

**OZET****RNA-YONLENDİRMELİ HEDEF DNA MODİFİKASYONU  
İÇİN VE RNA-YONLENDİRMELİ TRANSKRİPSİYON  
MODİFİKASYONU İÇİN YONTEMLER VE BİLEŞİMLER**

5 Bu buluş, bir hedefleme sekansı içeren ve bir modifiye edici polipeptid ile birlikte, bir hedef DNA'da ve/veya o hedef DNA ile ilişkili bir polipeptidde yer-spesifik modifikasyon yapılmasına olanak  
10 sağlayan bir DNA-hedefleyen RNA ortaya koyar. Bu buluş, yer-spesifik modifiye edici polipeptidler de ortaya koyar. Bu buluş, bir hedef DNA'da ve/veya o hedef DNA ile ilişkili bir polipeptidde yer-spesifik modifikasyon yapmaya yarayan yöntemler de ortaya koyar. Bu buluş, bir hedef hücrede yer alan bir hedef nükleik asidin  
15 transkripsiyonunu modüle etmeyi sağlayan ve genel itibarıyla hedef nükleik asidin bir enzimatik olarak inaktif Cas9 polipeptidi ve bir DNA-hedefleyen RNA ile temas ettirilmesine dayanan yöntemler ortaya koyar. Bu yöntemleri gerçekleştirmek için kullanılacak kitler ve bileşimler de bu buluş kapsamında sunulmaktadır. Bu buluş,  
20 insan olmayan Cas9 transgenik çok hücreli organizmalar ve ayrıca, Cas9 üreten genetiği değiştirilmiş hücreler ortaya koyar.

## İSTEMLER

### 1. Aşağıdakileri içeren bir bileşimdir:

- 5 (a) bir kimerik Cas9 proteini ya da adı geçen kimerik Cas9 proteini kodlayan bir polinükleotit olup, burada kimerik Cas9 proteini, mütakabil doğal tip Cas9'a kıyasla azaltılmış nükleaz aktivitesine sahip olan bir modifiye edilmiş Cas9 proteinini içerir ve aşağıdaki işlevlere sahip bir heterolog polipeptit içerir:
- 10 (i) DNA modifiye etme aktivitesine sahip olma, ya da  
(ii) transkripsiyonu artırma ya da azaltma kabiliyeti sergileme, ya da  
(iii) DNA ile ilişkili bir polipeptidi modifiye eden enzimatik aktiviteye sahip olma;
- 15 ve
- (b) bir DNA hedefleyici RNA ya da adı geçen DNA hedefleyici RNA'yı kodlayan bir ya da daha fazla DNA polinükleotidi, burada adı geçen DNA hedefleyici RNA aşağıdakileri içerir:
- 20 (i) bir hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı olan bir nükleotit sekansını içeren bir DNA hedefleyici segment, ve  
(ii) adı geçen kimerik Cas9 proteini ile etkileşen bir protein bağlayıcı segment olup, burada protein bağlayıcı segment, çift dizili bir RNA (dsRNA) dupleksini meydana getirmek için hibritlenen iki tamamlayıcı nükleotit serisini içerir.

25

2. Bir hedef DNA'yı modifiye etmek için yöntem olup, burada yöntem hedef DNA'nın aşağıdakileri içeren bir kompleks ile temas ettirilmesini içerir:

(a) mütakabil doğal tip Cas9'a kıyasla azaltılmış nükleaz aktivitesine sahip olan bir modifiye edilmiş Cas9 proteini ve DNA modifiye edici aktiviteye sahip olan bir heterolog polipeptidi içeren bir kimerik Cas9 proteini; ve

5 (b) aşağıdakileri içeren bir DNA hedefleyen RNA:

(i) hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı olan bir nükleotit sekansını içeren bir DNA hedefleyici segment, ve

(ii) adı geçen kimerik Cas9 proteini ile etkileşen bir protein bağlayıcı segment, burada protein bağlayıcı segment, çift dizili bir RNA

10 (dsRNA) dupleksini meydana getirmek için hibritlenen iki tamamlayıcı nükleotit serisini içerir,

burada adı geçen temas in vitro'dur ya da bir hücre içinde ex vivo'dur.

15 **3.** Bir hedef DNA içinde yere özgü transkripsiyonu modüle etmek için bir yöntem olup, burada yöntem hedef DNA'nın aşağıdakileri içeren bir kompleks ile temas ettirilmesini içerir:

20 (a) mütakabil doğal tip Cas9'a kıyasla azaltılmış nükleaz aktivitesine sahip olan bir modifiye edilmiş Cas9 proteini ve DNA modifiye edici aktiviteye sahip olan bir heterolog polipeptidi içeren bir kimerik Cas9 proteini; ve

(b) aşağıdakileri içeren bir DNA hedefleyen RNA:

25 (i) hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı olan bir nükleotit sekansını içeren bir DNA hedefleyici segment, ve

(ii) adı geçen kimerik Cas9 proteini ile etkileşen bir protein bağlayıcı segment, burada protein bağlayıcı segment, çift dizili bir

RNA (dsRNA) dupleksini meydana getirmek için hibritlenen iki tamamlayıcı nükleotit serisini içerir,

burada adı geçen temas in vitro'dur ya da bir hücre içinde ex vivo'dur.

5

4. Bir hedef DNA ile ilişkili bir polipeptidi modifiye etmek için bir yöntem olup, yöntem hedef DNA'nın aşağıdakileri içeren bir kompleks ile temas ettirilmesini içerir:

10 (a) mütakabil doğal tip Cas9'a kıyasla azaltılmış nükleaz aktivitesine sahip olan bir modifiye edilmiş Cas9 proteini ve DNA modifiye edici aktiviteye sahip olan bir heterolog polipeptidi içeren bir kimerik Cas9 proteini; ve

(b) aşağıdakileri içeren bir DNA hedefleyen RNA:

15

(i) hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı olan bir nükleotit sekansını içeren bir DNA hedefleyici segment, ve

(ii) adı geçen kimerik Cas9 proteini ile etkileşen bir protein bağlayıcı segment, burada protein bağlayıcı segment, çift dizili

20 bir RNA (dsRNA) dupleksini meydana getirmek için hibritlenen iki tamamlayıcı nükleotit serisini içerir,

burada adı geçen temas in vitro'dur ya da bir hücre içinde ex vivo'dur.

25 5. Bir kit olup aşağıdakileri içerir:

(a) bir kimerik Cas9 proteini ya da adı geçen kimerik Cas9 proteini kodlayan bir polinükleotit olup, burada kimerik Cas9 proteini,

mütekabil doğal tip Cas9'a kıyasla azaltılmış nükleaz aktivitesine sahip olan bir modifiye edilmiş Cas9 proteinini içerir ve aşağıdaki işlevlere sahip bir heterolog polipeptit içerir:

- 5
- (i) DNA modifiye etme aktivitesine sahip olma, ya da
  - (ii) transkripsiyonu arttırma ya da azaltma kabiliyeti sergileme, ya da
  - (iii) DNA ile ilişkili bir polipeptidi modifiye eden enzimatik aktiviteye sahip olma;

ve

- 10 (b) bir DNA hedefleyici RNA ya da adı geçen DNA hedefleyici RNA'yı kodlayan bir ya da daha fazla DNA polinükleotidi, burada adı geçen DNA hedefleyici RNA aşağıdakileri içerir:

- 15
- (i) bir hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı olan bir nükleotit sekansını içeren bir DNA hedefleyici segment, ve
  - (ii) adı geçen kimerik Cas9 proteini ile etkileşen bir protein bağlayıcı segment olup, burada protein bağlayıcı segment, çift dizili bir RNA (dsRNA) dupleksini meydana getirmek için hibritlenen iki tamamlayıcı nükleotit serisini içerir

20

burada (a) ve (b) aynı ya da ayrı konteynerlerdir.

- 25
6. İstem 1'e göre bileşim ya da 2 ila 4 arasındaki istemlerden herhangi birine göre yöntem ya da istem 5'e göre kit olup, burada adı geçen dsRNA dupleks, 8 baz çift (bp) ila 30 bp arasındaki bir uzunluğuna sahiptir.

7. İstem 6'ya göre bileşim, yöntem ya da kit olup, burada adı geçen dsRNA dupleksini 8 ila 10 bp arasında bir uzunluğa sahiptir.

8. 1, 6 ya da 7 arasındaki istemlerden herhangi birine göre bileşim, 2  
5 ila 4 ya da 6 ila 7 arasındaki istemlerden herhangi birine göre yöntem, ya da 5 ila 7 arasındaki istemlerden herhangi birine göre kit olup,

10 burada protein bağlayıcı segmentin dsRNA dupleksini meydana getirmek için hibritlenen nükleotitler arasındaki yüzde tamamlayıcılığı %70'ten fazladır.

9. 1, 6 ya da 8 arasındaki istemlerden herhangi birine göre bileşim, 2  
15 ila 4 ya da 6 ila 8 arasındaki istemlerden herhangi birine göre yöntem, ya da 5 ila 8 arasındaki istemlerden herhangi birine göre kit olup,

20 burada DNA hedefleyici RNA, iki moleküllü bir DNA hedefleyen RNA'dır ve iki ayrı RNA molekülünü içerir, ki bunların her biri dsRNA dupleksini meydana getirmek için hibritlenen nükleotitlerin iki tamamlayıcı serisinden birini içerir.

10. 1, 6 ya da 8 arasındaki istemlerden herhangi birine göre bileşim, 2  
25 ila 4 ya da 6 ila 8 arasındaki istemlerden herhangi birine göre yöntem, ya da 5 ila 8 arasındaki istemlerden herhangi birine göre kit olup,

burada DNA hedefleyen RNA, tek moleküllü bir DNA hedefleyen RNA'dır ve burada protein bağlayıcı segmentte, nükleotitlerin iki

tamamlayıcı serisi, müdahale eden nükleotitler tarafından kovalent olarak bağlanmıştır.

11. 2 ila 4 ya da 6 ila 10 arasındaki istemlerden herhangi birine göre  
5 yöntem olup, burada temas ettirme işlemi, bir hücreye (a) adı geçen  
kimerik Cas9 polipeptidinin ya da adı geçen kimerik Cas9  
polipeptidini kodlayan bir polinükleotidin, ve (b) adı geçen DNA  
hedefleyici RNA'nın ya da adı geçen DNA hedefleyici RNA'yı  
10 kodlayan bir ya da daha fazla DNA polinükleotidinin sokulmasını  
içerir.

12. 1 ya da 6 ila 10 arasındaki istemlerden herhangi birine göre bileşim  
ya da istem 11'e göre yöntem ya da 5 ila 10 arasındaki istemlerden  
herhangi birine göre kit olup, burada

15

(a) adı geçen DNA hedefleyen RNA'yı kodlayan bir ya da daha  
fazla DNA polinükleotidi, bir ya da daha fazla rekombinant  
ekspresyon vektörüdür; ve/veya

(b) adı geçen kimerik Cas9 polipeptidini kodlayan bir ya da daha  
20 fazla polinükleotid, bir ya da daha fazla rekombinant  
ekspresyon vektörüdür.

13. İstem 12'ye göre bileşim, yöntem ya da kit olup, burada bir ya da  
daha fazla rekombinant ekspresyon vektörü, bir ya da daha fazla  
25 viral vektördür.

14. İstem 1'e ya da 6 ila 10 ya da 12 ila 13 arasındaki istemlerden  
herhangi birine göre bileşim ya da 2 ila 4, ya da 6 ila 13 arasındaki

istemlerden herhangi birine göre yöntem ya da 5 ila 10 ya da 12 ila 13 arasındaki istemlerden herhangi birine göre kit olup, burada DNA hedefleyen RNA, bir modifiye edilmiş nükleobaz, bir modifiye edilmiş bel kemiği ya da doğal olmayan internükleosit bağlantısı, bir modifiye edilmiş şeker kısmı, bir Kilitli Nükleik Asit ya da bir Peptit Nükleik Asidi arasından birini ya da daha fazlasını içerir.

15. İstem 1'e ya da 6 ila 10 ya da 12 ila 14 arasındaki istemlerden herhangi birine göre bileşim ya da 2 ila 4 ya da 6 ila 14 arasındaki istemlerden herhangi birine göre yöntem ya da 5 ila 10 ya da 12 ila 14 arasındaki istemlerden herhangi birine göre kit olup, burada hedef DNA, bir bakteri hücresi, bir arkaeal hücre, tek hücreli bir ökaryotik organizma, bir bitki hücresi, bir omurgasız hayvandan alınan hücre ya da bir omurgalı hayvandan alınan hücre içinde mevcuttur.

16. İstem 1'e ya da 6 ila 10 ya da 12 ila 15 arasındaki istemlerden herhangi birine göre bileşim ya da 2 ila 4 ya da 6 ila 15 arasındaki istemlerden herhangi birine göre yöntem ya da 5 ila 10 ya da 12 ila 15 arasındaki istemlerden herhangi birine göre kit olup, burada hedef DNA, koromozomal DNA'dır.

17. İstem 1'e ya da 6 ila 10 ya da 12 ila 16 arasındaki istemlerden herhangi birine göre bileşim ya da 2 ya da 6 ila 16 arasındaki istemlerden herhangi birine göre yöntem ya da 5 ila 10 ya da 12 ila 16 arasındaki istemlerden herhangi birine göre kit olup, burada heterolog polipeptit aşağıdakiler arasından seçilen bir DNA



modifiye etme aktivitesine sahiptir: metiltransferaz aktivitesi, demetilaz aktivitesi, DNA onarımı aktivitesi, DNA hasarı aktivitesi, deaminasyon aktivitesi, dismutaz aktivitesi, alkilasyon aktivitesi, depürinasyon aktivitesi, oksidasyon aktivitesi, pirimidin dimeri  
5 oluşturma aktivitesi, integras aktivitesi, transpozaz aktivitesi, rekombinaz aktivitesi, polimeraz aktivitesi, ligaz aktivitesi, helikaz aktivitesi, fotolizaz aktivitesi ya da glikozilaz aktivitesi.

**18.** İstem 1'e ya da 6 ila 10 ya da 12 ila 16 arasındaki istemlerden  
10 herhangi birine göre bileşim ya da 3 ya da 6 ila 16 arasındaki istemlerden herhangi birine göre yöntem ya da 5 ila 10 ya da 12 ila 16 arasındaki istemlerden herhangi birine göre kit olup, burada heterolog polipeptit transkripsiyonu artırma ya da azaltma kabiliyeti sergiler ve burada heterolog polipeptit bir  
15 transkripsiyonel aktivatördür ya da transkripsiyon represör polipeptididir.

**19.** İstem 1'e ya da 6 ila 10 ya da 12 ila 16 arasındaki istemlerden  
20 herhangi birine göre bileşim ya da 4 ya da 6 ila 16 arasındaki istemlerden herhangi birine göre yöntem ya da 5 ila 10 ya da 12 ila 16 arasındaki istemlerden herhangi birine göre kit olup, burada heterolog polipeptit DNA ile ilişkili bir polipeptidi modifiye eden enzimatik aktiviteye sahiptir ki bu aktivite histon modifiye edici aktivitedir.

25

**20.** İstem 1'e ya da 6 ila 10 ya da 12 ila 16 ya da 19 arasındaki istemlerden herhangi birine göre bileşim ya da 4 ya da 6 ila 16 ya da 19 arasındaki istemlerden herhangi birine göre yöntem ya da 5

ila 10 ya da 12 ila 16 ya da 19 arasındaki istemlerden herhangi birine göre kit olup, burada heterolog polipeptit DNA ile ilişkili bir polipeptidi modifiye eden enzimatik aktiviteye sahiptir ki burada aktivite aşağıdakiler arasından seçilir: metiltransferaz aktivitesi, demetilaz aktivitesi, asetiltransferaz aktivitesi, deasetilaz aktivitesi, kinaz aktivitesi, fosfataz aktivitesi, ubiquitin ligaz aktivitesi, deubikitinasyon aktivitesi, adenilasyon aktivitesi, deadenilasyon aktivitesi, SUMOilasyon aktivitesi, deSUMOilasyon aktivitesi, ribozilasyon aktivitesi, deribozilasyon aktivitesi, miristoilasyon aktivitesi, demiristoilasyon aktivitesi, glikosilasyon aktivitesi (örneğin O-GlcNAc transferaz) ya da deglikosilasyon aktivitesi.

**21.** İstem 1'e ya da 6 ila 10 ya da 12 ila 20 arasındaki istemlerden herhangi birine göre bileşim ya da 5 ila 10 ya da 12 ila 20 arasındaki istemlerden herhangi birine göre kit olup, burada bir hastanın terapötik tedavisi için bir yöntemde kullanım amaçlıdır.

**TARİFNAME****RNA-YONLENDİRMELİ HEDEF DNA MODİFİKASYONU**  
**5 İÇİN VE RNA-YONLENDİRMELİ TRANSKRİPSİYON**  
**MODİFİKASYONU İÇİN YONTEMLER VE BİLEŞİMLER****ARKA PLAN**

- 10 Bakterilerin yaklaşık %60'ı ve arkelerin yaklaşık %90'ında, yabancı DNA elemanlarına karşı direnç kazandıran CRISPR (düzenli aralıklarla kümelenmiş kısa palindromik tekrarlar) / CRISPR ile ilişkili (Cas) sistem sistemleri bulunur. Streptococcus pyogenes menşeli tip II CRISPR sisteminde, hem Cas9 proteinini hem de
- 15 yabancı DNA'ların RNA yönlendirmesiyle susturulması için gerekli ve yeterli olan iki RNA'yı, yani bir matür CRISPR RNA'sı (crRNA) ile bir kısmen tamamlayıcı trans-etkili RNA'yı (tracrRNA) kodlayan yalnızca tek bir gen bulunur. Deltcheva (Nature 471, 2011), CRISPR RNA'sının trans-kodlanan küçük RNA ve konakçı faktörü RNaz III ile
- 20 matürasyonunu ele alan bir makale kaleme almıştır.

- Geçtiğimiz yıllarda, spesifik DNA sekanslarını hedef alacak şekilde tasarlanan nükleaz enzimleri, hücreleri ve tam organizmaları genlerin spesifik olarak hedef alınarak silinmesine, değiştirilmesine ve
- 25 onarılmasına olanak sağlayacak bir genetik manipülasyona tâbi tutmak ve ayrıca eksojen sekansları (transgenler) genoma sokmak amacıyla kullanılacak kuvvetli araçlar olarak sektörde kayda değer

ölçüde dikkat çekmişlerdir. Yer-spesifik DNA nükleazlar tasarlamak için, her ikisi de bir sekans-spesifik olmayan DNA endonükleaz domaininin bir tasarlanmış DNA bağlanma domainine füzyonlanmış olduğu kimerik endonükleaz enzimlerinin yapımına dayanan iki majör teknoloji su yüzüne çıkmıştır. Ancak her bir yeni genomik lokusun hedef alınabilmesi için yeni bir nükleaz enzimi tasarlamann gerekli olması, bu yaklaşımların her ikisini de fazla zaman alan ve maliyetli yaklaşımlar haline getirir. Ayrıca bu teknolojilerin her ikisi de, önceden kestirilemeyecek hedef dışı etkilere yol açabilecek sınırlı bir kesinliğe sahip olmaktan mustarıptir. WO 2011/072246 sayılı patent yayınında, transkripsiyon aktivatörü benzeri efektör nükleazlar ile gen hedeflemesi anlatılmakta ve açıklanmaktadır.

Hücrelerin genetik tekrar programlaması ve genomlar sistematik şekilde sorgulanırken, eksprese edilmek veya baskılanmak üzere gen setleri hedef alınır. Rastgele seçilmiş genlerin düzenlemek üzere hedef alınmasını sağlamak için günümüzde en sık başvurulanan yaklaşım RNA enterferansıdır (RNAi). Ancak bu yaklaşımın çeşitli kısıtları vardır. Örneğin RNAi, istatistiksel açıdan anlamlı hedef dışı etkilere ve toksisiteye neden olabilir.

Sektörde, nükleaz aktivitesinin (veya başka protein aktivitelerinin) bir hedef DNA bünyesindeki birbirinden ayrı farklı konumları hedef almasını sağlayacak ve her yeni hedef sekans için yeni bir protein tasarlanmasını gerektirmeyecek bir teknolojiye ihtiyaç vardır. Bunun yanı sıra, gen ekspresyonunu asgari düzeyde hedef dışı etki eşliğinde kontrol altında tutmayı sağlayan yöntemlere de sektörde ihtiyaç duyulmaktadır.

**OZET**

Hücrelerin genetik modifikasyonuna yapılan hiçbir atıf, insanlara yönelik germ hattı modifikasyonlarını içine alan bir anlam taşımamaktadır. Bu buluşa konu olan bileşimlerde insan germ hücreleri, insan embriyoları veya insan embriyonik germ hücreleri bulunmaz. Bu buluşa konu olan yöntemlerde insan embriyoları veya insan embriyonik germ hücreleri kullanılmaz.

10 Mevcut buluş aşağıdakileri içeren bir bileşim sağlar:

(a) bir kimerik Cas9 proteini ya da adı geçen kimerik Cas9 proteinini kodlayan bir polinükleotit, burada kimerik Cas9 proteini, karşılık gelen doğal tip Cas9'a kıyasla indirgenmiş nükleaz aktivitesine sahip olan bir modifiye edilmiş Cas9 proteinini ihtiva eder ve şu özelliklere sahip bir heterolog polipeptidi ihtiva eder: (i) DNA modifiye edici aktivite, ya da (ii) transkripsiyonu artırma ya da azaltma kabiliyeti sergilenmesi, ya da (iii) DNA ile ilişkili bir polipeptidi modifiye eden enzimatik aktiviteye sahip olma; ve

(b) bir DNA'yı hedefleyen RNA ya da adı geçen DNA'yı hedefleyen RNA'yı kodlayan bir ya da daha fazla DNA polinükleotiti, burada DNA'yı hedefleyen RNA aşağıdakileri içerir: (i) bir DNA hedefleyen segment, bir hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı olan bir nükleotit sekansını içeren bir DNA hedefleyen segmenttir, ve (ii) adı geçen kimerik Cas9 proteini ile etkileşen bir protein-bağlayıcı segment, burada protein-bağlayıcı segment çift dizili bir RNA (dsRNA) dupleksini

meydana getirmek için hibritlenen iki adet tamamlayıcı nükleotit serisini ihtiva eder.

[0007] Mevcut buluş, bir hedef DNA'yı modifiye etmek için bir yöntem sağlar, burada yöntem hedef DNA'nın aşağıdakileri içeren bir kompleks ile temas ettirilmesini içerir:

- (a) karşılık gelen doğal tip Cas9'a kıyasla azaltılmış nükleaz aktivitesine sahip olan bir modifiye edilmiş Cas9 proteinini ihtiva eden ve DNA modifiye edici aktiviteye sahip olan bir heterolog polipeptidi ihtiva eden bir kimerik Cas9 proteini; ve
- (b) DNA'yı hedefleyen RNA aşağıdakileri içerir: (i) hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı olan bir nükleotit sekansını içeren bir DNA-hedefleyici segment, ve (ii) adı geçen kimerik Cas9 proteini ile etkileşen bir protein bağlayıcı segment, burada protein bağlayıcı segment, çift dizili bir RNA (dsRNA) dupleksini meydana getirmek için hibritlenen nükleotitlerin iki tamamlayıcı serisini ihtiva eder.

Mevcut buluş aynı zamanda bir hedef DNA içindeki siteye özgü transkripsiyonu modüle etmek için bir yöntem sağlar, burada yöntem hedef DNA'nın aşağıdakileri içeren bir kompleks ile temas ettirilmesini içerir:

- (a) karşılık gelen doğal tip Cas9'a kıyasla azaltılmış nükleaz aktivitesine sahip olan bir modifiye edilmiş Cas9 proteinini içeren ve transkripsiyonu artırma ya da azaltma kabiliyeti

sergileyen bir heterolog polipeptiti içeren bir kimerik Cas9 proteini; ve

- 5 (b)DNA'yı hedefleyen RNA aşağıdakileri içerir: (i) hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı olan bir nükleotit sekansını içeren bir DNA-hedefleyici segment, ve (ii) adı geçen kimerik Cas9 proteini ile etkileşen bir protein bağlayıcı segment, burada protein bağlayıcı segment, çift dizili bir RNA (dsRNA) dupleksini meydana getirmek için hibritlenen nükleotitlerin iki tamamlayıcı serisini ihtiva eder, burada adı geçen temas in vitro'dur ya da bir hücre içinde ex vivo'dur.
- 10

Mevcut buluş aynı zamanda, bir hedef DNA ile ilişkili bir polipeptitin modifiye edilmesi için bir yöntem sağlar, burada yöntem hedef DNA'nın aşağıdakileri içeren bir kompleks ile temas ettirilmesini içerir:

15

- (a)karşılık gelen doğal tip Cas9'a kıyasla azaltılmış nükleaz aktivitesine sahip olan bir modifiye edilmiş Cas9 proteinini içeren ve DNA ile ilişkili bir polipeptiti modifiye eden enzimatik aktiviteye sahip olan bir heterolog polipeptiti içeren bir kimerik Cas9 proteini; ve
- 20

(b) DNA'yı hedefleyen RNA aşağıdakileri içerir: (i) hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı olan bir nükleotit sekansını içeren bir DNA-hedefleyici segment, ve (ii) adı geçen kimerik Cas9 proteini ile etkileşen bir protein bağlayıcı segment, burada protein bağlayıcı segment, çift dizili bir RNA (dsRNA) dupleksini meydana getirmek için hibritlenen nükleotitlerin iki tamamlayıcı serisini ihtiva eder, burada adı geçen temas in vitro'dur ya da bir hücre içinde ex vivo'dur.

10 Mevcut buluş, aşağıdakileri içeren bir kiti sağlar:

(a) bir kimerik Cas9 proteini ya da adı geçen kimerik Cas9 proteinini kodlayan bir polinükleotit, burada adı geçen kimerik Cas9 proteini, karşılık gelen doğal tip Cas9'a kıyasla azaltılmış nükleaz aktivitesine sahip olan bir modifiye edilmiş Cas9 proteinini içerir ve aşağıdakilere sahip olan bir heterolog polipeptiti içerir:

20 (i) DNA modifiye edici aktivite, ya da (ii) transkripsiyonu artırma ya da azaltma kabiliyetinin sergilenmesi, ya da (iii) DNA ile ilişkili bir polipeptiti modifiye eden enzimatik aktiviteye sahip olunması; ve

25 (b) bir DNA hedefleyici RNA ya da adı geçen DNA hedefleyici RNA'yı kodlayan bir ya da daha fazla DNA polinükleotiti, burada adı geçen DNA-hedefleyici RNA şunları içerir: (i) bir hedef DNA'daki bir hedef sekansı tamamlayıcı olan bir nükleotit sekansını ihtiva eden bir DNA hedefleyici segment, ve



(ii) kimerik Cas9 proteini ile etkileşen bir protein bağlayıcı segment, burada protein bağlayıcı segment, bir çift dizili RNA (dsRNA) dupleksini meydana getirmek için hibritlenen nükleotitlerin iki tamamlayıcı serisini ihtiva eder, burada (a) ve  
5 (b), aynı ya da ayrı kaplar içindedir.

Bu buluş, bir hedefleme sekansı içeren ve bir modifiye edici polipeptid ile birlikte, bir hedef DNA'da ve/veya o hedef DNA ile ilişkili bir polipeptidde yer-spesifik modifikasyon yapılmasına olanak  
10 sağlayan bir DNA-hedefleyen RNA ortaya koyar. Bu buluş, yer-spesifik modifiye edici polipeptidler de ortaya koyar. Bu buluş, bir hedef DNA'da ve/veya o hedef DNA ile ilişkili bir polipeptidde yer-spesifik modifikasyon yapmaya yarayan yöntemler de ortaya koyar. Bu buluş, bir hedef hücrede yer alan bir hedef nükleik asidin  
15 transkripsiyonunu modüle etmeyi sağlayan ve genel itibarıyla hedef nükleik asidin bir enzimatik olarak inaktif Cas9 polipeptidi ve bir DNA-hedefleyen RNA ile temas ettirilmesine dayanan yöntemler ortaya koyar. Bu yöntemleri gerçekleştirmek için kullanılacak kitler ve bileşimler de bu buluş kapsamında sunulmaktadır. Bu buluş,  
20 insan olmayan Cas9 transgenik çokhücreli organizmalar ve ayrıca, Cas9 üreten genetiği değiştirilmiş hücreler ortaya koyar.

Buluşun özelliklerinden biri, aşağıda belirtilen unsurları barındıran bir DNA-hedefleyen RNA'dır: (i) bir hedef DNA'daki bir sekansı  
25 tamamlayıcı nitelikte bir nükleotid sekansı içeren bir birinci segment ve (ii) bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid ile etkileşime giren bir ikinci segment. Bazı durumlarda, bahsi geçen birinci segment, hedef DNA'daki bir sekansı %100 oranında tamamlayıcı nitelikte olan 8 adet

nükleotid ihtiva eder. Bazı durumlarda, bahsi geçen ikinci segment, en az 8 adet bitişik nükleotidden oluşan bir kesit boyunca SEKANS KOD NO.: 431-682'de gösterilen nükleotid sekanslarından herhangi biri (örneğin 431-562) ile en az %60 oranında özdeşliğe sahip olan bir nükleotid sekansı ihtiva eder. Bazı durumlarda, ikinci segment, en az 8 adet bitişik nükleotidden oluşan bir kesit boyunca SEKANS KOD NO.: 563-682'de gösterilen nükleotid sekanslarından herhangi biri ile en az %60 oranında özdeşliğe sahip olan bir nükleotid sekansı ihtiva eder. Bazı durumlarda, yer-hedefli modifiye edici polipeptid, Şekil 3'te gösterilen Cas9/Csn1 amino asit sekansının 7-166 veya 731-1003 numaralı amino asitlerinden oluşan kısım ile ya da SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346'da gösterilen amino asit sekanslarından herhangi birindeki müteakabil kısımlar ile en az yaklaşık %75 oranında amino asit sekansı özdeşliğine sahip olan bir amino asit sekansı ihtiva eder.

Buluşun özelliklerinden biri, DNA-hedefleyen RNA'yı kodlayan bir nükleotid sekansının bulunduğu bir DNA polinükleotididir. Bazı durumlarda, DNA polinükleotidi bir rekombinan ekspresyon vektöründe bulunur. Bazı durumlarda, DNA-hedefleyen RNA'yı kodlayan nükleotid sekansı bir promotöre operabl bağlıdır. Bazı durumlarda, bu promotör bir indüklenebilir promotördür. Bazı durumlarda, DNA-hedefleyen RNA'yı kodlayan nükleotid sekansında bir çoklu klonlama yeri de bulunur. Buluşun özelliklerinden biri, DNA polinükleotidinin bulunduğu bir in vitro genetiği değiştirilmiş konakçı hücredir.

Buluşun özelliklerinden biri, aşağıda belirtilen unsurları içeren bir rekombinan ekspresyon vektörüdür: (i) bir DNA-hedefleyen RNA'yı kodlayan ve DNA-hedefleyen RNA'nın aşağıda sıralanan unsurları ihtiva eden bir nükleotid sekansı: (a) bir hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı nitelikte bir nükleotid sekansı ihtiva ettiği bir birinci segment ve (b) bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid ile etkileşime giren bir ikinci segment; ve (ii) aşağıda sıralanan unsurları ihtiva eden yer-hedefli modifiye edici polipeptidi kodlayan bir nükleotid sekansı: (a) DNA-hedefleyen RNA ile etkileşime giren bir RNA-bağımlı kısım ve (b) DNA-hedefleyen RNA'nın belirlediği bir yerde bir yer-hedefli enzimatik aktivite sergileyen bir aktivite kısmı.

Buluşun özelliklerinden biri, aşağıda sıralanan unsurları içeren bir rekombinan ekspresyon vektörüdür: (i) aşağıda belirtilen unsurları ihtiva eden bir DNA-hedefleyen RNA'yı kodlayan bir nükleotid sekansı: DNA-hedefleyen RNA (a) bir hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı nitelikte bir nükleotid sekansı barındıran bir birinci segment ve (b) bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid ile etkileşime giren bir ikinci segment içerir; ve (ii) aşağıda belirtilen unsurları ihtiva eden yer-hedefli modifiye edici polipeptidi kodlayan bir nükleotid sekansı: (a) DNA-hedefleyen RNA ile etkileşime giren bir RNA-bağımlı kısım ve (b) hedef DNA içerisinde modüle edilmiş transkripsiyon yerinin, DNA-hedefleyen RNA tarafından belirlendiği, hedef DNA içerisindeki transkripsiyonu modüle eden bir aktivite kısmı.

Bu buluşun özelliklerinden biri, aşağıda belirtilen unsurları ihtiva eden bir varyant yer-hedefli modifiye edici polipeptiddir: (i) DNA-

hedefleyen RNA'nın bir hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı nitelikte bir nükleotid sekansı barındırdığı bir DNA-hedefleyen RNA ile etkileşime giren bir RNA-bağlanımlı kısım ve (ii) DNA-hedefleyen RNA'nın belirlediği bir yerde bir azaltılmış yer-hedefli enzimatik aktivite sergileyen bir aktivite kısmı. Bazı durumlarda, bahsi geçen varyant yer-hedefli modifiye edici polipeptid, SEKANS KOD NO.: 8 ile gösterilen *S. pyogenes* sekansının bir H840A mutasyonunu ya da SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346'da gösterilen amino asit sekanslarından herhangi birinin mütakabil mutasyonunu içerir. Bazı durumlarda, varyant yer-hedefli modifiye edici polipeptid, SEKANS KOD NO.: 8 ile gösterilen *S. pyogenes* sekansının bir D10A mutasyonunu ya da SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346'da gösterilen amino asit sekanslarından herhangi birinin mütakabil mutasyonunu içerir. Bazı durumlarda, varyant yer-hedefli modifiye edici polipeptid, (i) hem SEKANS KOD NO.: 8 ile gösterilen *S. pyogenes* sekansının bir D10A mutasyonunu veya SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346'da gösterilen amino asit sekanslarından herhangi birinin mütakabil mutasyonunu, (ii) hem de SEKANS KOD NO.: 8 ile gösterilen *S. pyogenes* sekansının bir H840A mutasyonunu veya SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346'da gösterilen amino asit sekanslarından herhangi birinin mütakabil mutasyonunu içerir.

Bu buluşun özelliklerinden biri, aşağıda belirtilen unsurları ihtiva eden bir kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptiddir: (i) DNA-hedefleyen RNA'nın bir hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı nitelikte bir nükleotid sekansı içerdiği bir DNA-hedefleyen RNA ile etkileşime giren bir RNA-bağlanımlı kısım ve (ii) DNA-hedefleyen RNA'nın belirlediği bir yerde yer-hedefli enzimatik aktivite sergileyen

bir aktivite kısmı. Bazı durumlarda, kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptid, Şekil 3'te gösterilen Cas9/Casn1 amino asit sekansının 7-166 veya 731-1003 numaralı amino asitlerinden oluşan kısım ile ya da SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346'da gösterilen amino asit

5 sekanslarından herhangi birindeki mütakabil kısımlar ile en az yaklaşık %75 oranında amino asit sekansı özdeşliği sergileyen bir amino asit sekansı ihtiva eder. Bazı durumlarda, DNA-hedefleyen RNA, en az 8 adet bitişik nükleotidden oluşan bir kesit boyunca SEKANS KOD NO.: 431-682'de gösterilen nükleotid sekanslarından

10 herhangi biri (örneğin 563-682) ile en az %60 oranında özdeşliğe sahip olan bir nükleotid sekansı da ihtiva eder. Bazı durumlarda, DNA-hedefleyen RNA, en az 8 adet bitişik nükleotidden oluşan bir kesit boyunca SEKANS KOD NO.: 431-562'de gösterilen nükleotid sekanslarından herhangi biri ile en az %60 oranında özdeşliğe sahip

15 olan bir nükleotid sekansı da ihtiva eder. Bazı durumlarda, kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptidin enzimatik aktivitesi hedef DNA'yı modifiye eder. Bazı durumlarda, kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptidin enzimatik aktivitesi; nükleaz aktivitesi, metiltransferaz aktivitesi, demetilaz aktivitesi, DNA onarımı

20 aktivitesi, DNA hasarı aktivitesi, deaminasyon aktivitesi, dismutaz aktivitesi, alkilasyon aktivitesi, depürinasyon aktivitesi, oksidasyon aktivitesi, pirimidin dimeri oluşturma aktivitesi, integras aktivitesi, transpozaz aktivitesi, rekombinaz aktivitesi, polimeraz aktivitesi, ligaz aktivitesi, helikaz aktivitesi, fotolizaz aktivitesi ya da glikozilaz

25 aktivitesidir. Bazı durumlarda, kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptidin enzimatik aktivitesi nükleaz aktivitesidir. Bazı durumlarda, nükleaz aktivitesi, hedef DNA'da bir çift iplikçik kırığı oluşturur. Bazı durumlarda, kimerik yer-hedefli modifiye edici

polipeptidin enzimatik aktivitesi, hedef DNA ile ilişkili bir hedef polipeptidi modifiye eder. Bazı durumlarda, kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptidin enzimatik aktivitesi; metiltransferaz aktivitesi, demetilaz aktivitesi, asetiltransferaz aktivitesi, deasetilaz aktivitesi, kinaz aktivitesi, fosfataz aktivitesi, ubikitin ligaz aktivitesi, deubikitinasyon aktivitesi, adenilasyon aktivitesi, deadenilasyon aktivitesi, SUMOilasyon aktivitesi, deSUMOilasyon aktivitesi, ribozilasyon aktivitesi, deribozilasyon aktivitesi, miristoilasyon aktivitesi ya da demiristoilasyon aktivitesidir.

10

Buluşun özelliklerinden biri, bir kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptid kodlayan bir nükleotid sekansının bulunduğu bir polinükleotiddir. Bazı durumlarda, bu polinükleotid bir RNA polinükleotididir. Bazı durumlarda, bu polinükleotid bir DNA polinükleotididir. Buluşun özelliklerinden biri, söz konusu polinükleotidi içeren bir rekombinan ekspresyon vektörüdür. Bazı durumlarda, polinükleotid bir promotöre operabl bağlıdır. Bazı durumlarda, promotör bir indüklenebilir promotördür. Buluşun özelliklerinden biri, polinükleotidin bulunduğu bir in vitro genetiği değiştirilmiş konakçı hücredir.

20

Buluşun özelliklerinden biri, aşağıda belirtilen unsurları ihtiva eden bir kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptiddir: (i) DNA-hedefleyen RNA'nın bir hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı nitelikte bir nükleotid sekansı barındırdığı bir DNA-hedefleyen RNA ile etkileşime giren bir RNA-bağlanımlı kısım ve (ii) DNA-hedefleyen RNA'nın belirlediği bir yerde hedef DNA içerisindeki transkripsiyonu modüle eden bir aktivite kısmı. Bazı durumlarda, aktivitesi kısmı,

25

hedef DNA içerisindeki transkripsiyonu artırır. Bazı durumlarda, aktivitesi kısmı, hedef DNA içerisindeki transkripsiyonu azaltır.

Buluşun özelliklerinden biri, bir DNA-hedefleyen RNA ile etkileşime giren bir RNA-bağımlı kısmın ve DNA-hedefleyen RNA'nın belirlediği bir yerde enzimatik yer-hedefli enzimatik aktivite sergileyen bir aktivite kısmının bulunduğu bir rekombinan yer-hedefli modifiye edici polipeptid içeren bir genetiği değiştirilmiş hücredir. Bazı durumlarda, yer-hedefli modifiye edici polipeptid, Şekil 3'te gösterilen Cas9/Csn1 amino asit sekansının 7-166 veya 731-1003 numaralı amino asitlerinden oluşan kısım ile ya da SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346'da gösterilen amino asit sekanslarından herhangi birindeki mütakabil kısımlar ile en az yaklaşık %75 oranında amino asit sekansı özdeşliği sergileyen bir amino asit sekansı barındırır. Bazı durumlarda, hücre, aşağıda belirtilen hücrelerden oluşan bir grup içerisinde seçilir: bir arke hücresi, bir bakteri hücresi, bir ökaryotik hücre, bir ökaryotik tekhücreli organizma, bir somatik hücre, bir germ hücresi, bir kök hücre, bir bitki hücresi, bir alg hücresi, bir hayvan hücresi, bir omurgasız hücresi, bir omurgalı hücresi, bir balık hücresi, bir kurbağa hücresi, bir kuş hücresi, bir memeli hücresi, bir domuz hücresi, bir inek hücresi, bir keçi hücresi, bir koyun hücresi, bir kemirgen hücresi, bir sıçan hücresi, bir fare hücresi, insan dışındaki bir primatın hücresi ve bir insan hücresi.

Bu buluşun özelliklerinden biri, aşağıda sıralı unsurları içeren bir rekombinan yer-hedefli modifiye edici polipeptidi kodlayan bir nükleotid sekansının yer aldığı bir transgeni genomunda barındıran bir insan olmayan transgenik organizmadır: (i) bir DNA-hedefleyen RNA

ile etkileşime giren bir RNA-bağlanımlı kısım ve (ii) DNA-hedefleyen RNA'nın belirlediği bir yerde yer-hedefli enzimatik aktivite sergileyen bir aktivite kısmı. Bazı durumlarda, yer-hedefli modifiye edici polipeptid, Şekil 3'te gösterilen Cas9/Csn1 amino asit sekansının 7-166 veya 731-1003 numaralı amino asitlerinden oluşan kısım ile ya da SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346'da gösterilen amino asit sekanslarından herhangi birindeki mütakabil kısımlar ile en az yaklaşık %75 oranında amino asit sekansı özdeşliğine sahip olan bir amino asit sekansı ihtiva eder. Bazı durumlarda, organizma, aşağıda belirtilen organizmalardan oluşan bir grup içerisinde seçilir: bir arke, bir bakteri, bir ökaryotik tekhücreli organizma, bir alg, bir bitki, bir hayvan, bir omurgasız, bir sinek, bir solucan, bir sölenler, bir omurgalı, bir balık, bir kurbağa, bir kuş, bir memeli, bir toynaklı, bir kemirgen, bir sıçan, bir fare ve insan dışındaki bir primat.

15

Bu buluşun özelliklerinden biri, aşağıda belirtilen unsurları içeren bir bileşimdir: (i) aşağıda sıralanan unsurları bünyesinde barındıran bir DNA-hedefleyen RNA ya da onu kodlayan bir DNA polinükleotidi: DNA-hedefleyen RNA (a) bir hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı nitelikte bir nükleotid sekansı içeren bir birinci segment ve (b) bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid ile etkileşime giren bir ikinci segment içerir; ve (ii) aşağıda belirtilen unsurları ihtiva eden yer-hedefli modifiye edici polipeptid ya da onu kodlayan bir polinükleotid: (a) DNA-hedefleyen RNA ile etkileşime giren bir RNA-bağlanımlı kısım ve (b) DNA-hedefleyen RNA'nın belirlediği bir yerde yer-hedefli enzimatik aktivite sergileyen bir aktivite kısmı. Bazı durumlarda, DNA-hedefleyen RNA'nın birinci segmenti, hedef DNA'daki bir sekansı %100 oranında tamamlayıcı nitelikte olan 8 adet

25



- nükleotid ihtiva eder. Bazı durumlarda, DNA-hedefleyen RNA'nın ikinci segmenti, en az 8 adet bitişik nükleotidden oluşan bir kesit boyunca SEKANS KOD NO.: 431-682'de gösterilen nükleotid sekanslarından herhangi biri (örneğin 563-682) ile en az %60 oranında
- 5 özdeşliğe sahip olan bir nükleotid sekansı ihtiva eder. Bazı durumlarda, DNA-hedefleyen RNA'nın ikinci segmenti, en az 8 adet bitişik nükleotidden oluşan bir kesit boyunca SEKANS KOD NO.: 431-562'de gösterilen nükleotid sekanslarından herhangi biri ile en az %60 oranında özdeşliğe sahip olan bir nükleotid sekansı ihtiva eder.
- 10 Bazı durumlarda, yer-hedefli modifiye edici polipeptid, Şekil 3'te gösterilen Cas9/Csn1 amino asit sekansının 7-166 veya 731-1003 numaralı amino asitlerinden oluşan kısım ile ya da SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346'da gösterilen amino asit sekanslarından herhangi birindeki mütakabil kısımlar ile en az yaklaşık %75 oranında
- 15 amino asit sekansı özdeşliğine sahip olan bir amino asit sekansı ihtiva eder. Bazı durumlarda, enzimatik aktivite hedef DNA'yı modifiye eder. Bazı durumlarda, enzimatik aktivite; nükleaz aktivitesi, metiltransferaz aktivitesi, demetilaz aktivitesi, DNA onarımı aktivitesi, DNA hasarı aktivitesi, deaminasyon aktivitesi, dismutaz
- 20 aktivitesi, alkilasyon aktivitesi, depürinasyon aktivitesi, oksidasyon aktivitesi, pirimidin dimeri oluşturma aktivitesi, integras aktivitesi, transpozaz aktivitesi, rekombinaz aktivitesi, polimeraz aktivitesi, ligaz aktivitesi, helikaz aktivitesi, fotolizaz aktivitesi ya da glikozilaz aktivitesidir. Bazı durumlarda, enzimatik aktivite nükleaz aktivitesidir.
- 25 Bazı durumlarda, nükleaz aktivitesi, hedef DNA'da bir çift iplikçik kırığı oluşturur. Bazı durumlarda, enzimatik aktivite, hedef DNA ile ilişkili bir hedef polipeptidi modifiye eder. Bazı durumlarda, enzimatik aktivite; metiltransferaz aktivitesi, demetilaz aktivitesi,

asetiltransferaz aktivitesi, deasetilaz aktivitesi, kinaz aktivitesi, fosfataz aktivitesi, ubikitin ligaz aktivitesi, deubikitinasyon aktivitesi, adenilasyon aktivitesi, deadenilasyon aktivitesi, SUMOilasyon aktivitesi, deSUMOilasyon aktivitesi, ribozilasyon aktivitesi, 5 deribozilasyon aktivitesi, miristoilasyon aktivitesi ya da demiristoilasyon aktivitesidir. Bazı durumlarda, hedef polipeptid bir histondur ve enzimatik aktivite, metiltransferaz aktivitesi, demetilaz aktivitesi, asetiltransferaz aktivitesi, deasetilaz aktivitesi, kinaz aktivitesi, fosfataz aktivitesi, ubikitin ligaz aktivitesi ya da 10 deubikitinasyon aktivitesidir. Bazı durumlarda, DNA-hedefleyen RNA bir çift-moleküllü DNA-hedefleyen RNA'dır ve bileşim, hem bir hedef gösteren RNA hem de bir aktive edici RNA ihtiva eder ve bu RNA'ların dubleks oluşturan segmentleri birbirlerini tamamlayıcı niteliktedir ve hibridize olarak DNA-hedefleyen RNA'nın ikinci 15 segmentini oluştururlar. Bazı durumlarda, aktive edici RNA'nın dubleks oluşturan segmenti, en az 8 adet bitişik nükleotidden oluşan bir kesit boyunca SEKANS KOD NO.: 431-682'de gösterilen nükleotid sekanslarından herhangi biri ile en az %60 oranında özdeşliğe sahip olan bir nükleotid sekansı ihtiva eder.

20

Bu buluşun özelliklerinden biri, aşağıda belirtilen unsurları ihtiva eden bir bileşimdir: (i) buluşa konu olan bir DNA-hedefleyen RNA ya da onu kodlayan bir DNA polinükleotidi ve (ii) nükleik asitleri stabilize etmeyi sağlayan bir tampon. Bu buluşun özelliklerinden biri, aşağıda 25 belirtilen unsurları ihtiva eden bir bileşimdir: (i) buluşa konu olan bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid veya onu kodlayan bir polinükleotid ve (ii) nükleik asitleri ve/veya proteinleri stabilize etmeyi sağlayan bir tampon. Bu buluşun özelliklerinden biri, aşağıda

- belirtilen unsurları ihtiva eden bir bileşimdir: (i) aşağıda sıralanan unsurları ihtiva eden bir DNA-hedefleyen RNA veya onu kodlayan bir DNA polinükleotidi: (a) bir hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı nitelikte bir nükleotid sekansı içeren bir birinci segment ve (b) bir yer-
- 5 hedefli modifiye edici polipeptid ile etkileşime giren bir ikinci segment; ve (ii) aşağıda belirtilen unsurları ihtiva eden yer-hedefli modifiye edici polipeptid veya onu kodlayan bir polinükleotid: (a) DNA-hedefleyen RNA ile etkileşime giren bir RNA-bağlanımlı kısım ve (b) hedef DNA içerisinde modüle edilmiş transkripsiyon yerinin,
- 10 DNA-hedefleyen RNA tarafından belirlendiği, hedef DNA içerisindeki transkripsiyonu modüle eden bir aktivite kısmı. Bazı durumlarda, aktivite kısmı, hedef DNA içerisindeki transkripsiyonu artırır. Bazı durumlarda, aktivite kısmı, hedef DNA içerisindeki transkripsiyonu azaltır. Bu buluşun özelliklerinden biri, aşağıda
- 15 belirtilen unsurları ihtiva eden bir bileşimdir: (i) bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid veya onu kodlayan bir polinükleotid ve (ii) nükleik asitleri ve/veya proteinleri stabilize etmeyi sağlayan bir tampon.
- 20 Bu buluşun özelliklerinden biri, bir hedef DNA'yı yer-spesifik modifikasyona uğratmayı sağlayan ve hedef DNA'yı aşağıda belirtilen unsurlar ile temas ettirmeye dayanan bir yöntemdir: (i) aşağıda sıralanan unsurları içeren bir DNA-hedefleyen RNA ya da onu kodlayan bir DNA polinükleotidi: DNA-hedefleyen RNA (a) hedef
- 25 DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı nitelikte bir nükleotid sekansı içeren bir birinci segment ve (b) bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid ile etkileşime giren bir ikinci segment; ve (ii) aşağıda belirtilen unsurları bünyesinde barındıran bir yer-hedefli modifiye

edici polipeptid ya da onu kodlayan bir polinükleotid: (a) DNA-hedefleyen RNA ile etkileşime giren bir RNA-bağımlı kısım ve (b) yer-hedefli enzimatik aktivite sergileyen bir aktivite kısmı. Bazı durumlarda, hedef DNA ekstrakromozomaldır. Bazı durumlarda, hedef DNA, tamamlayıcı iplikçiginde 5'-CCY-3' şeklinde gösterilen bir PAM sekansı içerir ve bu sekansta geçen Y herhangi bir DNA nükleotidi olabilir ve Y hedef DNA'nın tamamlayıcı iplikçigindeki hedef sekansın hemen 5' ucunda yer alır. Bazı durumlarda, hedef DNA, in vitro ortamdaki bir kromozomun bir parçasıdır. Bazı durumlarda, hedef DNA, in vivo ortamdaki bir kromozomun bir parçasıdır. Bazı durumlarda, hedef DNA, bir hücredeki bir kromozomun bir parçasıdır. Bazı durumlarda, hücre, aşağıda belirtilen hücrelerden oluşan bir grup içerisinde seçilir: bir arke hücresi, bir bakteri hücresi, bir ökaryotik hücre, bir ökaryotik tekhücreli organizma, bir somatik hücre, bir germ hücresi, bir kök hücre, bir bitki hücresi, bir alg hücresi, bir hayvan hücresi, bir omurgasız hücresi, bir omurgalı hücresi, bir balık hücresi, bir kurbağa hücresi, bir kuş hücresi, bir memeli hücresi, bir domuz hücresi, bir inek hücresi, bir keçi hücresi, bir koyun hücresi, bir kemirgen hücresi, bir sıçan hücresi, bir fare hücresi, insan dışındaki bir primatın hücresi ve bir insan hücresi. Bazı durumlarda, DNA-hedefleyen RNA, en az 8 adet bitişik nükleotidden oluşan bir kesit boyunca SEKANS KOD NO.: 431-682'de gösterilen nükleotid sekanslarından herhangi biri (örneğin 563-682) ile en az %60 oranında özdeşliğe sahip olan bir nükleotid sekansı ihtiva eder. Bazı durumlarda, DNA-hedefleyen RNA, en az 8 adet bitişik nükleotidden oluşan bir kesit boyunca SEKANS KOD NO.: 431-562'de gösterilen nükleotid sekanslarından herhangi biri ile en az %60 oranında özdeşliğe sahip olan bir nükleotid sekansı ihtiva

eder. Bazı durumlarda, DNA-modifiye edici polipeptid, Şekil 3'te gösterilen Cas9/Csn1 amino asit sekansının 7-166 veya 731-1003 numaralı amino asitlerinden oluşan kısım ile ya da SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346'da gösterilen amino asit sekanslarından herhangi birindeki mütakabil kısımlar ile en az yaklaşık %75 oranında amino asit sekansı özdeşliğine sahip olan bir amino asit sekansı ihtiva eder. Bazı durumlarda, enzimatik aktivite hedef DNA'yı modifiye eder. Bazı durumlarda, enzimatik aktivite; nükleaz aktivitesi, metiltransferaz aktivitesi, demetilaz aktivitesi, DNA onarımı aktivitesi, DNA hasarı aktivitesi, deaminasyon aktivitesi, dismutaz aktivitesi, alkilasyon aktivitesi, depürinasyon aktivitesi, oksidasyon aktivitesi, pirimidin dimeri oluşturma aktivitesi, integraz aktivitesi, transpozaz aktivitesi, rekombinaz aktivitesi, polimeraz aktivitesi, ligaz aktivitesi, helikaz aktivitesi, fotolizaz aktivitesi ya da glikozilaz aktivitesidir. Bazı durumlarda, DNA-modifiye edici enzimatik aktivite nükleaz aktivitesidir. Bazı durumlarda, nükleaz aktivitesi, hedef DNA'da bir çift iplikçik kırığı oluşturur. Bazı durumlarda, temas, homolog olmayan uç birleştirmeye veya homoloji-yönlendirmeli onarıma izin veren koşullar altında gerçekleştirilir. Bazı durumlarda, söz konusu yöntem kapsamında, hedef DNA bir donör polinükleotid ile de temas ettirilir ve donör polinükleotid, donör polinükleotidin bir kısmı, donör polinükleotidin bir kopyası ya da donör polinükleotidin bir kopyasının bir kısmı hedef DNA'ya entegre olur. Bazı durumlarda, yöntem kapsamında, hücre bir donör polinükleotid ile temas ettirilmez ve hedef DNA, hedef DNA içerisindeki nükleotidlerin silinmesini sağlayacak bir modifikasyona uğrattır. Bazı durumlarda, enzimatik aktivite, hedef DNA ile ilişkili bir hedef polipeptidi modifiye eder. Bazı durumlarda, enzimatik aktivite; metiltransferaz aktivitesi,

demetilaz aktivitesi, asetiltransferaz aktivitesi, deasetilaz aktivitesi, kinaz aktivitesi, fosfataz aktivitesi, ubikitin ligaz aktivitesi, deubikitinasyon aktivitesi, adenilasyon aktivitesi, deadenilasyon aktivitesi, SUMOilasyon aktivitesi, deSUMOilasyon aktivitesi, 5 ribozilasyon aktivitesi, deribozilasyon aktivitesi, miristoilasyon aktivitesi ya da demiristoilasyon aktivitesidir. Bazı durumlarda, hedef polipeptid bir histondur ve enzimatik aktivite, metiltransferaz aktivitesi, demetilaz aktivitesi, asetiltransferaz aktivitesi, deasetilaz aktivitesi, kinaz aktivitesi, fosfataz aktivitesi, ubikitin ligaz aktivitesi 10 ya da deubikitinasyon aktivitesidir. Bazı durumlarda, komplekste bir aktive edici RNA da bulunur. Bazı durumlarda, aktive edici RNA, en az 8 adet bitişik nükleotidden oluşan bir kesit boyunca SEKANS KOD NO.: 431-682'de gösterilen nükleotid sekanslarından herhangi biri ile en az %60 oranında özdeşliğe sahip olan bir nükleotid sekansı ihtiva 15 eder.

Buluşun özelliklerinden biri, bir hedef DNA içerisinde yer-spesifik transkripsiyonu modüle etmeyi sağlayan, söz konusu temasın hedef DNA'daki transkripsiyonun modüle olmasını sağladığı bir yöntemdir: 20 (i) aşağıda sıralanan unsurları ihtiva eden bir DNA-hedefleyen RNA veya onu kodlayan bir DNA polinükleotidi: DNA-hedefleyen RNA (a) hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı nitelikte bir nükleotid sekansı barındıran bir birinci segment ve (b) bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid ile etkileşime giren bir ikinci segment içerir; ve (ii) 25 aşağıda sıralanan unsurları bünyesinde barındıran bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid veya onu kodlayan bir polinükleotid: (a) DNA-hedefleyen RNA ile etkileşime giren bir RNA-bağlanımlı kısım ve (b) transkripsiyonu modüle eden bir aktivite kısmı. Bazı

durumlarda, hedef DNA içerisindeki transkripsiyon artırılır. Bazı durumlarda, hedef DNA içerisindeki transkripsiyon azaltılır.

Bu buluşun özelliklerinden biri, hedef DNA'da yer-spesifik modifikasyon yapmayı sağlayan ve hedef DNA'yı aşağıda belirtilen unsurlar ile temas ettirmeye dayanan bir yöntemdir: (i) aşağıda sıralanan unsurları ihtiva eden bir DNA-hedefleyen RNA veya onu kodlayan bir DNA polinükleotidi: DNA-hedefleyen RNA (a) hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı nitelikte bir nükleotid sekansı barındıran bir birinci segment ve (b) bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid ile etkileşime giren bir ikinci segment içerir; ve (ii) aşağıda sıralanan unsurları bünyesinde barındıran bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid veya onu kodlayan bir polinükleotid: (a) DNA-hedefleyen RNA ile etkileşime giren bir RNA-bağlanımlı kısım ve (b) hedef DNA içerisindeki transkripsiyonu modüle eden bir aktivite kısmı. Bazı durumlarda, yer-hedefli modifiye edici polipeptid hedef DNA içerisindeki transkripsiyonu artırır. Bazı durumlarda, yer-hedefli modifiye edici polipeptid hedef DNA içerisindeki transkripsiyonu azaltır.

20

Buluşun özelliklerinden biri, bir hücrede bir hedef DNA'nın yer-spesifik yarılıp modifiye edilmesine yardımcı olmaya yarayan ve aşağıda belirtilen unsurların hücreye sokulmasına dayanan, temasın homolog olmayan uç birleştirmeye veya homoloji-yönlendirmeli onarıma izin veren koşullar altında gerçekleştirildiği ve hedef DNA yarılıp tekrar birleştirilerek bir modifiye DNA sekansının üretildiği bir yöntemdir: (i) aşağıda sıralanan unsurları içeren bir DNA-hedefleyen RNA veya onu kodlayan bir DNA polinükleotidi: DNA-hedefleyen

25

RNA (a) hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı nitelikte bir nükleotid sekansı içeren bir birinci segment ve (b) bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid ile etkileşime giren bir ikinci segment içerir; ve (ii) aşağıda sıralanan unsurları bünyesinde barındıran bir yer-

5 hedefli modifiye edici polipeptid veya onu kodlayan bir polinükleotid: (a) DNA-hedefleyen RNA ile etkileşime giren bir RNA-bağlanımlı kısım ve (b) DNA-hedefleyen RNA'nın belirlediği bir yerde hedef DNA'da bir çift iplikçik kırığı oluşmasını sağlayan bir nükleaz aktivitesi sergileyen bir aktivite kısmı. Bazı durumlarda, söz konusu

10 yöntem kapsamında, hedef DNA bir donör polinükleotid ile de temas ettirilir ve donör polinükleotid, donör polinükleotidin bir kısmı, donör polinükleotidin bir kopyası ya da donör polinükleotidin bir kopyasının bir kısmı hedef DNA'ya entegre olur. Bazı durumlarda, yöntem kapsamında, hücre bir donör polinükleotid ile temas ettirilmez ve

15 hedef DNA, hedef DNA içerisindeki nükleotidlerin silinmesini sağlayacak bir modifikasyona uğrattır. Bazı durumlarda, hücre, aşağıda belirtilen hücrelerden oluşan bir grup içerisinde seçilir: bir arke hücresi, bir bakteri hücresi, bir ökaryotik hücre, bir ökaryotik tekhücreli organizma, bir somatik hücre, bir germ hücresi, bir kök

20 hücre, bir bitki hücresi, bir alg hücresi, bir hayvan hücresi, bir omurgasız hücresi, bir omurgalı hücresi, bir balık hücresi, bir kurbağa hücresi, bir kuş hücresi, bir memeli hücresi, bir domuz hücresi, bir inek hücresi, bir keçi hücresi, bir koyun hücresi, bir kemirgen hücresi, bir sıçan hücresi, bir fare hücresi, insan dışındaki bir primatın hücresi

25 ve bir insan hücresi. Bazı durumlarda, hücre in vitro ortamdadır. Bazı durumlarda, hücre in vivo ortamdadır.



Buluşun özelliklerinden biri, bir denekte bir genetiği değiştirilmiş hücre üretmeyi sağlayan ve aşağıda belirtilen basamakların gerçekleştirilmesine dayanan bir yöntemdir: (I) temasın homolog olmayan uç birleştirmeye veya homoloji-yönlendirmeli onarıma izin veren koşullar altında gerçekleştirildiği ve hedef DNA yarıp tekrar birleştirilerek bir modifiye DNA sekansının üretildiği bir basamak olarak, bir hücreye aşağıda sıralanan unsurların sokulması: DNA-hedefleyen RNA (i) aşağıda belirtilen unsurları ihtiva eden bir DNA-hedefleyen RNA veya onu kodlayan bir DNA polinükleotidi: (a) hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı nitelikte bir nükleotid sekansı içeren bir birinci segment ve (b) bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid ile etkileşime giren bir ikinci segment içerir; ve (ii) aşağıda sıralanan unsurları bünyesinde barındıran bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid veya onu kodlayan bir polinükleotid: (a) DNA-hedefleyen RNA ile etkileşime giren bir RNA-bağlanımlı kısım ve (b) DNA-hedefleyen RNA'nın belirlediği bir yerde hedef DNA'da bir çift iplikçik kırığı oluşmasını sağlayan bir nükleaz aktivitesi sergileyen bir aktivite kısmı; ve (II) genetiği değiştirilmiş hücrenin deneğe transplante edilmesi. Bazı durumlarda, söz konusu yöntem kapsamında, hücre bir donör polinükleotid ile de temas ettirilir ve donör polinükleotid, donör polinükleotidin bir kısmı, donör polinükleotidin bir kopyası ya da donör polinükleotidin bir kopyasının bir kısmı hedef DNA'ya entegre olur. Bazı durumlarda, yöntem kapsamında, hücre bir donör polinükleotid ile temas ettirilmez ve hedef DNA, hedef DNA içerisindeki nükleotidlerin silinmesini sağlayacak bir modifikasyona uğrattılır. Bazı durumlarda, hücre, aşağıda belirtilen hücrelerden oluşan bir grup içerisinde seçilir: bir arke hücresi, bir bakteri hücresi, bir ökaryotik hücre, bir ökaryotik

tekhücreli organizma, bir somatik hücre, bir germ hücresi, bir kök hücre, bir bitki hücresi, bir alg hücresi, bir hayvan hücresi, bir omurgasız hücresi, bir omurgalı hücresi, bir balık hücresi, bir amfibi hücresi, bir kuş hücresi, bir memeli hücresi, bir toynaklı hücresi, bir kemirgen hücresi, insan dışındaki bir primatın hücresi ve bir insan hücresi.

Buluşun özelliklerinden biri, bir eksojen yer-hedefli modifiye edici polipeptid kodlayan bir nükleotid sekansının bulunduğu bir genetiği değiştirilmiş hücrede hedef DNA'yı modifiye etmeyi sağlayan ve genetiği değiştirilmiş hücreye bir DNA-hedefleyen RNA'nın veya onu kodlayan bir DNA polinükleotidinin sokulmasına dayanan bir yöntemdir ve bu yöntemde kullanılan (i) DNA-hedefleyen RNA şu unsurları içerir: (a) hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı nitelikte bir nükleotid sekansı içeren bir birinci segment ve (b) bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid ile etkileşime giren bir ikinci segment; ve (ii) bu yer-hedefli modifiye edici polipeptid şunları içerir: (a) DNA-hedefleyen RNA ile etkileşime giren bir RNA-bağlanımlı kısım ve (b) nükleaz aktivitesi sergileyen bir aktivite kısmı. Bazı durumlarda, yer-hedefli modifiye edici polipeptid, Şekil 3'te gösterilen Cas9/Csn1 amino asit sekansının 7-166 veya 731-1003 numaralı amino asitlerinden oluşan kısım ile ya da SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346'da gösterilen amino asit sekanslarından herhangi birindeki mütakabil kısımlar ile en az yaklaşık %75 oranında amino asit sekansı özdeşliğine sahip olan bir amino asit sekansı ihtiva eder. Bazı durumlarda, hücre, aşağıda belirtilen hücrelerden oluşan bir grup içerisinde seçilir: bir arke hücresi, bir bakteri hücresi, bir ökaryotik hücre, bir ökaryotik tekhücreli organizma, bir somatik hücre, bir germ

hücresi, bir kök hücre, bir bitki hücresi, bir alg hücresi, bir hayvan hücresi, bir omurgasız hücresi, bir omurgalı hücresi, bir balık hücresi, bir amfibi hücresi, bir kuş hücresi, bir memeli hücresi, bir toynaklı hücresi, bir kemirgen hücresi, insan dışındaki bir primatın hücresi ve  
 5 bir insan hücresi. Bazı durumlarda, hücre in vivo ortamdadır. Bazı durumlarda, hücre in vitro ortamdadır. Bazı durumlarda, yer-hedefli modifiye edici polipeptidin ekspresyonu bir indüklenebilir promotörün kontrolü altındadır. Bazı durumlarda, yer-hedefli modifiye edici polipeptidin ekspresyonu bir hücre tipi-spesifik promotörün kontrolü  
 10 altındadır.

Buluşun özelliklerinden biri, aşağıda belirtilen unsurları barındıran bir kittir: DNA-hedefleyen RNA veya onu kodlayan bir DNA polinükleotidi ve sulandırma ve/veya seyreltme amaçlı bir reaktif.  
 15 Bazı durumlarda, kitte, aşağıda sıralanan unsurlar arasından seçilen bir reaktif de bulunur: DNA-hedefleyen RNA'yı hücrelere sokmak için kullanılacak bir tampon, bir yıkama tamponu, bir kontrol reaktifi, bir kontrol ekspresyon vektörü veya RNA polinükleotidi, DNA-hedefleyen RNA'yı DNA'dan transkribe etmek için kullanılacak  
 20 bir reaktif ve bunlardan oluşan kombinasyonlar.

Bu buluşun özelliklerinden biri, aşağıda belirtilen unsurları barındıran bir kittir: buluşa konu olan bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid veya onu kodlayan bir polinükleotid ve sulandırma ve/veya seyreltme amaçlı bir reaktif. Bazı durumlarda, kitte, aşağıda sıralanan unsurlar arasından seçilen bir reaktif de bulunur: yer-hedefli modifiye edici polipeptidi hücrelere sokmak için kullanılacak bir tampon, bir yıkama tamponu, bir kontrol reaktifi, bir kontrol ekspresyon vektörü

veya RNA polinükleotidi, yer-hedefli modifiye edici polipeptidin DNA'dan in vitro ortamda üretilmesini sağlamak için kullanılabilir bir reaktif ve bunlardan oluşan kombinasyonlar.

- 5 Bu buluşun özelliklerinden biri, aşağıda belirtilen unsurları barındıran bir kittir: buluşa konu olan bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid veya onu kodlayan bir polinükleotid ve sulandırma ve/veya seyreltme amaçlı bir reaktif. Bu buluşun özelliklerinden biri, aşağıda belirtilen unsurları barındıran bir kittir: (i) aşağıda sıralanan unsurları ihtiva
- 10 eden bir DNA-hedefleyen RNA veya onu kodlayan bir DNA polinükleotidi: DNA-hedefleyen RNA (a) bir hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı nitelikte bir nükleotid sekansı içeren bir birinci segment ve (b) bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid ile etkileşime giren bir ikinci segment içerir; ve (ii) aşağıda sıralanan unsurları ihtiva
- 15 eden yer-hedefli modifiye edici polipeptid veya onu kodlayan bir polinükleotid: (a) DNA-hedefleyen RNA ile etkileşime giren bir RNA-bağlanımlı kısım ve (b) DNA-hedefleyen RNA'nın belirlediği bir yerde yer-hedefli enzimatik aktivite sergileyen bir aktivite kısmı.
- 20 Bu buluşun özelliklerinden biri, aşağıda belirtilen unsurları barındıran bir kittir: (i) aşağıda sıralanan unsurları ihtiva eden bir DNA-hedefleyen RNA veya onu kodlayan bir DNA polinükleotidi: (a) bir hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı nitelikte bir nükleotid sekansı içeren bir birinci segment ve (b) bir yer-hedefli modifiye edici
- 25 polipeptid ile etkileşime giren bir ikinci segment; ve (ii) aşağıda sıralanan unsurları ihtiva eden yer-hedefli modifiye edici polipeptid veya onu kodlayan bir polinükleotid: (a) DNA-hedefleyen RNA ile etkileşime giren bir RNA-bağlanımlı kısım ve (b) hedef DNA

içerisinde modüle edilmiş transkripsiyon yerinin, DNA-hedefleyen RNA tarafından belirlendiği, hedef DNA içerisindeki transkripsiyonu modüle eden bir aktivite kısmı.

- 5 Bu buluşun özelliklerinden biri, aşağıda belirtilen unsurları barındıran bir kittir: (i) yukarıda bahsi geçen rekombinan ekspresyon vektörlerinden herhangi biri ve (ii) sulandırma ve/veya seyreltme amaçlı bir reaktif. Bu buluşun özelliklerinden biri, aşağıda belirtilen unsurları barındıran bir kittir: (i) yukarıda bahsi geçen rekombinan
- 10 ekspresyon vektörlerinden herhangi biri ve (ii) aşağıda sıralanan unsurları içeren bir yer-hedefli modifiye edici polipeptidi kodlayan bir nükleotid sekansının bulunduğu bir rekombinan ekspresyon vektörü: (a) DNA-hedefleyen RNA ile etkileşime giren bir RNA-bağımlı kısım ve (b) DNA-hedefleyen RNA'nın belirlediği bir yerde yer-
- 15 hedefli enzimatik aktivite sergileyen bir aktivite kısmı. Bu buluşun özelliklerinden biri, aşağıda belirtilen unsurları barındıran bir kittir: (i) yukarıda bahsi geçen rekombinan ekspresyon vektörlerinden herhangi biri ve (ii) aşağıda sıralanan unsurları içeren bir yer-hedefli modifiye edici polipeptidi kodlayan bir nükleotid sekansının bulunduğu bir
- 20 rekombinan ekspresyon vektörü: (a) DNA-hedefleyen RNA ile etkileşime giren bir RNA-bağımlı kısım ve (b) hedef DNA içerisinde modüle edilmiş transkripsiyon yerinin, DNA-hedefleyen RNA tarafından belirlendiği, hedef DNA içerisindeki transkripsiyonu modüle eden bir aktivite kısmı.

25

Buluşun özelliklerinden biri, hedef DNA'yı hedef almayı sağlayan ve aşağıda belirtilen unsurları bünyesinde barındıran bir kittir: iki veya daha fazla sayıda DNA-hedefleyen RNA veya bunları kodlayan DNA

polinükleotidleri; bu iki veya daha fazla sayıdaki DNA-hedefleyen RNA'dan en az birinin birinci segmenti, iki veya daha fazla sayıdaki DNA-hedefleyen RNA'dan diğerinin veya diğerlerinden en az birinin birinci segmentinden en az bir nükleotid bakımından farklılık gösterir.

5

## ŞEKİLLERE DAİR KISA AÇIKLAMALAR

**Şekiller 1A-B'de**, buluşa uygun örnek niteliğindeki iki adet DNA-hedefleyen RNA'nın şematik çizimleri sunulmakta ve bu RNA'ların her ikisi de birer yer-hedefli modifiye edici polipeptid ve birer hedef DNA ile ilişki içerisinde resmedilmektedir.

**Şekil 2'de**, bir Cas9/Csn1 yer-hedefli modifiye edici polipeptid ve bir DNA-hedefleyen RNA kullanılarak çift iplikçikli DNA kırıkları oluşturulması yoluyla yapılan hedef DNA düzenlemesi gösterilmektedir.

**Şekiller 3A-B'de**, Streptococcus pyogenes menşeli bir Cas9/Csn1 proteininin amino asit sekansı (SEKANS KOD NO.: 8) gösterilmektedir. Cas9, hem HNH hem de RuvC endonükleazlarına homolog domainlere sahiptir. **(A)** Motifler 1-4 üst çizgiyle işaretlenmiştir. **(B)** Domainler 1 ve 2 üst çizgiyle işaretlenmiştir.

**Şekiller 4A-B'de**, birden çok türdeki farklı Cas9/Csn1 proteinleri arasındaki yüzde cinsinden özdeşlik gösterilmektedir. **(A)** Streptococcus pyogenes'in referans alındığı durumda sekans özdeşliği. Örneğin, Domain 1 ile Domain 2, Şekil 3B'de gösterilen Streptococcus pyogenes Cas9/Csn1 proteininin sırasıyla 7-166

numaralı amino asitlerinin ve 731-1003 numaralı amino asitlerinin oluşturduğu kısımlardır. **(B)**Neisseria meningitidis'in referans alındığı durumda sekans özdeşliği. Orneği Domain 1 ile Domain 2, Neisseria meningitidis Cas9/Csn1 proteininin (SEKANS KOD NO.: 79) 5 sırasıyla 13-139 numaralı amino asitlerinin ve 475-750 numaralı amino asitlerinin oluşturduğu kısımlardır.

**Şekil 5'te**, Şekil 32'deki filogenetik tablodan seçilen birçok farklı türdeki Cas9/Csn1 proteinlerinin 1-4 numaralı motifleri arasında yapılan bir çoklu sekans hizalaması gösterilmektedir (bkz: Şekil 32, Şekil 3A ve Tablo 1) (Streptococcus pyogenes (SEKANS KOD NO.: 8), Legionellapneumophila (SEKANS KOD NO.: 17),Gamma proteobacterium (SEKANS KOD NO.: 107), Listeria innocua (SEKANS KOD NO.: 3), Lactobacillus gasseri (SEKANS KOD NO.: 15 152), Eubacterium rectale (SEKANS KOD NO.: 99), Staphylococcus lugdunensis (SEKANS KOD NO.: 185), Mycoplasma synoviae (SEKANS KOD NO.: 22), Mycoplasma mobile (SEKANS KOD NO.: 16), Wolinella succinogenes (SEKANS KOD NO.: 10), Flavobacterium columnare (SEKANS KOD NO.: 235), Fibrobacter 20 succinogenes (SEKANS KOD NO.: 121), Bacteroides fragilis (SEKANS KOD NO.: 21),Acidothermus cellulolyticus (SEKANS KOD NO.: 42) ve Bifidobacterium dentium (SEKANS KOD NO.: 131)).

25 **Şekil 6A-B'de**, çeşitli farklı türlerdeki doğada kendiliğinden oluşan tracrRNA ("aktive edici RNA") sekansları arasında yapılan hizalamalar sunulmaktadır (L. innocua (SEKANS KOD NO.: 268); S. pyogenes (SEKANS KOD NO.: 267); S. mutans (SEKANS KOD

NO.: 269); *S. thermophilus1* (SEKANS KOD NO.: 270); *M. mobile* (SEKANS KOD NO.: 274); *N. meningitides* (SEKANS KOD NO.: 272); *P. multocida* (SEKANS KOD NO.: 273); *S. thermophilus2* (SEKANS KOD NO.: 271) ve *S. pyogenes* (SEKANS KOD NO.: 267)). **(A)** Benzer mimariye ve epey benzer Cas9/Csn1 sekanslarına sahip CRISPR/Cas lokuslarıyla ilişkili seçilmiş tracrRNA ortologları arasında yapılan bir çoklu sekans hizalaması (AlignX, VectorNTI paketi, Invitrogen). Siyah renkli kutucuklar ortak nükleotidleri temsil etmektedir. **(B)** Farklı mimariye ve yakın ilişkili olmayan Cas9/Csn1 sekanslarına sahip CRISPR/Cas lokuslarıyla ilişkili seçilmiş tracrRNA ortologları arasında yapılan bir çoklu sekans hizalaması (AlignX, VectorNTI paketi, Invitrogen). *N. meningitidis* ve *P. multocida* tracrRNA ortologlarının sekans benzerliğine dikkat ediniz. Siyah renkli kutucuklar ortak nükleotidleri temsil etmektedir. Daha fazla aktive edici RNA sekansı örneği için bkz: SEKANS KOD NO.: 431-562.

**Şekiller 7A-B'de**, çeşitli farklı türlerdeki crRNA ("hedef gösteren RNA") sekanslarının doğada kendiliğinden oluşan dubleks oluşturuçu segmentleri arasında yapılan hizalamalar sunulmaktadır (*L. innocua* (SEKANS KOD NO.: //); *S. pyogenes* (SEKANS KOD NO.: //); *S. mutans* (SEKANS KOD NO.: //); *S. thermophilus1* (SEKANS KOD NO.: //); *C. jejuni* (SEKANS KOD NO.: //); *S. pyogenes* (SEKANS KOD NO.: //); *F. novicida* (SEKANS KOD NO.: //); *M. mobile* (SEKANS KOD NO.: //); *N. meningitides* (SEKANS KOD NO.: //); *P. multocida* (SEKANS KOD NO.: //) ve *S. thermophilus2* (SEKANS KOD NO.: //)). **(A)** Benzer mimariye ve epey benzer Cas9/Csn1 sekanslarına sahip lokuslarla ilişkili örnek niteliğindeki hedef gösteren



RNA sekansı dubleks oluşturucu segmentleri arasında yapılan çoklu sekans hizalamaları (AlignX, VectorNTI paketi, Invitrogen). **(B)** Farklı mimariye ve farklı Cas9 sekanslarına sahip lokuslarla ilişkili örnek niteliğindeki hedef gösteren RNA sekansı dubleks oluşturucu segmentleri arasında yapılan çoklu sekans hizalamaları (AlignX, VectorNTI paketi, Invitrogen). Siyah renkli kutucuklar ortak nükleotidleri temsil etmektedir. Daha fazla hedef gösteren RNA sekansı dubleks oluşturucu segmenti rneği için bkz: SEKANS KOD NO.: 563-679.

10

**Şekil 8'de**, cRNA'nın ("hedef gösteren RNA") doğada kendiliğinden oluşan dubleks oluşturucu segmenti ile mütekabil tracrRNA ortoloğunun ("aktive edici RNA") dubleks oluşturucu segmentinin hibridzasyonuna ilişkin bir Şematik sunulmaktadır. Ust sekans, hedef gösteren RNA; alt sekans, mütekabil aktive edici RNA'nın dubleks oluşturucu segmenti. CRISPR lokusları, Tip II (Nmeni(CASS4)) CRISPR/Cas sistemine aittir. Nomenklatür, CRISPR veritabanına (CRISPR DB) dayanmaktadır. *S. pyogenes* (SEKANS KOD NO.: // ve //); *S. mutans* (SEKANS KOD NO.: // ve //); *S. thermophilus1* (SEKANS KOD NO.: // ve //); *S. thermophilus2* (SEKANS KOD NO.: // ve //); *L. innocua* (SEKANS KOD NO.: // ve //); *T. denticola* (SEKANS KOD NO.: // ve //); *N. meningitides* (SEKANS KOD NO.: // ve //); *S. gordonii* (SEKANS KOD NO.: // ve //); *B. bifidum* (SEKANS KOD NO.: // ve //); *L. salivarius* (SEKANS KOD NO.: // ve //); *F. tularensis* (SEKANS KOD NO.: // ve //) ve *L. pneumophila* (SEKANS KOD NO.: // ve //). Bazı türlerin iki Tip II CRISPR lokusunun her ikisini de içerdiğini gözden kaçırmayınız. Daha fazla aktive edici RNA sekansı rneği için bkz: SEKANS KOD NO.: 431-

25

562. Daha fazla hedef gösteren RNA sekansı dubleks oluşturuucu segmenti örneği için bkz: SEKANS KOD NO.: 563-679.

**Şekil 9'da**, iki türdeki tracrRNA (aktive edici RNA) ve crRNA (hedef gösteren RNA) sekansları gösterilmektedir. Aralarında belirli bir ölçüde birbirleri yerine kullanılabilirlik söz konusudur; örneğin, *S. pyogenes* Cas9/Csn1 proteini, *L. innocua* menşeli tracrRNA ve crRNA ile işlevsel olabilmektedir. "|" işareti bir kanonik Watson-Crick baz çiftini temsil etmekte, "•" işareti ise bir G-U oynak baz çiftini temsil etmektedir. "Değişken 20nt" ya da "20nt", bir hedef DNA'yı tamamlayıcı nitelikte olan DNA-hedefleyen segmenti temsil etmektedir (bu bölgenin uzunluğu yaklaşık 100 nükleotidi bulabilir). Hedef gösteren RNA ve aktive edici RNA'nın özelliklerini bünyesinde barındıran tek moleküllü DNA-hedefleyen RNA'nın tasarımı da şekilde gösterilmektedir. (Birçok farklı türdeki Cas9/Csn1 proteini sekansları Şekil 3'te gösterilmekte ve SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346 ile temsil edilmektedir) *Streptococcus pyogenes*: yukarıdan aşağıya doğru: (SEKANS KOD NO.: //, //, //); *Listeria innocua*: yukarıdan aşağıya doğru: (SEQ ID NO://, //, //). Sunulan sekanslar örnek niteliğindedir ve yalnızca, tek moleküllü DNA-hedefleyen RNA'ların ve iki moleküllü DNA-hedefleyen RNA'ların çeşitli farklı türlerdeki doğada kendiliğinden oluşan sekanslar temelinde nasıl tasarlanabileceğini ortaya koymak amacıyla gösterilmektedirler. Çeşitli türlerdeki uygun muhtelif sekans örnekleri aşağıda gösterildiği gibidir (Cas9 proteini: SEKANS KOD NO.: 1-259; tracrRNA'lar: SEKANS KOD NO.: 431-562 veya onların tamamlayıcıları; crRNA'lar: SEKANS KOD NO.: 563-679 veya onların

tamamlayıcıları ve tek moleküllü DNA-hedefleyen RNA örnekleri: SEKANS KOD NO.: 680-682).

**Şekiller 10A-E'de**, Cas9'un iki RNA molekülü tarafından  
5 yönlendirilen bir DNA endonükleaz olduğu gösterilmektedir. Şekil E (yukarıdan aşağıya doğru, SEKANS KOD NO.: 278-280 ve //).

**Şekiller 11A-B'de**, Cas9'un iki nükleaz domainini kullanarak hedef DNA'daki iki iplikçiği yardığı ortaya konmaktadır.

10

**Şekiller 12A-E'de**, hedef DNA'nın Cas9 katalizörlüğünde yarılması için tracrRNA'da bir aktive edici domain bulunmasının gerektiğı ve bu yarıma sürecinin crRNA'daki bir tohum sekansı tarafından yönlendirildiğı gösterilmektedir. Şekil 12C (yukarıdan aşağıya doğru, SEKANS KOD NO.: 278-280 ve //); Şekil 12D (yukarıdan aşağıya doğru, SEKANS KOD NO.: 281-290) ve Şekil 12E (yukarıdan aşağıya doğru, SEKANS KOD NO.: 291-292, 283, 293-298).

**Şekiller 13A-C'de**, Cas9-tracrRNA:crRNA kompleksinin hedef  
20 DNA'yı yarabilmesi için bir PAM sekansının bulunmasının gerekli olduğu gösterilmektedir.

**Şekiller 14A-C'de**, Cas9'un tracrRNA ve crRNA özelliklerini bir arada bünyesinde bulunduran bir tasarlanmış tekil RNA molekülü  
25 kullanılarak programlanabileceğı gösterilmektedir. Kimera A (ŞEKANS KOD NO.: 299); Kimera B (SEKANS KOD NO.: 300).

**Şekil 15'te**, tip II RNA-aracılı CRISPR/Cas immün yolağı gösterilmektedir.

**Şekiller 16A-B'de**, Cas9 nükleazların saflaştırılması gösterilmektedir.

5

**Şekiller 17A-C'de**, iki yönlü tracrRNA:crRNA'nın yönlendirdiği Cas9'un ön-aralık plazmidini ve oligonükleotid DNA'sını yardığı gösterilmektedir. Şekil 17B (yukarıdan aşağıya doğru, SEKANS KOD NO.: 301-303 ve //) ve Şekil 17C (yukarıdan aşağıya doğru, SEKANS

10 KOD NO.: 304-306 ve //).

**Şekiller 18A-B'de**, Cas9'un 3'-5' eksonükleaz aktivitesine sahip olan bir Mg<sup>2+</sup>-bağımlı endonükleaz olduğu gösterilmektedir.

15 **Şekiller 19A-C'de**, Cas9'un iki yönlü tracrRNA:crRNA'nın yönlendirmesiyle hedef DNA'da gerçekleştirdiği yarma olayının yer-spesifik olduğu gösterilmektedir. Şekil 19C (yukarıdan aşağıya doğru, SEKANS KOD NO.: 307-309, //, 337-339 ve //).

20 **Şekiller 20A-B'de**, Cas9'un iki yönlü tracrRNA:crRNA'nın yönlendirmesiyle hedef DNA'da gerçekleştirdiği yarma olayının hızlı ve etkili olduğu gösterilmektedir.

25 **Şekiller 21A-B'de**, tamamlayıcı olan ve olmayan DNA iplikçiklerindeki yarılmamanın sırasıyla Cas9'un HNH ve RuvC-benzeri domainleri tarafından gerçekleştirildiği gösterilmektedir.

**Şekil 22'de**, hedef DNA'nın tanınması için tracrRNA'nın gerekli olduğu ortaya konmaktadır.

**Şekiller 23A-B'de**, tracrRNA'daki asgari boyutlardaki bir bölgenin hedef DNA'da iki yönlü tracrRNA:crRNA'nın etkisiyle gerçekleşen yarılmayı yönlendirmek için yeterli olduğu gösterilmektedir.

**Şekiller 24A-D'de**, hedef DNA'da iki yönlü tracrRNA:crRNA'nın yönlendirmesiyle Cas9 tarafından gerçekleştirilen yarılmamanın tür-spesifik olabileceği ortaya konmaktadır.

**Şekiller 25A-C'de**, hedef DNA'da iki yönlü tracrRNA:crRNA'nın yönlendirmesiyle Cas9 tarafından gerçekleştirilen yarma olayının crRNA'daki bir tohum sekansı tarafından yönetildiği gösterilmektedir.

15 **Şekil 25A:** hedef DNA prob 1 (SEKANS KOD NO.: 310); aralık 4 crRNA (1-42) (SEKANS KOD NO.: 311); tracrRNA (15-89) (SEKANS KOD NO.: //). **Şekil 25B sol panel** (SEKANS KOD NO.: 310).

20 **Şekiller 26-C'de**, Cas9-tracrRNA:crRNA tarafından aralık plazmid DNA'sının yarılabilmesi ve bakteri hücrelerinde Cas9-aracılı plazmid DNA enterferansının söz konusu olabilmesi için PAM sekansının bulunmasının gerekli olduğu ortaya konmaktadır. **Şekil 26B** (yukarıdan aşağıya doğru, SEKANS KOD NO.: 312-314) ve **Şekil**

25 **26C** (yukarıdan aşağıya doğru, SEKANS KOD NO.: 315-320).

**Şekiller 27A-C'de**, Cas9'un iki yönlü tracrRNA:crRNA'yı taklit eden bir tekil kimerik RNA'nın yönlendirmesiyle de aralık DNA'sını

yarabildiği gösterilmektedir. Şekil 27C (yukarıdan aşağıya doğru, SEKANS KOD NO.: 321-324).

**Şekiller 28A-D'de**, Yeşil Floresan Protein (GFP) gen sekansını hedef alan kimerik RNA'ların de novo tasarımı gösterilmektedir. Şekil 28B (yukarıdan aşağıya doğru, SEKANS KOD NO.: 325-326). Şekil 28C: GFP1 hedef sekansı (SEKANS KOD NO.: 327); GFP2 hedef sekansı (SEKANS KOD NO.: 328); GFP3 hedef sekansı (SEKANS KOD NO.: 329); GFP4 hedef sekansı (SEKANS KOD NO.: 330); GFP5 hedef sekansı (SEKANS KOD NO.: 331); GFP1 kimerik RNA'sı (SEKANS KOD NO.: 332); GFP2 kimerik RNA'sı (SEKANS KOD NO.: 333); GFP3 kimerik RNA'sı (SEKANS KOD NO.: 334); GFP4 kimerik RNA'sı (SEKANS KOD NO.: 335); GFP5 kimerik RNA'sı (SEKANS KOD NO.: 336).

15

**Şekiller 29A-E'de**, Cas9 ve yönlendirici RNA insan hücrelerinde birlikte eksprese olduklarında hedef lokusta çift iplikçik DNA kırıklarının oluştuğu ortaya konmaktadır. Şekil 29C (yukarıdan aşağıya doğru, SEKANS KOD NO.: 425-428).

20

**Şekiller 30A-B'de**, hücre lizatlarının aktif Cas9:sgRNA içerdikleri ve yer-spesifik DNA yarılmasını destekledikleri ortaya konmaktadır.

**Şekiller 31A-B'de**, sgRNA yapılarının 3' ucundaki uzatmanın yer-spesifik NHEJ-aracılı mutagenezi artırdıkları ortaya konmaktadır. Şekil 31A (yukarıdan aşağıya doğru, SEKANS KOD NO.: 428-430).

25

**Şekiller 32A-B'de**, çeşitli organizmalardaki temsili Cas9 sekanslarından oluşan bir filogenetik ağaç (**A**) ve ayrıca bu ağaçtaki ana gruplara ilişkin Cas9 lokusu mimarileri (**B**) gösterilmektedir.

- 5 **Şekiller 33A-E'de**, seçilen bakteriyel türlerdeki tip II CRISPR-Cas mimarileri gösterilmektedir.

**Şekiller 34A-B'de**, seçilen tip II CRISPR Cas sistemlerinde tracrRNA ve pre-crRNA'nın birlikte işleme olayı gösterilmektedir. Şekil 34A  
10 (yukarıdan aşağıya doğru, SEKANS KOD NO.: //, //, //, //, //, //, //, //);  
Şekil 34B (yukarıdan aşağıya doğru, SEKANS KOD NO.: //, //, //, //).

**Şekil 35'te**, tracrRNA ortologları arasında yapılan bir sekans hizalaması gösterilerek tracrRNA sekanslarının çeşitliliği ortaya  
15 konmaktadır.

**Şekiller 36A-F'de**, derin RNA sekanslaması yoluyla açığa çıkarılan bakteriyel tracrRNA ortoloğu ve crRNA ekspresyonları gösterilmektedir.  
20

**Şekiller 37A-O'da**, çalışılan bakteriyel türlere istinaden yapılan sekanslamalar yoluyla elde edilen tüm tracrRNA ortologları ve matür crRNA'lar, koordinatları (ilgilenilen bölge) ve mütakabil cDNA sekansları (5' → 3') ile birlikte listelenmektedir.  
25

**Şekiller 38A-B'de**, imza geni cas9'un varlığı ile karakterize edilen tip II CRISPR-Cas lokusları içeren bakteriyel türlerin listelendiği bir

tablo sunulmaktadır. Bu sekanslar, filogenetik analizler için kullanılmışlardır.

**Şekiller 39A-B'de**, CRISPR enterferans (CRISPRi) sisteminin tasarımı gösterilmektedir.

**Şekiller 40A-E'de**, CRISPRi'nin transkripsiyon uzama ve başlama basamaklarını etkili ölçüde susturabildiği ortaya konmaktadır.

**Şekiller 41A-B'de**, CRISPRi'nin transkripsiyon uzamasını bloke etmek suretiyle işlev gösterdiği ortaya konmaktadır.

**Şekiller 42A-C'de**, CRISPRi sisteminin hedefleme spesifisitesi gösterilmektedir.

15

**Şekiller 43A-F'de**, susturma etkinliğini etkileyen faktörlerin karakterizasyonu resmedilmektedir.

**Şekiller 44A-C'de**, CRISPRi gen knockdown'u kullanılan kompleks bir düzenleyici ağın fonksiyonel profili resmedilmektedir.

20

**Şekiller 45A-B'de**, memeli hücrelerinde CRISPRi kullanılarak gen susturması yapılabileceği ortaya konmaktadır.

**Şekil 46'da**, *S. pyogenes* tip II CRISPR sisteminin mekanizması gösterilmektedir.

25



**Şekiller 47A-B'de**, dCas9 ve sgRNA ile birlikte transforme edilen *E. coli* hücre kültürlerinin çoğalma eğrileri gösterilmektedir.

**Şekil 48'de**, CRISPRi'nin bir çok kopyalı plazmidde bir raportör genin ekspresyonunu susturabildiği gösterilmektedir.

**Şekiller 49A-C'de**, farklı genleri hedef alan sgRNA'ların bulunduğu hücrelerde kaydedilen RNA-sekans verileri gösterilmektedir.

**Şekille 50A-E'de**, komşu ikili yanlış eşleşmelerin bulunduğu sgRNA'ların susturucu etkileri gösterilmektedir.

**Şekiller 51A-C'de**, tek bir geni düzenlemek için iki sgRNA'nın kullanılmasının kombinasyonel susturucu etkileri gösterilmektedir.

15

**Şekil 52'de**, sgRNA baskılamasının hedef lokuslara ve transkripsiyon başlangıcından nispi uzaklığa bağlı olduğu gösterilmektedir.

**Şekiller 53A-C'de**, dCas9'un sadece RuvC1 domaininde (örneğin D10A), sadece HNH domaininde (örneğin H840A) ya da her iki domainde de (örneğin D10A ve H8340A) azaltılmış aktiviteye sahip olduğu bir varyant Cas9 yer-hedefli polipeptidin (dCas9) buluşa uygun yöntemlerde işe yarayacağını kanıtlayan deneysel sonuçlar sunulmaktadır.

25

**Şekiller 54A-C'de**, buluşa uygun bir varyant Cas9 yer-hedefli polipeptid için uygun füzyon partneri örnekleri (veya onların

fragmanları) listelenmektedir. Buna verilebilecek örnekler sadece söz konusu şekillerde listelenenlerle sınırlı değildir.

**Şekiller 55A-D'de**, bir kimerik yer-hedefli polipeptid kullanılarak insan hücrelerinde transkripsiyonun aktive edilebileceği (artırılabilirliği) ortaya konmaktadır.

**Şekil 56'da**, bir kimerik yer-hedefli polipeptid kullanılarak insan hücrelerinde transkripsiyonun baskılanabileceği (azaltılabilirliği) ortaya konmaktadır.

**Şekiller 57A-B'de**, doğada kendiliğinden oluşan tracrRNA'lar ve crRNA'lar ile hemen hemen %50 oranında özdeşlik sergileyen yapay sekansların DNA-hedefleyen RNA'nın protein-bağımlı domaininin yapısı korunduğu sürece Cas9 ile birlikte çalışarak hedef DNA'yı yarabilecekleri ortaya konmaktadır.

## **TANIMLAR - BÖLÜM I**

"Polinükleotid" ve "nükleik asit" terimleri burada birbirlerine alternatif terimler olarak, ister ribonükleotid ister deoksiribonükleotid olsun nükleotidlerden oluşan herhangi bir uzunluktaki bir polimerik forma atıf yapmak amacıyla kullanılmaktadırlar. Dolayısıyla bu terimler, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, tek-, çift- veya çok-iplikli DNA veya RNA'yı, genomik DNA'yı, cDNA'yı, DNA-RNA hibritlerini ve pürin ve pirimidin bazlarından veya başka doğal, kimyasal veya biyokimyasal olarak modifiye edilmiş, doğal olmayan veya türetilmiş nükleotid bazlarından oluşan bir polimeri içine alan bir

anlam taşımaktadırlar. "Oligonükleotid" terimi, genelde, bir tek- veya çiftlikçikli DNA'daki yaklaşık 5 ilâ yaklaşık 100 adet nükleotidden oluşan polinükleotidlere atıf yapar. Bununla birlikte, bu buluşun amaçları bakımından oligonükleotid uzunluğu için bir üst limit sözü konusu değildir. Oligonükleotidler, "oligomerler" ya da "oligolar" olarak da bilinirler ve sektörde bilinen uygun yöntemlerden istifade edilerek genlerden izole edilebilir veyahut kimyasal olarak sentezlenebilirler. "Polinükleotid" ve "nükleik asit" terimleri, burada açıklanan buluş yapıları kapsamında hem tekiplikçikli (örneğin sens veya antisens) polinükleotidleri hem de çiftlikçikli polinükleotidleri içine alan bir anlamda okunmalı ve anlaşılmalıdırlar.

"Sap-ilmik yapısı" terimi kullanıldığında, bir tarafından ağırlıklı olarak tekiplikçikli nükleotidlerden oluşan bir bölgeye (ilmik kısmı) bağlı bir çift iplikçik (sap kısmı) oluşturdukları bilinen veya oluşturacakları öngörülen nükleotidlerin meydana getirdiği bir bölge içeren bir sekonder yapı sahibi bir nükleik aside atıf yapılmış olunur. Burada sap-ilmik yapılarına atıf yapmak için "saç tokası" ve "geri katlanma" terimleri de kullanılmaktadır. Bu yapılar sektörde iyi bilinmekte olup, bunları temsilen kullanılan terimler sektörde bilinen anlamlarıyla kullanılmaktadırlar. Sektörde bilindiği üzere, bir sap-ilmik yapısı tam ve kesin bir baz eşleşmesi olmasını gerektirmez. Dolayısıyla sap kısmında bir veya daha fazla sayıda yanlış baz eşleşmesi sözü konusu olabilir. Alternatif olarak, baz eşleşmesi mükemmel ölçüde de olabilir, yani hiç yanlış eşleşme bulunmaması da mümkündür.

"Hibridize edilebilir" ya da "tamamlayıcı" ya da "büyük ölçüde tamamlayıcı" terimi ile, uygun in vitro ve/veya in vivo sıcaklık ve çözelti iyonik kuvveti koşulları altında başka bir nükleik aside paralel olmayan ve sekans-spesifik bir şekilde (yani bir nükleik asidin bir tamamlayıcı nükleik aside spesifik bağlanması) ve kovalent olmayan bir tarzda bağlanabilmesini, yani onunla birlikte Watson-Crick baz çiftleri ve/veya G/U baz çiftleri oluşturabilmesini, onunla "kaynaşabilmesini" ya da ona "hibridize olabilmelerini" sağlayan bir nükleotid sekansına sahip olan bir nükleik aside (örneğin RNA) atıf yapılıır. Sektörde bilindiği üzere, standart Watson-Crick baz eşleşmesi aşağıda belirtilen eşleşmeleri kapsar: timidin (T) ile eşleşen adenin (A), urasil (U) ile eşleşen adenin (A) ve sitozin (C) ile eşleşen guanin (G) [DNA, RNA]. Bunların yanı sıra, yine sektörde bilindiği üzere, iki RNA molekülü (örneğin dsRNA) arasında hibridizasyon meydana gelebilmesi için guanin (G) ile urasilden (U) oluşan baz çiftlerinin söz konusu olması gereklidir. Örneğin, G/U baz eşleşmesi, tRNA antikodonları ile mRNA'daki kodonlar arasında meydana gelen baz eşleşmelerinde genetik kodun dejenerasyonundan (yani gen fazlalığı) kısmen sorumludur. Bu buluş bağlamında, buluşa uygun bir DNA-hedefleyen RNA molekülünün protein-bağlanımlı segmentindeki (dsRNA dubleks) bir guanin (G) bir urasili (U) tamamlayıcı olarak değerlendirilir ve aynı şekilde bir urasil de bir guanini tamamlayıcı olarak değerlendirilir. Bu bakımdan, buluşa uygun bir DNA-hedefleyen RNA molekülünün protein-bağlanımlı segmentindeki (dsRNA dubleks) belirli bir nükleotid pozisyonunda bir G/U baz çiftinin yapılması mümkünse, söz konusu pozisyon tamamlayıcı olmayan bir pozisyon olarak değil de tamamlayıcı olan bir pozisyon olarak değerlendirilir.

Hibridizasyon ve yıkama koşulları iyi bilinmekte olup, "Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1989)" eserinde ve özellikle de bu eserdeki Bölüm 11 ve Tablo 11.1 kapsamında ve "Sambrook, J. and Russell, W., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (2001)" eserinde örneklendirilmektedirler. Sıcaklık ve iyonik kuvvet koşulları, hibridizasyonun "zorlayıcılığını" belirleyen unsurlardır.

10

Hibridizasyon, bazlar arasında yanlış eşleşmeler meydana gelmesi ihtimalini dışlamaksızın ilgili iki nükleik asitte birbirini tamamlayıcı sekanslar bulunmasını gerektirir. İki nükleik asit arasında hibridizasyon yapılabilmesi için ideal koşulların ne olduğu, nükleik asitlerin uzunluğuna ve tamamlayıcılık derecesine ve sektörde iyi bilinen diğer ilgili değişkenlere bağlıdır. İki nükleotid sekansı arasındaki tamamlayıcılık derecesi ne kadar yüksekse, bu sekanslara sahip olan nükleik asitlerin hibritlerine ilişkin erime sıcaklığı ( $T_m$ ) değerleri de o kadar yüksek olur. Tamamlayıcılık kesitleri kısa (35 veya daha az sayıda, 30 veya daha az sayıda, 25 veya daha az sayıda, 22 veya daha az sayıda, 20 veya daha az sayıda ya da 18 veya daha az sayıda nükleotid boyunca tamamlayıcılık) olan nükleik asitler arasındaki hibridizasyonlarda, yanlış eşleşmelerin hangi pozisyonlarda buldukları önemli hale gelir (bkz: Sambrook et al., yukarıda atıf yapılan eser, 11.7-11.8). Bir hibridize edilebilir nükleik asit normalde en az yaklaşık 10 nükleotidden oluşur. Örnek niteliğindeki hibridize edilebilir nükleik asit asgari uzunlukları olarak şunlar gösterilebilir: en az yaklaşık 15 nükleotid; en az yaklaşık 20 nükleotid; en az yaklaşık

25

22 nükleotid; en az yaklaşık 25 nükleotid ve en az yaklaşık 30 nükleotid. Bunlara ek olarak, sektörde bilgi ve beceri sahibi uzmanlar, sıcaklık ve yıkama çözeltisi tuz konsantrasyonunda tamamlayıcılık bölgesinin uzunluğu ve tamamlayıcılık derecesi gibi faktörlere bağlı olarak gerektiğinde ayarlama yapılabileceğini fark edeceklerdir.

Sektörde bilindiği ve kabul edildiği üzere, bir polinükleotidin sekansının ilgili hedef nükleik asidin sekansına hibridize edilebilir veya spesifik olarak hibridize edilebilir olması için o sekansı %100 oranında tamamlayıcı nitelikte olması gerekmez. Ayrıca, bir polinükleotid sadece bir veya daha fazla sayıda segment üzerinden hibridize olabilir, dolayısıyla ara segmentler veya komşu segmentler hibridizasyon olayında yer almayabilirler (örneğin bir ilmik yapısı veya saç tokası yapısı). Bir polinükleotidin sekansı, hedef aldığı hedef nükleik asit sekansındaki bir hedef bölgeyi en az %70, en az %80, en az %90, en az %95, en az %99 veya en az %100 oranında tamamlayıcı nitelikte olabilir. Örneğin, içeriğindeki 20 nükleotidden 18'i bir hedef bölgeyi tamamlayıcı nitelikte olan ve dolayısıyla o hedef bölgeye spesifik hibridize olması mümkün olan bir antisens nükleik asit %90 oranında tamamlayıcıdır. Bu örnekte, diğer tamamlayıcı olmayan nükleotidler tamamlayıcı nükleotidler ile bir arada küme halinde bulunabilecekleri gibi tamamlayıcı nükleotidlerin aralarına karışmış da olabilirler ve birbirlerine ya da tamamlayıcı nükleotidlere bitişik olmaları şart değildir. Nükleik asitlerdeki belirli nükleik asit sekansı kesitleri arasındaki tamamlayıcılık oranı, alışıldığı gibi, sektörde bilinen BLAST programları (temel lokal hizalama arama araçları) ve PowerBLAST programları (Altschul et al., J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410; Zhang and Madden, Genome Res., 1997, 7, 649-656)

kullanılarak ya da Smith ve Waterman algoritmasının (Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482-489) kullanıldığı Gap programı (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wis.) varsayılan  
5 ayarlarında kullanılarak belirlenebilir.

"Peptid", "polipeptid" ve "protein" terimleri burada birbirlerine alternatif terimler olarak, kodlanan ve kodlanmayan amino asitler ve kimyasal veya biyokimyasal olarak modifiye edilmiş veya türetilmiş  
10 amino asitler ihtiva edebilecek olan, amino asitlerden müteşekkil herhangi bir uzunluktaki bir polimerik forma ve modifiye peptid omurgalarına sahip polipeptidlere atıf yapmak amacıyla kullanılmaktadırlar.

15 Burada (örneğin bir polipeptidin bir RNA-bağlanımlı domainine atfen) kullanıldığı anlamıyla "bağlanma" terimi, makromoleküller arasındaki (örneğin bir protein ile bir nükleik asit arasındaki) kovalent olmayan bir etkileşimi ifade eder. Bir kovalent olmayan etkileşim betimlenirken, ilgili makromoleküllerin birbirleriyle "ilişkili  
20 oldukları" veya birbirleriyle "etkileşime girdikleri" veya birbirlerine "bağlandıkları" söylenir (örneğin bir X molekülünün bir Y molekülü ile etkileşime girdiği belirtildiğinde kastedilen, X molekülünün Y molekülüne kovalent olmayan bir tarzda bağlandığıdır). Bir bağlanma etkileşiminin her bileşeni sekans-spesifik olmayabilir (örneğin bir  
25 DNA omurgasındaki fosfat artıkları ile temas kurabilir) ve bir bağlanma etkileşiminin bazı kısımları sekans-spesifik olabilir. Bağlanma etkileşimleri genelde  $10^{-6}$  M'den küçük,  $10^{-7}$  M'den küçük,  $10^{-8}$  M'den küçük,  $10^{-9}$  M'den küçük,  $10^{-10}$  M'den küçük,  $10^{-11}$  M'den

küçük,  $10^{-12}$  M'den küçük,  $10^{-13}$  M'den küçük,  $10^{-14}$  M'den küçük veya  $10^{-15}$  M'den küçük bir ayrışma sabiti (Kd) ile karakterize edilirler. "Afinite", bağlanma kuvvetine atıf yapar ve Kd değeri ne kadar küçükse bağlanma afinitesi de o kadar büyüktür.

5

"Bağlanma domaini" terimi, başka bir moleküle kovalent olmayan tarzda bağlanma kabiliyeti bulunan bir protein domainine atıf yapar. Bir bağlanma domaini, örneğin bir DNA molekülüne (bir DNA-bağlanımlı protein), bir RNA molekülüne (bir RNA-bağlanımlı protein) ve/veya bir protein molekülüne (bir protein-bağlanımlı protein) bağlanabilir. Bir protein domaini-bağlanımlı protein söz konusu ise, bu protein kendisine (homodimerler, homotrimerler ve benzeri unsurlar oluşturmak maksadıyla) ve/veya farklı bir proteinin veya proteinlerin bir veya daha fazla sayıda molekülüne bağlanabilir.

15

"Konservatif amino asit ikamesi" terimi, benzer yan zincirlere sahip olan amino asit artıklarından oluşan proteinlerdeki birbiriyle değiştirilebilirliğe atıf yapar. Örneğin, alifatik yan zincirlere sahip olan amino asitlerden oluşan bir amino asit grubunda glisin, alanin, valin, lösin ve izolösin bulunur; alifatik-hidroksil yan zincirlere sahip olan amino asitlerden oluşan bir amino asit grubunda serin ve treonin bulunur; yan zincirleri üzerinde amid barındıran amino asitlerden oluşan bir amino asit grubunda asparajin ve glutamin bulunur; aromatik yan zincirlere sahip olan amino asitlerden oluşan bir amino asit grubunda fenilalanin, tirozin ve triptofan bulunur; bazik yan zincirlere sahip olan amino asitlerden oluşan bir amino asit grubunda lizin, arjinin ve histidin bulunur; asidik yan zincirlere sahip olan amino asitlerden oluşan bir grupta glutamat ve asparat bulunur ve yan

25



zincirleri üzerinde sülfür barındıran amino asitlerden oluşan bir amino asit grubunda sistein ve metionin bulunur. Konservatif amino asit ikame gruplarına verilebilecek örnekler arasında, valin-lösin-izolösin, fenilalanin-tirozin, lizin-arjinin, alanin-valin ve asparajin-glutamin sayılabilir.

Bir polinükleotid veya polipeptidin başka bir polinükleotid veya polipeptid ile belirli bir oranda "sekans özdeşliğine" sahip olması, bu iki unsur hizalandığında bunların sekanslarındaki bazlar veya amino asitlerin belirli bir kısmının aynı olduğu ve birbirlerine göre aynı pozisyonlarda bulunduğu anlamına gelir. Sekans özdeşliği, birçok farklı yolla belirlenebilir. Sekanslar internette [ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), [ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/](http://ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/), [ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/](http://ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/), [mafft.cbrc.jp/alignment/software/](http://mafft.cbrc.jp/alignment/software/) gibi web sitelerinden erişilebilecek olan çeşitli yöntemler ve bilgisayar programları (örneğin BLAST, T-COFFEE, MUSCLE, MAFFT ve benzeri) ile hizalanarak aralarındaki sekans özdeşliği belirlenebilir. Örneğin bkz: Altschul et al. (1990), J. Mol. Biol. 215:403-10.

Belirli bir RNA'yı "kodlayan" bir DNA sekansı, o RNA'ya transkribe olan bir DNA nükleik asit sekansıdır. Bir DNA polinükleotidi, proteine translate olan bir RNA (mRNA) ya da proteine translate olmayan bir RNA (örneğin tRNA, rRNA veya bir DNA-hedefleyen RNA; "kodlamayan" RNA veya "ncRNA" olarak da adlandırılır) kodlayabilir.

Bir "protein kodlama sekansı" ya da belirli bir protein veya polipeptidi kodlayan bir sekans, uygun düzenleyici sekansların bulunduğu in vitro

veya in vivo ortamda bu sekansların kontrolü altında mRNA'ya transkribe olan (DNA ise) ve bir polipeptide translate olan (mRNA ise) bir nükleik asit sekansıdır. Kodlama sekansının sınırlarını, 5' terminal ucundaki (N-terminusu) bir başlangıç kodonu ve 3' terminal ucundaki (C-terminusu) bir translasyon bitiş anlamsız kodonu belirler. Kodlama sekansı, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, bir prokaryotik veya ökaryotik mRNA'dan gelen bir cDNA, bir prokaryotik veya ökaryotik DNA'dan gelen bir genomik DNA sekansı ya da bir sentetik nükleik asit olabilir. Bir transkripsiyon terminasyon sekansı genelde kodlama sekansının 3' ucunda yer alır.

Burada kullanıldığı anlamıyla bir "promotör sekans", RNA polimeraza bağlanma ve downstream kısımdaki (3' yönündeki) bir kodlayan veya kodlamayan sekansın transkripsiyonunu başlatma kabiliyetine sahip olan bir düzenleyici DNA bölgesidir. Buluşun tanımlanmasını sağlamak bakımından belirtilmesi gerekir ki, promotör sekans 3' terminal ucundan transkripsiyon başlangıç yerine bağlıdır ve arka plan seviyesinden yüksek tespit edilebilir seviyelerde transkripsiyon başlatmak için gerekli asgari sayıda baz veya elemanı içine alacak ölçüde upstream yönünde (5' yönünde) uzanır. Promotör sekans içerisinde, bir transkripsiyon başlangıç yeri ve ayrıca, RNA polimerazın bağlanmasını sağlayan protein-bağlanımlı domainler bulunur. Ökaryotik promotörlerde her zaman olmasa da genelde "TATA" kutuları ve "CAT" kutuları bulunur. İndüklenebilir promotörlerin de aralarında bulunduğu muhtelif promotörler, buluşa konu olan çeşitli vektörleri yönlendirmek amacıyla kullanılabilirler.

- Bir promotör; bir konstitütif olarak aktif promotör (yani, konstitütif olarak aktif/"AÇIK" halde bulunan bir promotör), bir indüklenabilir promotör (yani, aktif/"AÇIK" halde mi yoksa inaktif/"KAPALI" halde mi bulunacağı, bir dışsal uyarının varlığına, örneğin belirli bir sıcaklık
- 5 değerin söz konusu olup olmamasına ya da belirli bir bileşik veya proteinin bulunup bulunmamasına göre belirlenen bir promotör), uzam bakımdan kısıtları bulunan bir promotör (yani transkripsiyonel kontrol elemanı, artırıcı ve benzeri) (örneğin doku-spesifik promotör, hücre tipi-spesifik promotör ve benzeri) ya da zaman bakımından kısıtları
- 10 bulunan bir promotör(yani, promotör, embriyonik gelişimin belirli safhaları esnasında ya da bir biyolojik prosesin örneğin farelerdeki kıl folikülü döngüsünün belirli safhaları esnasında "AÇIK" ya da "KAPALI" halde bulunur) olabilir.
- 15 Uygun promotörler virüslerden edinilebilirler ve böyle promotörlere viral promotörler olarak atıf yapılabilir ya da ister prokaryotik ister ökaryotik nitelikte olan herhangi bir organizmadan elde edilebilirler. Uygun promotörler, herhangi bir RNA polimerazla (örneğin pol I, pol II, pol III) ekspresyonu yönlendirmek için kullanılabilirler. Promotör
- 20 örnekleri arasında, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, SV40 erken promotörü, fare meme tümörü virüsü uzun terminal tekrarı (LTR) promotörü, adenovirüs majör geç promotörü (Ad MLP), bir herpes simpleks virüsü (HSV) promotörü, bir sitomegalovirüs (CMV) promotörü, örneğin CMV ilk erken promotör bölgesi (CMVIE), bir
- 25 rous sarkoma virüsü (RSV) promotörü, bir insan U6 küçük nükleer promotörü (U6) (Miyagishi et al., Nature Biotechnology 20, 497 - 500 (2002)), bir geliştirilmiş U6 promotörü (örneğin bkz: Xia et al.,

Nucleic Acids Res. 2003 Sep 1;31(17)), bir insan H1 promotörü (H1) ve benzeri promotörler sayılabilir.

İndüklenebilir promotörlere verilebilecek örnekler arasında, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, T7 RNA polimeraz promotörü, T3 RNA polimeraz promotörü, izopropil-beta-D-tiogalaktopiranozitin (IPTG) düzenlediği promotör, laktozu indüklediği promotör, ısı şok promotörü, tetrasiklinin düzenlediği promotör, steroidin düzenlediği promotör, metalin düzenlediği promotör, östrojen reseptörünün düzenlediği promotör ve benzeri promotörler bulunur. Dolayısıyla, indüklenebilir promotörler, aralarında sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın doksisiklin, RNA polimeraz, örneğin T7 RNA polimeraz, bir östrojen reseptörü, bir östrojen reseptörü füzyonu ve benzeri moleküllerin bulunduğu moleküllerle düzenlenebilirler.

15

Buluşun bazı yapılarında, promotör, uzam bakımından kısıtları bulunan bir promotördür (yani hücre tipi-spesifik promotör, doku-spesifik promotör ve benzeri), örneğin bir çokhücreli organizmada sadece belirli hücrelerden oluşan bir hücre altkümesinde aktiftir (yani "AÇIK"). Uzam bakımından kısıtları bulunan promotörlere artırıcılar, transkripsiyonel kontrol elemanları, kontrol sekansları ve benzeri başka adlarla da atıf yapılabilir. Uygun herhangi bir uzam bakımından kısıtları bulunan promotör kullanılabilir; hangi promotörün (örneğin bir beyin-spesifik promotör, bir nöron altkümesindeki ekspresyonu yönlendiren bir promotör, germ hattındaki ekspresyonu yönlendiren bir promotör, akciğerlerdeki ekspresyonu yönlendiren bir promotör, kaslardaki ekspresyonu yönlendiren bir promotör, pankreas adacık hücrelerindeki ekspresyonu yönlendiren bir promotör ve benzeri

25

- promotörler) en uygunu olduğu, ilgili organizmanın ne olduğuna bağlıdır. Örneğin bitkiler, sinekler, solucanlar, memeliler, fareler ve benzeri canlılar için bilinen çeşitli farklı uzam bakımından kısıtları bulunan promotörler söz konusudur. Dolayısıyla, bir uzam
- 5 bakımından kısıtları bulunan promotör, organizmanın ne olduğuna bağlı olarak türlü çeşit farklı dokuda ve hücre tipinde, buluşa uygun bir yer-hedefli modifiye edici polipeptidi kodlayan bir nükleik asidin ekspresyonunu düzenlemek için kullanılabilir. Bazı uzam bakımından kısıtları bulunan promotörlerde aynı zamanda zaman bakımından da
- 10 kısıtlar söz konusudur; böyle bir promotör örneğin embriyonik gelişimin belirli safhaları esnasında ya da bir biyolojik prosesin (örneğin farelerdeki kıl folikülü döngüsü) belirli safhaları esnasında "AÇIK" ya da "KAPALI" halde bulunur.
- 15 Uzam bakımından kısıtları bulunan promotörlere örnek olarak, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, nöron-spesifik promotörler, adiposit-spesifik promotörler, kardiyomiyosit-spesifik promotörler, düz kas-spesifik promotörler, fotoreseptör-spesifik promotörler ve benzeri promotörler gösterilebilir. Uzam bakımından kısıtları bulunan nöron-spesifik promotörler arasında, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, bir
- 20 nöron-spesifik enolaz (NSE) promotörü (örneğin bkz: EMBL HSENO2, X51956), bir aromatik amino asit dekarboksilaz (AADC) promotörü, bir nörofilamen promotörü (örneğin bkz: GenBank HUMNFL, L04147), bir sinapsin promotörü (örneğin bkz: GenBank HUMSYNIB, M55301), bir thy-1 promotörü (örneğin bkz: Chen et al. (1987) Cell 51:7-19; Llewellyn, et al. (2010) Nat. Med. 16(10):1161-1166), bir serotonin reseptörü promotörü (örneğin bkz: GenBank S62283); bir tirozin hidroksilaz promotörü (TH) (örneğin bkz: Oh et
- 25

al. (2009) *Gene Ther* 16:437; Sasaoka et al. (1992) *Mol. Brain Res.* 16:274; Boundy et al. (1998) *J. Neurosci.* 18:9989; Kaneda et al. (1991) *Neuron* 6:583-594), bir GnRH promotörü (örneğin bkz: Radovick et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:3402-3406), bir L7 promotörü (örneğin bkz: Oberdick et al. (1990) *Science* 248:223-226), bir DNMT promotörü (örneğin bkz: Bartge et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:3648-3652); bir enkefalin promotörü (örneğin bkz: Comb et al. (1988) *EMBO J.* 17:3793-3805), bir miyelin bazik protein (MBP) promotörü, bir Ca<sup>2+</sup>-kalmodulin-bağımlı protein kinaz II-alfa (CamKII $\alpha$ ) promotörü (örneğin bkz: Mayford et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:13250; Casanova et al. (2001) *Genesis* 31:37), bir CMV artırıcı/trombosit-kaynaklı büyüme faktörü- $\beta$  promotörü (örneğin bkz: Liu et al. (2004) *Gene Therapy* 11:52-60) ve benzeri promotörler sayılabilir.

Uzam bakımından sınırları bulunan adiposit-spesifik promotörler arasında, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, bir aP2 geni promotörü/artırıcısı, örneğin bir insan aP2 geninin -5,4 ilâ +21 bp'sinden oluşan bölgesi (örneğin bkz: Tozzo et al. (1997) *Endocrinol.* 138:1604; Ross et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:9590; Pavjani et al. (2005) *Nat. Med.* 11:797), bir glukoz taşıyıcı-4 (GLUT4) promotörü (örneğin bkz: Knight et al. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:14725), bir yağ asidi translokaz (FAT/CD36) promotörü (örneğin bkz: Kuriki et al. (2002) *Biol. Pharm. Bull.* 25:1476; Sato et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277:15703); bir stearoil-CoA desaturaz-1 (SCD1) promotörü (Tabor et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274:20603), bir leptin promotörü (örneğin bkz: Mason et al.

(1998) *Endocrinol.* 139:1013; Chen et al. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 262:187), bir adiponektin promotörü (örneğin bkz: Kita et al. (2005) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 331:484; Chakrabarti (2010) *Endocrinol.* 151:2408), bir adipsin promotörü (örneğin bkz: Platt et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:7490), bir resistin promotörü (örneğin bkz: Seo et al. (2003) *Molec. Endocrinol.* 17:1522) ve benzeri promotörler sayılabilir.

Uzam bakımından kısıtları bulunan kardiyomiyosit-spesifik promotörler arasında, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, aşağıda belirtilen genlerden elde edilebilecek olan kontrol sekansları bulunur: miyosin hafif zinciri-2,  $\alpha$ -miyosin ağır zinciri, AE3, kardiyak troponin C, kardiyak aktin ve benzerleri. Franz et al. (1997) *Cardiovasc. Res.* 35:560-566; Robbins et al. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 752:492-505; Linn et al. (1995) *Circ. Res.* 76:584-591; Parmacek et al. (1994) *Mol. Cell. Biol.* 14:1870-1885; Hunter et al. (1993) *Hypertension* 22:608-617; Sartorelli et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4047-4051.

Uzam bakımından kısıtları bulunan düz kas-spesifik promotörler arasında, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, bir SM22 $\alpha$  promotörü (örneğin bkz: Akyürek et al. (2000) *Mol. Med.* 6:983; 7.169.874 sayılı ABD patenti), bir smoothelin promotörü (örneğin bkz: WO 2001/018048), bir  $\alpha$ -düz kas aktif promotörü ve benzeri promotörler sayılabilir. Örneğin, SM22 $\alpha$  promotörünün iki CArG elemanının bulunduğu 0,4 kb büyüklüğündeki bir bölgesinin vasküler düz kas hücreleri-spesifik ekspresyona aracılık ettiği ortaya konmuştur (örneğin bkz: Kim, et al. (1997) *Mol. Cell. Biol.* 17, 2266-2278; Li, et al.,

(1996) J. Cell Biol. 132, 849-859; Moessler, et al. (1996) Development 122, 2415-2425).

Uzam bakımından kısıtları bulunan fotoreseptör-spesifik promotörler  
 5 arasında, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, bir rodopsin promotörü,  
 bir rodopsin kinaz promotörü (Young et al. (2003) Ophthalmol. Vis.  
 Sci. 44:4076), bir beta fosfodiesteraz geni promotörü (Nicoud et al.  
 (2007) J. Gene Med. 9:1015), bir retinitis pigmentosa geni promotörü  
 (Nicoud et al. (2007), yukarıda atıf yapılan eser), bir interfotoreseptör  
 10 retinoid-bağlanımlı protein (IRBP) geni artırıcısı (Nicoud et al.  
 (2007), yukarıda atıf yapılan eser), bir IRBP geni promotörü  
 (Yokoyama et al. (1992) Exp Eye Res. 55:225) ve benzeri promotörler  
 sayılabilir.

15 "Düzenleyici DNA sekansları", "kontrol elemanları" ve "düzenleyici  
 elemanlar" terimleri burada birbirlerine alternatif terimler olarak, bir  
 kodlamayan sekansın (örneğin DNA-hedefleyen RNA) veya bir  
 kodlayan sekansın (örneğin yer-hedefli modifiye edici polipeptid veya  
 Cas9/Csn1 polipeptidi) transkribe olmasını sağlayan ve/veya  
 20 transkripsiyonunu düzenleyen ve/veya bir kodlanan polipeptidin  
 translasyonunu düzenleyen promotörler, artırıcılar, poliadenilasyon  
 sinyalleri, terminatörler, protein degradasyon sinyalleri gibi ve benzeri  
 transkripsiyonel ve translasyonel kontrol sekanslarına atıf yapmak  
 amacıyla kullanılmaktadırlar.

25

Burada bir nükleik asit, bir polipeptid, bir hücre veya bir organizmayla  
 bağlantılı bir şekilde kullanılan "doğada kendiliğinden oluşan" ya da  
 "modifiye edilmemiş" terimi, doğada bulunduğu halini korumakta



olan bir nükleik asit, polipeptid, hücre veya organizmaya atıf yapar. Örneğin, doğadaki bir kaynaktan izole edilebilecek olan ve laboratuvar ortamında insanlar tarafından kasıtlı olarak modifiye edilmemiş olan bir organizmada (virüsler de dahil) bulunan bir polipeptid veya polinükleotid sekansı bir doğada kendiliğinden oluşan sekanstır.

Burada bir nükleik asit veya polipeptid ile bağlantılı olarak kullanılan "kimerik" terimi, farklı kaynaklardan elde edilmiş yapıları üzerinden tanımlanan iki komponente atıf yapar. Örneğin "kimerik" terimi bir kimerik polipeptid (örneğin bir kimerik Cas9/Csn1 proteini) bağlamında kullanılıyorsa, bu kimerik polipeptidde farklı polipeptidlerden gelen amino asit sekanslarının bulunduğu anlaşılır. Bir kimerik polipeptid, modifiye edilmiş olan veya doğada kendiliğinden oluşan polipeptid sekansları ihtiva edebilir (örneğin bir modifiye edilmiş veya edilmemiş Cas9/Csn1 proteininin kaynaklık ettiği bir birinci amino asit sekansı ile Cas9/Csn1 proteini dışındaki bir proteinden gelen bir ikinci amino asit sekansının birlikteliği). "Kimerik" terimi, bir kimerik polipeptidi kodlayan bir polinükleotid bağlamında da benzer şekilde farklı kodlama bölgelerinin kaynaklık ettikleri nükleotid sekanslarını kapsayan bir anlam taşır (örneğin bir modifiye edilmiş veya edilmemiş Cas9/Csn1 proteinini kodlayan bir birinci nükleotid sekansı ile bir Cas9/Csn1 proteini dışındaki bir polipeptidi kodlayan bir ikinci nükleotid sekansının birlikteliği).

"Kimerik polipeptid" terimi, bir amino asit sekansının normalde birbirlerinden ayrı olan iki segmenti genelde insan müdahalesiyle olmak üzere kombine edilerek (yani "füzyonlanarak") yapılan bir polipeptiddir. Bir kimerik amino asit sekansı içeren bir polipeptid bir

kimerik polipeptiddir. Bazı kimerik polipeptidlere "füzyon varyantları" olarak da atıf yapılabilir.

Burada kullanıldığı anlamıyla "heterolog", mütakabil nativ nükleik asit veya proteinde bulunmayan bir nükleotid veya polipeptid sekansı anlamına gelir. Örneğin bir kimerik Cas9/Csn1 proteininde, bir doğada kendiliğinden oluşan bakteriyel Cas9/Csn1 polipeptidinin (veya onun bir varyantının) RNA-bağımlı domaini bir heterolog polipeptid sekansına (yani, Cas9/Csn1 dışındaki bir proteinden elde edilen bir polipeptid sekansına ya da başka bir organizmadan elde edilen bir polipeptid sekansına) füzyonlanabilir. Heterolog polipeptid sekansı, kimerik Cas9/Csn1 proteini tarafından da sergilenecek olan bir aktivite (örneğin enzimatik aktivite) sergileyebilir (örneğin metiltransferaz aktivitesi, asetiltransferaz aktivitesi, kinaz aktivitesi, 15 ubikitinasyon aktivitesi ve benzerleri). Bir heterolog nükleik asit sekansı bir doğada kendiliğinden oluşan nükleik asit sekansına (veya onun bir varyantına) (örneğin genetik mühendisliği yoluyla) bağlanarak bir kimerik polipeptid kodlayan bir kimerik nükleotid oluşturulabilir. Başka bir örnek vermek gerekirse, bir füzyon varyant 20 Cas9 yer-hedefli polipeptidinde, bir varyant Cas9 yer-hedefli polipeptidi, füzyon varyant Cas9 yer-hedefli polipeptidi tarafından sergilenecek olan bir aktivite sergileyen bir heterolog polipeptide (yani Cas9 dışındaki bir polipeptide) füzyonlanabilir. Bir heterolog nükleik asit sekansı bir varyant Cas9 yer-hedefli polipeptidine 25 (örneğin genetik mühendisliği yoluyla) bağlanarak bir füzyon varyant Cas9 yer-hedefli polipeptidi kodlayan bir nükleotid sekansı oluşturulabilir.

Burada kullanıldığı anlamıyla "rekombinan", atıf yaptığı nükleik asidin (DNA veya RNA), klonlama, restriksiyon, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve/veya ligasyon basamaklarının çeşitli kombinasyonlar halinde gerçekleştirildiği ve doğada bulunan endojen nükleik asitlerden ayırt edilebilir bir yapısal kodlayan veya kodlamayan sekansın bulunduğu bir yapının oluşmasıyla sonuçlanan bir uygulamanın ürünü olduğunu ifade eder. Polipeptidleri kodlayan DNA sekansları, cDNA fragmanlarından ya da bir dizi sentetik oligonükleotidden alınıp bir araya getirilerek, bir hücrede bulunan bir rekombinan transkripsiyonel birimden veyahut bir hücresiz transkripsiyon ve translasyon sisteminde eksprese olma kabiliyeti taşıyan bir sentetik nükleik asit oluşturulabilir. İlgili sekansları içeren genomik DNA, bir rekombinan gen veya transkripsiyonel birimin oluşturulması amacıyla da kullanılabilir. Translate olmayan DNA sekansları açık okuma çerçevesine göre 5' veya 3' yönünde bulunabilirler ve bu sekanslar kodlayan bölgelerin manipülasyonu veya ekspresyonuna karışmaksızın aslen hedef ürünün çeşitli mekanizmalar aracılığıyla üretilmesini modüle edici bir işlev gösterebilirler (örneğin bkz: aşağıdaki "düzenleyici DNA sekansları).

Alternatif olarak, translate olmayan RNA'yı (örneğin DNA-hedefleyen RNA) kodlayan DNA sekansları da rekombinan olarak değerlendirilebilirler. Dolayısıyla, "rekombinan" nükleik asit terimi örneğin doğada kendiliğinden oluşmayan, örneğin sekansın normalde birbirinden ayrı olan iki segmenti insan müdahalesiyle artifisyonel olarak kombine edilerek yapılan bir nükleik aside atıf yapar. Bu artifisyonel kombinasyon genelde ya kimyasal sentez yoluyla ya da nükleik asitlerin izole segmentlerinin örneğin genetik mühendislik teknikleriyle artifisyonel manipülasyona uğratılması yoluyla

gerçekleştirilir. Bu, genelde, bir kodon aynı amino asidi, bir konservatif amino asidi veya bir konservatif olmayan amino asidi kodlayan bir kodon ile değiştirilerek yapılır. Alternatif olarak, istenen fonksiyon kombinasyonunu oluşturmak maksadıyla istenen fonksiyonlara sahip olan nükleik asit segmentleri bir araya getirilerek gerçekleştirilir. Bu artifisyel kombinasyon genelde ya kimyasal sentez yoluyla ya da nükleik asitlerin izole segmentlerinin örneğin genetik mühendislik teknikleriyle artifisyel manipülasyona uğratılması yoluyla gerçekleştirilir. Bir rekombinan polinükleotid bir polipeptidi kodladığında, bu kodlanan polipeptidin sekansı doğada kendiliğinden oluşan ("yabani tip") sekans olabileceği gibi doğada kendiliğinden oluşan sekansın bir varyantı (örneğin bir mutant) da olabilir. Dolayısıyla bir polipeptid nitelenirken "rekombinan" teriminin kullanılmış olması, o polipeptidin doğada kendiliğinden oluşmayan bir sekansa sahip olan bir polipeptid olduğu anlamına gelmez. Bir "rekombinan" polipeptid daha ziyade bir rekombinan DNA sekansı tarafından kodlanan bir polipeptiddir ve kendi sekansı doğada kendiliğinden oluşan ("yabani tip") sekans olabileceği gibi doğada kendiliğinden oluşmayan bir sekans (örneğin bir varyant, bir mutant ve benzeri) da olabilir. Dolayısıyla bir "rekombinan" polipeptid, insan müdahalesi sonucu oluşmuş olan bir polipeptiddir fakat yine de bir doğada kendiliğinden oluşan amino asit sekansına sahip olabilir.

Bir "vektör" veya "ekspresyon vektörü", başka bir DNA segmentinin yani bir "insert" in bir hücrede replike olmasını sağlamak maksadıyla eklenebileceği plazmid, faj, virüs veya kozmid gibi bir replikondur.

Bir "ekspresyon kaseti", bir promotöre operabl bağı bir DNA kodlama sekansı içerir. "Operabl bağı" terimi, ilgili komponentlerin hedeflenen şekillerde işlev göstermelerine müsaade eden bir ilişki içerisinde buldukları bir yan yana veya yakında bulunma halini tanımlar. Örneğin eğer bir promotör bir kodlayan sekansın transkripsiyonunu veya ekspresyonunu etkileyebiliyorsa, o promotör o kodlayan sekansa operabl bağıdır.

"Rekombinan ekspresyon vektörü" veya "DNA yapısı" terimleri burada birbirlerine alternatif terimler olarak, bir vektör ve en az bir adet insert içeren bir DNA molekülüne atıf yapmak amacıyla kullanılmaktadırlar. Rekombinan ekspresyon vektörleri genelde insert(ler)i eksprese etme ve/veya çoğaltma maksadıyla ya da başka rekombinan nükleotid sekanslarının yapımı için oluşturulurlar. İntert(ler) bir promotör sekansa operabl bağı olabilir veya olmayabilir ve düzenleyici DNA sekanslarına operabl bağı olabilir veya olmayabilir.

Bir eksojen DNA, örneğin bir rekombinan ekspresyon vektörü bir hücrenin içerisine sokulduğunda o hücre o eksojen DNA ile "genetik olarak değiştirilmiş" veya "transforme edilmiş" veya "transfekte edilmiş" olur. Eksojen DNA varlığı, kalıcı veya geçici genetik değişime yol açar. Transforme edici DNA hücrenin genomuna entegre edilebilir (kovalent bağlanabilir) de edilmeyebilir de. Örneğin prokaryotlar, mayalar ve memeli hücrelerinde transforme edici DNA bir plazmid gibi bir epizomal eleman üzerinde korunabilir. Ökaryotik hücrelerde ise, bir stabil transforme hücre, transforme edici DNA'nın kromozoma entegre edilmiş olduğu ve buna bağı olarak söz konusu

DNA'nın kromozom replikasyonu sonucunda yavru hücreler tarafından kalıtım yoluyla edinildiği bir hücredir. Okaryotik hücrenin transforme edici DNA'yı içeren bir yavru hücre popülasyonunun dahil olduğu hücre hatları veya klonların temelini teşkil edebilecek nitelikte olması bahsi geçen stabilitenin varlığını kanıtlar. Bir "klon", tek bir hücreden veya ortak atadan mitoz yoluyla türeyen bir hücre popülasyonudur. Bir "hücre hattı", in vitro ortamda birçok jenerasyon boyunca stabil bir çoğalma sergileyebilecek olan bir primer hücrenin bir klonudur.

10

Uygun genetik modifikasyon (burada "transformasyon" olarak da atıf yapılmaktadır) yöntemleri arasında, örneğin viral enfeksiyon veya bakteriyofaj enfeksiyonu, transfeksiyon, konjugasyon, protoplast füzyonu, lipofeksiyon, elektroporasyon, kalsiyum fosfat presipitasyonu, polietilenimin (PEI) aracılı transfeksiyon, DEAE-dekstran aracılı transfeksiyon, lipozom aracılı transfeksiyon, partikül tabancası teknolojisi, kalsiyum fosfat presipitasyonu, direkt mikro enjeksiyon, nanopartikül aracılı nükleik asit taşınması (örneğin bkz: Panyam et. al., Adv Drug Deliv Rev. 2012 Sep 13. pii: S0169-409X(12)00283-9. doi: 10.1016/j.addr.2012.09.023) ve benzeri yöntemler sayılabilir.

20

Uygulanacak genetik modifikasyon yöntemi genelde transforme edilen hücrenin tipi ve transformasyonun gerçekleştirildiği koşul ve şartlar (örneğin in vitro, ex vivo veya in vivo) temelinde belirlenir. Bu yöntemlere ilişkin genel bir tartışma için "Ausubel, et al., Short Protocols in Molecular Biology, 3rd ed., Wiley & Sons, 1995" eserine bakılabilir.

25

Burada kullanıldığı anlamıyla bir "hedef DNA", bir "hedef yer" veya "hedef sekans" ihtiva eden bir DNA polinükleotididir. "Hedef yer", "hedef sekans" ve "hedef ön-aralık DNA'sı" terimleri burada birbirlerine alternatif terimler olarak, bağlanma için yeterli koşulların mevcut olması şartıyla buluşa uygun bir DNA-hedefleyen RNA'nın DNA-hedefleyen segmentinin bağlanacağı bir hedef DNA'da bulunan bir nükleik asit sekansına (bkz: Şekil 1 ve Şekil 39) atıf yapmak amacıyla kullanılmaktadırlar. Örneğin, RNA sekansı 5'-GAUAUGCUC-3' (SEKANS KOD NO.: //), bir hedef DNA içerisindeki hedef yeri (veya hedef sekansı) 5'-GAGCATATC-3' (SEKANS KOD NO.: //) hedef alır (veya ona bağlanır veya onunla hibridize olur veya onu tamamlayıcı niteliktedir). Uygun DNA/RNA bağlanma koşullarına örnek olarak, bir hücrede normalde var olan fizyolojik koşullar gösterilebilir. Diğer uygun DNA/RNA bağlanma koşulları (örneğin bir hücresiz sistemdeki koşullar) sektörde bilinmekte ve örneğin yukarıda atıf yapılan Sambrook imzalı eserde açıklanmaktadır. Hedef DNA'nın DNA-hedefleyen RNA'yı tamamlayıcı nitelikte olan ve onunla hibridize olan iplikçğine "tamamlayıcı iplikçik", hedef DNA'nın bu "tamamlayıcı iplikçigi" tamamlayıcı nitelikte olan (ve dolayısıyla DNA-hedefleyen RNA'yı tamamlayıcı olmayan) iplikçğine ise "tamamlayıcı olmayan iplikçik" veya "tamamlayıcı-olmayan iplikçik" olarak atıf yapılır (bkz: Şekil 12).

"Yer-hedefli modifiye edici polipeptid" veya "RNA-bağlanımlı yer-hedefli polipeptid" veya "RNA-bağlanımlı yer-hedefli modifiye edici polipeptid" veya "yer-hedefli polipeptid" terimi kullanıldığında atıf yapılan, RNA'ya bağlanan ve belirli bir DNA sekansına yönlendirilen

bir polipeptiddir. Burada tanımlandığı gibi olan bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid, bağlı olduğu RNA molekülünün yönlendirmesiyle belirli bir DNA sekansını hedef alır. RNA molekülü, hedef DNA içerisindeki bir hedef sekansı tamamlayıcı nitelikte olan bir sekans içerir ve bu sayede, bağlı olduğu polipeptidin hedef DNA içerisindeki belirli bir konumu (hedef sekans) hedef almasını sağlar.

"Yarılma" terimi ile atıf yapılan, bir DNA molekülünün kovalent omurgasının kırılmasıdır. Yarılma olayı, aralarında sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın bir fosfodiester bağının enzimatik veya kimyasal hidrolize tâbi tutulmasının da bulunduğu muhtelif yöntemlerle başlatılabilir. Hem bir tek iplikçik yarılmasının hem de bir çift iplikçik yarılmasının meydana gelmesi mümkündür ve çift iplikçik yarılması, iki ayrı tek iplikçik yarılması olayının bir sonucu olabilir. DNA yarılması, ya künt uçların ya da dirsekli uçların oluşmasına yol açar. Buluşun belirli yapılarında, bir DNA-hedefleyen RNA ile bir yer-hedefli modifiye edici polipeptidden oluşan bir kompleksle hedef gözetilerek çift iplikçikli DNA yarılmasının meydana gelmesi sağlanır.

20

"Nükleaz" ve "endonükleaz" terimleri burada birbirlerine alternatif terimler olarak, DNA yarılması için gerekli katalitik aktiviteye sahip olan bir enzim anlamında kullanılmaktadırlar.

25

Bir nükleazın "yarma domaini" veya "aktif domaini" veya "nükleaz domaini, nükleazın DNA yarılması için gerekli katalitik aktiviteye sahip olan polipeptid sekansı veya domainidir. Bir yarma domaini, tek bir polipeptid zincirinde bulunabilir ya da yarma aktivitesi, iki (veya



daha fazla sayıda) polipeptidin bir araya gelmesi sonucunda oluşabilir. Bir nükleaz domaini, bulunduğu polipeptidde yer alan birden fazla sayıda izole amino asit kesitinden oluşur.

- 5 Yer-hedefli modifiye edici polipeptide bağlanan ve polipeptidin hedef DNA içerisindeki belirli bir konumu hedef almasını sağlayan RNA molekülüne burada "DNA-hedefleyen RNA" veyahut "DNA-hedefleyen RNA polinükleotidi" olarak atıf yapılmaktadır (aynı zamanda "yönlendirici RNA" ya da "gRNA" da denmektedir). Buluşa
- 10 uygun bir DNA-hedefleyen RNA'da, bir "DNA-hedefleyen segment" ve bir "protein-bağlanımlı segment" denilen iki segment bulunur. "Segment" terimi, bir molekülün bir segmenti/bölümü/bölgesini, örneğin bir RNA'daki ardışık sıralı nükleotidlerden oluşan bir kesiti temsil eder. Bir segment, bir kompleksin bir bölgesi/bölümü de
- 15 olabilir, öyle ki bir segmentte birden fazla sayıda moleküle ait bölgeler bulunabilir. Örneğin bazı durumlarda, bir DNA-hedefleyen RNA'nın protein-bağlanımlı segmenti (aşağıda tanımlanmaktadır) bir RNA molekülüdür ve dolayısıyla bu protein-bağlanımlı segment o RNA molekülünün bir bölgesini içerir. Başka durumlarda, bir DNA-
- 20 hedefleyen RNA'nın protein-bağlanımlı segmentinde (aşağıda tanımlanmaktadır) bir tamamlayıcılık bölgesi üzerinden hibridize olan iki ayrı molekül bulunur. Tanımı sınırlayıcı bir anlam taşımayan bir örnek vermek gerekirse, bir DNA-hedefleyen RNA'nın iki ayrı molekül içeren bir protein-bağlanımlı segmentinde, (i) 100 baz çifti
- 25 uzunluğundaki bir birinci RNA molekülünün 40-75 numaralı baz çiftleri ve (ii) 50 baz çifti uzunluğundaki bir ikinci RNA molekülünün 10-25 numaralı baz çiftleri bulunabilir. "Segment", terimin geçtiği bağlamda açıkça aksini ifade eden bir ifade bulunmadığı sürece, belirli

bir toplam baz çifti sayısı, bir RNA molekülünden gelen belirli bir baz çifti sayısı ve bir kompleks içerisindeki ayrı moleküllere istinaden belirli bir molekül adediyle sınırlı değildir ve toplam uzunlukları herhangi bir değerde olan ve aralarında başka molekülleri tamamlayıcı nitelikte bölgeler de bulunan veya bulunmayan RNA molekülü bölgeleri içerebilir.

DNA-hedefleyen segment (veya "DNA-hedefleyen sekans"), bir hedef DNA içerisindeki belirli bir sekansı (hedef DNA'nın tamamlayıcı iplikçığı) tamamlayıcı nitelikte olan bir nükleotid sekansı ihtiva eder. Protein-bağımlı segment (veya "protein-bağımlı sekans") bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid ile etkileşime girer. Yer-hedefli modifiye edici polipeptid bir Cas9 veya Cas9-ilişkili polipeptid (aşağıda daha ayrıntılı bir dille açıklanmaktadır) ise, hedef DNA'daki yer-spesifik yarıma, (i) hem DNA-hedefleyen RNA ile hedef DNA arasındaki baz eşleşmesine dayalı tamamlayıcılık derecesinin, (ii) hem de hedef DNA'daki kısa bir motifin (ön-aralığa komşu motif (PAM)) belirlediği konumlarda medyana gelir.

20 Buluşa uygun bir DNA-hedefleyen RNA'nın protein-bağımlı segmenti, birbirlerine hibridize olarak bir çift iplikçikli RNA dubleksi (dsRNA dubleksi) oluşturan iki tamamlayıcı nükleotid kesiti ihtiva eder.

25 Buluşun bazı yapılarında, buluşa uygun bir nükleik asitte (örneğin bir DNA-hedefleyen RNA, bir DNA-hedefleyen RNA kodlayan bir nükleotid sekansının bulunduğu bir nükleik asit, bir yer-hedefli polipeptid kodlayan bir nükleik asit ve benzeri), bir ek cazip özellik

(örneğin modifiye veya düzenlenmiş stabilite; hücre içi hedefleme; takip, örneğin bir floresan etiket; bir protein veya protein kompleksi için bir bağlanma yeri ve benzeri) sağlayan bir modifikasyon veya sekans bulunur. Buna verilebilecek örnekler arasında, sadece bunlarla

5 sınırlı kalmaksızın, bir 5' başlığı (örneğin bir 7-metilguanilat başlığı ( $m^7G$ )), bir 3' poliadenile kuyruğu (yani bir 3' poli(A) kuyruğu), bir ribo-anahtar sekansı (örneğin düzenlenmiş stabiliteye ve/veya proteinlerin ve/veya protein komplekslerinin erişimine istinaden düzenlenmiş erişilebilirliğe olanak sağlamak için), bir stabilite kontrol

10 sekansı, bir dsRNA dubleksi (yani bir saç tokası) oluşturan bir sekans, RNA'yı bir hücre içi konuma (örneğin nükleus, mitokondri, kloroplastlar ve benzeri unsurlar) yönlendiren bir modifikasyon veya sekans, takibe olanak sağlayan bir modifikasyon veya sekans (örneğin bir floresan moleküle doğrudan konjugasyon, floresan belirleme

15 yapmayı kolaylaştıran bir moieteye konjugasyon, floresan belirleme yapmaya olanak sağlayan bir sekans ve benzeri), proteinler (örneğin, transkripsiyonel aktivatörler, transkripsiyonel baskılayıcılar, DNA metiltransferazlar, DNA demetilazlar, histon asetiltransferazlar, histon deasetilazlar ve benzerlerinin örnek gösterilebileceği, DNA'ya etki

20 eden proteinler) için bir bağlanma yeri sağlayan bir modifikasyon veya sekans ve bunlardan oluşan kombinasyonlar sayılabilir.

Buluşun bazı yapılarında, bir DNA-hedefleyen RNA, 5' veya 3' ucunda yukarıda açıklanan özelliklerden herhangi birini sağlayan bir

25 ek segment barındırır. Örneğin uygun bir üçüncü segmentte, bir 5' başlığı (örneğin bir 7-metilguanilat başlığı ( $m^7G$ )), bir 3' poliadenile kuyruğu (yani bir 3' poli(A) kuyruğu), bir ribo-anahtar sekansı (örneğin düzenlenmiş stabiliteye ve/veya proteinlerin ve protein

komplekslerinin erişimine istinaden düzenlenmiş erişilebilirliğe olanak sağlamak için), bir stabilite kontrol sekansı, bir dsRNA dubleks (yani bir saç tokası) oluşturan bir sekans, RNA'yı bir hücre içi konuma (örneğin nükleus, mitokondri, kloroplastlar ve benzeri unsurlar) 5 yönlendiren bir sekans, takibe olanak sağlayan bir modifikasyon veya sekans (örneğin bir floresan moleküle doğrudan konjugasyon, floresan belirleme yapmayı kolaylaştıran bir moietye konjugasyon, floresan belirleme yapmaya olanak sağlayan bir sekans ve benzeri), proteinler (örneğin, transkripsiyonel aktivatörler, transkripsiyonel baskılayıcılar, 10 DNA metiltransferazlar, DNA demetilazlar, histon asetiltransferazlar, histon deasetilazlar ve benzerlerinin örnek gösterilebileceği, DNA'ya etki eden proteinler) için bir bağlanma yeri sağlayan bir modifikasyon veya sekans ya da bunlardan oluşan herhangi bir kombinasyon bulunabilir.

15

Buluşa uygun bir DNA-hedefleyen RNA ile buluşa uygun bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid (yani yer-hedefli polipeptid) birlikte bir kompleks oluştururlar (yani kovalent olmayan etkileşimler aracılığıyla bağlanırlar). DNA-hedefleyen RNA, bir hedef DNA'nın 20 bir sekansını tamamlayıcı nitelikte bir nükleotid sekansı ihtiva etmesi sayesinde komplekse hedef spesifitesi kazandırır. Kompleksteki yer-hedefli modifiye edici polipeptid ise yer-spesifik aktiviteyi sağlar. Diğer bir deyişle, yer-hedefli modifiye edici polipeptid, DNA-hedefleyen RNA'nın protein-bağlanımlı segmenti ile kurduğu ilişki 25 sayesinde bir hedef DNA sekansına (örneğin bir kromozomal nükleik asitteki bir hedef sekans; bir ekstrakromozomal nükleik asitteki, örneğin bir epizomal nükleik asit, bir mini-daire veya benzeri bir unsurdaki bir hedef sekans; bir mitokondriyal nükleik asitteki bir

hedef sekans; bir kloroplast nükleik asidindeki bir hedef sekans; bir plazmiddeki bir hedef sekans ya da benzeri bir hedef sekans) doğru yönlendirilir.

- 5 Bazı uygulamalarda, iki ayrı RNA molekülü (RNA polinükleotidleri: bir "aktive edici RNA" ve bir "hedef gösteren RNA"; açıklamalar için aşağıya bakınız) ihtiva eden ve burada bir "çift moleküllü DNA-hedefleyen RNA" veya bir "iki moleküllü DNA-hedefleyen RNA" olarak atıf yapılan söz konusu bir DNA-hedefleyen RNA da burada
- 10 konu edilmektedir. Diğer uygulamalarda, hedef DNA-hedefleyen RNA bir tekil RNA molekülüdür (tekil RNA polinükleotidi) ve burada bir "tek moleküllü DNA-hedefleyen RNA", bir "tekil yönlendirici RNA" ya da bir "sgRNA" olarak anılmaktadır. "DNA-hedefleyen RNA" ya da "gRNA" terimi ise, hem çift moleküllü DNA-hedefleyen
- 15 RNA'ları hem de tek moleküllü DNA-hedefleyen RNA'ları (yani sgRNA'ları) içine alan bir anlam taşımaktadır.

