



# CRISPR-Cas İmmün Sisteminin Biyolojisi, Mekanizması ve Kullanım Alanları

## Biology, Mechanism and Applications of CRISPR-Cas Immune System

Zehra Gün Gök<sup>1</sup>, Beste Çağdaş Tunalı<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Kırıkkale Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, 71450 KIRIKKALE

Başvuru/Received: 28/01/2016

Kabul/Accepted: 13/04/2016

Son Versiyon/Final Version: 15/06/2016

### Öz

Hedeflenmiş nükleazlar genom düzenlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Kısa süre önce, düzenli aralıklarla bölünmüş palindromik tekrar kümeleri (CRISPRs)-ilişkili Cas9 nükleazları genom düzenleme çalışmalarında ilk defa kullanılmış ve o zamandan beri bu alanda devrim yaratmıştır. CRISPR-Cas9 genom düzenleme aracının bu büyük başarısının ardında Cas9'un istenilen DNA lokusuna hedefleyen kılavuz RNA'nın tasarımının basitliği ve CRISPR-Cas9 aracılı DNA kırılmalarının yüksek özgüllük ve verimlilikte olması yatmaktadır. Yakın zamanda yapılan bazı çalışmalarda, *in vivo* hayvan modellerinde ve *ex vivo* somatik ve uyarılmış pluripotent kök hücrelerinde hastalığa neden olan allellerin düzenlenmesinde CRISPR-Cas9 sistemi başarıyla kullanılarak terapötik genom düzenlenmesinin klinik uygulamaları için umutları arttırmıştır. Bu derleme ile bu sistemlerden en çok kullanılan CRISPR-Cas9 Tip II sisteminin diğer sistemlere göre avantaj ve dezavantajları belirtilmiş ve bu sistemler ile yapılan uygulamalara değinilmiştir. Ayrıca bu derlemede, çeşitli araştırma ya da transkripsiyonel uygulamalarda kullanılan ve olağanüstü bir mikrobiyal savunma sisteminden türetilen CRISPR-Cas9'un gelişiminden ve uygulamalarındaki zorluklarından bahsedilmiştir.

### Anahtar Kelimeler

“CRISPR, CRISPR-Cas9 Tip II sistem, genom düzenleme, Cas proteinleri, HDR, NHEJ”

### Abstract

Targeted nucleases are widely used as tools for genome editing. Recently, the clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)-associated Cas9 nuclease was used in the genome editing studies for the first time, and since then has largely revolutionized the field. The great success of the CRISPR/Cas9 genome editing tool is powered by the simple design principle of the guide RNA that aims Cas9 to the target DNA locus, and by the high specificity and efficiency of CRISPR/Cas9-generated DNA breaks. Several studies lately used CRISPR-Cas9 to successfully arrange disease-causing alleles *in vivo* in animal models and *ex vivo* in somatic and induced pluripotent stem cells, increasing hope for therapeutic genome editing in the clinics. In this study, we focus on the CRISPR-Cas9 Type II system, provide specific examples for use of the system, and highlight the advantages and disadvantages of CRISPR versus other techniques. Also in this review, we briefly describe the development and applications of Cas9 which is derived from a remarkable microbial defense system for a variety of research or translational applications while highlighting challenges.

### Key Words

“CRISPR, CRISPR-Cas9 Type II system, genome editing, Cas proteins, HDR, NHEJ”

<sup>1</sup> Beste Çağdaş Tunalı ve Zehra Gün Gök, bu çalışmaya eşit katkıda bulunmuştur.

## 1.GİRİŞ

Bakteriler son derece öldürücü virüsleri dahi içeren yaşanması çok zor çevreler olmak üzere birçok doğal habitatta egemendirler. Bakterilerde reseptör mutasyonu, restriksiyon modifikasyonu gibi çok sayıda doğal bağışıklık benzeri sistemlerinin yanında, son olarak spesifik ve dış kaynaklı genetik elementlere karşı kazanılmış bağışıklığı sağlayan CRISPR-Cas adaptif immün sistemi tanımlanmıştır (Barrangou ve Marraffini, 2014).

Düzenli aralıklarla bölünmüş palindromik tekrar kümeleri (CRISPRs) ve ilişkili genleri (cas), bakteri ve arkelerin nükleik asit tabanlı adaptif bağışıklık sistemlerinin temel bileşenleridir (Wilkinson ve Wiedenheft, 2014). Ayrıca, CRISPR dizileri ve Cas proteinlerinin bağışıklık kazandırmasının yanı sıra farklı mekanizma ile hücre içerisinde, gen regülasyonu ve genom düzenlenmelerinde rollerinin olduğuna dair kanıtlar giderek artmaktadır (Peters vd., 2015). Bu korunmuş tekrar-aralık-tekrar yapıları ilk olarak 1987 yılında *Escherichia coli* genomu içinde gözlenmiştir (Wilkinson ve Wiedenheft, 2014). Bu CRISPR dizileri daha sonra çeşitli bakterilerde ve arkelerde de bulunmuş, ancak bu tekrarların işlevi, 2005 yılına kadar esrarengizliğini korumuş, üç farklı araştırma ekibinin CRISPR bölgesindeki bu aralık sekanslarının bakteriyi daha önce enfekte eden bakteriyofaj (faj) genomları ve plazmidlerdeki diziler ile genellikle aynı olduğunu bildirmesi ile aydınlığa kavuşmuştur. Bu gözlemler, CRISPR'ların virüsler ve diğer genetik parazitlerin neden olduğu enfeksiyona karşı bakteri ve arkeleri korumak için tasarlanmış yeni bir nükleik asit tabanlı bağışıklık sisteminin bir parçası olabileceğini akla getirmiştir. Bu hipotezin uygulaması için Barrangou vd. (2007) *Streptococcus thermophilus*'u farklı fajlarla kültüre almış ve faja dirençli mutantları görüntülemişlerdir. Faja dirençli *S. thermophilus* suşlarının CRISPR bölge DNA'sının sekanslanması ile bu bölgenin bakteriyi enfekte eden faj DNA'sından türetilen yeni aralık kısımları içerdiği gösterilmiş ve bu yeni faj türevli aralık kısımların sayısı faja dirençliliğin derecesi ile orantılı bulunmuştur (Wilkinson ve Wiedenheft, 2014).

Bakteriyel immünitede CRISPR'ın rolünün deneysel olarak kanıtlanmasından sadece 3 yıl sonra, 2010 yılında, CRISPR sistemlerinin temel işlev ve mekanizmaları açıklığa kavuşmaya başlamıştır. Farklı araştırma grupları faja dirençli suşların üretimi ve bakteriyel suşların filogenetik sınıflandırılması gibi çeşitli biyoteknolojik uygulamalar için doğal CRISPR sistemlerinden yararlanmışlardır (Quiberon vd., 2010; Horvath vd., 2008). Ancak genom düzenleme uygulamaları henüz araştırma aşamasındadır (Hsu vd., 2014). Bu zaman zarfında, CRISPR Tip II sisteminin fonksiyonel mekanizmalarını tanımlayan iki çalışmada, genom düzenlenmesi için bu sistemin basitliği ve temel bileşenleri ortaya konmuştur. İlk olarak *Streptococcus thermophilus* ile yapılan genetik çalışmalarla Cas9 (Cas5, Csn1 veya Csx12 olarak adlandırılmış olan)'un cas gen kümeleri içerisinde hedef DNA'nın kesimini sağlayan tek enzim olduğu gösterilmiştir (Garneau vd., 2010), ardından Deltcheva vd. (2011) CRISPR Tip II sistemlerindeki crRNA'ların prosesi ve biyogenezinde anahtar bileşen olan crRNA ile hibridize olan ve Cas9'un RNA hedeflendirmesini kolaylaştıran, kodlayıcı olmayan trans-aktif edici crRNA (tracrRNA)'ları açığa çıkarmışlardır. Cas9 ve endojen RNAaz III ile oluşan bu ikili RNA hibriti CRISPR dizisinin matür crRNA'lara transkripsiyonu prosesi için gereklidir (Deltcheva vd., 2011). Yapılan çalışmalarda, CRISPR Tip II sistemi için gerekli olan en az üç bileşen olduğu bildirilmiştir (Cas9, matür crRNA, tracrRNA).

