

## BÖLÜM 16

# ENFEKSİYON HASTALIKLARINDA SON GELİŞMELER: CRISPR/CAS9 UYGULAMALARI

Ali ÜÇKAYABAŞI<sup>1</sup>  
Halil İbrahim ÖKSÜZ<sup>2</sup>  
Hale ÖKSÜZ<sup>3</sup>

### GİRİŞ

Yıllar boyunca, düzenli aralıklarla bölünmüş palindromik tekrar kümeleri (CRISPR)-ilişkili protein 9 (Cas9), çinko-parmak nükleazları (ZFN), homing nükleazlar (HN) ve transkripsiyon aktivatörü benzeri efektör nükleazlar (TALEN) dahil olmak üzere çeşitli gen düzenleme sistemleri geliştirilmiştir (1,2). Bu tekniklerin kullanımı sayesinde hedef genler mutasyona uğratarak ya da genomdan kesilerek susturulabilmekte, ayrıca genlerde istenilen nükleotidlerin değiştirilmesi de mümkün olabilmektedir (3). Bu yeni teknolojiler hızlı bir şekilde bilimsel gelişmelere öncülük etmektedir (4). İn vivo çalışmaların birçoğunda çeşitli ökaryotlar kullanılırken, son zamanlarda CRISPR/Cas sistemleriyle bakteriyel genlerin fonksiyonlarının anlaşılmasına dair çalışmalar hız kazanmıştır (5). Özellikle, çoklu ilaca dirençli (ÇİD) suşların sayısındaki artış, enfeksiyonların tanı ve tedavisine yönelik daha yenilikçi adımların atılmasını zorunlu kılmıştır. Araştırmacılar CRISPR/Cas sistemlerinin yardımıyla genlerin fonksiyonlarının anlaşılabilir, antimikrobiyaller için yeni potansiyel hedefler bulabileceklerini düşünmektedir (6).

### CRISPR/CAS SİSTEMİNİN TEMEL BİYOLOJİK ÖZELLİKLERİ

İlk olarak 1987 yılında Ishino ve ark. (7) tarafından *Esherichia coli* genomunda tanımlan CRISPR, orijini ve fonksiyonu bilinmeyen bir DNA tekrar dizisidir. Prokaryotik organizmalarda bulunan CRISPR/Cas kompleksleri, genetik elementlere karşı direnç sağlamaktadır (8). Cas proteinlerinin içeriğine ve amino asit dizilerine göre, CRISPR/Cas sistemleri yapay olarak tip I, tip II ve tip III olmak üzere üç gruba ayrılmıştır (9,10). Yakın zamana kadar, bakteri genomlarında

<sup>1</sup> Dr. Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD., Adana. ckybsiali@gmail.com

<sup>2</sup> Doktora Öğrencisi, Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik AD., Adana, haliloksuz@gmail.com

<sup>3</sup> Doktora Öğrencisi, Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD., Adana, haleoksuz\_90@hotmail.com

da üç farklı grup CRISPR/Cas sistemi (tip IV-VI) tanımlanmıştır; bunlardan hem tip II hem de tip V CRISPR/Cas sistemleri, yalnızca tek bir alt birim RNA efektöründen oluşan (Cas9 ve Cas12) benzer sistemlerdir (11,12). Yaygın olarak CRISPR/Cas9 olarak bilinen tip II CRISPR/Cas sistemi, endonükleaz Cas9, iki küçük rehber RNA (gRNA'lar ve CRISPR RNA (crRNA) ve transaktive olabilen CRISPR RNA'dan (tracrRNA) oluşan bir komplekstir ve yaygın olarak genom düzenlenmesi için kullanılmaktadır (13-16). Hücre genom düzenlenmesinin başarılı bir şekilde gerçekleşebilmesi için Cas9 ekspresyonunun optimizasyonuna ve eşleşebilen gRNA tasarımına ihtiyaç duyulmaktadır.

Doğal CRISPR/Cas9 sistemleri, çeşitli yapısal özelliklere sahiptir (17,18). *Streptococcus pyogenes* Cas9 (SpCas9) ve *Staphylococcus aureus* (SaCas9) varyantları araştırma amacıyla yaygın olarak kullanılan iki türdür. Ayrıca, farklı bakteri türlerine ait Cas9 nükleazlar, hedef aramak için farklı protospacer-bitişik motif (PAM) dizilerini tanımaktadır; SpCas9, bağlayıcı hedef olarak "NGG" PAM'i kullanırken (19) SaCas9, "NNGRRT" PAM'ı kullanır (20). Son birkaç yılda, basit tasarımlı CRISPR/Cas sistemleri yaşam bilimlerindeki uygulama alanlarını genişleterek hızlı bir şekilde gelişmeye devam etmektedir.