Bir iki moleküllü DNA-hedefleyen RNA örneğinde, bir crRNA benzeri ("CRISPR RNA'sı" veya "hedef gösteren RNA" veya

20 "crRNA" veya "crRNA tekrarı") molekül ve bir mütakabil tracrRNA benzeri ("trans-etkili CRISPR RNA'sı" veya "aktive edici RNA") molekül bulunur. Bir crRNA benzeri molekül (hedef gösteren RNA), hem DNA-hedefleyen RNA'nın DNA-hedefleyen segmentini (tek iplikçikli) hem de DNA-hedefleyen RNA'nın protein-bağlanımlı

25 segmentinin dsRNA dubleksinin bir yarısını oluşturan bir nükleotid kesiti ("dubleks oluşturucu segment") ihtiva eder. Bir mütakabil tracrRNA benzeri molekül (aktive edici RNA) ise, DNA-hedefleyen RNA'nın protein-bağlanımlı segmentinin dsRNA dubleksinin diğer

yarısını oluşturan bir nükleotid kesiti (dubleks oluşturucu segment) içerir. Başka bir deyişle, bir crRNA benzeri moleküldeki nükleotid kesiti, bir tracrRNA benzeri moleküldeki nükleotid kesitini tamamlayıcı niteliktedir ve onunla hibridize olarak DNA-hedefleyen RNA'nın protein-bağlanımlı domaininin dsRNA dubleksini oluşturur.

5 Buna bağlı olarak, her crRNA benzeri molekülde bir mütakabil tracrRNA benzeri molekül bulunduğu söylenebilir. CrRNA benzeri molekül ayrıca tek iplikçikli DNA-hedefleyen segment de sağlar. Dolayısıyla bir crRNA benzeri ve bir tracrRNA benzeri molekül (bir

10 mütakabil çift olarak) hibridize olarak bir DNA-hedefleyen RNA oluştururlar. Belirli bir crRNA veya tracrRNA molekülünün tam sekansı, söz konusu RNA molekülünün ait olduğu türe göre farklılık gösterir. Çeşitli crRNA'lar ve tracrRNA'lar, Şekil 8'deki mütakabil tamamlayıcı çiftler kapsamında gösterilmektedir. Buluşa uygun bir

15 çift moleküllü DNA-hedefleyen RNA'da herhangi bir mütakabil crRNA ve tracrRNA çifti bulunabilir. Buluşa uygun bir çift moleküllü DNA-hedefleyen RNA herhangi bir crRNA ve tracrRNA çiftini ihtiva edebilir.

20 "Aktive edici RNA" terimi burada bir çift moleküllü DNA-hedefleyen RNA'nın bir tracrRNA benzeri molekülü anlamında kullanılmaktadır. "Hedef gösteren RNA" terimi burada bir çift moleküllü DNA-hedefleyen RNA'nın bir crRNA benzeri molekülü anlamında kullanılmaktadır. "Dubleks oluşturucu segment" terimi burada bir

25 mütakabil aktive edici RNA veya hedef gösteren RNA molekülündeki ardışık bir dizi nükleotidin oluşturduğu bir kesite hibridize olmak suretiyle onunla birlikte dsRNA dubleksinin oluşumuna katkıda bulunan bir aktive edici RNA veya bir hedef gösteren RNA'daki

ardışık bir dizi nükleotidin oluşturduğu bir kesite atfen kullanılmaktadır. Diğer bir deyişle, bir aktive edici RNA, mütakabil hedef gösteren RNA'nın dubleks oluşturucu segmentini tamamlayıcı nitelikte olan bir dubleks oluşturucu segment ihtiva eder. Bir aktive edici RNA bir dubleks oluşturucu segment içerirken, bir hedef gösteren RNA hem bir dubleks oluşturucu segment hem de DNA-hedefleyen RNA'nın DNA-hedefleyen segmentini içerir. Dolayısıyla, buluşa uygun bir çift moleküllü DNA-hedefleyen RNA, herhangi bir mütakabil aktive edici RNA ve hedef gösteren RNA çiftinden oluşabilir.

Burada kullanıldığı anlamıyla bir "konakçı hücre", bir nükleik asidin alıcısı olarak kullanılabilir veya kullanılmış olan bir in vivo veya in vitro ökaryotik hücre, bir prokaryotik hücre (örneğin bakteri veya arke hücresi) ya da bir tekhücreli varlık olarak kültürlenmiş bir çokhücreli organizmadan (örneğin bir hücre hattı) edinilen bir hücredir ve nükleik asit ile transforme edilmiş olan orijinal hücrenin progenisini de içine alan bir anlam taşır. Bir tekil hücrenin progenisinin doğal, arazi veya kasıtlı mutasyonlardan dolayı orijinal parent hücre ile morfoloji ya da genomik veya toplam DNA tamamlayıcısı bakımından tamamen özdeş olmayabileceği anlaşılacaktır. Bir "rekombinan konakçı hücre" (bir "genetiği değiştirilmiş konakçı hücre" de denmektedir), bir heterolog nükleik asidin, örneğin bir ekspresyon vektörünün sokulmuş olduğu bir konakçı hücredir. Örneğin, buluşa uygun bir bakteriyel konakçı hücre, bir eksojen nükleik asidin (örneğin plazmid veya rekombinan ekspresyon vektörü) uygun bir bakteriyel konakçı hücreye sokulması yoluyla elde edilmiş bir genetiği değiştirilmiş bakteriyel konakçı hücredir ve buluşa uygun bir

ökaryotik konakçı hücre, bir eksojen nükleik asidin uygun bir ökaryotik konakçı hücreye sokulması yoluyla elde edilmiş bir genetiği değiştirilmiş ökaryotik konakçı hücredir (örneğin bir memeli germ hücresi).

5

"Kök hücre" terimi burada hem kendi kendini yenileme kabiliyetine hem de bir farklılaşmış hücre tipi üretme kabiliyetine sahip olan bir hücreye (örneğin bitki kök hücresi, omurgalı kök hücresi) atfen kullanılmaktadır (bkz: Morrison et al. (1997) Cell 88:287-298). Hücre ontogenisi bağlamında, "farklılaşmış" veya "farklılaşan" sıfatı birlikte kullanıldığı terime göreceli bir nitelik kazandıran bir terimdir. Bir "farklılaşmış hücre", karşılaştırıldığı hücreye göre gelişimsel yolda daha ileri bir evrede bulunan bir hücredir. Dolayısıyla, pluripotent kök hücreler (aşağıda tanımlanmaktadır) farklılaşarak soy-sınırlı progenitör hücrelere (örneğin mezodermal kök hücreler) dönüşebilirler, bunlar da yine farklılaşarak daha da sınırlı hücrelere (örneğin nöron progenitörleri) dönüşebilirler ve bunlar da yine farklılaşarak son-evre hücrelere (yani terminal olarak farklılaşmış hücreler, örneğin nöronlar, kardiyomiyositler ve benzerleri) dönüşebilirler ve bu son-evre hücreler belirli bir doku tipinde karakteristik bir rol oynarlar ve üreme kapasitesini hâlâ sürdürüyor olabilirler de olmayabilirler de. Kök hücreler, hem spesifik markerlerin (örneğin proteinler, RNA'lar ve benzerleri) varlığıyla hem de spesifik markerlerin yokluğuyla karakterize edilebilirler. Kök hücreler, başta kök hücrelerin birden çok farklılaşmış progenininin oluşmasını sağlama kabiliyetlerine ilişkin eseyler olmak üzere, in vitro veya in vivo fonksiyonel eseylerle de belirlenip tanımlanabilirler.

25



İlgilenilen kök hücreler arasında pluripotent kök hücreler (PSC'ler) bulunur. "Pluripotent kök hücre" ya da "PSC" terimi burada ilgili organizmanın tüm hücre tiplerini üretme kabiliyetine sahip olan bir kök hücre anlamında kullanılmaktadır. Dolayısıyla bir PSC, ilgili organizmanın herhangi bir germ katmanındaki (örneğin bir omurgalının endoderm, mezoderm ve ektodermi) herhangi bir hücrenin oluşmasını sağlayabilen bir hücredir. Pluripotent hücreler, teratomlar oluşturma ve bir canlı organizmada ektoderm, mezoderm veya endoderm dokularına katkıda bulunma kabiliyetine sahiptirler.

5 Bitkilerin pluripotent kök hücreleri, bitkideki tüm hücre tiplerini (örneğin kök, gövde, yaprak hücreleri ve benzeri hücreler) oluşturma kabiliyetine sahiptirler.

10

Hayvanların PSC'leri, bir dizi farklı yolla elde edilebilirler. Örneğin embriyonik kök hücreler (ESC'ler) bir embriyonun iç hücre kitlesinden elde edilirlerken, indüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPSC'ler) somatik hücrelerden elde edilirler (Takahashi et. al, Cell. 2007 Nov 30;131(5):861-72; Takahashi et. al, Nat Protoc. 2007;2(12):3081-9; Yu et. al, Science. 2007 Dec 21;318(5858):1917-20. Epub 2007 Nov 20). PSC terimi nerden türetildikleri veya elde edildikleri fark etmeksizin genel olarak tüm pluripotent kök hücrelere atıf yaptığı için, ESC ve iPSC terimlerinin her ikisini de içine alan bir anlam taşır. PSC'ler bir yerleşik hücre hattı formunda bulunabilirler, doğrudan doğruya primer embriyonik dokudan elde edilebilirler ya da bir somatik hücreden türetilirler. PSC'ler, burada açıklanan yöntemlerdeki hedef hücreler olabilirler.

15

20

25

"Embriyonik kök hücre" (ESC), bir embriyodan, tipik olarak blastokistin iç hücre kitlesinden izole edilen bir PSC'dir. İlgilenilen kök hücreler arasında, başka primatların kaynaklık ettikleri embriyonik kök hücreler, örneğin Rhesus kök hücreleri ve ipek maymunu kök hücreleri de bulunur. Kök hücreler, herhangi bir memeli türünden, örneğin insan, at, sığır, domuz, köpek, kedi, kemirgen, örneğin fare, sıçan, hamster, primat veya benzeri başka bir türden elde edilebilirler (Thomson et al. (1998) Science 282:1145; Thomson et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci USA 92:7844; Thomson et al. (1996) Biol. Reprod. 55:254; Shambloott et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13726, 1998). ESC'ler kültürde normalde büyük nükleo-sitoplazmik oranlar sergileyen, tanımlı sınırlara sahip olan ve belirgin nükleouslar bulunan düz koloniler olarak çoğalır. Bunun yanı sıra, ESC'ler, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81 ve Alkalın Fosfataz eksprese eder fakat SSEA-1 eksprese etmezler. ESC'leri oluşturmak ve karakterize etmek için kullanılacak yöntem örnekleri örneğin 7.029.913 sayılı ABD patenti, 5.843.780 sayılı ABD patenti ve 6.200.806 sayılı ABD patentinde bulunabilir. hESC'leri farklılaşmamış formda çoğaltmak için kullanılacak yöntemler WO 99/20741, WO 01/51616 ve WO 03/020920 sayılı patent yayımlarında açıklanmakta ve anlatılmaktadırlar. İnsan embriyonik germ kök hücreleri veya insan embriyonik germ hücreleri, buluşun bir kısmını oluşturmaz.

İnsan embriyonik germ kök hücreleri veya insan embriyonik germ hücreleri bu buluşun bir parçası değildirler. "Embriyonik germ kök hücresi" (EGSC) veya "embriyonik germ hücresi" veya "EG hücresi", germ hücreleri ve/veya germ hücresi progenitörlerinden, örneğin

primordial germ hücrelerinden, yani sperm ve yumurtalar haline gelen hücrelerden elde edilen bir PSC anlamına gelir. Embriyonik germ hücrelerinin (EG hücreleri), yukarıda tanımlandığı gibi olan embriyonik kök hücreler ile benzer özelliklere sahip oldukları düşünölmektedir. EG hücrelerini oluşturmak ve karakterize etmek için kullanılabilir yöntem örnekleri için örneğin sıralanan referanslara bakılabilir: 7.153.684 sayılı ABD patenti; Matsui, Y., et al., (1992) Cell 70:841; Shambloft, M., et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 113; Shambloft, M., et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:13726; Koshimizu, U., et al. (1996) Development, 122:1235.

"İndüklenmiş pluripotent kök hücre" ya da "iPSC" terimi, bir PSC olmayan bir hücreden (örneğin bir PSC'ye kıyasla farklılaşmış olan bir hücreden) elde edilen bir PSC anlamına gelir. iPSC'ler, terminal olarak farklılaşmış hücrelerin de aralarında bulunduğu birçok farklı hücre tipinden elde edilebilirler. iPSC'ler, bir ES hücresi benzeri morfolojiye sahiptirler ve buna bağlı olarak, büyük nükleositooplazmik oranlara, tanımlı sınırlara ve belirgin nükleuslara sahip olan düz koloniler olarak çoğalırlar. iPSC'ler, ayrıca, aralarında sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın Alkalın Fosfataz, SSEA3, SSEA4, Sox2, Oct3/4, Nanog, TRA160, TRA181, TDGF 1, Dnmt3b, FoxD3, GDF3, Cyp26a1, TERT ve zfp42'nin bulunduğu, sektörde bilgi ve beceri sahibi uzmanlarca bilinen bir veya daha fazla sayıda kilit pluripotans markeri eksprese ederler. iPSC'leri oluşturmak ve karakterize etmek için kullanılabilir yöntem örnekleri, US20090047263, US20090068742, USA 20090191159, US20090227032, US20090246875 ve USA 20090304646 sayılı ABD patentlerinde bulunabilir. iPSC'leri elde etmek için kullanılan somatik hücreler

genelde somatik hücreleri pluripotent kök hücreler haline gelmelerini sağlayacak şekilde tekrar programladıkları sektörde bilinen tekrar programlanma faktörleri (örneğin Oct4, SOX2, KLF4, MYC, Nanog, Lin28 ve benzerleri) ile birlikte temin edilirler.

5

Bir "somatik hücre", deneysel yolla manipülasyona uğratılmamış olduğu sürece normalde bir organizmadaki hücre tiplerinden hiçbirini meydana getirmeyecek olan, o organizmadaki herhangi bir hücredir.

Diğer bir deyişle, somatik hücreler, vücuttaki üç germ katmanına, yani 10 ektoderm, mezoderm ve endoderm katmanlarına mensup hiçbir hücrenin oluşmasına yol açmayacak ölçüde farklılaşmış olan hücrelerdir. Somatik hücreler, örneğin hem nöronları hem de nöral progenitörleri kapsarlar; bunlardan ikincisi, doğal ortamda merkezi sinir sistemindeki hücre tiplerinden bazılarının veya hepsinin 15 oluşmasını sağlayabilir, fakat mezoderm veya endoderm soylarına mensup hücrelerin oluşmasını sağlayamaz.

Bir "mitotik hücre", mitozu uğrayan bir hücredir. Mitoz, bir ökaryotik hücrenin nükleusundaki kromozomları iki ayrı nükleus içerisindeki iki 20 özdeş set şeklinde ayırdığı prosesin adıdır. Mitozu genelde sitokinez takip eder; bu süreçte, nükleuslar, sitoplazma, organeller ve hücre membranı bölünür ve bu hücresel komponentlerden hemen hemen eşit ölçülerde ihtiva eden iki hücre oluşur.

25 Bir "post-mitotik hücre", mitozdan çıkmış olan bir hücredir, yani "sessizdir", yani artık daha fazla bölünmeye uğramaz. Bu sessiz hücre hali geçici, yani tersine çevrilebilir olabileceği gibi kalıcı da olabilir.

Bir "mayotik hücre", mayoza uğrayan bir hücredir. Mayoz, bir hücrenin nükleer materyalini gametler veya sporlar üretmek amacıyla böldüğü prosesin adıdır. Mitozdan farklı olarak mayozda, kromozomlar, genetik materyali kromozomlar arasında taşıyıp 5 karıştıran bir rekombinasyon basamağına uğrarlar. Bunun yanı sıra, mitozun sonucunda üreyen iki (genetik olarak özdeş) diploid hücreye kıyasla mayozun sonucunda dört (genetik olarak özgün ve eşsiz) haploid hücre açığa çıkar.

10 "Rekombinasyon", genetik bilginin iki polinükleotid arasında değiş tokuş edildiği bir prosestir. Burada kullanıldığı anlamıyla "homoloji-yönlendirmeli onarım (HDR)" terimi, örneğin hücrelerdeki çift iplikçik kırıklarının onarımı esnasında meydana gelen özel bir DNA onarımı formuna atıf yapar. Bu proses nükleotid sekansı homolojisinin 15 söz konusu olmasını gerektirir, "hedef" molekülün (yani çift iplikçik kırığına maruz kalmış olan molekülün) onarımı için şablon olarak bir "donör" molekül kullanılmasını gerektirir ve donördeki genetik bilginin hedefe aktarılması ile sonuçlanır. Homoloji-yönlendirmeli onarım, eğer donör polinükleotid hedef molekülden farklıysa ve donör 20 polinükleotidin sekansının bir kısmı veya tamamı hedef DNA'ya aktarıldıysa hedef molekülün sekansında bir alterasyon (örneğin insersiyon, delesyon, mutasyon) meydana gelmesi ile sonuçlanabilir. Buluşun bazı yapılarında, donör polinükleotid, donör polinükleotidin bir kısmı, donör polinükleotidin bir kopyası ya da donör 25 polinükleotidin bir kopyasının bir kısmı hedef DNA'ya entegre olur.

"Homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ)" terimi, kırık uçların birbirlerine bir homolog şablona ihtiyaç duyulmadan (onarım

rehberlik edecek bir homolog sekansa ihtiyaç duyulan homoloji-yönlendirmeli onarıma kıyasla) doğrudan ligate edilmeleri yoluyla DNA'lardaki çift iplikçik kırıklarının onarılması anlamına gelir. NHEJ genelde çift iplikçik kırığının bulunduğu yerin yanındaki 5 nükleotid sekansının yitirilmesi (delesyonu) ile sonuçlanır.

"Tedavi", "tedavi etme" ve benzeri terim ve tabirler burada genelde istenen farmakolojik ve/veya fizyolojik etkinin elde edilmesi anlamında kullanılmaktadırlar. Bu etki, bir hastalığın veya bir hastalığın bir semptomunun kısmen veya tamamen önlenmesi anlamında profilaktik ve/veya bir hastalığın veya o hastalıkla ilişkilendirilebilecek bir advers etkinin kısmen veya tamamen iyileştirilmesi anlamında terapötik olabilir. Burada kullanıldığı anlamıyla "tedavi" terimi, bir memelideki bir hastalık veya semptomun her türlü tedavisini içine alan bir anlam taşır ve bu bakımdan aşağıda belirtilen etkilerden birine sahip olan bir tedaviye işaret eder: (a) bir hastalık veya semptoma yatkınlığı bulunabilecek olan fakat o hastalık veya semptomun teşhis edilmemiş olduğu bir denekte o hastalık veya semptomun meydana gelmesinin önlenmesi; (b) hastalık veya semptomun inhibe edilmesi, yani gelişiminin durdurulması ya da (c) hastalığın hafifletilmesi, yani hastalığın gerilemesinin sağlanması. Terapötik ajan, hastalık veya hasar başladıktan veya meydana gelmeden önce, başladığı veya meydana geldiği esnada ya da başladıktan veya meydana geldikten sonra uygulanabilir. Devam eden bir hastalığın tedavisi, yani hastadaki istenmeyen klinik semptomları stabilize etmeye veya azaltmaya yönelik bir tedavi bilhassa önem arz eder. Bu gibi bir tedavinin hastalığın etkisi altında bulunan dokularda tam fonksiyon kaybı

yaşanmadan önce gerçekleştirilmesi arzu edilir. Bu tedavi tercihen hastalığın semptomatik safhası esnasında ve bazı durumlarda hastalığın semptomatik safhasından sonra uygulanacaktır.

- 5 "Kişi", "denek", "konakçı" ve "hasta" terimleri burada birbirlerine alternatif terimler olarak kullanılmakta olup, geçtikleri yerlerde, başta insanlar olmak üzere, bir tanı, tedavi veya terapinin uygulanması istenen herhangi bir memeli deneğe atıf yaparlar.
- 10 Moleküler ve hücrel biyokimyada kullanılan genel yöntemler aşağıda örnekleri verilen standart ders kitaplarında bulunabilirler: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed. (Sambrook et al., HaRBor Laboratory Press 2001); Short Protocols in Molecular Biology, 4th Ed. (Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons 1999);
- 15 Protein Methods (Bollag et al., John Wiley & Sons 1996); Nonviral Vectors for Gene Therapy (Wagner et al. eds., Academic Press 1999);Viral Vectors (Kaplif & Loewy eds., Academic Press 1995);Immunology Methods Manual (I. Lefkovits ed., Academic Press 1997); Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in
- 20 Biotechnology (Doyle & Griffiths, John Wiley & Sons 1998).

- Buluş daha ayrıntılı bir dille açıklanmadan önce, bu buluşun burada açıklanan buluş yapıları ile sınırlı olmadığı, bu buluşa ilişkin başka yapıların da oluşturulabileceği anlaşılmalıdır. Ayrıca burada
- 25 kullanılan terminolojinin sadece belirli buluş yapılarını açıklamak amacıyla kullanıldığı ve buluşun bu terminoloji ile sınırlı olmadığı, zira buluşun yalnızca ekteki istemler ile sınırlı olduğu da unutulmamalıdır.

Bir değer aralığının belirtildiği durumlarda, değer aralığının geğtiği içerikte açıkça aksi belirtilmediği sürece o değer aralığının alt limitininonda birler basamağına bir yazılarak gösterilen değere varana  
5 dek değer aralığının st ve alt limitleri arasında kalan her ara değer ve belirtilen aralık dahilindeki diğer her türlü belirtilmiş değer veya ara değerin de bu buluşun kapsamına girdiği açıktır. Belirtilen aralığınzel olarak kapsamı dışında bırakılmış olabilecek limitlere tâbi olarak, bu daha küçük aralıkların st ve alt limitleri birbirlerinden  
10 bağımsız olarak daha küçük aralıkların dahilinde sayılabilir veya sayılmayabilirler ve yine bu buluşun kapsamına girerler. Belirtilen aralığın ilgili limitlerden birini veya her ikisini de bünyesinde barındırdığı durumlara istinaden, bu limitlerden birini veya her ikisini de dışarıda bırakan aralıklar da bu buluşun kapsamına girerler.

15

Belirli aralıklar burada öncesinde "yaklaşık" terimi kullanılan sayısal değerlerle sunulmaktadırlar. "Yaklaşık" terimi burada fiili değerin terimi müteakiben belirtilen sayısal değere eşit olabileceği gibi terimi müteakiben belirtilen sayıya yakın veya ona hemen hemen denk bir  
20 sayıya eşit olabileceğini de ortaya koymak amacıyla kullanılmaktadır. Bir sayının spesifik olarak belirtilen sayıya yakın mı yoksa ona hemen hemen denk mi olduğunun belirlenmesinde, belirtilmemiş olan yakın veya hemen hemen denk sayı, geğtiği içerikte, spesifik olarak belirtilen sayının büyük lde eşdeğerini sağlayan bir sayı olabilir.

25

Açıkça aksine işaret eden bir anlamda tanımlanmadıka, burada geçen tüm teknik ve bilimsel terimler, buluşun ilgili olduğu sektörde olağan bilgi ve beceri sahibi uzmanların ilk bakışta anlayacakları anlamlarda



kullanılmaktadırlar. Bu buluşun uygulanışı veya test edilişi sırasında burada belirtilenlere benzer veya eşdeğer başka yöntem ve materyallerin kullanılmasının bir sakıncası olmamakla birlikte, burada sunulmakta olan yöntemler ve materyallerin, kullanılması tercih edilen yöntemler ve materyaller oldukları bilinmelidir.

Burada herhangi bir yayına yapılan atıf yalnızca o yayının bu buluşun başvuru tarihinden önce açıklanması amacını taşımaktadır ve bu buluşun bu patent açıklamasına önceki buluş sebebiyle daha erken bir tarih atma hakkına sahip olmadığını kabulü anlamında yorumlanmamalıdır. Ek olarak, sunulan yayın tarihleri, fiili yayın tarihlerinden farklı olabilir ve bunun da bağımsız şekilde teyit edilmesi gerekebilir.

Burada ve ekli istemlerde kullanılan "bir", "bu" ve "o" tekil formlarının, içerikte açıkça aksi belirtilmedikçe, atıf yaptıkları unsurların çoğul hallerini de içine alan bir anlam taşıdıkları gözden kaçırılmamalıdır. Bundan dolayı, örneğin "bir polinükleotide" atıf yapıldığında o polinükleotidden birden çok bulunuyor olabileceği ya da belirli bir "polipeptide" atıf yapıldığında aslında o polipeptidden ve sektörde bilgi ve beceri sahibi uzmanlarca bilinen muadillerinden bir veya daha fazla sayıda bulunuyor olabileceği de dikkate alınmalı ve başka unsurlara ilişkin benzer durumlarda da aynı gerçek akılda tutulmalıdır. Ayrıca istemlerin herhangi bir isteğe bağlı elemanı dışarıda bırakacak şekilde tasarlanabilecekleri not edilmelidir. Bu beyanın yapılmasının amacı, istem konusu elemanlar belirtilirken onlarla birlikte "tek başına", "yalnızca", "sadece" ve benzeri dışlayıcı

bir terminolojinin kullanılabilceğini ya da bir "negatif" sınırlamanın söz konusu olabileceğini önceden haber vermektir.

Açıkça anlaşılmalrı için ayrı buluş yapıları kapsamında tanımlanan ve tarif edilen belirli buluş özellikleri, tek bir buluş yapısı kapsamında kombinasyon halinde de sunulabilirler. Benzer şekilde, kısaca özetlemek maksadıyla aynı buluş yapısı kapsamında tanımlanan ve tarif edilen çeşitli buluş özellikleri, uygun alt-kombinasyonlar halinde ya da ayrı ayrı da sunulabilirler. Bu buluşa ilişkin yapılardan oluşan tüm kombinasyonlar, burada ayrı ayrı tüm ayrıntılarıyla açıklanmış ve ortaya konmuş olsunlar ya da olmasınlar, bu buluşun kapsamı dahilinde sayılırlar. Bunun yanı sıra, çeşitli buluş yapıları ve bu yapılardaki çeşitli elemanlardan oluşan tüm alt-kombinasyonlar da, burada ayrı ayrı tüm ayrıntılarıyla açıklanmış ve ortaya konmuş olsunlar ya da olmasınlar, bu buluşun kapsamı dahilinde sayılırlar.

Burada tartışılan yayınlar, yalnızca bu yayınları bu patent başvurusunun başvuru tarihinden önce açıklamak maksadıyla sunulmaktadırlar. Burada yapılan beyanların hiçbirisi, bu buluşun bu patent açıklamasına önceki buluş sebebiyle daha erken bir tarih atma hakkına sahip olmadığının kabulü anlamında yorumlanamaz. Ek olarak, sunulan yayın tarihleri, fiili yayın tarihlerinden farklı olabilir ve bunun da bağımsız şekilde teyit edilmesi gerekebilir.

## 25 AYRINTILI TARİFNAME - BOLUM I

Bu buluş, bir hedefleme sekansı içeren ve bir modifiye edici polipeptid ile birlikte, bir hedef DNA'da ve/veya o hedef DNA ile

ilişkili bir polipeptidde yer-spesifik modifikasyon yapılmasına olanak sağlayan bir DNA-hedefleyen RNA ortaya koyar. Bu buluş, yer-spesifik modifiye edici polipeptidler de ortaya koyar. Bu buluş, bir hedef DNA'da ve/veya o hedef DNA ile ilişkili bir polipeptidde yer-spesifik modifikasyon yapmaya yarayan yöntemler de ortaya koyar. Bu buluş, bir hedef hücrede yer alan bir hedef nükleik asidin transkripsiyonunu modüle etmeyi sağlayan ve genel itibarıyla hedef nükleik asidin bir enzimatik olarak inaktif Cas9 polipeptidi ve bir DNA-hedefleyen RNA ile temas ettirilmesine dayanan yöntemler ortaya koyar. Bu yöntemleri gerçekleştirmek için kullanılacak kitler ve bileşimler de bu buluş kapsamında sunulmaktadır. Bu buluş, insan olmayan Cas9 transgenik çok hücreli organizmalar ve ayrıca, Cas9 üreten genetiği değiştirilmiş hücreler ortaya koyar.

## 15 **NUKLEİK ASİTLER**

### **DNA-hedefleyen RNA**

Bu buluş, bir ilgili polipeptidin (örneğin bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid) aktivitelerini bir hedef DNA içerisindeki spesifik bir hedef sekansa yönlendiren bir DNA-hedefleyen RNA ortaya koyar. Buluşa uygun bir DNA-hedefleyen RNA'da şunlar bulunur: bir birinci segment (burada bir "DNA-hedefleyen segment" veya bir "DNA-hedefleyen sekans" olarak da anılmaktadır) ve bir ikinci segment (burada bir "protein-bağımlı segment" veya bir "protein-bağımlı sekans" olarak da anılmaktadır).

### **Bir DNA-hedefleyen RNA'nın DNA-hedefleyen segmenti**

- Buluşa uygun bir DNA-hedefleyen RNA'nın DNA-hedefleyen segmenti, bir hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı nitelikte olan bir nükleotid sekansı ihtiva eder. Başka bir deyişle, buluşa uygun bir
- 5 DNA-hedefleyen RNA'nın DNA-hedefleyen segmenti, bir hedef DNA ile hibridizasyon (yani baz eşleşmesi) yoluyla sekans-spesifik bir şekilde etkileşime girer. DNA-hedefleyen segmentin nükleotid sekansı çeşitlilik gösterebilir ve DNA-hedefleyen RNA ile hedef DNA'nın hedef DNA içerisinde etkileşime gireceği konumu belirler. Buluşa
- 10 uygun bir DNA-hedefleyen RNA'nın DNA-hedefleyen segmenti, segmentin hedef DNA içerisindeki istenen herhangi bir sekansa hibridize olmasını sağlayacak bir modifikasyona uğratılabilir (örneğin genetik mühendisliği yoluyla).
- 15 DNA-hedefleyen segment, yaklaşık 12 nükleotid ile yaklaşık 100 nükleotid arası bir sayıda nükleotidi kapsayan bir uzunluğa sahip olabilir. DNA-hedefleyen segment, örneğin, yaklaşık 12 nükleotid (nt) ile yaklaşık 80 nt, yaklaşık 12 nt ile yaklaşık 50 nt, yaklaşık 12 nt ile yaklaşık 40 nt, yaklaşık 12 nt ile yaklaşık 30 nt, yaklaşık 12 nt ile
- 20 yaklaşık 25 nt, yaklaşık 12 nt ile yaklaşık 20 nt ya da yaklaşık 12 nt ile yaklaşık 19 nt arası bir sayıda nükleotidi kapsayan bir uzunluğa sahip olabilir. DNA-hedefleyen segment, örneğin, yaklaşık 19 nt ile yaklaşık 20 nt, yaklaşık 19 nt ile yaklaşık 25 nt, yaklaşık 19 nt ile yaklaşık 30 nt, yaklaşık 19 nt ile yaklaşık 35 nt, yaklaşık 19 nt ile
- 25 yaklaşık 40 nt, yaklaşık 19 nt ile yaklaşık 45 nt, yaklaşık 19 nt ile yaklaşık 50 nt, yaklaşık 19 nt ile yaklaşık 60 nt, yaklaşık 19 nt ile yaklaşık 70 nt, yaklaşık 19 nt ile yaklaşık 80 nt, yaklaşık 19 nt ile yaklaşık 90 nt, yaklaşık 19 nt ile yaklaşık 100 nt, yaklaşık 20 nt ile

yaklaşık 25 nt, 20 nt ile yaklaşık 30 nt, 20 nt ile yaklaşık 35 nt, 20 nt  
 ile yaklaşık 40 nt, 20 nt ile yaklaşık 45 nt, 20 nt ile yaklaşık 50 nt, 20  
 nt ile yaklaşık 60 nt, 20 nt ile yaklaşık 70 nt, 20 nt ile yaklaşık 80 nt,  
 20 nt ile yaklaşık 90 nt ya da 20 nt ile yaklaşık 100 nt arası bir sayıda  
 5 nükleotidi kapsayan bir uzunluğa sahip olabilir. DNA-hedefleyen  
 segmentin hedef DNA'daki bir nükleotid sekansını (hedef sekans)  
 tamamlayıcı nitelikte olan nükleotid sekansı (DNA-hedefleyen  
 sekans), en az yaklaşık 12 nükleotidi kapsayan bir uzunluğa sahip  
 olabilir. DNA-hedefleyen segmentin hedef DNA'daki bir hedef  
 10 sekansı tamamlayıcı nitelikte olan DNA-hedefleyen sekansı, örneğin,  
 en az yaklaşık 12 nt, en az yaklaşık 15 nt, en az yaklaşık 18 nt, en az  
 yaklaşık 19 nt, en az yaklaşık 20 nt, en az yaklaşık 25 nt, en az  
 yaklaşık 30 nt, en az yaklaşık 35 nt ya da en az yaklaşık 40 nükleotidi  
 kapsayan bir uzunluğa sahip olabilir. DNA-hedefleyen segmentin  
 15 hedef DNA'daki bir hedef sekansı tamamlayıcı nitelikte olan DNA-  
 hedefleyen sekansı, örneğin, yaklaşık 12 nükleotid (nt) ile yaklaşık 80  
 nt, yaklaşık 12 nt ile yaklaşık 50 nt, yaklaşık 12 nt ile yaklaşık 45 nt,  
 yaklaşık 12 nt ile yaklaşık 40 nt, yaklaşık 12 nt ile yaklaşık 35 nt,  
 yaklaşık 12 nt ile yaklaşık 30 nt, yaklaşık 12 nt ile yaklaşık 25 nt,  
 20 yaklaşık 12 nt ile yaklaşık 20 nt, yaklaşık 12 nt ile yaklaşık 19 nt,  
 yaklaşık 19 nt ile yaklaşık 20 nt, yaklaşık 19 nt ile yaklaşık 25 nt,  
 yaklaşık 19 nt ile yaklaşık 30 nt, yaklaşık 19 nt ile yaklaşık 35 nt,  
 yaklaşık 19 nt ile yaklaşık 40 nt, yaklaşık 19 nt ile yaklaşık 45 nt,  
 yaklaşık 19 nt ile yaklaşık 50 nt, yaklaşık 19 nt ile yaklaşık 60 nt,  
 25 yaklaşık 20 nt ile yaklaşık 25 nt, 20 nt ile yaklaşık 30 nt, 20 nt ile  
 yaklaşık 35 nt, 20 nt ile yaklaşık 40 nt, 20 nt ile yaklaşık 45 nt, 20 nt  
 ile yaklaşık 50 nt ya da 20 nt ile yaklaşık 60 nt arası bir sayıda  
 nükleotidi kapsayan bir uzunluğa sahip olabilir. DNA-hedefleyen

segmentin hedef DNA'daki bir nükleotid sekansını (hedef sekans) tamamlayıcı nitelikte olan nükleotid sekansı (DNA-hedefleyen sekans) en az yaklaşık 12 nükleotidi kapsayan bir uzunluğa sahip olabilir.

5

Bazı durumlarda, DNA-hedefleyen segmentin hedef DNA'daki bir hedef sekansı tamamlayıcı nitelikte olan DNA-hedefleyen sekansı 20 nükleotid uzunluğundadır. Bazı durumlarda, DNA-hedefleyen segmentin hedef DNA'daki bir hedef sekansı tamamlayıcı nitelikte  
10 olan DNA-hedefleyen sekansı 19 nükleotid uzunluğundadır.

DNA-hedefleyen segmentin DNA-hedefleyen sekansı ile hedef DNA'nın hedef sekansı arasındaki tamamlayıcılık oranı en az yaklaşık %60 (örneğin en az %65, en az %70, en az %75, en az %80, en az  
15 %85, en az %90, en az %95, en az %97, en az %98, en az %99 ya da 100) olabilir. Bazı durumlarda, DNA-hedefleyen segmentin DNA-hedefleyen sekansı ile hedef DNA'nın hedef sekansı arasındaki tamamlayıcılık oranı, hedef DNA'nın tamamlayıcı iplikçığının hedef sekansında 5' ucunda bulunan yedi bitişik nükleotid boyunca  
20 %100'dür. Bazı durumlarda, DNA-hedefleyen segmentin DNA-hedefleyen sekansı ile hedef DNA'nın hedef sekansı arasındaki tamamlayıcılık oranı, yaklaşık 20 bitişik nükleotid boyunca en az %60'tır. Bazı durumlarda, DNA-hedefleyen segmentin DNA-hedefleyen sekansı ile hedef DNA'nın hedef sekansı arasındaki  
25 tamamlayıcılık oranı, hedef DNA'nın tamamlayıcı iplikçığının hedef sekansında 5' ucunda bulunan on dört bitişik nükleotid boyunca %100'dür ve sekansın geri kalan kısmında %0 kadar düşüktür. Bu gibi bir durumda, DNA-hedefleyen sekans 14 nükleotid uzunluğunda bir

sekans olarak değerlendirilebilir (bkz: Şekil 12D-E). Bazı durumlarda, DNA-hedefleyen segmentin DNA-hedefleyen sekansı ile hedef DNA'nın hedef sekansı arasındaki tamamlayıcılık oranı, hedef DNA'nın tamamlayıcı iplikçığının hedef sekansında 5' ucunda bulunan yedi bitişik nükleotid boyunca %100'dür ve sekansın geri kalan kısmında %0 kadar düşüktür. Bu gibi bir durumda, DNA-hedefleyen sekans 7 nükleotid uzunluğunda bir sekans olarak değerlendirilebilir.

### **Bir DNA-hedefleyen RNA'nın protein-bağlanımlı segmenti**

10

Buluşa uygun bir DNA-hedefleyen RNA'nın protein-bağlanımlı segmenti bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid ile etkileşime girer. Buluşa uygun DNA-hedefleyen RNA, bağlanan polipeptidi yukarıda bahsi geçen DNA-hedefleyen segmenti aracılığıyla hedef DNA içerisindeki spesifik bir nükleotid sekansına yönlendirir. Buluşa uygun bir DNA-hedefleyen RNA'nın protein-bağlanımlı segmentinde, birbirlerini tamamlayıcı nitelikte olan iki adet nükleotid kesiti bulunur. Protein-bağlanımlı segmentin bu tamamlayıcı nükleotid kesitleri hibridize olarak bir çift iplikçikli RNA dubleksi (dsRNA) oluştururlar (bkz: Şekiller 1A ve 1B).

20

Buluşa uygun bir çift moleküllü DNA-hedefleyen RNA'da iki ayrı RNA molekülü yer alır. Buluşa uygun bir çift moleküllü DNA-hedefleyen RNA'nın bu iki RNA molekülünden her biri, diğerindeki nükleotid kesitini tamamlayıcı nitelikte olan bir nükleotid kesiti içerir ve bahsi geçen iki RNA molekülündeki söz konusu tamamlayıcı nükleotid kesitleri hibridize olarak protein-bağlanımlı segmentin çift iplikçikli RNA dubleksini oluştururlar (Şekil 1A).

25

Buluşun bazı yapılarında, aktive edici RNA'nın dubleks oluşturucu segmenti, en az 8 adet bitişik nükleotidden oluşan bir kesit boyunca SEKANS KOD NO.: 431-562'de gösterilen aktive edici RNA (tracrRNA) moleküllerinden biri veya onun bir tamamlayıcısı ile en az

5 yaklaşık %60 oranında özdeştir. Aktive edici RNA'nın dubleks oluşturucu segmenti (ya da aktive edici RNA'nın dubleks oluşturucu segmentini kodlayan DNA), örneğin, en az 8 adet bitişik nükleotidden oluşan bir kesit boyunca SEKANS KOD NO.: 431-562'de gösterilen tracrRNA sekanslarından biri veya onun bir tamamlayıcısı ile en az

10 yaklaşık %60 oranında, en az yaklaşık %65 oranında, en az yaklaşık %70 oranında, en az yaklaşık %75 oranında, en az yaklaşık %80 oranında, en az yaklaşık %85 oranında, en az yaklaşık %90 oranında, en az yaklaşık %95 oranında, en az yaklaşık %98 oranında, en az yaklaşık %99 oranında ya da %100 oranında özdeştir.

15

Buluşun bazı yapılarında, hedef gösteren RNA'nın dubleks oluşturucu segmenti, en az 8 adet bitişik nükleotidden oluşan bir kesit boyunca SEKANS KOD NO.: 563-679'da gösterilen hedef gösteren RNA (crRNA) sekanslarından biri veya onun bir tamamlayıcısı ile en az

20 yaklaşık %60 oranında özdeştir. Hedef gösteren RNA'nın dubleks oluşturucu segmenti (ya da hedef gösteren RNA'nın dubleks oluşturucu segmentini kodlayan DNA), örneğin, en az 8 adet bitişik nükleotidden oluşan bir kesit boyunca SEKANS KOD NO.: 563-679'da gösterilen crRNA sekanslarından biri veya onun bir

25 tamamlayıcısı ile en az yaklaşık %65 oranında, en az yaklaşık %70 oranında, en az yaklaşık %75 oranında, en az yaklaşık %80 oranında, en az yaklaşık %85 oranında, en az yaklaşık %90 oranında, en az



yaklaşık %95 oranında, en az yaklaşık %98 oranında, en az yaklaşık %99 oranında ya da %100 oranında özdeştir.

Burada tanımlandığı gibi olan bir iki moleküllü DNA-hedefleyen RNA, bir hedef gösteren RNA ile bir aktive edici RNA'nın kontrollü (yani belirli bir şarta bağlı) bir bağlanım gerçekleştirmelerine olanak sağlayacak bir şekilde tasarlanabilir. Aktive edici RNA ile hedef gösteren RNA dCas9'un bulunduğu bir fonksiyonel komplekste bağlı olmadıkları sürece bir iki moleküllü DNA-hedefleyen RNA işlem gösteremeyeceği için, bir iki moleküllü DNA-hedefleyen RNA, aktive edici RNA ile hedef gösteren RNA arasındaki bağlanım indüklenebilir hale getirilerek indüklenebilir (örneğin ilaçla indüklenebilir) nitelikte hazırlanabilir. Bu bağlamda sınırlayıcı olmayan bir örnek vermek gerekirse, aktive edici RNA'nın hedef gösteren RNA'ya bağlanımını düzenlemek (yani kontrol altında tutmak) için RNA aptamerlerinden istifade edilebilir. Buna bağlı olarak, aktive edici RNA ve/veya hedef gösteren RNA'da bir RNA aptameri sekansı bulunabilir.

RNA aptamerleri sektörde bilinen unsurlardır ve genel itibarıyla ribo-anahtarın bir sentetik versiyonunu teşkil ederler. "RNA aptameri" ve "ribo-anahtar" terimleri burada birbirlerine alternatif terimler gibi kullanılmakta olup, bir parçasını teşkil ettikleri RNA molekülünün yapısı (ve dolayısıyla spesifik sekansların bulunma durumu) için indüklenebilir bir düzenlenme olanağı sağlayan hem sentetik hem de doğal nükleik asit sekanslarını içine alan bir anlam taşımaktadırlar. RNA aptamerleri, genelde, katlanıp belirli bir yapı (örneğin bir saç tokası) haline gelen ve bu yapıya büründüğünde belirli bir ilaca (örneğin bir küçük molekül) spesifik bağlanabilen bir sekans ihtiva

ederler. İlaça bağlanması sonucunda RNA'nın katlanmasında yapısal bir değişim meydana gelir ve bu değişim de aptamerin bir parçasını teşkil ettiği nükleik asidin bir özelliğinde bir değişikliğe yol açar. Buna verilebilecek örneklerden bazıları şunlardır: (i) bir aptamer bulunan bir aktive edici RNA, aptamer uygun ilaca bağlanmadığı sürece kognat hedef gösteren RNA'ya bağlanma kabiliyetini ortaya koyamayabilir; (ii) bir aptamer bulunan bir hedef gösteren RNA, aptamer uygun ilaca bağlanmadığı sürece kognat aktive edici RNA'ya bağlanma kabiliyetini ortaya koyamayabilir ve (iii) her ikisi de farklı birer ilaca bağlanan farklı birer aptamer ihtiva eden bir hedef gösteren RNA ile bir aktive edici RNA, bahsi geçen her iki ilaç da mevcut olmadığı sürece birbirlerine bağlanma kabiliyetlerini ortaya koyamayabilirler. Bu örneklerden anlaşılacağı üzere, bir iki moleküllü DNA-hedefleyen RNA, indüklenebilir olacak şekilde tasarlanabilir.

Aptamer ve ribo-anahtar örnekleri için örneğin aşağıda sıralanan eserlere bakılabilir: Nakamura et al., *Genes Cells*. 2012 May;17(5):344-64; Vavalle et al., *Future Cardiol*. 2012 May;8(3):371-82; Citartan et al., *Biosens Bioelectron*. 2012 Apr 15;34(1):1-11; Liberman et al., *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2012 May-Jun;3(3):369-84.

İki moleküllü DNA-hedefleyen RNA'ya dahil edilebilecek nükleotid sekanslarına örnek olarak, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, SEKANS KOD NO.: 431-562'de gösterilen sekanslar veya onların tamamlayıcılarından herhangi biri ve onunla eşleşip hibridize olarak bir protein-bağlanım segment oluşturabilecek olan SEKANS KOD

NO.: 563-679'da gösterilen sekanslar veya onların tamamlayıcılarından herhangi biri gösterilebilir.

Buluşa uygun bir tek moleküllü DNA-hedefleyen RNA, birbirlerini  
 5 tamamlayıcı nitelikte olan, ara nükleotidler ("bağlayıcılar" veya  
 "bağlayıcı nükleotidler") aracılığıyla birbirlerine kovalent bağlı olan  
 ve hibridize olup protein-bağlanımlı segmentin çift iplikçikli RNA  
 dubleksini (dsRNA dubleksi) oluşturarak bir sap-ilmik yapısı  
 meydana getiren iki nükleotid kesiti (bir hedef gösteren RNA ve bir  
 10 aktive edici RNA) ihtiva eder (Şekil 1B). Hedef gösteren RNA ve  
 aktive edici RNA, hedef gösteren RNA'nın 3' ucu ve aktive edici  
 RNA'nın 5' ucu üzerinden birbirlerine kovalent bağlanabilirler.  
 Alternatif olarak, hedef gösteren RNA ve aktive edici RNA, hedef  
 gösteren RNA'nın 5' ucu ve aktive edici RNA'nın 3'u üzerinden  
 15 birbirlerine kovalent bağlanabilirler.

Bir tek moleküllü DNA-hedefleyen RNA'nın bağlayıcısı, yaklaşık 3  
 nükleotid ile yaklaşık 100 nükleotid arası bir sayıda nükleotidi  
 kapsayan bir uzunluğa sahip olabilir. Bağlayıcı, örneğin, yaklaşık 3  
 20 nükleotid (nt) ile yaklaşık 90 nt, yaklaşık 3 nükleotid (nt) ile yaklaşık  
 80 nt, yaklaşık 3 nükleotid (nt) ile yaklaşık 70 nt, 3 nükleotid (nt) ile  
 yaklaşık 60 nt, 3 nükleotid (nt) ile yaklaşık 50 nt, 3 nükleotid (nt) ile  
 yaklaşık 40 nt, 3 nükleotid (nt) ile yaklaşık 30 nt, 3 nükleotid (nt) ile  
 yaklaşık 20 nt ya da 3 nükleotid (nt) ile yaklaşık 10 nt arası bir sayıda  
 25 nükleotidi kapsayan bir uzunluğa sahip olabilir. Bağlayıcı, örneğin,  
 yaklaşık 3 nt ile yaklaşık 5 nt, yaklaşık 5 nt ile yaklaşık 10 nt, yaklaşık  
 10 nt ile yaklaşık 15 nt, yaklaşık 15 nt ile yaklaşık 20 nt, yaklaşık 20  
 nt ile yaklaşık 25 nt, yaklaşık 25 nt ile yaklaşık 30 nt, yaklaşık 30 nt

ile yaklaşık 35 nt, yaklaşık 35 nt ile yaklaşık 40 nt, yaklaşık 40 nt ile yaklaşık 50 nt, yaklaşık 50 nt ile yaklaşık 60 nt, yaklaşık 60 nt ile yaklaşık 70 nt, yaklaşık 70 nt ile yaklaşık 80 nt, yaklaşık 80 nt ile yaklaşık 90 nt ya da yaklaşık 90 nt ile yaklaşık 100 nt arası bir sayıda  
5 nükleotidi kapsayan bir uzunluğa sahip olabilir. Buluşun bazı yapılarında, bir tek moleküllü DNA-hedefleyen RNA'nın bağlayıcısı 4 nükleotidi kapsayan bir uzunluğa sahiptir.

Ornek niteliğindeki bir tek moleküllü DNA-hedefleyen RNA,  
10 hibridize olup bir dsRNA dubleksi oluşturan iki tamamlayıcı nükleotid kesiti ihtiva eder. Buluşun bazı yapılarında, tek moleküllü DNA-hedefleyen RNA'nın iki tamamlayıcı nükleotid kesitinden biri (ya da onu kodlayan DNA), en az 8 adet bitişik nükleotidden oluşan bir kesit boyunca SEKANS KOD NO.: 431-562'de gösterilen aktive edici RNA  
15 (tracrRNA) molekülleri veya onların tamamlayıcılarından biri ile en az yaklaşık %60 oranında özdeştir. Tek moleküllü DNA-hedefleyen RNA'nın iki tamamlayıcı nükleotid kesitinden biri (ya da onu kodlayan DNA), örneğin, en az 8 adet bitişik nükleotidden oluşan bir kesit boyunca SEKANS KOD NO.: 431-562'de gösterilen aktive edici  
20 RNA (tracrRNA) molekülleri veya onların tamamlayıcılarından biri ile en az yaklaşık %65 oranında, en az yaklaşık %70 oranında, en az yaklaşık %75 oranında, en az yaklaşık %80 oranında, en az yaklaşık %85 oranında, en az yaklaşık %90 oranında, en az yaklaşık %95 oranında, en az yaklaşık %98 oranında, en az yaklaşık %99 oranında  
25 ya da %100 oranında özdeştir.

Buluşun bazı yapılarında, tek moleküllü DNA-hedefleyen RNA'nın iki tamamlayıcı nükleotid kesitinden biri (ya da onu kodlayan DNA), en

az 8 adet bitişik nükleotidden oluşan bir kesit boyunca SEKANS KOD NO.: 563-679'da gösterilen hedef gösteren RNA (crRNA) sekansları veya onların tamamlayıcılarından biri ile en az yaklaşık %60 oranında özdeştir. Tek moleküllü DNA-hedefleyen RNA'nın iki tamamlayıcı

5 nükleotid kesitinden biri (ya da onu kodlayan DNA), örneğin, en az 8 adet bitişik nükleotidden oluşan bir kesit boyunca SEKANS KOD NO.: 563-679'da gösterilen crRNA sekansları veya onların tamamlayıcılarından biri ile en az yaklaşık %65 oranında, en az yaklaşık %70 oranında, en az yaklaşık %75 oranında, en az yaklaşık

10 %80 oranında, en az yaklaşık %85 oranında, en az yaklaşık %90 oranında, en az yaklaşık %95 oranında, en az yaklaşık %98 oranında, en az yaklaşık %99 oranında ya da %100 oranında özdeştir.

SEKANS KOD NO.: 431-679da gösterilen sekanslar için uygun

15 doğada kendiliğinden oluşan kognat crRNA ve tracrRNA çiftleri, belirleme esnasında tür adlarına ve baz eşleşmesine (protein-bağlanımlı domainin dsRNA dubleksini için) dikkat edilerek rutin uygulamalarla belirlenebilirler (sınırlayıcı olmayan bir örnek olarak bkz: Şekil 8).

20

Hem buluşa uygun bir tek moleküllü DNA-hedefleyen RNA hem de söz konusu bir çift moleküllü DNA-hedefleyen RNA'ya istinaden, **Şekil 57'de**, doğada kendiliğinden oluşan tracrRNA'lar ve crRNA'lar ile epey az şey paylaşan (kabaca %50 oranında özdeşlik gösteren)

25 artifisyel sekansların DNA-hedefleyen RNA'nın protein-bağlanımlı domaininin yapısını muhafaza ettikleri sürece Cas9 ile birlikte hedef DNA'yı yarma işlevini yerine getirebilecekleri ortaya konmaktadır. Dolayısıyla, artifisyel protein-bağlanımlı domainler tasarlarken (ister

iki moleküllü ister tek moleküllü versiyon) bir DNA-hedefleyen RNA'nın bir doğada kendiliğinden oluşan protein-bağlanımlı domaininin RNA katlanma yapısı dikkate alınabilir. Sınırlayıcı bir anlam taşımayan bir örnek vermek gerekirse, Şekil 57'de gösterilen

5 fonksiyonel artifisyel DNA-hedefleyen RNA, doğada kendiliğinden oluşan protein-bağlanımlı segmentinin yapısı temelinde tasarlanmıştır (örneğin, RNA dubleksinde aynı sayıda baz çifti barındıracak ve doğada kendiliğinden oluşan RNA'da bulunanla aynı "tümsek" bölgesini içerecek şekilde). Sektörde olağan bilgi ve beceri sahibi bir

10 uzmanın herhangi bir türdeki herhangi bir doğada kendiliğinden oluşan crRNA:tracrRNA çiftine (türlü çeşit türde kaydedilmiş olan crRNA ve tracrRNA sekansları için bkz: SEKANS KOD NO.: 431-679) ilişkin yapıyı rahatlıkla üretebilecek olmasından dolayı, bir artifisyel DNA-hedefleyen RNA, belirli bir türe ait Cas9 (veya ilişkili

15 bir Cas9, bkz: Şekil 32A) kullanılıyorsa o türe ilişkin doğal yapıyı taklit edecek şekilde tasarlanabilir (bkz: Şekil 24D ve ayrıca Örnek 1'deki ilgili ayrıntılar). Dolayısıyla, uygun bir DNA-hedefleyen RNA, bir doğada kendiliğinden oluşan DNA-hedefleyen RNA'nın bir protein-bağlanımlı domaininin yapısını taklit edecek şekilde

20 tasarlanmış bir protein-bağlanımlı domain ihtiva eden bir artifisyel olarak tasarlanmış RNA (doğada kendiliğinden oluşmayan) olabilir (uygun kognat çiftini belirlerken türün adını dikkate almak için bkz: SEKANS KOD NO.: 431-679).

25 Protein-bağlanımlı segment, yaklaşık 10 nükleotid ile yaklaşık 100 nükleotid arası bir sayıda nükleotidi kapsayan bir uzunluğa sahip olabilir. Protein-bağlanımlı segment, örneğin, yaklaşık 15 nükleotid (nt) ile yaklaşık 80 nt, yaklaşık 15 nt ile yaklaşık 50 nt, yaklaşık 15 nt

ile yaklaşık 40 nt, yaklaşık 15 nt ile yaklaşık 30 nt ya da yaklaşık 15 nt ile yaklaşık 25 nt arası bir sayıda nükleotidi kapsayan bir uzunluğa sahip olabilir.

- 5 Yine hem buluşa uygun bir tek moleküllü DNA-hedefleyen RNA hem de söz konusu olan bir çift moleküllü DNA-hedefleyen RNA'ya istinaden, protein-bağlanımlı segmentin dsRNA dubleksini, yaklaşık 6 baz çifti (bp) ile yaklaşık 50 bp arası bir sayıda baz çiftini kapsayan bir uzunluğa sahip olabilir. Protein-bağlanımlı segmentin dsRNA
- 10 dubleksini, örneğin, yaklaşık 6 bp ile yaklaşık 40 bp, yaklaşık 6 bp ile yaklaşık 30 bp, yaklaşık 6 bp ile yaklaşık 25 bp, yaklaşık 6 bp ile yaklaşık 20 bp, yaklaşık 6 bp ile yaklaşık 15 bp, yaklaşık 8 bp ile yaklaşık 40 bp, yaklaşık 8 bp ile yaklaşık 30 bp, yaklaşık 8 bp ile yaklaşık 25 bp, yaklaşık 8 bp ile yaklaşık 20 bp ya da yaklaşık 8 bp ile
- 15 yaklaşık 15 bp arası bir sayıda baz çiftini kapsayan bir uzunluğa sahip olabilir. Protein-bağlanımlı segmentin dsRNA dubleksini, örneğin, yaklaşık 8 bp ile yaklaşık 10 bp, yaklaşık 10 bp ile yaklaşık 15 bp, yaklaşık 15 bp ile yaklaşık 18 bp, yaklaşık 18 bp ile yaklaşık 20 bp, yaklaşık 20 bp ile yaklaşık 25 bp, yaklaşık 25 bp ile yaklaşık 30 bp,
- 20 yaklaşık 30 bp ile yaklaşık 35 bp, yaklaşık 35 bp ile yaklaşık 40 bp ya da yaklaşık 40 bp ile yaklaşık 50 bp arası bir sayıda baz çiftini kapsayan bir uzunluğa sahip olabilir. Buluşun bazı yapılarında, protein-bağlanımlı segmentin dsRNA dubleksini, 36 baz çiftini kapsayan bir uzunluğa sahiptir. Hibridize olup protein-bağlanımlı
- 25 segmentin dsRNA dubleksini oluşturan nükleotid sekansları arasındaki tamamlayıcılık oranı en az yaklaşık %60'tır. Hibridize olup protein-bağlanımlı segmentin dsRNA dubleksini oluşturan nükleotid sekansları arasındaki tamamlayıcılık oranı, örneğin, en az yaklaşık

%65, en az yaklaşık %70, en az yaklaşık %75, en az yaklaşık %80, en az yaklaşık %85, en az yaklaşık %90, en az yaklaşık %95, en az yaklaşık %98 ya da en az yaklaşık %99'dur. Bazı durumlarda, hibridize olup protein-bağlanımlı segmentin dsRNA dubleksini  
5 oluşturan nükleotid sekansları arasındaki tamamlayıcılık oranı %100'dür.

### **Yer-hedefli modifiye edici polipeptid**

10 Buluşa uygun bir DNA-hedefleyen RNA ile buluşa uygun bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid birlikte bir kompleks oluştururlar. DNA-hedefleyen RNA, bir hedef DNA'nın bir sekansını tamamlayıcı nitelikte bir nükleotid sekansı ihtiva etmesi sayesinde komplekse hedef spesifisitesi kazandırır (yukarıda belirtildiği gibi). Kompleksteki  
15 yer-hedefli modifiye edici polipeptid ise yer-spesifik aktiviteyi sağlar. Diğer bir deyişle, yer-hedefli modifiye edici polipeptid, (yukarıda açıklanan) DNA-hedefleyen RNA'nın asgari olarak protein-bağlanımlı segmenti ile kurduğu ilişki sayesinde bir DNA sekansına (örneğin bir kromozomal sekans veya bir ekstrakromozomal sekans, örneğin bir  
20 epizomal sekans, bir mini-daire sekansı, bir mitokondri sekansı, bir kloroplast sekansı ve benzeri) doğru yönlendirilir.

Buluşa uygun bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid, hedef DNA'yı (örneğin hedef DNA'nın yarılanması veya metilasyonu) ve/veya hedef  
25 DNA ile ilişkili bir polipeptidi (örneğin bir histon kuyruğunun metilasyonu veya asetilasyonu) modifiye eder. Bir yer-hedefli modifiye edici polipeptide burada bir "yer-hedefli polipeptid" ya da



bir "RNA-bağlanımlı yer-hedefli modifiye edici polipeptid" olarak da atıf yapılmaktadır.

Bazı durumlarda, yer-hedefli modifiye edici polipeptid bir doğada kendiliğinden oluşan modifiye edici polipeptiddir. Diğer durumlarda, yer-hedefli modifiye edici polipeptid bir doğada kendiliğinden oluşmayan polipeptiddir (örneğin aşağıda açıklandığı gibi olan bir kimerik polipeptid ya da örneğin mutasyon, delesyon veya insersiyon tipi bir modifikasyona uğratılmış bir doğada kendiliğinden oluşan polipeptid).

Doğada kendiliğinden oluşan yer-hedefli modifiye edici polipeptid örnekleri, doğada kendiliğinden oluşmayan Cas9/Csn1 endonükleazlarının sıralandığı, sınırlayıcı, tam ve eksiksiz olmayan bir listeyi teşkil eden SEKANS KOD NO.: 1-255 sekans listesinde gösterilmektedir. Burada açıklandığı gibi olan bu doğada kendiliğinden oluşan polipeptidler bir DNA-hedefleyen RNA'ya bağlanırlar, böylelikle bir hedef DNA içerisindeki bir spesifik sekansa yönlendirler ve o hedef DNA'yı yararak bir çift iplikçik kırığı oluştururlar. Buluşa uygun bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid, bir RNA-bağlanımlı kısım ve bir aktivite kısmı olarak anılan iki kısım içerir. Buluşun bazı yapılarında, buluşa uygun bir yer-hedefli modifiye edici polipeptidde şunlar bulunur: (i) bir hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı nitelikte bir nükleotid sekansı ihtiva eden bir DNA-hedefleyen RNA ile etkileşime giren bir RNA-bağlanımlı kısım ve (ii) DNA-hedefleyen RNA'nın belirlediği bir yerde yer-hedefli enzimatik aktivite (örneğin DNA metilasyonuna yönelik aktivite, DNA yarmaya yönelik aktivite, histon asetilasyonuna yönelik aktivite, histon

metilasyonuna yönelik aktivite ve benzeri aktiviteler) sergileyen bir aktivite kısmı.

Buluşun başka yapılarında, buluşa uygun bir yer-hedefli modifiye edici polipeptidde şunlar bulunur: (i) DNA-hedefleyen RNA'nın bir hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı nitelikte bir nükleotid sekansı ihtiva ettiği bir DNA-hedefleyen RNA ile etkileşime giren bir RNA-bağlanımlı kısım ve (ii) DNA-hedefleyen RNA'nın belirlediği bir yerde hedef DNA içerisindeki transkripsiyonu modüle eden (örneğin transkripsiyonu artıran veya azaltan) bir aktivite kısmı.

Bazı durumlarda, buluşa uygun bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid, hedef DNA'yı modifiye eden bir enzimatik aktiviteye (örneğin nükleaz aktivitesi, metiltransferaz aktivitesi, demetilaz aktivitesi, DNA onarımı aktivitesi, DNA hasarı aktivitesi, deaminasyon aktivitesi, dismutaz aktivitesi, alkilasyon aktivitesi, depürinasyon aktivitesi, oksidasyon aktivitesi, pirimidin dimeri oluşturma aktivitesi, integraz aktivitesi, transpozaz aktivitesi, rekombinaz aktivitesi, polimeraz aktivitesi, ligaz aktivitesi, helikaz aktivitesi, fotolizaz aktivitesi ya da glikozilaz aktivitesi) sahiptir.

Başka durumlarda, buluşa uygun bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid, hedef DNA ile ilişkili bir polipeptidi (örneğin bir histon) modifiye eden bir enzimatik aktiviteye (örneğin metiltransferaz aktivitesi, demetilaz aktivitesi, asetiltransferaz aktivitesi, deasetilaz aktivitesi, kinaz aktivitesi, fosfataz aktivitesi, ubiquitin ligaz aktivitesi, deubikitinasyon aktivitesi, adenilasyon aktivitesi, deadenilasyon aktivitesi, SUMOilasyon aktivitesi, deSUMOilasyon aktivitesi,

ribozilasyon aktivitesi, deribozilasyon aktivitesi, miristoilasyon aktivitesi ya da demiristoilasyon aktivitesi) sahiptir.

### **Ornek niteliğindeki yer-hedefli modifiye edici polipeptidler**

5

Bazı durumlarda, yer-hedefli modifiye edici polipeptid, Şekil 3'te gösterilen Cas9/Csn1 amino asit sekansının 7-166 veya 731-1003 numaralı amino asitlerinden oluşan kısım ile ya da SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346'da gösterilen amino asit sekanslarından herhangi birindeki mütakabil kısımlar ile en az yaklaşık %75 oranında, en az yaklaşık %80 oranında, en az yaklaşık %85 oranında, en az yaklaşık %90 oranında, en az yaklaşık %95 oranında, en az yaklaşık %99 oranında ya da %100 oranında amino asit sekansı özdeşliğine sahip olan bir amino asit sekansı ihtiva eder.

15

### **Nükleik asit modifikasyonları**

Buluşun bazı yapılarında, buluşa uygun bir nükleik asit (örneğin bir DNA-hedefleyen RNA), nükleik aside yeni veya gelişmiş bir özellik (örneğin gelişmiş stabilite) kazandıran bir veya daha fazla sayıda modifikasyon, örneğin bir baz modifikasyonu, bir omurga modifikasyonu ya da benzeri başka bir modifikasyon içerir. Sektörde bilindiği üzere, bir nükleosid bir baz-şeker kombinasyonudur. Nükleosidin baz kısmı normalde bir heterosiklik bazı teşkil eder. Pürinler ve pirimidinler, en yaygın bulunan iki heterosiklik baz sınıfıdır. Nükleotidler, nükleosidin şeker kısmına kovalent bağlı bir fosfat grubunun da bulunduğu nükleosidlerdir. Bir pentofuranosil şekeri içeren nükleosidlere istinaden, fosfat grubu şekerin 2', 3' veya 5'

hidroksil moietesine bağlanabilir. Oligonükleotidlerin oluşumu esnasında, fosfat grupları, komşu nükleosidleri birbirlerine kovalent bağlayarak bir lineer polimerik bileşik oluştururlar. Bu lineer polimerik bileşiğin ilgili uçları bir araya gelerek bir dairesel bileşik de oluşturabilirler, ancak genelde lineer bileşikler daha uygundur. Ayrıca, lineer bileşiklerde iç nükleotid bazı tamamlayıcılığı söz konusu olabilir ve buna bağlı olarak bu bileşikler bir tamamen veya kısmen çift iplikçikli bileşik oluşmasını sağlayacak şekilde katlanabilirler. Oligonükleotidler içerisindeki fosfat gruplarına genelde oligonükleotidin internükleosid omurgasını oluşturan unsurlar olarak atıf yapılır. RNA ve DNA'nın normal bağı veya omurgası bir 3' → 5' fosfodiester bağıdır.

### **Modifiye omurgalar ve modifiye internükleosid bağları**

15

Modifikasyonlar içeren uygun nükleik asitlere verilebilecek örnekler arasında, modifiye omurgalar veya doğal olmayan internükleosid bağları ihtiva eden nükleik asitler bulunur. Modifiye omurgalar barındıran nükleik asitler arasında, hem omurgasındaki bir fosfor atomunu muhafaza eden nükleik asitler hem de omurgasında bir fosfor atomu bulunmayan nükleik asitler bulunur.

20

Bir fosfor atomu içeren uygun modifiye oligonükleotid omurgaları arasında, örneğin fosfortioatlar, kiral fosfortioatlar, fosforoditioatlar, fosfotriesterler, aminoalkilfosfotriesterler, metil ve 3'-alkilen fosfonatlar, 5'-alkilen fosfonatlar ve kiral fosfonatlar da dahil başka alkil fosfonatlar, fosfinatlar, 3'-amino fosforamidat ve aminoalkilfosforamidatlar da dahil fosforamidatlar, fosforodiamidatlar

25

tionofosforamidatlar, tionoalkilfosfonatlar, tionoalkilfosfotriesterler, normal 3'-5' bağları içeren selenofosfatlar ve boranofosfatlar, bunların 2'-5' bağlı analogları ve internükleotid bağlarından birinin veya birden fazlasının 3'-3', 5'-5' ya da 2'-2' bağı olduğu ters polariteye sahip olanlar sayılabilir. Uygun ters polariteli oligonükleotidler, 3' yönündeki en uç internükleotid bağına sadece bir 3'-3'bağı, yani abazik nitelikte olabilecek tek bir ters nükleosid artığı (nükleobaz yoktur ya da onun yerine bir hidroksil grubu vardır) içerirler. Çeşitli farklı tuzlar (örneğin potasyum veya sodyum), karışık tuzlar ve serbest asit formları da bunun kapsamına girerler.

Buluşun bazı yapılarında, buluşa uygun bir nükleik asit, başta  $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{O}-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{O}-\text{CH}_2-$  (bir metilen (metilimino) veya MMI omurgası olarak bilinir),  $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$  ve  $-\text{O}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$  (nativ fosfodiester internükleotid bağı,  $-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-\text{O}-\text{CH}_2-$  olarak gösterilir) olmak üzere bir veya daha fazla sayıda fosforotioat ve/veya heteroatom internükleosid bağı ihtiva eder. MMI tipi internükleosid bağları, yukarıda atıf yapılan 5.489.677 sayılı ABD patentinde açıklanmaktadır. Uygun amid internükleosid bağları, 5.602.240 sayılı ABD patentinde açıklanmaktadır.

Örneğin 5.034.506 sayılı ABD patentinde açıklandığı gibi olan morfolino omurga yapılarının bulunduğu nükleik asitler de uygundur. Örneğin buluşun bazı yapılarında, buluşa uygun bir nükleik asit, bir riboz halkası yerine bir 6 üyeli morfolino halkası ihtiva eder. Bu buluş yapılarından bazılarında, bir fosfodiester bağının yerine bir

fosforodiamidat veya başka bir fosfodiester olmayan internükleosid bağı bulunur.

Bir fosfor atomu ihtiva etmeyen uygun modifiye polinükleotid omurgaları, kısa zincirli alkil veya sikloalkil internükleosid bağları, 5 karışık heteroatom ve alkil veya sikloalkil internükleosid bağları ya da bir veya daha fazla sayıda kısa zincirli heteroatomik veya heterosiklik internükleosid bağlarıyla oluşturulurlar. Bunlar arasında, morfolino bağlarına sahip olanlar (kısmen bir nükleosidin şeker kısmından 10 oluşurlar); siloksan omurgaları; sülfür, sülfoksit ve sülfon omurgaları; formasetil ve tioformasetil omurgaları; metilen formasetil ve tioformasetil omurgaları; riboasetil omurgaları; alken içeren omurgalar; sülfamat omurgaları; metilenimino ve metilenhidrazino omurgaları; sülfonat ve sülfonamid omurgaları; amid omurgaları ve 15 karışık N, O, S ve CH<sub>2</sub> komponent kısımlarına sahip olan diğer omurgalar sayılabilir.

### **Mimetikler**

20 Buluşa uygun bir nükleik asit bir nükleik asit mimetiği de olabilir. Polinükleotidlere atfen kullanıldığı haliyle "mimetik" terimi, yalnızca furanoz halkasının ya da hem furanoz halkasının hem de internükleotid bağının furanoz olmayan gruplarla değiştirilmiş olduğu polinükleotidlere karşılamaktadır; yalnızca furanoz halkasının 25 değiştirilmesine sektörde şeker ikamesi de denmektedir. Uygun bir hedef nükleik asit ile hibridizasyon için heterosiklik baz moiyesi ya da bir modifiye heterosiklik baz moiyesi korunur. Mükemmel hibridizasyon özelliklerine sahip olduğu gösterilmiş olan bir

polinükleotid mimetiği olarak bu gibi bir nükleik aside bir peptid nükleik asit (PNA) denir. PNA'da, bir polinükleotidin şeker omurgası, bilhassa bir aminoetilglisin omurgası olmak üzere bir amid içerikli omurga ile değiştirilir. Nükleotidler muhafaza edilir ve omurganın 5 amid kısmındaki aza nitrojen atomlarına dolaylı veya dolaysız olarak bağlanırlar.

Mükemmel hibridizasyon özelliklerine sahip olduğu rapor edilmiş olan polinükleotid mimetiklerinden biri bir peptid nükleik asittir (PNA). PNA bileşiklerindeki omurgada, PNA'ya bir amid içerikli omurga kazandıran iki veya daha fazla sayıda bağlı aminoetilglisin birimi bulunur. Heterosiklik baz moieteleri, omurganın amid kısmındaki aza nitrojen atomlarına dolaylı veya dolaysız olarak bağlanırlar. PNA bileşiklerinin hazırlanışının anlatıldığı temsili ABD patentleri arasında, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, 5.539.082, 5.714.331 ve 5.719.262 sayılı ABD patentleri bulunur.

Uzerinde çalışılmış olan bir diğer polinükleotid mimetiği sınıfı, morfolino halkasına bağlı heterosiklik bazlar barındıran bağlı morfolino birimlerine (morfolino nükleik asit) dayanmaktadır. Bir morfolino nükleik asitteki morfolino monomerik birimlerini bağlayan bir dizi bağlayıcı grup rapor edilmiştir. Bir iyonik olmayan oligomerik bileşik oluşturmak için bir bağlayıcı grup sınıfı seçilmiştir. İyonik olmayan morfolino-bazlı oligomerik bileşiklerin hücresele proteinler ile istenmeyen etkileşimlere girme ihtimalleri epey düşüktür. Morfolino-bazlı polinükleotidler, hücresele proteinler ile istenmeyen etkileşimlere girmeleri epey düşük ihtimal olan iyonik olmayan oligonükleotid mimetikleridir (Dwayne A. Braasch and David R. Corey,

Biochemistry, 2002, 41(14), 4503-4510). Morfolino-bazlı polinükleotidler, 5.034.506 sayılı ABD patentinde anlatılmakta ve açıklanmaktadır. Morfolino polinükleotid sınıfı kapsamında, monomerik alt-birimleri birleştiren çeşitli farklı bağlayıcı gruplara  
5 sahip olan çeşitli bileşikler hazırlanmıştır.

Bir diğer polinükleotid mimetiği sınıfına sikloheksenil nükleik asitler (CeNA) olarak atıf yapılmaktadır. Bir DNA/RNA molekülünde normalde mevcut bulunan furanoz halkası bir sikloheksenil halkası ile  
10 değiştirilir. CeNA DMT korumalı fosforamidit monomerleri hazırlanmış ve klasik fosforoamidit kimyasını takiben oligomerik bileşik sentezi için kullanılmışlardır. CeNA ile modifiye edilmiş spesifik pozisyonlara sahip olan tamamen modifiye CeNA oligomerik bileşikleri ve oligonükleotidleri hazırlanmış ve çalışılmıştır  
15 (bkz: Wang et al., J. Am. Chem. Soc., 2000, 122, 8595-8602). Bir DNA zincirine CeNA monomerlerinin dahil edilmesi genelde DNA/RNA hibridinin stabilitesini artırır. CeNA oligoadenilatları, RNA ve DNA tamamlayıcıları ile birlikte, nativ kompleksler ile benzer bir stabiliteye sahip olan kompleksler oluşturmuşlardır. NMR  
20 ve dairesel dikroizm analizi ile, CeNA yapılarının doğal nükleik asit yapılarına dahil edilmesi üzerine yapılan çalışmanın kolay bir konformasyonel adaptasyonla sürdürülebildiği gösterilmiştir.

Bir diğer modifikasyon, 2'-hidroksil grubunun şeker halkasının 4'  
25 karbon atomuna bağlandığı ve böylelikle bir 2'-C,4'-C-oksümetilen bağı oluşturulup bir bisiklik şeker moietesinin oluşmasının sağlandığı Kilitli Nükleik Asitlerdir (LNA'lar). Bahsi geçen bağ, 2' oksijen atomu ile 4' karbon atomunu birbirlerine köprüleyen, n'nin 1 veya 2'ye



karşılık geldiği bir metilen (-CH<sub>2</sub>-)<sub>n</sub> grubu olabilir (Singh et al., Chem. Commun., 1998, 4, 455-456). LNA ve LNA analogları, tamamlayıcı DNA ve RNA ile çok yüksek termal stabilite seviyeleri (T<sub>m</sub> = +3°C ilâ +10°C) sergilerler, 3'-eksonükleolitik degradasyona karşı stabilite gösterirler ve iyi çözünürlük özellikleri ortaya koyarlar. LNA'ların bulunduğu toksik olmayan kuvvetli antisens oligonükleotidleri sektörde daha önceden tanımlanmış ve açıklanmıştır (Wahlestedt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2000, 97, 5633-5638).

10

LNA monomerleri adenin, sitozin, guanin, 5-metil-sitozin, timin ve urasilin sentezi ve hazırlanışı, bunların oligomerizasyonu ve nükleik asit tanıma özellikleri ile birlikte daha önceden açıklanmıştır (Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630). LNA'lar ve onların hazırlanışı, WO 98/39352 ve WO 99/14226 sayılı patent yayınlarında da anlatılmakta ve açıklanmaktadır.

15

### **Modifiye şeker moietyleri**

20 Buluşa uygun bir nükleik asitte bir veya daha fazla sayıda ikameli şeker moietyesi bulunabilir. Uygun polinükleotidler, aşağıda sıralananlar arasından seçilen bir şeker ikame grubu içerirler: OH; F; O-, S- veya N-alkil; O-, S- veya N-alkenil; O-, S- veya N-alkinil ya da O-alkil-O-alkil; burada bahsi geçen alkil, alkenil ve alkinil, ikameli veya ikamesiz C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkil veya C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> alkenil ve alkinil olabilir. Bilhassa uygun olanlar, n ve m'nin 1 ile yaklaşık 10 arası bir değere karşılık geldikleri O((CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O)<sub>m</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ONH<sub>2</sub> ve O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ON((CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>'dir. Diğer

25

- uygun polinükleotidlerde, aşağıda sıralananlar arasından seçilen bir şeker ikame grubu bulunur: C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> düşük alkil, ikameli düşük alkil, alkenil, alkinil, alkaril, aralkil, O-alkaril veya O-aralkil, SH, SCH<sub>3</sub>, OCN, Cl, Br, CN, CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, SOCH<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, ONO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, heterosikloalkil, heterosikloalkaril, aminoalkilamino, polialkilamino, ikameli silil, bir RNA yarma grubu, bir raportör grup, bir interkalatör, bir oligonükleotidin farmakokinetik özelliklerini geliştiren bir grup ya da bir oligonükleotidin farmakodinamik özelliklerini geliştiren bir grup ve benzer özelliklere sahip olan başka ikameler. Uygun modifikasyonlardan biri, 2'-metoksietoksi (2'-O-(2-metoksietil) veya 2'-MOE olarak da bilinen 2'-O-CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>) (Martin et al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504), yani bir alkoksialkoksi grubudur. Bir diğer uygun modifikasyonda, aşağıdaki örneklerde açıklandığı gibi olan 2'-dimetilaminooksietoksi, yani 2'-DMAOE olarak da bilinen bir O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>ON(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> grubu ve 2'-dimetilaminoetoksietoksi (sektörde 2'-O-dimetil-amino-etoksi-etil veya 2'-DMAEOE olarak da bilinir), yani 2'-O-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> bulunur.
- Diğer uygun şeker ikame grupları arasında, metoksi (-O-CH<sub>3</sub>), aminopropoksi (-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>), allil (-CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), -O-allil (-O-CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>) ve flor (F) bulunur. 2'-şeker ikame grupları, arabino (üst) pozisyonunda veya ribo (alt) pozisyonunda bulunabilirler. Uygun 2'-arabino modifikasyonlarından biri 2'-F'dir.
- Başta 3' terminal nükleosiddeki şekerin 3' pozisyonunda veya 2'-5' bağlı oligonükleotidlerde ve 5' terminal nükleotidin 5' pozisyonunda olmak üzere, oligomerik bileşik üzerindeki başka pozisyonlarda da benzer modifikasyonlar yapılabilir. Oligomerik bileşiklerde,

pentofuranosil şekeri yerine siklobütil moieteleri gibi şeker mimetikleri de bulunabilir.

### **Baz modifikasyonları ve ikameleri**

5

Buluşa uygun bir nükleik asitte, nükleobaz (sektörde genelde "baz" olarak atıf yapılır) modifikasyonları veya ikameleri de bulunabilir. Burada kullanıldığı anlamıyla "modifiye edilmemiş" ya da "doğal" nükleobazlar arasında, pürin bazları adenin (A) ve guanin (G) ve 10 pirimidin bazları timin (T), sitozin (C) ve urasil (U) bulunur. Modifiye nükleobazlar arasında, örneğin 5-metilsitozin (5-me-C), 5-hidroksimetil sitozin, ksantin, hipoksantin, 2-aminoadenin, 6-metil ve adenin ve guaninin başka alkil türevleri, 2-propil ve adenin ve guaninin başka alkil türevleri, 2-tiourasil, 2-tiotimin ve 2-tiositozin, 15 halourasil ve sitozin, 5-propinil ( $-C\equiv C-CH_3$ ) urasil ve sitozin ve pirimidin bazlarının başka alkinil türevleri, 6-azo urasil, sitozin ve timin, 5-urasil (psödourasil), 4-tiourasil, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalkil, 8-hidroksil ve başka 8-ikameli adeninler ve guaninler, 5-halo, özellikle de 5-bromo, 5-triflorometil ve başka 5-ikameli urasiller ve 20 sitozinler, 7-metilguanin ve 7-metiladenin, 2-F-adenin, 2-aminoadenin, 8-azaguanin ve 8-azaadenin, 7-deazaguanin ve 7-deazaadenin ve 3-deazaguanin ve 3-deazaadenin gibi başka sentetik ve doğal nükleobazlar bulunur. Modifiye nükleobazlar arasında, yukarıda sayılanların yanı sıra, örneğin fenoksazin sitidin(1H-pirimido(5,4- 25 b)(1,4)benzoksazin-2(3H)-on), fenotiazin sitidin (1H-pirimido(5,4-b)(1,4)benzotiazin-2(3H)-on), G-kelepçeleri, örneğin bir ikameli fenoksazin sitidin (örneğin 9-(2-aminoetoksi)-H-pirimido(5,4-b)(1,4)benzoksazin-2(3H)-on), karbazol sitidin (2H-pirimido(4,5-

b)indol-2-on) ve piridoindol sitidin (H-pirido(3',2':4,5)pirolo(2,3-d)pirimidin-2-on) gibi trisiklik pirimidinler de bulunur.

Heterosiklik baz moieteleri arasında, pürin veya pirimidin bazının başka heterosikller ile, örneğin 7-deaza-adenin, 7-deazaguanozin, 2-aminopiridin ve 2-piridon ile değiştirilmiş olduğu moieteler de bulunur. Diğer nükleobazlar arasında, 3.687.808 sayılı ABD patentinde açıklananlar, "The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990" eserinde açıklananlar, "Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613" eserinde açıklananlar ve "Sanghvi, Y. S., Chapter 15, Antisense Research and Applications, pages 289-302, Crooke, S. T. and Lebleu, B., ed., CRC Press, 1993" eserinde açıklananlar bulunur. Bu nükleobazlardan bazıları, bir oligomerik bileşiğin bağlanma afinitesini artırmak için kullanıma uygundur. Bunlar arasında, 5-ikameli pirimidinler, 6-azapirimidinler ve N-2, N-6 ve O-6 ikameli pürinler, örneğin 2-aminopropiladenin, 5-propinilurasil ve 5-propinilsitozin bulunur. 5-metilsitozin ikamelerinin nükleik asit dubleks stabilitesini 0,6-1,2°C kadar artırdıkları daha önceden gösterilmiştir (Sanghvi et al., eds., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) ve bunlar, örneğin 2'-O-metoksietil şeker modifikasyonları ile birlikte uygulanmaları halinde uygun baz ikameleri olarak görülmektedirler.

25

### **Konjugatlar**

Buluşa uygun bir nükleik asitte yapılabilecek bir diğer modifikasyon, oligonükleotidin aktivitesini, hücre sel dağılımını veya hücre içine

alımını artıran bir veya daha fazla sayıda moiete veya konjugatın polinükleotide kimyasal olarak bağlanmasına dayanır. Bahsi geçen moieteler veya konjugatlar arasında, primer veya sekonder hidroksil grupları gibi fonksiyonel gruplara kovalent bağlı konjugat grupları sayılabilir. Konjugat grupları arasında, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, interkalatörler, raportör moleküller, poliaminler, poliamidler, polietilen glikoller, polieterler, oligomerlerin farmakodinamik özelliklerini artıran grupları ve oligomerlerin farmakokinetik özelliklerini artıran gruplar bulunur. Uygun konjugat grupları arasında, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, kolesteroller, lipidler, fosfolipidler, biyotin, fenazın, folat, fenantridin, antrakinin, akridin, floreseinler, rodaminler, kumarinler ve boyalar sayılabilir. Farmakodinamik özellikleri artıran gruplar arasında, alımı geliştiren, degradasyona direnci artıran ve/veya hedef nükleik asit ile sekans-spesifik hibridizasyonu kuvvetlendiren gruplar bulunur. Farmakokinetik özellikleri artıran gruplar arasında ise, buluşa uygun bir nükleik asidin alımını, dağılımını, metabolizmasını veya atılımını artıran gruplar bulunur.

Konjugat moieteleri arasında, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, bir kolesterol moiyesi (Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553-6556), kolik asit (Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Let., 1994, 4, 1053-1060), bir tioeter, örneğin heksil-S-tritiltiol (Manoharan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306-309; Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Let., 1993, 3, 2765-2770), bir tiokolesterol (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533-538), bir alifatik zincir, örneğin dodekandiol veya undesil artıkları (Saison-Behmoaras et al., EMBO J., 1991, 10, 1111-1118; Kabanov et

al., FEBS Lett., 1990, 259, 327-330; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75, 49-54), bir fosfolipid, örneğin di-heksadesil-rak-gliserol veya trietilamonyum 1,2-di-O-heksadesil-rak-gliserol-3-H-fosfonat (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654; Shea et al., 5 Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783), bir poliamin veya bir polietilen glikol zinciri (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969-973) veya adamantan asetik asit (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654) gibi lipid moieteleri, bir palmitil moietesi (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 10 229-237) ve bir oktadesilamin veya heksilamino-karbonil-oksikolesterol moietesi (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923-937) sayılabilir.

Bir konjugatta, bir lipid çift katman, misel, hücre membranı, organel 15 membranı veya vezikül membranının kat edilmesine olanak sağlayan bir polipeptid, polinükleotid, karbonhidrat ya da organik veya inorganik bileşiğe atıf yapıyor olabilecek olan bir "Protein Aktarım Domaini" ya da PTD (bir CPP - hücreye nüfuz eden peptid olarak da bilinir) bulunabilir. Bir küçük polar molekül olabileceği gibi bir büyük 20 makromolekül ve/veya bir nanopartikül de olabilecek olan başka bir moleküle bağlı haldeki bir PTD, o molekülün bir membranı kat etmesine, örneğin ekstraselüler boşluktan intraselüler boşluğa gitmesine ya da sitozolden bir organelin içerisine seyahat etmesine yardımcı olur. Buluşun bazı yapılarında, bir PTD, bir eksojen 25 polipeptidin (örneğin bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid) amino terminal ucuna kovalent bağlanır. Buluşun bazı yapılarında, bir PTD, bir eksojen polipeptidin (örneğin bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid) karboksil terminal ucuna kovalent bağlanır. Buluşun bazı

yapılarında, bir PTD, bir nükleik aside (örneğin bir DNA-hedefleyen RNA, bir DNA-hedefleyen RNA kodlayan bir polinükleotid, bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid kodlayan bir polinükleotid ve benzeri) kovalent bağlanır. PTD örnekleri arasında, sadece bunlarla

5 sınırlı kalmaksızın, bir minimal undekapeptid protein aktarım domaini (HIV-1 TAT sekansının YGRKKRRQRRR şeklinde gösterilen 47-57 numaralı artıklarına tekabül eden domain; SEKANS KOD NO.: 264); bir hücreye direkt giriş yapılması için yeterli sayıda arjinin (örneğin 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 veya 10-150 adet arjinin) ihtiva eden bir poliarjinin

10 sekansı; bir VP22 domaini (Zender et al. (2002) *Cancer Gene Ther.* 9(6):489-96); bir *Drosophila* Antennapedia proteini aktarım domaini (Noguchi et al. (2003) *Diabetes* 52(7): 1732-1737); bir kesik insan kalsitonin peptidi (Trehin et al. (2004) *Pharm. Research* 21:1248-1256); polilizin (Wender et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*

15 97:13003-13008); RRQRRTSKLMKR (SEKANS KOD NO.: 265); Transportan GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL (SEKANS KOD NO.: 266); KALAWEAKLAKALAKALAKHLAKALAKAL KCEA (SEKANS KOD NO.: 267) ve RQIKIWFQNRRMKWKK (SEKANS KOD NO.: 268) sayılabilir. Örnek niteliğindeki PTD'ler

20 arasında, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, YGRKKRRQRRR (SEKANS KOD NO.: 264), RKKRRQRRR (SEKANS KOD NO.: 269) ve 3 ilâ 50 adet arjinin artığından oluşan bir arjinin homopolimeri sayılabilir. Örnek niteliğindeki PTD amino asit sekansları arasında, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın aşağıda

25 sıralanan sekanslar bulunur: YGRKKRRQRRR (SEKANS KOD NO.: 264); RKKRRQRR (SEKANS KOD NO.: 270); YARAAARQARA (SEKANS KOD NO.: 271); THRLPRRRRRR (SEKANS KOD NO.: 272) ve GGRRARRRRRR (SEKANS KOD NO.: 273). Buluşun bazı

yapılarında, PTD, bir aktive edilebilir CPP'dir (ACPP) (Aguilera et al. (2009) Integr Biol (Camb) June; 1(5-6): 371-381). ACPP'ler, bir polikasyonik CPP (örneğin Ar9 ve "R9") ve bir yarılabilir bağlayıcı aracılığıyla bu CPP'ye bağlı halde bulunan ve onunla eşleşen bir polianiyondan (örneğin Glu9 veya "E9") oluşurlar ve bu polianyon, net yükü hemen hemen sıfıra indirger ve böylelikle hücrelere adezyonu ve hücre içine alımı inhibe eder. Bahsi geçen bağlayıcı yarıldığında polianyon serbest kalıp poliarjininin ve onun özü itibarıyla taşıdığı adezyon kabiliyetinin üzerindeki maskeyi kaldırır ve böylelikle ACPP'yi membranı kat etmesi yönünde "aktive eder".

### **Ornek niteliğindeki DNA-hedefleyen RNA'lar**

Bazı uygulamalarda, uygun bir DNA-hedefleyen RNA'nın bir tipinde iki ayrı RNA polinükleotid molekülü bulunur. Bu iki ayrı RNA polinükleotid molekülünden birincisi (aktive edici RNA), en az 8 adet bitişik nükleotidden oluşan bir kesit boyunca SEKANS KOD NO.: 431-562'de gösterilen nükleotid sekansları veya onların tamamlayıcılarından herhangi biri ile en az yaklaşık %60 oranında, en az yaklaşık %65 oranında, en az yaklaşık %70 oranında, en az yaklaşık %75 oranında, en az yaklaşık %80 oranında, en az yaklaşık %85 oranında, en az yaklaşık %90 oranında, en az yaklaşık %95 oranında, en az yaklaşık %98 oranında, en az yaklaşık %99 oranında ya da %100 oranında nükleotid sekansı özdeşliğine sahip olan bir nükleotid sekansı ihtiva eder. Bahsi geçen iki ayrı RNA polinükleotid molekülünden ikincisi (hedef gösteren RNA) ise, en az 8 adet bitişik nükleotidden oluşan bir kesit boyunca SEKANS KOD NO.: 563-679'da gösterilen nükleotid sekansları veya onların



tamamlayıcılarından herhangi biri ile en az yaklaşık %60 oranında, en az yaklaşık %65 oranında, en az yaklaşık %70 oranında, en az yaklaşık %75 oranında, en az yaklaşık %80 oranında, en az yaklaşık %85 oranında, en az yaklaşık %90 oranında, en az yaklaşık %95 oranında, en az yaklaşık %98 oranında, en az yaklaşık %99 oranında ya da %100 oranında nükleotid sekansı özdeşliğine sahip olan bir nükleotid sekansı ihtiva eder.

Buluşun bazı yapılarında, buluşa uygun bir DNA-hedefleyen RNA bir tekil RNA polinükleotidini teşkil eder ve en az 8 adet bitişik nükleotidden oluşan bir kesit boyunca SEKANS KOD NO.: 431-562'de gösterilen nükleotid sekanslarından herhangi biri ile en az yaklaşık %60 oranında, en az yaklaşık %65 oranında, en az yaklaşık %70 oranında, en az yaklaşık %75 oranında, en az yaklaşık %80 oranında, en az yaklaşık %85 oranında, en az yaklaşık %90 oranında, en az yaklaşık %95 oranında, en az yaklaşık %98 oranında, en az yaklaşık %99 oranında ya da %100 oranında nükleotid sekansı özdeşliğine sahip olan bir birinci nükleotid sekansı ve en az 8 adet bitişik nükleotidden oluşan bir kesit boyunca SEKANS KOD NO.: 563-679'da gösterilen nükleotid sekanslarından herhangi biri ile en az yaklaşık %60 oranında, en az yaklaşık %65 oranında, en az yaklaşık %70 oranında, en az yaklaşık %75 oranında, en az yaklaşık %80 oranında, en az yaklaşık %85 oranında, en az yaklaşık %90 oranında, en az yaklaşık %95 oranında, en az yaklaşık %98 oranında, en az yaklaşık %99 oranında ya da %100 oranında nükleotid sekansı özdeşliğine sahip olan bir ikinci nükleotid sekansı ihtiva eder.

Bazı uygulamalarda, DNA-hedefleyen RNA çift moleküllü DNA-hedefleyen bir RNA'dır ve bunlardaki hedef gösteren RNA, 5' ucu

5 üzerinden bir hedef DNA'yı tamamlayıcı nitelikteki bir nükleotid kesitine bağlı olan 5'GUUUUAGAGCUA-3' sekansını (SEKANS KOD NO.: 679) ihtiva eder. Bazı uygulamalarda DNA-hedefleyen RNA çift moleküllü DNA-hedefleyen RNA'dır ve bunlardaki aktive edici RNA, 5' UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCG-3' sekansını (SEKANS KOD NO.: //) ihtiva eder.

10 Buluşun bazı yapılarında, DNA-hedefleyen RNA bir tek moleküllü DNA-hedefleyen RNA'dır ve 5' ucu üzerinden bir hedef DNA'yı tamamlayıcı nitelikteki bir nükleotid kesitine bağlı olan 5'-GUUUUAGAGCUA -bağlayıcı- UAGCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCG-3' sekansını ihtiva eder (burada geçen "bağlayıcı" terimi, herhangi bir nükleotid sekansından oluşabilecek olan herhangi bir bağlayıcı nükleotid sekansına atıf yapar) (SEKANS KOD NO.: //).  
15 Diğer tek moleküllü DNA-hedefleyen RNA örnekleri arasında, SEKANS KOD NO.: 680-682'de gösterilenler bulunur.

**Buluşa uygun bir DNA-hedefleyen RNA ve/veya buluşa uygun bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid kodlayan nükleik asitler**

20

Bu buluş, buluşa uygun bir DNA-hedefleyen RNA ve/veya buluşa uygun bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid kodlayan bir nükleotid sekansının bulunduğu bir nükleik asit de ortaya koyar. Buluşun bazı yapılarında, buluşa uygun bir DNA-hedefleyen RNA-kodlayan  
25 nükleik asit, bir ekspresyon vektörüdür, örneğin bir rekombinan ekspresyon vektörüdür.

Buluşun bazı yapılarında, buluşa uygun bir yöntemde, buluşa uygun bir DNA-hedefleyen RNA ve/veya bir yer-hedefli modifiye edici

polipeptid kodlayan nükleotid sekanslarının bulunduğu bir veya daha fazla sayıda nükleik asit bir hedef DNA ile temas ettirilir veya bir hücreye (ya da bir hücre popülasyonuna) sokulur. Buluşun bazı yapılarında, hedef DNA'yı bünyesinde barındıran hücre in vitro ortamda bulunur. Buluşun bazı yapılarında, hedef DNA'yı bünyesinde barındıran hücre ex vivo ortamda bulunur. Bir DNA-hedefleyen RNA ve/veya bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid kodlayan nükleotid sekanslarının bulunduğu uygun nükleik asitler arasında, bir DNA-hedefleyen RNA ve/veya bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid kodlayan bir nükleotid sekansının yer aldığı bir "rekombinan ekspresyon vektörü"nü teşkil eden ekspresyon vektörleri bulunur.

Buluşun bazı yapılarında, rekombinan ekspresyon vektörü, bir viral yapıdır, örneğin bir rekombinan adeno-bağlantılı virüs yapısı (örneğin bkz: 7.078.387 sayılı ABD patenti), bir rekombinan adenoviral yapı, bir rekombinan lentiviral yapı, bir rekombinan retroviral yapı ya da benzeri başka bir yapıdır.

Uygun ekspresyon vektörleri arasında, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, viral vektörler (örneğin vaksiniya virüsü; poliovirüs; adenovirüs (örneğin bkz: Li et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 35:2543 2549, 1994; Borrás et al., Gene Ther 6:515 524, 1999; Li and Davidson, PNAS 92:7700 7704, 1995; Sakamoto et al., H Gene Ther 5:1088 1097, 1999; WO 94/12649; WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 ve WO 95/00655); adeno-bağlantılı virüs (örneğin bkz: Ali et al., Hum Gene Ther 9:81 86, 1998; Flannery et al., PNAS 94:6916 6921, 1997; Bennett et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 38:2857 2863, 1997; Jomary et al., Gene Ther 4:683 690, 1997;

Rolling et al., Hum Gene Ther 10:641-648, 1999; Ali et al., Hum Mol Genet 5:591-594, 1996; Srivastava in WO 93/09239; Samulski et al., J. Vir. (1989) 63:3822-3828; Mendelson et al., Virol. (1988) 166:154-165; Flotte et al., PNAS (1993) 90:10613-10617); SV40; herpes simpleks virüsü; insan immün yetmezlik virüsü (örneğin bkz: Miyoshi et al., PNAS 94:10319-23, 1997; Takahashi et al., J Virol 73:7812-7816, 1999); bir retroviral vektöre (örneğin murin lösemi virüsü; dalak nekroz virüsü; ve rous sarkoma virüsü, harvey sarkoma virüsü, avian lökoz virüsü, bir lentivirüs, insan immün yetmezlik virüsü, miyeloproliferatif sarkoma virüsü ve meme tümörü virüsünden elde edilen vektörler) dayanan viral vektörler) ve benzeri vektörler sayılabilir.

Sektörde bilgi ve beceri sahibi uzmanların bilgisi dahilinde olan pek çok uygun ekspresyon vektörü bulunmakta ve bunların birçoğu ticari piyasada yer almaktadır. Aşağıda sıralanan vektörler bunlara verilebilecek örneklerden bazılarıdır: ökaryotik konakçı hücreler için: pXT1, pSG5 (Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG ve pSVLSV40 (Pharmacia). Bunların yanı sıra, konakçı hücre ile uyumlu ve geçimli olduğu sürece başka herhangi bir vektör de kullanılabilir.

Kullanılan konakçı/vektör sistemine bağlı olarak, ekspresyon vektöründe aralarında konstitütif ve indüklenebilir promotörlerin, transkripsiyon artırıcı elemanların, transkripsiyon terminatörlerinin ve benzeri unsurların da bulunduğu pek çok uygun transkripsiyon ve translasyon kontrol elemanından herhangi biri kullanılabilir (örneğin bkz: Bitter et al. (1987) Methods in Enzymology, 153:516-544).

- Buluşun bazı yapılarında, bir DNA-hedefleyen RNA ve/veya bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid kodlayan bir nükleotid sekansı, bir kontrol elemanına, örneğin bir promotör gibi bir transkripsiyonel kontrol elemanına operabl bağlanır. Transkripsiyonel kontrol elemanı,
- 5 bir ökaryotik hücrede, örneğin bir memeli hücrede ya da bir prokaryotik hücrede (örneğin bir bakteri veya arke hücresi) fonksiyonel olabilir. Buluşun bazı yapılarında, bir DNA-hedefleyen RNA ve/veya bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid kodlayan bir nükleotid sekansı, bir DNA-hedefleyen RNA ve/veya bir yer-hedefli
- 10 modifiye edici polipeptid kodlayan nükleotid sekansının hem prokaryotik hücrelerde hem de ökaryotik hücrelerde eksprese olmasına olanak sağlayacak olan birden çok kontrol elemanına operabl bağlanır.
- 15 Uygun ökaryotik promotörlere (bir ökaryotik hücrede fonksiyonel olan promotörler) verilebilecek örnekler arasında, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, sitomegalovirüs (CMV) ilk erken, herpes simpleks virüsü (HSV), timidin kinaz, erken ve geç SV40, uzun terminal tekrarlar (LTR'ler), retrovirüs ve fare metallothioneini-I'den elde
- 20 edilebilecek olan promotörler bulunur. Uygun vektör ve promotör, sektörde olağan bilgi ve beceri sahibi uzmanlarca kolayca seçilebilir. Ekspresyon vektöründe, translasyonu başlatan bir ribozom bağlanma yeri ve bir transkripsiyon terminatörü de bulunabilir. Ekspresyon vektörü, ekspresyonu amplifiye etmeye yarayan uygun sekanslar da
- 25 ihtiva edebilir. Ekspresyon vektöründe, yer-hedefli modifiye edici polipeptide füzyonlanarak bir kimerik polipeptid oluşmasını sağlayan protein taglarını (örneğin 6xHis tagı, hemagglütinin tagı, yeşil floresan protein ve benzeri) kodlayan nükleotid sekansları da yer alabilir.

Buluşun bazı yapılarında, bir DNA-hedefleyen RNA ve/veya bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid kodlayan bir nükleotid sekansı, bir indüklenabilir promotöre operabl bağlıdır. Buluşun bazı yapılarında,  
5 bir DNA-hedefleyen RNA ve/veya bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid kodlayan bir nükleotid sekansı, bir konstitütif promotöre operabl bağlıdır.

Bir nükleik asidi bir konakçı hücreye dahil etmeye yarayan yöntemler  
10 sektörde bilinmektedir ve bir nükleik asidi (örneğin bir ekspresyon yapısı) bir hücreye sokmak için bilinen yöntemlerden herhangi biri kullanılabilir. Uygun yöntemler arasında, örneğin viral enfeksiyon veya bakteriyofaj enfeksiyonu, transfeksiyon, konjugasyon, protoplast füzyonu, lipofeksiyon, elektroporasyon, kalsiyum fosfat  
15 presipitasyonu, polietilenimin (PEI) aracılı transfeksiyon, DEAE-dekstran aracılı transfeksiyon, lipozom aracılı transfeksiyon, partikül tabancası teknolojisi, kalsiyum fosfat presipitasyonu, direkt mikro enjeksiyon, nanopartikül aracılı nükleik asit taşınması (örneğin  
20 bkz:Panyam et. al., Adv Drug Deliv Rev. 2012 Sep 13. pii: 50169-409X(12)00283-9. doi: 10.1016/j.addr.2012.09.023) ve benzeri yöntemler sayılabilir.

## **KİMERİK POLİPEPTİDLER**

25 Mevcut tarifname bir kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptidi sağlamaktadır. Buluşa uygun bir kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptid, buluşa uygun bir DNA-hedefleyen RNA (yukarıda açıklanmaktadır) ile etkileşime girer (örneğin ona bağlanır). DNA-

5 hedefleyen RNA, kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptidi hedef DNA içerisindeki bir hedef sekansa (örneğin bir kromozomal sekans veya bir ekstrakromozomal sekans, örneğin bir epizomal sekans, bir mini-daire sekansı, bir mitokondri sekansı, bir kloroplast sekansı ve benzeri) doğru yönlendirir. Bir söz konusu kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptid, hedef DNA'yı (örneğin hedef DNA'nın yarılması veya metilasyonu) ve/veya hedef DNA ile ilişkili bir polipeptidi (örneğin bir histon kuyruğunun metilasyonu veya asetilasyonu) modifiye eder.

10

Bir söz konusu kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptid, hedef DNA'yı (örneğin hedef DNA'nın yarılması veya metilasyonu) ve/veya hedef DNA ile ilişkili bir polipeptidi (örneğin bir histon kuyruğunun metilasyonu veya asetilasyonu) modifiye eder. Bir söz konusu kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptid burada bir "kimerik yer-hedefli polipeptid" ya da bir "kimerik RNA-bağımlı yer-hedefli modifiye edici polipeptid" olarak da anılmaktadır.

20 Bir söz konusu kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptid, bir RNA-bağımlı kısım ve bir aktivite kısmı olarak anılan iki kısım içerir. Bir söz konusu kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptid, en az iki farklı polipeptidden gelen amino asit sekansları ihtiva eder. Bir söz konusu kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptidde, modifiye ve/veya doğada kendiliğinden oluşan polipeptid sekansları (örneğin bir modifiye olan veya olmayan Cas9/Csn1 proteininden 25 gelen bir birinci amino asit sekansı ve Cas9/Csn1 proteini dışındaki bir ikinci amino asit sekansı) bulunabilir.

### **RNA-bağlanımlı kısım**

Bazı durumlarda, bir söz konusu kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptidin RNA-bağlanımlı kısmı bir doğada kendiliğinden oluşan polipeptiddir. Başka durumlarda, bir söz konusu kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptidin RNA-bağlanımlı kısmı bir doğada kendiliğinden oluşan molekül değildir (yani modifiye edilmiştir, örneğin mutasyon, delesyon veya insersiyon içerir). İlgilenilen doğada kendiliğinden oluşan RNA-bağlanımlı kısımlar, sektörde bilinen yer-hedefli modifiye edici polipeptidlerden elde edilirler. Örneğin SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346'da, yer-hedefli modifiye edici polipeptidler olarak kullanılabilcek olan doğada kendiliğinden oluşan Cas9/Csn1 endonükleazlarının sıralandığı bir sınırlayıcı, tam ve eksiksiz olmayan liste sunulmaktadır. Bazı durumlarda, bir söz konusu kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptidin RNA-bağlanımlı kısmı, SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346'da gösterilen amino asit sekanslarından herhangi birinin bulunduğu bir polipeptidin RNA-bağlanımlı kısmı ile en az yaklaşık %75 oranında, en az yaklaşık %80 oranında, en az yaklaşık %85 oranında, en az yaklaşık %90 oranında, en az yaklaşık %95 oranında, en az yaklaşık %98 oranında, en az yaklaşık %99 oranında ya da %100 oranında amino asit sekansı özdeşliğine sahip olan bir amino asit sekansı ihtiva eder.

Bazı durumlarda, yer-hedefli modifiye edici polipeptid, Şekil 3'te gösterilen Cas9/Csn1 amino asit sekansının 7-166 veya 731-1003 numaralı amino asitlerinden oluşan kısım ile ya da SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346'da gösterilen amino asit sekanslarından



herhangi birindeki mütakabil kısımlar ile en az yaklaşık %75 oranında, en az yaklaşık %80 oranında, en az yaklaşık %85 oranında, en az yaklaşık %90 oranında, en az yaklaşık %95 oranında, en az yaklaşık %99 oranında ya da %100 oranında amino asit sekansı özdeşliğine sahip olan bir amino asit sekansı ihtiva eder.

### **Aktivite kısmı**

Kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptidde RNA-bağlanımlı kısmın yanı sıra bir "aktivite kısmı" da bulunur. Buluşun bazı yapılarında, bir söz konusu kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptidin aktivite kısmı, bir yer-hedefli modifiye edici polipeptidin (örneğin Cas9/Csn1 endonükleazı) doğada kendiliğinden oluşan aktivite kısmını içerir. Buluşun başka yapılarında, bir söz konusu kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptidin aktivite kısmı, bir yer-hedefli modifiye edici polipeptidin bir doğada kendiliğinden oluşan aktivite kısmının amino asit sekansının modifiye edilmiş (örneğin ikame, delesyon, insersiyon) bir formunu içerir. İlgilenilen doğada kendiliğinden oluşan aktivite kısımları, sektörde bilinen yer-hedefli modifiye edici polipeptidlerden elde edilenlerdir. Örneğin SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346'da, yer-hedefli modifiye edici polipeptidler olarak kullanılabilir olan doğada kendiliğinden oluşan Cas9/Csn1 endonükleazlarının sıralandığı bir sınırlayıcı, tam ve eksiksiz olmayan liste sunulmaktadır. Bir söz konusu kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptidin aktivite kısmı değişkendir ve burada açıklanan yöntemlerde kullanılabilir olan herhangi bir heterolog polipeptid sekansını ihtiva edebilir.

Buluşun bazı yapılarında, bir söz konusu kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptidde şunlar bulunur: DNA-hedefleyen RNA'nın (i) bir hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı nitelikte bir nükleotid sekansı ihtiva ettiği bir DNA-hedefleyen RNA ile etkileşime giren bir RNA-bağlanımlı kısım ve (ii) DNA-hedefleyen RNA'nın belirlediği bir yerde yer-hedefli enzimatik aktivite (örneğin DNA metilasyonuna yönelik aktivite, DNA yarmaya yönelik aktivite, histon asetilasyonuna yönelik aktivite, histon metilasyonuna yönelik aktivite ve benzeri aktiviteler) sergileyen bir aktivite kısmı.

10

Buluşun başka yapılarında, bir söz konusu kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptidde şunlar bulunur: (i) DNA-hedefleyen RNA'nın bir hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı nitelikte bir nükleotid sekansı ihtiva ettiği bir DNA-hedefleyen RNA ile etkileşime giren bir RNA-bağlanımlı kısım ve (ii) hedef DNA içerisinde modüle edilmiş transkripsiyon yerinin, DNA-hedefleyen RNA tarafından belirlendiği, hedef DNA içerisindeki transkripsiyonu modüle eden (örneğin transkripsiyonu artıran veya azaltan) bir aktivite kısmı.

20

Bazı durumlarda, bir söz konusu kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptidin aktivite kısmı, hedef DNA'yı modifiye eden bir enzimatik aktiviteye (örneğin nükleaz aktivitesi, metiltransferaz aktivitesi, demetilaz aktivitesi, DNA onarımı aktivitesi, DNA hasarı aktivitesi, deaminasyon aktivitesi, dismutaz aktivitesi, alkilasyon aktivitesi, depürinasyon aktivitesi, oksidasyon aktivitesi, pirimidin dimeri oluşturma aktivitesi, integraz aktivitesi, transpozaz aktivitesi, rekombinaz aktivitesi, polimeraz aktivitesi, ligaz aktivitesi, helikaz aktivitesi, fotolizaz aktivitesi ya da glikozilaz aktivitesi) sahiptir.

25

Başka durumlarda, bir söz konusu kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptidin aktivite kısmı, hedef DNA ile ilişkili bir polipeptidi (örneğin bir histon) modifiye eden bir enzimatik aktiviteye (örneğin metiltransferaz aktivitesi, demetilaz aktivitesi, asetiltransferaz aktivitesi, deasetilaz aktivitesi, kinaz aktivitesi, fosfataz aktivitesi, ubikitin ligaz aktivitesi, deubikitinasyon aktivitesi, adenilasyon aktivitesi, deadenilasyon aktivitesi, SUMOilasyon aktivitesi, deSUMOilasyon aktivitesi, ribozilasyon aktivitesi, deribozilasyon aktivitesi, miristoilasyon aktivitesi ya da demiristoilasyon aktivitesi) sahiptir.

Bazı durumlarda, bir söz konusu kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptidin aktivite kısmı enzimatik aktivite (yukarıda açıklanmaktadır) sergiler. Başka durumlarda, buluşa uygun bir söz konusu kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptidin aktivite kısmı hedef DNA'nın transkripsiyonunu modüle eder (yukarıda açıklanmaktadır). Bir söz konusu kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptidin aktivite kısmı değişkendir ve burada açıklanan yöntemlerde kullanılabilir olan herhangi bir heterolog polipeptid sekansını ihtiva edebilir.

### **Ornek niteliğindeki kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptidler**

Buluşun bazı yapılarında, kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptidin aktivite kısmı Cas9/Csn1 proteininin modifiye bir formunu ihtiva eder. Buluşun bazı yapılarında, Cas9/Csn1 proteininin modifiye formu, Cas9/Csn1 proteininin doğada kendiliğinden oluşan

nükleaz aktivitesini azaltan bir amino asit değişikliği (örneğin delesyon, insersiyon veya ikame) ihtiva eder. Örneğin bazı durumlarda, Cas9/Csn1 proteininin modifiye formunda, mütakabil yabani tip Cas9/Csn1 polipeptidinin sahip olduğu nükleaz 5 aktivitesinin %50'sinden daha az, %40'ından daha az, %30'undan daha az, %20'sinden daha az, %10'undan daha az, %5'inden daha az ya da %1'inden daha az nükleaz aktivitesi vardır. Bazı durumlarda, Cas9/Csn1 polipeptidinin modifiye formunda hemen hemen hiç nükleaz aktivitesi yoktur.

10

Buluşun bazı yapılarında, Cas9/Csn1 polipeptidinin modifiye formu, hedef DNA'nın tamamlayıcı iplikçliğini yarabilecek olan fakat hedef DNA'nın tamamlayıcı olmayan iplikçliğini yarma yönünde azaltılmış bir kabiliyete sahip olan bir D10A (SEKANS KOD NO.: 8'in 10 15 numaralı amino asit pozisyonunda aspartat → alanin) mutasyonudur (ya da SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346'da gösterilen proteinlerden herhangi birindeki bir mütakabil mutasyon) (bkz: Şekil 11). Buluşun bazı yapılarında, Cas9/Csn1 polipeptidinin modifiye formu, hedef DNA'nın tamamlayıcı olmayan iplikçliğini yarabilecek 20 olan fakat hedef DNA'nın tamamlayıcı iplikçliğini yarma yönünde azaltılmış bir kabiliyete sahip olan bir H840A (840 numaralı amino asit pozisyonunda histidin → alanin) mutasyonudur (ya da SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346'da gösterilen proteinlerden herhangi birindeki bir mütakabil mutasyon) (bkz: Şekil 11). Buluşun bazı 25 yapılarında, Cas9/Csn1 polipeptidinin modifiye formunda hem D10A hem de H840 mutasyonu (ya da SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346'da gösterilen proteinlerden herhangi birindeki mütakabil mutasyonlar) bulunur, öyle ki söz konusu polipeptidde hedef DNA'nın

tamamlayıcı olan ve olmayan iplikçiklerinin her ikisine de karşı azaltılmış bir yarma kabiliyeti vardır. Yukarıdaki etkilere (yani nükleaz kısımlarından birini veya diğerinin inaktivasyonu) ulaşmak için başka artıklar da mutasyona uğratılabilir. Örnek vermek gerekirse, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, D10, G12, G17, E762, H840, N854, N863, H982, H983, A984, D986 ve/veya A987 artıkları (ya da SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346'da gösterilen proteinlerden herhangi birindeki mütetekabil mutasyonlar) değişikliğe uğratılabilir (yani ikame edilebilir) (Cas9 amino asit artıklarının korunumu hakkında daha fazla bilgi almak için bkz: **Şekil 3**, **Şekil 5**, **Şekil 11A** ve **Tablo 1**). Ayrıca, alanin ikameleri dışındaki mutasyonlar da uygundur.

**Tablo 1:** Tablo 1'de, çeşitli türlerdeki Cas9 sekanslarında bulunan 4 motif listelenmektedir (ayrıca bkz: **Şekil 3** ve **Şekil 5**). Burada listelenen amino asitlerin kaynağı, *S.pyogenes* Cas9'udur (SEKANS KOD NO.: 8).

Motif #	Motif	Amino asitler (artık #)	Yüksek düzeyde korunan artıklar
1	RuvC-benzeri I	IGLDIGTNSVGVAVI (7-21) (SEKANS KOD NO.: 260)	D10, G12, G17
2	RuvC-benzeri II	IVIEMARE (759-766) (SEKANS KOD NO.: 261)	E762

3	HNH-motifi	DVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKN (837-863) (SEKANS KOD NO.: 262)	H840, N854, N863
4	RuvC- benzeri II	HHAHDAYL (982-989) (SEKANS KOD NO.: 263)	H982, H983, A984, D986, A987

Bazı durumlarda, kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptid, Şekil 3'te gösterilen Cas9/Csn1 amino asit sekansının 7-166 veya 731-1003 numaralı amino asitlerinden oluşan kısım ile ya da SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346'da gösterilen amino asit sekanslarından herhangi birindeki mütakabil kısımlar ile en az yaklaşık %75 oranında, en az yaklaşık %80 oranında, en az yaklaşık %85 oranında, en az yaklaşık %90 oranında, en az yaklaşık %95 oranında, en az yaklaşık %99 oranında ya da %100 oranında amino asit sekansı özdeşliğine sahip olan bir amino asit sekansı ihtiva eder. Bazı durumlarda, kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptid, her birinde Tablo 1'de listelenen 4 motiftten (SEKANS KOD NO.: 260-263) ilgili motif ile ya da SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346'da gösterilen amino asit sekanslarından herhangi birindeki mütakabil kısımlar ile en az yaklaşık %75 oranında, en az yaklaşık %80 oranında, en az yaklaşık %85 oranında, en az yaklaşık %90 oranında, en az yaklaşık %95 oranında, en az yaklaşık %99 oranında ya da %100 oranında amino asit sekansı özdeşliğine sahip olan bir amino asit sekansının bulunduğu 4 motif (Tablo 4'te listelendiği ve Şekil 3A ve Şekil 5'te gösterildiği gibi olan motifler) ihtiva eder. Bazı durumlarda, kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptid, Şekil 3'te gösterilen Cas9/Csn1

- amino asit sekansının 7-166 veya 731-1003 numaralı amino asitlerinden oluşan kısım ile ya da SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346'da gösterilen amino asit sekanslarından herhangi birindeki mütakabil kısımlar ile en az yaklaşık %75 oranında, en az yaklaşık
- 5 %80 oranında, en az yaklaşık %85 oranında, en az yaklaşık %90 oranında, en az yaklaşık %95 oranında, en az yaklaşık %99 oranında ya da %100 oranında amino asit sekansı özdeşliğine sahip olan amino asit sekansları ihtiva eder.
- 10 Buluşun bazı yapılarında, yer-hedefli modifiye edici polipeptidin aktivite kısmı, DNA-modifiye edici aktiviteye ve/veya transkripsiyon fakötür aktivitesine ve/veya DNA-bağlantılı polipeptid-modifiye edici aktiviteye sahip olan bir heterolog polipeptid içerir. Bazı durumlarda, bir heterolog polipeptid, Cas9/Csn1 polipeptidinin nükleaz aktivitesi
- 15 sağlayan bir kısmının yerine geçer. Buluşun başka yapılarında, bir söz konusu yer-hedefli modifiye edici polipeptid, hem Cas9/Csn1 polipeptidinin normalde nükleaz aktivitesi sağlayan (ve tamamen aktif olabilecek olan ya da mütakabil yabancı tip aktivitesini %100'den daha düşük bir seviyede sergilemesini sağlayacak bir modifikasyona tâbi
- 20 tutulabilecek olan) bir kısmını hem de bir heterolog polipeptid ihtiva eder. Diğer bir deyişle, bazı durumlarda, bir söz konusu kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptid, hem Cas9/Csn1 polipeptidinin normalde nükleaz aktivitesi sağlayan kısmını hem de heterolog polipeptidi ihtiva eden bir füzyon polipeptididir. Başka durumlarda,
- 25 bir söz konusu kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptid, Cas9/Csn1 polipeptidinin aktivite kısmının modifiye edilmiş bir varyantı (örneğin amino asit değişikliği, delesyonu, insersiyonu) ile bir heterolog polipeptidden oluşan bir füzyon polipeptididir. Yine

başka durumlarda, bir söz konusu kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptid, bir doğada kendiliğinden oluşan ya da modifiye edilmiş yer-hedefli modifiye edici polipeptidin RNA-bağlanımlı kısmı ile bir heterolog polipeptidten oluşan bir füzyon polipeptididir.

5

Örneğin, bir kimerik Cas9/Csn1 proteininde, bir doğada kendiliğinden oluşan (ya da modifiye edilmiş olan, örneğin mtuasyon, delesyon veya insersiyona tâbi tutulmuş olan) bakteriyel Cas9/Csn1 polipeptidi bir heterolog polipeptid sekansına (yani Cas9/Csn1 dışındaki bir proteinin polipeptid sekansına ya da başka bir organizmadaki bir polipeptid sekansına) füzyonlanabilir. Heterolog polipeptid, aynı zamanda kimerik Cas9/Csn1 proteininin de sergileyeceği bir aktivite (örneğin enzimatik aktivite) (örneğin metiltransferaz aktivitesi, asetiltransferaz aktivitesi, kinaz aktivitesi, ubikitinasyon aktivitesi ve benzeri) sergileyebilir. Bir heterolog nükleik asit sekansı başka bir nükleik asit sekansına (örneğin genetik mühendisliği yoluyla) bağlanarak bir kimerik polipeptid kodlayan bir kimerik nükleotid sekansı oluşturulabilir. Buluşun bazı yapılarında, bir kimerik Cas9/Csn1 polipeptidi, bir Cas9/Csn1 polipeptidinin (örneğin yabani tip Cas9 veya bir Cas9 varyantı, örneğin azaltılmış veya inaktive edilmiş bir nükleaz aktivitesine sahip olan bir Cas9) hücre içi lokalizasyon sağlayan bir heterolog sekansa (örneğin nükleusu hedef almayı sağlayan bir nükleer lokalizasyon sinyali (NLS); mitokondriyi hedef almayı sağlayan bir mitokondri lokalizasyon sinyali; bir kloroplastı hedef almayı sağlayan bir kloroplast lokalizasyon sinyali; bir ER retansiyon sinyali ve benzeri unsurlar) füzyonlanması yoluyla oluşturulur. Buluşun bazı yapılarında, heterolog sekans, takibi veya saflaştırmayı kolaylaştırma amaçlı bir tag (örneğin bir floresan

10

15

20

25



protein, örneğin yeşil floresan protein (GFP), YFP, RFP, CFP, mCherry, tdTomato ve benzeri; bir HIS tagı, örneğin bir 6XHis tagı; bir hemaglütininin (HA) tagı; bir FLAG tagı; bir Myc tagı ve benzeri) sağlayabilir. Buluşun bazı yapılarında, heterolog sekans, daha yüksek veya daha düşük bir stabilite sağlayabilir. Buluşun bazı yapılarında, heterolog sekans, bir bağlanma domaini (örneğin bir kimerik Cas9 polipeptidine ilgilenilen başka bir proteine, örneğin bir DNA veya histon modifiye edici protein, bir transkripsiyon faktörü veya transkripsiyon baskılayıcı, bir toplayıcı protein veya benzeri başka bir proteine bağlanma kabiliyeti kazandıran bir bölge olarak) sağlayabilir.

Buluşa uygun bir varyant Cas9 yer-hedefli polipeptid için uygun diğer çeşitli füzyon partnerlerine (veya onların fragmanlarına) verilebilecek örnekler arasında sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın Şekil 54'te listelenen unsurlar bulunur.

**Bir söz konusu kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptid kodlayan nükleik asit**

Mevcut tarifname, buluşa uygun bir kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptid kodlayan bir nükleotid sekansının bulunduğu bir nükleik asiti sağlamaktadır. Buluşun bazı yapılarında, bir söz konusu kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptid kodlayan bir nükleotid sekansının bulunduğu nükleik asit bir ekspresyon vektörüdür, örneğin bir rekombinan ekspresyon vektörüdür.

Buluşun bazı yapılarında, bir söz konusu yöntemde, bir kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptidin bulunduğu bir veya daha fazla

sayıda nükleik asit bir hedef DNA ile temas ettirilir veya bir hücreye (ya da bir hücre popülasyonuna) sokulur. Bir kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptid kodlayan nükleotid sekanslarının bulunduğu uygun nükleik asitler arasında, bir kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptid kodlayan bir nükleotid sekansının yer aldığı bir "rekombinan ekspresyon vektörü"nü teşkil eden ekspresyon vektörleri bulunur.

Buluşun bazı yapılarında, rekombinan ekspresyon vektörü, bir viral yapıdır, örneğin bir rekombinan adeno-bağlantılı virüs yapısı (örneğin bkz: 7.078.387 sayılı ABD patenti), bir rekombinan adenoviral yapı, bir rekombinan lentiviral yapı ya da benzeri başka bir yapıdır.

Uygun ekspresyon vektörleri arasında, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, viral vektörler (örneğin vaksiniya virüsü; poliovirüs; adenovirüs (örneğin bkz: Li et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 35:2543 2549, 1994; Borrás et al., Gene Ther 6:515 524, 1999; Li and Davidson, PNAS 92:7700 7704, 1995; Sakamoto et al., H Gene Ther 5:1088 1097, 1999; WO 94/12649; WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 ve WO 95/00655); adeno-bağlantılı virüs (örneğin bkz: Ali et al., Hum Gene Ther 9:81 86, 1998; Flannery et al., PNAS 94:6916 6921, 1997; Bennett et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 38:2857 2863, 1997; Jomary et al., Gene Ther 4:683 690, 1997; Rolling et al., Hum Gene Ther 10:641 648, 1999; Ali et al., Hum Mol Genet 5:591 594, 1996; Srivastava in WO 93/09239; Samulski et al., J. Vir. (1989) 63:3822-3828; Mendelson et al., Virol. (1988) 166:154-165; Flotte et al., PNAS (1993) 90:10613-10617); SV40; herpes simpleks virüsü; insan immün yetmezlik virüsü (örneğin bkz: Miyoshi

et al., PNAS 94:10319 23, 1997; Takahashi et al., J Virol 73:7812 7816, 1999); bir retroviral vektöre (örneğin murin lösemi virüsü; dalak nekroz virüsü; ve rous sarkoma virüsü, harvey sarkoma virüsü, avian lökoz virüsü, bir lentivirüs, insan immün yetmezlik virüsü, miyeloproliferatif sarkoma virüsü ve meme tümörü virüsünden elde edilen vektörler) dayanan viral vektörler) ve benzeri vektörler sayılabilir.

Sektörde bilgi ve beceri sahibi uzmanların bilgisi dahilinde olan pek çok uygun ekspresyon vektörü bulunmakta ve bunların birçoğu ticari piyasada yer almaktadır. Aşağıda sıralanan vektörler bunlara verilebilecek örneklerden bazılarıdır: ökaryotik konakçı hücreler için: pXT1, pSG5 (Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG ve pSVLSV40 (Pharmacia). Bunların yanı sıra, konakçı hücre ile uyumlu ve geçimli olduğu sürece başka herhangi bir vektör de kullanılabilir.

Kullanılan konakçı/vektör sistemine bağlı olarak, ekspresyon vektöründe aralarında konstitütif ve indüklenebilir promotörlerin, transkripsiyon artırıcı elemanların, transkripsiyon terminatörlerinin ve benzeri unsurların da bulunduğu pek çok uygun transkripsiyon ve translasyon kontrol elemanından herhangi biri kullanılabilir (örneğin bkz: Bitter et al. (1987) *Methods in Enzymology*, 153:516-544).

Buluşun bazı yapılarında, bir kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptid kodlayan bir nükleotid sekansı, bir kontrol elemanına, örneğin bir promotör gibi bir transkripsiyonel kontrol elemanına operabl bağlanır. Transkripsiyonel kontrol elemanı, bir ökaryotik hücrede, örneğin bir memeli hücresinde ya da bir prokaryotik hücrede

(örneğin bir bakteri veya arke hücresi) fonksiyonel olabilir. Buluşun bazı yapılarında, bir kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptid kodlayan bir nükleotid sekansı, bir kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptid kodlayan nükleotid sekansının hem prokaryotik hücrelerde hem de ökaryotik hücrelerde eksprese olmasına olanak sağlayacak olan birden çok kontrol elemanına operabl bağlanır.

Uygun ökaryotik promotörlere (bir ökaryotik hücrede fonksiyonel olan promotörler) verilebilecek örnekler arasında, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, sitomegalovirüs (CMV) ilk erken, herpes simpleks virüsü (HSV), timidin kinaz, erken ve geç SV40, uzun terminal tekrarlar (LTR'ler), retrovirüs ve fare metallothioneini-I'den elde edilebilecek olan promotörler bulunur. Uygun vektör ve promotör, sektörde olağan bilgi ve beceri sahibi uzmanlarca kolayca seçilebilir.

Ekspresyon vektöründe, translasyonu başlatan bir ribozom bağlanma yeri ve bir transkripsiyon terminatörü de bulunabilir. Ekspresyon vektörü, ekspresyonu amplifiye etmeye yarayan uygun sekanslar da ihtiva edebilir. Ekspresyon vektöründe, kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptide füzyonlanan protein taglarını (örneğin 6xHis tagı, hemaglütinin (HA) tagı, bir floresan protein (örneğin bir yeşil floresan protein; bir sarı floresan protein ve benzeri) ve benzeri) kodlayan nükleotid sekansları da yer alabilir.

Buluşun bazı yapılarında, bir kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptid kodlayan bir nükleotid sekansı bir indüklenbilir promotöre (örneğin ısı şok promotörü, tetrasiklinin düzenlediği promotör, steroidin düzenlediği promotör, metalin düzenlediği promotör, östrojen reseptörünün düzenlediği promotör ve benzeri promotörler)

operabl bağıdır. Buluşun bazı yapılarında, bir kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptid kodlayan bir nükleotid sekansı bir uzam bakımından ve/veya zaman bakımından kısıtları bulunan promotöre (örneğin bir doku-spesifik promotör, bir hücre tipi-spesifik promotör ve benzeri) operabl bağıdır. Buluşun bazı yapılarında, bir kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptid kodlayan bir nükleotid sekansı bir konstitütif promotöre operabl bağıdır.

Bir nükleik asidi bir konakçı hücreye dahil etmeye yarayan yöntemler sektörde bilinmektedir ve bir nükleik asidi (örneğin bir ekspresyon yapısı) bir kök hücre veya progenitör hücreye sokmak için bilinen yöntemlerden herhangi biri kullanılabilir. Uygun yöntemler arasında, örneğin viral enfeksiyon veya bakteriyofaj enfeksiyonu, transfeksiyon, konjugasyon, protoplast füzyonu, lipofeksiyon, elektroporasyon, kalsiyum fosfat presipitasyonu, polietilenimin (PEI) aracılı transfeksiyon, DEAE-dekstran aracılı transfeksiyon, lipozom aracılı transfeksiyon, partikül tabancası teknolojisi, kalsiyum fosfat presipitasyonu, direkt mikro enjeksiyon, nanopartikül aracılı nükleik asit taşınması (örneğin bkz: Panyam et. al., Adv Drug Deliv Rev. 2012 Sep 13. pii: S0169-409X(12)00283-9. doi: 10.1016/j.addr.2012.09.023) ve benzeri yöntemler sayılabilir.

## **YONTEMLER**

Bu buluş, bir hedef DNA ve/veya hedef DNA ile ilişkili bir polipeptidi modifiye etmeye yarayan yöntemler ortaya koyar. Buluşa uygun bir yöntemde, genelde, bir hedef DNA bir DNA-hedefleyen RNA ile bir

yer-hedefli modifiye edici polipeptid ihtiva eden bir kompleksle (bir "hedefleme kompleksi") temas ettirilir.

Yukarıda belirtildiği gibi, buluşa uygun bir DNA-hedefleyen RNA ile  
 5 buluşa uygun bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid bir kompleks oluştururlar. DNA-hedefleyen RNA, bir hedef DNA'nın bir sekansını tamamlayıcı nitelikte bir nükleotid sekansı ihtiva etmesi sayesinde komplekse hedef spesifisitesi kazandırır. Kompleksteki yer-hedefli modifiye edici polipeptid ise yer-spesifik aktiviteyi sağlar. Buluşun  
 10 bazı yapılarında, buluşa uygun bir kompleks bir hedef DNA'yı modifiye ederek örneğin DNA yarılmaması, DNA metilasyonu, DNA hasarı, DNA onarımı veya benzeri başka etkilerin oluşmasını sağlar. Buluşun başka yapılarında, buluşa uygun bir kompleks hedef DNA ile ilişkili bir hedef polipeptidi (örneğin bir histon, bir DNA-bağlanımlı  
 15 protein ve benzeri) modifiye ederek örneğin histon metilasyonu, histon asetilasyonu, histon ubiquitinasyonu veya benzeri başka etkilerin oluşmasını sağlar. Hedef DNA, örneğin in vitro ortamda bulunan bir çıplak DNA, in vitro ortamdaki hücrelerde bulunan bir kromozomal DNA, in vivo ortamdaki hücrelerde bulunan bir kromozomal DNA  
 20 veya benzeri olabilir.

Bazı durumlarda, yer-hedefli modifiye edici polipeptid, DNA-hedefleyen RNA ile hedef DNA arasındaki tamamlayıcılık bölgesi ile tanımlanan bir hedef DNA sekansı üzerinden hedef DNA'nın yarılmamasını sağlayan bir nükleaz aktivitesi sergiler. Bazı durumlarda,  
 25 yer-hedefli modifiye edici polipeptid bir Cas9 veya Cas9 ile ilişkili bir polipeptid ise, hedef DNA'daki yer-spesifik yarıma, (i) hem DNA-hedefleyen RNA ile hedef DNA arasındaki baz eşleşmesine dayalı tamamlayıcılık derecesinin, (ii) hem de hedef DNA'daki kısa bir

motifin [ön-aralığa komşu motif (PAM) olarak atıf yapılır] belirlediği konumlarda meydana gelir. Buluşun bazı yapılarında (örneğin *S. pyogenes* Cas9'unun ya da onunla yakından ilişkili bir Cas9'un (bkz: SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346) kullanıldığı hallerde),

5 tamamlayıcı olmayan iplikçiğin PAM sekansı, X'in herhangi bir DNA nükleotidini temsil ettiği ve X'in hedef DNA'nın tamamlayıcı olmayan iplikçiğindeki hedef sekansın hemen 3' ucunda yer aldığı 5'-XGG-3' sekansıdır (bkz: Şekil 10). Tamamlayıcı iplikçiğin PAM sekansı ise, Y'nin herhangi bir DNA nükleotidini temsil ettiği ve Y'nin hedef

10 DNA'nın tamamlayıcı iplikçiğindeki hedef sekansın hemen 5' ucunda yer aldığı 5'-CCY-3' sekansıdır (bkz: tamamlayıcı olmayan iplikçiğin PAM sekansının 5'-GGG-3' ve tamamlayıcı iplikçiğin PAM sekansının 5'-CCC-3' olduğu Şekil 10). Buluşun bu gibi yapılarından bazılarında, X ve Y birbirlerini tamamlayıcı nitelikte olabilirler ve X-

15 Y baz çifti herhangi bir baz çifti (örneğin X=C ve Y=G; X=G ve Y=C; X=A ve Y=T; X=T ve Y=A) olabilir.

Bazı durumlarda, sunulan çeşitli yöntemlerde farklı Cas9 proteinlerine ait muhtelif enzimatik karakteristiklerden yararlanabilmek adına farklı

20 Cas9 proteinlerinin (yani farklı türlerden edinilen Cas9 proteinleri) kullanılması avantaj sağlayabilir (örneğin farklı PAM sekansı tercihleri için; daha yüksek veya daha düşük enzimatik aktivite için; daha yüksek veya daha düşük bir hücrel toksisite seviyesi için; NHEJ, homoloji-yönlendirmeli onarım, tek iplikçik kırıkları, çift

25 iplikçik kırıkları ve benzerleri arasındaki dengeyi değiştirmek için). Farklı türlerden edinilen Cas9 proteinleri (bkz: SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346), hedef DNA'da farklı PAM sekansları bulunmasını gerektirebilirler. Dolayısıyla, seçilen belirli bir Cas9

proteinine ilişkin PAM sekansı gereksinimi, yukarıda tanımlanan 5'-XGG-3' sekansından farklı olabilir.

Burada birçok farklı türe ait birçok Cas9 ortoloğu tanımlanmıştır ve ilgili proteinlerde yalnızca birkaç adet ortak amino asit bulunmaktadır. Tanımlanmış olan tüm Cas9 ortologları, bir merkezi HNH endonükleaz domaini ve bir bölünmüş RuvC/RNazH domaininin bulunduğu aynı domain mimarisine sahiptirler (bkz: Şekiller 3A, 3B ve 5 ve Tablo 1). Cas9 proteinleri, korunan bir mimari eşliğinde 4 kilit motifi paylaşırlar. Motifler 1, 2 ve 4 RuvC benzeri motiflerken, motif 3 bir HNH motifidir. Bazı durumlarda, buluşa uygun bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid, her biri Şekil 3A'da gösterilen Cas9/Csn1 amino asit sekansının 1-4 numaralı motifleri (Tablo 1'de gösterildiği üzere sırasıyla SEKANS KOD NO.: 260-263) ile ya da SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346'da gösterilen amino asit sekanslarından herhangi birindeki mütakabil kısımlar ile en az yaklaşık %75 oranında, en az yaklaşık %80 oranında, en az yaklaşık %85 oranında, en az yaklaşık %90 oranında, en az yaklaşık %95 oranında, en az yaklaşık %99 oranında ya da %100 oranında amino asit sekansı özdeşliğine sahip olan 4 motifin bulunduğu bir amino asit sekansı ihtiva eder (farklı Cas9 sekanslarındaki motifler 1-4 arasındaki bir hizalama için bkz: Şekil 5). Bazı durumlarda, buluşa uygun bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid, Şekil 3'te gösterilen Cas9/Csn1 amino asit sekansının 7-166 veya 731-1003 numaralı amino asitlerinden oluşan kısım ile ya da SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346'da gösterilen amino asit sekanslarından herhangi birindeki mütakabil kısımlar ile en az yaklaşık %75 oranında, en az yaklaşık %80 oranında, en az yaklaşık %85 oranında, en az yaklaşık %90



oranında, en az yaklaşık %95 oranında, en az yaklaşık %99 oranında ya da %100 oranında amino asit sekansı özdeşliğine sahip olan bir amino asit sekansı ihtiva eder. Buluşa konu olan yöntemlerde yukarıda tanımlandığı gibi olan herhangi bir Cas9 proteini bir yer-hedefli  
5 modifiye edici polipeptid ya da bir kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptidin bir parçası olarak kullanılabilir.

Nükleaz aktivitesi, hedef DNA'yı yararak çift iplikçik yarıklarının oluşmasını sağlar. Daha sonra hücre iki farklı yoldan birini kullanarak  
10 bu yarıkları onarır: homolog olmayan uç birleştirme ve homoloji-yönlendirmeli onarım (Şekil 2). Homolog olmayan uç birleştirmede (NHEJ), çift iplikçik kırıkları kırık uçların birbirlerine doğrudan ligasyonu yoluyla onarılırlar. Bu süreç esnasında birtakım nükleik asit materyali yitirilebilecek ve bir silinme meydana gelebilecek olmasına  
15 rağmen herhangi bir yeni nükleik asit materyali ilgili yere eklenmez. Homoloji-yönlendirmeli onarımda, yarılmış hedef DNA sekansına homolog bir donör polinükleotid, yarılmış hedef DNA sekansının onarımı için bir şablon olarak kullanılır ve buna göre, donör polinükleotidden hedef DNA'ya genetik bilgi transferi gerçekleştirilir.  
20 Bu süreç sonucunda ilgili yere yeni nükleik asit materyali eklenebilir/kopyalanabilir. Bazı durumlarda, bir hedef DNA buluşa uygun bir donör polinükleotid ile temas ettirilir. Bazı durumlarda, buluşa uygun bir donör polinükleotid buluşa uygun bir hücreye sokulur. Hedef DNA'da NHEJ ve/veya homoloji-yönlendirmeli  
25 onarım sonucunda meydana gelen modifikasyonlar, örneğin gen düzeltilmesi, gen değişikliği, gen taglaması, transgen insersiyonu, nükleotid delesyonu, gen bozulması, gen mutasyonu ve benzeri etkilere yol açar.

Bu bilgiler ışığında anlaşılacağı üzere, hedef DNA sekansını yarıp hücrenin sekansı eksojen olarak temin edilmiş bir donör polinükleotid olmadan onarmasına olanak sağlamaya dayanan bir DNA'yı bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid ile yarma yaklaşımı, bir hedef DNA sekansındaki nükleik asit materyalini silmek (örneğin, hücreleri enfeksiyona yatkınlaştıran bir geni (örneğin T hücrelerini HIV enfeksiyonuna duyarlı hale getiren CCR5 veya CXCR4 genini) bozmak, nöronlardaki hastalığa sebep olan trinükleotid tekrar sekanslarını çıkarmak, araştırmalarda hastalık modeli olarak gen knock-out'ları ve mutasyonları yaratmak ve benzeri amaçlarla) için kullanılabilir. Dolayısıyla, bu buluşa konu olan yöntemler, bir geni knock-out etmek (böylelikle transkripsiyonun tamamen baskılanmasını sağlamak veya transkripsiyonu değiştirmek) ya da hedef DNA'da seçilen bir lokusa genetik materyal knock-in etmek amacıyla kullanılabilirler.

Alternatif olarak, söz konusu yöntemler kapsamında bir DNA-hedefleyen RNA ve bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid hücrelere hedef DNA sekansına homolog en az bir adet segment barındıran bir donör polinükleotid sekansı ile birlikte uygulanarak, hedef DNA sekansına nükleik asit materyali eklenebilir, yani sokulabilir veya mevcut materyalin yerine ikame edilebilir (örneğin, bir protein, bir siRNA, bir miRNA ve benzeri bir unsuru kodlayan bir nükleik asit "knock-in" etmek için), bir tag (örneğin 6xHis, bir floresan protein (örneğin bir yeşil floresan protein; bir sarı floresan protein ve benzeri), hemaglütinin (HA), FLAG ve benzeri) eklenebilir, bir gene bir düzenleyici sekans (örneğin promotör, poliadenilasyon sinyali, iç ribozom giriş sekansı (IRES), 2A peptidi, başlangıç kodonu, bitiş

kodonu, uçbirleştirme sinyali, lokalizasyon sinyali ve benzeri) eklenebilir, bir nükleik asit sekansı modifiye edilebilir (örneğin bir mutasyon dahil edilebilir) ve benzeri başka bir amaç yerine getirilebilir. Bu bağlamda, bir DNA-hedefleyen RNA ile bir yer-  
5 hedefli modifiye edici polipeptidden oluşan bir kompleks, DNA'nın yer-spesifik şekilde, yani "hedef gözetilerek" modifiye edilmesinin amaçlandığı, örneğin gen knock-out'u, gen knock-in'i, gen editleme, gen taglama ve benzeri herhangi bir in vitro veya in vivo uygulamada, örneğin bu tarz uygulamalara başvuru olan örneğin bir hastalığı tedavi  
10 etmek amacıyla gerçekleştirilen ya da bir antiviral, antipatojenik veya antikanser terapötüğü olarak kullanılan gen terapisinde, tarımda genetiği değiştirilmiş organizmaların üretiminde, hücrelerle gerçekleştirilen tedavi, tanı veya araştırma amaçlı büyük ölçekli protein üretiminde, iPS hücrelerinin indüksiyonunda, biyolojik araştırmalarda, patojen genlerinin silinmek veya ikame edilmek üzere  
15 hedeflenmesinde ve benzeri alanlarda kullanılabilir.

Buluşun bazı yapılarında, yer-hedefli modifiye edici polipeptid, Cas9/Csn1 proteininin modifiye bir formunu ihtiva eder. Bazı  
20 durumlarda, Cas9/Csn1 proteininin modifiye formu, Cas9/Csn1 proteininin doğada kendiliğinden oluşan nükleaz aktivitesini azaltan bir amino asit değişikliği (örneğin delesyon, insersiyon veya ikame) ihtiva eder. Örneğin bazı durumlarda, Cas9/Csn1 proteininin modifiye formunda, mütakabil yabancı tip Cas9/Csn1 polipeptidinin sahip  
25 olduğu nükleaz aktivitesinin %50'sinden daha az, %40'ından daha az, %30'undan daha az, %20'sinden daha az, %10'undan daha az, %5'inden daha az ya da %1'inden daha az nükleaz aktivitesi vardır. Bazı durumlarda, Cas9/Csn1 polipeptidinin modifiye formunda hemen

hemen hiç nükleaz aktivitesi yoktur. Hemen hemen hiç nükleaz aktivitesi içermeyen modifiye bir Cas9/Csn1 polipeptidi formunu teşkil eden buluşa uygun bir yer-hedefli modifiye edici polipeptide "dCas9" olarak atıf yapılabilir.

5

Buluşun bazı yapılarında, Cas9/Csn1 polipeptidinin modifiye formu, hedef DNA'nın tamamlayıcı iplikçliğini yarabilecek olan fakat hedef DNA'nın tamamlayıcı olmayan iplikçliğini yarma yönünde azaltılmış bir kabiliyete sahip olan (böylelikle bir DSB yerine bir tek iplikçik kırığının (SSB) oluşmasını sağlayan) bir D10A (SEKANS KOD NO.: 8'in 10 numaralı amino asit pozisyonunda aspartat → alanin) mutasyonudur (ya da SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346'da gösterilen proteinlerden herhangi birindeki bir mütakabil mutasyon) (bkz: Şekil 11). Buluşun bazı yapılarında, Cas9/Csn1 polipeptidinin modifiye formu, hedef DNA'nın tamamlayıcı olmayan iplikçliğini yarabilecek olan fakat hedef DNA'nın tamamlayıcı iplikçliğini yarma yönünde azaltılmış bir kabiliyete sahip olan (böylelikle bir DSB yerine bir tek iplikçik kırığının (SSB) oluşmasını sağlayan) bir H840A (SEKANS KOD NO.: 8'in 840 numaralı amino asit pozisyonunda histidin → alanin) mutasyonudur (ya da SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346'da gösterilen proteinlerden herhangi birindeki bir mütakabil mutasyon) (bkz: Şekil 11). Cas9'un D10A veya H840A mutasyonunun (ya da SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346'da gösterilen proteinlerden herhangi birine istinaden mütakabil mutasyonların) kullanılması beklenen biyolojik sonucu değişikliğe uğratabilir, zira SSB'lere kıyasla DSB'ler söz konusu olduğunda homolog olmayan uç birleştirmenin (NHEJ) meydana gelmesi çok daha olasıdır. Dolayısıyla, DSB meydana gelmesi ihtimalinin (ve

bağlantılı olarak NHEJ meydana gelmesi ihtimalinin) düşürülmesinin istendiği bazı durumlarda bir Cas9 D10A veya H840A varyantı kullanılabilir. Aynı etkiye (yani nükleaz kısımlarından birini veya diğerinin inaktivasyonu) ulaşmak için başka artıklar da mutasyona uğratılabilir. Örnek vermek gerekirse, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, D10, G12, G17, E762, H840, N854, N863, H982, H983, A984, D986 ve/veya A987 artıkları (ya da SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346'da gösterilen proteinlerden herhangi birindeki mütetekabil mutasyonlar) değişikliğe uğratılabilir (yani ikame edilebilir) (Cas9 amino asit artıklarının korunumu hakkında daha fazla bilgi almak için bkz: **Şekil 3**, **Şekil 5**, **Şekil 11A** ve **Tablo 1**). Ayrıca, alanin ikameleri dışındaki mutasyonlar da uygundur. Buluşun bazı yapılarında, bir yer-hedefli polipeptidde (örneğin yer-hedefli modifiye edici polipeptid) azaltılmış bir katalitik aktivite varsa (örneğin bir Cas9 proteininde bir D10, G12, G17, E762, H840, N854, N863, H982, H983, A984, D986 ve/veya A987 mutasyonunun, örneğin D10A, G12A, G17A, E762A, H840A, N854A, N863A, H982A, H983A, A984A ve/veya D986A'nın bulunduğu durumlarda), bu polipeptid, DNA-hedefleyen RNA ile etkileşime girme kabiliyetini muhafaza ettiği sürece hedef DNA'ya hâlâ yer-spesifik bir şekilde bağlanabilir (zira hâlâ bir DNA-hedefleyen RNA tarafından bir hedef DNA sekansına yönlendirilmektedir).

Buluşun bazı yapılarında, Cas9/Csn1 polipeptidinin modifiye formunda hem D10A hem de H840 mutasyonu (ya da SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346'da gösterilen proteinlerden herhangi birindeki mütetekabil mutasyonlar) bulunur, öyle ki söz konusu polipeptidde hedef DNA'nın tamamlayıcı olan ve olmayan iplikçiklerinin her

ikisine de karşı azaltılmış bir yarma kabiliyeti vardır (yani varyant hemen hemen hiç nükleaz aktivitesine sahip olmayabilir). Aynı etkiye (yani nükleaz kısımlarından birini veya diğerinin inaktivasyonu) ulaşmak için başka artıklar da mutasyona uğratılabilir. Örnek vermek gerekirse, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, D10, G12, G17, E762, H840, N854, N863, H982, H983, A984, D986 ve/veya A987 artıkları (ya da SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346'da gösterilen proteinlerden herhangi birindeki müteakbil mutasyonlar) değişikliğe uğratılabilir (yani ikame edilebilir) (Cas9 amino asit artıklarının korunumu hakkında daha fazla bilgi almak için bkz: **Şekil 3**, **Şekil 5**, **Şekil 11A** ve **Tablo 1**). Ayrıca, alanin ikameleri dışındaki mutasyonlar da uygundur.

Buluşun bazı yapılarında, yer-hedefli modifiye edici polipeptid bir heterolog sekans (örneğin bir füzyon) içerir. Buluşun bazı yapılarında, bir heterolog sekans, yer-hedefli modifiye edici polipeptid için hücre içi lokalizasyon sağlar (örneğin nükleusu hedef almayı sağlayan bir nükleer lokalizasyon sinyali (NLS); mitokondriyi hedef almayı sağlayan bir mitokondri lokalizasyon sinyali; bir kloroplastı hedef almayı sağlayan bir kloroplast lokalizasyon sinyali; bir ER retansiyon sinyali ve benzeri unsurlar). Buluşun bazı yapılarında, heterolog sekans, takibi veya saflaştırmayı kolaylaştırma amaçlı bir tag (örneğin bir floresan protein, örneğin yeşil floresan protein (GFP), YFP, RFP, CFP, mCherry, tdTomato ve benzeri; bir his tagı, örneğin bir 6XHis tagı; bir hemaglütinin (HA) tagı; bir FLAG tagı; bir Myc tagı ve benzeri) sağlayabilir. Buluşun bazı yapılarında, heterolog sekans, daha yüksek veya daha düşük bir stabilite sağlayabilir.

Buluşun bazı yapılarında, buluşa uygun bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid kodon-optimize edilir. Bu optimizasyon çeşidi sektörde bilinmektedir ve bir yabancı kaynaklı DNA'yı hedeflenen konakçı organizma veya hücrenin kodon tercihlerini taklit etmesini fakat aynı proteini kodlamaya devam etmesini sağlayacak bir mutasyona uğratmayı gerektir. Dolayısıyla kodonlar değiştirilir ancak kodlanan protein aynı kalır. Örneğin, eğer hedeflenen hedef hücre bir insan hücresi ise, bir insan kodon-optimize Cas9 (veya varyantı, örneğin enzimatik olarak inaktif varyantı) uygun bir yer-hedefli modifiye edici polipeptidi teşkil eder (bir örnek için bkz: SEKANS KOD NO.: 256). Uygun herhangi bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid (örneğin herhangi bir Cas9, örneğin SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346'da gösterilen sekanslardan herhangi biri) kodon-optimize edilebilir. Sınırlayıcı bir anlam taşımayan bir diğer örnek olarak, eğer hedeflenen konakçı hücre bir fare hücresi ise, bir fare kodon-optimize Cas9 (veya varyantı, örneğin enzimatik olarak inaktif varyantı) uygun bir yer-hedefli modifiye edici polipeptidi teşkil eder. Kodon optimizasyonunun yapılması şart olmamakla birlikte, kabul edilebilir bir uygulamadır ve hatta belirli durumlarda yapılması tercih edilebilir.

