

# Bölüm 1

## Genom mühendisliği: CRISPR/Cas9 teknolojisi

Aslı GİRAY<sup>1</sup>

### GİRİŞ

CRISPR/Cas, birbirinin tekrarı olan DNA dizilerinden oluşan özel bir DNA ailesidir ve prokaryotlarda bir tür adaptif bağışıklık görevi görmektedir. Bu diziler ilk kez 1987'de Ishino ve ark. tarafından E. coli K12 suşunda alkalın fosfatazın izoenzim dönüşümünden sorumlu olan (IAP: Apoptoz İnhibitör Proteinin (The İnhibitory Of Apoptosis Protein) gen dizisi çalışılırken tanımlanmıştır. Ishino ve ark. Escherichia coli'de iap geninin downstream bölgesinde dizi analizini yaptıkları sırada, 29 nükleotit uzunluğunda 14 tane tekrar kümesi ile bu tekrarların arasında 32–33 nükleotidlik ara DNA bölgelerinin (“tandem tekrar” aralığı) olduğunu belirlemişlerdir (1,2). CRISPR/ Cas sistemi, RNA (CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats- Düzenli Aralıklarla Bölünmüş Kısa Palindromik Tekrar Kümeleri) ve protein (Cas: CRISPR Associated-CRISPR İlişkili Genler) bileşenlerinden oluşturmaktadır. 2002'de “tandem tekrarları”, “kümeleneşmiş düzenli aralıklı kısa palindromik tekrarlar” (CRISPR) olarak adlandırıldı. 2005'te, CRISPR aralayıcı dizisinin, bakteriyel plazmitlerden ve fajlardan gelen eksojen dizilerle yüksek oranda homolog olduğu bulundu. Konak ve eksojen maddeler arasındaki bu homolojinin bir sonucu olarak, CRISPR yabancı DNA'yı parçalayabilir. Özellikle, hayati bölgeye özgü gen CRISPR/Cas sistemi adı verilen düzenleme aracı 2013 yılında geliştirilmiştir. CRISPR/Cas, Watson-Crick baz eşleşmesine göre hedef lokusları tanımak için yalnızca kısa bir rehber RNA dizisine ihtiyaç duyar; Cas'in endonükleaz aktivitesi, hedef DNA'yı parçalayarak ve oluşturarak gen modifikasyonuna yol açabilir (1).

Bakteri ve arkealarda adaptif bağışıklık sistemleri olan CRISPR-Cas, karmaşık bir makineye benzemektedir. Özellikle son on yılda, Cas9, Cas12 ve Cas13 endonükleazlarının, genom düzenleme araçları olarak benzeri görülmemiş başarıları sayesinde, CRISPR-Cas (CRISPR ile ilişkili proteinler) sistemlerinin biyokimya-

<sup>1</sup> Dr. Öğr. Üyesi, Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, asli.giray@alanya.edu.tr

sal aktiviteleri, yapıları, karşılaştırmalı genomik ve biyolojik fonksiyonlarının bir kısmı ile Cas proteinleri en ince ayrıntılarına kadar incelenmiştir. CRISPR-Cas sistemi, çoğunlukla mobil genetik elementlerden (MGE) gelen yabancı nükleik asit fragmentelerini, mikrobiyal genomlarda gömülü olan CRISPR dizilerine entegre eder. Eklenen parçaların (spacerlar) transkriptleri, aynı kökenli hedeflerin tanınması ve etkisizleştirilmesi için rehber (g)RNA'lar olarak CRISPR-Cas sistemleri tarafından kullanılırlar. CRISPR-Cas sistemleri, evrimsel yörüngeleri en azından kısmen bağımsız görünen farklı adaptasyon ve efektör modüllerinden oluşur. Karşılaştırmalı genom analizi, adaptasyon modülünün kökenini, transpozaz olarak CRISPR dizilerine aralayıcı dahil edilmesinden sorumlu olan Cas1 proteininin bir homologunu kullanan farklı bir transpozon türü olan kaspozonlardan ortaya çıkarır. Efektör modül (ler)inin kökeni çok daha az açıktır. CRISPR-Cas sistemleri, çoklu alt birim efektörlü sınıf 1 ve efektörün tek, büyük bir proteinden oluştuğu sınıf 2 olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar. Sınıf 2 efektörler, farklı MGE tarafından kodlanan nükleazlardan kaynaklanırken, sınıf 1 efektör komplekslerinin kökeni bilinmemektedir. Fakat, sınıf 1'in, tip III sistemlerdeki bir sinyal yolağı ile ilgili son keşfi sayesinde, bir ipucu sunmaktadır ve tip III efektör modüllerinin, stres kaynaklı programlanmış hücre ölümüyle ilgili bir sinyal iletim sisteminden evrimleşmiş olabileceğini düşündürmektedir (3).

CRISPR-Cas bağışıklık yanıtı, üç farklı ve çoğunlukla iç içe geçmiş aşamayı kapsamaktadır: (i) adaptasyon, (ii) pre-crRNA (pre-CRISPR RNA) ekspresyonu ve işlenmesi ve (iii) interferans.

