COVID-19 TANI VE TEDAVİSİNDE GEN DÜZENLEME TEKNOLOJİLERİNİN KULLANIMI

Ahmet Adar IRMAK, Emine ÇINAR, İlayda DURMAZ, Murat Uğur SANCAK, Sinem TÜMER, Yaren KAYMAZ, Yüksel Petek KOÇYİĞİT

Danışman: Prof. Dr. Yunus Kasım TERZİ

GENOM DÜZENLEME YÖNTEMLERİ VE COVID-19

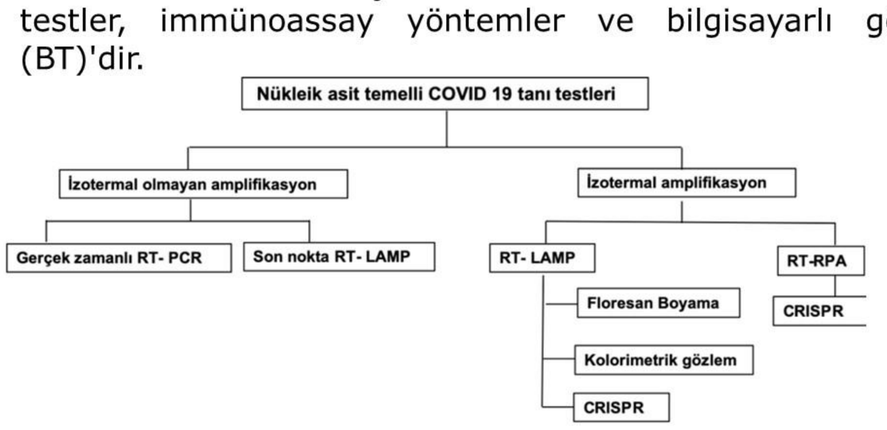
Genom düzenleme bir organizmanın genetik materyalinde yapılan değişikliklerdir. Günümüzde genom düzenleme teknikleri sayesinde canlı hücrelerin DNA'sı üzerindeki genlerin düzenlenmesi ve nükleotid dizilerinin değiştirilmesi, hücrenin DNA tamir mekanizmalarının da yardımıyla mümkün olabilmektedir. Özellikle 2020 yılında Nobel ödülü alan CRISPR yöntemi COVID-19 tanı ve tedavisinde aktif olarak kullanılmaktadır.

	ZFN	TALEN	CRISPR/Cas
Tanıma Bölümü	Çinko-Parmak proteini	TALE proteinin RVD tekrar bölümü	crRNA veya crDNA bölümü
Dizayn Basitliği	Normal	Biraz Karmaşık	Basit
Mühendislik Fizibilitesi	Düşük	Yüksek	En Yüksek
Spesifite	Düşük	Yüksek	En Yüksek
Verimlilik	Normal	Normal	Yüksek
Maliyet	Düşük	Yüksek	Düşük
Bağışıklık Yanıtı Oluşturma Olasılığı	Az	Az	Fazla

TABLO1: Güncel olarak kullanılan gen düzenleme tekniklerinin karşılaştırılması

COVID 19 TANI YÖNTEMLERİ

COVID 19 tanısında üç ana teknik kullanılmaktadır. Bunlar: moleküler testler, immünoassay yöntemler ve bilgisayarlı göğüs tomografi (BT)'dir.



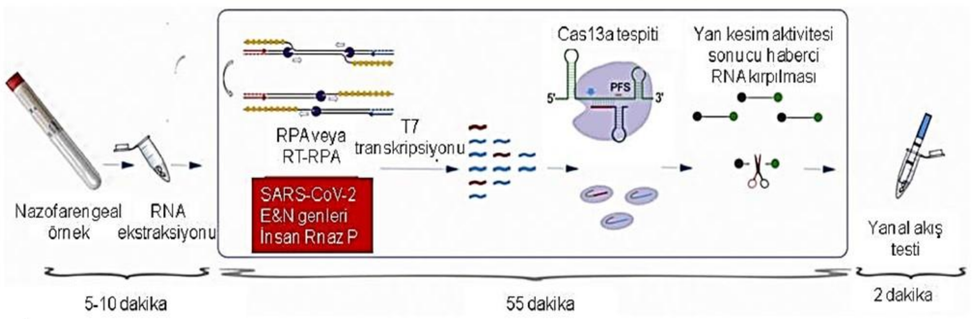
CRISPR KULLANILAN COVID 19 TANI YÖNTEMLERİ

Temel stratejisi; virüs genomunun amplifikasyonuna, daha sonrasında yönlendirici RNA'ların kontrolü ile CRISPR Cas enzimlerinin aktivasyonu sonucu floresan probların kesilmesi ile sinyal oluşumuna dayanır. Kullanılan Cas enzimine göre teknikler farklı isimler almaktadırlar.

