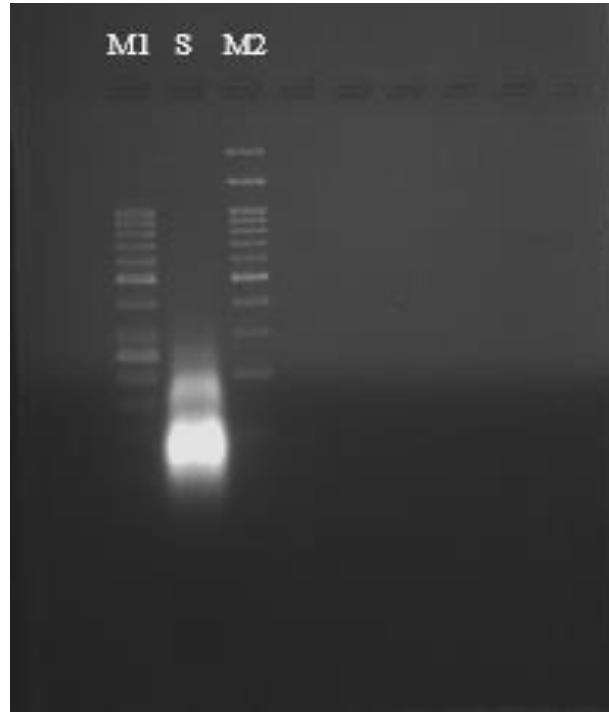
Hedef dışı hasta için yapılan dizileme sonucunda 42 ile 53. bazlar arasında yer alan 5'-CCGTGGTGCTGC-3' dizisi her iki gen için de kesişim bölgesini ifade etmektedir.



Şekil 4.3. Hedef olmayan hasta için BCR-ABL füzyon bölgesine ait Sanger Dizileme görüntüsü.

#### 4.6 Çift Zincir Oligo Sentezi

Dizayn edilen gRNA ve Cas9 ile bağlanmasını sağlayacak sabit bölgesi birleştirildikten sonra *in vitro* transkripsiyon işlemi öncesinde çift zincirli DNA haline getirildi. Bu dizinin beklenen bant boyu yaklaşık 120 baz çiftidir. Tek zincirden çift zincire getirilen oligonun agaroz jel elektroforezi görüntüsü Şekil 17’de verilmiştir.

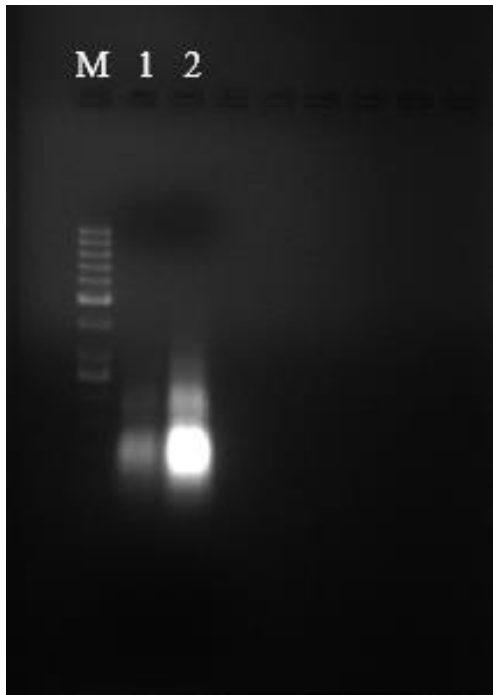


Şekil 4.4. Çift zincir oligoya ait agaroz jel görüntüsü. M1: 50bp marker, S: Stok gRNA, M2: 100bp marker. Görüntü 1s 00ms pozlama zamanında elde edilmiştir.

#### 4.7 Sentezi Yapılan RNA'nın Agaroz Jel ile Kontrolü



Çift zincirli hale getirilen DNA'dan *in vitro* transkripsiyon ile tracrRNA üretildi. Agaroz jel elektroforezi işlemi sırasında sentezlenen RNA'nın degrade olmaması için çamaşır suyu kullanıldı. Şekil 18'de sentezlenen tracrRNA'nın %2'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü verilmiştir. Bu optimizasyon için iki farklı protokol izlendi. Bu iki protokol arasındaki farklılık kullanılan enzimdir. 1 numaralı kuyucukta uygulanan protokolda Phusion DNA Polimeraz (91) kullanırken, 2 numaralı kuyucukta Invitrogen™ Platinum™ Taq DNA Polimeraz kullanıldı. Beklenen bant boyu yaklaşık 120bp'dir. Platinum DNA polimeraz protokolündeki bandın daha belirgin olmasından dolayı deneyin devamında bu protokol kullanıldı.



Şekil 4.5. RNA Sentezinin agaroz jel ile kontrolü. M: 50bp moleküler ağırlık belirleyicisi, 1. kuyucuk Phusion DNA Polimeraz enzimi uygulanan protokol ürünü, 2. kuyucuk Taq Platinum enzimi uygulanan protokol ürünü

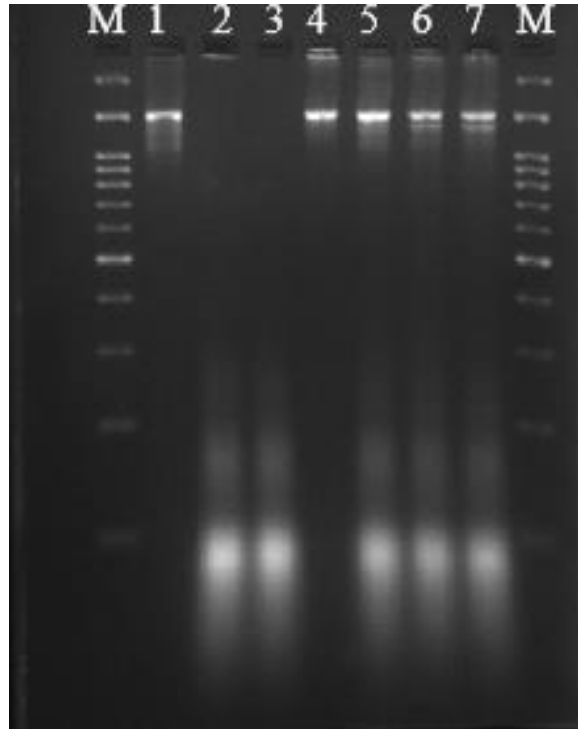
#### 4.8 Kesim Protokolünün Belirlenmesi (Optimizasyon)

Kesim protokolünü belirlemek amacıyla gRNA, Cas9, PZR ürünü ve Proteinaz K farklı miktarlarda kullanılarak optimizasyon çalışmaları yapıldı. Denenen deneysel şartlar Tablo 19'da verilmiştir.

