BİYOTEKNOLOJİ ve CRISPR-Cas9

BIOTECHNOLOGY AND CRISPR-Cas9

Tuğba Şehitoğulları

Acıbadem Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Özet:
Genetik manipülasyon yöntemleri günümüzde birçok hastalığın tedavisinde, tarım endüstrisinde ve bilimsel çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Bu yazıda gen düzenleme yöntemlerinden CRISPR-Cas9'un nasıl ortaya çıktığı ve mekanizması anlatılmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Biyoteknoloji, Gen Düzenleme, Gen, Rekombinant DNA, CRISPR-Cas9, DNA, RNA, Mutasyon

Summary:
Today, genetic manipulation methods have used a variety of disease treatments, agricultural industry, and scientific studies. This article explains the CRISPR-Cas9 gene-editing method including its working mechanism and origin.

Keywords: Biotechnology, Gene Regulation, Gene, Recombinant DNA, CRISPR-Cas9, DNA, RNA, Mutation

Biyoteknolojinin son meyvesi; CRISPR

Genetik bilimi günümüz dünyasının en önemli bilim dallarından biridir. Genetiğin biyoteknolojiyle buluşmasıyla ortaya çıkan gen değiştirme teknolojileri şüphesiz genetiğin gelecekte de insan sağlığını ve evrimini büyük ölçüde etki edeceğini göstermektedir.
Gen değiştirmeyle ilgili bilimsel çalışmalar 1970'lerde rekombinant DNA teknolojisinin geliştirilmesiyle başladı. İlk kez, moleküler biyologlar DNA'yı manipüle etme özelliği kazandılar, böylece genleri incelemek ve yeni tıp ve biyoteknoloji geliştirmek için onları kullanmak mümkün oldu. [1] Rekombinant DNA teknolojisiyle başlayan gen değiştirme teknolojisi 2012'de Jennifer Dougna ve Emmanuelle Charpentier liderliğindeki ekip tarafından keşfedilen CRISPR yöntemiyle yeni bir döneme girdi. [2] CRISPR-Cas9 diğer gen değiştirme yöntemlerine kıyasla daha hızlı, ucuz ve kullanım alanı geniş bir yöntem olmasıyla fark yarattı. [3]

CRISPR-Cas9 Nedir?

CRISPR aslında bakterilerin kendilerini virüslerden korumak için geliştirdikleri bir mekanizmanın biyologlar tarafından gen manipüle edilme aracı olarak kullanılmasıdır. İnsan bağışıklığı her zaman daha karmaşık olarak tanımlanır. Adaptif ve doğal bağışıklık sistemleri özelleşmiş B ve T hücreleri, patojenleri ve enfekte olmuş hücreleri yok etmek için proteinleri tanıması ve hafıza oluşturması bağışıklık sistemimizi diğer türlere kıyasla daha karmaşık yapmaktaydı. Bu sistemin karmaşıklığı nedeniyle, prokaryotlardan [4] uyarlanabilir bir bağışıklık sisteminin keşfedilmesi bilim insanları için şaşırtıcı bir bulguydu.
Bakteriler 3.22 milyar yıldır dünyamızda var olan yaşam formlarıdır. [5] Dünyada sadece 300.000 bin yıldır bulunan Homo Sapiens'e göre virüslerle savaşmak için daha yaratıcı silahlara sahip olmaları aslında ilginç değil. [6] Bilim insanları daha önce de prokaryotlardan (E.coli) keşfedilen DNA kesme/kısıtlama enzimleriyle rekombinant DNA teknolojisini

geliştirmişlerdi. (Arber & Linn, 1969). Bu protein sayesinde DNA'yı belli sekanslarından kesebilme yeteneği kazanıldı. [7] CRISPR yöntemi de doğadan esinlenen teknolojinin gen değiştirmede kullanılan çok daha gelişmiş bir ürünüdür. CRISPR'ın Türkçe karşılığı DNA'nın Kümelenmiş Düzenli Olarak Aralıklı Kısa Palindromik Tekrarları'dır [8]. CRISPR-Cas sistemi bakterilerde, virüslere ve diğer mobil genetik elementlere karşı korunmanın bir yolu olarak istilacının DNA'sını veya RNA'sını hedefler [9].

Peki CRISPR-Cas9 sistemi nasıl çalışır?