Buluşun bazı yapılarında, buluşa uygun bir DNA-hedefleyen RNA ile buluşa uygun bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid, bakteriyel hücrelerde gen ekspresyonunu durdurmayı sağlayan bir indüklenebilir sistem olarak kullanılırlar. Bazı durumlarda, uygun bir DNA-hedefleyen RNA ve/veya uygun bir yer-hedefli polipeptid kodlayan nükleik asitler bir hedef hücrenin kromozomuna sokulurlar ve bir indüklenebilir promotörün kontrolü altında işlev gösterirler. DNA-hedefleyen RNA ile yer-hedefli modifiye edici polipeptidin her ikisi de mevcut olup bir kompleks oluşturduklarında ve DNA-hedefleyen

RNA ve/veya yer-hedefli polipeptid indüklendiklerinde, hedef DNA ilgililenilen konum (örneğin ayrı bir plazmid üzerindeki bir hedef gen) üzerinden yarıdır (veya başka türlü bir modifikasyona uğrar). Buna göre, bazı durumlarda, bakteriyel ekspresyon suşları, bakteriyel genomda uygun bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid ve/veya bir plazmid üzerinde uygun bir DNA-hedefleyen RNA kodlayan nükleik asit sekansları (örneğin bir indüklenebilir promotörün kontrolü altında) ihtiva edecek ve hedeflenen herhangi bir genin (suşa sokulan ayrı bir plazmidden eksprese olan) ekspresyonunun DNA-hedefleyen RNA ve yer-hedefli polipeptidin ekspresyonu indüklenerek kontrol altında tutulabileceği deneyler gerçekleştirilmeye olanak sağlayacak şekilde tasarlanıp geliştirilirler.

Bazı durumlarda, hedef DNA'nın çift iplikçik kırıkları oluşturmaya dayalı yaklaşım dışındaki yollarla modifiye olmasını sağlayan bir enzimatik aktivitenin söz konusu olduğu yer-hedefli modifiye edici polipeptit bulunmaktadır. Hedef DNA'yı modifiye etmek (örneğin enzimatik aktivite sahibi bir heterolog polipeptidi bir yer-hedefli modifiye edici polipeptide füzyonlayıp bir kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptid oluşturmak suretiyle) için istifade edilebilecek enzimatik aktivite çeşitleri arasında, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, metiltransferaz aktivitesi, demetilaz aktivitesi, DNA onarımı aktivitesi, DNA hasarı aktivitesi, deaminasyon aktivitesi, dismutaz aktivitesi, alkilasyon aktivitesi, depürinasyon aktivitesi, oksidasyon aktivitesi, pirimidin dimeri oluşturma aktivitesi, integras aktivitesi, transpozaz aktivitesi, rekombinaz aktivitesi, polimeraz aktivitesi, ligaz aktivitesi, helikaz aktivitesi, fotoliaz aktivitesi ve glikozilaz aktivitesi sayılabilir. Metilasyon ve



demetilasyon sektöründe önemli bir epigenetik gen düzenleme şekli olarak tanınmakta olup, DNA hasarı ve onarımı aktivitesinin hücre sağ kalımı ve çevresel stres kaynaklarına cevaben doğru genom idamesinin sağlanması bakımından önemli oldukları bilinmektedir.

5

Bunun gibi buradaki yöntemler, hedef DNA'nın epigenetik modifikasyonunda kullanılırlar ve istenen tamamlayıcı nükleik asit sekansının DNA-hedefleyen RNA'nın DNA-hedefleyen segmentine genetik mühendisliğiyle dahil edilmesi yoluyla hedef DNA'nın

10 epigenetik modifikasyonunun hedef DNA'daki herhangi bir konum üzerinden kontrol altında tutulması amacıyla da kullanılabilirler.

Burada açıklanan yöntemler, hedef DNA içerisindeki istenen herhangi bir konum üzerinden DNA'da kasıtlı ve kontrollü bir hasar oluşturmak amacıyla da kullanılabilirler. Burada açıklanan yöntemler, hedef DNA

15 içerisindeki istenen herhangi bir konum üzerinden DNA'yı sekans-spesifik ve kontrollü bir şekilde onarmak amacıyla da kullanılabilirler. DNA-modifiye edici enzimatik aktiviteleri hedef DNA'daki spesifik konumlara yönlendirmeyi sağlayan yöntemler hem araştırma amaçlı uygulamalarda hem de klinik uygulamalarda kullanılabilirler.

20 Bazı durumlarda, yer-hedefli modifiye edici polipeptid, hedef DNA'nın transkripsiyonunu modüle eden bir aktiviteye sahiptir (örneğin bir kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptid veya benzeri bir unsur söz konusu ise). Bazı durumlarda, transkripsiyonu artırma veya azaltma kabiliyeti sergileyen bir heterolog polipeptidin

25 (örneğin transkripsiyonel aktivatör veya transkripsiyon baskılayıcı polipeptidler) bulunduğu bir kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptid kullanılarak, hedef DNA içerisinde DNA-hedefleyen RNA'nın DNA-hedefleyen segmentinin belirlediği spesifik bir konum

üzerinden hedef DNA'nın transkripsiyonu artırılır veya azaltılır. Transkripsiyon modüle edici aktiviteye sahip bir kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptid elde edilmesini sağlayabilecek kaynak polipeptid örnekleri arasında, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, 5 ışıkla indüklenebilir transkripsiyon düzenleyiciler, küçük molekül/ilaca duyarlı transkripsiyon düzenleyicileri, transkripsiyon faktörleri, transkripsiyon baskılayıcılar ve benzeri unsurlar sayılabilir. Bazı durumlarda, buluşa konu olan yöntem, bir hedeflenen kodlayıcı RNA'nın (protein-kodlayan gen) ve/veya bir hedeflenen kodlayıcı 10 olmayan RNA'nın (örneğin tRNA, rRNA, snoRNA, siRNA, miRNA, uzun ncRNA ve benzeri) ekspresyonunu kontrol altında tutmak amacıyla kullanılır.

Bazı durumlarda, yer-hedefli modifiye edici polipeptid, DNA ile 15 ilişkili bir polipeptidi (örneğin histon) modifiye eden bir enzimatik aktiviteye sahiptir. Bazı uygulamalarda, bu enzimatik aktivite; metiltransferaz aktivitesi, demetilaz aktivitesi, asetiltransferaz aktivitesi, deasetilaz aktivitesi, kinaz aktivitesi, fosfataz aktivitesi, ubikitin ligaz aktivitesi (yani ubikitinasyon aktivitesi), 20 deubikitinasyon aktivitesi, adenilasyon aktivitesi, deadenilasyon aktivitesi, SUMOilasyon aktivitesi, deSUMOilasyon aktivitesi, ribozilasyon aktivitesi, deribozilasyon aktivitesi, miristoilasyon aktivitesi, demiristoilasyon aktivitesi, glikozilasyon aktivitesi (örneğin O-GlcNac transferaz kaynaklı) ya da deglikozilasyon aktivitesidir. 25 Burada listelenen enzimatik aktiviteler, proteinlerdeki kovalent modifikasyonları katalize ederler. Bu gibi modifikasyonların hedef proteinin stabilite veya aktivitesini değiştirdikleri sektörde bilinmektedir (örneğin kinaz aktivitesinden dolayı meydana gelen

fosforilasyon, hedef proteinin ne olduğuna bağlı olarak protein aktivitesini stimüle edebilir veya susturabilir). Bilhassa ilgilenilen protein hedefleri histonlardır. Histon proteinlerinin DNA'ya bağlandıkları ve nükleozomlar adıyla bilinen kompleksler oluşturdukları sektörde bilinmektedir. Histonlar, çevre DNA dokusunda yapısal değişimlerin meydana gelmesini ve dolayısıyla DNA'nın potansiyel olarak büyük kısımlarının transkripsiyon faktörleri, polimerazlar ve benzeri etkileşimli faktörlere erişiminin kontrol altında tutulmasını sağlayacak şekilde modifiye edilebilirler (örneğin metilasyon, asetilasyon, ubikitinasyon, fosforilasyon yoluyla). Bir histon birçok farklı şekilde ve birçok farklı kombinasyon halinde modifiye edilebilir (örneğin, histon 3'teki lizin 27'nin, yani H3K27'nin trimetilasyonu baskılanmış transkripsiyonlu DNA bölgeleri ile ilişkiliyken, histon 3'teki lizin 4'ün, yani H3K4'ün trimetilasyonu aktif transkripsiyonlu DNA bölgeleri ile ilişkilidir). Dolayısıyla, histon-modifiye edici aktiviteye sahip olan bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid, DNA yapısının yer-spesifik şekilde kontrol altında tutulması amacıyla kullanılır ve hedef DNA'nın seçilen bir bölgesindeki histon modifikasyon paternini değiştirmek maksadıyla kullanılabilir. Bu gibi yöntemler hem araştırma amaçlı uygulamalarda hem de klinik uygulamalarda kullanılabilirler.

Buluşun bazı yapılarında, aynı hedef DNA veya farklı hedef DNA'lar üzerindeki farklı konumları eşzamanlı modifiye etmek için birden çok DNA-hedefleyen RNA eşzamanlı kullanılırlar. Buluşun bazı yapılarında, iki veya daha fazla sayıda DNA-hedefleyen RNA aynı gen veya transkript veya lokusu hedef gösterirler. Buluşun bazı yapılarında, iki veya daha fazla sayıda DNA-hedefleyen RNA

birbiriyle ilgisiz farklı lokusları hedef gösterirler. Buluşun bazı yapılarında, iki veya daha fazla sayıda DNA-hedefleyen RNA farklı fakat birbiriyle ilgili lokusları hedef gösterirler.

- 5 Bazı durumlarda, yer-hedefli modifiye edici polipeptid, doğrudan doğruya bir protein olarak temin edilir. Sınırlayıcı bir anlam taşımayan bir örnek vermek gerekirse, mantarlar (örneğin maya), sferoplast transformasyonu çerçevesinde eksojen protein ve/veya nükleik asit ile transforme edilebilirler (bkz:Kawai et al., Bioeng
- 10 Bugs. 2010 Nov-Dec;1(6):395-403: "Transformation of Saccharomyces cerevisiae and other fungi: methods and possible underlying mechanism"; Tanka et al., Nature. 2004 Mar 18;428(6980):323-8: "Conformational variations in an infectious protein determine prion strain differences"). Dolayısıyla, bir yer-
- 15 hedefli modifiye edici polipeptid (örneğin Cas9) bir sferoplasta sokulabilir (bir DNA-hedefleyen RNA kodlayan bir nükleik asitle birlikte veya böyle bir nükleik asit olmadan ve bir donör polinükleotidle birlikte veya böyle bir polinükleotid olmadan) ve daha sonra bu sferoplast ilgili içeriği bir maya hücresine dahil etmek
- 20 amacıyla kullanılabilir. Bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid bir hücreye uygun herhangi bir yöntemle sokulabilir (hücreye sunulabilir); bu yöntemler sektörde olağan bilgi ve beceri sahibi uzmanların bilgisi dahilindedirler. Sınırlayıcı bir anlam taşımayan başka bir örnek vermek gerekirse, bir yer-hedefli modifiye edici
- 25 polipeptid bir hücrenin, örneğin bir zebra balığı embriyosu hücresinin, bir döllenen fare oositinin pronükleusunun veya benzeri başka bir hücrenin içerisine doğrudan enjekte edilebilir (örneğin bir DNA-hedefleyen RNA kodlayan bir nükleik asitle birlikte veya böyle bir

nükleik asit olmadan ve bir donör polinükleotidle birlikte veya böyle bir polinükleotid olmadan).

### **İlgilenilen hedef hücreler**

5

Yukarıda bahsi geçen uygulamalardan bazılarında, buluşa konu olan yöntemler, in vivo ve/veya ex vivo ve/veya in vitro (örneğin bir kişiye geri yerleştirilebilecek olan genetiği değiştirilmiş hücreler üretmek için) ortamda bulunan mitotik veya post-mitotik hücrelerde DNA

10

yarılması, DNA modifikasyonu ve/veya transkripsiyonel modülasyon indüklemek amacıyla kullanılabilirler. DNA-hedefleyen RNA hedef DNA'ya hibridize olarak spesifisite sağladığı için, burada açıklanan yöntemlerde kullanılan ilgili mitotik ve/veya post-mitotik hücre,

15

herhangi bir organizmaya ait olan bir hücre olabilir (örneğin bir bakteri hücresi, bir arke hücresi, bir tekhücreli ökaryotik organizma hücresi, bir bitki hücresi, bir alg hücresi, örneğin *Botryococcus braunii*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Nannochloropsis gaditana*,

20

*Chlorella pyrenoidosa*, *Sargassum patens*, *C. Agardh* ve benzeri, bir mantar hücresi (örneğin bir maya hücresi), bir hayvan hücresi, bir omurgasız hayvan (örneğin meyve sineği, sölenler, ekinoderm, nematod ve benzeri) hücresi, bir omurgalı hayvan (örneğin balık, amfibi, sürüngen, kuş, memeli) hücresi, bir memeli hücresi, bir kemirgen hücresi, bir insan hücresi ve benzeri).

25

Herhangi bir hücre tipi (örneğin bir kök hücre, örneğin bir embriyonik kök (ES) hücre, bir indüklenmiş pluripotent kök (iPS) hücre, bir germ hücresi; insan germ hücreleri buluşa konu olan bileşimler bir parçasını teşkil etmezler; bir somatik hücre, örneğin bir fibroblast, bir

hematopoetik hücre, bir nöron, bir kas hücresi, bir kemik hücresi, bir hepatosit, bir pankreas hücresi; herhangi bir safhada bulunan, örneğin 1-hücreli, 2-hücreli, 4-hücreli, 8-hücreli veya benzeri bir safhada bulunan insan embriyosu olmayan bir embriyonun, örneğin bir zebra balığı embriyosu veya benzeri başka bir embriyonun insan embriyonik hücresi olmayan bir in vitro veya in vivo embriyonik hücresi) söz konusu olabilir. Hücreler yerleşik hücre hatlarından geliyor olabilecekleri gibi, primer hücreler de olabilirler; "primer hücreler", "primer hücre hatları" ve "primer kültürler" burada birbirlerine alternatif terimler olarak, bir denekten elde edilmiş olan ve in vitro ortamda sınırlı sayıda kültür pasajı, yani bölünme boyunca çoğalmalarına izin verilmiş olan hücreler ve hücre kültürlerine atıf yapmak için kullanılmaktadırlar. Primer kültürler, örneğin, 0 defa, 1 defa, 2 defa, 4 defa, 5 defa, 10 defa ya da 15 defa, fakat kriz safhasına girilmesine sebep olmayacak kadar alt-kültürlenmiş olan kültürlerdir. Buluşa konu olan primer hücre hatlarının in vitro ortamdaki pasaj sayısı normalde 10'un altında tutulur. Buluşun birçok yapısında hedef hücreler tekhücreli organizmaları teşkil ederler ya da kültürde çoğaltılırlar.

20

Eğer hücreler primer hücreler ise, bir kişiden uygun herhangi bir yöntemle hasat edilebilirler. Örneğin lökositler, aferez, lökositaferez, yoğunluk gradyanlı ayırma veya benzeri bir yöntemle rahatça hasat edilebilirken, cilt, kas, kemik iliği, dalak, karaciğer, pankreas, akciğer, bağırsak, mide ve benzeri dokuların hücrelerini hasat etmek için en uygun yöntem biyopsidir. Hasat edilen hücreler, uygun bir çözelti yardımıyla disperse veya süspanse edilebilirler. Bu çözelti, genelde, fetal buzağı serumu veya doğada kendiliğinden oluşan başka faktörler

25

ve genelde 5-25 mM arası olmak üzere düşük bir konsantrasyondaki kabul edilebilir bir tampon ile desteklenmiş bir dengeli tuz çözeltisi, örneğin normal salin, fosfat tamponlu salin (PBS), Hank dengeli tuz çözeltisi ya da benzeri başka bir çözelti olacaktır. Uygun tamponlar arasında, HEPES, fosfat tamponları, laktat tamponları ve benzeri tamponlar sayılabilir. Hücreler derhal kullanılacakları gibi, öncelikle uzun bir süre boyunca dondurularak saklanabilir ve kullanılacakları zaman çözülüp öyle kullanılabilirler. Bu gibi durumlarda, hücreler, %10 DMSO, %50 serum, %40 tamponlu vasatta ya da hücreleri dondurucu sıcaklıklar altında muhafaza etmek için sektörde yaygın olarak kullanılan bu gibi başka herhangi bir çözeltide dondurulacak ve kullanılacakları zaman, dondurulmuş kültürlenmiş hücreleri çözmek için sektörde yaygın olarak kullanılan bir metotla çözüleceklerdir.

15

**Buluşa uygun bir DNA-hedefleyen RNA ve/veya buluşa uygun bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid kodlayan nükleik asitler**

Buluşun bazı yapılarında, buluşa uygun bir yöntemde, bir DNA-hedefleyen RNA ve/veya bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid kodlayan nükleotid sekanslarının bulunduğu bir veya daha fazla sayıda nükleik asit bir hedef DNA ile temas ettirilir veya bir hücreye (ya da bir hücre popülasyonuna) sokulur. Bir DNA-hedefleyen RNA ve/veya bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid kodlayan nükleotid sekanslarının bulunduğu uygun nükleik asitler arasında, bir DNA-hedefleyen RNA ve/veya bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid kodlayan bir nükleotid sekansının yer aldığı bir "rekombinan ekspresyon vektörü"nü teşkil eden ekspresyon vektörleri bulunur.

25

Buluşun bazı yapılarında, rekombinan ekspresyon vektörü, bir viral yapıdır, örneğin bir rekombinan adeno-bağlantılı virüs yapısı (örneğin bkz: 7.078.387 sayılı ABD patenti), bir rekombinan adenoviral yapı, bir rekombinan lentiviral yapı ya da benzeri başka bir yapıdır.

5

Uygun ekspresyon vektörleri arasında, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, viral vektörler (örneğin vaksiniya virüsü; poliovirüs; adenovirüs (örneğin bkz: Li et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 35:2543 2549, 1994; Borrás et al., Gene Ther 6:515 524, 1999; Li and Davidson, PNAS 92:7700 7704, 1995; Sakamoto et al., Hum Gene Ther 5:1088 1097, 1999; WO 94/12649; WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 ve WO 95/00655); adeno-bağlantılı virüs (örneğin bkz: Ali et al., Hum Gene Ther 9:81 86, 1998; Flannery et al., PNAS 94:6916 6921, 1997; Bennett et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 38:2857 2863, 1997; Jomary et al., Gene Ther 4:683 690, 1997; Rolling et al., Hum Gene Ther 10:641 648, 1999; Ali et al., Hum Mol Genet 5:591 594, 1996; Srivastava in WO 93/09239; Samulski et al., J. Vir. (1989) 63:3822-3828; Mendelson et al., Virol. (1988) 166:154-165; Flotte et al., PNAS (1993) 90:10613-10617); SV40; herpes simpleks virüsü; insan immün yetmezlik virüsü (örneğin bkz: Miyoshi et al., PNAS 94:10319 23, 1997; Takahashi et al., J Virol 73:7812 7816, 1999); bir retroviral vektöre (örneğin murin lösemi virüsü; dalak nekroz virüsü; ve rous sarkoma virüsü, harvey sarkoma virüsü, avian lökoz virüsü, bir lentivirüs, insan immün yetmezlik virüsü, miyeloproliferatif sarkoma virüsü ve meme tümörü virüsünden elde edilen vektörler) dayanan viral vektörler) ve benzeri vektörler sayılabilir.

25



Sektörde bilgi ve beceri sahibi uzmanların bilgisi dahilinde olan pek çok uygun ekspresyon vektörü bulunmakta ve bunların birçoğu ticari piyasada yer almaktadır. Aşağıda sıralanan vektörler bunlara verilebilecek örneklerden bazılarıdır: ökaryotik konakçı hücreler için:

5 pXT1, pSG5 (Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG ve pSVLSV40 (Pharmacia). Bunların yanı sıra, konakçı hücre ile uyumlu ve geçimli olduğu sürece başka herhangi bir vektör de kullanılabilir.

Buluşun bazı yapılarında, bir DNA-hedefleyen RNA ve/veya bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid kodlayan bir nükleotid sekansı, bir kontrol elemanına, örneğin bir promotör gibi bir transkripsiyonel kontrol elemanına operabl bağlanır. Transkripsiyonel kontrol elemanı, bir ökaryotik hücrede, örneğin bir memeli hücresinde ya da bir prokaryotik hücrede (örneğin bir bakteri veya arke hücresi)

10 fonksiyonel olabilir. Buluşun bazı yapılarında, bir DNA-hedefleyen RNA ve/veya bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid kodlayan bir nükleotid sekansı, bir DNA-hedefleyen RNA ve/veya bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid kodlayan nükleotid sekansının hem prokaryotik hücrelerde hem de ökaryotik hücrelerde eksprese

15 olmasına olanak sağlayacak olan birden çok kontrol elemanına operabl bağlanır.

Kullanılan konakçı/vektör sistemine bağlı olarak, ekspresyon vektöründe aralarında konstitütif ve indüklenebilir promotörlerin,

25 transkripsiyon artırıcı elemanların, transkripsiyon terminatörlerinin ve benzeri unsurların da bulunduğu pek çok uygun transkripsiyon ve translasyon kontrol elemanından herhangi biri (örneğin U6 promotörü,

H1 promotörü ve benzeri; yukarıya bakınız) kullanılabilir (örneğin bkz: Bitter et al. (1987) *Methods in Enzymology*, 153:516-544).

Buluşun bazı yapılarında, bir DNA-hedefleyen RNA ve/veya bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid, bir RNA olarak temin edilebilir. Bu gibi durumlarda, DNA-hedefleyen RNA ve/veya yer-hedefli modifiye edici polipeptidi kodlayan RNA, direkt kimyasal sentez yoluyla üretilebilir ya da DNA-hedefleyen RNA'yı kodlayan bir DNA'dan in vitro ortamda transkribe edilebilir. Bir DNA şablonundan RNA sentezlemeyi sağlayan yöntemler sektörde iyi bilinmektedirler. Bazı durumlarda, DNA-hedefleyen RNA ve/veya yer-hedefli modifiye edici polipeptidi kodlayan RNA, bir RNA polimeraz enzimi (örneğin T7 polimeraz, T3 polimeraz, SP6 polimeraz ve benzeri) kullanılarak in vitro ortamda sentezlenecektir. RNA sentezlendiğinde bir hedef DNA ile direkt temas edebilir ya da nükleik asitleri hücrelere sokmayı sağlayan sektörde iyi bilinen tekniklerden (örneğin mikroenjeksiyon, elektroporasyon, transfeksiyon ve benzeri) herhangi biri kullanılarak bir hücreye yerleştirilebilir.

Bir DNA-hedefleyen RNA (DNA veya RNA olarak dahil edilir) ve/veya bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid (DNA veya RNA olarak dahil edilir) ve/veya bir donör polinükleotid kodlayan nükleotidler, hücrelere iyi bilinen yerleşik transfeksiyon teknikleri (örneğin bkz: Angel and Yanik (2010) *PLoS ONE* 5(7):e11756), Qiagen mamulü ticari piyasada mevcut bulunan Transmessenger® reaktifleri, Stemgent mamulü Stemfect™ RNA Transfeksiyon kiti ve Mirus Bio LLC mamulü TransIT®-mRNA Transfeksiyon Kiti kullanılarak dahil edilebilirler (ayrıca bkz: Beumer et al. (2008),

Efficient gene targeting in *Drosophila* by direct embryo injection with zinc-finger nucleases, PNAS 105(50):19821-19826). Alternatif olarak, bir DNA-hedefleyen RNA ve/veya bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid ve/veya bir kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptid ve/veya bir donör polinükleotid kodlayan nükleik asitler, DNA vektörleri ile birlikte kullanılabilirler. Nükleik asitlerin hedef hücrelerin içerisine aktarımında kullanılacak birçok vektör, örneğin plazmidler, kozmidler, mini-daireler, fajlar, virüsler ve benzeri unsurlar vardır. Nükleik asit(ler)i ihtiva eden vektörler, epizomda örneğin plazmidler, mini-daire DNA'ları veyahut sitomegalovirüs veya adenovirüs gibi virüsler ya da benzeri başka unsurlar olarak muhafaza edilebilirler ya da örneğin retrovirüs-menşeli MMLV, HIV-1, ALV ve benzeri vektörler için geçerli olduğu gibi homolog rekombinasyon veya rastgele entegrasyon aracılığıyla hedef hücre genomuna entegre edilebilirler.

Vektörler hücrelere doğrudan aktarılabilirler. Başka bir deyişle, hücreler, DNA-hedefleyen RNA ve/veya bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid ve/veya bir kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptid ve/veya bir donör polinükleotid kodlayan nükleik asidin yer aldığı vektörler ile temas ettirilerek bu vektörlerin hücrenin içerisine alınmaları sağlanır. Plazmidleri teşkil eden nükleik asit vektörlerini hücreler ile temas ettirmeyi sağlayan, aralarında elektroporasyon, kalsiyum klorür transfeksiyonu, mikroenjeksiyon ve lipofeksiyonun bulunduğu yöntemler sektörde iyi bilinmektedirler. Viral vektör uygulamasında, hücreler, bir DNA-hedefleyen RNA ve/veya bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid ve/veya bir kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptid ve/veya bir donör polinükleotid kodlayan

nükleik asidin yer aldığı viral partiküller ile temas ettirilirlen. Buluşa konu olan yöntemde kullanıma bilhassa uygun olanlar retrovirüsler, örneğin lentivirüslerdir. Yaygın olarak kullanılan retroviral vektörler "defektif"tir, yani verimli bir enfeksiyon için gerekli viral proteinleri üretme kabiliyetleri yoktur. Daha ziyade, vektörün replike olabilmesi için bir paketleme hücre hattında çoğaltma yapılması gerekir. İlgili nükleik asitleri içeren viral partiküller oluşturmak için, nükleik asidi ihtiva eden retroviral nükleik asitler bir paketleme hücre hattıyla viral kapsidler içerisinde paketlenirlen. Farklı paketleme hücre hatları, kapsidin bünyesine katılacak farklı zarf proteinleri (ekotropik, amfotropik veya ksenotropik) sağlarlar; zarf proteini tipi, viral partikülün hücrelere yönelik spesifisitesini belirler (murin ve sıçanlar için ekotropik; insanlar, köpekler ve farelerin de dahil olduğu birçok memeli hücre tipi için amfotropik ve murin hücreleri hariç birçok memeli hücre tipi için ksenotropik). Hücrelerin paketlenen viral partiküller tarafından hedef alınmasını sağlama almak adına, uygun paketleme hücre hattının kullanılmasına dikkat edilebilir. Tekrar programlama faktörlerini kodlayan nükleik asidin bulunduğu retroviral vektörleri paketleme hücre hatlarının içerisinde yerleştirmeyi ve paketleme hatları ile oluşturulan viral partikülleri toplamayı sağlayan yöntemler sektörde iyi bilinmektedirler. Nükleik asitler, direkt mikroenjeksiyon (örneğin RNA'nın bir zebra balığı embriyosuna enjeksiyonu) yoluyla da sokulabilirler.

25 DNA-hedefleyen RNA ve/veya bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid ve/veya bir kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptid ve/veya bir donör polinükleotid kodlayan nükleik asitleri buluşa uygun hücrelere aktarmak için kullanılan vektörler, normalde, ilgili

nükleik asidin ekspresyonunu, yani transkripsiyonel aktivasyonunu yönlendiren uygun promotörler ihtiva edeceklerdir. Başka bir deyişle, ilgili nükleik asit bir promotöre operabl bağlı olacaktır. Bu promotörler, ubikitöz etki gösteren promotörler, örneğin CMV- $\beta$ -aktin promotörü veya indüklenebilir promotörler, örneğin belirli hücre popülasyonlarında aktif olan ya da tetrasiklin gibi ilaçların varlığına karşı cevap veren promotörler olabilirler. Transkripsiyonel aktivasyon ile, transkripsiyonun hedef hücredeki taban seviyenin en az yaklaşık 10 katına, en az yaklaşık 100 katına ve daha genel olarak en az yaklaşık 1000 katına yükseltilmesi hedeflenir. Bunların yanı sıra, ilgili hücrelere bir DNA-hedefleyen RNA ve/veya bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid ve/veya bir kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptid ve/veya bir donör polipeptid aktarmak için kullanılan vektörlerde, DNA-hedefleyen RNA'yı ve/veya bir yer-hedefli modifiye edici polipeptidi ve/veya bir kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptidi ve/veya bir donör polinükleotidi içerisine alan hücreleri daha sonradan belirleyip ayırt edebilmek için hedef hücrelerde seçilebilir markerler kodlayan nükleik asit sekansları da bulundurulabilir.

20

Buluşa uygun bir DNA-hedefleyen RNA ve/veya bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid ve/veya bir kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptid DNA ile temas ettirilerek de kullanılabilir ya da hücrelere RNA olarak sokulabilir. RNA'yı hücrelere sokmayı sağlayan yöntemler sektörde bilinmekte olup, bunlar arasında örneğin direkt enjeksiyon, transfeksiyon ve DNA sokmak için kullanılan diğer herhangi bir yöntem sayılabilir.

25

Buluşa uygun bir yer hedefli modifiye edici polipeptid hücrelere bir polipeptid olarak da aktarılabilir. Bu gibi bir polipeptid, ürünün çözünürlüğünü artırmak adına isteğe bağlı olarak bir polipeptid domainine füzyonlanabilir. Bu domain, TEV proteazın yaracağı bir tanımlı proteaz yarma yeri, örneğin bir TEV sekansı aracılığıyla polipeptide bağlanabilir. Bağlayıcı bünyesinde, bir veya daha fazla sayıda esnek sekans, örneğin 1 ilâ 10 adet glisin artığı da bulunabilir. Buluşun bazı yapılarında, füzyon proteini, ürünün çözünürlüğü muhafaza eden bir tamponda, örneğin 0,5 ilâ 2 mM üre eşliğinde, çözünürlüğü artıran polipeptidler ve/veya polinükleotidler eşliğinde veya benzeri unsurlar eşliğinde yarıdır. İlgili domainler arasında, endozomolitik domainler, örneğin influenza HA domaini ve üretime yardımcı olan diğer polipeptidler, örneğin IF2 domaini, GST domaini, GRPE domaini ve benzeri domainler bulunur. Polipeptid, stabilizeyi yükseltecek şekilde formüle edilebilir. Örneğin, peptidler PEG ile edilebilirler ve polietilenoksi grubu kan dolaşımında geçirilen sürenin daha uzun olmasını sağlar.

Ek veya alternatif olarak, buluşa uygun yer-hedefli modifiye edici polipeptid, hücre içerisine alma önayak olacak olan bir polipeptid geçirgen domaine füzyonlanabilir. Sektörde bilinen bir dizi geçirgen domain bulunmakta olup, bunlar buluşa konu olan entegre olmayan polipeptidlerde kullanılabilirler ve bunlara örnek olarak peptidler, peptidomimetikler ve peptid olmayan taşıyıcılar gösterilebilir. Bir geçirgen peptid, örneğin, RQIKIWFQNRRMKWKK (SEKANS KOD NO.: //) amino asit sekansını ihtiva eden ve penetratin olarak anılan *Drosophila melanogaster* transkripsiyon faktörü Antennapedia'nın üçüncü alfa helisinden elde edilebilir. Bir diğer örnek olarak, geçirgen

peptid, doğada kendiliğinden oluşan tat proteininin örneğın 49-57 numaralı amino asitlerini bünyesinde barındırıyor olabilecek olan HIV-1 tat bazık bölge amino asit sekansını ihtiva eder. Diğer geçirgen domainler arasında, poliarjının motifleri, örneğın HIV-1 rev

5 proteininin 34-56 numaralı amino asitlerinden oluşan bölge, nona-arjının, okta-arjının ve benzerleri bulunur (örneğın bkz:Futaki et al. (2003) Curr Protein Pept Sci. 2003 Apr; 4(2): 87-9 and 446;Wender et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 2000 Nov. 21; 97(24):13003-8; 20030220334, 20030083256, 20030032593 ve 20030022831 sayılı

10 yayımlanmış ABD patent başvuruları). Nona-arjının (R9) sekansı, karakterize edilmiş olan en etkili PTD'lerden biridir (Wender et al. 2000; Uemura et al. 2002). Füzyonun yapılacağı yer, polipeptidin biyolojik aktivite, sekresyon veya bağlanma karakteristiklerinin optimize edilmesi dikkate alınarak seçilebilir. Optimum yer, rutin

15 deney ve denemelerle belirlenecektir.

Buluşa uygun bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid, in vitro ortamda ya da ökaryotik hücrelerle veya prokaryotik hücrelerle üretilebilir ve üretildikten sonra katı açılarak, örneğın ısıyla denatüre

20 edilerek, DTT ile indirgenerek ya da benzeri bir yolla daha da işlenebilir ve akabinde sektörde bilinen yöntemler kullanılarak tekrar katlanabilir.

Primer sekansta değışikliğe sebep olmayan ilgili modifikasyonlar

25 arasında, polipeptidlerin derivatizasyonu, örneğın asilasyon, asetilasyon, karboksilasyon, amidasyon ve benzeri modifikasyonlar bulunur. Glikozilasyon modifikasyonları, örneğın bir polipeptidin sentezi ve işlenmesi esnasında ya da müteakip işlenme basamakları

esnasında glikozilasyon paternlerinin değiştirilmesine dayanan ve örneğin polipeptidin glikozilasyonu etkileyen enzimlere, örneğin memeli glikozilasyon veya deglikozilasyon enzimlerine maruz bırakılması yoluyla gerçekleştirilen modifikasyonlar da ilgilenilen 5 modifikasyonlara dahildir. Fosforlanmış amino asit artıkları, örneğin fosfotirozin, fosfoserin veya fosfotreonin barındıran sekanslar da bu ilgilidir.

Proteolitik degradasyona karşı dirençlerinin artırılması, hedef sekans 10 spesifitesinin değiştirilmesi, çözünürlük özelliklerinin optimize edilmesi, protein aktivitesinin (örneğin transkripsiyon modüle edici aktivite, enzimatik aktivite ve benzeri) değiştirilmesi ya da bir terapötik ajan olarak daha uygun hale gelmelerini sağlanması amacıyla standart moleküler biyolojik teknikler ve sentetik kimya 15 metotları kullanılarak modifiye edilmiş olan DNA-hedefleyen RNA'lar ve yer-hedefli modifiye edici polipeptidler de bu buluşun kapsamına girmektedirler. Bu gibi polipeptidlerin analogları arasında, doğada kendiliğinden oluşan L-amino asitler dışındaki artıkları, örneğin D-amino asitler ya da doğada kendiliğinden oluşmayan 20 sentetik amino asitler ihtiva eden peptidler bulunur. Amino asit artıklarının hepsi veya bir kısmının yerine D-amino asitler ikame edilebilir.

Yer-hedefli modifiye edici polipeptidler, sektörde bilinen 25 konvansiyonel yöntemlerle in vitro ortamda sentezlenerek hazırlanabilirler. Applied Biosystems, Inc., Beckman mamulü otomatik sentezleyiciler ve benzeri aparatların örnek gösterilebileceği çeşitli ticari sentez aparatları mevcuttur. Sentezleyiciler kullanılarak,



doğada kendiliğinden oluşan amino asitlerin yerine doğal olmayan amino asitler ikame edilebilir. Sekans ve hazırlama şekli, uygunluğa, maliyete, gerekli saflık düzeyine ve benzeri faktörlere göre belirlenecektir.

5

Peptidin sentezi esnasında veya ekspresyonu sırasında, peptidin içerisine başka moleküllere veya bir yüzeyin üzerine bağlanmasına olanak sağlayacak çeşitli gruplar sokulabilir. Bu bağlamda, tioeterler yapmak için sisteinler, bir metal iyonu kompleksine bağlanıma olanak sağlamak için histidinler, amidler veya esterler oluşturmak için karboksil grupları, amidler oluşturmak için amino grupları ve benzeri amaçlarla benzeri unsurlar kullanılabilir.

10

Yer-hedefli modifiye edici polipeptidleri konvansiyonel rekombinan sentez yöntemlerine göre izole etmek ve saflaştırmak da mümkündür. Ekspresyon konakçısının bir lizati hazırlanabilir ve bu lizat, HPLC, dışlama kromatografisi, jel elektroforezi, afinite kromatografisi ya da başka bir saflaştırma tekniğiyle saflaştırılabilir. Kullanılan bileşimler, ürünün hazırlanma yöntemiyle ve saflaştırılmasıyla bağlantılı kontaminantlar karşısında, istenen ürünü çoğunluklu ağırlık bakımından en az %20 oranında, daha genel olarak en az yaklaşık %75 oranında, tercihen en az yaklaşık %95 oranında ve terapötik amaçlı bir üretim söz konusu ise genelde en az yaklaşık %99,5 oranında ihtiva edeceklerdir. Yüzdeler genelde toplam protein içerine dayanacaktır.

20

25

DNA-hedefleyen RNA ve/veya yer-hedefli modifiye edici polipeptid ve/veya donör polinükleotid, ister nükleik asit ister polipeptid halinde

sokulacak olsunlar, DNA yarılmaması ve rekombinasyonunu ya da bir hedef DNA'da istenen herhangi bir modifikasyonu ya da hedef DNA ile ilişkili bir polipeptidde istenen herhangi bir modifikasyonu indüklemek amacıyla hücrelere yaklaşık olarak her gün ilâ yaklaşık olarak her 4 günde bir, örneğin yaklaşık 1,5 günde bir, yaklaşık 2 günde bir, yaklaşık 3 günde 1 ya da yaklaşık olarak her gün ile yaklaşık olarak dört günde bir arası başka herhangi bir sıklıkta tekrar edilebilecek olan yaklaşık 30 dakika ilâ yaklaşık 24 saatlik, örneğin 1 saatlik, 1,5 saatlik, 2 saatlik, 2,5 saatlik, 3 saatlik, 3,5 saatlik, 4 saatlik, 5 saatlik, 6 saatlik, 7 saatlik, 8 saatlik, 12 saatlik, 16 saatlik, 18 saatlik, 20 saatlik ya da yaklaşık 30 dakika ile yaklaşık 24 saat arası başka herhangi bir uzunluktaki bir periyot boyunca verilirler. Ajan(lar), ilgili hücrelere, bir ilâ birçok defa, örneğin bir defa, iki defa, üç defa ya da üçten fazla defa verilebilirler ve hücreler, her temas olayını takip eden belirli bir süre boyunca, örneğin 16-24 saat boyunca ajan(lar) ile birlikte inkübe edilirler ve bu sürenin sonunda vasat taze vasatla değiştirilip hücreler kültürlenmeye devam edilir.

Hücreye iki veya daha fazla sayıda farklı hedefleme kompleksinin (örneğin aynı veya farklı hedef DNA'lar içerisindeki farklı sekansları tamamlayıcı nitelikte olan iki farklı DNA-hedefleyen RNA) verileceği durumlarda, bu kompleksler eşzamanlı olarak temin edilebilirler (örneğin iki polipeptid ve/veya nükleik asit olarak) ya da eşzamanlı olarak uygulanabilirler. Alternatif olarak, sırayla temin edilebilirler, örneğin önce hedefleme kompleksi verilip ardından ikinci hedefleme kompleksi verilebilir ya da tam tersi bir düzende uygulama yapılabilir.

DNA-hedefleyen RNA ve/veya yer-hedefli modifiye edici polipeptid ve/veya donör polinükleotid hedef DNA'ya veya hücrelere normalde yarılmanın indükte olmasını sağlayacak kadar etkili bir miktarda uygulanır. DNA-hedefleyen RNA ve/veya yer-hedefli modifiye edici polipeptid ve/veya donör polinükleotidin etkili miktarı, iki homolog sekans arasında gözlemlenen hedef modifikasyon miktarının bir negatif kontrol ile, örneğin boş bir vektörle veya ilgisiz bir polipeptidle temas ettirilen bir hücre ile kaydedilen değere kıyasla 2 kat veya daha fazla yüksek olmasını sağlayacak olan miktardır. Bu da demek oluyor ki, DNA-hedefleyen RNA ve/veya yer-hedefli modifiye edici polipeptid ve/veya donör polinükleotidin etkili miktarı veya dozu, bir hedef DNA bölgesinde gözlemlenen hedef modifikasyon miktarında 2 katlık bir artış, 3 katlık bir artış, 4 katlık bir artış veya daha yüksek bir artış, bazı durumlarda 5 katlık bir artış, 6 katlık bir artış veya daha yüksek bir artış, bazen 7 katlık bir artış veya 8 katlık bir artış ya da daha yüksek bir artış, örneğin 10 katlık bir artış, 50 katlık bir artış veya 100 katlık bir artış ya da daha yüksek bir artış, bazı durumlarda 200 katlık bir artış, 500 katlık bir artış, 700 katlık bir artış veya 1000 katlık bir artış ya da daha yüksek bir artış, örneğin 5000 katlık bir artış veya 10.000 katlık bir artış indükleyecektir. Hedef modifikasyonun miktarı uygun herhangi bir yöntemle ölçülebilir. Örneğin, DNA-hedefleyen RNA'nın yanında tekrar sekansları bulunan ve rekombine edildiğinde bir aktif raportörü kodlayan bir nükleik asidi yeniden oluşturacak olan hedefleme segmentini (hedefleme sekansı) tamamlayıcı nitelikteki bir sekansın bulunduğu bir sessiz raportör yapısı hücrelere eşzamanlı transfekte edilir ve DNA-hedefleyen RNA ve/veya yer-hedefli modifiye edici polipeptid ve/veya donör polinükleotid ile temas sağlandıktan sonra, örneğin DNA-hedefleyen

RNA ve/veya yer-hedefli modifiye edici polipeptid ve/veya donör polinükleotid ile temas sağlandıktan 2 saat, 4 saat, 8 saat, 12 saat, 24 saat, 36 saat, 48 saat, 72 saat veya daha uzun bir süre sonra raportör protein miktarı değerlendirilir. Daha hassas başka bir analizde ise, hedef DNA sekanslarını içeren ilgili genomik DNA bölgesindeki rekombinasyonun düzeyi, bir DNA-hedefleyen RNA ve/veya yer-hedefli modifiye edici polipeptid ve/veya donör polinükleotid ile temas sağlandıktan sonra, örneğin bir DNA-hedefleyen RNA ve/veya yer-hedefli modifiye edici polipeptid ve/veya donör polinükleotid ile temas sağlandıktan 2 saat, 4 saat, 8 saat, 12 saat, 24 saat, 36 saat, 48 saat, 72 saat ya da daha uzun bir süre sonra bölgede PCR veya Southern hibridizasyonu yapılarak değerlendirilir.

Hücreler ile bir DNA-hedefleyen RNA ve/veya yer-hedefli modifiye edici polipeptid ve/veya donör polinükleotid arasındaki temas, uygun herhangi bir vasatta ve hücrelerin sağ kalımını destekleyen uygun herhangi bir kültür koşulu altında sağlanabilir. Örneğin, hücreler, kullanımı elverişli ve rahat uygun herhangi bir besin vasatında, örneğin fetal buzağı serumu veya ısıyla inaktive edilmiş keçi serumu (yaklaşık %5-10), L-glutamin, bir tiol, özellikle de 2-merkaptoetanol ve penisilin ve streptomisin gibi antibiyotikler ile desteklenmiş Iscove modifiye DMEM veya RPMI 1640'da süspanse edilebilirler. Kültürde, hücrelerin cevap verebileceği büyüme faktörleri bulunabilir. Burada tanımlandığı anlamıyla büyüme faktörleri, ister kültür içerisinde ister intakt dokuda bulunuyor olsunlar hücrelerin sağ kalımını, çoğalmalarını ve/veya farklılaşmasını bir transmembran reseptör üzerinde sergiledikleri spesifik etkiler aracılığıyla destekleme ve artırma kabiliyetine sahip olan moleküllerdir. Büyüme faktörleri arasında,

polipeptidler ve polipeptid olmayan faktörler bulunur. Hücrelerin sağ kalımını destekleyip artıran koşullar, normalde homolog olmayan uç birleştirmeye ve homoloji-yönlendirmeli onarıma izin veren koşullardır.

5

Bir hedef DNA sekansına bir polinükleotid sekansının sokulmasının istendiği uygulamalarda, sokulması hedeflenen bir donör sekansın bulunduğu bir polinükleotid de hücreye uygulanır. "Donör sekans" ya da "donör polinükleotid" terimi ile, bir yer-hedefli modifiye edici polipeptidin indüklediği yarıma yerine sokulacak olan bir nükleik asit sekansına atıf yapılmaktadır. Donör polinükleotid, kendisi ve homolog olduğu bir genomik sekans arasındaki homoloji-yönlendirmeli onarımı destekleyecek bir özellik olarak, yarıma yerindeki genomik sekans ile yeterli düzeyde homolojiye sahip olacaktır, örneğin yarıma yerinin yanlarındaki, örneğin yarıma yerinden itibaren yaklaşık 50 baz veya daha kısa bir mesafe içerisindeki, örneğin yaklaşık 30 baz, yaklaşık 15 baz, yaklaşık 10 baz, yaklaşık 5 baz içerisindeki ya da yarıma yerinin hemen yanlarındaki nükleotid sekansları ile %70, %80, %85, %90, %95 veya %100 oranında homoloji sergileyecektir. Bir donör sekans ile bir genomik sekans arasında yaklaşık 25, 50, 100 veya 200 nükleotidi veya 200'den fazla sayıda 200 nükleotidi (ya da 10 ve 200 veya daha yüksek bir değer arasındaki herhangi bir sayıda) kapsayan bir sekans homolojisinin söz konusu olması homoloji-yönlendirmeli onarımı destekleyecektir. Donör sekanslar herhangi bir uzunlukta olabilirler, örneğin 10 veya daha fazla sayıda nükleotidden, 50 veya daha fazla sayıda nükleotidden, 100 veya daha fazla sayıda nükleotidden, 250 veya daha fazla sayıda nükleotidden, 500 veya daha fazla sayıda nükleotidden, 1000 veya daha fazla sayıda nükleotidden,

25

5000 veya daha fazla sayıda nükleotidden veya benzeri bir sayıda nükleotidden oluşabilirler.

Donör sekans, normalde yerine geçtiği genomik sekans ile özdeş  
 5 olmaz. Donör sekansta, daha ziyade, genomik sekansa kıyasla, homoloji-yönlendirmeli onarımı destekleyecek kadar yeterli homolojinin söz konusu olmasına zeval getirmeyecek ölçüde en az bir veya daha fazla sayıda tekil baz değişikliği, insersiyonu, delesyonu, inversiyonu veya yeniden düzenlemesi bulunabilir. Buluşun bazı  
 10 yapılarında, donör sekans, yanlarında iki homoloji bölgesi bulunan bir homolog olmayan sekans ihtiva eder, öyle ki hedef DNA bölgesi ile iki yan komşu sekans arasındaki homoloji-yönlendirmeli onarım homolog olmayan sekansın hedef bölgeye aktarılması ile sonuçlanır. Donör sekanslar, ilgili DNA bölgesine homolog olmayan ve ilgili  
 15 DNA bölgesine sokulması hedeflenmeyen sekansların yer aldığı bir vektör omurgası da ihtiva edebilirler. Bir donör sekansın homolog bölge(ler)i genelde rekombinasyonun yapılmasının istendiği bir genomik sekans ile en az %50 oranında sekans özdeşliğine sahip olacaktır. Buluşun belirli yapılarında, %60, %70, %80, %90, %95,  
 20 %98, %99 veya %99,9 oranında sekans özdeşliği vardır. Donör polinükleotidin uzunluğuna bağlı olarak, %1 ile %100 arası herhangi bir oranda sekans özdeşliği söz konusu olabilir.

Donör sekans, donör sekansın yarıma yerine başarılı bir şekilde  
 25 sokulup sokulamadığını değerlendirmek amacıyla kullanılabilir olan veya bazı durumlarda başka amaçlarla (örneğin hedef alınan genomik lokustaki ekspresyona işaret etmek amacıyla) da kullanılabilir olan, genomik sekansa kıyasla belirli sekans

farklılıkları, örneğin restriksiyon yerleri, nükleotid polimorfizmleri, seçilebilir markerler (örneğin ilaç direnç genleri, floresan proteinler, enzimler ve benzeri unsurlar) ya da benzeri başka unsurlar ihtiva edebilir. Bazı durumlarda, bu gibi nükleotid sekansı farklılıkları eğer  
 5 bir kodlayan bölge bünyesinde bulunuyorlarsa amino asit sekansını değiştirmeyecekler ya da yalnızca sessiz amino asit değişikliklerine (yani, proteinin yapısı veya fonksiyonunu etkilemeyen değişiklikler) yol açacaklardır. Alternatif olarak, bu sekans farklılıkları, marker sekansının çıkartılması maksadıyla daha sonradan aktive edilebilecek  
 10 olan, FLP'ler, loxP sekansları veya benzeri başka komşu rekombinasyon sekansları ile de ilgili olabilirler.

Donör sekans hücreye tek iplikçikli DNA, tek iplikçikli RNA, çift iplikçikli DNA ya da çift iplikçikli RNA olarak uygulanabilir. bir  
 15 hücreye lineer veya dairesel formda dahil edilebilir. Eğer lineer formda dahil edilecekse, donör sekansın uçları sektörde bilgi ve beceri sahibi uzmanlarca bilinen yöntemlerle (örneğin eksonükleolitik degradasyondan) korunabilir. Örneğin, bir lineer molekülün 3' terminal ucuna bir veya daha fazla sayıda dideoksinükleotid artığı  
 20 eklenir ve/veya kendi kendilerini tamamlayıcı oligonükleotidler uçlardan birine veya her ikisine de ligate edilirler. Örneğin bkz: Chang et al. (1987) Proc. Natl. Acad Sci USA 84:4959-4963; Nehls et al. (1996) Science 272:886-889. Eksojen polinükleotidleri degradasyona karşı korumayı sağlayan ek yöntemler arasında, sadece bunlarla sınırlı  
 25 kalmaksızın, terminal amino grup(lar)ının eklenmesine ve modifiye internükleotid bağlarının, örneğin fosforotioatlar, fosforamidatlar ve O-metil riboz veya deoksiriboz artıklarının kullanılmasına dayanan yöntemler sayılabilir. Bir lineer donör sekansın terminal uçlarının

korunmasına alternatif olarak, homoloji bölgelerinin dışına, rekombinasyonda bir değişikliğe yol açılmaksızın bozunabilecek olan ek sekans kesitleri ilave edilebilir. Bir donör sekans bir hücreye ek sekanslar barındıran, örneğin replikasyon kaynakları, promotörler ve antibiyotik direnci kodlayan genler barındıran bir vektör molekülünün bir parçası olarak sokulabilir. Ayrıca, donör sekanslar, bir DNA-hedefleyen RNA ve/veya yer-hedefli modifiye edici polipeptid ve/veya donör polinükleotid kodlayan nükleik asitlere istinaden yukarıda tarif edildiği gibi virüslerle (örneğin adenovirüs, AAV) birlikte aktarılabilirler ya da bir çıplak nükleik asit olarak veya bir lipozom veya poloksamer gibi bir ajanla kompleks halindeki bir nükleik asit olarak sokulabilirler.

Yukarıda açıklanan yöntemler takip edilerek, ilgilenilen bir DNA bölgesi *ex vivo* ortamda yarılabılır ve modifiye edilebilir, yani "genetiği değiştirilebilir". İlgili DNA bölgesine bir seçilebilir markerin sokulduğu bazı buluş yapılarında, hücre popülasyonunda bulunan genetiği değiştirilmiş hücreler diğer hücrelerden ayrılarak hücre popülasyonu genetik modifikasyon barındıran hücreler bakımından zenginleştirilebilir. "Genetiği değiştirilmiş" hücreler, zenginleştirme yapılmadan önce, hücre popülasyonunun yalnızca %1'ini veya daha fazlasını (örneğin %2 veya daha fazla, %3 veya daha fazla, %4 veya daha fazla, %5 veya daha fazla, %6 veya daha fazla, %7 veya daha fazla, %8 veya daha fazla, %9 veya daha fazla, %10 veya daha fazla, %15 veya daha fazla ya da %20 veya daha fazla) oluşturuyor olabilirler. "Genetiği değiştirilmiş" hücreleri diğer hücrelerden ayırmak için, kullanılan seçilebilir marker için uygun herhangi bir ayırma tekniğine başvurulabilir. Örneğin eğer bir floresan marker



sokulmuş ise, hücreler floresans-aktive hücre ayıklama yöntemi ile ayrılabilirler; bir hücre yüzeyi markeri sokulmuş ise, hücreler heterojen popülasyondan afinite ayırma teknikleri, örneğin manyetik ayırma, afinite kromatografisi, bir katı matrise bağlı bir afinite reaktifi ile "panning" ya da başka uygun bir teknik kullanılarak ayrılabilirler. Doğru ve düzgün ayıklama sağlayan teknikler arasında, kapsamlılıkları ve çok yönlülükleri farklı derecelerde olan, örneğin birden çok renk kanalına, dar açı ve geniş açı saçılma tespit kanallarına, empedans kanallarına ve benzeri unsurlara sahip olan floresans-aktive hücre ayıklayıcılar bulunur. Hücreler, ölü hücrelerle ilişkili boyalar (örneğin propidyum iyodür) kullanılarak ölü hücrelere karşı seçilebilirler. Genetiği değiştirilmiş hücrelerin viyabilitesine gereksiz ölçüde zarar vermeyen herhangi bir teknikten istifade edilebilir. Modifiye edilmiş DNA içeren hücreler bakımından yüksek düzeyde zengin olan hücre bileşimlerine bu şekilde ulaşılır. "Yüksek düzeyde zengin" tabiriyle kast edilen, genetiği değiştirilmiş hücrelerin hücre bileşiminin %70'ini veya daha fazlasını, %75'ini veya daha fazlasını, %80'ini veya daha fazlasını, %85'ini veya daha fazlasını ya da %90'ını veya daha fazlasını, örneğin hücre bileşiminin yaklaşık %95'ini veya daha fazlasını ya da %98'ini veya daha fazlasını oluşturduğudur. Başka bir deyişle, bileşim, genetiği değiştirilmiş hücrelerden oluşan büyük ölçüde saf bir bileşim olabilir.

Burada açıklanan yöntemlerle üretilen genetiği değiştirilmiş hücreler hazırlandıktan hemen sonra kullanılabilirler. Alternatif olarak, hücreler hazırlandıktan sonra sıvı nitrojen sıcaklıklarında dondurulup uzun periyotlar boyunca saklanabilir ve kullanılacakları zaman çözülüp öyle kullanılabilirler. Bu gibi durumlarda, hücreler, genelde,

%10 dimetilsülfoksit (DMSO), %50 serum, %40 tamponlu vasatta ya da hücreleri dondurucu sıcaklıklar altında muhafaza etmek için sektörde yaygın olarak kullanılan bu gibi başka herhangi bir çözültide dondurulacak ve kullanılacakları zaman, dondurulmuş kültürlenmiş hücreleri çözmek için sektörde yaygın olarak kullanılan bir metotla çözüleceklerdir.

Genetiği değiştirilmiş hücreler, çeşitli kültür koşulları altında in vitro ortamda kültürlenebilirler. Hücreler kültürde ekspande edilebilir, örneğin proliferasyonlarını destekleyen ve artıran koşullar altında çoğaltılabilirler. Kültür vasatı sıvı veya yarı-katı olabilir, örneğin agar, metilselüloz ve benzeri unsurlar ihtiva edebilir. Hücre popülasyonu, uygun bir besin vasatında, örneğin fetal buzağı serumu (yaklaşık %5-10), L-glutamin, bir tiol, özellikle de 2-merkaptoetanol ve penisilin ve streptomisin gibi antibiyotikler ile desteklenmiş Iscove modifiye DMEM veya RPMI 1640'da süspanse edilebilir. Kültürde, düzenleyici T hücrelerinin cevap verebileceği büyüme faktörleri bulunabilir. Burada tanımlandığı anlamıyla büyüme faktörleri, ister kültür içerisinde ister intakt dokuda bulunuyor olsunlar hücrelerin sağ kalımını, çoğalmasını ve/veya farklılaşmasını bir transmembran reseptör üzerinde sergiledikleri spesifik etkiler aracılığıyla destekleme ve artırma kabiliyetine sahip olan moleküllerdir. Büyüme faktörleri arasında, polipeptidler ve polipeptid olmayan faktörler bulunur.

Bu yolla genetiği değiştirilmiş olan hücreler bir deneğe gen terapisi gibi amaçlarla, örneğin bir hastalığı tedavi etmek maksadıyla ya da bir antiviral, antipatojenik veya antikanser terapötüğü olarak, tarımda genetiği değiştirilmiş organizmaların üretimi için ya da biyolojik

- araştırma amaçlı olarak transplante edilebilirler. Denek bir yenidoğan, bir juvenil ya da bir erişkin olabilir. Bilhassa tercih edilenler memeli deneklerdir. Buluşa konu olan yöntemlerle tedavi edilebilecek olan memeli denekler arasında, köpekler ve kediler; atlar; sığırlar; 5 küçükbaşlar ve benzeri hayvanlar ve başta insanlar olmak üzere primatlar bulunur. Deneysel araştırmalarda, başta küçük memeliler (örneğin fare, sıçan, gine domuzu, hamster, tavşangiller (örneğin tavşan) ve benzeri) olmak üzere hayvan modelleri kullanılabilir.
- 10 Hücreler deneğe tek başlarına verilebilecekleri gibi, örneğin transplante edildikleri dokudaki çoğalma ve/veya organizasyon davranışlarını destekleyecek uygun bir substrat veya matriks ile birlikte de verilebilirler. Genelde en az  $1 \times 10^3$  adet hücre, örneğin  $5 \times 10^3$  adet hücre,  $1 \times 10^4$  adet hücre,  $5 \times 10^4$  adet hücre,  $1 \times 10^5$  15 adethücre,  $1 \times 10^6$  adet hücre ya da daha fazla sayıda hücre uygulanır. Hücreler deneğe uygun herhangi bir yolla yerleştirilebilirler: parenteral, subkutan, intravenöz, intrakraniyal, intraspinal, intraoküler ya da spinal sıvı içerisinde. Hücreler enjeksiyon yoluyla, kateter yardımıyla ya da benzeri başka bir yolla uygulanabilirler. Lokal 20 uygulama, yani hasar yerine uygulama için uygun yöntemlere verilebilecek örnekler arasında, örneğin intratekal uygulamada kullanılabilen bir Ommaya rezervuarı aracılığıyla uygulama (örneğin bkz: 5.222.982 ve 5.385.582 sayılı ABD patentleri); örneğin bir enjektör yardımıyla bir ekleme bolus enjeksiyon; örneğin 25 konveksiyonlu kanülasyonla kesintisiz infüzyon (örneğin bkz: 20070254842 ABD patent başvurusu) ve hücrelerin tersine çevrilebilir şekilde bağlanmış oldukları bir cihazın implantasyonu (örneğin bkz: 20080081064 ve 20090196903 sayılı ABD patent başvuruları)

sayılabilir. Ayrıca, insan olmayan bir transgenik hayvan (örneğin bir transgenik fare) oluşturmak amacıyla, insan menşeli olmayan hücreler insan menşeli olmayan bir embriyoya (örneğin bir blastokist) yerleştirilebilirler.

5

Tedavi uygulamasının kaç defa yapılacağı denekten deneğe farklılık gösterebilir. Genetiği değiştirilmiş hücrelerin deneğe sokulması tek seferlik bir uygulamayı teşkil eder, ancak bazı durum ve koşullarda bu gibi bir tedavi sınırlı bir zaman aralığı boyunca gelişme sergileyebilir ve bundan dolayı devam eden bir dizi tedavi tekrarının yapılmasını gerektirebilir. Başka durum ve koşullarda ise, bir etkinin gözlemlenebilmesi için genetiği değiştirilmiş hücrelerin birden fazla defa uygulanmaları gerekebilir. Tam olarak nasıl bir protokolün uygulanacağı, ilgili hastalık veya bozukluğun ne olduğuna, hastalığın bulunduğu evreye ve tedavi edilen deneğin ilgili parametrelerine bağlıdır.

Buluşun başka özelliklerinde, DNA-hedefleyen RNA ve/veya yer-hedefli modifiye edici polipeptid ve/veya donör polinükleotid, yine gen terapisi gibi amaçlarla, örneğin bir hastalığı tedavi etmek amacıyla ya da bir antiviral, antipatojenik veya antikanser terapötüğü olarak, tarımda genetiği değiştirilmiş organizmaların üretimi için ya da biyolojik araştırma amaçlı olarak in vivo ortamda hücreSEL DNA'yı modifiye etmek için kullanılabilirler. Bu in vivo buluş yapılarında, bir DNA-hedefleyen RNA ve/veya yer-hedefli modifiye edici polipeptid ve/veya donör polinükleotid kişiye doğrudan uygulanırlar. Bir DNA-hedefleyen RNA ve/veya yer-hedefli modifiye edici polipeptid ve/veya donör polinükleotid, sektörde peptidler, küçük moleküller ve

25

nükleik asitleri bir deneğe uygulamak için kullanılan ve iyi bilinen pek çok yöntemden herhangi biriyle uygulanabilirler. Bir DNA-hedefleyen RNA ve/veya yer-hedefli modifiye edici polipeptid ve/veya donör polinükleotid, çeşitli formülasyonlara dahil edilebilirler. Daha somut ifade etmek gerekirse, buluşa konu olan bir DNA-hedefleyen RNA ve/veya yer-hedefli modifiye edici polipeptid ve/veya donör polipeptid, uygun farmasötik açıdan kabul edilebilir taşıyıcılar veya seyrelticiler ile kombine edilerek farmasötik bileşimler halinde formüle edilebilirler.

10

Farmasötik preparatlar, bir farmasötik açıdan kabul edilebilir vehikül içerisinde bir veya daha fazla sayıda DNA-hedefleyen RNA ve/veya yer-hedefli modifiye edici polipeptid ve/veya donör polinükleotid ihtiva eden bileşimlerdir. "Farmasötik açıdan kabul edilebilir vehiküller", memelilerde, örneğin insanlarda kullanım için ABD Farmakopesinde veya genel kabul gören diğer farmakopelerde listelenen ya da federal devlete veya eyalete bağlı bir ruhsatlandırma kurumu tarafından onaylanmış olan vehiküller olabilirler. "Vehikül" terimi, bir memeliye uygulanmak üzere buluşa konu olan bir bileşik ile birlikte formüle edilen bir seyreltici, adjuvan, yardımcı madde veya taşıyıcıya atıf yapar. Bu gibi farmasötik vehiküller arasında, lipidler, örneğin lipozomlar, örneğin lipozom dendrimerleri; sıvılar, örneğin su ve yağlar, örneğin petrol, hayvan, bitki ve sentetik kaynaklı yağlar, örneğin yerfıstığı yağı, soya fasulyesi yağı, mineral yağı, susamyacı ve benzerleri, salin; akasya zamkı, jelatin, nişasta macunu, talk, keratin, koloidal silika, üre ve benzerleri sayılabilir. Bunların yanı sıra, yardımcı, stabilize edici, kıvamlaştırıcı, kayganlaştırıcı ve renklendirici ajanlar da kullanılabilir. Farmasötik bileşimler, katı, yarı-

25

katı, sıvı veya gaz formundaki preparatlar halinde, örneğin tablet, kapsül, toz, granül, merhem, çözelti, supozituar, enjeksiyon, inhalant, jel, mikrosfer veya aerosol formunda formüle edilebilirler. Öyle ki, bir DNA-hedefleyen RNA ve/veya yer-hedefli modifiye edici polipeptid ve/veya donör polinükleotid uygulaması çeşitli farklı yollarla, örneğin oral, bukkal, rektal, parenteral, intraperitoneal, intradermal, transdermal, intratrakeal, intraoküler ya da benzeri başka bir yolla gerçekleştirilebilir. Aktif ajan uygulamadan sonra sistemik etki gösterebileceği gibi, bölgesel uygulama yapılması, intramural uygulama yapılması veya aktif dozu implantasyon yerinde muhafaza etmeye yarayan bir implant kullanılması yoluyla lokalize etki de gösterebilir. Aktif ajan, sahip olduğu aktiviteyi uygulandığı gibi hemen ortaya koyacak şekilde formüle edilebileceği gibi, sürekli salımlı bir formda da formüle edilebilir.

15

Başta merkezi sinir sistemi koşulları olmak üzere bazı koşullar karşısında, ajanların kan beyin bariyerini (BBB) aşabilecek şekilde formüle edilmeleri gerekli olabilir. İlacın kan beyin bariyerinden (BBB) geçmesini sağlamaya yönelik bir strateji, ister mannitol veya lökotrienler gibi osmotik araçlarla ister bradikinin gibi vazoaaktif maddelerin kullanılmasıyla biyokimyasal olarak olmak üzere BBB'nin bozulmasına dayanır. Spesifik ajanları beyin tümörlerine yönlendirmek için BBB'de bir açıklık oluşturmak da bir seçenektir. Buluşa konu olan terapötik bileşimler intravasküler enjeksiyon ile uygulanacaklarsa bileşimlerle birlikte bir BBB bozucu ajan da uygulanabilir. BBB'yi aşmaya yönelik diğer stratejiler, aralarında Kaveolin-1 aracılı transitoz, glukoz ve amino asit taşıyıcıları gibi taşıyıcı aracılı transporterler, insülin veya transferrin için reseptör

25

aracılı transitoz ve p-glikoprotein gibi aktif dışarı akış transporterlerinin de bulunduğu endojen taşıma sistemlerinin kullanılmasını gerektirebilirler. Aktif taşıma moieteleri buluşta kullanılan terapötik bileşiklere kan damarının endotel duvarından geçişi kolaylaştırmak amacıyla da konjuge edilebilirler. Alternatif olarak, lokal uygulama, örneğin bir Ommaya rezervuarı aracılığıyla intratekal uygulama (örneğin bkz: 5.222.982 ve 5.385.582 sayılı ABD patentleri) yapılarak; örneğin bir enjektör yardımıyla örneğin bir intravitreal veya intrakraniyal bolus enjeksiyon yapılarak; örneğin konveksiyonlu kanülasyonla kesintisiz infüzyon (örneğin bkz: 20070254842 ABD patent başvurusu) yapılarak ya da ajanın tersine çevrilebilir şekilde bağlanmış olduğu bir cihaz implante edilerek (örneğin bkz: 20080081064 ve 20090196903 sayılı ABD patent başvuruları), terapötik ajanlar BBB'nin arkasındaki bir noktaya uygulanabilirler.

Bir DNA-hedefleyen RNA ve/veya yer-hedefli modifiye edici polipeptid ve/veya donör polinükleotid normalde etkili bir miktarda uygulanır. Yukarıda ex vivo yöntemlere istinaden belirtildiği gibi, in vivo ortamda bir DNA-hedefleyen RNA ve/veya yer-hedefli modifiye edici polipeptid ve/veya donör polinükleotidin etkili miktarı veya dozu, iki homolog sekans arasında gözlemlenen rekombinasyon miktarının bir negatif kontrol ile, örneğin boş bir vektörle veya ilgisiz bir polipeptidle temas ettirilen bir hücre ile kaydedilen değere kıyasla 2 kat veya daha fazla yüksek olmasını sağlayacak olan miktardır. Rekombinasyon miktarı, uygun herhangi bir yöntemle, örneğin yukarıda tarif edildiği gibi olan ve sektörde bilinen uygun herhangi bir yöntemle ölçülebilir. Uygulanacak olan bir DNA-hedefleyen RNA ve/veya yer-hedefli modifiye edici polipeptid ve/veya donör

polinükleotidin etkili miktarı veya etkili dozunun nasıl hesaplanacağı sektörde olağan bilgi ve beceri sahibi uzmanlarca bilinmektedir ve bu tarz uygulamalar sektörde bilgi ve beceri sahibi uzmanlarca rutin olarak gerçekleştirilmektedir. Uygulanacak olan nihai miktar, 5 uygulama yoluna ve tedavi edilecek hastalık veya bozukluğun niteliğine bağlı olacaktır.

Bir hastada uygulanması gereken etkili miktarın seviyesi, bir kısmı hastadan hastaya değişiklik gösterecek olan çeşitli faktörlere bağlı olacaktır. İşinin ehli bir klinisyen, bir hastada bir terapötik ajan ile ilgili hastalığın progresyonunu gerekiyorsa durdurmak gerekiyorsa tersine çevirmek için o terapötik ajandan uygulanması gereken etkili miktarın ne olduğunu kolayca belirleyebilir. Bir klinisyen, LD50 hayvan verileri ve ilgili ajana istinaden mevcut bulunan diğer bilgiler ışığında, uygulama yapılacak kişi için maksimum güvenli dozu uygulama yolunu da dikkate alarak rahatlıkla belirleyebilir. Örneğin, terapötik bileşimin uygulandığı sıvı kütlesinin daha büyük olması göz önünde tutulduğunda, intravenöz yolla uygulanan bir doz intratekal yolla uygulanan bir dozdan daha fazla olabilir. Benzer şekilde, 20 vücuttan süratli bir şekilde temizlenen bileşimler, bir terapötik konsantrasyonun sürdürülmesini sağlamak adına daha yüksek dozlarda ya da tekrarlayan dozlarla uygulanabilirler. İşinin ehli bir klinisyen, sektörde sahibi olduğu olağan bilgi ve becerileri kullanarak, rutin klinik deneylerin seyri içerisinde belirli bir terapötüğün dozajını 25 kolaylıkla optimize edebilecektir.

Bir ilaç bünyesinde kullanılacak olan bir DNA-hedefleyen RNA ve/veya yer-hedefli modifiye edici polipeptid ve/veya donör



polinükleotid uygun bir ticari kaynaktan elde edilebilir. Genel bir önerme olarak, parenteral yolla uygulanan bir DNA-hedefleyen RNA ve/veya yer-hedefli modifiye edici polipeptid ve/veya donör polinükleotidin doz başına toplam farmasötik açıdan etkili miktarı, bir doz cevap eğrisiyle ölçülebilecek olan bir aralık dahilinde olacaktır.

Bir DNA-hedefleyen RNA ve/veya yer-hedefli modifiye edici polipeptid ve/veya donör polinükleotidlere dayanan terapiler, yani terapötik uygulama da kullanılacak olan bir DNA-hedefleyen RNA ve/veya yer-hedefli modifiye edici polipeptid ve/veya donör polinükleotidin preparatları steril olmalıdır. Sterilite, steril filtrasyon membranları (örneğin 0,2 µm membranlar) ile kolayca sağlanır. Terapötik bileşimler, genelde, bir steril giriş portu bulunan bir kabın, örneğin bir hipodermik enjeksiyon iğnesi kullanılarak delinebilecek bir tıpanın bulunduğu bir intravenöz çözelti torbası veya flakonun içerisine konurlar. Bir DNA-hedefleyici RNA ve/veya yer-hedefli modifiye edici polipeptid ve/veya donör polinükleotide dayalı terapiler, bir aköz çözelti ya da sulandırılarak kullanılacak bir liyofilize formülasyon halinde birim veya çoklu doz kaplarında, örneğin sızdırmaz kapatılmış ampuller veya flakonlarda saklanabilirler. Bir liyofilize formülasyon örneği olarak, 10 mL hacimli flakonlar 5 mL steril filtrelenmiş %1 (a/h) aköz bileşik çözeltisiyle doldurulurlar ve elde edilen karışım liyofilize edilir. İnfüzyon çözeltisi, liyofilize çözeltinin bakteriyostatik enjeksiyonluk su ile sulandırılması yoluyla hazırlanır.

Farmasötik bileşimlerde, istenen formülasyona bağlı olarak, hayvan veya insanlarda kullanılacak farmasötik bileşimlerin formülasyonunda

- yaygın olarak kullanılan vehiküller olarak tanımlanan farmasötik açıdan kabul edilebilir toksik olmayan taşıyıcılar veya seyrelticiler bulunabilir. Bir seyreltici kullanılacaksa, kombinasyonun biyolojik aktivitesini etkilemeyecek olan bir seyreltici seçilir. Bu gibi
- 5 seyrelticilere verilebilecek örnekler arasında, distile su, tamponlu su, fizyolojik salin, PBS, Ringer çözeltisi, dekstroz çözeltisi ve Hank çözeltisi bulunur. Farmasötik bileşim veya formülasyonda, ayrıca, başka taşıyıcılar, adjuvanlar veya toksik olmayan, terapötik olmayan, immünojenik olmayan stabilizatörler, yardımcı maddeler ve benzeri
- 10 başka maddeler de bulunabilir. Bileşimlerde, fizyolojik koşulların sağlanmasına yardımcı olan ek maddeler, örneğin pH ayarlama ve tamponlama ajanları, toksisite ayarlama ajanları, ıslatıcı ajanlar ve deterjanlar da bulunabilir.
- 15 Bileşimde çeşitli stabilize edici ajanlardan herhangi biri, örnek vermek gerekirse bir antioksidan bulunabilir. Farmasötik bileşimde bir polipeptid varsa, bu polipeptid, polipeptidin in vivo stabilitesini artıran ya da onun farmakolojik özelliklerini geliştiren (örneğin polipeptidin yarı ömrünü uzatan, toksisitesini azaltan, çözünürlüğü veya hücre
- 20 içine alımını artıran) çeşitli iyi bilinen bileşiklerle kompleks haline getirilebilir. Bu gibi modifikasyonlar veya kompleksleştirici ajanlara örnek olarak, sülfat, glukonat, sitrat ve fosfat gösterilebilir. Bir bileşimdeki nükleik asitler veya polipeptidler, in vivo özniteliklerini geliştiren moleküllerle de kompleks haline getirilebilirler. Bu gibi
- 25 moleküller arasında, örneğin karbonhidratlar, poliaminler, amino asitler, başka peptidler, iyonlar (örneğin sodyum, potasyum, kalsiyum, magnezyum, manganez) ve lipidler sayılabilir.

Çeşitli farklı uygulama şekilleri için uygun farklı formülasyon biçimleri hakkında daha fazla bilgi almak için "Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Philadelphia, Pa., 17th ed. (1985)" eserine bakılabilir. İlaç uygulama yöntemleri hakkında kısa bir inceleme için bkz: Langer, Science 249:1527-1533 (1990).

Farmasötik bileşimler, profilaktik ve/veya terapötik tedaviler kapsamında kullanılabilirler. Etkin bileşenin toksisitesi ve terapötik etkinliği, hücre kültürleri ve/veya deneysel hayvanlarda kullanılan standart farmasötik prosedürlere göre, örneğin LD50 (popülasyonun %50'si için öldürücü olan doz) ve ED50 (popülasyonun %50'sinde terapötik açıdan etkili olan doz) tayin edilerek belirlenebilir. Toksik ve terapötik etkiler arasındaki doz oranı terapötik indeksi teşkil eder ve LD50/ED50 oranı şeklinde ifade edilebilir. Büyük terapötik indeksler sergileyen terapiler tercih edilirler.

Hücre kültürü ve/veya hayvan çalışmalarından elde edilen veriler, insanlarda kullanıma uygun bir dozaj aralığının formüle edilmesinde kullanılabilir. Etkin bileşenin dozajı, normalde, düşük toksisiteli ED50'nin dahil olduğu bir dolaşımdaki konsantrasyon aralığı içerisinde yer alır. Dozaj, dozaj formuna ve uygulama yoluna bağlı olarak bu aralık içerisinde farklılık gösterebilir.

Farmasötik bileşimleri formüle etmek için kullanılan komponentler tercihen yüksek saflıkta olurlar ve potansiyel olarak zararlı kontaminantları hemen hemen hiç içermezler (örneğin asgari olarak Ulusal Gıda (NF) kalitesinde, genelde asgari olarak analitik kalitede

- ve daha genel olarak asgari olarak farmasötik kalitede olurlar). Ayrıca, in vivo kullanımı hedeflenen bileşimler genelde steril olurlar. Bir bileşiğin kullanılmadan önce sentezlenmesi gerekiyorsa, elde edilen ürün, sentez veya saflaştırma prosesi esnasında bulunabilecek olan,
- 5 başta endotoksinler olmak üzere potansiyel olarak toksik olan herhangi bir ajandan normalde hemen hemen hiç ihtiva etmez. Parenteral uygulamaya yönelik bileşimler de steril ve büyük ölçüde izotonik olurlar ve GMP koşulları altında yapılırlar.
- 10 Belirli bir hastada bir terapötik bileşimle etkili bir sonuç elde etmek için o bileşimden o hastaya verilmesi gereken etkili miktarın ne olduğu, bir kısmı hastadan hastaya farklılık gösterecek olan çeşitli faktörlere bağlı olacaktır. İşinin ehli bir klinisyen, bir hastada bir terapötik ajan ile ilgili hastalığın progresyonunu gerekiyorsa
- 15 durdurmak gerekiyorsa tersine çevirmek için o terapötik ajandan uygulanması gereken etkili miktarın ne olduğunu kolayca belirleyebilir. Bir klinisyen, LD50 hayvan verileri ve ilgili ajana istinaden mevcut bulunan diğer bilgiler ışığında, uygulama yapılacak kişi için maksimum güvenli dozu uygulama yolunu da dikkate alarak
- 20 rahatlıkla belirleyebilir. Örneğin, terapötik bileşimin uygulandığı sıvı kütlesinin daha büyük olması göz önünde tutulduğunda, intravenöz yolla uygulanan bir doz intratekal yolla uygulanan bir dozdan daha fazla olabilir. Benzer şekilde, vücuttan süratli bir şekilde temizlenen bileşimler, bir terapötik konsantrasyonun sürdürülmesini sağlamak
- 25 adına daha yüksek dozlarda ya da tekrarlayan dozlarla uygulanabilirler. İşinin ehli bir klinisyen, sektörde sahibi olduğu olağan bilgi ve becerileri kullanarak, rutin klinik deneylerin seyri

içerisinde belirli bir terapötüğün dozajını kolaylıkla optimize edebilecektir.

## GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ KONAKÇI HÜCRELER

5

Bu buluş, izole genetiği değiştirilmiş konakçı hücrelerin de aralarında bulunduğu genetiği değiştirilmiş konakçı hücreler ortaya koyar ve buluşa uygun bir genetiği değiştirilmiş konakçı hücre, aşağıda belirtilenlerden birini ihtiva eder (aşağıda belirtilenlerden biriyle 10 genetiği değiştirilmiş olan bir hücredir): 1) bir eksojen DNA-hedefleyen RNA; 2) bir DNA-hedefleyen RNA kodlayan bir nükleotid sekansının bulunduğu bir eksojen nükleik asit; 3) bir eksojen yer-hedefli modifiye edici polipeptid (örneğin bir doğada kendiliğinden oluşan Cas9; bir modifiye, yani mutasyona uğratılmış veya varyant 15 Cas9; bir kimerik Cas9 ve benzeri); 4) bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid kodlayan bir nükleotid sekansının bulunduğu bir eksojen nükleik asit ya da 5) yukarıda sıralananlardan oluşan herhangi bir kombinasyon. Buluşa uygun bir genetiği değiştirilmiş hücre, bir konakçı hücrenin genetiği örneğin aşağıda belirtilenlerden biriyle 20 değiştirilerek oluşturulur: 1) bir eksojen DNA-hedefleyen RNA; 2) bir DNA-hedefleyen RNA kodlayan bir nükleotid sekansının bulunduğu bir eksojen nükleik asit; 3) bir eksojen yer-hedefli modifiye edici polipeptid; 4) bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid kodlayan bir nükleotid sekansının bulunduğu bir eksojen nükleik asit ya da 5) 25 yukarıda sıralananlardan oluşan herhangi bir kombinasyon.

Bir hedef hücre olmaya uygun olan hücreler aynı zamanda bir genetiği değiştirilmiş konakçı hücre olmaya da uygundur. Örneğin,

ilgilenilen bir genetiği değiştirilmiş konakçı hücre, herhangi bir organizmaya ait olan bir hücre olabilir (örneğin bir bakteri hücresi, bir arke hücresi, bir tekhücreli ökaryotik organizma hücresi, bir bitki hücresi, bir alg hücresi, örneğin *Botryococcus braunii*,  
 5 *Chlamydomonas reinhardtii*, *Nannochloropsis gaditana*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Sargassum patens*, C. Agardh ve benzeri, bir mantar hücresi (örneğin bir maya hücresi), bir hayvan hücresi, bir omurgasız hayvan (örneğin meyve sineği, sölenter, ekinoderm, nematod ve benzeri) hücresi, bir omurgalı hayvan (örneğin balık, amfibi,  
 10 sürüngen, kuş, memeli) hücresi, bir memeli (örneğin bir domuz, inek, keçi, koyun, kemirgen, sıçan, fare, insan olmayan primat, insan ve benzeri) hücresi ve benzeri).

Buluşun bazı yapılarında, bir genetiği değiştirilmiş konakçı hücrenin genetiği bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid (örneğin bir doğada kendiliğinden oluşan Cas9; bir modifiye, yani mutasyona uğratılmış veya varyant Cas9; bir kimerik Cas9 ve benzeri) kodlayan bir nükleotid sekansının bulunduğu bir eksojen nükleik asit ile değiştirilmiştir. Bir genetiği değiştirilmiş konakçı hücrenin DNA'sı,  
 15 hücreye bir DNA-hedefleyen RNA'nın (veya modifiye edilecek genomik konum/sekansı belirleyen bir DNA-hedefleyen RNA'yı kodlayan bir DNA) ve isteğe bağlı olarak bir donör nükleik asidin sokulması yoluyla, modifiye edilmek üzere hedef alınır. Buluşun bazı yapılarında, bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid kodlayan  
 25 nükleotid sekansı bir indüklenebilir promotöre (örneğin ısı şok promotörü, tetrasiklinin düzenlediği promotör, steroidin düzenlediği promotör, metalin düzenlediği promotör, östrojen reseptörünün düzenlediği promotör ve benzeri promotörler) operabl bağlıdır.

Buluşun bazı yapılarında, bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid kodlayan nükleotid sekansı bir uzam bakımından ve/veya zaman bakımından kısıtları bulunan promotöre (örneğin bir doku-spesifik promotör, bir hücre tipi-spesifik promotör ve benzeri) operabl  
5 bağıdır. Buluşun bazı yapılarında, bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid kodlayan nükleotid sekansı bir konstitütif promotöre operabl bağıdır.

Buluşun bazı yapılarında, buluşa uygun bir genetiği değiştirilmiş  
10 konakçı hücre in vitro ortamda bulunur. Buluşun bazı yapılarında, buluşa uygun bir genetiği değiştirilmiş konakçı hücre in vivo ortamda bulunur. Buluşun bazı yapılarında, buluşa uygun bir genetiği değiştirilmiş konakçı hücre bir prokaryotik hücredir ya da bir prokaryotik hücreden elde edilir. Buluşun bazı yapılarında, buluşa  
15 uygun bir genetiği değiştirilmiş konakçı hücre bir bakteri hücresidir ya da bir bakteri hücrelerinden elde edilir. Buluşun bazı yapılarında, buluşa uygun bir genetiği değiştirilmiş konakçı hücre bir arke hücresidir ya da bir arke hücrelerinden elde edilir. Buluşun bazı yapılarında, buluşa  
20 uygun bir genetiği değiştirilmiş konakçı hücre bir ökaryotik hücredir ya da bir ökaryotik hücreden elde edilir. Buluşun bazı yapılarında, buluşa uygun bir genetiği değiştirilmiş konakçı hücre bir bitki hücresidir ya da bir bitki hücrelerinden elde edilir. Buluşun bazı yapılarında, buluşa uygun bir genetiği değiştirilmiş konakçı hücre bir hayvan hücresidir ya da bir hayvanda hücrelerinden elde edilir. Buluşun  
25 bazı yapılarında, buluşa uygun bir genetiği değiştirilmiş konakçı hücre bir omurgasız hücresidir ya da bir omurgasız hücrelerinden elde edilir. Buluşun bazı yapılarında, buluşa uygun bir genetiği değiştirilmiş konakçı hücre bir omurgalı hücresidir ya da bir omurgalı hücrelerinden

elde edilir. Buluşun bazı yapılarında, buluşa uygun bir genetiği değiştirilmiş konakçı hücre bir memeli hücredir ya da bir memeli hücrelerinden elde edilir. Buluşun bazı yapılarında, buluşa uygun bir genetiği değiştirilmiş konakçı hücre bir kemirgen hücredir ya da bir kemirgen hücrelerinden elde edilir. Buluşun bazı yapılarında, buluşa uygun bir genetiği değiştirilmiş konakçı hücre bir insan hücredir ya da bir insan hücrelerinden elde edilir.

Bu buluş, buluşa uygun bir genetiği değiştirilmiş hücrenin progeneriyle de ilgilidir ve bu progeneri, türetildiği buluşa uygun genetiği değiştirilmiş hücre ile aynı eksojen nükleik asit veya polipeptidi ihtiva edebilir. Bu buluş, buluşa uygun bir genetiği değiştirilmiş konakçı hücre ihtiva eden bir bileşim de ortaya koyar.

#### 15 **Genetiği değiştirilmiş kök hücreler ve genetiği değiştirilmiş progenitör hücreler**

Buluşun bazı yapılarında, buluşa uygun bir genetiği değiştirilmiş konakçı hücre bir genetiği değiştirilmiş kök hücre veya progenitör hücredir. Uygun konakçı hücreler arasında örneğin kök hücreler (erişkin kök hücreler, embriyonik kök hücreler, iPS hücreleri ve benzerleri) ve progenitör hücreler (örneğin kardiyak progenitör hücreler, nöral progenitör hücreleri ve benzerleri) sayılabilir. Uygun konakçı hücreler arasında, kök hücreler ve progenitör hücreler, örneğin kemirgen kök hücreleri, kemirgen progenitör hücreleri, insan kök hücreleri, insan progenitör hücreleri ve benzeri hücreler bulunur. Uygun konakçı hücreler arasında, in vitro konakçı hücreler, örneğin izole konakçı hücreler bulunur.



Buluşun bazı yapılarında, buluşa uygun bir genetiği değiştirilmiş konakçı hücre bir eksojen DNA-hedefleyen RNA nükleik asidi içerir. Buluşun bazı yapılarında, buluşa uygun bir genetiği değiştirilmiş konakçı hücre bir DNA-hedefleyen RNA kodlayan bir nükleotid sekansının bulunduğu bir eksojen nükleik asit ihtiva eder. Buluşun bazı yapılarında, buluşa uygun bir genetiği değiştirilmiş konakçı hücre bir eksojen yer-hedefli modifiye edici polipeptid (örneğin bir doğada kendiliğinden oluşan Cas9; bir modifiye, yani mutasyona uğratılmış veya varyant Cas9; bir kimerik Cas9 ve benzeri) içerir. Buluşun bazı yapılarında, buluşa uygun bir genetiği değiştirilmiş konakçı hücre bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid kodlayan bir nükleotid sekansının bulunduğu bir eksojen nükleik asit ihtiva eder. Buluşun bazı yapılarında, buluşa uygun bir genetiği değiştirilmiş konakçı hücre, 1) bir DNA-hedefleyen RNA ve 2) bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid kodlayan bir nükleotid sekansının bulunduğu bir eksojen nükleik asit barındırır.

Bazı durumlarda, yer-hedefli modifiye edici polipeptid, Şekil 3'te gösterilen Cas9/Csn1 amino asit sekansının 7-166 veya 731-1003 numaralı amino asitlerinden oluşan kısım ile ya da SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346'da gösterilen amino asit sekanslarından herhangi birindeki mütakabil kısımlar ile en az yaklaşık %75, en az yaklaşık %80, en az yaklaşık %85, en az yaklaşık %90, en az yaklaşık %95, en az yaklaşık %99 ya da %100 oranında amino asit sekansı özdeşliğine sahip olan bir amino asit sekansı ihtiva eder.

## **BİLEŞİMLER**

Bu buluş, buluşa uygun bir DNA-hedefleyen RNA ve/veya bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid içeren bir bileşim de ortaya koyar.

- 5 Yer-hedefli modifiye edici polipeptid buluşa uygun bir kimerik polipeptiddir. Buluşa uygun bir bileşim, bu buluşa konu olan bir yöntemi, örneğin bir hedef DNA'da yer-spesifik modifikasyon yapmayı sağlayan bir yöntemi, bir hedef DNA ile ilişkili bir polipeptidde yer-spesifik modifikasyon yapmayı sağlayan bir yöntemi
- 10 ya da benzeri başka bir yöntemi gerçekleştirmek için kullanılabilir.

### **Bir DNA-hedefleyen RNA ihtiva eden bileşimler**

- Mevcut tarifname, buluşa uygun bir DNA-hedefleyen RNA içeren bir
- 15 bileşim ortaya koyar. Bu bileşim, DNA-hedefleyen RNA'nın yanı sıra, aşağıda sıralanan unsurlardan birini veya birden fazlasını ihtiva edebilir: bir tuz, örneğin NaCl, MgCl<sub>2</sub>, KCl, MgSO<sub>4</sub> ve benzeri; bir tamponlama ajanı, örneğin bir Tris tamponu, N-(2-hidroksietil)piperazin-N'-(2-etansülfonik asit) (HEPES), 2-(N-morfolino)etansülfonik asit (MES), MES sodyum tuzu, 3-(N-morfolino)propansülfonik asit (MOPS), N-tris[hidroksimetil]metil-3-aminopropansülfonik asit (TAPS) ve benzeri; bir çözünürleştirici ajan;
- 20 bir deterjan, örneğin Tween-20 gibi bir iyonik olmayan deterjan ve benzeri; bir nükleaz inhibitörü ve benzeri maddeler. Örneğin bazı
- 25 durumlarda, buluşa uygun bir bileşimde, buluşa uygun bir DNA-hedefleyen RNA ve onun yanı sıra, nükleik asitleri stabilize etmek için kullanılan bir tampon bulunur.

Buluşun bazı yapılarında, buluşa uygun bir bileşimde bulunan bir DNA-hedefleyen RNA örneğinin en az yaklaşık %75, en az yaklaşık %80, en az yaklaşık %85, en az yaklaşık %90, en az yaklaşık %95, en az yaklaşık %98, en az yaklaşık %99 veya %99'dan daha yüksek bir oranda saftır ve burada geçen "% saflık" tabiri, DNA-hedefleyen RNA'nın DNA-hedefleyen RNA'nın üretimi esnasında bulunabilecek olan başka makromolekülleri veya kontaminantları belirtilen yüzde değeri ölçüsünde hiç ihtiva etmediği anlamına gelir.

#### 10 **Buluşa uygun bir kimerik polipeptid ihtiva eden bileşimler**

Mevcut buluş söz konusu bir kimerik polipeptidin bulunduğu bir bileşim anlatılmakta ve açıklanmaktadır. Bu bileşim, DNA-hedefleyen RNA'nın yanı sıra, aşağıda sıralanan unsurlardan birini veya birden fazlasını ihtiva edebilir: bir tuz, örneğinin NaCl, MgCl<sub>2</sub>, KCl, MgSO<sub>4</sub> ve benzeri; bir tamponlama ajanı, örneğinin bir Tris tamponu, HEPES, MES, MES sodyum tuzu, MOPS, TAPS ve benzeri; bir çözünürleştirici ajan; bir deterjan, örneğinin Tween-20 gibi bir iyonik olmayan deterjan ve benzeri; bir proteaz inhibitörü; bir indirgen ajan (örneğin ditiotritol) ve benzeri maddeler.

Buluşun bazı yapılarında, söz konusu bir bileşimde bulunan söz konusu bir kimerik polipeptid örneğinin en az yaklaşık %75, en az yaklaşık %80, en az yaklaşık %85, en az yaklaşık %90, en az yaklaşık %95, en az yaklaşık %98, en az yaklaşık %99 veya %99'dan daha yüksek bir oranda saftır ve burada geçen "% saflık" tabiri, yer-hedefli modifiye edici polipeptidin kimerik polipeptidin üretimi esnasında bulunabilecek olan başka proteinleri, başka makromolekülleri veya

kontaminantları belirtilen yüzde değeri ölçüsünde hiç ihtiva etmediği anlamına gelir.

**Bir DNA-hedefleyen RNA ve bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid ihtiva eden bileşimler**

Bu buluş, aşağıda belirtilenleri içeren bir bileşim ortaya koyar: (i) bir DNA-hedefleyen RNA veya onu kodlayan bir DNA polinükleotidi ve (ii) bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid ya da onu kodlayan bir polinükleotid. Yer-hedefli modifiye edici polipeptid buluşa uygun bir kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptiddir. Bazı durumlarda, yer-hedefli modifiye edici polipeptid bir hedef DNA'yı modifiye eden bir enzimatik aktivite sergiler. Başka durumlarda, yer-hedefli modifiye edici polipeptid bir hedef DNA ile ilişkili bir polipeptidi modifiye eden bir enzimatik aktivite sergiler. Yine başka durumlarda, yer-hedefli modifiye edici polipeptid hedef DNA'nın transkripsiyonunu modüle eder.

Bu buluş, aşağıda belirtilenleri ihtiva eden bir bileşim ortaya koyar: (i) yukarıda tanımlandığı gibi olan ve aşağıda sıralananları içeren bir DNA-hedefleyen RNA veya onu kodlayan bir DNA polinükleotidi: DNA-hedefleyen RNA (a) bir hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı nitelikte bir nükleotid sekansı bulunan bir birinci segment ve (b) bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid ile etkileşime giren bir ikinci segment içerir; ve (ii) aşağıda belirtilenleri ihtiva eden yer-hedefli-modifiye edici polipeptid ya da onu kodlayan bir polinükleotid: (a) DNA-hedefleyen RNA ile etkileşime giren bir

RNA-bağlanımlı kısım ve (b) DNA-hedefleyen RNA'nın belirlediği bir yerde yer-hedefli enzimatik aktivite sergileyen bir aktivite kısmı.

- Bazı durumlarda, buluşa uygun bir bileşim şunları içerir: (i) aşağıda belirtilenleri ihtiva eden buluşa uygun bir DNA-hedefleyen RNA:
- 5 DNA-hedefleyen RNA (a) bir hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı nitelikte bir nükleotid sekansı bulunan bir birinci segment ve (b) bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid ile etkileşime giren bir ikinci segment içerir; ve (ii) aşağıda belirtilenleri ihtiva eden yer-
- 10 hedefli-modifiye edici polipeptid: (a) DNA-hedefleyen RNA ile etkileşime giren bir RNA-bağlanımlı kısım ve (b) DNA-hedefleyen RNA'nın belirlediği bir yerde yer-hedefli enzimatik aktivite sergileyen bir aktivite kısmı.
- 15 Buluşun başka yapılarında, buluşa uygun bir bileşim şunları içerir: (i) aşağıda belirtilenleri ihtiva eden buluşa uygun bir DNA-hedefleyen RNA'yı kodlayan bir polinükleotid: DNA-hedefleyen RNA (a) bir hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı nitelikte bir nükleotid sekansı bulunan bir birinci segment ve (b) bir yer-hedefli modifiye
- 20 edici polipeptid ile etkileşime giren bir ikinci segment içerir; ve (ii) aşağıda belirtilenleri ihtiva eden yer-hedefli-modifiye edici polipeptidi kodlayan bir polinükleotid: (a) DNA-hedefleyen RNA ile etkileşime giren bir RNA-bağlanımlı kısım ve (b) DNA-hedefleyen RNA'nın belirlediği bir yerde yer-hedefli enzimatik aktivite sergileyen bir
- 25 aktivite kısmı.

Bazı uygulamalarda, bir çift molekül DNA-hedefleyen RNA'nın her iki RNA molekülünü de bünyesinde barındıran söz konusu bir bileşim

anlatılmakta ve açıklanmaktadır. Bu gibi, bazı uygulamalarda, söz konusu bir bileşim, bir hedef gösteren RNA'nın dubleks oluşturucu segmentini tamamlayıcı nitelikte olan bir dubleks oluşturucu segmentin yer aldığı bir aktive edici RNA içerir (bkz: Şekil 1A).

- 5 Aktive edici RNA ile hedef gösteren RNA'nın dubleks oluşturucu segmentleri birbirlerine hibridize olarak DNA-hedefleyen RNA'nın protein-bağımlı segmentinin dsRNA dubleksini oluştururlar. Hedef gösteren RNA, ayrıca DNA-hedefleyen RNA'nın DNA-hedefleyen segmentini (tek iplikçikli) de sağlar ve dolayısıyla DNA-hedefleyen
- 10 RNA'yı hedef DNA içerisindeki bir spesifik sekansa yönlendirir. Sınırlayıcı olmayan bir örnek vermek gerekirse, aktive edici RNA'nın dubleks oluşturucu segmenti, 5'-UAGCAAGUAAA AU-3' (SEKANS KOD NO.: 562) ile en az yaklaşık %70, en az yaklaşık %80, en az yaklaşık %90, en az yaklaşık %95, en az yaklaşık %98 ya
- 15 da %100 oranında özdeş olan bir nükleotid sekansı ihtiva eder. Sınırlayıcı olmayan bir diğer örnek vermek gerekirse, hedef gösteren RNA'nın dubleks oluşturucu segmenti, 5'-GUUUUAGAGC UA-3' (SEKANS KOD NO.: 679) ile en az yaklaşık %70, en az yaklaşık %80, en az yaklaşık %90, en az yaklaşık %95, en az yaklaşık %98 ya
- 20 da %100 oranında özdeş olan bir nükleotid sekansı ihtiva eder.

- Bu buluş, aşağıda belirtilenleri ihtiva eden bir bileşim ortaya koyar: (i) aşağıda sıralananları içeren bir DNA-hedefleyen RNA veya onu kodlayan bir DNA polinükleotidi: DNA-hedefleyen RNA (a) bir hedef
- 25 DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı nitelikte bir nükleotid sekansı bulunan bir birinci segment ve (b) bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid ile etkileşime giren bir ikinci segment içerir; ve (ii) aşağıda belirtilenleri ihtiva eden yer-hedefli-modifiye edici polipeptid ya da

onu kodlayan bir polinükleotid: (a) DNA-hedefleyen RNA ile etkileşime giren bir RNA-bağlanımlı kısım ve (b) DNA-hedefleyen RNA'nın belirlediği bir yerde hedef DNA içerisindeki transkripsiyonu modüle eden bir aktivite kısmı.

5

Örneğin bazı durumlarda, buluşa uygun bir bileşim şunları içerir: (i) aşağıda sıralananları içeren bir DNA-hedefleyen RNA: DNA-hedefleyen RNA (a) bir hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı nitelikte bir nükleotid sekansı bulunan bir birinci segment ve (b) bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid ile etkileşime giren bir ikinci segment içerir; ve (ii) aşağıda belirtilenleri ihtiva eden yer-hedefli-modifiye edici polipeptid: (a) DNA-hedefleyen RNA ile etkileşime giren bir RNA-bağlanımlı kısım ve (b) DNA-hedefleyen RNA'nın belirlediği bir yerde hedef DNA içerisindeki transkripsiyonu modüle eden bir aktivite kısmı.

15

Başka bir örnek vermek gerekirse, bazı durumlarda, buluşa uygun bir bileşimde şunlar bulunur: (i) aşağıda sıralananları içeren bir DNA-hedefleyen RNA'yı kodlayan bir DNA polinükleotidi: DNA-hedefleyen RNA (a) bir hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı nitelikte bir nükleotid sekansı bulunan bir birinci segment ve (b) bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid ile etkileşime giren bir ikinci segment içerir; ve (ii) aşağıda belirtilenleri ihtiva eden yer-hedefli-modifiye edici polipeptidi kodlayan bir polinükleotid: (a) DNA-hedefleyen RNA ile etkileşime giren bir RNA-bağlanımlı kısım ve (b) DNA-hedefleyen RNA'nın belirlediği bir yerde hedef DNA içerisindeki transkripsiyonu modüle eden bir aktivite kısmı.

20

25

Buluşa uygun bir bileşim, i) buluşa uygun bir DNA-hedefleyen RNA veya onu kodlayan bir DNA polinükleotidinin ve ii) buluşa uygun bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid veya onu kodlayan bir polinükleotidin yanı sıra, aşağıda sıralananlardan birini veya birden  
 5 fazlasını da ihtiva edebilir: bir tuz, örneğin NaCl, MgCl<sub>2</sub>, KCl, MgSO<sub>4</sub> ve benzeri; bir tamponlama ajanı, örneğin bir Tris tamponu, HEPES, MES, MES sodyum tuzu, MOPS, TAPS ve benzeri; bir çözünürleştirici ajan; bir deterjan, örneğin Tween-20 gibi bir iyonik olmayan deterjan ve benzeri; bir proteaz inhibitörü; bir indirgen ajan  
 10 (örneğin ditiotreitol) ve benzeri maddeler.

Bazı durumlarda, bileşimdeki komponentler birbirlerinden bağımsız olarak saftırlar, örneğin komponentlerin her biri, en az yaklaşık %75, en az yaklaşık %80, en az yaklaşık %90, en az yaklaşık %95, en az  
 15 yaklaşık %98, en az yaklaşık %99 veya en az yaklaşık %99 oranında saftır. Bazı durumlarda, buluşa uygun bir bileşimin komponentlerinin her biri bileşime ilave edilmeden önce saftır.

Örneğin buluşun bazı yapılarında, bir bileşimde bulunan bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid, örneğin en az yaklaşık %75, en az  
 20 yaklaşık %80, en az yaklaşık %85, en az yaklaşık %90, en az yaklaşık %95, en az yaklaşık %98, en az yaklaşık %99 veya %99'dan daha yüksek bir oranda saftır ve burada geçen "% saflık" tabiri, yer-hedefli modifiye edici polipeptidin yer-hedefli modifiye edici polipeptidin  
 25 üretimi esnasında bulunabilecek olan başka proteinleri (örneğin yer-hedefli modifiye edici polipeptid dışındaki proteinleri), başka makromolekülleri veya kontaminantları belirtilen yüzde değeri ölçüsünde hiç ihtiva etmediği anlamına gelir.



## KİTLER

Bu buluş, buluşa uygun bir yöntemi gerçekleştirmeyi sağlayan kitler de ortaya koyar. Buluşa uygun bir kitte aşağıda belirtilenlerden biri

5 veya birden fazlası bulunur: bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid; bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid kodlayan bir nükleotidin yer aldığı bir nükleik asit; bir DNA-hedefleyen RNA; bir DNA-hedefleyen RNA kodlayan bir nükleotid sekansının yer aldığı bir nükleik asit; bir aktive edici RNA; bir aktive edici RNA kodlayan bir

10 nükleotid sekansının yer aldığı bir nükleik asit; bir hedef gösteren RNA ve bir hedef gösteren RNA kodlayan bir nükleotid sekansının yer aldığı bir nükleik asit. Bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid; bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid kodlayan bir nükleotidin yer aldığı bir nükleik asit; bir DNA-hedefleyen RNA; bir DNA-hedefleyen RNA kodlayan bir nükleotid sekansının yer aldığı bir

15 nükleik asit; bir aktive edici RNA; bir aktive edici RNA kodlayan bir nükleotid sekansının yer aldığı bir nükleik asit; bir hedef gösteren RNA ve bir hedef gösteren RNA kodlayan bir nükleotid sekansının yer aldığı bir nükleik asit yukarıda ayrıntılarıyla anlatılmakta ve

20 açıklanmaktadır. Bir kit, aşağıda belirtilenlerden ikisini veya daha fazlasını ihtiva eden bir kompleks içerebilir: bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid; bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid kodlayan bir nükleotidin yer aldığı bir nükleik asit; bir DNA-hedefleyen RNA; bir DNA-hedefleyen RNA kodlayan bir nükleotid sekansının yer aldığı

25 bir nükleik asit; bir aktive edici RNA; bir aktive edici RNA kodlayan bir nükleotid sekansının yer aldığı bir nükleik asit; bir hedef gösteren RNA ve bir hedef gösteren RNA kodlayan bir nükleotid sekansının yer aldığı bir nükleik asit.

Buluşun bazı yapılarında, buluşa uygun bir kit, bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid ya da onu kodlayan bir polinükleotid ihtiva eder. Bazı uygulamalarda, belirli yer-hedefli modifiye edici polipeptidlerde şunlar bulunur: (a) DNA-hedefleyen RNA ile etkileşime giren bir RNA-bağlanımlı kısım ve (b) hedef DNA içerisinde modüle edilmiş transkripsiyon yerinin, DNA-hedefleyici RNA tarafından belirlendiği, hedef DNA içerisindeki transkripsiyonu modüle eden bir aktivite kısmı. Bazı durumlarda, bir yer-hedefli modifiye edici polipeptidin aktivite kısmı, azaltılmış veya inaktive edilmiş bir nükleaz aktivitesi sergiler. Bazı durumlarda, yer-hedefli modifiye edici polipeptid, bir kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptiddir.

Buluşun bazı yapılarında, buluşa uygun bir kitte şunlar bulunur: bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid veya onu kodlayan bir polinükleotid ve yer-hedefli modifiye edici polipeptidi sulandırmayı ve/veya seyreltmeyi sağlayan bir reaktif. Buluşun başka yapılarında, buluşa uygun bir kitte, bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid kodlayan bir nükleotidin yer aldığı bir nükleik asit (örneğin DNA, RNA) bulunur. Buluşun bazı yapılarında, buluşa uygun bir kitte şunlar bulunur: bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid kodlayan bir nükleotidin yer aldığı bir nükleik asit (DNA, RNA) ve yer-hedefli modifiye edici polipeptidi sulandırmayı ve/veya seyreltmeyi sağlayan bir reaktif.

25

Bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid veya onu kodlayan bir polinükleotid ihtiva eden buluşa uygun bir kitte, aşağıda belirtilenler arasından seçilebilecek olan bir veya daha fazla sayıda ek reaktif de

- bulunabilir: yer-hedefli modifiye edici polipeptidi bir hücrenin içerisine sokmayı sağlayan bir tampon; bir yıkama tamponu; bir kontrol reaktifi; bir kontrol ekspresyon vektörü veya RNA polinükleotidi; yer-hedefli modifiye edici polipeptidin DNA'dan in vitro ortamda üretimi için bir reaktif ve benzeri unsurlar. Bazı durumlarda, söz konusu bir kit içerisinde yer alan yer-hedefli modifiye edici polipeptid, yukarıda tanımlandığı gibi olan bir kimerik yer-hedefli modifiye edici polipeptiddir.
- 10 Buluşun bazı yapılarında, buluşa uygun bir kit, aşağıda belirtilenleri ihtiva eden bir DNA-hedefleyen RNA veya onu kodlayan bir DNA polinükleotidi içerir: DNA-hedefleyen RNA (a) bir hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı nitelikte bir nükleotid sekansı ihtiva eden bir birinci segment ve (b) bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid ile etkileşime giren bir ikinci segment içerir. Buluşun bazı yapılarında, DNA-hedefleyici RNA'da bir üçüncü segment (yukarıda tanımlandığı gibi) de bulunur. Buluşun bazı yapılarında, buluşa uygun bir kitte şunlar bulunur: (i) aşağıda belirtilenleri ihtiva eden bir DNA-hedefleyen RNA veya onu kodlayan bir DNA polinükleotidi: (a) bir hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı nitelikte bir nükleotid sekansı içeren bir birinci segment ve (b) bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid ile etkileşime giren bir ikinci segment; ve (ii) aşağıda belirtilenleri ihtiva eden bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid veya onu kodlayan bir polinükleotid: (a) DNA-hedefleyen RNA ile etkileşime giren bir RNA-bağımlı kısım ve (b) DNA-hedefleyen RNA'nın belirlediği bir yerde yer-hedefli enzimatik aktivite sergileyen bir aktivite kısmı. Buluşun bazı yapılarında, yer-hedefli modifiye edici polipeptidin aktivite kısmı enzimatik aktivite sergilemez (örneğin

mutasyon yoluyla inaktive edilmiş veya olmuş olan bir nükleaz içerir). Bazı durumlarda, kitte bir DNA-hedefleyen RNA ve bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid yer alır. Başka durumlarda, kitte şunlar bulunur: (i) bir DNA-hedefleyen RNA kodlayan bir nükleotid sekansının bulunduğu bir nükleik asit ve (ii) bir yer-hedefli modifiye edici polipeptidi kodlayan bir nükleotid sekansının bulunduğu bir nükleik asit.

Başka bir örnek vermek gerekirse, buluşa uygun bir kitte şunlar bulunabilir: (i) aşağıda belirtilenleri ihtiva eden bir DNA-hedefleyen RNA ya da onu kodlayan bir DNA polinükleotidi: (a) bir hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı nitelikte bir nükleotid sekansının yer aldığı bir birinci segment ve (b) bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid ile etkileşime giren bir ikinci segment; ve (ii) aşağıda belirtilenleri ihtiva eden yer-hedefli modifiye edici polipeptid ya da onu kodlayan polinükleotid: (a) DNA-hedefleyen RNA ile etkileşime giren bir RNA-bağlanımlı kısım ve (b) hedef DNA içerisinde modüle edilmiş transkripsiyon yerinin, DNA-hedefleyen RNA tarafından belirlendiği, hedef DNA içerisindeki transkripsiyonu modüle eden bir aktivite kısmı. Bazı durumlarda, kitte şunlar bulunur: (i) bir DNA-hedefleyen RNA ve (ii) bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid. Başka durumlarda, kitte şunlar bulunur: (i) bir DNA-hedefleyen RNA kodlayan bir nükleotid sekansının yer aldığı bir nükleik asit ve (ii) bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid kodlayan bir nükleotid sekansının yer aldığı bir nükleik asit.

Bu buluş, aşağıda belirtilenleri barındıran bir kit ortaya koyar: (1) aşağıda belirtilenleri ihtiva eden bir rekombinan ekspresyon vektörü:

(i) aşağıda sıralananları içeren bir DNA-hedefleyen RNA'yı kodlayan bir nükleotid sekansı: DNA-hedefleyen RNA (a) bir hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı nitelikte bir nükleotid sekansının yer aldığı bir birinci segment ve (b) bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid ile etkileşime giren bir ikinci segment içerir; ve (ii) aşağıda sıralananları ihtiva eden yer-hedefli modifiye edici polipeptidi kodlayan bir nükleotid sekansı: (a) DNA-hedefleyen RNA ile etkileşime giren bir RNA-bağlanımlı kısım ve (b) DNA-hedefleyen RNA'nın belirlediği bir yerde yer-hedefli enzimatik aktivite sergileyen bir aktivite kısmı; ve (2) ekspresyon vektörünü sulandırmayı ve/veya seyreltmeyi sağlayan bir reaktif.

Bu buluş, aşağıda belirtilenleri barındıran bir kit ortaya koyar: (1) aşağıda belirtilenleri ihtiva eden bir rekombinan ekspresyon vektörü: (i) aşağıda sıralananları içeren bir DNA-hedefleyen RNA'yı kodlayan bir nükleotid sekansı: DNA-hedefleyen RNA (a) bir hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı nitelikte bir nükleotid sekansının yer aldığı bir birinci segment ve (b) bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid ile etkileşime giren bir ikinci segment içerir; ve (ii) aşağıda sıralananları ihtiva eden yer-hedefli modifiye edici polipeptidi kodlayan bir nükleotid sekansı: (a) DNA-hedefleyen RNA ile etkileşime giren bir RNA-bağlanımlı kısım ve (b) hedef DNA içerisinde modüle edilmiş transkripsiyon yerinin, DNA-hedefleyen RNA tarafından belirlendiği, hedef DNA içerisindeki transkripsiyonu modüle eden bir aktivite kısmı; ve (2) ekspresyon vektörünü sulandırmayı ve/veya seyreltmeyi sağlayan bir reaktif.

Bu buluş, aşağıda belirtilenleri barındıran bir kit ortaya koyar: (1) aşağıda sıralananları ihtiva eden bir DNA-hedefleyen RNA'yı kodlayan bir nükleotid sekansının bulunduğu bir nükleik asit içeren bir rekombinan ekspresyon vektörü: (i) bir hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı nitelikte bir nükleotid sekansı ihtiva eden bir 5 birinci segment ve (ii) bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid ile etkileşime giren bir ikinci segment; ve (2) rekombinan ekspresyon vektörünü sulandırmayı ve/veya seyreltmeyi sağlayan bir reaktif. Bu kite ilişkin bazı buluş yapılarında, kitte şu bulunur: aşağıda 10 sıralananları içeren bir yer-hedefli modifiye edici polipeptidi kodlayan bir nükleotid sekansının yer aldığı bir rekombinan ekspresyon vektörü: (a) DNA-hedefleyen RNA ile etkileşime giren bir RNA-bağımlı kısım ve (b) DNA-hedefleyen RNA'nın belirlediği bir yerde yer-hedefli enzimatik aktivite sergileyen bir aktivite kısmı. Bu 15 kite ilişkin başka buluş yapılarında, kitte şu bulunur: aşağıda sıralananları içeren bir yer-hedefli modifiye edici polipeptidi kodlayan bir nükleotid sekansının yer aldığı bir rekombinan ekspresyon vektörü: (a) DNA-hedefleyen RNA ile etkileşime giren bir RNA-bağımlı kısım ve (b) hedef DNA içerisinde modüle edilmiş 20 transkripsiyon yerinin, DNA-hedefleyen RNA tarafından belirlendiği, hedef DNA içerisindeki transkripsiyonu modüle eden bir aktivite kısmı.

Yukarıdaki kitlerden herhangi birine ilişkin bazı buluş yapılarında, kit 25 bünyesinde bir aktive edici RNA veya bir hedef gösteren RNA bulunur. Yukarıdaki kitlerden herhangi birine ilişkin bazı buluş yapılarında, kitte bir tek moleküllü DNA-hedefleyen RNA bulunur. Yukarıdaki kitlerden herhangi birine ilişkin bazı buluş yapılarında,

kitte iki veya daha fazla sayıda çift moleküllü veya tek moleküllü DNA-hedefleyen RNA bulunur. Yukarıdaki kitlerden herhangi birine ilişkin bazı buluş yapılarında, bir DNA-hedefleyen RNA (örneğin iki veya daha fazla sayıda DNA-hedefleyen RNA'yı da içine alan bir anlamda), bir dizi (örneğin RNA moleküllerinden oluşan bir dizi, DNA-hedefleyen RNA(lar)ı kodlayan DNA moleküllerinden oluşan bir dizi ve benzeri) olarak temin edilebilir. Bu gibi kitler, örneğin, buluşa uygun bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid ihtiva eden yukarıda açıklandığı gibi olan genetiği değiştirilmiş konakçı hücreler ile birlikte kullanılabilirler. Yukarıdaki kitlerden herhangi birine ilişkin bazı buluş yapılarında, kitte, istenen genetik modifikasyonun gerçekleşmesini sağlamak üzere kite katılan bir donör polinükleotid de bulunur. Buluşa uygun bir kitin komponentleri ayrı kaplarda bulunabilecekleri gibi aynı kap bünyesinde de toplanabilirler.

15

Yukarıda açıklanan kitlerden herhangi birinde, aşağıda belirtilenler arasından seçilebilecek olan bir veya daha fazla sayıda ek reaktif de bulunabilir: bir seyreltme tamponu; bir sulandırma çözeltisi; bir yıkama tamponu; bir kontrol reaktifi; bir kontrol ekspresyon vektörü ya da RNA polinükleotidi; yer-hedefli modifiye edici polipeptidin DNA'dan in vitro üretimi için bir reaktif ve benzeri unsurlar.

20

Buluşa uygun bir kitte, yukarıda bahsi geçen komponentlerin yanı sıra, buluşa konu olan yöntemlerin uygulanışı esnasında kit komponentlerinin nasıl kullanılmaları gerektiğini açıklayan bir talimatname de bulunabilir. Buluş konusu yöntemlerin uygulanışını açıklayan bir talimatname genelde uygun bir kayıt ortamına kaydedilir. Talimatname örneğin kâğıt veya plastik ya da benzeri bir

25

alt malzemenin üzerine basılabilir. Talimatname kitlerde kitin veya komponentlerinin ya da benzeri unsurların bulunduğu kabın etiket bilgileri kapsamında (yani ambalaj malzemesiyle veya alt-ambalaj malzemesiyle bağlantılı bir yerde) bir kullanma talimatı olarak da sunulabilir. Buluşun başka yapılarında, talimatname, bilgisayarda okunabilir uygun bir saklama ortamında, örneğin CD-ROM, disket, flaş disk veya benzeri başka bir saklama ortamında bulunan bir elektronik saklama veri dosyası olarak sunulur. Buluşun yine başka yapılarında, talimatname fiilen kit bünyesinde yer almaz, fakat kullanıcının talimatnameyi kaynağından, örneğin internetten nasıl edinebileceği hakkında bilgi verilir. Bu buluş yapısına bir örnek olarak, talimatnamenin görüntülenebileceği ve/veya talimatnamenin indirilebileceği bir web adresinin bilgilerini içeren bir kit gösterilebilir. Talimatnamenin kite fiilen dahil edildiği durumda olduğu gibi, talimatnamenin nasıl edinilebileceği hakkındaki bilgiler de uygun bir alt malzemenin üzerine kaydedilir.

## **İNSAN OLMAYAN GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ ORGANİZMALAR**

20

Buluşun bazı yapılarında, bir genetiği değiştirilmiş konakçı hücrenin genetiği bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid (örneğin bir doğada kendiliğinden oluşan Cas9; bir modifiye, yani mutasyona uğratılmış veya varyant Cas9; bir kimerik Cas9 ve benzeri) kodlayan bir nükleotid sekansının bulunduğu bir eksojen nükleik asit ile değiştirilmiştir. Bu hücre bir ökaryotik tekhücreli organizma ise, modifiye edilen hücre bir genetiği değiştirilmiş organizma olarak değerlendirilebilir. Buluşun bazı yapılarında, ilgili insan olmayan

25



genetiği değiştirilmiş organizma bir Cas9 transgenik çokhücreli organizmadır.

Buluşun bazı yapılarında, buluşa uygun bir genetiği değiştirilmiş insan olmayan konakçı hücre (örneğin, bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid, örneğin bir doğada kendiliğinden oluşan Cas9, bir modifiye, yani mutasyona uğratılmış veya varyant Cas9, bir kimerik Cas9 veya benzeri bir Cas9 kodlayan bir nükleotid sekansının bulunduğu bir eksojen nükleik asit ile genetiği değiştirilmiş olan bir hücre), buluşa uygun bir genetiği değiştirilmiş insan olmayan organizma (örneğin bir fare, bir balık, bir kurbağa, bir sinek, bir solucan ve benzeri) oluşturabilir. Örneğin, eğer genetiği değiştirilmiş konakçı hücre bir pluripotent kök hücre (yani PSC) ya da bir germ hücresi (örneğin sperm, oosit ve benzeri) ise, genetiği değiştirilmiş hücreden bir genetiği değiştirilmiş organizma türetilir. Buluşun bazı yapılarında, genetiği değiştirilmiş konakçı hücre, ister in vivo ister in vitro ortamda bir genetiği değiştirilmiş organizmanın oluşmasını sağlayabilecek olan bir pluripotent kök hücre (örneğin ESC, iPSC, pluripotent bitki kök hücresi ve benzeri) ya da bir germ hücresidir (örneğin sperm hücresi, oosit ve benzeri). Buluşun bazı yapılarında, genetiği değiştirilmiş hücre bir omurgalı PSC'sidir (örneğin ESC, iPSC ve benzeri) ve bir genetiği değiştirilmiş organizma (örneğin bir PSC'yi bir blastokistin içerisine enjekte ederek bir kimerik/mozaik hayvan üretmek ve daha sonra bu hayvanı çiftleştirerek kimerik olmayan/mozaik olmayan genetiği değiştirilmiş organizmalar üretmek; bitkiler söz konusu ise greftleme yapmak suretiyle ve benzeri durumlarda benzeri uygulamalarla) üretmek için kullanılır. Aralarında burada açıklanan yöntemlerin de bulunduğu, bir

genetiği değiştirilmiş organizma üretmeyi sağlayan uygun yöntemler/protokollerden herhangi biri, bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid (örneğin bir doğada kendiliğinden oluşan Cas9; bir modifiye, yani mutasyona uğratılmış veya varyant Cas9; bir kimerik Cas9 ve benzeri) kodlayan bir nükleotid sekansının bulunduğu bir eksojen nükleik asit ihtiva eden bir genetiği değiştirilmiş konaçı hücre üretmek için uygundur. Genetiği değiştirilmiş organizmalar üretmeyi sağlayan yöntemler sektörde bilinmektedirler. Örneğin bkz: Cho et al., Curr Protoc Cell Biol. 2009 Mar;Chapter 19:Unit 19.11: Generation of transgenic mice;Gama et al., Brain Struct Funct. 2010 Mar;214(2-3):91-109. Epub 2009 Nov 25: Animal transgenesis: an overview;Husaini et al., GM Crops. 2011 Jun-Dec;2(3):150-62. Epub 2011 Jun 1: Approaches for gene targeting and targeted gene expression in plants.

15

Buluşun bazı yapılarında, bir genetiği değiştirilmiş organizma, buluşa konu olan yöntemlerle hedef alınabilecek bir hedef hücre içerir ve bu yüzden bir hedef hücre kaynağı olarak değerlendirilebilir. Örneğin, eğer bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid (örneğin bir doğada kendiliğinden oluşan Cas9; bir modifiye, yani mutasyona uğratılmış veya varyant Cas9; bir kimerik Cas9 ve benzeri) kodlayan bir nükleotid sekansının bulunduğu bir eksojen nükleik asit içeren bir genetiği modifiye edilmiş hücre kullanılarak bir genetiği değiştirilmiş organizma üretiliyse, bu genetiği değiştirilmiş organizmanın hücreleri, bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid (örneğin bir doğada kendiliğinden oluşan Cas9; bir modifiye, yani mutasyona uğratılmış veya varyant Cas9; bir kimerik Cas9 ve benzeri) kodlayan bir nükleotid sekansının bulunduğu bir eksojen nükleik asit

25

barındıracaklardır. Bu gibi bazı buluş yapılarında, genetiği değiştirilmiş organizmanın bir hücrenin veya hücrelerinin DNA'sı, bu hücre veya hücrelerin içerisine bir DNA-hedefleyen RNA (veya bir DNA-hedefleyen RNA kodlayan bir DNA) ve isteğe bağlı olarak bir donör nükleik asit sokularak, modifiye edilmek üzere hedef alınabilir. Orneğin, genetiği değiştirilmiş organizmanın bir hücre altkütmesine (örneğin beyin hücreleri, intestinal hücreler, böbrek hücreleri, akciğer hücreleri, kan hücreleri ve benzeri) bir DNA-hedefleyen RNA (ya da bir DNA-hedefleyen RNA kodlayan bir RNA) dahil edilerek, bu hücrelerin DNA'sı, sokulan DNA-hedefleyen RNA'nın DNA-hedefleyen sekansına bağlı belirli bir genomik konum üzerinden hedef alınabilir.

Buluşun bazı yapılarında bir genetiği değiştirilmiş organizma, buluşa konu olan yöntemlerle hedef alınabilecek hedef hücrelerin bulunduğu bir kaynaktır. Orneğin, bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid (örneğin bir doğada kendiliğinden oluşan Cas9; bir modifiye, yani mutasyona uğratılmış veya varyant Cas9; bir kimerik Cas9 ve benzeri) kodlayan bir nükleotid sekansının bulunduğu bir eksojen nükleik asit ile genetiği değiştirilmiş olan hücrelerin yer aldıkları bir genetiği değiştirilmiş organizma, genetiği değiştirilmiş hücrelerin, örneğin genetiği değiştirilmiş PSC'ler (örneğin ESC'ler, iPSC'ler, sperm, oositler ve benzeri), nöronlar, progenitör hücreler, kardiyomyositler ya da benzeri başka hücrelerin bulunduğu bir kaynak olarak değerlendirilebilir.

25

Buluşun bazı yapılarında, bir genetiği değiştirilmiş hücre, bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid (örneğin bir doğada kendiliğinden oluşan Cas9; bir modifiye, yani mutasyona uğratılmış veya varyant

- Cas9; bir kimerik Cas9 ve benzeri) kodlayan bir nükleotid sekansının bulunduğu bir eksojen nükleik asit içeren bir PSC'dir. Böyle bir durumda, söz konusu PSC bir hedef hücre olabilir, öyle ki PSC'nin DNA'sı, PSC'nin içerisine bir DNA-hedefleyen RNA (veya bir DNA-hedefleyen RNA kodlayan bir DNA) ve isteğe bağlı olarak bir donör nükleik asit sokularak, sokulan DNA-hedefleyen RNA'nın DNA-hedefleyen sekansına bağlı bir genomik konum üzerinden modifiye edilmek üzere hedef alınabilir. Dolayısıyla, buluşun bazı yapılarında, burada açıklanan yöntemler kullanılarak, buluşa uygun bir genetiği değiştirilmiş organizmadan elde edilen PSC'lerinin DNA'sı modifiye edilebilir (örneğin istenen herhangi bir genomik konum silinebilir ve/veya değiştirilebilir). Daha sonra bu modifiye PSC'ler kullanılarak, (i) hem bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid (örneğin bir doğada kendiliğinden oluşan Cas9; bir modifiye, yani mutasyona uğratılmış veya varyant Cas9; bir kimerik Cas9 ve benzeri) kodlayan bir nükleotid sekansının bulunduğu bir eksojen nükleik asit, (ii) hem de PSC'nin içerisine yerleştirilmiş DNA modifikasyonunu bünyesinde barındıran organizmalar üretilebilir.
- 20 Bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid (örneğin bir doğada kendiliğinden oluşan Cas9; bir modifiye, yani mutasyona uğratılmış veya varyant Cas9; bir kimerik Cas9 ve benzeri) kodlayan bir nükleotid sekansının bulunduğu bir eksojen nükleik asit, bilinmeyen bir promotörün (örneğin nükleik asit rastgele bir konakçı hücrenin genomuna entegre olduysa) kontrolü altında bulunabilir (yani o promotöre operabl bağlı olabilir) ya da bilinen bir promotörün kontrolü altında bulunabilir (yani o promotöre operabl bağlı olabilir). Uygun bilinen promotörlere örnek olarak her türlü bilinen promotör

- gösterilebilir ve bunlar arasında, konstitütif olarak aktif promotörler (örneğin CMV promotörü), indüklenebilir promotörler (örneğin ısı şok promotörü, tetrasiklinin düzenlediği promotör, steroidin düzenlediği promotör, metalin düzenlediği promotör, östrojen reseptörünün düzenlediği promotör ve benzeri), uzam bakımından ve/veya zaman bakımından kısıtları bulunan promotörler (örneğin bir doku-spesifik promotör, bir hücre tipi-spesifik promotör ve benzeri) ve benzeri promotörler bulunur.
- 10 Buluşa uygun bir genetiği değiştirilmiş organizma (örneğin bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid, örneğin bir doğada kendiliğinden oluşan Cas9, bir modifiye, yani mutasyona uğratılmış veya varyant Cas9, bir kimerik Cas9 veya benzeri bir Cas9 kodlayan bir nükleotid sekansının bulunduğu hücreler ihtiva eden bir organizma), herhangi
- 15 bir organizma, örneğin bit bitki, bir alg, bir omurgasız (bir sölenler, bir ekinoderm, bir solucan, bir sinek ve benzeri), bir omurgalı (örneğin bir balık (örneğin zebra balığı, balon balığı, Japon balığı ve benzeri), bir amfibi (örneğin semender, kurbağa ve benzeri), bir sürüngen, bir kuş, bir memeli ve benzeri), bir toynaklı (örneğin bir
- 20 keçi, bir domuz, bir koyun, bir inek ve benzeri), bir kemirgen (örneğin bir fare, bir sıçan, bir hamster, bir gine domuzu), bir tavşangil (örneğin bir tavşan) ya da benzeri başka bir organizma olabilir.

Bazı durumlarda, yer-hedefli modifiye edici polipeptid, Şekil 3'te

25 gösterilen Cas9/Csn1 amino asit sekansının 7-166 veya 731-1003 numaralı amino asitlerinden oluşan kısım ile ya da SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346'da gösterilen amino asit sekanslarından herhangi birindeki mütakabil kısımlar ile en az yaklaşık %75

oranında, en az yaklaşık %80 oranında, en az yaklaşık %85 oranında, en az yaklaşık %90 oranında, en az yaklaşık %95 oranında, en az yaklaşık %99 oranında ya da %100 oranında amino asit sekansı özdeşliğine sahip olan bir amino asit sekansı ihtiva eder.

5

### **Transgenik insan olmayan hayvanlar**

Yukarıda belirtildiği gibi, buluşun bazı yapılarında, buluşa uygun bir nükleik asit (örneğin, bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid kodlayan, örneğin bir doğada kendiliğinden oluşan Cas9, bir modifiye, 10 yani mutasyona uğratılmış veya varyant Cas9, bir kimerik Cas9 veya benzerinikodlayan bir nükleotid sekansı) ya da buluşa uygun bir rekombinan ekspresyon vektörü, bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid üreten bir transgenik hayvan oluşturmak için bir transgen olarak kullanılır. Dolayısıyla, bu buluş, yukarıda açıklandığı gibi, bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid kodlayan, örneğin bir doğada kendiliğinden oluşan Cas9, bir modifiye, yani mutasyona uğratılmış veya varyant Cas9, bir kimerik Cas9 veya benzerini kodlayan bir nükleotid sekansının bulunduğu buluşa uygun bir nükleik asit ihtiva eden bir transgenin yer aldığı bir transgenik insan olmayan hayvan da 15 ortaya koyar. Buluşun bazı yapılarında, transgenik insan olmayan hayvanın genomunda, bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid kodlayan buluşa uygun bir nükleotid sekansı bulunur. Buluşun bazı yapılarında, transgenik insan olmayan hayvan, genetik modifikasyon bakımından homozigottur. Buluşun bazı yapılarında, transgenik insan 20 olmayan hayvan, genetik modifikasyon bakımından heterozigottur. Buluşun bazı yapılarında, transgenik insan olmayan hayvan, bir omurgalı, örneğin bir balık (örneğin zebra balığı, Japon balığı, balon

balığı, mağara balığı ve benzeri), bir amfibi (kurbağa, semender ve benzeri), bir kuş (örneğin tavuk, hindi ve benzeri), bir sürüngen (örneğin yılan, kertenkele ve benzeri), bir memeli (bir toynaklı, 5 örneğin bir domuz, bir inek, bir keçi, bir koyun ve benzeri; bir tavşangil (örneğin bir tavşan); bir kemirgen (örneğin bir sıçan, bir fare); insan olmayan bir primat ve benzeri) ya da benzeri başka bir hayvandır.

Bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid (örneğin bir doğada 10 kendiliğinden oluşan Cas9; bir modifiye, yani mutasyona uğratılmış veya varyant Cas9; bir kimerik Cas9 ve benzeri) kodlayan bir nükleotid sekansının bulunduğu bir eksojen nükleik asit, bilinmeyen bir promotörün (örneğin nükleik asit rastgele bir konakçı hücrenin genomuna entegre olduysa) kontrolü altında bulunabilir (yani o 15 promotöre operabl bağlı olabilir) ya da bilinen bir promotörün kontrolü altında bulunabilir (yani o promotöre operabl bağlı olabilir). Uygun bilinen promotörlere örnek olarak her türlü bilinen promotör gösterilebilir ve bunlar arasında, konstitütif olarak aktif promotörler (örneğin CMV promotörü), indüklenebilir promotörler (örneğin ısı şok 20 promotörü, tetrasiklinin düzenlediği promotör, steroidin düzenlediği promotör, metalin düzenlediği promotör, östrojen reseptörünün düzenlediği promotör ve benzeri), uzam bakımından ve/veya zaman bakımından kısıtları bulunan promotörler (örneğin bir doku-spesifik promotör, bir hücre tipi-spesifik promotör ve benzeri) ve benzeri 25 promotörler bulunur.

Bazı durumlarda, yer-hedefli modifiye edici polipeptid, Şekil 3'te gösterilen Cas9/Csn1 amino asit sekansının 7-166 veya 731-1003

numaralı amino asitlerinden oluşan kısım ile ya da SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346'da gösterilen amino asit sekanslarından herhangi birindeki mütetekabil kısımlar ile en az yaklaşık %75 oranında, en az yaklaşık %80 oranında, en az yaklaşık %85 oranında, 5 en az yaklaşık %90 oranında, en az yaklaşık %95 oranında, en az yaklaşık %99 oranında ya da %100 oranında amino asit sekansı özdeşliğine sahip olan bir amino asit sekansı ihtiva eder.

### **Transgenik bitkiler**

10

Yukarıda belirtildiği gibi, buluşun bazı yapılarında, buluşa uygun bir nükleik asit (örneğin, bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid kodlayan, örneğin bir doğada kendiliğinden oluşan Cas9, bir modifiye, yani mutasyona uğratılmış veya varyant Cas9, bir kimerik Cas9 veya 15 benzeri bir Cas9 kodlayan bir nükleotid sekansı) ya da buluşa uygun bir rekombinan ekspresyon vektörü, bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid üreten bir transgenik bitki oluşturmak için bir transgen olarak kullanılır. Dolayısıyla, bu buluş, yukarıda açıklandığı gibi, bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid kodlayan, örneğin bir doğada 20 kendiliğinden oluşan Cas9, bir modifiye, yani mutasyona uğratılmış veya varyant Cas9, bir kimerik Cas9 veya benzeri bir Cas9 kodlayan bir nükleotid sekansının bulunduğu buluşa uygun bir nükleik asit ihtiva eden bir transgenin yer aldığı bir transgenik bitki de ortaya koyar. Buluşun bazı yapılarında, transgenik bitkinin genomunda, 25 buluşa uygun bir nükleik asit bulunur. Buluşun bazı yapılarında, transgenik bitki, genetik modifikasyon bakımından homozigottur. Buluşun bazı yapılarında, transgenik bitki, genetik modifikasyon bakımından heterozigottur.



Eksojen nükleik asitleri bitki hücrelerinin içerisine sokmayı sağlayan yöntemler sektörde iyi bilinmektedirler. Bu gibi bitki hücreleri, tanımı yukarıda verilmekte olan "transforme" hücreler olarak değerlendirilirler. Uygun yöntemler arasında, viral enfeksiyon (örneğin çift iplikçikli DNA virüsleri), transfeksiyon, konjugasyon, 5 protoplast füzyonu, elektroporasyon, partikül tabancası teknolojisi, kalsiyum fosfat presipitasyonu, direkt mikroenjeksiyon, silisyum karbür çubuk teknolojisi, *Agrobacterium* aracılı transformasyon ve benzeri yöntemler bulunur. Hangi yöntemin kullanılacağı, genelde, 10 transforme edilen hücre tipi ve transformasyon gerçekleştirileceği koşul ve şartlar (yani *in vitro*, *ex vivo* ya da *in vivo*) temelinde belirlenir.

Toprak bakterisi *Agrobacterium tumefaciens*'e dayanan 15 transformasyon yöntemleri, bir eksojen nükleik asit molekülünün bir vasküler bitkinin içerisine sokulmasında bilhassa faydalıdır. *Agrobacterium*'un yabani tip formu, konakçı bitkilerdeki taç tümörü büyümesini yönlendiren bir Ti (tümör indükleyici) plazmidi içerir. Ti plazmidinin tümör indükleyici T-DNA bölgesinin bir bitki genomuna 20 transferi, transferin yapılacağı bölgeyi betimleyici bir dizi direkt DNA tekrarını teşkil eden T-DNA sınırlarının ve ayrıca Ti plazmidinin kodladığı virülans genlerinin bulunmasını gerektirir. Bir *Agrobacterium* bazlı vektör, tümör indükleyici fonksiyonların yerini konakçı bitkiye dahil edilmesi hedeflenen nükleik asit sekansının 25 almış olduğu bir modifiye Ti plazmidi formudur.

*Agrobacterium* aracılı transformasyonda, genelde, *Agrobacterium* konakçısında kalıcı olarak yerleşik bulunan ve virülans genlerini

taşıyan bir yardımcı vektör ve T-DNA sekansları ile sınırlandırılmış ilgili geni ihtiva eden bir mekik vektörünün söz konusu olduğu ve Ti plazmidi komponentlerinin bu vektörler arasında bölüştürülmüş olduğu eş-entegre vektörler veya ikili vektör sistemleri kullanılır.

- 5 Sektörde iyi bilinen çeşitli ikili vektörler bulunmaktadır; bunlardan bazıları örneğin Clontech (Palo Alto, Calif.) firmasından temin edilebilirler. *Agrobacterium*'u kültürlenmiş bitki hücreleri veya yaralı dokuyla, örneğin yaprak dokusu, kök eksplantları, hipokotiledonlar, gövde parçaları veya yumrularla birlikte kültürlemeyi sağlayan
- 10 yöntemler de sektörde iyi bilinmektedirler. Örneğin bkz: Glick and Thompson, (eds.), *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Boca Raton, Fla.: CRC Press (1993).

- Buluşa uygun bir transgenik bitki üretmek için mikroprojektil aracılı
- 15 transformasyon da kullanılabilir. İlk olarak Klein ve arkadaşları (*Nature* 327:70-73 (1987)) tarafından tanımlanmış ve tarif edilmiş olan bu yöntem, altın veya tungsten gibi mikroprojektilere dayanmakta ve bu yöntemde bu mikroprojektiler, kalsiyum klorür, spermidin veya polietilen glikolle presipitasyon gerçekleştirilerek
- 20 istenen nükleik asit molekülü ile kaplanmaktadırlar. Mikroprojektil partikülleri, BIOLISTIC PD-1000 (Biorad; Hercules Calif.) gibi bir cihaz kullanılarak bir anjiyosperm dokusunun içerisinde yüksek hızda hızlandırılmaktadırlar.

- 25 Buluşa uygun bir nükleik asit bir bitkinin içerisine bükleik asidin bitki hücre(ler)ine örneğin bir *in vivo* veya *ex vivo* protokol aracılığıyla giriş yapabilmesini sağlayacak bir şekilde yerleştirilebilir. "*In vivo*" ile kastedilen, nükleik asidin bir canlı bitkinin vücudunda örneğin

infiltrasyon yoluyla uygulanmasıdır. "Ex vivo" ile kastedilen ise, hücreler veya eksplantların bitkinin dışında modifiye edilmeleri ve daha sonra bu hücreler veya organların bitkide rejenere edilmeleridir. Bitki hücrelerinin stabil transformasyonu için ya da transgenik

5 bitkilerin oluşturulması için uygun pek çok vektör tanımlanmış ve tarif edilmiştir ve bunlar arasında, örneğin "Weissbach and Weissbach, (1989) Methods for Plant Molecular Biology Academic Press" ve "Gelvin et al., (1990) Plant Molecular Biology Manual, Kluwer Academic Publishers" eserlerinde açıklananlar bulunmaktadır.

10 Spesifik örnekler olarak, *Agrobacterium tumefaciens*'in bir Ti plazmidinden türetilenler ve ayrıca, "Herrera-Estrella et al. (1983) Nature 303: 209", "Bevan (1984) Nucl Acid Res. 12: 8711-8721" ve "Klee (1985) Bio/Technolo 3: 637-642" eserlerinde açıklananlar gösterilebilir. Alternatif olarak, DNA'yı bitkilerin ve hücrelerin

15 içerisine serbest DNA uygulama teknikleriyle aktarmak için Ti olmayan vektörler de kullanılabilir. Bu yöntemlerle, buğday, pirinç (Christou (1991) Bio/Technology 9:957-9 and 4462) ve mısır (Gordon-Kamm (1990) Plant Cell 2: 603-618) gibi transgenik bitkiler üretilebilir. Tek çenekli bitkilere istinaden, partikül tabancası

20 kullanılan direkt DNA uygulama tekniklerinde (Weeks et al. (1993) Plant Physiol 102: 1077-1084; Vasil (1993) Bio/Technolo 10: 667-674; Wan and Lemeaux (1994) Plant Physiol 104: 37-48 ) ve *Agrobacterium* aracılı DNA transferinde (Ishida et al. (1996) Nature Biotech 14: 745-750) bir immatür embriyo da iyi bir hedef doku

25 olarak değerlendirilebilir. Kloroplastların içerisine DNA sokmak için kullanılacak örnek niteliğindeki yöntemler arasında, biyolistik bombardıman, protoplastların polietilen glikolle transformasyonu ve mikroenjeksiyon sayılabilir (Danieli et al Nat. Biotechnol 16:345-348,

- 1998;Staub et al Nat. Biotechnol 18: 333-338, 2000;O'Neill et al Plant J. 3:729-738, 1993;Knoblauch et al Nat. Biotechnol 17: 906-909; 5.451.313, 5.545.817, 5.545.818 ve 5.576.198 sayılı ABD patentleri; WO 95/16783 sayılı uluslararası patent başvurusu; Boynton et al.,
- 5 Methods in Enzymology 217: 510-536 (1993);Svab et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 913-917 (1993);McBride et al., Proc. Nati. Acad. Sci. USA91: 7301-7305 (1994)). Biyolistik bombardıman, protoplastların polietilen glikolle transformasyonu ve mikroenjeksiyon yöntemleri için uygun herhangi bir vektör, kloroplast
- 10 transformasyonuna yönelik bir hedefleme vektörü olarak kullanıma uygun olacaktır. Başta aktarım yönteminde Agrobacterium'un kullanılmadığı durumlarda olmak üzere, bir transformasyon vektörü olarak herhangi bir çift iplikçikli DNA vektörü kullanılabilir.
- 15 Genetiği değiştirilebilecek olan bitkiler arasında, tahıllar, yem bitkileri, meyveler, sebzeler, yağlı tohum bitkileri, palmiyeler, orman ağaçları ve asmalar bulunur. Modifiye edilebilecek spesifik bitki örnekleri arasında şunlar sayılabilir: mısır, muz, yerfıstığı, bezelye, ayçiçeği, domates, kanola, tütün, buğday, arpa, yulaf, patates, soya,
- 20 pamuk, karanfil, sorgum, acıbakla ve pirinç.

Bu buluşta aynı zamanda transforme bitki hücreleri ve transforme bitki hücreleri içeren dokular, bitkiler ve ürünler de konu edilmektedir. Buluşa konu olan transforme hücreler ve onları içeren

25 dokular ve ürünlerin bir özelliği, genomun içerisine entegre edilmiş buluşa uygun bir nükleik asidin mevcut olması ve bitki hücrelerinin bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid, örneğin bir doğada kendiliğinden oluşan Cas9, bir modifiye, yani mutasyona uğratılmış

veya varyant Cas9, bir kimerik Cas9 ya da benzeri başka bir Cas9 üretmesidir. Buluşa konu olan rekombinan bitki hücreleri, rekombinan hücre popülasyonları olarak ya da bir doku, tohum, tam bitki, gövde, meyve, yaprak, kök, çiçek, sap, yumru, dane, hayvan yemi, bir bitki 5 sahası veya benzeri bir unsur olarak kullanıma uygundurlar.

Bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid (örneğin bir doğada kendiliğinden oluşan Cas9; bir modifiye, yani mutasyona uğratılmış veya varyant Cas9; bir kimerik Cas9 ve benzeri) kodlayan bir 10 nükleotid sekansının bulunduğu bir nükleik asit, bilinmeyen bir promotörün (örneğin nükleik asit rastgele bir konakçı hücrenin genomuna entegre olduysa) kontrolü altında bulunabilir (yani o promotöre operabl bağlı olabilir) ya da bilinen bir promotörün kontrolü altında bulunabilir (yani o promotöre operabl bağlı olabilir). 15 Uygun bilinen promotörlere örnek olarak her türlü bilinen promotör gösterilebilir ve bunlar arasında, konstitütif olarak aktif promotörler, indüklenebilir promotörler, uzam bakımından ve/veya zaman bakımından kısıtları bulunan promotörler ve benzeri promotörler bulunur.

20

Bazı durumlarda, yer-hedefli modifiye edici polipeptid, Şekil 3'te gösterilen Cas9/Csn1 amino asit sekansının 7-166 veya 731-1003 numaralı amino asitlerinden oluşan kısım ile ya da SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346'da gösterilen amino asit sekanslarından 25 herhangi birindeki mütakabil kısımlar ile en az yaklaşık %75 oranında, en az yaklaşık %80 oranında, en az yaklaşık %85 oranında, en az yaklaşık %90 oranında, en az yaklaşık %95 oranında, en az

yaklaşık %99 oranında ya da %100 oranında amino asit sekansı özdeşliğine sahip olan bir amino asit sekansı ihtiva eder.

Bu buluşta, buluşa uygun bir transgenik bitkinin ürettiği unsurlar da konu edilmekte ve bunlar arasında tohumlar, projeni bitkileri ve klonal unsurlar yer almaktadır.

## TANIMLAR - BÖLÜM II

10 Burada bir nükleik asit, bir polipeptid, bir hücre veya bir organizmayla bağlantılı bir şekilde kullanılan "doğada kendiliğinden oluşan" ya da "modifiye edilmemiş" terimi, doğada bulunduğu halini korumakta olan bir nükleik asit, polipeptid, hücre veya organizmaya atıf yapar. Örneğin, doğadaki bir kaynaktan izole edilebilecek olan ve laboratuvar ortamında insanlar tarafından kasıtlı olarak modifiye edilmemiş olan 15 bir organizmada (virüsler de dahil) bulunan bir polipeptid veya polinükleotid sekansı bir doğada kendiliğinden oluşan sekanstır.

Burada kullanıldığı anlamıyla "heterolog", mütakabil nativ nükleik asit veya proteinde bulunmayan bir nükleotid veya polipeptid sekansı anlamına gelir. Örneğin, bir füzyon varyant Cas9 yer-hedefli polipeptidinde, bir varyant Cas9 yer-hedefli polipeptidi, bir heterolog polipeptide (yani Cas9 dışındaki bir polipeptide) füzyonlanabilir. Heterolog polipeptid, füzyon varyant Cas9 yer-hedefli polipeptidi 25 tarafından da sergilenecek olan bir aktivite (örneğin enzimatik aktivite) sergileyebilir. Bir heterolog nükleik asit sekansı bir varyant Cas9 yer-hedefli polipeptidine (örneğin genetik mühendisliği yoluyla)

bağlanarak bir füzyon varyant Cas9 yer-hedefli polipeptidi kodlayan bir nükleotid sekansı oluşturulabilir.

"Kimerik polipeptid" terimi, doğada kendiliğinden oluşmayan, 5 örneğin bir amino asit sekansının normalde birbirlerinden ayrı olan iki segmenti insan müdahalesiyle artifisyel olarak kombine edilerek yapılan bir polipeptide atıf yapar. Dolayısıyla bir kimerik polipeptid de insan müdahalesinin sonucu oluşan bir unsurdur. Bu bağlamda, bir kimerik amino asit sekansı içeren bir polipeptid bir kimerik 10 polipeptiddir.

"Yer-hedefli modifiye edici polipeptid" veya "RNA-bağlanımlı yer-hedefli polipeptid" veya "RNA-bağlanımlı yer-hedefli modifiye edici polipeptid" terimi kullanıldığında atıf yapılan, RNA'ya bağlanan ve 15 belirli bir DNA sekansına yönlendirilen bir polipeptiddir. Burada tanımlandığı gibi olan bir yer-hedefli polipeptid, bağlı olduğu RNA molekülünün yönlendirmesiyle belirli bir DNA sekansını hedef alır. RNA molekülü, hedef DNA içerisindeki bir hedef sekansı tamamlayıcı nitelikte olan bir sekans içerir ve bu sayede, bağlı olduğu 20 polipeptidin hedef DNA içerisindeki belirli bir konumu (hedef sekans) hedef almasını sağlar.

Buluşun bazı yapılarında, buluşa uygun bir nükleik asitte (örneğin bir DNA-hedefleyen RNA, bir DNA-hedefleyen RNA kodlayan bir 25 nükleotid sekansının bulunduğu bir nükleik asit, bir yer-hedefli polipeptid kodlayan bir nükleik asit ve benzeri), bir ek cazip özellik (örneğin modifiye veya düzenlenmiş stabilite; hücre içi hedefleme; takip, örneğin bir floresan etiket; bir protein veya protein kompleksi

- için bir bağlanma yeri ve benzeri) sağlayan bir modifikasyon veya sekans bulunur. Buna verilebilecek örnekler arasında, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, bir 5' başlığı (örneğin bir 7-metilguanilat başlığı ( $m^7G$ )), bir 3' poliadenile kuyruğu (yani bir 3' poli(A) kuyruğu), bir
- 5 ribo-anahtar sekansı (örneğin düzenlenmiş stabiliteye ve/veya proteinlerin ve/veya protein komplekslerinin erişimine istinaden düzenlenmiş erişilebilirliğe olanak sağlamak için), RNA'yı bir hücre içi konuma (örneğin nükleus, mitokondri, kloroplastlar ve benzeri unsurlar) yönlendiren bir modifikasyon veya sekans, takibe olanak
- 10 sağlayan bir modifikasyon veya sekans (örneğin bir floresan moleküle doğrudan konjugasyon, floresan belirleme yapmayı kolaylaştıran bir moietye konjugasyon, floresan belirleme yapmaya olanak sağlayan bir sekans ve benzeri), proteinler (örneğin, transkripsiyonel aktivatörler, transkripsiyonel baskılayıcılar, DNA metiltransferazlar,
- 15 DNA demetilazlar, histon asetiltransferazlar, histon deasetilazlar ve benzerlerinin örnek gösterilebileceği, DNA'ya etki eden proteinler) için bir bağlanma yeri sağlayan bir modifikasyon veya sekans ve bunlardan oluşan kombinasyonlar sayılabilir.
- 20 Buluşun bazı yapılarında, bir DNA-hedefleyen RNA, 5' veya 3' ucunda yukarıda açıklanan özelliklerden herhangi birini sağlayan bir ek segment barındırır. Örneğin uygun bir üçüncü segmentte, bir 5' başlığı (örneğin bir 7-metilguanilat başlığı ( $m^7G$ )), bir 3' poliadenile kuyruğu (yani bir 3' poli(A) kuyruğu), bir ribo-anahtar sekansı
- 25 (örneğin düzenlenmiş stabiliteye ve/veya proteinlerin ve protein komplekslerinin erişimine istinaden düzenlenmiş erişilebilirliğe olanak sağlamak için), RNA'yı bir hücre içi konuma (örneğin nükleus, mitokondri, kloroplastlar ve benzeri unsurlar) yönlendiren bir sekans,



5 takibe olanak sağlayan bir modifikasyon veya sekans (örneğin bir floresan moleküle doğrudan konjugasyon, floresan belirleme yapmayı kolaylaştıran bir moietye konjugasyon, floresan belirleme yapmaya olanak sağlayan bir sekans ve benzeri), proteinler (örneğin, transkripsiyonel aktivatörler, transkripsiyonel baskılayıcılar, DNA metiltransferazlar, DNA demetilazlar, histon asetiltransferazlar, histon deasetilazlar ve benzerlerinin örnek gösterilebileceği, DNA'ya etki eden proteinler) için bir bağlanma yeri sağlayan bir modifikasyon veya sekans ya da bunlardan oluşan herhangi bir kombinasyon  
10 bulunabilir.