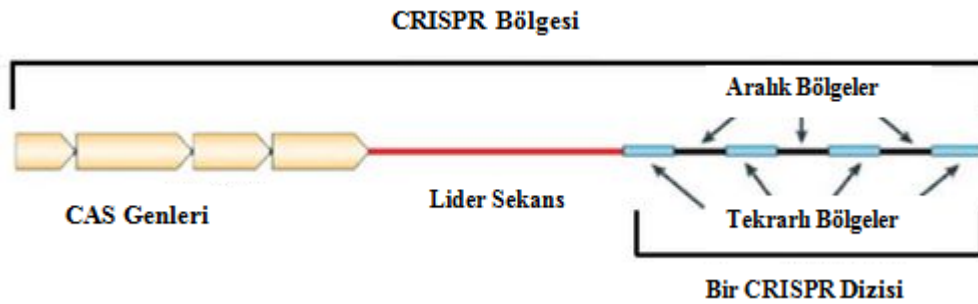
2011 yılında, Sapranaukas vd. (2011) ilk defa tip II CRISPR'ın aktarılabir bir sistem olduğunu göstermiş, böylece tip II CRISPR bölgesinin *Streptococcus thermophilus*'tan *Escherichia coli*'ye transplantasyonu ile CRISPR girişiminin farklı bakteriyel suşlarda yeniden düzenlenebildiği gösterilmiştir. 2012'ye kadar Charpentier, Doudna ve Siksnyis gruplarınca yapılan çalışmalarda biyokimyasal karakterizasyonlar ile gösterilmiştir ki *Streptococcus thermophilus* veya *Streptococcus pyogenes* Cas9'u hedef DNA'nın *in vitro* kesimi için crRNA'lar ile yönlendirilebilmektedir ve alınan sonuçlar daha önceki yapılan bakteriyel çalışmalar ile uyumlu bulunmuştur (Garneau vd., 2010; Deltcheva vd., 2011; Sapranaukas vd., 2011; Jinek vd., 2012; Gasiunas vd., 2012; Hsu vd., 2014).

2013 yılında, iki ayrı çalışmada, memeli hücrelerinde genom düzenlenmesi için *Streptococcus thermophilus* ve *Streptococcus pyogenes*'ten CRISPR sistemlerinin mühendisliği başarıyla gerçekleştirilmiştir. Böylece, CRISPR-Cas9 sistemi genom düzenlemede kullanılmaya başlanmıştır (Cong vd., 2013). Bu çalışmaların ardından, Cas9 tabanlı deneysel model sistemleri çeşitli genom düzenleme uygulamaları için binlerce laboratuvar tarafından kullanılmaya başlanmıştır (Hsu vd., 2014) ve 2013 yılından itibaren 2015 sonlarına kadar Science veri tabanında konu ile ilgili 1400'den fazla çalışma yayınlanmıştır (Quetier, 2015). CRISPR RNA hedefli nükleazların keşfinden önce, protein mühendisliği kapsamında genom düzenleme için çinko parmak nükleazlar (ZFNs), transkripsiyon aktivatörü benzeri efektör nükleazlar (TALENs) ya da özgülümlü meganükleazlar yaygın olarak kullanılmıştır (Wilkinson ve Wiedenheft, 2014). Bu yapay füzyon proteinleri, DNA bağlanma bölgesinin restriksiyon enzimi FokI'in spesifik olmayan nükleaz bölgesi ile birleştirilmesi sonucu oluşturulmuş ve genom düzenleme için

bitkiler de dahil birçok farklı organizmada başarıyla kullanılmışlardır (Bortesi ve Fischer, 2015). Ancak, pahalı protein mühendisliği teknikleri ile üretilen enzimlerin bazen hedef olmayan sekansları da kesmesi, hedef dışı etkilerin gözlenmesine ve toksik etkilere neden olmaktadır. Önceden var olan teknolojilerin aksine, CRISPR RNA-hedefli nükleazlar sofistike protein mühendisliğine ihtiyaç duymadan basit Watson-Crick baz eşleşmesi kurallarına dayanmaktadır. CRISPR RNA hedefli genom düzenleme etkinliği ve doğruluğu günümüzde yoğun olarak araştırılmaktadır (Wilkinson ve Wiedenheft, 2014).

## 2. CRISPR-CAS SİSTEMİ

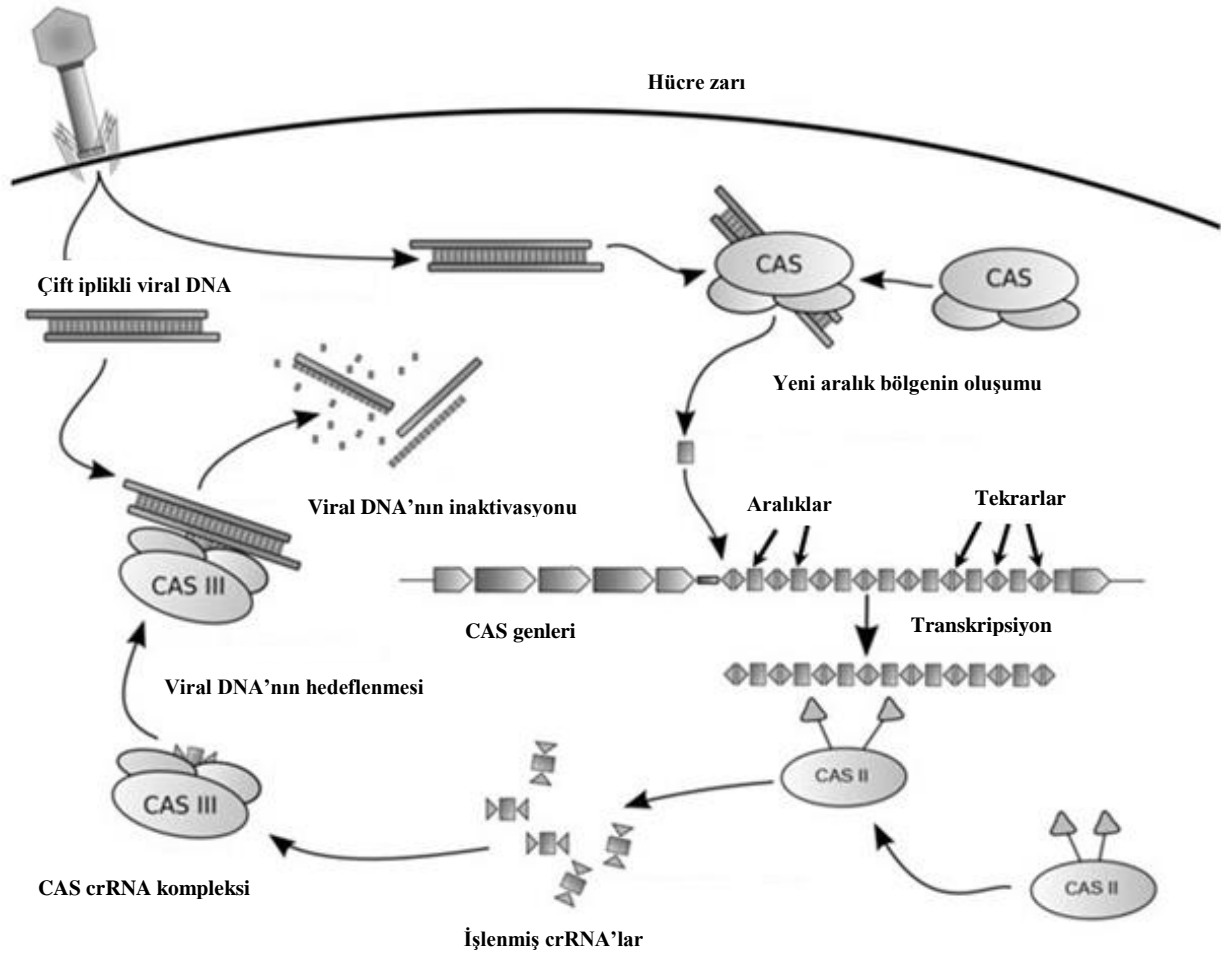
CRISPR-Cas sistemini oluşturan düzenli aralıklarla bölünmüş palindromik tekrar kümeleri (CRISPR) ve ilgili proteinler (Cas) birçok bakteri ve çoğu arkelerde yabancı maddelere karşı adaptif bağışıklık kazandırır (Barrangou ve Marraffini, 2014). CRISPR-Cas sistemleri CRISPR-ilişkili (Cas) genleri ve bu genlere karşılık gelen CRISPR dizilerini içerir (Nishimasu vd., 2014). CRISPR aktivitesi için genellikle CRISPR dizilerine bitişik bulunan ve immün yanıt için proteinleri kodlayan CRISPR ilişkili (Cas) genlerin varlığına ihtiyaç vardır (Rath vd., 2015). Bu karakteristik CRISPR dizileri yabancı genetik materyalin kısa segmentlerinden türetilen tekrarlanmayan sekansların tekrarlayan sekanslar içerisine girmesi ile oluşur (Nishimasu vd., 2014). Yani bakteriyi enfekte eden virüs DNA'sının belirli kısımları tekrar genleriyle birlikte CRISPR bölgesine yerleştirilir (Şekil 1). CRISPR bölgeleri ile ilişkili diğer bir özellik, transkripsiyon yönüne göre CRISPR'ın gerisinde yer alan lider olarak adlandırılan korunmuş sekansların varlığıdır. Bu lider dizilerin varlığı başlangıçta sadece *Methanocaldococcus jannaschii*, *Archaeoglobus fulgidus* ve *Methanothermobacter thermautotrophicus*'ta gözlenmiş olsa da, daha sonraki çalışmalarda birçok bakteri türünde bulunmuştur (Rath vd., 2015).