Adaptasyon aşamasında, Cas protein kompleksi hedef DNA molekülüne bağlanır ve tipik olarak, PAM (Protospacer-Adjacent Motif) olarak bilinen 2-4 baz çiftinden oluşan ayrı, kısa bir motifle karşılaştıktan sonra, hedef DNA içinde iki çift zincir kırılması meydana getirir. Serbest kalan segment, yani protospacer, daha sonra CRISPR dizisindeki iki tekrar arasına (çoğunlukla, lider diziyi hemen takip eden proksimal tekrar ünitesine) eklenir ve böylece bir spacer haline gelir. CRISPR dizisi daha sonra hücresel onarım makinesi tarafından onarılır, bu da proksimal tekrarın kopyalanmasıyla sonuçlanır (4). Ekspresyon-işleme (expression-processing) aşamasında ise, CRISPR dizisi tipik olarak uzun tek bir transkriptte, yani pre-crRNA'ya kopyalanır. Bu transkript, olgun crRNA'lar üretmek için ayrı bir Cas protein kompleksi tarafından işlenir. Son olarak interference aşamasında, işleme (processing) kompleksine bağlı kalan crRNA molekülü, rehber (gRNA) olarak kullanılır (5).

CRISPR-Cas sistemleri hem yapısal hem de işlevsel seviyelerde, ayrı bir modüler organizasyona sahiptir (6). CRISPR-Cas sistemlerinin iki temel bileşeni, adap-

tasyon ve efektör modülleridir. CRISPR-Cas sistemlerinin çoğunda, adaptasyon modülü Cas1 ve Cas2 proteinlerinden oluşan bir komplekstir. Bu yapıda, Cas1, enzimatik olarak aktif alt birimi oluştururken; Cas2, kompleksin yapısal iskelesini oluşturmaktadır. Cas1 ve Cas2 genleri, adaptif bağışıklık yanıtının oluşumunda görevlidirler ve tüm CRISPR/Cas sistemlerinde bulunmaktadırlar. Bunun yanısıra, bu iki Cas geninin dışında, o tipe özgü Cas genleri de bulunabilmektedir. Birçok CRISPR-Cas sisteminde adaptasyon aşamasına Cas4, Cas3, Cas9 veya RT gibi ek Cas proteinleri de katkıda bulunur, bazı durumlarda ise, Cas1 veya Cas2 ile füzyonlar oluşturur. Adaptasyon modülünün nispeten basit ve tek tip yapısının aksine, efektör modülleri, CRISPR-Cas sistemleri arasında oldukça çeşitlidir ve bunların varyasyonları mevcut CRISPR-Cas sınıflandırmasının temelini oluşturur (7).

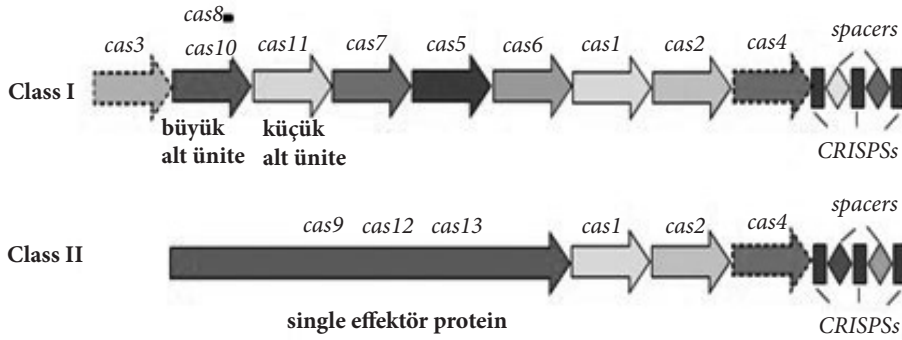
## **1. CRISPR-CAS'IN YAPISI**

CRISPR-Cas sistemi, Cas gen ailesi proteinlerini ve CRISPR tekrar dizilerini, speysırlar ve lider dizisinden oluşmaktadır. Lider dizisi, CRISPR dizisinin yukarı akışında bulunur ve CRISPR transkripsiyonunun başlatılmasından sorumludur. Tekrarlar, bir saç halkası oluşturabilen, uzunluğu 21-48 nükleotit olan kısa tekrarlayan dizilerdir ve tekrar sayısı türlere göre değişir, genellikle birkaç ila birkaç yüz arasında değişir. Aralayıcılar yaklaşık 26-72 nükleotittir ve iki tekrar arasında yer alır (8). Cas geninin kodlama dizisi genellikle CRISPR dizisinin yukarı akış bölgesinde bulunur ve bir nükleaz, helikaz ve nickaz ve diğer aktivitelere sahip olan ve spesifik olarak DNA dizilerini parçalayabilen yüksek oranda korunmuş nükleik asitle ilişkili Cas proteinini kodlayabilir (9).