Buluşa uygun bir DNA-hedefleyen RNA ile buluşa uygun bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid birlikte bir kompleks oluştururlar (yani kovalent olmayan etkileşimler aracılığıyla bağlanırlar). DNA-  
15 hedefleyen RNA, bir hedef DNA'nın bir sekansını tamamlayıcı nitelikte bir nükleotid sekansı ihtiva etmesi sayesinde komplekse hedef spesifisitesi kazandırır. Kompleksteki yer-hedefli modifiye edici polipeptid ise yer-spesifik aktiviteyi sağlar. Diğer bir deyişle, yer-hedefli polipeptid, DNA-hedefleyen RNA'nın protein-bağlanımlı  
20 segmenti ile kurduğu ilişki sayesinde bir hedef DNA sekansına (örneğin bir kromozomal nükleik asitteki bir hedef sekans; bir ekstrakromozomal nükleik asitteki, örneğin bir epizomal nükleik asit, bir mini-daire veya benzeri bir unsurdaki bir hedef sekans; bir mitokondriyal nükleik asitteki bir hedef sekans; bir kloroplast nükleik  
25 asidindeki bir hedef sekans; bir plazmiddeki bir hedef sekans ya da benzeri bir hedef sekans) doğru yönlendirilir.

Bazı uygulamalarda, iki ayrı RNA molekülü (RNA polinükleotidleri) ihtiva eden ve burada bir "çift moleküllü DNA-hedefleyen RNA" veya bir "iki moleküllü DNA-hedefleyen RNA" olarak atıf yapılan söz konusu bir DNA-hedefleyen RNA da burada konu edilmektedir.

- 5 Buluşun başka yapılarında, konu edilen bir DNA-hedefleyen RNA bir tekil RNA molekülüdür (tekil RNA polinükleotidi) ve burada bir "tek moleküllü DNA-hedefleyen RNA" olarak anılmaktadır. "DNA-hedefleyen RNA" terimi, aksi belirtilmedikçe, hem çift moleküllü DNA-hedefleyen RNA'ları hem de tek moleküllü DNA-hedefleyen
- 10 RNA'ları içine alan bir anlam taşımaktadır.

- Bir söz konusu iki moleküllü DNA-hedefleyen RNA iki ayrı RNA molekülü (bir "hedef gösteren RNA" ve bir "aktive edici RNA") ihtiva eder. Buluşa uygun bir iki moleküllü DNA-hedefleyen RNA'nın bu iki
- 15 RNA molekülünden her biri, diğerindeki nükleotid kesitini tamamlayıcı nitelikte olan bir nükleotid kesiti içerir ve bahsi geçen iki RNA molekülündeki söz konusu tamamlayıcı nükleotid kesitleri hibridize olarak protein-bağlanımlı segmentin çift iplikçikli RNA dubleksini oluştururlar.

20

- Buluşa uygun bir tek moleküllü DNA-hedefleyen RNA, birbirlerini tamamlayıcı nitelikte olan, ara nükleotidler ("bağlayıcılar" veya "bağlayıcı nükleotidler") aracılığıyla birbirlerine kovalent bağlı olan ve hibridize olup protein-bağlanımlı segmentin çift iplikçikli RNA
- 25 dubleksini (dsRNA dubleksi) oluşturarak bir sap-ilmik yapısı meydana getiren iki nükleotid kesiti (bir hedef gösteren RNA ve bir aktive edici RNA) ihtiva eder. Hedef gösteren RNA ve aktive edici RNA, hedef RNA'nın 3' ucu ve aktive edici RNA'nın 5' ucu üzerinden

birbirlerine kovalent bağlanabilirler. Alternatif olarak, hedef gösteren RNA ve aktive edici RNA, hedef gösteren RNA'nın 5' ucu ve aktive edici RNA'nın 3'u üzerinden birbirlerine kovalent bağlanabilirler.

- 5 Bir iki moleküllü DNA-hedefleyen RNA örneğinde, bir crRNA benzeri ("CRISPR RNA'sı" veya "hedef gösteren RNA" veya "crRNA" veya "crRNA tekrarı") molekül ve bir mütakabil tracrRNA benzeri ("trans-etkili CRISPR RNA'sı" veya "aktive edici RNA") molekül bulunur. Bir crRNA benzeri molekül (hedef gösteren RNA),
- 10 hem DNA-hedefleyen RNA'nın DNA-hedefleyen segmentini (tek iplikçikli) hem de DNA-hedefleyen RNA'nın protein-bağlanımlı segmentinin dsRNA dubleksinin bir yarısını oluşturan bir nükleotid kesiti ("dubleks oluşturucu segment") ihtiva eder. Bir mütakabil tracrRNA benzeri molekül (aktive edici RNA) ise, DNA-hedefleyen
- 15 RNA'nın protein-bağlanımlı segmentinin dsRNA dubleksinin diğer yarısını oluşturan bir nükleotid kesiti (dubleks oluşturucu segment) içerir. Başka bir deyişle, bir crRNA benzeri moleküldeki nükleotid kesiti, bir tracrRNA benzeri moleküldeki nükleotid kesitini tamamlayıcı niteliktedir ve onunla hibridize olarak DNA-hedefleyen
- 20 RNA'nın protein-bağlanımlı domaininin dsRNA dubleksini oluşturur. Buna bağlı olarak, her crRNA benzeri molekülde bir mütakabil tracrRNA benzeri molekül bulunduğu söylenebilir. CrRNA benzeri molekül ayrıca tek iplikçikli DNA-hedefleyen segment de sağlar. Dolayısıyla bir crRNA benzeri ve bir tracrRNA benzeri molekül (bir
- 25 mütakabil çift olarak) hibridize olarak bir DNA-hedefleyen RNA oluştururlar. Belirli bir crRNA veya tracrRNA molekülünün tam sekansı, bu RNA moleküllerinin buldukları türe özgü olur.

"Aktive edici RNA" terimi burada bir çift moleküllü DNA-hedefleyen RNA'nın bir tracrRNA benzeri molekülü anlamında kullanılmaktadır. "Hedef gösteren RNA" terimi burada bir çift moleküllü DNA-hedefleyen RNA'nın bir crRNA benzeri molekülü anlamında kullanılmaktadır. "Dubleks oluşturucu segment" terimi burada bir mütakabil aktive edici RNA veya hedef gösteren RNA molekülündeki ardışık bir dizi nükleotidin oluşturduğu bir kesite hibridize olmak suretiyle onunla birlikte dsRNA dubleksinin oluşumuna katkıda bulunan bir aktive edici RNA veya bir hedef gösteren RNA'daki ardışık bir dizi nükleotidin oluşturduğu bir kesite atfen kullanılmaktadır. Diğer bir deyişle, bir aktive edici RNA, mütakabil hedef gösteren RNA'nın dubleks oluşturucu segmentini tamamlayıcı nitelikte olan bir dubleks oluşturucu segment ihtiva eder. Bir aktive edici RNA bir dubleks oluşturucu segment içerirken, bir hedef gösteren RNA hem bir dubleks oluşturucu segment hem de DNA-hedefleyen RNA'nın DNA-hedefleyen segmentini içerir. Dolayısıyla, buluşa uygun bir çift moleküllü DNA-hedefleyen RNA, herhangi bir mütakabil aktive edici RNA ve hedef gösteren RNA çiftinden oluşabilir.

20

Bir iki moleküllü DNA-hedefleyen RNA, bir hedef gösteren RNA ile bir aktive edici RNA'nın kontrollü (yani belirli bir şarta bağlı) bir bağlanım gerçekleştirilmelerine olanak sağlayacak bir şekilde tasarlanabilir. Aktive edici RNA ile hedef gösteren RNA dCas9'un bulunduğu bir fonksiyonel komplekste bağlı olmadıkları sürece bir iki moleküllü DNA-hedefleyen RNA işlev gösteremeyeceği için, bir iki moleküllü DNA-hedefleyen RNA, aktive edici RNA ile hedef gösteren RNA arasındaki bağlanım indüklenebilir hale getirilerek

25

indüklenebilir (örneğin ilaçla indüklenebilir) nitelikte hazırlanabilir. Bu bağlamda sınırlayıcı olmayan bir örnek vermek gerekirse, aktive edici RNA'nın hedef gösteren RNA'ya bağlanımını düzenlemek (yani kontrol altında tutmak) için RNA aptamerlerinden istifade edilebilir.

- 5 Buna bağlı olarak, aktive edici RNA ve/veya hedef gösteren RNA'da bir RNA aptameri sekansı bulunabilir.

RNA aptamerleri sektörde bilinen unsurlardır ve genel itibarıyla ribo-anahtarın bir sentetik versiyonunu teşkil ederler. "RNA aptameri" ve  
10 "ribo-anahtar" terimleri burada birbirlerine alternatif terimler gibi kullanılmakta olup, bir parçasını teşkil ettikleri RNA molekülünün yapısı (ve dolayısıyla spesifik sekansların bulunma durumu) için indüklenebilir bir düzenlenme olanağı sağlayan hem sentetik hem de doğal nükleik asit sekanslarını içine alan bir anlam taşımaktadırlar.

15

RNA aptamerleri sektörde bilinen unsurlardır ve genel itibarıyla ribo-anahtarın bir sentetik versiyonunu teşkil ederler. "RNA aptameri" ve "ribo-anahtar" terimleri burada birbirlerine alternatif terimler gibi kullanılmakta olup, bir parçasını teşkil ettikleri RNA molekülünün  
20 yapısı (ve dolayısıyla spesifik sekansların bulunma durumu) için indüklenebilir bir düzenlenme olanağı sağlayan hem sentetik hem de doğal nükleik asit sekanslarını içine alan bir anlam taşımaktadırlar. RNA aptamerleri, genelde, katlanıp belirli bir yapı (örneğin bir saç tokası) haline gelen ve bu yapıya büründüğünde belirli bir ilaca  
25 (örneğin bir küçük molekül) spesifik bağlanabilen bir sekans ihtiva ederler. İlaça bağlanması sonucunda RNA'nın katlanmasında yapısal bir değişim meydana gelir ve bu değişim de aptamerin bir parçasını teşkil ettiği nükleik asidin bir özelliğinde bir değişikliğe yol açar.

Buna verilebilecek örneklerden bazıları şunlardır: (i) bir aptamer bulunan bir aktive edici RNA, aptamer uygun ilaca bağlanmadığı sürece kognat hedef gösteren RNA'ya bağlanma kabiliyetini ortaya koyamayabilir; (ii) bir aptamer bulunan bir hedef gösteren RNA, aptamer uygun ilaca bağlanmadığı sürece kognat aktive edici RNA'ya bağlanma kabiliyetini ortaya koyamayabilir ve (iii) her ikisi de farklı birer ilaca bağlanan farklı birer aptamer ihtiva eden bir hedef gösteren RNA ile bir aktive edici RNA, bahsi geçen her iki ilaç da mevcut olmadığı sürece birbirlerine bağlanma kabiliyetlerini ortaya koyamayabilirler. Bu örneklerden anlaşılacağı üzere, bir iki moleküllü DNA-hedefleyen RNA, indüklenebilir olacak şekilde tasarlanabilir.

Aptamer ve ribo-anahtar örnekleri için örneğin aşağıda sıralanan eserlere bakılabilir: Nakamura et al., *Genes Cells*. 2012 May;17(5):344-64; Vavalle et al., *Future Cardiol*. 2012 May;8(3):371-82; Citartan et al., *Biosens Bioelectron*. 2012 Apr 15;34(1):1-11; Liberman et al., *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2012 May-Jun;3(3):369-84.

20

Bir iki moleküllü DNA-hedefleyen RNA'ya dahil edilebilecek nükleotid sekanslarına örnek olarak, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, SEKANS KOD NO.: 671-678'de gösterilen aktive edici RNA'lardan herhangi birinin dubleks oluşturucu segmenti ile bir çift oluşturabilecek olan hedef gösteren RNA'lar (örneğin SEKANS KOD NO.: 566-567) gösterilebilir.

25

Örnek niteliğindeki bir tek moleküllü DNA-hedefleyen RNA,

hibridize olup bir dsRNA dubleksini oluşturan iki tamamlayıcı nükleotid kesiti ihtiva eder. Buluşun bazı yapılarında, tek molekül DNA-hedefleyen RNA'nın iki tamamlayıcı nükleotid kesitinden biri (ya da onu kodlayan DNA), en az 8 adet bitişik nükleotidden oluşan bir kesit

5 boyunca SEKANS KOD NO.: 431-562'de gösterilen aktive edici RNA (tracrRNA) sekanslarından biri ile en az yaklaşık %60 oranında özdeştir. Tek molekül DNA-hedefleyen RNA'nın iki tamamlayıcı nükleotid kesitinden biri (ya da onu kodlayan DNA), örneğin, en az 8 adet bitişik nükleotidden oluşan bir kesit boyunca SEKANS KOD

10 NO.: 431-562'de gösterilen tracrRNA sekanslarından biri ile en az yaklaşık %65 oranında, en az yaklaşık %70 oranında, en az yaklaşık %75 oranında, en az yaklaşık %80 oranında, en az yaklaşık %85 oranında, en az yaklaşık %90 oranında, en az yaklaşık %95 oranında, en az yaklaşık %98 oranında, en az yaklaşık %99 oranında ya da

15 %100 oranında özdeştir.

Buluşun bazı yapılarında, tek molekül DNA-hedefleyen RNA'nın iki tamamlayıcı nükleotid kesitinden biri (ya da onu kodlayan DNA), en az 8 adet bitişik nükleotidden oluşan bir kesit boyunca SEKANS KOD

20 NO.: 563-679'da gösterilen hedef gösteren RNA (crRNA) sekanslarından biri ile en az yaklaşık %60 oranında özdeştir. Tek molekül DNA-hedefleyen RNA'nın iki tamamlayıcı nükleotid kesitinden biri (ya da onu kodlayan DNA), örneğin, en az 8 adet bitişik nükleotidden oluşan bir kesit boyunca SEKANS KOD NO.:

25 563-679'da gösterilen crRNA sekanslarından biri ile en az yaklaşık %65 oranında, en az yaklaşık %70 oranında, en az yaklaşık %75 oranında, en az yaklaşık %80 oranında, en az yaklaşık %85 oranında, en az yaklaşık %90 oranında, en az yaklaşık %95 oranında, en az

yaklaşık %98 oranında, en az yaklaşık %99 oranında ya da %100 oranında özdeştir.

Burada kullanıldığı anlamıyla bir "konakçı hücre", bir nükleik asidin alıcısı olarak kullanılabilir veya kullanılmış olan bir in vivo veya in vitro ökaryotik hücre, bir prokaryotik hücre (örneğin bakteri veya arke hücresi) ya da bir tekhücreli varlık olarak kültürlenmiş bir çok hücreli organizmadan (örneğin bir hücre hattı) edinilen bir hücredir ve nükleik asit ile transforme edilmiş olan orijinal hücrenin progenisini de içine alan bir anlam taşır. Bir tek hücrenin progenisinin doğal, arızeli veya kasıtlı mutasyonlardan dolayı orijinal parent hücre ile morfoloji ya da genomik veya toplam DNA tamamlayıcısı bakımından tamamen özdeş olmayabileceği anlaşılacaktır. Bir "rekombinan konakçı hücre" (bir "genetiği değiştirilmiş konakçı hücre" de denmektedir), bir heterolog nükleik asidin, örneğin bir ekspresyon vektörünün sokulmuş olduğu bir konakçı hücredir. Örneğin, buluşa uygun bir bakteriyel konakçı hücre, bir eksojen nükleik asidin (örneğin plazmid veya rekombinan ekspresyon vektörü) uygun bir bakteriyel konakçı hücreye sokulması yoluyla elde edilmiş bir genetiği değiştirilmiş bakteriyel konakçı hücredir ve buluşa uygun bir ökaryotik konakçı hücre, bir eksojen nükleik asidin uygun bir ökaryotik konakçı hücreye sokulması yoluyla elde edilmiş bir genetiği değiştirilmiş ökaryotik konakçı hücredir (örneğin bir memeli germ hücresi).

25

"Tanımlar - Bölüm I'de" sunulan tanımlamalar, bu bölüm için geçerlidir; terimler hakkında daha ayrıntılı bilgi almak için "Tanımlar - Bölüm I"e bakınız.



Buluş daha ayrıntılı bir dille açıklanmadan önce, bu buluşun burada açıklanan buluş yapıları ile sınırlı olmadığı, bu buluşa ilişkin başka yapıların da oluşturulabileceği anlaşılmalıdır. Ayrıca burada kullanılan terminolojinin sadece belirli buluş yapılarını açıklamak amacıyla kullanıldığı ve buluşun bu terminoloji ile sınırlı olmadığı, zira buluşun yalnızca ekteki istemler ile sınırlı olduğu da unutulmamalıdır.

Bir değer aralığının belirtildiği durumlarda, değer aralığının geçtiği içerikte açıkça aksi belirtilmediği sürece o değer aralığının alt limitinin onda birler basamağına bir yazılarak gösterilen değere varana dek değer aralığının üst ve alt limitleri arasında kalan her ara değer ve belirtilen aralık dahilindeki diğer her türlü belirtilmiş değer veya ara değer de bu buluşun kapsamına girdiği açıktır. Belirtilen aralığın özel olarak kapsamı dışında bırakılmış olabilecek limitlere tâbi olarak, bu daha küçük aralıkların üst ve alt limitleri birbirlerinden bağımsız olarak daha küçük aralıkların dahilinde sayılabilir veya sayılmayabilirler ve yine bu buluşun kapsamına girerler. Belirtilen aralığın ilgili limitlerden birini veya her ikisini de bünyesinde barındırdığı durumlara istinaden, bu limitlerden birini veya her ikisini de dışarıda bırakan aralıklar da bu buluşun kapsamına girerler.

Açıkça aksine işaret eden bir anlamda tanımlanmadıkça, burada geçen tüm teknik ve bilimsel terimler, buluşun ilgili olduğu sektörde olağan bilgi ve beceri sahibi uzmanların ilk bakışta anlayacakları anlamlarda kullanılmaktadırlar. Bu buluşun uygulanışı veya test edilişi sırasında burada belirtilenlere benzer veya eşdeğer başka yöntem ve materyallerin kullanılmasının bir sakıncası olmamakla birlikte, burada

sunulmakta olan yöntemler ve materyallerin, kullanılması tercih edilen yöntemler ve materyaller oldukları bilinmelidir.

Burada ve ekli istemlerde kullanılan "bir", "bu" ve "o" tekil formlarının, içerikte açıkça aksi belirtilmedikçe, atıf yaptıkları unsurların çoğul hallerini de içine alan bir anlam taşıdıkları gözden kaçırılmamalıdır. Bundan dolayı, bir "enzimatik olarak inaktif Cas9 polipeptidi"ne atıf yapıldığında aslında o polipeptitten bir veya daha fazla sayıda bulunuyor olabileceği ve belirli bir "hedef nükleik asit"e atıf yapıldığında aslında o nükleik asitten ve sektörde bilgi ve beceri sahibi uzmanlarca bilinen muadillerinden bir veya daha fazla sayıda bulunuyor olabileceği de dikkate alınmalı ve başka unsurlara ilişkin benzer durumlarda da aynı gerçek akılda tutulmalıdır. Ayrıca istemlerin herhangi bir isteğe bağlı elemanı dışarıda bırakacak şekilde tasarlanabilecekleri not edilmelidir. Bu beyanın yapılmasının amacı, istem konusu elemanlar belirtilirken onlarla birlikte "tek başına", "yalnızca", "sadece" ve benzeri dışlayıcı bir terminolojinin kullanılabileceğini ya da bir "negatif" sınırlamanın söz konusu olabileceğini önceden haber vermektir.

20

Açıkça anlaşılmaları için ayrı buluş yapıları kapsamında tanımlanan ve tarif edilen belirli buluş özellikleri, tek bir buluş yapısı kapsamında kombinasyon halinde de sunulabilirler. Benzer şekilde, kısaca özetlemek maksadıyla aynı buluş yapısı kapsamında tanımlanan ve tarif edilen çeşitli buluş özellikleri, uygun alt-kombinasyonlar halinde ya da ayrı ayrı da sunulabilirler. Bu buluşa ilişkin yapılardan oluşan tüm kombinasyonlar, burada ayrı ayrı tüm ayrıntılarıyla açıklanmış ve ortaya konmuş olsunlar ya da olmasınlar, bu buluşun kapsamı

25

dahilinde sayılırlar. Bunun yanı sıra, çeşitli buluş yapıları ve bu yapılardaki çeşitli elemanlardan oluşan tüm alt-kombinasyonlar da, burada ayrı ayrı tüm ayrıntılarıyla açıklanmış ve ortaya konmuş olsunlar ya da olmasınlar, bu buluşun kapsamı dahilinde sayılırlar.

5

Burada tartışılan yayınlar, yalnızca bu yayınları bu patent başvurusunun başvuru tarihinden önce açıklamak maksadıyla sunulmaktadırlar. Burada yapılan beyanların hiçbiri, bu buluşun bu patent açıklamasına önceki buluş sebebiyle daha erken bir tarih atma  
10 hakkına sahip olmadığının kabulü anlamında yorumlanamaz. Ek olarak, sunulan yayın tarihleri, fiili yayın tarihlerinden farklı olabilir ve bunun da bağımsız şekilde teyit edilmesi gerekebilir.

## **AYRINTILI TARİFNAME - BOLUM II**

15 Mevcut tarifname bir konakçı hücredeki bir hedef nükleik asidin transkripsiyonunu modüle etmeye yönelik yöntemler sağlamaktadır. Bu yöntemler, genel itibarıyla, hedef nükleik asidin bir enzimatik olarak inaktif Cas9 polipeptidi ve bir tekil yönlendirici RNA ile temas ettirilmesine dayanırlar. Bu yöntemler, tedarik edilen çeşitli  
20 uygulamalarda kullanıma uygundur.

Bu tarifname kapsamında açıklanan transkripsiyonel modülasyon yöntemi, RNAi'ye dayanan yöntemlerin dezavantajlarından bazılarının üstesinden gelmektedir. Bu buluşa konu olan transkripsiyonel  
25 modülasyon yöntemi, aralarında araştırma uygulamaları, ilaç keşfi (örneğin yüksek çıktılı tarama), hedef validasyonu, endüstriyel uygulamalar (örneğin ekin mühendisliği, mikrobiyal mühendislik ve benzeri), tanı uygulamaları, terapötik uygulamalar ve görüntüleme

tekniklerinin de bulunduğu birçok farklı uygulama kapsamında kullanılabilir.

## **TRANSKRİPSİYONU MODULE ETME YONTEMLERİ**

5

Bu buluş, bir konakçı hücredeki bir hedef DNA'nın transkripsiyonunu seçici olarak module etmeyi sağlayan bir yöntem sağlar. Bu yöntemde genelde şu yapılıır: a) konakçı hücrenin içerisine aşağıda sıralanan unsurların sokulması: i) bir DNA-hedefleyen RNA ya da DNA-  
10 hedefleyen RNA'yı kodlayan bir nükleotid sekansının bulunduğu bir nükleik asit ve ii) azaltılmış bir endodeoksiribonükleaz aktivitesi sergileyen bir varyant Cas9 yer-hedefli polipeptidi ("varyant Cas9 polipeptidi") ya da varyant Cas9 polipeptidini kodlayan bir nükleotid sekansının bulunduğu bir nükleik asit.

15

DNA-hedefleyen RNA ("crRNA" veya "yönlendirici RNA" veya "gRNA" olarak da anılmaktadır) şunları içerir: i) bir hedef DNA'daki bir hedef sekansı tamamlayıcı nitelikte bir nükleotid sekansı ihtiva eden bir birinci segment; ii) bir yer-hedefli polipeptid ile etkileşime  
20 giren bir ikinci segment ve iii) bir transkripsiyonel terminatör. Bir hedef DNA'daki bir hedef sekansı tamamlayıcı nitelikte bir nükleotid sekansı ihtiva eden birinci segmente burada bir "hedefleme segmenti" olarak atıf yapılmaktadır. Bir yer-hedefli polipeptid ile etkileşime giren ikinci segmente burada bir "protein-bağlanımlı sekans" veya  
25 "dCas9-bağlanımlı saç tokası" veya "dCas9 sapı" olarak da atıf yapılmaktadır. "Segment" terimi, bir molekülün bir segmenti/bölümü/bölgesini, örneğin bir RNA'daki ardışık sıralı nükleotidlerden oluşan bir kesiti temsil eder. "Segment", terimin

- geçtiği bağlamda açıkça aksini ifade eden bir ifade bulunmadığı sürece, belirli bir toplam baz çifti sayısı ile sınırlı değildir ve toplam uzunlukları herhangi bir değerde olan ve aralarında başka molekülleri tamamlayıcı nitelikte bölgeler de bulunan veya bulunmayan RNA molekülü bölgeleri içerir. Bu buluşa konu olan bir DNA-hedefleyen RNA, burada bir "tek molekül DNA-hedefleyen RNA", bir "tekil yönlendirici RNA" ya da bir "sgRNA" olarak da atıf yapılmakta olan bir tekil RNA molekülüdür (tekil RNA polinükleotidi. Mevcut buluşa göre DNA-hedefleyen RNA iki RNA molekülünden oluşmaktadır. Bu 5 10 tarifnamede geçen "DNA-hedefleyen RNA" ya da "gRNA" terimi, hem iki molekül DNA-hedefleyen RNA'ları hem de tek molekül DNA-hedefleyen RNA'ları (yani sgRNA'ları) içine alan bir anlam taşımaktadır.
- 15 Varyant Cas9 yer-hedefli polipeptidi şunları içerir: i) DNA-hedefleyen RNA ile etkileşime giren bir RNA-bağımlı kısım ve ii) azaltılmış endodeoksiribonükleaz aktivitesi sergileyen bir aktivite kısmı.

20 DNA-hedefleyen RNA ile varyant Cas9 polipeptidi konakçı hücrede bir kompleks oluştururlar ve bu kompleks, konakçı hücredeki bir hedef DNA'nın transkripsiyonunu seçici olarak modüle eder.

25 Bazı durumlarda, buluşa konu olan bir transkripsiyon modüle etme yöntemi, bir konakçı hücredeki bir hedef nükleik asidin transkripsiyonunu seçici olarak modüle eder (örneğin azaltır veya artırır). Örneğin, bir hedef nükleik asidin transkripsiyonunun "seçici" olarak azaltılması, bir DNA-hedefleyen RNA/varyant Cas9 polipeptidi kompleksinin bulunmadığı durumda hedef nükleik aside

istinaden kaydedilen transkripsiyon seviyesine kıyasla hedef nükleik asidin transkripsiyonunun en az yaklaşık %10, en az yaklaşık %20, en az yaklaşık %30, en az yaklaşık %40, en az yaklaşık %50, en az yaklaşık %60, en az yaklaşık %70, en az yaklaşık %80, en az yaklaşık %90 ya da %90'dan daha yüksek bir oranda azalmasını sağlar. Bir hedef nükleik asidin transkripsiyonunun seçici olarak azaltılması, hedef nükleik asidin transkripsiyonunun azalmasını sağlarken, hedef olmayan bir nükleik asidin transkripsiyonunda hemen hemen hiç azalmaya neden olmaz, örneğin hedef olmayan bir nükleik asidin transkripsiyonunda bir miktar azalmaya neden olsa da bu azalmanın düzeyi, DNA-hedefleyen RNA/varyant Cas9 polipeptidi kompleksinin bulunmadığı durumda hedef olmayan nükleik aside istinaden kaydedilen transkripsiyon seviyesine kıyasla %10'u geçmez.

### 15 **Artırılmış transkripsiyon**

Bir hedef DNA'nın transkripsiyonunun "seçici" olarak artırılması, bir DNA-hedefleyen RNA/varyant Cas9 polipeptidi kompleksinin bulunmadığı durumda hedef DNA'ya istinaden kaydedilen transkripsiyon seviyesine kıyasla hedef DNA'nın transkripsiyonunun en az yaklaşık 1,1 kat (örneğin en az yaklaşık 1,2 kat, en az yaklaşık 1,3 kat, en az yaklaşık 1,4, kat, en az yaklaşık 1,5 kat, en az yaklaşık 1,6 kat, en az yaklaşık 1,7 kat, en az yaklaşık 1,8 kat, en az yaklaşık 1,9 kat, en az yaklaşık 2 kat, en az yaklaşık 2,5 kat, en az yaklaşık 3 kat, en az yaklaşık 3,5 kat, en az yaklaşık 4 kat, en az yaklaşık 4,5 kat, en az yaklaşık 5 kat, en az yaklaşık 6 kat, en az yaklaşık 7 kat, en az yaklaşık 8 kat, en az yaklaşık 9 kat, en az yaklaşık 10 kat, en az yaklaşık 12 kat, en az yaklaşık 15 kat ya da en az yaklaşık 20 kat)

artmasını sağlar. Bir hedef DNA'nın transkripsiyonunun seçici olarak artırılması, hedef DNA'nın transkripsiyonunun artmasını sağlarken, hedef olmayan bir DNA'nın transkripsiyonunda hemen hemen hiç artışa neden olmaz, örneğin hedef olmayan bir DNA'nın transkripsiyonunda bir miktar artışa neden olsa da bu artışın düzeyi, DNA-hedefleyen RNA/varyant Cas9 polipeptidi kompleksinin bulunmadığı durumda hedef olmayan nükleik aside istinaden kaydedilen transkripsiyon seviyesinin yaklaşık 5 katını (örneğin yaklaşık 4 katını, yaklaşık 3 katını, yaklaşık 2 katını, yaklaşık 1,8 katını, yaklaşık 1,6 katını, yaklaşık 1,4 katını, yaklaşık 1,2 katını ya da yaklaşık 1,1 katını aşmaz.

Sınırlayıcı olmayan bir örnek vermek gerekirse, bahsi geçen artış, dCas9'u bir heterolog sekansa füzyonlamak suretiyle elde edilebilir. Uygun füzyon partnerleri arasında, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, doğrudan hedef DNA'ya ya da hedef DNA ile ilişkili bir polipeptide (örneğin bir histon ya da başka bir DNA-bağlanımlı protein) etki etmek suretiyle transkripsiyonu dolaylı olarak artıran bir aktivitenin söz konusu olduğu bir polipeptid sayılabilir. Uygun füzyon partnerleri arasında, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, metiltransferaz aktivitesi, demetilaz aktivitesi, asetiltransferaz aktivitesi, deasetilaz aktivitesi, kinaz aktivitesi, fosfataz aktivitesi, ubiquitin ligaz aktivitesi, deubikitinasyon aktivitesi, adenilasyon aktivitesi, deadenilasyon aktivitesi, SUMOilasyon aktivitesi, deSUMOilasyon aktivitesi, ribozilasyon aktivitesi, deribozilasyon aktivitesi, miristoilasyon aktivitesi ya da demiristoilasyon aktivitesi sağlayan polipeptidler bulunur.

Diğer uygun füzyon partnerlerine örnek olarak, sadece bununla sınırlı kalmaksızın, hedef nükleik asidin transkripsiyonunda direkt olarak artış sağlayan bir poliopeptid (örneğin bir transkripsiyon aktivatörü veya onun bir fragmanı, bir transkripsiyon aktivatörü barındıran bir protein veya protein fragmanı, bir küçük molekül/ilaca duyarlı transkripsiyon düzenleyicisi ve benzeri) gösterilebilir.

Bir dCas9 füzyon proteini kullanarak bir prokaryottaki transkripsiyonu artırmaya yönelik söz konusu yöntemlere verilebilecek örneklerden biri, bakteriyel tek hibrit (B1H) veya iki hibrit (B2H) sisteminin modifiye edilmesine dayanır. B1H sisteminde, bir DNA bağlanma domaini (BD) bir bakteriyel transkripsiyon aktivasyon domainine (AD, örneğin *Escherichia coli* RNA polimerazın alfa alt-birimi (RNAP $\alpha$ )). füzyonlanır. Dolayısıyla, söz konusu bir dCas9, bir AD içeren bir heterolog sekansa füzyonlanabilir. Söz konusu dCas9 füzyon proteini bir promotörün upstream bölgesine (DNA-hedefleyen RNA tarafından orada hedef alınır) ulaştığında, dCas9 füzyon proteininin AD'si (örneğin RNAP $\alpha$ ) RNAP holoenzimini alarak transkripsiyonu aktive eder. B2H sisteminde, BD AD'ye doğrudan füzyonlanmaz; bunun yerine, bir protein-protein etkileşimi (örneğin GAL11P - GAL4 etkileşimi) bunlar arasındaki etkileşime aracılık eder. Söz konusu yöntemlerde kullanmak üzere böyle bir sistemi modifiye etmek için, dCas9, protein-protein etkileşimi sağlayan bir birinci protein sekansına (örneğin maya GAL11P ve/veya GAL4 proteini) füzyonlanabilir ve RNA $\alpha$ , protein-protein etkileşimini tamamlayan bir ikinci protein sekansına (örneğin dCas9'a GAL11P füzyonlandığıysa GAL4, dCas9'a GAL4 füzyonlandığıysa GAL11P ve benzeri) füzyonlanabilir. GAL11P



ile GAL4 arasındaki bağlanma afinitesi, bağlanma etkinliğini ve transkripsiyon ateşlenme hızını artırır.

Bir dCas9 füzyon proteini kullanarak bir ökaryottaki transkripsiyonu artırmaya yönelik söz konusu yöntemlere verilebilecek örneklerden biri, dCas9'un bir aktivasyon domainine (AD) (örneğin GAL4, herpes virüsü aktivasyon proteini VP16 veya VP64, insan nükleer faktörü NF- $\kappa$ B p65 alt-birimi ve benzeri) füzyonlanmasına dayanır. Sistemi indüklenebilir hale getirmek için, dCas9 füzyon proteininin ekspresyonu bir indüklenebilir promotör (örneğin Tet-AÇIK, Tet-KAPALI ve benzeri) ile kontrol altında tutulabilir. DNA-hedefleyen RNA, bilinen transkripsiyon cevap elemanları (örneğin promotörler, artırıcılar ve benzeri), bilinen upstream aktive edici sekanslar (UAS), bilinmeyen veya bilinen fonksiyonlar barındıran ve hedef DNA'nın ekspresyonunu kontrol altında tutma kabiliyetine sahip olduğundan şüphelenilen sekanslar ve benzeri unsurları hedef gösterecek şekilde tasarlanabilirler.

### **Ek füzyon partnerleri**

Transkripsiyonu artırmak veya azaltmak amacıyla kullanılacak füzyon partneri örnekleri **Şekil 54**'te listelenmektedir ve bunlar arasında, transkripsiyon aktive edici ve transkripsiyon baskılayıcı domainler (örneğin Krüppel ilişkili kutu (KRAB ya da SKD); Mad mSIN3 etkileşim domaini (SID); ERF baskılayıcı domaini (ERD) ve benzeri) bulunmaktadır. Bu gibi bazı durumlarda, dCas9 füzyon proteini DNA-hedefleyen RNA tarafından hedef DNA'daki spesifik bir konuma (yani sekansa) yönlendirilir ve RNA polimerazın

(transkripsiyon aktive edici fonksiyonu seçici olarak inhibe eden) bir promotöre bağlanımını bloke etmek ve/veya lokal kromatin durumunu modifiye etmek (örneğin, hedef DNA'yı modifiye eden ya da hedef DNA ile ilişkili bir polipeptidi modifiye eden bir füzyon sekansı kullanıldığında) gibi bir lokus-spesifik düzenleyici işlev gösterir. Bazı durumlarda, değişimler geçicidir (örneğin transkripsiyonun baskılanması veya aktivasyonu) Bazı durumlarda, değişimler kalıtsaldır (örneğin hedef DNA'da ya da hedef DNA ile ilişkili proteinlerde, örneğin nükleozomal histonlarda epigenetik modifikasyonlar yapıldığında).

Buluşun bazı yapılarında, heterolog sekans, dCas9 polipeptidinin C-terminal ucuna füzyonlanabilir. Buluşun bazı yapılarında, heterolog sekans, dCas9 polipeptidinin N-terminal ucuna füzyonlanabilir. Buluşun bazı yapılarında, heterolog sekans, dCas9 polipeptidinin bir iç kısmına (yani N- veya C-terminusu dışındaki bir kısmına) füzyonlanabilir.

Buluşu uygun bir dCas9 füzyon proteini kullanılan bir yöntemin biyolojik etkileri uygun herhangi bir yöntemle (örneğin gen ekspresyonu eseyleri; kromatin bazlı eseyler, örneğin kromatin immünopresipitasyonu (ChiP), kromatin in vivo eseyi (CiA) ve benzeri ya da benzeri başka yöntemlerle) tespit edilebilir.

Bazı durumlarda, söz konusu bir yöntemde iki veya daha fazla sayıda farklı DNA-hedefleyen RNA kullanılır. Örneğin, her ikisi de aynı hedef nükleik asitteki iki farklı hedef sekansı hedef gösteren iki farklı DNA-hedefleyen RNA aynı konakçı hücrede kullanılabilir.

- Dolayısıyla, söz konusu bir transkripsiyonel modülasyon yönteminde, konakçı hücrenin içerisine aşağıda belirtilen unsurları ihtiva eden bir ikinci DNA-hedefleyen RNA ya da bu ikinci DNA-hedefleyen RNA'yı kodlayan bir nükleotid sekansının yer aldığı bir nükleik asidi de sokulabilir: i) hedef DNA'daki bir ikinci hedef sekansı tamamlayıcı nitelikte bir nükleotid sekansı içeren bir birinci segment; ii) yer-hedefli polipeptid ile etkileşime giren bir ikinci segment ve iii) bir transkripsiyonel terminatör. Bazı durumlarda, Aynı hedef nükleik asitteki iki farklı hedef sekansı hedef gösteren iki farklı DNA-hedefleyen RNA'nın kullanılması hedef nükleik asitteki transkripsiyonun modülasyonunu (örneğin azaltma veya artırma) artırır.
- 5
- 10
- 15 Bir diğer örneğe göre, iki farklı DNA-hedefleyen RNA'nın iki farklı hedef nükleik asidi hedef gösteren iki farklı DNA-hedefleyen RNA aynı konakçı hücrede kullanılabilirler. Dolayısıyla, buluşa uygun bir transkripsiyonel modülasyon yönteminde, örneğin, konakçı hücrenin içerisine aşağıda belirtilen unsurları ihtiva eden bir ikinci DNA hedefleyen RNA ya da bu ikinci DNA-hedefleyen RNA'yı kodlayan bir nükleotid sekansının yer aldığı bir nükleik asit de sokulabilir: i) asgari olarak bir ikinci hedef DNA'daki bir hedef sekansı tamamlayıcı nitelikte bir nükleotid sekansı içeren bir birinci segment; ii) yer-hedefli polipeptid ile etkileşime giren bir ikinci segment ve iii) bir transkripsiyonel terminatör.
- 20
- 25

Buluşun bazı yapılarında, buluşa uygun bir nükleik asitte (örneğin bir DNA-hedefleyen RNA, örneğin bir tek moleküllü DNA-hedefleyen

RNA, bir aktive edici RNA, bir hedef gösteren RNA ve benzeri; bir donör polinükleotid; bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid kodlayan bir nükleik asit ve benzeri), bir ek cazip özellik (örneğin modifiye veya düzenlenmiş stabilite; hücre içi hedefleme; takip, 5 örneğin bir floresan etiket; bir protein veya protein kompleksi için bir bağlanma yeri ve benzeri) sağlayan bir modifikasyon veya sekans bulunur. Buna verilebilecek örnekler arasında, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, bir 5' başlığı (örneğin bir 7-metilguanilat başlığı ( $m^7G$ )), bir 3' poliadenile kuyruğu (yani bir 3' poli(A) kuyruğu), bir ribo- 10 anahtar sekansı veya bir aptamer sekansı (örneğin düzenlenmiş stabiliteye ve/veya proteinlerin ve/veya protein komplekslerinin erişimine istinaden düzenlenmiş erişilebilirliğe olanak sağlamak için), bir terminatör sekans, bir dsRNA dubleks (yani bir saç tokası) oluşturan bir sekans, RNA'yı bir hücre içi konuma (örneğin nükleus, 15 mitokondri, kloroplastlar ve benzeri unsurlar) yönlendiren bir modifikasyon veya sekans, takibe olanak sağlayan bir modifikasyon veya sekans (örneğin bir floresan moleküle doğrudan konjugasyon, floresan belirleme yapmayı kolaylaştıran bir moietye konjugasyon, floresan belirleme yapmaya olanak sağlayan bir sekans ve benzeri), 20 proteinler (örneğin, transkripsiyonel aktivatörler, transkripsiyonel baskılayıcılar, DNA metiltransferazlar, DNA demetilazlar, histon asetiltransferazlar, histon deasetilazlar ve benzerlerinin örnek gösterilebileceği, DNA'ya etki eden proteinler) için bir bağlanma yeri sağlayan bir modifikasyon veya sekans ve bunlardan oluşan 25 kombinasyonlar sayılabilir.

### **DNA-hedefleyen segment**

Bir DNA-hedefleyen RNA'nın ("crRNA") DNA-hedefleyen segmenti (ya da "DNA-hedefleyen sekans"ı), bir hedef DNA içerisindeki (hedef  
5 DNA'nın tamamlayıcı iplikçiğindeki) spesifik bir sekansı tamamlayıcı nitelikte olan bir nükleotid sekansı ihtiva eder.

Başka bir deyişle, buluşa uygun bir DNA-hedefleyen RNA'nın DNA-hedefleyen segmenti, bir hedef DNA ile hibridizasyon (yani baz  
10 eşleşmesi) yoluyla sekans-spesifik bir şekilde etkileşime girer. DNA-hedefleyen segmentin nükleotid sekansı çeşitlilik gösterebilir ve DNA-hedefleyen RNA ile hedef DNA'nın hedef DNA içerisinde etkileşime gireceği konumu belirler. Buluşa uygun bir DNA-hedefleyen RNA'nın DNA-hedefleyen segmenti, segmentin hedef  
15 DNA içerisindeki istenen herhangi bir sekansa hibridize olmasını sağlayacak bir modifikasyona uğratılabilir (örneğin genetik mühendisliği yoluyla).

DNA-hedefleyen segment, yaklaşık 12 nükleotid ile yaklaşık 100  
20 nükleotid arası bir sayıda nükleotidi kapsayan bir uzunluğa sahip olabilir. DNA-hedefleyen segment, örneğin, yaklaşık 12 nükleotid (nt) ile yaklaşık 80 nt, yaklaşık 12 nt ile yaklaşık 50 nt, yaklaşık 12 nt ile yaklaşık 40 nt, yaklaşık 12 nt ile yaklaşık 30 nt, yaklaşık 12 nt ile yaklaşık 25 nt, yaklaşık 12 nt ile yaklaşık 20 nt ya da yaklaşık 12 nt ile  
25 yaklaşık 19 nt arası bir sayıda nükleotidi kapsayan bir uzunluğa sahip olabilir. DNA-hedefleyen segment, örneğin, yaklaşık 19 nt ile yaklaşık 20 nt, yaklaşık 19 nt ile yaklaşık 25 nt, yaklaşık 19 nt ile yaklaşık 30 nt, yaklaşık 19 nt ile yaklaşık 35 nt, yaklaşık 19 nt ile

yaklaşık 40 nt, yaklaşık 19 nt ile yaklaşık 45 nt, yaklaşık 19 nt ile yaklaşık 50 nt, yaklaşık 19 nt ile yaklaşık 60 nt, yaklaşık 19 nt ile yaklaşık 70 nt, yaklaşık 19 nt ile yaklaşık 80 nt, yaklaşık 19 nt ile yaklaşık 90 nt, yaklaşık 19 nt ile yaklaşık 100 nt, yaklaşık 20 nt ile yaklaşık 25 nt, 20 nt ile yaklaşık 30 nt, 20 nt ile yaklaşık 35 nt, 20 nt ile yaklaşık 40 nt, 20 nt ile yaklaşık 45 nt, 20 nt ile yaklaşık 50 nt, 20 nt ile yaklaşık 60 nt, 20 nt ile yaklaşık 70 nt, 20 nt ile yaklaşık 80 nt, 20 nt ile yaklaşık 90 nt ya da 20 nt ile yaklaşık 100 nt arası bir sayıda nükleotidi kapsayan bir uzunluğa sahip olabilir.

10

DNA-hedefleyen segmentin hedef DNA'daki bir nükleotid sekansını (hedef sekans) tamamlayıcı nitelikte olan nükleotid sekansı (DNA-hedefleyen sekans), en az yaklaşık 12 nükleotidi kapsayan bir uzunluğa sahip olabilir. DNA-hedefleyen segmentin hedef DNA'daki bir hedef sekansı tamamlayıcı nitelikte olan DNA-hedefleyen sekansı, örneğin, en az yaklaşık 12 nt, en az yaklaşık 15 nt, en az yaklaşık 18 nt, en az yaklaşık 19 nt, en az yaklaşık 20 nt, en az yaklaşık 25 nt, en az yaklaşık 30 nt, en az yaklaşık 35 nt ya da en az yaklaşık 40 nükleotidi kapsayan bir uzunluğa sahip olabilir. DNA-hedefleyen segmentin hedef DNA'daki bir hedef sekansı tamamlayıcı nitelikte olan DNA-hedefleyen sekansı, örneğin, yaklaşık 12 nükleotid (nt) ile yaklaşık 80 nt, yaklaşık 12 nt ile yaklaşık 50 nt, yaklaşık 12 nt ile yaklaşık 45 nt, yaklaşık 12 nt ile yaklaşık 40 nt, yaklaşık 12 nt ile yaklaşık 35 nt, yaklaşık 12 nt ile yaklaşık 30 nt, yaklaşık 12 nt ile yaklaşık 25 nt, yaklaşık 12 nt ile yaklaşık 20 nt, yaklaşık 12 nt ile yaklaşık 19 nt, yaklaşık 19 nt ile yaklaşık 20 nt, yaklaşık 19 nt ile yaklaşık 25 nt, yaklaşık 19 nt ile yaklaşık 30 nt, yaklaşık 19 nt ile yaklaşık 35 nt, yaklaşık 19 nt ile yaklaşık 40 nt, yaklaşık 19 nt ile

25

yaklaşık 45 nt, yaklaşık 19 nt ile yaklaşık 50 nt, yaklaşık 19 nt ile yaklaşık 60 nt, yaklaşık 20 nt ile yaklaşık 25 nt, 20 nt ile yaklaşık 30 nt, 20 nt ile yaklaşık 35 nt, 20 nt ile yaklaşık 40 nt, 20 nt ile yaklaşık 45 nt, 20 nt ile yaklaşık 50 nt ya da 20 nt ile yaklaşık 60 nt arası bir sayıda nükleotidi kapsayan bir uzunluğa sahip olabilir. DNA-hedefleyen segmentin hedef DNA'daki bir nükleotid sekansını (hedef sekans) tamamlayıcı nitelikte olan nükleotid sekansı (DNA-hedefleyen sekans) en az yaklaşık 12 nükleotidi kapsayan bir uzunluğa sahip olabilir.

10

Bazı durumlarda, DNA-hedefleyen segmentin hedef DNA'daki bir hedef sekansı tamamlayıcı nitelikte olan DNA-hedefleyen sekansı 20 nükleotid uzunluğundadır. Bazı durumlarda, DNA-hedefleyen segmentin hedef DNA'daki bir hedef sekansı tamamlayıcı nitelikte olan DNA-hedefleyen sekansı 19 nükleotid uzunluğundadır.

15

DNA-hedefleyen segmentin DNA-hedefleyen sekansı ile hedef DNA'nın hedef sekansı arasındaki tamamlayıcılık oranı en az yaklaşık %60 (örneğin en az %65, en az %70, en az %75, en az %80, en az %85, en az %90, en az %95, en az %97, en az %98, en az %99 ya da 100) olabilir. Bazı durumlarda, DNA-hedefleyen segmentin DNA-hedefleyen sekansı ile hedef DNA'nın hedef sekansı arasındaki tamamlayıcılık oranı, hedef DNA'nın tamamlayıcı iplikçığının hedef sekansında 5' ucunda bulunan yedi bitişik nükleotid boyunca %100'dür. Bazı durumlarda, DNA-hedefleyen segmentin DNA-hedefleyen sekansı ile hedef DNA'nın hedef sekansı arasındaki tamamlayıcılık oranı, yaklaşık 20 bitişik nükleotid boyunca en az %60'tır. Bazı durumlarda, DNA-hedefleyen segmentin DNA-

25

5 hedefleyen sekansı ile hedef DNA'nın hedef sekansı arasındaki tamamlayıcılık oranı, hedef DNA'nın tamamlayıcı iplikçığının hedef sekansında 5' ucunda bulunan on dört bitişik nükleotid boyunca %100'dür ve sekansın geri kalan kısmında %0 kadar düşüktür. Bu gibi  
 10 bir durumda, DNA-hedefleyen sekans 14 nükleotid uzunluğunda bir sekans olarak değerlendirilebilir. Bazı durumlarda, DNA-hedefleyen segmentin DNA-hedefleyen sekansı ile hedef DNA'nın hedef sekansı arasındaki tamamlayıcılık oranı, hedef DNA'nın tamamlayıcı iplikçığının hedef sekansında 5' ucunda bulunan yedi bitişik nükleotid  
 15 boyunca %100'dür ve sekansın geri kalan kısmında %0 kadar düşüktür. Bu gibi bir durumda, DNA-hedefleyen sekans 7 nükleotid uzunluğunda bir sekans olarak değerlendirilebilir.

### **Protein-bağlanımlı segment**

15

Bir DNA-hedefleyen RNA'nın protein-bağlanımlı segmenti (yani "protein-bağlanımlı sekans"ı) bir varyant yer-hedefli polipeptid ile etkileşime girer. DNA-hedefleyen RNA ile birlikte varyant Cas9 yer-hedefli polipeptidi bir hedef DNA'ya bağlandığında, hedef DNA'nın  
 20 transkripsiyonu azalır.

Bir DNA-hedefleyen RNA'nın protein-bağlanımlı segmenti, birbirlerine hibridize olarak bir çift iplikçik RNA dubleks (dsRNA dubleks) oluşturan iki tamamlayıcı nükleotid kesiti ihtiva eder.

25

Buluşa konu olan bir DNA-hedefleyen RNA'nın protein-bağlanımlı segmenti, birbirlerini tamamlayıcı nitelikte olan, ara nükleotidler (örneğin bir tek moleküllü DNA-hedefleyen RNA söz konusu ise)



("bağlayıcılar" ya da "bağlayıcı nükleotidler") ile birbirlerine kovalent bağlı olan ve hibridize olup protein-bağlanımlı segmentin çift iplikçikli RNA dubleksini (dsRNA dubleksi ya da "dCas9-bağlanımlı saç tokası") oluşturarak bir sap-ilmik yapısı meydana getiren iki  
5 nükleotid kesiti (bir hedef gösteren RNA ve bir aktive edici RNA) ihtiva eder. Bu sap-ilmik yapısı Şekil 39A'da şematik olarak gösterilmektedir. Hedef gösteren RNA ve aktive edici RNA, hedef gösteren RNA'nın 3' ucu ve aktive edici RNA'nın 5' ucu üzerinden birbirlerine kovalent bağlanabilirler. Alternatif olarak, hedef gösteren  
10 RNA ve aktive edici RNA, hedef gösteren RNA'nın 5' ucu ve aktive edici RNA'nın 3'u üzerinden birbirlerine kovalent bağlanabilirler.

Protein-bağlanımlı segment, yaklaşık 10 nükleotid ile yaklaşık 100 nükleotid arası, örneğin, 10 nükleotid (nt) ile yaklaşık 20 nt, yaklaşık  
15 20 nt ile yaklaşık 30 nt, yaklaşık 30 nt ile yaklaşık 40 nt, yaklaşık 40 nt ile yaklaşık 50 nt, yaklaşık 50 nt ile yaklaşık 60 nt, yaklaşık 60 nt ile yaklaşık 70 nt, yaklaşık 70 nt ile yaklaşık 80 nt, yaklaşık 80 nt ile yaklaşık 90 nt ya da yaklaşık 90 nt ile yaklaşık 100 nt arası bir sayıda nükleotidi kapsayan bir uzunluğa sahip olabilir. Protein-bağlanımlı  
20 segment, örneğin, yaklaşık 15 nükleotid (nt) ile yaklaşık 80 nt, yaklaşık 15 nt ile yaklaşık 50 nt, yaklaşık 15 nt ile yaklaşık 40 nt, yaklaşık 15 nt ile yaklaşık 30 nt ya da yaklaşık 15 nt ile yaklaşık 25 nt arası bir sayıda nükleotidi kapsayan bir uzunluğa sahip olabilir.

25 Protein-bağlanımlı segmentin dsRNA dubleksi, yaklaşık 6 baz çifti (bp) ile yaklaşık 50 bp arası bir sayıda baz çiftini kapsayan bir uzunluğa sahip olabilir. Protein-bağlanımlı segmentin dsRNA dubleksi, örneğin, yaklaşık 6 bp ile yaklaşık 40 bp, yaklaşık 6 bp ile

yaklaşık 30 bp, yaklaşık 6 bp ile yaklaşık 25 bp, yaklaşık 6 bp ile yaklaşık 20 bp, yaklaşık 6 bp ile yaklaşık 15 bp, yaklaşık 8 bp ile yaklaşık 40 bp, yaklaşık 8 bp ile yaklaşık 30 bp, yaklaşık 8 bp ile yaklaşık 25 bp, yaklaşık 8 bp ile yaklaşık 20 bp ya da yaklaşık 8 bp ile

5 yaklaşık 15 bp arası bir sayıda baz çiftini kapsayan bir uzunluğa sahip olabilir. Protein-bağlanımlı segmentin dsRNA dubleksini, örneğin, yaklaşık 8 bp ile yaklaşık 10 bp, yaklaşık 10 bp ile yaklaşık 15 bp, yaklaşık 15 bp ile yaklaşık 18 bp, yaklaşık 18 bp ile yaklaşık 20 bp, yaklaşık 20 bp ile yaklaşık 25 bp, yaklaşık 25 bp ile yaklaşık 30 bp,

10 yaklaşık 30 bp ile yaklaşık 35 bp, yaklaşık 35 bp ile yaklaşık 40 bp ya da yaklaşık 40 bp ile yaklaşık 50 bp arası bir sayıda baz çiftini kapsayan bir uzunluğa sahip olabilir. Buluşun bazı yapılarında, protein-bağlanımlı segmentin dsRNA dubleksini, 36 baz çiftini kapsayan bir uzunluğa sahiptir. Hibridize olup protein-bağlanımlı

15 segmentin dsRNA dubleksini oluşturan nükleotid sekansları arasındaki tamamlayıcılık oranı en az yaklaşık %60'tır. Hibridize olup protein-bağlanımlı segmentin dsRNA dubleksini oluşturan nükleotid sekansları arasındaki tamamlayıcılık oranı, örneğin, en az yaklaşık %65, en az yaklaşık %70, en az yaklaşık %75, en az yaklaşık %80, en

20 az yaklaşık %85, en az yaklaşık %90, en az yaklaşık %95, en az yaklaşık %98 ya da en az yaklaşık %99'dur. Bazı durumlarda, hibridize olup protein-bağlanımlı segmentin dsRNA dubleksini oluşturan nükleotid sekansları arasındaki tamamlayıcılık oranı %100'dür.

25

Bağlayıcı, yaklaşık 3 nükleotid ile yaklaşık 100 nükleotid arası bir sayıda nükleotidi kapsayan bir uzunluğa sahip olabilir. Bağlayıcı, örneğin, yaklaşık 3 nükleotid (nt) ile yaklaşık 90 nt, yaklaşık 3

nükleotid (nt) ile yaklaşık 80 nt, yaklaşık 3 nükleotid (nt) ile yaklaşık 70 nt, 3 nükleotid (nt) ile yaklaşık 60 nt, 3 nükleotid (nt) ile yaklaşık 50 nt, 3 nükleotid (nt) ile yaklaşık 40 nt, 3 nükleotid (nt) ile yaklaşık 30 nt, 3 nükleotid (nt) ile yaklaşık 20 nt ya da 3 nükleotid (nt) ile yaklaşık 10 nt arası bir sayıda nükleotidi kapsayan bir uzunluğa sahip olabilir. Bağlayıcı, örneğin, yaklaşık 3 nt ile yaklaşık 5 nt, yaklaşık 5 nt ile yaklaşık 10 nt, yaklaşık 10 nt ile yaklaşık 15 nt, yaklaşık 15 nt ile yaklaşık 20 nt, yaklaşık 20 nt ile yaklaşık 25 nt, yaklaşık 25 nt ile yaklaşık 30 nt, yaklaşık 30 nt ile yaklaşık 35 nt, yaklaşık 35 nt ile yaklaşık 40 nt, yaklaşık 40 nt ile yaklaşık 50 nt, yaklaşık 50 nt ile yaklaşık 60 nt, yaklaşık 60 nt ile yaklaşık 70 nt, yaklaşık 70 nt ile yaklaşık 80 nt, yaklaşık 80 nt ile yaklaşık 90 nt ya da yaklaşık 90 nt ile yaklaşık 100 nt arası bir sayıda nükleotidi kapsayan bir uzunluğa sahip olabilir. Buluşun bazı yapılarında, bir DNA-hedefleyen RNA'nın bağlayıcısı 4 nükleotidi kapsayan bir uzunluğa sahiptir.

Uygun bir protein-bağlanımlı segmente (yani dCas9 sapı) dahil edilebilecek olan nükleotid sekansı örnekleri arasında, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, SEKANS KOD NO.: 563-682'de gösterilen sekanslar bulunur (örnekler için bkz: Şekil 8 ve Şekil 9).

Bazı durumlarda, uygun bir protein-bağlanımlı segment, yukarıda listelenen sekansların herhangi birinden 1, 2, 3, 4 veya 5 nükleotid bakımından farklı olan bir nükleotid sekansı ihtiva eder.

25

**Stabilite kontrol sekansı (örneğin transkripsiyonel terminatör segment)**

- Bir stabilite kontrol sekansı, bir RNA'nın (örneğin bir DNA-hedefleyen RNA, bir hedef gösteren RNA, bir aktive edici RNA ve benzeri) stabilitesine etki eder. Uygun stabilite kontrol sekanslarına verilebilecek örneklerden biri bir transkripsiyonel terminatör segmenttir (yani bir transkripsiyon terminasyon sekansı). Buluşa uygun bir DNA-hedefleyen RNA'daki bir transkripsiyonel terminatör segment, yaklaşık 10 nükleotid ile yaklaşık 100 nükleotid arası, örneğin yaklaşık 10 nükleotid (nt) ile yaklaşık 20 nt, yaklaşık 20 nt ile yaklaşık 30 nt, yaklaşık 30 nt ile yaklaşık 40 nt, yaklaşık 40 nt ile yaklaşık 50 nt, yaklaşık 50 nt ile yaklaşık 60 nt, yaklaşık 60 nt ile yaklaşık 70 nt, yaklaşık 70 nt ile yaklaşık 80 nt, yaklaşık 80 nt ile yaklaşık 90 nt ya da yaklaşık 90 nt ile yaklaşık 100 nt arası bir sayıda nükleotidi kapsayan bir toplam uzunluğa sahip olabilir. Transkripsiyonel terminatör segment, örneğin, yaklaşık 15 nükleotid (nt) ile yaklaşık 80 nt, yaklaşık 15 nt ile yaklaşık 50 nt, yaklaşık 15 nt ile yaklaşık 40 nt, yaklaşık 15 nt ile yaklaşık 30 nt ya da yaklaşık 15 nt ile yaklaşık 25 nt arası bir sayıda nükleotidi kapsayan bir uzunluğa sahip olabilir.
- 20 Bazı durumlarda, transkripsiyon terminasyon sekansı, bir ökaryotik hücrede fonksiyonel olan bir sekanstır. Bazı durumlarda, transkripsiyon terminasyon sekansı, bir prokaryotik hücrede fonksiyonel olan bir sekanstır.
- 25 Bir stabilite kontrol sekansına (örneğin transkripsiyonel terminasyon segmenti ya da DNA-hedefleyen RNA'nın stabilitenin artmasını sağlayan herhangi bir segmenti) dahil edilebilecek olan nükleotid sekansı örnekleri arasında, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın,

SEKANS KOD NO.: 683-696'da gösterilen sekanslar ve örneğin 5'-  
 UAAUCCACAGCCGCCAGUCCGCUGGGCGGCAUUUU -5'  
 (SEKANS KOD NO.: 795) (bir Rho-bağımsız trp terminasyon yeri)  
 bulunur.

5

### **Ek sekanslar**

Buluşun bazı yapılarında, bir DNA-hedefleyen RNA, 5' veya 3' ucunda yukarıda açıklanan özelliklerden herhangi birini sağlayan en az bir adet ek segment barındırır.

- 10 Örneğin uygun bir üçüncü segmentte, bir 5' başlığı (örneğin bir 7-  
 metilguanilat başlığı (m<sup>7</sup>G)), bir 3' poliadenile kuyruğu (yani bir 3'  
 poli(A) kuyruğu), bir ribo-anahtar sekansı (örneğin düzenlenmiş  
 stabiliteye ve/veya proteinlerin ve protein komplekslerinin erişimine  
 istinaden düzenlenmiş erişilebilirliğe olanak sağlamak için), bir dsRNA  
 15 dubleks (yani bir saç tokası) oluşturan bir sekans, RNA'yı bir hücre  
 içi konuma (örneğin nükleus, mitokondri, kloroplastlar ve benzeri  
 unsurlar) yönlendiren bir sekans, takibe olanak sağlayan bir  
 modifikasyon veya sekans (örneğin bir floresan moleküle doğrudan  
 konjugasyon, floresan belirleme yapmayı kolaylaştıran bir moietye  
 20 konjugasyon, floresan belirleme yapmaya olanak sağlayan bir sekans  
 ve benzeri), proteinler (örneğin, transkripsiyonel aktivatörler,  
 transkripsiyonel baskılayıcılar, DNA metiltransferazlar, DNA  
 demetilazlar, histon asetiltransferazlar, histon deasetilazlar ve  
 benzerlerinin örnek gösterilebileceği, DNA'ya etki eden proteinler)  
 25 için bir bağlanma yeri sağlayan bir modifikasyon veya sekans, artmış,  
 azalmış ve/veya kontrol altında tutulabilir stabilite sağlayan bir  
 modifikasyon veya sekans ya da bunlardan oluşan herhangi bir  
 kombinasyon bulunabilir.

### **Birden çok eşzamanlı DNA-hedefleyen RNA**

Buluşun bazı yapılarında, birden çok DNA-hedefleyen RNA aynı hücrede aynı da kullanılarak aynı hedef DNA veya farklı hedef DNA'lar üzerindeki farklı konumlarda transkripsiyon eşzamanlı olarak modüle edilir. Buluşun bazı yapılarında, iki veya daha fazla sayıda DNA-hedefleyen RNA aynı gen veya transkript veya lokusu hedef gösterirler. Buluşun bazı yapılarında, iki veya daha fazla sayıda DNA-hedefleyen RNA birbiriyle ilgisiz farklı lokusları hedef gösterirler. Buluşun bazı yapılarında, iki veya daha fazla sayıda DNA-hedefleyen RNA farklı fakat birbiriyle ilgili lokusları hedef gösterirler.

DNA-hedefleyen RNA'lar küçük ve dayanıklı oldukları için, aynı anda aynı ekspresyon vektöründe bulunabilirler ve hatta istenirse aynı transkripsiyonel kontrol altında da bulunabilirler. Buluşun bazı yapılarında, iki veya daha fazla (örneğin 3 veya daha fazla, 4 veya daha fazla, 5 veya daha fazla, 10 veya daha fazla, 15 veya daha fazla, 20 veya daha fazla, 25 veya daha fazla, 30 veya daha fazla, 35 veya daha fazla, 40 veya daha fazla, 45 veya daha fazla ya da 50 veya daha fazla) sayıda DNA-hedefleyen RNA bir hedef hücrede eşzamanlı olarak eksprese edilirler (aynı veya farklı vektörlerden). Eksprese olan DNA-hedefleyen RNA'lar, *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *L. innocua* ve *N. meningitidis* gibi farklı bakterilere ait dCas9 proteinleri tarafından farklı şekilde algılanıp tanınabilirler.

Birden çok DNA-hedefleyen RNA eksprese etmek için, Csy4 endoribonükleazın aracılık ettiği bir artifisyel RNA işleme sistemi

kullanılabilir. Birden çok DNA-hedefleyen RNA, bir prekürsor transkript (örneğin bir U6 promotöründen eksprese olan) üzerinde peş peşe dizili halde sıralanabilir ve Csy4-spesifik RNA sekansı ile ayrılabilir. Birlikte eksprese edilen Csy4 proteini, prekürsor transkripti

5 yarararak birden çok DNA-hedefleyen RNA'yı açığa çıkarır. Bir RNA işleme sistemi kullanmanın sağladığı avantajlar arasında şunlar bulunur: birincisi, birden çok promotör kullanmaya gerek yoktur; ikincisi, tüm DNA-hedefleyen RNA'lar aynı prekürsor transkriptten işlendikleri için, konsantrasyonları benzer dCas9-bağlanımı için

10 normalizedir.

Csy4, *Pseudomonas aeruginosa* bakterilerinden elde edilen küçük bir endoribonükleazdır (RNaz). Csy4, 17 bp büyüklüğündeki bir asgari RNA saç tokası yapısını spesifik tanıır ve RNA'yı hızlı (< 1 dakika) ve

15 yüksek düzeyde etkili (> %99,9) bir şekilde yarar. Birçok RNaz'dan farklı olarak, yardığı RNA fragmanı stabilitesini korur ve fonksiyonel açıdan aktif olmaya devam eder. Csy4 bazlı RNA yarılmaları bir

20 artifisyel RNA işleme sistemine uyarlanabilir. Bu sistemde, 17 bp büyüklüğündeki RNA saç tokası yapıları, aynı promotörden bir prekürsor transkript olarak transkribe edilen birden çok RNA fragmanının arasına sokulurlar. Birlikte Csy4'ün eksprese edilmesi, birbirlerinden ayrı münferit RNA fragmanlarının elde edilmesinde etkili bir metottur.

## 25 **Yer-hedefli polipeptid**

Yukarıda belirtildiği gibi, buluşa uygun bir DNA-hedefleyen RNA ile bir varyant Cas9 yer-hedefli polipeptidi birlikte bir kompleks

oluştururlar. DNA-hedefleyen RNA, bir hedef DNA'nın bir sekansını tamamlayıcı nitelikte bir nükleotid sekansı ihtiva etmesi sayesinde komplekse hedef spesifisitesi kazandırır.

- 5 Varyant Cas9 yer-hedefli polipeptidinde azaltılmış endodeoksiribonükleaz aktivitesi vardır. Örneğin, bu buluşa konu olan bir transkripsiyon modüle etme yönteminde kullanıma uygun bir varyant Cas9 yer-hedefli polipeptidi, bir yabancı tip Cas9 polipeptidinin, örneğin Şekil 3'te gösterildiği gibi olan bir amino asit
- 10 sekansının (SEKANS KOD NO.: 8) bulunduğu bir yabancı tip Cas9 polipeptidinin sahip olduğu endodeoksiribonükleaz aktivitesinin yaklaşık %20'sinden düşük, yaklaşık %15'inden düşük, yaklaşık %10'undan düşük, yaklaşık %5'inden düşük, yaklaşık %1'inden düşük ya da yaklaşık %0,1'inden düşük bir düzeyde endodeoksiribonükleaz
- 15 aktivitesi sergiler. Buluşun bazı yapılarında, varyant Cas9 yer-hedefli polipeptidinde hemen hemen hiç tespit edilebilir endodeoksiribonükleaz aktivitesi yoktur. Buluşun bazı yapılarında, bir yer-hedefli polipeptidde azaltılmış bir katalitik aktivite varsa (örneğin bir Cas9 proteininde bir D10, G12, G17, E762, H840, N854, N863,
- 20 H982, H983, A984, D986 ve/veya A987 mutasyonunun, örneğin D10A, G12A, G17A, E762A, H840A, N854A, N863A, H982A, H983A, A984A ve/veya D986A'nın bulunduğu durumlarda), bu polipeptid, DNA-hedefleyen RNA ile etkileşime girme kabiliyetini muhafaza ettiği sürece hedef DNA'ya hâlâ yer-spesifik bir şekilde
- 25 bağlanabilir (zira hâlâ bir DNA-hedefleyen RNA tarafından bir hedef DNA sekansına yönlendirilmektedir).



- Bazı durumlarda, uygun bir varyant Cas9 yer-hedefli polipeptidi, Şekil 3'te gösterilen Cas9/Csn1 amino asit sekansının (SEKANS KOD NO.: 8) 7-166 veya 731-1003 numaralı amino asitlerinden oluşan kısımlar ile ya da SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346'da gösterilen amino asit sekanslarının herhangi birisindeki mütetekabil kısımlar ile en az yaklaşık %75, en az yaklaşık %80, en az yaklaşık %85, en az yaklaşık %90, en az yaklaşık %95, en az yaklaşık %99 ya da %100 oranında amino asit sekansı özdeşliğine sahip olan bir amino asit sekansı ihtiva eder.
- 5
- 10 Bazı durumlarda, varyant Cas9 yer-hedefli polipeptidi, hedef DNA'nın tamamlayıcı iplikçliğini yarabilir ancak hedef DNA'nın tamamlayıcı olmayan iplikçliğini yarma yönünde azaltılmış bir kabiliyete sahiptir. Örneğin, varyant Cas9 yer-hedefli polipeptidinde, RuvC domaininin (örneğin Şekil 3'teki "domain 1") fonksiyonunu azaltan bir mutasyon
- 15 (amino asit ikamesi) bulunabilir. Sınırlayıcı olmayan bir örnek vermek gerekirse, bazı durumlarda, varyant Cas9 yer-hedefli polipeptidi, Şekil 3'te gösterilen amino asit sekansının bir D10A (aspartat → alanin) mutasyonudur (ya da SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346'da gösterilen amino asit sekanslarından herhangi birindeki bir mütetekabil
- 20 mutasyon).

- Bazı durumlarda, varyant Cas9 yer-hedefli polipeptid, hedef DNA'nın tamamlayıcı olmayan iplikçliğini yarabilir ancak hedef DNA'nın tamamlayıcı iplikçliğini yarma yönünde azaltılmış bir kabiliyete sahiptir. Örneğin, varyant Cas9 yer-hedefli polipeptidinde, HNH domaininin (RuvC/HNH/RuvC domain motifleri, Şekil 3'teki "domain 2") fonksiyonunu azaltan bir mutasyon (amino asit ikamesi) bulunabilir. Sınırlayıcı olmayan bir örnek vermek gerekirse, bazı
- 25

durumlarda, varyant Cas9 yer-hedefli polipeptidi, bir H840A mutasyonu (SEKANS KOD NO.: 8 sekansının 840 numaralı amino asit pozisyonunda histidin → alanin) ya da SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346'da gösterilen amino asit sekanslarından herhangi birindeki bir mütetekabil mutasyondur.

Bazı durumlarda, varyant Cas9 yer-hedefli polipeptidi, hedef DNA'nın hem tamamlayıcı iplikçliğini hem de tamamlayıcı olmayan iplikçliğini yarma yönünde azaltılmış bir kabiliyete sahiptir. Sınırlayıcı olmayan bir örnek vermek gerekirse, bazı durumlarda, varyant Cas9 yer-hedefli polipeptidinde, Şekil 3'te gösterilen amino asit sekansının hem D10A hem de H840A mutasyonları (ya da SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346'da gösterilen proteinlerden herhangi birindeki mütetekabil mutasyonlar) bulunur.

Aynı etkiye ulaşmak (yani nükleaz kısımlarından biri veya diğerinin inaktivasyonu) için başka artıklar da mutasyona uğratılabilir. Örnek vermek gerekirse, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, D10, G12, G17, E762, H840, N854, N863, H982, H983, A984, D986 ve/veya A987 artıkları (ya da SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346'da gösterilen proteinlerden herhangi birindeki mütetekabil mutasyonlar) değişikliğe uğratılabilir (yani ikame edilebilir) (Cas9 amino asit artıklarının korunumu hakkında daha fazla bilgi almak için bkz: **Şekil 3**, **Şekil 5**, **Şekil 11A** ve **Tablo 1**). Ayrıca, alanin ikameleri dışındaki mutasyonlar da uygundur.

Bazı durumlarda, varyant Cas9 yer-hedefli polipeptidi bir füzyon polipeptididir (bir "varyant Cas9 füzyon polipeptidi"), yani aşağıda

belirtilenleri ihtiva eden bir füzyon polipeptididir: i) bir varyant Cas9 yer-hedefli polipeptidi ve b) bir kovalent bağlı heterolog polipeptid (bir "füzyon partneri" olarak da atıf yapılmaktadır).

- 5 Heterolog polipeptid, varyant Cas9 füzyon polipeptidi tarafından da sergilenecek olan bir aktivite (örneğin enzimatik aktivite) (örneğin metiltransferaz aktivitesi, asetiltransferaz aktivitesi, kinaz aktivitesi, ubiquitinasyon aktivitesi ve benzeri) sergileyebilir. Bir heterolog nükleik asit sekansı başka bir nükleik asit sekansına (örneğin genetik
- 10 mühendisliği yoluyla) bağlanarak bir kimerik polipeptid kodlayan bir kimerik nükleotid sekansı oluşturulabilir. Buluşun bazı yapılarında, bir varyant Cas9 füzyon polipeptidi, bir varyant Cas9 polipeptidinin hücre içi lokalizasyon sağlayan bir heterolog sekansa (yani, heterolog sekans bir hücre içi lokalizasyon sekansı, örneğin nükleusu hedef
- 15 almayı sağlayan bir nükleer lokalizasyon sinyali (NLS); mitokondriyi hedef almayı sağlayan bir mitokondri lokalizasyon sinyali; bir kloroplastı hedef almayı sağlayan bir kloroplast lokalizasyon sinyali; bir ER retansiyon sinyali ya da benzeri bir unsurdur) füzyonlanması yoluyla oluşturulur. Buluşun bazı yapılarında, heterolog sekans, takibi
- 20 veya saflaştırmayı kolaylaştırma amaçlı bir tag (örneğin bir floresan protein, örneğin yeşil floresan protein (GFP), YFP, RFP, CFP, mCherry, tdTomato ve benzeri; bir HIS tagı, örneğin bir 6XHis tagı; bir hemaglütinin (HA) tagı; bir FLAG tagı; bir Myc tagı ve benzeri) sağlayabilir (yani, heterolog sekans bir tespit edilebilir etikettir).
- 25 Buluşun bazı yapılarında, heterolog sekans, daha yüksek veya daha düşük bir stabilite sağlayabilir (yani, heterolog sekans, bir stabilite kontrol peptididir, örneğin bir degrondur ve bazı durumlarda kontrol altında tutulabilir niteliktedir (örneğin sıcaklığa duyarlı veya ilaçla

kontrol altında tutulabilir bir degron sekansı, aşağıya bakınız)). Buluşun bazı yapılarında, heterolog sekans, hedef DNA'da daha yüksek veya daha düşük transkripsiyon sağlayabilir (yani, heterolog sekans bir transkripsiyon modülasyon sekansıdır, örneğin bir transkripsiyon faktörü/aktivatörü veya onun bir fragmanı, bir transkripsiyon faktörü/aktivatörü barındıran bir protein veya protein fragmanı, bir transkripsiyon baskılayıcı veya onun bir fragmanı, bir transkripsiyon baskılayıcı barındıran bir protein veya protein fragmanı, bir küçük molekül/ilaca duyarlı transkripsiyon düzenleyici ya da benzeri başka bir unsurdur). Buluşun bazı yapılarında, heterolog sekans, bir bağlanma domaini sağlayabilir (yani, heterolog sekans, örneğin bir kimerik dCas9 polipeptidine ilgilenilen başka bir proteine, örneğin bir DNA veya histon modifiye edici protein, bir transkripsiyon faktörü veya transkripsiyon baskılayıcı, bir toplayıcı protein veya benzeri başka bir proteine bağlanma kabiliyeti kazandıran bir protein bağlanma sekansıdır).

Daha yüksek veya daha düşük stabilite sağlayan uygun füzyon partnerleri arasında, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, degron sekansları bulunur. Degronların bir parçasını oluşturdukları proteinin stabilitesini kontrol altında tutan amino asit sekansları oldukları sektörde olağan bilgi ve beceri sahibi uzmanlar tarafından kolaylıkla anlaşılmaktadır. Örneğin, bir degron sekansı içeren bir proteinin stabilitesi en azından kısmen degron sekansı tarafından kontrol altında tutulur. Bazı durumlarda, uygun bir degron konstitütif niteliktedir, öyle ki degron protein stabilitesi üzerinde sahip olduğu etkiyi deneysel kontrolden bağımsız olarak ortaya koyar (yani, degron ilaçla indüklenebilir değildir, sıcaklıkla indüklenebilir değildir ya da benzeri

başka bir niteliğe sahip değildir). Bazı durumlarda, degran, varyant Cas9 polipeptidine kontrol edilebilir bir stabilite sağlar ve böylelikle Cas9 polipeptidi, istenen koşullara bağlı olarak "açık" (yani stabil) ya da "kapalı" (yani stabil olmayan, bozunmuş) hale getirilebilir.

5 Örneğin, eğer degran bir sıcaklığa duyarlı degran ise, varyant Cas9 polipeptidi, bir eşik sıcaklık değerinin (örneğin 42°C, 41°C, 40°C, 39°C, 38°C, 37°C, 36°C, 35°C, 34°C, 33°C, 32°C, 31°C, 30°C ve benzeri) altındaki sıcaklıklarda fonksiyonellik gösterebilirken (yani "açık", stabil), eşik sıcaklıktan yüksek sıcaklıklarda fonksiyonellik

10 gösteremeyebilir (yani "kapalı", bozunmuş). Bir diğer örnek olarak, eğer degran bir ilaçla indüklebilir degran ise, ilacın bulunup bulunmaması proteini "kapalı" (yani stabil olmayan) halden "açık" (yani "stabil") hale geçirebilir ya da tersi bir ilişki söz konusu olabilir. Örnek niteliğindeki bir ilaçla indüklenebilir degran, FKBP12

15 proteininden elde edilir. Degronun stabilitesi, degranın bağlandığı bir küçük molekülün varlığı veya yokluğu ile kontrol altında tutulur.

Uygun degranlara verilebilecek örnekler arasında, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, Shield-1, DHFR ve/veya oksinler ile kontrol

20 altında tutulan degranlar bulunur. Uygun degran örnekleri sektörde bilinmektedir (örneğin bkz: Dohmen et al., Science, 1994. 263(5151): p. 1273-1276: Heat-inducible degran: a method for constructing temperature-sensitive mutants; Schoeber et al., Am J Physiol Renal Physiol. 2009 Jan;296(1):F204-11: Conditional fast expression and

25 function of multimeric TRPV5 channels using Shield-1; Chu et al., Bioorg Med Chem Lett. 2008 Nov 15;18(22):5941-4: Recent progress with FKBP-derived destabilizing domains; Kanemaki, Pflugers Arch. 2012 Dec 28: Frontiers of protein expression control with conditional

degrons; Yang et al., Mol Cell. 2012 Nov 30;48(4):487-8: Titivated for destruction: the methyl degnon; Barbour et al., Biosci Rep. 2013 Jan 18;33(1).: Characterization of the bipartite degnon that regulates ubiquitin-independent degradation of thymidylate synthase; Greussing et al., J Vis Exp. 2012 Nov 10;(69): Monitoring of ubiquitin-proteasome activity in living cells using a Degron (dgn)-destabilized green fluorescent protein (GFP)-based reporter protein).

Degron sekansı örnekleri hem hücrelerde hem de hayvanlarda iyi karakterize edilmiş ve test edilmişlerdir. dCas9'un bir degnona sekansına füzyonlanması sonucunda bir "ayarlanabilir" ve "indüklenebilir" dCas9 polipeptidi elde edilir. Burada açıklanan füzyon partnerleri arzu edilebilecek her türlü kombinasyon halinde kullanılabilirler. Buna sınırlayıcı olmayan bir örnek vermek gerekirse, bir dCas9 füzyon proteininde, tespit için bir YFP sekansı, stabilite için bir degnon sekansı ve hedef DNA'nın transkripsiyonunu artırmak için bir transkripsiyon aktive edici sekans bulunabilir. Ayrıca, bir dCas9 füzyon proteini bünyesinde kullanılacak füzyon partneri sayısı belirli bir değerle sınırlı değildir. Bazı durumlarda, bir dCas9 füzyon proteininde bir veya daha fazla sayıda (örneğin iki veya daha fazla sayıda, üç veya daha fazla sayıda, dört veya daha fazla sayıda ya da beş veya daha fazla sayıda) heterolog sekans yer alır.

Uygun füzyon partnerleri arasında, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, metiltransferaz aktivitesi, demetilaz aktivitesi, asetiltransferaz aktivitesi, deasetilaz aktivitesi, kinaz aktivitesi, fosfataz aktivitesi, ubikitin ligaz aktivitesi, deubikitinasyon aktivitesi, adenilasyon aktivitesi, deadenilasyon aktivitesi, SUMOilasyon

aktivitesi, deSUMOilasyon aktivitesi, ribozilasyon aktivitesi, deribozilasyon aktivitesi, miristoilasyon aktivitesi ya da demiristoilasyon aktivitesi sağlayan ve doğrudan doğruya DNA'nın kendisinin modifikasyonuna (örneğin DNA'nın metilasyonu) ya da DNA ile ilişkili bir polipeptidin (örneğin bir histon veya DNA-bağlanımlı protein) modifikasyonuna yönlendirilebilecek olan polipeptidler bulunur. Diğer uygun füzyon partnerleri arasında, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, sınır elemanları (örneğin CTCF), periferide toplanma sağlayan proteinler ve protein fragmanları (örneğin Lamin A, Lamin B ve benzeri) ve protein kenetlenme elemanları (örneğin FKBP/FRB, Pil1/Aby1 ve benzeri) sayılabilir.

Buluşa uygun bir varyant Cas9 yer-hedefli polipeptidi için uygun diğer çeşitli füzyon partnerlerine (veya onların fragmanlarına) verilebilecek örneklerden bazıları **Şekil 54**'te listelenmektedir.

Buluşun bazı yapılarında, söz konusu bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid kodon-optimize edilebilir. Bu optimizasyon çeşidi sektörde bilinmektedir ve bir yabancı kaynaklı DNA'yı hedeflenen konakçı organizma veya hücrenin kodon tercihlerini taklit etmesini fakat aynı proteini kodlamaya devam etmesini sağlayacak bir mutasyona uğratmayı gerektir. Dolayısıyla kodonlar değiştirilir ancak kodlanan protein aynı kalır. Örneğin, eğer hedeflenen hedef hücre bir insan hücresi ise, bir insan kodon-optimize dCas9 (veya dCas9 varyantı) uygun bir yer-hedefli modifiye edici polipeptidi teşkil eder. Sınırlayıcı bir anlam taşımayan bir diğer örnek olarak, eğer hedeflenen konakçı hücre bir fare hücresi ise, bir fare kodon-optimize Cas9 (veya varyantı, örneğin enzimatik olarak inaktif varyantı) uygun bir Cas9

yer-hedefli polipeptidini teşkil eder. Kodon optimizasyonunun yapılması şart olmamakla birlikte, kabul edilebilir bir uygulamadır ve hatta belirli durumlarda yapılması tercih edilebilir.

## 5 **Konakçı hücreler**

Mevcut buluşun bir transkripsiyon modüle etme yöntemi, in vivo ve/veya ex vivo ve/veya in vitro ortamda bulunan mitotik veya post-mitotik hücrelerde transkripsiyonel modülasyon indüklemek amacıyla kullanılabilir. DNA-hedefleyen RNA hedef DNA'ya hibridize olarak spesifisite sağladığı için, kullanılan mitotik ve/veya post-mitotik hücre, türlü çeşit farklı konakçı hücre seçeneklerinden herhangi biri olabilir; uygun konakçı hücreler arasında, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, bir bakteri hücresi, bir arke hücresi, bir tekhücreli ökaryotik organizma, bir bitki hücresi, bir alg hücresi, örneğin *Botryococcus braunii*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Nannochloropsis gaditana*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Sargassum patens*, C. Agardh ve benzerleri, bir mantar hücresi, bir hayvan hücresi, bir omurgasız hayvan (örneğin meyve sineği, sölenler, ekinoderm, nematod ve benzeri) hücresi, ökaryotik parazit (örneğin bir malarya paraziti, örneğin *Plasmodium falciparum*; bir helmint ve benzeri), bir omurgalı hayvan (örneğin balık, amfibi, sürüngen, kuş, memeli) hücresi, bir memeli hücresi, örneğin bir kemirgen hücresi, bir insan hücresi ve insan dışındaki bir primatın hücresi ve benzeri hücreler sayılabilir.

Uygun konakçı hücreler arasında, doğada kendiliğinden oluşan hücreler, genetiği değiştirilmiş hücreler (örneğin bir laboratuarda, örneğin "insan eliyle" genetiği değiştirilmiş olan hücreler) ve in vitro



ortamda herhangi bir yolla manipüle edilmiş olan hücreler bulunur. Bazı durumlarda, bir konakçı hücre kaynağından izole edilir.

Herhangi bir hücre tipi (örneğin bir kök hücre, örneğin bir embriyonik kök (ES) hücre, bir indüklenmiş pluripotent kök (iPS) hücre, bir germ hücresi, burada insan germ hücreleri buluşa konu olan bileşimler bir parçasını teşkil etmezler; bir somatik hücre, örneğin bir fibroblast, bir hematopoetik hücre, bir nöron, bir kas hücresi, bir kemik hücresi, bir hepatosit, bir pankreas hücresi; herhangi bir safhada bulunan, örneğin 10 1-hücreli, 2-hücreli, 4-hücreli, 8-hücreli veya benzeri bir safhada bulunan insan embriyosu olmayan bir embriyonun, örneğin bir zebra balığı embriyosu veya benzeri başka bir embriyonun insan embriyonik hücresi olmayan bir in vitro veya in vivo embriyonik hücresi) söz konusu olabilir. Hücreler yerleşik hücre hatlarından geliyor olabilecekleri gibi, primer hücreler de olabilirler; "primer hücreler", "primer hücre hatları" ve "primer kültürler" burada birbirlerine alternatif terimler olarak, bir denekten elde edilmiş olan ve in vitro ortamda sınırlı sayıda kültür pasajı, yani bölünme boyunca çoğalmalarına izin verilmiş olan hücreler ve hücre kültürlerine atıf yapmak için kullanılmaktadırlar. Primer kültürler, örneğin, 0 defa, 1 defa, 2 defa, 4 defa, 5 defa, 10 defa ya da 15 defa, fakat kriz safhasına girilmesine sebep olmayacak kadar alt-kültürleşmiş olan kültürlerdir. Primer hücre hatlarının in vitro ortamdaki pasaj sayısı 10'un altında tutulabilir. Buluşun birçok yapısında hedef hücreler tekhücreli 25 organizmaları teşkil ederler ya da kültürde çoğaltılırlar.

Eğer hücreler primer hücreler ise, bir kişiden uygun herhangi bir yöntemle hasat edilebilirler. Örneğin lökositler, aferez, lökositaferez,

yoğunluk gradyanlı ayırma veya benzeri bir yöntemle rahatça hasat edilebilirken, cilt, kas, kemik iliği, dalak, karaciğer, pankreas, akciğer, bağırsak, mide ve benzeri dokuların hücrelerini hasat etmek için en uygun yöntem biyopsidir. Hasat edilen hücreler, uygun bir çözelti yardımıyla disperse veya süspanse edilebilirler. Bu çözelti, genelde, fetal buzağı serumu veya doğada kendiliğinden oluşan başka faktörler ve genelde 5-25 mM arası olmak üzere düşük bir konsantrasyondaki kabul edilebilir bir tampon ile desteklenmiş bir dengeli tuz çözeltisi, örneğin normal salin, fosfat tamponlu salin (PBS), Hank dengeli tuz çözeltisi ya da benzeri başka bir çözelti olacaktır. Uygun tamponlar arasında, HEPES, fosfat tamponları, laktat tamponları ve benzeri tamponlar sayılabilir. Hücreler derhal kullanılacakları gibi, öncelikle uzun bir süre boyunca dondurularak saklanabilir ve kullanılacakları zaman çözülüp öyle kullanılabilirler. Bu gibi durumlarda, hücreler, %10 dimetil sülfoksit (DMSO), %50 serum, %40 tamponlu vasatta ya da hücreleri dondurucu sıcaklıklar altında muhafaza etmek için sektörde yaygın olarak kullanılan bu gibi başka herhangi bir çözeltide dondurulacak ve kullanılacakları zaman, dondurulmuş kültürlenmiş hücreleri çözmek için sektörde yaygın olarak kullanılan bir metotla çözüleceklerdir.

### **Nükleik asidin bir konakçı hücreye sokulması**

Bir DNA-hedefleyen RNA'ya da onu kodlayan bir nükleotid sekansının yer aldığı bir nükleik asit bir konakçı hücrenin içerisine iyi bilinen muhtelif yöntemlerden herhangi biri kullanılarak sokulabilir. Benzer şekilde, bir varyant Cas9 yer-hedefli polipeptidi kodlayan bir nükleotid sekansının yer aldığı bir nükleik asidin bir konakçı hücrenin

içerisine sokulması söz konusu ise, bu nükleik asit konakçı hücrenin içerisine iyi bilinen çeşitli yöntemlerden herhangi biri kullanılarak sokulabilir.

- 5 Bir nükleik asidi bir konakçı hücreye dahil etmeye yarayan yöntemler sektörde bilinmektedir ve bir nükleik asidi (örneğin bir ekspresyon yapısı) bir kök hücre veya progenitör hücreye sokmak için bilinen yöntemlerden herhangi biri kullanılabilir. Uygun yöntemler arasında, 10 örneğin viral enfeksiyon veya bakteriyofaj enfeksiyonu, transfeksiyon, konjugasyon, protoplast füzyonu, lipofeksiyon, elektroporasyon, kalsiyum fosfat presipitasyonu, polietilenimin (PEI) aracılı transfeksiyon, DEAE-dekstran aracılı transfeksiyon, lipozom aracılı transfeksiyon, partikül tabancası teknolojisi, kalsiyum fosfat presipitasyonu, direkt mikro enjeksiyon, nanopartikül aracılı nükleik 15 asit taşınması (örneğin bkz: Panyam et. al., Adv Drug Deliv Rev. 2012 Sep 13. pii: S0169-409X(12)00283-9. doi: 10.1016/j.addr.2012.09.023) ve benzeri yöntemler sayılabilir.

## **NUKLEİK ASİTLER**

20

Bu buluş, buluşa uygun bir DNA-hedefleyen RNA kodlayan bir nükleotid sekansının yer aldığı bir izole nükleik asit ortaya koyar. Bazı durumlarda, buluşa uygun bir nükleik asitte, bir varyant Cas9 yer-hedefli polipeptidi kodlayan bir nükleotid sekansı da yer alır.

25

Buluşun bazı yapılarında, buluşa uygun bir yöntemde, bir konakçı hücrenin (ya da bir konakçı hücre popülasyonunun) içerisine bir DNA-hedefleyen RNA ve/veya bir varyant Cas9 yer-hedefli

polipeptidi kodlayan nükleotid sekanslarının yer aldığı bir veya daha fazla sayıda nükleik asit sokulur. Buluşun bazı yapılarında, bir hedef DNA içeren bir hücre in vitro ortamda bulunur. Buluşun bazı yapılarında, bir hedef DNA içeren bir hücre in vivo ortamda bulunur.

- 5 Bir DNA-hedefleyen RNA ve/veya bir yer-hedefli polipeptid kodlayan nükleotid sekanslarının yer aldığı uygun nükleik asitler arasında, bir DNA-hedefleyen RNA ve/veya bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid kodlayan bir nükleotid sekansının yer aldığı bir "rekombinan ekspresyon vektörü"nü teşkil eden ekspresyon vektörleri  
10 bulunur.

- Buluşun bazı yapılarında, rekombinan ekspresyon vektörü, bir viral yapıdır, örneğin bir rekombinan adeno-bağlantılı virüs yapısı (örneğin bkz: 7.078.387 sayılı ABD patenti), bir rekombinan adenoviral yapı,  
15 bir rekombinan lentiviral yapı, bir rekombinan retroviral yapı ya da benzeri başka bir yapıdır.

- Uygun ekspresyon vektörleri arasında, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, viral vektörler (örneğin vaksiniya virüsü; poliovirüs;  
20 adenovirüs (örneğin bkz: Li et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 35:2543 2549, 1994; Borrás et al., Gene Ther 6:515 524, 1999; Li and Davidson, PNAS 92:7700 7704, 1995; Sakamoto et al., H Gene Ther 5:1088 1097, 1999; WO 94/12649; WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 ve WO 95/00655); adeno-bağlantılı  
25 virüs (örneğin bkz: Ali et al., Hum Gene Ther 9:81 86, 1998; Flannery et al., PNAS 94:6916 6921, 1997; Bennett et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 38:2857 2863, 1997; Jomary et al., Gene Ther 4:683 690, 1997; Rolling et al., Hum Gene Ther 10:641 648, 1999; Ali et al., Hum Mol

Genet 5:591-594, 1996; Srivastava in WO 93/09239; Samulski et al., J. Vir. (1989) 63:3822-3828; Mendelson et al., Virol. (1988) 166:154-165; Flotte et al., PNAS (1993) 90:10613-10617); SV40; herpes simpleks virüsü; insan immün yetmezlik virüsü (örneğin bkz: Miyoshi et al., PNAS 94:10319-23, 1997; Takahashi et al., J Virol 73:7812-7816, 1999); bir retroviral vektöre (örneğin murin lösemi virüsü; dalak nekroz virüsü; ve rous sarkoma virüsü, harvey sarkoma virüsü, avian lökoz virüsü, bir lentivirüs, insan immün yetmezlik virüsü, miyeloproliferatif sarkoma virüsü ve meme tümörü virüsünden elde edilen vektörler) dayanan viral vektörler) ve benzeri vektörler sayılabilir.

Sektörde bilgi ve beceri sahibi uzmanların bilgisi dahilinde olan pek çok uygun ekspresyon vektörü bulunmakta ve bunların birçoğu ticari piyasada yer almaktadır. Aşağıda sıralanan vektörler bunlara verilebilecek örneklerden bazılarıdır: ökaryotik konakçı hücreler için: pXT1, pSG5 (Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG ve pSVLSV40 (Pharmacia). Bunların yanı sıra, konakçı hücre ile uyumlu ve geçimli olduğu sürece başka herhangi bir vektör de kullanılabilir.

Kullanılan konakçı/vektör sistemine bağlı olarak, ekspresyon vektöründe aralarında konstitütif ve indüklenebilir promotörlerin, transkripsiyon artırıcı elemanların, transkripsiyon terminatörlerinin ve benzeri unsurların da bulunduğu pek çok uygun transkripsiyon ve translasyon kontrol elemanından herhangi biri kullanılabilir (örneğin bkz: Bitter et al. (1987) Methods in Enzymology, 153:516-544).

Buluşun bazı yapılarında, bir DNA-hedefleyen RNA ve/veya bir

varyant Cas9 yer-hedefli polipeptidi kodlayan bir nükleotid sekansı, bir kontrol elemanına, örneğin bir promotör gibi bir transkripsiyonel kontrol elemanına operabl bağlanır. Transkripsiyonel kontrol elemanı, bir ökaryotik hücrede, örneğin bir memeli hücrede ya da bir prokaryotik hücrede (örneğin bir bakteri veya arke hücresi) fonksiyonel olabilir. Buluşun bazı yapılarında, bir DNA-hedefleyen RNA ve/veya bir varyant Cas9 yer-hedefli polipeptidi kodlayan bir nükleotid sekansı, bir DNA-hedefleyen RNA ve/veya bir varyant Cas9 yer-hedefli polipeptidi kodlayan nükleotid sekansının hem prokaryotik hücrelerde hem de ökaryotik hücrelerde eksprese olmasına olanak sağlayacak olan birden çok kontrol elemanına operabl bağlanır.

Bir promotör; bir konstitütif olarak aktif promotör (yani, konstitütif olarak aktif/"AÇIK" halde bulunan bir promotör), bir indüklenebilir promotör (yani, aktif/"AÇIK" halde mi yoksa inaktif/"KAPALI" halde mi bulunacağı, bir dışsal uyarının varlığına, örneğin belirli bir sıcaklık değerinin söz konusu olup olmamasına ya da belirli bir bileşik veya proteinin bulunup bulunmamasına göre belirlenen bir promotör), uzam bakımından kısıtları bulunan bir promotör (yani transkripsiyonel kontrol elemanı, artırıcı ve benzeri) (örneğin doku-spesifik promotör, hücre tipi-spesifik promotör ve benzeri) ya da zaman bakımından kısıtları bulunan bir promotör (yani, promotör, embriyonik gelişimin belirli safhaları esnasında ya da bir biyolojik prosesin örneğin farelerdeki kıl folikülü döngüsünün belirli safhaları esnasında "AÇIK" ya da "KAPALI" halde bulunur) olabilir.

Uygun promotörler virüslerden edinilebilirler ve böyle promotörlere viral promotörler olarak atıf yapılabilir ya da ister prokaryotik ister

- ökaryotik nitelikte olan herhangi bir organizmadan elde edilebilirler. Uygun promotörler, herhangi bir RNA polimerazla (örneğin pol I, pol II, pol III) ekspresyonu yönlendirmek için kullanılabilirler. Promotör örnekleri arasında, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, SV40 erken promotörü, fare meme tümörü virüsü uzun terminal tekrarı (LTR) promotörü, adenovirüs majör geç promotörü (Ad MLP), bir herpes simpleks virüsü (HSV) promotörü, bir sitomegalovirüs (CMV) promotörü, örneğin CMV ilk erken promotör bölgesi (CMVIE), bir rous sarkoma virüsü (RSV) promotörü, bir insan U6 küçük nükleer promotörü (U6) (Miyagishi et al., Nature Biotechnology 20, 497 - 500 (2002)), bir geliştirilmiş U6 promotörü (örneğin bkz: Xia et al., Nucleic Acids Res. 2003 Sep 1;31(17)), bir insan H1 promotörü (H1) ve benzeri promotörler sayılabilir.
- 15 İndüklenebilir promotörlere verilebilecek örnekler arasında, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, T7 RNA polimeraz promotörü, T3 RNA polimeraz promotörü, izopropil-beta-D-tiogalaktopiranozitin (IPTG) düzenlediği promotör, laktozun indüklediği promotör, ısı şok promotörü, tetrasiklinin düzenlediği promotör (örneğin Tet-AÇIK, 20 Tet-KAPALI ve benzeri), steroidin düzenlediği promotör, metalin düzenlediği promotör, östrojen reseptörünün düzenlediği promotör ve benzeri promotörler bulunur. Dolayısıyla, indüklenebilir promotörler, aralarında sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın doksisisiklin, RNA polimeraz, örneğin T7 RNA polimeraz, bir östrojen reseptörü, bir 25 östrojen reseptörü füzyonu ve benzeri moleküllerin bulunduğu moleküllerle düzenlenebilirler.

Buluşun bazı yapılarında, promotör, uzam bakımından kısıtları

bulunan bir promotördür (yani hücre tipi-spesifik promotör, doku-spesifik promotör ve benzeri), örneğin bir çokhücreli organizmada sadece belirli hücrelerden oluşan bir hücre altkümesinde aktiftir (yani "AÇIK"). Uzam bakımından kısıtları bulunan promotörlere artırıcılar, transkripsiyonel kontrol elemanları, kontrol sekansları ve benzeri başka adlarla da atıf yapılabilir. Uygun herhangi bir uzam bakımından kısıtları bulunan promotör kullanılabilir; hangi promotörün (örneğin bir beyin-spesifik promotör, bir nöron altkümesindeki ekspresyonu yönlendiren bir promotör, germ hattındaki ekspresyonu yönlendiren bir promotör, akciğerlerdeki ekspresyonu yönlendiren bir promotör, kaslardaki ekspresyonu yönlendiren bir promotör, pankreas adacık hücrelerindeki ekspresyonu yönlendiren bir promotör ve benzeri promotörler) en uygunu olduğu, ilgili organizmanın ne olduğuna bağlıdır. Örneğin bitkiler, sinekler, solucanlar, memeliler, fareler ve benzeri canlılar için bilinen çeşitli farklı uzam bakımından kısıtları bulunan promotörler söz konusudur. Dolayısıyla, bir uzam bakımından kısıtları bulunan promotör, organizmanın ne olduğuna bağlı olarak türlü çeşit farklı dokuda ve hücre tipinde, buluşa uygun bir yer-hedefli polipeptidi kodlayan bir nükleik asidin ekspresyonunu düzenlemek için kullanılabilir. Bazı uzam bakımından kısıtları bulunan promotörlerde aynı zamanda zaman bakımından da kısıtlar söz konusudur; böyle bir promotör örneğin embriyonik gelişimin belirli safhaları esnasında ya da bir biyolojik prosesin (örneğin farelerdeki kıl folikülü döngüsü) belirli safhaları esnasında "AÇIK" ya da "KAPALI" halde bulunur.

Uzam bakımından kısıtları bulunan promotörlere örnek olarak, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, nöron-spesifik promotörler, adiposit-



spesifik promotörler, kardiyomiyosit-spesifik promotörler, düz kas-spesifik promotörler, fotoreseptör-spesifik promotörler ve benzeri promotörler gösterilebilir. Uzam bakımından kısıtları bulunan nöron-spesifik promotörler arasında, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, bir

5 nöron-spesifik enolaz (NSE) promotörü (örneğin bkz: EMBL HSENO2, X51956), bir aromatik amino asit dekarboksilaz (AADC) promotörü, bir nörofilamen promotörü (örneğin bkz: GenBank HUMNFL, L04147), bir sinapsin promotörü (örneğin bkz: GenBank HUMSYNIB, M55301), bir thy-1 promotörü (örneğin bkz: Chen et al.

10 (1987) *Cell* 51:7-19; ve Llewellyn, et al. (2010) *Nat. Med.* 16(10):1161-1166), bir serotonin reseptörü promotörü (örneğin bkz: GenBank S62283); bir tirozin hidroksilaz promotörü (TH) (örneğin bkz: Oh et al. (2009) *Gene Ther* 16:437; Sasaoka et al. (1992) *Mol. Brain Res.* 16:274; Boundy et al. (1998) *J. Neurosci.* 18:9989; Kaneda

15 et al. (1991) *Neuron* 6:583-594), bir GnRH promotörü (örneğin bkz: Radovick et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:3402-3406), bir L7 promotörü (örneğin bkz: Oberdick et al. (1990) *Science* 248:223-226), bir DNMT promotörü (örneğin bkz: Bartge et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:3648-3652); bir enkefalin

20 promotörü (örneğin bkz: Comb et al. (1988) *EMBO J.* 17:3793-3805), bir miyelin bazik protein (MBP) promotörü, bir Ca<sup>2+</sup>-kalmodulin-bağımlı protein kinaz II-alfa (CamKII $\alpha$ ) promotörü (örneğin bkz: Mayford et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:13250; Casanova et al. (2001) *Genesis* 31:37), bir CMV

25 artırıcı/trombosit-kaynaklı büyüme faktörü- $\beta$  promotörü (örneğin bkz: Liu et al. (2004) *Gene Therapy* 11:52-60) ve benzeri promotörler sayılabilir.

Uzam bakımından sınırları bulunan adiposit-spesifik promotörler arasında, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, bir aP2 geni promotörü/artırıcısı, örneğin bir insan aP2 geninin -5,4 ilâ +21 bp'sinden oluşan bölgesi (örneğin bkz: Tozzo et al. (1997) *Endocrinol.* 138:1604; Ross et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:9590; ve Pavjani et al. (2005) *Nat. Med.* 11:797), bir glukoz taşıyıcı-4 (GLUT4) promotörü (örneğin bkz: Knight et al. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:14725), bir yağ asidi translokaz (FAT/CD36) promotörü (örneğin bkz: Kuriki et al. (2002) *Biol. Pharm. Bull.* 25:1476; Sato et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277:15703); bir stearoil-CoA desatüraz-1 (SCD1) promotörü (Tabor et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274:20603), bir leptin promotörü (örneğin bkz: Mason et al. (1998) *Endocrinol.* 139:1013; Chen et al. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 262:187), bir adiponektin promotörü (örneğin bkz: Kita et al. (2005) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 331:484; Chakrabarti (2010) *Endocrinol.* 151:2408), bir adipsin promotörü (örneğin bkz: Platt et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:7490), bir resistin promotörü (örneğin bkz: Seo et al. (2003) *Molec. Endocrinol.* 17:1522) ve benzeri promotörler sayılabilir.

20

Uzam bakımından kısıtları bulunan kardiyomiyosit-spesifik promotörler arasında, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, aşağıda belirtilen genlerden elde edilebilecek olan kontrol sekansları bulunur: miyosin hafif zinciri-2,  $\alpha$ -miyosin ağır zinciri, AE3, kardiyak troponin C, kardiyak aktin ve benzerleri. Franz et al. (1997) *Cardiovasc. Res.* 35:560-566; Robbins et al. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 752:492-505; Linn et al. (1995) *Circ. Res.* 76:584-591; Parmacek et al. (1994) *Mol. Cell. Biol.* 14:1870-1885; Hunter et al. (1993) *Hypertension*

25

22:608-617; Sartorelli et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4047-4051.

Uzam bakımından kısıtları bulunan düz kas-spesifik promotörler arasında, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, bir SM22 $\alpha$  promotörü (örneğin bkz: Akyürek et al. (2000) Mol. Med. 6:983; 7.169.874 sayılı ABD patenti), bir smoothelin promotörü (örneğin bkz: WO 2001/018048), bir  $\alpha$ -düz kas aktif promotörü ve benzeri promotörler sayılabilir. Örneğin, SM22 $\alpha$  promotörünün iki CArG elemanının bulunduğu 0,4 kb büyüklüğündeki bir bölgesinin vasküler düz kas hücreleri-spesifik ekspresyona aracılık ettiği ortaya konmuştur (örneğin bkz: Kim, et al. (1997) Mol. Cell. Biol. 17, 2266-2278; Li, et al., (1996) J. Cell Biol. 132, 849-859; Moessler, et al. (1996) Development 122, 2415-2425).

15

Uzam bakımından kısıtları bulunan fotoreseptör-spesifik promotörler arasında, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, bir rodopsin promotörü, bir rodopsin kinaz promotörü (Young et al. (2003) Ophthalmol. Vis. Sci. 44:4076), bir beta fosfodiesteraz geni promotörü (Nicoud et al. (2007) J. Gene Med. 9:1015), bir retinitis pigmentosa geni promotörü (Nicoud et al. (2007), yukarıda atıf yapılan eser), bir interfotoreseptör retinoid-bağlanımlı protein (IRBP) geni artırıcısı (Nicoud et al. (2007), yukarıda atıf yapılan eser), bir IRBP geni promotörü (Yokoyama et al. (1992) Exp Eye Res. 55:225) ve benzeri promotörler sayılabilir.

25

## **KUTUPHANELER**

Bu buluş, bir DNA-hedefleyen RNA kütüphanesi ortaya koyar. Bu buluş, DNA-hedefleyen RNA'lar kodlayan nükleotidlerin yer aldığı nükleik asitlerden oluşan bir nükleik asit kütüphanesi ortaya koyar. DNA-hedefleyen RNA'lar kodlayan nükleotidlerin yer aldığı nükleik asitlerden oluşan buluşa uygun bir nükleik asit kütüphanesinde, DNA-hedefleyen RNA'ları kodlayan nükleotidlerin yer aldığı rekombinan ekspresyon vektörlerinden oluşan bir rekombinan ekspresyon vektörü kütüphanesi bulunabilir.

10 Buluşa uygun bir kütüphane, yaklaşık 10 ayrı üye ile yaklaşık  $10^{12}$  ayrı üye arası bir sayıda üyeden oluşabilir; örneğin, buluşa uygun bir kütüphane, yaklaşık 10 ayrı üye ile yaklaşık  $10^2$  ayrı üye arası, yaklaşık  $10^2$  ayrı üye ile yaklaşık  $10^3$  ayrı üye, yaklaşık  $10^3$  ayrı üye ile yaklaşık  $10^5$  ayrı üye, yaklaşık  $10^5$  ayrı üye ile yaklaşık  $10^7$  ayrı üye, yaklaşık  $10^7$  ayrı üye ile yaklaşık  $10^9$  ayrı üye ya da yaklaşık  $10^9$  ayrı üye ile yaklaşık  $10^{12}$  ayrı üye arası bir sayıda üyeden oluşabilir.

Buluşa uygun bir kütüphanedeki her bir "ayrı üye", kütüphanenin diğer üyelerinden DNA-hedefleyen RNA'nın DNA-hedefleyen segmentindeki nükleotid sekansı bakımından ayrılır. Dolayısıyla, buluşa uygun bir kütüphanenin her ayrı üyesi, örneğin, kütüphanenin diğer üyelerinin tümü ile aynı veya hemen hemen aynı protein-bağlanımlı segment nükleotid sekansını ihtiva edebilir ve kütüphanesinin diğer üyelerinin tümü ile aynı veya hemen hemen aynı transkripsiyonel terminasyon segmenti nükleotid sekansını ihtiva edebilir, fakat DNA-hedefleyen RNA'nın DNA-hedefleyen segmentindeki nükleotid sekansı bakımından kütüphanenin diğer

üyelerinden ayrılır. Kütüphane, bu sayede, farklı hedef nükleik asitlere bağlanan üyelerden oluşabilir.

## **KULLANIM ALANLARI**

5

Bu tarifnameye göre bir transkripsiyon modüle etme yöntemi, yine burada sunulmakta olan çeşitli uygulamalarda kullanılabilir. Bu uygulamalar arasında, araştırma amaçlı uygulamalar, diagnostik uygulamalar, endüstriyel uygulamalar ve tedavi uygulamaları bulunur.

10

Araştırma uygulamalarına örnek olarak, örneğin bir hedef nükleik asidin transkripsiyonunun azaltılması veya artırılmasının örneğin downstream kısımdaki bir genin gelişimi, metabolizması ve ekspresyonuna etkisini belirlemeye yönelik bir uygulama ve benzeri uygulamalar gösterilebilir.

15

Buluşa uygun bir transkripsiyon modülasyon yöntemi kullanılarak, DNA-hedefleyen RNA'nın sadece DNA-hedefleyen segmentinin değiştirilmesinin gerektiği, protein-bağlanımlı segment ile transkripsiyon terminasyon segmentinin (bazı durumlarda) sabit tutulabileceği yüksek çıktılı genomik analiz gerçekleştirilebilir.

20

Genomik analizde kullanılan ve birden çok nükleik asitten oluşan bir kütüphanede (örneğin buluşa uygun bir kütüphane), bir DNA-hedefleyen RNA kodlayan bir nükleotid sekansına operabl bağlı bir promotör bulunur ve her nükleik asit farklı birer DNA-hedefleyen

25

segmente, aynı protein-bağlanımlı segmente ve aynı-transkripsiyon terminasyon segmentini içerir. Bir çipte  $5 \times 10^4$  adet özgün ve eşsiz DNA-hedefleyen RNA bulunabilir. Uygulamalar arasında, büyük

ölçekli fenotipleme, gen-fonksiyon haritalaması ve meta-genomik analiz bulunur.

Burada açıklanan buluşa uygun yöntemler, metabolik mühendislik alanında kullanılabilirler. Burada açıklandığı gibi olan uygun bir DNA-hedefleyen RNA tasarlanarak transkripsiyon seviyeleri önceden tahmin edilebilir ve etkili bir şekilde kontrol altında tutulabileceği için, metabolik yolların (örneğin biyosentetik yollar) aktivitesi ilgilenilen metabolik yoldaki belirli enzimlerin seviyesini (örneğin transkripsiyonu artırmak veya azaltmak suretiyle) kontrol altında tutmak suretiyle isabetli ve kesin bir şekilde kontrol altında tutulabilir ve ayarlanabilir. İlgilenilen metabolik yollar arasında, kimyasal (ince kimyasallar, yakıt, antibiyotikler, toksinler, agonistler, antagonistler ve benzerleri) ve/veya ilaç üretimi için kullanılanlar bulunur.

İlgilenilen biyosentetik yollar arasında, sadece bunlarla sınırlı kalmaksızın, (1) mevalonat yolu (örneğin HMG-CoA redüktaz yolu) (asetil-CoA'yı dimetilallil pirofosfat (DMAPP) ve izopentenil pirofosfata (IPP) dönüştüren yoldur; bu ürünler, terpenoidler/izoprenoidlerin de aralarında bulunduğu pek çok farklı biyomolekülün biyosentezinde kullanılırlar), (2) mevalonat yolu olmayan yol (yani "2-C-metil-D-eritritol 4-fosfat/1-deoksi-D-ksiluloz 5-fosfat yolu" ya da "MEP/DOXP yolu" ya da "DXP yolu") (yine DMAPP ve IPP üreten bir yoldur, ancak bunu mevalonat yoluna alternatif bir yolla piruvat ve gliseraldehit 3-fosfatı DMAPP ve IPP'ye dönüştürmek suretiyle yapar), (3) poliketid sentez yolu (çeşitli poliketid sentaz enzimleri aracılığıyla muhtelif

poliketidler üreten yolaktır; poliketidler arasında, kemoterapi için kullanılan doğada kendiliğinden oluşan küçük moleküller (örneğin tetrasiklin ve makrolidler) bulunur ve endüstriyel açıdan önemli poliketidler arasında, rapamisin (immünoşüpresan), eritromisin (antibiyotik), lovastatin (antikolesterol ilacı) ve epotilon B (antikanser ilacı) bulunur), (4) yağ asidi sentez yolları, (5) DAHP (3-deoksi-D-arabino-heptülozonat 7-fosfat) sentez yolağı, (6) potansiyel biyoyakıtlar (örneğin kısa zincirli alkoller ve alkan, yağ asidi metil esterleri ve yağ alkoller, izoprenoidler ve benzeri) üreten yollar ve benzeri yollar sayılabilir.

### **Ağlar ve kaskadlar**

Burada açıklanan yöntemler, entegre kontrol ağları (yani bir kaskad veya kaskadlar) tasarlamak için kullanılabilirler. Örneğin, buluşa uygun bir DNA-hedefleyen RNA / varyant Cas9 yer-hedefli polipeptidi, başka bir DNA-hedefleyen RNA veya başka bir buluşa uygun varyant Cas9 yer-hedefli polipeptidinin ekspresyonunu kontrol altına almak (yani modüle etmek, örneğin artırmak, azaltmak) için kullanılabilir. Örneğin, bir birinci DNA-hedefleyen RNA, birinci varyant Cas9 yer-hedefli polipeptidinin sahip olduğu fonksiyondan farklı bir fonksiyona (örneğin metiltransferaz aktivitesi, demetilaz aktivitesi, asetiltransferaz aktivitesi, deasetilaz aktivitesi ve benzeri) sahip olan bir ikinci kimerik dCas9 polipeptidinin transkripsiyonunu modüle edecek şekilde tasarlanabilir. Ayrıca, farklı dCas9 proteinleri (örneğin farklı türlerden elde edilen proteinler) farklı Cas9 sapları (yani protein-bağımlı segment) gerektirebilecekleri için, ikinci kimerik dCas9 polipeptidi, birinci dCas9 polipeptidinin elde edildiği türden farklı bir türe ait olabilir. Dolayısıyla, bazı durumlarda, ikinci

kimerik dCas9 polipeptidi olarak, birinci DNA-hedefleyen RNA ile etkileşime girmeyecek olan bir polipeptid seçilebilir. Başka durumlarda ise, ikinci kimerik dCas9 polipeptidi olarak, birinci DNA-hedefleyen RNA ile etkileşime girecek olan bir polipeptid seçilebilir.

5 Bu gibi durumların bazılarında, iki (veya daha fazla sayıdaki) dCas9 proteininin aktiviteleri birbirleriyle yarışabilir (örneğin polipeptidlerde ters aktiviteler varsa) ya da sinerji oluşturabilir (örneğin polipeptidlerde benzer veya sinerjistik aktiviteler varsa). Benzer şekilde, yukarıda belirtildiği gibi, ağdaki komplekslerden (yani DNA-

10 hedefleyen RNA / dCas9 polipeptidi) herhangi biri, diğer DNA-hedefleyen RNA'lar veya dCas9 polipeptidlerini kontrol altında tutacak şekilde tasarlanabilir. Buluşa uygun bir DNA-hedefleyen RNA ve buluşa uygun bir varyant Cas9 yer-hedefli polipeptidi istenen herhangi bir DNA sekansına yönlendirebileceği için, burada açıklanan

15 yöntemler kullanılarak istenen herhangi bir hedefin ekspresyonu kontrol altına alınabilir ve düzenlenebilir. Tasarlanabilecek olan entegre ağlar (yani etkileşim kaskadları), çok basit olabilecekleri gibi çok kompleks de olabilirler ve herhangi bir sınırlamaya tâbi değildirler.

20

İki veya daha fazla sayıda komponentin (örneğin DNA-hedefleyen RNA'lar, aktive edici RNA'lar, hedef gösteren RNA'lar veya dCas9 polipeptidleri) her birinin başka bir DNA-hedefleyen RNA/dCas9 polipeptidi kompleksinin düzenleyici kontrolü altında bulunduğu bir

25 ağda, ağdaki komponentlerden birinin ekspresyon seviyesi, ağdaki başka bir komponentin ekspresyon seviyesine etki edebilir (örneğin o ekspresyonu artırabilir veya azaltabilir). Bu mekanizma aracılığıyla, bir komponentin ekspresyonu aynı ağdaki farklı bir komponentin



ekspresyonunu etkileyebilir ve bu ağda, diğer komponentlerin ekspresyonunu artıran komponentler ile diğer komponentlerin ekspresyonunu azaltan komponentlerden oluşan bir karışım yer alabilir. Sektörde bilgi ve beceri sahibi uzmanların rahatlıkla anlayabilecekleri üzere, bir komponentin ekspresyon seviyesinin bir veya daha fazla sayıda farklı komponentin ekspresyon seviyesini etkileyebileceğine işaret eden yukarıdaki örnekler, sadece söz konusu konuyu açıklamak ve örneklendirmek maksadıyla sunulmaktadır ve bu bağlamda sınırlayıcı bir anlam taşımamaktadırlar. İsteğe bağlı olarak bir veya daha fazla sayıda komponent modifiye edilip (yukarıda açıklandığı gibi) manipüle edilebilir hale getirilerek (yani deneysel kontrol, örneğin sıcaklık kontrolü, ilaç kontrolü, yani ilaçla indüklenebilirlik, ışık kontrolü ve benzeri bir unsurla kontrol altında tutulabilir hale getirilerek), bir ağa bir ek komplekslik katmanı daha katılabilir.

Sınırlayıcı bir anlam taşımayan bir örnek olarak, bir birinci DNA-hedefleyen RNA, bir ikinci DNA-hedefleyen RNA'nın bir hedef terapötik/metabolik genin ekspresyonunu kontrol altında tutan promotörüne bağlanabilir. Bu gibi bir durumda, birinci DNA-hedefleyen RNA'nın koşullu ekspresyonu terapötik/metabolik geni dolaylı olarak aktive eder. Bu tip RNA kaskadları, örneğin bir baskılayıcının kolayca bir aktive ediciye dönüştürülmesini sağlarlar ve bir hedef genin ekspresyonunun lojiklerini veya dinamiklerini kontrol altında tutmak için kullanılabilirler.

Buluşa uygun bir transkripsiyon modülasyon yöntemi, ilaç keşfi ve hedef validasyonu için de kullanılabilir.

## KİTLER

- Bu buluş, söz konusu yöntemi gerçekleştirmeyi sağlayan bir kit sağlar. Söz konusu bir kitte şunlar bulunur: a) aşağıda belirtilenleri
- 5 ihtiva eden buluşa konu olan bir DNA-hedefleyen RNA ya da DNA-hedefleyen RNA'yı kodlayan bir nükleotid sekansının yer aldığı bir nükleik asit: i) hedef DNA'daki bir hedef sekansı tamamlayıcı nitelikte bir nükleotid sekansı içeren bir birinci segment; ii) bir yer-hedefli polipeptid ile etkileşime giren bir ikinci segment ve iii) bir
- 10 transkripsiyonel terminatör; ve b) bir tampon. Bazı durumlarda, DNA-hedefleyen RNA'yı kodlayan bir nükleotid sekansının yer aldığı nükleik asitte, yabani tip Cas9'a kıyasla daha az endodeoksiribonükleaz aktivitesi sergileyen bir varyant Cas9 yer-hedefli polipeptidini kodlayan bir nükleotid sekansı da bulunur.
- 15 Bazı durumlarda, söz konusu bir kitte, yabani tip Cas9'a kıyasla daha az endodeoksiribonükleaz aktivitesi sergileyen bir varyant Cas9 yer-hedefli polipeptidi de bulunur.
- 20 Bazı durumlarda, söz konusu bir kitte, yabani tip Cas9'a kıyasla daha az endodeoksiribonükleaz aktivitesi sergileyen bir varyant Cas9 yer-hedefli polipeptidini kodlayan bir nükleotid sekansının yer aldığı bir nükleik asit de bulunur.
- 25 Söz konusu bir kitte, aşağıda belirtilenler arasından seçilebilecek olan bir veya daha fazla sayıda ek reaktif de bulunabilir: bir tampon; bir yıkama tamponu; bir kontrol reaktifi; bir kontrol ekspresyon vektörü veya RNA polinükleotidi; varyant Cas9 yer-hedefli polipeptidinin

DNA'dan in vitro ortamda üretimi için bir reaktif ve benzeri unsurlar. Bazı durumlarda, buluşa uygun bir kit içerisinde varyant Cas9 yer-hedefli polipeptidi, yukarıda tanımlandığı gibi olan bir füzyon varyant Cas9 yer-hedefli polipeptididir.

5

Söz konusu bir kitin komponentleri ayrı kaplarda bulunabilecekleri gibi aynı kap bünyesinde de toplanabilirler.

Söz konusu bir kitte, yukarıda bahsi geçen komponentlerin yanı sıra, buluşa konu olan yöntemlerin uygulanışı esnasında kit komponentlerinin nasıl kullanılmaları gerektiğini açıklayan bir talimatname de bulunabilir. Buluş konusu yöntemlerin uygulanışını açıklayan bir talimatname genelde uygun bir kayıt ortamına kaydedilir. Talimatname örneğin kâğıt veya plastik ya da benzeri bir alt malzemenin üzerine basılabilir. Talimatname kitlerde kitin veya komponentlerinin ya da benzeri unsurların bulunduğu kabın etiket bilgileri kapsamında (yani ambalaj malzemesiyle veya alt-ambalaj malzemesiyle bağlantılı bir yerde) bir kullanma talimatı olarak da sunulabilir. Buluşun başka yapılarında, talimatname, bilgisayarda okunabilir uygun bir saklama ortamında, örneğin CD-ROM, disket, flaş disk veya benzeri başka bir saklama ortamında bulunan bir elektronik saklama veri dosyası olarak sunulur. Buluşun yine başka yapılarında, talimatname fiilen kit bünyesinde yer almaz, fakat kullanıcının talimatnameyi kaynağından, örneğin internetten nasıl edinebileceği hakkında bilgi verilir. Bu buluş yapısına bir örnek olarak, talimatnamenin görüntülenebileceği ve/veya talimatnamenin indirilebileceği bir web adresinin bilgilerini içeren bir kit gösterilebilir. Talimatnamenin kite fiilen dahil edildiği durumda

10  
15  
20  
25

olduğu gibi, talimatnamenin nasıl edinilebileceği hakkındaki bilgiler de uygun bir alt malzemenin üzerine kaydedilir.

## ÖRNEKLER

5

Aşağıdaki örnekler, sektörde bilgi ve beceri sahibi kişilere, bu buluşun nasıl yapıldığına ve nasıl kullanılacağına ilişkin tam bir açıklama ve tarifname sunmak için verilmişlerdir ve ne buluş sahiplerinin buluş olarak kabul ettikleri kapsamı sınırlandırmaları hedeflenir, ne de bu

10 örneklerde açıklanan deneylerin gerçekleştirilen deneylerin tümü olduğu ya da yalnızca bu deneylerin gerçekleştirildiği kastedilmektedir. Kullanılan rakamların (örneğin, miktarlar, sıcaklıklar ve benzerleri) doğruluğunu sağlamak ve garanti etmek için çaba sarf edilmiştir, fakat bazı deneysel hatalar ve sapmalar

15 olabileceği dikkate alınmalıdır. Aksi belirtilmedikçe, birimleri, ağırlık itibariyle birimlerdir; moleköl ağırlığı, ağırlık ortalamalı moleköl ağırlığıdır; sıcaklık, derece Santigrat cinsindedir ve basınç, atmosferik basınç seviyesinde ya da ona yakındır. Aşağıda örnekleri verilenler gibi standart kısaltmalar kullanılabilir: bp, baz çift(ler)i; kb,

20 kilobaz(lar); pl, pikolitre(ler); s veya sn., saniye(ler); dak., dakika(lar); h veya hr, saat(ler); aa, amino asit(ler); kb, kilobaz(lar); bp, baz çift(ler)i; nt, nükleotid(ler); i.m., intramüsüler (yolla); i.p., intraperitoneal (yolla); s.c., subkutan (yolla) ve benzerleri.

25 **Örnek 1: Hedef DNA'da modifikasyonlar oluşturmak için Cas9 kullanımı.**

## MALZEMELER VE YONTEMLER

### **Bakteriyel suşlar ve kültür koşulları**

%0,2 maya ekstresi (Oxoid)) takviyeli THY vasatı (Todd Hewitt Broth (THB, Bacto, Becton Dickinson) içinde ya da %3 koyun kanı takviyeli TSA (triptikaz soya agarı, BBL, Becton Dickinson) üzerinde 5 kültürlenmiş *Streptococcus pyogenes*, çalkalama yapılmadan %5 CO<sub>2</sub> ilave edilmiş bir atmosferde 37°C sıcaklıkta inkübe edildi. Luria-Bertani (LB) vasatı ve agarında kültürlenmiş *Escherichia coli*, çalkalanarak 37°C sıcaklıkta inkübe edildi. Gerektiğinde, vasata 10 aşağıdaki nihai konsantrasyonlarda uygun antibiyotikler ilave edildi: ampisilin, *E. coli* için 100 µg/ml; kloramfenikol, *Escherichia coli* için 33 µg/ml; kanamisin, *E. coli* için 25 µg/ml ve *S. pyogenes* için 300 µg/ml. Bakteriyel hücre çoğalması, bir mikropilaka okuyucu (SLT Spectra Reader) kullanılarak 620 nm'de kültür alikotlarının optik 15 yoğunluğunun ölçülmesi suretiyle periyodik olarak izlendi.

### **Bakteriyel hücrelerin transformasyonu**

*E. coli* hücrelerine plazmid DNA transformasyonu, bir standart ısı şok 20 protokolüne göre gerçekleştirildi. *S. pyogenes* transformasyonu, yapılan bazı modifikasyonlar hariç daha önce tarif edildiği gibi gerçekleştirildi. Plazmid idamesi üzerinde *in vivo* CRISPR/Cas aktivitesini izleme amacına yönelik transformasyon eseyi esas olarak daha önce tarif edildiği gibi gerçekleştirildi. Kısaca açıklamak 25 gerekirse, elektrokompentan *S. pyogenes* hücreleri, aynı hücre yoğunluğuna eşitlendi ve 500 ng plazmid DNA'yla elektropore edildi. Her transformasyon iki ilâ üç defa plakalandı ve istatistiksel analiz için kompetan hücrelerin farklı serileriyle bağımsız şekilde üç defa

deney gerçekleştirildi. Transformasyon etkinlikleri, beher  $\mu\text{g}$  DNA'da CFU (koloni oluşturuucu birimler) olarak hesaplandı. Steril suyla ve omurga vektör pEC85'le kontrol transformasyonları gerçekleştirildi

## 5 DNA manipülasyonları

DNA hazırlama, amplifikasyonu, sindirimi, ligasyonu, saflaştırması, agaroz jel elektroforezi de dahil DNA manipülasyonları, çok küçük modifikasyonlarla standart teknikler uygulanarak gerçekleştirildi. *İn vitro* yarma ve *S. Pyogenes* transformasyon eseyleri için ön-aralık plazmidleri daha önce tarif edildiği gibi oluşturuldu (4). *İn vitro* yarıma eseyleri için ilave pUC19-bazlı ön-aralık plazmidleri, pUC19'da sindirilen EcoRI ile BamHI yerleri arasına kaynaşmış oligonükleotidlerin ligate edilmeleri yoluyla oluşturuldu. GFP geni içeren plazmid daha önce tarif edilmiştir (41). DNA hazırlama ve plazmid hazırlama işlemleri için kitler (Qiagen) kullanıldı. QuikChange® II XL kit (Stratagene) veya QuikChange yer-hedefli mutageniz kiti (Agilent) kullanılarak plazmid mutagenizi gerçekleştirildi. Sentetik oligonükleotidler ve RNA'lar, VBC-Biotech Services, Sigma-Aldrich ve Integrated DNA Technologies firmalarından tedarik edildi.

### *İn vitro* transkripsiyon şablonları için oligonükleotidler

25 ***S. Pyogenes*'in *in vitro* ortamda transkribe edilmiş CRISPR Tip II-A tracrRNA ve crRNA'ları için şablonlar (tracrRNA için - kromozom DNA SF370 üzerinde PCR; crRNA için - iki oligonükleotidin kaynaştırılması)**

**T7-tracrRNA (75nt)**

OLEC1521 (F 5' tracrRNA): SEKANS KOD NO.: 34

OLEC1522 (R 3' tracrRNA): SEKANS KOD NO.: 341

5

**T7-crRNA (şablon)**

OLEC2176 (F crRNA-sp1): SEKANS KOD NO.: 342

OLEC2178 (R crRNA-sp1): SEKANS KOD NO.: 343

10 OLEC2177 (F crRNA-sp2): SEKANS KOD NO.: 344

OLEC2179 (R crRNA-sp2): SEKANS KOD NO.: 345

15 ***İn vitro* ortamda transkribe edilmiş N. meningitidis tracrRNA ve tasarlanmış crRNA-sp2 için şablonlar (tracrRNA için - kromozom DNA Z2491 üzerinde PCR; crRNA için - iki oligonükleotidin kaynaştırılması)**

**T7-tracrRNA**

20 OLEC2205 (F tahmin edilen 5'): SEKANS KOD NO.: 346

OLEC2206 (R tahmin edilen 3'): SEKANS KOD NO.: 347

**T7-crRNA (şablon)**

25 OLEC2209 (F sp2(speM) + N.m. tekrarı): SEKANS KOD NO.:  
348

OLEC2214 (R sp2(speM) + N.m. tekrarı): SEKANS KOD NO.:  
349

***İn vitro* ortamda transkribe edilmiş *L. innocua* tracrRNA ve tasarlanmış crRNA-sp2 için şablonlar (tracrRNA için - kromozom DNA Clip11262 üzerinde PCR; crRNA için - iki oligonükleotidin kaynaştırılması)**

5

**T7-tracrRNA**

OLEC2203 (F tahmin edilen 5'): SEKANS KOD NO.: 350

OLEC2204 (R tahmin edilen 3'): SEKANS KOD NO.: 351

10

**T7-crRNA (şablon)**

OLEC2207 (F sp2(speM) + L.in. tekrarı): SEKANS KOD NO.:  
352

15

OLEC2212 (R sp2(speM) + L.in. tekrarı): SEKANS KOD NO.:  
353

***İn vitro* ve *in vivo* çalışmalar kullanmak üzere ön-aralık plazmidler inşa etmek için oligonükleotidler**

20

***İn vitro* ortamda ve *S. Pyogenes*'de (şablon: kromozom DNA MGAS8232 veya speM fragmanları içeren plazmidler) speM (aralık 2 (CRISPR Tip II-A, SF370; MGAS8232'den ön-aralık profajı ø8232.3) analizi için plazmidler**

25

**pEC287**

OLEC1555 (F speM): SEKANS KOD NO.: 354



OLEC1556 (R speM): SEKANS KOD NO.: 355

**pEC488**

5 OLEC2145 (F speM): SEKANS KOD NO.: 356

OLEC2146 (R speM): SEKANS KOD NO.: 357

**pEC370**

10 OLEC1593 (F pEC488 ön-aralık 2 A22G): SEKANS KOD  
NO.: 358

OLEC1594 (R pEC488 ön-aralık 2 A22G): SEKANS KOD  
NO.: 359

15 **pEC371**

OLEC1595 (F pEC488 ön-aralık 2 T10C): SEKANS KOD  
NO.: 360

20 OLEC1596 (R pEC488 ön-aralık 2 T10C): SEKANS KOD  
NO.: 361

**pEC372**

25 OLEC2185 (F pEC488 ön-aralık 2 T7A): SEKANS KOD NO.:  
362

OLEC2186 (R pEC488 ön-aralık 2 T7A): SEKANS KOD NO.:  
363

**pEC373**

- OLEC2187 (F pEC488 ön-aralık 2 A6T): SEKANS KOD NO.:  
364
- 5 OLEC2188 (R pEC488 ön-aralık 2 A6T): SEKANS KOD NO.:  
365

**pEC374**

- 10 OLEC2235 (F pEC488 ön-aralık 2 A5T): SEKANS KOD NO.:  
366
- OLEC2236 (R pEC488 ön-aralık 2 A5T): SEKANS KOD NO.:  
367

**pEC375**

- OLEC2233 (F pEC488 ön-aralık 2 A4T): SEKANS KOD NO.:  
368
- OLEC2234 (R pEC488 ön-aralık 2 A4T): SEKANS KOD NO.:  
369
- 20

**pEC376**

- OLEC2189 (F pEC488 ön-aralık 2 A3T): SEKANS KOD NO.:  
370
- 25 OLEC2190 (R pEC488 ön-aralık 2 A3T): SEKANS KOD NO.:  
371

**pEC377**

OLEC2191 (F pEC488 ön-aralık 2 PAM G1C): SEKANS KOD NO.: 372

- 5 OLEC2192 (R pEC488 ön-aralık 2 PAM G1C): SEKANS KOD NO.: 373

**pEC378**

- 10 OLEC2237 (F pEC488 ön-aralık 2 PAM GG1, 2CC): SEKANS KOD NO.: 374

OLEC2238 (R pEC488 ön-aralık 2 PAM GG1, 2CC): SEKANS KOD NO.: 375

- 15 ***İn vitro ortamda ve S. Pyogenes'de (şablon: kromozom DNA SF370 veya SPy\_0700 fragmanları içeren plazmidler) SPy\_0700 (aralık 1 (CRISPR Tip II-A, SF370; SF370'ten ön-aralık profajı ø370.1) analizi için plazmidler***

20 **pEC489**

OLEC2106 (F Spy\_0700): SEKANS KOD NO.: 376

OLEC2107 (R Spy\_0700): SEKANS KOD NO.: 377

25 **pEC573**

OLEC2941 (F PAM TG1, 2GG): SEKANS KOD NO.: 378

OLEC2942 (R PAM TG1, 2GG): SEKANS KOD NO.: 379

**Sekanslama analizi yoluyla plazmid yapılarının ve kesme yerlerinin doğrulanması için oligonükleotidler**

**ColE1 (pEC85)**

5

oliRN228 (R sekanslama): SEKANS KOD NO.: 380

**speM (pEC287)**

10

OLEC1557 (F sekanslama): SEKANS KOD NO.: 381

OLEC1556 (R sekanslama): SEKANS KOD NO.: 382

**repDEG-pAMbeta1 (pEC85)**

15

OLEC787 (F sekanslama): SEKANS KOD NO.: 383

**İn vitro ortamda yarıлма eseyleri için oligonükelotidler**

**crRNA**

20

Aralık 1 crRNA (1-42): SEKANS KOD NO.: 384

Aralık 2 crRNA (1-42): SEKANS KOD NO.: 385

Aralık 4 crRNA (1-42): SEKANS KOD NO.: 386

Aralık 2 crRNA (1-36): SEKANS KOD NO.: 387

25

Aralık 2 crRNA (1-32): SEKANS KOD NO.: 388

Aralık 2 crRNA (11-42): SEKANS KOD NO.: 389

**tracrRNA**

- (4-89): SEKANS KOD NO.: 390  
 (15-89): SEKANS KOD NO.: 391  
 (23-89): SEKANS KOD NO.: 392  
 5 (15-53): SEKANS KOD NO.: 393  
 (15-44): SEKANS KOD NO.: 394  
 (15-36): SEKANS KOD NO.: 395  
 (23-53): SEKANS KOD NO.: 396  
 (23-48): SEKANS KOD NO.: 397  
 10 (23-44): SEKANS KOD NO.: 398  
 (1-26): SEKANS KOD NO.: 399

**kimerik RNA'lar**

- 15 Aralık 1 - kimera A: SEKANS KOD NO.: 400  
 Aralık 1 - kimera B: SEKANS KOD NO.: 401  
 Aralık 2 - kimera A: SEKANS KOD NO.: 402  
 Aralık 2 - kimera B: SEKANS KOD NO.: 403  
 Aralık 4 - kimera A: SEKANS KOD NO.: 404  
 20 Aralık 4 - kimera B: SEKANS KOD NO.: 405  
 GFP1: SEKANS KOD NO.: 406  
 GFP2: SEKANS KOD NO.: 407  
 GFP3: SEKANS KOD NO.: 408  
 GFP4: SEKANS KOD NO.: 409  
 25 GFP5: SEKANS KOD NO.: 410

**Yarılma eseyleri için substratlar olarak DNA oligonükleotidleri  
 (ön-aralık koyu karakterlerle, PAM alto çizili olarak verilmiştir)**

- ön-aralık 1 - tamamlayıcı - WT: SEKANS KOD NO.: 411  
 ön-aralık 1 - tamamlayıcı olmayan - WT: SEKANS KOD NO.:  
 412  
 ön-aralık 2 - tamamlayıcı - WT: SEKANS KOD NO.: 413  
 5 ön-aralık 2 - tamamlayıcı olmayan - WT: SEKANS KOD NO.:  
 414  
 ön-aralık 4 - tamamlayıcı - WT: SEKANS KOD NO.: 415  
 ön-aralık 4 - tamamlayıcı olmayan - WT: SEKANS KOD NO.:  
 416  
 10 ön-aralık 2 - tamamlayıcı - PAM1: SEKANS KOD NO.: 417  
 ön-aralık 2 - tamamlayıcı olmayan - PAM1: SEKANS KOD  
 NO.: 418  
 ön-aralık 2 - tamamlayıcı - PAM2: SEKANS KOD NO.: 419  
 ön-aralık 2 - tamamlayıcı olmayan - PAM2: SEKANS KOD  
 15 NO.: 420  
 ön-aralık 4 - tamamlayıcı - PAM1: SEKANS KOD NO.: 421  
 ön-aralık 4 - tamamlayıcı olmayan - PAM1: SEKANS KOD  
 NO.: 422  
 ön-aralık 4 - tamamlayıcı - PAM2: SEKANS KOD NO.: 423  
 20 ön-aralık 4 - tamamlayıcı olmayan - PAM2: SEKANS KOD  
 NO.: 424

### **RNA'nın in vitro transkripsiyonu ve saflaştırılması**

- 25 RNA, T7 Flash in vitro Transkripsiyon Kiti (Epicentre, Illumina company) ve bir T7 promotör sekansı taşıyan PCR'yle oluşturulmuş DNA şablonları kullanılarak in vitro ortamda transkribe edildi. RNA jelle saflaştırıldı ve kullanılmadan önce kalite kontrolüne tâbi tutuldu.

*S. pyogenes* SF370, *Listeria innocua* Clip 11262 ve *Neisseria meningitidis* A Z2491'den RNA şablonları hazırlamak için kullanılan primerler yukarıda açıklanmaktadır.

## 5 Protein saflaştırma

Cas9'u kodlayan sekans (artıklar 1-1368), *S. pyogenes* SF370'in genomik DNA'sından PCR'yle amplifiye edildi ve ligasyon-bağımsız klonlama (LIC) tekniği kullanılarak bir özel pET-bazlı ekspresyon vektörü içine sokuldu. Elde edilen füzyon yapısı, bir N-terminal heksahistidin-maltoz bağlanma proteini (His6- MBP) tagı ve onu takiben, bir tütün etch virüsü (TEV) proteaz yarıma yeri bulunan bir peptid sekansı içeriyordu. Protein, *E. coli* suşu BL21 Rosetta 2'de (DE3) (EMD Biosciences) eksprese edildi; 0,2 mM IPTG'yle indüksiyondan sonra 16 saat süreyle 18°C sıcaklıkta 2xTY vasatı içinde çoğaltıldı. Protein, afinite, iyon değişimi ve boyut dışlama kromatografisi basamaklarının bir kombinasyonu gerçekleştirilerek saflaştırıldı. Kısaca açıklamak gerekirse, hücreler, bir homojenleştiricide (Avestin) 20 mM Tris pH 8,0, 500 mM NaCl, 1 mM TCEP (proteaz inhibitör kokteyli (Roche) takviyeli) içinde lize edildi. Berraklaştırılan lizat, Ni-NTA agaroz (Qiagen) parti halinde bağlandı. Reçine, 20 mM Tris pH 8,0, 500 mM NaCl ile kapsamlı biçimde yıkandı ve bağlı protein, 20 mM Tris pH 8,0, 250 mM NaCl, %10 gliserol içinde elüe edildi. His6-MBP afinite tagı, TEV proteazla yarıma olayı yoluyla çıkartıldı; bu esnada, protein, 20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM KCl, 1 mM TCEP, %10 gliserole karşı gece boyunca diyaliz edildi. Yarılan Cas9 proteini, bir 5 ml SP Sepharose HiTrap kolonda (GE Life Sciences) saflaştırılıp bir 100 mM - 1 M KCl lineer

gradiyentiyle elüe edilerek füzyon tagından ayrıldı. Protein, 20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM KCl ve 1 mM TCEP içinde bir Superdex 200 16/60 kolonda boyut dışlama kromatografisi yoluyla ilaveten saflaştırıldı. Elüe edilen protein, ~8 mg/ml konsantrasyona kadar konsantre edildi; sıvı nitrojen içinde şok donduruldu ve -80°C sıcaklıkta saklandı. QuikChange yer-hedefli mutagenез kiti (Agilent) kullanılarak Cas9 D10A, H840A ve D10A/H840A nokta mutantları oluşturuldu ve DNA sekanslama yoluyla doğrulama yapıldı. Proteinler, yabancı tip Cas9 proteini için tarif edilen prosedürün aynısı uygulanarak saflaştırıldı.

*Streptococcus thermophilus* (LMD-9,YP\_820832.1), *L. innocua* (Clip11262, NP\_472073.1), *Campylobacter jejuni* (subsp. *jejuni* NCTC 11168, YP\_002344900.1) ve *N. Meningitidis*'den (Z2491, YP\_002342100.1) Cas9 ortologları, BL21 Rosetta (DE3) pLysS hücrelerinde (Novagen) His6-MBP (*N. meningitidis* ve *C. jejuni*), His6-Thioredoxin (*L. innocua*) ve His6-GST (*S. thermophilus*) füzyon proteinleri olarak eksprese edildiler ve aşağıdaki modifikasyonların yapılması kaydıyla esas olarak *S. pyogenes* Cas9 için tarif edildiği gibi saflaştırıldı. Birlikte saflaştırılan nükleik asitlerin miktarları büyük olduğundan dolayı, dört Cas9 proteininin hepsi, jel filtrasyonundan önce bir ilave heparin sepharose basamağı gerçekleştirilip bir 100 mM - 2 M KCl lineer gradiyentiyle bağlı protein elüe edilerek saflaştırıldı. Bu proses, *C. jejuni*, *N. meningitidis* ve *L. innocua* proteinlerinden nükleik asit kontaminasyonunu başarıyla ortadan kaldırdı, fakat birlikte saflaştırılan nükleik asitleri *S. thermophilus* Cas9 preparatından çıkartamadı. Proteinlerin hepsi, 20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM KCl ve 1 mM TCEP içinde 1-8 mg/ml



konsantrasyona kadar konsantre edildi; sıvı N2 içinde şok donduruldu ve -80°C sıcaklıkta saklandı.

### **Plazmid DNA yarıma eseyi**

5

Sentetik veya in vitro ortamda transkribe edilmiş tracrRNA ve crRNA, reaksiyondan önce 95°C sıcaklığa kadar ısıtılıp yavaş yavaş oda sıcaklığına kadar soğutularak ön-kaynaştırıldı. Nativ ya da restriksiyon digesti-linearize plazmid DNA (300 ng (~8 nM)), 10 mM MgCl<sub>2</sub>'nin varlığında veya yokluğunda bir Cas9 plazmid yarma tamponu (20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM KCl, 0,5 mM DTT, 0,1 mM EDTA) içinde saflaştırılmış Cas9 proteini (50-500 nM) ve tracrRNA:crRNA dubleksiyle (50-500 nM, 1:1) 37°C sıcaklıkta 60 dakika süreyle inkübe edildi. Reaksiyonlar, 250 mM EDTA içeren 5X DNA yükleme tamponuyla durduruldu; %0,8 veya %1 agaroz jel elektroforeziyle ayrıştırıldı ve etidyum bromür boyama yöntemiyle görüntülendi. Cas9 mutanti yarıma eseyleri için, reaksiyonlar, agaroz jele yüklenmeden önce 5X SDS yükleme tamponuyla (%30 gliserol, %1,2 SDS, 250 mM EDTA) durduruldu.

20

### **Metal-bağımlı yarıma eseyi**

On-aralık 2 plazmid DNA'sı (5 nM), 1, 5 veya 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 veya 10 mM MnCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, NiSO<sub>4</sub> veya CuSO<sub>4</sub> ilave edilmiş yarma tamponu (20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM KCl, 0,5 mM DTT, 0,1 mM EDTA) içinde 50 nM tracrRNA:crRNA-sp2'yle ön-inkübasyona tâbi tutulmuş Cas9'la (50 nM) 37°C sıcaklıkta 1 saat süreyle inkübe edildi. Reaksiyon, 5X SDS yükleme tamponu (%30

gliserol, %1,2 SDS, 250 mM EDTA) ilave edilerek durduruldu; %1 agaroz jel elektroforeziyle ayrıştırıldı ve etidyum bromür boyama yöntemiyle görüntülendi.

## 5 Tekli turnover eseyi

Cas9 (25 nM), dubleks oluşturulmuş tracrRNA:crRNA-sp2 (25 nM, 1:1) veya ön-kaynaştırılmamış her iki RNA'yla (25 nM) yarma tamponu (20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5  
10 mM DTT, 0,1 mM EDTA) içinde 37°C sıcaklıkta 15 dakika süreyle ön-inkübasyona tâbi tutuldu ve ön-aralık 2 plazmid DNA'sı (5 nM) ilave edilerek reaksiyon başlatıldı. Reaksiyon karışımı 37°C sıcaklıkta inkübe edildi. Tanımlanan zaman aralıklarında, reaksiyondan numuneler çekildi; 5X SDS yükleme tamponu (%30 gliserol, %1,2  
15 SDS, 250 mM EDTA) ilave edilerek reaksiyon durduruldu ve %1 agaroz jel elektroforezi ve etidyum bromür boyama yöntemi uygulanarak yarıma olayı izlendi. Aynı işlem, Cas9 ve RNA ön-inkübasyonu olmadan tekli turnover kinetikleri için de gerçekleştirildi; burada, ön-aralık 2 plazmid DNA'sı (5 nM), yarma tamponu içinde  
20 dubleks tracrRNA:crRNA-sp2'yle (25 nM) veya ön-kaynaştırılmamış her iki RNA'yla (25 nM) karıştırıldı ve Cas9 (25 nM) ilave edilerek reaksiyon başlatıldı. Yarıma yüzdesi dansitometriyle analiz edildi ve üç bağımsız deneyin ortalamasınının zaman karşı grafiği çizildi. Veriler, lineer olmayan regresyon analiziyle uyduruldu ve yarıma hızları  
25 ( $k_{obs}$  [dakika<sup>-1</sup>]) hesaplandı.

## Çoklu turnover eseyi

Cas9 (1 nM), ön-kaynaştırılmış tracrRNA:crRNA-sp2'yle (1 nM, 1:1) yarma tamponu (20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM DTT, 0,1 mM EDTA) içinde 37°C sıcaklıkta 15 dakika süreyle ön-inkübasyona tâbi tutuldu. On-aralık 2 plazmid DNA'sı (5 nM) ilave edilerek reaksiyon başlatıldı. Tanımlanan zaman aralıklarında, numuneler alındı ve 5X SDS yükleme tamponu (%30 gliserol, %1,2 SDS, 250 mM EDTA) ilave edilerek reaksiyon durduruldu. Yarma reaksiyonu, %1 agaroz jel elektroforeziyle ayrıştırıldı; etidyum bromürle boyandı ve yarıma yüzdesi dansitometriyle analiz edildi. Dört bağımsız deneyin ortalamasının zaman (dakika) karşı grafiği çizildi.

### **Oligonükleotid DNA'sı yarıma eseyi**

DNA oligonükleotidleri (10 pmol), 50 µL reaksiyonda, 37°C sıcaklıkta 30 dakika süreyle 1X T4 polinükleotid kinaz reaksiyon tamponu içinde 5 birim T4 polinükleotid kinaz (New England Biolabs) ve ~3-6 pmol (~20-40 mCi) [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP (Promega) ile inkübe edilerek radyo-etiketlendi. Isıyla inaktivasyondan (20 dakika süreyle 65°C sıcaklık) sonra, reaksiyonlar, bir Illustra MicroSpin G-25 kolonla (GE Healthcare) saflaştırılarak bağı olmayan etiket çıkartıldı. Etiketli oligonükleotidler eşmolar miktarlarda etiketsiz tamamlayıcı oligonükleotidle 95°C sıcaklıkta 3 dakika süreyle kaynaştırılarak ve ardından yavaş yavaş oda sıcaklığına kadar soğutulularak dubleks substratlar (100 nM) oluşturuldu. Yarıma eseyleri için, 30 saniye süreyle 95°C sıcaklığa kadar ısıtma ve ardından, yavaş yavaş oda sıcaklığına kadar soğutma yoluyla tracrRNA ve crRNA kaynaştırıldı. Cas9 (500 nM nihai konsantrasyon), 9 µl toplam hacimde yarıma

eseyi tamponu (20 mM HEPES pH 7,5, 100 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, %5 gliserol) içinde, kaynaştırılmış tracrRNA:crRNA dubleksiyile (500 nM) ön-inkübasyona tâbi tutuldu. 1 µl hedef DNA (10 nM) ilave edilerek reaksiyonlar başlatıldı ve 37°C sıcaklıkta 1 saat  
 5 süreyle inkübe edildi. Reaksiyonlar, 20 µl yükleme boyası (formamid içinde %5 gliserol, 5 mM EDTA, %0,025 SDS) ilave edilerek söndürüldü ve 5 dakika süreyle 95°C sıcaklığa kadar ısıtıldı. Yarıлма ürünleri, 7 M üre içeren %12 denatüre edici poliakrilamid jeller üzerinde ayrıştırıldı ve fosfor görüntülemeyle (Storm, GE Life  
 10 Sciences) görüntülendi. %8 nativ akrilamid jel üzerinde ön-kaynaştırılmış ve saflaştırılmış ve ardından, her iki 5' ucunda da radyo-etiketlenmiş DNA dubleksi substratları kullanılarak, PAM gerekliliklerini test eden yarıлма eseyleri (Şekil 13B) gerçekleştirildi. Reaksiyonlar yukarıda tarif edildiği gibi başlatıldı ve analiz edildi.