Şekil 1. Bakteriyel kromozomda bir CRISPR bölgesinin yapısı (Anonim, 2016)

Tekrar bölgelerinin sekansı ve uzunluğu ve aralık bölgelerinin uzunluğu CRISPR bölgesinde çok iyi bir şekilde korunmaktadır, fakat aynı veya farklı genomlarda bu CRISPR bölgeleri farklılık gösterebilmektedir. Tekrar sekansları 21-48 baz çifti (bç) arasında iken, aralık (boşluk) bölgeleri 26-72 bç arasındadır. CRISPR bölgesindeki aralık kısımlar birkaç taneden birkaç yüze kadar büyük değişkenlik gösterir. Genom tekli veya çoklu CRISPR bölgesi içerebilir ve bazı türlerde bu bölgeler kromozomun önemli kısmını oluşturabilir. Örneğin, *Methanocaldococcus* sp. FS406-22 (18 CRISPR ve 191 aralık kısım içerir) ve *Sulfolobus tokodaii* 7 (beş CRISPR ve 458 aralık kısım içerir) suşlarındaki CRISPR bölgeleri genomun % 1'ini oluşturur (Rath vd., 2015).

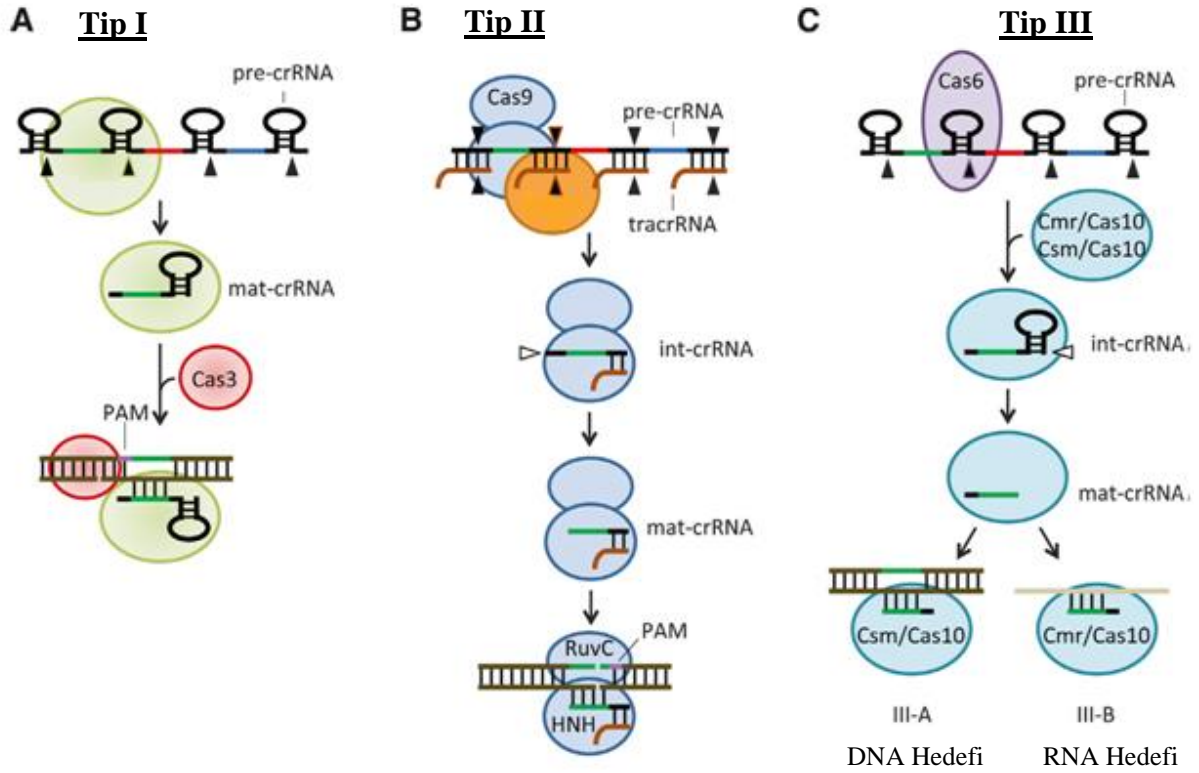
CRISPR-Cas bağışıklık sistemi hücre içerisinde immüneyi üç adımda gerçekleştirir (Şekil 2). İlk adım, ekzojen nükleik asitten elde edilen aralık kısımların CRISPR bölgesine yerleştirildiği adaptasyondur (Barrangou ve Marraffini, 2014). Bu adımda, protoaralıkların seçimi, istilacı plazmid ve faj genomlarında bulunan protoaralık bitişik motiflerin (protospacer adjacent motif-PAM) spesifik tanınması ile belirlenir (Jiang ve Doudna, 2015). PAM'lar 2-5 nükleotitten oluşan, yüksek korunmuş dizi motifleridir (Barrangou ve Marraffini, 2014). PAM sekansına sahip yabancı DNA aralık kısmı, tekrarlayan genlerle birlikte CRISPR bölgesine yerleştirilir. Bakteriyel CRISPR bölgesindeki tekrarlar içindeki PAM tanıma dizilerinin eksikliği CRISPR-Cas sistemlerinin kendini hedefleme ve kendini kesme olasılığını ortadan kaldırırken PAM dizilerindeki mutasyonlar fajın CRISPR bağışıklığından kaçmasına izin vermektedir (Jiang ve Doudna, 2015). İkinci adımda, istilacı DNA'daki hedef sekansın CRISPR lokusuna sokulduğu bölge, öncül CRISPR RNA'lara (pre-crRNA) transkribe edilir ve oluşan pre-crRNA transkriptleri Cas endoribonükleazlar tarafından ekzojen DNA hedef sekanslarıyla Watson-Crick baz eşleşmesi gösteren küçük crRNA'lara dönüştürülür (crRNA'nın sekansı istilacı DNA'nın sekansına karşılık gelir) (Nishimasu vd., 2014; Barrangou ve Marraffini, 2014; Savic ve Schwank, 2015). Son adım ise hedefleme olup, bu adımda, crRNA ile Watson-Crick baz eşleşmesinden yararlanılarak istilacı nükleik asitler hedeflenir, Cas nükleazlar ile homolog sekanslar kesilerek virüslerin ve plazmidlerin çoğalması önlenir (Nishimasu vd., 2014).



**Şekil 2.** CRISPR-Cas 3 adımlı çalışma mekanizması: (1) bakteriyi enfekte eden virüsün PAM taşıyan DNA bölgesi, tekrarlayan bölgelerle birlikte CRISPR lokusuna sokulur, (2) CRISPR dizilerinin ifade edilip işlenerek küçük crRNA dizilerinin oluşturulduğu CRISPR RNA (crRNA) biyogenezi, (3) Virüs DNA'sına karşılık gelen crRNA'nın Cas proteinleri ile birleşip virüs DNA'sına hedeflendirilmesi ve virüs DNA'sının kesilmesi (Anonim, 2016)

## 2.1. CRISPR-Cas Sistemi Tipleri

Cas proteinleri çok çeşitlidir ve nükleazlar, helikazlar ve RNA bağlama proteinleri gibi nükleik asitlerle etkileşmektedirler. Cas1 ve Cas2 proteinleri adaptasyonda rol oynar ve bu proteinler bütün CRISPR-Cas sistemlerinde bulunmaktadır. Diğer Cas proteinleri ise sadece belirli tipte CRISPR-Cas sistemleri ile ilişkilidirler. Cas proteinlerinin çeşitliliği, çoklu CRISPR bölgelerin varlığı ve canlılar arasındaki geçişi CRISPR-Cas sistemlerinin sınıflandırılmalarını zorlaştırmaktadır (Rath vd., 2015). CRISPR bölgesinin organizasyonu ve Cas genlerinin içeriğine göre CRISPR-Cas sistemleri üç ana tipte (I, II ve III) ve 11 alt tipte (I-A'dan I-F'e, II-A'dan II-C'e, ve III-A'dan III-B'e) sınıflandırılmaktadır (Jiang ve Doudna, 2015). Cas proteinleri crRNA biyogenezinden ve istilacı nükleik asitlerin tanınması ve yıkımından sorumlu olduğundan her CRISPR tipinin moleküler mekanizması özgünlük göstermektedir (Barrangou ve Marraffini, 2014). Tip I ve Tip III sistemlerinde, küçük matür crRNA'ları üretmek üzere pre-crRNA'ların tekrarlı sekanslarının endoribonükleolitik kesimi Cas6 nükleaz ailesine dayanmaktadır (Jiang ve Doudna, 2015). Tip I sisteminde, oluşan crRNA molekülü Kaskat ve Cas3 proteinleri ile birleşerek yabancı DNA'yı kesmektedir, Tip III sisteminde ise pre-crRNA'dan oluşan crRNA Cmr/Cas10 veya Csm/Cas10 proteinleri ile kompleks oluşturup, kompleksteki Cas proteinleri yabancı DNA'yı kesmektedir. Tip II sistemi, bu sistemler arasından en çok çalışılan ve mekanizması en iyi aydınlatılan sistemdir. Tip II sisteminde, kodlayıcı olmayan ikinci bir RNA ile birlikte (trans-aktif edici CRISPR RNA (tracrRNA)), crRNA, endonükleaz Cas9 ile bir ribonükleoprotein kompleksi oluşturup istilacı DNA'yı tanıyıp kesmektedir (Savic ve Schwank, 2015). Tek bir organizmada aynı anda farklı tip CRISPR-Cas sistemleri var olabilir (Rath vd., 2015). Şekil 3'te CRISPR-Cas sistemlerinin crRNA biyogenez ve hedeflendirme mekanizmaları verilmiştir.



