

# Koronavirüs (COVID19) ve İnfluenza'nın Profilaktik Tedavisinde CRISPR-CAS13 Sistemlerinin Rolü ve Geliştirilmesi

The Role and Development Of CRISPR-CAS13 Systems in Prophylactic Treatment of Coronavirus (COVID19) and Influenza

Mikail YENİÇERİ\*

## ÖZET

İnfluenza, insanlarda influenza A ve influenza B virüslerinin neden olduğu bulaşıcı bir solunum yolu hastalığıdır. Genellikle yıllık mevsimsel salgınlarla karakterize edilen sporadik salgınları, zoonotik kökenli influenza A virüs suşlarını içerir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), yıllık grip salgınının yaklaşık 1 milyar enfeksiyon, 3-5 milyon ağır hastalık vakası ve 300.000-500.000 ölümlerle sonuçlanmaktadır. İlk olarak Wuhan (Çin) eyaletinde bildirilen, daha önce tanımlanmamış yeni bir Koronavirüs, orta derecede solunum yolu sendromu (MERS) ve Şiddetli Akut Solunum Yolu Sendromu'na (SARS) neden olanların yanı sıra hafif enfektif virüsleri içeren bir virüs ailesidir. Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi göre, virüsün resmi adı artık SARS-CoV-2 ve Koronavirüs hastalığı 2019 (COVID-19)'dur. Kümelenmiş Düzenli Olarak Aralıklı Kısa Palindromik Tekrarlar (CRISPR)-CRISPR ile ilişkili (Cas) sistemleri modern molekül28592086820er biyolojide devrim yaratmıştır. Bugüne kadar bu sistemlerin çok sayıda türü keşfedilmiştir. Şimdiye kadarki tüm CRISPR yaklaşımları DNA'yı hedeflemiştir. Ancak araştırma gruplarınca yapılan çalışmalarda, DNA yerine RNA'yı hedefleyen ve yeni karakterize edilmiş CRISPR ile ilişkili bir enzim kullanarak, haberci RNA'yı (mRNA) hedefleyebilen yeni bir düzenleme aracı geliştirmişlerdir. Bu yaklaşım ile genomu değiştirmeden bir hücrenin gen ekspresyonunda değişiklikler yapmak, genom düzenlemesinin hedef dışı etkileriyle ilişkili riskleri azaltmak için kullanılabilir. CRISPR-Cas13 sistemi, bakterileri virüslerden koruyan bakteriyel bağışıklık sistemine dayanan bir RNA hedefleme ve düzenleme sistemidir. CRISPR-Cas13 sistemi, CRISPR-Cas9 sistemine benzemektedir. Bununla birlikte, DNA'yı hedefleyen Cas-9'un aksine, Cas-13 tek sarmallı RNA'yı hedefler ve ayırır. Cas13, Cas13a ve Cas13b üyeleri, RNA seviyesinde terapötik gen düzeltmesi ve viral patojenlerin (yeni koronavirüs (SARS-CoV-2) gibi bu retrovirüslerin RNA bazlı genomlarında) kullanılabilirliği yönünde geliştirilmektedir. Bu derlemede CRISPR-Cas13 sisteminin profilaktik tedavide kullanılmasının önemi amaçlanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** İnfluenza, COVID-19, CRISPR-Cas13 sistemi

## ABSTRACT

Influenza is an infectious respiratory disease caused by influenza A and influenza B viruses in humans. Sporadic outbreaks, often characterized by annual seasonal outbreaks, include influenza A virus strains of zoonotic origin. The World Health Organization (WHO) results in an annual flu epidemic of approximately 1 billion infections, 3-5 million cases of severe illness, and 300,000-500,000 deaths. A new coronavirus not previously described, first reported in the province of Wuhan (China), is a family of viruses that contain mild infectious viruses, as well as those that cause moderate respiratory syndrome (MERS) and Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS). According to the Center for Disease Control and Protection, the official name of the virus is now SARS-CoV-2 and Coronavirus disease 2019 (COVID-19). Clustered Regularly Intermittent Short Palindromic Repeats (CRISPR) -CRISPR-related (Cas) systems have revolutionized modern molecular biology. Many types of these systems have been discovered to date. All CRISPR approaches so far have targeted DNA. However, in studies by research groups, they have developed a new regulatory tool that can target messenger RNA (mRNA), using a newly characterized CRISPR-related enzyme that targets RNA instead of DNA. With this approach, changes in a cell's gene expression without altering the genome can be used to reduce the risks associated with non-target effects of genome editing. The CRISPR-Cas13 system is an RNA targeting and regulation system based on the bacterial immune system that protects bacteria from viruses. The CRISPR-Cas13 system is similar to the CRISPR-Cas9 system. However, unlike Cas-9, which targets DNA, Cas-13 targets and separates single stranded RNA. Members of Cas13, Cas13a, and Cas13b are being developed at the level of RNA that therapeutic gene correction and viral pathogens can be used (in the RNA-based genomes of these retroviruses, such as new coronavirus (SARS-CoV-2)). In this review, it was aimed to use the CRISPR-Cas13 system in prophylactic treatment.

**Key Words:** Influenza, COVID-19, CRISPR-Cas13 system

## Sorumlu Yazar:

**Adı Soyadı:** Mikail YENİÇERİ

**Adres:** Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, Kırşehir, Türkiye

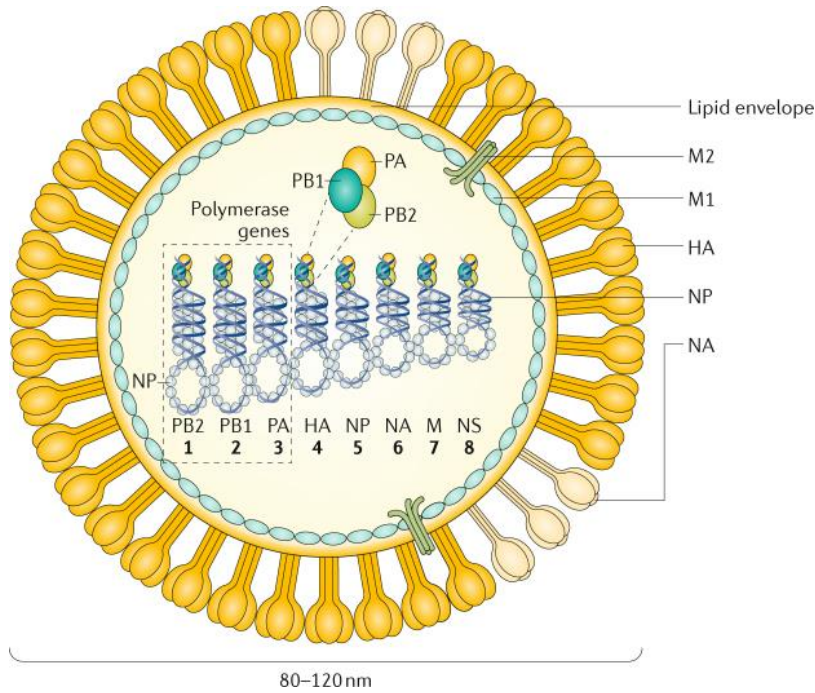
**e-mail:** [myeniceri@ahievran.edu.tr](mailto:myeniceri@ahievran.edu.tr)