15

### **Elektroforetik hareketlilik kayma eseyleri**

Hedef DNA dubleksleri, deiyonize su içinde her bir iplikçiği (10 nmol) karıştırma, 3 dakika süreyle 95°C sıcaklığa kadar ısıtma ve  
 20 yavaş yavaş oda sıcaklığına kadar soğutma yoluyla oluşturuldu. DNA'ların hepsi, 1X TBE içeren %8 nativ jeller üzerinde saflaştırıldı. DNA bantları, UV gölgeleme yoluyla görüntülendi; eksize edildi ve jel parçaları DEPC-işlenmiş H<sub>2</sub>O içine daldırılarak elüe edildi. Elüe edilen DNA, etanolla çökeltildi ve DEPC-işlenmiş H<sub>2</sub>O içinde  
 25 çözüldürüldü. 37°C sıcaklıkta 30 dakika süreyle T4 polinükleotid kinaz (New England Biolabs) kullanılarak DNA numunelerinin 5' ucu [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP ile etiketlendi. PNK, 65°C sıcaklıkta 20 dakika süreyle ısıyla denatüre edildi ve bir Illustra MicroSpin G-25 kolon (GE

Healthcare) kullanılarak bağı olmayan radyo-etiket çıkartıldı. 10 µl toplam hacimde 20 mM HEPES pH 7,5, 100 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT ve %10 gliserol içeren tampon içinde bağlanma eseyleri gerçekleştirildi. Cas9 D10A/H840A ikili mutanti, eşmolar miktarlarda  
 5 ön-kaynaştırılmış tracrRNA:crRNA dubleksiyile programlandı ve 100 pM'den 1 µM'ye titre edildi. 20 pM nihai konsantrasyona kadar radyo-etiketlenmiş DNA ilave edildi. Numuneler 37°C sıcaklıkta 1 saat süreyle inkübe edildi ve 1X TBE ve 5 mM MgCl<sub>2</sub> içeren %8 nativ poliakrilamid jel üzerinde 4°C sıcaklıkta ayrıştırıldı. Jeller kurutuldu  
 10 ve fosfor görüntüleme yoluyla DNA görüntülendi.

### **DNA ve protein sekanslarının in siliko analizi**

DNA sekans analizi (Vector NTI) ve proteinlerin karşılaştırmalı  
 15 sekans analizi (AlignX) için Vector NTI paketi (Invitrogen) kullanıldı.

### **RNA yapısının in siliko modellemesi ve eş-katlanma**

Vienna RNA paketi algoritmaları kullanılarak in silico kestirimler  
 20 yapıldı (42, 43). RNA sekonder yapıları ve eş-katlanma modelleri, sırasıyla RNAfold ve RNACofold kullanılarak tahmin edildi ve VARNA ile görüntülendi (44).

## **SONUÇLAR**

25

Bakteriler ve arkeler, organizmaları istilacı virüslerden ve plazmidlerden koruyan düzenli aralıklarla kümelenmiş kısa palindromik tekrarlar (CRISPR)/CRISPR ile ilişkili (Cas) sistem

denilen RNA aracılı adaptif savunma sistemleri geliştirmişlerdir (1-3). Bu sistemlerin bir alt-setinde, trans-etkili crRNA'yla (tracrRNA) baz çifti oluşturan matür crRNA'nın hedef DNA'da çift iplikçik (ds) kırıkları sokmak için CRISPR ile ilişkili protein Cas9'u yönlendiren bir iki RNA'lı yapı oluşturduğunu gösterdik. crRNA-yönlendirme sekansını tamamlayıcı nitelikte yerlerde, Cas9 HNH nükleaz domaini, tamamlayıcı iplikçiği yarar; Cas9 RuvC-benzeri domain ise tamamlayıcı olmayan iplikçiği yarar. İki yönlü tracrRNA:crRNA, bir tekil RNA kimerası olarak tasarlandığında, sekans-spesifik Cas9 dsDNA yarılmasını da yönlendirir. Bu çalışmalar, yer-spesifik DNA yarılması için iki yönlü-RNA'lar kullanan bir endünükleaz ailesi ortaya çıkarmakta ve RNA-programlanabilir genom editleme için sistemden istifade etme kabiliyetinin altını çizmektedir.

15 CRISPR/Cas savunma sistemleri, yabancı nükleik asitlerin sekans-spesifik belirlenmesi ve susturulması için küçük RNA'ları temel almaktadır. CRISPR/Cas sistemleri, aralarına özdeş tekrarlar (1-3) yerleştirilmiş genom-hedefleme sekanslarından (aralıklar denilir) oluşan CRISPR dizi(ler)i ve operon(lar)da dizilmiş cas genlerinden oluşur. CRISPR/Cas-aracılı bağışıklık üç basamakta ortaya çıkar. Adaptif fazda, bir veya daha fazla CRISPR lokusu bulunan bakteriler ve arkeler, yabancı sekansın kısa fragmanlarını (ön-aralıklar) CRISPR dizisinin proksimal ucunda (1-3) konakçı kromozomuna entegre ederek virüs veya plazmid sınamasına cevap verirler. Ekspresyon ve enterferans fazlarında, tekrar aralık elementinin prekürsör CRISPR RNA (pre-crRNA) moleküllerine transkripsiyonu ve ardından, enzimatik yarılma, istilacı viral veya plazmid hedeflerinin tamamlayıcı ön-aralık sekanslarıyla eşleşebilen kısa crRNA'lar verir

(4-11). crRNA'ların hedefi tanınması, crRNA'larla kompleks halde ilev gören Cas proteinleri yoluyla yabancı sekansların susturulmasını yönlendirir (10, 12-20).

- 5 Uç tip CRISPR/Cas sistemi vardır (21-23). Tip I ve III sistemlerin bazı önemli özellikleri ortaktır: özel Cas endonükleazları, pre-crRNA'ları işler ve matürasyondan sonra, her crRNA birleşerek crRNA'yı tamamlayıcı nitelikte nükleik asitleri tanıyabilen ve yarabilen büyük bir multi-Cas protein kompleksi oluşturur. Bunun aksine, tip II sistemler, pre-crRNA'da tekrar sekanslarını tamamlayıcı nitelikte bir trans-etkili crRNA'nın (tracrRNA) Cas9 (eski adıyla Csn1) proteininin varlığında çift iplikçikli (ds) RNA-spesifik ribonükleaz RNase III tarafından işlenmeyi tetiklediği farklı bir mekanizmayla precrRNA'ları işler (Şekil 15) (4, 24). Cas9'un yabancı DNA'nın crRNA-yönlendirmeli susturulmasından sorumlu tek protein olduğu düşünülmektedir (25-27).

Tip II sistemlerde Cas9 proteinlerinin hedef dsDNA'yı yarmak için aktive edici tracrRNA ile hedef gösteren crRNA arasında oluşturulan bir baz çiftli yapıya gereksinim duyan bir enzim ailesini oluşturduğunu göstermekteyiz. Yer-spesifik yarıma olayı, hem crRNA ile hedef ön-aralık DNA'sı arasında baz-eşleşmesi tamamlayıcılığı yoluyla hem de hedef DNA'da tamamlayıcı bölgeyle yan yana bulunan bir kısa motif [ön-aralığa komşu motif (PAM) olarak da anılır] yoluyla tayin edilen lokasyonlarda meydana gelir. Bizim çalışmamız, Cas9 endonükleaz ailesinin spesifik DNA yerlerini yarmak için tekil RNA molekülleriyle programlanabileceğini ve bu yolla, genom hedefleme ve editleme için dsDNA kırıkları oluşturmak

üzere bir basit ve çok yönlü RNA-yönlendirmeli sistem geliştirilmesinin kolaylaştırılabileceğini de göstermektedir.

**Cas9, iki RNA tarafından yönlendirilen bir DNA endonükleazdır.**

5

Tip II sistemlerin ayırıcı nitelikte proteini Cas9'un hem crRNA matürasyonunda hem de crRNA-yönlendirmeli DNA enterferansında rol oynadığı hipotezi ortaya atılmıştır (Şekil 15) (4, 25-27). Cas9, crRNA matürasyonunda rol oynar (4), fakat hedef DNA yıkımına doğrudan katılımı konusu araştırılmamıştır. Cas9'un hedef DNA'yı yarıp yaramadığını ve nasıl yardığını test etmek amacıyla, *Streptococcus pyogenes* patojeninden türetilen Cas9 proteinini saflaştırmak için bir aşırı ekspresyon sistemini kullandık (Şekil 16, ek malzemeler ve yöntemler bölümüne bakınız) ve onun bir plazmid DNA'yı yarma ya da bir matür crRNA'yı tamamlayıcı nitelikte bir ön-  
10 aralık sekansı ve ayrıca, bir hakiki PAM bulunan bir oligonükleotid dubleksini yarma kabiliyetini test ettik. Tek başına matür crRNA'nın Cas9-katalize plazmid DNA yarılmasını yönlendirmediğini tespit ettik (Şekil 10A ve Şekil 17A). Bununla birlikte, crRNA'nın tekrar  
15 sekansı ile eşleşebilen ve bu sistemde crRNA matürasyonu için gerekli olan tracrRNA'nın ilavesi, plazmid DNA'yı yarmak için Cas9'u tetikledi (Şekil 10A ve Şekil 17A). Yarılma reaksiyonu için hem magnezyum hem de DNA'yı tamamlayıcı nitelikte bir crRNA  
20 sekansının varlığı gerekiyordu; tracrRNA baz eşleşmesi yapabilen, fakat bir kognat olmayan hedef DNA-bağlanımlı sekans içeren bir crRNA, Cas9-katalize plazmid yarılmasını desteklemedi (Şekil 10A; Şekil 17A, crRNA-sp2'nin crRNA-sp1'le karşılaştırması ve Şekil 18A). Bir kısa lineer dsDNA substratıyla benzer sonuçlar elde ettik



(Şekil 10B ve Şekil 17, B ve C). Sonuçta, trans-etkili tracrRNA, iki kritik fonksiyonu bulunan bir küçük kodlamayan RNA'dır: enzim RNase III tarafından pre-crRNA işlenmesini tetikleme (4) ve daha sonra, Cas9 tarafından crRNA-yönlendirmeli DNA yarılmasını aktive etme.

Hem plazmidin hem de kısa lineer dsDNA'nın tracrRNA:crRNA-yönlendirmeli Cas9 tarafından yarılması yer-spesifik niteliktedir (Şekil 10, C ilâ E ve Şekil 19, A ve B). Plazmid DNA yarılması, PAM sekansının üç baz çifti upstream bölgesinde bir pozisyonda künt uçlar oluşturdu (Şekil 10, C ve E ve Şekil 19, A ve C) (26). Benzer şekilde, kısa dsDNA dubleksleri içinde, crRNA'da hedef-bağlanımlı sekansı tamamlayıcı nitelikte DNA iplikçığı (tamamlayıcı iplikçik), PAM sekansının üç baz çifti upstream bölgesinde bir yerde yarar (Şekil 10, D ve E ve Şekil 19, B ve C). Tamamlayıcı olmayan DNA iplikçığı, PAM sekansının üç ilâ sekiz baz çifti upstream bölgesi içinde bir veya daha fazla yerde yarar. İlave araştırmalar, tamamlayıcı olmayan iplikçığın ilk önce endonükleolitik olarak yarıldığını ve ardından, bir 3'-5' eksonükleaz aktivitesiyle kırıldığını ortaya çıkardı (Şekil 18B).

Tekli turnover koşulları altında Cas9 tarafından yarılma hızları 0,3 ile 1 dakika-1 aralığındaydı; bu aralık, restriksiyon endonükleazlarıninkine kıyaslanabilir ve onlara denkti (Şekil 20A); yabani tip (WT) Cas9-tracrRNA:crRNA kompleksinin substrat DNA'nın beş kat molar fazlalığıyla inkübasyonu ise iki yönlü-RNA-yönlendirmeli Cas9'un bir çoklu turnover enzimi olduğuna ilişkin kanıt sundu (Şekil 20B). CRISPR tip I Kaskad kompleksinin aksine (18), Cas9 hem linearize hem de aşırı sargılı plazmidleri yarar (Şekiller 10A ve 11A). Sonuçta, bir istilacı plazmid, prensipte, farklı

crRNA'larla programlanan Cas9 proteinleri tarafından birden çok defa yarılabılır.

**Şekil 10 (A)** Cas9, 75-nükleotid tracrRNA'nın varlığında ya da yokluğunda bir 42-nükleotid crRNA-sp2'yle (bir aralık 2 sekansı içeren crRNA) programlandı. Kompleks, aralık 2'yi tamamlayıcı nitelikte bir sekans ve bir fonksiyonel PAM içeren dairesel veya XhoI-linearize plazmid DNA'ya ilave edildi. crRNA-sp1, spesifisite kontrolü; M, DNA markeri; kbp, kilo-baz çifti. Bakınız Şekil 10A. **(B)** Cas9, crRNA-sp2 ve tracrRNA (nükleotidler 4 ilâ 89) ile programlandı. Kompleks, aralık 2'yi tamamlayıcı nitelikte bir sekans ve bir fonksiyonel PAM içeren çift veya tek iplikçikli DNA'larla inkübe edildi (4). DNA'nın tamamlayıcı iplikçikleri veya tamamlayıcı olmayan iplikçikleri, 5'-radyo-etiketlendi ve bir etiketlenmemiş partner iplikçikle kaynaştırıldı. nt, nükleotidler. Bakınız Şekil 10B ve C. **(C)** Şekil 10A'dan yarıma ürünlerinin sekanslama analizi. Sekanslama reaksiyonunda primer uzamanın sonlandırılması, yarıma yeri pozisyonuna işaret eder. 3' terminal A çıkıntısı (yıldız işaretleri), bir sekanslama reaksiyonu artefaktıdır. Bakınız Şekil 10C, A ve C. **(D)** Şekil 10B'den yarıma ürünleri, hedef DNA dubleksinin tamamlayıcı iplikçikleri ve tamamlayıcı olmayan iplikçiklerinden elde edilen 5' ucu-etiketli boyut markerleri yanında analiz edildi. M, marker; P, yarıma ürünü. Bakınız Şekil 10D, B ve C. **(E)** tracrRNA, crRNA-sp2, ve ön-aralık 2 DNA sekanslarının şematik sunumu. tracrRNA (üstü çizili) ve ön-aralık DNA'yı (altı çizili) tamamlayıcı nitelikte crRNA bölgeleri temsil edilmektedir. PAM sekansı etiketlenir; (C) ve (D)'de haritalanan yarıma yerleri, beyaz dolu oklar (C), bir siyah dolu ok

[(D), tamamlayıcı iplikçik] ve bir siyah çubukla [(D), tamamlayıcı olmayan iplikçik] temsil edilir.

**Şekil 15**, tip II RNA-aracılı CRISPR/Cas immün yolağı gösterilmektedir. Ekspresyon ve enterferans basamakları şekillerde temsil edilmektedir. Tip II CRISPR/Cas lokusları, Cas9, Cas1, Cas2 ve Csn2 proteinlerini kodlayan dört genin bir operonunu, bir lider sekanstan ve onu takiben, aralarına özgün genom-hedefleyen aralıklar (baklava şekilleri) yerleştirilmiş özdeş tekrarlardan (siyah dikdörtgenler) oluşan bir CRISPR dizisi ve trans-etkili tracrRNA'yı kodlayan bir sekans içerir. Burada, *S. pyogenes* SF370'in tip II CRISPR/Cas lokusu (Erişim numarası NC\_002737) temsil edilmektedir (4). Bu lokusta deneysel olarak teyit edilmiş promotörler ve transkripsiyon terminatörü gösterilir (4). CRISPR dizisi, tip II sistemlere özgü bir matürasyon prosesine maruz kalan bir prekürsör CRISPR RNA (pre-crRNA) molekülü olarak transkribe edilir (4). *S. pyogenes* SF370'te, tracrRNA, uzunlukları 171 ve 89 nt olan ve pre-crRNA'nın her bir tekrarını tamamlayıcı nitelikte olan iki primer transkript olarak transkribe edilir. İlk işlenme olayı, tracrRNA'nın pre-crRNA'yla eşleştirilmesini ve Cas9 proteininin varlığında housekeeping endoribonükleaz RNase III tarafından tanınan ve yarılan bir dubleks RNA oluşturulmasını kapsar. Dubleks RNA'nın RNase III-aracılı yarılması, bir aralık sekansı ve ona komşu tekrar sekansı kısımları içeren bir merkez bölgeden oluşan bir 66-nt ara crRNA'lar ve bir 75-nt işlenmiş tracrRNA oluşturur. Bilinmeyen ribonükleaz(lar)ın aracılık ettiği bir ikinci işlenme olayı, 5'-terminal aralık-kaynaklı yönlendirme sekansı ve tekrar-kaynaklı 3'-terminal sekanstan oluşan ve 39 ilâ 42 nt uzunlukta olan matür crRNA'ların

oluşmasına yol açar. Birinci ve ikinci işleme olayının ardından, matür tracrRNA, matür crRNA'larla eşleşmiş ve Cas9 proteinine bağlı vaziyette kalır. Bu üçlü komplekste, iki yönlü tracrRNA:crRNA yapısı, endonükleaz Cas9'u kognat hedef DNA'ya yönlendiren yönlendirici RNA işlevini görür. Hedefin Cas9-tracrRNA:crRNA kompleksi tarafından tanınması prosedürü, istilacı DNA molekülünü, hedef DNA'da ön-aralık sekansı ile crRNA'da aralık-kaynaklı sekans arasındaki homoloji açısından taramak suretiyle başlatılır. DNA ön-aralık-crRNA aralık tamamlayıcılığına ek olarak, DNA hedeflemesi, ön-aralığa komşu bir kısa motifin (NGG, burada N simgesi herhangi bir nükleotid olabilir) (ön-aralığa komşu motif - PAM) varlığını gerektirir. İki yönlü-RNA ile ön-aralık sekansı arasındaki eşleşmenin ardından, R-ilmik oluşturulur ve daha sonra, Cas9, DNA'ya bir çift iplikçik kırığı (DSB) dahil eder. Hedef DNA'nın Cas9 tarafından yarılması, proteinde iki katalitik domain gerektirir. PAM'la ilgili bir spesifik yerde, HNH domaini, DNA'nın tamamlayıcı iplikçiğini yarar; RuvC-benzeri domain ise tamamlayıcı olmayan iplikçiği yarar.

**Şekil 16 (A)** *S. pyogenes* Cas9, *E. coli*'de bir N-terminal His6-MBP tagı içeren bir füzyon proteini olarak eksprese edildi ve afinite, iyon değişimi ve boyut dışlama kromatografik basamaklarının bir kombinasyonu ile saflaştırıldı. Afinitite tagı, afiniteyle saflaştırma basamağının ardından TEV proteaz yarılması yoluyla çıkartıldı. Bir Superdex 200 (16/60) kolonda nihai boyut dışlama kromatografisi basamağının bir kromatogramı gösterilmektedir. Cas9, 280 ve 260 nm'de absorbans hızıyla değerlendirildiği gibi, kontamine edici nükleik asitler bulunmayan bir tekli monomerik pik olarak elüe olur. Ek olarak, elüe olan fraksiyonlar, bir %10 poliakrilamid jel üzerinde

SDS-PAGE yöntemiyle ayrıştırıldı ve SimplyBlue Safe Stain (Invitrogen) boyayla boyandı. **(B)** Saflaştırılan Cas9 ortologlarının SDS-PAGE analizi. Cas9 ortologları, Ek Malzemeler ev Yöntemler bölümünde tarfi edildiği gibi saflaştırıldı. Saflaştırılan her Cas9'dan  
 5 2,5 µg, bir %4 - %20 gradiyent poliakrilamid jelde analiz edildi ve SimplyBlue Safe Stain boyayla boyandı.

**Şekil 17** (Şekil 10 da bakınız). On-aralık 1 sekansı, *S. pyogenes* SF370 crRNAsp1 hedefi olan *S. pyogenes* SF370 (M1) SPy\_0700'den elde edilmektedir (4). Burada, ön-aralık 1 sekansı, bir fonksiyonel olmayan sekanstan (TTG) PAM'ın bir fonksiyonel olandan (TGG) PAM ile değiştirilmesi suretiyle manipüle edildi. On-aralık 4 sekansı, *S. pyogenes* SF370 crRNA-sp4 hedefi olan *S. pyogenes* MGAS10750 (M4) MGAS10750\_Spy1285'ten elde edilir (4). **(A)** kognat tracrRNA:crRNA dublekslerinin yönlendirdiği ön-aralık 1 plazmid DNA yarılmaması. Yarıлма ürünleri, agaroz jel elektroforeziyle ayrıştırıldı ve etidyum bromür boyama yöntemiyle görüntülendi. M, DNA markeri; baz çiftleri açısından fragman büyüklükleri gösterilmektedir. **(B)** Kognat tracrRNA:crRNA-sp1 dubleksinin  
 10 yönlendirdiği ön-aralık 1 oligonükleotid DNA yarılmaması. Yarıлма ürünleri, denatüre edici poliakrilamid jel elektroforeziyle ayrıştırıldı ve fosfor görüntülemeyle görüntülendi. Nükleotidler açısından fragman büyüklükleri gösterilmektedir. **(C)** Kognat tracrRNA:crRNA-sp4 dubleksinin yönlendirdiği ön-aralık 4 oligonükleotid DNA  
 15 yarılmaması. Yarıлма ürünleri, denatüre edici poliakrilamid jel elektroforeziyle ayrıştırıldı ve fosfor görüntülemeyle görüntülendi. Nükleotidler açısından fragman büyüklükleri gösterilmektedir. **(A, B, C)** Madde (A) altında deneyler, Şekil 10A'da tarif edildiği  
 20  
 25

gerçekleştirildi; madde (B) ve (C)'de deneyler ise Şekil 10B'de Şekil 10A'da tarif edildiği gerçekleştirildi. (B, C) tracrRNA:crRNA target DNA etkileşiminin bir şeması aşağıda gösterilmektedir. tracrRNA'yı ve ön-aralık DNA'sını tamamlayıcı nitelikte crRNA bölgelerinin 5 sırasıyla üstü ve altı çizilmiştir. PAM sekansı etiketlenmiştir.

**Şekil 18** (Şekil 10 da bakınız). (A) Ön-aralık 2 plazmid DNA, farklı konsantrasyonlarda  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  veya  $Cu^{2+}$ 'nin varlığında tracrRNA:crRNA-sp2'yle kompleks oluşturan Cas9'la 10 inkübe edildi. Yarıma ürünleri, agaroz jel elektroforeziyle ayrıştırıldı ve etidyum bromür boyama yöntemiyle görüntülendi. Plazmid formları gösterilmektedir. (B) Bir PAM motifi içeren bir ön-aralık 4 oligonükleotid DNA dubleksi kaynaştırıldı ve jelle saflaştırıldı ve ardından, her iki 5' ucunda radyo-etiketlendi. Dubleks (10 nM nihai 15 konsantrasyon), tracrRNA (nükleotidler 23-89) ve crRNA<sub>sp4</sub> (500 nM nihai konsantrasyon, 1:1) ile programlanmış Cas9'la inkübe edildi. Belirtilen zaman noktalarında (dakika), yarıma reaksiyonundan 10 µl alikotlar, %0,025 SDS ve 5 mM EDTA içeren formamid tamponuyla 20 söndürüldü ve Şekil 10B'de tarif edildiği gibi denatüre edici poliakrilamid jel elektroforeziyle analiz edildi. Nükleotidler açısından büyüklükler gösterilmektedir.

**Şekil 19** (A) Ön-aralık 1 plazmid DNA yarımasının haritalanması. Şekil 17A'dan yarıma ürünleri, Şekil 10C'de tarif edildiği gibi 25 sekanslama yoluyla analiz edildi. 3' terminal A çıkıntısının (yıldız işareti) sekanslama reaksiyonunun bir artefaktı olduğunu not ediniz. (B) Ön-aralık 4 oligonükleotid DNA yarımasının haritalanması. Şekil 17C'den yarıma ürünleri, ön-aralık 4 dubleks DNA'nın tamamlayıcı

iplikçikleri ve tamamlayıcı olmayan iplikçiklerinden elde edilen 5' ucu etiketli oligonükleotid boyut markerleri yanında, denatüre edici poliakrilamid jel elektroforeziyle analiz edildi. M, marker; P, yarıma ürün. Şerit 1-2: tamamlayıcı iplikçik. Şerit 3-4: tamamlayıcı olmayan iplikçik. Nükleotidler açısından fragman büyüklükleri gösterilmektedir. (C) tracrRNA, crRNA-sp1 ve ön-aralık 1 DNA sekansları (üst) ve tracrRNA, crRNA-sp4 ve ön-aralık 4 DNA sekanslarının (alt) şematik sunumları. tracrRNA:crRNA, crRNA-ön-aralık DNA eşleştirme yoluyla tamamlayıcı ön-aralık DNA'sına yönlendirilen bir iki yönlü-RNA yapısı oluşturur. tracrRNA ve ön-aralık DNA'sını tamamlayıcı nitelikte crRNA bölgelerinin sırasıyla üstü ve altı çizilir. (A) (üst) ve (B)'de (alt) haritalanan tamamlayıcı ve tamamlayıcı olmayan DNA iplikçiklerinde yarıma yerleri, sırasıyla sekansların üzerindeki oklarla (A ve B, tamamlayıcı iplikçik) ve bir siyah çubukla (B, tamamlayıcı olmayan iplikçik) temsil edilir.

**Şekil 20** (A) Farklı RNA ön-kaynaştırma ve protein-RNA ön-inkübasyon koşullarında Cas9'ın tekli turnover kinetikleri. Ön-aralık 2 plazmid DNA'sı, ön-kaynaştırılmış tracrRNA:crRNA-sp2 ile ön-inkübe edilmiş Cas9'la (○), ön-kaynaştırılmış tracrRNA:crRNA-sp2 ile ön-inkübe edilmemiş Cas9'la (●), ön-kaynaştırılmamış tracrRNA ve crRNA-sp2 ile ön-inkübe edilmiş Cas9'la (□) ya da ön-kaynaştırılmamış RNA'larla ön-inkübe edilmemiş Cas9'la (■) inkübe edildi. Yarıma aktivitesi, zamana bağımlı bir biçimde izlendi ve agaroz jel elektroforezi ve ardından, etidyum bromür boyama yöntemiyle analiz edildi. Uç bağımsız deneyden elde edilen ortalama yarıma yüzdesinin zamana (dakika) karşı grafiği çizilmiş ve veriler, bir lineer olmayan regresyonla uydurulmuştur. Hesaplanan yarıma

hızları ( $k_{obs}$ ) tabloda gösterilmektedir. Elde edilen sonuçlar, Cas9'un RNA'lara bağlanmasının test edilen koşullar altında hız sınırlayıcı olmadığını göstermektedir. Plazmid formları gösterilmektedir. Elde edilen  $k_{obs}$  değerleri, normalde dakikada 1-10 civarında olan restriksiyon endonükleazlarınınkine denktir (45-47). (B) Cas9, bir çoklu turnover endonükleazıdır. Dupleks hale getirilmiş tracrRNA:crRNA-sp2 (1 nM, 1:1:1 - grafikte gri çizgiyle gösterilmektedir) yüklenmiş Cas9, 5-kat fazlalık nativ ön-aralık 2 plazmid DNA'sıyla inkübe edildi. Belirlenen zaman aralıklarında (0 ilâ 120 dakika) reaksiyondan numuneler alınarak ve ardından, agaroz jel elektroforezi analizi (üst) ve yarıma ürünü miktarı (nM) (alt) tayini yapılarak yarıma izlendi. Uç bağımsız deneyin standart sapmaları belirtilmektedir. Araştırılan zaman aralığında, 1 nM Cas9, ~2,5 nM plazmid DNA'yı yarabildi.

15

### **Her bir Cas9 nükleaz domaini bir DNA iplikçisini yarar**

Cas9, hem HNH hem de RuvC endonükleazlarına homoloğ domainler içerir (Şekil 11A ve Şekil 3) (21-23, 27, 28). HNH veya RuvC-like domainlerinin katalitik artıklarında inaktive edici nokta mutasyonları içeren Cas9 varyantları tasarladık ve saflaştırdık (Şekil 11A ve Şekil 3) (23, 27). Bu varyant Cas9 proteinlerinin nativ plazmid DNA'sıyla inkübasyonu, iki yönlü-RNA-yönlendirmeli mutant Cas9 proteinlerinin çentikli açık dairesel plazmidler verdiğini, WT Cas9 protein-tracrRNA:crRNA kompleksinin ise bir lineer DNA ürünü ürettiğini gösterdi (Şekil 10A ve 11A ve Şekil 17A ve 25A). Bu sonuç, Cas9 HNH ve RuvC-benzeri domainlerin her birinin bir plazmid DNA iplikçisi yaradığını gösterir. Hedef DNA'nın iplikçisinin

25



her bir Cas9 katalitik domaini tarafından yarılıp yarılmadığını belirlemek için, mutant Cas9-tracrRNA:crRNA komplekslerini, tamamlayıcı iplikçiğin veya tamamlayıcı olmayan iplikçiğin 5' ucunda radyo-etiketlendiği kısa dsDNA substratlarıyla inkübe ettik. Elde edilen yarıılma ürünleri, Cas9 HNH domaininin tamamlayıcı DNA iplikçiğini yardığını, Cas9 RuvC-benzeri domainin ise tamamlayıcı olmayan DNA iplikçiğini yardığını gösterdi (Şekil 11B ve Şekil 21B)

**Şekil 11(A)** (Ust) Domain mutasyonlarının pozisyonlarını gösteren Cas9 domaini yapısının şematik temsili. D10A, Asp10→Ala10; H840A; His840→Ala840. WT veya nükleaz mutant Cas9 proteinlerinin tracrRNA: crRNA-sp2 ile oluşturduğu kompleksler, Şekil 10A'da tarif edildiği gibi endonükleaz aktivitesi miktarı analiz edildi. **(B)** WT Cas9 veya nükleaz domaini mutantlarının tracrRNA ve crRNA-sp2'yle oluşturduğu kompleksler, Şekil 10B'de tarif edildiği gibi aktivite açısından test edildi.

**Şekil 3** S. Pyogenes'den Cas9'un amino asit sekansı (SEKANS KOD NO.: 8) temsil edilmektedir. Çeşitli farklı türlerden elde edilen Cas9/Csn1 proteinlerinde, hem HNH hem de RuvC endonükleazlarına homolog motifler içeren 2 domain bulunur. **(A)** Motifler 1-4 (motif numaraları sekansın sol tarafından gösterilmektedir), S. pyogenes Cas9/Csn1 için gösterilmektedir. Kestirilen üç RuvC-benzeri motif (1, 2, 4) ve kestirilen HNH motifi (3) üstü çizili olarak verilmektedir. Bu çalışmada Ala ile ikame edilen Asp10 ve His840 artıkları, sekansın üzerindeki bir yıldız işaretiyle belirtilmektedir. Altı çizili artıklar, farklı türlerden elde edilen Cas9 proteinleri arasında yüksek düzeyde korunur. Altı çizili artıklarda mutasyonların Cas9

aktivitesi üzerinde fonksiyonel sonuçlar doğurma olasılığı vardır. Bu çalışmada, iki nükleaz-benzeri aktivitenin birleştirilmesinin deneysel olarak kanıtlandığını not ediniz (Şekil 11 ve Şekil 21). **(B)** Motifler 1-4'ü içeren domainler 1 (amino asitler 7-166) ve 2 (amino asitler 731-1003), *S. pyogenes* Cas9/Csn1 için gösterilmektedir. Ek bilgiler için **Tablo 1** ve **Şekil 5**'e bakınız.

**Şekil 21** On-aralık DNA'sının HNH veya RuvC-benzeri domainde mutasyonlar içeren kognat tracrRNA:crRNA-directed Cas9 mutantları tarafından yarılanması. **(A)** On-aralık 1 plazmid DNA yarılanması. Deney, Şekil 11A'da gösterildiği gibi gerçekleştirildi. Plazmid DNA konformasyonları ve baz çiftleri açısından büyüklükler gösterilmektedir. **(B)** On-aralık 4 oligonükleotid DNA yarılanması. Deney, Şekil 11B'de gösterildiği gibi gerçekleştirildi. Nükleotidler açısından büyüklükler gösterilmektedir.

### **Hedef DNA bağlanımı ve yarılanması için iki yönlü-RNA gereksinimleri**

Hedef DNA bağlanımı için ve/veya hedef tanınmasının downstream kısmında Cas9'un nükleaz aktivitesini stimüle etmek için tracrRNA gerekebilir. Bu olasılıklar arasında ayırım yapmak amacıyla, crRNA ve/veya tracrRNA'nın varlığında ya da yokluğunda katalitik olarak inaktif Cas9 tarafından hedef DNA bağlanımını izlemek için bir elektroforetik hareketlilik kayma eseyi kullandık. tracrRNA ilavesi, Cas9 tarafından hedef DNA bağlanımını büyük ölçüde arttırdı; tek başına Cas9'la ya da Cas9- crRNA'yla spesifik DNA bağlanımının ise çok az olduğunu gözlemledik (Şekil 22). Bu, muhtemelen hedef

DNA'nın tamamlayıcı iplikçığıyle etkileşim için crRNA'yı uygun şekilde yönlendirmek suretiyle hedef DNA tanınması için tracrRNA'nın gerektiğine işaret eder. Kestirilen tracrRNA:crRNA sekonder yapısı, crRNA'nın 3' terminusundaki 22 nükleotid ile matür tracrRNA'nın 5' ucuna yakın bir segment arasındaki baz eşleşmesini kapsar (Şekil 10E). Bu etkileşim, hedef DNA bağlanımı için, farklı crRNA'larda sekans açısından farklılık gösteren crRNA'nın 5'-terminal 20 nükleotidinin mevcut olduğu bir yapı oluşturur. crRNA baz eşleşmesi bölgesinin downstream kısmında tracrRNA bulku, ilave RNA yapı(lar)ı oluşturabilir ve /veya Cas9 veya hedef DNA yeriyle etkileşime girebilir. yer-spesifik Cas9-katalize DNA yarılmaları için tracrRNA'nın tam boyunun gerekli olup olmadığını belirlemek için, tam boy matür (42-nükleotidli) crRNA ve tracrRNA'nın 5' or 3' uçlarında sekanslar bulunmayan çeşitli farklı kesilmiş formları kullanılarak yeniden oluşturulan Cas9-tracrRNA:crRNA komplekslerini test ettik. Bu kompleksler, bir kısa hedef dsDNA kullanılarak yarıma açısından test edildi. Nativ sekansın 23 ilâ 48. nükleotidleri korunarak oluşturulan tracrRNA'nın büyük ölçüde kesilmiş versiyonu, sağlam iki yönlü-RNA-yönlendirmeli Cas9-katalize DNA yarılmalarını destekleyebildi (Şekil 12, A ve C ve Şekil 23, A ve B). crRNA'nın uçların birinden kesilmesi, tracrRNA varlığında Cas9-katalize yarılmalarının 3'-terminal 10 nükleotidi kaybeden crRNA'larla tetiklenebileceğini gösterdi (Şekil 12, B ve C). Bunun aksine, crRNA'nın 5' ucundan 10-nükleotid silinmesi, Cas9 tarafından DNA yarılmalarını durdurdu (Şekil 12B). Çeşitli farklı bakteriyel türlerden elde edilen Cas9 ortologlarını *S. pyogenes* tracrRNA:crRNA-yönlendirmeli DNA yarılmalarını destekleme kabiliyetleri açısından da analiz ettik. Yakından ilişkili *S.*

pyogenes Cas9 ortologlarının aksine, daha uzak ilişkili ortologlar, yarıma reaksiyonunda fonksiyonel değildi (Şekil 24). Benzer şekilde, daha uzak sistemlerden elde edilen tracrRNA:crRNA dublekslerinin yönlendirdiği *S. pyogenes* Cas9, DNA'yı etkin ve etkili biçimde yaramadı (Şekil 24). DNA'nın iki yönlü-RNA-yönlendirmeli yarımasının tür spesifisitesi, Cas9, tracrRNA ve crRNA tekrarının birlikte evrimine ve yanı sıra, spesifik Cas9 ortologlarıyla üçlü kompleks oluşturmak için önemli iki yönlü- RNA'da hâlâ bilinmeyen bir yapının ve/veya sekansın bulunduğu işaret eder.

10

Bakteriyel hücrelerde tip II CRISPR/Cas immünitesi için ön-aralık sekansı gereksinimlerini araştırmak amacıyla, tek-nükleotid mutasyonları bulunan bir dizi ön-aralık-içeren plazmid DNA'yı *S. Pyogenes*'de transformasyonun ardından idameleri açısından ve in vitro ortamda Cas9 tarafından yarıma kabiliyetleri açısından analiz ettik. Ön-aralığın 5' ucunda yapılan nokta mutasyonlarının aksine, PAM ve Cas9 yarıma yerlerine yakın bölgede mutasyonlar in vivo ortamda tolere edilmedi ve in vitro ortamda plazmid yarıma etkinliğinin azalmasına yol açtı (Şekil 12D). Elde ettiğimiz sonuçlar, in vivo ortamda *S. Thermophilus*'dan tip II CRISPR sisteminde seçilen ön-aralık kaçış mutantlarına ilişkin daha önce hazırlanan bir rapora uygundur (27, 29). Ek olarak, plazmid idamesi ve yarıma sonuçları, crRNA'yla etkileşim ve ardından, Cas9 tarafından yarıma için gerekli ve önemli ön-aralık sekansının 3' ucunda konumlanan bir "tohum" bölgesinin varlığına işaret etmektedir. Bu kanıyı destekleyen başka bir veri de, Cas9'un crRNA'ya tamamlayıcı DNA iplikçik hibridizasyonunu artırması ve bu artışın, crRNA hedefleyen sekansın 3'-terminal bölgesinde daha kuvvetli olmasıydı (Şekil 25A-C). Etkin

25

ve etkili hedef yarılmaması için PAM'a yakın hedef DNA yeri ile crRNA arasında en az 13 baz çiftinden oluşan bir bitişik kesit bulunması gerekirken, ön-aralığın 5'-terminal bölgesinde altı adede kadar bitişik yanlış eşleşmenin tolere edilmesi de, bu bulguyu destekler niteliktedir (Şekil 12E). Bu bulgular, Argonot proteinlerinde (30, 31) ve Kaskad ve Csy CRISPR komplekslerinde (13, 14) hedef nükleik asit tanınması için daha önce gözlemlenen tohum-sekansı gereksinimlerini anımsatmaktadır.

10 **Şekil 12 (A)** Cas9-tracrRNA: crRNA kompleksleri, 42-nükleotidli crRNA-sp2 ve kesilmiş tracrRNA yapıları kullanılarak yeniden oluşturuldu ve Şekil 10B'de gösterildiği gibi yarıma aktivitesi açısından test edildi. **(B)** Tam boy tracrRNA ve crRNA-sp2 kesikleriyle programlanan Cas9, (A)'da olduğu gibi aktivitesi 15 açısından test edildi. **(C)** Cas9-aracılı DNA yarılmamasını yönlendirebilen tracrRNA ve crRNA minimal bölgeleri (taralı alan). **(D)** WT veya belirtilen nokta mutasyonlarına sahip mutant ön-aralık 2 sekansları içeren plazmidler, Şekil 10A'da gösterildiği gibi, programlanmış Cas9 tarafından in vitro ortamda yarıldı ve WT veya 20 pre-crRNA-yoksun *S. Pyogenes*'in transformasyon eseyleri için kullanıldı. Transformasyon etkinliği, plazmid DNA'nın beher mikrogramında koloni oluşturucu birimler (CFU) olarak hesaplandı. Hata çubukları, üç biyolojik replika için SD değerlerini temsil etmektedir. **(E)** WT ve çeşitli farklı düzeyde crRNA-hedef DNA 25 yanlış eşleşmeleri bulunan mutant ön-aralık 2 insertleri içeren plazmidler (alt), programlanmış Cas9 (üst) tarafından in vitro ortamda yarıldı. Yarıma reaksiyonları, XmnI ile ilaveten sindirildi. 1880- ve

800-bp büyüklükte fragmanlar, Cas9 ile oluşturulan yarıma ürünleridir. M, DNA markeri.

**Şekil 22** Elektroforetik hareketlilik kayma eseyleri, ön-aralık 4 hedef DNA dubleksi ve tek başına Cas9 (nükleaz domaini inaktive edici mutasyonlar D10A ve H840 içerir) kullanılarak ya da crRNA-sp4 veya tracrRNA (75nt) veya her ikisinin varlığında gerçekleştirildi. Hedef DNA dubleksi, her iki 5' ucunda radyo-etiketlendi. Cas9 (D10/H840A) ve kompleksler, 1 nM'den 1 µM'ye titre edildi. Bağlanım, %8 nativ poliakrilamid jel elektroforeziyle analiz edildi ve fosfor görüntülemeyle görüntülendi. Tek başına Cas9'un hedef DNA'yı orta düzeyde afiniteyle bağladığını not ediniz. Bu bağlanım, crRNA ilavesinden etkilenmez; böylece, bunun dsDNA'yla sekans spesifik olmayan etkileşimi temsil ettiği gösterilir. Ek olarak, bu etkileşim, crRNA yokluğunda tek başına tracrRNA tarafından aşılabilir. Hem crRNA hem de tracrRNA varlığında, hedef DNA bağlanımı büyük ölçüde arttır ve farklı elektroforetik hareketliliğe sahip bir tür verir; bu, spesifik hedef DNA tanınmasına işaret eder.

**Şekil 23** crRNA eşleştirilmiş bölgesinin bir parçasını ve downstream bölgenin bir kısmını kapsayan bir tracrRNA fragmanı, ön-aralık oligonükleotid DNA'sının Cas9 tarafından yarılmasını yönlendirmek için yeterlidir. Bir matür kognat crRNA ve çeşitli farklı tracrRNA fragmanlarıyla yönlendirilen Cas9 tarafından (A) Ön-aralık 1 oligonükleotid DNA yarılması ve (B) Ön-aralık 4 oligonükleotid DNA yarılması. (A, B) Nükleotidler açısından büyüklükler gösterilmektedir.

**Şekil 24** S. Pyogenes'den elde edilen Cas9'a benzer şekilde, Gram-

pozitif bakteriler *L. innocua* ve *S. Thermophilus*'dan elde edilen yakın ilişkili Cas9 ortologları da, *S. Pyogenes*'den elde edilen tracrRNA:crRNA tarafından hedeflendiklerinde, ön-aralık DNA'sını yararlar. Bununla birlikte, aynı koşullar altında, Gram-negatif bakteriler *C. jejuni* ve *N. Meningitidis*'den elde edilen daha uzak ilişkili Cas9 ortologları tarafından DNA yarılmaması gözlemlenmez. *Spy*, *S. pyogenes* SF370 (Erişim Numarası NC\_002737); *Sth*, *S. thermophilus* LMD-9 (STER\_1477 Cas9 orthologu; Erişim Numarası NC\_008532); *Lin*, *L. innocua* Clip11262 (Erişim Numarası NC\_003212); *Cje*, *C. jejuni* NCTC 11168 (Erişim Numarası NC\_002163); *Nme*, *N. meningitidis* A Z2491 (Erişim Numarası NC\_003116). (A) Ön-aralık plazmid DNA'sının yarılmaması. Ön-aralık 2 plazmid DNA'sı (300 ng), farklı türlerden elde edilen hibrid tracrRNA:crRNA-sp2 dublekslerinin (500 nM, 1:1) rehberliğinde farklı Cas9 ortologları (500 nM) tarafından yarılmaya tâbi tutuldu. RNA dubleksleri tasarlamak için, daha önce yayınlanmış Northern blot verileri temelinde, *L. innocua* ve *N. Meningitidis*'den elde edilen tracrRNA sekanslarını tahmin ettik (4). İki yönlü-hibrid RNA dubleksleri, tür spesifik tracrRNA ve bir heterolog crRNA'dan oluşur. Heterolog crRNA sekansı, 3' ucunda *L. innocua* veya *N. meningitidis* tracrRNA-bağlanımlı tekrar sekansına füzyonlanmış 5' ucunda *S. pyogenes* DNA-hedefleyen sp2 sekansı içerecek şekilde tasarlanır. *N. meningitidis* veya *C. jejuni*'den değil de *S. thermophilus* ve *L. Innocua*'dan elde edilen Cas9 ortologları, ön-aralık 2 plazmid DNA'sını yarmaları için *S. Pyogenes* tracrRNA:crRNA-sp2 tarafından yönlendirilebilir, fakat etkinlikte hafif düşüş olur. Benzer şekilde, hibrid *L. innocua* tracrRNA:crRNA-sp, *S. pyogenes* Cas9'u hedef DNA'yı yüksek etkinlikle yarması için yönlendirebilir; hibrid *N.*

Meningitidis tracrRNA:crRNA-sp2 ise *S. pyogenes* Cas9 tarafından yalnızca hafif DNA yarma aktivitesini tetikler. Kontroller olarak *N. meningitidis* ve *L. innocua* Cas9 ortologları, kognat hibrid tracrRNA:crRNA-sp2 tarafından yönlendirildiğinde, ön-aralık 2 plazmid DNA'sını yarar. Yukarıda bahsi geçtiği gibi, *N. meningitidis* tracrRNA sekansının yalnızca kestirimden ibaret olduğunu ve RNA sekanslama yoluyla henüz teyit edilmediğini not ediniz. Bundan dolayı, düşük yarma etkinliği, Cas9 ortologlarının aktivitesinin düşük olmasının ya da optimum-dışı şekilde tasarlanmış bir tracrRNA sekansının kullanılmasının sonucu olabilir. **(B)** Ön-aralık oligonükleotid DNA'sının klevajı. Etiketlenmemiş tamamlayıcı olmayan iplikçik oligonükleotidiyle (ön-aralık 1) (10 nM) (sol) ön-kaynaştırılmış 5'-ucu radyoaktif etiketli tamamlayıcı iplikçik oligonükleotidi (10 nM) ya da etiketlenmemiş tamamlayıcı iplikçik oligonükleotidiyle (10 nM) (sağ) (ön-aralık 1) ön-kaynaştırılmış 5'-ucu radyo aktif etiketlenmiş tamamlayıcı olmayan iplikçik oligonükleotidi (10 nM), *S. Pyogenes*'den elde edilen tracrRNA:crRNA-sp1 dubleksinin (500 nM, 1:1) rehberliğinde Cas9 ortologları (500 nM) tarafından yarılmaya tâbi tutulur. *N. meningitidis* veya *C. jejuni*'den değil de *S. thermophilus* ve *L. innocua*'dan elde edilen Cas9 ortologları, ön-aralık oligonükleotid DNA'sını yarmaları için *S. pyogenes* kognat iki yönlü-RNA'sı tarafından yönlendirilebilir, fakat etkinlik düşüktür. Tamamlayıcı DNA iplikçiğindeki yarıma yerinin üç ortologun hepsi için özdeş olduğunu not ediniz. Tamamlayıcı olmayan iplikçiğin yarıması olayı, farklı pozisyonlarda meydana gelir. **(C)** Cas9 ortologlarının amino asit sekansı özdeşliği. *S. pyogenes*, *S. thermophilus* ve *L. innocua* Cas9 ortologlarının hepsi yüksek amino asit özdeşliği yüzdesine sahiptirler.



Bunun aksine, *C. jejuni* ve *N. meningitidis* Cas9 proteinleri, sekans ve uzunluk açısından farklılık gösterirler (~300-400 amino asit daha kısa). (D) Tasarlanmış tür-spesifik heterolog crRNA sekanslarının *S. pyogenes* (deneysel olarak teyit edilmiş, (4)), *L. innocua* (kestirilen) veya *N. meningitidis* (kestirilen) kaynaklı tekabül eden tracrRNA ortologlarıyla eş-katlanmaları. tracrRNA'lar; crRNA aralık 2 fragmanları ve crRNA tekrarı fragmanları izlendi ve etiketlendi. *L. innocua* ve *S. pyogenes* hibrid tracrRNA:crRNA-sp2 dubleksleri çok benzer yapısal özelliklere sahiptirler, fakat *N. meningitidis* hibrid tracrRNA:crRNA'dan farklıdır. Yukarıda (A) ve (B) maddelerinde açıklanan yarıma verileriyle birlikte, eş-katlanma kestirimleri, hedef DNA'nın Cas9-tracrRNA:crRNA tarafından tür-spesifik yarılmasının, bir kognat Cas9 ortoloğu tarafından spesifik olarak tanınan tracrRNA:crRNA dubleksinde hâlâ bilinmeyen bir yapısal özellikte edildiğine işaret eder. (A) ve (B) maddelerinde gözlemlenen yarımanın tür-spesifitesinin Cas9'un iki yönlü-tracrRNA:crRNA'ya bağlanma seviyesinde ortaya çıktığı tahmin edildi. Hedef DNA'nın iki yönlü-RNA yönlendirmeli Cas9 yarıması tür spesifik olabilir. Cas9 proteinleri ve tracrRNA:crRNA dubleksleri arasındaki çeşitlilik/evrim derecesine bağlı olarak, Cas9 ve iki yönlü- RNA ortologları kısmen birbirinin yerine geçebilir niteliktedir.

**Şekil 25** DNA-hedefleyen bölgeyi ve tracrRNA-bağlanımlı bölgeyi kapsayan crRNA'da bölgelerini tamamlayıcı nitelikte bir dizi 8-nükleotidli DNA probu, bir tracrRNA:crRNA dubleksi ve Cas9-tracrRNA:crRNA üçlü kompleksi bağlamında crRNA'ya hibridize olma kabiliyeti açısından analiz edildi. (A) Eseyde kullanılan DNA problemlerinin sekanslarının ve onların crRNA-sp4'te bağlanma

yerlerinin şematik temsili. (B-C) tracrRNA:crRNA-sp4 ve Cas9-tracrRNA:crRNA-sp4 içeren hedef DNA problemlerinin elektroforetik hareketlilik kayma deneyleri. Deneyde tracrRNA(15-89) yapısı kullanıldı. Duplekslerin veya komplekslerin hedef oligonükleotid DNA'larına bağlanımları, %16 nativ poliakrilamid jelde analiz edildi ve fosfor görüntülemeyle görüntülendi.

### **Bir kısa sekans motifi, R-ilmik oluşumunu dikte eder**

10 Çoklu CRISPR/Cas sistemlerinde, nonself tanımasına kıyasla self tanımasının yabancı genomda korunan ve PAM olarak anılan bir kısa sekans motifini kapsadığı gösterilmiştir (27, 29, 32-34). PAM motifleri yalnızca birkaç baz çifti uzunluktadır ve bunların kesin sekansı ve pozisyonu, CRISPR/Cas sistem tipine göre değişir (32). S. pyogenes tip II sisteminde, PAM, hedef DNA içinde, crRNA bağlanma sekansının downstream kısmında bir baz çifti oluşturan iki G:C baz çifti içeren bir NGG konsensüs sekansına uygundur (4). Transformasyon deneyleri, bakteriyel hücrelerde ön-aralık plazmid DNA'sının CRISPR/Cas tarafından eliminasyonu için GG motifinin gerekli olduğunu gösterdi (Şekil 26A); bu bulgu, S. Thermophilus'da daha önce yapılan gözlemlerle uyumludur (27). Motif, tracrRNA:crRNA-yönlendirmeli Cas9 tarafından in vitro ön-aralık plazmid yarılmaları için de gereklidir (Şekil 26B). Hedef DNA'nın Cas9-tracrRNA: crRNA kompleksi tarafından yarılmada PAM'ın rolünü belirlemek için, tamamlayıcı iplikçik veya tamamlayıcı olmayan iplikçik ya da her ikisi üzerinde PAM sekansında mutasyonlar içeren bir dizi dsDNA dupleksini test ettik (Şekil 13A). Bu substratlar kullanılarak gerçekleştirilen yarıma deneyleri, tip I CRISPR/Cas

sistemleri tarafından tamamlayıcı iplikçik PAM tanınmasının aksine, Cas9-katalize DNA yarılmasının DNA tamamlayıcı olmayan iplikçiği üzerinde PAM sekansında mutasyonlara özellikle hassas olduğunu gösterdi (18, 34). Hedef tek iplikçikli DNA'ların yarılması, PAM motifinin mutasyonlarından etkilenmedi. Bu gözlem, PAM motifinin yalnızca hedef dsDNA bağlamında gerektiğini ve dolayısıyla, dupleks açılmasına, iplikçik invazyonuna ve bir R-ilmik yapısı oluşumuna izin vermek için gerekebileceğini gösterir. Ön-aralık 2 hedef DNA'sında bulunmayan bir kanonik PAM varlığından dolayı seçilen farklı bir crRNA-hedef DNA çifti (crRNA-sp4 ve ön-aralık 4 DNA'sı) kullandığımızda, etkin ve etkili Cas9-katalize DNA yarılması için PAM'ın her iki G nükleotidinin de gerektiğini tespit ettik (Şekil 13B ve Şekil 26C). PAM'ın Cas9-tracrRNA:crRNA kompleksini doğru hedef DNA yerine toplamada doğrudan rol oynayıp oynamadığını tayin etmek için, nativ jel hareketlilik kayma eseyleriyle kompleksin hedef DNA sekanslarına bağlanma afinitelerini analiz ettik (Şekil 13C). PAM sekansında herhangi bir G'nin mutasyonu, Cas9-tracrRNA: crRNA'nın hedef DNA için afinitesini büyük ölçüde azalttı. Bu bulgu, Cas9 tarafından hedef DNA bağlanımında PAM sekansının rolünü göstermektedir.

**Şekil 13 (A)** İki yönlü RNA'yla programlanmış Cas9, Şekil 10B'de gösterildiği gibi aktivitesi açısından test edildi. Hedef DNA'larda WT ve mutant PAM sekansları çizgilerle gösterilmektedir. **(B)** WT ve mutant PAM motifleri içeren ön-aralık 4 hedef DNA dubleksleri (her iki 5' ucunda da etiketlenmiş), tracrRNA:crRNA-sp4'le (nükleotidler 23 ilâ 89) programlanmış Cas9'la inkübe edildi. Belirtilen zaman noktalarında (dakika cinsinden), yarılma reaksiyonu alikotları alındı

ve Şekil 10B'de gösterildiği gibi analiz edildi. (C) WT ve mutasyonlu PAM motifleri içeren ön-aralık 4 hedef DNA dubleksleri [(B)'dekiyle aynı] ve RNA-programlı Cas9 (D10A/H840A) kullanılarak elektroforetik hareketlilik kayma eseyleri gerçekleştirildi. Cas9 (D10A/H840A)-RNA kompleksi 100 pM'den 1 mM'ye titre edildi.

**Şekil 26 (A)** Ön-aralık 2 plazmid DNA'sında PAM sekansı mutasyonları, bakteriyel hücrelerde Tip II CRISPR/Cas sistemi tarafından plazmid idamesinin enterferansını ortadan kaldırır. Bir fonksiyonel ya da mutasyonlu PAM içeren yabancı tip ön-aralık 2 plazmidleri, Şekil 12D'de gösterildiği gibi yabancı tip (suş SF370, EC904 olarak da adlandırılır) ve pre-crRNA-yoksun mutant (EC1479) *S. Pyogenes*'e transforme edildi. PAM mutasyonları, Tip II CRISPR/Cas sistemi tarafından in vivo ortamda tolere edilmez. Uç biyolojik replikanın ortalama değerleri ve standart sapmaları gösterilmektedir. **(B)** Ön-aralık plazmid DNA'sında PAM sekansının mutasyonları, Cas9-tracrRNA:crRNA tarafından yarılmayı ortadan kaldırır. Bir fonksiyonel veya mutasyonlu PAM içeren yabancı tip ön-aralık 2 plazmid, Şekil 10A'da olduğu gibi Cas9 yarılmaya maruz kaldı. PAM mutant plazmidleri, Cas9-tracrRNA:crRNA kompleksi tarafından yarılmaz. **(C)** Kanonik PAM sekansı mutasyonları, bakteriyel hücrelerde Tip II CRISPR/Cas sistemi tarafından plazmid idamesinin enterferansını ortadan kaldırır. Bir fonksiyonel ya da mutasyonlu PAM içeren yabancı tip ön-aralık 4 plazmidleri, tracrRNA ve crRNA-sp2'yle programlanan Cas9'la yarıldı. Yarıлма reaksiyonları, iki fragman (~1880 ve ~800 bp) olarak Cas9 yarıлма ürünlerini görüntülemek için XmnI restriksiyon endonükleazının

varlığında gerçekleştirildi. Baz çiftleri açısından fragman büyüklükleri gösterilmektedir.

## 5 **Cas9, bir tekil kimerik RNA'yla programlanabilir.**

tracrRNA:crRNA dubleksinin muhtemel sekonder yapısına ilişkin inceleme (Şekil 10E ve 12C), yer-spesifik Cas9-katalize DNA yarılmaları için gereken özelliklerin bir tekil kimerik RNA'da yakalanabilme olasılığına işaret eder. tracrRNA:crRNA hedef-seçim mekanizması doğada etkin ve etkili biçimde çalışıyor olmasına rağmen, bir tekil RNA-yönlendirmeli Cas9 olasılığı, programlı DNA yarılmaları ve genom editleme için potansiyel kullanılabilirliğinden dolayı ilgi çekicidir (Şekil 1A-B). 5' ucunda bir hedef tanıma sekansı ve onu takiben, bir saç tokası yapısı içeren ve tracrRNA ile crRNA arasında meydana gelen baz eşleşmesi etkileşimlerini koruyan ve sürdüren, bir kimerik RNA'nın iki versiyonunu tasarladık (Şekil 14A). Bu tekil transkript, crRNA'nın 3' ucunu tracrRNA'nın 5' ucuna etkin ve etkili biçimde füzyonlar ve bu yolla, Cas9 tarafından yer-spesifik DNA yarılmalarını yönlendirmek için gereken iki yönlü-RNA yapısını taklit eder. Plazmid DNA kullanılan yarıma eseylerinde, kesilmiş tracrRNA:crRNA dubleksini için gözlemlenene benzer şekilde, daha uzun kimerik RNA'nın Cas9-katalize DNA yarılmalarını yönlendirebildiğini gözlemledik (Şekil 14A ve Şekil 27, A ve C). Daha kısa kimerik RNA ise bu eseyde etkin ve etkili işlev göstermedi; bu bulgu, tracrRNA:crRNA baz-eşleşmesi etkileşiminin 5 ilâ 12 pozisyon ötesinde nükleotidlerin etkin ve etkili Cas9 bağlanması ve/veya hedef tanıma için önemli olduğunu teyit etti. Bir substrat

olarak kısa dsDNA kullanarak gerçekleştirdiğimiz yarıma eseylerinde de benzer sonuçlar elde ettik; bu da, hedef DNA'da yarıma yeri pozisyonunun bir yönlendirici olarak iki yönlü tracrRNA:crRNA kullanılarak gözlemlenene özdeş olduğunu gösterir (Şekil 14B ve 5 Şekil 27, B ve C). Son olarak, kimerik RNA tasarımının genel geçer uygulanıp uygulanamayacağını belirlemek için, yeşil floresan proteini (GFP) kodlayan bir gen kısmını hedef alacak beş farklı kimerik yönlendirici RNA tasarladık (Şekil 28, A ilâ C) ve bunların GFP kodlayan sekans içeren bir plazmide karşı etkinliklerini in vitro 10 ortamda test ettik. Beş durum hepsinde, bu kimerik RNA'larla programlanan Cas9, doğru hedef yerde plasmidi etkin ve etkili biçimde yardı (Şekil 14C ve Şekil 28D); bu, hedeflenen sekansa komşu bir GC dinükleotidinin varlığının ötesinde birkaç kısıtlamayla birlikte, kimerik RNA'ların rasyonel tasarımının sağlam olduğunu ve 15 prensipte, ilgili DNA sekansının hedeflenmesini sağladığını gösterir.

**Şekil 1** Bir DNA-hedefleyen RNA, bir tek iplikçikli "DNA-hedefleyen segment" ve çift iplikçikli RNA'nın bir kesitini içeren bir "protein-bağlanımlı segment" içerir. (A) Bir DNA-hedefleyen RNA, 20 iki ayrı RNA molekülü (bir "çift molekül" veya "iki molekül" DNA-hedefleyen RNA olarak anılır) içerebilir. Bir çift molekül DNA-hedefleyen RNA, bir "hedef gösteren RNA" ve bir "aktivatör-RNA" içerir. (B) Bir DNA-hedefleyen RNA, bir tekil RNA molekülü (bir "tek molekül" DNA-hedefleyen RNA olarak anılır) içerebilir. 25 Bir tek molekül DNA-hedefleyen RNA, "bağlayıcı nükleotidler" içerir.

**Şekil 14 (A)** On-aralık 4 hedef sekansı ve bir WT PAM içeren bir plazmid, bir GAAA tetra-ilmikle crRNA'nın 3' ucunun tracrRNA'nın 5' ucuna birleştirilmesi suretiyle oluşturulan in vitro-transkribe edilmiş kimerik RNA'larla ya da tracrRNA(4-89):crRNA-sp4 dubleksiyle programlanmış Cas9 tarafından yarılma olayına tâbi tutuldu. Yarılma reaksiyonları, XmnI'yla restriksiyon haritalama yoluyla analiz edildi. Kimerik RNA'lar A ve B'nin sekansları, DNA-hedefleyen (altı çizili), crRNA tekrarı-kaynaklı sekanslar (üstü çizili) ve tracrRNA-kaynaklı (kesik alt çizgili) sekanslarla gösterilmektedir. **(B)** On-aralık 4 DNA dubleks yarılma reaksiyonları, Şekil 10B'de gösterildiği gibi gerçekleştirildi. **(C)** Cas9'u bir GFP geni-içeren plazmidi yaracak şekilde programlamak için, GFP genini hedef alacak şekilde tasarlanmış beş kimerik RNA kullanıldı. Plazmid yarma reaksiyonları, plazmid DNA'nın Cas9 yarılmasından sonra AvrII'yle restriksiyon haritalamasına tâbi tutulması hariç, Şekil 12E'de gösterildiği gibi gerçekleştirildi.

**Şekil 27 (A)** Bir tekil kimerik RNA, kognat ön-aralık plazmid DNA'sının (ön-aralık 1 ve ön-aralık 2) Cas9-katalize yarılmasını yönlendirir. Yarılma reaksiyonları, iki fragman olarak (~1880 ve ~800 bp) Cas9 yarılma ürünlerini görüntülemek için XmnI restriksiyon endonükleazının varlığında gerçekleştirildi. Baz çiftleri açısından fargman büyüklükleri gösterilmektedir. **(B)** Bir tekil kimerik RNA, , kognat ön-aralık oligonükleotid DNA'sının (ön-aralık 1 ve ön-aralık 2) Cas9-katalize yarılmasını yönlendirir. Nükleotidler açısından fragman büyüklükleri gösterilmektedir. **(C)** Deneyde kullanılan kimerik RNA'ların şematik temsilleri. Kimerik RNA'lar A ve B'nin sekansları, crRNA'nın 5' ön-aralık DNA-hedefleyen sekansı (altı

çizili), crRNA'nın tracrRNA-bağlanımlı sekansı (üstü çizili) ve tracrRNA-kaynaklı sekansla (kesik alt çizgili) gösterilmektedir.

**Şekil 28 (A)** GFP ekspresyon plazmidini pCFJ127'nin şematik temsili. 5 GFP açık okuma çerçevesinin hedeflenen kısmı, bir siyah ok ucuyla gösterilmektedir. **(B)** Hedeflenen bölgenin sekansının yakından görünüşü. Kimerik RNA'ların hedef aldığı sekanslar, gri çubuklarla gösterilmektedir. PAM dinükleotidleri kutu içinde verilmektedir. Bir özgün Sall restriksiyon yeri, hedef lokusunun 60 bp upstream 10 konumunda bulunur. **(C)** Sol: Hedef DNA sekansları, komşu PAM motifleriyle birlikte gösterilmektedir. Sağ: Kimerik yönlendirici RNA'ların sekansları. **(D)** pCFJ127, belirtildiği gibi, kimerik RNA'lar GFP1-5'le programlanmış Cas9 tarafından yarıldı. Plazmid, ek olarak, Sall'le sindirildi ve reaksiyonlar, %3 agaroz jel üzerinde 15 elektroforezle analize edildi ve SYBR Safe ile boyama yoluyla görüntülendi.

## Sonuçlar

20 Hedef DNA'da bir Cas9 endonükleazını yer-spesifik çift iplikçik kırıkları sokmaya yönlendiren bir iki yönlü-RNA yapısını kapsayan bir DNA enterferans mekanizması tanımlandı. tracrRNA:crRNA-yönlendirmeli Cas9 proteini, hedef DNA'da iki iplikçiği yarmak için 25 istifa eder. Hedefin Cas9 tarafından tanınması, hem crRNA'da bir tohum sekansı hem de DNA hedefinde crRNA-bağlanımlı bölgeye komşu bir GG dinükleotid-içeren PAM sekansı gerektirir. İlgili dsDNA sekansını hedef almak ve yarmak için, Cas9 endonükleazının



bir tekli transkript olarak tasarlanmış yönlendirici RNA'yla programlanabileceğini de gösterdik. Sistem, yönlendirici kimerik RNA'da DNA hedef-bağlanımlı sekansı değiştirilerek programlanabilir, çok yönlü ve etkili bir sistemdir. Çinko-parmak nükleazlar ve transkripsiyon-aktivatör-benzeri efektör nükleazlar, genomları mainipüle etmek için tasarlanmış artifisyonel enzimler olarak çok ilgili çekmişlerdir (35-38). Bu, gene-hedefleyen ve genom-editleyen uygulamaları kolaylaştıran RNA-programlı Cas9'u baz alan alternatif metodolojiyi temsil eder.

10

#### **Atıf Yapılan Referanslar**

1. B. Wiedenheft, S. H. Sternberg, J. A. Doudna, *Nature* 482, 331 (2012).
- 15 2. D. Bhaya, M. Davison, R. Barrangou, *Annu. Rev. Genet.* 45, 273 (2011).
3. M. P. Terns, R. M. Terns, *Curr. Opin. Microbiol.* 14, 321 (2011).
4. E. Deltcheva et al., *Nature* 471, 602 (2011).
- 20 5. J. Carte, R. Wang, H. Li, R. M. Terns, M. P. Terns, *Genes Dev.* 22, 3489 (2008).
6. R. E. Haurwitz, M. Jinek, B. Wiedenheft, K. Zhou, J. A. Doudna, *Science* 329, 1355 (2010).
7. R. Wang, G. Preamplume, M. P. Terns, R. M. Terns, H. Li, 25 *Structure* 19, 257 (2011).
8. E. M. Gesner, M. J. Schellenberg, E. L. Garside, M. M. George, A. M. Macmillan, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 688 (2011).

9. A. Hatoum-Aslan, I. Maniv, L. A. Marraffini, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 21218 (2011).
10. S. J. J. Brouns et al., *Science* 321, 960 (2008).
11. D. G. Sashital, M. Jinek, J. A. Doudna, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 680 (2011).
- 5
12. N. G. Lintner et al., *J. Biol. Chem.* 286, 21643 (2011).
13. E. Semenova et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 10098 (2011).
14. B. Wiedenheft et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 10092 (2011).
- 10
15. B. Wiedenheft et al., *Nature* 477, 486 (2011).
16. C. R. Hale et al., *Cell* 139, 945 (2009).
17. J. A. L. Howard, S. Delmas, I. Ivančić-Baće, E. L. Bolt, *Biochem. J.* 439, 85 (2011).
- 15
18. E. R. Westra et al., *Mol. Cell* 46, 595 (2012).
19. C. R. Hale et al., *Mol. Cell* 45, 292 (2012).
20. J. Zhang et al., *Mol. Cell* 45, 303 (2012).
21. K. S. Makarova et al., *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 467 (2011).
22. K. S. Makarova, N. V. Grishin, S. A. Shabalina, Y. I. Wolf, E. V. Koonin, *Biol. Direct* 1, 7 (2006).
- 20
23. K. S. Makarova, L. Aravind, Y. I. Wolf, E. V. Koonin, *Biol. Direct* 6, 38 (2011).
24. S. Gottesman, *Nature* 471, 588 (2011).
25. R. Barrangou et al., *Science* 315, 1709 (2007).
- 25
26. J. E. Garneau et al., *Nature* 468, 67 (2010).
27. R. Saprunauskas et al., *Nucleic Acids Res.* 39, 9275 (2011).
28. G. K. Taylor, D. F. Heiter, S. Pietrokovski, B. L. Stoddard, *Nucleic Acids Res.* 39, 9705 (2011).

29. H. Deveau et al., *J. Bacteriol.* 190, 1390 (2008).
30. B. P. Lewis, C. B. Burge, D. P. Bartel, *Cell* 120, 15 (2005).
31. G. Hutvagner, M. J. Simard, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 22 (2008).
- 5 32. F. J. M. Mojica, C. Díez-Villaseñor, J. García-Martínez, C. Almendros, *Microbiology* 155, 733 (2009).
33. L. A. Marraffini, E. J. Sontheimer, *Nature* 463, 568 (2010).
34. D. G. Sashital, B. Wiedenheft, J. A. Doudna, *Mol. Cell* 46, 606 (2012).
- 10 35. M. Christian et al., *Genetics* 186, 757 (2010).
36. J. C. Miller et al., *Nat. Biotechnol.* 29, 143 (2011).
37. F. D. Urnov, E. J. Rebar, M. C. Holmes, H. S. Zhang, P. D. Gregory, *Nat. Rev. Genet.* 11, 636 (2010).
38. D. Carroll, *Gene Ther.* 15, 1463 (2008).
- 15 39. J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, ed. 2, 1989).
40. M. G. Caparon, J. R. Scott, Genetic manipulation of pathogenic streptococci. *Methods Enzymol.* 204, 556 (1991).  
20 doi:10.1016/0076-6879(91)04028-M Medline
41. C. Frøkjær-Jensen et al., Single-copy insertion of transgenes in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Genet.* 40, 1375 (2008).  
doi:10.1038/ng.248 Medline
42. R. B. Denman, Using RNAFOLD to predict the activity of small catalytic RNAs. *Biotechniques* 15, 1090 (1993). Medline
- 25 43. I. L. Hofacker, P. F. Stadler, Memory efficient folding algorithms for dairesel RNA secondary structures.

Bioinformatics 22, 1172 (2006).

doi:10.1093/bioinformatics/bt1023 Medline

44. K. Darty, A. Denise, Y. Ponty, VARNA: Interactive drawing and editing of the RNA secondary structure.

5 Bioinformatics 25, 1974 (2009).

doi:10.1093/bioinformatics/btp250 Medline

### **Ornek 2: İnsan hücrelerinde RNA-programlı genom editleme**

- 10 Aşağıda sunulan veriler, Cas9'un insan hücrelerinin nükleusuna eksprese edilebileceğini ve lokalize edilebileceğini ve bir insan hücrelerinde tekil-yönlendirici RNA'yla (hem Cas9 bağlanması hem de DNA hedef yer tanınması için gereken özelliklere sahip "sgRNA") birleştiğini gösterir. Bu kompleksler, çift iplikçik kırıkları oluşturabilir ve sgRNA sekansını tamamlayıcı nitelikte bir yerde genomik DNA'da homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) onarımını stimüle edebilir; ki bu aktivite, hem Cas9 hem de sgRNA gerektiren bir aktivitedir. RNA sekansının 3' ucunda uzaması, canlı hücrelerde DNA hedefleme aktivitesini artırır. Ek olarak, transfekte hücrelerden elde edilen 15 ekstrelerin kullanıldığı deneyler, sgRNA'nın Cas9'a birleşmesinin Cas9-aracılı DNA yarılmaları için sınırlayıcı faktör olduğunu gösterir. Bu sonuçlar, RNA-programlı genom editlemenin canlı hücrelerde ve in vivo ortamda işe yaradığını gösterir.

### **25 MALZEMELER VE YONTEMLER**

#### **Plazmid tasarımı ve yapımı**

Bir HA epitopuna (amino asit sekansı DAYPYDVPDYASL (SEKANS KOD NO.: 274)), bir nükleer lokalizasyon sinyaline (amino asit sekansı PPKKRKVEDPKKRKVD (SEKANS KOD NO.: 275)) füzyonlanmış *Streptococcus pyogenes* Cas9'ünü kodlayan sekans (artıklar 1-1368), insan ekspresyonu için kodon-optimize edildi ve GeneArt tarafından sentezlendi. DNA sekansı SEKANS KOD NO.: 276'dır ve protein sekansı SEKANS KOD NO.: 277'dir. Ligasyon-bağımsız klonlama (LIC) kullanılarak bu sekans bir pcDNA3.1-kaynaklı GFP ve mCherry LIC vektörlerine (UC Berkeley MacroLab firmasından temin edilen sırasıyla vektörler 6D ve 6B) sokuldu ve bu, CMV promotörü kontrolü altında eksprese edilen Cas9-HA-NLS-GFP ve Cas9-HA-NLS-mCherry füzyonlarına yol açtı. Yönlendirici sgRNA'lar, ekspresyon vektörü pSilencer 2.1-U6 puro (Life Technologies) ve pSuper (Oligoengine) kullanılarak eksprese edildi. RNA ekspresyon yapıları, tamamlayıcı oligonükleotidlerin kaynaştırılarak RNA-kodlayan DNA sekansı oluşturulması ve kaynaştırılmış DNA fragmanının pSilencer 2.1-U6 puro'da BamHI ile HindIII yerleri arasında ve pSuper'de BglII ile HindIII yerleri arasında ligate edilmesi suretiyle oluşturuldu.

20

### **Hücre kültürü koşulları ve DNA transfeksiyonları**

HEK293T hücreleri, 37°C sıcaklıkta bir nemli inkübatörde %5 CO<sub>2</sub> koşullarında, %10 fetal bovin serumu (FBS) ilave edilmiş Dulbecco modifiye eagle vasatı (DMEM) içinde tutuldu. Hücreler, tavsiye edilen protokollere göre X-tremeGENE DNA Transfeksiyon Reaktifi (Roche) ya da Turbofect Transfeksiyon Reaktifi (Thermo Scientific) kullanılarak plazmid DNA'yla geçici transfekte edildi. Kısaca

25

açıklamak gerekirse, HEK293T hücreleri, 0,5 µg Cas9 ekspresyon plazmidi ve 2,0 µg RNA ekspresyon plazmidi kullanılarak 6 kuyucuklu plakalarda %60 - %80 konflüens oranında transfekte edildi. Floresans mikroskopisiyle gözlemlenen GFP-pozitif hücrelerin fraksiyonu bazında, transfeksiyon etkinliklerinin Tubofect için %30 - %50 olduğu (Şekil 29E ve 37A-B) ve X-tremegene için %80 - %90 olduğu (Şekil 31B) tahmin edildi. Transfeksiyondan 48 saat sonra, hücreler, fosfat tamponlu salinle (PBS) yıkandı ve 250 µl liziz tamponu (Roche Proteaz İnhibitör kokteyli ilave edilmiş 20 mM HEPES pH 7,5, 100 mM potasyum klorür (KCl), 5 mM magnezyum klorür (MgCl<sub>2</sub>), 1 mM ditiyotreitöl (DTT), %5 gliserol, %0,1 Triton X-100) uygulanarak lize edildi ve ardından, 4°C sıcaklıkta 10 dakika süreyle çalkalandı. Elde edilen hücre lizatı, ilave analiz için alikotlara ayrıldı. Üretici protokolüne göre DNeasy Kan ve Doku Kiti (Qiagen) kullanılarak 200 µl hücre lizatından genomik DNA izole edildi.

### **Cas9 ekspresyonunun Western blot analizi**

Cas9-HA-NLS-GFP ekspresyon plazmidiyle transfekte edilen HEK293T hasat edildi ve yukarıda açıklandığı gibi transfeksiyondan 48 saat sonra lize edildi. 5 µl lizat, %10 SDS poliakrilamid jel üzerinde elektroforezlendi; bir PVDF membran üzerine blotlandı ve HRP-konjuge anti-HA antikoruyla (Sigma, 1x PBS içinde 1:1000 seyreltme) problandı.

25

### **Surveyor eseyi**

Surveyor eseyi daha önce tarif edildiği gibi gerçekleştirildi [10, 12, 13]. Kısaca açıklamak gerekirse, insan kltrin hafif zinciri A (CLTA)

lokusu, bir yüksek fideliteli polimeraz Herculase II Füzyon DNA Polimerazı (Agilent Technologies) ve ileri primer 5'-GCAGCAGAAGAAGCCTTTGT-3' (SEKANS KOD NO.: //) ve ters primer 5'-TTCCTCCTCTCCCTCCTCTC-3' (SEKANS KOD NO.: //) kullanılarak 200 ng genomik DNA'dan PCR yöntemiyle amplifiye edildi. Daha sonra, 300 ng 360 bp ampikon 95°C sıcaklığa kadar ısıtılarak denatüre edildi ve yabancı tip ve mutant DNA iplikçiklerini rastgele yeniden hibridize etmek için bir ısı bloğu kullanılarak yavaş yavaş yeniden kaynaştırıldı. Akabinde, numuneler, Cel-1 nükleazla (Surveyor Kit, Transgenomic) 42°C sıcaklıkta 1 saat süreyle inkübe edildi. Cel-1, yanlış eşleşmeler (yabancı tip:mutant hibridizasyonu) içeren DNA sarmallarını tanır ve yarar. Cel-1 nükleaz sindirim ürünleri, bir %10 akrilamid jel üzerinde ayrıldı ve SYBR Safe (Life Technologies) ile boyanarak görüntülendi. Yarıma bantlarının miktar tayini, ImageLab yazılımı (Bio-Rad) kullanılarak gerçekleştirildi. Yarıma yüzdesi, yarıma ürünlerinin (160-200 bp) ortalama yoğunluğu yarılmamış PCR ürününün (360 bp) ve yarıma ürünün yoğunluklarının toplamına bölünerek belirlendi.

## 20 ***In vitro* transkripsiyon**

Yönlendirici RNA, rekombinan T7 RNA polimeraz ve daha önce açıklandığı gibi tamamlayıcı sentetik oligonükleotidlerin kaynaştırılması suretiyle oluşturulan bir DNA şablonu kullanılarak *in vitro* ortamda transkribe edildi [14]. RNA'lar, 7M üre denatüre edici akrilamid jel üzerinde elektroforezle saflaştırıldı; etanolla çöktüldü ve DEPC'yle işlenmiş su içinde çözündürüldü.

### **Northern blot analizi**

RNA, mirVana small-RNA izolasyon kiti (Ambion) kullanılarak HEK293T hücrelerinden saflaştırıldı. Her numune için, RNA yükleme  
 5 tamponu (0,5X TBE (pH7,5), 0,5 mg/ml bromofenol mavi, 0,5 mg  
 ksilen siyanol ve %47 formamid) içinde 70°C sıcaklıkta 10 dakika  
 süreyle denatürasyondan sonra bir %10 üre-PAGE jeli üzerinde 800  
 ng RNA ayrıldı. Bromofenol mavi boya jelin üstüne ulaşana kadar  
 0,5X TBE tamponu içinde 10W'de elektroforezden sonra, numuneler,  
 10 0,5X TBE içinde 20 volt seviyesinde 1,5 saat süreyle bir Nytran  
 membran üzerine elektroblotlandı. Transfer edilen RNA'lar, UV-  
 Çapraz Bağlayıcı (Strategene) içinde Nytran membrana çapraz  
 bağlandı ve %40 formamid, 5X SSC, 3X Dernhardt çözeltisi (ficoll,  
 polivinilpirolidon ve BSA'nın her birinden %0,1) ve 200 µg/ml  
 15 Somon balığı spermi DNA'sı içeren bir tampon içinde 45°C sıcaklıkta  
 3 saat süreyle ön-hibridize edildi. Ön-hibridize edilen membranlar, 1  
 milyon cpm/ml seviyesinde 5'-<sup>32</sup>P-etiketli antisens DNA oligo probu  
 ilave edilmiş ön-hibridizasyon tamponu içinde gece boyunca inkübe  
 edildiler. SSC tamponu içinde birkaç yıkama basamağının (0,2X SCC  
 20 içinde nihai yıkama) ardından, membranlar, fosfor görüntülemeyle  
 görüntülendi.

### **İn vitro yarıma eseyi**

25 Hücre lizatları yukarıda tarif edildiği gibi hazırlandı ve CLTA-RFP  
 donör plazmidle inkübe edildi [10]. Yarıma reaksiyonları, 20 µl  
 toplam hacimde gerçekleştirildi ve 10 µl lizat, 2 µl 5x yarıma  
 tamponu (100 mM HEPES pH 7,5, 500 mM KCl, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 5



mM DTT, %25 gliserol) ve 300 ng plazmid içeriyordu. Belirtilmesi halinde, reaksiyonlar, 10 pmol in vitro ortamda transkribe edilmiş CLTA1 sgRNA'yla desteklendi. Reaksiyonlar 37°C sıcaklıkta bir saat süreyle inkübe edildi ve ardından, 10 U XhoI (NEB) ile ilave 30 dakika süreyle 37°C sıcaklıkta sindirildi. Reaksiyonlar, Proteinaz K (Thermo Scientific) ilave edilerek durduruldu ve 37°C sıcaklıkta 15 dakika süreyle inkübe edildi. Yarıma ürünleri, %1 agaroz jel üzerinde elektroforezle analiz edildi ve SYBR Safe boyayla boyandı. ~2230 ve ~3100 bp fragmanların varlığı, Cas9-aracılı yarılmaya işaret eder.

10

## SONUÇLAR

Cas9'un canlı hücrelerde genomik DNA'yı yaracak şekilde programlanıp programlanamayacağını test etmek için, Cas9, insan klatriin hafifi zincir (CLTA) genini hedef alacak şekilde tasarlanmış bir sgRNA'yla birlikte eksprese edildi. CLTA genomik lokusu, ZFN'ler kullanılarak daha önce hedef alınmıştır ve editlenmiştir [10]. Biz ilk önce insan HEK293T hücrelerinde *Streptococcus pyogenes* Cas9 proteininin bir insan-kodon-optimize versiyonunun ve sgRNA'nın ekspresyonunu test ettik. 160 kDa Cas9 proteini, Cas9'un C-terminusuna ekli bir HA epitopu, bir nükleer lokalizasyon signali (NLS) ve yeşil floresan protein (GFP) içeren bir füzyon proteini olarak eksprese edildi (Şekil 29A). GFP'ye füzyonlanmış Cas9'u kodlayan bir vektörle transfekte edilen hücrelerin analizi, bol miktarda Cas9 ekspresyonu ve nükleer lokalizasyon gösterdi (Şekil 29B). Western blotlama, Cas9 proteininin bu hücrelerden elde edilen ekstraktlarda büyük ölçüde intakt formda eksprese edildiğini teyit etti (Şekil 29A). Cas9 programlamak için, hedef DNA sekansını

25

tamamlayıcı nitelikte bir 5'-terminal 20-nükleotidli sekans ve Cas9 bağlanması için gereken bir 42-nükleotidli 3'-terminal sap ilmik yapısı içeren sgRNA eksprese ettik (Şekil 29C). Bu 3'-terminal sekans, in vitro ortamda Cas9 programlamak için daha önce kullanılmış olan minimal sap-ilmik yapısına tekabül eder [8]. Bu sgRNA'nın ekspresyonu, insan U6 (RNA polimeraz III) promotörü tarafından yönlendirildi [11]. U6 promotörü-yönlendirmeli sgRNA plazmid ekspresyon vektörüyle transfekte edilmiş hücrelerden ekstrakte edilen RNA'nın Northern blotlama analizi sgRNA'nın gerçekten eksprese edildiğini ve stabilitesinin Cas9 varlığıyla arttığını gösterdi (Şekil 29D).

**Şekil 29**, insan hücrelerinde Cas9 ve yönlendirici RNA'nın birlikte ekspresyonunun hedef lokusta çift-iplikçik DNA kırıkları oluşturduğunu gösterir. (A) Ust; Cas9-HA-NLS-GFP ekspresyon yapısının şematik diyagramı. Ust; Cas9 ekspresyon plazmidıyla transfekte edilen HEK293T hücrelerinden elde edilen lizat, bir anti-HA antikoru kullanılarak Western blotlama analiziyle analiz edildi. (B) Cas9-HA-NLS-GFP eksprese eden HEK293T hücrelerinin floresans mikroskopisi. (C) İnsan CLTA lokusunu hedef alan bir tekil yönlendirici RNA'nın (sgRNA, yani bir tek molekül DNA-hedefleyen RNA) tasarımı. Ust; insan CLTA geninin ekson 7'sinde sgRNA hedef yerinin şematik diyagramı. CLTA1 sgRNA'nın yönlendirici segmentine hibridize olan hedef sekans "CLTA1 sgRNA" ile gösterilmektedir. GG di-nükleotid ön-aralığa komşu motifi (PAM) bir okla gösterilir. Siyah çizgiler, kontrol ZFN proteininin DNA bağlanma bölgelerini temsil etmektedir. CLTA açık okuma çerçevesinin translasyon durdurma kodonu, referans olması için bir

kesikli çizgiyle işaretlenir. Orta; sgRNA ekspresyon yapısının şematik diyagramı. RNA, bir Pol III transkripsiyonel terminatör sinyali işlevini gören bir poli(T) trakt ve U6 Pol III promotörü kontrolü altında eksprese edilir. Ust; hedef DNA'nın Cas9 tarafından sgRNA-yönlendirmeli yarılmaması. sgRNA, bir 20-nt 5'-terminal yönlendirici segment ve onu takiben, Cas9 bağlanması için gereken bir 42-nt sap-ilmik yapısından oluşur. İki hedef DNA iplikçığının Cas9-aracılı yarılmaması olayı, hedef DNA'nın açılması ve sgRNA'nın yönlendirici segmenti ile hedef DNA arasında bir dubleks oluşmasının ardından meydana gelir. Bu, hedef DNA'da hedef sekansın downstream bölgesinde bir PAM motifinin (kullanılan Cas9 için uygun, örneğin GG dinükleotid; yukarıda verilen Örnek 1'e bakınız) varlığına bağımlı ve bağımlıdır. Hedef sekansın üst diyagrama göre ters çevrildiğini not ediniz. **(D)** HEK239T hücrelerinde sgRNA ekspresyonunun Northern blot analizi. **(E)** Cas9 ve/veya CLTA sgRNA eksprese eden HEK239T hücrelerinden izole edilen genomik DNA'nın Surveyor nükleaz eseyi. CLTA lokusunu hedef almak için daha önce kullanılan bir ZFN yapısı [10], homolog olmayan uç birleştirme yoluyla DSB-indüklü DNA onarımını belirlemek için bir pozitif kontrol olarak kullanıldı.

20

Daha sonra, Cas9-HA-NLS-mCherry ve CLTA1 sgRNA ile transfekte edilen HEK239T hücrelerinde yer-spesifik DSB'lerin oluşup oluşmadığını araştırdık. Bu araştırma için, Surveyor nükleaz eseyi kullanılarak DSB-indüklü NHEJ'yle onarımın kusurlu olması sebebiyle lokusta meydana gelebilecek küçük insersiyonları ve delesyonları aradık [12]. Cas9:sgRNA'nın hedeflediği genomik DNA bölgesi, PCR yöntemiyle amplifiye edilir ve elde edilen ürünler denatüre edilir ve yeniden kaynaştırılır. Yeniden hibridize edilen PCR

25

ürünleri, yanlış eşleşme tanıma endonükleazı Cel-1'le inkübe edilir ve bir akrilamid jel üzerinde ayrıştırılarak Cel-1 yarıma bantları tanımlanır. NHEJ tarafından DNA onarımı normalde bir DSB'yle indüklendiğinden dolayı, Surveyor eseyinde bir pozitif sinyal, 5 genomik DNA yarımmasının meydana gelmiş olduğunu gösterir. Bu eseyi kullanarak, CLTA1 sgRNA'nın hedeflediği bir pozisyonda CLTA lokusunda yarıma belirledik (Şekil 29E). CLTA lokusunda bir komşu yeri hedef alan bir ZFN çifti, bu deneylerde bir pozitif kontrol sundu [10].

10

Cas9 veya sgRNA ekspresyonunun gözlemlenen genom editleme reaksiyonlarında bir sınırlayıcı faktör olup olmadığını belirlemek için, transfekte edilen hücrelerden hazırlanan lizatlar, CLTA1 sgRNA'nın hedef aldığı bir CLTA geni fragmanı içeren plazmid DNA'yla inkübe edildi. Tek başına Cas9-HA-NLS-GFP ekspresyon vektörüyle 15 transfekte edilen hücrelerden hazırlanan lizatla inkübasyondan sonra plazmid DNA yarıması gözlemlenmedi; bu bulgu, Surveyor esey sonuçlarıyla tutarlıdır. Bununla birlikte, lizata in vitro transkribe edilmiş CLTA1 sgRNA ilave edildiğinde, sağlam plazmid yarıması 20 belirlendi (Şekil 30A). Ek olarak, hem Cas9 hem de sgRNA ekspresyon vektörleriyle transfekte edilmiş hücrelerden hazırlanan lizat, plazmid yarımmasını desteklerken, tek başına sgRNA-kodlayan vektörle transfekte edilmiş hücrelerden hazırlanan lizatlar desteklemedi (Şekil 30A). Bu sonuçlar, insna hücrelerinde Cas9 25 fonksiyonu için bir sınırlayıcı faktörün sgRNA'yla birleşme olabileceğini gösterir. İlave edilmiş eksojen sgRNA'nın varlığında ve yokluğunda daha önce açıklandığı gibi transfekte edilmiş hücrelerden hazırlanan lizatlarda plazmid yarımmasını doğrudan doğruya analiz

ederek bu olasılığı test ettik. Özellikle, hem Cas9 hem de sgRNA ekspresyon vektörleriyle transfekte edilen hücrelerden elde edilen lizata eksojen sgRNA ilave edildiğinde, DNA yarma aktivitesinde önemli bir artış gözlemlendi (Şekil 30B). Bu sonuç, HEK293T hücrelerinde Cas9 fonksiyonu için sınırlayıcı faktörün sgRNA ekspresyonu veya onun Cas9'a yüklenmesi olduğunu gösterir.

**Şekil 30**, hücre lizatlarının aktif Cas9:sgRNA içerdiğini ve yerspesifik DNA yarılmasını desteklediğini gösterir. (A) Sol tarafta gösterilen plazmid(ler)le transfekte edilmiş hücrelerden elde edilen lizatlar, bir PAM ve CLTA1 sgRNA'yı tamamlayıcı nitelikte hedef sekans içeren plazmid DNA'yla inkübe edildi; belirtilmesi halinde, reaksiyon, 10 pmol in vitro ortamda transkribe edilmiş CLTA1 sgRNA'yla desteklendi; XhoI'yla sekonder yarılma, ~2230 ve ~3100 bp büyüklükte fragmanlar oluşturdu; bu, Cas9-aracılı yarılmaya işaret etmektedir. Bir ZFN ekspresyon yapısıyla transfekte edilmiş hücrelerden elde edilen lizat kullanılan bir kontrol reaksiyonu, hafif farklı boyutta fragmanlar gösterir; bu, ZFN hedef yerinin CLTA1 hedef yeriyle denk olduğunu gösterir. (B) Cas9-GFP ekspresyon plazmidıyla ve belirtilmesi halinde, CLTA1 sgRNA ekspresyon plazmidıyla transfekte edilen hücrelerden elde edilen lizatlar, in vitro ortamda transkribe edilmiş CLTA1 sgRNA'nın varlığında ya da yokluğunda (A)'da olduğu gibi hedef plazmid DNA'yla inkübe edildi.

Canlı hücrelerde Cas9:sgRNA birleşmesini arttırmamanın bir yolu olarak, daha sonra, yönlendirici RNA'nın tahmin edilen Cas9-bağımlı bölgesini uzatma etkisini test ettik. CLTA1 sgRNA'nın iki yeni versiyonu, sarmalda, crRNA ile tracrRNA arasındaki baz

eşleşmesi etkileşimlerini taklit eden ilave altı veya on iki baz çifti içerecek şekilde tasarlandı (Şekil 31A). Ek olarak, yönlendirici RNA'nın 3'-ucu, *S. Pyogenes* tracrRNA nativ sekansı bazında beş nükelotidle uzatıldı [9]. U6 veya H1 Pol III promotörlerinin kontrolü altında bu 3' uzatılmış sgRNA'ları kodlayan vektörler, Cas9-HA-NLS-GFP ekspresyon vektörüyle birlikte hücrelere transfekte edildi ve Surveyor eseyi kullanılarak yer-spesifik genom yarılması test edildi (Şekil 31B). Elde edilen sonuçlar, yarılma olayının hem Cas9 hem CLTA1 sgRNA gerektirdiğini, fakat Cas9 veya sgRNA tek başına eksprese edildiğinde bu olayın meydana gelmediğini teyit etti. Ek olarak, Cel-1 nükleaz yarılmasıyla belirlendiği gibi, NHEJ sıklıklarında büyük ölçüde artış gözlemledik; kontrol ZFN çiftiyle elde edilen NHEJ mutagenезinin sıklığı ise büyük ölçüde değişmemiş vaziyette kaldı.

15

**Şekil 31**, sgRNA yapılarının 3' uzamasının yer-spesifik NHEJ-aracılı mutagenезi arttırdığını gösterir. (A) CLTA1 sgRNA ekspresyonu için yapı (üst), orijinal Cas9-bağlanımlı sekans (v1.0) ya da 4 baz çiftiyle (v2.1) veya 10 baz çiftiyle (v2.2) uzatılan dsRNA dubleksleri içeren transkriptler oluşturulacak şekilde tasarlandı. (B) Cas9 ve/veya CLTA sgRNA v1.0, v2.1 veya v2.2 eksprese eden HEK293T hücrelerinden izole edilen genomik DNA'nın Surveyor nükleaz eseyi. CLTA lokusunu hedef almak için daha önce kullanılmış olan bir ZFN yapısı [10], homolog olmayan uç birleştirme yoluyla DSB-indüklü DNA onarımını belirlemek için bir pozitif kontrol olarak kullanıldı.

25

Sonuçta, elde edilen sonuçlar, çeşitli genom editleme uygulamaları için bir basit moleküler araç olarak Cas9 oluşturmak için bir çerçeve

sunmaktadır. Bu sistemin güçlü bir özelliği, tek bir lokusu hedefleme etkinliğini arttırmak amacıyla ya da birkaç lokusu eşzamanlı hedefleme yolu olarak, aynı hücrede birden çok sgRNA'ya sahip Cas9 programlama potansiyelidir. Bu stratejiler, tüm genomları kapsayan deneylerde ve büyük ölçekli araştırmalarda, örneğin multinejik hastalık modellerinin gelişiminde geniş kullanım alanına sahip olacaktır.

### **Ornek 3: Tip II CRISPR-Cas immünite sistemlerinin tracrRNA ve Cas9 aileleri**

Tip II sistemin ayırıcı nitelikte proteini olan Cas9'a homolog sekansları tarayarak, ticari piyasada mevcut bakteriyel genomlarda şu anda bulunan tüm putatif tip II CRISPR-Cas lokuslarını taradık. Tanımlanmış Cas9 ortologlarının çoklu sekans hizalamasından bir filogenetik ağaç oluşturduk. İlişkili tip II sistemlerin cas operonlarının CRISPR tekrarı uzunluğu ve gen organizasyonu, farklı Cas9 alt-kümelerinde analiz edildi. Tip II lokusların bir alt-sınıfı önerildi ve bu alt-sınıf da 75 temsilci Cas9 ortologunun seçimi bazında alt-gruplara ayrıldı. Daha sonra, CRISPR tekrar sekanslarını elde ederek ve seçili tip II lokuslarının cas genlerinin ve CRISPR dizilerinin içinde veya civarındaki anti-tekrarları tarayarak tracrRNA sekanslarını tahmin ettik. Seçilen tracrRNA ortologlarının sekanslarının ve tahmin edilen yapılarının karşılaştırmalı analizi gerçekleştirildi. Son olarak, beş bakteri türünden tracrRNA'lar ve crRNA'ların ekspresyon ve işleme profillerini tayin ettik.

## MALZEMELER VE YONTEMLER

### Bakteriyel suşlar ve kültür koşulları

Plakalar üzerinde bakterileri çoğaltmak için aşağıdaki vasatlar kullanıldı: *S. mutans* (UA159) için %3 koyun kanı ilave edilmiş TSA (triptikaz soya agarı, Trypticase™ Soya Agarı (TSA II) BD BBL, Becton Dickinson) ve *L. innocua* (Clip11262) için BHI (beyin kalp infüzyonu, BD Bacto™ Beyin Kalp İnfüzyonu, Becton Dickinson) agarı. Sıvı kültürler içinde kültürlendiğinde, *S. Mutans* için %0,2 maya ekstresi (Servabacter®) ilave edilmiş THY vasatı (Todd Hewitt Broth (THB, Bacto, Becton Dickinson), *L. innocua* için BHI brothu, *N. meningitidis* (A Z2491) için %1 vitamin-miksi VX (Difco, Becton Dickinson) içeren BHI sıvı vasatı, *C. jejuni* (NCTC 11168; ATCC 700819) için %1 vitamin-miksi VX içeren MH (Mueller Hinton Broth, Oxoid) Brothu ve *F. novicida* (U112) için TSB (Triptik Soya Brothu, BD BBL™ Trypticase™ Soya Brothu). *S. mutans*, çalkalanmadan 37°C sıcaklıkta %5 CO<sub>2</sub> altında inkübe edildi. *L. innocua*, *N. meningitidis* ve *F. novicida* suşları, bir yandan çalkalanarak 37°C sıcaklıkta aerobik olarak çoğaltıldı. *C. jejuni*, Campygen (Oxoid) atmosferi kullanılarak mikroaerofilik koşullarda 37°C sıcaklıkta çoğaltıldı. Bakteriyel hücre çoğalması, bir mikropilaka okuyucu (BioTek PowerWave™) kullanılarak düzenli zaman aralıklarında 620 nm'de (OD<sub>620</sub> nm) kültürlerin optik yoğunluğu ölçülerek izlendi.

### 25 Bakteriyel küçük RNA kütüphanelerinin sekanslanması

Mid-logaritmik büyüme fazı ve total RNA, TRIZOL (Sigma-Aldrich) ile ekstrakte edilene kadar, *C. jejuni* NCTC 11168 (ATCC 700819), *F.*



novicida U112, L. innocua Clips 1262, N. meningitidis A Z2491 ve S. mutans UA159 kültürlendi. Her suştan 10 µg total RNA, TURBO™ DNase (Ambion) ile işleme tâbi tutularak herhangi bir artık genomik DNA çıkartıldı. Ribozomal RNA'lar, Gram-pozitif veya Gram-negatif bakteriler (Epicentre) için Ribo-Zero™ rRNA Removal Kits® üretici talimatlarına göre kullanılarak çıkartıldı. RNA Clean & Concentrator™-5 kitiyle (Zymo Research) saflaştırma işleminden sonra, üretici talimatlarına göre ScriptMiner™ Küçük RNA-Sekansı Kütüphanesi Hazırlama Kiti (Multiplex, Illumina® uyumlu) kullanılarak kütüphaneler hazırlandı. RNA'lar, Tütün Asit Pirofosfatazi (TAP) (Epicentre) ile işleme tâbi tutuldu. RNA Clean & Concentrator™-5 (Zymo Research) kolonları, müteakip RNA saflaştırma için kullanıldı ve PCR amplifikasyonu için Phusion® Yüksek Fideliteli DNA Polimeraz (New England Biolabs) kullanıldı. Her kütüphaneye Spesifik kullanıcı tanımlı barkodlar (RNA-Sekansı Barkod Primerleri (Illumina®- uyumlu) Epicentre) ilave edildi ve numuneler, Vienna Biocenter, Viyana, Avusturya'nın İleri Nesil Sekanslama (CSF NGS Birimi; internette "csf." ve takiben "ac.at" domaininde) tesisinde sekanslandı (Illumina tek uç sekanslaması).

20

### **tracrRNA ve crRNA sekanslama verilerinin analizi**

RNA sekanslama okumaları, illumina2bam aracı kullanılarak bölündü ve (i) Illumina adaptör sekanslarının çıkarılması (cutadapt 1.0) ve (ii) 3' ucunda 15 nt çıkarılarak okuma kalitesinin geliştirilmesi yoluyla kırıldı. 15 nt'den daha kısa okumaların çıkartılmasından sonra, cDNA okumaları, 2 yanlış eşleşmeye izin verilmesi suretiyle Bowtie kullanılarak ilgili genomlarına hizalandılar: C. jejuni (GenBank:

NC\_002163), *F. novicida* (GenBank: NC\_008601), *N. meningitidis* (GenBank: NC\_003116), *L. innocua* (GenBank: NC\_003212) ve *S. mutans* (GenBank: NC\_004350). Okumaların içeriği, BEDTools-Versiyon-2.15.0 kullanılarak her nükleotid pozisyonunda her iki DNA  
 5 iplikçığı için de ayrı ayrı hesaplandı. Beher milyonda okuma (rpm) birimiyle okuma içeriğini barındıran bir normalize oynatma dosyası oluşturuldu ve Integrative Genomics Viewer (IGV) aracı kullanılarak görüntüledi ("www." ve takiben "broadinstitute.org/igv/") (Şekil 36). SAMTools flagstat<sup>80</sup> kullanılarak, *C. jejuni* için toplam 9914184  
 10 haritalanmış okuma, *F. Novicida* için 48205 okuma, *N. Meningitidis* için 13110087 okuma, *L. innocua* için 161865 okuma ve *S. mutans* için 1542239 okuma bazında haritalanmış okumaların oranı hesaplandı. Her bir tekli nükleotid pozisyonunda (5') ucunda başlayan ve (3') ucunda biten okumaların sayısını içeren bir dosya oluşturuldu ve IGV'de görüntüledi. Her bir tracrRNA ortoloğu ve crRNA için,  
 15 SAMtools kullanılarak, elde edilen toplam okuma sayısı hesaplandı.

### **Cas9 sekans analizi, çoklu sekans hizalaması ve yönlendirici ağaç oluşturulması**

20

NCBI non-redundant veritabanında Cas9 ailesinin homologlarını elde etmek için Pozisyon-Spesifik Tekrarlamalı (PSI)-BLAST programı kullanıldı. 800 amino asitten daha kısa sekanslar çıkartıldı. 0,8 uzunluk içeriği kesme değeri ve 0,8 skor içeriği eşliğiyle (hizalama  
 25 uzunluğuna bölünen bit skoru) ayarlanmış BLASTClust programı kullanılarak geriye kalan sekanslar kümelendi (Şekil 38). Bu prosedür, 78 küme oluşturdu (bunların 48'i yalnızca bir sekansla temsil edildi). Her kümeden bir temsilci (ya da nadiren birkaç temsilci) seçildi ve

varsayılan parametreler kullanılan MUSCLE programı kullanılarak bu sekanslar için çoklu hizalama oluşturuldu ve daha sonra, PSI-BLAST ve HHpred programları kullanılarak elde edilen lokal hizalamalar bazında bir manüel düzeltme yapıldı. Birkaç sekans daha hizalanamaz nitelikteydi ve nihai hizalamalardan çıkartıldı. Varsayılan parametrelerle FastTree programı kullanılarak en çok olabilirlik ağacının yeniden oluşturulması için 272 bilgilendirici pozisyonlu hizalanmış bloklar kullanıldı: JTT evrim modeli, 20 hız kategorili ayrık gamma modeli. Onyükleme değerlerini hesaplamak için de aynı program kullanıldı.

**Şekil 38**, BLASTclust kümeleme programına göre gruplanan sekansları göstermektedir. BLASTclust analizi için yalnızca 800 amino asitten daha uzun sekanslar seçildi (Malzemeler ve Yöntemler bölümüne bakınız). cas9 ortolog genleri bulunan temsilci suşlar kullanıldı. Bazı sekanslar kümelendi, fakat hemen yakınlarında korunan motifler ve/veya başka cas genleri bulunduğu için Cas9 sekansları oldukları teyit edildi.

## 20 CRISPR-Cas lokuslarının analizi

CRISPR tekrar sekansları, CRISPRdb veritabanından elde edildi ya da CRISPRFinder aracı kullanılarak tahmin edildi (Grissa I et al., BMC Bioinformatics 2007; 8:172; Grissa I et al., Nucleic Acids Res 2007). cas genleri, BLASTp algoritması kullanılarak tanımlandı ve/veya KEGG veritabanıyla (internette "www." ve takiben kegg.jp/domaininde) doğrulandı.

### **tracrRNA ortologlarının in siliko kesintirimi ve analizi**

Putatif anti-tekrarlar, Vector NTI® yazılımı (Invitrogen) kullanılarak, 15 adede kadar yanlış eşleşmeye izin verilmesi suretiyle ilgili genomun her iki iplikçiğinde tekrar-aralık dizisine ait olmayan ilave, 5 dejenere tekrar sekansları taranarak tanımlandı. Transkripsiyonel promotörler ve rho-bağımsız terminatörler, sırasıyla BDGP Sinir Ağı Promotörü Kesirimi programı ("www." ve takiben fruitfly.org/seq\_tools/promotor.html) ve TransTermHP yazılımı 10 kullanılarak tahmin edildi. Varsayılan parametrelerle MUSCLE programı kullanılarak çoklu sekans hizalamaları gerçekleştirildi. Hizalamalar, Vienna RNA paketi 2.0'ın RNAalifold algoritması kullanılarak korunan yapı motiflerinin varlığı açısından analiz edildi

### **15 SONUÇLAR**

#### **Tip II CRISPR-Cas sistemleri bakterilerde yaygın olarak bulunmaktadır.**

20 tracrRNA-kodlayan DNA ve tekrar-aralık dizisine ek olarak, tip II CRISPR-Cas lokusları tipik olarak bir operon şeklinde organize edilmiş üç ilâ dört cas geninden oluşur (Şekil 32A-B). Cas9, tip II'ye özgü ayırıcı nitelikte bir proteindir ve ekspresyon ve enterferans basamaklarında rol oynar. Cas1 ve Cas2, tüm CRISPR-Cas 25 sistemlerinin ortaklaşa sahip oldukları çekirdek proteinlerdir ve aralık elde edilmesinde rol oynarlar. Csn2 ve Cas4, tip II sistemlerin yalnızca bir alt-setinde bulunur ve adaptasyonda bir rol oynadığı ileri sürüldü. Maksimum sayıda tracrRNA içeren Tip II CRISPR-Cas

lokusu elde etmek için, ilk önce, ticari piyasada mevcut genomları, zaten açıklanmış olan Cas9 proteinlerine homolog sekanslar açısından taradık. 235 Cas9 ortoloğu, 203 bakteriyel türde tanımlandı. Elde edilen tüm Cas9 ortologlarını temsilci 75 farklı sekanstan oluşan bir set, ilave analiz için seçildi (Şekil 32, Şekil 38 ve Malzemeler ve Yöntemler).

**Şekil 32,** (A) çeşitli farklı organizmalardan temsilci Cas9 sekanslarının bir filogenetik ağacı ve (B) temsilci Cas9 lokusu yapısı. Her devre için hesaplanan önyükleme değerleri gösterilmektedir. Aynı renkte dallar, benzer Cas9 ortologlarının seçili alt-kümelerini temsil eder. Her alt-küme için nükleotidler açısından CRISPR tekrarı uzunluğu, amino asitler (aa) açısından ortalama Cas9 proteini büyüklüğü ve konsensüs lokus yapısı gösterilmektedir. \*-gi|116628213 \*\*-gi|116627542 †- gi|34557790 ‡-gi|34557932. Tip II-A, cas9- csx12, cas1, cas2, cas4 ile karakterize edilir. Tip II-B, cas9, cas1, cas2 ve ardından, bir csn2 varyantıyla karakterize edilir. Tip II-C, bir korunmuş cas9, cas1, cas2 operonla karakterize edilir (Ayrıca bakınız Şekil 38).

20

Daha sonra, seçili Cas9 ortologlarının bir çoklu sekans hizalaması işlemini gerçekleştirdik. Karşılaştırmalı analiz, amino asit bileşimi ve protein büyüklüğü açısından yüksek çeşitlilik ortaya çıkardı. Cas9 ortologları yalnızca birkaç özdeş amino asit içerirler ve elde edilen tüm sekanslar, bir merkezi HNH endonükleaz domaini ve bölünmüş RuvC/RNaseH domainiyle aynı domain yapısında sahiptirler. Cas9 proteinlerinin uzunlukları, 984 (Campylobacter jejuni) ile 1629 (Francisella novicida) amino asit aralığındadır ve tipik büyüklük

25

~1100 veya ~1400 amino asittir. Cas9 sekansı çeşitliliğinin özellikle domain-arası bölgelerin uzunluğu açısından yüksek olması sebebiyle, analiz edilen sekansların bir filogenetik ağacını yeniden oluşturmak için, hazırlanan hizalamaların yalnızca iyi-hizalanmış, bilgilendirici pozisyonlarını seçtik (Şekil 32 ve Malzemeler ve Yöntemler). Cas9 ortologları, bazı aykırı sekanslarla üç ana monofiletik küme halinde gruplandı. Cas9 ağacının gözlemlenen topolojisi, tip II lokuslarının güncel sınıflandırmasına çok uygundur ve daha önce tanımlanmış tip II-A ve tip II-B, ayrı monofiletik kümeler oluşturur. Kümeleri ilaveten karakterize etmek için, listelenen suşların hepsinin cas operon bileşimlerini ve CRISPR tekrar sekanslarını detaylı inceledik.

### **Cas9 alt-kümelemesi, tip II CRISPR-Cas lokusları yapısında çeşitliliği yansıtır**

Seçilen tip II lokuslarına ilişkin daha derin bir analiz, Cas9 ortoloğu sekanslarının kümelenmesinin CRISPR tekrarı uzunluğunun çeşitliliğiyle bağıntılı olduğunu ortaya çıkardı. Tip II CRISPR-Cas sistemlerinin çoğu için tekrar uzunluğu, Cas9 ağacı alt-kümelerinin ikisi için bazı değişimlerle 36 nükleotiddir (nt). Önceden Csx12 olarak adlandırılan, uzun Cas9 ortologlarını kodlayan lokuslar içeren tip II-A kümesinde (Şekil 32), CRISPR tekrarları 37 nt uzunluktadır. Bacteroidetes phylum türüne ait bakterilerden elde edilen sekanslardan oluşan küçük alt-küme (Şekil 32), boyutu 48 nt'ye kadar olan olağandışı düzeyde uzun CRISPR tekrarlarıyla karakterize edilir. Ek olarak, Cas9 sekanslarının alt-kümelemesinin Şekil 32'de gösterildiği gibi ayrı cas operon yapısıyla bağıntılı olduğunu fark ettik. Üçüncü ana küme (Şekil 32) ve aykırı lokuslar (Şekil 32), daha sonra

açıklanacak olan bazı uyumsuz lokuslar hariç, esas olarak, cas9, cas1 ve cas2 genlerinin oluşturduğu minimum operondan oluşur. İlk iki ana kümenin diğer tüm lokusları, bir dördüncü genle, esas olarak tip II-A'ya özgü cas4'le ya da tip II-B'ye özgü csn2- benzeri genle ilişkendirilir (Şekil 32). Tip II-B *S. pyogenes* CRISPR01'ine ve *S. thermophilus* CRISPR3'üne benzer lokuslar içinde Csn2 proteininin daha kısa varyantlarını - Csn2a - kodlayan genleri tanımladık (Şekil 32). Csn2'nin daha uzun varyantı Csn2b'nin tip II-B *S. thermophilus* CRISPR1'ine benzer lokuslarla ilişkilendirildiği tespit edildi (Şekil 32). İlginçtir ki, daha önce açıklanan Csn2 varyantlarına açık ve belirgin herhangi bir sekans benzerliği bulunmayan proteinleri kodlayan ilave putatif cas genleri tanımladık. Karakterize edilmemiş proteinlerden biri, yalnızca *Mycoplasma* türünün tip II-B lokuslarıyla ilişkilendirilir (Şekil 32 ve Şekil 33). Diğer ikisinin ise *Staphylococcus* türünün tip II-B lokuslarında kodlandığı tespit edilmiştir (Şekil 33). Her durumda, cas operon yapısı çeşitliliği, sonuçta, Cas9 sekanslarının alt-kümelenmesiyle uyumludur. Uç ayrı ana monofiletik kümeye ayrılan Cas9 ağacının genel topolojisiyle birlikte bu karakteristikler, tip II CRISPR-Cas sisteminin yeni üç alt-tipe tekrar ayırmamıza yol açtı. Tip II-A, Csx12- benzeri Cas9 ve Cas4 ile ilişkilendirilir; tip II-B ise Csn2-benzeri ile ilişkilendirilir ve Şekil 32'de gösterildiği gibi, tip II-C yalnızca minimal cas9, cas1 ve cas2 genleri setini içerir

**Şekil 33**, seçili bakteriyel türlerden tip II CRISPR-Cas'ın yapısını göstermektedir. Dikey çubuklar, aynı ağaç alt-kümesine ait Cas9 ortologlarını kodlayan lokusları gruplandırır (Şekil 32 ile kıyaslama). Yatay siyah çubuk, lider sekans; siyah dikdörtgenler ve baklavalalar,

tekrar-aralık dizisi. Tahmin edilen anti-tekrarları, putatif tracrRNA ortolog transkripsiyonunun yönünü gösteren oklarla temsil edilir. Deneysel olarak doğrulanmamış lokuslar için, CRISPR tekrarı-aralık dizisinin, burada, cas operonla aynı iplikçikten transkribe edilmesinin düşünülmesini not ediniz. Putatif tracrRNA ortologunun transkripsiyon yönü bu doğrultuda gösterilmektedir.

### **Yeni tracrRNA ortologlarının in siliko kestirimleri**

75 temsilci Cas9 ortologu bazında daha önce seçilen tip II lokuslar, putatif tracrRNA ortologlarının varlığı açısından tarandı. Kısıtlı sayıda tracrRNA sekansında daha önce yaptığımız analiz, ne tracrRNA sekanslarının ne de bunların CRISPR-Cas lokusları içindeki lokalizasyonlarının korunuyor gözüktüğünü ortaya çıkardı. Bununla birlikte, yukarıda bahsi geçtiği gibi, tracrRNA'lar, ayrıca, pre-crRNA tekrarlarının her biriyle baz eşleşmesi yaparak Cas9 varlığında RNase III tarafından yarılan tracrRNA:precrRNA tekrar dubleksleri oluşturabilen bir anti-tekrarı sekansı ile de karakterize edilir. Yeni tracrRNA'lara ilişkin kestirimde bulunmak için, bu karakteristikten faydalandık ve aşağıdaki iş akışını kullandık: (i) CRISPR-Cas lokusları içinde potansiyel anti-tekrarları (CRISPR tekrarlarıyla sekans baz-eşleşmesi) tarama, (ii) intergenik bölgelerde konumlanan anti-tekrarları seçme, (iii) CRISPR anti-tekrarı:tekrar baz-eşleşmesini valide etme ve (iv) tanımlanan tracrRNA'larla ilişkilendirilen promotörleri ve Rho-bağımsız transkripsiyonel terminatörleri kestirme.



Putatif anti-tekrarları taramak amacıyla, CRISPRdb veritabanından tekrar sekansları elde ettik ya da bilgiler mevcut olmadığında, CRISPRfinder yazılımını kullanarak tekrar sekanslarını tahmin ettik. Daha önce yaptığımız çalışmada, cas operonunkine kıyasla tekrar-  
5 aralık dizisinin transkripsiyon yönünün lokuslar arasında değiştiğini deneysel olarak gösterdik. Burada, RNA sekanslama analizi, bu gözlemi teyit etti. Analiz edilen lokusların bazılarında, yani *F. novicida*, *N. meningitidis* ve *C. jejuni* lokuslarında, tekrar-aralık dizisi, cas operona zıt yönde transkribe edilir ('Derin RNA  
10 sekanslaması, yeni tracrRNA ortologlarının ekspresyonunu valide eder' paragrafına ve Şekil 33 ve 34'e bakınız); *S. pyogenes*, *S. mutans*, *S. thermophilus* ve *L. innocua*'da ise, dizi ve cas operon aynı yönde transkribe edilir. Bunlar, bu güne kadar elde edilen tek tip II tekrar-aralık dizisi ekspresyon verileridir. Başka tekrar-aralık dizilerinin  
15 transkripsiyon yönünü kestirmek için, daha önce yapılan gözlemleri dikkate aldık ve bu gözlemlere göre, dizilerin son tekrarları genellikle mutasyona uğratılır. Bu açıklama, normalde adaptasyon fazı esnasında bir aralık sekansının insersiyonundan sonra dizinin ilk tekrarının kopyalandığı güncel aralık edinme modeliyle uyumludur. 37 tekrar  
20 aralık dizisi için, dizilerin putatif ucunda mutasyonlu tekrarı tanımlayabildik. *N. meningitidis* ve *C. jejuni* tekrar-aralık dizisi için transkripsiyonun kestirilen oryantasyonunun deneysel olarak tayin edilen (RNA sekanslama ve Northern blot analizi) oryantasyona zıt olacağını gözlemledik. Kestirilen oryantasyon kümeler içinde uyumlu  
25 olmadığından ve çoğu durumda, dizilerin her iki ucunda potansiyel promotörleri belirleyebileceğimizden dolayı, tekrar-aralık dizilerinin transkripsiyonunun, aksi kanıtlanmadıkça, cas operonun transkripsiyonuyla aynı yönde olduğunu düşündük.

**Şekil 34**, seçilen tip II CRISPR Cas sistemlerinde tracrRNA ve pre-crRNA'nın birlikte işlenme olayını göstermektedir. tracrRNA ve pre-crRNA transkripsiyonunun pozisyonları ve yönleri doğrulanmış olan CRISPR lokusları yapıları gösterilmektedir. Ust sekanslar, pre-crRNA tekrarları; alt sekanslar, crRNA tekrarlarıyla tracrRNA sekansları baz-eşleşmesi. Putatif RNA işlenme yerleri, RNA sekanslama yoluyla bulunur ve ok uçlarıyla gösterilir. Her bir lokus için, ok ucu büyüklükleri, elde edilen 5' ve 3' uçlarının bağıl miktarlarını temsil etmektedir (**Şekil 37** de bakınız).

**Şekil 37**'de, çalışılan bakteriyel türlere istinaden yapılan sekanslamalar yoluyla elde edilen tüm tracrRNA ortologları ve matür crRNA'lar, koordinatları (ilgilenilen bölge) ve müteakbil cDNA sekansları (5' ilâ 3') ile birlikte listelenmektedir. Oklar, transkripsiyon yönünü (iplikçik) temsil etmektedir. cDNA okumalarının sayısı (SAMtools kullanılarak hesaplanır), içerik sayısı (haritalanna okuma yüzdesi) ve her bir transkriptle ilişkilendirilen baskın uçlar gösterilmektedir. Her bir transkriptin 5' ve 3' uçları civarında her bir nükleotid pozisyonunda başlayan veya biten okumaların sayısı gösterilmektedir. Her bir crRNA matür formunun boyutu gösterilmektedir. Her bir crRNA türüne tahsis edilen sayı, CRISPRdb'ye göre, pre-crRNA'da aralık sekansı pozisyonuna tekabül eder. Her bir tracrRNA türüne tahsis edilen sayı, aynı transkriptin farklı formlarına tekabül eder.

Daha sonra, 15 adede kadar yanlış eşleşmeye izin verilmesi suretiyle, tekrar-aralık dizisine ait olmayan olası tekrar sekansları için her iki

iplikçikte 1 kb upstream ve downstream konumda bulunan sekanslar da dahil, seçilen CRISPR-Cas lokuslarını taradık. Beher lokusta tracrRNA ortologlarının anti-tekrarlarına tekabül eden ortalama olarak bir ilâ üç dejenere tekrar sekansı bulduk ve intergenik bölgelerde

5 konumlanan sekansları seçtik. Putatif anti-tekrarlar, dört tipik lokalizasyonda bulundu: cas9 geninin upstream bölgesinde, cas9 ile cas1 arasında bölgede ve tekrar-aralık dizisinin upstream veya downstream bölgesinde (Şekil 33). Elde edilen her sekans için olası

10 RNA:RNA etkileşimini tahmin ederek ve özellikle daha uzun ve mükemmel tamamlayıcılık bölgesine sahip olup RNase III işleme süreci için bir optimum çift-iplikçikli yapı oluşturan adaylar üzerine odaklanarak, tekrar ile anti-tekrar arasında oluşan baz eşleşmesi düzeyini (Şekil 44) valide ettik. Anti-tekrara komşu promotörleri ve transkripsiyonel terminatörleri tahmin etmek için, putatif

15 transkripsiyon başlama ve bitiş yerlerini, daha önce yapılan gözlemler<sup>26</sup> bazında, sırasıyla anti-tekrar sekansının maksimum 200 nt upstream ve 100 nt downstream konumunda bulunan bir bölge içinde bulunacak şekilde ayarladık. Daha önce bahsi geçtiği gibi, tip II sistemlerin tekrar-aralık dizilerinin çoğunun transkripsiyon yönüne

20 ilişkin deneysel bilgiler mevcut değildir. İn siliko promotör kestirim algoritmaları çoğunlukla yanlış pozitif sonuçlar verir ve her iki iplikçikten tekrar-aralık dizilerinin transkripsiyonuna yol açacak putatif promotörlere işaret eder. Bazı durumlarda, C. jejuni lokusuyla örneklendirildiği gibi ('Derin RNA sekanslaması, yeni tracrRNA ortologlarının ekspresyonunu valide eder' paragrafına bakınız),

25 tracrRNA ortolog ekspresyonu deneysel olarak valide edilebilmesine rağmen, transkripsiyon terminatörlerini tahmin edemedik. Promotör ve transkripsiyonel terminatör kestirimlerini, yukarıda açıklanan

kılavuzun temel bir basamağı değil de, yalnızca bir destekleyici basamağı olarak kabul etmeyi öneriyoruz.

**Şekil 44**, seçilen bakteriyel türlerde kestirilen pre-crRNA 5 tekrarı:tracrRNA anti-tekrarı baz eşleşmesini göstermektedir. <sup>b</sup>CRISPR lokusları, tip II (Nmeni/CASS4) CRISPR-Cas sistemine aittir. Nomenklatür, CRISPR veritabanına (CRISPRdb) göre oluşturulmuştur. *S. thermophilus* LMD-9 ve *W. Succinogenes*'in iki tip II lokusu içerdiğini not ediniz. <sup>c</sup>Ust sekans, pre-crRNA tekrarı 10 konsensüs sekansı (5' ilâ 3'); alt sekans, tekrara kaynaşan tracrRNA homolog sekansı (anti-tekrar; 3' ilâ 5'). Verilen tekrar sekansının, CRISPR tekrarı-aralık dizisinin cas operonuyla aynı iplikçikten transkribe edildiği varsayımına dayandığını not ediniz. Bu çalışmada deneysel olarak valide edilen sekanslar için, RNA sekanslama verileri 15 dikkate alınarak baz eşleşmesi tayin edildi. Bakınız Şekil 33. <sup>d</sup> *F. tularensis* alt-türü *novicida*, *W. succinogenes* ve gamma proteobakterisi HTCC5015 tip II-A lokuslarında olası iki anti-tekrar tanımlandı. Ust sekans eşleşmesi, putatif lider sekans içinde anti-tekrar; alt sekans eşleşmesi, tekrar aralık dizisinin anti-tekrar 20 downstream kısmı. Bakınız Şekil 33. <sup>e</sup> *S. wadsworthensis* tip II-A lokusunda iki olası anti-tekrar tanımlandı. Ust sekans eşleşmesi, anti-tekrar; alt sekans eşleşmesi, putatif lider sekans içinde anti-tekrar. Bakınız Şekil 33. <sup>f</sup> *L. gasseri* tip II-B lokusunda iki olası anti-tekrar tanımlandı. Ust sekans eşleşmesi, cas9'un anti-tekrar upstream kısmı; 25 alt sekans eşleşmesi, cas9 ile cas1 genleri arasında anti-tekrar. Bakınız Şekil 33. <sup>g</sup> *C. jejuni* tip II-C lokusunda iki olası anti-tekrar tanımlandı. Ust sekans eşleşmesi, cas9'un anti-tekrar upstream kısmı; alt sekans eşleşmesi, tekrar-aralık dizisinin anti-tekrar downstream kısmı.

Bakınız Şekil 33.<sup>h</sup> R. rubrum tip II-C lokusunda iki olası anti-tekrar tanımlandı. Ust sekans eşleşmesi, tekrar-aralık dizisinin anti-tekrar downstream kısmı; alt sekans eşleşmesi, cas1'in anti-tekrar upstream kısmı. Bakınız Şekil 33.

5

### **tracrRNA ortologlarının bir pletoru**

Daha önce seçilen 75 lokusun 56'sı için putatif tracrRNA ortologları tahmin ettik. Kestirim sonuçları Şekil 33'te gösterilmektedir. Daha önce bahsi geçtiği gibi, bu şekilde gösterilen tracrRNA transkripsiyonunun yönü varsayıma dayalıdır ve tekrar-aralık dizisi transkripsiyonun belirtilen yönünü esas alır. Daha önce belirtildiği gibi, tip II-A lokuslarında yaygın olarak bulunan putatif lider sekanslar da dahil olmak üzere, putatif tracrRNA ortologlarını kodlayan sekanslar, cas operonunun upstream kısmında, içinde ve downstream kısmında ve yanı sıra, tekrar aralık dizilerinin downstream kısmında tanımlandı (Şekil 33). Bununla birlikte, CRISPR-Cas lokusları içinde benzer lokalizasyonun anti-tekrarlarının farklı yönlerde transkribe edilebileceğini gözlemledik (örneğin Lactobacillus rhamnosus ve Eubacterium rectale ya da Mycoplasma mobile ve S. pyogenes ya da N. Meningitidis kıyaslandığında gözlemlendiği gibi) (Şekil 33). Bilhassa, Cas9 yönlendirici ağacının aynı alt-kümesi içinde gruplanan lokuslar, tracrRNA-kodlayan genin pozisyonu açısından bir ortak yapıya sahiptirler. Tip II-A lokuslarında tekrar-aralık dizisi etrafında ve tip II-B'nin üç ayrı alt-kümesinde cas9 ile cas1 arasında konumlanan putatif tracrRNA için dikkate değer birkaç istisna hariç, çoğunlukla tip II-B ve II-C'de cas9 geninin upstream kısmında anti-tekrarlar tanımladık.

25

**Bazı tip II CRISPR-Cas lokusları, kusurlu tekrar-aralık dizilerine ve/veya tracrRNA ortologlarına sahiptirler**

5 Altı adet tip II lokusu (*Fusobacterium nucleatum*, *Aminomonas paucivorans*, *Helicobacter mustelae*, *Azospirillum* sp., *Prevotella ruminicola* ve *Akkermansia muciniphila*) için, tekrar sekansına zayıf baz eşleşmesine sahip olan ya da açık okuma çerçeveleri içinde konumlanan potansiyel anti-tekrarları tanımladık. Bilhassa, bu

10 lokuslarda, *A. Paucivorans*'da bir a putatif ATPase kodlayıcı genin açık okuma çerçevesi içinde bir zayıf anti-tekrar, *Azospirillum* sp. B510'da *cas9* geninin ilk 100 nükleotidi içinde bir kuvvetli anti-tekrar ve *A. Muciniphila*'da hem *cas9* hem de *cas1*'le üst üste binen bir kuvvetli anti-tekrar tanımladık (Şekil 33). On iki ilave lokus

15 (*Peptoniphilus duerdenii*, *Coprococcus catus*, *Acidaminococcus intestini*, *Catenibacterium mitsuokai*, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Ilyobacter polytropus*, *Elusimicrobium minutum*, *Bacteroides fragilis*, *Acidothermus cellulolyticus*, *Corynebacterium diptheriae*, *Bifidobacterium longum* ve *Bifidobacterium dentium*) için,

20 herhangi putatif anti-tekrar belirleyemedik. Bu CRISPR-Cas lokuslarında pre-crRNA ekspresyonu ve işlenmesine ilişkin herhangi bir veri mevcut değildir. Bundan dolayı, açıkça tanımlanmış tracrRNA ortoloğunun yokluğunda tip II sistemlerin fonksiyonelliği henüz ele alınmamıştır. Analiz edilmiş yedi lokus (*Parasutterella*

25 *excrementihominis*, *Bacillus cereus*, *Ruminococcus albus*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Nitrobacter hamburgensis*, *Bradyrhizobium* sp. ve *Prevotella micans*) için, herhangi bir tekrar aralık dizisi tanımlayamadık (Şekil 33) ve bunların üçünde

(*Bradyrhizobium* sp. BTAi1, *N. hamburgensis* ve *B. cereus*), yakınında herhangi bir cas geni bulunmayan bir tekli gen olarak cas9 belirledik. Bu üç lokus için, cas9 geninin upstream veya downstream kısmında herhangi bir küçük RNA sekansı kestiriminde bulunamadık.

- 5 *R. albus* ve *P. Excrementihominis* söz konusu olduğunda, cas9 içeren genomik kontig, tekrar aralık dizisinin kestirimine olanak sağlayamayacak kadar kısadır.

## 10 **Derin RNA sekanslaması, yeni tracrRNA ortologlarının ekspresyonunu valide eder**

İn silico tracrRNA kestirimlerini doğrulamak ve tracrRNA:pre-crRNA birlikte işlenme paternlerini tayin etmek için, seçilen Gram-pozitif (*S. mutans* ve *L. innocua*) ve Gram-negatif (*N. meningitidis*, *C. jejuni* ve 15 *F. novicida*) bakterilerden elde edilen RNA'lar, derin sekanslama yoluyla analiz edildi. tracrRNA ortologları ve işlenmiş crRNA'ların sekansları elde edildi (Şekil 36 ve Şekil 37). *S. pyogenes*'e ilişkin daha önce yayınlanmış diferansiyel tracrRNA sekanslama verilerine<sup>26</sup> uygun olarak, tracrRNA ortologları, kütüphanelerde yüksek düzeyde 20 temsil edildi ve toplam haritalanmış okumanın %0,08'i ile %6,2'si aralığına tekabül ediyordu. İşlenmiş tracrRNA'lar da primer transkriptlere kıyasla daha bol miktarda bulunuyordu ve toplam tracrRNA okumaları miktarının %66'sı ile en az %95'i aralığına tekabül ediyordu (Şekil 36 ve Şekil 37).

25

Şekil 36, derin RNA sekanslaması yoluyla ortaya çıkarılan bakteriyel tracrRNA ortologları ve crRNA'ların ekspresyonunu göstermektedir. seçilen bakteriyel suşların tracrRNA ortologları ve crRNA'larının

ekspresyon profilleri, tekabül eden genomlarla birlikte, çubuk çizelgelerle temsil edilmektedir (Integrative Genomics Viewer (IGV) aracından yakalanan görüntüler). *Campylobacter jejuni* (GenBank: NC\_002163), *Francisella novicida* (GenBank: NC\_008601), *Neisseria meningitidis* (GenBank: NC\_003116), *Listeria innocua* (GenBank: NC\_003212) ve *Streptococcus mutans* (GenBank: NC\_004350). Genomik koordinatlar verilmektedir.<sup>a</sup> BEDTools-Versiyon-2.15.0 kullanılarak hesaplanan sekans içeriği (Ölçek, beher milyonda okuma birimiyle verilmektedir).<sup>b</sup> Her bir nükleotid pozisyonunda (5') ucunda başlayan ve (3') ucunda biten okumaların dağılımı gösterilmektedir (Ölçek, okuma sayısı birimiyle verilmektedir). Ust paneller, pozitif iplikçikten transkriptlere tekabül eder; alt paneller ise negatif iplikçikten transkriptlere tekabül eder. Eksenlerin altında verilen negatif içerik değerleri ve pikler, genomun negatif iplikçiğinden transkripsiyonu gösterir. Okumaların baskın 5'- ve 3'-uçları, RNA'ların hepsi için grafik halinde sunulmaktadır. *L. innocua* cDNA kütüphanesi düşük kalitede olursa, crRNA'lar için okumaların kısaldığını ve muhtemelen RNA dejenerasyonundan dolayı, tracrRNA'nın 3' ucunda okumalarda yığılma gözlemlendiğini not ediniz

tracrRNA primer transkriptlerinin 5' uçlarını değerlendirmek için, tracrRNA'nın 5' ucu okumalarının hepsinin bolluğunu analiz ettik ve kestirilen anti-tekrar sekansının 5' ucunun upstream kısmında ya da civarında en baskın okumaları elde ettik. tracrRNA ortologlarının 5' uçları, promotör kestirim algoritması kullanılarak ilaveten teyit edildi. *S. mutans*, *L. innocua* ve *N. Meningitidis*'den elde edilen tracrRNA'ların tanımlanmış 5' uçları, tracrRNA ekspresyonunun hem



in silico kestirimleriyle hem de Northern blot analiziyle bağıntılıydı <sup>26</sup>.  
C. jejuni tracrRNA'nın en baskın 5' ucu, anti-tekrar sekansının ortasında tanımlandı. Beş nükleotid upstream kısımda, in silico kestirimle bağıntılı olan ve CRISPR tekrar sekansı ile daha uzun etkileşim sekansı sağlayan bir ilave putatif 5' ucu belirlendi. F. novicida kütüphanesinden nispeten düşük okuma miktarı elde ettik ve bu da, neredeyse sadece işlenen transkriptlere tekabül ediyordu. Primer transkriptlerin çok küçük okuma miktarına ilişkin analiz, kuvvetli in silico promotör kestirimlerine tekabül eden bir 5' ucu sundu. F. novicida tracrRNA Northern blot problemi, yaklaşık 90 nt uzunlukta transkriptlerin bolluğunun düşük olduğunu göstererek kestirimlerin geçerliliğini ilaveten teyit etti. Sonuçlar, **Tablo 2**'de listelenmektedir. N. meningitidis hariç incelenen türlerin hepsi için, 75 ilâ 100 nt uzunlukta tekil küçük RNA türü olarak primer tracrRNA transkriptleri tanımlandı. N. Meningitidis söz konusu olduğunda, çok düşük okuma miktarıyla temsil edildiği ve Northern blot analiziyle bir zayıf bant olarak daha önce belirlendiği gibi, ~110 nt uzunlukta bir baskın primer tracrRNA formu ve ~170 nt uzunlukta bir putatif daha uzun transkript bulduk.

20

25

Tablo 2 Seçilen tracrRNA ortologları

Suşlar <sup>a</sup>	Transkript	5' ucu <sup>b</sup>			3' ucu <sup>c</sup>	Uzunluk (nt)
		RNA-sekansısı		Kestirilen		
		İlk okuma	En baskın			
S. pyogenes SF370	primer	-	854.546	-	854.376	171
	primer	-	<u>854.464</u>	-		89
	işlenmiş	-	854.450	-		~75
C. jejuni NCTC 11168	primer	<u>1.455.497</u>	1.455.502	<u>1.455.497</u>	1.455.570	~75
	işlenmiş	-	1.455.509	-		~60
L. innocua Clip11262	primer	<u>2.774.774</u>	<u>2.774.774</u>	2.774.773	2.774.863	~90
	işlenmiş	-	2.774.788	-		~75
S. mutans UA159	primer	<u>1.335.040</u>	1.335.040	1.355.039	1.335.141	~100
	işlenmiş	-	1.335.054 1.335.062	-		~85 ~80
N. meningitidis A Z2491	primer	614.158	614.162	614.154	614.333	~175
	primer	<u>614.223</u>	614.225	<u>614.223</u>		~110
	işlenmiş	-	614.240	-		~90
F. novicida U112	primer	817.144	-	817.145 <u>817.154</u>	817.065	~80
	işlenmiş	-	817.138 817.128	-		~75 ~65
S. thermophilus LMD-9	primer	-	-	<u>1.384.330</u>	1.384.425	~95
	primer	-	-	<u>646.654</u>	646.762	~110
P. multocida Pm70	primer	-	-	<u>1.327.287</u>	1.327.396	~110
M. mobile 163K	primer	-	-	<u>49.470</u>	49.361	~110

- a *S. thermophilus*, *P. Multocida* ve *M. Mobile*'nin *tracrRNA* ortologları in siliko ortamda kestirimle belirlendi.
- b RNA sekanslama yoluyla ortaya çıkartılan RNA-sekansı (Tablo S3); ilk okuma, sekanslama yoluyla elde edilen ilk 5'-ucu pozisyonu; en baskın, RNA sekansı verilerine göre en bol miktarda 5'-ucu; kestirilen, transkripsiyon başlama yerinin in siliko kestirimi; altı çizili, hizalanacak primer *tracrRNA* için seçilen 5' ucu.
- c RNA sekansı verilerine ve transkripsiyon terminatörü kestirimine göre tahmin edilen 3' ucu.

***tracrRNA* ve *pre-crRNA*'nın birlikte işlenme yerleri, anti-tekrar:tekrar bölgesinde bulunur.**

- 15 Kestirilen anti-tekrar sekansı içinde bol miktarda bulunan *tracrRNA* 5' uçlarını ve bol miktarda matür *crRNA* 3' uçlarını analiz ederek, işlenmiş *tracrRNA* transkriptlerini inceledik (Şekil 34 ve 45). Türlerin hepsinde, *tracrRNA*:*pre-crRNA* tekrarı dublekslerinin RNase III tarafından birlikte işlenmesinden kaynaklanabilecek, *tracrRNA* ortologlarının baskın 5' uçlarını tanımladık. Daha yapılan gözlemlere de uygun olarak, çok büyük olasılıkla putatif kırpma yoluyla bir ikinci matürasyon olayından kaynaklanan, *crRNA*'ların işlenmiş 5' uçlarını da tanımladık. *S. pyogenes*, *S. mutans* ve *L. innocua*'nın yakın ilişkili RNA çiftlerinde, anti-tekrar sekansının ortasında G:C baz çifti civarında aynı işlenme yeri gözlemlememiz de dikkate değer bir durumdur. Hem *S. mutans* hem *L. innocua*'da, ilave baskın *tracrRNA* 5' uçları ve *crRNA* 3' uçları belirledik; bu, *tracrRNA*:*crRNA* dubleksinin ilaveten kırıldığına işaret edebilir ve yanı sıra, RNase III-

katalize ilk işleme olayının ardından, crRNA'nın 3' ucu da, daha önce atıf yapılan 5' ucu kırılmasına ek olarak kısaltıldı. Benzer şekilde, C. jejuni'de, RNase III işleme paternlerine uygun olarak yalnızca küçük bir miktar crRNA 3' ucu tespit ettik ve işlenmiş tracrRNA'nın tekabül eden 5' uçlarını elde ettik. Sonuçta, RNase III tarafından ilk 5 yarılmadan sonra tracrRNA:crRNA dublekslerinin putatif kırılması, matür crRNA'larda daha kısa bir tekrar-kaynaklı kısma yol açarak, endonükleaz Cas9'la etkileşim ve hedef DNA'ların müteakip 10 yarılması için bir üçlü G:C baz eşleşmesiyle stabilize edilen daha kısa tracrRNA:crRNA dubleksleri üretir. N. meningitidis RNA dubleksi, CRISPR tekrarının 3' ucuna ek olarak iki primer yerde işleniyor gözükmektedir ve bu da, matür crRNA'da bir uzun tekrar-kaynaklı kısma ve dubleksler içinde orta tümseğe rağmen stabil RNA:RNA etkileşimine yol açmaktadır. İlginçtir ki, F. Novicida'nın 15 tracrRNA:pre-crRNA dubleksi, düşük tamamlayıcılık bölgesinde yarılıyor gözükmektedir ve tracrRNA'nın elde edilen bol miktarda 5' uçlarının bazıları, onun, eşzamanlı crRNA kırılması olmaksızın ilaveten kırıldığını göstermektedir. Primer transkript boyutlarında ve işleme yerlerinin lokasyonunda farklar, ~65 ile 85 nt aralığında çeşitli 20 farklı uzunluklarda işlenmiş tracrRNA'lara yol açar. Baskın işlenmiş tracrRNA transkriptlerinin koordinatları ve büyüklükleri **Tablo 2** ve **Şekil 37**'de gösterilmektedir. tracrRNA ve crRNA'nın gözlemlenmiş işlenme paternleri, iki matürasyon olayı için daha önce önerilen modele oldukça uygundur. tracrRNA 5'-uçlarının ve crRNA 3'- 25 uçlarının bazılarının putatif ilave kırılması, ikinci matürasyon olayından kaynaklanabilir ya da alternatif olarak, cDNA kütüphanesi hazırlama ya da RNA sekanslama prosesinin bir artefaktı olabilir. Bu işleme olaylarının niteliği henüz detaylı araştırılmamıştır.

### tracrRNA ortologlarının sekansları çok çeşitlidir

Seçilen tracrRNA ortologlarının sekans benzerlikleri de tayin edildi. *S. pyogenes* (yalnızca 89 nt formu), *S. mutans*, *L. innocua* ve *N.*  
 5 *meningitidis* (yalnızca 110 nt formu), *S. thermophilus*, *P. multocida* ve  
*M. Mobile*'nin primer tracrRNA transkriptlerinin (**Tablo 2, Şekil 35**)  
 çoklu sekans hizalamalarını yaptık. tracrRNA sekanslarında yüksek  
 çeşitlilik gözlemledik, fakat yakın ilişkili CRISPR-Cas lokuslarından  
 elde edilen sekansların anlamlı ve önemli düzeyde korunduğunu  
 10 gördük. Eşli hizalamalara göre, *L. innocua*, *S. pyogenes*, *S. mutans* ve  
*S. thermophiles*'den elde edilen tracrRNA'ların hepsi ortalama %77  
 özdeşliğe sahiptir; *N. meningitidis* ve *P. Multocida*'dan elde edilen  
 tracrRNA'ların hepsi ise %82 özdeşliğe sahiptir. Analiz edilen  
 tracrRNA sekanslarının ortalama özdeşliği %56'dır ve bu oran,  
 15 rastgele RNA sekanslarının özdeşliğine denktir. Bu gözlem, yalnızca  
 yakın ilişkili lokuslar söz konusu olduğunda, sekans benzerliği  
 temelinde tracrRNA ortologları kestiriminin yapılabileceğini ilaveten  
 doğrular. Olası tracrRNA yapısı korumasını da araştırdık, fakat bir ko-  
 varyasyon ve korunan transkripsiyonel terminatör yapısı haricinde  
 20 anlamlı ve önemli herhangi bir benzerlik bulamadık (**Şekil 35**).

**Şekil 35**, tracrRNA ortologlarının sekans çeşitliliğini göstermektedir.  
 tracrRNA sekansı çoklu hizalaması. *S. thermophilus* ve *S.*  
*thermophilus2*, SEKANS KOD NO.: 41 ve SEKANS KOD NO.: 40  
 25 Cas9 ortologlarıyla ilişkilendirilen tracrRNA. Siyah, yüksek düzeyde  
 korunan; koyu gri, korunan; açık gri, zayıf korunan. Kestirilen  
 konsensüs yapısı, hizalamanın üstünde gösterilmektedir. Oklar,  
 nükleotid kovaryasyonlarına işaret etmektedir. *S. pyogenes* SF370, *S.*

mutans UA159, *L. innocua* Clip11262, *C. jejuni* NCTC 11168, *F. novicida* U112 ve *N. meningitidis* A Z2491 tracrRNA'ları, RNA sekanslama ve Northern blot analiziyle valide edilmiştir. *S. thermophiles* LMD-9 tracrRNA, Northern blot analiziyle valide edilmiştir. *P. multocida* Pm70 tracrRNA, CRISPR-Cas lokusunun *N. meningitidis* A Z2491 lokusuyla yüksek benzerliği baz alınarak kestirilmiştir. *M. mobile* 163K tracrRNA, transkripsiyonel promotör ve terminatöre ilişkin kuvvetli kestirimler baz alınarak in silico ortamda kestirilmiştir.

10

**Ornek 4: Gen Ekspresyonunun Sekans-Spesifik Kontrolü için CRISPR'nin İşlevinin bir RNA-yönlendirmeli Platform olarak Yeniden Belirlenmesi**

15 Tüm genomları kapsayan hedeflenen gen regülasyonu, sorgulayıcı, bozucu ve tasarlayıcı selüler sistemler için güçlü bir stratejidir. Buluş sahipleri, bir Tip II CRISPR sisteminden bir RNA-yönlendirmeli DNA endonükleaz olan Cas9'u baz alarak, gen ekspresyonun kontrolü için yeni bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu örnek, endonükleaz

20 aktivitesi bulunmayan katalitik olarak ölü bir Cas9'un, bir yönlendirici RNA'yla birlikte eksprese edildiğinde, transkripsiyonel uzama, RNA polimeraz bağlanması ya da transkripsiyon faktörü bağlanmasına spesifik olarak müdahale edebilecek bir DNA tanıma kompleksi oluşturduğunu gösterir. CRISPR enterferansı (CRISPRi) denilen bu

25 sistem, belirlenebilir herhangi bir hedef-harici etki oluşturmaksızın, *Escherichia coli*'de hedeflenen genlerin ekspresyonu etkin ve etkili biçimde baskılayabilir. CRISPRi, birden çok sayıda hedef geni eşzamanlı baskılamak için kullanılabilir ve etkileri tersine çevrilebilir

niteliktedir. Ek olarak, sistem, memeli hücrelerinde gen baskılanması için de adapte edilebilir. Bu RNA-yönlendirmeli DNA tanıma platformu, tüm genomları kapsayan bir ölçekte gen ekspresyonunu selektif biçimde bozmak için uygulanabilecek basit bir yaklaşım sunar.

## **MALZEMELER VE YONTEMLER**

### **Suşlar ve Vasatlar**

10

İn vivo floresans ölçümleri için konakçı suş olarak *Escherichia coli* K-12 suşu MG1655 kullanıldı. Sekanslama deneylerinin hepsi için, RpoC alt-biriminin C-terminal ucuna ekli bir 3x-FLAG epitop tagıyla bir RNAP varyantını endojen eksprese eden bir *E. coli* MG1655-  
15 kaynaklı suş kullanıldı. İn vivo floresans eseyleri için çoğalma vasatları olarak, EZ Rich Defined Media (EZ-RDM, Teknoka) kullanıldı. Genetik transformasyon ve transformasyonun doğrulaması, seçilebilir markerler olarak AmpR, CmR veya KanR genlerinin kullanılması suretiyle standart protokoller uygulanarak yapıldı.

20

### **Plazmid Oluşturma ve *E. coli* Genomu Klonlama**

Cas9 ve dCas9 genleri, sırasıyla daha önce tarif edilen pMJ806 ve pMJ841 vektörlerinden klonlandı. Genler, PCR yöntemiyle amplifiye edildi ve bir anhidrotetrasiklin (aTc)-indüklenebilir promotör PLtetO-  
25 1, bir kloramfenikol seçilebilir markeri ve bir p15A replikasyon kaynağı içeren bir vektör içine sokuldu. sgRNA şablonu, bir açılanmış transkripsiyon başlama yeri bulunan bir minimal sentetik

promotör (J23119), bir ampisilin seçilebilir markeri ve bir ColE1 replikasyon kaynağı içeren bir vektör içine klonlandı. Yeni 20-bp tamamlayıcı bölgelerle sgRNA kasetleri oluşturmak için ters PCR kullanıldı. Floresan raportör genleri *E. coli* genomları içine sokmak için, ilk önce, floresans gen, bir giriş vektörüne klonlandı ve daha sonra, PCR yöntemiyle amplifiye edilerek nsfA 5'/3' UTR sekansları, floresan gen ve bir KanR seçilebilir markeri içeren linearize DNA fragmanları oluşturuldu. *E. coli* MG1655 suşu,  $\lambda$ -Kırmızı rekombinasyon proteinleri (Ekso, Beta ve Gama) içeren sıcaklığa duyarlı bir plazmid pKD46 ile transforme edildi. Hücre kültürleri 30°C sıcaklıkta ~ 0,5 OD (600 nm) değerine kadar çoğaltıldı ve %0,2 arabinoz ilave edilerek  $\lambda$ -Kırmızı rekombinasyon proteinlerinin ekspresyonu 1 saat süreyle indüklendi. Hücreler 4°C sıcaklıkta hasat edildi ve elektroporasyon yoluyla linearize DNA fragmanlarının transformasyonu için kullanıldı. Doğru genom insersiyonlarını içeren hücreler, 50  $\mu$ g/mL Kanamisin kullanılarak seçildi.

### **Akış sitometrisi ve analiz**

Suşlar, 2 mL derin 96-kuyucuklu plakalarda (Costar 3960) 100  $\mu$ g/mL karbenisilin ve 34  $\mu$ g/mL kloramfenikol içeren EZ-RDM içinde 37°C sıcaklıkta ve 1200 devir/dakika hızda gece boyunca kültürlendi. Daha sonra, gece boyunca kültürlenmiş bu kültürden bir  $\mu$ L, dCas9 proteininin üretimini indüklemek için 2  $\mu$ M aTc eklenmiş aynı antibiyotik konsantrasyonlarına sahip 249  $\mu$ L taze EZ-RDM'ye ilave edildi. Hücreler mid-log faza kadar (~4 saat) çoğaltıldı; bir yüksek verimli numune alıcı donanımlı LSRII akış sitometresi (BD Biosciences) kullanılarak floresans protein seviyeleri tayin edildi. En



az 20.000 hücre toplanana kadar düşük akış hızıyla hücrelerden numuneler alındı. FCS Express (De Novo Yazılımı) kullanılarak, öne saçılma-yana saçılma grafiğinde %60 hücre popülasyonu içeren bir çokgensel bölgede kapılama yoluyla veriler analiz edildi. Her deney için, üç kopya kültürler ölçüldü ve bunların standart sapma değeri, hata çubuğu olarak gösterildi.

### **B-galaktosidaz eseyi**

- 10  $\beta$ -galaktosidaz eseyi gerçekleştirmek için, yukarıda tarif edildiği gibi hazırlanan gece boyunca bekletilmiş kültürden 1  $\mu$ L, 1 mM İzopropil  $\beta$ -D-1-tiyogalaktopiranozitin (IPTG) varlığında veya yokluğunda, 2  $\mu$ M aTc eklenmiş aynı antibiyotik konsantrasyonlarına sahip 249  $\mu$ L taze EZ-RDM'ye ilave edildi. Hücreler mid-log faza kadar çoğaltıldı.
- 15 Bu kültürün 100  $\mu$ L'sinin LacZ aktivitesi, talimatlara göre maya  $\beta$ -galaktosidaz esey kiti (Pierce) kullanılarak ölçüldü.

### **Total RNA'nın ekstraksiyonu ve saflaştırılması**

- 20 Her numune için, E. coli'nin bir monoklonal kültürü, 37°C sıcaklıkta 500 mL EZ-RDM içinde 0,1 OD (600 nm) değerinden erken log-faza (OD  $0,45 \pm 0,05$ ) kadar çoğaltıldı ve bu noktada, hücreler, 0,22  $\mu$ m nitroselülüz filtrelerde (GE) filtrasyon yoluyla hasat edildi ve tüm transkripsiyonel seyri eşzamanlı durdurmak için sıvı nitrojen içinde
- 25 donduruldu. Dondurulan hücreler (100  $\mu$ g), 10 mM MnCl<sub>2</sub> ve 15  $\mu$ M Tagetin transkripsiyonel inhibitörle (Epicentre) takviye edilmiş 500  $\mu$ L dondurulmuş lizis tamponu (20 mM Tris pH 8, %0,4 Triton X-100, %0,1 NP-40, 100 mM NH<sub>4</sub>Cl, 50 U/mL SUPERase•In (Ambion)

ve 1x proteaz inhibitör kokteylinin (Complete, EDTA-içermez, Roche) varlığında, bir Qiagen TissueLyser II mikser değirmende 15 Hz hızda 3 dakika süreyle 6 defa pulverize edildi.