Şekil 3. CRISPR-Cas Sistem tiplerinin crRNA biyogenez ve hedeflendirme mekanizması (Barrangou ve Marraffini, 2014)

## 2.2. CRISPR-Cas Sisteminin Memeli İmmün Sistemiyle Karşılaştırılması

Konakçıyı başarıyla savunabilmek için adaptif immün sistemin, özgünlük, çeşitlilik ve hafıza olmak üzere üç temel özellik geliştirmesi gerekmektedir. Özgünlük, yabancı yapıları ve organizmaları tanımak ve onlara gerekli saldırıyı yapabilmek ve tolere edilenlerden ayırt edebilmek için gereklidir. İmmün yanıtta çeşitlilik konakçının geniş çeşitlilikteki patojenlerden ve/veya kötü huylu maddelerden korunması ve invazif ajanlarla karşı karşıya geldiğinde hayatta kalabilmesi için oldukça gereklidir. Geçmiş enfeksiyonlara karşı bellek oluşumu da, tekrarlayan enfeksiyonlara hem daha etkili hem de çok daha hızlı yanıtın oluşumunu sağlamaktadır (Barrangou ve Marraffini, 2014).

Hem memeli bağışıklık sisteminin adaptif dallanması (Murphy, 2012) hem de CRISPR-Cas immünitesi bu 3 önemli özelliğe sahiptir. Ancak, bu özelliklerin moleküler ve hüresel mekanizmalarının etkinleştirilmesi farklı şekillerde olmaktadır (Barrangou ve Marraffini, 2014). Hedeflerinin moleküler doğası açısından her iki sistemde de temel farklılıklar vardır.

Memeli immünitesi geniş yelpazedeki ekzojen ajanlar ve çeşitli yapısal elementleri sunan invazif hüresel organizma tipleri ile ilişkili iken prokaryotlar için enfeksiyona neden olan ajanlar, virüsler ve plazmidlerdir. Ayrıca memeli bağışıklık sisteminin konakçı içerisindeki farklı dokuları koruması gerekirken tek hücreli prokaryotların istilacı organizmanın (kısa yaşam döngüsüne sahip tek hücreli) sitoplazmik nükleik asitlerine saldırması gerekmektedir. Bu farklılıkların bir sonucu olarak, bu hedefleri tespit etmek için özgüllük sağlayan moleküller farklılık göstermektedir (Barrangou ve Marraffini, 2014).

Memeli immün sisteminde, antikorlar (proteinler) 3 boyutlu antijenleri, yabancı organizmanın veya malignant hücrelerin şeker, protein ve nükleik asit yapılarını tanıyıp bunlara spesifik olarak bağlanma özelliğindedir. Antikorlar kanda serbest halde veya lenfosit yüzeylerinde bulunmaktadır. CRISPR immün sisteminde, memelilerdeki antikor/antijen çiftinin karşılığı crRNA ve istilacı genomdaki PAM sekans ikilisidir (Barrangou ve Marraffini, 2014).

İmmün yanıtın özgüllüğü organizmanın kendi yapılarına ve ortakçı organizmalarına karşı saldırıyı önlemek için gereklidir. Memelilerde merkezi tolerans mekanizmaları, kendine karşı antikor üreten yeni gelişen B hücrelerinin ve kendine ait MHC

(Major histocompatibility complex-Temel doku uygunluk proteini)-sunan yüksek afiniteli peptidlerini tanıyan T hücrelerinin sırasıyla kemik iliği ve timusta ortadan kaldırılmasını sağlar. Diğer taraftan, çevresel tolerans mekanizmaları ile matür lenfositler inaktive edilerek de bağırsak ortakçı mikrobiyotası ve zararsız besinsel proteinler gibi kendinden olmayan yapılara karşı tolerans geliştirilir. CRISPR immün yanıtta ise kendinden olana tolerans gelişimi, CRISPR dizisindeki aralık sekanslarına hedeflenmenin önlenmesi için gereklidir. Bu, protoaralıkların komşu sekanslarında bulunmayan aralık komşu sekanslarının özelliklerinin Cas mekanizması tarafından tanınması ile sağlanır. Kendinden olana tolerans için ihtiyaç duyulan bir başka mekanizma ile de bakteriyel kromozomdan aralık sekansların edinimi önlenir. CRISPR-Cas sistemlerinin kendi DNA'sını, örneğin, faj DNA'sından edinim aşamasında ayırt edip etmediği ve bunu nasıl yaptığı henüz bilinmemektedir. CRISPR immünesinin kendinden olmayana toleransı ise henüz gözlenmemiştir. Yararlı plazmidler ve profajlar (konakçı kromozomuna entegre olan bakteriyofajlar) da bakteriler için gerekli olarak düşünülebilir ve bu yapılara karşı immün yanıt konakçıya zararlı olabilir. Öte yandan deneysel kanıtlar, aktif bir CRISPR-Cas sistemi ve hedefinin aynı hücre içerisinde birlikte var olamayacağını göstermektedir ve bu nedenle plazmid ve profajlara tolerans mümkün değildir (Barrangou ve Marraffini, 2014).

Memeli bağışıklık sisteminde, V(D)J rekombinasyonu (somatik rekombinasyon olarak da bilinir) ve antikorların hafif zincir genlerinin somatik hipermutasyonu ile birçok farklı antikor üretimi gerçekleşmekte, bu da memeli bağışıklık sistemine çeşitlilik kazandırmaktadır. Böylece, kazanılan çeşitlilik hemen hemen her hedefin fark edilebilir olmasını sağlamaktadır. Memeliler bir patojene maruz kaldığında, enfeksiyon temizlendikten sonra, en etkili antikor üreten lenfosit hücrelerinin bir kısmı, bir sonraki enfeksiyon sırasında çoğalmaya ve patojene saldırmaya hazır bellek hücreleri haline gelmektedir. Daha önce belirtildiği gibi, CRISPR-Cas sistemleri bağışıklığı sağlayan aralık genlerini doğrudan bakteriyi enfekte eden istilacı genomundan alır, istilacıya ait aralık geninin CRISPR bölgesine yerleştirilmesiyle, aynı zamanda çeşitlilik ve bellek depolama işlemi de gerçekleştirilmiş olur. Her viral ve plazmid DNA'nın CRISPR lokusuna yerleştirilebilir olduğundan kuşulanılmakta, ancak prensip olarak, CRISPR bağışıklık sisteminin çok çeşitli prokaryotik virüs ve plazmidler ile başa çıkabileceği bilinmektedir. CRISPR bağışıklık sistemi ile memelilerdeki bağışıklık sisteminin önemli farklılıklarından biri de, memeli bağışıklık sisteminde kazanılan antikor çeşitliliği ve patojenlere karşı oluşturulan bellek hücrelerinin bireysel olup kalıtsal olarak aktarılamazken, CRISPR sistemiyle elde edilen bağışıklığın bakteri duplikasyonundan sonra kalıtsal olarak aktarılmasıdır. CRISPR-Cas sistemi ile kazanılan bağışıklığın kalıtsal olarak aktarılması, bu sistemin önemli bir avantajıdır. İki sistem arasındaki son farklılık da patojenlere karşı hafızanın nasıl oluşturulduğudur. Memelilerde, bellek lenfositler enfeksiyon sırasında ya da aşılama ile oluşabilir. CRISPR sistemi için ise bakteriyi enfekte eden faj aralık genlerinin bakteri enfeksiyonu sırasında mı, bakteriyi enfekte eden fajın bakteriyi öldürmeden önce mi yoksa canlılığını kaybetmek üzere olan virüslerin DNA'sını bakteriyeye enjekte ettiği zaman mı kazandığı halen bilinmemektedir (Barrangou ve Marraffini, 2014).

### 3. CRISPR-CAS SİSTEMİNİN GENETİK MÜHENDİSLİĞİ UYGULAMALARI

DNA restriksiyon enzimleri, 1970'li yıllarda bakteriyofajlar üzerine yapılan temel araştırmalarla keşfedilmiştir (Kelly ve Smith, 1970). Bu enzimler spesifik DNA sekanslarının kesilmesine imkan sağlayarak moleküler biyolojinin seyrini değiştirmiştir. Restriksiyon enzimleri gibi CRISPR sistemleri de spesifik DNA sekanslarının kesilmesini sağlayan prokaryotik bağışıklık sistemleridir. Restriksiyon enzimleri tipik olarak 4-8 bp'den oluşan çift halkalı DNA moleküllerine bağlanıp, DNA molekülünü keserken, çeşitlilik gösteren CRISPR sistemleri kolaylıkla herhangi bir DNA ya da RNA molekülüne hedeflenmeye programlanabilmektedir (Wilkinson ve Wiedenheft, 2014).