Tablo 4.1. Deney optimizasyonu için jel yükleme kriterleri

Bileşenler	A	B	C	D	E	F
Steril su	+	+	+	+	+	+
NEBuffer	+	+	+	+	+	+
Stok gRNA	+	+	-	+	+	+
Stok Cas9	+	+	+	-	+	+
PZR	-	-	+	+	+	+
Proteinaz K	-	+	+	+	+	+
Kuyucuk No	2	3	4	5	6	7

Yükleme sırasına göre elde edilen bant boyları şekilde gösterildiği gibidir. Jel ilk önce 35 Voltta 300 dakika, sonra 50 Volt 60 dakika daha yürütüldü. Jelin görüntüsü 1s 500ms pozlama zamanı ile elde edildi. Şekil 19’da M: 100bp marker ifade ederken 1 numaralı örnek hedeflenen hastaya ait PZR ürünüdür.



Şekil 4.6. Deney kesim protokolünün agaroz jel görüntüsü

Şekilde, 1. kuyucukta herhangi bir kesim uygulaması olmadan, sadece hedeflenen hastanın PZR ürünü yürütüldü ve beklenen bant boyu gözlemlendi. İkinci kuyucukta gRNA'nın tanıyabileceği herhangi bir PZR ürünü olmadığı için kesim gerçekleşmedi. Burada PZR ürünü olmadan sistemin çalışmadığını doğruladık, aynı zamanda Proteinaz K yokluğunda Cas9'un kuyucukta kaldığını göstermiş olduk. Üçüncü kuyucukta PZR örneği olmadığı için kesim olmadı. Ayrıca 2. kuyucuğa yüklenen örnekten farklı olarak Proteinaz K kullanıldığı için Cas9'ın kuyucukta bulunmadığı gösterildi. Dördüncü kuyucukta gRNA yokluğunda füzyon bölgesinin tespiti olmayacağı için Cas9 enziminin kesim yapmadığını doğruladık. Beşinci kuyucukta Cas9 enzim yokluğunda, gRNA hedef bölgeyi tanısa bile herhangi bir kesim olmadığını gösterdik Altıncı ve yedinci kuyucuklarda kesim için bütün gerekli bileşenler eklendiğinde sistemin doğru çalıştığını ispatladık. Deneyde kullanılacak kesim protokolünün E/F koşullarına göre olmasına karar verildi

#### **4.9 Füzyon Bölge Tanıma Hassasiyetinin Belirlenmesi**

Füzyon bölgesinin tanıma hassasiyetinin belirlenmesi için iki farklı BCR-ABL1 füzyon bölgesi kullanıldı. Bunlarda birincisi gRNA dizayn edilen hedef DNA dizisi, diğeri ise dizayn edilen gRNA tarafından tanıma bölgesi olmayan BCR-ABL1 füzyon bölgesi. Yapılan çalışma kapsamında hedef dizi miktarı giderek seyreltilerek Cas9 enziminin kesim yapıp yapamadığı incelendi. Bu amaçla uygulanan kesim protokolünde kullanılan oranlar ve bu ürünlerin jelde yüklendiği kuyucuk numarası Tablo 20'de verilmiştir. Deney planına göre hedeflenen hasta için hassasiyet 100%'den belirli oranlarla düşülerek %10'a (Panel A ) ve daha sonra %10'dan %2'ye (Panel B) kadar seyreltilerek çalışma yapılmıştır.

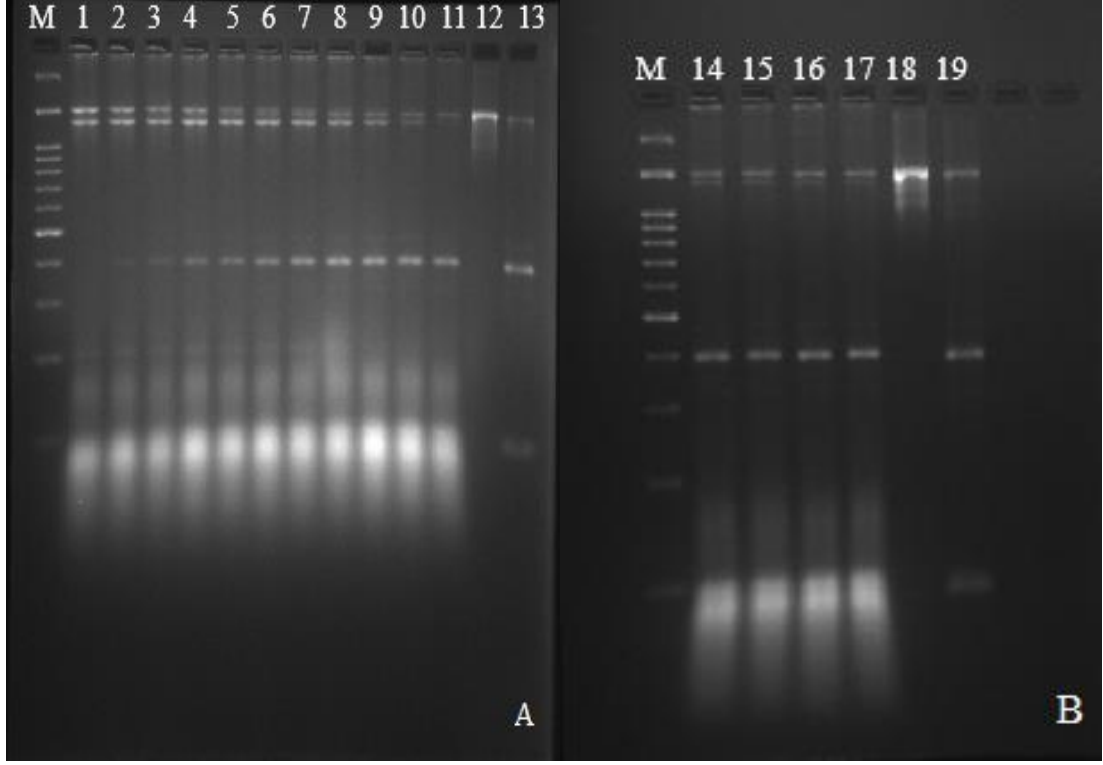
Tablo 4.2. Füzyon bölge tanıma hassasiyeti için A paneline ait jel yükleme kriterleri