## BAKTERİYEL GEN FONKSİYONLARININ TANIMLANMASI

CRISPR/Cas9 sistemi, bakterilerin hayatta kalması için gereken temel genlerin tanımlanması ve bunların virülans faktörlerinin belirlenmesi için kullanılmıştır (21). Peters ve ark. (21) yapmış oldukları çalışmada, *Bacillus subtilis*'in tüm genom interaksiyonlarının CRISPR aracılı bir yöntem ile ortaya çıkarılabileceği görüşünü literatüre sunmuştur. Bu yaklaşım, diğer patojenik bakterilerin tanısı ve tedavisinde yeni stratejilerinin belirlenmesine yardımcı olabileceği fikrini desteklemektedir (21).

Tao ve ark. (22), *Clostridium difficile* üzerinde CRISPR/Cas9 aracılı genom çapında araştırmalar gerçekleştirmiş ve toksin B (TcdB) reseptörleri olarak işlev gören Wnt reseptörünün kıvrılmış ailesinin (FZD'ler) üyelerini tanımlamışlardır. Toksin B, *Clostridium difficile* enfeksiyonunun birçok semptomundan sorumlu olan önemli bir virülans faktörüdür.

Rousset ve ark. (23) *Esheria coli* izolatu ve yakından ilişkili türler için uygun olan yeni bir CRISPRi platformu tasarlamışlardır. Bu teknik sayesinde, belirli bir cinsin bir alt kümesini hedeflemek için özel tek bir rehber RNA (sgRNA) kütüphanesi tasarlamak mümkün hale gelmiştir. Bu tasarımla, dizili izolatlarda bulunan *Esheria coli* genlerinin %90'ından fazlası hedeflenebilir ve taranabilir hale gelmiştir (23).

Peters ve ark. ise (24) genlerin fenotiplerle ilişkisini açıklayabilecek yöntemlerin eksik olduğunu açıklamışlar, bunun neticesinde de, konjugasyon yoluyla farklı bakterilere genomik entegrasyon ve kolay bir şekilde transfer olabilen “Mobile-CRISPRi” adını verdikleri bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntem katalitik olarak inaktif Cas9 proteini (dCas9) ve sgRNA kullanarak gen ekspresyonunu bloke etmek için kullanılmaktadır. Araştırmacılar bu yöntemin etkinliğini antibiyotik direnci ile ilişkili insan patojenlerinde de göstermişlerdir (24).

Zheng ve ark. (25) prokaryotik hücrelerde sitozinin timine dönüşümünü promote etmek için için nikaz Cas9-sitidin deaminaz füzyon proteini kullanmışlardır. Sonuç olarak, *Esheria coli* ve *Brucella melitensis*'te yüksek oranda mutasyon tespit etmişlerdir (25).

CRISPR/Cas9 sistemlerinin mikrobiyolojide kullanılması ile enfeksiyon hastalıklarının patogenezinde yer alan patojen ve konağa ait faktörlerin tanımlanması hedeflenmektedir. Dolayısıyla, bu sistemlerin yakın zamanda enfeksiyon hastalıkları için yeni potansiyel terapötikler olarak kullanılabilceği düşünülmektedir.

## CRISPR/CAS SİSTEMLERİNİN TANIDA KULLANIMI

Enfeksiyon hastalıklarında, erken tanı ve doğru tedavi stratejileri büyük önem arz etmektedir. Özellikle yapılan birkaç çalışmada tanı amaçlı CRISPR/Cas sistemleri kullanılmıştır. Pardee ve ark. (26) in vitro olarak gerçekleştirdikleri çalışmada, bir makak modelinde Zika virüs suşlarını ayırt etmek için CRISPR-Cas9 ile nükleik asit temelli bir amplifikasyon yönteminin kombinasyonunu kullanmışlardır (26).

Müller ve ark. (27) da bakterilerdeki antibiyotik direnç genlerinin tanımlanması amacıyla bir optik DNA haritalaması ile birlikte CRISPR-Cas9 kombinasyonunu kullanmışlardır. Bu çalışmada gRNA-Cas9 kompleksi, direnç genlerinin barındıran plazmitlerin nükleik asitlerinin spesifik bir dizisine bağlanır ve bu bölgeden keser. Daha sonra, bir floresan boya olan YOYO-1 ve bir antimikrobiyal olan netropsin, DNA üzerinde adenin-timin açısından zengin bölgeye bağlanır ve her bir DNA fragmanında benzersiz bir emisyonuna yol açar. Bu çalışma, araştırmacıların, genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL), karbapenemazlar ve Yeni Delhi metallo- $\beta$  laktamaz (NDM)-1 (27) gibi antimikrobiyallere direnç kazandıran farklı direnç enzimleri üreten plazmitlerin tanımlanmasına yardımcı olmuştur.