## **2. CRISPR-CAS SİSTEMLERİNİN SINIFLANDIRILMASI**

CRISPR-Cas sistemleri, prensipte, konağı herhangi bir MGE'den korumak için uyum sağlayabilen evrensel bir bağışıklık mekanizmasıdır. Bununla birlikte, Cas protein dizileri ve CRISPR-cas lokuslarının genomik organizasyonu önemli çeşitlilik gösterir. Tüm CRISPR-Cas sistemleri, efektör modüllerinin tasarım ilkeleri temeline bağlı olarak iki farklı sınıfa ayrılır. Sınıf 1 sistemlerde, birkaç Cas proteini içeren çoklu alt birim efektör kompleksleri bulunurken, sınıf 2 sistemlerde, efektör tek, büyük, multidomainli bir proteindir. CRISPR-Cas sistemlerinin sınıflandırılması karmaşık bir konudur. Filogenetik belirteçler olarak kullanılacak evrensel Cas proteinleri yoktur ve evrimsel olarak en korunmuş protein olan Cas1'in filogenisi bile, farklı modüllerin yarı bağımsız evrimi nedeniyle CRISPR-Cas sistemleri arasındaki ilişkileri yeterince temsil edemez. Bu nedenle, CRISPR-

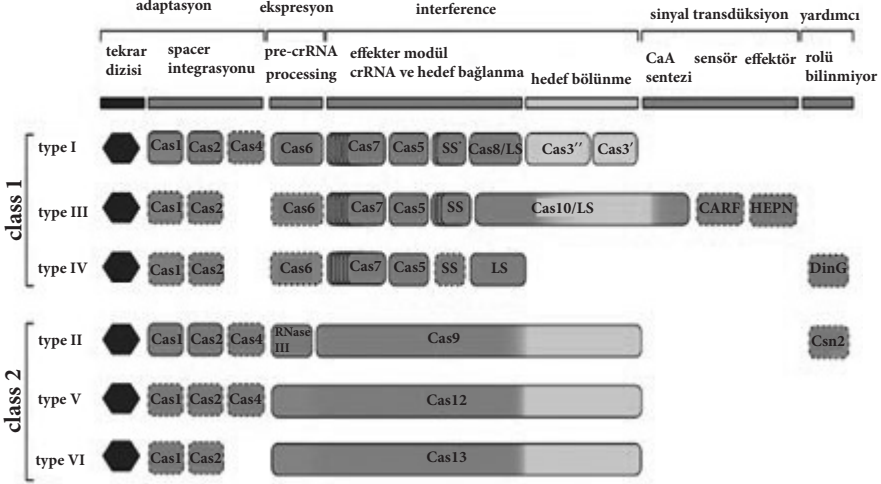
Cas sistemlerinin mevcut sınıflandırmasında, imza cas genleri, cas operonlarının organizasyonu ve korunmuş Cas proteinlerinin filogenileri de dahil olmak üzere birçok kriter kullanılır (3).



Şekil 1. Sınıf 1 ve sınıf 2 sistemleri ve 13 çekirdek gen ailesi. Sınıf 1 (çok proteinli efektör kompleksleri) ve sınıf 2 (tek proteinli efektör kompleksleri) CRISPR-Cas sistemlerinin genel mimarileri. Genler oklarla gösterilmiştir; homolog genler aynı renkle gösterilir. Gen adları, mevcut terminolojiyi ve sınıflandırmayı takip eder (3).

CRISPR-Cas sınıflarının her biri kendi içinde üç türe ayrılmıştır. Sınıf 1'de, tip I, III ve IV bulunurken; sınıf 2'de tip II, V ve VI bulunmaktadır.

CRISPR/Cas, I, II ve III olmak üzere üç ana tipe ayrılabilir. Şu anda, çoğu araştırma, tip II CRISPR/Cas9 prensiplerine ve uygulamalarına, diğer iki türden daha fazla odaklanmaktadır. CRISPR/Cas sistemi tiplerinin crRNA işleme mekanizmaları birbirinden farklılık göstermektedir. Bu sistemlerden Tip II sistemi sadece bakterilerde bulunurken, Tip I ve III sistemleri hem bakterilerde hem de arkealarda bulunmaktadır ve bu iki sistem benzerlik sergilemektedir. CRISPR/Cas9 sisteminde, hedef genleri düzenlemek için CAS ile ilişkili 9 protein, crRNA (CRISPRRNA), tracrRNA (transaktif edici crRNA) ve RNaseIII (Ribonükleaz III) gereklidir. CRISPR/Cas9 teknolojisi, gen mutasyonu, gen susturma ve transkripsiyonel düzenleme yoluyla metabolik yolları değiştirmek ve mahsul kalitesini arttırmak için hızla geliştirildi ve günümüzde başarıyla uygulanmaktadır (1,3).

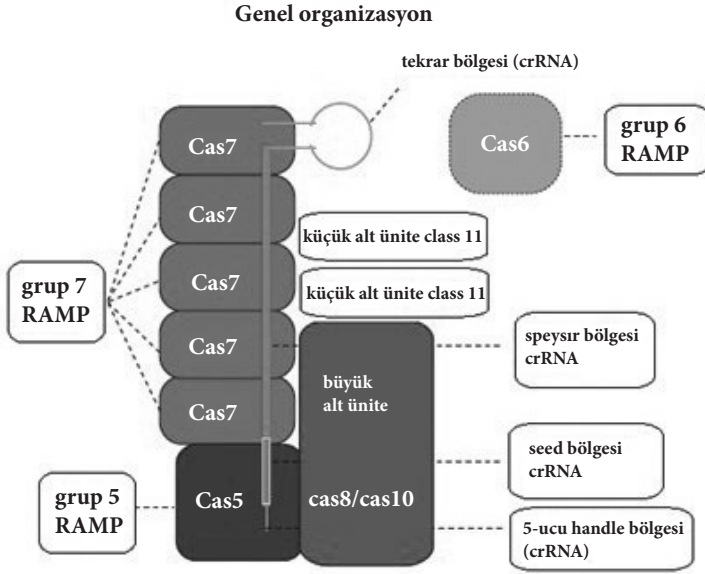


Şekil 2. CRISPR-Cas sistem türlerinin temel yapı taşları (3).