Bakteriler bakteriyofaj yani bakteri virüsleri tarafından enfekte edildiklerinde, yabancı virüs DNA'sını fark edip yok etmek için iki farklı RNA sekansı oluşturur. Bakterinin oluşturduğu ilk RNA sekansı virüs DNA'sıyla eşleşir. Rehber RNA diye tanımladığımız bu RNA, Cas9 enzimiyle birleşip virüs DNA'sını tarar. Bu tarama işleminin amacı bakterinin virüs DNA'sına bağlanabileceği yeri bulup, bu noktadan yabancı DNA'yı kesip işlevsiz hale getirmektedir. [10] İnsanlarda da bu şekilde kullanılmaktadır. CRISPR aktivitesi, genellikle CRISPR'a bitişik olarak bulunan ve bağışıklık tepkisi için gerekli proteinleri kodlayan bir dizi CRISPR ile ilişkili (Cas) genin varlığını gerektirir. CRISPR-Cas9 genom düzenleme iki farklı kısımdan oluşur. "Rehber" RNA (gRNA) ve CRISPR ile ilişkili endonükleazı yani Cas9 enzimi. Cas9 enzimi, DNA hedef dizileri ile baz çiftleri oluşturmak için rehber RNA'yı kullanan bir endonükleazdır, bu da Cas9'un DNA'ya bölgeye özgü çift sarmallı bir kopma vermesini sağlar. Bu teknolojinin güzel tarafı istenilen bölgede oluşturulan delesyon ve eklemelerden veya mutasyonlu bölgenin düzeltilmesi için hücre onarım mekanizmalarını kullanır. RNA'ya yönelik Cas9 moleküler makasları sayesinde CRISPR-Cas9 sistemi, DNA'yı daha önceden kullanılan TALEN ve ZFN gibi gen manipülasyon teknolojilerden daha hassas bir şekilde modifiye edebilir. [11]

Cas9'un değiştirilmiş versiyonlarını kullanarak, araştırmacılar DNA'yı kesmek yerine gen ifadesini aktive edebilirler. Bu teknikler araştırmacıların genin işlevini incelemesine izin verir. CRISPR konusunda araştırmaların büyük bir ivmeyle devam etmesi, bu tekniğin çeşitli kabiliyetlerinden ve uygulama menzilinin genişliğinden kaynaklanır. Kanser ve genetik hastalıklarının tedavisinde uygulanabilirliği, tarımda bitkilerde ürün geliştirme fırsatları ve belirli patojenleri yeryüzünden silme olanağı CRISPR yöntemini gen manipülasyonunun gözdesi haline getirdi. Bunun yanında düşük maliyeti ve kullanım kolaylığı da CRISPR'ı birçok laboratuvarda çalışmasına imkân verdi. [12] CRISPR-Cas'ın birçok avantajı olduğu gibi optimize edilmesi gereken istenmeyen hedef dışı mutasyonlara sebep olması da bilim insanları için aşılacak bir engel oluşturmaktadır. Gen değiştirmeyle ilgili çalışmalar bilim dünyasında son sürat devam etmektedir. DNA ve RNA hedefli gen değiştirme teknolojileri insanlara genetik hastalıkları önleme gibi haklı gerekçelerin yanında etik olmayan başka uygulamalara da yol açabilir. Tasarım bebekler, sadece asker gücü olarak kullanılacak GDO'lu insanlar ya da insan ırkının yeni bir versiyonu yakın ya da uzak gelecekte karşılaşacağımız CRISPR sonuçları olabilir. Umuyoruz ki, bilim ve teknoloji hayatımızı kolaylaştırmaya devam ederken etik ışığının uzağında kalmaz.

Kaynaklar

1. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4343198/ Hsu, P. D., Lander, E. S., & Zhang, F. (2014, June 5). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering.
2. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012, August 17). A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity.
3. Cong et al., (2013) Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science*, : 819–823. doi:10.1126/science.1231143.
4. R. Barrangou, *et al.*CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes Science, 315 (5819) (2007), pp. 1709-1712
5. . *Dodd, Matthew S.; Papineau, Dominic; Grenne, Tor; slack, John F.; Rittner, Martin; Pirajno, Franco; O'Neil, Jonathan; Little, Crispin T. S. (2 March 2017).* "Evidence for early life in Earth's oldest hydrothermal vent precipitates" (PDF). *Nature. 543 (7643): 60-64*
6. *Scerri, Eleanor M. L.; Thomas, Mark G.; Manica, Andrea; Gunz, Philipp; Stock, Jay T.; Stringer, Chris; Grove, Matt; Groucutt, Huw S.;* Timmermann, Axel*; Rightmire, G. Philip; d'Errico, Francesco (1 August 2018).* "Did Our Species Evolve in Subdivided Populations across Africa, and Why Does It Matter?". *Trends in Ecology & Evolution. 33 (8): 582–594.* doi*:*10.1016/j.tree.2018.05.005. ISSN 0169-5347. PMC 6092560. PMID 30007846
7. Berg, J., Tymoczko, J. and Stryer, L., 2020. *Restriction Enzymes: Performing Highly Specific DNA-Cleavage Reactions*.
8. R. Jansen, *et al.*Identification of a novel family of sequence repeats among prokaryotes OMICS, 6 (1) (2002), pp. 23-33
9. C.R. Hale, *et al.*RNA-guided RNA cleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex Cell, 139 (5) (2009), pp. 945-956
10. Berg, J., Tymoczko, J. and Stryer, L., 2020. *Restriction Enzymes: Performing Highly Specific DNA-Cleavage Reactions*.
11. GEN- Genetic Engineering and Biotechnology News. 2020. *Comparing Genome Editing Technologies*.
12. Doudna, J. and Sternberg, S., 2018. *A Crack In Creation*. London: Vintage, p.109.