- 5 Lizat, pipetlenerek buz üzerinde yeniden süspanse edildi. RQ1 DNase I (110 U total, Promega) ilave edildi ve buz üzerinde 20 dakika süreyle inkübe edildi. Reaksiyon, EDTA'yla (25 mM nihai konsantrasyon) söndürüldü ve lizat, 20.000 g hızda 10 dakika süreyle santrifüjlenerek 4°C sıcaklıkta berraklaştırıldı. Lizat, bir PD MiniTrap
- 10 G-25 kolona (GE Healthcare) yüklendi ve 1mM EDTA ilave edilmiş liziz tamponuyla elüe edildi.

#### **Total mRNA saflaştırma**

- 15 miRNeasy kiti (Qiagen) kullanılarak, berraklaştırılan lizattan total RNA saflaştırıldı. 20 µL 10 mM Tris pH 7 içinde 1 µg RNA, eşit hacimde 2x alkalın fragmentasyon çözeltisiyle (2 mM EDTA, 10 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 90 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 9.3) karıştırıldı ve 95°C sıcaklıkta ~25
- 20 dakika süreyle inkübe edilerek 30-100 nt aralığında büyüklükte fragmanlar oluşturuldu. Fragmentasyon reaksiyonu, 0,56 mL buz gibi soğuk çökeltme çözeltisi (300 mM NaOAc pH 5,5 artı GlycoBlue (Ambion)) ilave edilerek durduruldu ve bir standart izopropanol çökeltme tekniğiyle RNA saflaştırıldı. Fragmanlara ayrılan mRNA,
- 25 daha sonra, bir 50 µL reaksiyonda 1x PNK tamponu (ATP olmadan) artı 0,5 U SUPERase•In içinde 25 U T4 PNK'le (NEB) defosforile edildi ve standart izopropanol çökeltme yöntemleriyle GlycoBlue ile çökeltildi.

## **Nasent RNA saflaştırma**

Nasent RNA saflaştırma için, berraklaştırılan lizat, daha önce tarif edildiği gibi, 0,5 mL anti-FLAG M2 afinite jeline (Sigma Aldrich) ilave edildi. Afinite jeli, 1 mM EDTA ilave edilmiş liziz tamponuyla iki defa yıkandı ve ardından, nütasyonla 4°C sıcaklıkta 2,5 saat süreyle berraklaştırılan lizatla inkübe edildi. İmmünopresipitasyon, 300 mM KCl ilave edilmiş 4 x 10 ml liziz tamponuyla yıkandı ve bağlı RNAP, 1 mM EDTA ve 2 mg/mL 3x-FLAG peptidi (Sigma Aldrich) ilave edilmiş liziz tamponuyla iki defa elüe edildi. Nasent RNA, miRNeasy kiti (Qiagen) kullanılarak elüattan saflaştırıldı ve daha önce belirlenen bir kütüphane oluşturma protokolü kullanılarak DNA'ya dönüştürüldü.

## **15 DNA kütüphanesi hazırlama ve DNA sekanslama**

DNA kütüphanesi, bir Illumina HiSeq 2000'de sekanslandı. Okumalar, HTSeq Python paketi ve Python'da yazılmış başka özel yazılım kullanılarak işlendi. Sekanslanan transkriptin 3'-ucu, Bowtie ("bowtie-bio" ve ardından ".sourceforge.net") ve MochiView'de ("johnsonlab.ucsf" ve sonra ".edu/mochi.html") oluşturulan RNAP profilleri kullanılarak referans genoma hizalandı.

## **İnsan hücrelerinde CRISPRi için plazmid tasarımı ve yapımı**

25

Memeli kodon-optimize Streptococcus pyogenes Cas9'unu kodlayan sekans (DNA 2.0), üç C-terminal SV40 nükleer lokalizasyon sekanslarıyla (NLS) ya da iki NLS'ye komşu tagBFP'ye füzyonlandı.

Standart ligasyon bağımsız klonlama tekniğini kullanarak, MSCV-Puro'ya (Clontech) bu iki füzyon proteinini klonladık. Bir CMV promotöründen mCherry'yi birlikte eksprese eden ve pSico'dan türetilen bir lentiviral U6 bazlı ekspresyon vektörü kullanılarak  
5 yönlendirici sgRNA'lar eksprese edildi. Kaynaştırılan primerlerin BstXI ve XhoI ile sindirilen lentiviral U6 bazlı ekspresyon vektörüne insersiyonu yoluyla sgRNA ekspresyon plazmidleri klonlandı.

## 10 İnsan hücrelerinde CRISPRi için hücre kültürü, DNA transfeksiyonları ve floresans ölçümleri

HEK293 hücreleri, %10 FBS, 2mM glutamin, 100 birim/mL streptomisin ve 100µg/mL penisilin içinde Dulbecco modifiye eagle vasatında (DMEM) tutuldu. HEK293, standart protokoller kullanılarak  
15 MSCV retrovirüsü eksprese eden bir GFP'yle enfekte edildi ve stabil GFP ekspresyonu için bir BD FACS Aria2 kullanılarak akış sitometrisiyle ayrıldı. HEK293 hücreleri eksprese eden GFP, 0,5 µg dCas9 ekspresyon plazmidi ve 0,5 µg RNA ekspresyon plazmidi (Şekil 45B için 0,25 µg GFP raportör plazmidi) kullanılarak 24  
20 kuyucuklu plakalarda üreticilerin tavsiye ettiği protokole göre TransIT-LT1 transfeksiyon reaktifinin (Mirus) uygulanması suretiyle geçici transfekte edildi. Transfeksiyondan 72 saat sonra, hücreler, bir tekli hücre süspansiyonuna tripsinize edildi. U6 vektörü, bir mCherry genini yönlendiren bir konstitütif CMV promotörü içerir. GFP  
25 ekspresyonu, bir BD LSRII FACS makinesi kullanılarak, mCherry pozitif popülasyonlarda (negatif kontrol hücrelerine kıyasla >10-katı daha parlak mCherry) kapılama yoluyla analiz edildi.

### **Tasarlanan RNA'lar**

Şekillerde kullanılan sgRNA tasarımları: yalnızca 20 nükleotid eşleşme bölgesi (DNA hedefleyen segment) listelenmektedir (aksi belirtilmedikçe):

- 5
- Şekil 40C'de kullanılan mRFP-hedefleyen sgRNA'lar (SEKANS KOD NO.: 741-746);
- Şekil 40D'de kullanılan promotör-hedefleyen sgRNA'lar (SEKANS KOD NO.: 747-751);
- 10 Şekil 40D'de hedef promotör sekans (SEKANS KOD NO.: 752);
- Şekil 43B'de kullanılan mRFP-hedefleyen sgRNA'lar (SEKANS KOD NO.: 753-760);
- Şekil 42B'de kullanılan sfGFP-hedefleyen sgRNA (gfp) (SEKANS KOD NO.: 761);
- 15 Şekil 43B'de kullanılan sfGFP-hedefleyen sgRNA'lar (SEKANS KOD NO.: 762-769);
- Şekil 43F ve Şekil 51'de çift-sgRNA hedeflemesi deneyleri (SEKANS KOD NO.: 770-778);
- 20 Şekil 44B'de kullanılan lac operon-hedefleyen sgRNA'lar (SEKANS KOD NO.: 779-787) ve
- Şekil 45'te kullanılan EGFP-hedefleyen sgRNA'lar (SEKANS KOD NO.: 788-794).

25 **Tablo 3. Örnek 4'ün şekillerinde (yukarıda listelenmektedir) kullanılan sekanslar**

Sekans	SEKANS KOD NO.:	Sekans	SEKANS KOD NO.:	Sekans	SEKANS KOD NO.:
T1	741	R2	771	crp	783
T2	742	R3	772	cya	784
T3	743	R4	773	A site	785
NT1	744	R5	774	O site	786
NT2	745	R6	775	P site	787
NT3	746	R7	776	eT1	788
P1	747	R8	777	eT2	789
P2	748	R9	778	eNT1	790
P3	749	lacZ	779	eNT2	791
P4	750	lacI	780	eNT3	792
P5	751	lacY	781	eNT4	793
R1	770	lacA	782	eNT5	794

## SONUÇLAR

CRISPR (düzenli aralıklarla kümelenmiş kısa palindromik tekrarlar) sistemi, hedefli gen regülasyonu için yeni bir potansiyel platform sunar. Bakterilerin yaklaşık %40'ı ve arkelerin yaklaşık %90'ı, yabancı DNA elementlerine karşı direnç sağlanması için CRISPR/CRISPR-ilişkili (Cas) sistemlere sahiptirler. CRISPR sistemleri, yabancı DNA elementlerini sekans-spesifik bir şekilde hedeflemek ve yarmak için küçük baz-eşleştirme RNA'larından 5 10

istifade ederler. Farklı organizmalarda çeşitli CRISPR sistemleri vardır ve en basit olanlardan birisi, *Streptococcus pyogenes*'den elde

edilen tip II CRISPR sistemidir: Cas9 proteinini ve yabancı DNA'ların RNA yönlendirmesiyle susturulması için gerekli ve yeterli olan bir matür CRISPR RNA (crRNA) ve bir kısmen tamamlayıcı trans-etkili RNA (tracrRNA) olmak üzere iki RNA'yı kodlayan yalnızca tek bir gen (**Şekil 46**). crRNA matürasyonu, tracrRNA ve RNase III gerektirir. Bununla birlikte, bu gereksinim, tracrRNA-crRNA kompleksini taklit eden bir tasarlanmış saç tokası içeren bir tasarlanmış küçük yönlendirici RNA (sgRNA) kullanılarak baypas edilebilir. sgRNA ile hedef DNA arasında baz eşleşmesi, Cas9'un endonükleaz aktivitesi sebebiyle çift iplikçik kırıklarına (DSB'ler) sebep olur. Bağlanma spesifisitesi, hem sgRNA-DNA baz eşleşmesi hem de DNA tamamlayıcı bölgesiyle yan yana bulunan bir kısa DNA motifi (ön-aralığa komşu motif veya PAM, sekans: NGG) yoluyla tayin edilir. Sonuçta, CRISPR sistemi yalnızca iki molekül-Cas9 proteini ve sgRNA'dan oluşan bir minimal set gerektirir ve bundan dolayı, bir konakçı-bağımsız gen-hedefleyen platform olarak kullanılma potansiyeline sahiptir. Yer-selektif RNA-yönlendirmeli genom editleme için Cas9/CRISPR'den yararlanılabileceği gösterilmiştir.

20

**Şekil 46**, *S. pyogenes*'den elde edilen tip II CRISPR sisteminin mekanizmasını göstermektedir. Bu sistem, tekrar aralık sekanslarının bir dizisini içeren bir CRISPR lokusu ile CRISPR-ilişkili (Cas) proteinlerin oluşturduğu bir setten oluşur. Tekrarların hepsi aynıdır ve aralıkların hepsi farklıdır ve hedef DNA sekanslarını tamamlayıcı niteliktedir. Hücre, yabancı DNA elementleri tarafından enfekte edildiğinde, CRISPR lokusu, yarılarak daha küçük fragmanlara ayrılacak bir uzun prekürsör transkriptine transkribe edilecektir.

25

Yarılma olayına, bir trans-etkili antisens RNA (tracrRNA) ve konakçı RNase III aracılık eder. Yarılma olayından sonra, tek bir protein, yani Cas9, crRNA'nın yarılmış formunu tanır ve ona bağlanır. Cas9, crRNA'yı DNA'ya yönlendirir ve DNA molekülünü tarar. Kompleks, crRNA ile DNA hedefi arasında baz eşleşmesi yoluyla stabilize edilir. Bu durumda, Cas9, nükleaz aktivitesinden dolayı çift iplikçik DNA kırıklarına sebep olur. Bu genellikle kognat DNA moleküllerini ayırır ve hücreler, belirli DNA popülasyonlarına karşı bağışıklık kazandırır.

- 10 **Şekil 39**, CRISPR enterferans (CRISPRi) sisteminin tasarımı gösterir. (A) Minimal enterferans sistemi, bir tekli protein ve bir tasarlanmış sgRNA kimerasından oluşur. sgRNA kimerası üç domainden (kutu içinde verilen bölge) oluşur: *S. pyogenes*'den elde edilen bir 40-nt transkripsiyon terminatörü, spesifik DNA bağlanması için bir 20-nt tamamlayıcı bölge ve Cas9 bağlanması için bir 42-nt saç tokası (Cas9 sapı). Yabani tip Cas9 proteini, nükleaz aktivitesi içerir. dCas9 proteini, nükleaz aktivitesi açısından kusurludur. (B) Yabani tip Cas9 proteini, sgRNA'ya bağlanır ve bir protein-RNA kompleksi oluşturur. Kompleks, sgRNA ile DNA hedefi arasında Watson-Crick baz eşleşmesi yoluyla spesifik DNA hedeflerine bağlanır. Yabani tip Cas9 söz konusu olduğunda, DNA, Cas9 proteininin nükleaz aktivitesi sebebiyle yarılacaktır. Nükleaz kusurlu Cas9 söz konusu olduğunda, kompleks, uygun transkripsiyonu aksatır.
- 25 **Bir minimal CRISPRi sistemi, tek bir protein ve RNA'Dan oluşur ve transkripsiyon başlama ve uzama başmaklarını etkili biçimde susturabilir**



E. coli’de böyle bir CRISPRi platformunu uygulamak için, yabancı tip S. pyogenes Cas9 geni ve bir sgRNA, bakteriyel vektörlerden eksprese edilerek sistemin bir hedeflenen lokusta gen ekspresyonunu bozup bozmadığı tayin edildi (Şekil 40A). S. pyogenes CRISPR sistemi, nativ E. coli sistemine ortogonaldır. Cas9 proteini, bir p15A replikasyon kaynağı içeren bir plazmid üzerinde bir anhidrotetrasiklin (aTc)-indüklenebilir promotörden eksprese edilir ve sgRNA, bir ColE1 replikasyon kaynağı içeren bir plazmid üzerinde bir minimal konstitütif promotörden eksprese edilir. Bir alternatif strateji olarak, DNA yarılmaması açısından kusurlu bir katalitik olarak ölü Cas9 mutanlığı (dCas9) kullanıldı ve Cas9’un bu formunun hâlâ basit bir RNA-yönlendirmeli DNA bağlama kompleksi olarak işlev gördüğü gösterildi.

**Şekil 40,** CRISPRi’nin transkripsiyon uzama ve başlama basamağını etkili biçimde susturduğunu göstermektedir. (A) CRISPRi sistemi, bir indüklenebilir Cas9 proteini ve bir tasarlanmış sgRNA kimerasından oluşur. dCas9, RuvC1 ve HNH nükleaz domainlerinin mutasyonlarını içerir. sgRNA kimerası, Şekil 1’de tarif edildiği gibi üç fonksiyonel domain içerir. (B) Tasarlanan sgRNA (NT1) ve DNA hedefinin sekansı. NT1, mRFP kodlayan bölgenin şablon-dışı DNA iplikçliğini hedef alır. Yalnızca baz eşleşmesi motifini çevreleyen bölge (20-nt) gösterilmektedir. Baz-eşleştirme nükleotidleri numaralandırılır ve dCas9-bağlanımlı saç tokasının üzeri çizilir. PAM sekansının altı çizilir. (C) CRISPRi, transkripsiyon uzamasını iplikçik-spesifik bir şekilde bloke etti. Bir mRFP-kodlayan gen içeren bir sentetik floresans-bazlı raportör sistem, E. coli MG1655 genomu (nsfA lokusu) içine sokuldu. Şablon DNA iplikçicine ya da şablon-dışı DNA

iplikçesine bağlanan altı sgRNA, dCas9 proteiniyle birlikte eksprese edildi; hedef mRFP üzerinde etkileri in-vivo floresans eseyiyle ölçüldü. Yalnızca şablon-dışı DNA iplikçesine bağlanan sgRNA'lar, susturma ( $10^3 \sim 300$ -katı) gösterdi. Kontrol, dCas9 proteini bulunan, fakat sgRNA bulunmayan hücrelerin floresansını göstermektedir. (D) CRISPRi, transkripsiyon başlatma basamağını bloke etti. E. coli promotörü (J23119) etrafındaki farklı bölgelere bağlanması için beş sgRNA tasarlandı. Transkripsiyon başlama yeri, +1 olarak etiketlendi. Kesikli oval, -55 ile +20 aralığında 75-bp bölgeyi kapsayan başlangıç RNAP kompleksini göstermektedir. Yalnızca başlangıç RNAP kompleksi içindeki sgRNA'lar hedefleme bölgeleri baskılama gösterdi (P1-P4). Transkripsiyon uzama basamağının blokaından farklı olarak, susturma, hedeflenen DNA iplikçesinden bağımsızdı. (E) CRISPRi regülasyonu tersine çevrilebilir niteliktedir. Hem dCas9 hem de sgRNA (NT1), bir aTc-indüklenebilir promotörünün kontrolü altındaydı. Hücre kültürü, eksponansiyel faz esnasında korundu ve sürdürüldü. T = 0 zaman noktasında, 1  $\mu$ M aTc, OD = 0,001 değeriyle hücrelere ilave edildi. Hedef mRFP'nin baskılanması işlemi 10 dakika içinde başladı. Floresans sinyali, hücre çoğalmasına uygun bir şekilde zayıfladı; bu, zayıflamanın hücre bölünmesinden kaynaklandığına işaret etmektedir. 240. dakikada, floresans tamamen baskılanmış seviyeye ulaştı. T = 370 dakika zaman noktasında, aTc, çoğalma vasatından yıkanarak temizlendi ve hücreler, yeniden OD = 0,001 değerine kadar seyreltildi. Floresans 50 dakika sonra artmaya başladı ve pozitif kontrolle aynı seviyeye kadar yükselmesi yaklaşık 300 dakika sürdü. Pozitif kontrol: her zaman indükleyici yokluğunda; negatif kontrol: her zaman 1  $\mu$ M aTc indükleyici varlığında. 2C, 2D ve 2E'de gösterilen floresans sonuçları,

en az üç biyolojik replikanın ortama ve SEM değerlerini temsil etmektedir. Şekil 47 ve Şekil 48'e de bakınız.

Cas9'la birlikte eksprese edilen sgRNA moleküllerinin her biri üç segmentten oluşur: *S. pyogenes*'den elde edilen bir 40-nt transkripsiyon terminatörü, bir 20-nükleotidli (nt) hedef-spesifik tamamlayıcı bölge ve bir 42-nt Cas9 bağlanımı saç tokası (Cas9 sapı) (Şekil 40B). Bir kırmızı floresan protein (mRFP)-bazlı raportör sistem, *E. coli* MG1655 genomu içine sokuldu.

10

Yabani tip Cas9 proteini ve mRFP kodlama sekansını hedefleyen bir sgRNA'nın (NT1) birlikte ekspresyonu, muhtemelen genomda Cas9-indüklü çift iplikçik kırıkları sebebiyle transformasyon etkinliğini belirgin düzeyde azalttı (Şekil 47A). Hayatta kalan birkaç koloninin sekanslaması, bunların hepsinin genom üzerinde hedef mRFP yeri etrafında sekans yeniden düzenlemelerine sahip olduğunu gösterdi; bu bulgu, yabani tip Cas9'un ve bir konakçı sekansını hedefleyen bir sgRNA'nın ekspresyonuna karşı kuvvetli seçim prosedürünün uygulandığına işaret eder. RuvC1 ve HNH nükleaz domainlerinin iki susturma mutasyonunu (D10A ve H841A) içeren dCas9 mutant geni (yarma olayı gerçekleştirilmeyen), transformasyon etkinliğiyle ve *E. coli* çoğalma hızıyla doğrulandığı gibi, bu letaliteyi azalttı (Şekil 47A&B).

25

**Şekil 47**, Şekil 40'la bağlantılıdır ve dCas9 ve sgRNA'yla birlikte transforme edilmiş *E. coli* hücre kültürlerinin çoğalma eğrilerini göstermektedir. (A) *E. coli* hücrelerini iki plazmidle transforme etmek için transformasyon etkinliği. Bir plazmid, mRFP'nin bir genomik

kopyasını hedefleyen bir sgRNA içerir; diğer plazmid ise yabancı tip Cas9 ya da dCas9 içerir. Yabancı tip Cas9 ve sgRNA'nın birlikte transformasyonu yüksek düzeyde toksiktir; bu toksisite, dCas9 kullanılarak azaltılabilir. (B) sgRNA (NT1), mRFP kodlama sekansını hedef alacak şekilde tasarlanır. dCas9 ve sgRNA'nın birlikte ekspresyonu, hücre çoğalma hızı üzerinde hemen hemen hiç etki göstermez; bu bulgu, DNA'yla dCas9-sgRNA etkileşiminin RNA polimerazı bloke etmek için yeterince kuvvetli olduğuna, fakat DNA polimerazı veya hücre replikasyonunu bloke etmek için olmadığına işaret eder. Sonuçlar, en az üç bağımsız deneyin ortalama ve SEM değerlerini temsil etmektedir.

dCas9:sgRNA kompleksinin gen ekspresyonunun oldukça etkili biçimde baskılanmasını sağlayıp sağlayamadığını test etmek için, şablon DNA iplikçisine ya da şablon-dışı DNA iplikçisine bağlanan, mRFP kodlama sekansının farklı bölgelerini tamamlayıcı nitelikte sgRNA'lar tasarlandı. Elde edilen sonuçlar, şablon-dışı DNA iplikçisini hedefleyen sgRNA'ların etkili gen susturması (baskılamanın 10 ilâ 300-katı) gösterdiğini, şablon iplikçisi hedef alanların ise çok az etki gösterdiğini ortaya koydu (Şekil 40C). bu sistem, E. coli genomu içinde ya da bir yüksek kopya sayısına sahip plazmidde bulunan genler için benzer baskılama etkileri gösterdi (Şekil 48). Ek olarak, promotör bölgeyi hedefleme, etkili gen susturmasına da yol açtı (Şekil 40D). sgRNA'nın -35 kutucuğuna yönlendirilmesi, gen ekspresyonunu anlamlı ve önemli düzeyde ortadan kaldırdı (P1, baskılamanın ~100-katı); başka komşu bölgelerin hedeflenmesi ise bir azalmış etki gösterdi (P2-P4). Promotörün yaklaşık 100-bp upstream kısmında yer alan hedefleme

sekansları herhangi bir etki göstermedi (P5). Kodlama sekansının hedeflenmesinden farklı olarak, promotör hedeflendiğinde, susturma etkinliği, DNA iplikçığinden bağımsız olur; şablon iplikçiklerin veya şablon-dışı iplikçiklerin hedeflenmesi eşit düzeyde etkilidir (P2 ve 5 P3).

**Şekil 48**, Şekil 40C'yle bağlantılı ve CRISPRi'nin çok kopyalı plazmidde bir raportör genin ekspresyonunu susturabildiğini göstermektedir. mRFP geni, bir p15A plazmidine klonlanmıştır. 10 dCas9 ve bir mRFP-spesifik sgRNA'nın (NT1) varlığı, mRFP'yi kuvvetli düzeyde (~300-kat) baskılar. Baskılama etkisi, genomda mRFP kullanılarak gözlemlenene benzerdir (Şekil 40C). Susturma basamağı, yalnızca, sgRNA, şablon DNA iplikçığı üzerinde değil de, yalnızca şablon-dışı DNA iplikçığı üzerinde işlev gördüğünde etkin ve 15 etkili olur (T1). Ayrıca, bir GFP-spesifik 3 sgRNA (gfp), mRFP ekspresyonu üzerinde herhangi bir etki göstermediğinden dolayı, susturma yüksek düzeyde spesifiktir. Floresans sonuçları, en az üç biyolojik replikanın ortama ve SEM değerlerini temsil etmektedir.

## 20 **CRISPRi gen knockdown'u indüklenebilir ve tersine çevrilebilir niteliktedir**

Gen knockout yöntemlerinden farklı olarak, gen ekspresyonunun CRISPRi-bazlı knockdown yöntemini kullanmanın bir avantajı, bu 25 bozulmanın tersine çevrilebilir nitelikte olmasının gerekmesidir. CRISPRi regülasyonunun indüklenip, ardından da tersine çevrilip çevrilemeyeceğini test etmek için, hem dCas9 hem de mRFP-spesifik sgRNA (NT1), aTc-indüklenebilir promotör kontrolü altına konuldu

ve indükleyicilere cevap olarak mRFP'nin CRISPRi-aracılı regülasyonunun zamana göre seyrine ilişkin ölçümler yapıldı (Şekil 40E). Sıfır zaman noktasında, indükleyiciler olmadan erken eksponansiyel faza kadar çoğalan hücre kültürü, 1  $\mu$ M aTc'yle takviye edildi. Veriler, sistemin indükleyicilerin varlığına hızla cevap verebildiğini - floresan raportör protein sinyalinin, indükleyici molekül ilave edildikten sonra 10 dakika içinde azalmaya başladığını gösterdi. mRFP proteini stabil olduğundan dolayı, floresan sinyali azalmasının hızı, hücre iki katına çıkma süresinin benzer olmasıyla ve floresan yarı-ömrünün azalmasıyla (her ikisi de ~36 dakika) gösterildiği gibi, hücre çoğalması sebebiyle protein seyrelmesiyle sınırlandırılır. 240. dakikada, hücrelerin hepsi, negatif kontrolle aynı seviyeye kadar üniform biçimde baskılanmıştır. 420 dakika zaman noktasında, indükleyici, çoğalma vasatlarından yıkanarak ayrıldı ve hücreler, yeniden daha düşük bir OD değerine seyreltildi. 50 dakika gecikmenin ardından, mRFP floresansı artmaya başladı. Tek hücre floresansının pozitif kontrolle aynı seviyeye kadar yükselmesi toplam 300 dakika sürdü. 50 dakika gecikme, çok büyük olasılıkla, hücre çoğalması ve bölünmesiyle seyreltme yoluyla dCas9/sgRNA turnover hızında düşüş olmasıyla tayin edilir. Özetle, bu sonuçlar, dCas9-sgRNA'nın suskunlaştırma etkilerinin indüklenebileceğini ve tersine çevrilebileceğini gösterir.

### **Nativ uzayan transkript sekanslama (NET-Seq), CRISPRi'nin transkripsiyonu bloke ederek işlev gördüğünü teyit eder**

dCas9, transkripsiyon uzaması esnasında RNA polimeraz (RNAP) bağlanmasını bloke edebilen bir RNA-yönlendirmeli DNA bağlanım

kompleksi olarak işlev görüyor gözükmektedir. Şablon-dışı DNA iplikçiği, transkribe mRNA'yla aynı sekans özdeşliğine sahip olduğundan ve yalnızca şablon-dışı DNA iplikçiğine bağlanan sgRNA'lar susturma gösterdiğinden dolayı, dCas9:sgRNA

5 kompleksinin mRNA'yla etkileşime girmesi ve onun translasyonunu veya stabilitesini değiştirmesi bir olasılık olarak kaldı. Bu olasılıklar arasında ayırım yapmak için, *E. coli*'ye, güncel tanımlanmış nativ uzayan transkript sekanslama (NET-seq) yaklaşımı uygulandı; bu yaklaşım, uzayan RNA polimerazların pozisyonlarını global

10 profillemek ve dCas9:sgRNA kompleksinin transkripsiyon üzerindeki etkisini izlemek için kullanılabilirdi. Bu NET-seq yönteminde, CRISPRi sistemi, bir FLAG-taglı RNAP içeren bir *E. coli* MG1655-kaynaklı suşa transforme edildi. CRISPRi, mRFP kodlama bölgesine bağlanan bir sgRNA (NT1) içeriyordu. Taglı RNAP'nın in vitro

15 immüno-saflaştırılması ve ardından, uzayan RNAP'lerle ilişkilendirilen nasent transkriptlerin sekanslanması, RNAP durdurma yerlerini ayırt etmeye olanak sağladı.

Bu deneyler, sgRNA'nın sgRNA hedef lokusunun upstream kısmında

20 kuvvetli transkripsiyonel durmayı indüklediğini gösterdi (Şekil 41 A). Durma yeri ile hedef yer arasındaki mesafe 19-bp'dir; bu mesafe, daha önce rapor edilen RNAP'nin nükleotid katılım pozisyonu ile onun ön kenarı arasındaki ~18-bp mesafeyle oldukça uyumludur. Bu bulgu, transkripsiyon blokajının uzayan RNAP ile dCas9:sgRNA kompleksi

25 arasındaki fiziksel çarpışmadan kaynaklandığı bir CRISPRi mekanizmasıyla uyumludur (Şekil 41B). dCas9:sgRNA kompleksinin şablon iplikçiğe bağlanmasının baskılayıcı etkisi çok azdı; bu, RNAP'nin kompleksi bu belirli oryantasyonda okuyabildiğini

göstermektedir. Bu durumda, sgRNA, RNAP'yle karşı karşıya gelir ve RNAP'nin helikaz aktivitesi, onun fermuarını açabilir. Bu deneyler, CRISPRi'nin transkripsiyonu doğrudan bloke etmek için RNA'lardan faydalandığını göstermiştir. Bu mekanizma, gen ekspresyonu knockdown'unun, zaten transkribe edilmiş haberci RNA'ların translasyonlarından önce yıkımlarını gerektirdiği RNAi'nin mekanizmasından farklıdır.

**Şekil 41**, CRISPRi'nin transkripsiyon uzamasını bloke ederek işlev gördüğünü göstermektedir. (A) FLAG-taglı RNAP molekülleri immünopresipitasyona tâbi tutuldu ve ilişkili nasent mRNA transkriptleri sekanslandı. Üst panel, sgRNA içermeyen hücrelerde nasent mRFP transkriptinin sekanslama sonuçlarını göstermektedir; alt panel ise sgRNA'lı hücrelerde sonuçları göstermektedir. sgRNA varlığında, hedef yerin 19-bp upstream kısmında güçlü bir transkripsiyonel durma gözlemlendi ve bunun ardından, sekanslama okumalarının sayısı hızla düştü. (B) RNAP ile dCas9-sgRNA arasındaki fiziksel çarpışma bazında önerilen CRISPRi mekanizması. RNAP'nin merkezinden onun ön kenarına kadar olan mesafe ~19 bp'dir; bu mesafe, transkripsiyon durma yeri ile sgRNA baz eşleşme bölgesinin 3' ucu arasında ölçtüğümüz mesafeye çok uygundur. Durdurulan RNAP, dCas9-sgRNA bariyeriyle karşılaştıktan sonra transkripsiyon uzamasını sona erdirir.

**25 CRISPRi sgRNA-yönlendirmeli gen susturma yüksek düzeyde spesifiktir**

Tüm genomları kapsayan bir ölçekte CRISPRi'nin spesifitesini değerlendirmek için, sgRNA'nin birlikte ekspresyonunun varlığında



ve yokluğunda dCas9-transforme hücrelerin tam transkriptom shotgun sekanslaması (RNA-seq) yapıldı (Şekil 42A). mRFP'ye yönlendirilen sgRNA (NT1) varlığında, mRFP transkripti, bollukta bir düşüş gösteren tek geni. Başka hiçbir gen, sekanslama hataları dahilinde, 5 sgRNA ilavesinden sonra ekspresyonda anlamlı ve önemli değişiklik göstermedi. Farklı genleri hedef alan farklı sgRNA'lar bulunan hücrelerde de RNA-seq gerçekleştirdik. Bu çalışmaların hiçbirisi, hedeflenen genden başka genlerde anlamlı ve önemli değişiklikler göstermedi (Şekil 49). Sonuçta, sgRNA-yönlendirmeli gen 10 hedeflemesi ve düzenlemesi yüksek düzeyde spesifiktir ve anlamlı ve önemli hedef-dışı etkileri yoktur.

**Şekil 42,** CRISPRi sisteminin hedefleme spesifitesini göstermektedir. (A) Genom-ölçekli mRNA sekanslama (RNA-seq), 15 CRISPRi hedeflemesinin hedef-dışı etkilerinin olmadığını teyit etmiştir. mRFP kodlama bölgesine bağlanan sgRNA NT1 kullanıldı. dCas9, mRFP ve sfGFP genleri karartılmıştır. (B) Çoklu sgRNA'lar, yanı hücrede iki floresan protein raportörünü bağımsız şekilde susturabilir. Her bir sgRNA, başka geni değil de, kendi kognat genini 20 spesifik olarak baskıladı. Her iki sgRNA da mevcut olduğunda, her iki gen de susturuldu. Hata çubukları, en az üç biyolojik replikadan elde edilen SEM değerini temsil etmektedir. (C) İki floresan proteini kontrol etmek için iki sgRNA kullanımına ilişkin mikroskopik görüntüler. Ust panel, E. coli hücrelerinin parlak-alan görüntülerini 25 göstermektedir; orta panel, RFP kanalını göstermektedir; alt panel ise GFP panelini göstermektedir. Bir sgRNA ve dCas9'un birlikte ekspresyonu yalnızca kognat floresan proteini susturur, başka proteini susturmaz. Belirli floresan proteini susturulmuş olan hücrelerden

hemen hemen hiç floresans gözlemlenmediğinden dolayı, knockdown etkisi kuvvetliydi. Ölçek çubuğu, 10 µm. Kontrol, herhangi bir floresan protein rapörtörü olmadan hücreleri göstermektedir. Floresans sonuçları, en az üç biyolojik replikanın ortama ve SEM değerlerini temsil etmektedir. Şekil 49'a da bakınız.

**Şekil 49**, Şekil 42A'yla bağlantılıdır ve farklı genleri hedef alan sgRNA'lar bulunan hücrelerin RNA-seq verilerini göstermektedir. (A) E. coli'de endojen lacI geninin promotörünü hedefleyen sgRNA (+/-). Şekil 44A'dakiyle aynı lacI'yi-hedefleyen sgRNA kullanıldı. (B) Otomatik inhibe edilmiş sgRNA bulunmayan hücreler için 1 mM IPTG (+/-) (sgRNA, kendi promotörünü baskılar). (C) E. coli'de endojen lacZ genini hedefleyen sgRNA (+/-). Şekil 44A'dakiyle aynı lacZ'yi-hedefleyen sgRNA kullanıldı. lacZ-hedefleyen sgRNA bulunan hücrelere 1 mM IPTG de ilave edildi.

### **CRISPRi, çoklu genleri eşzamanlı düzenlemek için kullanılabilir**

CRISPRi sistemi, çoklu genlerin çaraz-karışma olmaksızın birbirlerinden bağımsız şekilde kontrolüne olanak sağlayabilir. mRFP ve sfGFP'yi baz alan bir çift-renkli floresan-rapörtör sistem planlandı. Her gen için ayrı tamamlayıcı bölgeleri bulunan iki sgRNA tasarlandı. Her bir sgRNA'nın ekspresyonu yalnızca kognat geni susturdu, başka gen üzerinde herhangi bir etki yapmadı. İki sgRNA'nın birlikte ekspresyonu her iki genin knockdown'una yol açtı (Şekil 42B&C). Bu sonuçlar, sgRNA-yönlendirmeli hedeflemenin spesifik olduğunu göstermektedir; spesifite, onun sekans özdeşliğiyle dikte edilmekte ve başka sgRNA'ların varlığından etkilenmemektedir. Bu davranış,

birden çok genin eşzamanlı olarak CRISPRi tarafından çoklu kontrolünü sağlamalıdır.

### **CRISPRi susturma etkinliğini belirleyen faktörler**

5

CRISPRi hedefleme etkinliğinin determinantlarını bulmak için, uzunluk, sekans tamamlayıcılığı ve pozisyonun susturma etkinliği üzerindeki rolü araştırıldı (Şekil 43A). Şekil 40C’de gösterildiği gibi, gen boyunca sgRNA hedef sekansının lokasyonu etkinlik açısından önemliydi. sgRNA’lar, hem mRFP hem de sfGFP için kodlama bölgelerinin tam boyunu kapsayacak şekilde de tasarlandı (sgRNA sekanslarına ilişkin Ek Veriler). Her durumda, baskılama etkisi, transkripsiyon başlama yerinden hedefin mesafesiyle ters bağıntılıydı (Şekil 43B). mRFP için daha kuvvetli bir doğrusal korelasyon gözlemlendi. Hedef olarak sfGFP kullanıldığında, benzer, fakat biraz daha zayıf korelasyon gözlemlendi; bu, muhtemelen, bu genin uzama sürecinde farklı zaman noktaları esnasında RNA polimerazın kinetiklerinin farklı olduğuna işaret etmektedir.

20

sgRNA, hedefi tamamlayıcı nitelikte bir 20-bp bölge içerir. Bu baz eşleşmesi bölgesinin önemini belirlemek için, sgRNA NT1 uzunluğu değiştirildi (Şekil 43C). Bölgenin 5’ ucundan uzaması susturma prosesini etkilemezken, bölgelerin kesilmesi, baskılama etkisini keskin biçimde azalttı. Gen susturma için gereken baz eşleşmesi bölgesinin minimal uzunluğu 12bp’ydi ve ilave kesme işlemi, fonksiyonun tamamen kaybolmasına neden oldu. sgRNA NT1’in baz eşleşmesi bölgesine tekli mutasyonlar sokuldu ve susturma üzerindeki genel etki test edildi. Bu sonuçlar temelinde, her biri genel bağlama ve

25

susturma basamakları üzerinde ayrı bir role sahip olan üç alt-bölge bulunabilir (Şekil 43D). İlk 7 nükleotidin herhangi bir tekli mutasyonu, baskılamayı belirgin düzeyde azalttı; bu bulgu, daha önce tip I ve tip II CRISPR sistemleri için de belirtildiği gibi, bu sekansın

5 bağlanma için bir "tohum bölgesi" oluşturduğuna işaret etmektedir. Komşu nükleotidler de eşler halinde mutasyona uğratıldı (Şekil 43E ve Şekil 50). Çoğu durumda, bir ikili mutasyondan kaynaklanan bağıl baskılama aktivitesi, tekli mutantların etkilerine kıyasla multiplikatifdir; bu, yanlış eşleşmeler arasındaki bir bağımsız ilişkiye

10 işaret etmektedir. Ek olarak, PAM sekansının önemine ilişkin daha önce elde edilen sonuçlara uygun olarak, bir yanlış PAM, bir 20-bp mükemmel bağlanma bölgesiyle bile susturma basamağını tamamen ortadan kaldırdı (Şekil 43E). Sonuçta, CRISPRi sisteminin spesifitesini, özgün hedef yerler için bakteriyel genomların çoğunu

15 kapsayacak kadar büyük boşluğa sahip olan en azından bir 12-bp sgRNA-DNA kesiti ve PAM (2-bp) ortaklaşa tayin ederler.

Her ikisi de aynı geni hedef alan iki sgRNA test edildi (Şekil 43F ve Şekil 51). Çoklu sgRNA'ların bağıl pozisyonuna bağlı olarak, ayrı

20 kombinasyonel etkiler gözlemlendi. Her biri yaklaşık 300-kat baskılama etkisine sahip iki sgRNA'nın kombine edilmesi, genel susturma etkisinin bin kata kadar artırılmasına olanak sağladı. Daha zayıf (~5-kat) iki sgRNA'nın kombine edilmesi, birlikte

25 hedefleri örtüşen iki sgRNA kullanıldığında, süpresif kombinasyonel etkiler gözlemlendi. Bu, muhtemelen, her iki sgRNA'nın aynı bölgeye bağlanmak için rekabet etmesinden kaynaklanmaktaydı.

**Şekil 43**, susturma etkinliğini etkileyen faktörlerin karakterizasyonunu göstermektedir. (A) Aynı gen üzerinde farklı hedefleme lokuslarına sahip sgRNA'ların (translasyon başlama kodonundan mesafe) ve aynı hedef lokusa baş eşleşmesi bölgesinin uzunlukları farklı olan (NT1

5 bazında) sgRNA'ların susturma etkileri ölçüldü. (B) Susturma etkinliği, translasyon başlama kodonundan hedefin mesafesiyle ters bağıntılıydı (turuncu - mRFP & yeşil - sfGFP). Her bir sgRNA'nın baskılama etkisi en yüksek baskılama misli değişikliğine sahip sgRNA'ninkine normalize edilerek bağıl baskılama aktivitesi

10 hesaplandı. Hata çubukları, üç biyolojik replikadan elde edilen SEM değerini temsil etmektedir. (C) sgRNA ile DNA hedefi arasında Watson-Crick baz eşleşmesi bölgesinin uzunluğu, baskılama etkinliğini etkiler. Baz eşleşmesi bölgesi uzamalarının hepsi, kuvvetli susturma etkisi gösterdi ve kesikler, baskılama etkisini belirgin

15 düzeyde azalttı. Belirlenebilir baskılama için baz eşleşmesi bölgesinin minimum uzunluğu 12-bp'dir. Hata çubukları, üç biyolojik replikadan elde edilen SEM değerini temsil etmektedir. (D) sgRNA'da her nükleotide tekli yanlış eşleşmeler sokuldu (NT1, Şekil 40B) ve bu yanlış eşleşmelerin baskılama etkinliğini nasıl etkilediği ölçüldü.

20 Genel susturma etkisi için önemli farklı olan üç alt-bölge bulunabilir. Bunlar bir basamak fonksiyonu görmektedirler. İlk 7-nükleotidli bölge, susturma etkisi için kritik nitelikteydi ve muhtemelen, DNA hedefine bağlanan sgRNA'ları problamak için bir "tohum" bölgesi oluşturmaktaydı. PAM sekansı (NGG), susturma için zorunluydu.

25 Hata çubukları, üç biyolojik replikadan elde edilen SEM değerini temsil etmektedir. (E) Komşu ikili yanlış eşleştirilmiş sgRNA'ların susturma etkileri. Tekli yanlış eşleştirilmiş sgRNA'ların bağıl baskılama aktivitesi, altta etiketlenmiş yanlış eşleşme pozisyonuyla

gösterilmektedir. İkili yanlış eşleştirilmiş sgRNA'ların deneysel ölçülen aktivitesi gösterilmektedir. İki adet tekli yanlış eşleştirilmiş sgRNA'nın etkileri çarpılarak hesaplanan aktivite beyaz renkte gösterilmekte ve "Com." olarak etiketlenmektedir. Çoğu durumda, bir

5 ikili yanlış eşleştirilmiş sgRNA'nın susturulması aktivitesi, basitçe, tekli yanlış eşleştirilmiş sgRNA'ların aktivitelerinin (Şekil 50B hariç) çarpımıydı; bu, tekli yanlış eşleşmeler arasında bir bağımsız ilişkiye işaret eder. Hata çubukları, üç biyolojik replikadan elde edilen SEM değerini temsil etmektedir. (F) Bir tekli mRFP genini hedeflemek için

10 için ikili sgRNA'ların kullanılmasının kombinasyonel susturma etkileri. Aynı geni hedefleyen iki sgRNA kullanıldığında, genel knockdown etkisi, hemen hemen 1.000-kata kadar arttırılabilir. İki sgRNA'nın aynı genin çakışmayan sekanslarına bağlandığı durumlarda, baskılama etkisi arttırıldı. İki sgRNA'nın çakışan

15 bölgeleri hedeflediği durumlarda, baskılama etkisi süprese edildi. Hata çubukları, üç biyolojik replikadan elde edilen SEM değerini temsil etmektedir.

**Şekil 50**, Şekil 43E'yle bağlantılıdır ve komşu ikili yanlış eşleşmelere

20 sahip sgRNA'ların susturma etkilerini göstermektedir. Tekli yanlış eşleştirilmiş sgRNA'ların bağıl baskılama aktivitesi, altta etiketlenen yanlış eşleşme pozisyonuyla gösterilmektedir. İkili yanlış eşleşmiş sgRNA'ların deneysel olarak ölçülen aktivitesi de gösterilmektedir. İki adet tekli yanlış eşleştirilmiş sgRNA'nın etkileri çarpılarak

25 hesaplanan aktivite, beyaz renkte gösterilmekte ve "Com." olarak etiketlenmektedir. Floresans sonuçları, üç biyolojik replikanın ortama ve SEM değerlerini temsil etmektedir.

**Şekil 51**, Şekil 43F'yle bağlantılıdır ve bir tekli geni düzenlemek için iki sgRNA'nın kullanılmasının kombinasyonel susturma etkilerini göstermektedir. Her durumda, çakışmayan sgRNA'lar, artırıcı susturma etkileri gösterdi ve çakışan sgRNA'lar, süpresif etkiler gösterdi. Kombinasyonel etki, sgRNA'nın şablon DNA iplikçiklerini mi, yoksa şablon-dışı DNA iplikçiklerini mi hedef aldığından bağımsızdı. Floresans sonuçları, üç biyolojik replikanın ortama ve SEM değerlerini temsil etmektedir.

## 10 **CRISPRi gen knockdown'ı kullanılarak bir endojen düzenleyici ağın sorgulanması**

CRISPRi sistemi, daha sonra, endojen gen ağlarını sorgulamak için bir gen knockdown platformu olarak kullanıldı. Mikrobiyal gen ağlarını sorgulamak için daha önce uygulanan yöntemler, çoğunlukla zahmetli ve maliyetli genomik mühendislik ve knockout prosedürlerine dayanıyordu. Bunun aksine, CRISPRi'yle gen knockdown'u yalnızca istenen genleri 20-bp tamamlayıcı bölgesi bulunan küçük bir sgRNA'nın tasarlanmasını ve sentezlenmesini gerektiriyordu. Bunu göstermek için, iyi karakterize edilmiş *E. coli* laktoz düzenleyici yolağın parçası olan genleri sistematik olarak bozmak için sgRNA'lar tasarlamak suretiyle *E. coli* knockdown suşları oluşturmak amacıyla CRISPRi kullanıldı (Şekil 44A). *lac* baskılayıcısını (*LacI*) inhibe eden bir kimyasal olan İzopropil  $\beta$ -D-1-tiyogalaktopiranozit (IPTG) varlığında veya yokluğunda knockdown suşlarından *LacZ* ekspresyonunu ölçmek için,  $\beta$ -galaktosidaz eseyleri gerçekleştirildi. Yabani tip hücrelere, IPTG ilavesi, *LacZ* ekspresyonunu indükledi. Sonuçlar, bir *lacZ*-spesifik sgRNA'nın *LacZ* ekspresyonunu kuvvetli

biçimde baskılayabileceğini gösterdi (Şekil 44B). Bunun aksine, LacZ ekspresyonunun bir doğrudan baskılayıcısını susturmak için beklendiği gibi, lacI genini hedefleyen bir sgRNA, IPTG'nin yokluğunda bile, LacZ ekspresyonunun aktivasyonuna yol açtı.

5

cAMP-CRP'nin promotörün upstream kısmında bir cis düzenleme yerine (A yeri) bağlanma yoluyla LacZ ekspresyonunun bir ana aktivatörü işlevini gördüğü bilinmektedir. Buna uygun olarak, LacZ promotöründe crp genine veya A yerine yönlendirilen sgRNA, baskılama etkisine yol açtı; bu, CRISPRi deneyleri kullanılarak bir düzenleyiciyi onun cis-düzenleme sekansına bağlamak için bir araca işaret etmektedir. LacZ promotöründe CRP'yi daha etkin ve etkili hale getiren cAMP üretmek için gereken adenilat silaz geninin (cya) hedeflenmesi, yalnızca kısmi baskılamaya yol açtı. Çoğalma vasatlarına 1mM cAMP eklenmesi, cya knockdown'ı için etkileri tamamlayıcı nitelik ortaya koyarken, crp knockdown'ı için etkileri tamamlamadı; bu bulgu, cya'nın LacZ'nin bir dolaylı düzenleyici olduğunu gösterir. Ek olarak, bir sgRNA'yla LacI cis-düzenleyici yerinin (O yeri) hedeflenmesi, inhibisyon etkisine sebep oldu; bunun muhtemel sebebi, bu yerde bağlanan Cas9 kompleksinin LacI transkripsiyonu baskılayıcısı davranışını taklit ederek RNA polimerazı sterik olarak bloke etmesidir. Bilinen RNAP bağlanma yerinin (P yeri) hedeflenmesi de ekspresyonu bloke etti. Özetle, bu çalışmalar, CRISPRi-bazlı gen knockdown yönteminin, bir kompleks düzenleyici ağda genlerin ve cis elementlerinin düzenleyici fonksiyonlarını (aktive etmek veya baskılama) sorgulamak için bir hızlı ve etkili yaklaşım sunduğunu gösterir (Şekil 44C).

25



**Şekil 44**, CRISPRi gen knockdown'ı kullanılarak bir kompleks düzenleyici ağın fonksiyonel profillenmesini göstermektedir. (A) sgRNA'lar tasarlandı ve lac düzenleyici yolakta genlerin (cya, crp, lacI, lacZ, lacY, lacA) knockdown'ı için ya da transkripsiyonel operatör yerleri (A/P/O) bloke etmek için kullanıldı. LacI, bir transkripsiyon operatör yerine (O yeri) bağlanma yoluyla lacZYA operonunun bir baskılayıcı işlevini görür. lacZ geni, laktozu glukoza katalize eden bir enzimi kodlar. cya ve crp gibi birkaç trans-etkili konakçı gen, lacZYA sisteminin aktivasyonunda rol oynar. cAMP-CRP kompleksi, bir transkripsiyon operatör yerine (A yeri) bağlanır ve P yerine RNA polimeraz bağlanmasına yardımcı olur ve bu da, lacZYA transkripsiyonunu başlatır. LacI fonksiyonunu inhibe eden bir kimyasal olan IPTG, LacZ ekspresyonunu indükler. (B) IPTG yokluğunda (beyaz) ve varlığında (gri) knockdown suşlarının  $\beta$ -galaktosidaz eseyi. Kontrol, CRISPRi bozama etkisi olmayan yabani tip hücrelerin IPTG ilave edilerek indüklenebileceğini göstermektedir. LacZ'yi hedefleyen sgRNA, IPTG varlığında bile, LacZ ekspresyonunu kuvvetli şekilde baskıladı. LacI hedeflendiğinde, IPTG olmadığında bile, LacZ ekspresyonu yüksekti. cya ve crp genlerinin hedeflenmesi, IPTG'nin varlığında, LacZ ekspresyon seviyesinde azalmaya sebep oldu. 1mM cAMP'nin varlığı, cya knockdown'ını kurtardı, fakat crp knockdown'ını kurtarmadı. Transkripsiyon operatör yerlerinin blokajı, LacZ'nin baskılanmasına yol açtı; bu, bunların LacZ için önemli cis-etkili düzenleyici yerler olduğunu göstermektedir. Bozma basamağından sonra, LacZ'in ekspresyonunda azalma (aşağı yönde oklar) ve artış (yukarı yönde oklar) belirtilmektedir. Hata çubukları, üç biyolojik replikadan elde edilen

SEM değerini temsil etmektedir. (C) Knockdown deneyleri, lac düzenleyici çevrimde düzenleyicilerin rollerinin profillerini çıkartmamıza olanak sağladı. Veriler, bir 2-D grafikte gösterilmektedir; burada, x-ekseni, IPTG'nin yokluğunda LacZ 5 aktivitesini göstermektedir ve y-ekseni, IPTG'nin varlığında onun aktivitesini göstermektedir. Oval Őekillerin her bir eksen boyunca yayılması, standart sapmaları göstermektedir.  $\beta$ -galaktosidaz eseyi sonuçları,  biyolojik replikanın ortalama ve SEM değerlerini temsil etmektedir. LacI ve LacZ hedeflemeye ilişkin RNA-seq verileri için, 10 Şekil 49 da bakınız.

### **CRISPRi, insan hücrelerinde hedeflenen gen ekspresyonunu knock-down edebilir**

15 Transkripsiyonu baskılamak üzere dCas9-sgRNA kompleksi kullanmak için CRISPRi yaklaŐımının genel niteliğini test etmek amacıyla, sistem, HEK293 memeli hücrelerinde test edildi. dCas9 proteini kodon-optimize edildi; bir nükleer lokalizasyon sekansının (NLS)  kopyasına füzyonlandı ve bir Murin Kök Hücre Virüsü (MSCV) retroviral vektöründen eksprese edildi. the RNA polimeraz 20 III U6 promotöründen ekspresyon için, Şekil 40B'de gösterilenle aynı sgRNA tasarımı kullanıldı. Viral enfeksiyon yoluyla, SV40 promotörünün kontrolü altında EGFP eksprese eden bir raportör HEK293 hücre hattı oluşturuldu. EGFP kodlama bölgesinin Şablon- 25 dışı DNA iplikçiğini hedefleyen bir sgRNA (eNT2) kullanıldığında, gen ekspresyonu için orta düzeyde, fakat tekrarlanabilir bir knockdown etkisi gözlemlendi (%46 baskılama, Şekil 45A). Baskılama aktivitesi, hem dCas9 proteinine hem de sgRNA'ya

bağımlı ve bağılıdı; bu, baskılama aktivitesinin dCas9-sgRNA kompleksi ve RNA-yönlendirmeli hedeflemeden kaynaklandığına işaret eder. Aynı sgRNA, bir plazmidden geçici eksprese edildiğinde, aynı gen üzerinde daha iyi baskılama aktivitesi gösterdi (%63 baskılama, Şekil 52). Bakteriyel sisteme uygun olarak, yalnızca şablon-dışı iplikçiğe yönlendirilen sgRNA'lar baskılama etkisi gösterdi. Transkripsiyon başlangıcından mesafe ve lokal kromatin durumu gibi faktörler, baskılama etkinliğini belirleyen kritik parametreler olabilirler (Şekil 52). dCas9 ve sgRNA ekspresyonunun, stabilitesinin, nükleer lokalizasyonunun ve etkileşiminin optimizasyonu, memeli hücrelerinde CRISPRi etkinliğinin ilaveten artırılmasına olanak sağlayacaktır.

**Şekil 45**, CRISPRi'nin insan hücrelerinde gen ekspresyonunu baskılayabileceğini göstermektedir. (A) HEK293 hücrelerinde bir CRISPRi sistemi. SV40-EGFP ekspresyon kaseti, retroviral enfeksiyon aracılığıyla genom içinde sokuldu. dCas9 proteini kodon-optimize edildi ve NLS sekansının üç kopyasıyla füzyonlandı. sgRNA, bir RNA polimeraz III U6 vektöründen eksprese edildi. dCas9 ile EGFP'nin şablon-dışı iplikçiğini hedefleyen bir sgRNA'nın (eNT2) birlikte transfeksiyonu floresansı (~%46) azalttı; tek başına dCas9 ya da sgRNA'nın ekspresyonu ise herhangi bir etki göstermedi. (B) dCas9:sgRNA-aarcılı baskılama etkisi, hedef lokuslarına bağımlı ve bağılıdı. Şablon ya da şablon-dışı iplikçikte EGFP kodlama sekansının farklı bölgelerini hedef almak için yedi sgRNA tasarlandı. Yalnızca eNT2 ve eNT5, orta düzeyde baskılama etkisi gösterdi. 7A ve 7B'den elde edilen floresans sonuçları, iki biyolojik replikanın ortalama ve hata değerlerini temsil etmektedir.

**Şekil 52**, Şekil 45'le bağlantılıdır ve sgRNA baskılama aktivitesinin hedef lokuslarına ve bunların transkripsiyon başlangıcından mesafesine bağımlı ve bağlı olduğunu göstermektedir. Aynı EGFP genini farklı promotörlerle baskılamak için aynı sgRNA kullanıldı.

5 Cas9/sgRNA kompleksleri, geçici transfekt edilen plazmid DNA'dan transfeksiyonu baskıladı. Transkripsiyonun baskılanma seviyesi, genomik genler için gözlemlenene kıyasla biraz daha iyiydi (%63) ve GFP-negatif hücrelerin yüzdesi sgRNA'nın varlığında arttı. Hedef lokusunun transkripsiyon başlangıcından mesafesi farklıdır. SV40-

10 EGFP baskılama etkisi gösterirken, LTR-EGFP herhangi bir etki göstermemiştir. Floresans sonuçları, iki biyolojik replikanın ortalama ve hata değerlerini temsil etmektedir

### 15 **CRISPRi, hedef genlerin transkripsiyonunu etkin ve selektif biçimde baskılar**

CRISPRi sistemi, hedeflenen gen düzenlemesi için nispeten basit bir platformdur. CRISPRi, kompleks konakçı faktörlerin varlığına dayanmaz; bunun yerine, yalnızca dCas9 proteini ve yönlendirici

20 RNA'lara gereksinim duyar ve bundan dolayı, esnek ve oldukça şekillendirilebilir niteliktedir. Bu sistem, bakterilerde genleri etkili şekilde susturabilir. Herhangi bir hedef harici etki belirlenmediğinden dolayı, susturma aktivitesi çok etkilidir. Ek olarak, hedef lokuslar ve sgRNA ile hedef gen arasında baz eşleşmesi derecesi değiştirilerek

25 knockdown etkinliği ayarlanabilir. Bu, hipomorfların allelik serisini oluşturmayı mümkün kılacaktır -- özellikle esansiyel genlere ilişkin çalışma için faydalı olacak bir özellik. Sistem, sgRNA'lar tasarlanarak kolaylıkla programlanabilir bir biçimde transkripsiyonu doğrudan

bloke ederek işlev görür. Mekanik olarak, bu sistem, zaten transkribe edilmiş mRNA'ların yıkımını gerektiren RNAi-bazlı susturma prosedüründen farklıdır.

- 5 Ek olarak, bu dCas9:sgRNA kompleksleri, herhangi bir promotör içindeki kilit cis-etkili motifleri hedefleyip onların kognat trans-etkili transkripsiyon faktörlerinin birleşmesini sterik olarak bloke etmek suretiyle de transkripsiyonu modüle edebilir. Sonuçta, CRISPRi, bir gen knockdown aracı olarak kullanılmamın yanı sıra, promotörlerin ve
- 10 başka genomik düzenleyici modüllerin fonksiyonel haritalanması için de kullanılabilir.

### **CRISPRi, genom-ölçekli analiz ve düzenleme için uygundur**

- 15 CRISPRi yöntemi, DNA-hedefleyen RNA'ların kullanımını baz alır ve spesifik gen hedefleri için yalnızca DNA hedefleyen segmentin tasarlanması gerekir. Büyük ölçekli DNA oligonükleotid sentezi teknolojisinde gelişmeler sayesinde, genom hedefleme için özgün 20-
- 20 bp bölgeler içeren oligonükleotidlerden oluşan büyük setlerin oluşturulması hızlı ve ucuz hale gelir. Bu oligonükleotid kütüphaneleri, gen fonksiyonunu anlamak için çok sayıda münferit geni hedef almamıza ya da genetik etkileşimleri haritalandırmak için gen çiftlerini hedef almamıza olanak sağlayabilir. Ek olarak, sgRNA'ların boyutunun küçük olması, birden çok elementi aynı
- 25 ekspresyon vektörüne bağlamaya olanak sağladığından dolayı, CRISPRi, büyük gen setlerinin ekspresyonunu eşzamanlı modüle etmek için de kullanılabilir.

## **CRISPRi, mikrobiyal genomları manipüle etmek için yeni araçlar sunar.**

CRISPRi platformu kompakt ve müstakil olduğundan dolayı, farklı organizmalar için adapte edilebilir. CRISPRi, patojenler veya endüstriyel kullanıma yönelik organizmalar da dahil olmak üzere, kendilerine yönelik genetik mühendisliği yöntemlerinin iyi geliştirilmemiş olduğu model-olmayan organizmaları araştırmak için güçlü bir araçtır. Okaryotların çoğundan farklı olarak, bakterilerin çoğunda RNAi düzeneği bulunmaz. Bunun bir sonucu olarak, tasarlanmış sentetik RNA'lar kullanılarak endojen genlerin düzenlenmesi şu anda sınırlıdır. CRISPRi, mikroplarda genin bozulması için RNAi-benzeri bir yöntem sağlayabilir.

## **15 Transkripsiyonal düzenleyici ağlar düzenlemek için bir platform olarak CRISPRi**

CRISPRi, transkripsiyonal düzenleyici ağlar düzenlemek bir esnek çerçeve olarak kullanılabilir. CRISPRi platformu, esas olarak bir RNA-yönlendirmeli DNA-bağlanımlı kompleks olduğundan dolayı, çeşitli düzenleyici düzenekleri genomda spesifik yerlere yönlendirmek için bir esnek omurga da sağlar. Yalnızca hedef genlerin transkripsiyonunu bloke etmenin ötesinde, dCas9 proteinini birçok düzenleyici domainle birleştirerek farklı biyolojik prosesleri modüle etmek ve farklı fonksiyonel sonuçlar (örneğin, transkripsiyonel aktivasyon, kromatin modifikasyonları) elde etmek mümkündür.

CRISPRi sisteminde, çoklu sgRNA'ları bir upstream sgRNA'nın farklı bir downstream sgRNA'nın ekspresyonunu kontrol ettiği transkripsiyonel devrelere bağlamak mümkündür. Mikroorganizmalarda bulunan RNA molekülleri kısa ömürlü olma eğilimi gösterdiklerinden dolayı, sgRNA'ların düzenlediği genetik programların, örneğin protein ekspresyonu ve bozunması gibi yavaş prosesleri kapsayan devrelerden farklı olarak, hızlı kinetikler gösterebileceğinden şüphelenmekteyiz. Özetle, CRISPRi sistemi, genom-ölçekli fonksiyonel profillemeye, mikrobiyal metabolik düzenleme ve hücre yeniden programlama da dahil çeşitli farklı biyomedikal araştırma ve klinik uygulamalar için uygun bir genel genetik programlama platformudur.

**Ornek 5: İnsan hücrelerinde transkripsiyonu modüle etmek (aktive etmek ya da baskılamak) için bir kimerik yer-hedefli polipeptid kullanılabilir**

İnsan hücrelerinde, katalitik olarak inaktif bir Cas9 ve bir aktivatör domaini ya da bir baskılama domaini içeren bir füzyon proteininin bir hedef DNA'dan transkripsiyonu sırasıyla arttırabileceğini ya da azaltabileceğini gösterdik.

**Şekil 55.** Katalitik olarak inaktif hümanize Cas9'u bir transkripsiyon aktivatör domaini VP64'le füzyonladık. (A) Bu sistemi kullanarak gen aktivasyonunun etkinliğini test etmek için, bir GFP'yi kontrol eden bir GAL4 UAS indüklenebilir promotörünü, HEK293 (insan doku kültürü hücreleri) genomu içine soktuk. (B) GAL4 UAS promotörü, maya kaynaklı protein GAL4'ün varlığında indüklenebilir. dCas9-VP64

füzyonu, GAL4 UAS bölgesine bağlanan bir kognat yönlendirici RNA'nın varlığında GAL4 UAS'yi 20-katı düzeyinde ve etkili biçimde aktive edebilir. (C) dCas9-VP64 aktivasyonu için mikroskopik görüntüler. (D) dCas9-VP64 aktivasyonu için akış sitometrisi verileri.

**Şekil 56.** Katalitik olarak inaktif hümanize Cas9'u bir transkripsiyon baskılayıcı domaini KRAB'yle füzyonladık. (Ust) İyi karakterize edilmiş bir promotörü, yani SV40 erken promotörünü hedefleyen 10 yönlendirici RNA ve EGFP kodlama bölgesini hedefleyen bir yönlendirici RNA tasarladık. (Alt) Bir non-kimerik dCas9 kullanarak, P9 ve NT2'nin gRNA'ları için 2~3 kat baskılama etkisi gözlemledik. Bu etkinlik, dCas9-KRAB füzyonu kullanıldığında büyük ölçüde arttı. Örneğin, dCas9-KRAB füzyonuyla, P9 ve NT2 sırasıyla 20-kat ve 15-15 kat baskılama etkisi gösterdi. Ek olarak, P1-P6, füzyon proteini kullanıldığında, ekspresyonda anlamlı ve önemli bir azalma gösterdi, fakat bir non-kimerik dCas9 kullanıldığında sınırlı baskılama etkisi gösterdi.

20 **Örnek 6: Cas9, hedef DNA yarılması olayını gerçekleştirmek için, doğada bulunmayan artifisyel yönlendirici RNA'lar kullanılabilir.**

S. pyogenes crRNA ve tracrRNA'larının doğada mevcut transkriptlerinin protein-bağlanımlı segmenti baz alınarak bir artifisyel crRNA ve bir artifisyel tracrRNA tasarlandı ve doğal S. pyogenes crRNA:tracrRNA dubleksi içindeki asimetrik tümseği (Şekil 57A'da gösterilen hem artifisyel (üst) hem de doğal (alt) RNA moleküllerinin protein-bağlanımlı domaininde bulunan tümseğe bakınız) taklit edecek



şekilde modifiye edildi. Artifisyel tracrRNA sekansının doğal tracrRNA'yla özdeşliği %50'den azdır. crRNA:tracrRNA protein-bağlanımlı dubleksinin kestirilen sekonder yapısı, her iki RNA çifti için de aynıdır, fakat RNA'ların geriye kalanının kestirilen yapısı çok farklıdır.

**Şekil 57**, doğada mevcut bir tracrRNA ve crRNA'yla özdeşliği çok az olan (yaklaşık %50 özdeşlik) artifisyel sekansların, DNA-hedefleyen RNA'nın protein-bağlanımlı domaininin yapısı korunduğu sürece, hedef DNA'yı yarmak için Cas9'la birlikte işlev görebileceklerini göstermektedir. (A) *S. pyogenes* tracrRNA ile crRNA'nın ve artifisyel tracrRNA ile crRNA'nın birlikte katlanması. (B) Plazmid DNA yarma eseyleri yapmak için *S. pyogenes* Cas9 ve tracrRNA:crRNA ortologları kombinasyonları kullanıldı. Spy - *S. pyogenes*, Lin - *L. innocua*, Nme - *N. meningitidis*, Pmu - *P. multocida*. *S. pyogenes* Cas9, seçili bakteriyel türlerde doğal olarak bulunan tracrRNA:crRNA ortologlarının hepsi değil de, bazıları tarafından yönlendirilebilir. Bilhassa, *S. pyogenes* Cas9, doğada mevcut DNA-hedefleyen RNA'nın protein-bağlanımlı segmentinin yapısı bazında CRISPR sistemiyle tamamen ilişkisiz sekans kullanılarak tasarlanan artifisyel tracrRNA:crRNA çifti tarafından yönlendirilebilir.

Kullanılan artifisyel "tracrRNA" (aktivatör RNA) şuydu: 5'-  
 GUUUUCCCUUUUCAAGAAAUCUCCUGGGCACCUAUCUUC  
 25 UUAGGUGCCCUCCU  
 UGUUUAAACCUGACCAGUUAACCGGCUGGUUAGGUUUUU-  
 3' (SEKANS KOD NO.: 1347) idi. Kullanılan artifisyel "crRNA"  
 (hedef gösteren RNA) ise şuydu: 5'-

GAGAUUUAUGAAAAGGGAAAAC-3' (SEKANS KOD NO.: 1348).

### **Örnek 7: İnsan-dışı Transgenik Organizmaların Oluşturulması**

5

Sektörde olağan bilgi ve beceri sahibi bir kişinin bildiği uygun bir yöntem (örneğin, (i) bir fare embriyonik kök hücrenin (ES hücresi) bir hedeflenen lokusunda (örneğin, ROSA 26) gen knock-in basamağı ve takiben, blastosist enjeksiyonu ve kimerik farelerin oluşturulması;

10

(ii) bir rastgele entegre olan transgenin bir fertilize fare oositinin pronükleusuna enjeksiyonu ve takiben, bir yalancı gebe dişiye ovum implantasyonu; v.b.) kullanılarak, Cas9 (modifiye edilmemiş ya da azaltılmış enzimatik aktiviteye sahip olacak şekilde modifiye edilmiş ya da yukarıda ana hatlarıyla açıklanan amaçların herhangi birisi için

15

bir füzyon proteini olarak modifiye edilmiş formda) eksprese eden bir transgenik fare oluşturulur. Cas9 proteini, en azından embriyonik kök hücrelerde eksprese olan bir promotörün kontrolü altındadır ve ek olarak, geçici veya doku-spesifik kontrol (örneğin, ilaçla indüklenebilir, bir Cre/Lox bazlı promotör sistemiyle kontrol

20

edilebilir, v.b.) altında da olabilir. Transgenik Cas9 eksprese eden fare hattı oluşturulduktan sonra, embriyonik kök hücreler izole edilir ve kültürlenir ve bazı durumlarda, ES hücreleri, daha sonra kullanılmak üzere dondurulur. İzole ES hücreleri, Cas9 eksprese ettiklerinden (ve bazı durumlarda, ekspresyon, geçici kontrol altında (örneğin, ilaçla indüklenebilir) olduğundan) dolayı, genomda istenen herhangi bir

25

lokusta, Cas9'u seçilen belirli bir lokusa yönlendiren bir uygun tasarlanmış DNA-hedefleyen RNA sokularak, yeni knock-out veya knock-in hücreler (ve dolayısıyla fareler) hızla oluşturulur. Seçilen

herhangi bir lokusta genetik olarak modifiye edilmiş yeni organizmalar oluşturmak için, böyle bir sistem ve onun birçok varyasyonu kullanılır. Modifiye edilmiş Cas9, transkripsiyonu modüle etmek ve/veya DNA'yı modifiye etmek ve/veya DNA'yla ilişkili polipeptitleri modifiye etmek amacıyla kullanıldığında, yalnızca uygun bir DNA-hedefleyen RNA'yı bir istenen Cas9 eksprese eden hücre içine sokmak suretiyle, seçilen herhangi bir genin (ya da seçilen herhangi bir ekspresyon ürününün ya da seçilen herhangi bir genomik lokusun) özelliklerini araştırmak için ES hücrelerinin kendisi (ya da ES hücrelerinden farklılaştırılmış hücrelerin herhangi birisi (örneğin, bir tüm fare, bir farklılaştırılmış hücre hattı ve benzeri)) kullanılır.

Tarifnamenin özelliklerini tarif eden aşağıda numaralandırılmış olan maddeler tarifnamenin parçasıdır.

15

1. Bir DNA hedefleyen RNA olup, aşağıdakileri içerir:

- (i) bir hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı olan bir nükleotit sekansını içeren bir birinci segment; ve
- 20 (ii) bir yer hedefli modifiye edici polipeptit ile etkileşen bir ikinci segment.

25

2. Madde 1'e göre DNA hedefleyen RNA olup, burada birinci segment, hedef DNA'daki bir sekansı %100 tamamlayıcı olan 8 nükleotiti içerir.

3. Madde 1'e göre DNA hedefleyen RNA olup, ikinci segment, en az 8 adet bitişik nükleotidden oluşan bir kesit boyunca

SEKANS KOD NO.: 563-682'de gösterilen nükleotid sekanslarından herhangi biri ya da bunların bir komplemanı ile en az %60 oranında özdeşliğe sahip olan bir nükleotid sekansı ihtiva eder.

5

4. Madde 1'e göre DNA hedefleyen RNA olup, ikinci segment, en az 8 adet bitişik nükleotidden oluşan bir kesit boyunca SEKANS KOD NO.: 431-562'de gösterilen nükleotid sekanslarından herhangi biri ya da bunların bir komplemanı ile en az %60 oranında özdeşliğe sahip olan bir nükleotid sekansı ihtiva eder.

10

5. Madde 1'e göre DNA hedefleyen RNA olup, burada yer-hedefli modifiye edici polipeptid, Şekil 3'te gösterilen Cas9/Csn1 amino asit sekansının 7-166 veya 731-1003 numaralı amino asitlerinden oluşan kısım ile ya da SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346'da gösterilen amino asit sekanslarından herhangi birindeki mütakabil kısımlar ile en az yaklaşık %75 oranında amino asit sekansı özdeşliğine sahip olan bir amino asit sekansı ihtiva eder.

15

20

6. Madde 1'e göre DNA hedefleyen RNA'yı kodlayan bir nükleotid sekansını içeren bir DNA polinükleotitidir.

25

7. Madde 6'ya göre DNA polinükleotitini içeren bir rekombinant vektördür.

8. Madde 7'ye göre rekombinant ekspresyon vektörü olup, burada DNA hedefleyen RNA'yı kodlayan nükleotit sekansı, faal olarak bir promotöre bağlıdır.
- 5 9. Madde 8'e göre rekombinant ekspresyon vektörü olup, burada promotör, bir indüklenebilir promotördür.
10. Madde 8'e göre rekombinant ekspresyon vektörü olup, burada Madde 1'e göre DNA hedefleyen RNA'yı kodlayan nükleotit sekansı bir çoğul klonlama alanını ihtiva eder.
- 10 11. Madde 6'ya göre DNA polinükleotitini içeren bir in vitro genetik olarak modifiye edilmiş konak hücredir.
- 15 12. Aşağıdakileri içeren bir rekombinant ekspresyon vektörüdür:
- (i) bir DNA hedefleyen RNA'yı kodlayan bir nükleotit sekansı olup, burada DNA hedefleyen RNA aşağıdakileri içerir:
- 20 (a) bir hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı olan bir nükleotit sekansını içeren bir birinci segment; ve
- (b) bir yer hedefli modifiye edici polipeptit ile etkileşen bir ikinci segment; ve
- (ii) yer hedefli modifiye edici polipeptidi kodlayan bir nükleotit sekansı olup, aşağıdakileri içerir:
- 25 (a) DNA hedefleyen RNA ile etkileşen bir RNA-bağlayıcı kısım; ve

(b) yer hedefli enzimatik aktivite sergileyen bir aktivite kısmı, burada enzimatik aktivitenin yeri DNA hedefleyen RNA ile tespit edilir.

5 13. Bir rekombinant ekspresyon vektörü olup, aşağıdakileri içerir:

(i) bir DNA hedefleyen RNA'yı kodlayan bir nükleotit sekansı olup, burada DNA hedefleyen RNA, aşağıdakileri içerir:

10 (a) bir hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı olan bir nükleotit sekansını içeren bir birinci segment; ve

(b) bir yer hedefli modifiye edici polipeptit ile etkileşen bir ikinci segment; ve

15 (ii) yer hedefli modifiye edici polipeptiti kodlayan bir nükleotit sekansı olup, burada yer hedefli modifiye edici polipeptit aşağıdakileri içerir:

20 (a) DNA hedefleyen RNA ile etkileşen bir RNA bağlayıcı kısım; ve

(b) hedef DNA içindeki transkripsiyonu modüle eden bir aktivite kısmı, burada, hedef DNA içindeki modüle edilmiş transkripsiyon alanı DNA hedefleyen RNA ile belirlenir.

25 14. Bir varyant yer hedefli modifiye edici polipeptit olup, aşağıdakileri içerir:

- (i) bir DNA hedefleyen RNA ile etkileşen bir RNA bağlayıcı kısım olup, burada DNA hedefleyen RNA, bir hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı olan bir nükleotit sekansını içerir; ve
- 5 (ii) azaltılmış yer hedefli enzimatik aktiviteyi sergileyen bir aktivite kısmı olup, burada enzimatik aktivite alanı DNA hedefleyen RNA ile belirlenir.
15. Madde 14'e göre varyant yer hedefli modifiye edici polipeptit  
10 olup, *S. pyogenes* sekansı SEKANS KOD NO.: 8'in bir H840A mutasyonunu ya da SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346'da gösterilen amino asit sekanslarından herhangi birindeki mütakabil mutasyonu içerir.
- 15 16. Madde 14'e göre varyant yer hedefli modifiye edici polipeptit olup, *S. pyogenes* sekansı SEKANS KOD NO.: 8'in bir D10A mutasyonunu ya da SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346'da gösterilen amino asit sekanslarından herhangi birindeki mütakabil mutasyonu içerir.
- 20 17. Madde 14'e göre varyant yer hedefli modifiye edici polipeptit olup, hem (i) *S. pyogenes* sekansı SEKANS KOD NO.: 8'in bir D10A mutasyonunu ya da SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346'da gösterilen amino asit sekanslarından herhangi birindeki mütakabil mutasyonu; hem de (ii) *S. pyogenes* sekansı SEKANS KOD NO.: 8'in bir H840A mutasyonunu ya da SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346'da gösterilen amino
- 25

asit sekanslarından herhangi birindeki mütakabil mutasyonu içerir.

5 18. Bir kimerik yer hedefli modifiye edici polipeptit olup, aşağıdakileri içerir:

10 (i) bir DNA hedefleyen RNA ile etkileşen bir RNA bağlayıcı kısım olup, burada DNA hedefleyen RNA, bir hedef DNA içindeki bir sekansı tamamlayıcı bir nükleotit sekansı içerir; ve

(ii) yer hedefli modifiye edici polipeptit sergileyen bir aktivite kısmı olup, burada enzimatik aktivite alanı, DNA hedefleyen RNA ile tespit edilir.

15 19. Madde 18'e göre kimerik yer hedefli modifiye edici polipeptit olup, Şekil 3'te gösterilen Cas9/Csn1 amino asit sekansının 7-166 veya 731-1003 numaralı amino asitlerinden oluşan kısım ile ya da SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346'da gösterilen amino asit sekanslarından herhangi birindeki mütakabil kısımlar ile en az yaklaşık %75 oranında amino asit sekansı özdeşliğine sahip olan bir amino asit sekansı ihtiva eder.

25 20. Madde 18'e göre kimerik yer hedefli modifiye edici polipeptit olup, burada DNA hedefleyen RNA ayrıca, en az 8 adet bitişik nükleotidden oluşan bir kesit boyunca SEKANS KOD NO.: 563-682'de gösterilen nükleotid sekanslarından herhangi biri ile en az %60 oranında özdeşliğe sahip olan bir nükleotid sekansı ihtiva eder.



21. Madde 18'e göre kimerik yer hedefli modifiye edici polipeptit olup, DNA hedefleyen RNA ayrıca, en az 8 adet bitişik nükleotidden oluşan bir kesit boyunca SEKANS KOD NO.: 431-562'de gösterilen nükleotid sekanslarından herhangi biri ile en az %60 oranında özdeşliğe sahip olan bir nükleotid sekansı ihtiva eder.
- 5
22. Madde 18'e göre kimerik yer hedefli modifiye edici polipeptit olup, burada enzimatik aktivite hedef DNA'yı modifiye eder.
- 10
23. Madde 22'ye göre kimerik yer hedefli modifiye edici polipeptit olup, burada enzimatik aktivite; nükleaz aktivitesi, metiltransferaz aktivitesi, demetilaz aktivitesi, DNA onarımı aktivitesi, DNA hasarı aktivitesi, deaminasyon aktivitesi, dismutaz aktivitesi, alkilasyon aktivitesi, depürinasyon aktivitesi, oksidasyon aktivitesi, pirimidin dimeri oluşturma aktivitesi, integras aktivitesi, transpozaz aktivitesi, rekombinaz aktivitesi, polimeraz aktivitesi, ligaz aktivitesi, helikaz aktivitesi, fotolizaz aktivitesi ya da glikozilaz aktivitesidir.
- 15
- 20
24. Madde 23'e göre kimerik yer hedefli modifiye edici polipeptit olup, enzimatik aktivite nükleaz aktivitesidir.
25. Madde 24'e göre kimerik yer hedefli modifiye edici polipeptit olup, nükleaz aktivitesi, hedef DNA'da bir çift iplikçik kırığı oluşturur.
- 25

- 26.Madde 18'e göre kimerik yer hedefli modifiye edici polipeptit olup, burada enzimatik aktivite, hedef DNA ile ilişkili bir hedef polipeptidi modifiye eder.
- 5 27.Madde 26'ya göre kimerik yer hedefli modifiye edici polipeptit olup, burada enzimatik aktivite; metiltransferaz aktivitesi, demetilaz aktivitesi, asetiltransferaz aktivitesi, deasetilaz aktivitesi, kinaz aktivitesi, fosfataz aktivitesi, ubikitin ligaz aktivitesi, deubikitinasyon aktivitesi, adenilasyon aktivitesi, deadenilasyon aktivitesi, SUMOilasyon aktivitesi, deSUMOilasyon aktivitesi, ribozilasyon aktivitesi, deribozilasyon aktivitesi, miristoilasyon aktivitesi ya da demiristoilasyon aktivitesidir.
- 10
- 15 28.Madde 26'ya göre kimerik yer hedefli modifiye edici polipeptit olup, hedef polipeptid bir histondur ve enzimatik aktivite, metiltransferaz aktivitesi, demetilaz aktivitesi, asetiltransferaz aktivitesi, deasetilaz aktivitesi, kinaz aktivitesi, fosfataz aktivitesi, ubikitin ligaz aktivitesi ya da deubikitinasyon aktivitesidir.
- 20
- 29.Madde 18'e göre kimerik yer hedefli modifiye edici polipeptidi kodlayan bir nükleotit sekansı içeren bir RNA polinükleotitidir.
- 25 30.Madde 18'e göre kimerik yer hedefli modifiye edici polipeptidi kodlayan bir nükleotit sekansı içeren bir DNA polinükleotitidir.

- 31.Madde 30'a göre polinükleotiti içeren bir rekombinant ekspresyon vektörüdür.
- 5 32.Madde 31'e göre rekombinant ekspresyon vektörü olup, burada polinükleotit faal olarak bir promotöre bağlıdır.
- 33.Madde 32'ye göre rekombinant ekspresyon vektörü olup, burada prömotör bir indüklenebilir promotördür.
- 10 34.Madde 30'un polinükleotitini içeren bir in vitro genetik olarak modifiye edilmiş konak hücre.
- 35.Bir kimerik yer hedefli modifiye edici polipeptit olup, aşağıdakileri içerir:
- 15
- (i) bir DNA hedefleyen RNA ile etkileşen bir RNA bağlayıcı kısım olup, burada DNA hedefleyen RNA, bir hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı olan bir nükleotit sekansını içerir; ve
- 20 (ii) hedef DNA içindeki transkripsiyonu modüle eden bir aktivite kısmı olup, burada hedef DNA içindeki modüle edilmiş transkripsiyon alanı DNA hedefleyen RNA ile tespit edilmiştir.
- 25 36.Madde 35'e göre kimerik yer hedefli modifiye edici polipeptit olup, burada aktivite kısmı, hedef DNA içindeki transkripsiyonu arttırır.

37. Madde 35'e göre kimerik yer hedefli modifiye edici polipeptit olup, burada aktivite kısmı, hedef DNA içindeki transkripsiyonu azaltır.
- 5 38. Bir DNA hedefleyen DNA ile etkileşen bir RNA-bağlayıcı kısmı içeren bir rekombinant yer hedefli modifiye edici polipeptiti; ve yerin enzimatik aktivitesinin DNA hedefleyen RNA ile tespit edildiği yer hedefli enzimatik aktivite sergileyen bir aktivite kısmı içeren bir genetik olarak modifiye edilmiş hücre.
- 10 39. Madde 38'e göre genetik olarak modifiye edilmiş hücre olup, burada yer-hedefli modifiye edici polipeptid, Şekil 3'te gösterilen Cas9/Csn1 amino asit sekansının 7-166 veya 731-1003 numaralı amino asitlerinden oluşan kısım ile ya da SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346'da gösterilen amino
- 15 asit sekanslarından herhangi birindeki mütakabil kısımlar ile en az yaklaşık %75 oranında amino asit sekansı özdeşliğine sahip olan bir amino asit sekansı ihtiva eder.
- 20 40. Madde 38'e göre genetik olarak modifiye edilmiş hücre olup, burada hücre aşağıda belirtilen hücrelerden oluşan bir grup içerisinde seçilir: bir arke hücresi, bir bakteri hücresi, bir ökaryotik hücre, bir ökaryotik tekhücreli organizma, bir somatik hücre, bir germ hücresi, bir kök hücre, bir bitki hücresi, bir alg hücresi, bir hayvan hücresi, bir omurgasız hücresi, bir omurgalı hücresi, bir balık hücresi, bir kurbağa hücresi, bir kuş hücresi,
- 25 bir memeli hücresi, bir domuz hücresi, bir inek hücresi, bir keçi hücresi, bir koyun hücresi, bir kemirgen hücresi, bir sıçan hücresi, bir fare hücresi, insan dışındaki bir primatın hücresi ve bir insan hücresi.

41. Genomu bir transgen içeren bir transgenik insan dışı organizma olup, şunları içeren bir rekombinant yer hedefli modifiye edici polipeptiti kodlayan bir nükleotit sekansını ihtiva eder: (i) bir DNA hedefleyen RNA ile etkileşen bir RNA-bağlayıcı kısım; ve (ii) yer hedefli enzimatik aktivite sergileyen bir aktivite kısmı olup, burada enzimatik aktivitenin yeri, DNA hedefleyen RNA tarafından belirlenir.
42. Madde 41'e göre transgenik organizma olup, burada yer hedefli modifiye edici peptit, Şekil 3'te gösterilen Cas9/Csn1 amino asit sekansının 7-166 veya 731-1003 numaralı amino asitlerinden oluşan kısım ile ya da SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346'da gösterilen amino asit sekanslarından herhangi birindeki mütakabil kısımlar ile en az yaklaşık %75 oranında amino asit sekansı özdeşliğine sahip olan bir amino asit sekansı ihtiva eder.
43. Madde 41'e göre transgenik organizma olup, burada organizma aşağıda belirtilen organizmalardan oluşan bir grup içerisinde seçilir: bir arke, bir bakteri, bir ökaryotik tekhücreli organizma, bir alg, bir bitki, bir hayvan, bir omurgasız, bir sinek, bir solucan, bir sölenler, bir omurgalı, bir balık, bir kurbağa, bir kuş, bir memeli, bir toynaklı, bir kemirgen, bir sıçan, bir fare ve insan dışındaki bir primat.
44. Bir bileşim olup, belirtilen unsurları içerir:

(i) aşağıda sıralanan unsurları bünyesinde barındıran bir DNA-hedefleyen RNA ya da onu kodlayan bir DNA polinükleotidi:  
DNA-hedefleyen RNA:

- 5 (a) bir hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı nitelikte bir nükleotid sekansı içeren bir birinci segmenti ve  
(b) bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid ile etkileşime giren bir ikinci segment içerir; ve
- 10 (ii) yer-hedefli modifiye edici polipeptid ya da onu kodlayan bir polinükleotid, burada yer hedefli modifiye edici polipeptid aşağıda belirtilen unsurları ihtiva eder:
- (a) DNA-hedefleyen RNA ile etkileşime giren bir RNA-bağımlı kısım; ve
- 15 (b) DNA-hedefleyen RNA'nın belirlediği bir yerde yer-hedefli enzimatik aktivite sergileyen bir aktivite kısmı.

20 45.Madde 44'e göre bileşim olup, burada, DNA-hedefleyen RNA'nın birinci segmenti, hedef DNA'daki bir sekansı en az %100 oranında tamamlayıcı nitelikte olan 8 adet nükleotid ihtiva eder.

25 46.Madde 44'e göre bileşim olup, burada, DNA-hedefleyen RNA'nın ikinci segmenti, en az 8 adet bitişik nükleotidden oluşan bir kesit boyunca SEKANS KOD NO.: 563-682'de gösterilen nükleotid sekanslarından herhangi biri ile en az %60 oranında özdeşliğe sahip olan bir nükleotid sekansı ihtiva eder.

47. Madde 44'e göre bileşim olup, burada, DNA-hedefleyen RNA'nın ikinci segmenti, en az 8 adet bitişik nükleotidden oluşan bir kesit boyunca SEKANS KOD NO.: 431-562'de gösterilen nükleotid sekanslarından herhangi biri ile en az %60 oranında özdeşliğe sahip olan bir nükleotid sekansı ihtiva eder.
- 5
48. Madde 44'e göre bileşim olup, burada, yer-hedefli modifiye edici polipeptid, Şekil 3'te gösterilen Cas9/Csn1 amino asit sekansının 7-166 veya 731-1003 numaralı amino asitlerinden oluşan kısım ile ya da SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-10 1346'da gösterilen amino asit sekanslarından herhangi birindeki mütakabil kısımlar ile en az yaklaşık %75 oranında amino asit sekansı özdeşliğine sahip olan bir amino asit sekansı ihtiva eder.
49. Madde 44'e göre bileşim olup, burada, enzimatik aktivite hedef 15 DNA'yı modifiye eder.
50. Madde 44'e göre bileşim olup, burada, enzimatik aktivite; nükleaz aktivitesi, metiltransferaz aktivitesi, demetilaz aktivitesi, DNA onarımı aktivitesi, DNA hasarı aktivitesi, deaminasyon aktivitesi, dismutaz aktivitesi, alkilasyon 20 aktivitesi, depürinasyon aktivitesi, oksidasyon aktivitesi, pirimidin dimeri oluşturma aktivitesi, integras aktivitesi, transpozaz aktivitesi, rekombinaz aktivitesi, polimeraz aktivitesi, ligaz aktivitesi, helikaz aktivitesi, fotolizaz aktivitesi ya da glikozilaz aktivitesidir.
- 25
51. Madde 50'ye göre bileşim olup, burada, enzimatik aktivite nükleaz aktivitesidir.
52. Madde 51'e göre bileşim olup, burada, nükleaz aktivitesi, hedef DNA'da bir çift iplikçik kırığı oluşturur.

53. Madde 44'e göre bileşim olup, burada, enzimatik aktivite, hedef DNA ile ilişkili bir hedef polipeptidi modifiye eder.
54. Madde 53'e göre bileşim olup, burada, enzimatik aktivite; metiltransferaz aktivitesi, demetilaz aktivitesi, asetiltransferaz aktivitesi, deasetilaz aktivitesi, kinaz aktivitesi, fosfataz aktivitesi, 5 ubikitin ligaz aktivitesi, deubikitinasyon aktivitesi, adenilasyon aktivitesi, deadenilasyon aktivitesi, SUMOilasyon aktivitesi, deSUMOilasyon aktivitesi, ribozilasyon aktivitesi, deribozilasyon aktivitesi, miristoilasyon aktivitesi ya da demiristoilasyon aktivitesidir. 10
55. Madde 53'e göre bileşim olup, burada, hedef polipeptid bir histondur ve enzimatik aktivite, metiltransferaz aktivitesi, demetilaz aktivitesi, asetiltransferaz aktivitesi, deasetilaz aktivitesi, kinaz aktivitesi, fosfataz aktivitesi, 15 ubikitin ligaz aktivitesi ya da deubikitinasyon aktivitesidir.
56. Madde 44'e göre bileşim olup, burada, DNA-hedefleyen RNA bir çift-moleküllü DNA-hedefleyen RNA'dır ve bileşim, hem bir hedef gösteren RNA hem de bir aktive edici RNA ihtiva eder ve bu RNA'ların dubleks oluşturan segmentleri birbirlerini 20 tamamlayıcı niteliktedir ve hibridize olarak DNA-hedefleyen RNA'nın ikinci segmentini oluştururlar.
57. Madde 56'ya göre bileşim olup, burada, aktive edici RNA'nın dubleks oluşturan segmenti, en az 8 adet bitişik nükleotidden oluşan bir kesit boyunca SEKANS KOD NO.: 431-682'de 25 gösterilen nükleotid sekanslarından herhangi biri ile en az %60 oranında özdeşliğe sahip olan bir nükleotid sekansı ihtiva eder.
58. Aşağıda belirtilen unsurları ihtiva eden bir bileşimdir:



- (i) Madde 44'e göre bir DNA-hedefleyen RNA ya da onu kodlayan bir DNA polinükleotidi ve
- (ii) nükleik asitleri stabilize etmeyi sağlayan bir tampon.
- 5 59.Aşağıda belirtilen unsurları ihtiva eden bir bileşimdir:
- (i) Madde 44'e göre bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid veya onu kodlayan bir polinükleotid; ve
- (ii) nükleik asitleri ve/veya proteinleri stabilize etmeyi sağlayan bir tampon.
- 10 60.Aşağıda belirtilen unsurları ihtiva eden bir bileşimdir:
- (i) aşağıda sıralanan unsurları ihtiva eden bir DNA-hedefleyen RNA veya onu kodlayan bir DNA polinükleotidi:
- 15 (a) bir hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı nitelikte bir nükleotid sekansı içeren bir birinci segment; ve
- (b) bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid ile etkileşime giren bir ikinci segment; ve
- (ii) aşağıda belirtilen unsurları ihtiva eden yer-hedefli modifiye
- 20 edici polipeptid veya onu kodlayan bir polinükleotid:
- (a) DNA-hedefleyen RNA ile etkileşime giren bir RNA-bağımlı kısım; ve
- (b) hedef DNA içerisinde modüle edilmiş transkripsiyon
- 25 yerinin, DNA-hedefleyen RNA tarafından belirlendiği, hedef DNA içerisindeki transkripsiyonu modüle eden bir aktivite kısmı.

61. Madde 60'a göre bileşim olup, burada, aktivite kısmı, hedef DNA içerisindeki transkripsiyonu artırır.
62. Madde 60'a göre bileşim olup, burada, aktivite kısmı, hedef DNA içerisindeki transkripsiyonu azaltır.
- 5 63. Aşağıda belirtilen unsurları ihtiva eden bir bileşimdir:
- (i) Madde 60'a göre bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid veya onu kodlayan bir polinükleotid; ve
  - (ii) nükleik asitleri ve/veya proteinleri stabilize etmeyi sağlayan bir tampon.
- 10 64. Bir hedef DNA'yı yer-spesifik modifikasyona uğratmayı sağlayan bir yöntem olup, yöntem aşağıdaki adımları içerir:
- hedef DNA'nın aşağıda belirtilen unsurlar ile temas ettirilmesi:
- 15 (i) bir DNA-hedefleyen RNA ya da onu kodlayan bir DNA polinükleotidi olup, burada DNA-hedefleyen RNA aşağıda sıralanan unsurları içerir:
- (a) hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı nitelikte bir nükleotid
  - 20 sekansı içeren bir birinci segment; ve
  - (b) bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid ile etkileşime giren bir ikinci segment; ve
- (ii) aşağıda belirtilen unsurları bünyesinde barındıran bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid ya da onu kodlayan bir
- 25 polinükleotid:

- (a) DNA-hedefleyen RNA ile etkileşime giren bir RNA-bağlanımlı kısım; ve
- (b) yer-hedefli enzimatik aktivite sergileyen bir aktivite kısmı.

- 5 65. Madde 64'e göre yöntem olup, burada, hedef DNA ekstrakromozomaldır.
66. Madde 64'e göre yöntem olup, burada, hedef DNA, tamamlayıcı iplikçiginde 5'-CCY-3' şeklinde gösterilen bir PAM sekansı içerir ve bu sekansta geçen Y herhangi bir DNA
- 10 nükleotidi olabilir ve hedef DNA'nın tamamlayıcı iplikçigindeki hedef sekansın hemen 5' ucunda yer alır.
67. Madde 64'e göre yöntem olup, burada, hedef DNA, in vitro ortamdaki bir kromozomun bir parçasıdır.
68. Madde 64'e göre yöntem olup, burada, hedef DNA, in vivo
- 15 ortamdaki bir kromozomun bir parçasıdır.
69. Madde 64'e göre yöntem olup, burada, hedef DNA, bir hücredeki bir kromozomun bir parçasıdır.
70. Madde 69'a göre yöntem olup, burada, hücre, aşağıda belirtilen hücrelerden oluşan bir grup içerisinde seçilir: bir arke hücresi,
- 20 bir bakteri hücresi, bir ökaryotik hücre, bir ökaryotik tekhücreli organizma, bir somatik hücre, bir germ hücresi, bir kök hücre, bir bitki hücresi, bir alg hücresi, bir hayvan hücresi, bir omurgasız hücresi, bir omurgalı hücresi, bir balık hücresi, bir kurbağa hücresi, bir kuş hücresi, bir memeli hücresi, bir domuz
- 25 hücresi, bir inek hücresi, bir keçi hücresi, bir koyun hücresi, bir kemirgen hücresi, bir sıçan hücresi, bir fare hücresi, insan dışındaki bir primatin hücresi ve bir insan hücresi.

71. Madde 64'e göre yöntem olup, burada, DNA-hedefleyen RNA, en az 8 adet bitişik nükleotidden oluşan bir kesit boyunca SEKANS KOD NO.: 563-682'de gösterilen nükleotid sekanslarından herhangi biri ile en az %60 oranında özdeşliğe sahip olan bir nükleotid sekansı ihtiva eder.
- 5
72. Madde 64'e göre yöntem olup, burada, DNA-hedefleyen RNA, en az 8 adet bitişik nükleotidden oluşan bir kesit boyunca SEKANS KOD NO.: 431-562'de gösterilen nükleotid sekanslarından herhangi biri ile en az %60 oranında özdeşliğe sahip olan bir nükleotid sekansı ihtiva eder.
- 10
73. Madde 64'e göre yöntem olup, burada, DNA-modifiye edici polipeptid, Şekil 3'te gösterilen Cas9/Csn1 amino asit sekansının 7-166 veya 731-1003 numaralı amino asitlerinden oluşan kısım ile ya da SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346'da gösterilen amino asit sekanslarından herhangi birindeki mütakabil kısımlar ile en az yaklaşık %75 oranında amino asit sekansı özdeşliğine sahip olan bir amino asit sekansı ihtiva eder.
- 15
74. Madde 64'e göre yöntem olup, burada, enzimatik aktivite hedef DNA'yı modifiye eder.
- 20
75. Madde 74'e göre yöntem olup, burada, enzimatik aktivite; nükleaz aktivitesi, metiltransferaz aktivitesi, demetilaz aktivitesi, DNA onarımı aktivitesi, DNA hasarı aktivitesi, deaminasyon aktivitesi, dismutaz aktivitesi, alkilasyon aktivitesi, depürinasyon aktivitesi, oksidasyon aktivitesi, pirimidin dimeri oluşturma aktivitesi, integraz aktivitesi, transpozaz aktivitesi, rekombinaz aktivitesi, polimeraz
- 25

aktivitesi, ligaz aktivitesi, helikaz aktivitesi, fotoliyaz aktivitesi ya da glikozilaz aktivitesidir.

76.Madde 75'e göre yöntem olup, burada, DNA-modifiye edici enzimatik aktivite nükleaz aktivitesidir.

5 77.Madde 76'ya göre yöntem olup, burada, nükleaz aktivitesi, hedef DNA'da bir çift iplikçik kırığı oluşturur.

78.Madde 77'ye göre yöntem olup, burada, temas, homolog olmayan uç birleştirmeye veya homoloji-yönlendirmeli onarıma izin veren koşullar altında gerçekleştirilir.

10 79.Madde 78'e göre yöntem olup, burada, söz konusu yöntem kapsamında, hedef DNA bir donör polinükleotid ile de temas ettirilir ve donör polinükleotid, donör polinükleotidin bir kısmı, donör polinükleotidin bir kopyası ya da donör polinükleotidin bir kopyasının bir kısmı hedef DNA'ya entegre olur.

15 80.Madde 78'e göre yöntem olup, burada, yöntem kapsamında, hücre bir donör polinükleotid ile temas ettirilmez ve hedef DNA, hedef DNA içerisindeki nükleotidlerin silinmesini sağlayacak bir modifikasyona uğratılır.

20 81.Madde 64'e göre yöntem olup, burada, enzimatik aktivite, hedef DNA ile ilişkili bir hedef polipeptidi modifiye eder.

25 82.Madde 81'e göre yöntem olup, burada, enzimatik aktivite; metiltransferaz aktivitesi, demetilaz aktivitesi, asetiltransferaz aktivitesi, deasetilaz aktivitesi, kinaz aktivitesi, fosfataz aktivitesi, ubikitin ligaz aktivitesi, deubikitinasyon aktivitesi, adenilasyon aktivitesi, deadenilasyon aktivitesi, SUMOilasyon aktivitesi, deSUMOilasyon aktivitesi, ribozilasyon aktivitesi, deribozilasyon aktivitesi, miristoilasyon aktivitesi ya da demiristoilasyon aktivitesidir.

83. Madde 81'e göre yöntem olup, burada, hedef polipeptid bir histondur ve enzimatik aktivite, metiltransferaz aktivitesi, demetilaz aktivitesi, asetiltransferaz aktivitesi, deasetilaz aktivitesi, kinaz aktivitesi, fosfataz aktivitesi, ubiquitin ligaz aktivitesi ya da deubikitinasyon aktivitesidir.
84. Madde 64'e göre yöntem olup, burada, komplekste bir aktive edici RNA da bulunur.
85. Madde 84'e göre yöntem olup, burada, aktive edici RNA, en az 8 adet bitişik nükleotidden oluşan bir kesit boyunca SEKANS KOD NO.: 431-682'de gösterilen nükleotid sekanslarından herhangi biri ile en az %60 oranında özdeşliğe sahip olan bir nükleotid sekansı ihtiva eder.
86. Bir hedef DNA içerisinde yer-spesifik transkripsiyonu modüle etmeyi sağlayan yöntem olup, burada yöntem, hedef DNA'nın aşağıdakilerle temas ettirilmesini içerir:
- (i) bir DNA-hedefleyen RNA veya onu kodlayan bir DNA polinükleotidi, burada DNA-hedefleyen RNA aşağıda sıralanan unsurları ihtiva eder:
- (a) hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı nitelikte bir nükleotid sekansı barındıran bir birinci segment; ve
- (b) bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid ile etkileşime giren bir ikinci segment; ve
- (ii) bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid veya onu kodlayan bir polinükleotid, burada yer-hedefli modifiye edici polipeptid aşağıda sıralanan unsurları bünyesinde barındırır:

(a) DNA-hedefleyen RNA ile etkileşime giren bir RNA-bağlanımlı kısım; ve

(b) transkripsiyonu modüle eden bir aktivite kısmı,

5 burada adı geçen temas, hedef DNA içindeki modüle edici transkripsiyon ile sonuçlanır.

87.Madde 86'ya göre yöntem olup, burada, hedef DNA içerisindeki transkripsiyon artırılır.

10 88.Madde 86'ya göre yöntem olup, burada, hedef DNA içerisindeki transkripsiyon azaltılır.

89.Hedef DNA'da yer-spesifik modifikasyon yapmayı sağlayan bir yöntem olup, burada yöntem aşağıda belirtilen unsurları içerir:

15 hedef DNA'nın aşağıdakilerle temas ettirilmesi:

(i) bir DNA-hedefleyen RNA veya onu kodlayan bir DNA polinükleotidi olup; burada DNA-hedefleyen RNA aşağıda sıralanan unsurları ihtiva eder:

20 (a) hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı nitelikte bir nükleotid sekansı barındıran bir birinci segment; ve

(b) bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid ile etkileşime giren bir ikinci segment; ve

(ii) bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid veya onu kodlayan bir polinükleotid, burada yer-hedefli modifiye edici polipeptid aşağıdakileri içerir:

25

(a) DNA-hedefleyen RNA ile etkileşime giren bir RNA-bağlanımlı kısım; ve

(b) hedef DNA içerisindeki transkripsiyonu modüle eden bir aktivite kısmı.

90. Madde 86'ya göre yöntem olup, burada, yer-hedefli modifiye edici polipeptid hedef DNA içerisindeki transkripsiyonu artırır.

5 91. Madde 86'ya göre yöntem olup, burada, yer-hedefli modifiye edici polipeptid hedef DNA içerisindeki transkripsiyonu azaltır.

92. Bir hücrede bir hedef DNA'nın yer-spesifik yarılıp modifiye edildiği bir yöntem olup, burada yöntem aşağıdakilerin hücreye sokulmasını içerir:

10 (i) bir DNA-hedefleyen RNA veya onu kodlayan bir DNA polinükleotidi olup, burada DNA-hedefleyen RNA aşağıda sıralanan unsurları içerir:

(a) hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı nitelikte bir nükleotid sekansı içeren bir birinci segment; ve

15 (b) bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid ile etkileşime giren bir ikinci segment; ve

(ii) aşağıda sıralanan unsurları bünyesinde barındıran bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid veya onu kodlayan bir polinükleotid, burada yer-hedefli modifiye edici polipeptid aşağıdakileri ihtiva eder:

20 (a) DNA-hedefleyen RNA ile etkileşime giren bir RNA-bağlanımlı kısım; ve

(b) DNA-hedefleyen RNA'nın belirlediği bir yerde hedef DNA'da bir çift iplikçik kırığı oluşmasını sağlayan bir nükleaz aktivitesi sergileyen bir aktivite kısmı;

25

burada çift dizili kırılma alanı DNA hedefleyici RNA tarafından belirlenir, temas, homolog olmatan uç birleştirici ya da homoloji



yönlendirmeli onarmaya izin veren koşullar altında meydana gelir ve hedef DNA, modifiye edilmiş bir DNA sekansı üretmek için klevajlanır ve yeniden birleştirilir.

93. Madde 92'ye göre yöntem olup, yöntem ayrıca, hedef DNA'nın  
5 bir donör polinükleotid ile temas ettirilmesini içerir, burada donör polinükleotid, donör polinükleotidin bir kısmı, donör polinükleotidin bir kopyası ya da donör polinükleotidin bir kopyasının bir kısmı hedef DNA'ya entegre olur.
94. Madde 92'ye göre yöntem olup, yöntem, hücrenin bir donör  
10 polinükleotid ile temas ettirilmesini içermez, burada hedef DNA, hedef DNA içerisindeki nükleotidlerin silinmesini sağlayacak bir modifikasyona uğratılır.
95. Madde 92'ye göre yöntem olup, burada, hücre, aşağıda belirtilen hücrelerden oluşan bir grup içerisinde seçilir: bir arke hücresi, bir  
15 bakteri hücresi, bir ökaryotik hücre, bir ökaryotik tekhücreli organizma, bir somatik hücre, bir germ hücresi, bir kök hücre, bir bitki hücresi, bir alg hücresi, bir hayvan hücresi, bir omurgasız hücre, bir omurgalı hücre, bir balık hücresi, bir kurbağa hücresi, bir kuş hücresi, bir memeli hücresi, bir domuz hücresi, bir  
20 inek hücresi, bir keçi hücresi, bir koyun hücresi, bir kemirgen hücresi, bir sıçan hücresi, bir fare hücresi, insan dışındaki bir primatın hücresi ve bir insan hücresi.
96. Madde 92'ye göre yöntem olup, burada, hücre in vitro ortamdadır.
97. Madde 92'ye göre yöntem olup, burada, hücre in vivo ortamdadır.
- 25
98. Bir denekte bir genetiği değiştirilmiş hücre üretmek için bir yöntem olup, yöntem aşağıdakileri içerir:

(I) bir hücreye aşağıda sıralanan unsurların sokulması:

(i) aşağıda belirtilen unsurları ihtiva eden bir DNA-hedefleyen RNA veya onu kodlayan bir DNA polinükleotidi, burada DNA-hedefleyen RNA aşağıdakileri içerir:

5 (a) hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı nitelikte bir nükleotid sekansı içeren bir birinci segment; ve

(b) bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid ile etkileşime giren bir ikinci segment; ve

10 (ii) aşağıda sıralanan unsurları bünyesinde barındıran bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid veya onu kodlayan bir polinükleotid, burada yer-hedefli modifiye edici polipeptid aşağıdakileri içerir:

(a) DNA-hedefleyen RNA ile etkileşime giren bir RNA-bağımlı kısım; ve

15 (b) DNA-hedefleyen RNA'nın belirlediği bir yerde hedef DNA'da bir çift iplikçik kırığı oluşmasını sağlayan bir nükleaz aktivitesi sergileyen bir aktivite kısmı;

20 burada çift dizi kırılması, DNA-hedefleyen RNA tarafından belirlenir, temas, homolog olmatan uç birleştirmesine ya da homoloji hedefli onarıma izin veren koşullar altında gerçekleştirilir ve hedef DNA, bir modifiye edilmiş DNA sekansını üretmek için klevajlanır ve yeniden birleştirilir;

25 böylece genetik olarak modifiye edilmiş hücre üretilir; ve

(II) genetiği değiştirilmiş hücrenin deneğe transplante edilmesi.

99. Madde 98'e göre yöntem olup, söz konusu yöntem ayrıca, hücrenin bir donör polinükleotid ile de temas ettirilmesini içerir,

burada donör polinükleotid, donör polinükleotidin bir kısmı, donör polinükleotidin bir kopyası ya da donör polinükleotidin bir kopyasının bir kısmı hedef DNA'ya entegre olur.

100. Madde 98'e göre yöntem olup, burada, yöntem hücrenin bir donör polinükleotid ile temas ettirilmesini içermez, burada hedef DNA, hedef DNA içerisindeki nükleotidlerin silinmesini sağlayacak bir modifikasyona uğratılır.
101. Madde 98'e göre yöntem olup, burada hücre, aşağıda belirtilen hücrelerden oluşan bir grup içerisinde seçilir: bir arke hücresi, bir bakteri hücresi, bir ökaryotik hücre, bir ökaryotik tekhücreli organizma, bir somatik hücre, bir germ hücresi, bir kök hücre, bir bitki hücresi, bir alg hücresi, bir hayvan hücresi, bir omurgasız hücre, bir omurgalı hücre, bir balık hücresi, bir amfibi hücresi, bir kuş hücresi, bir memeli hücresi, bir toynaklı hücre, bir kemirgen hücresi, insan dışındaki bir primatın hücresi ve bir insan hücresi.
102. Bir eksojen yer-hedefli modifiye edici polipeptid kodlayan bir nükleotid sekansının bulunduğu bir genetiği değiştirilmiş hücrede hedef DNA'yı modifiye etmeyi sağlayan bir yöntem olup, yöntem genetiği değiştirilmiş hücreye bir DNA-hedefleyen RNA'nın veya onu kodlayan bir DNA polinükleotidinin sokulmasını içerir, burada :
- (i) DNA-hedefleyen RNA şu unsurları içerir:
- (a) hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı nitelikte bir nükleotid sekansı içeren bir birinci segment; ve
- (b) bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid ile etkileşime giren bir ikinci segment; ve
- (ii) bu yer-hedefli modifiye edici polipeptid şunları içerir:

(a) DNA-hedefleyen RNA ile etkileşime giren bir RNA-bağlanımlı kısım; ve

(b) nükleaz aktivitesi sergileyen bir aktivite kısmı.

5 103. Madde 102'ye göre yöntem olup, burada, yer-hedefli modifiye edici polipeptid, Şekil 3'te gösterilen Cas9/Csn1 amino asit sekansının 7-166 veya 731-1003 numaralı amino asitlerinden oluşan kısım ile ya da SEKANS KOD NO.: 1-256 ve 795-1346'da gösterilen amino asit sekanslarından herhangi birindeki mütakabil kısımlar ile en az yaklaşık %75 oranında amino asit sekansı özdeşliğine sahip olan bir amino asit sekansı ihtiva eder.

10 104. Madde 102'ye göre yöntem olup, burada, hücre, aşağıda belirtilen hücrelerden oluşan bir grup içerisinde seçilir: bir arke hücresi, bir bakteri hücresi, bir ökaryotik hücre, bir ökaryotik tekhücreli organizma, bir somatik hücre, bir germ hücresi, bir kök hücre, bir bitki hücresi, bir alg hücresi, bir hayvan hücresi, bir omurgasız hücresi, bir omurgalı hücresi, bir balık hücresi, bir amfibi hücresi, bir kuş hücresi, bir memeli hücresi, bir toynaklı hücresi, bir kemirgen hücresi, insan dışındaki bir primatın hücresi ve bir insan hücresi.

20 105. Madde 102'ye göre yöntem olup, burada hücre in vivo ortamdadır.

106. Madde 102'ye göre yöntem olup, burada hücre in vitro ortamdadır.

25 107. Madde 102'ye göre yöntem olup, burada, yer-hedefli modifiye edici polipeptidin ekspresyonu bir indüklenbilir promotörün kontrolü altındadır.

108. Madde 102'ye göre yöntem olup, burada yer-hedefli modifiye edici polipeptidin ekspresyonu bir hücre tipi-spesifik promotörün kontrolü altındadır.
109. Bir kit olup, aşağıda belirtilen unsurları barındırır:
- 5 (i) Madde 1'e göre DNA-hedefleyen RNA veya onu kodlayan bir DNA polinükleotidi; ve
- (ii) sulandırma ve/veya seyreltme amaçlı bir reaktif.
110. Madde 109'a göre kit olup, ayrıca aşağıda sıralanan unsurlar arasından seçilen bir reaktifi içerir: DNA-hedefleyen RNA'yı
- 10 hücrelere sokmak için kullanılacak bir tampon, bir yıkama tamponu, bir kontrol reaktifi, bir kontrol ekspresyon vektörü veya RNA polinükleotidi, DNA-hedefleyen RNA'yı DNA'dan transkribe etmek için kullanılacak bir reaktif ve bunlardan oluşan kombinasyonlar.
- 15 111. Bir kit olup, aşağıdakileri içerir:
- (i) Madde 44'e göre bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid veya onu kodlayan bir polinükleotid; ve
- (ii) sulandırma ve/veya seyreltme amaçlı bir reaktif.
112. Madde 111'e göre kit olup, ayrıca, kitte, aşağıda sıralanan
- 20 unsurlar arasından seçilen bir reaktif de bulunur: yer-hedefli modifiye edici polipeptidi hücrelere sokmak için kullanılacak bir tampon, bir yıkama tamponu, bir kontrol reaktifi, bir kontrol ekspresyon vektörü veya RNA polinükleotidi, yer-hedefli modifiye edici polipeptidin DNA'dan
- 25 in vitro ortamda üretilmesini sağlamak için kullanılacak bir reaktif ve bunlardan oluşan kombinasyonlar.

113. Bir kit olup aşağıdakileri içerir:
- (i) Madde 60'a göre yer-hedefli modifiye edici polipeptid veya onu kodlayan bir polinükleotid; ve
  - (ii) sulandırma ve/veya seyreltme amaçlı bir reaktif.
- 5 114. Bir kit olup, aşağıdakileri içerir:
- (i) bir DNA-hedefleyen RNA veya onu kodlayan bir DNA polinükleotidi olup, DNA-hedefleyen RNA aşağıda sıralanan unsurları ihtiva eder:
    - (a) bir hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı nitelikte bir nükleotid sekansı içeren bir birinci segment; ve
    - (b) bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid ile etkileşime giren bir ikinci segment ; ve
  - (ii) yer-hedefli modifiye edici polipeptid veya onu kodlayan bir polinükleotid, burada yer-hedefli modifiye edici polipeptid
- 10
- 15 aşağıda sıralanan unsurları ihtiva eder:
- (a) DNA-hedefleyen RNA ile etkileşime giren bir RNA-bağımlı kısım; ve
  - (b) yer-hedefli enzimatik aktivite sergileyen bir aktivite kısmı olup, burada yer-hedefli enzimatik aktivite DNA hedefleyen
- 20 RNA ile belirlenir.
115. Bir kit olup, aşağıdakileri içerir:
- (i) bir DNA-hedefleyen RNA veya onu kodlayan bir DNA polinükleotidi, olup aşağıda sıralanan unsurları ihtiva eder:
    - (a) bir hedef DNA'daki bir sekansı tamamlayıcı nitelikte bir nükleotid sekansı içeren bir birinci segment; ve
    - (b) bir yer-hedefli modifiye edici polipeptid ile etkileşime giren bir ikinci segment; ve
- 25

- (ii) yer-hedefli modifiye edici polipeptid veya onu kodlayan bir polinükleotid, olup aşağıda sıralanan unsurları ihtiva eder:
- (a) DNA-hedefleyen RNA ile etkileşime giren bir RNA-bağlanımlı kısım; ve
- 5 (b) hedef DNA içerisinde transkripsiyon modüle eden bir aktivite kısmı olup, burada hedef DNA içinde modüle edilmiş transkripsiyon yeri, DNA-hedefleyen RNA tarafından belirlenmiştir.
116. Bir kit olup, aşağıda belirtilen unsurları içerir:
- 10 (i) Madde 12'ye göre rekombinan ekspresyon vektörü; ve  
(ii) sulandırma ve/veya seyreltme amaçlı bir reaktif.
117. Bir kit olup, aşağıda belirtilen unsurları içerir:
- (i) Madde 13'e göre rekombinan ekspresyon vektörü; ve  
(ii) sulandırma ve/veya seyreltme amaçlı bir reaktif.
- 15 118. Bir kit olup, aşağıda belirtilen unsurları içerir:
- (i) Madde 7'ye göre rekombinan ekspresyon vektörü; ve  
(ii) sulandırma ve/veya seyreltme amaçlı bir reaktif
119. Bir kit olup, aşağıda belirtilen unsurları içerir:
- 20 (i) Madde 7'ye göre rekombinan ekspresyon vektörü; ve  
(ii) bir yer-hedefli modifiye edici polipeptidi kodlayan bir nükleotid sekansının bulunduğu bir rekombinan ekspresyon vektörü, burada yer-hedefli modifiye edici polipeptidaşağıda sıralanan unsurları ihtiva eder:
- (a) DNA-hedefleyen RNA ile etkileşime giren bir RNA-bağlanımlı kısım; ve
- 25 (b) yer-hedefli enzimatik aktivite sergileyen bir aktivite kısmı, burada enzimatik aktivite yeri DNA-hedefleyen RNA tarafından belirlenir.

120. Bir kit olup, aşağıda belirtilen unsurları içerir:
- (i) Madde 7'ye göre rekombinan ekspresyon vektörü; ve
  - (ii) bir yer-hedefli modifiye edici polipeptidi kodlayan bir nükleotid sekansının bulunduğu bir rekombinan ekspresyon vektörü, burada yer-hedefli modifiye edici polipeptid aşağıda sıralanan unsurları ihtiva eder:
    - (a) DNA-hedefleyen RNA ile etkileşime giren bir RNA-bağımlı kısım; ve
    - (b) hedef DNA içerisinde modüle edilmiş transkripsiyon yerinin, DNA-hedefleyen RNA tarafından belirlendiği, hedef DNA içerisindeki transkripsiyonu modüle eden bir aktivite kısmı.
121. Hedef DNA'yı hedef almayı sağlayan bir kit olup, aşağıdakileri içerir: Madde 1'e göre iki veya daha fazla sayıda DNA-hedefleyen RNA veya bunları kodlayan DNA polinükleotidleri; burada iki veya daha fazla sayıdaki DNA-hedefleyen RNA'dan en az birinin birinci segmenti, iki veya daha fazla sayıdaki DNA-hedefleyen RNA'dan diğerinin veya diğerlerinden en az birinin birinci segmentinden en az bir nükleotid bakımından farklılık gösterir.
122. Bir konakçı hücredeki bir hedef DNA'nın transkripsiyonunu seçici olarak modüle etmeyi sağlayan bir yöntem sağlar, burada yöntem konakçı hücrenin içerisine aşağıda sıralanan unsurların sokulmasını içerir:
- a) bir DNA-hedefleyen RNA ya da DNA-hedefleyen RNA'yı kodlayan bir nükleotid sekansının bulunduğu bir nükleik asit; burada DNA hedefleyen RNA aşağıdakileri içerir:



- 5
- i) hedef DNA'daki bir hedef sekansı tamamlayıcı olan bir nükleotit sekansını içeren bir birinci segment;
  - ii) bir yer hedefli polipeptit ile etkileşen bir ikinci segment;
  - ve
  - iii) bir stabilite kontrol sekansı; ve

10

b) bir varyant Cas9 yer-hedefli polipeptidi ya da varyant Cas9 polipeptidini kodlayan bir nükleotid sekansının bulunduğu bir nükleik asit, burada varyant Cas9 yer-hedefli polipeptidi içerir:

- 15
- i) DNA hedefleyen RNA ile etkileşen bir RNA bağlayıcı kısım; ve
  - ii) azaltılmış endodeoksiribonükleaz aktivitesi sergileyen bir aktivite kısmı,

20

burada adı geçen DNA hedefleyici RNA ve adı geçen varyant Cas9 polipeptidi hücre içinde bir kompleksi meydana getirir ve burada adı geçen kompleks seçici olarak hücre içindeki bir hedef DNA'nın transkripsiyonunu modüle eder.

25

123. Madde 122'ye göre yöntem olup, burada varyant Cas9 yer-hedefli polipeptidi, hedef DNA'nın tamamlayıcı olmayan dizisini yarabilir ancak hedef DNA'nın tamamlayıcı dizisini yarma bakımından azaltılmış bir kabiliyete sahiptir.

124. Madde 123'e göre yöntem olup, burada varyant yer-hedefli polipeptid, Şekil 39A'da gösterilen amino asit sekansının bir H840A mutasyonunu ya da SEKANS KOD NO: 1-256 ve 795-

1346'da ifade edilen amino asit sekanslarından herhangi birindeki karşılık gelen mutasyonu içerir.

5 125. Madde 122'ye göre yöntem olup, varyant yer-hedefli polipeptid, hedef DNA'nın tamamlayıcı dizisini yarabilir ancak hedef DNA'nın tamamlayıcı olmayan dizisini yarma bakımından azaltılmış bir kabiliyete sahiptir.

10 126. Madde 125'e göre yöntem olup, burada varyant yer-hedefli polipeptid, Şekil 39A'da gösterilen amino asit sekansının bir D10A mutasyonunu ya da SEKANS KOD NO: 1-256 ve 795-1346'da ifade edilen amino asit sekanslarından herhangi birindeki karşılık gelen mutasyonu içerir.

15 127. Madde 122'ye göre yöntem olup, varyant yer-hedefli polipeptid, hedef DNA'nın tamamlayıcı dizisini yarma bakımından azaltılmış bir kabiliyete sahiptir ve hedef DNA'nın tamamlayıcı olmayan dizisini yarma bakımından azaltılmış bir kabiliyete sahiptir.

20 128. Madde 127'ye göre yöntem olup, burada varyant yer-hedefli polipeptid, hem (i) Şekil 41'de gösterilen amino asit sekansının bir D10A mutasyonunu ya da SEKANS KOD NO: 1-256 ve 795-1346'da ifade edilen amino asit sekanslarından herhangi birindeki karşılık gelen mutasyonu içerir; hem de (ii) SEKANS KOD NO: 8'in bir H840A mutasyonunu ya da SEKANS KOD NO: 1-256 ve 795-1346'da ifade edilen amino asit sekanslarından herhangi birindeki karşılık gelen mutasyonu içerir.

25

129. Madde 122'ye göre yöntem olup, burada konak hücre bir prokaryotik hücredir.

130. Madde 122'ye göre yöntem olup, burada konak hücre bir ökaryotik hücredir.
131. Madde 130'a göre yöntem olup, burada ökaryotik hücre bir memeli hücrelidir.
- 5 132. Madde 122'ye göre yöntem olup, burada hedef DNA'nın transkripsiyonu, kompleksin yokluğunda hedef DNA'nın transkripsiyonuna kıyasla en az yaklaşık %10 oranında inhibe edilir.
133. Madde 122'ye göre yöntem olup, burada varyant Cas9 yer-  
10 hedefli polipeptidi, bir heterolog polipeptidi içerir.
134. Madde 133'e göre yöntem olup, burada heterolog polipeptit, bir alt hücrel lokalizasyon sekansını, bir saptanabilir etiketi, bir stabilite kontrol peptidini, bir transkripsiyon modülasyon sekansını, bir protein bağlayıcı sekansı ya da bunların bir  
15 kombinasyonunu içerir.
135. Madde 134'e göre yöntem olup, burada heterolog polipeptit, bir stabilite kontrol peptidini içerir.
136. Madde 135'e göre yöntem olup, burada stabilite kontrol peptidi, bir degran sekansını içerir.
- 20 137. Madde 133'e göre yöntem olup, burada heterolog polipeptit aşağıdakilerden meydana gelen gruptan seçilir: bir transkripsiyonel aktivatör, bir transkripsiyonel represör, bir histon lizin metiltransferazı, bir histon lizin demetilazı, bir histon lizin asetiltransferazı, bir histon lizin deasetilazı, bir DNA  
25 metilazı, bir DNA demetilazı, bir sınır elemanı, bir dışkenar katma elemanı, bir protein yerleştirme elemanı ve bunların kombinasyonları.

138. Madde 133'e göre yöntem olup, burada hedef DNA'nın transkripsiyonu, kompleksin yokluğunda hedef DNA'nın transkripsiyonuna kıyasla en az yaklaşık 1.2 kat arttırılır.
139. Madde 138'e göre yöntem olup, burada heterolog polipeptit, aşağıdakilerden meydana gelen gruptan seçilir: bir transkripsiyonel aktivatör, bir histon lizin metiltransferazı, bir histon lizin demetilazı, bir histon lizin asetiltransferazı, bir DNA demetilazı, bir protein yerleştirme elemanı ve bunların kombinasyonları.
140. Madde 122'ye göre yöntem olup, burada DNA hedefleyen RNA, tek moleküllü DNA hedefleyici RNA'dır.
141. Madde 122'ye göre yöntem olup, burada DNA hedefleyen RNA, iki moleküllü DNA hedefleyici RNA'dır.
142. Madde 122'ye göre yöntem olup, ayrıca, konak hücreye bir ikinci DNA-hedefleyici RNA'nın ya da ikinci DNA hedefleyici RNA'yı kodlayan bir nükleotit sekansı içeren bir nükleik asidin sokulmasını içerir, burada ikinci DNA hedefleyen RNA, hedef DNA'daki bir ikinci hedef sekansı tamamlayıcı olan bir nükleotit sekansını içeren bir birinci segmenti; yer hedefli polipeptit ile etkileşen bir ikinci segmenti; ve bir stabilite kontrol sekansını içerir.
143. Madde 122'ye göre yöntem olup, burada ikinci segment, yaklaşık 30 nükleotit ile yaklaşık 60 nükleotit arasında bir uzunluğa sahiptir ve aşağıdakiler arasından seçilen bir nükleotit sekansı ile en az yaklaşık %95 nükleotit sekans özdeşliğine sahip bir nükleotit sekansını içerir:
- 1) 5'-GUUUUAGAGCUA-(linker)-UAGCAAGUUAAAA-3';
  - 2) 5'-GUUUAGAGCUG-(linker)-CAGCAAGUUAAAA-3';

- 3) 5'-GUUUUAGAGCUG-(finker)-CAGCGAGUUAAA-3';  
 4) 5'-GUUUUUGUACUCU-(linker)-AGAAGCUACAAAGAU-3';  
 5) 5'-GUUGUAGCUCC-(linker)-GUUGCUACAAU-3'; ve  
 5 6) 5'-GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCG-3'.

144. Aşağıdakileri içeren bir DNA hedefleyen RNA'yı kodlayan bir nükleotit sekansını içeren bir izole edilmiş nükleik asittir:
- 10 a) hedef DNA'daki bir hedef sekansı tamamlayıcı olan bir nükleotit sekansını içeren bir birinci segment;
- b) bir yer hedefli polipeptit ile etkileşen bir ikinci segment; ve
- c) bir stabilite kontrol sekansı.
145. Madde 144'e göre izole edilmiş nükleik asit olup, burada DNA hedefleyen RNA'yı kodlayan nükleotit sekansı, faal olarak bir
- 15 promotöre bağlıdır.
146. Madde 144'e göre izole edilmiş nükleik asit olup, burada nükleik asit ayrıca doğal tip Cas9'a kıyasla azaltılmış enodeoksiribonükleaz aktivite sergileyen bir varyant Cas9 yer hedefli polipeptidi kodlayan bir nükleotit sekansını içerir.
- 20 147. Madde 146'ye göre izole edilmiş nükleik asit olup, burada varyant Cas9 yer hedefli polipeptidi kodlayan nükleotit sekansı faal olarak bir promotöre bağlıdır.
148. Madde 24'e göre nükleik asidi içeren bir rekombinant ekspresyon vektörü.
- 25 149. Madde 24'e göre izole edilmiş nükleik asidi ya da Madde 28'in rekombinant ekspresyon vektörünü içeren bir genetik olarak modifiye edilmiş konak hücre.

150. Çok sayıda elemanı içeren bir nükleik asit kütüphanesi, burada her bir eleman nükleik asit, aşağıdakileri içeren bir DNA hedefleyen RNA'yı kodlayan bir nükleotit sekansını içerir:

- 5 a) hedef DNA'daki bir hedef sekansı tamamlayıcı olan bir nükleotit sekansını içeren bir birinci segment;  
 b) bir yer hedefli polipeptit ile etkileşen bir ikinci segment; ve  
 c) bir stabilite kontrol sekansı;

10 burada her bir eleman, birinci segmentin nükleotit sekansındaki kütüphanenin diğer elemanlarından farklılaşır.

151. Madde 150'ye göre bir kütüphane olup, burada DNA hedefleyen RNA'yı kodlayan nükleotit sekansı, faal olarak bir promotöre bağlıdır.

15 152. Bir kit olup, aşağıdakileri içerir:

- a) bir DNA hedefleyen RNA ya da DNA hedefleyen RNA'yı kodlayan bir nükleotit sekansını içeren bir nükleik asit, burada DNA hedefleyen RNA aşağıdakileri içerir:
- 20 i) hedef DNA'daki bir hedef sekansı tamamlayıcı olan bir nükleotit sekansını içeren bir birinci segment;  
 ii) bir yer hedefli polipeptit ile etkileşen bir ikinci segment; ve  
 iii) bir stabilite kontrol sekansı; ve
- 25 b) bir tampon.

153. Madde 152'ye göre, ayrıca doğal tip Cas9'a kıyasla azaltılmış enodeoksiribonükleaz aktivite sergileyen bir varyant Cas9 yer hedefli polipeptidi içerir.

154. Madde 152'ye göre kit olup, burada DNA hedefleyen RNA'yı kodlayan bir nükleotit sekansı içeren nükleik asit, doğal tip Cas9'a kıyasla azaltılmış enodeksiribonükleaz aktivite sergileyen bir varyant Cas9 yer hedefli polipeptidi kodlayan bir nükleotit sekansını içerir.

5

155. Madde 152'ye göre kit olup, ayrıca doğal tip Cas9'a kıyasla azaltılmış enodeksiribonükleaz aktivite sergileyen bir varyant Cas9 yer hedefli polipeptidi kodlayan bir nükleotit sekansını içeren bir nükleik asidi içerir.

10

## **TARİFNAME İÇERİSİNDE ATIF YAPILAN REFERANSLAR**

Başvuru sahibi tarafından atıf yapılan referanslara ilişkin bu liste, yalnızca okuyucunun yardımı içindir ve Avrupa Patent Belgesinin bir kısmını oluşturmaz. Her ne kadar referansların derlenmesine büyük önem verilmiş olsa da, hatalar veya eksiklikler engellenememektedir ve EPO bu bağlamda hiçbir sorumluluk kabul etmemektedir.

### **Tarifname içerisinde atıfta bulunulan patent dökümanları:**

- WO 2011072246 A [0002]
- US 7169874 B [0058] [0430]
- WO 2001018048 A [0058] [0430]
- US 7029913 B [0090]
- US 5843780 A [0090]
- US 6200806 B [0090]
- WO 9920741 A [0090]
- WO 0151616 A [0090]
- WO 03020920 A [0090]
- US 7153684 B [0091]
- US 20090047263 A [0092]
- US 20090068742 A [0092]
- US 20090191159 A [0092]
- US 20090227032 A [0092]
- US 20090246875 A [0092]
- US 20090304646 A [0092]
- US 5489677 A [0143]
- US 5602240 A [0143]
- US 5034506 A [0144] [0148]
- US 5539082 A [0147]
- US 5714331 A [0147]
- US 5719262 A [0147]
- WO 9839352 A [0151]
- WO 9914226 A [0151]
- US 3687808 A [0155]
- US 7078387 B [0165] [0193] [0225] [0418]
- WO 9412649 A [0166] [0194] [0226] [0419]
- WO 9303769 A [0166] [0194] [0226] [0419]
- WO 9319191 A [0166] [0194] [0226] [0419]
- WO 9428938 A [0166] [0194] [0226] [0419]
- WO 9511984 A [0166] [0194] [0226] [0419]
- WO 9500655 A [0166] [0194] [0226] [0419]
- WO 9309239 A [0166] [0194] [0226] [0419]
- US 20030220334 A [0236]
- US 20030083256 A [0236]
- US 20030032593 A [0236]
- US 20030022831 A [0236]
- US 5222982 A [0255] [0259]
- US 5385582 A [0255] [0259]
- US 20070254842 A [0255] [0259]
- US 20080081064 A [0255] [0259]
- US 20090196903 A [0255] [0259]
- US 5451513 A [0323]
- US 5545817 A [0323]
- US 5545818 A [0323]
- US 5576198 A [0323]
- WO 9516783 A [0323]



### Tarifnamede belirtilen patentleştirilmemiş literatür:

- **SAMBROOK, J. ; FRITSCH, E. F. ; MANIATIS, T.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0040]
- 2001. **SAMBROOK, J. ; RUSSELL, W.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press [0040]
- **ALTSCHUL et al.** J. Mol. Biol., 1990, vol. 215, 403-410 [0042]
- **ZHANG ; MADDEN.** Genome Res., 1997, vol. 7, 649-656 [0042]
- **SMITH; WATERMAN.** Adv. Appl. Math., 1981, vol. 2, 482-489 [0042]
- **ALTSCHUL et al.** J. Mol. Bioi., 1990, vol. 215, 403-10 [0047]
- **MIYAGISHI et al.** Nature Biotechnology, 2002, vol. 20, 497-500 [0052] [0424]
- **XIA et al.** Nucleic Acids Res., September 2003, vol. 1;31, 17 [0052] [0424]
- **CHEN et al.** Cell, 1987, vol. 51, 7-19 [0055] [0427]
- **LLEWELLYN et al.** Nat. Med., 2010, vol. 16 (10), 1161-1166 [0055] [0427]
- **TOZZO et al.** Endocrinol, 1997, vol. 138, 1604 [0056][0428]
- **ROSS et al.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, vol. 87, 9590 [0056]
- **PAVJANI et al.** Nat. Med., 2005, vol. 11, 797 [0056] [0428]
- **KNIGHT et al.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003, vol. 100, 14725 [0056]
- **KURIKI et al.** Biol. Pharm. Bull., 2002, vol. 25, 1476 [0056] [0428]
- **SATO et al.** J. Biol. Chem., 2002, vol. 277, 15703 [0056] [0428]
- **TABOR et al.** J. Biol. Chem., 1999, vol. 274, 20603 [0056] [0428]
- **MASON et al.** Endocrinol, 1998, vol. 139, 1013 [0056] [0428]
- **CHEN et al.** Biochem. Biophys. Res. Comm., 1999, vol. 262, 187 [0056] [0428]
- **KITA et al.** Biochem. Biophys. Res. Comm., 2005, vol. 331, 484 [0056] [0428]
- **CHAKRABARTI.** Endocrinol, 2010, vol. 151, 2408 [0056] [0428]
- **PLATT et al.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, vol. 86, 7490 [0056]
- **SEO et al.** Molec. Endocrinol, 2003, vol. 17, 1522 [0056]
- **FRANZ et al.** Cardiovasc. Res., 1997, vol. 35, 560-566 [0057] [0429]
- **OH et al.** Gene Ther, 2009, vol. 16, 437 [0055] [0427]
- **SASAOKA et al.** Mol. Brain Res., 1992, vol. 16, 274 [0055] [0427]
- **BOUNDY et al.** J. Neurosci., 1998, vol. 18, 9989 [0055] [0427]
- **KANEDA et al.** Neuron, 1991, vol. 6, 583-594 [0055] [0427]
- **RADOVICK et al.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, vol. 88, 3402-3406 [0055]
- **OBERDICK et al.** Science, 1990, vol. 248, 223-226 [0055] [0427]
- **BARTGE et al.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, vol. 85, 3648-3652 [0055]
- **COMB et al.** EMBO J., 1988, vol. 17, 3793-3805 [0055] [0427]
- **MAYFORD et al.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, vol. 93, 13250 [0055]
- **CASANOVA et al.** Genesis, 2001, vol. 31, 37 [0055] [0427]
- **LIU et al.** Gene Therapy, 2004, vol. 11, 52-60 [0055] [0427]
- **TAKAHASHI.** Cell, November 2007, vol. 30;131 (5), 861-72 [0089]
- **TAKAHASHI.** Nat Protoc., 2007, vol. 2 (12), 3081-9 [0089]
- **YU.** Science, December 2007, vol. 21;318 (5858), 1917-20 [0089]
- **THOMSON et al.** Science, 1998, vol. 282, 1145 [0090]
- **THOMSON.** Proc. Natl. Acad. Sci USA, 1995, vol. 92, 7844 [0090]
- **THOMSON et al.** Biol. Reprod., 1996, vol. 55, 254 [0090]
- **SHAMBLOTT et al.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, vol. 95, 13726 [0090]
- **MATSUI, Y. et al.** Cell, 1992, vol. 70, 841 [0091]
- **SHAMBLOTT, M. et al.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001, vol. 98, 113 [0091]
- **SHAMBLOTT, M. et al.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, vol. 95, 13726 [0091]
- **KOSHIMIZU, U. et al.** Development, 1996, 122 [0091]
- **SAMBROOK et al.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. HarBor Laboratory Press, 2001 [0101]
- Short Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, 1999 [0101]
- **BOLLAG et al.** Protein Methods. John Wiley & Sons, 1996 [0101]

- **ROBBINS et al.** Ann. N.Y. Acad. Sci., 1995, vol. 752, 492-505 [0057] [0429]
- **LINN et al.** Circ. Res., 1995, vol. 76, 584-591 [0057] [0429]
- **PARMACEK et al.** Mol. Cell. Biol., 1994, vol. 14, 1870-1885 [0057] [0429]
- **HUNTER et al.** Hypertension, 1993, vol. 22, 608-617 [0057] [0429]
- **SARTORELLI et al.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, vol. 89, 4047-4051 [0057] [0429]
- **AKYUREK et al.** Mol. Med., 2000, vol. 6, 983 [0058] [0430]
- **KIM et al.** Mol. Cell. Biol., 1997, vol. 17, 2266-2278 [0058] [0430]
- **LI et al.** J. Cell Biol., 1996, vol. 132, 849-859 [0058] [0430]
- **MOESSLER et al.** Development, 1996, vol. 122, 2415-2425 [0058] [0430]
- **YOUNG et al.** Ophthalmol. Vis. Sci., 2003, vol. 44, 4076 [0059]
- **NICOUD et al.** J. Gene Med., 2007, vol. 9, 1015 [0059] [0431]
- **YOKOYAMA et al.** Exp Eye Res., 1992, vol. 55, 225 [0059] [0431]
- **PANYAM.** Adv Drug Deliv Rev., September 2012, vol. 13, 0169-409 [0070] [0172] [0200] [0415]
- **AUSUBEL et al.** Short Protocols in Molecular Biology. Wiley & Sons, 1995 [0071]
- **MORRISON et al.** Cell, 1997, vol. 88, 287-298 [0087]
- **ENGLISCH et al.** Angewandte Chemie, International Edition, 1991, vol. 30, 613 [0155]
- **SANGHVI, Y. S.** Antisense Research and Applications. CRC Press, 1993, 289-302 [0155]
- Antisense Research and Applications. CRC Press, 1993, 276-278 [0155]
- **LETSINGER et al.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, vol. 86, 6553-6556 [0157]
- **MANOHARAN et al.** Bioorg. Med. Chem. Let., 1994, vol. 4, 1053-1060 [0157]
- **MANOHARAN et al.** Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, vol. 660, 306-309 [0157]
- **MANOHARAN et al.** Bioorg. Med. Chem. Let., 1993, vol. 3, 2765-2770 [0157]
- **OBERHAUSER et al.** Nucl. Acids Res., 1992, vol. 20, 533-538 [0157]
- **SAISON-BEHMOARAS et al.** EMBO J., Nonviral Vectors for Gene Therapy. Academic Press, 1999 [0101]
- **Viral Vectors.** Academic Press, 1995 [0101]
- **Immunology Methods Manual.** Academic Press, 1997 [0101]
- **DOYLE; GRIFFITHS.** Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology. John Wiley & Sons, 1998 [0101]
- **NAKAMURA et al.** Genes Cells, May 2012, vol. 17 (5), 344-64 [0122] [0343]
- **VAVALLE et al.** Future Cardiol, May 2012, vol. 8 (3), 371-82 [0122] [0343]
- **CITARTAN et al.** Biosens Bioelectron, April 2012, vol. 15;34 (1), 1-11 [0122] [0343]
- **LIBERMAN et al.** Rev RNA. Wiley Interdiscip, May 2012, vol. 3, 369-84 [0122] [0343]
- **DWAINE A. BRAASCH ; DAVID R. COREY.** Biochemistry, 2002, vol. 41 (14), 4503-4510 [0148]
- **WANG et al.** J. Am. Chem. Soc., 2000, vol. 122, 8595-8602 [0149]
- **SINGH et al.** Chem. Commun., 1998, vol. 4, 455-456 [0150]
- **WAHLESTEDT et al.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2000, vol. 97, 5633-5638 [0150]
- **KOSHKIN et al.** Tetrahedron, 1998, vol. 54, 3607-3630 [0151]
- **MARTIN et al.** Helv. Chim. Acta, 1995, vol. 78, 486-504 [0152]
- The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering. John Wiley & Sons, 1990, 858-859 [0155]
- **JOMARY et al.** Gene Ther, 1997, vol. 4, 683-690 [0166] [0194] [0226]
- **ROLLING et al.** Hum Gene Ther, 1999, vol. 10, 641-648 [0166] [0194] [0226] [0419]
- **ALI et al.** Hum Mol Genet, 1996, vol. 5, 591-594 [0166] [0194] [0226]
- **SAMULSKI et al.** J. Vir., 1989, vol. 63, 3822-3828 [0166] [0194] [0226] [0419]
- **MENDELSON et al.** Virol, 1988, vol. 166, 154-165 [0166] [0194] [0226] [0419]
- **FLOTTE et al.** PNAS, 1993, vol. 90, 10613-10617 [0166] [0194] [0226] [0419]
- **MIYOSHI et al.** PNAS, 1997, vol. 94, 10319-23 [0166] [0194] [0226] [0419]
- **TAKAHASHI et al.** J Virol, 1999, vol. 73, 7812-7816 [0166] [0194] [0226] [0419]
- **BITTER et al.** Methods in Enzymology, 1987, vol. 153, 516-544 [0168] [0196] [0229] [0421]

- 1991, vol. 10, 1111-1118 [0157]
- **KABANOV et al.** FEBS Lett., 1990, vol. 259, 327-330 [0157]
  - **SVINARCHUK et al.** Biochimie, 1993, vol. 75, 49-54 [0157]
  - **MANOHARAN et al.** Tetrahedron Lett., 1995, vol. 36, 3651-3654 [0157]
  - **SHEA et al.** Nucl. Acids Res., 1990, vol. 18, 3777-3783 [0157]
  - **MANOHARAN et al.** Nucleosides & Nucleotides, 1995, vol. 14, 969-973 [0157]
  - **MANOHARAN et al.** Tetrahedron Lett., 1995, vol. 36 [0157]
  - **MISHRA et al.** Biochim. Biophys. Acta, 1995, vol. 1264, 229-237 [0157]
  - **CROOKE et al.** J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, vol. 277, 923-937 [0157]
  - **ZENDER et al.** Cancer Gene Ther., 2002, vol. 9 (6), 489-96 [0158]
  - **NOGUCHI et al.** Diabetes, 2003, vol. 52 (7), 1732-1737 [0158]
  - **TREHIN et al.** Pharm. Research, 2004, vol. 21, 1248-1256 [0158]
  - **WENDER et al.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, vol. 97, 13003-13008 [0158]
  - **AGUILERA et al.** Integr Biol (Camb), June 2009, vol. 1 (5-6), 371-381 [0158]
  - **LI et al.** Invest Ophthalmol Vis Sci, 1994, vol. 35, 2543-2549 [0166] [0194] [0226]
  - **BORRAS et al.** Gene Ther, 1999, vol. 6, 515-524 [0166] [0194] [0226] [0419]
  - **LI; DAVIDSON.** PNAS, 1995, vol. 92, 7700-7704 [0166] [0194] [0226]
  - **SAKAMOTO et al.** H Gene Ther, 1999, vol. 5, 1088-1097 [0166] [0194] [0226] [0419]
  - **ALI et al.** Hum Gene Ther, 1998, vol. 9, 81-86 [0166] [0194] [0226] [0419]
  - **FLANNERY et al.** PNAS, 1997, vol. 94, 6916-6921 [0166] [0194] [0226] [0419]
  - **BENNETT et al.** Invest Ophthalmol Vis Sci, 1997, vol. 38, 2857-2863 [0166] [0194] [0226] [0419]
  - **GORDON-KAMM.** Plant Cell, 1990, vol. 2, 603-618 [0323]
  - **WEEKS et al.** Plant Physiol, 1993, vol. 102, 1077-1084 [0323]
  - **VASIL.** Bio/Technolo, 1993, vol. 10, 667-674 [0323]
  - **WAN; LEMEAUX.** Plant Physiol, 1994, vol. 104, 37-48 [0323]
  - **KAWAI et al.** Bioeng Bugs., November 2010, vol. 1 (6), 395-403 [0220]
  - **TANKA et al.** Nature, March 2004, vol. 18;428 (6980), 323-8 [0220]
  - **ANGEL ; YANIK.** PLoS ONE, 2010, vol. 5 (7), e11756 [0231]
  - **BEUMER et al.** Efficient gene targeting in Drosophila by direct embryo injection with zinc-finger nucleases. PNAS, 2008, vol. 105 (50), 19821-19826 [0231]
  - **FUTAKI et al.** Curr Protein Pept Sci., April 2003, vol. 4 (2), 87-9 [0236]
  - **WENDER et al.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, November 2000, vol. 21; 97 (24), 13003-8 [0236]
  - **CHANG et al.** Proc. Natl. Acad. Sci USA, 1987, vol. 84, 4959-4963 [0250]
  - **NEHLS et al.** Science, 1996, vol. 272, 886-889 [0250]
  - Remington's Pharmaceutical Sciences. Mace Publishing Company, Philadelphia, 1985 [0266]
  - **LANGER.** Science, 1990, vol. 249, 1527-1533 [0266]
  - **CHO et al.** Curr Protoc Cell Biol., March 2009 [0308]
  - **GAMA et al.** Brain Struct Funct., March 2010, vol. 214 (2-3), 91-109 [0308]
  - **HUSAINI et al.** GM Crops., June 2011, vol. 2 (3), 150-62 [0308]
  - Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology. CRC Press, 1993 [0321]
  - **KLEIN et al.** Nature, 1987, vol. 327, 70-73 [0322]
  - **WEISSBACH ; WEISSBACH.** Methods for Plant Molecular Biology. Academic Press, 1989 [0323]
  - **GELVIN et al.** Plant Molecular Biology Manual. Kluwer Academic Publishers, 1990 [0323]
  - **HERRERA-ESTRELLA et al.** Nature, 1983, vol. 303, 209 [0323]
  - **BEVAN.** Nucl Acid Res., 1984, vol. 12, 8711-8721 [0323]
  - **KLEE.** Bio/Technolo, 1985, vol. 3, 637-642 [0323]
  - **CHRISTOU.** Bio/Technology, 1991, vol. 9, 957-9, 4462 [0323]
  - **YOUNG et al.** Ophthalmol. Vis. Sci., 2003, vol. 44, 4076 [0431]
  - **B. WIEDENHEFT ; S. H. STERNBERG ; J. A. DOUDNA.** Nature, 2012, vol. 482, 331 [0524]

- **ISHIDA et al.** Nature Biotech, 1996, vol. 14, 745-750 [0323]
- **DANIELI et al.** Nat. Biotechnol, 1998, vol. 16, 345-348 [0323]
- **STAUB et al.** Nat. Biotechnol, 2000, vol. 18, 333-338 [0323]
- **O'NEILL et al.** Plant J., 1993, vol. 3, 729-738 [0323]
- **KNOBLAUCH et al.** Nat. Biotechnol, vol. 17, 906-909 [0323]
- **BOYNTON et al.** Methods in Enzymology, 1993, vol. 217, 510-536 [0323]
- **SVAB et al.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, vol. 90, 913-917 [0323]
- **MCBRIDE et al.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, vol. 91, 7301-7305 [0323]
- **DOHMEN et al.** Science, 1994, vol. 263 (5151), 1273-1276 [0406]
- **SCHOEBER et al.** Am J Physiol Renal Physiol., January 2009, vol. 296 (1), F204-11 [0406]
- **CHU et al.** Bioorg Med Chem Lett., November 2008, vol. 15;18 (22), 5941-4 [0406]
- **KANEMAKI.** Pflugers Arch., 28 December 2012 [0406]
- **YANG et al.** Mol Cell, November 2012, vol. 30;48 (4), 487-8 [0406]
- **BARBOUR et al.** Biosci Rep., January 2013, vol. 18;33, 1 [0406]
- **GREUSSING et al.** J Vis Exp., November 2012, vol. 10, 69 [0406]
- **LI et al.** Invest Ophthalmol Vis Sci, 1994, vol. 35, 2543-2549 [0419]
- **LI; DAVIDSON.** PNAS, 1995, vol. 92, 7700-7704 [0419]
- **JOMARY et al.** Gene Ther, 1997, vol. 4, 683-690 [0419]
- **ALI et al.** Hum Mol Genet, 1996, vol. 5, 591-594 [0419]
- **RADOVICK et al.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, vol. 88, 3402-3406 [0427]
- **BARTGE et al.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, vol. 85, 3648-3652 [0427]
- **MAYFORD et al.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, vol. 93, 13250 [0427]
- **ROSS et al.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, vol. 87, 9590 [0428]
- **KNIGHT et al.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003, vol. 100, 14725 [0428]
- **PLATT et al.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, vol. 86, 7490 [0428]
- **SEO et al.** Molec. Endocrinol., 2003, vol. 17, 1045-1052 [0428]
- **D. BHAYA ; M. DAVISON ; R. BARRANGOU.** Annu. Rev. Genet., 2011, vol. 45, 273 [0524]
- **M. P. TERNS ; R. M. TERNS.** Curr. Opin. Microbiol., 2011, vol. 14, 321 [0524]
- **E. DELTCHEVA et al.** Nature, 2011, vol. 471, 602 [0524]
- **J. CARTE ; R. WANG ; H. LI ; R. M. TERNS ; M. P. TERNS.** Genes Dev., 2008, vol. 22, 3489 [0524]
- **R. E. HAURWITZ ; M. JINEK ; B. WIEDENHEFT ; K. ZHOU ; J. A. DOUDNA.** Science, 2010, vol. 329, 1355 [0524]
- **R. WANG ; G. PREAMPLUME ; M. P. TERNS ; R. M. TERNS ; H. LI.** Structure, 2011, vol. 19, 257 [0524]
- **E. M. GESNER ; M. J. SCHELLENBERG ; E. L. GARSIDE ; M. M. GEORGE ; A. M. MACMILLAN.** Nat. Struct. Mol. Biol., 2011, vol. 18, 688 [0524]
- **A. HATOUM-ASLAN ; I. MANIV ; L. A. MARRAFFINI.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2011, vol. 108, 21218 [0524]
- **S. J. J. BROUNS et al.** Science, 2008, vol. 321, 960 [0524]
- **D. G. SASHITAL ; M. JINEK ; J. A. DOUDNA.** Nat. Struct. Mol. Biol., 2011, vol. 18, 680 [0524]
- **N. G. LINTNER et al.** J. Biol. Chem., 2011, vol. 286, 21643 [0524]
- **E. SEMENOVA et al.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2011, vol. 108, 10098 [0524]
- **B. WIEDENHEFT et al.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2011, vol. 108, 10092 [0524]
- **B. WIEDENHEFT et al.** Nature, 2011, vol. 477, 486 [0524]
- **C. R. HALE et al.** Cell, 2009, vol. 139, 945 [0524]
- **J. A. L. HOWARD ; S. DELMAS ; I. IVANCIC-BACE ; E. L. BOLT.** Biochem. J., 2011, vol. 439, 85 [0524]
- **E. R. WESTRA et al.** Mol. Cell, 2012, vol. 46, 595 [0524]
- **C. R. HALE et al.** Mol. Cell, 2012, vol. 45, 292 [0524]
- **J. ZHANG et al.** Mol. Cell, 2012, vol. 45, 303 [0524]
- **K. S. MAKAROVA et al.** Nat. Rev. Microbiol., 2011, vol. 9, 467 [0524]
- **K. S. MAKAROVA ; N. V. GRISHIN ; S. A. SHABALINA ; Y. I. WOLF ; E. V.**

- 17, 1522 [0428]
- **G. K. TAYLOR; D. F. HEITER ; S. PIETROKOVSKI ; B. L. STODDARD.** *Nucleic Acids Res.*, 2011, vol. 39, 9705 [0524]
  - **H. DEVEAU et al.** *J. Bacteriol.*, 2008, vol. 190, 1390 [0524]
  - **B. P. LEWIS; C. B. BURGE ; D. P. BARTEL.** *Cell*, 2005, vol. 120, 15 [0524]
  - **G. HUTVAGNER ; M. J. SIMARD.** *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2008, vol. 9, 22 [0524]
  - **F. J. M. MOJICA ; C. DIEZ-VILLASENOR ; J. GARCIA-MARTINEZ ; C. ALMENDROS.** *Microbiology*, 2009, vol. 155, 733 [0524]
  - **L. A. MARRAFFINI ; E. J. SONTHEIMER.** *Nature*, 2010, vol. 463, 568 [0524]
  - **D. G. SASHITAL ; B. WIEDENHEFT ; J. A. DOUDNA.** *Mol. Cell*, 2012, vol. 46, 606 [0524]
  - **M. CHRISTIAN et al.** *Genetics*, 2010, vol. 186, 757 [0524]
  - **J. C. MILLER et al.** *Nat. Biotechnol.*, 2011, vol. 29, 143 [0524]
  - **F. D. URNOV ; E. J. REBAR ; M. C. HOLMES ; H. S. ZHANG ; P. D. GREGORY.** *Nat. Rev. Genet.*, 2010, vol. 11, 636 [0524]
  - KOONIN.** *Biol. Direct*, 2006, vol. 1, 7 [0524]
  - **K. S. MAKAROVA ; L. ARAVIND ; Y. I. WOLF ; E. V. KOONIN.** *Biol. Direct*, 2011, vol. 6, 38 [0524]
  - **S. GOTTESMAN.** *Nature*, 2011, vol. 471, 588 [0524]
  - **R. BARRANGOU et al.** *Science*, 2007, vol. 315, 1709 [0524]
  - **J. E. GARNEAU et al.** *Nature*, 2010, vol. 468, 67 [0524]
  - **R. SAPRANAUSKAS et al.** *Nucleic Acids Res.*, 2011, vol. 39, 9275 [0524]
  - **D. CARROLL.** *Gene Ther.*, 2008, vol. 15, 1463 [0524]
  - **J. SAMBROOK ; E. F. FRITSCH ; T. MANIATIS.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 2 [0524]
  - **M. G. CAPARON ; J. R. SCOTT.** *Genetic manipulation of pathogenic streptococci.* *Methods Enzymol.*, 1991, vol. 204, 556 [0524]
  - **C. FRØKJAER-JENSEN et al.** *Single-copy insertion of transgenes in Caenorhabditis elegans.* *Nat. Genet.*, 2008, vol. 40, 1375 [0524]
  - **R. B. DENMAN.** *Using RNAFOLD to predict the activity of small catalytic RNAs.* *Biotechniques*, 1993, vol. 15, 1090 [0524]
  - **I. L. HOFACKER ; P. F. STADLER.** *Memory efficient folding algorithms for circular RNA secondary structures.* *Bioinformatics*, 2006, vol. 22, 1172 [0524]
  - **K. DARTY ; A. DENISE ; Y. PONTY.** *VARNA: Interactive drawing and editing of the RNA secondary structure.* *Bioinformatics*, 2009, vol. 25, 1974 [0524]
  - **GRISSA I et al.** *BMC Bioinformatics*, 2007, vol. 8,172 [0547]
  - **GRISSA I et al.** *Nucleic Acids Res*, 2007 [0547]

## **ŞEKİLLERDEKİ YAZILARIN ANLAMLARI**

### **ŞEKİL 1**

- A = Yer-hedefli modifiye edici polipeptid  
 B = Molekül bir, "hedef gösteren RNA"  
 5 C = Molekül iki, "aktive edici RNA"  
 D = Hedef DNA  
 E = DNA-hedefleyen RNA (çift moleküllü)  
 F = İkinci segment, "Protein-bağlanımlı segment"  
 G = Birinci segment, "DNA-hedefleyen segment"  
 10 H = DNA-hedefleyen RNA (tek moleküllü) (tekil yönlendirici RNA; sgRNA)  
 I = Bağlayıcı nükleotidler

### **ŞEKİL 2**

- 15 J = Homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ)  
 K = Homoloji-yönlendirmeli onarım (HDR)  
 L = Tek yerden kesme ve onu takiben tam ve eksiksiz olmayan ligasyon  
 M = Gen parçalama (kısa delesyon/insersiyon yoluyla)  
 20 N = İki farklı RNA kullanılarak iki uzak yeri yarma  
 O = Büyük (> 100 bp) delesyon  
 P = Uyumlu yapışkan uçların bulunduğu bir bağdaştırıcı DNA tedariki  
 R = Gen taglama  
 S = Bir nokta mutasyonun bulunduğu bir donör şablonun temini  
 25 T = Gen düzeltme  
 U = Bir transgenin bulunduğu bir donör şablonun temini  
 V = Hedeflenen genin değiştirilmesi

Y = Hedeflenen transgenin insersiyonu

Z = DNA-hedefleyen RNA

A1 = Çift iplikçikli DNA kırığı (DSB)

### 5 **ŞEKİL 3A**

B2 = Motifler

### **ŞEKİL 3B**

C2 = Domainler

10

### **ŞEKİL 4**

D2 = *S. pyogenes* Cas9/Csn1'ine kıyasla sekans özdeşlikleri

E2 = Sekans özdeşlikleri MUSCLE hizalama

F2 = Tam boy

15 G2 = Özdeşlik

H2 = Tür

I2 = Referans sekans

J2 = *N. meningitidis* Cas9/Csn1'ine kıyasla sekans özdeşlikleri

### 20 **ŞEKİL 8**

K2 = SUŞ

L2 = CRISPR SAYISI

M2 = Tanımlayıcı kod

N2 = CRISPR TEKRARI: tracrRNAB BAZ EŞLEŞTİRMESİ<sup>b</sup>

25

### **ŞEKİL 9**

O2 = *İn vivo* ortamda baz eşleştirmesi

P2 = Hedef gösteren RNA

R2 = Aktive edici RNA

S2 = Bir tek moleküllü DNA-hedefleyen RNA örneği

T2 = Bağlayıcı

U2 = Değişken

5

### ŞEKİL 10

V2 = On-aralık 2 plazmid DNA'sı

Y2 = Dairesel

Z2 = Linearize

10 A3 = Plazmid

B3 = On-aralık 2 oligonükleotid DNA'sı

C3 = Etiketli iplikçik

D3 = Partner iplikçik

E3 = Tamamlayıcı

15 F3 = Tamamlayıcı olmayan

G3 = Tamamlayıcı olmayan iplikçik bağlanma primeri

H3 = Tamamlayıcı iplikçik bağlanma primeri

I3 = Tamamlayıcı iplikçik

J3 = Tamamlayıcı olmayan iplikçik

20 K3 = On-aralık 2 hedef DNA'sı

### ŞEKİL 11

L3 = Çentikli

M3 = Lineer

25 N3 = Süper sarmal

O3 = YABANI TİP

### ŞEKİL 12



P3= Kesilmemiş

R3= Omurga

S3 = On-aralık 2 hedef plazmidi

T3 = On-aralık 2 yanlış eşleşmesi

5 U3 = DNA için CFU/ug

V3 = Yanlış eşleşmiş hedefler

### ŞEKİL 13

Y3 = On-aralık 4 oligonükleotid DNA'sı

10 Z3 = Zaman (dakika)

A4 = Tamamlayıcı olmayan iplikçik ürünü

B4 = Tamamlayıcı iplikçik ürünü

C4 = Hedef DNA dubleksi

D4 = Cas9-RNA kompleksi (nM)

15 E4 = Bağlanan

F4 = Bağlanmayan

### ŞEKİL 14

G4 = On-aralık 4 plazmid DNA'sı

20 H4 = Kimera

I4 = Kimerik RNA

### ŞEKİL 15

J4= Aralık

25 K4 = Tekrar

L4 = pre-CRISPR RNA transkripsiyonu

M4 = RNaz

N4 = 1. İşleme basamağı: RNaz III'ü yarma

O4 = 2. İşleme basamağı: Bilinmeyen nükleaz(lar) ile 5' ucu oluşturma

P4 = İşlenmiş tracrRNA

R4 = Ara crRNA

5 S4 = Ön-aralık

T4 = DNA hedefleme

U4 = Homoloji araması

V4 = R-ilmîği oluşturma

Y4 = Hedef DNA'yı yarma

10 Z4 = Çift iplikçikli RNA kırığı (DSB)

### ŞEKİL 16

A5 = Superdex 200 fraksiyonları

B5 = Absorbsiyon

15 C5 = Elüsyon hacmi

### ŞEKİL 17

D5 = Ön-aralık 1 plazmid DNA'sı

E5 = Ön-aralık 1 oligonükleotid DNA'sı

20 F5 = Hedef olmayan

G5 = Hedef

H5 = Ön-aralık 4 hedef oligonükleotid DNA'sı

### ŞEKİL 18

25 I5 = Lineer yarıлма ürünü

J5 = Metal iyonu

### ŞEKİL 19

K5 = Tamamlayıcı iplikçik bağlanma primeri

L5 = Tamamlayıcı olmayan iplikçik bağlanma primeri

M5 = Hedef iplikçik bağlanma primeri

N5 = Ön-aralık 1 hedef DNA'sı

O5 = Ön-aralık 4 hedef DNA'sı

5

### ŞEKİL 20

P5 = Önceden kaynaştırılmış / önceden inkübe edilmiş

R5 = Önceden kaynaştırılmış / önceden inkübe edilmemiş

S5 = Önceden kaynaştırılmamış / önceden inkübe edilmemiş

10 T5 = Önceden kaynaştırılmamış / önceden inkübe edilmiş

U5 = Yarıлма ürünü

V5 = Koşullar

Y5 = Yarıлма

Z5 = Dakika

15 A6 = Cas9-tracrRNA:crRNA-sp2 konsantrasyonu

### ŞEKİL 21

B6 = Ön-aralık 1 hedef plazmid DNA'sı

### 20 ŞEKİL 22

C6 = Bağlanan hedef

D6 = Bağlanmayan hedef dubleks

E6 = Ayrışmış hedef DNA iplikçikleri

F6 = Spesifik olmayan bağlanma

25

### ŞEKİL 23

G6 = Ön-aralık 1 hedef oligonükleotid DNA'sı

**ŞEKİL 24**

H6 = crRNA tekrar fragmanı

I6 = crRNA aralık 2 fragmanı

5 **ŞEKİL 25**

J6 = Hedef DNA probu

**ŞEKİL 26**

K6 = Hedef plazmid

10 L6 = Ön-aralık 2 hedef

M6 = Ön-aralık 4 hedef

**ŞEKİL 27**

N6 = Cas9 proteini

15 O6 = Ön-aralık 1 hedefleyen kimerik RNA'lar

P6 = Ön-aralık 2 hedefleyen kimerik RNA'lar

**ŞEKİL 28**

R6 = Hedef bölge

20 S6 = Hedef sekans

**ŞEKİL 29**

T6 = Birleştirme

U6 = 1. segment

25 V6 = 2. segment

Y6 = Taklit

Z6 = in vitro ortamda transkribe edilmiş CLTA1 sgRNA'sı

A7 = Cel-1 Nükleazı

**ŞEKİL 30**

B7 = Cas9-GFP plazmidi

C7 = U6-CLTA1 sgRNA plazmidi

- 5 D7 = Lizata eklenen in vitro ortamda transkribe edilmiş CLTA1 sgRNA'sı

**ŞEKİL 31**

E7 = CLTA1 sgRNA'sı

- 10 F7 = RNA ekspresyon plazmidi

G7 = U6 promotörü

H7 = HA promotörü

**ŞEKİL 32A**

- 15 I7 = Kültürlenmemiş Termit grup 1 bakterisi Rs-D17

**ŞEKİL 32B**

J7 = Tekrar uzunluğu

K7 = Cas9 büyüklüğü

- 20 L7 = Lokus mimarisi

**ŞEKİL 33**

M7= Tip

N7 = Devamı

- 25 **ŞEKİL 35**

O7 = Konsensüs yapısı

P7 = SEKANS KOD NO.