## 2.1. Sınıf 1 efektor modülleri

Sınırlı doğrudan dizi benzerliğine rağmen, sınıf 1 sistemlerinin büyük çoğunluğunu birlikte oluşturan tip I ve tip III efektor komplekslerinin ortak bir atayı paylaştığına dair neredeyse hiç şüphe yoktur (Şekil 3). Bu komplekslerin genel mimarileri çarpıcı biçimde benzerdir ve her iki durumda da kompleksin iskeleti, RAMP (Tekrarla İlişkili Gizemli Protein) süper ailesinin bir üyesi olan Cas7 proteininin çoklu kopyalarından oluşmaktadır (10). Ek olarak, her iki türün efektor kompleksleri, Cas5 proteininin tek bir kopyasını, Cas7 ile uzaktan akraba olan başka bir RAMP üst ailesi üyesini ve büyük ve küçük alt birimler olarak adlandırılanları içerir (şekil 1 ve 3). Cas genlerinin genel olarak hızlı evrimi ve bunun sonucunda ortaya çıkan düşük dizilimin korunması nedeniyle, tip I ve III arasındaki büyük ve küçük alt birimlerin homolojisi dizi düzeyinde tespit edilememektedir; bununla birlikte, küçük alt birimler, homoloji bakımından önemli yapısal benzerlikler de göstermektedir. Tip III sistemlerin büyük alt birimi olan Cas10, iki RRM (RNA tanıma motifi) alanı içeren bir proteindir (11). RRM alanı, çok çeşitli RNA ve DNA polimerazlarının ve nükleotid siklazların katalitik alanı olan avuç içi alanına oldukça önemli benzerlik göstermektedir (12). Bu avuç içi alanının aktif bir enzim olduğu tahmin edilirken, ikinci RRM alanı inaktivedir. Tip I büyük alt birim, farklı tip I alt tipleri arasında bile sekans olarak oldukça farklı olan ve saptanabilir

bir sekans benzerliği göstermeyen ve en iyi ihtimalle Cas10'a sadece zayıf yapısal benzerlik gösteren Cas8 proteinidir (6). Bu belirsizliğe rağmen, genel yapısal organizasyonun ve Cas7-Cas5 iskelesinin korunması, tip I ve tip III arasındaki efektör komplekslerinin ortak ataları için yeterli kanıt sağlamaktadır (3) (Şekil 3). Ayrıca, tip I ve tip III sistemlerin birlikte tespit edilen tüm CRISPR-Cas lokuslarının yaklaşık %90'ını temsil ettiği ve dahası arkealar arasında %100'e ulaştığı düşünüldüğünde (13), tip I ve tip III efektör modülleri de genel olarak CRISPR-Cas sistemleri için bu modülün atasal formu olarak değerlendirilmektedir (6, 14).



Şekil 3. sınıf I CRISPR-Cas sistemlerinin temel özellikleri ve genel organizasyonu. Şekil, sınıf I efektör kompleksinin genel organizasyonunu şematik olarak göstermektedir. Şekillerin renklendirilmesi, şekil 1'deki cas genlerinin renk koduna karşılık gelmektedir.

Tip III'te, küçük alt birim hariç, tüm efektör kompleksleri aynı RRM yapısal kıvrıma sahip alanlardan oluşmaktadır (15). RRM, Cas10'da olduğu gibi, RAMP süper ailesinin ortak atasına polimeraz-siklaz aktivitesi sağlar; bu, RAMP'lerin üç grubunun hepsinde, glisin açısından zengin döngüde tanımlanabilen ortak bir yapısal özellik edinmesini sağlamaktadır. Ayrıca, yapısal karşılaştırmalar hem tip I hem de tip III sistemlerden küçük alt birimlerin homolog olduğunu ve Cas10'un C-terminal dört sarmal demet alanına benzer olduğunu göstermektedir (16). Bu nedenle, bir çoğaltmayı takiben, atalardan kalma Cas10 benzeri bir proteinin bölünmesinin hem RAMP'lerin hem de küçük alt birimlerin atalarına yol açmış

olabileceği akla yatkın görünmektedir. Üç ana ailenin, Cas5, Cas7 ve Cas6'nın katalitik olarak aktif RAMP'lerinin bilindiği göz önüne alındığında, atalardan kalma bir RAMP de bir RNase olabilmektedir. Bununla birlikte, özellikle farklı Cas6 proteininin katalize katılan farklı kalıntılara sahip olduğu göz önüne alındığında, RNase aktivitesinin bağımsız kökenleri göz ardı edilememesi gerekir (6, 17).