\*Yüksek Biyolog, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, Kırşehir, Türkiye

## GİRİŞ

Bulaşıcı bir solunum yolu hastalığı olan İnfluenza; insanlarda, influenza A ve influenza B virüslerinden kaynaklanmaktadır. İnfluenza virüsü enfeksiyonu ile ilişkili semptomlar, ateş, boğaz ağrısı, burun akıntısı, öksürük, baş ağrısı, şiddetli kas ağrısı ile kendini göstermekle beraber bazı durumlarda ölümcül pnömoni veya alt solunum yollarının sekonder bakteriyel enfeksiyonuna neden olmaktadır. <sup>(1)</sup> İnfluenza virüsü enfeksiyonu ayrıca bazı kişilerde solunum yolu dışı komplikasyonlara da neden olabilmektedir. Vakalar kalbi, merkezi sinir sistemini ve diğer organ sistemlerini etkilemektedir. Yıllık mevsimsel salgınlarla karakterize olmasına

rağmen, zoonotik kökenli influenza A virüs suşlarını içeren sporadik ve öngörülemez küresel pandemik salgınlar da ortaya çıkmaktadır. Pandemi influenza her 10-50 yılda bir oluşmakta ve antijenik olarak çok yeni bir influenza A virüs suşunun ortaya çıkması ile karakterize edilmektedir. Daha önce dolaşan suşlardan farklı; olarak, enfeksiyonun ciddiyeti ve mortalitesindeki artış insanlardaki immün sistem eksikliği ile ilişkili olmaktadır. <sup>(2)</sup> İlk olarak Wuhan (Çin) eyaletinde bildirilen ve daha önce tanımlanmamış ancak daha sonra (COVID-19) olarak adlandırılan yeni bir koronavirüs, Coronaviridae familyasına ve Nidovirales sırasına ait ve insanlar ile diğer memelilerde yayılış gösteren, RNA virüsleri olarak tanımlanmıştır.



Şekil 1. İnfluenza virüsünün yapısı <sup>(6)</sup>

İnsan koronavirüs enfeksiyonlarının çoğu hafif olmasına rağmen, iki betakoronavirüsün salgını, (SARS-CoV) ve (MERS-CoV), son yirmi yılda 10.000'den fazla kümülatif vakaya neden olmuş ve SARS-CoV için mortalite oranı %10 ve MERS-CoV içinde %37 olmuştur. Yeni Koronavirüs, MERS ve SARS virüsleri ile aynı aile içerisinde bulunmaktadır. Koronavirüs bulaşması, enfekte bir kişiden solunum damlacıklarının solunma-

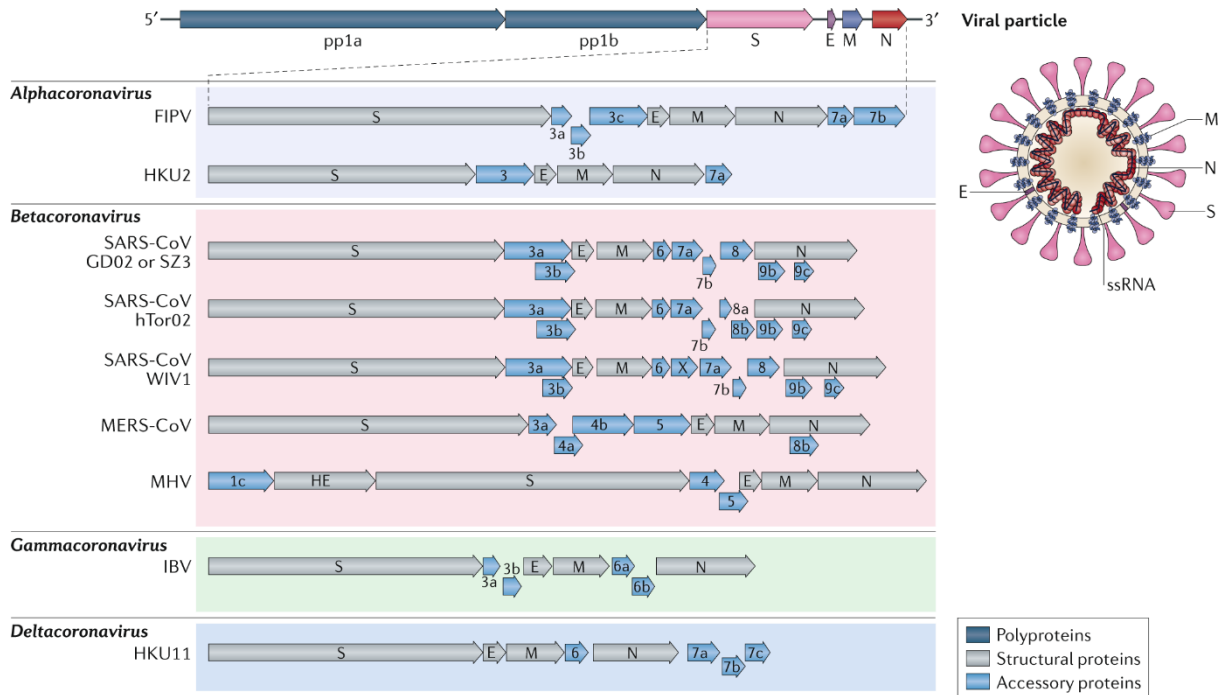
sıyla gerçekleşmekte, aynı aileden gelen virüsler enfektiviteleri ve şiddetleri açısından büyük ölçüde farklılık gösterebilmektedirler. Bundan dolayı yeni koronavirüsün halk sağlığı için tehlikesini tahmin etmek zorlaşmaktadır. <sup>(3,4)</sup> Kümelenmiş Düzenli Olarak Aralıklı Kısa Palindromik Tekrarlar (CRISPR), CRISPR ile ilişkili (Cas) (CRISPR-Cas) sistemler Prokaryotlardan kaynaklanmakta olup, faj ve plazmidler gibi mobil genetik

elementlere karşı savunma mekanizması olarak hizmet etmektedirler. Bu sistemler iki bileşenden oluşmaktadır. Birincisi, CRISPR adı verilen genomik bir lokustur. CRISPR-Cas sistemlerinin ikinci bileşeni Cas proteinleridir. Bunlar genellikle bir CRISPR dizisinin yakınında bulunan cas genleri tarafından kodlanır. Cas proteinleri CRISPR -Cas sistemlerinde efektör rol oynamaktadır. (5)