Yüzde Konsantrasyon	Hedef Hasta PZR Miktarı	Hedef dışı Hasta PZR Miktarı	Jeldeki Yeri
%100	10 $\mu$ l	-	A - 1
%90	9 $\mu$ l	1 $\mu$ l	A - 2
%80	8 $\mu$ l	2 $\mu$ l	A - 3
%70	7 $\mu$ l	3 $\mu$ l	A - 4
%60	6 $\mu$ l	4 $\mu$ l	A - 5
%50	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	A - 6
%40	4 $\mu$ l	6 $\mu$ l	A - 7
%30	3 $\mu$ l	7 $\mu$ l	A - 8
%20	2 $\mu$ l	8 $\mu$ l	A - 9
%10	1 $\mu$ l	9 $\mu$ l	A - 10
%0	-	10 $\mu$ l	A - 11

Tablo 4.3. Füzyon bölge tanıma hassasiyeti için B paneline ait jel yükleme kriterleri ile uygulanan protokol ürünü

Yüzde Konsantrasyon	Hedef PCR	Hedef dışı PCR	Jeldeki Yeri
%8	0,8 $\mu$ l	9,2 $\mu$ l	B - 14
%6	0,6 $\mu$ l	9,4 $\mu$ l	B - 15
%4	0,4 $\mu$ l	9,6 $\mu$ l	B - 16
%2	0,2 $\mu$ l	9,8 $\mu$ l	B - 17

Cas9 enzimi ile kesim hassasiyetinin belirlenmesi amacıyla uygulanan kesim protokolüne ait agaroz jel elektroforez görüntüleri Şekil 20’de verilmektedir. Hedef füzyon geninin %2 oranında bulunduğu karışımda füzyon geninin tespit edilebildiği gösterilmektedir. A panelindeki görüntüde 12. kuyucuk hedef PZR ürünü, 13. kuyucuk hedef dışı PZR ürünü ifade etmektedir. B panelinde ise 18. kuyucuk hedef PZR ürünü, 19. kuyucuk hedef dışı PZR ürünü ifade etmektedir.



Şekil 4.7. Füzyon bölge tanıma hassasiyetini belirlemek amacıyla uygulanan protokole ait jel elektroforez görüntüsü M:100bp moleküler ağırlık belirleyicisi. A panelinde görüntü 35 Voltta 300dk ve sonrasında 50Volta 60dk yürütülmesi sonucunda 2s 000ms pozlama zamanı ile elde edilmiştir. B panelinde görüntü, 60Volt, 180 dakika sonunda 1s 500ms pozlama zamanı ile elde edilmiştir.

Hedeflenen hastanın füzyon bölgesinin tespit edilmesi Şekil 20A'da çift bant şeklinde görülmektedir. Bunun yanı sıra, hedef dışı hastanın PZR ürününe ait kesim protokolünün yüklendiği 11 numaralı kuyucukta herhangi bir kesim olmadığı gözlenmiştir. Bu sayede dizayn edilen gRNA'nın sadece hedeflenen hastadaki füzyon bölgeyi saptadığını göstermiş bulunmaktayız. Füzyon bölge tanıma hassasiyeti %8, %6, %4 ve %2'ye indirdiğimizde dahi hedeflenen füzyon bölgesinin tespit edilip kesim yapıldığı ve hedef dışı hastada bir kesim olmadığı görülmektedir.

## 5. TARTIŞMA

Prokaryotlarda adaptif immün sistem olarak çalışan ve hücreyi virüs ve plazmid gibi yabancı DNA işgalinden koruyan savunma mekanizması CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/ CRISPR Associated Protein 9) olarak adlandırılmaktadır (8, 58). Çalışma prensibi bir endonükleaz enzim olan Cas9'un, tek bir rehber RNA molekülünün yönlendirmesi ile hedef DNA dizisini bulup, çift zincir kırığı oluşturmasına dayanmaktadır (8). Enzim, kesim yapabilmek için hedef DNA dizisinin 3' ucunda kısa, *protospacer adjacent motif* (PAM) adı verilen bir diziye ihtiyaç duymaktadır (10). Şimdiye kadar altı farklı CRISPR/Cas sistemi (Tip I, tip II, tip III, tip IV, Tip V, Tip VI) tanımlanmıştır (74). Bu sistemler temel özellikler açısından benzerlik göstermekle beraber rehber RNA'nın işlenip, Cas9 enzimini yönlendirmesi açısından farklılıklar taşımaktadır (58).

Son dönemde Cas nükleazlarının DNA ve RNA düzeyinde oluşan değişikliklerin tespit edilmesinde yararlı bir araç olarak kullanılabileceği yönünde yayınlar çıkmaktadır. Cas9 nükleazın *in vitro* olarak DNA'da var olan mutasyonları %1-10 arasında değişen hassasiyet ile saptama kapasitesi olduğu vurgulanmaktadır [8]. Bununla birlikte biz Cas9 nükleazın sadece DNA'daki nokta mutasyonlarının değil translokasyon gibi gen yeniden düzenlenmelerinin varlığını da tespit etme potansiyeli olduğu düşünmekteyiz. Bu proje kapsamında Cas9 enzimi ve gRNA kullanarak *in vitro* şartlarda BCR/ABL füzyon geninin saptanabileceğini gösterdik. Böylece, kronik miyeloid lösemi hastalarında, bu yöntemle BCR/ABL füzyon geninin varlığının %2 hassasiyetle yapılabileceğini göstermiş olduk. Sonraki projelerde Cas9 enziminin hedeflemesi değiştirilerek farklı gen füzyonlarının saptanmasını sağlayacak sistemlerin geliştirilmesi düşünülmektedir.

1960 yılında Peter Nowell (93) ve David Hungerford tarafından KML'nin ayırt edici özelliği olarak bulunan anormal kromozom olan *Philadelphia* kromozomunun, kanserin ilk kez belirli bir genetik anormallikten kaynaklandığı gösterilmiştir (94). Sitogenetik teknikler geliştikçe, 1973'te Rowley, KML'de 9 ve 22 numaralı kromozomun uzun kolları arasında bir translokasyon olduğunu keşfetti (95). Daha sonraki çalışmalar, bu translokasyonun kanser hücrelerinde ifade edilen yeni bir füzyon proteini ile sonuçlandığını gösterdi (96). Dolayısıyla *Philadelphia* kromozomunun tanımlanmasıyla birlikte genetik tanı çağı başlamış oldu. Elde edilen genetik verilerin, neoplazmaların tanı ve prognozu ile yakından ilişkili olduğu ve böylece kanser sitogenetiğinin araştırma laboratuvarlarından klinik

uygulamaya taşındığı gösterilmiştir. Bu nedenle konvansiyonel sitogenetik analiz; tanı, sınıflandırma ve prognozdeki kullanışlılığı nedeniyle, yeni teşhis edilen tüm lösemiler için zorunlu kabul edilmektedir (94).

