

BÖLÜM 15

CRISPR-CAS SİSTEMİ: TIBBİ MİKROBİYOLOJİDE KULLANIMI



Alpaslan ALP¹

Canlıların genomu üzerinde değişiklikler yaparak fenotipik özelliklerini değiştirebilme fikri, uzun yıllardan beri bilim dünyasının ilgisini çekmiştir. Gen mühendisliği başlığı altında toplanabilecek birçok çalışmada, bu amaç doğrultusunda farklı moleküller yöntemler kullanılarak çok sayıda çalışma gerçekleştirilmiştir¹.

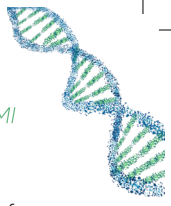
CRISPR-Cas [CRISPR (**clustered regularly interspaced short palindromic repeats**)-Cas (CRISPR-associated protein)] sistemi keşfinin temeli 1987 yılında, Ishino ve arkadaşlarının² *Escherichia coli* "iap" (*isozyme conversion of alkaline phosphatase*) geninin nükleotit dizilimini araştırdıkları çalışmada atılmıştır. Bu çalışma sonucunda araştırmacılar ilgili genin dizilimi ve fonksiyonu ile ilgili önemli veriler elde etmişlerdir. Yayınladıkları makalenin son paragrafında, ortaya çıkardıkları gen dizisinde alışılmadık dışında belirli aralıklarla tekrarlayan nükleotit dizileri bulunduğunu belirtmiş, ancak bu dizilerin biyolojik önemini bilmediğini vurgulamışlardır. Aslında farkında olmadan keşfettikleri, anlamını ve önemini bilmedikleri tek-

rarlayan bu dizilere daha sonraları CRISPR (Düzenli Aralıklarla Dizilmiş Kısa Palindromik Tekrarlar) ismi verilmiştir. İlerleyen yıllar içinde, CRISPR'ları ayıran ayırıcı dizilerin (spacer) bazı yabancı plazmit ve bakteriyofaj dizilerine homolog olduğu gösterilmiştir³.

CRISPR-Cas Sisteminin Çalışma Prensipleri

Bakterilerde yaygın olarak bulunan CRISPR-Cas sistemi, bakterileri bakteriyofaj ve virüslerden koruyan bir tür kazanılmış immünitedir. Öncelikle bakteri hücresi içerisine giren invaziv elementlerin belirli kısa genom dizilerinin bakteri genomuna insersiyonu gerçekleştirilir. Böylece invaziv elementin daha sonraki girişlerinde tanınmasını sağlayacak olan bilgi 'hafızaya' alınmış olur. Aynı invaziv elementin bakteri hücresine bir kez daha girmesi durumunda, bu 'enfeksiyon etkeninin' hafızaya alınmış bilgiler kullanılarak tanınması ve parçalanarak ortadan kaldırılmasıyla bakterinin korunması sağlanmış olur.

¹ Doç.Dr. Alpaslan Alp, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD., aalp@hacettepe.edu.tr



Sonuç olarak CRISPR-Cas temelli tanı testlerinin rutin günlük kullanıma girebilmesi için, Dünya Sağlık Örgütü tarafından belirtilen ve ideal bir hasta başı testte bulunması gereken kriterleri sağlaması gerekmektedir. Bu kriterlere göre ideal bir hasta başı test ucuz, kullanımını kolay, duyarlılık ve özgüllüğü yüksek olmalı, hızlı sonuç verebilmeli, cihaz gerektirmemeli ve ihtiyaç duyulan kesimlere kolaylıkla sunulabilmelidir ¹⁹. Test, hasta başı testi uygulayan sağlık çalışanının fazla müdahalesi gerekmeden, hızlı bir şekilde sonuçlandırılabilir. Kullanılan tüm reaktifler uzun süre saklanmaya uygun olmalıdır. Sonuçların okunması için cihaz gereksinimi duyulması durumunda, bu cihazlar kolay taşınabilir özellikte olmalı ve tek kullanımlık sarf malzemeleri ile çalışabilmelidir. Devam etmekte olan çalışmalarda tüm bu güçlüklerin ne oranda aşılabileceği, CRISPR-Cas sistemini temel alan hızlı mikrobiyolojik tanı testlerinin yakın gelecekteki kullanımı konusunda belirleyici olacaktır.

Kaynaklar

1. Javed MR, Sadaf M, Ahmed T, Jamil A, Nawaz M, Abbas H, et al. CRISPR-Cas system: History and prospects as a genome editing tool in microorganisms. *Current Microbiol* 2018;75: 1675-1683.
2. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isoenzyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol* 1987;169: 5429-5433.
3. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 2007;315(5819): 1709-1712.
4. Chen JS, Doudna JA. The chemistry of Cas9 and its CRISPR colleagues. *Nat Rev Chem* 2017;1: 0078.
5. Mali P, Esvelt KM, Church GM. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat Methods* 2013;10: 957-963.
6. 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: 816-821.
7. Chaudhary K, Chattopadhyay A, Pratap D. The evolution of CRISPR/Cas9 and their cousins: hope or hype? *Biotechnol Lett* 2018;40: 465-477.
8. Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, Essletzbichler P, Dy AJ, Joung J, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science* 2017;356(6336): 438-442.
9. Katzmeier F, Aufinger L, Dupin A, Quintero J, Lenz M, Bauer L, et al. A low-cost fluorescence reader for in vitro transcription and nucleic acid detection with Cas13a. *PLoS ONE* 2019;14(12): e0220091.
10. Caliendo AM, Hodinka RL. A CRISPR way to diagnose infectious diseases. *New Engl J Med* 2017;377: 1685-1687.
11. Bhardwaj P, Kant R, Behera SP, Dwivedi GR, Singh R. Next-generation diagnostic with CRISPR/Cas: beyond nucleic acid detection. *Int J Mol Sci* 2022;23: 6052.
12. Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Kellner MJ, Joung J, Collins JJ, Zhang F. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *Science* 2018;360: 439-444.
13. Chen JS, Ma E, Harrington LB, Da Costa M, Tian X, Palefsky JM, et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science* 2018;360: 436-439.
14. Chu H, Liu C, Liu J, Yang J, Li Y, Zhang X. Recent advances and challenges of biosensing in point-of-care molecular diagnosis. *Sensors and Actuators: B. Chemical* 2021;348: 130708.
15. Nguyen HQ, Nguyen VD, Nguyen HV, Seo TS. Quantification of colorimetric isothermal amplification on the smartphone and its opensource app for pointofcare pathogen detection. *Sci Rep* 2020;10: 15123.
16. Nunez-Bajo E, Collins ASP, Kasimatis M, Cotur Y, Asfour T, Tanriverdi U, et al. Disposable silicon-based all-in-one micro-qPCR for rapid on-site detection of pathogens. *Nat Commun* 2020;11: 6176.
17. van Dongen JE, Berendsen JTW, Steenbergen RDM, Wolthuis RMF, Eijkel JCT, Segerink LI. Point-of-care CRISPR/Cas nucleic acid detection: Recent advances, challenges and opportunities. *Biosens Bioelectron* 2020;166: 112445.
18. Li L, Shen G, Wu M, Jiang J, Xia Q, Lin P. CRISPR-Cas-mediated diagnostics. *Trends Biotechnol* 2022;17: S0167.
19. Drain PK, Hyle EP, Noubary F, Freedberg KA, Wilson D, Bishai W, et al. Evaluating diagnostic point-of-care tests in resource-limited settings. *Lancet Infect Dis* 2014;14: 239-249.