## İnfluenza Virüsü'nün Yapısı

Tüm influenza virüsleri, segmentlere ayrılmış bir genomu olan negatif-negatif tek-sarmallı RNA virüsleridir. İnfluenza A ve influenza B virüsleri, RNA polimeraz alt birimlerini, viral glikoproteinleri (hemagglutinin (HA),

viral girişi kolaylaştıran yapılar) ve nöraminidazı (NA), (viral salınımı kolaylaştıran) kodlayan sekiz RNA segmenti içermektedir. Ayrıca viral nükleoprotein (NP), matris proteini (M1) ve membran proteini (M2), yapısal olmayan protein NS1 ve nükleer taşıyıcı proteini (NEP) de içermektedir (Şekil 1). (6) HA ve NA viral proteinleri antijenik olarak değişkendir ve antijenik olarak çeşitli alt tiplere sınıflandırılmaktadır. Her influenza virüsü izolatu, tipine veya cinsine, konakçıya ve izolasyon yerine, izole sayısı ve izolasyon yılına göre adlandırılmaktadır. İnfluenza C ve influenza D virüsleri sadece yedi RNA segmentleri içermekte ve insanlarda önemli hastalığa neden olmamaktadırlar.



Şekil 2. Farklı koronavirüslerin genomları, genleri ve proteinleri (8)

Bununla birlikte, influenza C virüs enfeksiyonları, özellikle çocuklarda, bazı durumlarda influenza benzeri hastalıklara ve hastaneye yatışlara neden olabilmektedir. A ve B tipi influenza virüsü enfeksiyonları, dünya çapında yaklaşık yarım milyon ölüme yol açan yıllık mevsimsel salgınlardan sorumlu olan virüslerdir. (7)

## Koronavirüs'ün Yapısı

Koronavirüsler, Koronaviridae ailesindeki Koronavirinae alt ailesinin ve Nidovirales (Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi) takımının üyeleridir. Bu alt aile, filogenetik ilişkileri ve genomik yapıları temelinde Alphacoronavirus, Betacoronavirus, Gammacoronavirus ve Deltacoronavirus olmak üzere dört cinsten oluşur. Yeni keşfedilen SARS-CoV-2'de dâhil bütün koronavi-

rüsler (CoV), virion yüzeyinden çıkıntı yapan başak proteinleri ile karakterize edilen küresel pozitif tek iplikli RNA virüsleridir. Küresel viral partikülün sivri çıkıntılarla birlikte morfolojisi, virüsün altında kraliyet tacı olarak görünmesi nedeniyle, korona anlamına gelen taç kelimesinden koronavirüs isminin verilmesine yol açmıştır. Elektron mikroskobu görüntüsünde CoV'ler, esas olarak sivri uç (S) gibi yapısal proteinlerden oluşan viral yapıya sahip zarflı virüslerdir (zarf, konakçı hücre zarından türetilen bir lipid çift tabakasıdır) (Şekil 2).<sup>(8)</sup> Bazı betakoronavirüslerde S proteini, membran (M), zarf (E) ve nükleokapsid (N) proteinleri ve hemaglutinin-esteraz (HE) proteinlerinin hepsi viral zarfa gömülü olarak bulunabilmektedir. N proteini viral partikülün çekirdeğinde bulunur ve viral RNA ile etkileşerek nükleokapsidi oluşturmaktadır. S proteini, homotrimerik sivri uçlar oluşturan ağır glikozile edilmiş bir proteindir. Viral partikülün yüzeyinde bulunmakta ve konakçı hücrelere viral giriş için aracılık etmektedir. Bazı CoV'lerde, homotrimerik S proteini iki alt birim (S1 ve S2) olarak bulunur. S proteini viral replikasyon sırasında konakçıda bulunan furin-benzeri proteazlar tarafından bozulmaktadır. Bununla birlikte, SARS-CoV dahil diğer CoV'lerde, S proteini S1 ve S2 bölgelerini oluşturmakta, viral partiküller üzerinde bozulmadan kalmakta ve viral giriş sırasında sadece endositik veziküllerin içinde bölünmektedir. M proteini, virion yapısındaki en önemli proteinlerden biridir. Olgun viral zarfların oluşturulmasında E proteini, diğer fonksiyonlara ek olarak konakçı hücrelerden viral partiküllerin salınmasında da işlev görmektedir.<sup>(9)</sup> HE bazı betakoronavirüslerin yüzeyinde bulunur. İnfluenza virüsü hemaglutininine benzer olarak konak hücre yüzeyi glikoproteinlerine siyalik asidi bağlamakta ve asetil-esteraz aktivitesine sahiptir. Viral yapıda bulunan HE proteini koronavirüslerde konak hücreye girişi ve patogenezi arttırmaktadır.<sup>(10)</sup>