Kellner ve ark. (28) “spesifik yüksek hassasiyetli enzimatik raportör kilit açıcı” (SHERLOCK) olarak adlandırdıkları, istenen DNA veya RNA dizilerinin tanınması için CRISPR/Cas enzimolojisi ile nükleik asit ön amplifikasyonunu kullanan yeni bir CRISPR tabanlı tanı platformu oluşturmuşlardır. Bu platform

DNA veya RNA'nın rekombinaz aracılı polimeraz ön amplifikasyonunu gerçekleştirir ve ardından floresans ve kolorimetrik okumalar aracılığıyla Cas13 - veya Cas12 - proteinlerini tespit eder. Çalışmanın raporuna, göre bu tespit yönteminin sensitivitesinin %100'e yakın olduğu ve 15 dakikadan daha kısa sürede sonuç verdiği gösterilmiştir (28).

## **TERAPÖTİK YAKLAŞIMLAR**

### **Bakteri direncine karşı mücadele etmek için CRISPR/Cas sistemlerinden yararlanılması**

Antibiyotik direnci, mevcut antibiyotik eksikliği ile daha da kötüye giden, zamanımızın en büyük halk sağlığı tehditlerinden biridir. Yeni yaklaşımlar geliştirilmediği takdirde 2050 yılına kadar antimikrobiyal direncin 10 milyon ölüme yol açacağı ve 100 trilyon dolara mal olacağı tahmin edilmektedir (29). Antimikrobiyal direnç zamanla doğal olarak gelişir. Genellikle genetik değişimler bu sürece yardımcı olur. Antimikrobiyal direncin ortaya çıkışını hızlandıran genellikle antibiyotiğin aşırı veya uygunsuz kullanımınıdır. Hijyen eksikliği, zayıf enfeksiyon ve hastalık önleme gibi diğer durumlar da antibiyotik direncine yol açabilen çeşitli komplikasyonlara neden olur. Antibiyotik dışa atım pompaları (effluxlar), bir ilaç hedefinin modifikasyonu, bir ilacın değiştirilmesi, inaktivasyonu ve hatta bir ilacın alımının sınırlandırılması gibi birçok mekanizma antimikrobiyal dirence neden olabilir (30).

Bakteriler, toksik bileşikleri dışarı pompalayarak ve hücrenin iç ortamını düzenleyerek bir hücredeki antibiyotik konsantrasyonunu azaltır (31). Bir ilaç hedef mekanizmasının modifikasyonu, bakteriler hedef bölgelerini değiştirir, böylece ilaç zayıf bağlanır veya hiç bağlanmaz (32). Çoğu zaman, bu değişiklikler gendeki nokta mutasyonları sonucunda gerçekleşir. Diğer bir mekanizma ise, ilaç inaktivasyonu veya modifikasyonudur. Bakteriler hücre zarı porin kanallarının geçirgenliğini azaltacak şekilde değiştirir. Bu mekanizmada kloramfenikol asetil-transferazlar,  $\beta$ -laktamazlar ve aminoglikozit modifiye edici enzimler rol oynar (33,34).

Biyomühendislik ürünü sentetik peptitler, tasarlanmış bakteriyofajlar ve nano-antibiyotikler (nanopartiküller gibi sentezlenmiş virüs) gibi, büyüme destekleyicileri olarak kullanılan bileşiklerin, antibiyotiğe dirençli bakterilerle savaşmak için kullanılabilmesi öne sürülmüştür, ancak bu yöntemlerin geliştirilmesi zaman alacaktır. CRISPR/Cas9 sistemlerinin de bu amaçla kullanılabilmesi düşünülmektedir. Bu yöntemin diğerlerine üstünlüğü hassasiyetinin oldukça yüksek olmasıdır. CRISPR/Cas sisteminde spesifik bir

hedef genle eşleşen bir sgRNA'nın programlanmasıyla, bakteriler seçici olarak ortadan kaldırılır (35).

CRISPR/Cas9 sistemi, ilk kez 2014 yılında antibiyotiğe dirençli suşlara karşı kullanılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda mühendislik ürünü olan CRISPR/Cas9 sisteminin hücre ölümünü veya plazmit kaybını indüklediği gösterilmiş, antibiyotik direnci veya virülansla ilişkili genetik sekanslar tespit edilmiştir (36,37). Citorik ve ark. (37) *Streptococcus pyogenes*'de tanımlanmış olduğu tip II CRISPR/Cas sistemini bilim dünyasıyla buluşturmuştur. Araştırmalar ise, tip I CRISPR/Cas sistemlerinin, tip II CRISPR/Cas sistemlerine göre ekzonükleaz aktivitesinin bir sonucu olarak DNA hasarını ve hücre ölümünü indükleme de daha verimli olduğunu göstermiştir. Pek çok bakteri türü için tip II CRISPR/Cas sistemleri kullanılabilir durumdadır. Ancak, bu yöntem bakteri popülasyonunu tamamen ortadan kaldırmamaktadır (4).