CRISPR lokusları ile ilgili yapılan ilk uygulamada CRISPR tekrar oluşumu ve sayı çeşitliliğine bakılarak *Mycobacterium* ve *Yersinia* izolatlarının tiplendirilmesi amaçlanmışken (Pourcel vd., 2005) sonrasında bu lokuslar, endüstriyel öneme sahip bakterilerin genotiplenmesinde ve korunan lokuslarına göre ortak kökenli bakterilerin keşfedilmesinde kullanılmıştır (Barrangou, 2012). Süt endüstrisinde starter kültür olarak kullanılan *Streptococcus thermophilus* bakterisinde CRISPR adaptif bağışıklık sisteminin keşfinden sonra, CRISPR sistemi daha verimli, uzun ömürlü ve fajlara karşı dirençli mutantlar elde etmek için kullanılmıştır (Barrangou ve Horvath, 2012). Viral direncin ötesinde, CRISPR adaptif bağışıklık sistemi antibiyotik direnç genleri taşıyan ya da hastalık oluşturma özellikleri taşıyan plazmidler gibi istenmeyen genetik elemanların alımı ve yayılmasına karşı bakteri türlerini aşılama potansiyeline sahiptir (Barrangou ve Marraffini, 2014).

CRISPR bağışıklık sisteminin, özellikle Cas9 tabanlı Tip II sisteminin detaylı olarak karakterize edilmesiyle, Cas9 enziminin genom mühendisliğindeki potansiyeli keşfedilmiştir (Barrangou ve Marraffini, 2014). Tip I ve Tip III CRISPR Cas sistemleri RNA hedefli nükleaz aktivitesine sahiptirler, ancak bunu büyük bir multimerik crRNA-Cas ribonükleoprotein kompleksi ile yapmaktadırlar. Bu da bu sistemlerin gen düzenlemede moleküler bir araç olarak geliştirilmelerini zorlaştırmaktadır. Tip I ve Tip

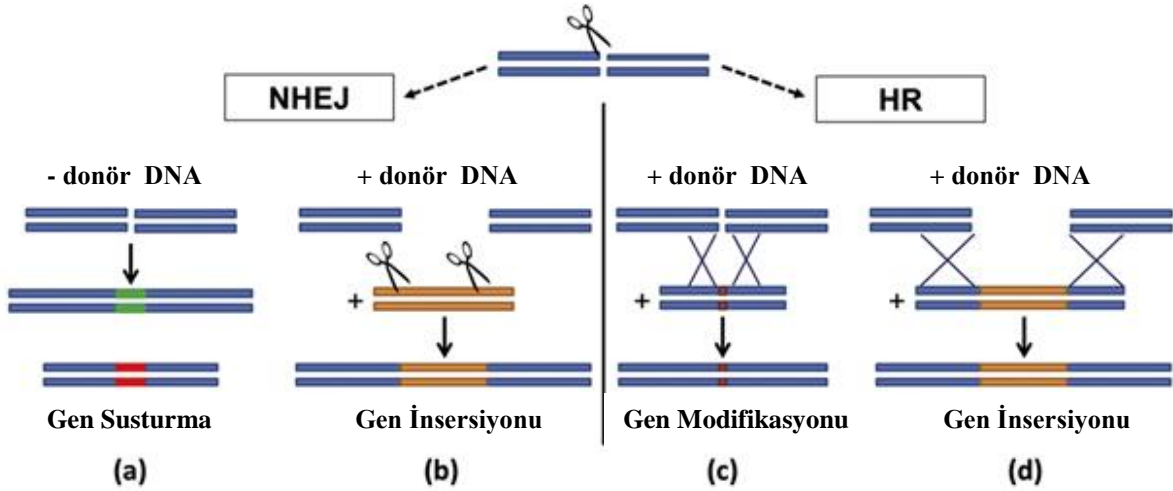
III'ün aksine Tip II sistemi hedef DNA molekülünü kesen tek bir endonükleaz aktivitesine dayanmaktadır (Sapranaukas vd., 2011). 2013 yılı içerisinde, RNA hedefli Cas9 sisteminin genom düzenleme, genetik taramalar ve gen ekspresyonu düzenlemesi için kullanıldığı bilimsel çalışma ve yayınların sayısında çok büyük artış olmuştur (Pennisi, 2013).

Hücre içerisinde, Cas9 sisteminin hedef DNA'yı kesmesi için crRNA ve tracrRNA ile birlikte RNaseIII enzimine ihtiyacı vardır (Barrangou ve Marraffini, 2014). Bütün bu gereksinimler tracrRNA ile crRNA'nın birleşimiyle oluşturulan tek klavuz RNA (single-guided RNA-sgRNA) olarak bilinen sgRNA'nın oluşturulması ile ortadan kaldırılabilir. Oluşturulan sgRNA'daki crRNA klavuzluk görevini korumaktadır ve sgRNA'nın ikincil yapısı Cas9'un hedef bölgeyi kesmesi için uygun olarak tasarlanmaktadır (Jinek vd., 2012). CRISPR RNA'ların içerisindeki sekanslar CRISPR antiviral savunma sisteminin doğal bir mekanizma ile oluşturduğu bakteriyi enfekte eden faj dizilerine karşılık gelmektedir ve Cas nükleazlarını yeniden başka bir bölgeye hedeflendirmek için istenilen sekans ile kolayca yer değiştirilebilmektedir (Hsu vd., 2014). Bu teknolojik gelişme Cas9'un ideal bir RNA hedefli çift zincirli DNA'yı kesebilen (dsDNA) nükleaz olması yönünde temel olmuştur ve birçok araştırmacının, geçmişte ZFN ve TALEN enzimlerinin kullanıldığı gibi, Cas9'u da genetik mühendisliği aracı olarak kullanmasını sağlamıştır (Wood vd., 2011). ZFN ve TALEN'in aksine, CRISPR-Cas9 sistemi insan hücrelerinde metillenmiş DNA'ları da kesmektedir ve bu da diğer nükleazlar ile yapılamayan genetik modifikasyonlara izin vermektedir (Bortesi ve Fischer, 2015).

Cas9, çift halkalı DNA'yı kesmek için gerekli olan HNH ve RuvC nükleaz domainlere ve sgRNA ile etkileşimi sağlayan alfa sarmal lobuna sahiptir (Peters vd., 2015). 20 nükleotitten oluşan sgRNA'nın yanı sıra, Cas9 proteininin hedef DNA'yı tanıması için PAM sekansı gerekmektedir. Cas9-sgRNA kompleksi DNA'ya bağlandığı zaman son derece kararlıdır ve *in vitro* bağlanma kinetik çalışmaları ile Cas9-sgRNA kompleksi ile hedef DNA arasındaki bağlanmanın uzun süre boyunca neredeyse geri dönüşümsüz olduğu gösterilmiştir. Gen düzenlemede, Cas9 tabanlı CRISPR sisteminin en önemli özelliği programlanabilir olmasıdır. Cas9 enzimi sgRNA'nın baz sekansını modifiye ederek PAM-sekansının olduğu herhangi bir bölgeye yönlendirilebilir. Bu sistemin ikinci önemli özelliği ise çok yönlü olmasıdır. Cas9 nükleazının genom düzenlemede kullanılmasının yanı sıra katalitik olarak aktif olmayan, çift halkalı DNA'yı parçalaması mümkün olmayan dCas9 (dead Cas9) enzimi gen ekspresyonunu etkinleştirmek ya da baskılamak için de kullanılmaktadır (Peter vd., 2015).

2012 yılında, Emmanuelle Charpentier ve Jennifer Doudna liderliğindeki bir araştırma ekibi *Streptococcus pyogenes* CRISPR Tip II sistemini genom düzenleme için uyarlamıştır (Jinek vd., 2012). Bu çalışmada, crRNA ile tracrRNA molekülleri birleştirilerek sgRNA molekülü oluşturulmuş ve oluşan sgRNA-Cas9 nükleaz kompleksi standart Watson-Crick baz eşleşmesi ile özel genomik bölgelere hedeflendirilmiştir. CRISPR-Cas9 kompleksinin hedef DNA sekansında çift iplikli kırılmalar oluşturması ile genom düzenleme prensibi hücresel DNA onarım sistemine dayanmaktadır. Nükleazlar tarafından oluşturulan dsDNA kırılmaları homolog olmayan uç birleştirme (non-homologous end-joining-NHEJ) ya da homolog rekombinasyon (HR) ile tamir edilmektedir. NHEJ hata eğilimli bir işlemdir ve genellikle hedef bölgede genetik nakavt ile sonuçlanan çerçeve kayması mutasyonuna ya da stop kodonların insersiyonu ile sonuçlanan nükleotit insersiyonuna ya da delesyonuna sebep olmaktadır. Çift sarmallı DNA kırılmalarının HR ile onarılması hedeflenen bölgeye özgü dizileri içeren kalıp DNA'nın varlığına bağlıdır. dsDNA kırılmaların olduğu çevrede sekans homolojisine sahip kalıp bir DNA molekülü olduğunda, DNA hasarı HR ile onarılabilir ve bu mekanizma hassas bir şekilde gen modifikasyonu ya da gen insersiyonu elde etmek için kullanılabilir (Wilkinson ve Wiedenheft, 2014). Ökaryotik hücrelerde, nükleazlar tarafından oluşturulan çift halkalı DNA kırılmalarının NHEJ ve HR mekanizmaları ile onarımı Şekil 4'te verilmiştir.