## **İnfluenza ve Koronavirüsün Benzer Özellikleri**

### **Virolojik ve epidemiyolojik benzerlikleri**

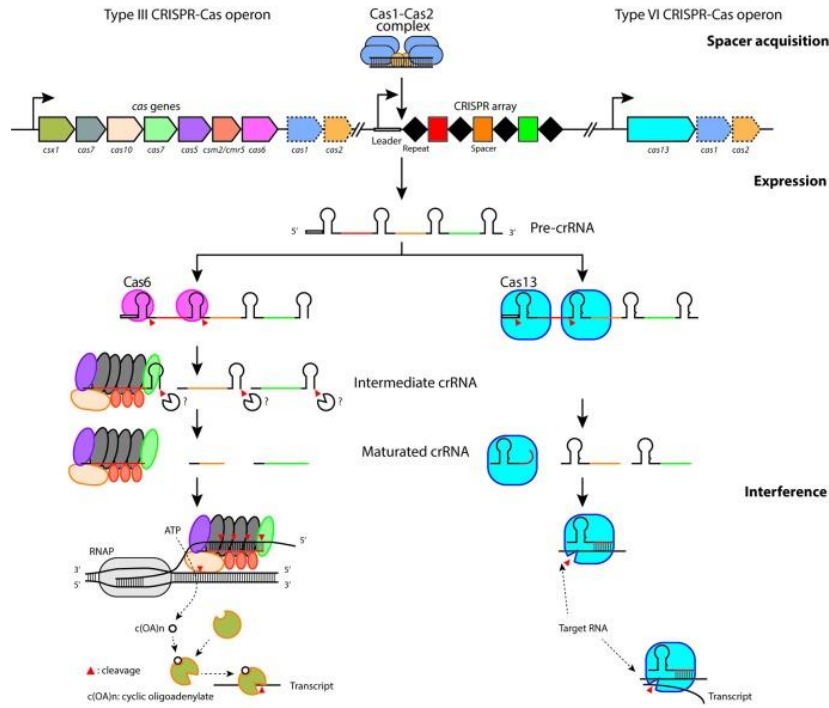
Hem koronavirüs hem de influenza, tek sarmallı, zarflı RNA virüsleridir. Her iki virüsün farklılıkları genomlar açısından değerlendirilmekte ve influenza virüsü, 8 tek sarmallı negatif anlamlı viral RNA segmentinden oluşurken, SARS-CoV-2, tek sarmallı, segmentsiz, pozitif anlamda bir viral RNA'dan oluşmaktadır. SARS-CoV-2 60 ila 140 nm arasında bir çapa sahiptir.<sup>(11)</sup> SARS-CoV-2, S proteinleri ve insan anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE2) reseptör kompleksi arasındaki etkileşimler yoluyla insan solunum epitel hücrelerini enfekte edebildiği için, bu virüsün insanları enfekte etme konusunda güçlü bir yeteneği vardır.<sup>(12)</sup> SARS-CoV-2'ye benzer şekilde influenza, yüksek enfektivite özelliklerine, yüksek insidansa, ve kolay mutasyona sahiptir. SARS-CoV-2'ye benzer şekilde, insan influenza virüsleri esas olarak solunum yolu epitelinde çoğalarak viral proteinlerin üretimini başlatmaktadır. Viral replikasyon etkinliği hücre tipine bağlı olarak değişirken, insanlarda hemaglutinin (HA) moleküllerinin etkili bir şekilde bölündüğü ve bulaşıcı virüs partikülleri ürettiği tek bölge solunum epitelidir.<sup>(13)</sup> COVID-19'un kuluçka süresi 24 güne kadar değişmektedir.<sup>(14)</sup> Fakat genellikle 4 ila 6 gün arasındadır. Yapılan çalışmalarda COVID-19 için ortalama kuluçka süresinin 4 gün olduğu bildirilmiş,<sup>(15)</sup> diğer bir çalışmada ortalama kuluçka süresi 5,2 gün olarak tahmin edilmiştir.<sup>(16)</sup> İnflüzanın kuluçka süresi 1 ile 7 gün arasında değişme beraber, genellikle 2 gün olduğu bildirilmiştir.<sup>(17)</sup>

### **Klinik benzerlikler**

COVID-19 ile enfekte kişiler genellikle erken evrelerde soğuk algınlığına benzer hafif üst solunum yolu enfeksiyonu semptomları göstermektedir.<sup>(18)</sup> Vakaların %60 ila %70'inde kuru öksürük, yorgunluk ve nefes darlığı gibi semptomlar görülmektedir. Kas ağrısı, deliryum, baş ağrısı, boğaz ağrısı, tıkanıklık, göğüs ağrısı, ishal, mide bulantısı ve kusma gibi semptomlar nispeten

nadirdir ve vakaların yaklaşık %1 ila %11'inde görülür. (19) İnfluenza yüksek ateş, titreme, baş ağrısı, kas ağrısı, rahatsızlık ve iştahsızlık gibi çeşitli sistemik semptomlar ve ayrıca öksürük, tıkanıklık ve boğaz ağrısı gibi solunum semptomları ile karakterize edilmektedir. En yaygın semptomlar, vakaların %60-80'inde görülen yüksek ateş ve öksürüktür. İshal nispeten nadirdir ve vakaların yaklaşık %2,8'inde meydana gelmektedir.

Ateş vücut sıcaklığının ilk 24 saat içinde potansiyel olarak 41°C'ye ulaştığı influenzada en önemli ve yaygın semptomdur. (20) İnfluenza, hipertermiye (sıcak çarpması) neden olma eğiliminde olup, ayrıca fotofobi (ışık hassasiyeti), konjonktivit, yırtılma ve göz hareketlerinde ağrı gibi göz semptomları olarak kendini gösterebilmektedir. (21)



Şekil 3. Tip III ve tip VI CRISPR-Cas sistemlerinin üç aşamasına genel bakış (38)

### CRISPR-Cas sistemleri

CRISPR-Cas sisteminde, CRISPR; düzenli aralıklarla bölünmüş palindromik tekrar kümelerini, Cas ise; ilişkili genleri ifade etmekte olup, bu sistem prokaryotlarda ve arkelerde nükleik asit tabanlı bağışıklık sisteminin temel bileşenleridir. (22) CRISPR adı verilen genomik bir lokus daha önce karşılaşılan genetik elemanların tanınmasını sağlayan ve bir dizi yabancı kaynaklı kısa diziler içermektedir. Cas proteinleri genellikle bir CRISPR dizisinin yakınında bulunan cas genleri tarafından kodlanmaktadır. Cas proteinleri CRISPR-Cas sistemlerinde önemli bir rol oynamaktadır. (23) CRISPR-Cas sistemlerinin mekanizması; adaptasyon, ekspresyon ve interferans olmak üzere üç aşamadan oluşmak-

tadır. **Adaptasyon aşamasında**, konakçıya ait nükleik asitlerden yeni aralayıcı DNA bölgelerinin CRISPR lokusuna kazandırılması aşaması olup, bu aşamada adaptasyonunun gerçekleşmesi için; birer nükleaz olan Cas1 ve Cas2 proteinlerine gerek duyulmaktadır. Adaptasyon aşamasında, PAM (Protospacer Adjacent Motif=Protoaralık Bitişik motif) dizileri önemli ve gereklidir. **Ekspresyon aşamasında ise**; CRISPR bölgesinden sentezlenen pre-crRNA, Cas genlerinin aktivasyonu ile pre-crRNA'dan olgun ve fonksiyonel crRNA oluşturulması aşamasıdır. Ayrıca bu aşamada enzim mekanizmaları ile gerekli olan proteinler açısından farklılıklar olabilmektedir. **İnterferans aşaması**, ekspresyon aşamasında meydana gelen olgun