Güncel KML tanı ve takip kılavuzları, KML için ilk değerlendirmenin klinik olarak yapılması sonrasında tanının doğrulanması için hematolojik ve moleküler genetik test yapılması önerilmektedir. Tanı anında BCR-ABL1 transkriptlerinin varlığını belirlemek için RT-PCR teknolojisi kullanılması önerilmektedir. Moleküler genetik analiz mümkün değilse, KML tanısını doğrulamak için FISH analizi de kabul edilebilir. İnterfaz FISH periferik kan üzerinde gerçekleştirilir, ancak kullanılan proba bağlı olarak %1 ila %5 arasında yanlış pozitiflik de mümkündür. Bunun yanı sıra daha hassas olan çift füzyonlu FISH probalar düşük yanlış pozitif oranlarla *Philadelphia* kromozomunun tüm varyant translokasyonlarını tespit edebilir (97).

Sitogenetik bir teknik olan floresan in situ hibridizasyon (FISH) 1980'lerin başında geliştirilmiştir (98). FISH, belirli kromozomlar üzerindeki lokusları haritalamak, hem sayısal hem de yapısal kromozomal anormallikleri tespit etmek için kullanılır (99) (100). Bu teknik, geleneksel sitogenetik metafaz karyotip analizi yöntemine kıyasla daha az zaman alan bir uygulamadır (101) (94). Günümüzde FISH, marker kromozomların ve kromozom kırılma noktalarının tanımlanması ile translokasyonlar, inversiyonlar, insersiyon ve mikrodelesyonlar gibi yapısal yeniden düzenlemelerin tespiti için vazgeçilmez bir araç olarak kullanılmaktadır (102, 103) (104).

Güncel kılavuzlar ölçülebilir BCR-ABL1 mRNA transkriptlerinin varlığının ve miktarının kantitatif RT-PCR (qPCR) ilk tanı sırasında yapılmasını önermektedir. Genellikle periferik kan üzerinde yapılan qPCR, BCR-ABL1 mRNA'nın ölçümü için mevcut olan en hassas yöntemdir ve 100.000 normal hücredeki bir KML hücrelerini tespit edebilecek hassasiyete sahiptir. Son yıllarda Uluslararası Ölçek (International Scale, IS), qPCR değerlerini ifade etmenin altın standardı haline gelmiştir (97) (105). (106).

2020 yılının başında tanımlanan ve Çin'in Vuhan Eyaleti'nden tüm Dünya'ya yayılan COVID-19 (107) pandemisi ile hastalıkların hızlı ve doğru tanısının önemi bir kez daha anlaşılmiş bulunmaktadır. Virüs enfeksiyonlarının neden olduğu bulaşıcı hastalıkların tanısında hızlı ve basitleştirilmiş tanı kitlerinin geliştirilme ihtiyacı fark edilmiştir. Son yıllarda özellikle Latin Amerika ve Güneydoğu Asya'da bulunan Zika virüsü gibi, virüslerin varlığını tespit etmek için CRISPR/Cas sistemini moleküler tanıya uygulamakla ilgili

makaleler yayınlamışlardır (108). Pardee ve arkadaşları 2016'da, RNA dizisini amplifiye etmek için kullanılan nükleik asit sekans bazlı amplifikasyon (NASBA) ile CRISPR-Cas9 tekniğini birlikte tanı amaçlı kullanmışlardır. İzotermal bir amplifikasyon tekniği olan (NASBA) ile CRISPR-Cas9 tekniği Zika virüs suşlarını doğru bir şekilde ayırt etmek için makak modelinde uygulanmıştır. Araştırmacılar NASBA ile amplifiye edilmiş viral RNA'ya sentetik bir tetikleyici dizi eklemiştir. Eklenen sentetik tetikleyici ve *toehold* (translasyonun başlaması için ribozumun tanıma bölgesini içeren dizi) dizisi birbirine komplementer olarak yerleşiktir. Ortaya çıkan dsDNA CRISPR/Cas9 yöntemi ile analiz edilmiş ve suşa özgü PAM dizisinin varlığına göre kesim gerçekleşmiştir. Cas9, hedef dsDNA'yı keserse toehold dizisi ile tetikleyici dizi arasındaki komplementerlik bozulacağı için hedef RNA amplifiye olamayacak. Tam uzunluktaki, kesintiye uğramayan fragmentler ise tetikleyici diziyi aktifleştirmiş ve suşları ayırt edebilmek için renk değişikliğine yol açmıştır (109).

Guk ve arkadaşları metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) enfeksiyonlarının yayılmasını önlemek ve hastaların tedavisine rehberlik etmek için tanıya yönelik çalışma yapmışlardır. Bu kapsamda MRSA'nın basit ve hassas tespit için CRISPR aracılı FISH sistemini kullanmışlardır. Bu yöntemde, hedefleme materyali olarak CRISPR ile ilişkili protein 9 / tek kılavuz RNA (dCas9 / sgRNA) kompleksini ve floresan prob olarak SYBR Green I (SG I) kullanır. Bir dCas9 / sgRNA-SG I bazlı saptama yaklaşımı, hedef gen ile sekansa özgü bir şekilde etkileşime girme kabiliyeti sayesinde geleneksel immünoanaliz sistemlerinde monoklonal antikora göre avantajlara sahiptir. MRSA saptama limiti 10 cfu/ml kadar düşük olması MRSA'yı etkili bir şekilde tespit etmek için yeterli bulunmuştur. Çalışmalar sonucunda hedeflenen genin PZR amplifikasyonu veya gen saflaştırma adımları olmadan 30 dakika içinde tespit edilebileceğini göstermişlerdir. Aynı zamanda tek kılavuzlu RNA (sgRNA) dizisini değiştirerek bu yöntemin MRSA dışındaki hedeflere de uygulanabileceğini ve dCas9 / sgRNA-SG I tabanlı algılama yaklaşımının kolay, hızlı, duyarlı ve düşük maliyetli olduğu kanıtlandığı için, bu çalışmada MRSA'nın yanı sıra çeşitli patojenleri tespit etmek için doğrudan uygulanabilirliği raporlanmıştır (110).

Nükleik asitlerin tespiti için geliştirilen tekniklerde CRISPR enzimlerinin ayırt edici enzimatik özelliklerinden yararlanılır (111). Bu tespitler için çeşitli gruplar tarafından farklı platformlar kuruldu. Feng Zhang ve ekibi, 2017 yılında çok düşük seviyelerde bile patojenlerin varlığını gösteren nükleik asitleri kolayca tespit edebilen bir yöntem geliştirmişlerdir (112).