Bikard ve ark. (36) virülen *Staphylococcus aureus* suşlarında direnci tespit etmek için CRISPR-Cas9 ile kodlanmış FNM1 fajını kullanmışlardır. Çalışmanın sonucunda, karışık kültürlerde *mecA* genini taşıyan *Staphylococcus aureus* suşlarının sayısında bir azalma tespit etmişlerdir. Deri enfeksiyonu olan bir fare modeliyle gerçekleştirilen başka bir çalışmada, faj kodlu bir CRISPR/Cas9 sistemi ile tedaviden önce ve sonra bakteri kolonizasyonu karşılaştırılmıştır. Tedavi sonrasında bakteri kolonizasyonunda önemli bir azalma tespit edilmiştir (36).

### **Bakteriyel gen ekspresyonunun düzenlenmesinde dCas9 enziminin kullanımı**

Gen transkripsiyonunun düzenlenmesi, CRISPR/Cas sisteminin diğer bir uygulamasıdır. Hedef DNA dizisine bağlanıp onun tanımlanmasına yardımcı olan deaktive Cas9 enzimi (dCas9) sayesinde bilim adamları gen transkripsiyonunu aşağı veya yukarı yönde düzenleyebilmektedirler. dCas9 gen baskılanması için kullanıldığında buna CRISPR interferansı (CRISPRi) denir, genlerin aktivasyonu için kullanıldığında ise CRISPR aktivasyonu (CRISPRa) adını almaktadır (4,38). Bu uygulamada, tipik DNA bölünmesi yerine, dCas9 enzimi hedef DNA sekansına bağlanır ve RNA polimeraz veya transkripsiyon faktörünün bağlanmasını engelleyebilir (39,40). Gilbert ve ark. (41) bir kolera-difteri toksinin duyarlılığı araştırmak için bu yöntemi kullanmıştır.

### **CRISPR/Cas sisteminin antimikrobiyal etkinliği**

CRISPR-Cas sistemini antimikrobiyallere uygulamanın en büyük zorluklarından biri, eksojen DNA'yı belirli bakterilere aktarabilen vektörlerin geliştirilmesidir. CRISPR/Cas sisteminin uygulanması çeşitli tekniklerle gerçekleşebilir. Polimerden türetilmiş CRISPR nanoparçacıkları, konjugatif plazmitler ve fajlar bu

tekniklerden bazılarıdır (42). Fajlar bakteri yüzeyindeki reseptörlere bağlanır ve genomlarını sitoplazmaya enjekte eder. CRISPR/Cas sisteminin antimikrobiyaller için uygulamasında çeşitli faj vektörleri kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda CRISPR/Cas9 sistemi, fajmitler kullanılarak *Esheria coli* veya *Staphylococcus aureus* gibi farklı bakteri modellerine uygulanmıştır (36,37). Bununla birlikte, fajmidlerin kullanılmasındaki problem, viral vektörün oluşturulmasında yardımcı fajlara ihtiyaç duyulmasıdır. Virülen veya ılıman fajlar ise, diğer fajlara kıyasla geliştirilmiş bakterisit özellikleri nedeniyle bu çalışmalarda kullanılmıştır (43,44). CRISPR/Cas sistemlerinin in vitro çalışmalarda antimikrobiyaller olarak etkili olabileceği düşünülse de, daha fazla klinik deneye ihtiyaç duyulmaktadır. Bununla birlikte fajlar ile memeli organizmalar arasındaki etkileşimler (örn. bağışıklık sistemi) veya faj tedavisinin etkinliği gibi çeşitli sorunlar hala devam etmektedir (45).

### **CRISPR/Cas sisteminin parazitoloji alanında kullanılması**

Dünya sağlık örgütünün (WHO) raporuna göre, parazit enfeksiyonları global olarak morbiditenin en önemli nedenlerinden biri olmaya devam etmektedir (46). Aşı eksikliği, ilaçların etkinliğinin düşük olması ve antimikrobiyal direnç parazitoloji alanındaki en büyük problemlerdir. Araştırmacılar, CRISPR gibi yeni sistemlerin parazitoloji alanında çeşitli tedavi seçenekleri sunabileceğini düşünmektedir (47,48).

