

Gen Düzenlemenin Altın Çağı

CRISPR SİSTEMİ

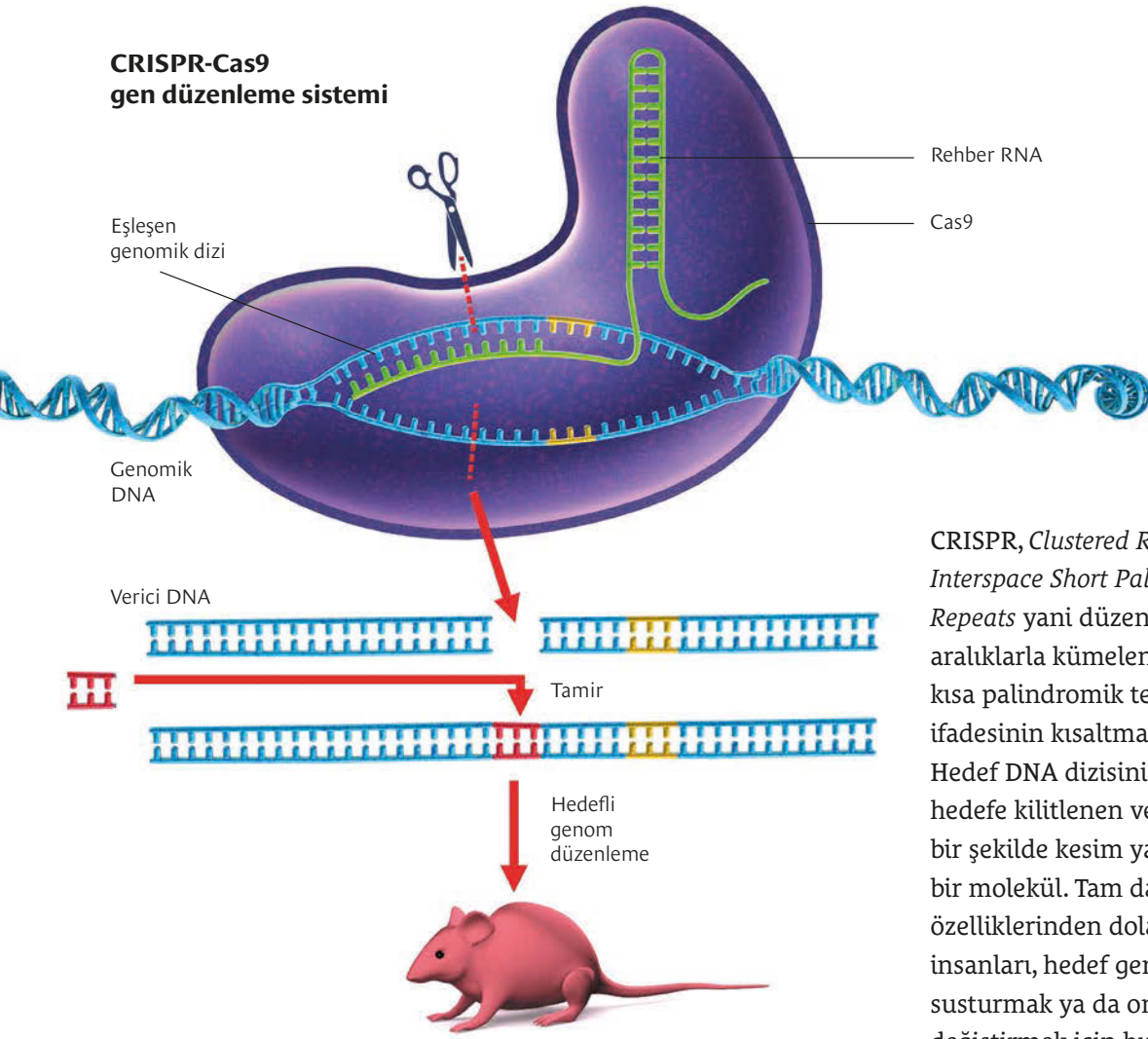
Elanur Yılmaz [*Araştırma Görevlisi - Akdeniz Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı*]

**Geçtiğimiz beş yıl içinde,
bilim camiasının tam ortasına düşen
CRISPR molekülü, gen düzenlemenin
altın çağını başlattı.**

**Peki, neydi bu CRISPR?
Nereden geliyor, nasıl çalışıyordu?**



CRISPR-Cas9 gen düzenleme sistemi



CRISPR, *Clustered Regular Interspace Short Palindromic Repeats* yani düzenli aralıklarla kümelenmiş kısa palindromik tekrarlar ifadesinin kısaltması. Hedef DNA dizisini bulan, hedefe kilitlenen ve hassas bir şekilde kesim yapan bir molekül. Tam da bu özelliklerinden dolayı bilim insanları, hedef genleri susturmak ya da onları değiştirmek için bu aracı kullanabiliyor.