Spesifik Yüksek Hassasiyetli Enzimatik Reporter *un-LOCKing* (SHERLOCK) ve DNA Endonükleaz Hedefli CRISPR Trans-Reporter (DETECTR), atomolar konsantrasyonlarında spesifik RNA / DNA'yı tespit etmek için kullanılabilen tanı araçlarıdır. HUDSON, vücut sıvılarındaki nükleotidlerin doğrudan tespiti için SHERLOCK ile eşleşir. Viral nükleik asidi doğrudan vücut sıvılarından SHERLOCK ile tespit etmek için, viral partikülleri parçalamak ve vücut sıvılarında bulunan yüksek RNaz seviyelerini ısı ve kimyasal indirgeme kullanarak inaktive etmek için bir yöntem olan HUDSON bulundu (113). SHERLOCK, izotermal bir nükleik asit amplifikasyonu olan rekombinaz polimeraz amplifikasyonu (RPA) kullanarak RNA'yı (veya ters transkriptazlı DNA'yı) amplifiye ederek çalışır. SHERLOCK, Cas9 endonükleaz kullanmak yerine, farklı bir protein olan Cas13a kullanır. İzotermal amplifikasyon, tek bir sıcaklık kullandığı için özel ölçüm aletleri gerektirmez. Amplifiye edilmiş nükleotidler, ilgilenilen nükleik asit sekansı ile eşleşen bir kılavuz RNA, bir floresan raportör ve bir söndürücüye bağlanan kısa bir nükleotid sekansı olan Cas13a nükleaz ile birleştirilir. Hedef sekans, amplifiye edilmiş nükleotidler havuzunda mevcutsa, Cas13a'nın spesifik olmayan RNaz aktivitesi aktive olur ve RNA raportörü yarılr ve floroforun aktivasyonu ile sonuçlanır. Bu nedenle, floresan sinyal, hedef dizinin orijinal nükleotid havuzunda olup olmadığını belirlemek için bir gösterge olarak kullanılır (114).

Çalışmalar, SHERLOCK'un 2000 kopya/mL (3.2aM) kadar düşük konsantrasyonları tespit edebildiği ve klinik örneklerde (serum veya idrar) Zika virüsü (ZIKV) ve dang virüsü (DENV) arasında ayırım yapabileceğini göstermiştir. Ayrıca bu yöntem ile birkaç patojenik bakteri suşu ve insan DNA'sı ayırt edilebildi ve serbest dolaşan tümör DNA'sındaki mutasyonlar saptanabildi (115). HUDSON ve SHERLOCK, ZIKV ve DENV'yi doğrudan idrar, tükürük, serum, plazma ve tam kandan 1-2 saatte analiz yapabilecek şekilde geliştirildi (113).

Gootenberg ve arkadaşları, SHERLOCK teknolojisini SHERLOCKv2'ye güncelledi. Yeni versiyonda 2 aM'ye kadar numunenin nicel ölçümü yapılabilmektedir. Bu yeni teknoloji ile bir test ile pnömoni patojenlerinin (viral ve bakteriyel) hızlı tespiti, kaynak sınırlı alanlarda tedavi gören HIV hastalarında viral yükün izlenmesi, hücresiz DNA'daki mutasyonları tespit etmek için sıvı biyopsi, Patojen direnç genlerinin hızlı tespiti için kullanımlar önerildi (114).

Tip V CRISPR proteini olan Cas12a (Cpf1)'in DNA'yı bakteriyel adaptif bağışıklık sistemlerinin bileşenleri olarak bağlayan ve kesen RNA güdümlü enzim olma özelliği tıpkı

CRISPR-Cas9'da olduğu gibi çift zincirli DNA kırıklarına neden olmasından dolayı genom düzenleme için kullanılmıştır. 2018'de Chen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre, RNA kılavuzlu DNA bağlanması, ssDNA moleküllerini tamamen parçalayan Cas12a'nın rasgele tek sarmallı DNA (ssDNA)'nın bölünme aktivitesini açığa çıkardığı gösterilmiştir. Cas12a tek zincirli DNA aktivasyonunu izotermal amplifikasyon ile birleştirilerek DNA tespiti için attomolar duyarlılığı sağlayan DNA endonükleaz hedefli CRISPR trans-raporör (DETECTR) olarak adlandırılan bir yöntem tanımlanmıştır (111).

Küresel bir pandemi olarak ortaya çıkan SARS-CoV-2 enfeksiyonu ile ilişkili hastalık olan COVID-19'un hızlı tanısı için araştırmacılar farklı teknikleri çalışmışlardır. Bu çalışmalardan Chiu ve ekibinin CRISPR tabanlı DETECTR testi, gerçek zamanlı RT-PCR testine göre daha hızlı bir alternatif sunduğu rapor edilmiştir. Çalışmada CRISPR-Cas12 tabanlı testin 40 dakikadan daha kısa sürede çalışması geliştirilmiştir. Çalışma kapsamında 36 COVID-19 enfeksiyonu olan hasta ve diğer viral solunum yolu enfeksiyonu olan 42 hasta dâhil olmak üzere ABD'deki hastalardan alınan referans örnekler analiz edildi ve tanımlar doğrulandı. CRISPR bazlı DETECTR analizi, Amerika Birleşik Devletleri'nin hastalığı kontrol etmek ve hastalığı önlemek için kullandığı SARS-CoV-2 gerçek zamanlı ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu analizine, %95 pozitif ön teşhis doğruluğu (uyumu) ve %100 negatif ön teşhis doğruluğu (uyumu) ile daha hızlı ve alternatif bir yaklaşım sunmaktadır (116).

