

Bölüm 12

CRISPR-CAS SİSTEMİ VE GÜNCEL MİKROBİYOLOJİDEKİ KULLANIM ALANLARI

Melda MERAL ÖCAL¹

GİRİŞ

Düzenli aralıklarla bölünmüş kısa palindromik tekrar kümeleri (CRISPR) ile ilişkili sistemler (Cas), bakteri ve arkelerin fajlar ve plazmitler gibi mobil genetik elementlere (MGE) karşı bir savunma mekanizması olarak hizmet eder ve prokaryot canlıların kazanılmış bağışıklık sistemini oluşturmaktadır ^(1,2).

Bakteriler, istilacı virüslerden DNA parçacıklarını yakalar ve bunları CRISPR dizileri olarak bilinen DNA segmentleri oluşturmak için kullanırlar. CRISPR dizileri, bakterilerin virüsleri hatırlamasına izin verir. Virüsler tekrar saldırdığında, bakteriler virüslerin DNA'sını hedeflemek için CRISPR dizilerinden RNA segmentleri üretir. Bakteriler daha sonra DNA'yı parçalamak için Cas9 veya benzeri bir enzim kullanır ve bu da istilacı virüsü devre dışı bırakır ⁽³⁾. Prokaryotların bu korunma sistemleri, laboratuvarında benzer şekilde çalıştırılarak kullanılmaktadır. Öncelikle bir genomdaki belirli bir hedef DNA dizisine bağlanan kısa bir kılavuz dizisi olan küçük bir RNA parçası oluşturulmaktadır. Bu kılavuz RNA, Cas9 enzimine de bağlanır. Modifiye edilmiş bu RNA, DNA dizisini tanımak için kullanılır ve Cas9 enzimi DNA'yı hedeflenen yerden keser. Kısacası CRISPR/Cas9 kılavuz bir RNA (gRNA) aracılığıyla özgül bir genomik bölgeye hedeflenen Cas9 nükleazının kullanıldığı bir genom düzenleme sistemidir ⁽⁴⁾. DNA kesildikten sonra, genetik materyal parçalarını eklemek, silmek veya mevcut bir segmentini özelleştirilmiş bir DNA dizisiyle değiştirerek DNA üzerinde değişiklik yapmak için hücrenin kendi DNA onarım yolları kullanılır ⁽⁵⁾.

Günümüzde CRISPR-Cas9 sistemi gen düzenlemelerinde hedeflenen bölgelerin kesilmesi ve genlerin yerleştirilmesine izin veren bir aracın parçasıdır. Genetik makas olarak da tanımlanan bu yöntem, hemen hemen her organizmanın genlerini değiştirme potansiyeline sahiptir. Bu sebeple çok sayıda hastalığa karşı mücadele için verimli gen düzenlemelerinde yaygın olarak uygulanmakta ve bi-

¹ Araş. Gör. Dr., Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, mmeral@cu.edu.tr

rinin kullanımı için standartlaştırılmış yöntemler gerekmektedir ve başarılı olursa gelecekte enfeksiyon hastalıklarının tanı ve tedavisinde CRISPR teknolojinin rutin uygulamaya entegre edilebileceğinin habercisidir.