1992'de İspanya'daki Alicante Üniversitesi'nde bakteriler üzerine çalışmalarını sürdüren Francis Mojica, biyoteknolojik bir devrimin kapılarını açtığının henüz farkında değildi. Bakterilerin bağışıklık sistemlerini anlamaya çalışan Mojica, *Haloferax mediterranei* türünün genomu üzerinde çalışırken, on dört ayrı DNA dizisi fark etti. Bu dizilerin her biri 30 baz uzunluğundaydı, her iki yönden de aynı okunuyordu (palindromik) ve belli aralıklarla tekrar ediyordu.

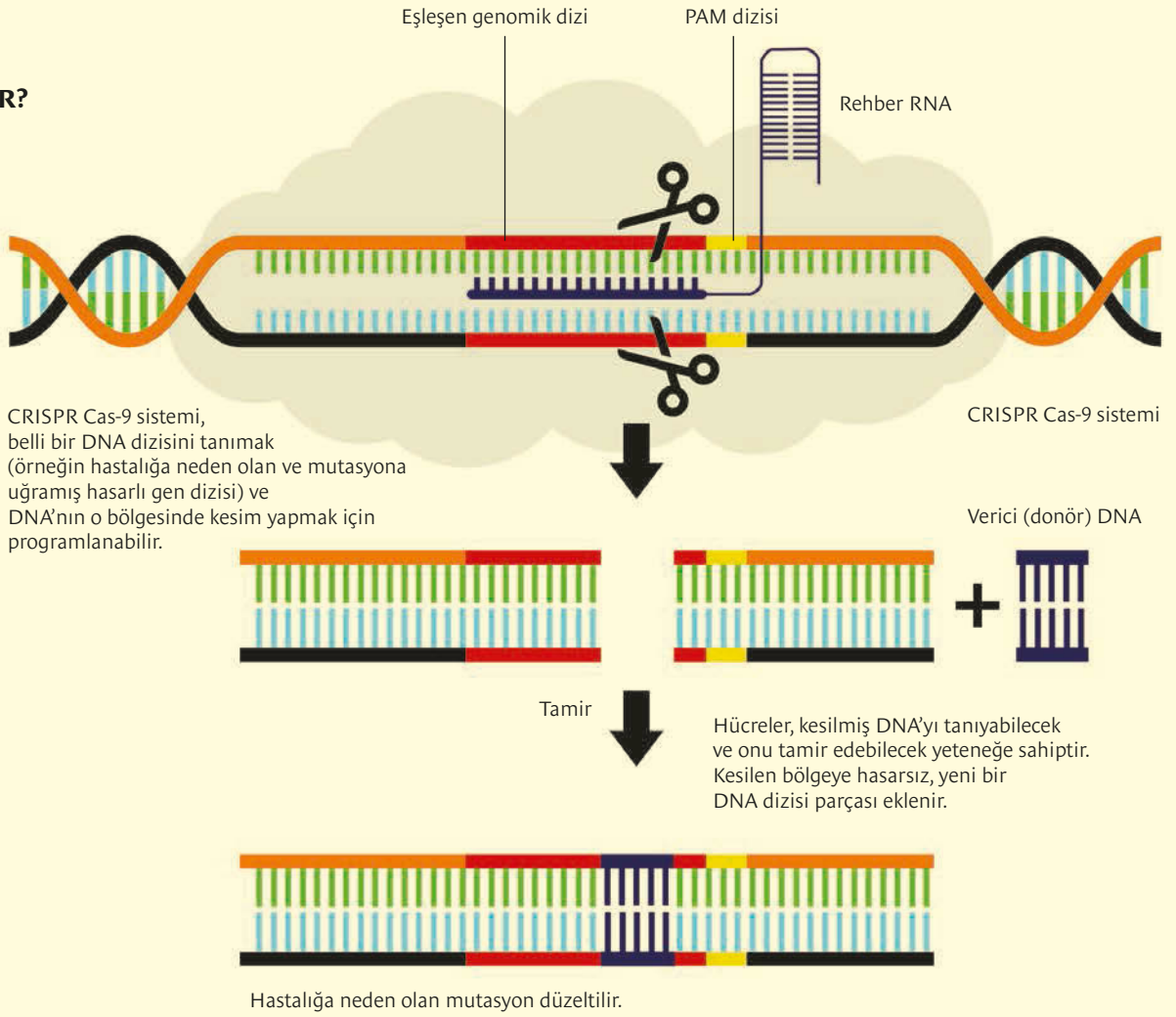
Daha sonra bunlardan daha fazlasını görse de, danıştığı kişilerin pek çok organizmada buna benzer tekrar dizilerinin olduğunu, ama kaç tanesinin işe yaradığının bilinmediğini söylediklerini belirtiyor Mojica bir röportajında. Bugün gelinen noktada ise, dünyanın her yerine yayılmış ve büyük bir heyecanla kullanılan CRISPR tekniğinin temeli olduğunu biliyoruz. Gelin şimdi de bu teknik nedir ve nasıl kullanılır kısaca bir göz atalım.