Geçtiğimiz yıllarda, 150'den fazla parazitin genomunun dizilenmesi için olağanüstü uğraşlar verilmiştir (49). Genom dizileme, genomu parçalara ayırmaya ve fonksiyonunu tanımlamaya yardımcı olurken, CRISPR'in tanımlanması ile, bilim adamları artık genleri manipüle edebilmekte, yeni diziler oluşturabilmektedir. Özellikle de son zamanlarda CRISPR/Cas sistemleri yardımıyla şistozom genomu üzerinde yapılan çalışmalar oldukça ilgi çekicidir (50,51). Araştırmacılar CRISPR/Cas sistemlerinin, paraziter hastalıkların tedavisinde kullanılması için çeşitli çalışmalar yürütmektedir. Bu tedavi yaklaşımında, parazitin ihtiyaç duyduğu konağa ait genler değiştirilebilmekte veya replikasyon için gerekli olan parazitik genler hedef alınabilmektedir (52-54). Genomda seçilen bir lokusta bir çift zincir kırılması (ÇZK) oluşturmak için Cas9 endonükleaz kullanılmaktadır. Cas9 spesifik olarak bir sgRNA'ya bağlanır. ÇZK'nın onarılması için üç yol mevcuttur: 1. doğrulanmış bir kalıp kullanılarak homolog rekombinasyonel onarım, 2. homolog olmayan uç birleştirme, 3. mikro homolog aracılı uç birleştirmedir. CRISPR/Cas9, çok az veya hiç genetik iz bırakmadan DNA'nın delesyonunu, insersiyonunu veya mutasyonunu kolaylaştırır (54).

CRISPR/Cas, *Plasmodium spp.*, *Toxoplasma gondii* ve *Cryptosporidium spp.*

gibi yüksek mortaliteyle ilişkili parazitlerin genomlarının düzenlenmesinde kullanılmıştır. ZFN, *Plasmodium falciparum*'da gen düzenlemede yaygın olarak kullanılsa da, hedefleme yeteneğinin sınırlı olması, maliyetinin yüksek olması, tasarım ve uygulamasının zor olması, bu teknolojinin yaygın olarak kullanılmasını engellemiştir (55). 2014 yılında Ghorbal ve Wagner (56,57), sgRNA ekspresyonu için farklı bir yaklaşım uygulayarak *Plasmodium falciparum* genomunun manipüle edilmesini sağlayan CRISPR/Cas9 tekniğinin uyarlamasını literatüre sunmuşlardır. Benzer şekilde araştırmacılar, CRISPR/Cas9'u kullanarak, *Toxoplasma* suşlarında etkili bir şekilde gen nakavtları oluşturmuşlardır (58-60). Yüksek mortalite ile ilişkili diğer bir parazit olan *Cryptosporidium spp.*, enfekte bireylerde monitörize edilememektedir. Dolayısıyla, araştırmacılar mikroorganizmanın biyolojisini anlayamamış ve yeni tedavi modelleri geliştirememişlerdir. Ayrıca moleküler genetik yöntemlerin eksikliği, mikroorganizmanın kültürünün yapılamaması ve in vivo olarak çalışılabilecek hayvan modellerinin uygun olmaması diğer problemlerdir (61). İlk kez, Vinayak ve ark. (62) *Cryptosporidium parvum* sporozoitlerini transfekte ederek genetik olarak kararlı parazitleri izole etmek için yeni bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu başarı, parazitlerin biyolojisinin anlaşılması, kültür ve yeni tedavi yöntemlerini keşfedilmesi konusundaki gelişmelere öncülük etmektedir.

Yapılan başka bir çalışmada, *Strongyloides stercoralis* ve motilite geni SS-unc-22, CRISPR/Cas9 sisteminin yardımıyla devre dışı bırakılmıştır (63). Janssen ve ark. (64) CRISPR/Cas9 teknolojisi kullanılarak dünya çapında 250 milyondan fazla insanı etkileyen en yaygın cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlardan biri olan *Trichomonas vaginalis*'in, ilaca dirençli gen kasetini değiştirerek iki endojen genini devre dışı bırakmışlardır (64).

CRISPR Cas9 sistemindeki ilerlemeler ve kullanımının hızlı bir şekilde artması ile, daha doğru gen düzenlemeleri oluşturmak mümkün hale gelmiştir. Bununla birlikte, birçok parazitte homolog olmayan uç birleştirme gibi bazı yolların eksik olması, CRISPR'ın genom çapında kullanımını sınırlamaktadır. Öte yandan, parazitlerde DNA çift zincir kırık onarımı gibi mekanizmaların daha iyi anlaşılması, genom çalışmaları için alternatif yolların kullanılmasına yardımcı olabilir.