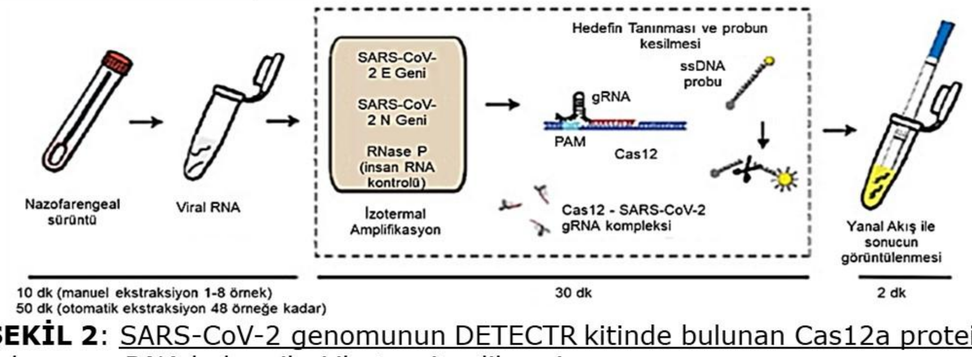
TEKNİKLER	CAS Protein Türü	Süre (dk)	Duyarlılık	Özgüllük	Görüntüleme Yöntemi	Hedef Gen	Amplifikasyon Türü	Sıcaklık
AIOD-CRISPR	Cas12 a	20	N/A	N/A	Çıplak Göz	N	RT-RPA	37
SHERLOCK	Cas13 a	35	88-96	100	Floresan Boyama – Yanal Akış	S	RT-RPA RT-LAMP	37
DETECTR	Cas12 a	30	90-95	100	Yanal Akış	E,N	RT-LAMP	62
CRISPR Cas12a NER	Cas12 a	45	N/A	N/A	Floresan Boyama	E	RT-RAA	39
CONAN	Cas3	40	N/A	N/A	Yanal Akış	N	RT-RPA	37

TABLO 2: COVID-19 Tanısında Kullanılan CRISPR/Cas Yöntemlerinin Karşılaştırılması

CRISPR prensibi ile çalışan tanı yöntemleri RT-PCR'a göre daha hızlı, hassasiyeti daha yüksek ve taşınılabilir olması nedeniyle hızlı tanı yöntemi olarak kullanılabilmektedir. Güncel olarak ikisi DNA Endonükleaz Hedefli CRIPSR Ters Haberci (DETECTR) biri Duyarlı Yüksek Hassas Enzimetik Haberci Çözümlemesi (SHERLOCK) yöntemleri kullanılarak geliştirilmiş ve Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi acil kullanım onayı almış üç hızlı test kiti bulunmaktadır. Bu kitler genelde 30- 60 dk aralığında sonuç verirler, yanal akış testleri olarak veya floresan sinyal testleri olarak geliştirilmektedirler.



ŞEKİL 1: SARS-CoV-2 genomunun SHERLOCK kitinde bulunan Cas13a proteini ve haberci RNA'lar ile tespit edilmesi



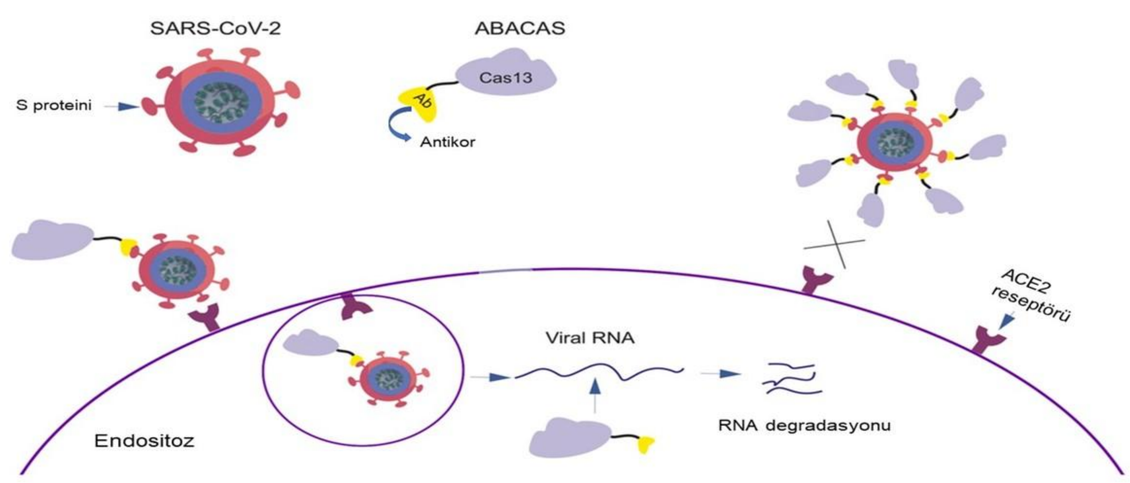
ŞEKİL 2: SARS-CoV-2 genomunun DETECTR kitinde bulunan Cas12a proteini ve tek sarma DNA habercileri ile tespit edilmesi

COVID-19 TEDAVİ YÖNTEMLERİ

Deaminazlar : Deaminasyon tepkimesinde kullanılan enzimlere verilen addır. Gen düzenlemesinde nükleotidlerin eklenmesi, çıkarılması veya değiştirilmesinde kullanılmaktadır. Buna ek olarak genomda büyük bir oranda çerçeve kaymasına yol açarak yönlendirilmiş evrim yapılabilir. Deaminazlar kullanılarak yapılan en başarılı uygulama HIV virüsünün replikasyonunu baskılamak için spesifik genlerin eliminasyonunun sağlanmasıdır.