CRISPR aslında bazı bakterilerin sahip oldukları ve virüslerden korunmalarını sağlayan doğal bir bağışıklık mekanizması. Virüsler bakterileri enfekte ettikleri zaman, DNA'larını bakteri hücrelerinin içine bırakır ve böylece bakteri hücrelerinin sistemini kullanarak kendilerini çoğaltırlar. Bakteriye yabancı olan bu DNA parçası, bakterinin CRISPR bağışıklık sistemi ile parçalanır. Böylelikle bakteri, hâlihazırdaki viral enfeksiyondan kurtulmuş olur.

CRISPR NASIL ÇALIŞIR?



Genomik DNA



Kıscacı CRISPR bağışıklık sistemi, bakterilerin yaklaşık yarısında ve arkelerin %90'unda bulunan bir savunma sistemidir.

2012'den beri bilim insanları CRISPR sistemini laboratuvarlarında kullanarak, hayvan ve bitki hücrelerindeki genleri hedeflemeye çalışıyor. Hayli hızlı, ucuz ve kolay uygulanabilir bir yöntem olan CRISPR sistemi, beş yıl gibi bir sürede tüm dünyadaki araştırma laboratuvarlarına

girmeyi başardı. Sistem temel olarak, hedef DNA dizisini tanıyan bir "rehber RNA"dan ve kesim yapacak Cas (CRISPR ilişkili protein) enziminden oluşuyor. Uygulaması da bir hayli basit: Araştırmacı incelemek istediği hedef DNA bölgesini tanyacak bir RNA tasarlar ve sentezletir, bir miktar Cas enzimiyle karıştırır ve kendisinin özelleştirdiği hassas gen-düzenleyici aracı tasarlamış olur. Genomu düzenlemenin sırrı ise, hedef DNA bölgesi için tasarlanan

Anahtar Kavramlar

- PAM dizisi:** PAM (protospacer bitişik motif) dizileri, hedeflenen DNA dizisinin hemen yanında bulunan, kesilecek hedef DNA'nın tanınmasını sağlayan, yüksek oranda korunmuş gen dizileridir.
- İndüklenmiş pluripotent:** Uyarılmış pluripotent hücre (gelişen bir embriyonun erken safhalarında var olan, canlıyı oluşturan özelleşmiş tüm hücre tiplerine dönüşebilme yeteneğindeki henüz farklılaşmamış hücreler)
- Primer insan hücresi:** Tedavinin ya da çalışmanın gerçekleştirileceği canlıdan doğrudan temin edilen hücreler.
- Epigenomik profileme:** Bir hücrenin sahip olduğu epigenetik yapının bütünüyle ortaya çıkartılması
- Epigenetik:** DNA dizisindeki değişikliklerden kaynaklanmayan ama aynı zamanda kalıtsal olan gen ifadesi değişiklikleri
- Proteomiks:** Proteinlerin yapısal ve işlevsel özelliklerinin belirlenmesi.



Akciğer kanserini tedavi etmek için kullanılan CRISPR-Cas9 gen düzenleme sistemi. CRISPR-Cas9 proteini (beyaz), bir rehber RNA dizisini (gri) kullanarak, hastanın beyaz kan hücrelerinden elde edilen T hücrelerindeki DNA'yı (yeşil) tamamlayıcı bölgeden kesiyor. CRISPR-Cas9 ile değiştirilmiş hücreler, tümör hücrelerini hedefleyerek onları yok etmek için tekrar hastaya enjekte ediliyor.