Son keşifler, CRISPR-Cas efektör modülünün varsayılan bağımsız atasının organizasyonu ve olası işlevleri hakkında da ipuçları vermektedir. Tip III CRISPR-Cas sistemlerinin çoğu, bir veya her iki karakteristik alanı içeren proteinleri kodlar: CARF (CRISPR-Associated Rossmann Fold), (öngörülen) bir nükleotid bağlama alanı (18) ve HEPN (Yüksek Ökaryot ve Prokaryot Nükleotid bağlama alanı), hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda temel olarak çeşitli savunma işlevlerinde yer alan bir RNaz. Tip III sistemlerde CARF-HEPN füzyonunun yaygın örnekleri arasında Csm6 ve Csx1; bunun yerine bazı tip III sistemler, ilişkisiz bir nükleaza veya bir DNA-bağlayıcı HTH alanına kaynaşmış bir CARF alanından oluşan proteinleri içerir (18). Cas10 ve HEPN alanlarının enzimatik aktivitelerinin yanı sıra, HEPN (veya diğer nükleazların) aktivitesinin allosterik düzenlenmesi anlamına gelen CARF alanlarının nükleotid bağlama kapasitesi, hesaplama yöntemleri ile tahmin edildikten sonra (15,18), işlevleri CRISPR-Cas'ta bu proteinlerin Cas10 tarafından sentezlenen oligonükleotidler aracılığıyla bağlandığı tahmin edilmesine rağmen, bu durum belirsizliğini korumaktadır.

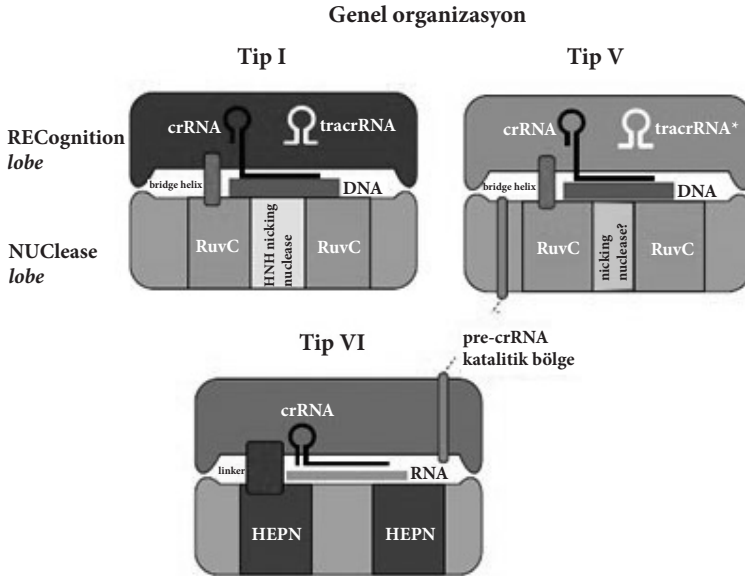
Son birkaç yılda CRISPR alanındaki en dikkate değer bulgulardan biri, bu hipotezin deneysel olarak doğrulanması olmuştur. Yapılan çalışmalar, özel bir sinyal yolunun tip III CRISPR-Cas sistemlerinin bağışıklık fonksiyonunun merkezinde olduğunu göstermektedir. Spesifik olarak, crRNA efektör kompleksinin hedefe bağlanması, siklik oligoA (cOA) sentezini katalize eden Cas10'un polimeraz aktivitesini allosterik olarak aktive eder. Üretilen cOA molekülleri, Csm6 proteininin CARF alanı (ve çıkarım yoluyla, diğer CARF alanı içeren proteinler) tarafından bağlanır, bu da Csm6'nın HEPN RNaz alanının rastgele RNaz aktivitesinin allosterik aktivasyonu ve hem hedef RNA'nın hem de diğer RNA moleküllerinin bozulmasıyla sonuçlanır (19). cOA-Cas10 sinyal yolunun keşfi, CRISPR-Cas efektörlerinin atasının bir stres-tepki sistemi olduğu yönünde makul bir olasılığı ortaya koymaktadır.

## **2.2. Sınıf 2 efektör modülleri**

Sınıf 2 efektörleri, tüm efektör fonksiyonlarının tek bir proteinde yoğunlaşması bakımından, sınıf 1'deki efektörlerden tamamen farklıdır. Sınıf 2 efektörlerin protein dizilerinin derinlemesine analizi, çarpıcı bir özelliği ortaya çıkarmıştır:

bunların tümü, farklı MGE sınıfları tarafından kodlanan nükleazlara homologtur (20). Tüm tip II ve tip V efektörler (sırasıyla Cas9 ve Cas12 proteinleri), çok çeşitli nükleazlarda ve diğer bazı proteinlerde ortak olan RNase H katına ait olan RuvC benzeri endonükleaz ailesine ait bir alanı paylaşır (Şekil 4). Bununla birlikte, Cas9 ve Cas12'nin RuvC benzeri alanları arasındaki ve hatta her tip içindeki farklı alt tipler arasındaki sekans benzerliği düşüktür, öyle ki bu proteinler homologlar olarak sadece oldukça hassas sekans profili aramaları veya yapısal karşılaştırmalar ile tanınabilir (20, 21).