Bulgular kısmında verdiğimiz sıra ile KML tanısında CRISPR/Cas9 yönteminin hızlı tanı amacı ile kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Bu kapsamda yaptığımız çalışmada %2 hassasiyete kadar füzyon gen varlığını saptayabildiğimizi gösterdik. Dünya'da yapılan ilk çalışma olma özelliğini taşıyan yöntemimizin geliştirilerek farklı gen füzyonlarından kaynaklanan hastalıkların hızlı ve ucuz tespitinin sağlanabileceğini düşünmekteyiz.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Yapılan tez çalışmasında hastaya ait hedeflenen BCR-ABL1 füzyon bölge tespiti için kullanılan GAGTTCAAAGCCCTTCAGCGG (CGG = PAM dizisi) gRNA'nın doğru bir şekilde çalıştığı gösterildi.
2. Cas9 nükleazın sadece DNA'daki nokta mutasyonlarının değil translokasyon gibi gen yeniden düzenlenmelerinin varlığını da tespit etme potansiyeli olduğu gösterildi.
3. Cas9 nükleazı ile kesim aşamasında sürenin 16 saate uzatılmasının daha iyi sonuç verdiği gösterildi.
4. Kronik miyeloid lösemi hastalarında, bu yöntemle BCR/ABL füzyon geni kalitatif analizinin yapılabileceği gösterildi.
5. DNA düzeyinde hedeflenen diziyi saptama kapasitesinin %2 hassasiyetle olduğu tespit edildi.
6. Sonraki çalışmalar için hassasiyetini arttıracak düzenlemeler yapılmalıdır. Bu durumda KML hastalarının tanısında kullanılma potansiyeli bulunabilir. Alternatif gRNA dizilerinin geliştirilmesi sonucunda ürünün kit formatına getirilebileceği düşünülmektedir.
7. Cas9 enziminin hedeflemesi değiştirilerek farklı gen füzyonlarının saptanmasını sağlayacak sistemlerin geliştirilmesi durumunda farklı hastalıkların tanısının çok kısa sürede yapılmasına katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

## KAYNAKLAR

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2019;69(1):7-34.
2. Rowley JD. A New Consistent Chromosomal Abnormality in Chronic Myelogenous Leukaemia identified by Quinacrine Fluorescence and Giemsa Staining. *Nature*. 1973;243(5405):290-3.
3. Collins SJ, Groudine MT. Rearrangement and amplification of c-abl sequences in the human chronic myelogenous leukemia cell line K-562. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1983;80(15):4813-7.
4. Tamai M, Inukai T, Kojika S, Abe M, Kagami K, Hama D, et al. T315I mutation of BCR-ABL1 into human Philadelphia chromosome-positive leukemia cell lines by homologous recombination using the CRISPR/Cas9 system. *Scientific reports*. 2018;8(1):9966.
5. Lekomtsev S, Aliyanni S, Lapao A, Bürckstümmer T. Efficient generation and reversion of chromosomal translocations using CRISPR/Cas technology. *BMC genomics*. 2016;17(1):739.
6. Radich JP, Deininger M, Abboud CN, Altman JK, Berman E, Bhatia R, et al. Chronic Myeloid Leukemia, Version 1.2019, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2018;16(9):1108-35.
7. Jensen TI, Axelgaard E, Bak RO. Therapeutic gene editing in haematological disorders with CRISPR/Cas9. *Br J Haematol*. 2019;185(5):821-35.
8. Jia C, Huai C, Ding J, Hu L, Su B, Chen H, et al. New applications of CRISPR/Cas9 system on mutant DNA detection. *Gene*. 2018;641:55-62.
9. Torres-Ruiz R, Rodriguez-Perales S. CRISPR-Cas9 technology: applications and human disease modelling. *Brief Funct Genomics*. 2017;16(1):4-12.
10. Brooks AK, Gaj T. Innovations in CRISPR technology. *Curr Opin Biotechnol*. 2018;52:95-101.
11. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/cancer>. [
12. Wang F, Lv H, Zhao B, Zhou L, Wang S, Luo J, et al. Iron and leukemia: new insights for future treatments. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2019;38(1):406.

13. Chung YJ, Robert C, Gough SM, Rassool FV, Aplan PD. Oxidative stress leads to increased mutation frequency in a murine model of myelodysplastic syndrome. *Leukemia research*. 2014;38(1):95-102.
14. Udensi UK, Tchounwou PB. Dual effect of oxidative stress on leukemia cancer induction and treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2014;33(1):106.
15. Kalu U, Tchounwou P. Dual effect of oxidative stress on leukemia cancer induction and treatment. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*. 2014;33:106.
16. Faderl S, Kantarjian HM, Talpaz M. Chronic myelogenous leukemia: update on biology and treatment. *Oncology (Williston Park, NY)*. 1999;13(2):169-80; discussion 81, 84.
17. Jagannathan-Bogdan M, Zon LI. Hematopoiesis. *Development*. 2013;140(12):2463-7.
18. Mondal JD, Tewary D, Sardar SMJIJSR. Chronic myeloid leukemia—an overview. 2014;3:128-32.
19. Mertens F, Johansson B, Fioretos T, Mitelman F. The emerging complexity of gene fusions in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2015;15(6):371-81.
20. Mitelman F, Johansson B, Mertens F. The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(4):233-45.
21. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM. The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 1999;341(3):164-72.
22. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2000;96(10):3343-56.
23. Kurzrock R, Kantarjian HM, Druker BJ, Talpaz M. Philadelphia chromosome-positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics. *Ann Intern Med*. 2003;138(10):819-30.
24. Nowell PC. Discovery of the Philadelphia chromosome: a personal perspective. *J Clin Invest*. 2007;117(8):2033-5.
25. Sholikah T. Fusion gene bcr-abl: From etiopathogenesis to the management of chronic myeloid leukemia. *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia*. 2017;8:29-37.
26. Cortez D, Reuther G, Pendergast AM. The Bcr-Abl tyrosine kinase activates mitogenic signaling pathways and stimulates G1-to-S phase transition in hematopoietic cells. *Oncogene*. 1997;15(19):2333-42.

27. Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, Branford S, Radich J, Kaeda J, et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood*. 2006;108(1):28-37.
28. Skorski T, Bellacosa A, Nieborowska-Skorska M, Majewski M, Martinez R, Choi JK, et al. Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3k/Akt-dependent pathway. *Embo j*. 1997;16(20):6151-61.
29. Bennour A, Saad A, Sennana H. Chronic myeloid leukemia: Relevance of cytogenetic and molecular assays. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016;97:263-74.
30. Cilloni D, Saglio G. Molecular pathways: BCR-ABL. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012;18(4):930-7.
31. Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, de Klein A, Bartram CR, Grosveld G. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell*. 1984;36(1):93-9.
32. Kurzrock R, Gutterman JU, Talpaz M. The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med*. 1988;319(15):990-8.
33. Li S, Ilaria RL, Jr., Million RP, Daley GQ, Van Etten RA. The P190, P210, and P230 forms of the BCR/ABL oncogene induce a similar chronic myeloid leukemia-like syndrome in mice but have different lymphoid leukemogenic activity. *J Exp Med*. 1999;189(9):1399-412.
34. Pane F, Frigeri F, Sindona M, Luciano L, Ferrara F, Cimino R, et al. Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with C3/A2 junction). *Blood*. 1996;88(7):2410-4.
35. Faderl S, Jeha S, Kantarjian HM. The biology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 2003;98(7):1337-54.
36. Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ, Witte ON. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science*. 1990;247(4946):1079-82.
37. Bennour A, Ouahchi I, Moez M, Elloumi M, Khelif A, Saad A, et al. Comprehensive analysis of BCR/ABL variants in chronic myeloid leukemia patients using multiplex RT-PCR. *Clin Lab*. 2012;58(5-6):433-9.
38. McLaughlin J, Chianese E, Witte ON. Alternative forms of the BCR-ABL oncogene have quantitatively different potencies for stimulation of immature lymphoid cells. *Mol Cell Biol*. 1989;9(5):1866-74.