**Şekil 4.** Çift zincirli DNA'nın kesilmesi ile hücre içerisinde NHEJ ve HR ile DNA onarım mekanizması. Spesifik bir bölgede nükleaz ile meydana gelen çift iplik DNA kırılmaları ya homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) ile ya da homolog rekombinasyon (HR) ile tamir edilebilir. (a) NHEJ ile tamir daima rasgele baz çiftlerinin insersiyonu (yeşil) veya silinmesi (kırmızı) ile olup bozulma ile genin susturulması ile sonuçlanır (b) Ortamda donör DNA varsa, aynı anda aynı nükleaz ile kesilip uyumlu kollar oluşturulur ve NHEJ ile gen insersiyonu gerçekleştirilir. (c) Donör DNA varlığında, HR aracılı nükleotid substitüsyonları ile gen modifikasyonu veya (d) gen insersiyonu meydana gelir (Bortesi ve Fischer, 2015).

CRISPR-Cas9 sistemi kolaylıkla ve hızlıca hedef bölgeye göre tasarlanabildiği için hızlı bir şekilde en çok kullanılan DNA düzenleme aracı olarak gelişmiş ve memeliler de dahil olmak üzere çok çeşitli organizmalar üzerinde, bu sistem kullanılarak gen düzenleme çalışmaları yapılmıştır (Sander ve Joung, 2014; Savic ve Schwank, 2015). Aşağıda CRISPR-Cas9 sistemi ile yapılan gen düzenleme çalışmaları özetlenmiştir.

Yapılan çalışmalarla Cas9 enziminin terapötik potansiyeli gösterilmiş ve bu çalışmalarda, Cas9 spesifik olarak antibiyotiğe dirençli bakterileri ve oldukça öldürücü suşları hedeflemek için antimikrobiyal ajan olarak geliştirilmiştir (Bikard vd., 2014; Citorik vd., 2014). CRISPR-Cas9 sisteminin gen terapi uygulamaları, kistik fibröz hastalarından kültüre edilen hücrelerde *cftr* geninin tamiri ile (Schwank vd., 2013), fare eşey hücrelerinde DNA'yı değiştirerek dominant katarakt bozukluğu ve Duchenne kas distrofi hastalıklarının iyileştirilmesiyle (Wu vd., 2013; Long vd., 2013) ve yetişkin farelerde kalıtsal tirozinemi hastalığının iyileştirilmesiyle (Yin vd., 2014) gösterilmiştir. Wu vd. (2013), CRISPR sistemini fare embriyosunda hastalığa sebep olan mutasyonu onarmak için kullanan ilk kişilerdendir ve yapmış oldukları çalışmada, *Crygc* geninde meydana gelen fonksiyon kaybına sebep olan mutasyon ile ortaya çıkan bir görme bozukluğu olan katarakt hastalığının Cas9 ile tedavisini araştırmışlardır. Cas9 mRNA'sı ve baskın *Crygc* allelini hedefleyen sgRNA zigot içerisine enjekte edilmiş ve meydana gelen mutasyon vahşi tip allelin kalıp DNA olarak görev almasıyla düzeltilmiştir. *In vivo* CRISPR-Cas9 genom düzenleme sistemi ile postnatal hayvanlardaki genetik hastalıkları başarılı bir şekilde iyileştiren çalışmalardan biri Yin vd. (2014) tarafından farelerde Tirozinemi tip 1 hastalığı için gerçekleştirilmiştir. Kalıtsal tip I Tirozinemi, FAH (fumarylacetoacetate hidrolaz) enziminin eksikliğinden kaynaklanmakta, sitotoksik metabolit birikimine ve karaciğer hücrelerinin ölümüne sebep olmaktadır. Cas9 ve spesifik sgRNA'yı kodlayan vektör, hidrodinamik kuyruk damar enjeksiyonu yoluyla HR için bir kalıp DNA molekülü ile birlikte farelerin karaciğerine verilmiştir. Vektörün aktarılmasıyla mutant fumarilasetoasetat hidrolaz allelindeki genetik bozukluk düzeltilmiş, proteinin stabilizasyonu sağlanmış ve sonuç olarak karaciğer hücreleri üzerindeki toksisite ve farenin kilo kaybı azalmıştır. CRISPR-Cas9 gen terapisi ile Tirozinemi hastalığının tedavisi mümkün olup, bu sistemle yapılan gen terapi işleminde düşük onarım frekansı (% 0,4) genetik bozukluğu ortadan kaldırılmış karaciğer hücrelerin seçilmesi ile telafi edilebilir (Savic ve Schwank, 2015).

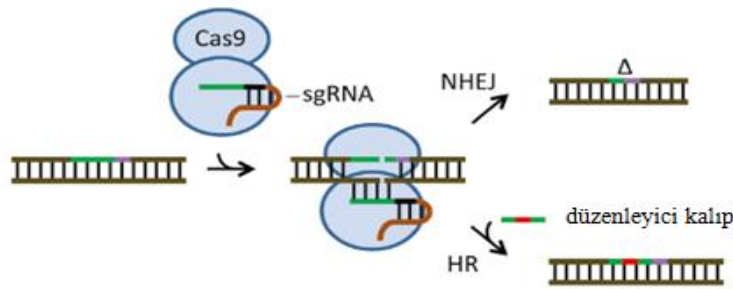
Cas9 aynı zamanda viral enfeksiyonların tedavisinde de kullanılma potansiyeline sahiptir ve HIV (Hu vd., 2014; Mandal vd., 2014; Ye vd., 2014) ve Hepatit B (Lin vd., 2014; Zhen vd., 2015) virüsleri için bu sistemin kullanılabilirliği gösterilmiştir. *Ex vivo* yapılan bir çalışmada, CRISPR-Cas9 sistemine dayalı gen düzenleme ile insan bağışıklık yetmezlik virüsü (HIV) enfeksiyonu ile mücadele üzerinde durulmuştur (Mandal vd., 2014). Bu virüsün yaşam döngüsü sırasında, HIV-1 immün hücrelerin genomuna entegre olmakta ve bu da viral enfeksiyona sebep olmaktadır. Bu aşamada, HIV enfeksiyonu gizli enfeksiyona yol açacak şekilde transkripsiyonel olarak sessizdir. Çünkü gizli olarak var olan virüsler bellek T hücreleri gibi uzun



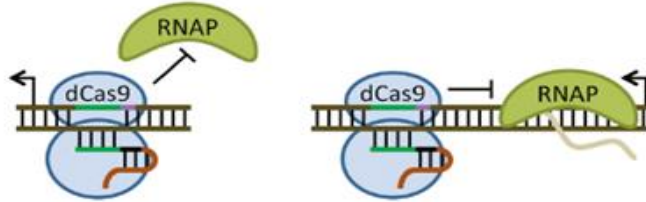
ömürlü hücrelerde bulunur ve enfeksiyon genellikle güçlü antiretroviral ilaçlar varlığında bile devam etmektedir. Günümüzde araştırmacılar, gizli HIV enfeksiyonu ile mücadele etmek için genom düzenleme teknolojilerini kullanarak 2 yaklaşımı test etmektedir. İlk yaklaşımda, enfekte olmuş T hücrelerinin genomuna entegre olmuş HIV DNA'sını ortadan kaldırmak için viral genom sekansı, nükleazlar tarafından hedeflendirilmektedir. Liao vd.'nin (2015) yapmış oldukları çalışmada bu yaklaşım kullanılarak enfekte edilmiş CD41T hücrelerindeki HIV-1'de bulunan ve çok iyi derecede korunmuş tekrar bölgeleri, CRISPR-Cas9 sistemi ile hedeflendirilmiştir. İlgili hücre hattında virüsün genomundaki tekrar bölgelerine hedeflenen CRISPR-Cas9 vektörünün ekspresyonu ile virüslerin genomu bozulmuş, virüs üretimi azalmış ve gizli olarak çoğalan virüsler ortadan kaldırılmıştır. Buna ek olarak, araştırmacılar HIV-1 tekrarlarına hedeflendirilmiş CRISPR-Cas9 vektörlerinin aktarıldığı pluripotent kök hücrelerinden elde edilen HIV rezervuar hücrelerinin de yeni HIV enfeksiyonlarına karşı dirençli olduğunu göstermiştir. İkinci yaklaşımda ise, genom düzenleme HIV-1'e karşı direnç kazanımında, HIV-1'in T hücrelerini enfekte etmek için ihtiyaç duyduğu ko-reseptör olan kemokin reseptörü 5'i (CCR5) modüle etmek için kullanılır. Mandal vd. (2015) CRISPR-Cas9 gen düzenleme yöntemi ile CD34+ hematopoietik kök ve progenitör hücrelerin (hematopoietic stem and progenitor cells-HSPCs) reseptörlerini inaktif hale getirmişlerdir. Bu çalışmada, CCR5'i hedefleyen CRISPR-Cas9 vektörleri ile HSPCs hücre hatlarında % 30 verimlilikle CCR5 reseptörlerinin ablasyonu gösterilmiştir. Ayrıca, CCR5 reseptör proteinleri inaktif hale getirilmiş HSPC klonlarının fareye naklinden sonra da, nakil edilen HSPC klonlarının HIV-1 enfeksiyonuna karşı dirençli oldukları belirtilmiştir. Lin vd. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada, CRISPR-Cas9 tabanlı gen düzenleme yönteminin aynı zamanda hepatit B virüsü (HBV) enfeksiyonu tedavisinde kullanılabilir olduğu gösterilmiştir. Birçok hastada, HBV enfeksiyonu kronik olup karaciğer sirozunu ve kanserini tetiklemektedir. HBV kronik hastaları için antiviral tedaviler geliştirilmiş olmasına rağmen, bu tedaviler genellikle virüsü karaciğerden uzaklaştıramamaktadır. Virüsün karaciğerden uzaklaştırılmamasının sebebi viral replikasyondan sorumlu kovalent olarak kapalı dairesel DNA'nın (covalently closed circular DNA-cccDNA) çok kararlı olmasıdır. Lin vd. (2014) yapmış oldukları çalışmada fare karaciğerine, kuyruk ucundan HBV ekspresyonu vektörünü göndererek HBV enfeksiyonunu modellemişlerdir. HBV enfeksiyonu modellenen fareye, HBV sekansını hedefleyen CRISPR-Cas9 sisteminin enjeksiyonu ile cccDNA'nın kesilmesi sağlanmıştır ve sonuç olarak serum hepatit B yüzey antijeninde azalma meydana gelmiştir. Araştırmacılar aynı sistemin insan hücre hattında da çalışır olduğunu ve HBV enfeksiyonunun tamamen ortadan kaldırılmasında kullanılabileceğini göstermişlerdir. Ancak, yine de, herhangi bir atık viral DNA yeniden enfeksiyona sebep olabilmektedir ve viral enfeksiyonların klinik uygulamaları için çok daha etkili CRISPR-Cas9 sistemlerinin geliştirilmesi gerekmektedir.