KAYNAKÇA

1. Rath, D., Amlinger, L., Rath A., et al. The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. *Biochimie*, 2015; 117, 119–28.
2. Hidalgo-Cantabrana, C., Goh, Y. J., Barrangou, R. Characterization and repurposing of type I and type II CRISPR-Cas systems in bacteria. *Journal of Molecular Biology*, 2018; 431 (1), 21-33.
3. Ishino, Y., Krupovic, M., Forterre, P., et al. History of CRISPR-Cas from Encounter with a Mysterious Repeated Sequence to Genome Editing Technology. *J Bacteriol*, 2018; 200 (7), e00580-17.
4. Bozok-Çetintaş, V., Kotmakçı, M., Tezcanlı-Kaymaz, B. Bağışıklık Yanıtından Genom Tasarımına; CRISPR-Cas9 Sistemi. *J Med Sci*, 2017; 37 (1), 27-42. Doi: 10.5336/medsci.2016-54153
5. Hsu, P. D., Lander, E. S., Zhang, F., et al. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 2014; 157 (6), 1262-78.
6. Nobel vakfı (2020). *Basın açıklaması 2020 Nobel Kimya Ödülü* (13.06 2021 tarihinde <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2020/press-release/> adresinden ulaşılmıştır).
7. Taşkın, E., Kutlu, Ö., Kuru C., et al. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats and Its Current Applications In Microbial Diagnosis. *J Biotechnol and Strategic Health Res*, 2019; 3 (3), 54-60.
8. 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, 5429–5433.
9. Gün-Gök, Z., Çağdaş-Tunalı, B. Biology, Mechanism and Applications of CRISPR-Cas Immune System. *International Journal of Engineering Research and Development*, 2016; 8 (2), 11-23.
10. Mojica, F. J., Diez-Villasenor, C., García-Martínez, J., et al. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*, 2009; 155 (3), 733-40. Doi: 10.1099/mic.0.023960-0.
11. Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H. et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 2007; 315, 1709–1712.
12. Burmistrz, M., Krakowski, K., Krawczyk-Balska, A., et al. RNA-Targeting CRISPR-Cas Systems and Their Applications. *Int J Mol Sci*, 2020; 21 (3), 1122. Doi:10.3390/ijms21031122.
13. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012; 337, 816–821.
14. Ding, W., Zhang, Y., Shi, S., et al. Development and Application of CRISPR/Cas in Microbial Biotechnology. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020; 8, 711. Doi: 10.3389/fbioe.2020.00711.
15. Zetsche, B., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O., et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*, 2015; 163, 759–771. Doi: 10.1016/j.cell.2015.09.038.
16. Tang, Y., Fu, Y. Class 2 CRISPR/Cas: an expanding biotechnology toolbox for and beyond genome editing. *Cell Biosci*, 2018; 8, 59. Doi: 10.1186/s13578-018-0255-x.
17. Ran, F. A. Adaptation of CRISPR nucleases for eukaryotic applications. *Anal Biochem*, 2016; 1 (532), 90-94 Doi: 10.1016/j.ab.2016.10.018.
18. Ford, K., McDonald, D., Mali, P. Functional genomics via CRISPR–Cas. *Journal of Molecular Biology*, 2019; 431 (1), 48-65.
19. Newire, E., Aydin, A., Juma, S., et al. Identification of a Type IV-A CRISPR-Cas System Located Exclusively on IncHI1B/IncFIB Plasmids in Enterobacteriaceae. *Front. Microbiol*, 2020; 11, 1-11.
20. Anders, C., Niewoehner, O., Duerst, A., et al. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature*, 2014; 513 (7519), 569-73.

21. Haft, D. H., Selengut, J., Mongodin, E. F., et al. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput Biol*, 2005; 1 (6), e60.
22. Khosravi, S., Ishii, T., Dreissig, S., et al. Application and prospects of CRISPR/Cas9-based methods to trace defined genomic sequences in living and fixed plant cells. *Chromosome Res*, 2020; 28 (1), 7-17.
23. Khanzadi, M. N., Khan, A. A. CRISPR/Cas9: Nature's gift to prokaryotes and an auspicious tool in genome editing. *J. Basic Microbiol*, 2019; 60, 91-102. doi: 10.1002/jobm.201900420.
24. Jiang, F., Doudna, J. A. CRISPR-Cas9 structures and mechanisms. *Annu Rev Biophys*, 2017; 46, 505-529. Doi: 10.1146/annurev-biophys-062215-010822.
25. Barrangou, R., Marraffini, L. A. CRISPR-Cas Systems: Prokaryotes Upgrade to Adaptive Immunity. *Molecular Cell*, 2014; 54, 234- 244,
26. Wood, A. J., Lo, T. W., Zeitler, B., et al. Targeted genome editing across species mouse via use of CRISPR Cas9^o. *Cell Stem Cell*, 2011; 13 (6), 659-662,
27. Strich, J. R., Chertow, D. S. CRISPR Cas biology and its application to infectious diseases. *J Clin Microbiol*, 2019; 57 (4), 307-318.
28. Doerflinger, M., Forsyth, W., Ebert, G., et al. CRISPR/ Cas9: the ultimate weapon to battle infectious diseases? *Cell Microbiol*, 2017; 19 (2), e12693. Doi: 10.1111/cmi.12693.
29. Winter, S. V., Zychlinsky, A., Bardoel, B. W., et al. Genome-wide CRISPR screen reveals novel host factors required for *Staphylococcus aureus* -hemolysin-mediated toxicity. *Sci Rep*, 2016; 6, 24242.
30. Ma, H., Dang, Y., Wu, Y., et al. CRISPR-based screen identifies genes essential for West-Nile-virus-induced cell death. *Cell Rep*, 2015; 12, 673- 683. Doi: 10.1016/j.celrep.2015.06.049.
31. Shi, T. Q., Liu, G. N., Ji, R. Y., et al. CRISPR/Cas9-based genome editing of the filamentous fungi: the state of the art. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017; 101, 7435-7443.
32. Sidik, S. M., Hackett, C. G., Tran, F., et al. Efficient genome engineering of *Toxoplasma gondii* using CRISPR/Cas9. *PLoS One*, 2014; 9, e100450.
33. Uppada, V., Gokara, M., Rasineni, G. K., et al. Diagnosis and therapy with CRISPR advanced CRISPR based tools for point of care diagnostics and early therapies. *Gene*, 2018; 656, 22-9.
34. Pardee, K., Green, A. A., Takahashi, M. K., et al. Rapid, low-cost detection of Zika virus using programmable biomolecular components. *Cell*, 2016; 165, 1255-1266.
35. Muller, 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.
36. Guk, K., Keem, J. O., Hwang, S. G., et al. A facile, rapid and sensitive detection of MRSA using a CRISPR-mediated DNA FISH method, antibody-like dCas9/sgRNA complex. *Biosens Bioelectron*, 2017; 95, 67-71.
37. Zhang, Y., Qian, L., Wei, W., et al. Paired design of dCas9 as a systematic platform for the detection of featured nucleic acid sequences in pathogenic strains. *ACS Synth Biol*, 2017; 6 (2), 211-216.
38. Wang, X., Xiong, E., Tian, T., et al. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/ cas9-mediated lateral flow nucleic acid assay. *ACS Nano*, 2020; 14 (2), 2497-2508.
39. Ai, J-W, Zhou, X., Xu, T., et al. CRISPR-based rapid and ultra-sensitive diagnostic test for *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerging microbes & infections*, 2019; 8 (1), 1361-1369.
40. Bhattacharyya, R. P., Thakku, S. G., Hung, D. T., et al. Harnessing CRISPR effectors for infectious disease diagnostics. *ACS Infect Dis*. 2018; 4 (9), 1278-82.
41. Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Lee, J. W., et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*, 2017; 356, 438 - 442.
42. Kellner, M. J., Koob, J. G., Gootenberg, J. S., et al. SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases. *Nat Protoc*, 2019; 14 (10), 2986-3012.