39. Hu LH, Pu LF, Yang DD, Zhang C, Wang HP, Ding YY, et al. How to detect the rare BCR-ABL (e14a3) transcript: A case report and literature review. *Oncol Lett.* 2017;14(5):5619-23.
40. Elliott SL, Taylor KM, Taylor DL, Rodwell RL, Williams BF, Shuttlewood MM, et al. Cytogenetic response to alpha-interferon is predicted in early chronic phase chronic myeloid leukemia by M-bcr breakpoint location. *Leukemia.* 1995;9(6):946-50.
41. Kang Z-J, Liu Y-F, Xu L-Z, Long Z-J, Huang D, Yang Y, et al. The Philadelphia chromosome in leukemogenesis. *Chin J Cancer.* 2016;35:48-.
42. Kantarjian HM, Keating MJ, Talpaz M, Walters RS, Smith TL, Cork A, et al. Chronic myelogenous leukemia in blast crisis. Analysis of 242 patients. *Am J Med.* 1987;83(3):445-54.
43. Sacha T. Imatinib in chronic myeloid leukemia: an overview. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases.* 2014;6(1):e2014007.
44. Mauro MJ, Druker BJ. STI571: targeting BCR-ABL as therapy for CML. *The oncologist.* 2001;6(3):233-8.
45. Bauer S, Romvari E. Interpreting molecular monitoring results and international standardization in chronic myeloid leukemia. *J Adv Pract Oncol.* 2012;3(3):151-60.
46. Savage DG, Antman KH. Imatinib mesylate--a new oral targeted therapy. *The New England journal of medicine.* 2002;346(9):683-93.
47. Hughes TP, Saglio G, Quintás-Cardama A, Mauro MJ, Kim DW, Lipton JH, et al. BCR-ABL1 mutation development during first-line treatment with dasatinib or imatinib for chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Leukemia.* 2015;29(9):1832-8.
48. Roumiantsev S, Shah NP, Gorre ME, Nicoll J, Brasher BB, Sawyers CL, et al. Clinical resistance to the kinase inhibitor STI-571 in chronic myeloid leukemia by mutation of Tyr-253 in the Abl kinase domain P-loop. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2002;99(16):10700-5.
49. O'Hare T, Eide CA, Deininger MW. Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2007;110(7):2242-9.
50. Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Canaani E. Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature.* 1985;315(6020):550-4.
51. Laurent E, Talpaz M, Kantarjian H, Kurzrock R. The BCR gene and philadelphia chromosome-positive leukemogenesis. *Cancer Res.* 2001;61(6):2343-55.

52. Heisterkamp N, Stam K, Groffen J, de Klein A, Grosveld G. Structural organization of the bcr gene and its role in the Ph' translocation. *Nature*. 1985;315(6022):758-61.
53. <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/BCR#location>. [
54. Wang JY. The capable ABL: what is its biological function? *Mol Cell Biol*. 2014;34(7):1188-97.
55. <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/ABL1#location>.
56. Jiang C, Meng L, Yang B, Luo X. Application of CRISPR/Cas9 gene editing technique in the study of cancer treatment. *Clin Genet*. 2019.
57. Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, Lander ES. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science*. 2014;343(6166):80-4.
58. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (New York, NY)*. 2012;337(6096):816-21.
59. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of bacteriology*. 1987;169(12):5429-33.
60. Jansen R, Embden JD, Gastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular microbiology*. 2002;43(6):1565-75.
61. Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Almendros C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology (Reading, England)*. 2009;155(Pt 3):733-40.
62. Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*. 2013;339(6121):823-6.
63. Wright AV, Nunez JK, Doudna JA. Biology and Applications of CRISPR Systems: Harnessing Nature's Toolbox for Genome Engineering. *Cell*. 2016;164(1-2):29-44.
64. Swiech L, Heidenreich M, Banerjee A, Habib N, Li Y, Trombetta J, et al. In vivo interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol*. 2015;33(1):102-6.
65. Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 2014;346(6213):1258096.
66. Fujii W, Ito H, Kanke T, Ikeda A, Sugiura K, Naito K. Generation of genetically modified mice using SpCas9-NG engineered nuclease. *Scientific reports*. 2019;9(1):12878-.



67. Mojica FJ, Diez-Villasenor C, Garcia-Martinez J, Almendros C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*. 2009;155(Pt 3):733-40.
68. van der Oost J, Westra ER, Jackson RN, Wiedenheft B. Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*. 2014;12(7):479-92.
69. Mougiakos I, Bosma EF, de Vos WM, van Kranenburg R, van der Oost J. Next Generation Prokaryotic Engineering: The CRISPR-Cas Toolkit. *Trends Biotechnol*. 2016;34(7):575-87.
70. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature protocols*. 2013;8(11):2281-308.
71. Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*. 2005;151(Pt 8):2551-61.
72. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013;339(6121):819-23.
73. Wu X, Scott DA, Kriz AJ, Chiu AC, Hsu PD, Dadon DB, et al. Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells. *Nat Biotechnol*. 2014;32(7):670-6.
74. Shmakov S, Smargon A, Scott D, Cox D, Pyzocha N, Yan W, et al. Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. *Nature reviews Microbiology*. 2017;15(3):169-82.
75. Makarova KS, Wolf YI, Iranzo J, Shmakov SA, Alkhnbashi OS, Brouns SJJ, et al. Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nature Reviews Microbiology*. 2020;18(2):67-83.
76. Semenova E, Severinov K. Interdependencies Between the Adaptation and Interference Modules Guide Efficient CRISPR-Cas Immunity. 2017. p. 51-62.
77. Ishino Y, Krupovic M, Forterre P. History of CRISPR-Cas from Encounter with a Mysterious Repeated Sequence to Genome Editing Technology. *Journal of bacteriology*. 2018;200(7).
78. Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, Makarova KS, Essletzbichler P, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*. 2015;163(3):759-71.
79. Koonin EV, Makarova KS, Zhang F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Current opinion in microbiology*. 2017;37:67-78.