CRISPR/Cas aracılığıyla DNA'yı tam doğru noktadan kesebilmek ve hücreye, sahip olduğu DNA tamir mekanizması sayesinde, kesilen bu noktayı tamir etmesi için izin vermek.

Gen düzenleme (DNA dizisini değiştirme) için daha önceden geliştirilmiş çeşitli teknikler olsa da, CRISPR/Cas sisteminin sadece haftalar içinde sonuç vermesi, diğer teknikleri gölgede bıraktı. Sadece genlerin işlevini anlamaya değil, tedaviler geliştirmeye ve hatta embriyo seviyesinde müdahalede bulunmaya kadar uzanan araştırmaların temel taşı haline geldi. Bu sebeple de "CRISPR/Cas devrimi" olarak anılmaya başlandı. Her geçen gün CRISPR teknolojisini bir adım öteye götüren yayınlar bilimsel dergilerdeki yerlerini alıyor. Hayvanlardan bitkilere kadar pek çok canlıda çeşitli amaçlarla kullanılıyor.

2016'nun sonlarında Çinli bir grup araştırmacı, CRISPR gen düzenleme sistemini ilk defa bir insanda denediklerini duyurdu. Sichuan Üniversitesi onkologlarından Lu You ve ekibi, agresif küçük hücreli dışı akciğer kanserli bir hastadan aldıkları kandan bağışıklık hücrelerini ayırdılar ve CRISPR/Cas9 teknolojisini kullanarak PD-1 genini etkisiz hale getirdiler. Hücreleri kültüre alarak sayılarını arttırdılar ve hastaya tekrar enjekte ettiler. Bekledikleri, etkisiz hale getirilmiş PD-1 genini taşıyan bağışıklık hücrelerinin, kanser hücrelerine saldırarak etkili bir mücadeleye girmesi ve hastanın kanseri yenmesi. Tedavinin düzgün bir şekilde gerçekleştiğini ve hastanın ikinci dozu alacağını söyleyen You, hedeflerinde 10 hastaya daha aynı yöntemi uygulamak olduğunu ve hastaların herhangi bir ciddi yan etki yaşamayı yaşamadıklarını gözlemlemek için altı ay takip altında tutulacağını belirtti.

Geçtiğimiz Şubat ayında yayımlanan ve fareler üzerinde gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise, günün birinde tek bir enjeksiyonla kolesterol seviyesinin tüm hayat boyunca azaltılabileceğinin sinyalleri paylaşıldı. 2005'te kolesterol seviyeleri doğal olarak çok düşük olan insanların PCSK9 genindeki bir mutasyondan dolayı PCSK9 proteinini

sentezleyemediği, kolesterol seviyelerinin düşük olmasının nedeninin bu gendeki mutasyon olduğu bulundu. Bu bilgi de şimdi bahsedeceğim çalışmanın temelini oluşturdu. Araştırmacılar, CRISPR tekniği kullanılarak devre dışı bırakılan insan PCSK9 genini taşıyan farelere, CRISPR/Cas9 proteinini ve rehber RNA dizisini enjekte etti. Rehber RNA, Cas9 proteininin gendeki belirli bir bölgeye bağlanmasını ve Cas9'un da geni o noktadan kesmesini sağladı. Bu noktada bir DNA kırığı oluşturularak, hücrenin kendisinde var olan DNA tamir mekanizmasıyla bu bölge tamir edildiğinde, istenilen değişiklik gerçekleştirilmiş oldu. Çalışmanın sonucunda, CRISPR ile tedavi edilen farelerin kolesterol seviyelerinin, antikor ilaçlarla tedavi edilen farelerinkinden daha düşük olduğu tespit edildi.

Şu ana kadar yapılan çalışmalarda sistemin başarısı zebra balıklarında ve bitkilerde %70'in üzerine çıkarken, indüklenmiş pluripotent kök hücrelerde bu oran sadece %2-%5 arasında. Tek hücreli fare embriyosunda ise genom hedeflemenin %78 oranında başarılı olduğunu gösteren çalışmalar da var. Tüm bunların yanı sıra Çin'den ve İsveç'ten farklı araştırma grupları insan embriyosu üzerinde çalışmalarına başlarken,

İngiltere de geçtiğimiz yıl etik onayını aldı. Genetik hastalıkların embriyonik aşamada düzeltilerek, sadece bireyin kendisinde değil sonraki nesillerinde de hastalığın ortadan kalkması ana hedef, ama şu an gelinen nokta itibarıyla bu şimdilik sadece kuramsal bir yaklaşım.