## SONUÇ

CRISPR/Cas sisteminin geliştirilmesi her alanda yeni denemelere ve uygulamalara olanak sağlamaktadır. Özellikle patojen mikroorganizmaların aktif ve güçlü bağışıklık sistemi elemanlarının yapısal bileşenlerinin tanımlanmasını, derinlemesine analizlerinin yapılmasını mümkün hale getirmiştir. Sonuç



olarak mikrobiyoloji alanında da, hedeflenen bakteri suşlarının seçici olarak çıkarılması, antibiyotik direnç ve virülans genlerini hedeflemesi ile CRISPR-Cas uygulamaları, gelecekte patojenlerle mücadelede kullanılacak yeni yolları keşfetmek için anahtar rol oynayabilir.

## KAYNAKLAR

1. Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 2014;346(6213): 1258096. doi: 10.1126/science.1258096.
2. Li H, Yang Y, Hong W, et al. Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects. *Signal Transduct Target Ther*, 2020;5(1): 1. doi: 10.1038/s41392-019-0089-y.
3. Akbudak MA, Kontbay K. Yeni nesil genom düzenleme teknikleri: ZFN, TALEN, CRISPR'lar ve bitkilerde kullanımı. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 2017;26 (1): 111-126.
4. Trevisan M, Palù G, Barzon L. Genome editing technologies to fight infectious diseases. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2017;15(11): 1001-1013. doi: 10.1080/14787210.2017.1400379.
5. Luo ML, Leenay RT, Beisel CL. Current and future prospects for CRISPR-based tools in bacteria. *Biotechnol Bioeng*, 2016;113(5): 930-943. doi: 10.1002/bit.25851.
6. Greene AC. CRISPR-based antibacterials: transforming bacterial defense into offense. *Trends Biotechnol*, 2018;36(2): 127-130. doi: 10.1016/j.tibtech.2017.10.021.
7. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, et al. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol*, 1987;169(12): 5429-5433. doi: 10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987.
8. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012;337(6096): 816-821. doi: 10.1126/science.1225829.
9. Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature*, 2012;482(7385): 331-338. doi: 10.1038/nature10886.
10. Chylinski K, Makarova KS, Charpentier E, et al. Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res*, 2014;42(10): 6091-6105. doi: 10.1093/nar/gku241.
11. Bayat H, Modarressi MH, Rahimpour A. The conspicuity of CRISPR-Cpf1 system as a significant breakthrough in genome editing. *Curr Microbiol*, 2018;75(1): 107-115. doi: 10.1007/s00284-017-1406-8.
12. Khadempour S, Familghadakhchi S, Motlagh RA, et al. CRISPR-Cas9 in genome editing: Its function and medical applications. *J Cell Physiol*, 2019;234(5): 5751-5761. doi: 10.1002/jcp.27476.
13. Gebre M, Nomburg JL, Gewurz BE. CRISPR-Cas9 genetic analysis of virus-host interactions. *Viruses*, 2018;10(2): 55. doi: 10.3390/v10020055.
14. Saayman S, Ali SA, Morris KV, Weinberg MS. The therapeutic application of CRISPR/Cas9 technologies for HIV. *Expert Opin Biol Ther*. 2015 Jun;15(6):819-30. doi: 10.1517/14712598.2015.1036736.
15. Wright AV, Sternberg SH, Taylor DW, et al. Rational design of a split-Cas9 enzyme complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015;112(10): 2984-2989. doi: 10.1073/pnas.1501698112.
16. Jiang F, Zhou K, Ma L, et al. Structural biology. A Cas9-guide RNA complex preorganized for target DNA recognition. *Science*, 2015;348(6242): 1477-1481. doi: 10.1126/science.aab1452.
17. Ran FA, Hsu PD, Wright J, et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*, 2013;8(11): 2281-2308. doi: 10.1038/nprot.2013.143.
18. Lin H, Li G, Peng X, et al. The Use of CRISPR/Cas9 as a tool to study human infectious viruses. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021;27;11: 590989. doi: 10.3389/fcimb.2021.590989.
19. Lino CA, Harper JC, Carney JP, et al. Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. *Drug Deliv*, 2018;25(1): 1234-1257. doi: 10.1080/10717544.2018.1474964.