43. Chen, J. S., Ma, E., Harrington, L. B., et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single stranded DNase activity. *Science*, 2018; 360, 436–439.
44. Broughton, J. P., Deng, X., Yu, G., et al. CRISPR-Cas12-based detection of SARS CoV-2. *Nat Biotechnol*, 2020; 38, 870-874.
45. Myhrvold, C., Freije, C. A., Gootenberg, J. S., et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13. *Science*, 2018; 360, 444–448.
46. Aydin, S., Personne, Y., Newire, E., et al. Presence of type I-F CRISPR/Cas systems is associated with antimicrobial susceptibility in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*, 2017; 72, 2213–2218.
47. Price, V. J., Huo, W., Sharififi, A., et al. CRISPR-Cas and restriction modification act additively against conjugative antibiotic resistance plasmid transfer in *Enterococcus faecalis*. *mSphere*, 2016; 1, e00064
48. Lin, T. L., Pan, Y. J., Hsieh, P. F., et al. Imipenem represses CRISPR-Cas interference of DNA acquisition through H-NS stimulation in *Klebsiella pneumoniae*. *Sci Rep*, 2016; 6, 31644.
49. Citorik, R. J., Mimee, M., Lu, T. K. Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases. *Nat Biotechnol*, 2014; 32, 1141–1145.
50. Yosef, I., Manor, M., Kiro, R., et al. Temperate and lytic bacteriophages programmed to sensitize and kill antibiotic-resistant bacteria. *Proc Natl Acad Sci*, 2015; 112, 7267–7272.
51. Bikard, D., Euler, C. W., Jiang, W., et al. Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials. *Nat Biotechnol*, 2014; 32, 1146-1150.
52. Wang, G., Zhao, N., Berkhout, B., et al. CRISPR-Cas based antiviral strategies against HIV-1. *Virus Res*, 2018; 244, 321–332.
53. Yin, C., Zhang, T., Qu, X., et al. In vivo excision of HIV-1 provirus by saCas9 and multiplex single-guide RNAs in animal models. *Mol Ther*, 2017; 25, 1168 –1186.
54. Van-Diemen, F. R., Kruse, E. M., Hooykaas, M. J., et al. CRISPR/Cas9- mediated genome editing of herpesviruses limits productive and latent infections. *PLoS Pathog*, 2016; 12, e1005701
55. Scott, T., Moyo, B., Nicholson, S., et al. ssAAVs containing cassettes encoding SaCas9 and guides targeting hepatitis B virus inactivate replication of the virus in cultured cells. *Sci Rep*, 2017; 7, 7401.