Her ne kadar CRISPR teknolojisi çok heyecan verici olsa da, sistem henüz mükemmel değil. Genin hedeflenme başarısı, genom düzenleme araçlarının en önemli parametrelerinden biri. Dolayısıyla da hedef geni tanıyacak olan rehber RNA'nın genomda başka bir yeri tanıyabilme ihtimali, CRISPR sisteminin en büyük sorunlarından biri. Böyle bir durumda, CRISPR/Cas aracı hedef gen yerine bambaşka bir geni kesecek ve istenmeyen, hedeflenmemiş sonuçların ortaya çıkması ihtimaliyle karşı karşıya kalınacak. Gerek hücreler gerekse hayvan modelleri üzerinde yapılan deneylerle, bu ihtimallerin azaltılması için çalışmalar devam ediyor.

CRISPR sisteminin genetikte kullanımı sadece insan hastalıkları ve hastalıkların tedavisiyle sınırlı değil. Bunların yanı sıra gen düzenlenmesi,

bir genin işlevini anlama, genom çapında tarama ve genomik yapıya yönelik çalışmalar moleküler ölçekte detaylandırılırken, kalıtımın temel mekanizmasıyla ilgili bilinmeyen noktalar da mercek altına alınmaya başlandı. İnsan genom yapısını anlamak ve yeni tedavi yöntemleri geliştirmek için CRISPR-Cas teknolojisinin kullanımının –yani istenmeyen değişimlere sebebiyet vermeden (örneğin kanser gibi) sadece düzeltilmek istenen genin hedeflenmesine yönelik çalışmaların- henüz çok başlarındayız. Nasıl ki insan genomunun dizilenmesiyle birlikte dizileme teknolojileri de hızla geliştirse, CRISPR/Cas sisteminin de geniş çaplı genom mühendisliği bakımından aynı potansiyeli var. Bu teknoloji geliştikçe, örneğin hastalığa neden olan mutasyonlar primer insan hücrelerinde yüksek doğruluk, seçicilik ve verimlilik ile sistemik olarak düzeltilebilir. Tek hücre DNA/RNA dizilemesi, epigenomik profillemeye, proteomiks gibi çeşitli yöntemlerle bir arada kullanıldığında ise, hücrelerin ve dokuların karmaşık biyolojik yapılarının anlaşılması için yeni ufuklar açılacak.

CRISPR sisteminin şu an için en büyük sıkıntısı, hedeflenen genin yanı sıra genomda başka bölgeleri de tanıyabilmesi.

Bunu önleyebilmek için de rehber RNA'ların daha özgün olarak tanıma yapabilmesine yönelik çalışmalar devam ediyor. Özellikle embriyonik seviyede genom düzenleme yapmayı hedefleyen araştırmacılar için, hedef genin yüksek özgünlükle tanınması çok önemli.



CRISPR-Cas9 gen düzenleme sisteminin RNA ve DNA (turuncu ve pembe) kompleksi ile birlikte moleküler yapısı

Gerek embriyonik seviyede deney yapılması ile ilgili etik tartışmalar, gerekse de genomda istenmeyen yerlerde genetik değişikliklere yol açma ihtimali sistemin henüz kusursuz çalışmamasından kaynaklanıyor. Diğer yandan dünyanın pek çok yerindeki bilim insanları, CRISPR sistemindeki bu sorunları ortadan kaldırmak ve sistemi daha güvenli hale getirmek için araştırma ve geliştirme çalışmalarına hızla devam ediyor. ■

Kaynaklar

Ledford, H., "Five big mysteries about CRISPR's origins", *Nature*, Sayı 541, s. 280-282, 2017

Cyranoski, D., "CRISPR gene-editing tested in a person for the first time", *Nature*, Sayı 539, s. 479, 2016.

<https://www.newscientist.com/article/2120369-injection-could-permanently-lower-cholesterol-by-changing-dna/>

<https://www.newscientist.com/article/mg22129530-900-right-on-target-new-era-of-fast-genetic-engineering/>

<https://cosmosmagazine.com/biology/what-crispr-and-what-does-it-mean-genetics>