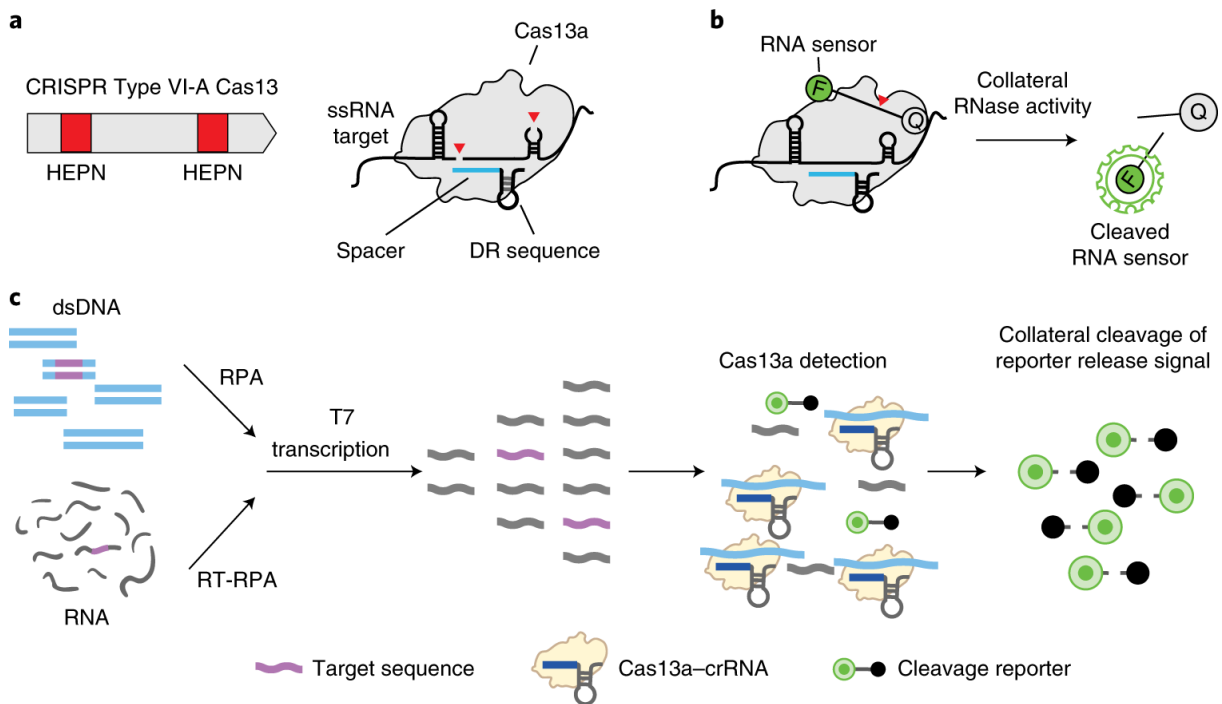
crRNA'nın Cas proteinleri ile oluşturduğu ribonükleoprotein yapısı crRNP'nin, hedef DNA'da bulunan PAM dizisi ile aralayıcı DNA'nın 5'ucundaki çekirdek dizisini ((seed sequence)7–8 bç.'lik bir bölge) tanımasıyla, hedef dizinin parçalanacağı basamaktır. (24)

## CRISPR Lokusunun Bileşenleri

### a) Palindromik tekrar dizileri

CRISPR lokusunda palindromik tekrar dizilerinin dizi uzunluğu ve dizi içeriği büyük oranda korunmasına rağmen; türler arasında farklılık görülmektedir. Bu diziler

lerin uzunlukları 24–47 baz çifti (bç) arasında değişmekte ve içeriğinde genellikle kısa 5–7 nt. (nükleotit) lik palindromik tekrar dizileri bulunmaktadır. Palindromik diziler, RNA stemloop (sap ilmik) ikincil yapısının (hairpin) oluşumuna katkıda bulunan durağan, yüksek oranda korunmuş diziler iken; CRISPR bölgesindeki tekrar bölgeleri birkaç tane veya yüzlerce olabilmektedir. (25)



Şekil 4. Cas13 kompleksi ve tamamlayıcı etkinliği (44)

### b) Aralayıcı (Spacer) DNA bölgeleri

Tekrar dizileri "Aralayıcı DNA" olarak isimlendirilen spesifik benzersiz dizilerce birbirinden ayrılmaktadır. CRISPR lokusunun hiper değişken elemanları olan bu dizilerin uzunluğu 26–72 bç arasında değişmektedir. Aralayıcı DNA'ların kaynağı plazmitlerin veya virüslerin nükleik asitleridir14–16; bu proto-aralıklar tipik olarak, korunmuş kısa 2–5 nt'lik PAM dizilerine bitişiktir. Bir genomda bulunan aralayıcı DNA lokusu, tek veya daha fazla sayıda olabilmektedir. (26) Bu aralayıcı DNA'lar prokaryotlardaki adaptif bağışıklık sisteminin merkezi

bileşenidir; özgül DNA dizilerinden oluşurlar ve kazanılmış bağışıklık mekanizmasının belleğini oluştururlar. Özelleşmiş bir genetik bellek olarak işlev yapan aralayıcı DNA dizileri, tanıma dizisi bulunan virüslerin, konakçıyı enfekte etmesini engellemekle yükümlüdür. (27)

### c) Lider dizisi

Lider dizisi, kodlanmayan, yaklaşık 500 nt içeren CRISPR lokusunun 5'ucunda bulunan Adenin ve Timin nükleotidlerce zengin bir dizidir; dolayısıyla transkripsiyonun başlama noktasıdır. (28) Lider dizisinin açık okuma çerçevesi yoktur ve türler arasında korunmaz.