CRISPR-Cas9 sistemi programlanabilir gen regülasyonu için de geliştirilmektedir (Rath vd., 2015). RuvC ve HNH domainlerinin mutasyona uğratılması ile katalitik olarak inaktive edilmiş dCas9 proteinleri genel bir DNA bağlama ajanına dönüştürülmektedir. Transkripsiyonel aktivatör ya da represörlerin veya epigenetik enzimler gibi fonksiyonel efektörlerin dCas9'a bağlanması ile, dCas9 nükleazının gen regülasyonunda kullanılması mümkün olmuştur (Barrangou ve Marraffini, 2014; Hsu vd., 2014). dCas9'a farklı fonksiyonel domainlerin eklenmesi bu enzimin kullanım alanlarını artırmıştır (Barrangou ve Marraffini, 2014). Örnek olarak, KRAB ve Kox1 kromatin düzenleyici domainlerinin eklenmesi ile genlerin baskılanması artarken (Gilbert vd., 2013), GFP gibi floresan boyaların dCas9'a eklenmesi ile kromozomlar üzerinde spesifik lokuslar görüntülenebilmektedir (Chen vd., 2013; Malina vd., 2013). Rekombinazlar, metilazlar ve histon proteinlerini modifiye eden enzimler gibi diğer domainlerin eklenmesi ile bu teknolojinin yeni fırsatlar yaratacağı kuşkusuzdur (Barrangou ve Marraffini, 2014). Şekil 5'te CRISPR-Cas9 tabanlı genetik uygulamalar gösterilmektedir.

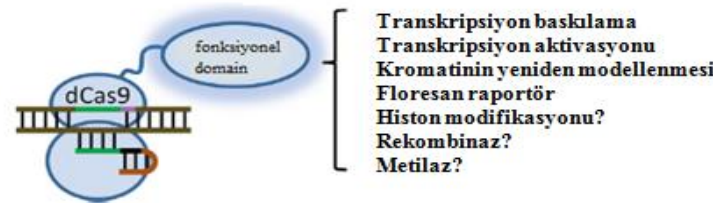
### Cas9 aralık genom düzenlenmesi



### dCas9-aracılı transkripsiyon baskılanması



### dCas9'un ek işlevleriyle beraber RNA yönlendirmeli DNA bağlanma proteini olarak kullanımı



**Şekil 5.** Klavuz sgRNA ile hedef DNA'ya yönlendirilen Cas9 proteini hedef DNA'nın çift zincirini keser. Oluşan kromozomal kırılmalar NHEJ ya da homolog DNA varlığında HR ile tamir edilir. Katalitik olarak aktif olmayan dCas9 proteini bir DNA bağlanma ajanı olarak görev görür ve dCas9'a çeşitli transkripsiyon aktivatörleri ya da represörleri bağlanarak gen ekspresyonu artırılır ya da baskılanır (Barrangou ve Marraffini, 2014).

## 4. CRISPR-CAS BAĞIŞIKLIK SİSTEMİNİN GELECEĞİ ÜZERİNE BİR PERSPEKTİF

Cas9 tabanlı genom düzenleme teknolojilerinin tıbbi uygulamalara aktarımının en önemli nedeni kuşkusuz insan sağlığı üzerinde önemli bir etki yaratma potansiyeline sahip gen tedavisi olmasıdır. Cas9 hedeflemesinin, Cas9-sgRNA kompleks oluşumunun yapısal incelemeleri (Jinek vd., 2014; Nishimasu vd., 2014) ile birlikte bu sistemin biyokimyasal doğasını anlamaya yönelik son gelişmeler (Sternberg vd., 2014), moleküler biyoloji tekniklerinin de gelişimini sağlayacaktır. Ayrıca CRISPR sistemleri üzerine ilgili bilimsel çevrede hızlı bir araştırma yapıldığında, CRISPR-Cas sistemlerinin potansiyeli üzerine yaygın bir farkındalığın kazanıldığı, konu ile ilgili yayın ve atıf sayısı hızındaki artış ile anlaşılmaktadır. Yine bu tekniğin çoğu laboratuvarında olmasa bile moleküler biyoloji laboratuvarlarında rutin olarak hızla kullanılacağı düşünülmektedir.

## 5. SONUÇ

Genetik mühendisliğinde, CRISPR-Cas prokaryotik viral savunma sisteminin son zamanların güçlü ve uyarlanabilir platformlarından biri haline gelmesi, temel bilim araştırmalarının önemini bir kez daha vurgulamıştır. CRISPR-Cas sistemleri, özellikle Cas9 tabanlı Tip II sisteminin sgRNA ile istenilen herhangi bir DNA bölgesine hedeflendirilebilir olması, büyük çaplı uygulamalarda bu sistemin genom düzenlemede son yıllarda yaygın olarak kullanılmasını sağlamıştır. Bu derleme ile Cas9'un hedef DNA'yı nasıl tanıdığı ve kestiğinin anlaşılması için temelde yatan tanımlanmış yapısal mekanizmalar aktarılmaya çalışılmıştır. Genom mühendisliği çalışmalarında, daha çok doğal ve tasarlanmış Cas9 varyantı kullanımı ile korunmuş olan yapısal ve mekanistik özelliklerin keşfi de artacaktır. Diğer CRISPR-Cas sistemlerinin çeşitli uygulamalardaki kullanımlarının da giderek artması düşünülmektedir. Örneğin, Tip I Kaskat kompleksi, RNA yönlendirmeli DNA hedefleme için geliştirilebilir ve ileri yapısal ve mekanik araştırmalar ile Tip I hedefleme komplekslerinin genom düzenlemede uygulanabilirliği gösterilebilir. CRISPR-Cas sistemleri ile ilgili çoğu çalışmada, bu sistemlerin en önemli rolünün istilacının genetik materyaline karşı olduğu gösterilmiş olsa da, virülansın düzenlenmesi, genom evrimi ve DNA tamiri gibi diğer hücresel işlemlerdeki rolleri de artarak ortaya çıkarılmaktadır. Çoğu durumda, alternatif fonksiyonların gerisindeki süreçler iyi bir şekilde bilinmemekte ve süreçlere

açıklık getirmek için ileri araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır (Rath vd., 2015). Bilim camiası tarafından Cas9 temelli gen modifikasyonların hızının ve bu sistemin artan çeşitlilikteki model sistemlerde uygulamalarının giderek artacağı tahmin edilmektedir. CRISPR-Cas sistemin basitliği, ilerleyen yıllarda, insanlarda *ex vivo* gen terapi çalışmalarında bu sistemin etkili bir biçimde kullanılmasına imkan sağlayacaktır.

## REFERANSLAR

Anonim, "Six Questions About CRISPRs, Microbial Embraces", <http://schaechter.asmblog.org/schaechter/2011/04/six-questions-about-crisprs.html> (Erişim Tarihi: 20.01.2016).

Barrangou, R., "RNA-mediated programmable DNA cleavage", *Nature Biotechnology* 30, 836-838, 2012.

Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A., Horvath, P., "CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes", *Science* 315, 1709-1712, 2007.