**ŞEKİL 36**

R7 = Haritalanan 48.205 adet okuma

S7 = Haritalanan 9.914.184 adet okuma

T7 = 5' ucu

5 U7 = 3' ucu

V7 = Kapsam

Y7 = tracrRNA'lar

Z7 = crRNA'lar

A8 = Haritalanan 13.110.087 adet okuma

10 B8 = Haritalanan 161.865 adet okuma

C8 = Haritalanan 1.542.239 adet okuma

**ŞEKİL 37**

D8 = İplikçik

15 E8 = Matür form büyüklüğü

F8 = İlgilenilen bölge

G8 = Okumalar

H8= Kapsam

I8 = Sekans

20 J8 = 5' ucu okuma numarası

K8 = 3' ucu okuma numarası

L8 = Toplam haritalanan okuma numarası

M8 = (Not:düşük kaliteli RNA kütüphanesi)

**ŞEKİL 38**

25 N8 = Küme

**ŞEKİL 39**

O8 = Tasarlanan sgRNA kimerası

- P8 = Baz-eşleşme bölgesi  
 R8 = dCas9 sapı  
 S8 = Terminatör  
 T8 = Yabani tip Cas9 endonükleazı  
 5 U8 = Protein-RNA kompleksi birleşmesi  
 V8 = Katalitik olarak inaktif  
 Y8 = RNA-yönlendirmeli hedefleme  
 Z8 = Yarılma  
 A9 = Transkripsiyon bloğu

10

**ŞEKİL 40**

- B9 = dcas9 mutasyonları  
 C9 = Terminal  
 D9 = sgRNA kimerası  
 15 E9 = Birinci Segment (DNA-hedefleyen segment)  
 F9 = İkinci Segment (protein-bağlanımlı segment)  
 G9 = Üçüncü Segment (stabilite kontrol segmenti)  
 H9 = dCas9 bağlanımı  
 I9 = Transkripsiyon uzama bloğu  
 20 J9 = Şablon olmayan iplikçik  
 K9 = Şablon iplikçik  
 L9 = mRFP Floresansı  
 M9 = Kontrol  
 N9 = Yaklaşık 30 katı baskılanma  
 25 O9 = Transkripsiyon başlama bloğu  
 P9 = RNA polimeraz başlangıç kompleksi  
 R9 = Promotör  
 S9 = Gecikme

- T9 = Baskılama  
 U9 = Aktivasyon  
 V9= İndükleyici  
 Y9 = RFP Floresansı  
 5 Z9 = Eksponansiyel Uydurma

### ŞEKİL 41

- A10 = Başlangıç kodonuna olan mesafe  
 B10 = 3.ncü okumu sayısı  
 10 C10 = Transkripsiyon  
 D10 = Nasent mRNA  
 E10 = R ilmiği  
 F10 = Transkripsiyon R ilmiği  
 G10 = CRISPRi çarpışma modeli  
 15

### ŞEKİL 42

- H10 = İki gen spesifisitesi  
 I10 = Okuma numarası  
 J10 = Floresans  
 20 K10 = Her ikisi de  
 L10 = Tek gen spesifisitesi  
 M10 = Parlak alan

### ŞEKİL 43

- 25 N10 = Başlangıç kodonundan itibaren olan mesafe  
 O10 = Başlangıç kodonundan itibaren olan nispi mesafe  
 P10 = Baskılama aktivitesi (nispi)  
 R10 = Uzatmalar



S10 = sgRNA baz-eşleşme bölgesinin uzunluğu

T10= Kesmeler

V10 = sgRNA baz-eşleşme bölgesindeki tekil yanlış eşleşmenin pozisyonu

5 Y10 = Bölge I (Tohum)

Z10 = Yanlış eşleşmenin pozisyonu

A11 = Kombine

B11 = Baskılama (misli düzeyinde)

C11 = Artırıcı kombinasyon

10 D11 = Süpresif kombinasyon

E11 = Çift sgRNA baskılaması

#### ŞEKİL 44

F11 = RNAP bağlanma yeri (başlatma)

15 G11 = LacI bağlanma yeri (inhibisyon)

H11 = Gen-spesifik sgRNA'lar

I11 = LacZ aktivasyonu

J11 = LacZ baskılama

K11 = Adenilat siklaz

20 L11 = CRP bağlanma yeri

M11 = A yeri

N11 = P yeri

O11 = O yeri

P11 =  $\beta$ -galaktosidaz aktivitesi (miller birimi cinsinden)

25 R11 = Bozulan gen/lokus

S11= Nötr

T11= Baskılayıcılar

U11 =  $\beta$ -galaktosidaz aktivitesi

V11 = Aktivatörler ya da cis-etkili elemanlar

### ŞEKİL 45

Y11 = Kromozomal raportör

5 Z11 = EGFP Floresansı

A12 = Kodon optimize

B12 = HEK293 hücreleri

C12 = Negatif Kontrol (EGFP yok)

D12 = mCherry Floresansı

10 E12 = mCherry raportörü

F12 = EGFP raportörü

### ŞEKİL 46

G12 = DNA taraması

15 H12 = RNA-DNA dubleksi oluşumu

I12 = Çift iplikçikli DNA kırığı

J12 = Post-transkripsiyonel işleme

K12 = crRNA kompleksi birleşmesi

20

### ŞEKİL 47

L12 = Transformasyon etkinliği

M12 = Cas proteini

N12 = İnkübasyon süresi (saat)

25

### ŞEKİL 49

O12 = LacI-hedefleyen sgRNA

P12 = sgRNA yok

R12 = LacZ-hedefleyen sgRNA

### ŞEKİL 51

S12 = Misli düzeyinde baskılanma

5 T12 = Misli düzeyinde baskılanma ( logaritma)

### ŞEKİL 52

U12 = Floresan olmayan hücrelerin yüzdesi

V12 = Plazmid raportörler

10 Y12 = MSCV-EGFP raportörü

Z12 = SV40-EGFP raportörü

### ŞEKİL 53

A13 = İnkübasyon süresi

15 B13 = Hem RuvC1 hem de HNH mutasyonları

C13 = RuvC1 mutasyonu

D13 = HNH mutasyonu

### 20 ŞEKİL 54

E13 = Transkripsiyonel baskılayıcılar

F13 = Mad mSIN3 etkileşim domaini

G13 = ERF baskılayıcı domaini

H13 = Histon lizin metiltransferazlar

25 I13 = KMT1 ailesi: SUV39H1, SUV39H2, G9A, ESET/SETDB1, ve homologları

J13 = KMT2 ailesi: hSET1A, hSET1B, MLL1'den 5'e, ASH1, ve homologları

- K13 = KMT3 ailesi  
 L13 = DOT1L ve homologları  
 M13 = KMT5 ailesi: Pr-SET7/8, SUV4-20H1, ve homologları  
 N13 = Histon lizin demetilasyonlar
- 5 O13 = LSD1/BHC110 ve homologları  
 P13 = KDM3 ailesi  
 R13 = KDM4 ailesi: JMJD2A/JHDM3A, JMJD2B, JMJD2C/GASC1, JMJD2D, ve homologları (Rph1)  
 S13 = KDM5 ailesi: JARID1A/RBP2, JARID1B/PLU-1,
- 10 JARID1C/SMCX, JARID1D/SMCY, ve homologları  
 T13 = KDM6 ailesi  
 U13 = Fonksiyon  
 V13 = Transkripsiyon aktivasyonu  
 Y13 = Transkripsiyon baskılama
- 15 Z13 = Heterokromatin oluşturma  
 A14 = DNA hasarı cevabı, transkripsiyon baskılama  
 B14 = Polikomb susturma  
 C14 = Transkripsiyon aktivasyonu ve baskılama, heterokromatin oluşturma
- 20 D14 = Androjen reseptör geni aktivasyonu, spermatogenez  
 E14 = Transkripsiyon uzatma, transkripsiyon baskılama, heterokromatin oluşturma, genom bütünlüğü  
 F14 = Proteinin adı  
 G14 = Transkripsiyonel Aktivatörler
- 25 H14 = p65 alt-domaini  
 I14 = KAT4: TAF1 ve homologları  
 J14 = KAT5: TIP60/PLIP, ve homologları  
 K14 = KAT6: MOZ/MYST3, MORF/MYST4, ve homologları

- L14 = KAT7: HBO1/MYST2 ve homologları  
M14 = KAT8: HMOF/MYST1, ve homologları  
N14 = KAT13 ailesi: SRC1, ACTR, P160, CLOCK ve homologları  
O14 = Histon lizin deasetilazlar
- 5 P14 = Sınıf I: HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8 ve onun homologları  
R14 = Sınıf IIa: HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9 ve onun homologları (Hda1, Ctr3 ve benzeri)  
S14 = Sınıf III: SIRT1, SIRT2 ve onun homologları
- 10 T14 = Sınıf  
U14 = DNA metilazlar (adenozin veya sitozin modifikasyonu)  
V14 = DNMT3a/DNMT3b, MET1, DRM3 (bitkiler) ve homologları  
Y14 = Kromometilazlar örneğin ZMET2, CMT1, CMT2 (bitkiler)  
Z14 = DNA demetilazlar
- 15 A15 = Deaminaz ailesi  
B15 = TET dioksigenaz ailesi  
C15 = DEMETER glikozilaz ailesi  
D15 = Transkripsiyon aktivasyonu, DNA onarımı  
E15 = Transkripsiyon aktivasyonu ve uzatma, DNA replikasyonu
- 20 F15= Transkripsiyon, DNA replikasyonu  
G15 = Kromatin sınırları, dozaj telafisi, DNA replikasyonu  
H15 = Restriksiyon sistemi  
I15 = Transkripsiyon baskılama, damgalama, heterokromatin oluşturma
- 25 J15 = Transkripsiyon aktivasyonu, genom bütünlüğü  
K15 = Histon lizin asetiltransferazlar  
L15 = KAT2 ailesi: hGCN5, PCAF, ve homologları  
M15 = KAT3 ailesi: CBP, p300, ve homologları

N15 = Kromatin insüstasyonu, heterkromatin yayılmasının süpresyonu

O15 = Rapamisine bağımlı toplama

P15 = ABA'ya bağımlı toplama

R15 = Sınır elemanları

5 S15 = Periferi toplama elemanları

T15 = Protein kenetlenme elemanları

### **ŞEKİL 55**

U15 = Yaklaşık 80 katı aktivasyon

10 V15 = Yaklaşık 20 katı aktivasyon

Y15 = Yönlendirici RNA

Z15 = Bir GAL4 kromozom raportörü bulunan HEK293 hücreleri

A16 = Maksimuma göre % değeri

### 15 **ŞEKİL 56**

B16 = Artırıcı (AP1) bağlanma yeri

C16 = Artırıcı (SP1) bağlanma yeri

D16 = TATA Kutusu

E16 = ATG başlangıç kodonu

20 F16 = Normalize Floresans

G16 = SV40 promotörü

H16 = Şablon olmayan

I16 = Şablon

### 25 **ŞEKİL 57**

J16 = Artifisyel tracrRNA:crRNA çifti

K16 = Protein-bağımlı segment

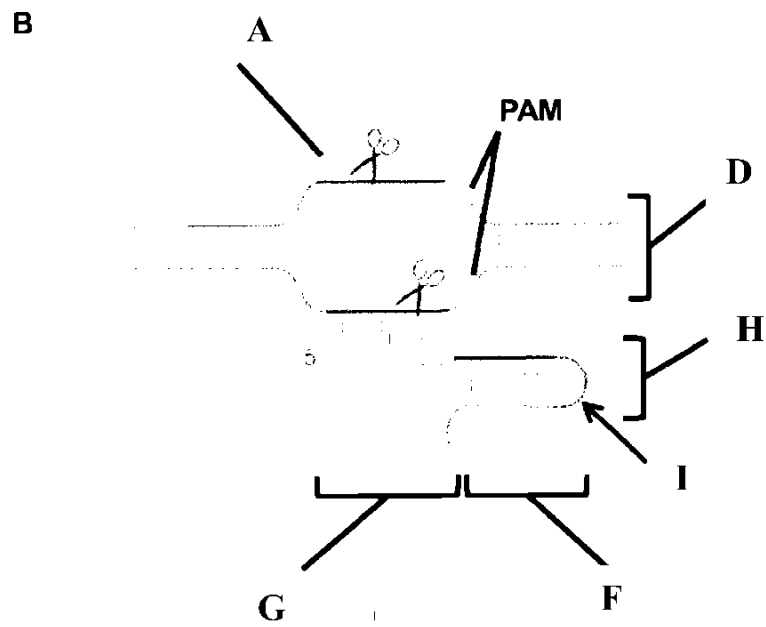
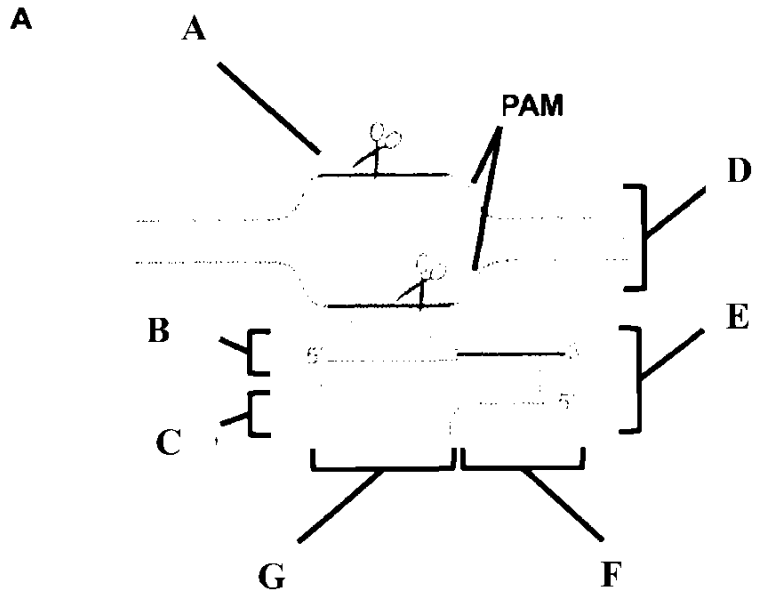
L16 = DNA-hedefleyen segment

M16 = tracrRNA:crRNA çifti

N16 = Yarılmış

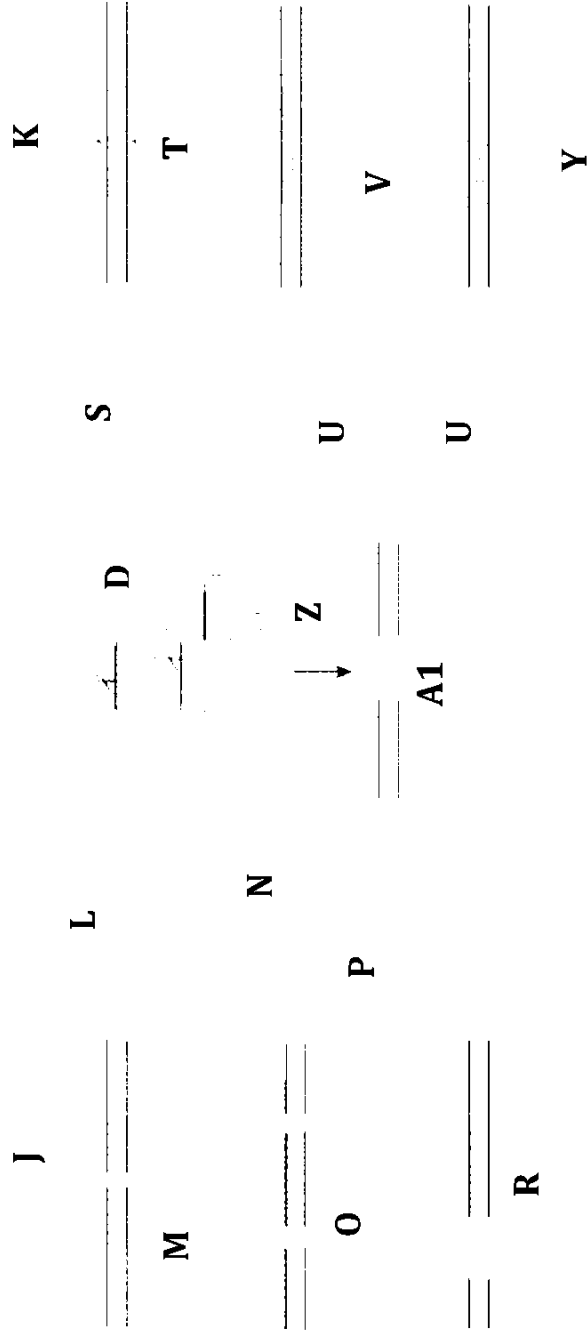
O16 = Artifisyel

ŞEKİL 1





ŞEKİL 2



## ŞEKİL 3A

Cas9/Csn1 Streptococcus pyogenes

B2

1 MDKKYSIGLDIGTNSVGVAVITDDYKVPSSKLLKGLGNTDRHGKKNLIGALL  
 FDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSSFFHRLLEE  
 SFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLADSTDKVDLRLIYL  
 ALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASRVDA  
 KAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAED  
 AKLQLSKDITYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDATLLSDILRVNSEITK  
 APLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPKEYKEIFFDQSKNGYAGYIDGG  
 ASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLAKLNREDLLRKQRTFDNGSIPYQIHLGEL  
 HAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEE  
 TITPWNFEVVDKGASQAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHSLLYEYFTVYN  
 ELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIEC  
 FDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFED  
 REMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTI  
 LDFLKSDGFANRFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGS  
 2 PAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRIHKPENIVEMARENQTTQKGQKNSRERM  
 KRIEEDIKELGSDILKEYPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRL  
 3 SDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYW  
 RQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGELSELDKVGFIKRQLVETRQITKIIVAQILD  
 4 SRMNTKYDENDKLIREVRVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVINNYHHAHDAY  
 LNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYS  
 NIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIWWDKGRDFATVRKVL SMPQV  
 NIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKGFFSPTVAYSVL  
 VVAKVEKGGKSKLKS VKELLGITIMERSSEKDPIDFLEAKGYKEVRKDIIKL  
 PKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFY LASHYEKLGKSP  
 EDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKHRDKPI  
 REQAENIIHLFTLNLGAPAAFKYFDITIDRKRYTSTKEVL DATLIHQSIIGLY  
 ETRIDLSQLGGD

## ŞEKİL 3B

Cas9/Csn1 Streptococcus pyogenes

C2

1 MDKKYSIGLDIGTNSVGVAVITDDYKVPSKKLKGLGNTDRHGKKNLIGAL  
LFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRL  
ESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLADSTDKVDLRLI  
YLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASRV  
 DAKAILSARLSKSRRENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLA  
 EDAKLQLSKDYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDATLLSDILRVNSEI  
 TKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYID  
 GGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLAKLNREDLLRKQRTFDNGSIPYQIHL  
 GELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFWMTRK  
 SEETITPWNFEVVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSHLLYEYFTV  
 YNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKI  
 ECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLF  
 EDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG  
 KTILDFLKSDGFANRFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLA

2 GSPAIKKQILQTVKVDELVKVMGRHKPENIVEMARENQTTQKGQKNSR  
ERMKRIEELGSDILKEYPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQEL  
DINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLRSDKNRGKSDNVPSEEVVKK  
MKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGELSELDKVGFIKRLVETRQIT  
KHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVRVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVIN  
NYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLSEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQCIG  
 KATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATV  
 RKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGF  
 DSPTVAYSVLVAKVEKGSKLLKSVKELLGITIMERSSEKDPIDFLEAKGY  
 KEVRKDLIILPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFYLA  
 SHYEKLGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL  
 SAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLD  
 ATLIHQISITGLYETRIDLSQLGGD

## ŞEKİL 4

## A. C2

H2	I2	E2		
		F2	Domain 1	Domain 2
		% G2	% G2	% G2
<i>Streptococcus pyogenes</i> M1645	MF_203015	100.0	100.0	100.0
<i>Streptococcus pyogenes</i> M945F005	XF_262131.1	99.9	99.4	100.0
<i>Enterococcus faecalis</i> 11292	MF_472073	94.9	60.0	64.9
<i>Pasteurella multocida</i> subsp. <i>multocida</i> strain Pen70	MF_241034.1	10.7	0.0	10.9
<i>Streptococcus thermophilus</i> CM09-011A	XF_810561	93.0	79.6	10.4
<i>Streptococcus thermophilus</i> CM09-011B	XF_810511.1	87.6	87.0	21.8
<i>Neisseria meningitidis</i> 22491	XF_062342390.1	20.2	33.6	33.1
<i>Streptococcus mutans</i> C9155	MF_721764	61.6	78.1	74.1
<i>Streptococcus pyoderidii</i> strain <i>S. pyoderidii</i> OH1	XF_061450662.1	19.8	28.0	27.0
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> NCTC 11169	XF_002344900.1	13.6	30.3	26.3
<i>Treponema denticola</i> ATCC 35415	MF_971941	30.9	47.3	38.3

## B. J2

H2	I2	E2		
		F2	Domain 1	Domain 2
		% G2	% G2	% G2
<i>Streptococcus pyogenes</i> M1645	MF_203015	100.0	39.5	25.1
<i>Streptococcus pyogenes</i> M945F005	XF_262131.1	100.0	34.7	25.1
<i>Enterococcus faecalis</i> 11292	MF_472073	18.6	83.6	25.4
<i>Pasteurella multocida</i> subsp. <i>multocida</i> strain Pen70	MF_241034.1	64.9	70.1	35.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> CM09-011A	XF_810561	19.6	33.2	25.4
<i>Streptococcus thermophilus</i> CM09-011B	XF_810511.1	25.6	55.1	35.1
<i>Neisseria meningitidis</i> 22491	XF_062342390.1	116.0	100.0	100.0
<i>Streptococcus mutans</i> C9155	MF_721764	19.0	36.1	25.5
<i>Streptococcus pyoderidii</i> strain <i>S. pyoderidii</i> OH1	XF_061450662.1	25.6	37.6	35.3
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> NCTC 11169	XF_002344900.1	34.7	49.0	41.0
<i>Treponema denticola</i> ATCC 35415	MF_971941	13.6	31.6	25.5

## ŞEKİL 5

	<u>Motif 1</u>	<u>Motif 2</u>	<u>Motif 4</u>
<i>S. pyogenes</i>	...IGLDIGSTNSVGVAVI... *	...IVVEMARE...	...HHAHDAYL...
<i>L. pneumophila</i>	...IGIDLEGKFTGVNLS...	...MQRDAYE...	...SHADATL...
<i>G. proteobacterium</i>	...IAIDLCAKFTQVALY...	...ITEHIARE...	...SHVVDAYE...
<i>L. innocua</i>	...IGLDIGSTNSVGVAVI...	...IVVEMARE...	...HHAHDAYL...
<i>L. gasseri</i>	...VGLDVGTNSCCGVAM...	...IAIEPTRD...	...HHAHDAYL...
<i>E. rectale</i>	...LALDIGTASVGVAVI...	...IVVEMARE...	...HHAHDAYL...
<i>S. lugdunensis</i>	...LGLDIGSTNSVGVAVI...	...IVVEMARE...	...HHAHDAYL...
<i>M. synoviae</i>	...IGFDLGVASVGVAVI...	...VVVEMARE...	...HHAHDAYL...
<i>M. mobile</i>	...LGLDLGSIASVGVAVI...	...IVVETRS...	...HHAHDAYL...
<i>W. succinogenes</i>	...LGVDLGSISSLGVAIV...	...VHVELARE...	...HHAHDAYL...
<i>F. columnare</i>	...LGLDLGSISSLGVAIV...	...IHEMARE...	...HHAHDAYL...
<i>F. succinogenes</i>	...LGLDLGSISSLGVAIV...	...IHELEGRD...	...HHAHDAYL...
<i>B. fragilis</i>	...LGLDLGSISSLGVAIV...	...IVVELARE...	...HHAHDAYL...
<i>A. cellulolyticus</i>	...LGVVGVGERSIGLAAV...	...IVVELARG...	...HHAHDAYL...
<i>B. dentium</i>	...IGIDVGLMCGVGLAAI...	...VQIEHYRE...	...HHAHDAYL...


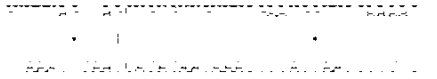
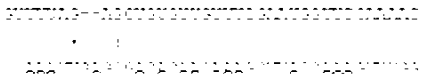
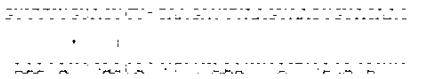
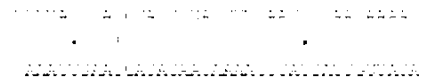
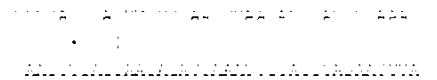

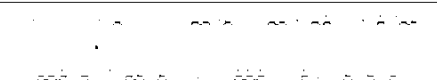
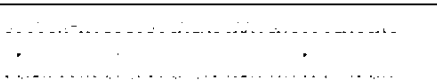
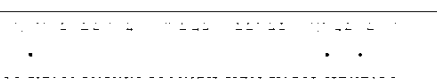
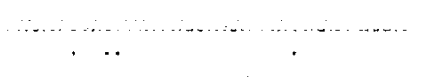
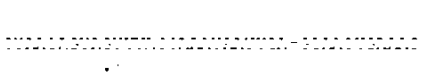
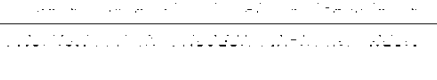
Motif 3

<i>S. pyogenes</i>	...EVDHIVPQSEIQR--	...DGIINAVLTRGQEN...
<i>L. pneumophila</i>	...EIDHIVPRSLGRKHF	...GVVFNSEVNLVYSSQGN...
<i>G. proteobacterium</i>	...EIDHIVPQSEIQR--	...DGIINAVLTRGQEN...
<i>L. innocua</i>	...EIDHIVPQSEIQR--	...DGIINAVLTRGQEN...
<i>L. gasseri</i>	...EIDHIVPQSEIQR--	...DGIINAVLTRGQEN...
<i>E. rectale</i>	...EIDHIVPQSEIQR--	...DGIINAVLTRGQEN...
<i>S. lugdunensis</i>	...EVDHIVPQSEIQR--	...DGIINAVLTRGQEN...
<i>M. synoviae</i>	...EIDHIVPQSEIQR--	...DGIINAVLTRGQEN...
<i>M. mobile</i>	...EIDHIVPQSEIQR--	...DGIINAVLTRGQEN...
<i>W. succinogenes</i>	...EIDHIVPQSEIQR--	...DGIINAVLTRGQEN...
<i>F. columnare</i>	...EIDHIVPQSEIQR--	...DGIINAVLTRGQEN...
<i>F. succinogenes</i>	...EIDHIVPQSEIQR--	...DGIINAVLTRGQEN...
<i>B. fragilis</i>	...EIDHIVPQSEIQR--	...DGIINAVLTRGQEN...
<i>A. cellulolyticus</i>	...EIDHIVPQSEIQR--	...DGIINAVLTRGQEN...
<i>B. dentium</i>	...EIDHIVPQSEIQR--	...DGIINAVLTRGQEN...





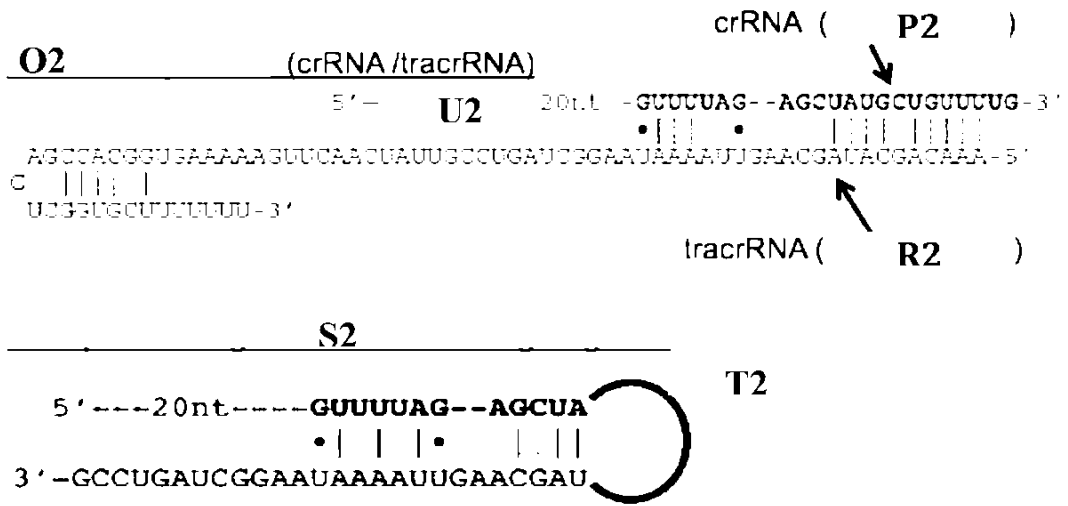
## ŞEKİL 8

K2	L2	CASS4 CRISPR M2*	N2
2020-2021 Eğitim-Yetiştirme Yılı 07070	1	N2_07070	
2020-2021 Eğitim-Yetiştirme Yılı 07159	1	N2_07159	
2020-2021 Eğitim-Yetiştirme Yılı 07165	1	N2_07165	
2020-2021 Eğitim-Yetiştirme Yılı 07166	1	N2_07166	
2020-2021 Eğitim-Yetiştirme Yılı 07167	1	N2_07167	
2020-2021 Eğitim-Yetiştirme Yılı 07168	1	N2_07168	
2020-2021 Eğitim-Yetiştirme Yılı 07169	1	N2_07169	
2020-2021 Eğitim-Yetiştirme Yılı 07170	1	N2_07170	
2020-2021 Eğitim-Yetiştirme Yılı 07171	1	N2_07171	
2020-2021 Eğitim-Yetiştirme Yılı 07172	1	N2_07172	
2020-2021 Eğitim-Yetiştirme Yılı 07173	1	N2_07173	
2020-2021 Eğitim-Yetiştirme Yılı 07174	1	N2_07174	
2020-2021 Eğitim-Yetiştirme Yılı 07175	1	N2_07175	

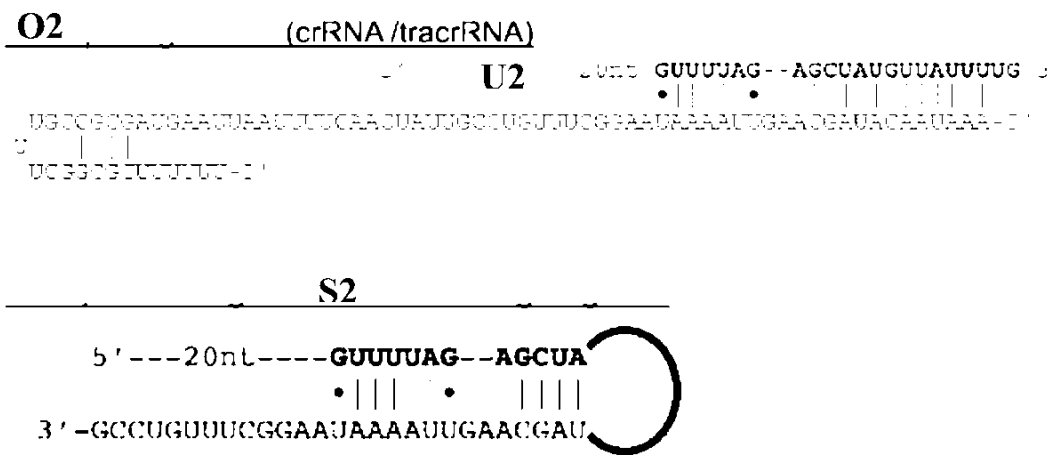


**ŞEKİL 9**

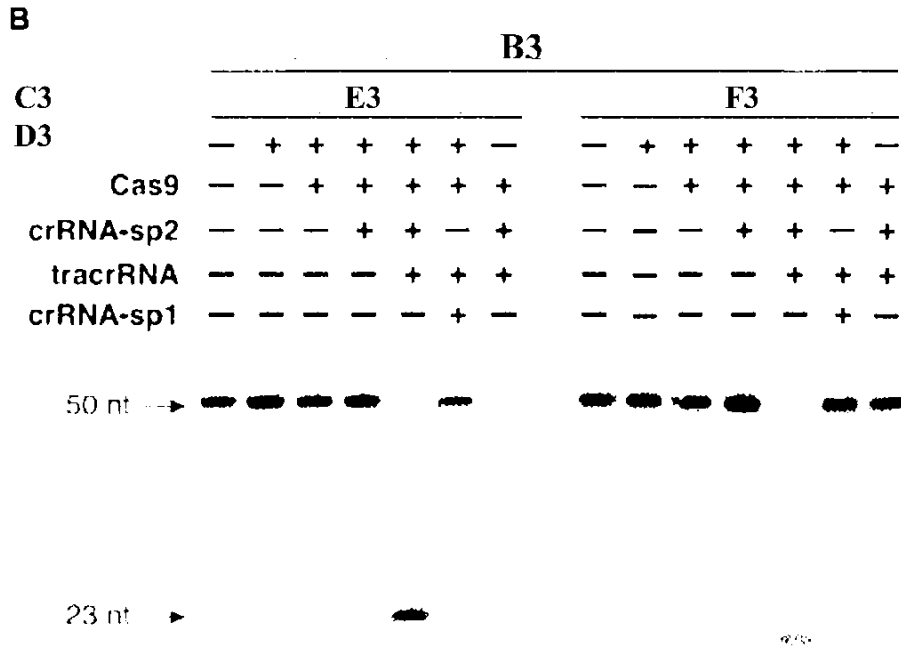
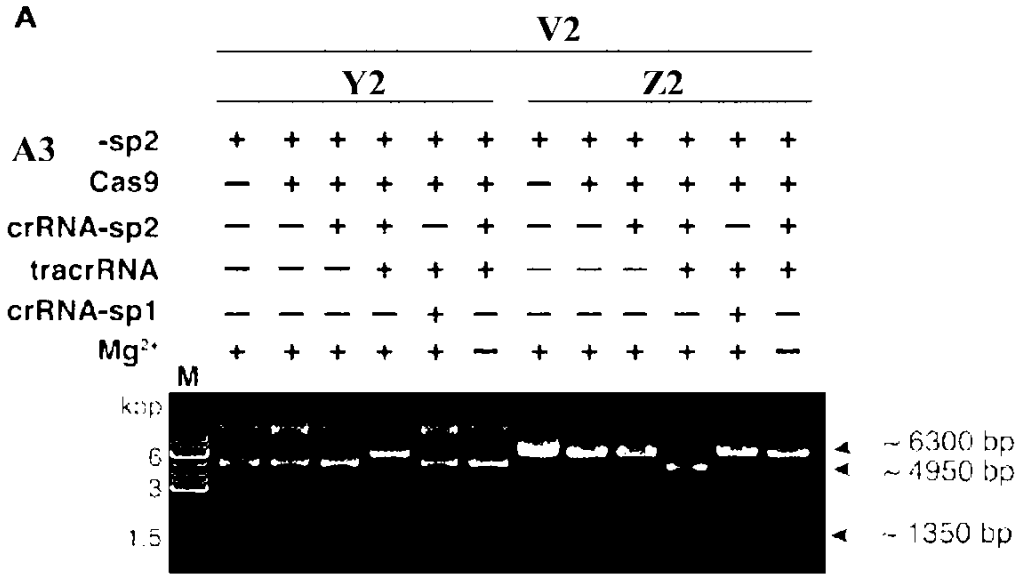
***Streptococcus pyogenes***



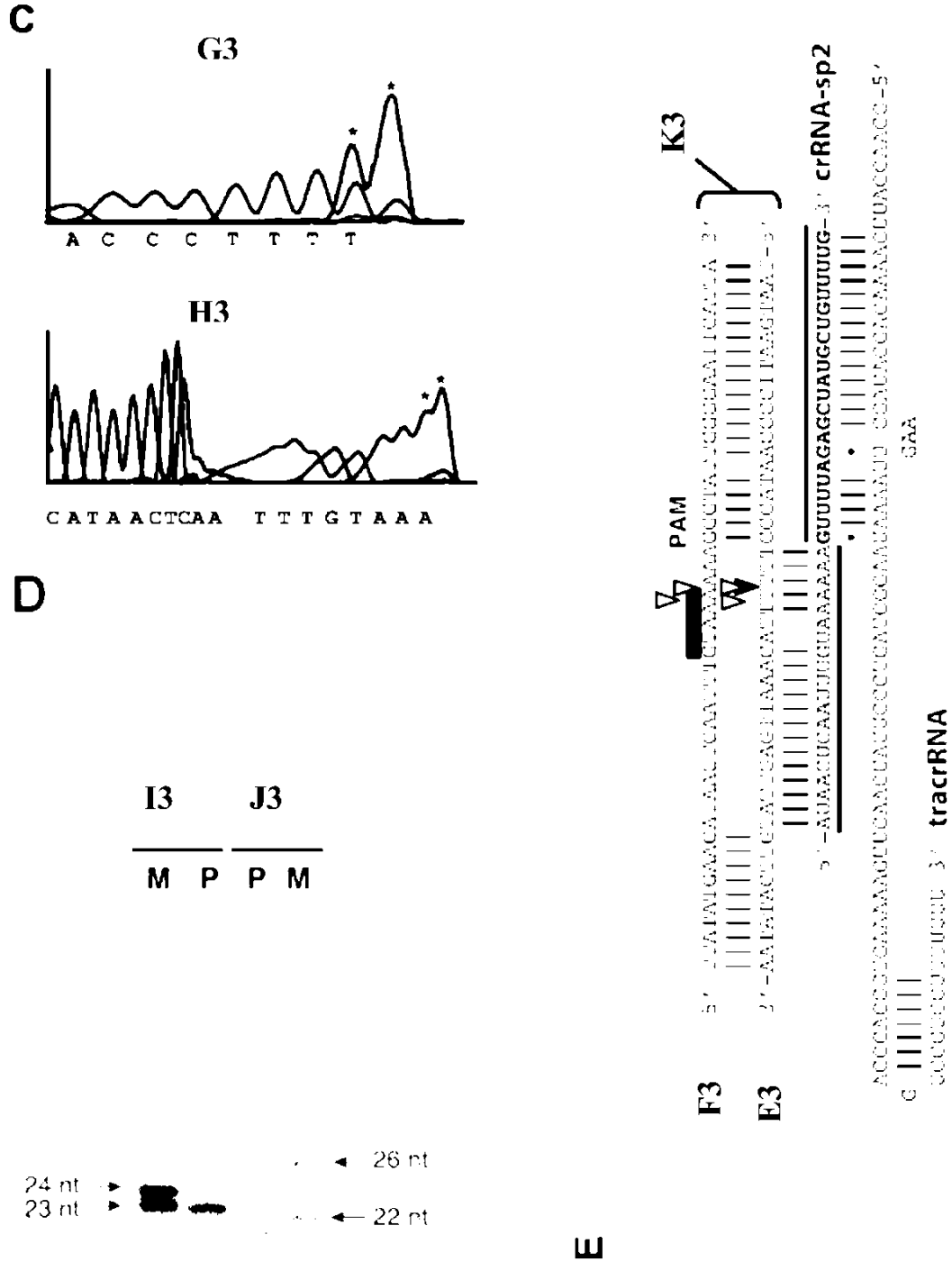
***Listeria innocua***



ŞEKİL 10

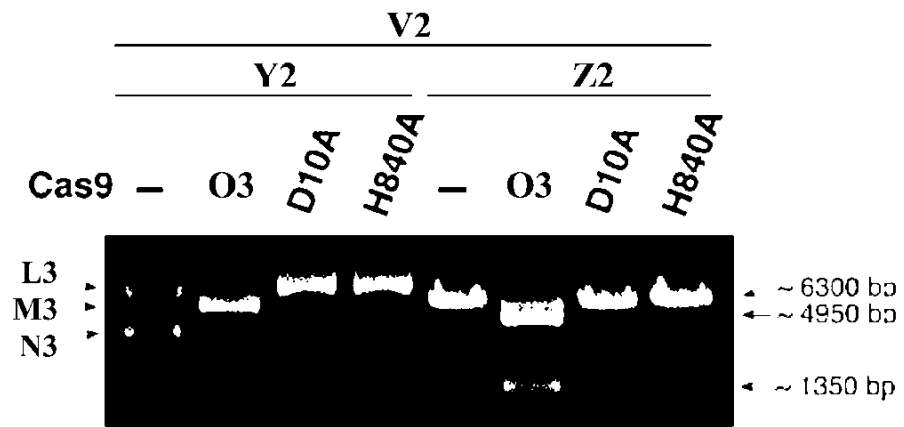
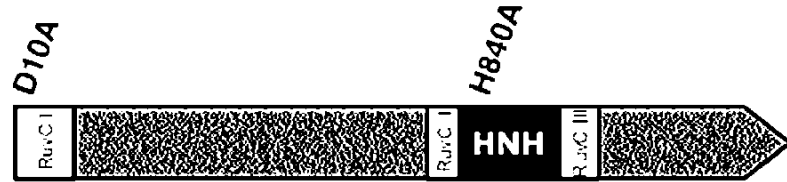


ŞEKİL 10

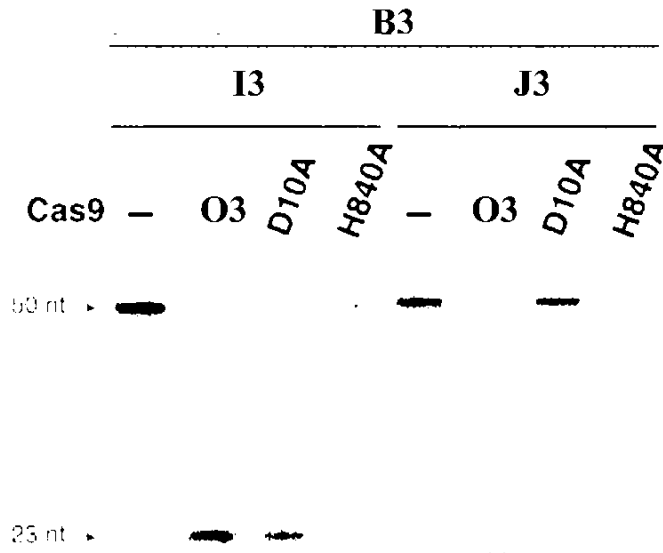


ŞEKİL 11

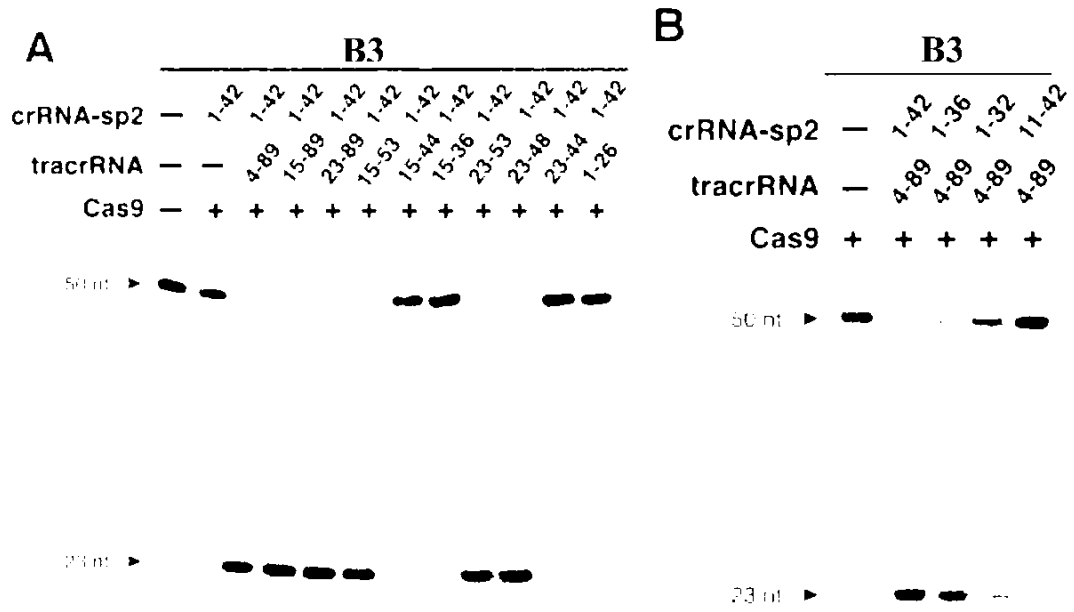
**A**



**B**

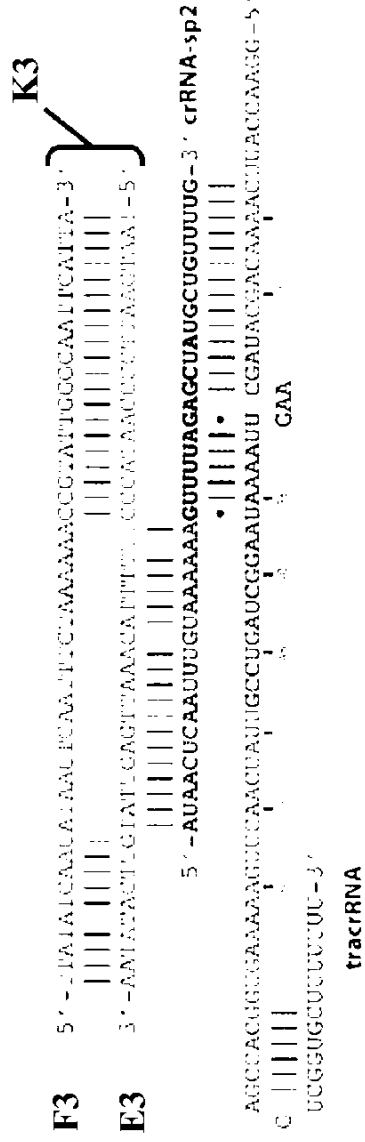


## ŞEKİL 12



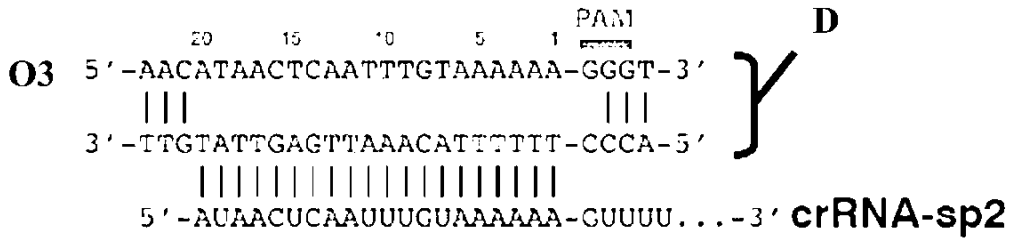
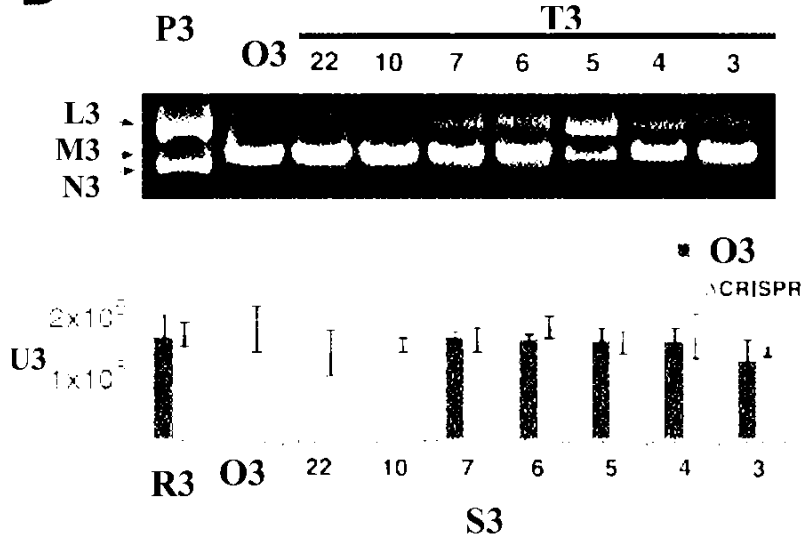
ŞEKİL 12

C



ŞEKİL 12

D

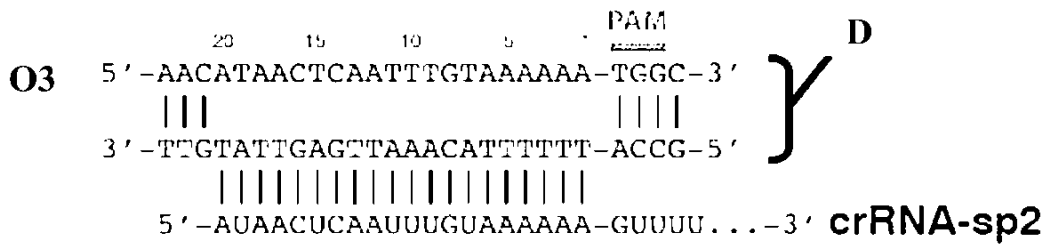
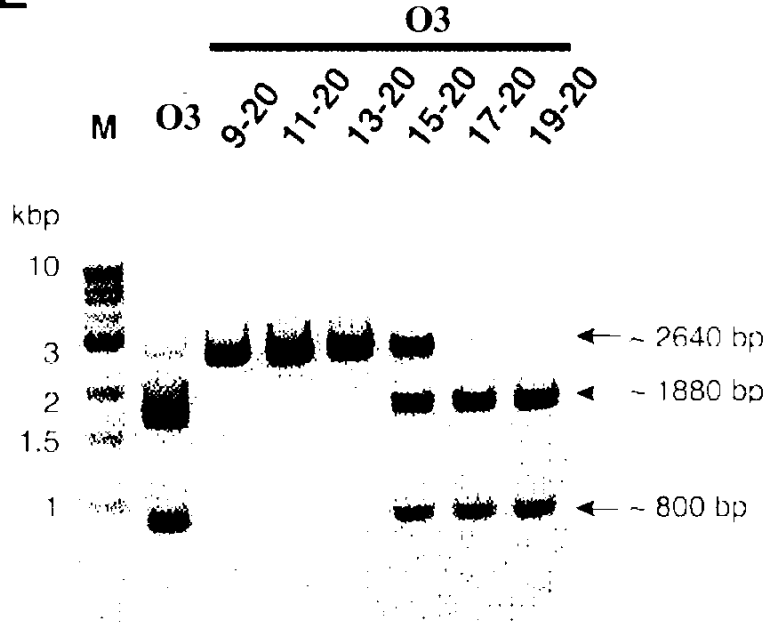


V3

- 22 5' -AGCATAACTCAATTTGTAAAAAA-3'
- 10 5' -AACATAACTCAATCTGTAAAAAA-3'
- 7 5' -AACATAACTCAATTTGAAAAAAA-3'
- 6 5' -AACATAACTCAATTTGTTAAAAA-3'
- 5 5' -AACATAACTCAATTTGTATAAAA-3'
- 4 5' -AACATAACTCAATTTGTAATAAA-3'
- 3 5' -AACATAACTCAATTTGTAATAA-3'

ŞEKİL 12

E

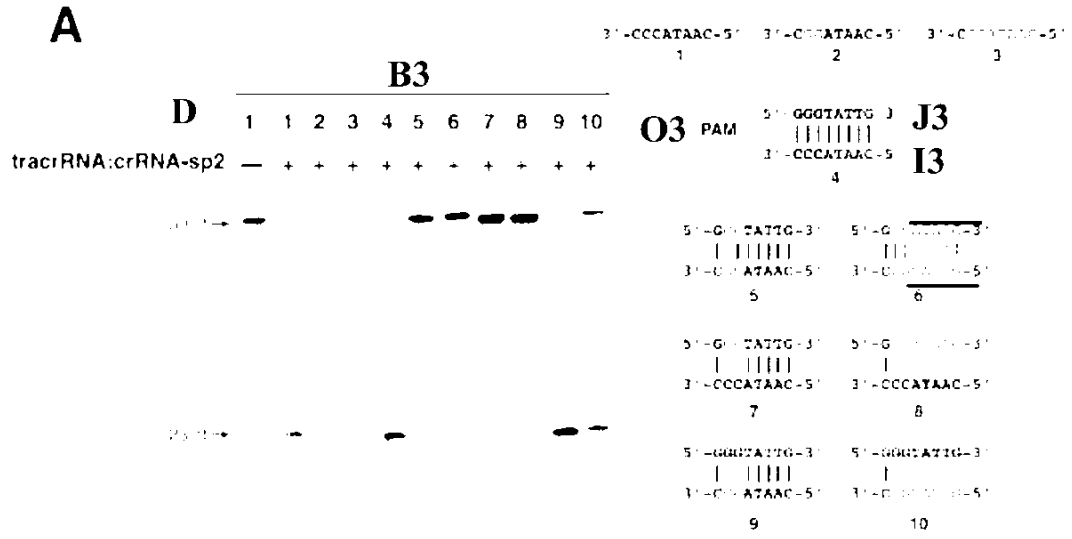


V3

- 9-20 5' - TATTGAGTTAAAGTAAAAAA - 3'
- 11-20 5' - TATTGAGTTATTGAAAAAA - 3'
- 13-20 5' - TATTGACTATTTGAAAAAA - 3'
- 15-20 5' - TATTGACAATTTGAAAAAA - 3'
- 17-20 5' - TATTCTCAATTTGAAAAAA - 3'
- 19-20 5' - TAAACTCAATTTGAAAAAA - 3'



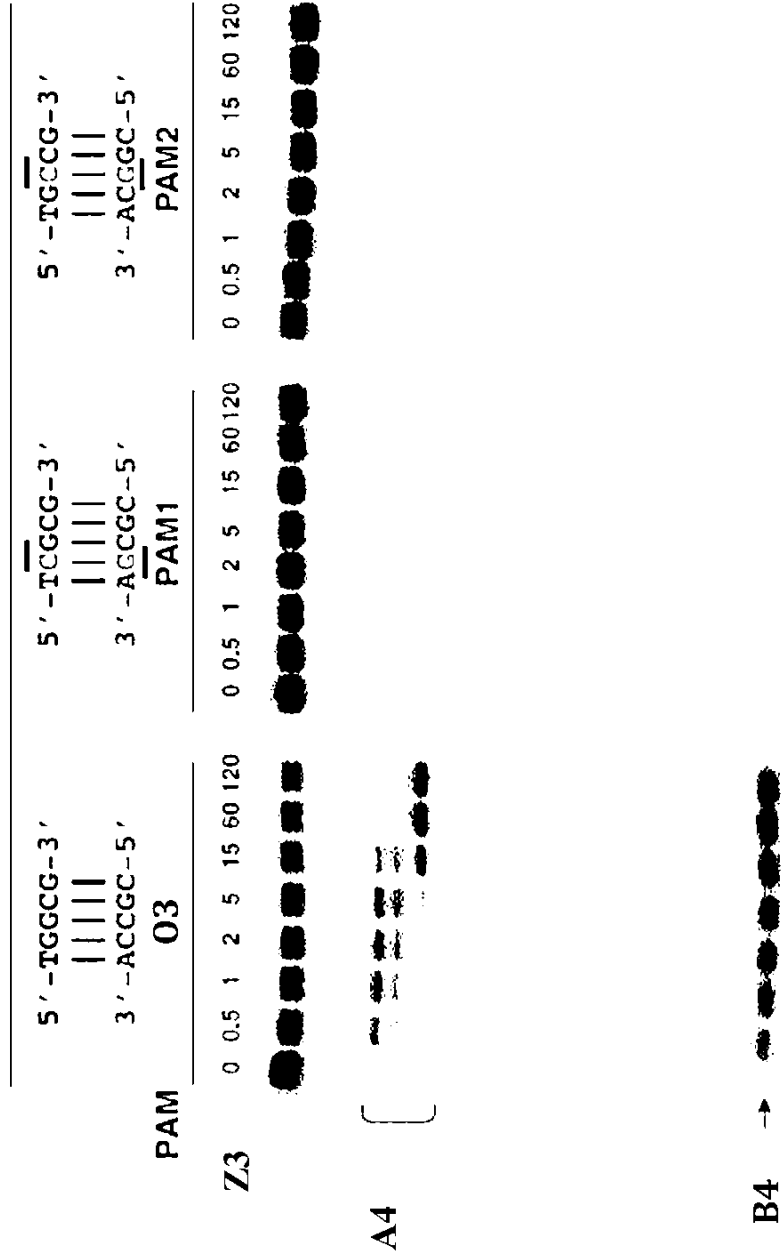
ŞEKİL 13



ŞEKİL 13

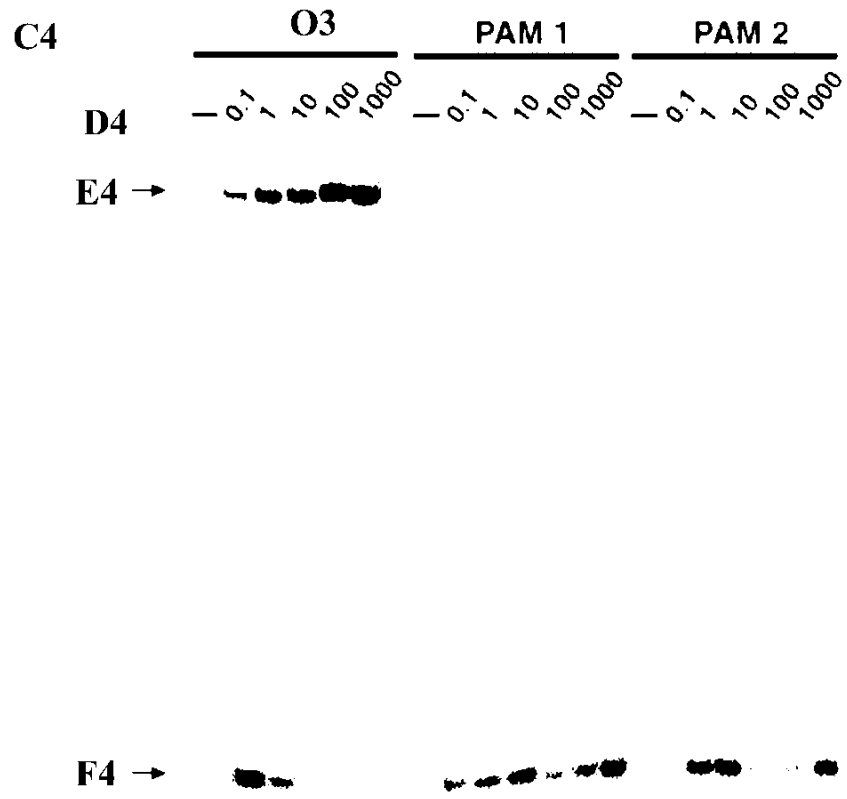
B

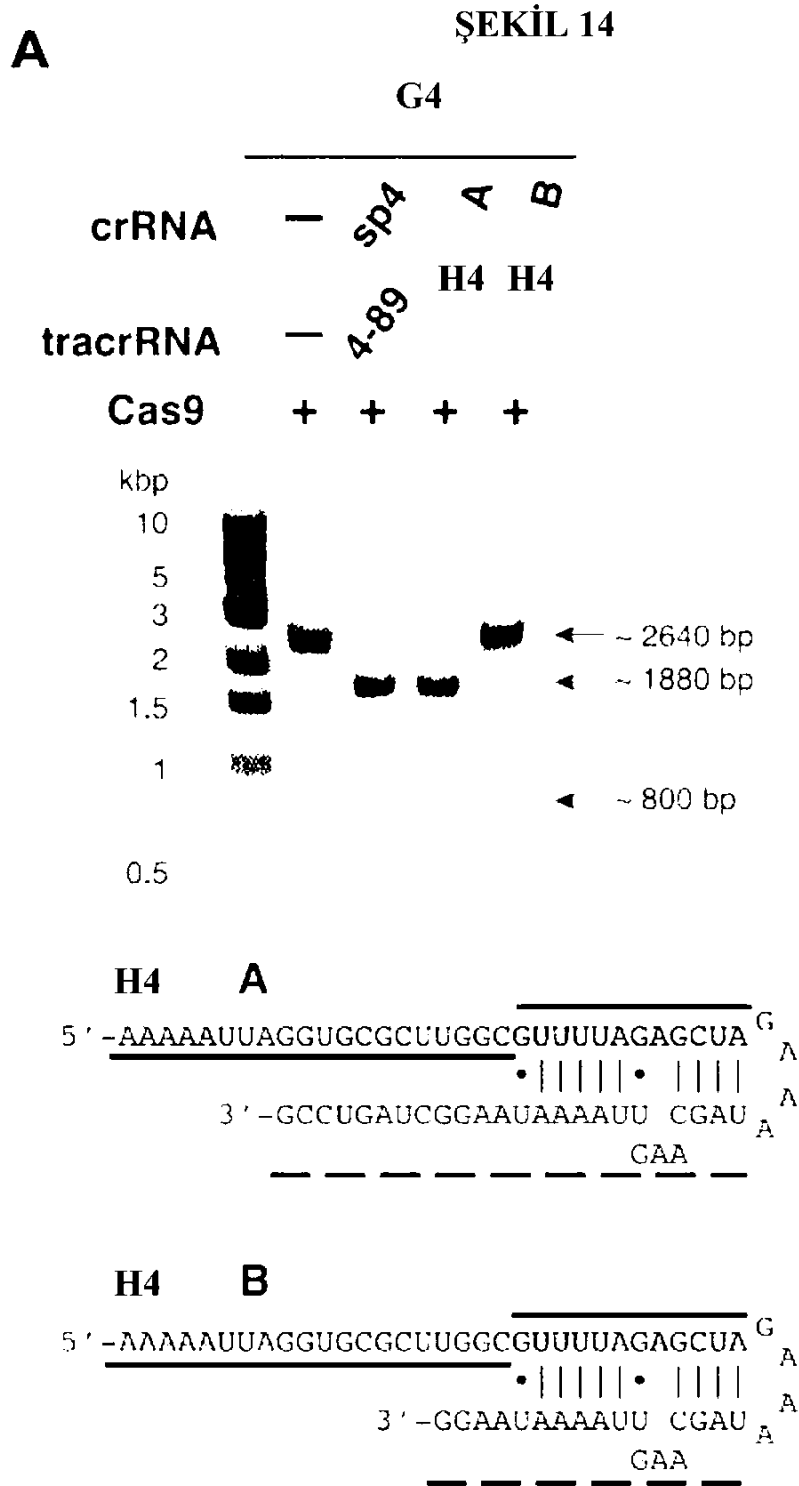
Y3



ŞEKİL 13

C

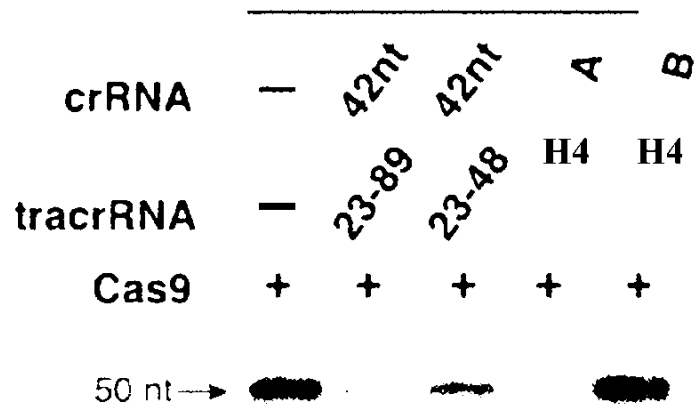




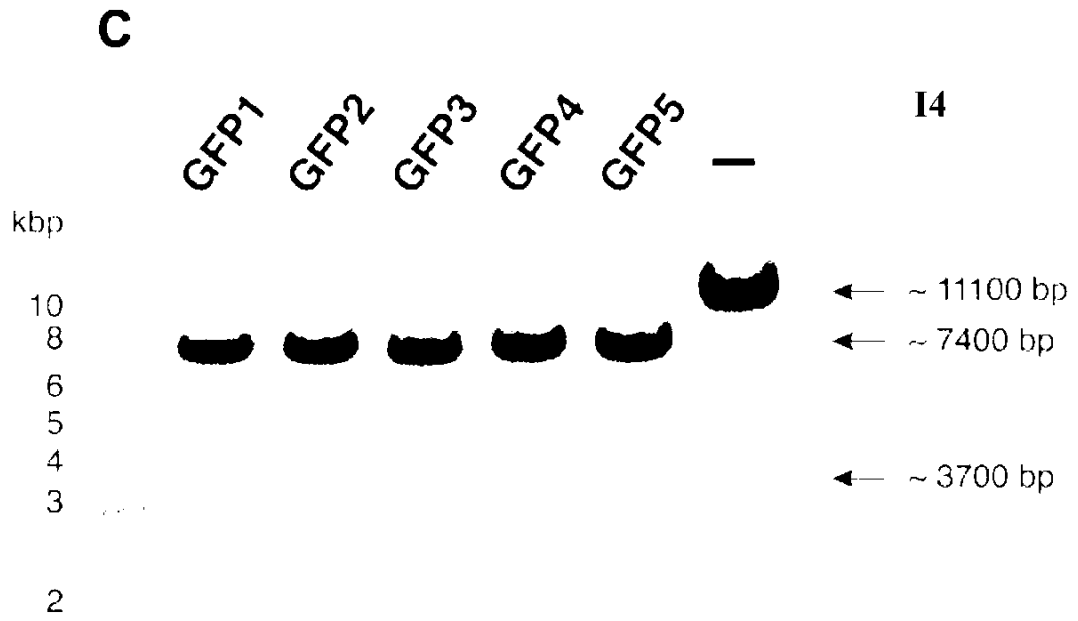
## ŞEKİL 14

B

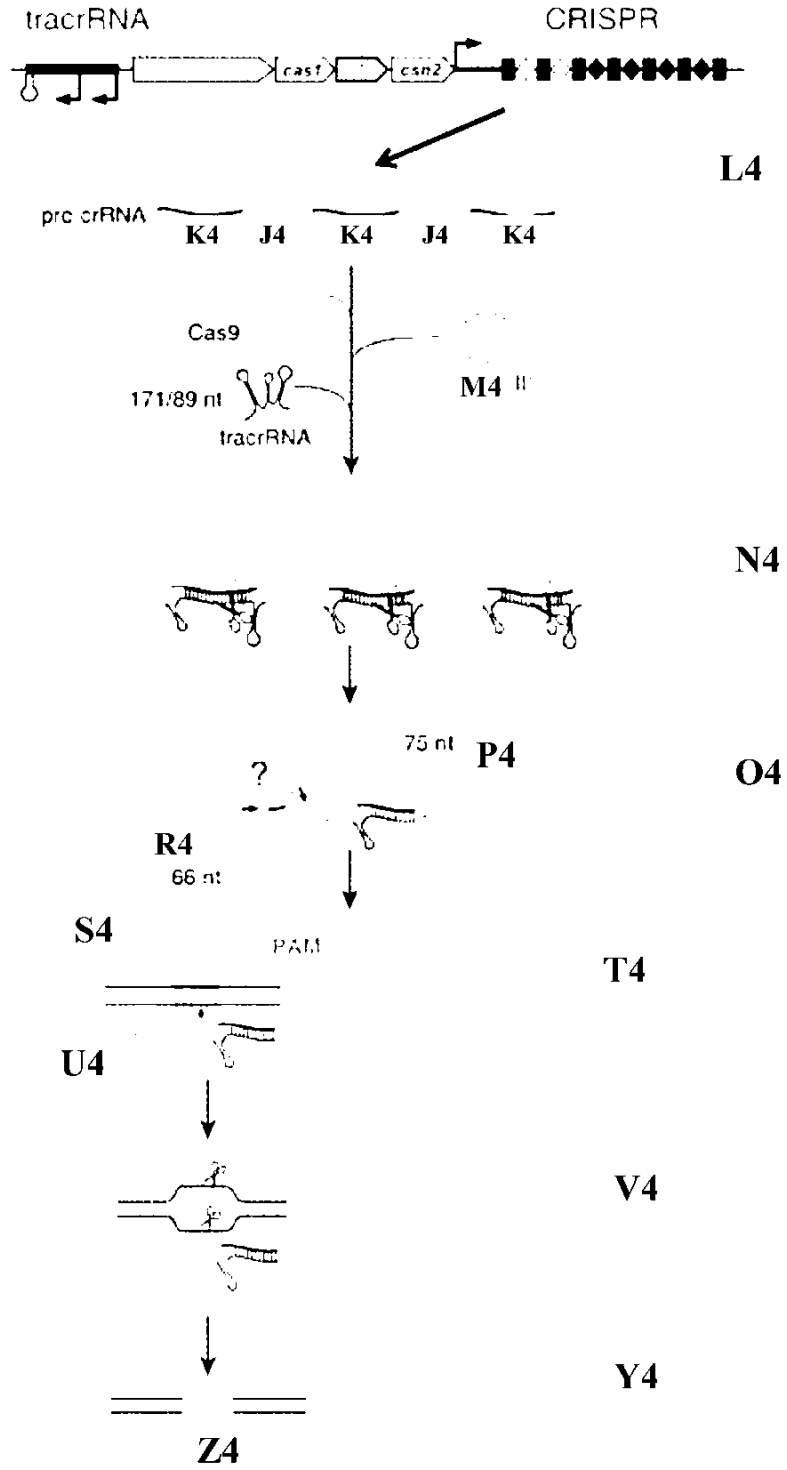
Y3



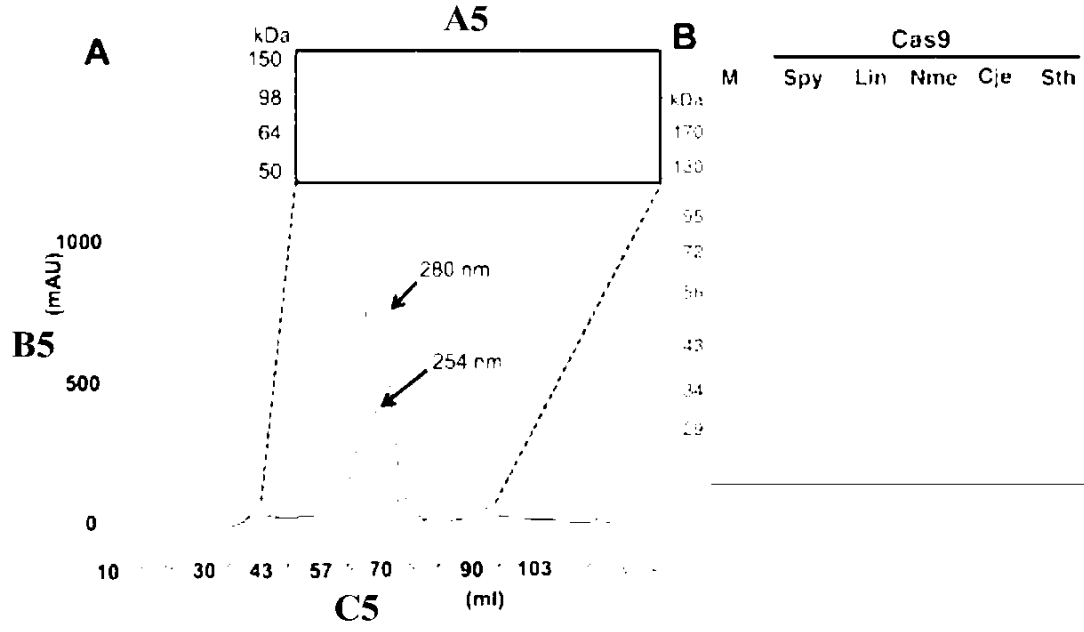
ŞEKİL 14



ŞEKİL 15

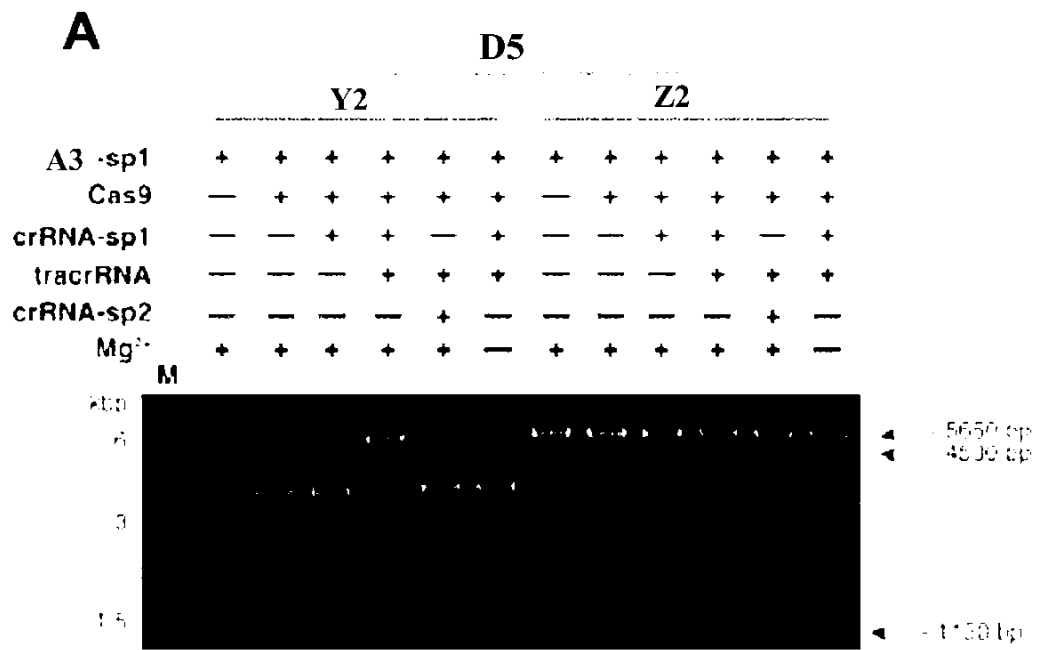


ŞEKİL 16





ŞEKİL 17





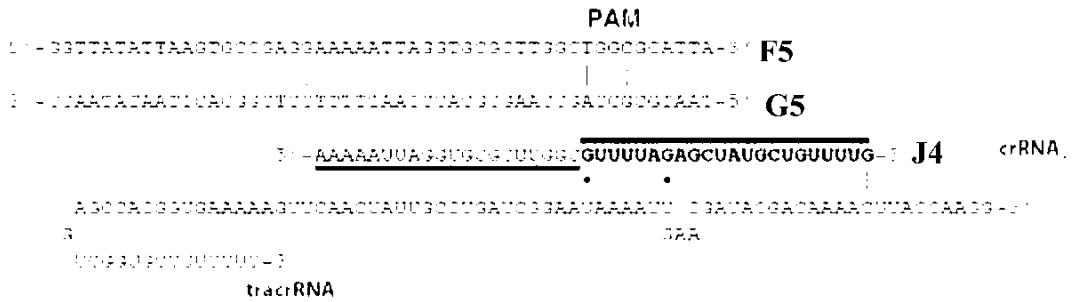
ŞEKİL 17

**C**

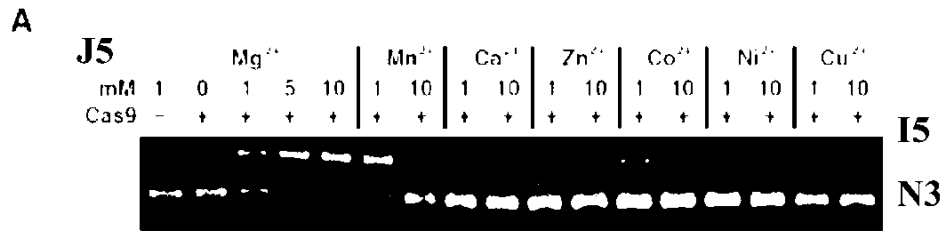
		H5															
		E3								F3							
C3		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D3		-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	Cas9	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	crRNA-sp4 (42nt)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	tracrRNA	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
	crRNA-sp2	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	crRNA-sp1	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-

50 nt →

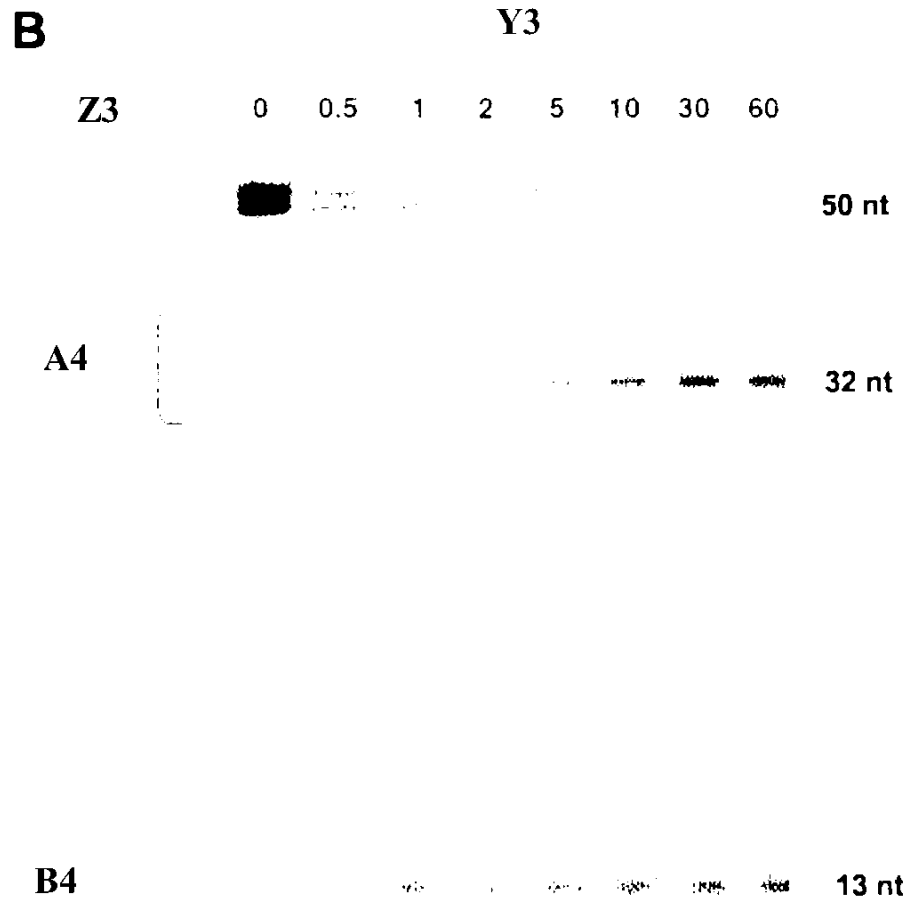
10 nt →



## ŞEKİL 18

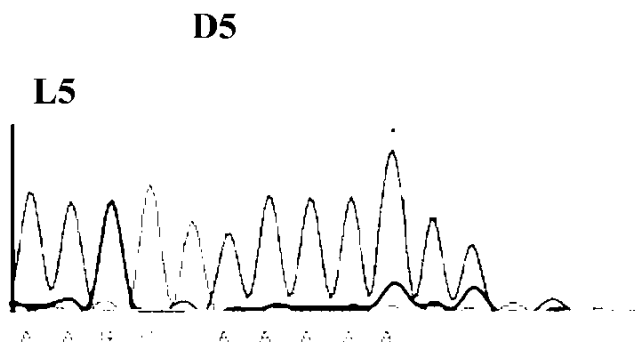


## ŞEKİL 18



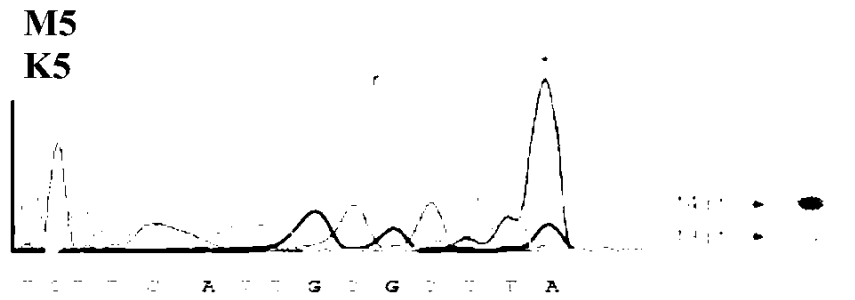
ŞEKİL 19

A



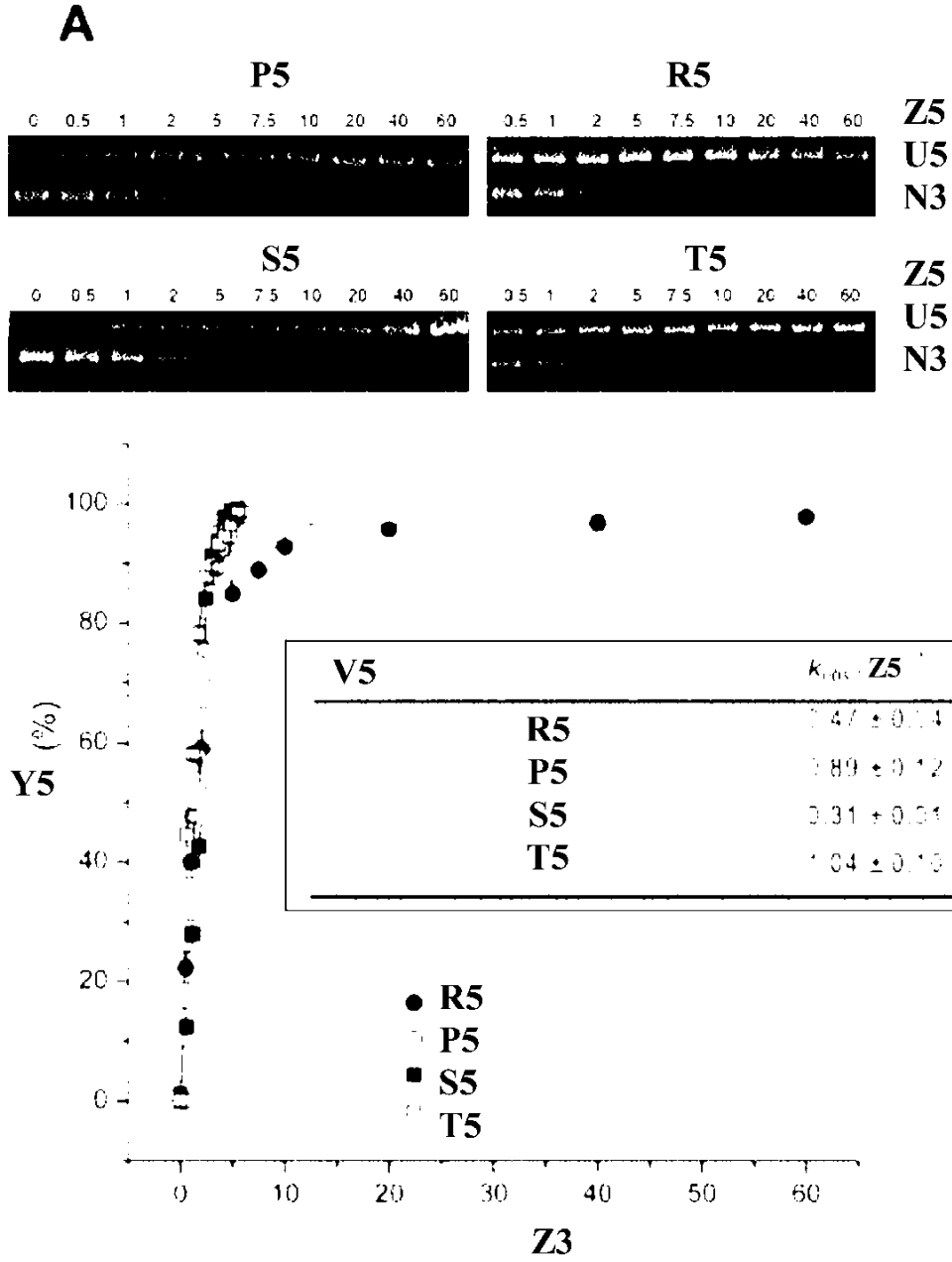
B

M P P M



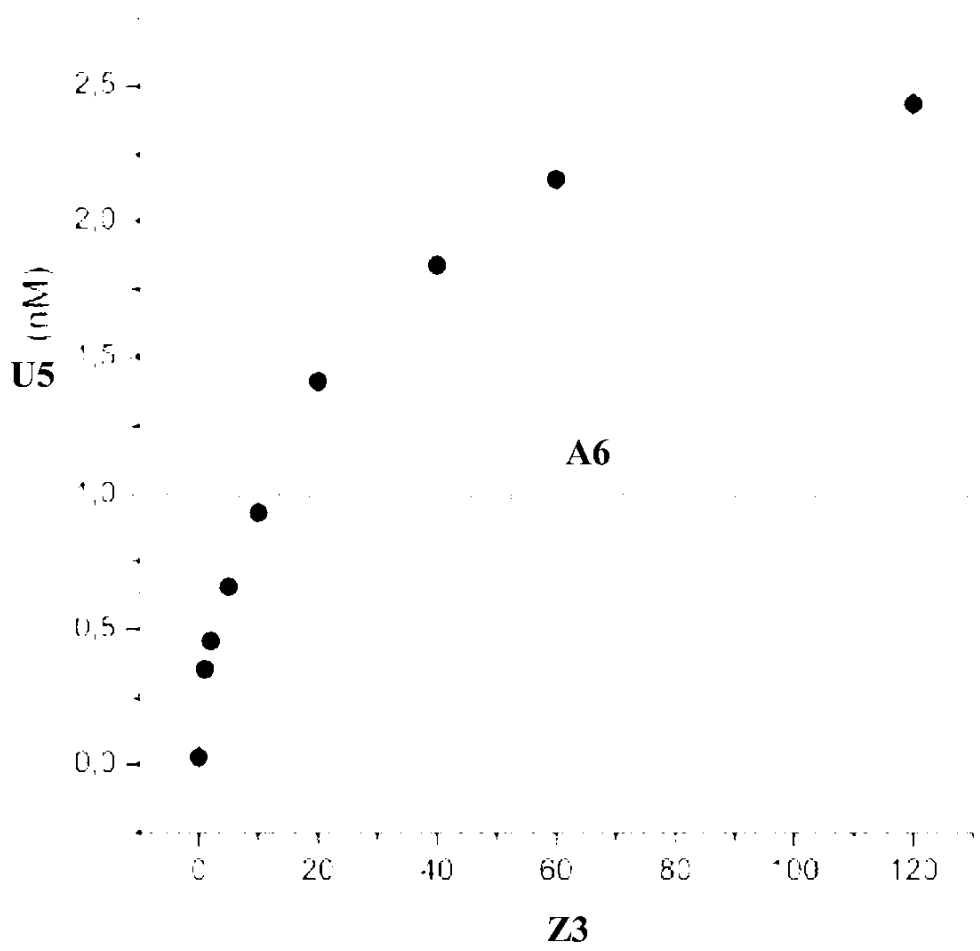
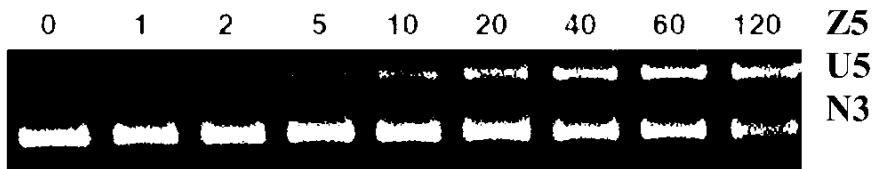


ŞEKİL 20

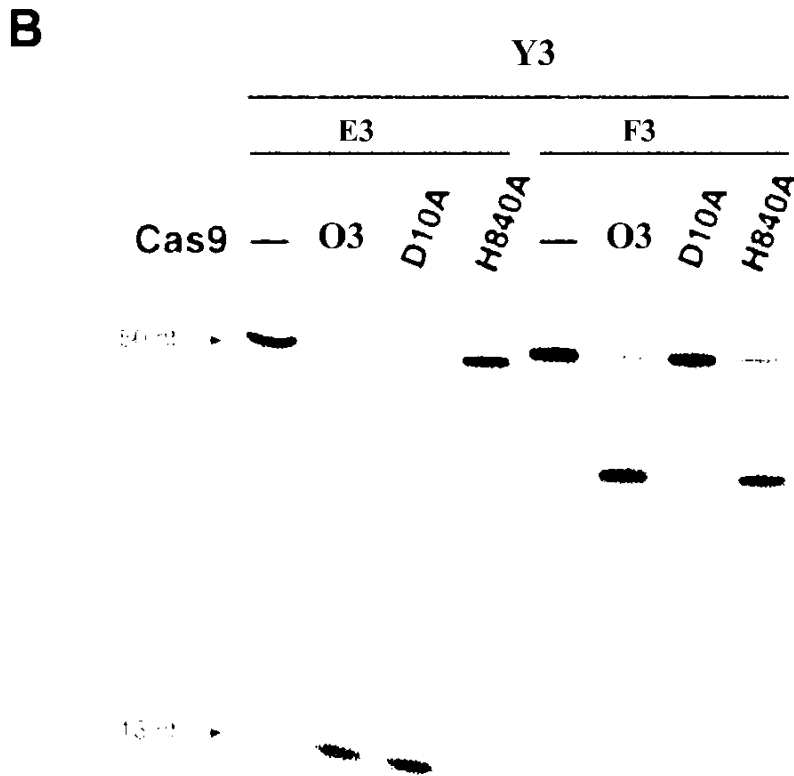
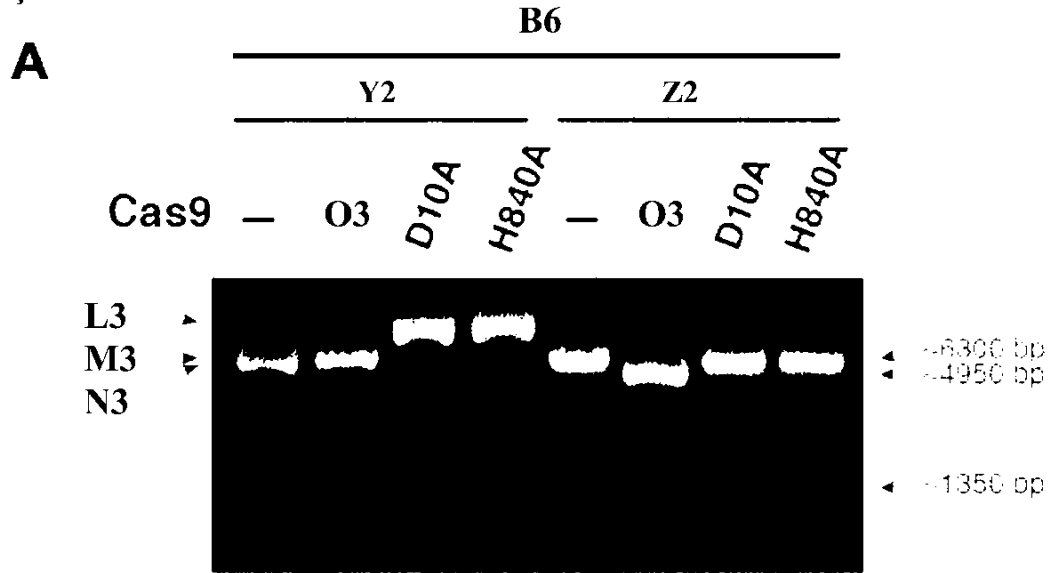




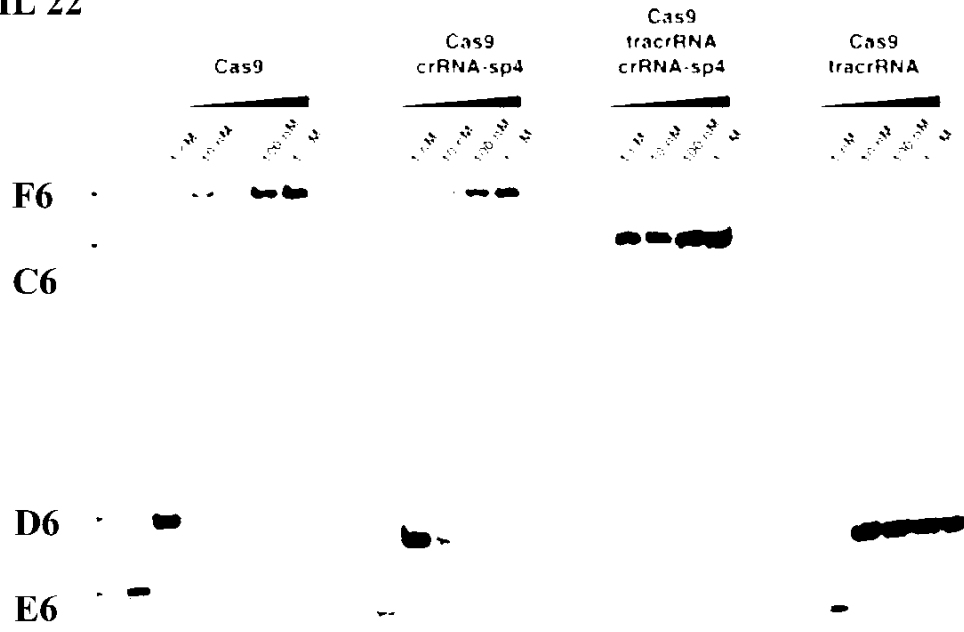
## ŞEKİL 20

**B**

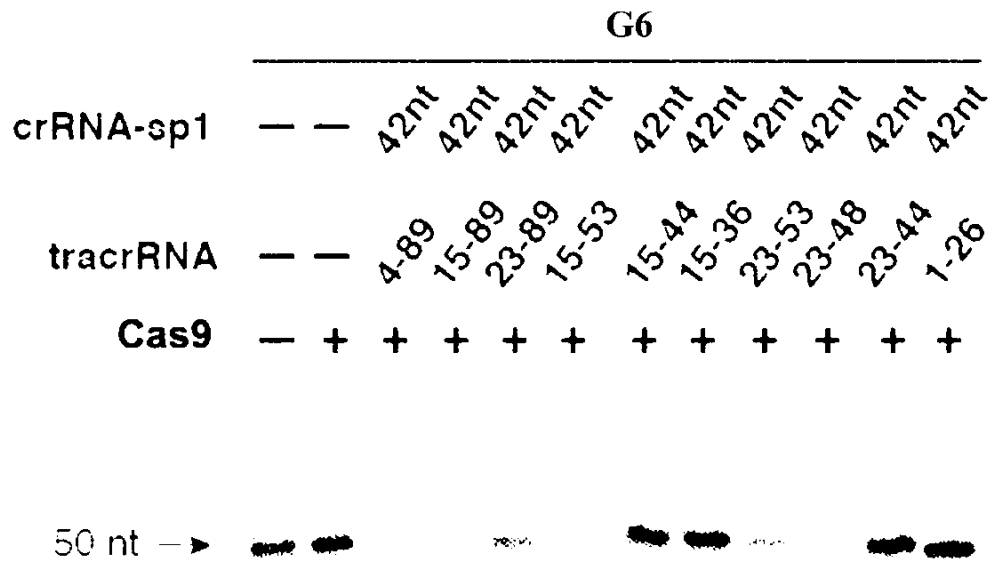
ŞEKİL 21



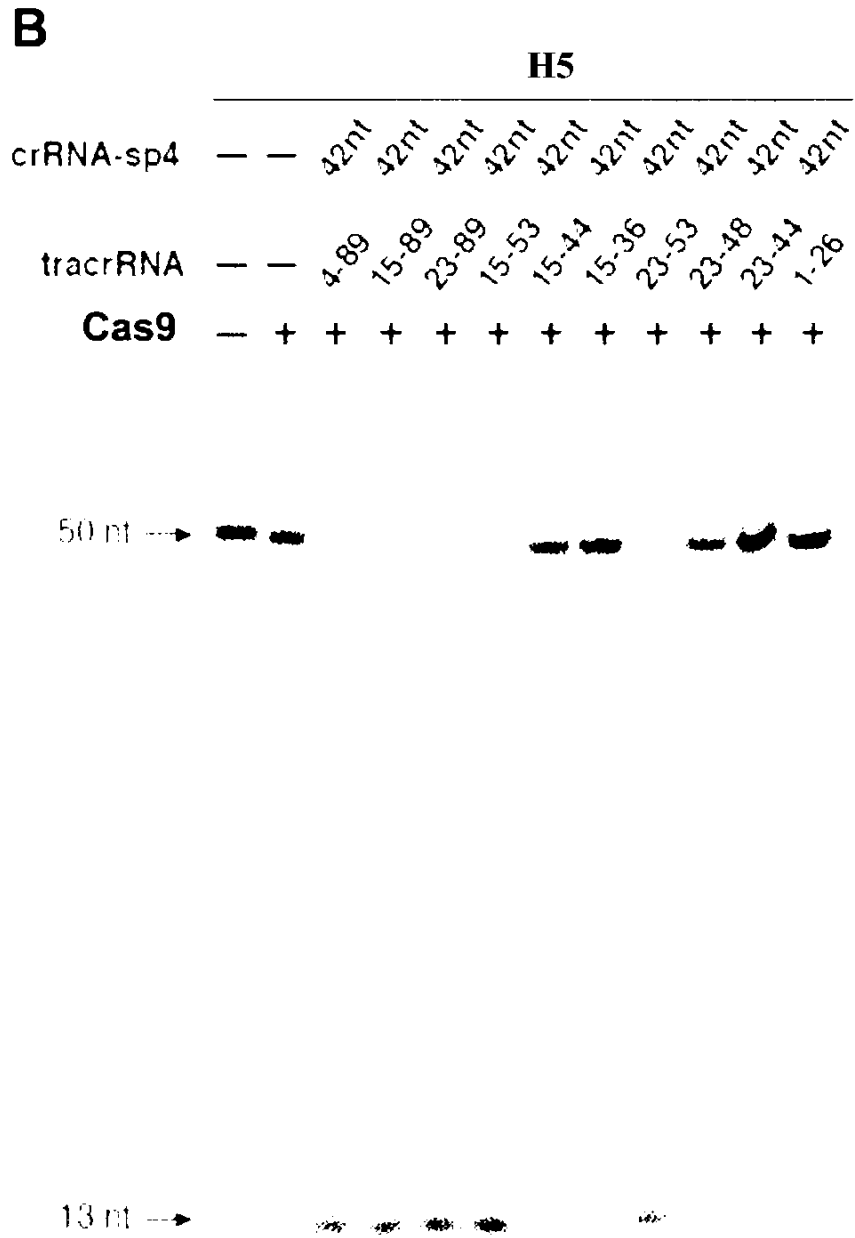
ŞEKİL 22



ŞEKİL 23

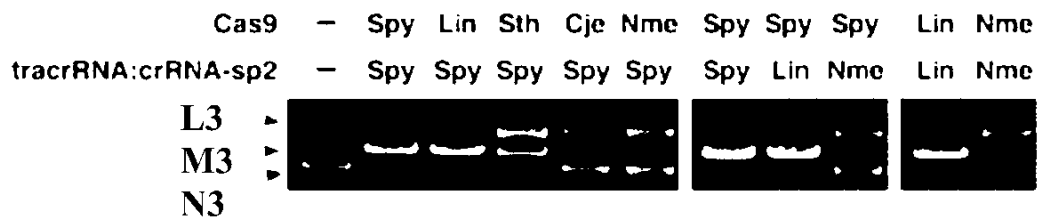
**A**

ŞEKİL 24

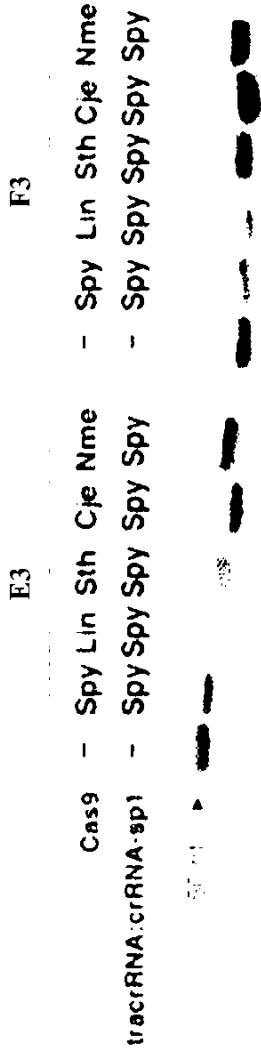


## ŞEKİL 24

A



**ŞEKİL 24 B** **E5**



50 bp

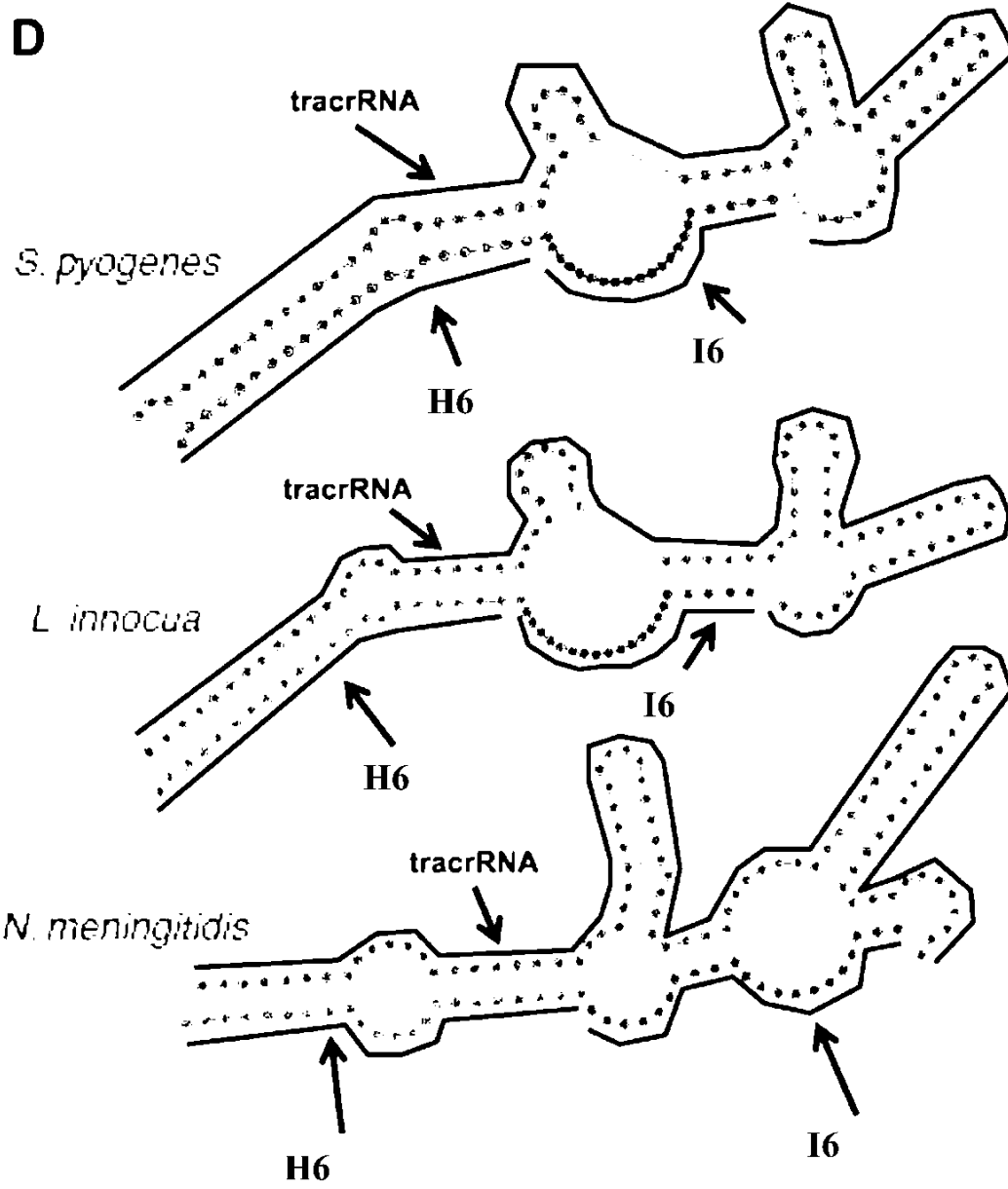
## ŞEKİL 24

C

	S. pyogenes	L. innocua	S. thermophilus	C. jejuni	N. meningitidis
S. pyogenes	x	54	58	16	16
L. innocua	54	x	52	15	14
S. thermophilus	58	52	x	16	15
C. jejuni	16	15	16	x	32
N. meningitidis	16	14	15	32	x



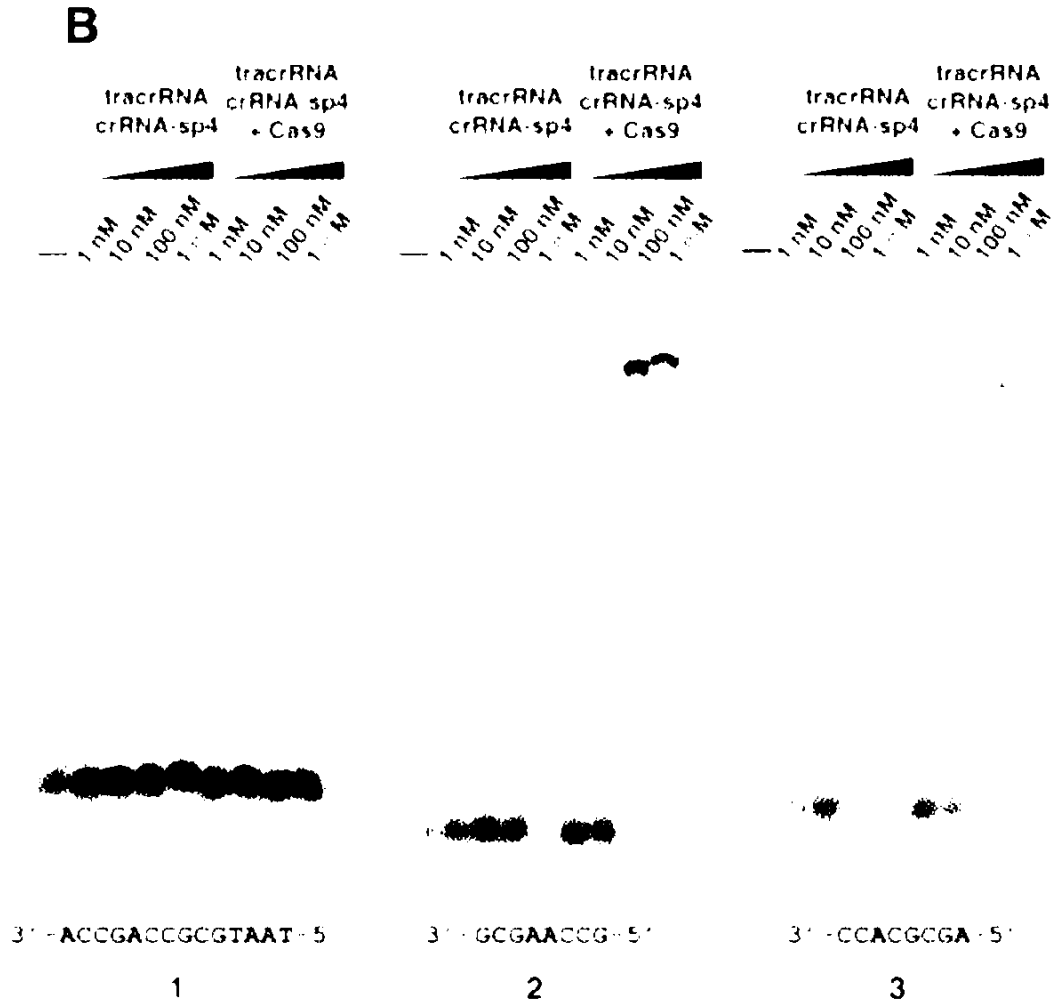
ŞEKİL 24



**ŞEKİL 25**

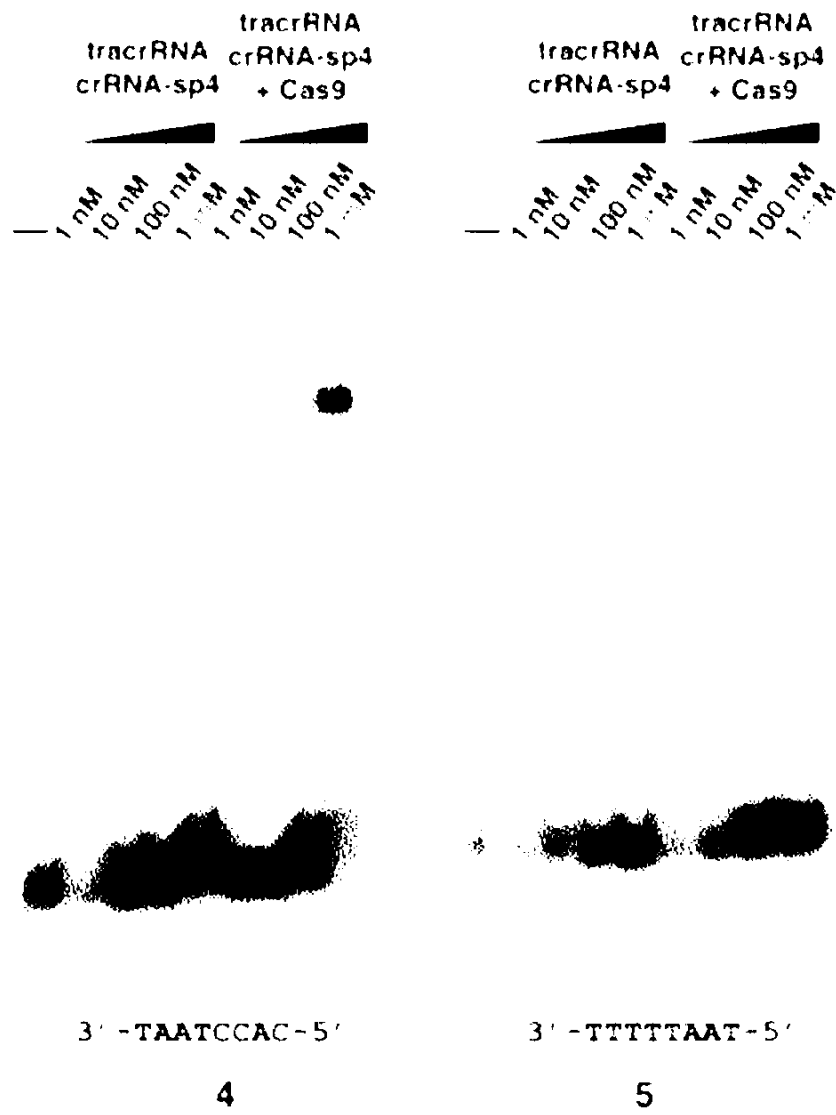


ŞEKİL 25

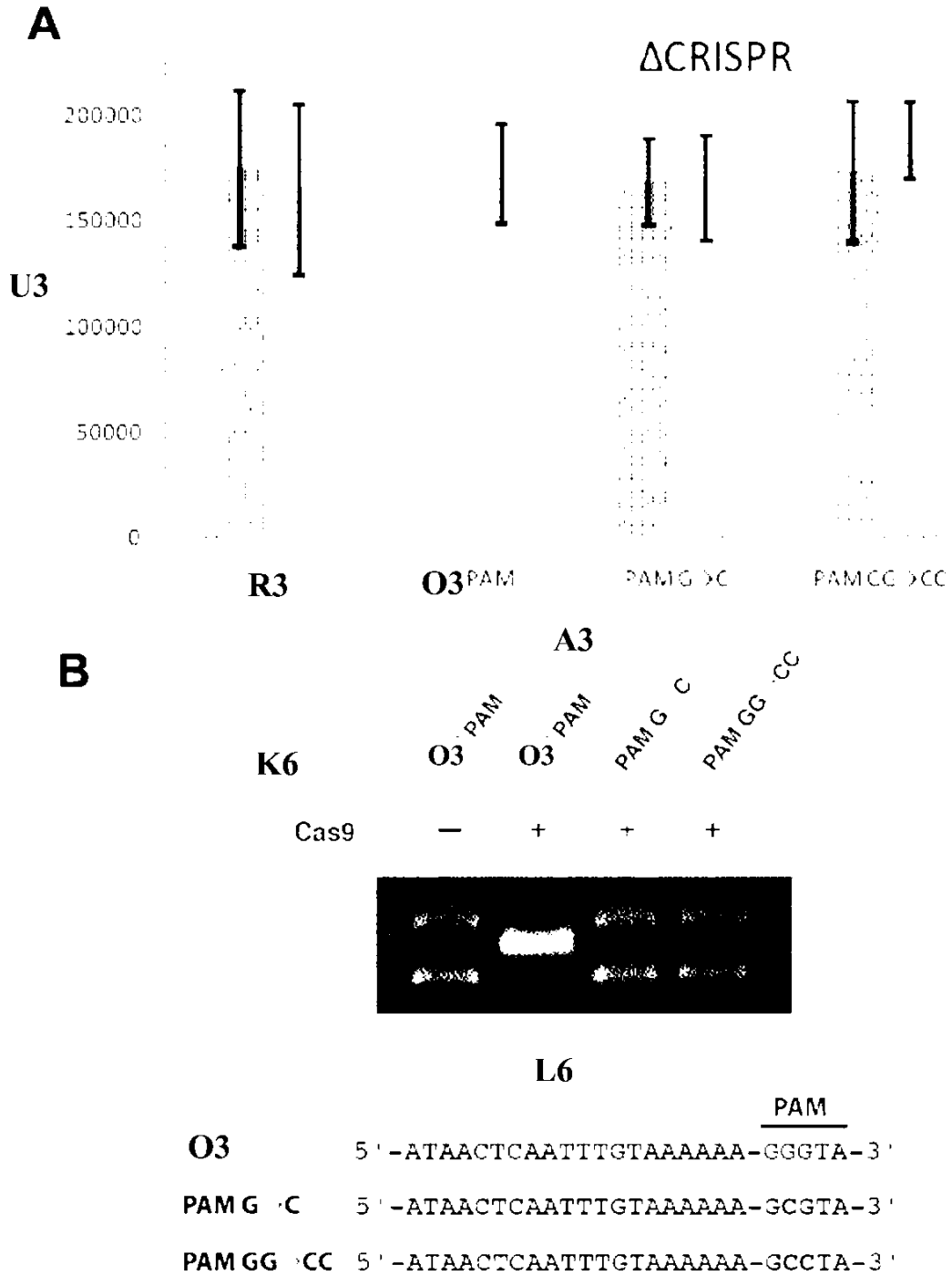


ŞEKİL 25

C

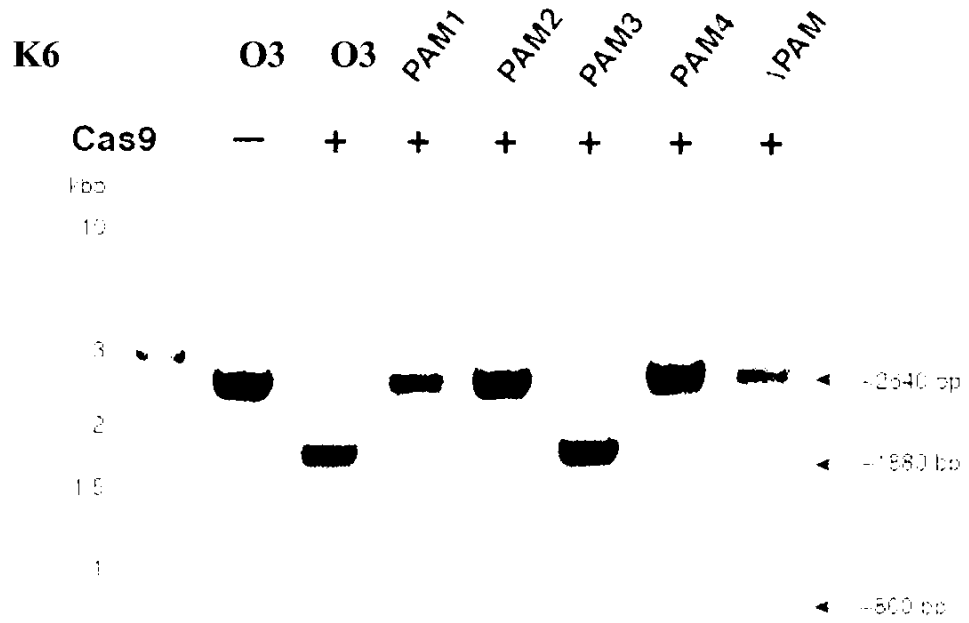


ŞEKİL 26

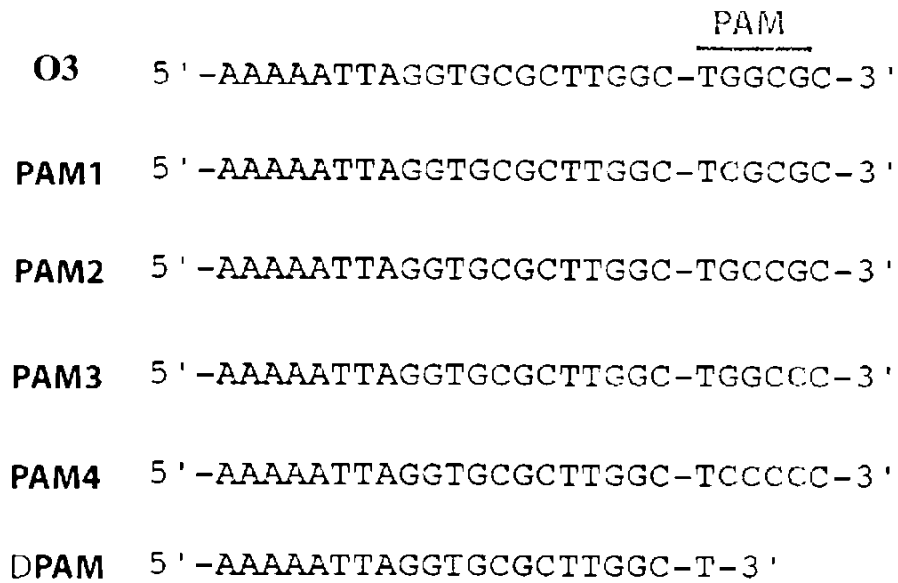


ŞEKİL 26

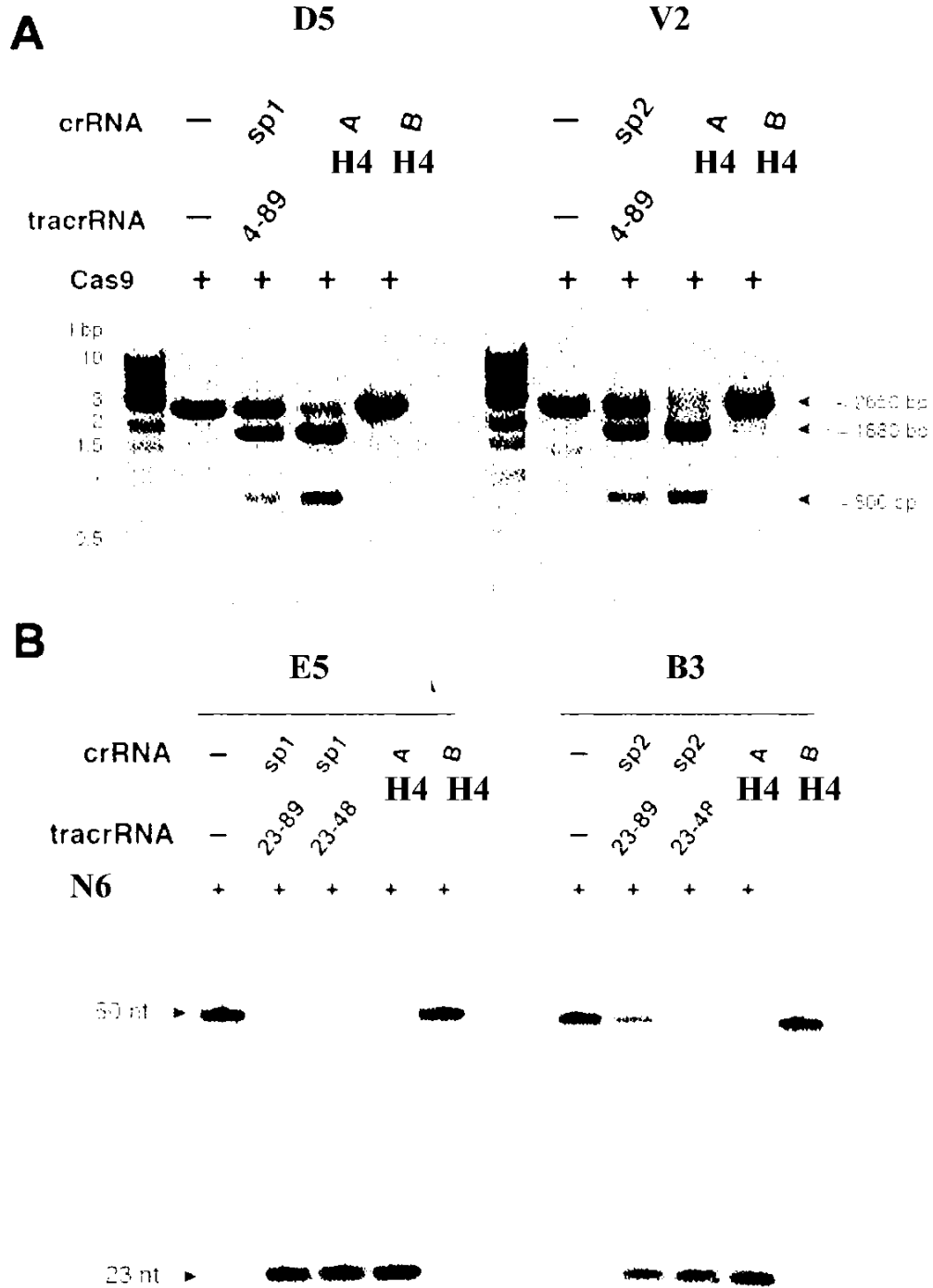
C



M6



ŞEKİL 27

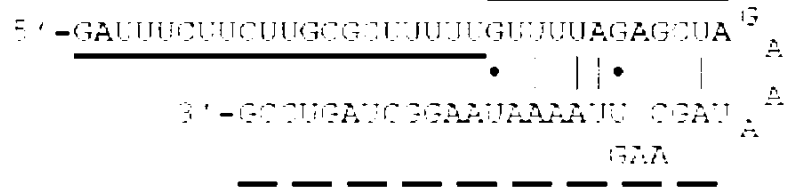


## ŞEKİL 27

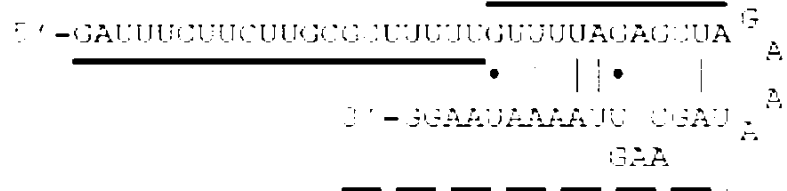
C

O6

H4 A

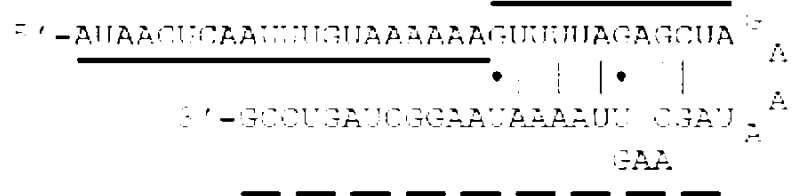


H4 B

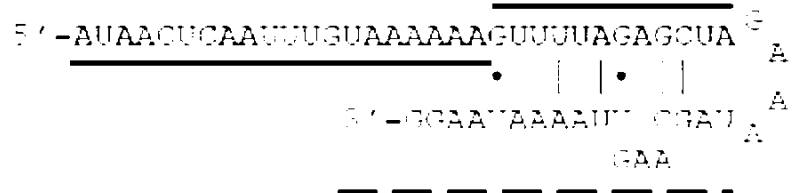


P6

H4 A



H4 B





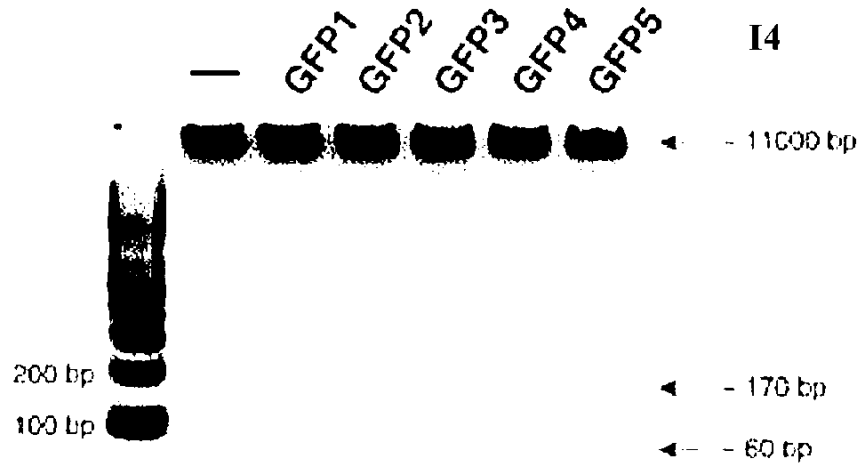


## ŞEKİL 28

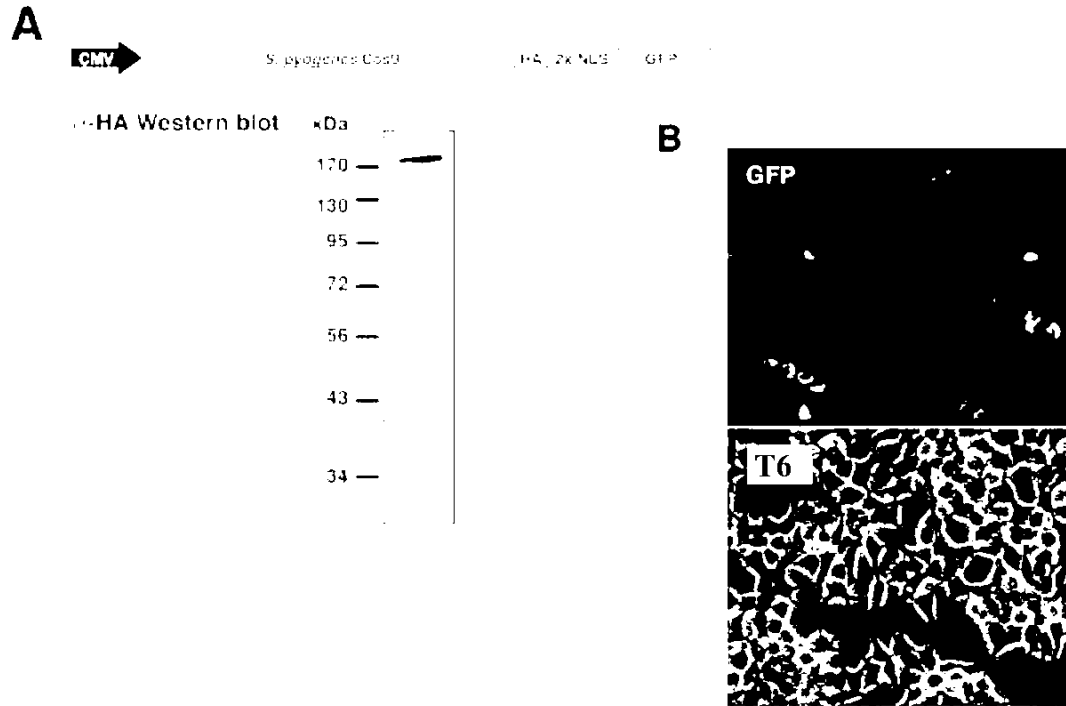
C	S6	PAM	
GFP1	CCAATTCTTGTGAAATTAGA-TGGTGA		5' - CCAAUJCUUGUUGAAUUAGAGUUUUUJAGAGCCUAG <sup>G</sup> A •         •         A 3' - GCCUGAUCGGAAUAAAUUU CGAUA GAA
GFP2	AATTAGATGGTGATGTTAAT-GGGCAC		5' - AAUUAGAUGGUGAUGUUUAUUGUUUUUJAGAGCCUAG <sup>G</sup> A •         •         A 3' - GCCUGAUCGGAAUAAAUUU CGAUA GAA
GFP3	AAATTTTCTGTCAGTGGAGA-GGGTGA		5' - AAUUUUJUCUGUCAGUGGAGAGUUUUUJAGAGCCUAG <sup>G</sup> A •         •         A 3' - GCCUGAUCGGAAUAAAUUU CGAUA GAA
GFP4	CATCTAATTCCAACAAGAAAT-TGGGACA		5' - CAUCUAAUUCACAAAGAAUUUGUUUUUJAGAGCCUAG <sup>G</sup> A •         •         A 3' - GCCUGAUCGGAAUAAAUUU CGAUA GAA
GFP5	CAGTAGTGCAAAATAAATTTA-AGGGTA		5' - CAGUAGUGCAAAUAAAUUUJAGAGCCUAG <sup>G</sup> A •         •         A 3' - GCCUGAUCGGAAUAAAUUU CGAUA GAA

ŞEKİL 28

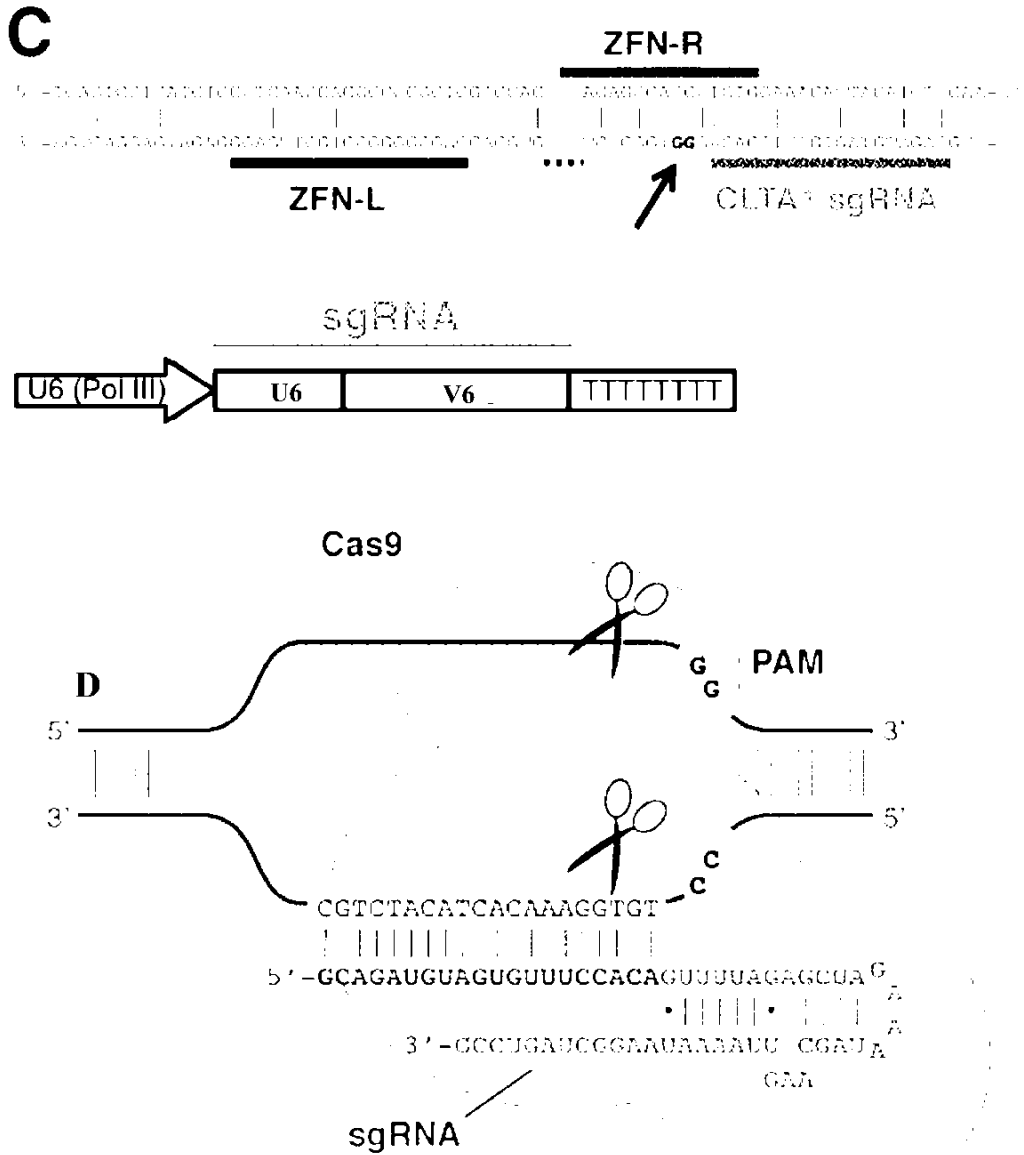
D



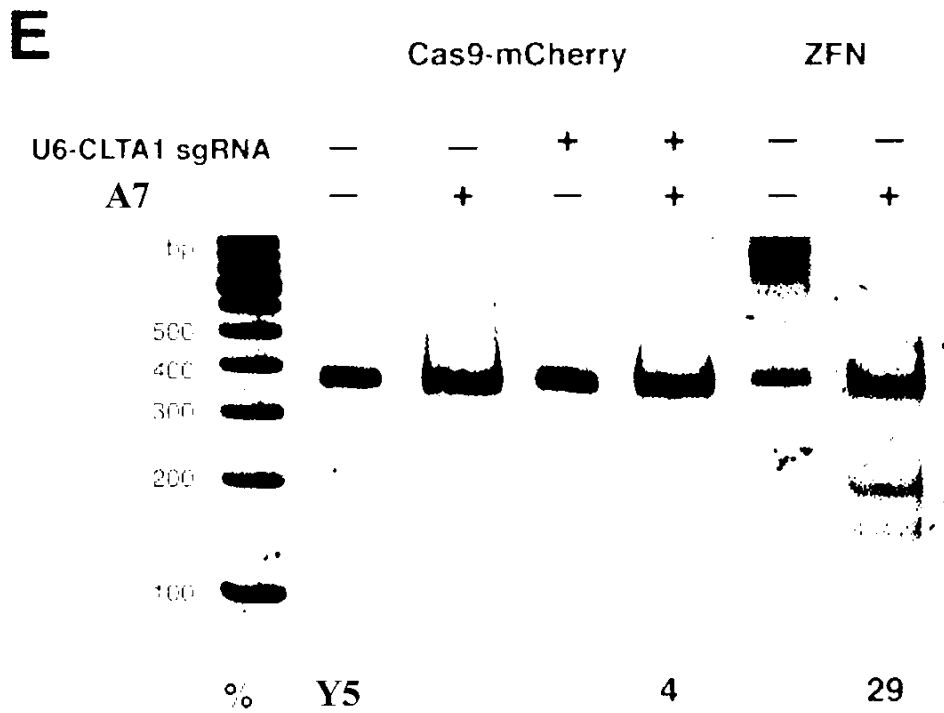
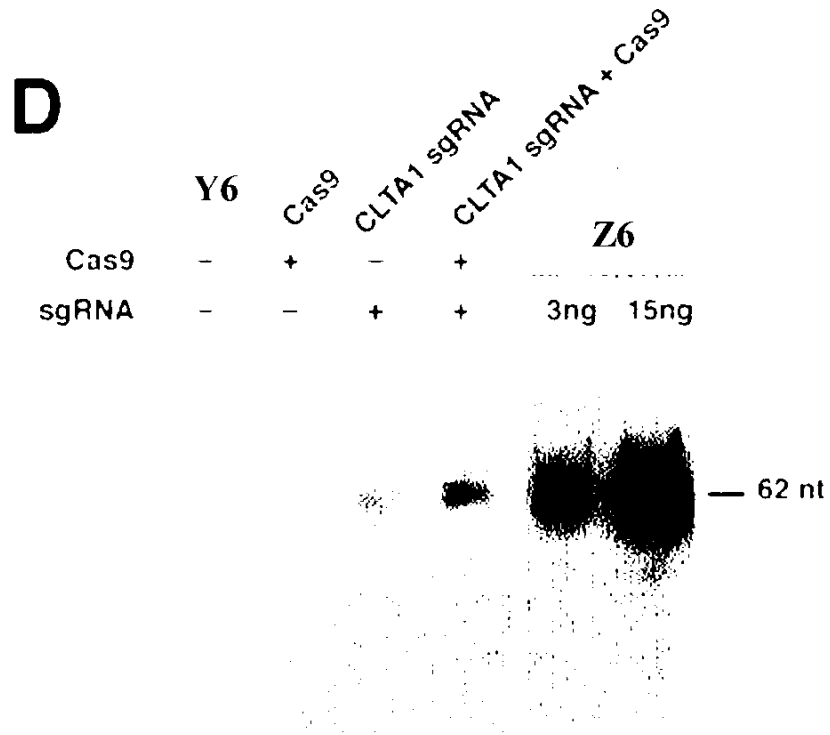
## ŞEKİL 29