80. Mir A, Edraki A, Lee J, Sontheimer EJ. Type II-C CRISPR-Cas9 Biology, Mechanism, and Application. *ACS Chem Biol*. 2018;13(2):357-65.
81. Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, Dohmae N, et al. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*. 2014;156(5):935-49.
82. Mir A, Edraki A, Lee J, Sontheimer EJ. Type II-C CRISPR-Cas9 Biology, Mechanism, and Application. *ACS chemical biology*. 2018;13(2):357-65.
83. Cribbs A, Perera S. Science and Bioethics of CRISPR-Cas9 Gene Editing: An Analysis Towards Separating Facts and Fiction. *The Yale Journal of Biology and Medicine*. 2017;90:625-34.
84. Westra ER, Semenova E, Datsenko KA, Jackson RN, Wiedenheft B, Severinov K, et al. Type I-E CRISPR-cas systems discriminate target from non-target DNA through base pairing-independent PAM recognition. *PLoS Genet*. 2013;9(9):e1003742.
85. Mao Z, Bozzella M, Seluanov A, Gorbunova V. DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells. *Cell Cycle*. 2008;7(18):2902-6.
86. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*. 1990;262(4):56-61, 4-5.
87. Valones MAA, Guimarães RL, Brandão LAC, de Souza PRE, de Albuquerque Tavares Carvalho A, Crovela S. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. *Braz J Microbiol*. 2009;40(1):1-11.
88. Garibyan L, Avashia N. Polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol*. 2013;133(3):1-4.
89. Ramesh R, Munshi A, Panda SK. Polymerase chain reaction. *The National medical journal of India*. 1992;5(3):115-9.
90. Petruska J, Goodman MF, Boosalis MS, Sowers LC, Cheong C, Tinoco I, Jr. Comparison between DNA melting thermodynamics and DNA polymerase fidelity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988;85(17):6252-6.
91. Varshney GK, Carrington B, Pei W, Bishop K, Chen Z, Fan C, et al. A high-throughput functional genomics workflow based on CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in zebrafish. *Nature protocols*. 2016;11(12):2357-75.
92. Aranda PS, LaJoie DM, Jorcyk CL. Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis*. 2012;33(2):366-9.

93. Nowell PC. The minute chromosome (Phl) in chronic granulocytic leukemia. *Blut*. 1962;8:65-6.
94. Wan TSK. Cancer cytogenetics: methodology revisited. *Ann Lab Med*. 2014;34(6):413-25.
95. Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*. 1973;243(5405):290-3.
96. Klein Ad, Kessel AGv, Grosveld G, Bartram CR, Hagemeijer A, Bootsma D, et al. A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature*. 1982;300(5894):765-7.
97. al. MWDe. NCCN Guidelines V3.2020 Chronic Myeloid Leukemia. 2020.
98. Bishop R. Applications of fluorescence in situ hybridization (FISH) in detecting genetic aberrations of medical significance. *Bioscience Horizons*. 2010;3:85-95.
99. Ratan ZA, Zaman SB, Mehta V, Haidere MF, Runa NJ, Akter N. Application of Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) Technique for the Detection of Genetic Aberration in Medical Science. *Cureus*. 2017;9(6):e1325-e.
100. Amann R, Fuchs BM. Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. *Nature reviews Microbiology*. 2008;6(5):339-48.
101. Sujobert P, Cucuini W, Vignon-Pennamen D, Martin-Garcia N, Albertini AF, Uzunov M, et al. Evidence of differentiation in myeloid malignancies associated neutrophilic dermatosis: a fluorescent in situ hybridization study of 14 patients. *J Invest Dermatol*. 2013;133(4):1111-4.
102. Wan T, Ma E. Molecular cytogenetics: An indispensable tool for cancer diagnosis. *Chang Gung medical journal*. 2012;35:96-110.
103. Lee DY, Cho HI, Kang YH, Yun SS, Park SY, Lee YS, et al. The role of fluorescence in situ hybridization (FISH) for monitoring hematologic malignancies with BCR/ABL or ETO/AML1 rearrangement: a comparative study with FISH and G-banding on 919 consecutive specimens of hematologic malignancies. *Cancer genetics and cytogenetics*. 2004;152(1):1-7.
104. Wertheim GB, Hexner E, Bagg A. Molecular-based classification of acute myeloid leukemia and its role in directing rational therapy: personalized medicine for profoundly promiscuous proliferations. *Molecular diagnosis & therapy*. 2012;16(6):357-69.

105. Kuang J, Yan X, Genders AJ, Granata C, Bishop DJ. An overview of technical considerations when using quantitative real-time PCR analysis of gene expression in human exercise research. *PLoS One*. 2018;13(5):e0196438-e.
106. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert review of molecular diagnostics*. 2005;5(2):209-19.
107. Koçak Tufan Z, Kayaaslan B. Crushing the curve, the role of national and international institutions and policy makers in COVID-19 pandemic. *Turk J Med Sci*. 2020;50(SI-1):495-508.
108. Zhou L, Peng R, Zhang R, Li J. The applications of CRISPR/Cas system in molecular detection. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2018;22(12):5807-15.
109. Pardee K, Green AA, Takahashi MK, Braff D, Lambert G, Lee JW, et al. Rapid, Low-Cost Detection of Zika Virus Using Programmable Biomolecular Components. *Cell*. 2016;165(5):1255-66.
110. Guk K, Keem JO, Hwang SG, Kim H, Kang T, Lim EK, et al. A facile, rapid and sensitive detection of MRSA using a CRISPR-mediated DNA FISH method, antibody-like dCas9/sgRNA complex. *Biosensors & bioelectronics*. 2017;95:67-71.
111. Chen JS, Ma E, Harrington LB, Da Costa M, Tian X, Palefsky JM, et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. 2018;360(6387):436-9.
112. Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, Essletzbichler P, Dy AJ, Joung J, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. 2017;356(6336):438-42.
113. Myhrvold C, Freije CA, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Metsky HC, Durbin AF, et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13. *Science (New York, NY)*. 2018;360(6387):444-8.
114. Gronowski AM. Who or What is SHERLOCK? *Ejifcc*. 2018;29(3):201-4.
115. Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, Essletzbichler P, Dy AJ, Joung J, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science (New York, NY)*. 2017;356(6336):438-42.
116. Broughton JP, Deng X, Yu G, Fasching CL, Servellita V, Singh J, et al. CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nature Biotechnology*. 2020;38(7):870-4.