CRISPR lokusuna yeni eklenecek olan Aralayıcı DNA'lar, lider dizisinin bulunduğu proksimal uçtan eklenmektedir. (29)

#### d) Cas genleri

Bu genler genellikle CRISPR dizilerinin yakınında bulunmakta olup, Cas proteinlerini kodlamaktadırlar. Cas proteinleri çeşitli nükleaz (endonükleaz, ekzonükleaz, helikaz gibi) özellikleri ve nükleik asitler için bağlanma bölgeleri (domainleri) taşımaları nedeniyle, DNA dizilerini açıp kesebilirler. (30) Ayrıca Cas genleri, aralayıcı DNA'ların CRISPR lokusuna entegre olmasını, crRNA'ların transkripyonu ve işlenmesi, crRNA'ların hedef DNA'ya yönlendirilmesiyle konakçı hedef DNA'nın parçalanması gibi CRISPR aracılı immünitenin çeşitli aşamalarında görev almaktadırlar. (31)

CRISPR-Cas sistemlerinin keşfi modern moleküler biyolojide devrim yaratmıştır. Benzersiz mekanizmalarının yanında en önemlisi tanınan sekans açısından oldukça spesifiktirler. (32) Ayrıca, bu özgülükleri sebebiyle, crRNA'yı kodlayan dizinin modifiye edilmesiyle kolayca değiştirilebilmektedirler. CRISPR'in modüler yapısı bu değişiklikleri daha da kolaylaştırmaktadır. CRISPR-Cas sistemleri için uygulama aralığı, Cas proteinlerinin değiştirilmesi ile daha da genişletilebilmektedir. (33) Bugüne kadar açıklanan CRISPR-Cas sistemlerinin çoğu DNA dizilerini hedefleyen sistemler olup, bunlar arasında, CRISPR-Cas9'un araştırma ve biyoteknoloji için geliştirilmesi en uygun omurga olduğu kanıtlanmıştır. Bunun en önemli nedenlerinden biri, Cas9'un faaliyeti için sadece bir Cas proteini gerektirmesidir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda RNA'yı hedefleyen birkaç yeni CRISPR-Cas sistemi keşfedilmiştir. (34)

### RNA Hedefli CRISPR-Cas Sistemlerine Genel Bakış

#### Tip III (Cmr/Csm) Sistemleri

Tip III sistemleri sınıf 1 CRISPR-Cas sistemleridir. Bu sistemde pre-crRNA'dan olgun crRNA'ların elde edilmesinde, endonükleaz özelliğine sahip olan Cas6 pro-

teini kullanılmaktadır. (35) CRISPR/Cas Tip III sistemi; Tip III-A ve Tip III-B olmak üzere iki alt tipe ayrılmaktadır. (36) Tip III-A DNA moleküllerini parçalarken, Tip III-B ise RNA molekülünü parçalamaktadır. Her iki durumda da hedefleme, RAMP süper ailesi üyesi (Repeat-Associated Mysterious Proteins Super Family), özel bir Cas gen grubuna dahil olan Csm-Cmr proteinleriyle gerçekleşmekte; Tip III-A'da Cas10-Csm kompleksi görev alırken, Tip III-B'de Cas RAMP (Cmr) kompleksi görev yapmaktadır. (37)

#### Tip VI (Cas13) Sistemleri

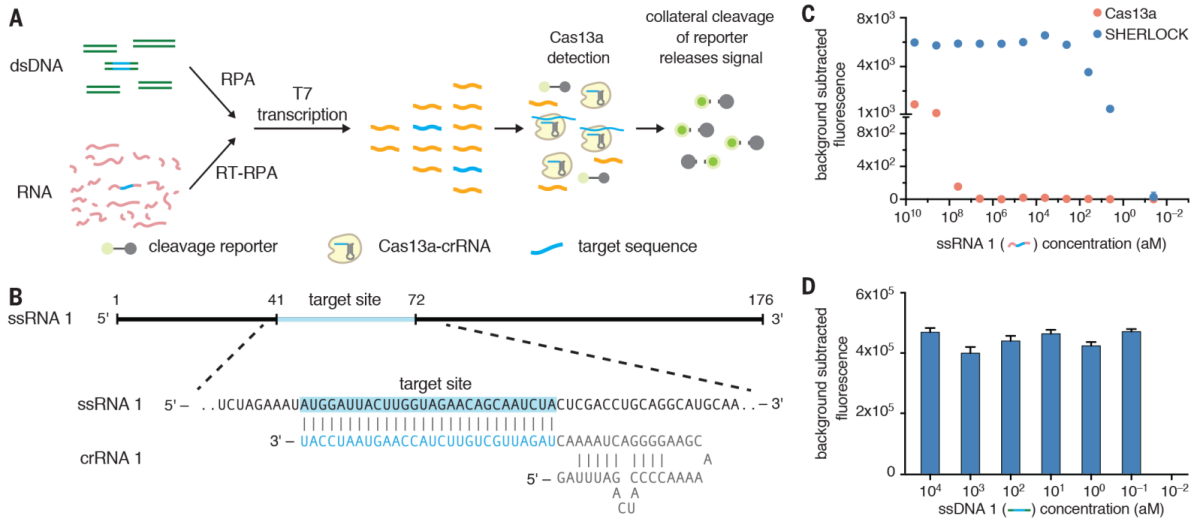
Tip VI CRISPR-Cas sistemleri, aktivite için sadece bir Cas13 proteini ve crRNA molekülüne ihtiyaç duyduklarından nispeten basit bir yapıdadırlar. Bugüne kadar dört alt tipi ayırt edilmiştir: VI-A (Cas13a varyantını kullanan, alternatif olarak C2c2 olarak bilinir), VI-B (Cas13b/C2c6), VI-C (Cas13c/C2c7) ve VI-D (Cas13d) (Şekil 3). (38) Bu alt tiplerin Cas13'leri boyut ve sekans bakımından farklılık gösterse de, hepsi iki HEPN (yüksek ökaryotlar ve prokaryotlar nükleotid bağlayıcı) alanının varlığı olan ortak bir özelliği paylaşmaktadır. Bu alanlar RNA hedefli nükleolitik aktiviteden sorumludur. HEPN alanları genellikle Cas13 proteininin farklı terminal uçlarına yakın yerleştirilmektedir. Genel olarak, pre-crRNA'nın crRNA'ya işlenmesi, Cas13 tarafından, diğer konakçı faktörlerin yardımı olmadan bağımsız bir şekilde (tip VI-D hariç) gerçekleştirilmektedir. (39)

Bazı araştırmacılar, spesifik olmayan RNA klevajının nedeni olarak, tüm RNA'nın temizlenmesi ve böylece faj replikasyonunun engellenmesi veya komşu hücreleri korumak için hücre ölümünü indükleyerek bakteriyofaj enfeksiyonu ile başa çıkmak olduğunu ileri sürmüşlerdir. (40) Diğer CRISPR-Cas tiplerine benzer şekilde, VI tipi sistemler, bir emniyet kilidi mekanizması kullanmaktadır. Bazı Cas13 varyantlarının nükleolitik aktivitesi, diğer proteinler tarafından modüle edilebilmektedir. Örneğin, iki proteinin Csx27 (baskılayıcı) ve Csx28'in (stimülatör) Cas13b aktivitesini düzenlediği çalışmalarda gösterilmiştir. (41)

## Tip VI (Cas13) Bazlı Uygulamalar

Cas13 sistemi birden fazla uygulama için bir temel haline gelmiştir. Bakterilerde, bitki hücrelerinde ve çeşitli memeli hücrelerinde RNA'nın yıkılması için kullanılmıştır. (42) Cas13'ün kollateral RNaz aktivitesi bak-

teriyel çalışmalarda gözlenirken, ökaryotik hücreler kullanan araştırmacılar böyle bir aktivite rapor etmemiştir. Cas13 ile ilişkili tamamlayıcı RNA klevajı bazı araştırmacılar tarafından bir dezavantaj olarak düşünülmektedir. (43) Bununla birlikte, bazı uygulamalarda da faydalı olabilmektedir.