RuvC-benzeri alan dışında, Cas9 ve Cas12 dizileri birbirine hiçbir benzerlik göstermemekte ve homolog görünmemektedir. Birkaç Cas9 proteininin, Cas12a (Cpf1) ve Cas12b (C2c1) yapıları kılavuz RNA, hedef DNA ve Cas9 ve Cas12b durumlarında tracrRNA ile kompleks oluşturduğu bilinmektedir (3, 20, 21). Tüm bu efektör proteinler, hedef DNA'yı barındıran iki loblu, "çene benzeri" bir yapı olan benzer boyut ve genel şekli paylaşır. Ancak, RuvC benzeri alanların ötesinde yapılar üst üste bindirilemez. Cas9, Cas12a ve Cas12b'nin RuvC benzeri alanları, sırasıyla homolog olmayan alanları temsil eden benzer fakat aynı olmayan pozisyonlarda, Cas9'daki HNH ailesi nükleaz domaninde ve Cas12 proteinlerinde hedef bölünmeyi kolaylaştıran benzersiz, enzimatik olmayan domainlerde insertler içermektedir (22).



**Şekil 4.** Sınıf 2 sistemlerin temel özellikleri, genel organizasyonu ve etki alanı tasarımı. Hedef DNA veya RNA ile efektör proteinlerin komplekslerinin şeması, RNA ve (tip II için) tracrRNA'nın gösterimi.



Cas9 ve Cas12'nin evrimsel kökenine dair önemli bir ipucu, aynı Cas protein ailesinin üyeleri dışında, her ikisi de IS605'in RuvC alanı içeren TnpB proteinlerine ve diğer ilgili transpozon ailelerine yüksek derecede dizi benzerliği göstermesidir (21). tnpB genleri, bakteri ve arke genomlarında en bol bulunan genler arasındadır ve ya ek olarak bir transpozazı (TnpA) kodlayan otonom transpozonlar tarafından ya da daha sık olarak TnpB'nin tek protein ürünü olduğu ökaryotik Fanzor elementleri dahil olmak üzere otonom olmayan transpozonlar tarafından kodlanır. TnpB'nin transpozonlardaki rolü, bu proteinin transpozisyon için gerekli olmadığı ve aslında onu aşağı regüle ettiği düşünüldüğünde belirsizliğini korumaktadır, ancak çoğu TnpB dizisinde RuvC benzeri endonükleaz katalitik bölgelerin iyi korunmuş olması, bu proteinlerin aktif nükleazlar olduğunu göstermektedir (23).

Tip II efektörleri ve tip V'nin farklı alt tipleri (sırasıyla Cas9 ve Cas12a, 12b, 12c), farklı TnpB protein gruplarına en yüksek benzerliği göstererek, aynı atasal protein ailesinden bağımsız kökenler olduğunu düşündürmektedir (21). TnpB'den V tipi efektörlere olası evrim yolu sayesinde, V-U alt tipi, CRISPR-Cas sistemlerinin tanımlanmasıyla daha izlenebilir hale geldi. Alt tip V-U lokusları, adaptasyon modüllerinden yoksundur ve tipik olarak yalnızca CRISPR dizilerinin yanında kodlanmış TnpB homologlarından oluşmaktadır (20). Varsayılan V-U efektörleri, Cas9 veya Cas12'den çok daha küçüktür, ancak boyut olarak benzerlik göstermektedir, diğer taraftan transpozon kodlu TnpB proteinlerinden ise daha büyüktür. Cas9 ve Cas12'nin aksine, V-U lokuslarında kodlanan TnpB homologları, transpozonla kodlanmış TnpB'ye büyük oranda benzerlik göstermektedir. Buna göre, V-U proteinleri, farklı TnpB alt ailelerinden olan beş farklı V-U2 efektör grubuna ait olabileceğini destekleyen filogenetik ağaçlara dahil edilebilir (20). Bununla birlikte, çeşitli bakterilerde V-U alt tipinin beş farklı varyantının evrimsel olarak korunması, aralayıcı dizilerin yakından ilişkili V-U lokuslarında bile tamamen farklı olduğunun bulunması ve faja özgü birden fazla aralayıcının birlikte bulunması, en azından bazı V-U varyantlarının, fonksiyonel CRISPR-Cas sistemleri olduğunu göstermektedir (20).

### **3. CRISPR/CAS9 MEKANİZMASI**

CRISPR/Cas9, yabancı DNA'yı Cas9 ve sgrNA olmak üzere iki bileşen aracılığıyla parçalar. Cas9, *Brevibacillus laterosporus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* ve *Streptococcus thermophilus* gibi farklı bakterilerden türetilen bir DNA endonükleazıdır ve Cas9 izolasyonu için en yaygın olarak kullanılan bakteri *Streptococcus pyogenes*'dir. CRISPR-Cas sisteminin çalışma mekanizması üç