ŞEKİL 29



ŞEKİL 29

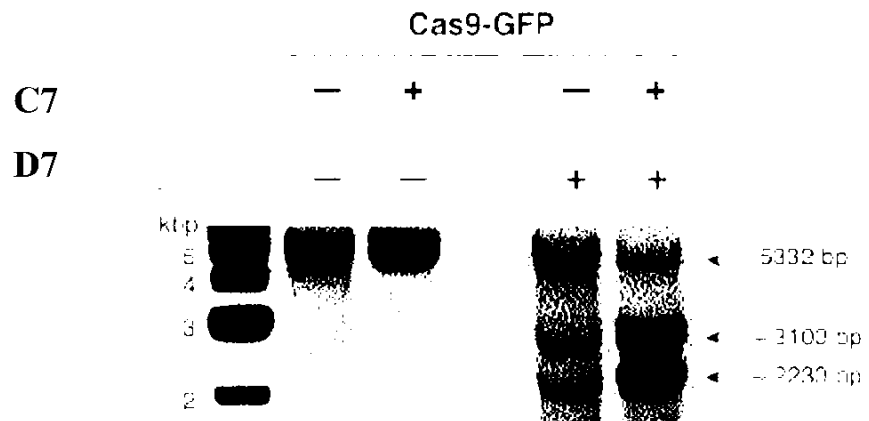


ŞEKİL 30

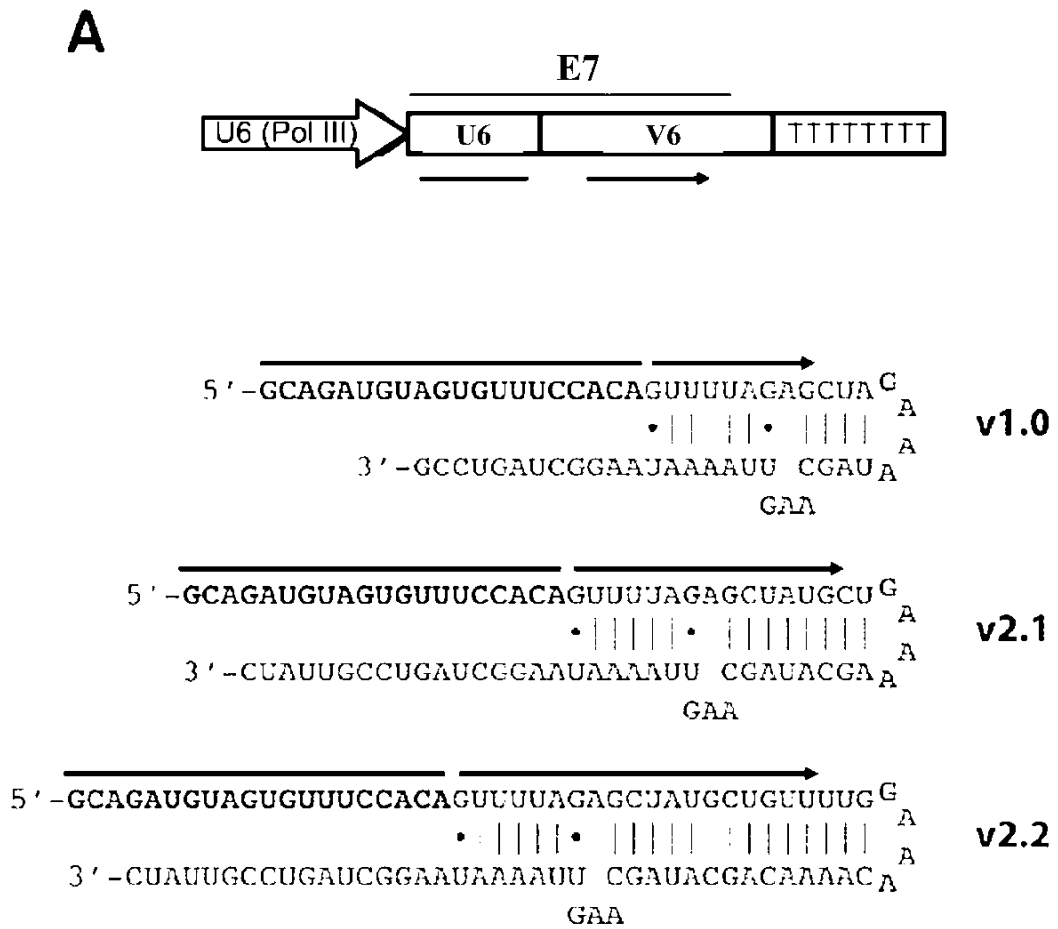
**A**



**B**



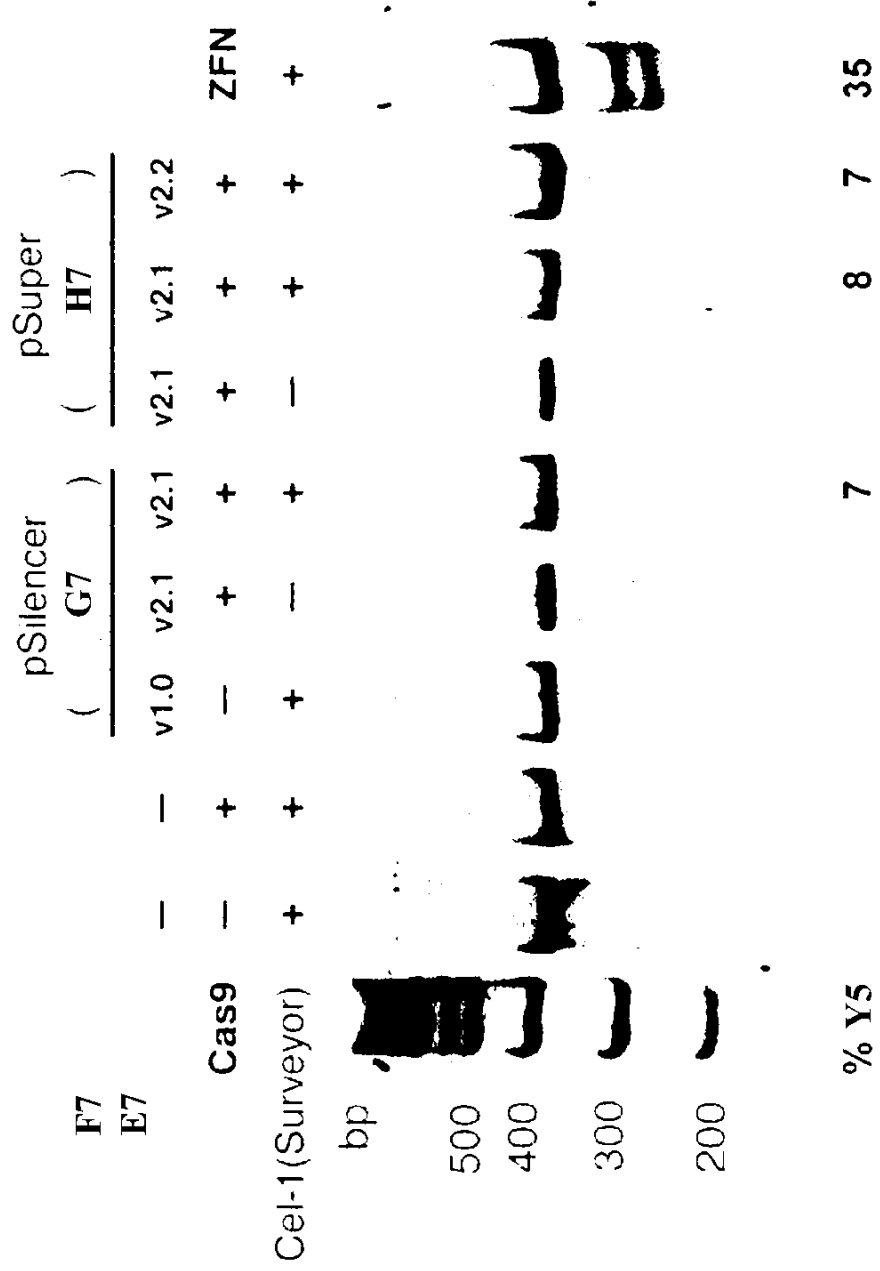
## ŞEKİL 31



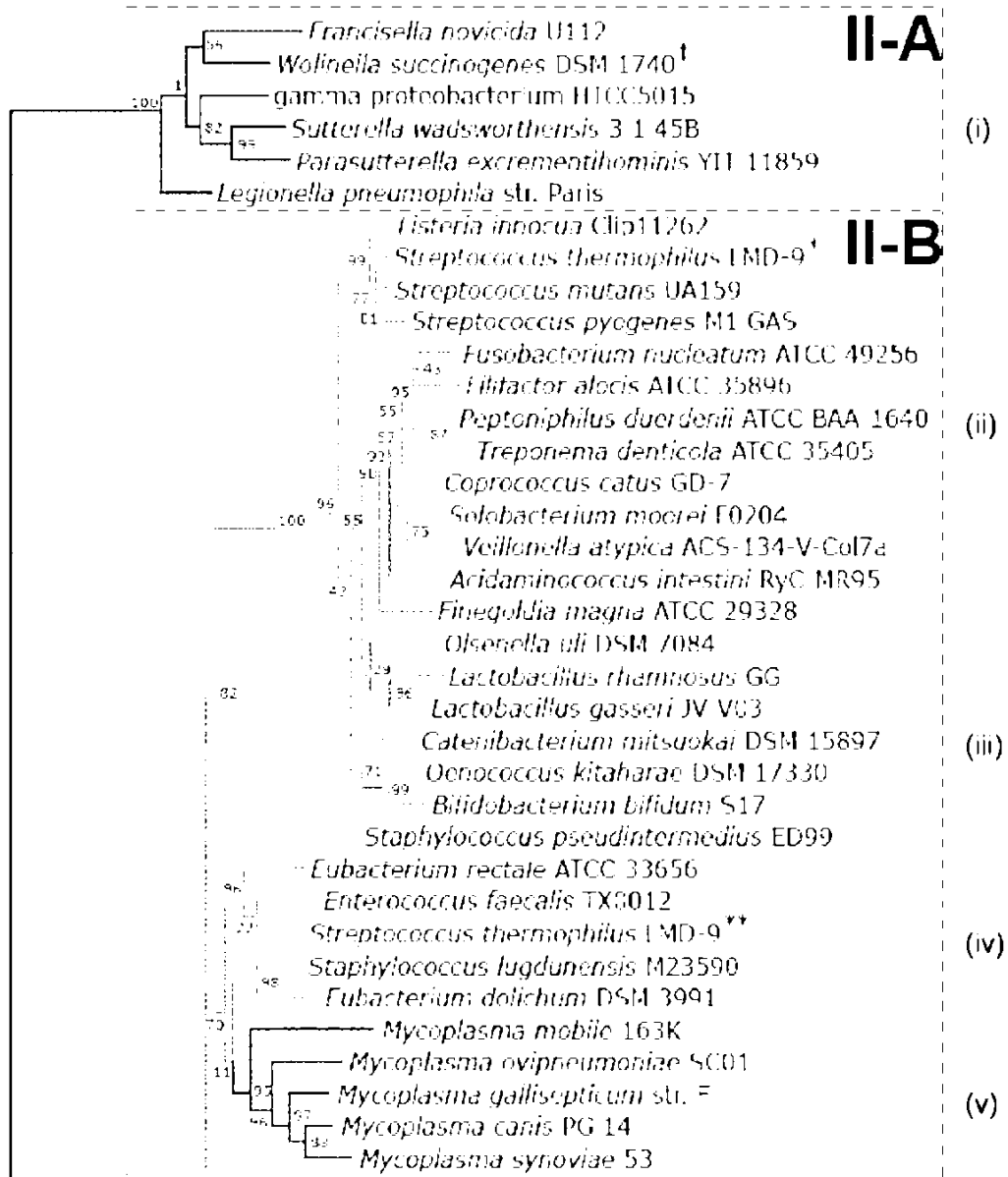


ŞEKİL 31

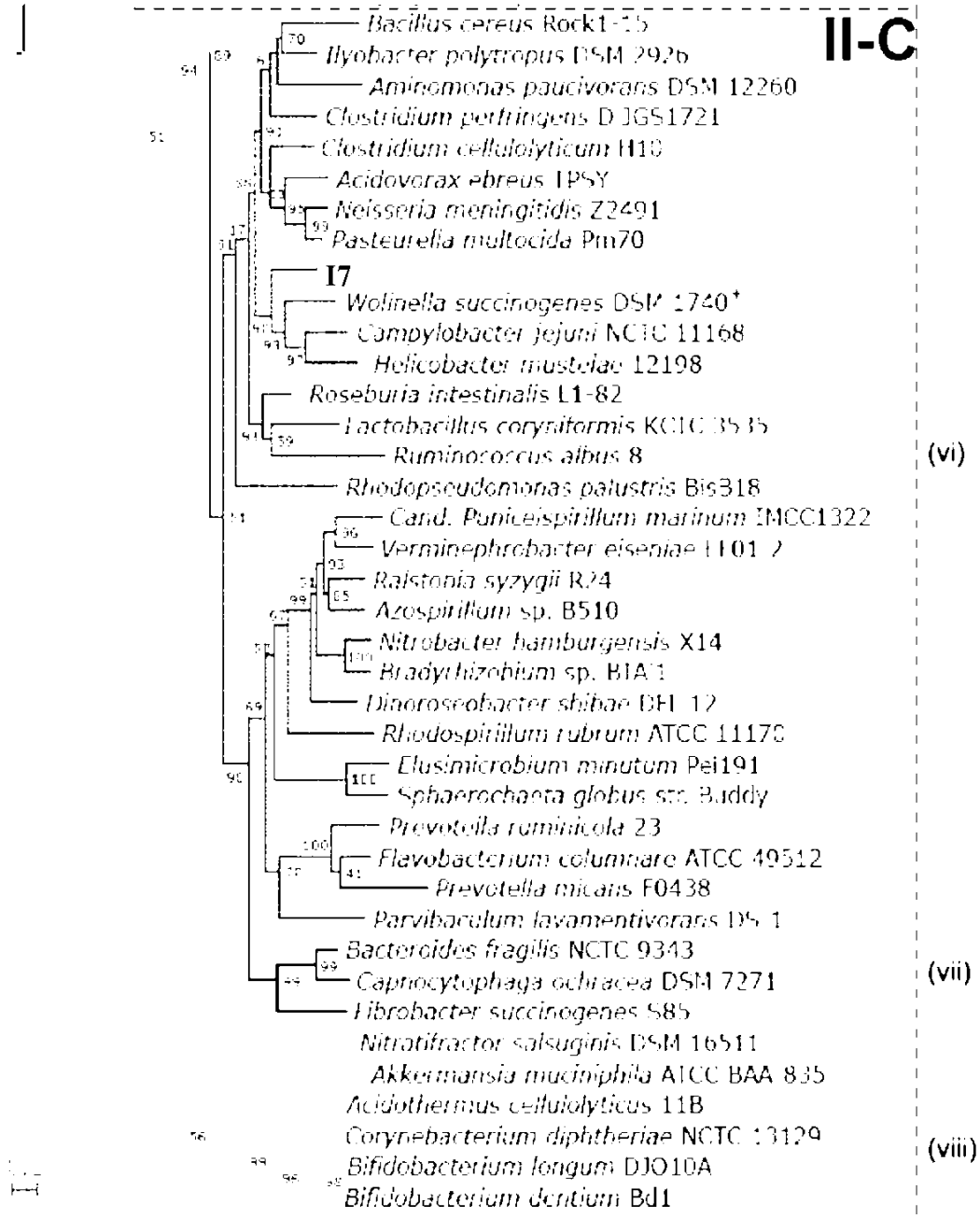
**B**



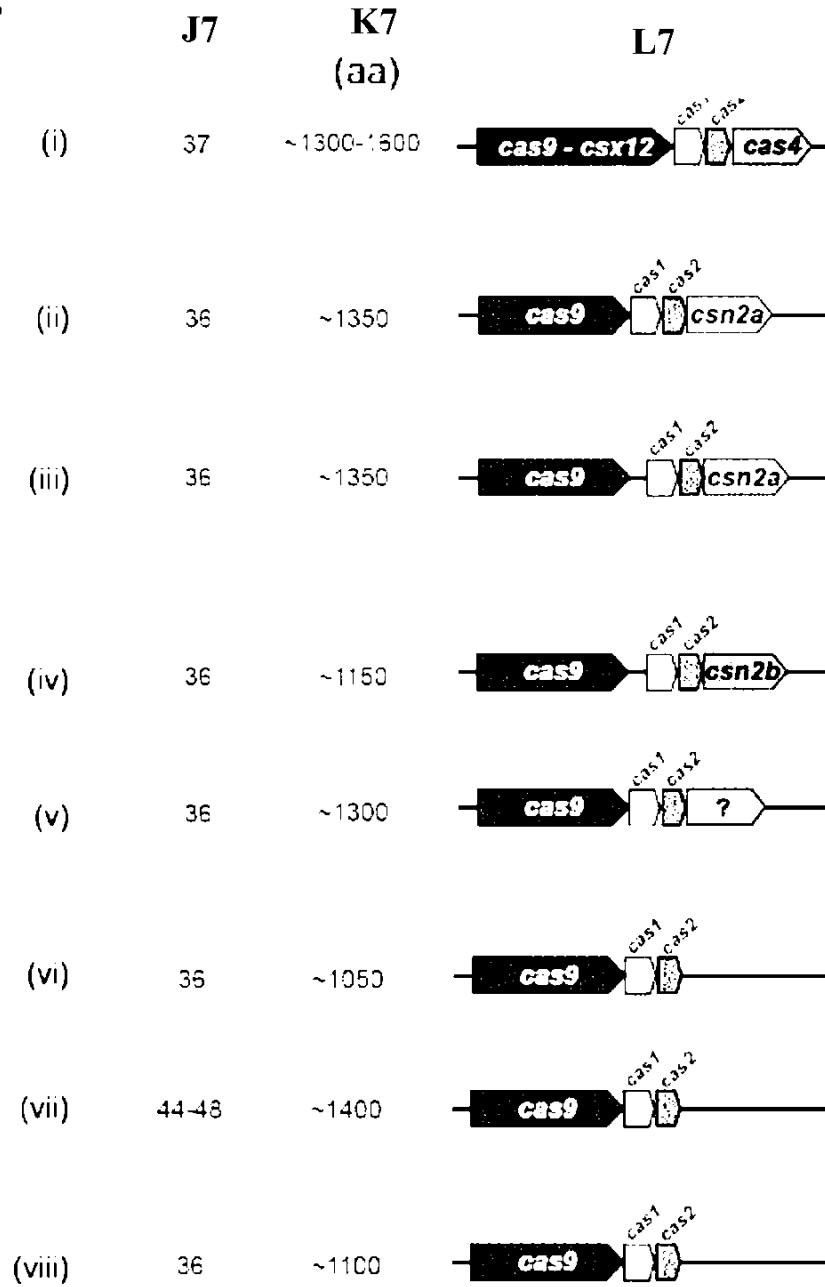
ŞEKİL 32 A



## ŞEKİL 32 (devami)



## ŞEKİL 32 B



## ŞEKİL 33

A

M7 II-A



**B****ŞEKİL 33****M7 II-B***Ustilago violacea* C1011000*Streptococcus thermophilus* LMD-9*Streptococcus mutans* UA159*Streptococcus pyogenes* M1 GAS*Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43870*Haemophilus influenzae* ATCC 49619*Haemophilus influenzae* ATCC 10211*Treponema pallidum* ATCC 35475*Geobacillus stearothermophilus* DSM 9790*Salmonella enteritidis* F0204*Yersinia enterocolitica* A05-134-V-0172*Zoolepteryx incana* ATCC 49619*Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43870*Ureaplasma* ATCC 29923*Lactobacillus rhamnosus* GG*Lactobacillus casei* DSM 20011*Enterobacter aerogenes* ATCC 29547*Enterobacter aerogenes* DSM 17930*Enterobacter aerogenes* DSM 17930

C

## ŞEKİL 33

## M7 II-B ( N7 )



D  
M7

II-C

## ŞEKİL 33

*Escherichia coli* ATCC 8739*Vibrio cholerae* O1 Inaba NCTC 2926*Vibrio cholerae* O1 Inaba NCTC 2926*Vibrio cholerae* O1 Inaba NCTC 2926*Shigella flexneri* ATCC 3546*Shigella flexneri* ATCC 3546*Shigella flexneri* ATCC 3546*Shigella flexneri* ATCC 3546

I7

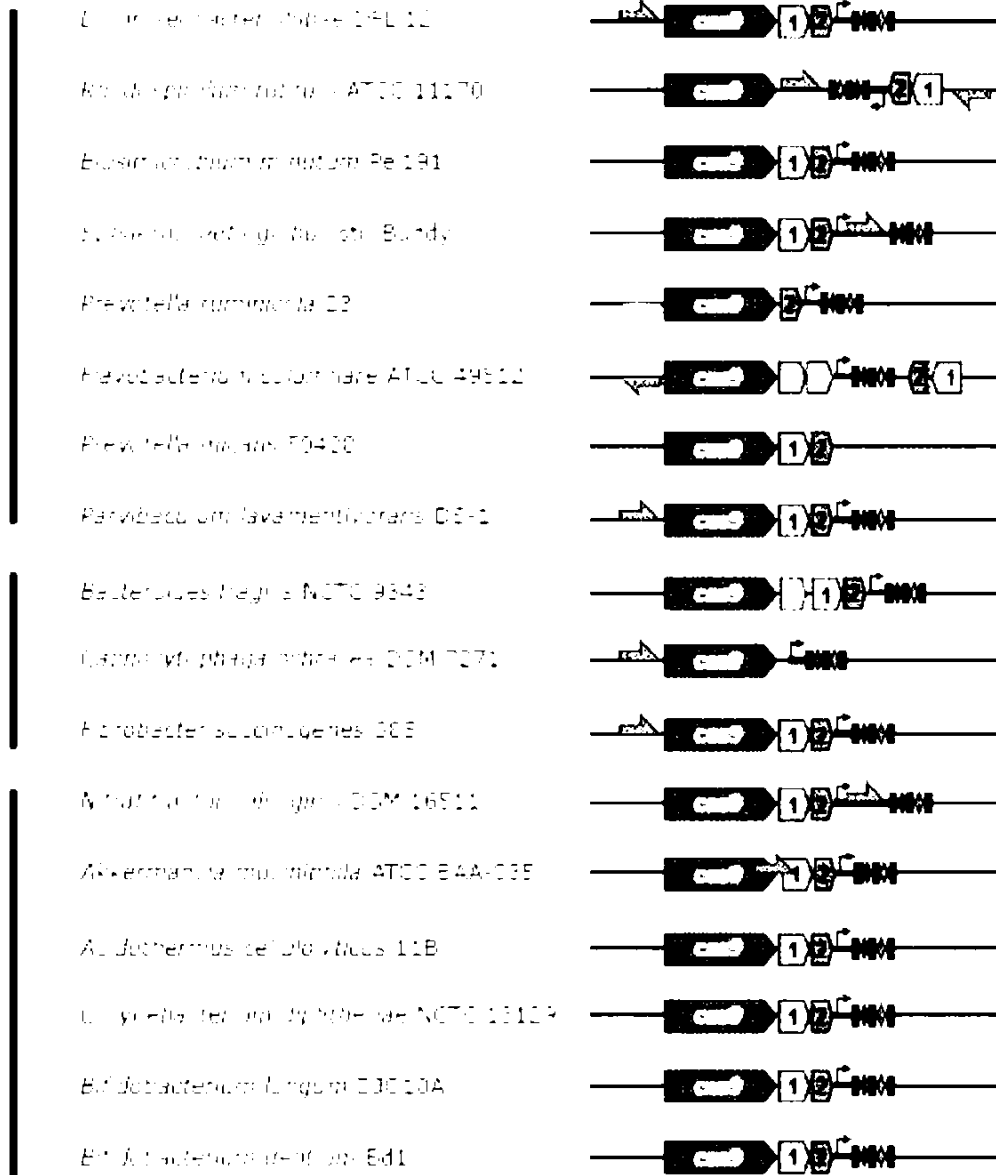
*Shigella flexneri* ATCC 3546*Shigella flexneri* ATCC 3546*Shigella flexneri* ATCC 3546*Shigella flexneri* ATCC 3546*Shigella flexneri* ATCC 3546*Shigella flexneri* ATCC 3546*Shigella flexneri* ATCC 3546*Shigella flexneri* ATCC 3546*Shigella flexneri* ATCC 3546*Shigella flexneri* ATCC 3546*Shigella flexneri* ATCC 3546*Shigella flexneri* ATCC 3546*Shigella flexneri* ATCC 3546



E

## ŞEKİL 33

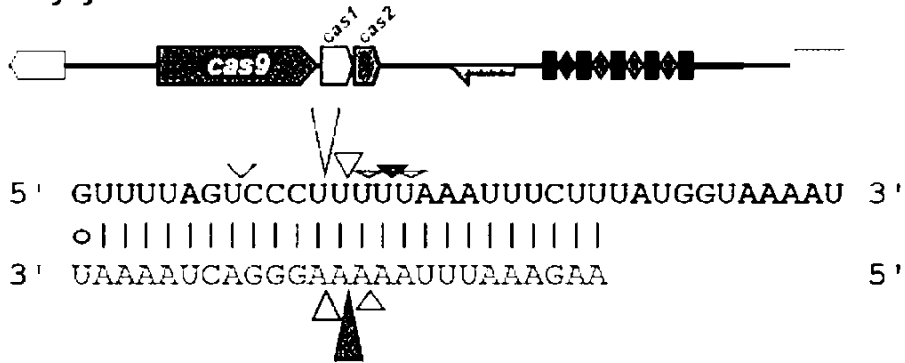
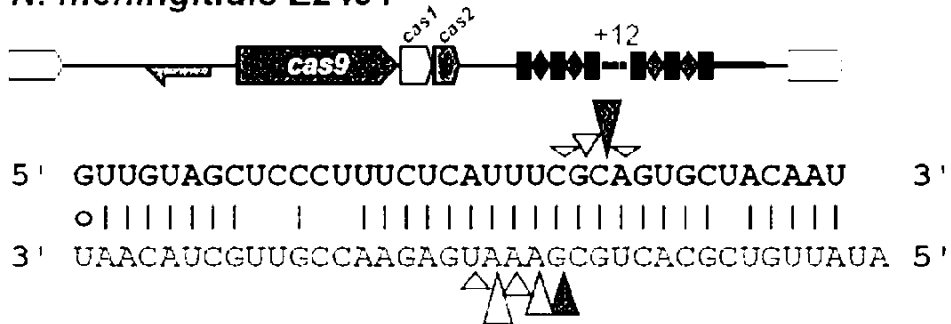
M7 II-C ( N7 )





## ŞEKİL 34

B

*C. jejuni* NCTC 11168*N. meningitidis* Z2491

ŞEKİL 35

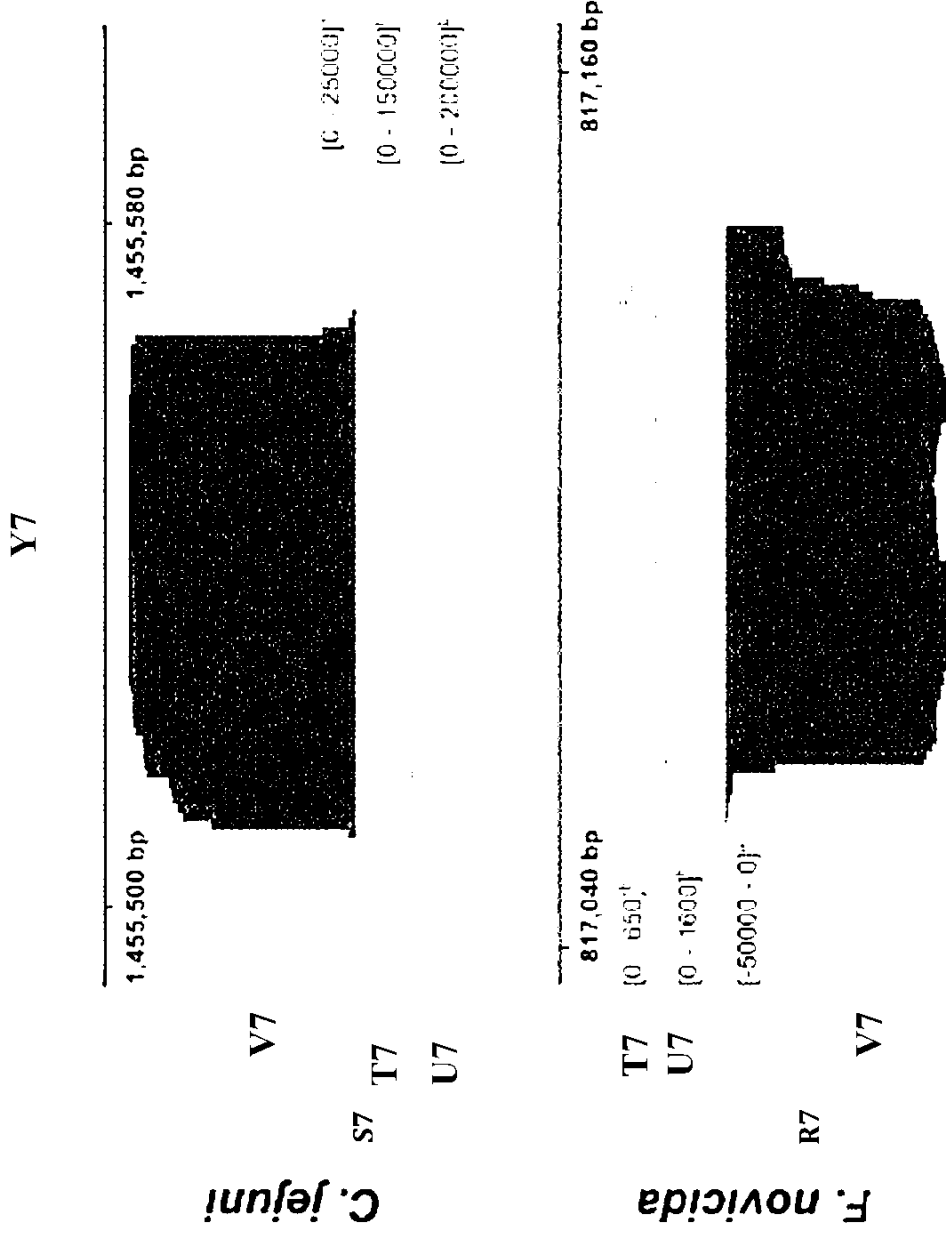
07

<i>C. jejuni</i>	-----AAGAAUUUAAAABAGGGACUAAAUAAGA-----
<i>F. novicida</i>	AUCUAAAUAUAAAUGUACCAAAUAUAUAUGUCUCUGJAAUUAUAAAAGUAUUUUGA
<i>S. thermophilus2</i>	-UGUA-AGGGACGCCUACACAGUUACUUP- AAUCUUGGAGAAASCURCAAAAGUAAGGCU
<i>M. mobile</i>	-UGUAUUUCGAAAUAACAGAUGUACAGUUAAAGAAUAC- AUMAGAAUGAAUACAUCAUAAAA
<i>L. innocua</i>	-----AUUGUUAGUAUUCAAAAUAACAUPGCAAGUCAAUUUAAGGC-----
<i>S. pyogenes</i>	-----GUUGGAAACCAUUCAAACAGCAUPGCAAGUCAAUUUAAGGC-----
<i>S. mutans</i>	-----GUUGGAAUCAUUCGAAACAACUPGCAAGUCAAUUUAAGGCAGUGAUUUUUAAU
<i>S. thermophilus</i>	UUGUGUUUGAAAACCAUUCGAAACAACUPGCGAGUCAAUUUAAGGC-----
<i>M. meningitidis</i>	--ACAUAUUGUGGCACUGCGAAUUGAGAACCGUUGCUACAUAUUAAGGC--CGUCUGAAAAG
<i>P. multocida</i>	--GCAUAUUGUUGCACUGCGAAUUGAGAGACGUUGCUACAUAUUAAGGC---UUCUGAAAAG



ŞEKİL 36

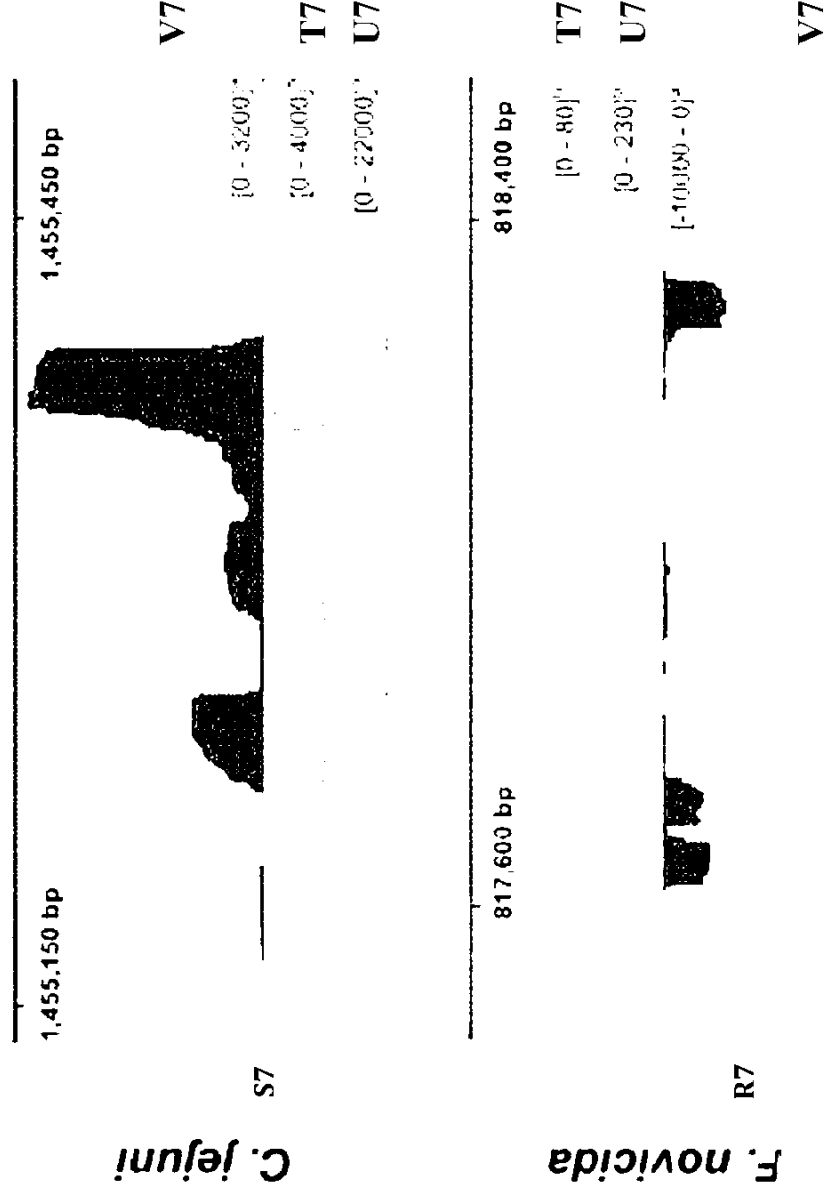
A



ŞEKİL 36

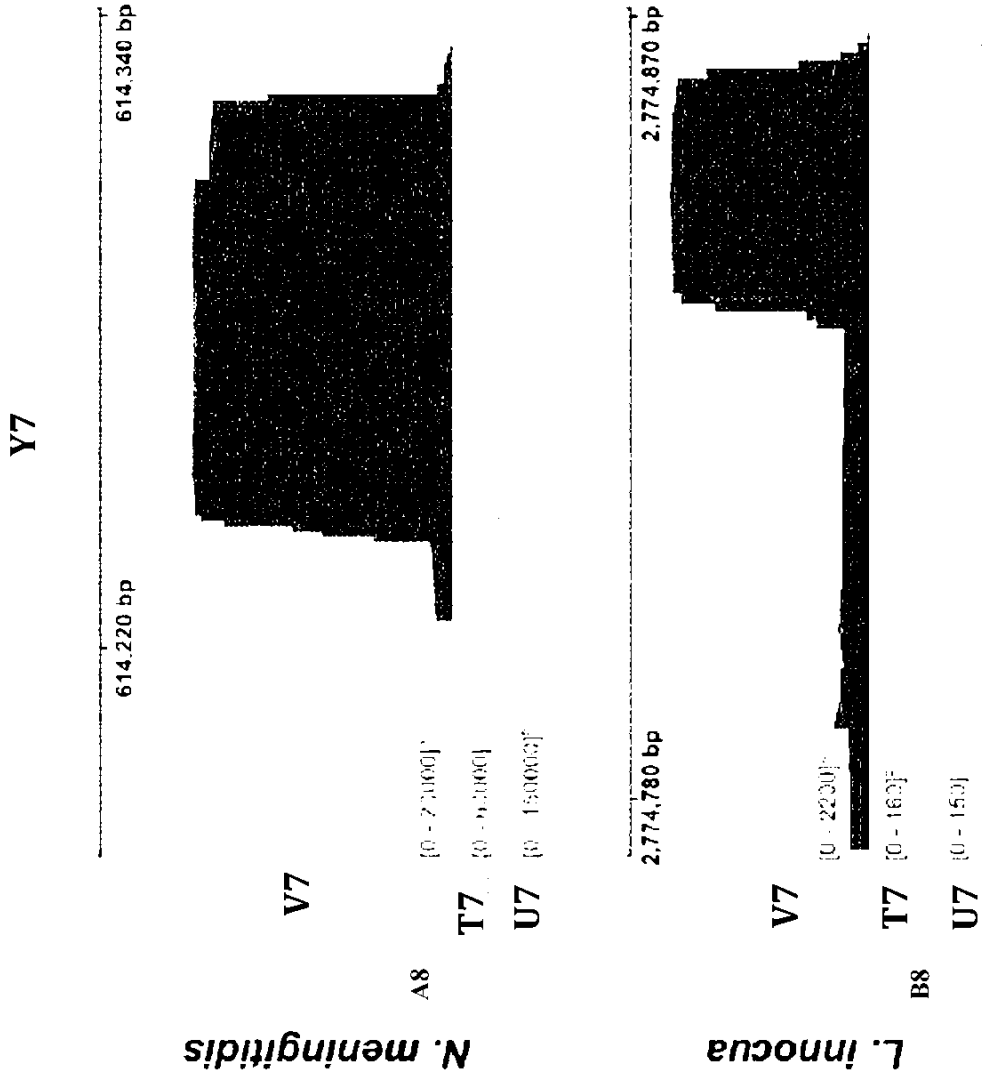
B

Z1



ŞEKİL 36

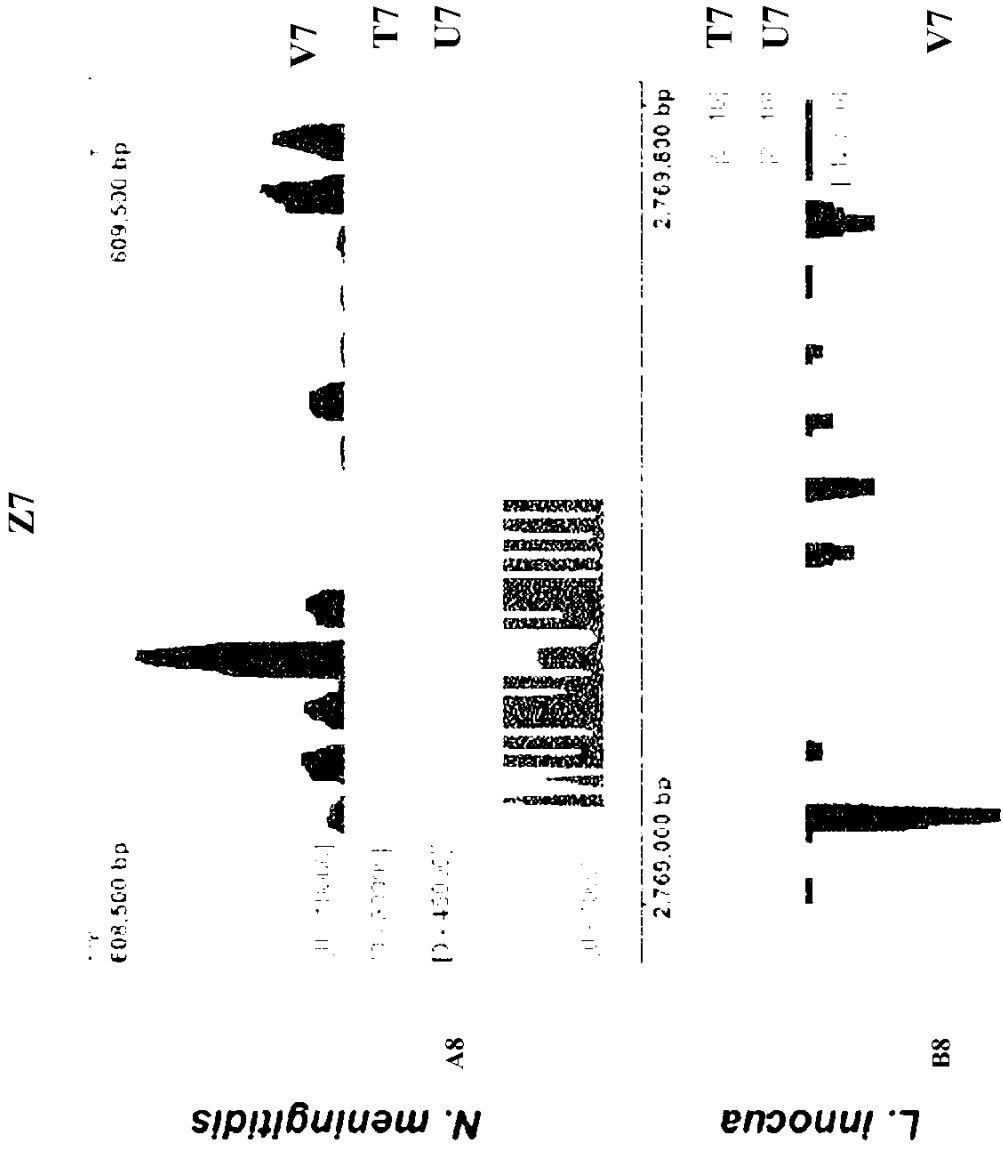
C





ŞEKİL 36

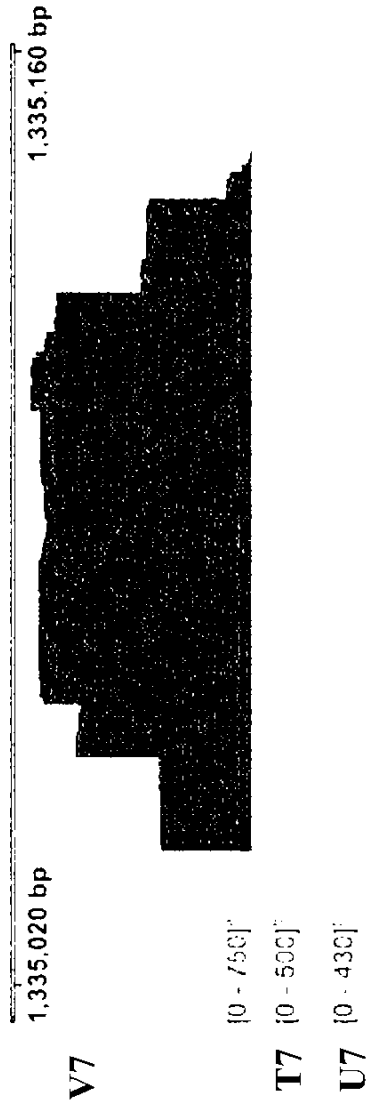
D



ŞEKİL 36

E

Y7

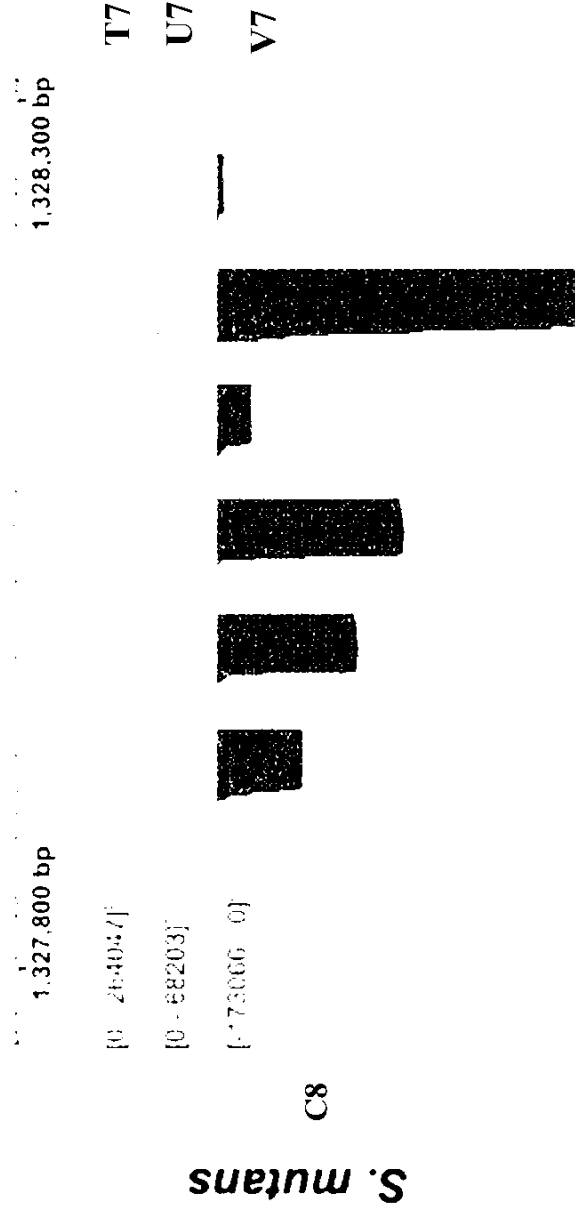


*S. mutans*

ŞEKİL 36

F

Z1





**ŞEKİL 37**     **B**

D8	E8	F8	G8	H8	I8	J8	K8
C:\egitim\KAT10_11\66\40_0101601					L8	9914134	
* J4						<p>1</p> <p>2</p> <p>3</p> <p>4</p> <p>5</p> <p>6</p> <p>7</p> <p>8</p> <p>9</p> <p>10</p> <p>11</p> <p>12</p> <p>13</p> <p>14</p> <p>15</p> <p>16</p> <p>17</p> <p>18</p> <p>19</p> <p>20</p> <p>21</p> <p>22</p> <p>23</p> <p>24</p> <p>25</p> <p>26</p> <p>27</p> <p>28</p> <p>29</p> <p>30</p> <p>31</p> <p>32</p> <p>33</p> <p>34</p> <p>35</p> <p>36</p> <p>37</p> <p>38</p> <p>39</p> <p>40</p> <p>41</p> <p>42</p> <p>43</p> <p>44</p> <p>45</p> <p>46</p> <p>47</p> <p>48</p> <p>49</p> <p>50</p> <p>51</p> <p>52</p> <p>53</p> <p>54</p> <p>55</p> <p>56</p> <p>57</p> <p>58</p> <p>59</p> <p>60</p> <p>61</p> <p>62</p> <p>63</p> <p>64</p> <p>65</p> <p>66</p> <p>67</p> <p>68</p> <p>69</p> <p>70</p> <p>71</p> <p>72</p> <p>73</p> <p>74</p> <p>75</p> <p>76</p> <p>77</p> <p>78</p> <p>79</p> <p>80</p> <p>81</p> <p>82</p> <p>83</p> <p>84</p> <p>85</p> <p>86</p> <p>87</p> <p>88</p> <p>89</p> <p>90</p> <p>91</p> <p>92</p> <p>93</p> <p>94</p> <p>95</p> <p>96</p> <p>97</p> <p>98</p> <p>99</p> <p>100</p>	
					<p>1</p> <p>2</p> <p>3</p> <p>4</p> <p>5</p> <p>6</p> <p>7</p> <p>8</p> <p>9</p> <p>10</p> <p>11</p> <p>12</p> <p>13</p> <p>14</p> <p>15</p> <p>16</p> <p>17</p> <p>18</p> <p>19</p> <p>20</p> <p>21</p> <p>22</p> <p>23</p> <p>24</p> <p>25</p> <p>26</p> <p>27</p> <p>28</p> <p>29</p> <p>30</p> <p>31</p> <p>32</p> <p>33</p> <p>34</p> <p>35</p> <p>36</p> <p>37</p> <p>38</p> <p>39</p> <p>40</p> <p>41</p> <p>42</p> <p>43</p> <p>44</p> <p>45</p> <p>46</p> <p>47</p> <p>48</p> <p>49</p> <p>50</p> <p>51</p> <p>52</p> <p>53</p> <p>54</p> <p>55</p> <p>56</p> <p>57</p> <p>58</p> <p>59</p> <p>60</p> <p>61</p> <p>62</p> <p>63</p> <p>64</p> <p>65</p> <p>66</p> <p>67</p> <p>68</p> <p>69</p> <p>70</p> <p>71</p> <p>72</p> <p>73</p> <p>74</p> <p>75</p> <p>76</p> <p>77</p> <p>78</p> <p>79</p> <p>80</p> <p>81</p> <p>82</p> <p>83</p> <p>84</p> <p>85</p> <p>86</p> <p>87</p> <p>88</p> <p>89</p> <p>90</p> <p>91</p> <p>92</p> <p>93</p> <p>94</p> <p>95</p> <p>96</p> <p>97</p> <p>98</p> <p>99</p> <p>100</p>		



ŞEKİL 37 D

ÇEKİŞ	D8	E8	F8	G8	H8	I8	J8	K8
F. aslında (132)K. 10491 D L8 4324								
K. Kuvveti J4	1. Kuvvetin (132)K. 10491 D L8 4324						1. Kuvvetin (132)K. 10491 D L8 4324	
	2. Kuvvetin (132)K. 10491 D L8 4324						2. Kuvvetin (132)K. 10491 D L8 4324	
	3. Kuvvetin (132)K. 10491 D L8 4324						3. Kuvvetin (132)K. 10491 D L8 4324	
Yapıya	1. Yapıya (132)K. 10491 D L8 4324						1. Yapıya (132)K. 10491 D L8 4324	

ŞEKİL 37  
E

YERİ	D8	E8	F8	G8	H8	I8	J8	K8
			ZARFI NO: 42441 MS_100114_11			1.8	10000 80	
J4							10000 80	
							10000 80	





ŞEKİL 37

G

ENNA	D8	E8	F8	G8	H8	I8	J8	K8
11.01.2014						1.8	12.10.2017	
12.01.2014							13.10.2017	
13.01.2014							14.10.2017	
14.01.2014							15.10.2017	
15.01.2014							16.10.2017	
16.01.2014							17.10.2017	
17.01.2014							18.10.2017	
18.01.2014							19.10.2017	
19.01.2014							20.10.2017	
20.01.2014							21.10.2017	
21.01.2014							22.10.2017	
22.01.2014							23.10.2017	
23.01.2014							24.10.2017	
24.01.2014							25.10.2017	
25.01.2014							26.10.2017	
26.01.2014							27.10.2017	
27.01.2014							28.10.2017	
28.01.2014							29.10.2017	
29.01.2014							30.10.2017	
30.01.2014							31.10.2017	
31.01.2014							01.11.2017	
01.02.2014							02.11.2017	
02.02.2014							03.11.2017	
03.02.2014							04.11.2017	
04.02.2014							05.11.2017	
05.02.2014							06.11.2017	
06.02.2014							07.11.2017	
07.02.2014							08.11.2017	
08.02.2014							09.11.2017	
09.02.2014							10.11.2017	
10.02.2014							11.11.2017	
11.02.2014							12.11.2017	
12.02.2014							13.11.2017	
13.02.2014							14.11.2017	
14.02.2014							15.11.2017	
15.02.2014							16.11.2017	
16.02.2014							17.11.2017	
17.02.2014							18.11.2017	
18.02.2014							19.11.2017	
19.02.2014							20.11.2017	
20.02.2014							21.11.2017	
21.02.2014							22.11.2017	
22.02.2014							23.11.2017	
23.02.2014							24.11.2017	
24.02.2014							25.11.2017	
25.02.2014							26.11.2017	
26.02.2014							27.11.2017	
27.02.2014							28.11.2017	
28.02.2014							29.11.2017	
29.02.2014							30.11.2017	
30.02.2014							01.12.2017	
01.03.2014							02.12.2017	
02.03.2014							03.12.2017	
03.03.2014							04.12.2017	
04.03.2014							05.12.2017	
05.03.2014							06.12.2017	
06.03.2014							07.12.2017	
07.03.2014							08.12.2017	
08.03.2014							09.12.2017	
09.03.2014							10.12.2017	
10.03.2014							11.12.2017	
11.03.2014							12.12.2017	
12.03.2014							13.12.2017	
13.03.2014							14.12.2017	
14.03.2014							15.12.2017	
15.03.2014							16.12.2017	
16.03.2014							17.12.2017	
17.03.2014							18.12.2017	
18.03.2014							19.12.2017	
19.03.2014							20.12.2017	
20.03.2014							21.12.2017	
21.03.2014							22.12.2017	
22.03.2014							23.12.2017	
23.03.2014							24.12.2017	
24.03.2014							25.12.2017	
25.03.2014							26.12.2017	
26.03.2014							27.12.2017	
27.03.2014							28.12.2017	
28.03.2014							29.12.2017	
29.03.2014							30.12.2017	
30.03.2014							31.12.2017	
31.03.2014							01.01.2018	
01.04.2014							02.01.2018	
02.04.2014							03.01.2018	
03.04.2014							04.01.2018	
04.04.2014							05.01.2018	
05.04.2014							06.01.2018	
06.04.2014							07.01.2018	
07.04.2014							08.01.2018	
08.04.2014							09.01.2018	
09.04.2014							10.01.2018	
10.04.2014							11.01.2018	
11.04.2014							12.01.2018	
12.04.2014							13.01.2018	
13.04.2014							14.01.2018	
14.04.2014							15.01.2018	
15.04.2014							16.01.2018	
16.04.2014							17.01.2018	
17.04.2014							18.01.2018	
18.04.2014							19.01.2018	
19.04.2014							20.01.2018	
20.04.2014							21.01.2018	
21.04.2014							22.01.2018	
22.04.2014							23.01.2018	
23.04.2014							24.01.2018	
24.04.2014							25.01.2018	
25.04.2014							26.01.2018	
26.04.2014							27.01.2018	
27.04.2014							28.01.2018	
28.04.2014							29.01.2018	
29.04.2014							30.01.2018	
30.04.2014							31.01.2018	
31.04.2014							01.02.2018	
01.05.2014							02.02.2018	
02.05.2014							03.02.2018	
03.05.2014							04.02.2018	
04.05.2014							05.02.2018	
05.05.2014							06.02.2018	
06.05.2014							07.02.2018	
07.05.2014							08.02.2018	
08.05.2014							09.02.2018	
09.05.2014							10.02.2018	
10.05.2014							11.02.2018	
11.05.2014							12.02.2018	
12.05.2014							13.02.2018	
13.05.2014							14.02.2018	
14.05.2014							15.02.2018	
15.05.2014							16.02.2018	
16.05.2014							17.02.2018	
17.05.2014							18.02.2018	
18.05.2014							19.02.2018	
19.05.2014							20.02.2018	
20.05.2014							21.02.2018	
21.05.2014							22.02.2018	
22.05.2014							23.02.2018	
23.05.2014							24.02.2018	
24.05.2014							25.02.2018	
25.05.2014							26.02.2018	
26.05.2014							27.02.2018	
27.05.2014							28.02.2018	
28.05.2014							29.02.2018	
29.05.2014							30.02.2018	
30.05.2014							01.03.2018	
31.05.2014							02.03.2018	
01.06.2014							03.03.2018	
02.06.2014							04.03.2018	
03.06.2014							05.03.2018	
04.06.2014							06.03.2018	
05.06.2014							07.03.2018	
06.06.2014							08.03.2018	
07.06.2014							09.03.2018	
08.06.2014							10.03.2018	
09.06.2014							11.03.2018	
10.06.2014							12.03.2018	
11.06.2014							13.03.2018	
12.06.2014							14.03.2018	
13.06.2014							15.03.2018	
14.06.2014							16.03.2018	
15.06.2014							17.03.2018	
16.06.2014							18.03.2018	
17.06.2014							19.03.2018	
18.06.2014							20.03.2018	
19.06.2014							21.03.2018	
20.06.2014							22.03.2018	
21.06.2014							23.03.2018	
22.06.2014							24.03.2018	
23.06.2014							25.03.2018	
24.06.2014							26.03.2018	
25.06.2014							27.03.2018	
26.06.2014							28.03.2018	
27.06.2014							29.03.2018	
28.06.2014							30.03.2018	
29.06.2014							31.03.2018	
30.06.2014							01.04.2018	
01.07.2014							02.04.2018	
02.07.2014							03.04.2018	
03.07.2014							04.04.2018	
04.07.2014							05.04.2018	
05.07.2014							06.04.2018	
06.07.2014							07.04.2018	
07.07.2014							08.04.2018	
08.07.2014							09.04.2018	
09.07.2014							10.04.2018	
10.07.2014							11.04.2018	
11.07.2014							12.04.2018	
12.07.2014							13.04.2018	
13.07.2014							14.04.2018	
14.07.2014							15.04.2018	
15.07.2014							16.04.2018	
16.07.2014							17.04.2018	
17.07.2014							18.04.2018	
18.07.2014							19.04.2018	
19.07.2014							20.04.2018	
20.07.2014							21.04.2018	
21.07.2014							22.04.2018	
22.07.2014							23.04.2018	
23.07.2014							24.04.2018	
24.07.2014							25.04.2018	
25.07.2014							26.04.2018	
26.07.2014							27.04.2018	
27.07.2014							28.04.2018	
28.07.2014							29.04.2018	
29.07.2014							30.04.2018	
30.07.2014							01.05.2018	
31.07.2014							02.05.2018	
01.08.2014							03.05.2018	
02.08.2014							04.05.2018	
03.08.2014							05.05.2018	
04.08.2014							06.05.2018	
05.08.2014							07.05.2018	
06.08.2014							08.05.2018	
07.08.2014							09.05.2018	
08.08.2014							10.05.2018	
09.08.2014							11.05.2018	
10.08.2014							12.05.2018	
11.08.2014							13.05.2018	
12.08.2014							14.05.2018	
13.08.2014							15.05.2018	
14.08.2014							16.05.2018	
15.08.2014							17.05.2018	
16.08.2014							18.05.2018	
17.08.2014							19.05.2018	
18.08.2014							20.05.2018	
19.08.2014							21.05.2018	
20.08.2014							22.05.2018	
21.08.2014							23.05.2018	
22.08.2014							24.05.2018	
23.08.2014							25.05.2018	
24.08.2014							26.05.2018	
25.08.2014							27.05.2018	
26.08.2014							28.05.2018	
27.08.2014							29.05.2018	
28.08.2014							30.05.2018	
29.08.2014							31.05.2018	
30.08.2014							01.06.2018	
31.08.2014							02.06.2018	
01.09.2014							03.06.2018	
02.09.2014							04.06.2018	
03.09.2014							05.06.2018	
04.09.2014							06.06.2018	
05.09.2014							07.06.2018	
06.09.2014							08.06.2018	
07.09.2014							09.06.2018	



## ŞEKİL 37

18A4	D8	E8	F8	G8	H8	I8	J8	K8
Tarih: 10/01/2018 No: 10/01/2018 L8 10/01/2018								
1. Kısım						2. Kısım		
3. Kısım						4. Kısım		
5. Kısım						6. Kısım		











## ŞEKİL 37

N

D8	E8	F8	G8	H8	I8	J8	K8
S. No: 1442339					L8	1442339	



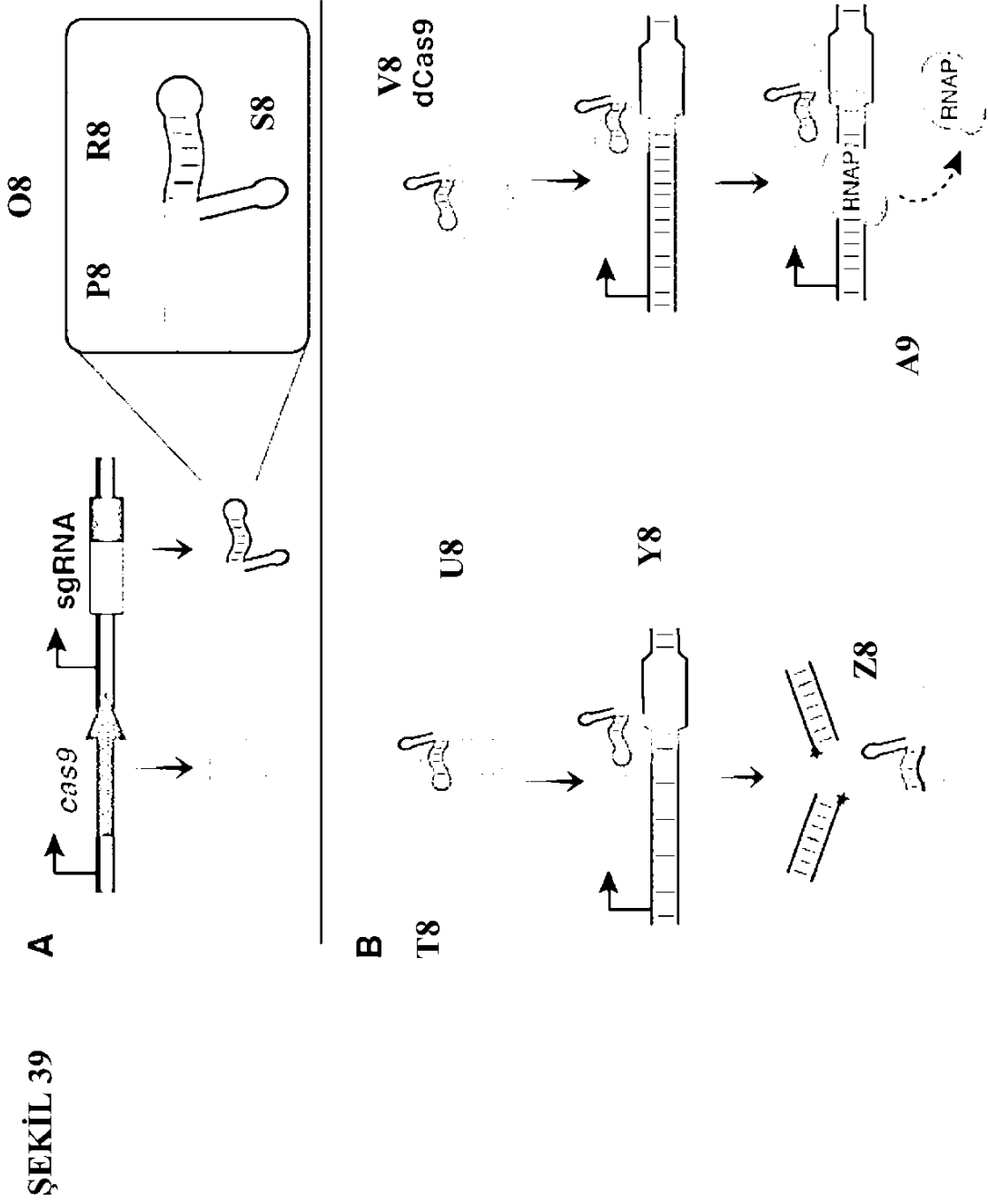
**A****ŞEKİL 38**

<b>N8</b>	<b>P7</b> :
1	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 15, 23, 24, 25, 36, 37, 38, 39, 41, 71, 74, 105, 116, 136, 133, 166, 177, 180, 183, 193, 204, and 232
2	83, 75, 156, 96, 121, 255, 208, 238, 127, 182, 134, 119, 246, 153, 202
3	101, 168, 48, 226, 216, 210, 120, 102, 176, 57, 106, 79, 1, 245
4	219, 135, 53, 62, 240, 165, 217, 82, 212, 19, 40, 16, 194
5	84, 21, 150, 221, 111, 76, 47, 59, 77, 112, 198, 147
6	90, 91, 214, 32, 152, 96, 243, 197, 32, 227, 162
7	103, 187, 223, 151, 156, 126
8	88, 167, 13, 164, 184, 123
9	58, 73, 195, 148, 31, 35
10	206, 188, 211, 161, 205, 44

<b>N8</b>	<b>P7</b> :
11	60, 54, 78, 106, 174
12	209, 220, 145, 157
13	70, 154, 100, 117
14	128, 144, 113, 129
15	131, 66, 149, 145
16	82, 169, 163
17	141, 49, 72
18	196, 114, 86
19	55, 27, 215
20	228, 234
21	160, 213
22	207, 237
23	230, 94
24	200, 247
25	133, 143
26	64, 68
27	20, 45
28	60, 56
29	99, 52

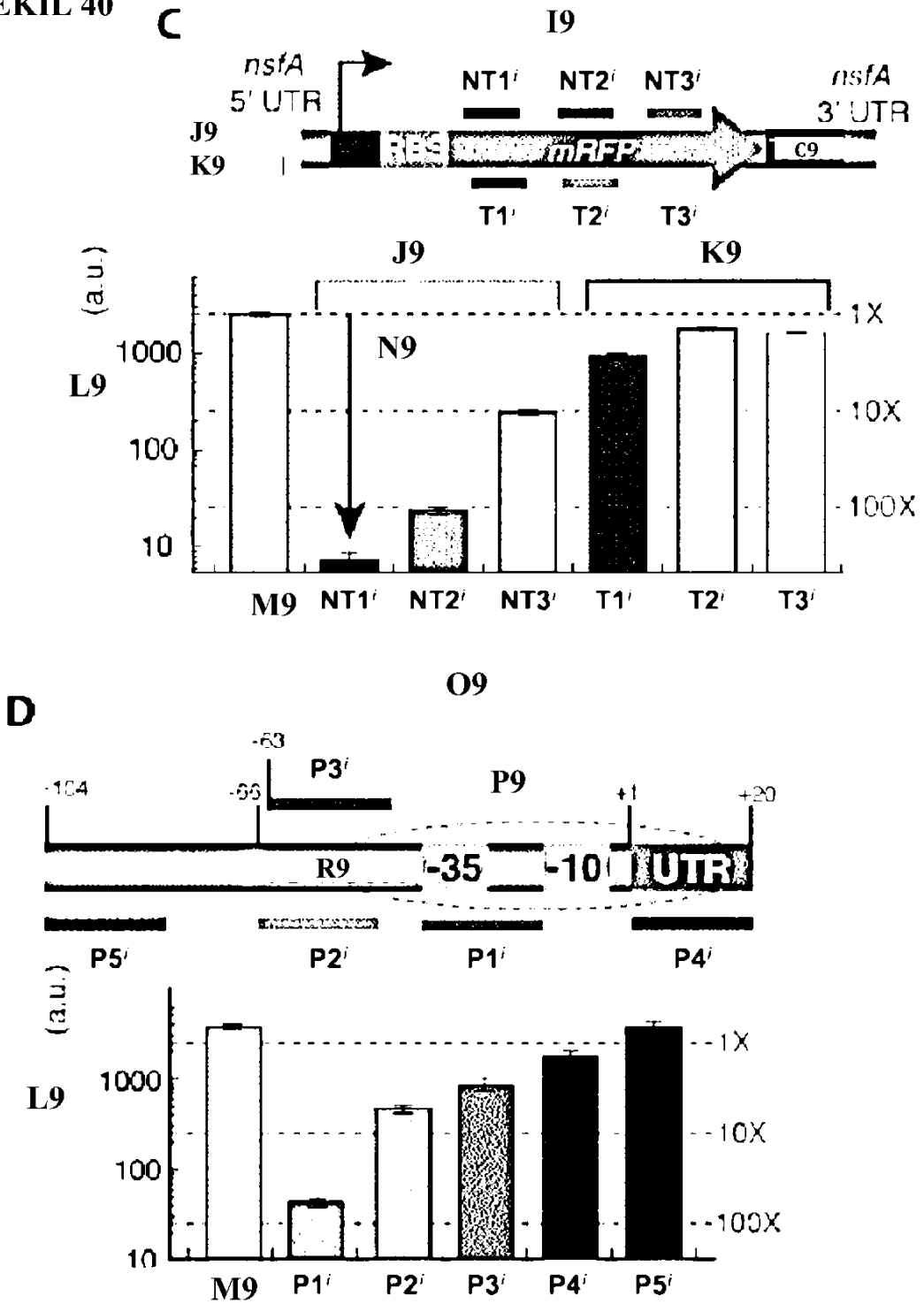
**B****SEKIL 38**

N8	P7	N8	P7	N8	P7
30	244, 185	45	233	59	218
31	43	46	122	60	65
32	189	47	16	61	171
33	170	48	342	62	97
34	11	49	203	63	63
35	107	50	26	64	46
36	14	51	137	65	225
37	236	52	199	66	10
38	12	53	34	67	173
39	17	54	201	68	51
40	239	55	178	69	142
41	61	56	42	70	69
42	85	57	190	71	28
43	191	58	81	72	139
44	23			73	80
				74	172
				75	115
				76	229
				77	175
				78	181

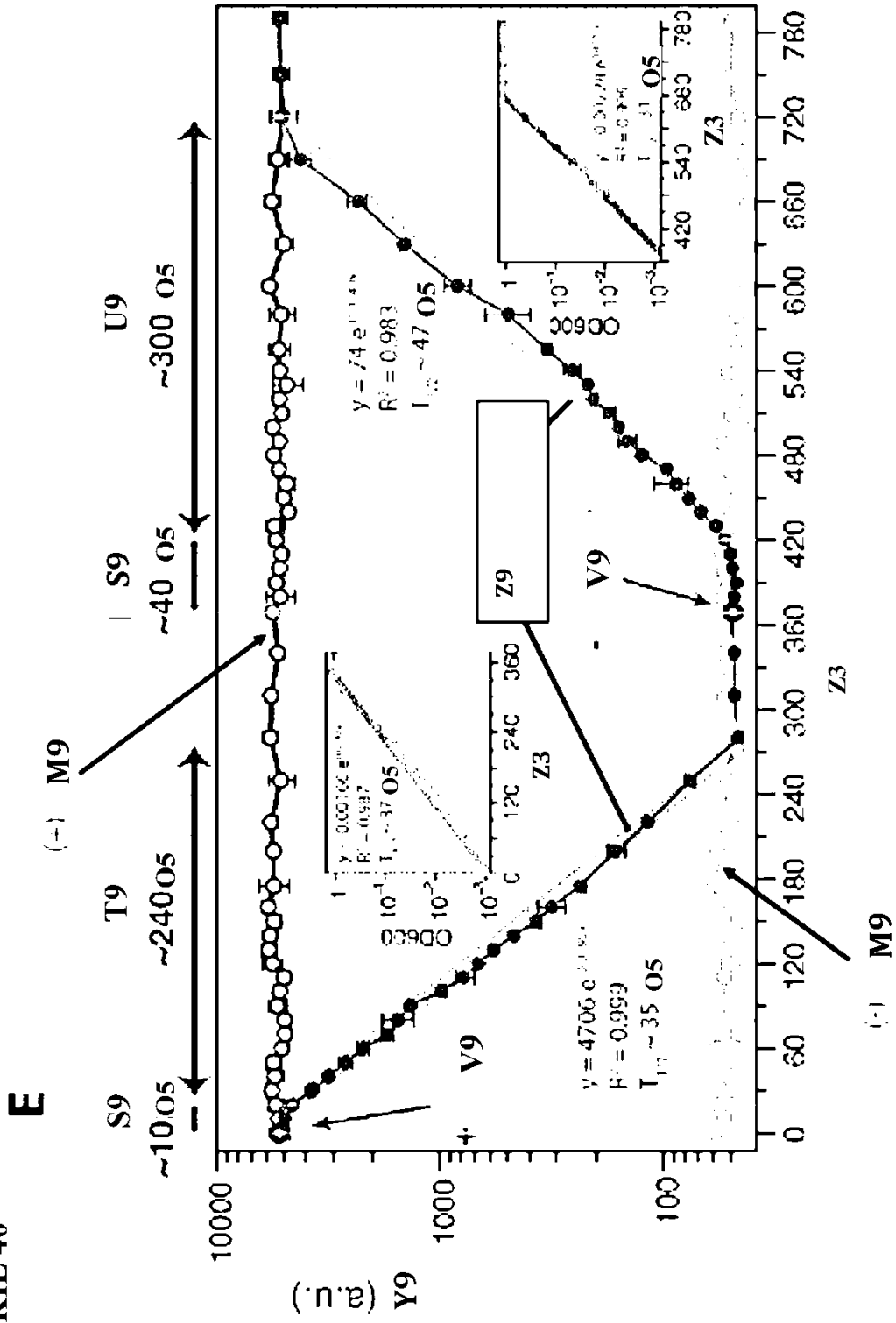




ŞEKİL 40

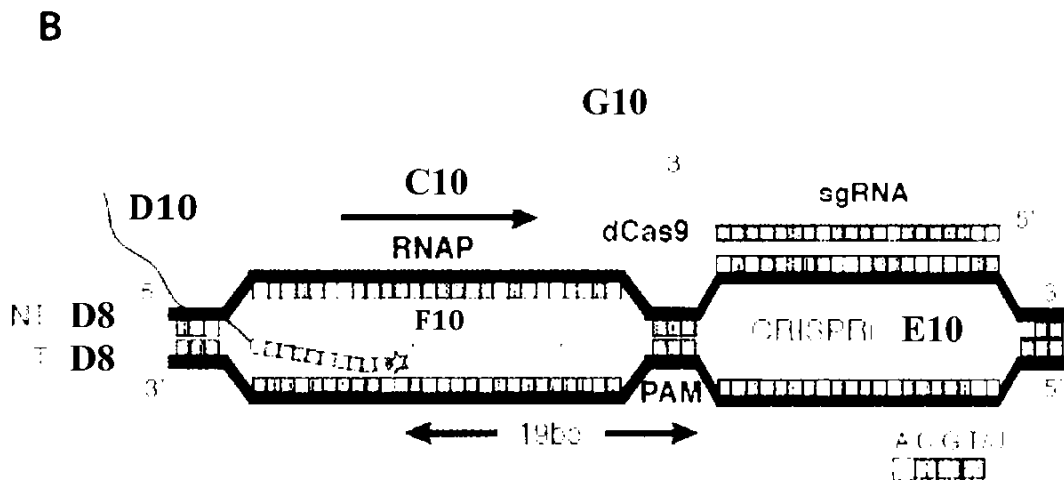
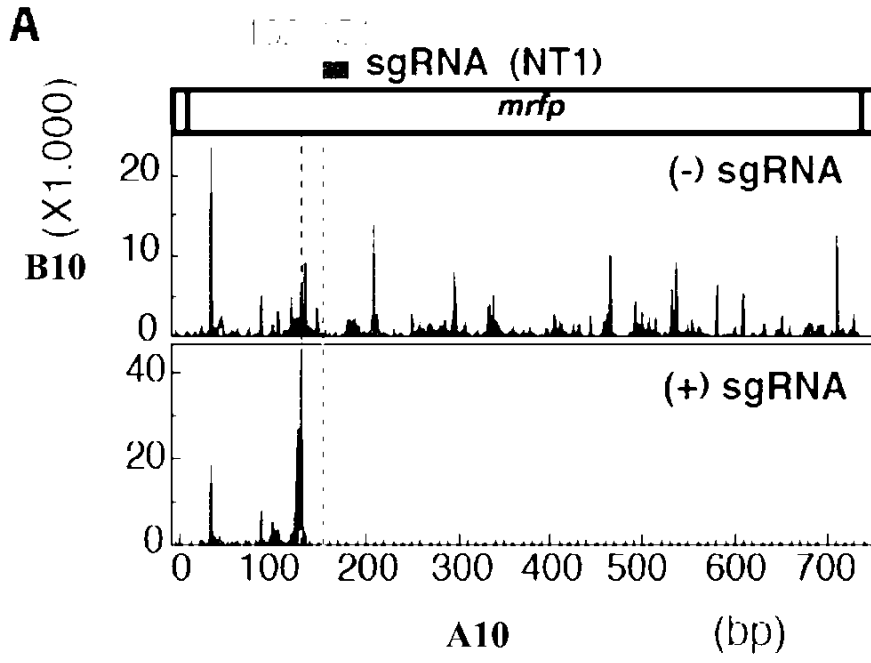


ŞEKİL 40

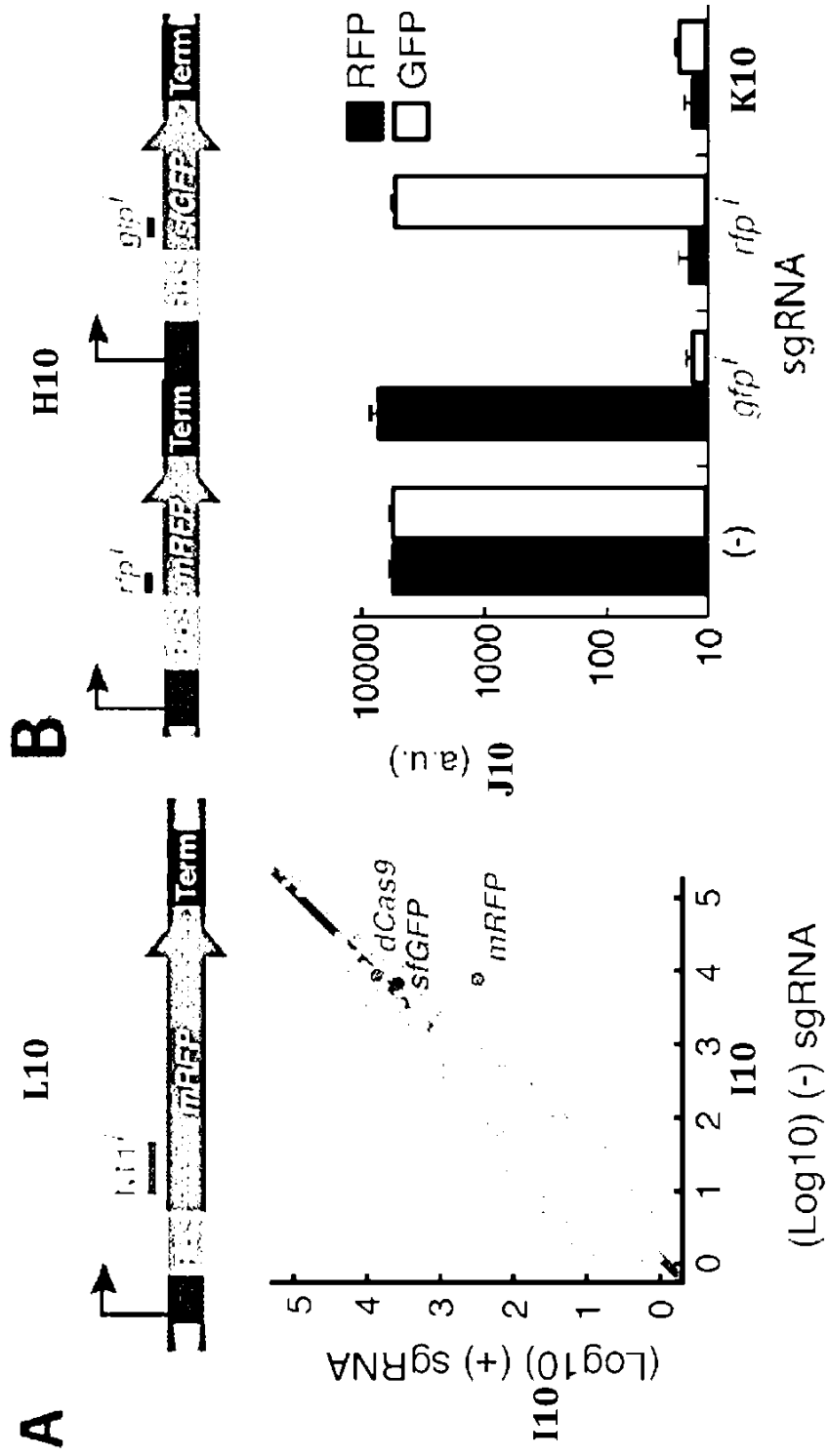




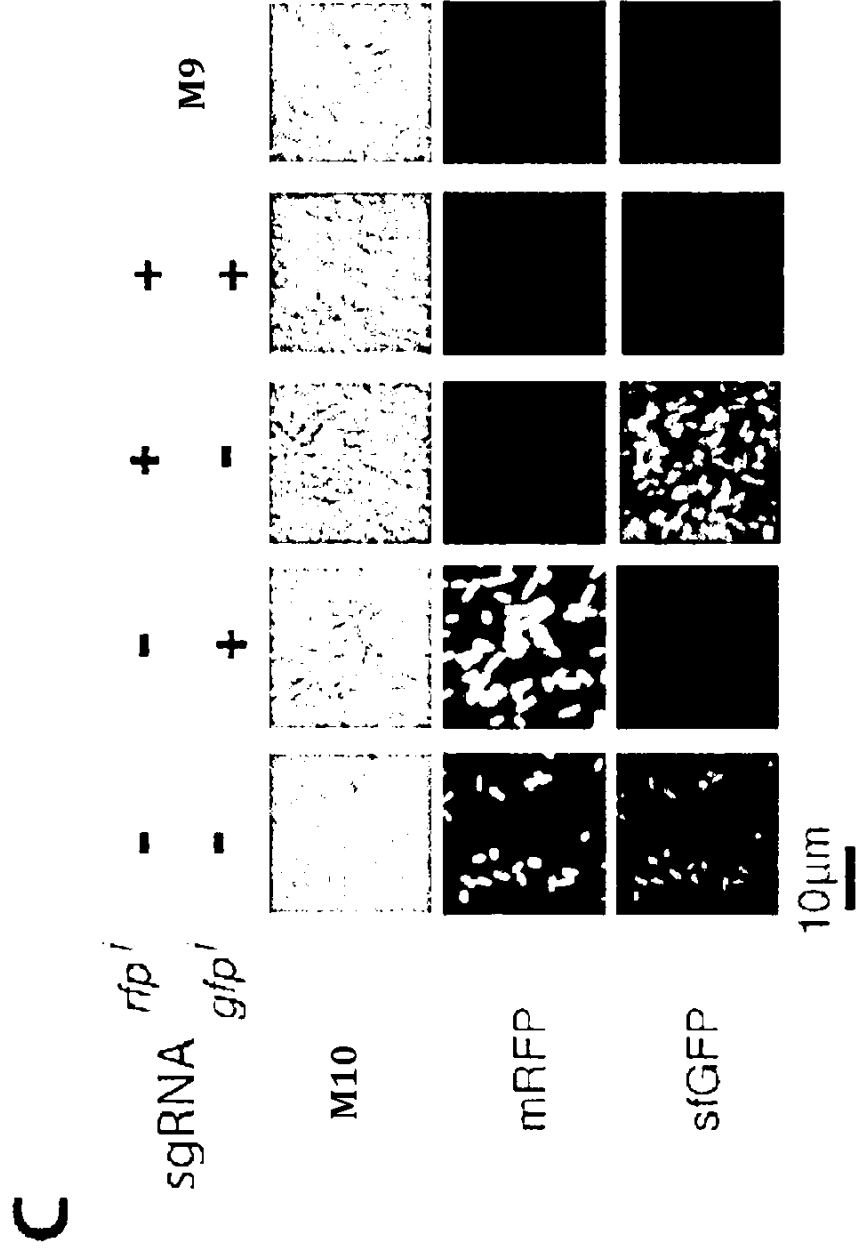
ŞEKİL 41



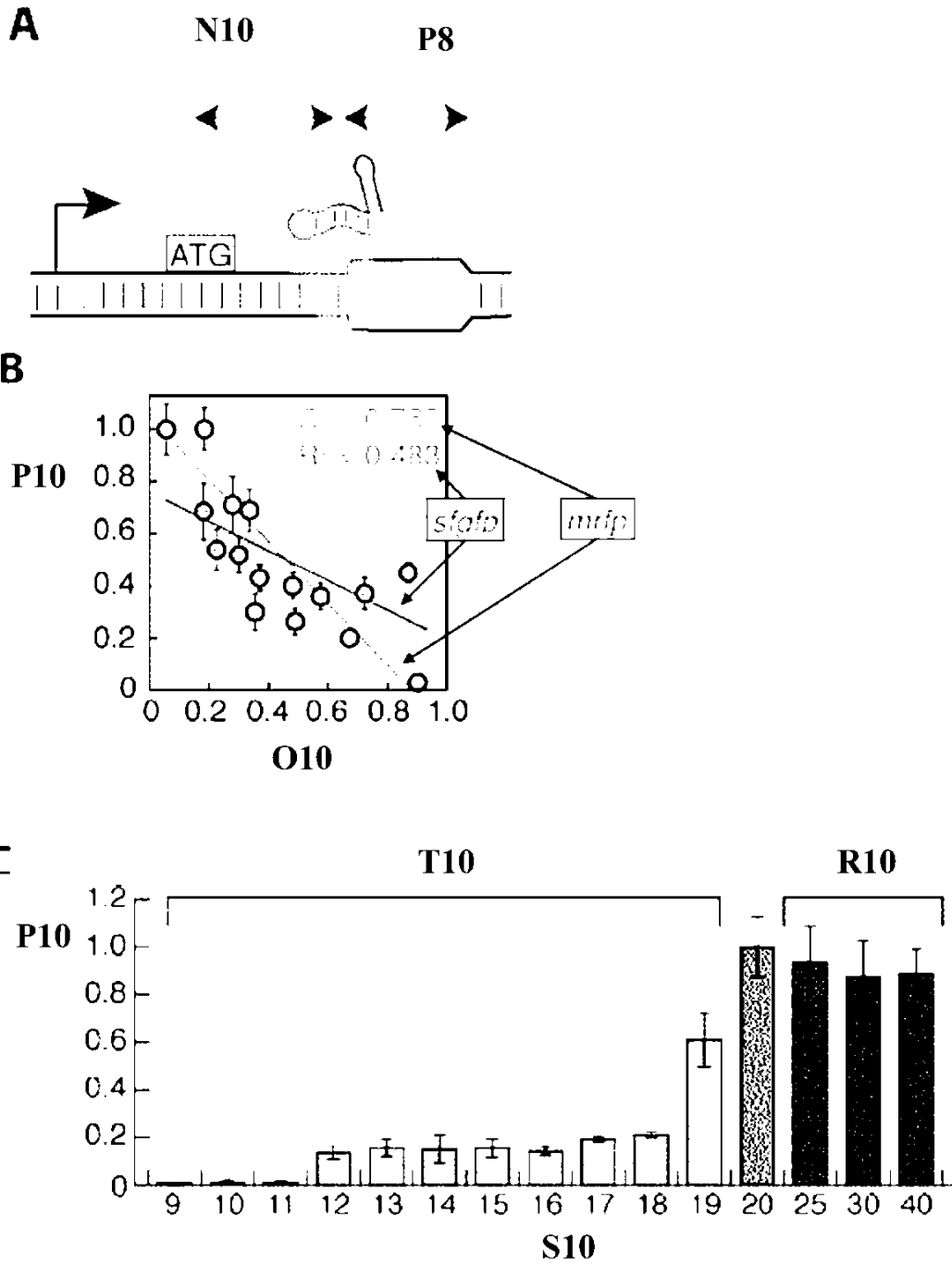
ŞEKİL 42



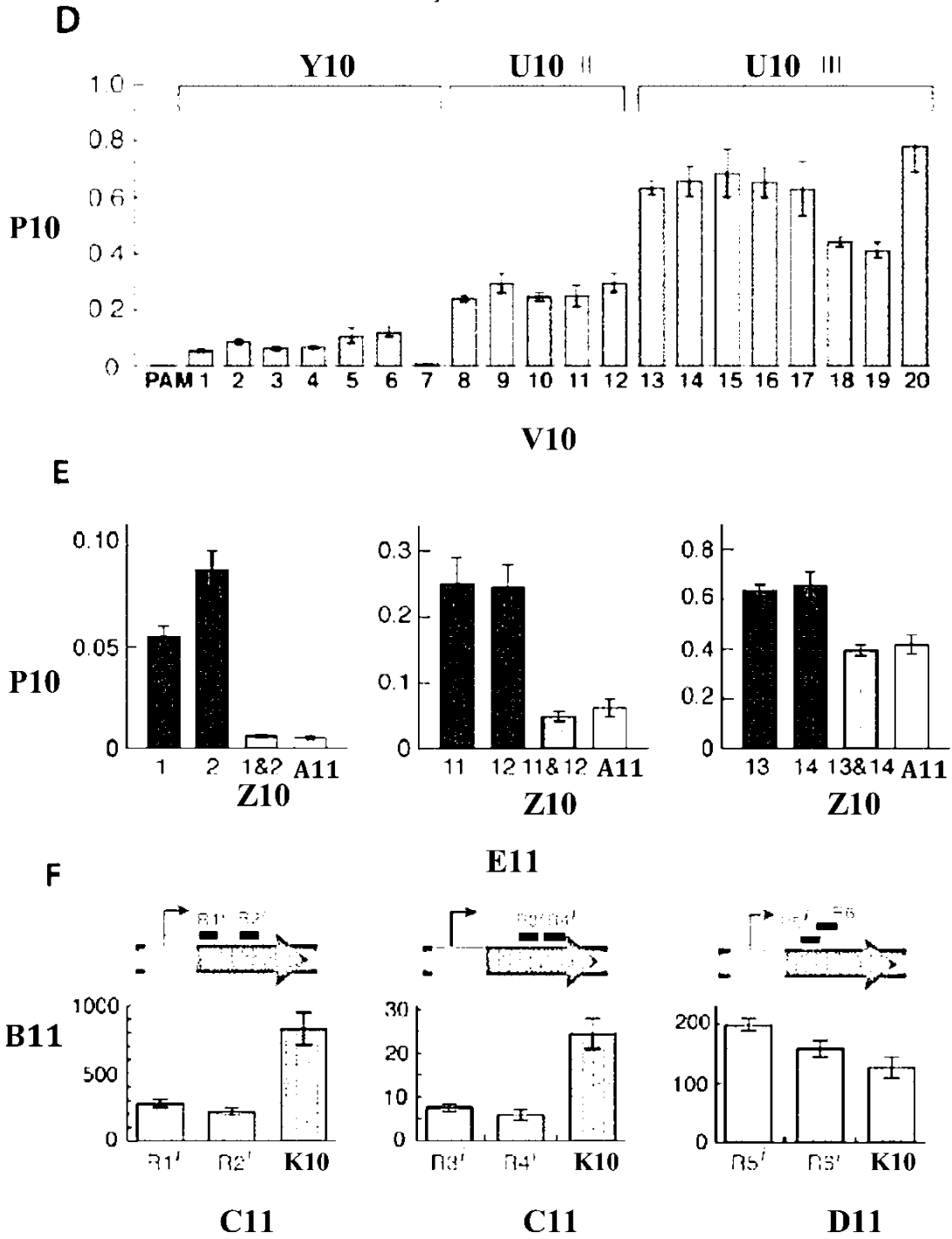
ŞEKİL 42



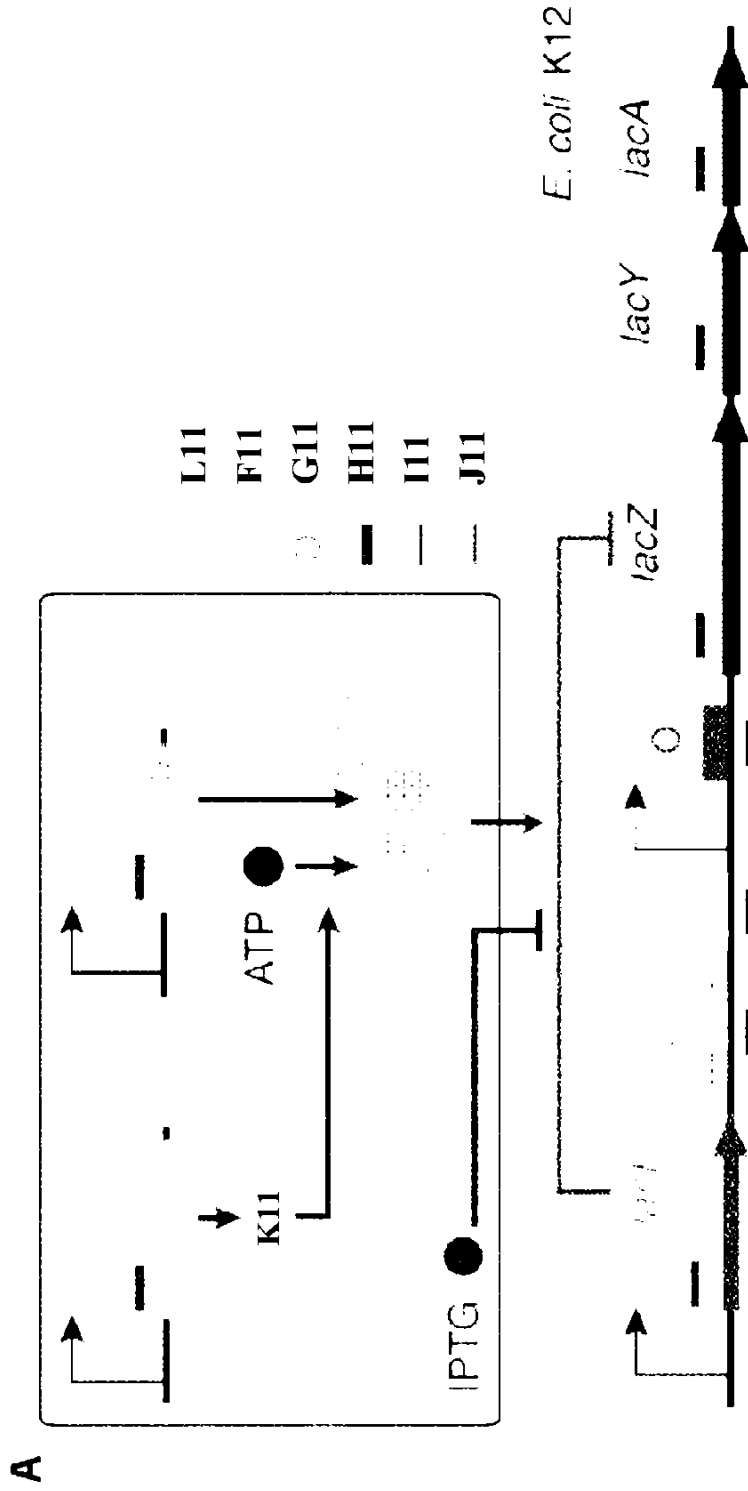
ŞEKİL 43



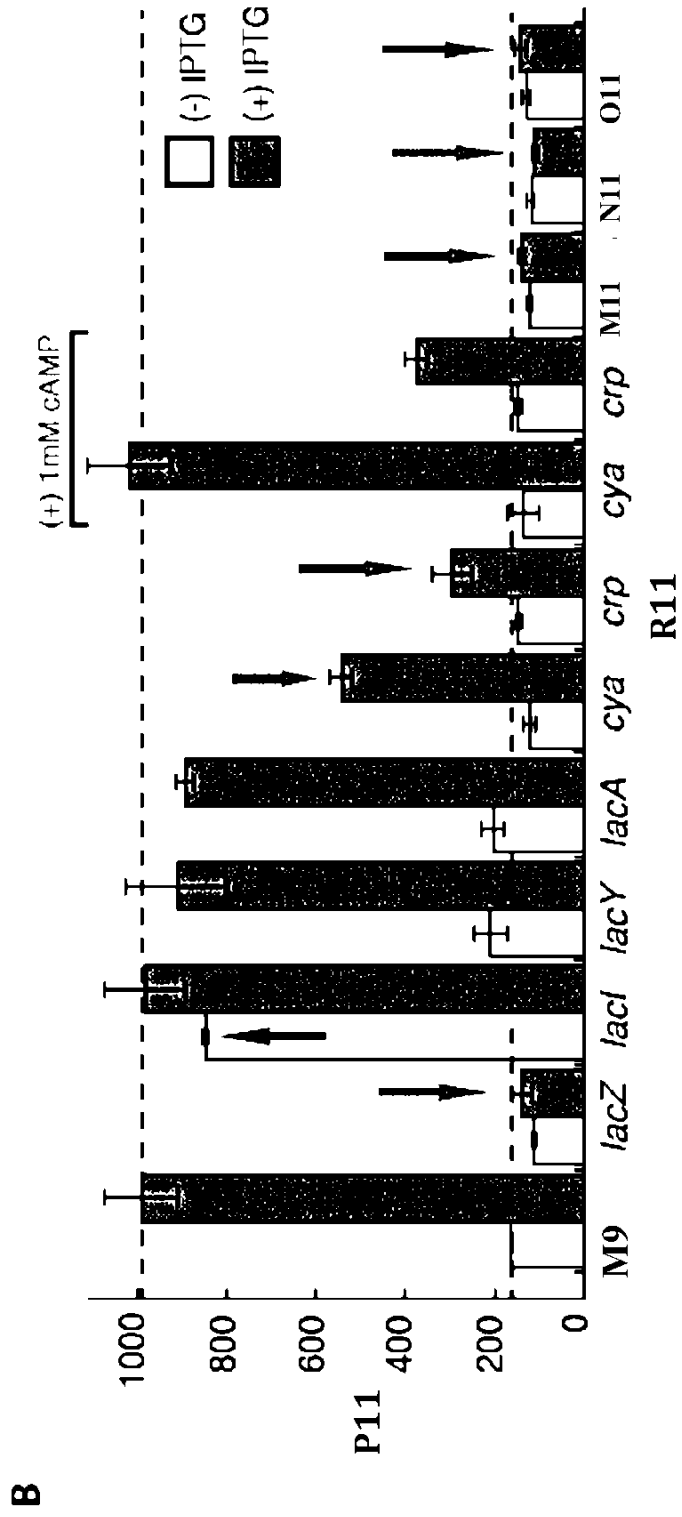
ŞEKİL 43



ŞEKİL 44

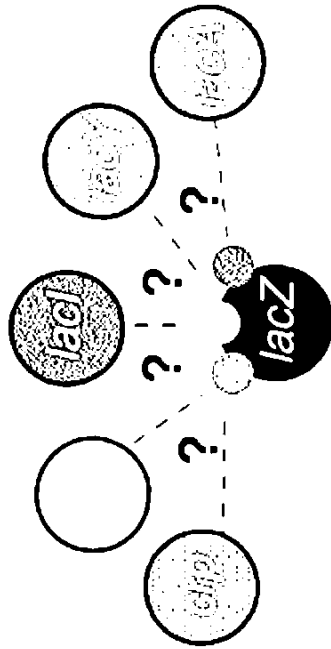
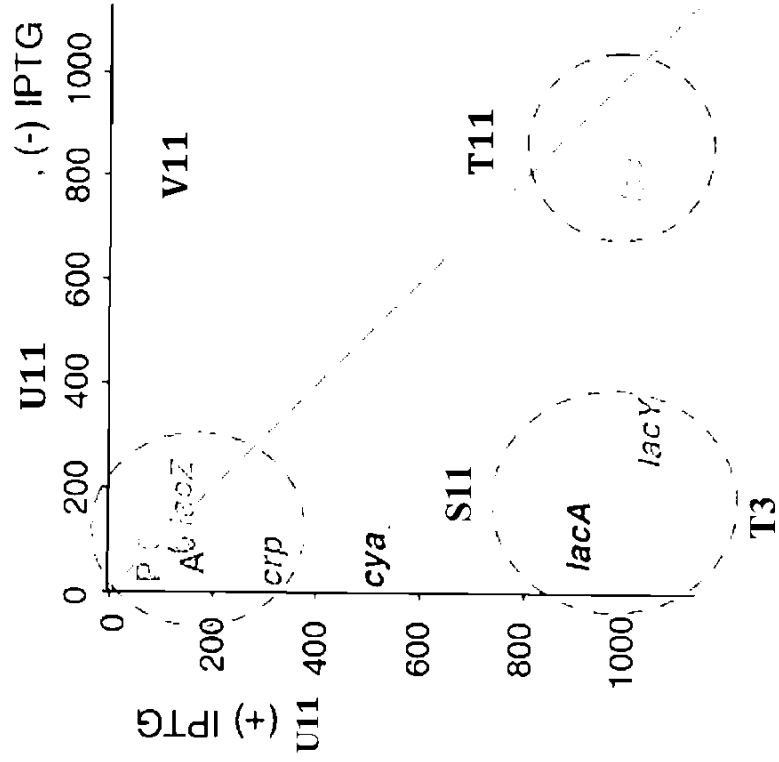


ŞEKİL 44



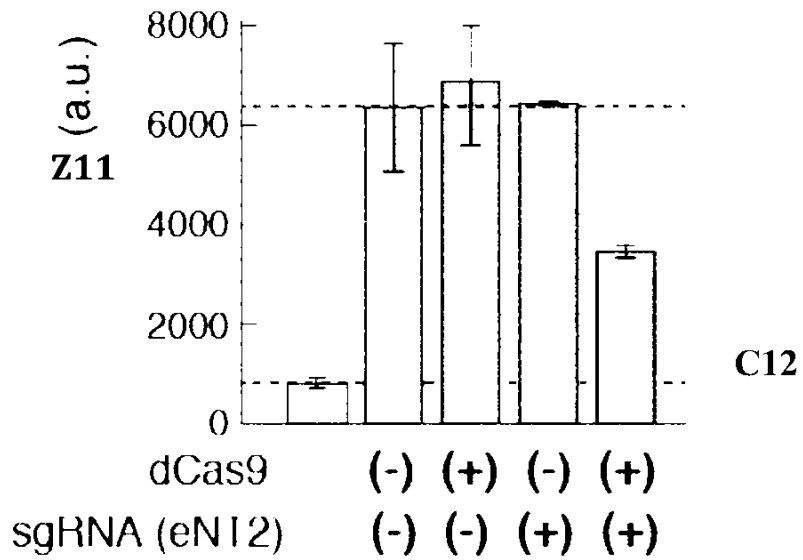
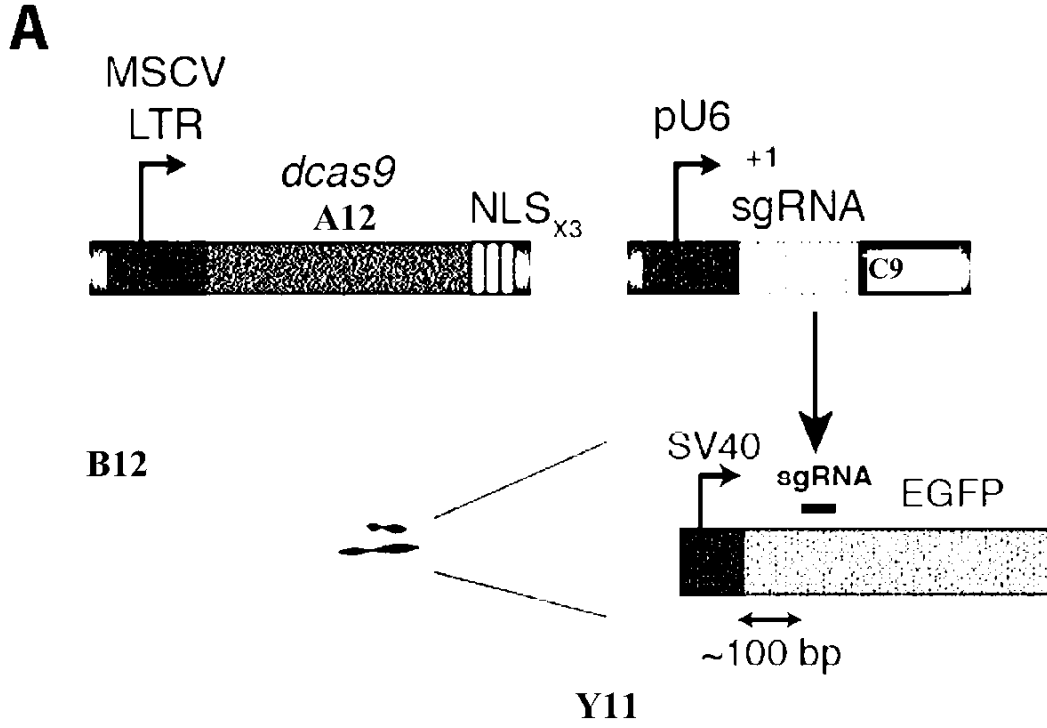
ŞEKİL 44

C

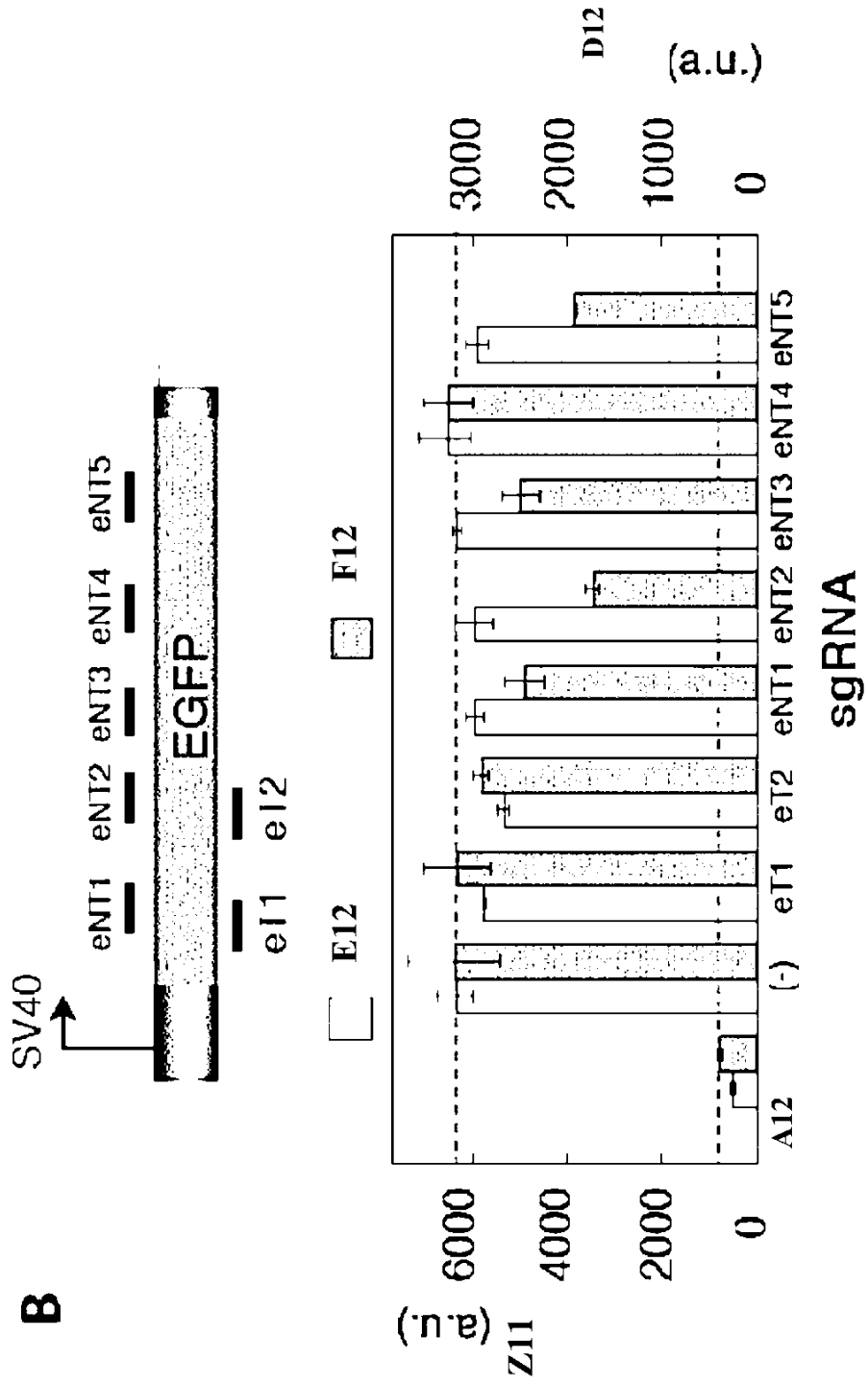




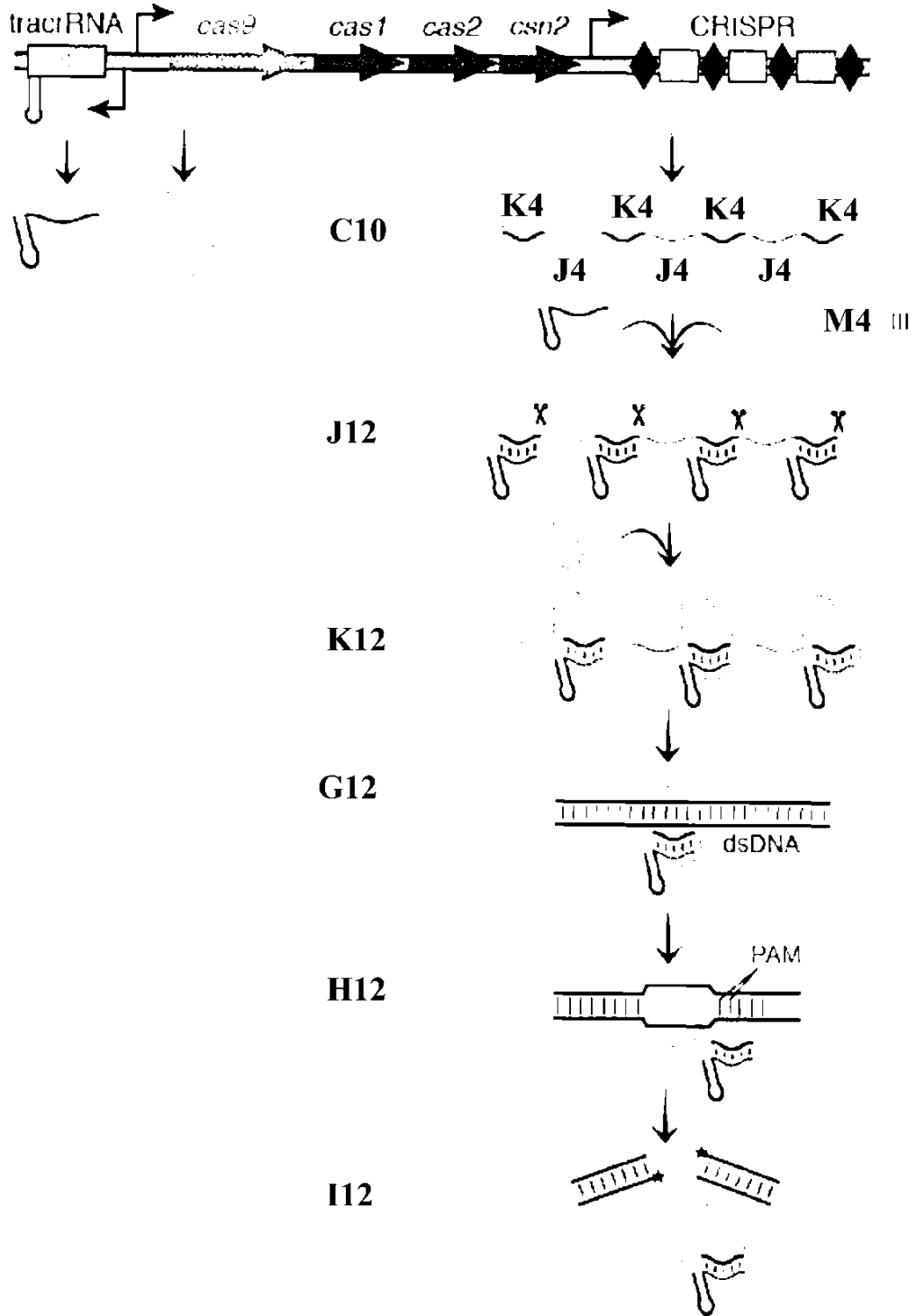
ŞEKİL 45



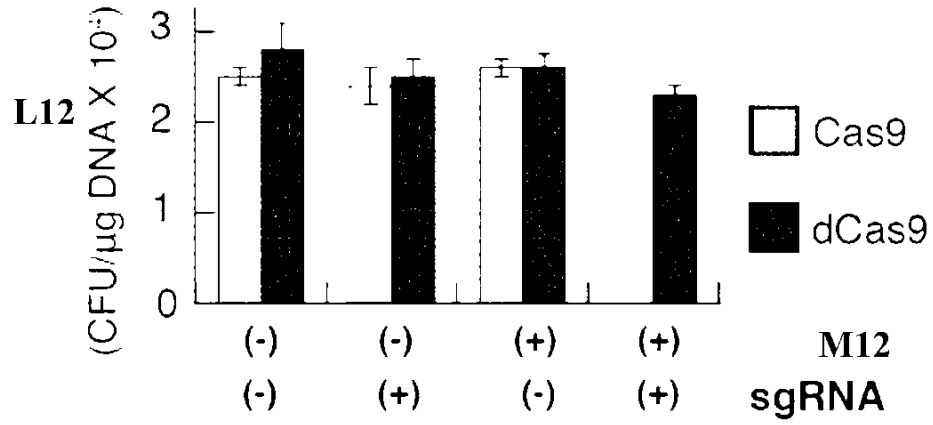
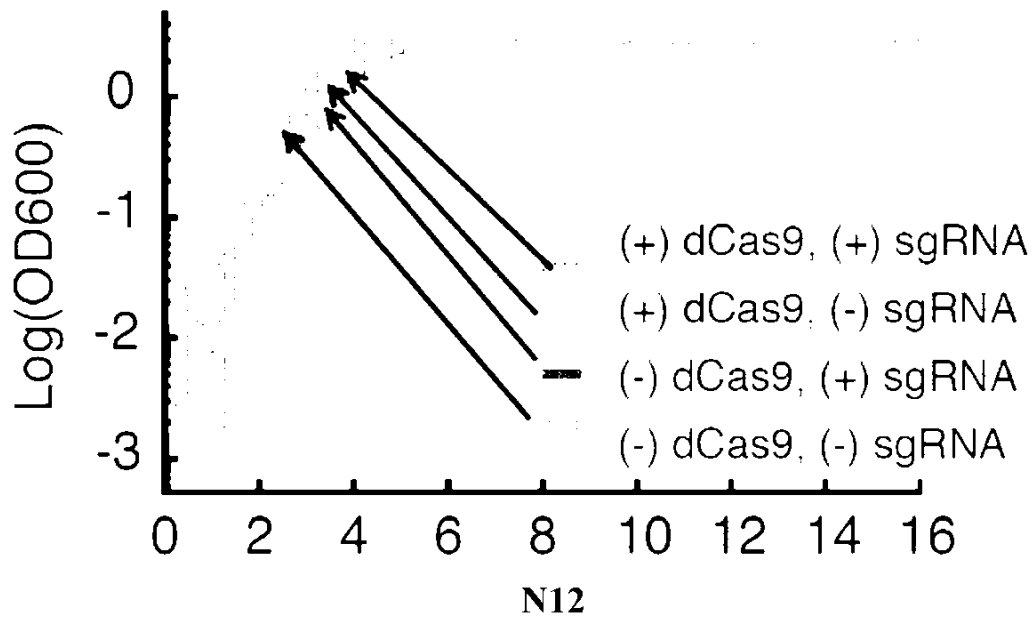
ŞEKİL 45



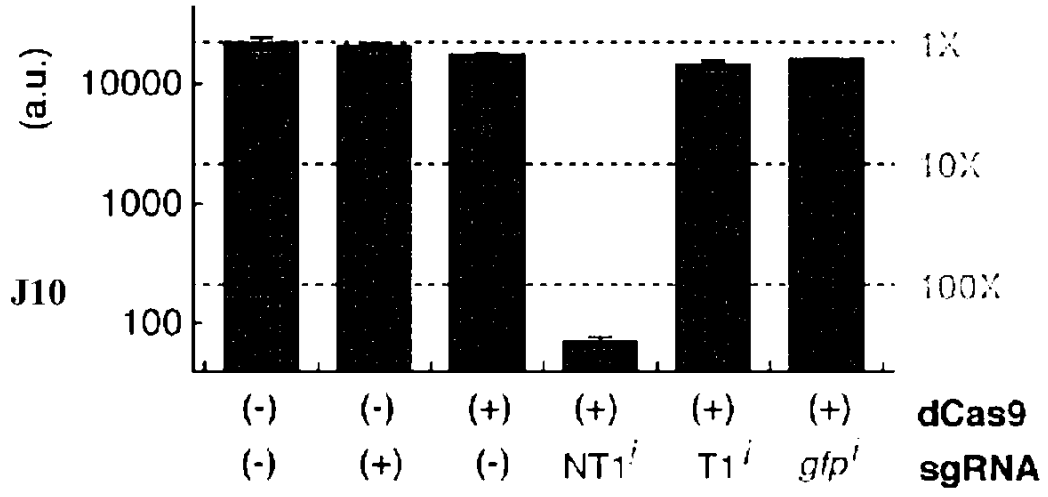
ŞEKİL 46



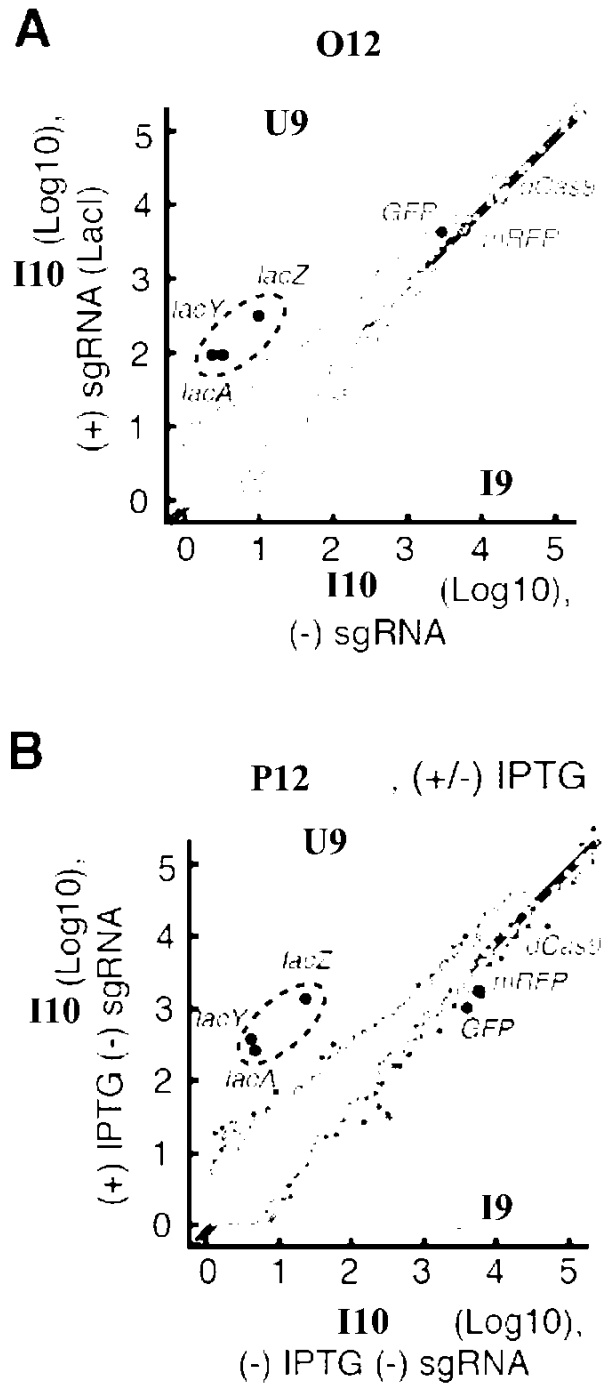
ŞEKİL 47

**A****B**

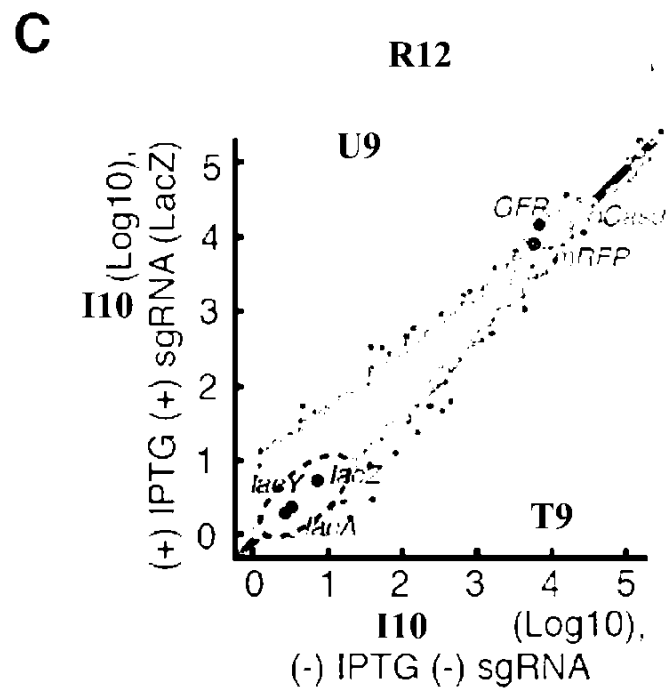
ŞEKİL 48



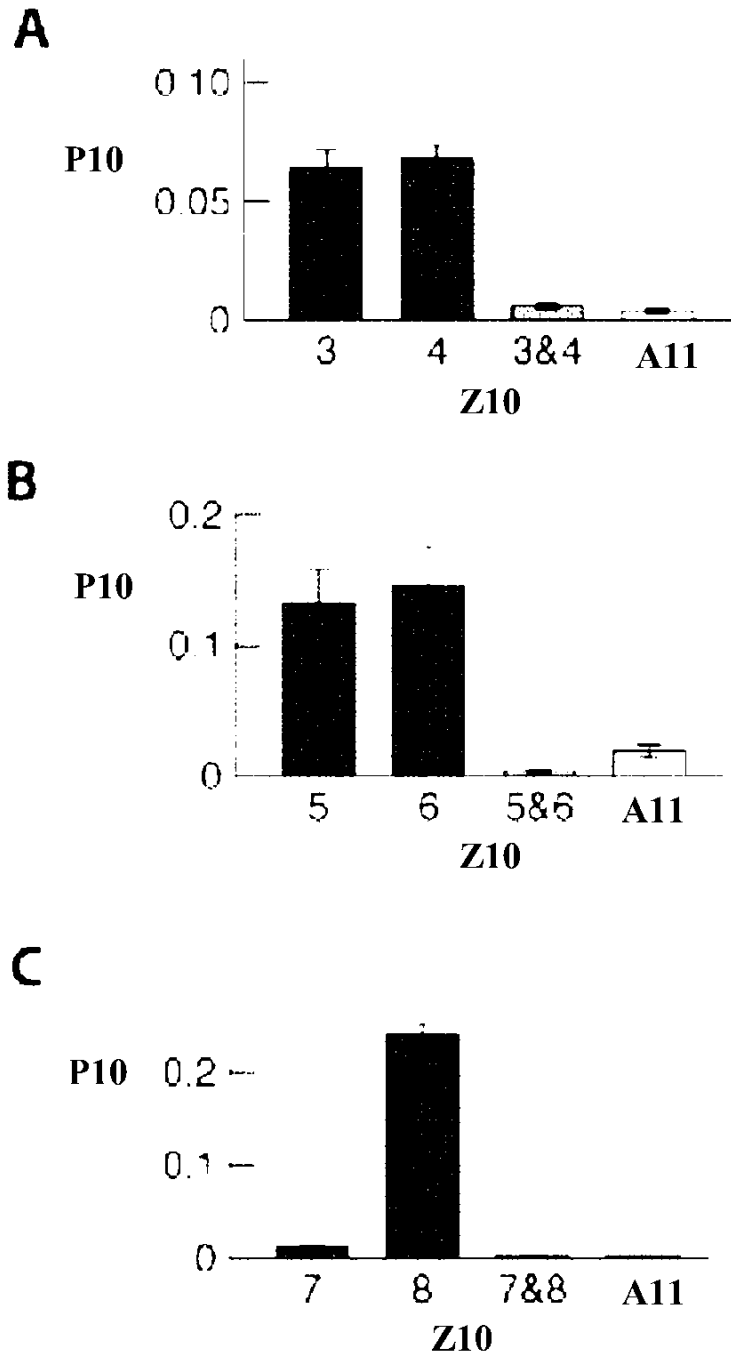
ŞEKİL 49



ŞEKİL 49

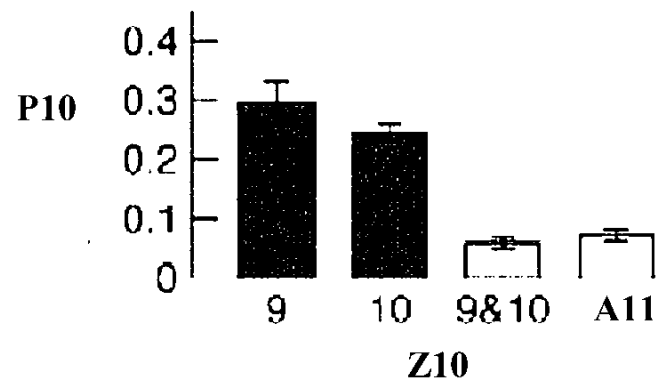
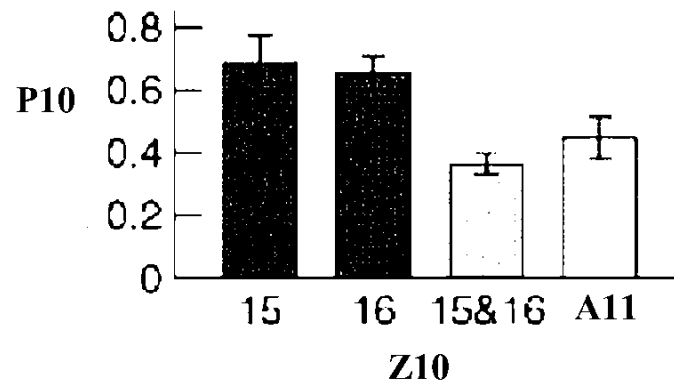


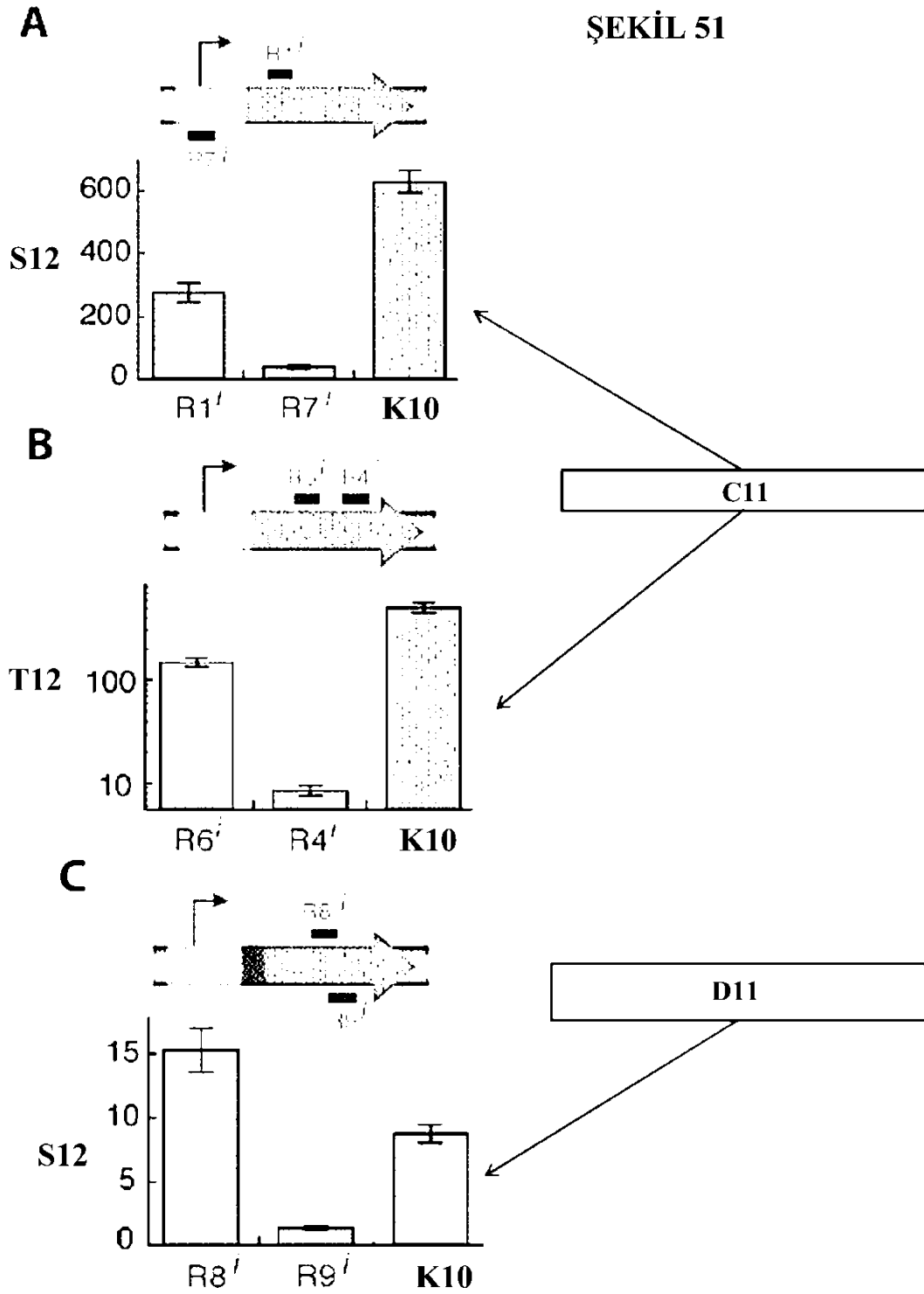
ŞEKİL 50



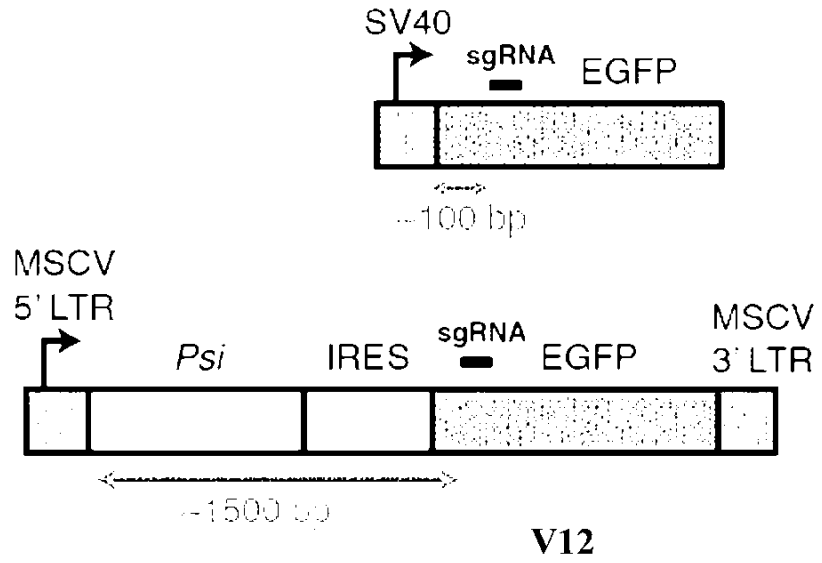


ŞEKİL 50

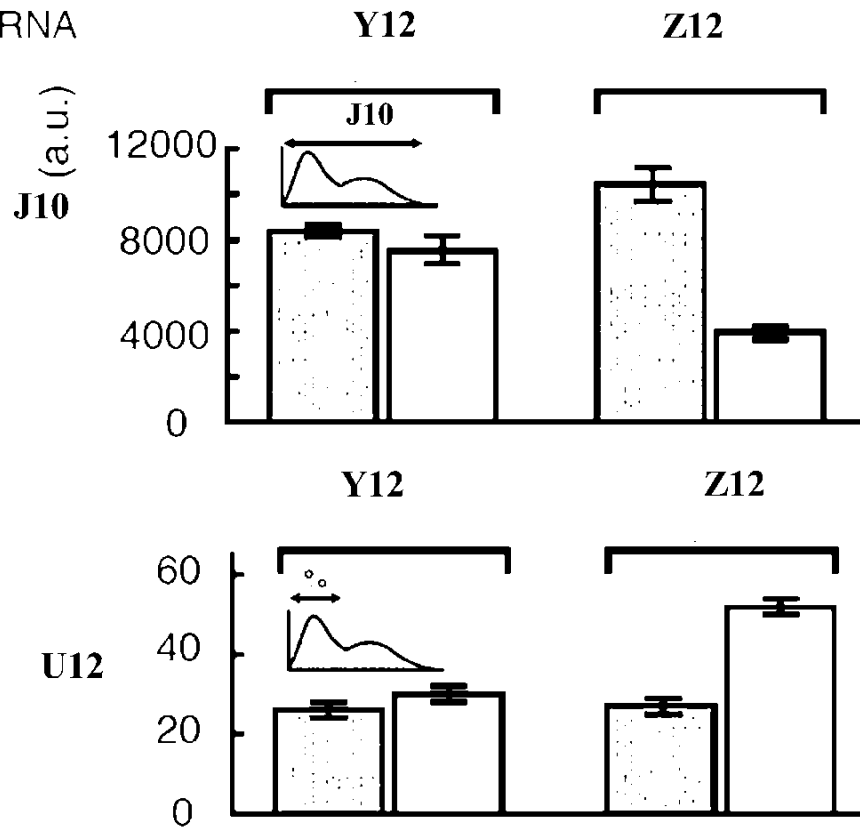
**D****E**



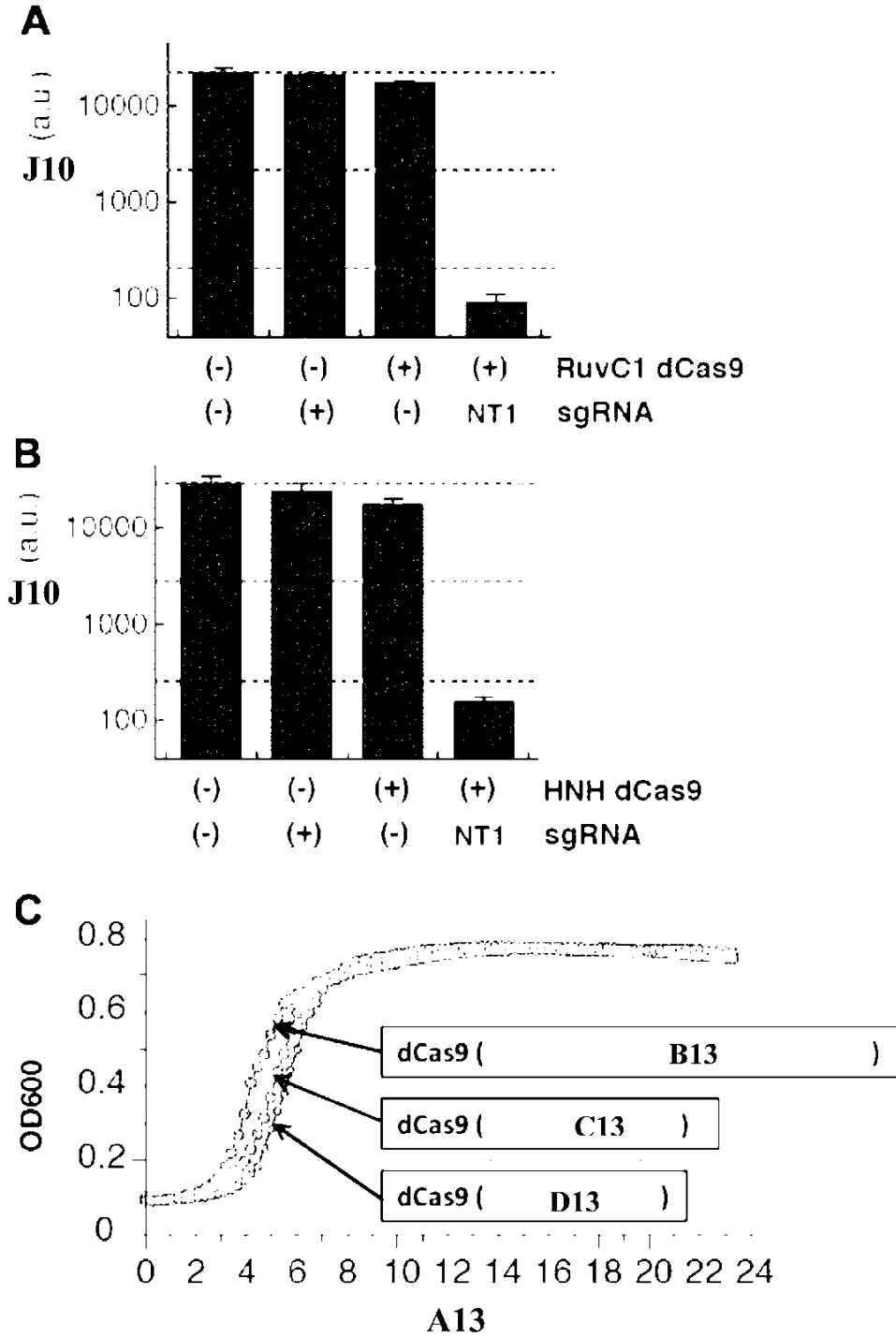
ŞEKİL 52



- (-) sgRNA
- (+) sgRNA



ŞEKİL 53



## ŞEKİL 54

A		U13
<b>F14</b>		
<b>G14</b>		
GAL4		V13
VP15		V13
VP64		V13
<b>H14</b>	(NFkB)	V13
<b>E13</b>		
KRAB		Y13
<b>F13</b>	(SID)	Y13
<b>G13</b>	(FRD)	Y13
<b>H13</b>	(KMT)	
<b>I13</b>		Z13
	(Clr4, Süvar13-9)	Y13
<b>J13</b>		V13
	(Trx, Trx, Ash1)	V13
<b>K13</b>	(SYMD2, NSD1)	
KMT4: <b>L13</b>		V13
<b>M13</b>		A14
	(PR-set7, Süv4-20, Set9)	
KM16: EZH2		B14
KMT8: RIZ1		Y13
<b>N13</b>	(KDM)	
KDM1: <b>O13</b>		C14
	(SpLsd1, Swml Saf110, Süvar13-3)	
<b>P13</b>	HDML2ab	D14
<b>R13</b>		E13
<b>S13</b>		Y13
<b>T13</b>	(UTX, RMD3)	V13

## ŞEKİL 54

## B

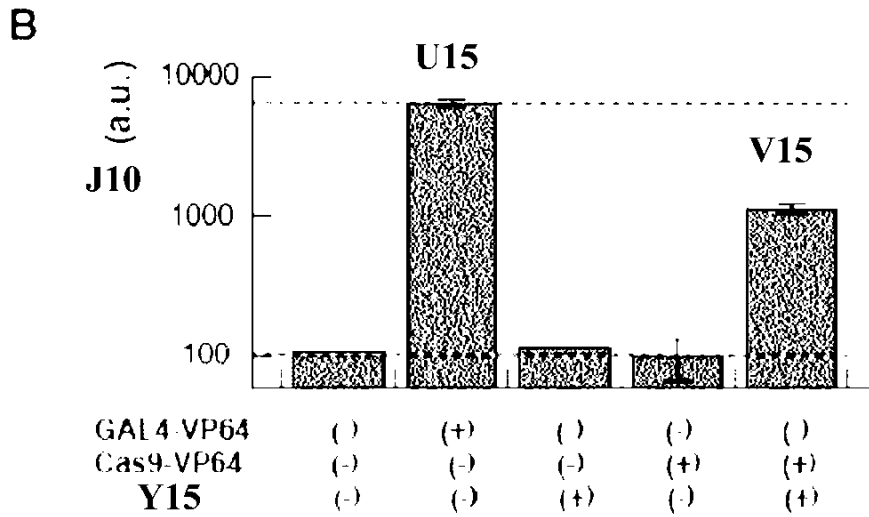
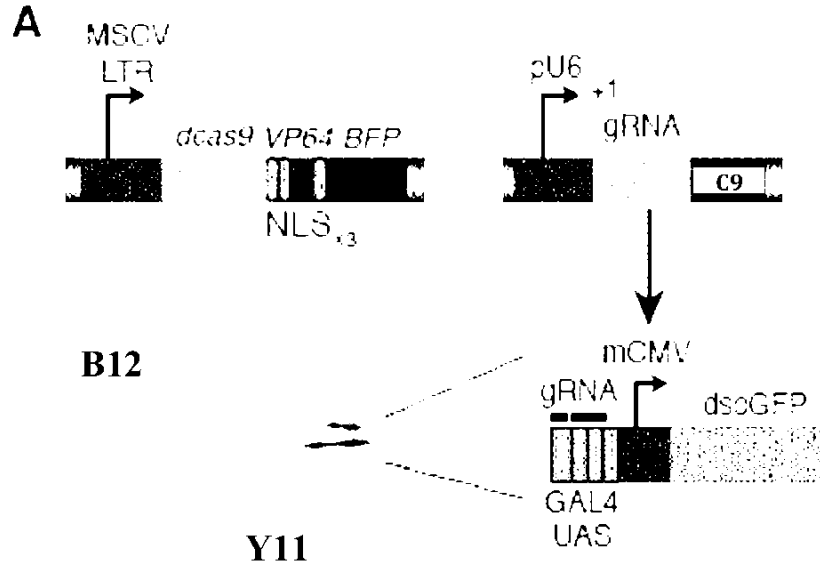
F14		U13
K15	(KAT)	
L15 (dGCN5/PCAF, Gcn5)		D15
M15	(dCBP/NEJ)	D15
I14	(dTAF1)	V13
J14		D15
K14 (Mst2, Sas3, CG1894)		E15
L14	(CHM, Mst2)	F15
M14 CG1894, Sas2, Mst2)	(dMOF,	G15
N14		V13
O14		
P14 (Rpd3, Hos1, Cir6)		Y13 Z13
R14		Y13 Z13
S14 Hst1, Hst2, Hst3, Hst4)	(Sir2,	Y13 Z13
T14	IV: HDAC11	Y13
U14		
Dam (E. coli)		H15
Dcm (E. coli)		H15
M. Sssl (Spiroplasma sp)		H15
DNMT1		I15
V14		I15
Y14		I15
Z14		
AID/Apobec	A15 : AID	J15
B15	: TET1	J15
C15 ROS1	: DME, DML1, DML2,	J15

## ŞEKİL 54

C

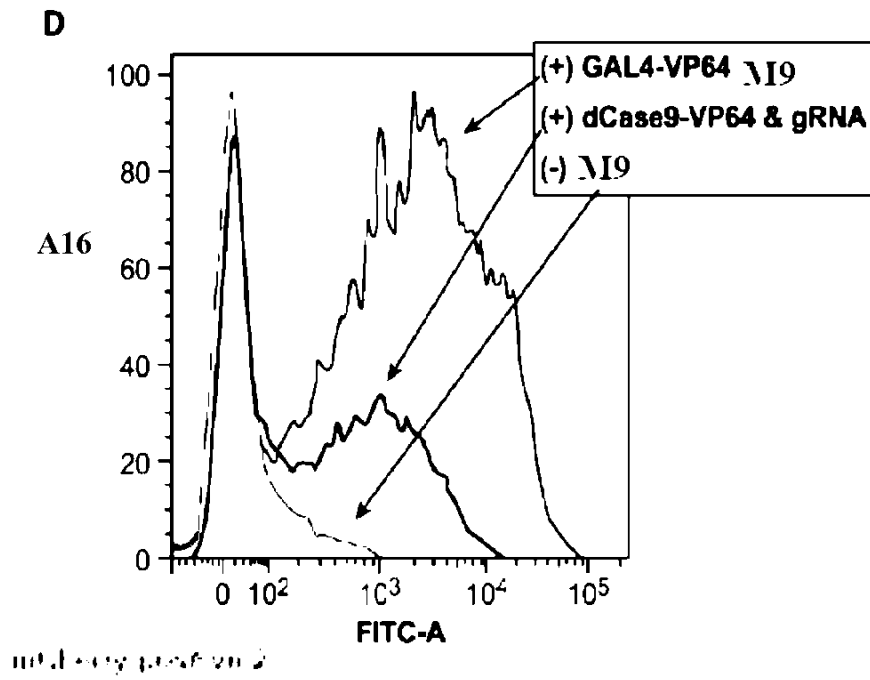
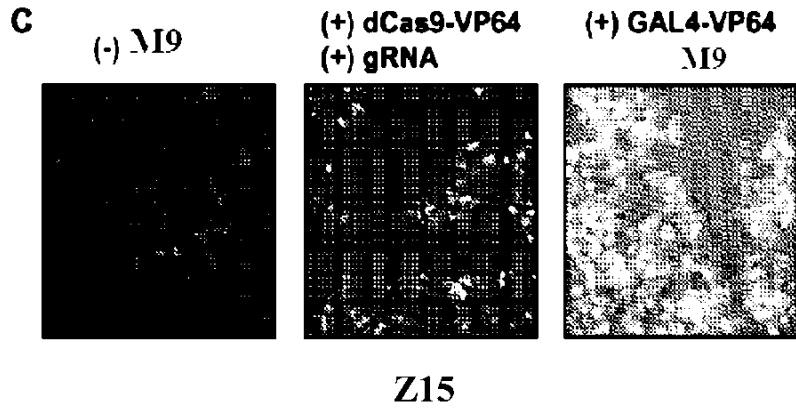
F14	U13
R15	
CTCF	N15
S15	
Lamin A	Y13
Lamin B	Y13
T15	
FKBP/FRB (S pombe)	O15
Pil1/Aby1 (E. coli)	P15

ŞEKİL 55

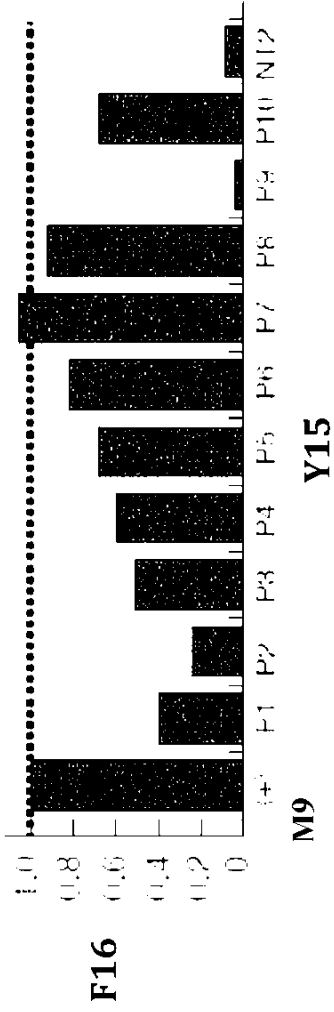
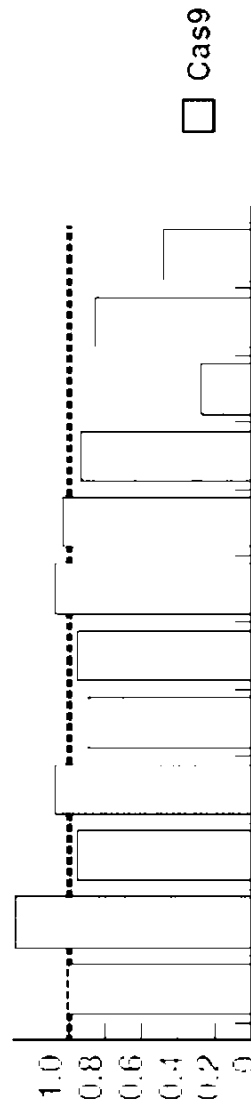
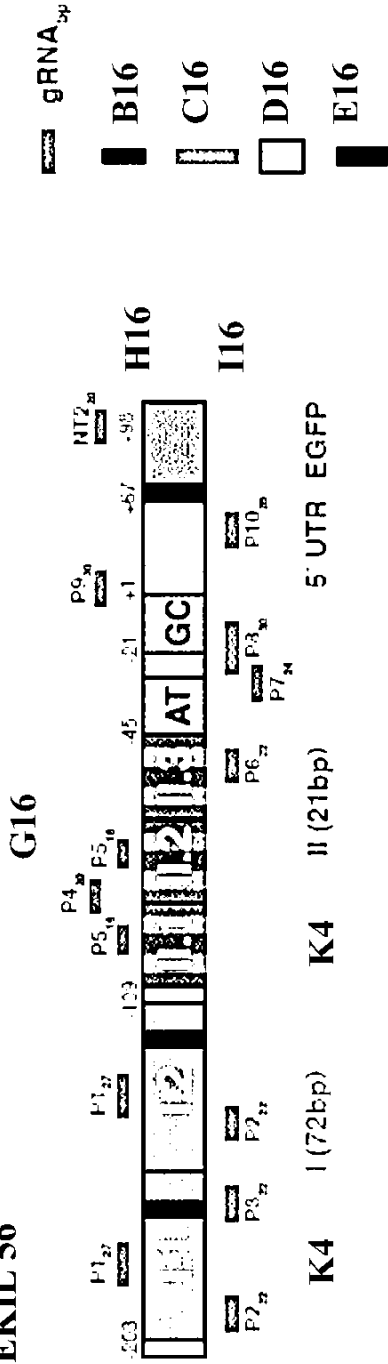




## ŞEKİL 55



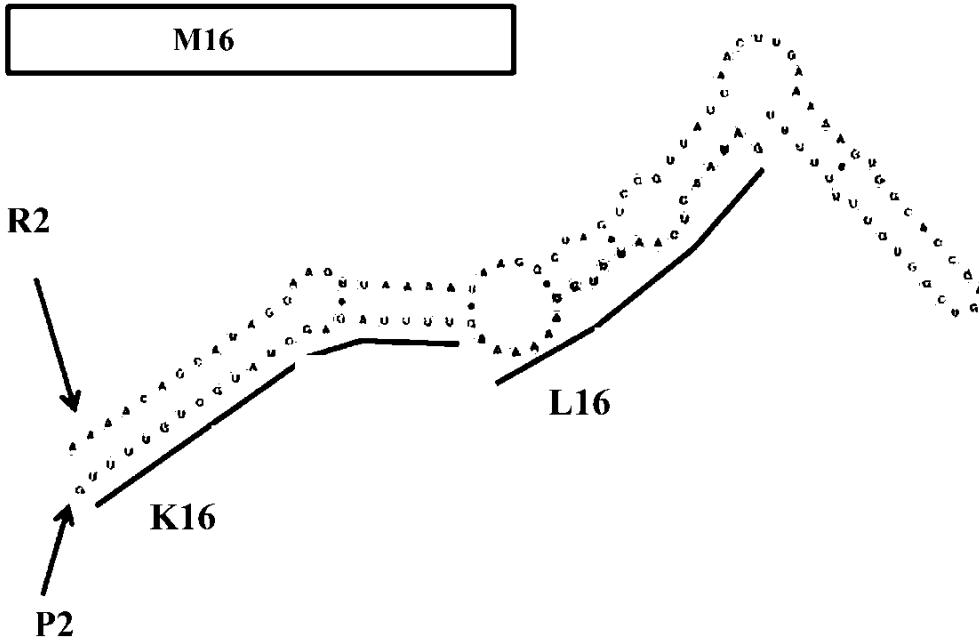
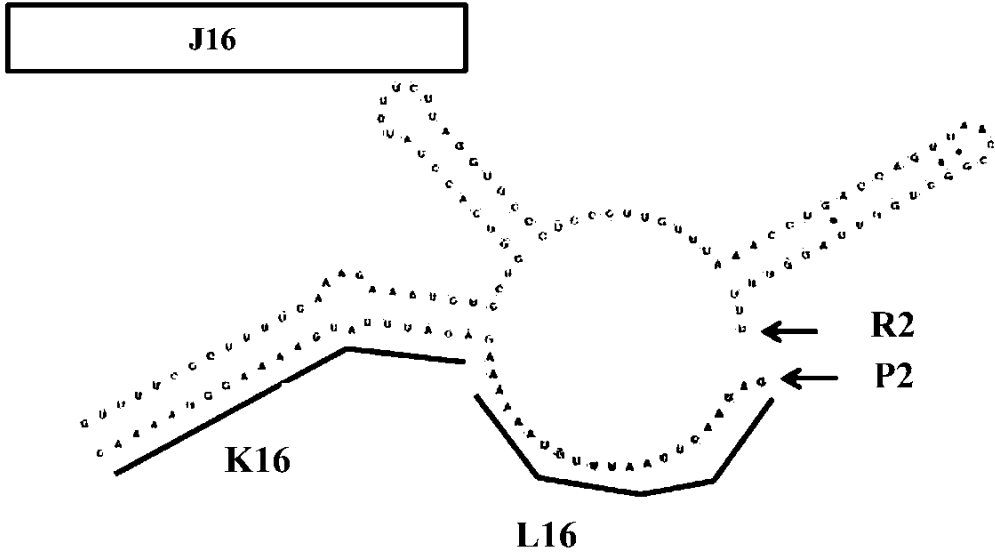
ŞEKİL 56



□ Cas9

■ Cas9-KRAB

ŞEKİL 57 A



ŞEKİL 57 B