Barrangou, R., Marraffini, L. A., "CRISPR-Cas Systems: Prokaryotes Upgrade to Adaptive Immunity", *Molecular Cell* 54, 234-244, 2014.

Bikard, D., Euler, C. W., Jiang, W., Nussenzweig, P. M., Goldberg, G. W., Duportet, X., Fischetti V. A., Marraffini L. A., "Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence specific antimicrobials", *Nature Biotechnology* 32 (11), 1146-1150, 2014.

Bortesi, L., Fisher, R., "The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond", *Biotechnology Advances* 33(1), 41-52, 2015

Chen, B., Gilbert, L. A., Cimini, B. A., Schnitzbauer, J., Zhang, W., Li, G. W., Park, J., Blackburn, E. H., Weissman, J. S., Qi, L. S., Huang, B., "Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system", *Cell* 155, 1479-1491, 2013.

Citorik, R. J., Mimee, M., Lu, T. K., "Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases", *Nature Biotechnology* 32 (11), 1141-1145, 2014.

Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A., Zhang, F., "Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems", *Science* 339 (6121), 819-23, 2013.

Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A., Eckert, M. R., Vogel, J., Charpentier, E., "CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III", *Nature* 471 (7340), 602-7, 2011.

Garneau, J. E., Dupuis, M. È., Villion, M., Romero, D. A., Barrangou, R., Boyaval, P., Fremaux, C., Horvath, P., Magadán, A. H., Moineau, S., "The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA", *Nature* 468 (7320), 67-71, 2010.

Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., Siksnys, V., "Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria", *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (39), 2579-86, 2012.

Gilbert, L. A., Larson, M. H., Morsut, L., Liu, Z., Brar, G.A., Torres, S. E., Stern-Ginossar, N., Brandman, O., Whitehead, E. H., Doudna, J. A., Lim, W. A., Weissman, J. S., Qi, L. S., "CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes", *Cell* 154, 442-451, 2013.

Horvath, P., Coute-Monvoisin, A.C., Romero, D.A., Boyaval, P., Fremaux, C., Barrangou, R. (2009). Comparative analysis of CRISPR loci in lactic acid bacteria genomes. *International Journal of Food Microbiology* 131, 62-70.

Horvath, P., Romero, D. A., Coute-Monvoisin, A. C., Richards, M., Deveau, H., Moineau, S., Boyaval, P., Fremaux, C., Barrangou, R., "Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus*", *Journal of Bacteriology* 190, 1401-1412, 2008.

Hsu, P. D., Lander, E. S., Zhang, F., "Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering", *Cell* 157, 1262-1278, 2014.

Hu, W., Kaminskia, R., Yanga, F., Zhang, Y., Cosentino, L., Lia, F., Luob, B., Alvarez-Carbonell, D., Garcia-Mesac, Y., Karn, J., Mo, X., Khalili, K., "RNA-directed gene editing specifically eradicates latent and prevents new HIV-1 infection", *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(31), 11461-11466, 2014.

- Jiang, F., Doudna, J.A. (2015). The structural biology of CRISPR-Cas systems. *Current Opinion in Structural Biology*, 30, 100-111
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337 (6096), 816-21.
- Kelly, T.J., Smith, H.O., "A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*", II. *Journal of Molecular Biology* 51, 393-409, 1970.
- Liao, H. K., Gu, Y., Diaz, A., Marlett, J., Takahashi, Y., Li, M., Suzuki, K., Xu, R., Hishida, T., Chang, C. J., Esteban, C. R., Young, J., Izpisua Belmonte, J. C., "Use of the CRISPR/Cas9 system as an intracellular defense against HIV-1 infection in human cells", *Nature Communications* 6, 1-10, 2015.
- Lin, S. R., Yang, H. C., Kuo, Y.T., Liu, C. J., Yang, T. Y., Sung, K. C., Lin, Y. Y., Wang, H. Y., Wang, C. C., Shen, Y. C., Wu, F. Y., Kao, C. H., Chen, D. S., Chen P. J., "The CRISPR/Cas9 system facilitates clearance of the intrahepatic HBV templates in vivo", *Molecular Therapy - Nucleic Acids - Nature* 3, e186, 2014.
- Long, C., McAnally, J. R., Shelton, J. M., Mireault, A. A., Bassel-Duby, R., Olson, E. N., "Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA", *Science* 345 (6201), 1184-1188, 2014.
- Malina, A., Mills, J. R., Cencic, R., Yan, Y., Fraser, J., Schippers, L. M., Paquet, M., Dostie, J., Pelletier, J., "Repurposing CRISPR/Cas9 for in situ functional assays", *Genes & Development* 27, 2602-2614, 2012.
- Mandal, P. K., Ferreira, L. M., Collins, R., Meissner, T. B., Boutwell, C. L., Friesen, M., Vrbanac, V., Garrison, B. S., Stortchevoi, A., Bryder, D., Musunuru, K., Brand, H., Tager, A. M., Allen, T. M., Talkowski, M. E., Rossi, D. J., Cowan, C. A., "Efficient ablation of genes in human hematopoietic stem and effector cells using CRISPR/Cas9", *Cell Stem Cell* 15, 643-52, 2014.
- Murphy, K., *J'aneaway's Immunobiology*, Garland Science, New York, 2012.
- Nishimasu, H., Ran, F. A., Hsu P. D., Konermann, S., Dohmae, N., Shehata, S. I., Ishitani, R., Zhang, F., Nureki, O., "Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA", *Cell* 156, 935-949, 2014.
- Pennisi, E., "The CRISPR craze", *Science* 341, 833-836, 2013.
- Peters, J. M., Silvis, M., Zhao, D., Hawkins, J. S., Gross, C. A., Qi, L. S., "Bacterial CRISPR: accomplishments and prospects", *Current Opinion in Microbiology* 27, 121-126, 2015.
- 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* 151, 653-663, 2005.
- Quetier F., "The CRISPR-Cas9 technology: Closer to the ultimate toolkit for targeted genome editing", *Plant Science* 242, 65-76 DOI: 10.1016/j.plantsci.2015.09.003, 2015.
- Quiberoni, A., Moineau, S., Rousseau, G. M., Reinheimer, J., Ackermann, H. W., "*Streptococcus thermophilus* bacteriophages", *International Dairy Journal - Elsevier* 20, 657-664, 2010.
- Rath, D., Amlinger, L., Rath, A., Lundgren, M., "The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications", *Biochimie* 117, 119-128, 2015.
- Sander, J. D., Joung, J. K., "CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes", *Nature Biotechnology* 32, 347-355, 2014.
- Sapranaukas, R., Gasiunas, G., Fremaux, C., Barrangou, R., Horvath, P., Siksnys, V., "The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*", *Nucleic Acids Research* 39 (21), 9275-9282, 2011.
- Savic, N., Schwank, G., "Advances in therapeutic CRISPR/Cas9 genome editing", *Translational Research* 168, 15-21, 2016.
- Schwank, G., Koo, B. K., Sasselli, V., Dekkers, J. F., Heo, I., Demircan, T., Sasaki, N., Boymans, S., Cuppen, E., van der Ent, C. K., Nieuwenhuis, E. E. S., Beekman, J. M., Clevers, H., "Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients", *Cell Stem Cell* 13 (6), 653-658, 2013.
- Sternberg, S. H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E. C., Doudna, J. A., "DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9", *Nature* 507, 62-7, 2014.
- Wilkinson, R., Wiedenheft, B., "A CRISPR method for genome engineering", *F1000 Prime Reports* 6, 3 (doi:10.12703/P6-3), 2014.

Wood, A. J., Lo, T. W., Zeitler, B., Pickle, C. S., Ralston, E. J., Lee, A. H., Amora, R., Miller, J. C., Leung, E., Meng, X., Zhang, L., Rebar, E. J., Gregory, P. D., Urnov, F. D., Meyer, B. J., "Targeted genome editing across species mouse via use of CRISPR-Cas9", *Cell Stem Cell* 13 (6), 659-662, 2011.

Wu, Y., Liang, D., Wang, Y., Bai, M., Tang, W., Bao, S., Yan, Z., Li, D., Li, J., "Correction of a genetic disease in using ZFNs and TALENs", *Science* 333, 307, 2013.

Ye, L., Wang, J., Beyer, A.I., Teque, F., Cradick, T. J., Qi, Z., Chang, J. C., Bao, G., Muench, M. O., Yu, J., Levy, J. A., Kan, Y. W., "Seamless modification of wild-type induced pluripotent stem cells to the natural CCR5Delta32 mutation confers resistance to HIV infection", *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 111 (26), 9591-9596, 2014.

Yin, H., Xue, W., Chen, S., Bogorad, R. L., Benedetti, E., Grompe, M., Koteliansky, V., Sharp, P. A., Jacks, T., Anderson, D. G., "Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nature Biotechnology* 32, 551-553, 2014.

Zhen, S., Hua, L., Liu, Y. H., Gao, L. C., Fu, J., Wan, D. Y., Dong, L. H., Song, H. F., Gao, X., "Harnessing the clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR-associated Cas9 system to disrupt the hepatitis B virus", *Gene Therapy* 22, 404-412, 2015.