adımdan oluşur: acquisition, ekspresyon ve interferens. İlk aşama, temel olarak, bilinen tüm CRISPR-Cas sistemleri tarafından paylaşılan ve bazen ek Cas proteinleri içeren Cas1 ve Cas2 proteinlerinin kompleksi tarafından gerçekleştirilir (24). Protein kompleksi, yönlendirilmiş olarak yakalanan ve tekrar dizileriyle ayrılmış bir CRISPR dizisine yeni CRISPR aralayıcıları olarak entegre edilen yabancı nükleik asitlerdeki protospacer ve protospacer bitişik motifini (PAM) tanır, böylece istilacı genetik elementlerin “bağışıklık belleğini” oluşturmaktadır (25). Aynı ekzojen gen yeniden istila edildiğinde, CRISPR lokusu bir öncü CRISPR RNA transkriptine (pre-crRNA) kopyalanır ve daha sonra Ribonükleaz III (RNase III) yardımıyla küçük bir olgun crRNA'ya işlenir. crRNA, kısmi CRISPR tekrarına birleştirilmiş kısmi CRISPR aralayıcı dizileri içerir. CRISPR lokusu ayrıca, crRNA'nın tekrar bölgelerine tamamlayıcılığı olan trans-aktif edici bir crRNA'yı (tracrRNA) kodlar. CRISPR dizisine ek olarak, tek veya çoklu Cas nükleazları, CRISPR lokusu tarafından kodlanır. Örneğin, bir tip II CRISPR-Cas9 sisteminde en önemli özellik, crRNA'nın olgunlaşmasına katılan ve istilacı ekzojen nükleik asitleri bozan büyük molekülü Cas9 proteindir. crRNA'yı tracrRNA ile birleştirmek, Cas9'u karmaşıklaştıran tek kılavuzlu RNA'yı (sgRNA) üretir. Daha sonra, sgRNA, gerekli bir 5'-NGG-3' PAM dizisinden uygun şekilde ayrılmış olan istilacı nükleik asitlerin yok edilmesinden sorumlu bir efektör ribonükleoprotein kompleksi oluşturmak için Cas9'a bağlanır (26). PAM tanıma, bölünme ve ayırım için esastır.

### **CRISPR/nCas9 ve CRISPR/dCas9**

Cas9 proteini, bölünme işlevlerini yerine getiren iki nükleaz alanı olan HNH ve RucV domainlerinden oluşmaktadır. HNH domaini, crRNA'nın tamamlayıcı zincirini keserken, RucV domaini ise çift sarmallı DNA'nın zıt zincirini keser. Alanlardan birine tek bir baz mutasyonu (D10A veya H840A) eklenirse, Cas9, hedef DNA dizisinde yalnızca tek bir ipliği parçalayabilen nickaz Cas9 (nCas9) olur. İki alan aynı anda mutasyona uğrarsa, Cas9, endonükleaz aktivitesini tamamen kaybeden nükleaz eksikliği olan Cas9 (dCas9) haline gelir. nCas9 ve dCas9, transkripsiyonel modülasyon, epigenetik modifikasyon ve genomik görüntüleme alanlarına önemli avantajlar sağlamıştır. nCas9, istenen bir genin iki tek dizisinin aynı anda hedeflenmesi için genellikle iki farklı sgRNA ile kombinasyon halinde kullanılır. Bu yaklaşım, CRISPR-Cas9 sistemlerinin hedef dışı etkilerini önemli ölçüde azaltabilir ve gen düzenlemenin özgüllüğünü büyük ölçüde iyileştirebilir. nCas9, büyük gen parçalarının değiştirilmesi ve homolog rekombinasyon onarımı olasılığının iyileştirilmesi için kullanılabilir (27). dCas9 nükleaz aktivitesini kaybetmesine rağmen, hala DNA bağlama aktivitesini korur ve hala grNA prog-

ramlanabilir bir şekilde DNA dizilerini hedefleyebilir ve bunlara bağlanabilir. dCas9, transkripsiyonel aktivatörleri veya baskılayıcıları birleştirerek ve bir genomu geri dönüşü olmayan mutasyonlar sokmadan gen ekspresyonunu modüle ederek transkripsiyonu düzenler (28, 29).

SgRNA, sentetik bir RNA'dır ve yaklaşık 100 nükleotid uzunluğundadır. 5'-ucunda, genellikle konsensus NGG (N, herhangi bir nükleotit; G, guanin) olan bir protospacer bitişik motif (PAM) dizisinin eşlik ettiği hedef diziyi tanımlamak için bir kılavuz dizisi görevi gören bir 20 nükleotid dizisi bulunmaktadır. SgRNA'nın 3'-ucundaki ilmek yapısı, hedef diziyi kılavuz dizi ile tutturabilir ve Cas9 ile bir kompleks oluşturabilir, bu da çift sarmallı DNA'yı böler ve bu bölgede bir çift sarmal kopması (DSB) oluşturur. Bir DSB oluştuğunda, homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ, Nonhomologous End-Joining) veya homolojiye yönelik onarım (HDR, Homology-Directed Repair) DNA onarım mekanizmaları başlatılır. Bir DSB, çoğu durumda genellikle NHEJ tarafından onarılır ve uyumsuzluklar ve gen ekleme/silmeleri oluşturmanın basit bir yoludur, bu da gen nakavtlarına yol açar. Bir oligo şablonu mevcut olduğunda, HDR spesifik gen değişimine veya yabancı DNA knock-in oluşumuna neden olur. Bu süreçler, her zaman CRISPR/Cas9'un insan, hayvan ve bitkiler dahil olmak üzere çeşitli organizmaların genomunu verimli bir şekilde düzenleyebildiğidir (30).