Şekil 5. Tipik bir tip III CRISPR-Cas kompleksinin yapısal düzenlemesi (45)

DNA ve RNA'nın in vitro tespit yöntemi için yüksek hassasiyetli enzimatik raportör kilidini açma (SHERLOCK) adı verilen bir sistem bu duruma bir örnektir. Bu yöntemde, nükleik asit numunesi, RNA örnekleri için ters transkripsiyon ile birleştirilen rekombinaz polimeraz amplifikasyonu kullanılarak dsDNA'ya amplifiye (çoğaltma) edilir. Elde edilen dsDNA, ssRNA transkriptleri T7 polimeraz için bir şablon görevi görmektedir. Daha sonra bu transkriptler Cas13 taraması ve tanınmadan sonra, Cas13 aktif hale gelmekte ve kollateral RNaz aktivitesi yoluyla ayırılma meydana gelmektedir (Şekil 4). (44) SHERLOCK yöntemi oldukça spesifik ve hassas olup, Zika ve Dang virüslerinin genomik fragmanlarının tespitinde başarıyla uygulanmıştır (Şekil 5). (45) SHERLOCK yöntemi, multipleks algılamaya izin vermek için daha da geliştirilmiştir (SHERLOCKv2). Bu, Cas13'ün çoklu varyantları birleştirilerek elde edilmiştir. Her varyant RNA yarılrken farklı bir motifi (AU, AC, UC veya GA gibi) tercih etmektedir. Sinyal gücünü artırmak için SHERLOCKv2, Cas13 tarafından alloste-

rik olarak aktive edilen bir Csm6 proteini kullanır. RNA yıkımına ek olarak, Cas13, RNA izleme ve RNA düzenlemesinde de başarıyla kullanılmıştır. Katalitik olarak inaktif bir Cas13 (dCas13a) geliştirilmiş ve RNA immünopresipitasyonunda (İmmün-çöktürme) ve RNA görüntülemeye kullanılmıştır. crRNA ile ilgili araştırmalarda başka bir inaktif Cas13 (dCas13d) kullanılmıştır. mRNA birleştirme işleminin crRNA güdümlü regülasyonu ile ilgili bir araştırmada başka bir inaktif Cas13 (dCas13d) kullanılmıştır. (46) Etkin olmayan Cas13 kullanan teknolojinin bir başka örneği programlanabilir A-to-I Değişimi için RNA Düzenleme'dir (REPAIRv1). Bu sistemde, pasif tip VI Cas13 (dCas13b), RNA (ADAR) enzimlerine, yani ADAR1 ve ADAR2'ye etki eden insan adenosin deaminaz ile birlikte kaynaştırılmıştır. Bu durum, tamamlayıcı baz eşleştirmesi sırasında bir guanin olarak kabul edilen adenosinin inosin ile programlanabilir şekilde değiştirilmesini sağlamıştır. Dolayısıyla, fonksiyonel perspektiften bu, seçilen bir mRNA bölgesi içinde A'dan G'ye bir nokta mu-



tasyonu olarak düşünülebilir. A-to-I değiştirme, seçilen bir genin translasyonunun geçici olarak değiştirilmesine izin vermektedir. Bu sistemin özgüllüğü, ADAR2 dizisi (REPAIRv2) içine bir mutasyon eklenerek daha da geliştirilmiştir. (47)

## SONUÇ VE ÖNERİLER

CRISPR-Cas sistemlerinin tip II (Cas9), III (Cmr/Csm) ve VI'nın (Cas13) RNA hedefleme aktivitesinin tanımlanması, bu sistemler için potansiyel uygulama aralığını önemli ölçüde genişletmiştir. Belirli RNA'ların izlenmesi, hedeflenmesi veya düzenlenmesi, yeni tedavilerin hem araştırılmasını hem de geliştirilmesini kolaylaştırmaktadır. RNA hedefleyen CRISPR-Cas sistemleri potansiyel klinik uygulamaları içermektedir, ancak bunlarla sınırlı olmayıp; çeşitli nükleik asitlerin hızlı tespiti, G-A mutasyonları ile ilişkili hastalıkların RNA düzenlenmesi ile tedavisi, RNA yıkma işlemi kullanılarak yanlış mRNA ekleme ile ilgili genetik hastalıkların tedavisinde yüksek verimli ilaç keşfi açısından önemlidir.