20. Xie H, Tang L, He X, et al. SaCas9 requires 5'-NNGRRT-3' PAM for sufficient cleavage and possesses higher cleavage activity than SpCas9 or FnCpf1 in human cells. *Biotechnol J*, 2018;13(4):e1700561. doi: 10.1002/biot.201700561.
21. Peters JM, Colavin A, Shi H, et al. A Comprehensive, CRISPR-based functional analysis of essential genes in bacteria. *Cell*, 2016;165(6): 1493-1506. doi: 10.1016/j.cell.2016.05.003.
22. Tao L, Zhang J, Meraner P, et al. Frizzled proteins are colonic epithelial receptors for *C. difficile* toxin B. *Nature*, 2016;538(7625): 350-355. doi: 10.1038/nature19799.
23. Rousset F, Cabezas-Caballero J, Piastra-Facon F, et al. The impact of genetic diversity on gene essentiality within the *Escherichia coli* species. *Nat Microbiol*, 2021;6(3): 301-312. doi: 10.1038/s41564-020-00839-y.
24. Peters JM, Koo BM, Patino R, et al. Enabling genetic analysis of diverse bacteria with Mobile-CRISPRi. *Nat Microbiol*, 2019;4(2): 244-250. doi: 10.1038/s41564-018-0327-z.
25. Zheng K, Wang Y, Li N, et al. Highly efficient base editing in bacteria using a Cas9-cytidine deaminase fusion. *Commun Biol*, 2018;1: 32. doi: 10.1038/s42003-018-0035-5.
26. Pardee K, Green AA, Takahashi MK, et al. Rapid, low-cost detection of Zika Virus using programmable biomolecular components. *Cell*, 2016;165(5): 1255-1266. doi: 10.1016/j.cell.2016.04.059.
27. Müller V, Rajer F, Frykholm K, et al. Direct identification of antibiotic resistance genes on single plasmid molecules using CRISPR/Cas9 in combination with optical DNA mapping. *Sci Rep*, 2016;6: 37938. doi: 10.1038/srep37938.
28. Kellner MJ, Koob JG, Gootenberg JS, et al. SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases. *Nat Protoc*, 2019;14(10): 2986-3012. doi: 10.1038/s41596-019-0210-2.
29. de la Fuente-Núñez C, Lu TK. CRISPR-Cas9 technology: applications in genome engineering, development of sequence-specific antimicrobials, and future prospects. *Integr Biol (Camb)*, 2017;9(2): 109-122. doi: 10.1039/c6ib00140h.
30. Shukla A, Jani N, Polra M, et al. CRISPR: The multidrug resistance endgame? *Mol Biotechnol*, 2021;63(8): 676-685. doi: 10.1007/s12033-021-00340-9.
31. Livermore DM. Linezolid in vitro: mechanism and antibacterial spectrum. *J Antimicrob Chemother*, 2003;51Suppl2: 9-16. doi: 10.1093/jac/dkg249.
32. Peterson E, Kaur P. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens. *Front Microbiol*, 2018;9: 2928. doi: 10.3389/fmicb.2018.02928.
33. Kapoor G, Saigal S, Elongavan A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol*, 2017;33(3): 300-305. doi: 10.4103/joacp.JOACP\_349\_15.
34. Reygaert WC. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol*, 2018;4(3): 482-501. doi: 10.3934/microbiol.2018.3.482.
35. Gomaa AA, Klumpe HE, Luo ML, et al. Programmable removal of bacterial strains by use of genome-targeting CRISPR-Cas systems. *mBio*, 2014;5(1): e00928-13. doi: 10.1128/mBio.00928-13.
36. Bikard D, Euler CW, Jiang W, et al. Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials. *Nat Biotechnol*, 2014;32(11): 1146-1150. doi: 10.1038/nbt.3043.
37. Citorik RJ, Mimee M, Lu TK. Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases. *Nat Biotechnol*, 2014;32(11): 1141-1145. doi: 10.1038/nbt.3011.
38. Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 2013;152(5): 1173-1183. doi: 10.1016/j.cell.2013.02.022.
39. Strich JR, Chertow DS. CRISPR-Cas biology and its application to infectious diseases. *J Clin Microbiol*, 2019;57(4): e01307-18. doi: 10.1128/JCM.01307-18.
40. Shalem O, Sanjana NE, Zhang F. High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9. *Nat Rev Genet*, 2015;16(5): 299-311. doi: 10.1038/nrg3899.
41. Gilbert LA, Horlbeck MA, Adamson B, et al. Genome-scale CRISPR-mediated control of gene repression and activation. *Cell*, 2014; 159(3): 647-661. doi: 10.1016/j.cell.2014.09.029.