## **KAYNAKÇA**

1. Zhao HW, Lv X, Yin W. The CRISPR/Cas9 system: a novel strategy for targeted genome engineering. *J Pathog Biol* 2015; 10:281-4.
2. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol Am Soc Microbiol*. 1987; 169:5429-33.
3. Koonin EV, Makarova KS. Origins and evolution of CRISPR-Cas systems. *Phil Trans R Soc B* 374: doi:10.1098/rstb.2018.0087.
4. Jackson SA, McKenzie RE, Fagerlund RD, Kieper SN, Fineran PC, Brouns SJ. CRISPR-Cas: adapting to change. *Science* 2017;356: doi:10.1126/science.aal5056.
5. Nishimasu H, Nureki O. Structures and mechanisms of CRISPR RNA-guided effector nucleases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2017; 43:68-78. doi: 10.1016/j.sbi.2016.11.013.
6. Makarova KS, Wolf YI, Koonin EV. The basic building blocks and evolution of CRISPR-Cas systems. *Biochem. Soc. Trans.* 2013; 41:1392-1400. doi:10.1042/BST20130038.
7. Amitai G, Sorek R. CRISPR-Cas adaptation: insights into the mechanism of action. *Nat. Rev. Microbiol.* 2016; 14:67-76. doi:10.1038/nrmicro.2015.14.
8. Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinform.* 2007; 8:172.
9. Richter H, Randau L, Plagens A. Exploiting CRISPR/Cas: interference mechanisms and applications. *Int J Mol Sci.* 2013; 14:14518-31.
10. Mohanraju P, Makarova KS, Zetsche B, Zhang F, Koonin EV, van der Oost J. Diverse evolutionary roots and mechanistic variations of the CRISPR-Cas systems. *Science* 2016;353, doi:10.1126/science.aad5147.

11. Zhu X, Ye K. Crystal structure of Cmr2 suggests a nucleotide cyclase-related enzyme in type III CRISPR-Cas systems. *FEBS Lett.* 2012; 586, 939–945. doi: 10.1016/j.febslet.2012.02.036.
12. Makarova KS, Aravind L, Wolf YI, Koonin EV. Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR-Cas systems. *Biol. Direct* 2011; 6, 38. doi:10.1186/1745-6150-6-38.
13. Barrangou R, Marraffini LA. CRISPR-Cas systems: prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Mol. Cell.* 2014; 54, 234–244. doi:10.1016/j.molcel.2014.03.011.
14. Shmakov S et al. Discovery and functional characterization of diverse class 2 CRISPR-Cas systems. *Mol. Cell* 2015; 60, 385–397. doi:10.1016/j.molcel.2015.10.008.
15. Makarova KS, Grishin NV, Shabalina SA, Wolf YI, Koonin EV. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNA and hypothetical mechanisms of action. *Biol. Direct* 2006; 1, 7. doi:10.1186/1745-6150-1-7.
16. Reeks J, Naismith JH, White MF. CRISPR interference: a structural perspective. *Biochem. J.* 2015; 453, 155–166. doi:10.1042/BJ20130316.
17. Carte J, Pfister NT, Compton MM, Terns RM, Terns MP. Binding and cleavage of CRISPR RNA by Cas6. *RNA* 2010; 16, 2181–2188. doi:10.1261/rna.2230110.
18. Makarova KS, Anantharaman V, Grishin NV, Koonin EV, Aravind L. CARF and WYL domains: ligand binding regulators of prokaryotic defense systems. *Front. Genet.* 2014; 5, 102. doi:10.3389/fgene.2014.0010.
19. Kazlauskienė M, Kostiuk G, Venclovas C, Tamulaitis G, Siksnyš V. A cyclic oligonucleotide signaling pathway in type III CRISPR-Cas systems. *Science* 2017; 357, 605–609. (doi:10.1126/science.aao0100)
20. Shmakov S et al. Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 2017; 15, 169–182. doi:10.1038/nrmicro.2016.184.
21. Shmakov S et al. Discovery and functional characterization of diverse class 2 CRISPR-Cas systems. *Mol. Cell* 2015; 60, 385–397. doi:10.1016/j.molcel.2015.10.008.
22. Lewis KM, Ke A. Building the class 2 CRISPR-Cas arsenal. *Mol. Cell* 2017; 65, 377–379. doi:10.1016/j.molcel.2017.01.024.
23. Bao W, Jurka J. Homologues of bacterial TnpB\_IS605 are widespread in diverse eukaryotic transposable elements. *Mob. DNA* 4, 12. 2013; doi:10.1186/1759-8753-4-12.
24. Xuan L, Surui W, Jiao X, Chun S, Jianhe W. Application of CRISPR/Cas9 in plant biology. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 2017; 7 (3):292–302.
25. Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology.* 2005; 151:653–63.
26. Guo M, Chen H, Dong S, Zhang Z and Luo H. CRISPR-Cas gene editing technology and its application prospect in medicinal plants. *Chinese Medicine* (2022) 17:33
27. Ran FA, Hsu PD, Lin C-Y, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell.* 2013; 154:1380–9.
28. Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell.* 2021; 184:844.
29. Gilbert LA, Horlbeck MA, Adamson B, Villalta JE, Chen Y, Whitehead EH, et al. Genome-scale CRISPR-mediated control of gene repression and activation. *Cell.* 2014; 159:647–61.
30. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 2012; 337:816–21.