## KAYNAKLAR

- Sellers SA, Hagan RS, Hayden FG, Fischer WA. The hidden burden of influenza: A review of the extra-pulmonary complications of influenza infection. *Influenza Other Respir. Viruses.* 2017;11:372-393.
- Kwong JC, Schwartz KL, Campitelli MA, Chung H, Crowcroft NS, Karnauchow T, et al. Acute myocardial infarction after laboratory-confirmed influenza infection. *N. Engl. J. Med.* 2018;378:345-353.
- Forni D, Cagliani R, Clerici M, Sironi M. Molecular Evolution of Human Coronavirus Genomes. *Trends Microbiol.* 2017;25:35-48.
- Ashour HM, Elkhatib WF, Rahman MM, Elshabrawy HA. Insights into the Recent 2019 Novel Coronavirus (SARS-CoV-2) in Light of Past Human Coronavirus Outbreaks. *Pathogens.* 2020;9(3):186.
- Burmistrz M, Krakowski K, Krawczyk-Balska A (2020). RNA-Targeting CRISPR-Cas Systems and Their Applications. *Int. J. Mol. Sci.* 21:1122.
- Krammer F, Smith G, Fouchier R, Peiris M, Kedzierska K, Doherty PC, et al. Influenza. *Nat Rev Dis Primers.* 2018;4:3.
- Izaguirre G. The Proteolytic Regulation of Virus Cell Entry by Furin and Other Proprotein Convertases. *Viruses.* 2019;11:837.
- Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol.* 2019;17(3):181-192.
- Kannan S, Shaik Syed Ali P, Sheeza A, Hemalatha K. COVID-19 (Novel Coronavirus 2019)-recent trends. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2020;24(4):2006-11.
- Yan R.; Zhang, Y.; Li, Y.; Xia, L.; Guo, Y.; Zhou, Q. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science.* 2020;367:1444-1448.
- Zhu N, Zhang DY, Wang WL, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med.* 2020; 382(8):727-733.
- Huang CL, Wang YM, Li XW, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 2020; 395(10223):497-506.
- Tolksdorf K, Buda S, Schuler E, et al. Influenza associated pneumonia as reference to assess seriousness of coronavirus disease (COVID-19). *Euro Surveill.* 2020;25(11):2000258.
- Wang DW, Hu B, Hu C, et al. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China. *JAMA.* 2020;323(11):1061-1069.
- Guan WJ, Ni ZY, HuY, et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *N Engl J Med.* 2020;382(18):1708-1720.
- Zhang JJ, Litvinova M, Wang W, et al. Evolving epidemiology and transmission dynamics of coronavirus disease 2019 outside Hubei province, China: a descriptive and modelling study. *Lancet Infect Dis.* 2020;20(7):793-802.
- Virlogeux V, Li M, Tsang TK, et al. Estimating the Distribution of the Incubation Periods of Human Avian Influenza A(H7N9) Virus Infections. *Am J Epidemiol.* 2015;182(8):723-729.
- Chan KW, Wong VT, Tang SCW. COVID-19: an update on the epidemiological, clinical, preventive and therapeutic evidence and guidelines of integrative Chinese-Western medicine for the management of 2019 novel coronavirus disease. *Am J Chin Med.* 2019;48(3):737-762.
- Chen NS, Zhou M, Dong X, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet.* 2020; 395(10223):507-513.
- Long SS, Pickering LK, Prober CG. *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*, 4th Ed. Elsevier, Edinburgh, USA. 2012.
- Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, 8th Ed. Elsevier, Philadelphia, USA. 2015.
- Gün Gök, Z. & Çağdaş Tunalı, B. *Biology, Mechanism and Applications of CRISPR-Cas Immune System.* *Int. J. Eng. Res. and Dev.* 2016;8(2):11-21.
- Marraffini LA. CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. *Nature.* 2015;526:55-61.

24. Manghwar H, Lindsey K, Zhang X, Jin S. CRISPR/Cas System: Recent Advances and Future Prospects for Genome Editing. *Trends Plant. Sci.* 2019;24:1102-1125.
25. Gümüş N, Kaymaz BT. Genom Düzenlemede CRISPR/Cas9 Çağı ve Lösemideki Uygulamaları. *Kafkas Tıp Bil Derg.* 2018;8(3) 232-248.
26. Barrangou R, Marraffini LA. CRISPR-Cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Molecular Cell.*2014;54(2):234-44.
27. Makarova KS, Wolf YI, Koonin EV. Classification and Nomenclature of CRISPR-Cas Systems: Where from Here? *Cris. J.* 2018;1:325-336.
28. Pul Ü, Wurm R, Arslan Z, Geissen R, Hofmann N, Wagner R. Identification and characterization of *E. coli* CRISPRCas promoters and their silencing by H-NS. *Mol Microbiol.* 2010; 75(6):1495-512.
29. Hale CR, Majumdar S, Elmore J, Pfister N, Compton M, Olson S, et al. Essential Features and Rational Design of CRISPR RNAs that Function with the Cas RAMP Module Complex to Cleave RNAs. *Mol Cell.* 2012;45(3):292-302.
30. 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 Res.* 2011;39(21):9275–82.
31. Spilman M, Coccozaki A, Hale C, Shao Y, Ramia N, Terns R, et al. Structure of an RNA Silencing Complex of the CRISPR-Cas Immune System. *Mol Cell.* 2013;52(1):146–52.
32. Valenti MT, Serena M, Carbonare LD, Zipeto D. CRISPR/Cas system: An emerging technology in stem cell research. *World J. Stem Cells.* 2019;11:937-956.
33. Khanzadi MN, Khan AA. CRISPR/Cas9: Nature's gift to prokaryotes and an auspicious tool in genome editing. *J. Basic Microbiol.* 2019.
34. Brezgin S, Kostyusheva A, Kostyushev D, Chulanov V. Dead Cas Systems: Types, Principles, and Applications. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20:6041.
35. Makarova KS, Wolf YI, Koonin E V. The basic building blocks and evolution of CRISPR-Cas systems. *Biochem Soc Trans.* 2013;41(6):1392-400.
36. Jiang F, Doudna JA. The structural biology of CRISPR-Cas systems. *Curr Opin Struct Biol.* 2015;30:100-11.
37. Hatoum-Aslan A, Maniv I, Marraffini LA. Mature clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats RNA (crRNA) length is measured by a ruler mechanism anchored at the precursor processing site. *Proc Natl Acad Sci.* 2011; 108(52):21218–22.
38. Zhu Y, et al. Shooting the messenger: RNA-targeting CRISPR-Cas systems. *Biosci. Rep.* 2018;38.
39. Liu L, Li X, Ma J, Li Z, You L, Wang J, et al. The Molecular Architecture for RNA-Guided RNA Cleavage by Cas13a. *Cell.* 2017;170:714-726.
40. Zhang B, Ye Y, Ye, W, et al. Two HEPN domains dictate CRISPR RNA maturation and target cleavage in Cas13d. *Nat Commun.* 2019;10:2544.
41. Smargon AA, Cox D, Pyzocha NK, Zheng K, Slaymaker IM, Gootenberg JS, et al. Cas13b Is a Type VI-B CRISPR-Associated RNA-Guided RNase Differentially Regulated by Accessory Proteins Csx27 and Csx28. *Mol. Cell.* 2017;65:618-630.
42. Khosravi S, Ishii T, Dreissig S, Houben A. Application and prospects of CRISPR/Cas9-based methods to trace defined genomic sequences in living and fixed plant cells. *Chromosome Res.* 2020;28:7-17.
43. Dugar G, Leenay RT, Eisenbart SK, Bischler T, Aul BU, Beisel CL, et al. CRISPR RNA-Dependent Binding and Cleavage of Endogenous RNAs by the *Campylobacter jejuni* Cas9. *Mol. Cell.* 2018;69:893-905.
44. Kellner MJ, Koob JG, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Zhang F. Author correction: SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases. *Nat Protoc.* 2020;15:1311.
45. Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, Essletzbichler P, Dy AJ, Joung J, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science.* 2017;356:438-442.
46. Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Kellner MJ, Joung J, Collins JJ, Zhang F. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *Science.* 2018;360(6387):439-444.
47. Cox DBT, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, et al. RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science.* 2017;358(6366):1019-1027.