42. Rodrigues M, McBride SW, Hullahalli K, et al. Conjugative delivery of CRISPR-Cas9 for the selective depletion of antibiotic-resistant Enterococci. *Antimicrob Agents Chemother*, 2019;63(11): e01454-19. doi: 10.1128/AAC.01454-19.
43. Krom RJ, Bhargava P, Lobritz MA, et. Engineered phagemids for nonlytic, targeted antibacterial therapies. *Nano Lett*, 2015;15(7): 4808-4813. doi: 10.1021/acs.nanolett.5b01943.
44. Samson JE, Magadán AH, Sabri M, et al. Revenge of the phages: defeating bacterial defences. *Nat Rev Microbiol*, 2013;11(10): 675-687. doi: 10.1038/nrmicro3096.
45. Fage C, Lemire N, Moineau S. Delivery of CRISPR-Cas systems using phage-based vectors. *Curr Opin Biotechnol*, 2021;68: 174-180. doi: 10.1016/j.copbio.2020.11.012.
46. Torgerson PR, Devleesschauwer B, Praet N, et al. World Health Organization estimates of the global and regional disease burden of 11 foodborne parasitic diseases, 2010: A data synthesis. *PLoS Med*, 2015;12(12): e1001920. doi: 10.1371/journal.pmed.1001920.
47. Hewitson JP, Maizels RM. Vaccination against helminth parasite infections. *Expert Rev Vaccines*, 2014;13(4): 473-487. doi: 10.1586/14760584.2014.893195.
48. McVeigh P, Maule AG. Can CRISPR help in the fight against parasitic worms? *Elife*, 2019;8: e44382. doi: 10.7554/eLife.44382.
49. Howe KL, Bolt BJ, Shafie M, et al ParaSite – a comprehensive resource for helminth genomics. *Mol Biochem Parasitol*, 2017;215: 2-10. doi: 10.1016/j.molbiopara.2016.11.005.
50. Beckmann S, Grevelding CG. Paving the way for transgenic schistosomes. *Parasitology*, 2012;139(5): 651-668. doi: 10.1017/S0031182011001466.
51. Dalzell JJ, Warnock ND, McVeigh P, et al. Considering RNAi experimental design in parasitic helminths. *Parasitology*, 2012;139(5): 589-604. doi: 10.1017/S0031182011001946.
52. Kirti A, Sharma M, Rani K, et al. CRISPRing protozoan parasites to better understand the biology of diseases. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2021;180: 21-68. doi: 10.1016/bs.pmbts.2021.01.004.
53. Serajian S, Ahmadpour E, Oliveira SMR, et al. CRISPR-Cas technology: emerging applications in clinical microbiology and Infectious diseases. *Pharmaceuticals*, 2021;14(11): 1171. doi: 10.3390/ph14111171.
54. Bryant JM, Baumgarten S, Glover L, et al. CRISPR in parasitology: not exactly cut and dried! *Trends Parasitol*, 2019;35(6): 409-422. doi: 10.1016/j.pt.2019.03.004.
55. Singer M, Marshall J, Heiss K, et al. Zinc finger nuclease-based double-strand breaks attenuate malaria parasites and reveal rare microhomology-mediated end joining. *Genome Biol*, 2015;16: 249. doi: 10.1186/s13059-015-0811-1.
56. Ghorbal M, Gorman M, Macpherson CR, et al. Genome editing in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Biotechnol*, 2014;32(8): 819-821. doi: 10.1038/nbt.2925.
57. Wagner JC, Platt RJ, Goldfless SJ, et al. Efficient CRISPR-Cas9-mediated genome editing in *Plasmodium falciparum*. *Nat Methods*, 2014;11(9): 915-918. doi: 10.1038/nmeth.3063.
58. Shen B, Brown KM, Lee TD, et al. Efficient gene disruption in diverse strains of *Toxoplasma gondii* using CRISPR/CAS9. *mBio*, 2014;5(3): e01114-14. doi: 10.1128/mBio.01114-14.
59. Sidik SM, Hackett CG, Tran F, et al. Efficient genome engineering of *Toxoplasma gondii* using CRISPR/Cas9. *PLoS One*, 2014;9(6): e100450. doi: 10.1371/journal.pone.0100450.
60. Wang JL, Huang SY, Li TT, et al. Evaluation of the basic functions of six calcium-dependent protein kinases in *Toxoplasma gondii* using CRISPR-Cas9 system. *Parasitol Res*, 2016;115(2): 697-702. doi: 10.1007/s00436-015-4791-6.
61. Striepen B. Parasitic infections: Time to tackle cryptosporidiosis. *Nature*, 2013;503(7475): 189-191. doi: 10.1038/503189a.
62. Vinayak S, Pawlowic MC, Sateriale A, et al. Genetic modification of the diarrhoeal pathogen *Cryptosporidium parvum*. *Nature*, 2015;523(7561): 477-480. doi: 10.1038/nature14651.
63. Gang SS, Castelletto ML, Bryant AS, et al. Targeted mutagenesis in a human-parasitic nematode. *PLoS Pathog*, 2017;13(10): e1006675. doi: 10.1371/journal.ppat.1006675.
64. Janssen BD, Chen YP, Molgora BM, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene modification and gene knock out in the human-infective parasite *Trichomonas vaginalis*. *Sci Rep*, 2018;8(1): 270. doi: 10.1038/s41598-017-18442-3.