PAC-MAN (İnsan Hücrelerinde Profilaktik Antiviral CRISPR): PAC-MAN gelişim aşamasında olan CRISPR bazlı bir gen düzenleme yöntemidir. Ana çalışma prensibi koronavirüslerde ortak olan genlerin tespit edilip bunları imha edecek bir sistem geliştirilmesidir. Bu sayede sadece tek tip bir koronavirüse karşı değil tüm koronavirüslere karşı bir tedavide kullanılması planlanmaktadır. Gelişimi önündeki en büyük engel insan vücuduna verilme protokolünün henüz optimize edilememiş olmasıdır.

ABACAS (Antikor ve Cas füzyonu): CRISPR-Cas sistemi spike proteinini tanıyan bir antikora bağlanır ve seçici olarak endositoz yoluyla hücre içine girmesini sağlar. Teslimatın ardından, CRISPR bileşenleri genom replikasyona geçmeden önce viral RNA'ya kolayca erişebilir ve RNA'nın konakçı hücre içinde Cas13 enzimi tarafından parçalanması sağlanır. CRISPR'nin ABACAS teknolojisi ile seçici iletilmesine ek olarak S proteini ve ACE2 reseptör etkileşimine müdahale edebilir ve konakçı hücrelere endositoz aracılığılıyla viral girişi en aza indirerek ikinci bir rol sağlar.



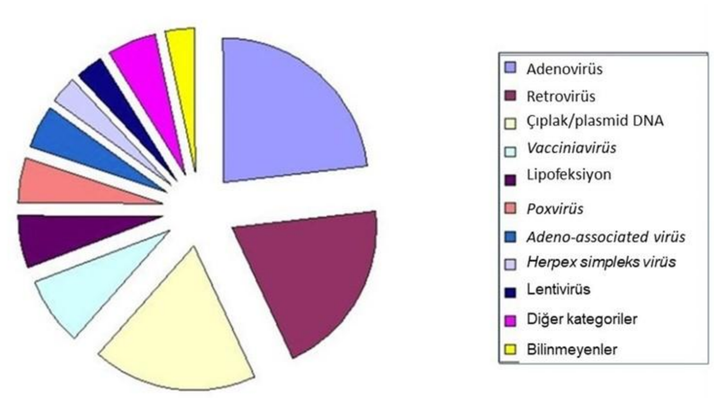
ŞEKİL 3: Hücre içerisinde Cas13 proteini ile tanınan viral genomun parçalanması ve ACE2 reseptörünün inhibisyonu ile viral genomun hücreye girişinin kısıtlanması

CRISPR temelli tedavi yöntemlerinden olan ABACAS şu anki ilaçlardan farklı olarak COVID-19'a spesifik olarak geliştirilirken, PAC-MAN yöntemi ileride oluşabilecek koronavirüs temelli hastalıkları da kapsayacak şekilde geliştirilmektedir. Bu sayede hastalığın tedavisinin daha kısa sürede ve daha kapsamlı yapılması hedeflenmektedir.

Genom düzenleme teknolojileri COVID-19 tanı ve tedavisinde kullanılabilen yeni yöntemlerdir. Özellikle 2020 yılında aldığı Nobel ödülüyle öne çıkan CRISPR'ın uygulama alanları gittikçe genişlemektedir. COVID-19 hastalığının tanı ve tedavisinde de CRISPR önemli çalışmalarda kullanılmaktadır.

GEN TEDAVİSİNDE VİRAL VE NON-VİRAL VEKTÖRLER

Gen terapisi yöntemlerindeki en önemli zorluklardan biri de taşımadır. Öncelikle hücre dışı engelleri ve ardından hücresel engelleri aşması gereken bir iletim sistemine ihtiyaç vardır. Bu iletim sistemlerine gen terapisi vektörleri denir. Gen taşıma sistemleri viral ve non-viral vektörler olmak üzere ikiye ayrılır.



ŞEKİL 4: Gen tedavilerinde kullanılan vektörlerin dağılımı

REFERANSLAR

Safari F. ve diğ. CRISPR systems: Novel approaches for detection and combating COVID-19. Virus Research. 2021. 294: 198282.

Broughton J. P. ve diğ. Rapid Detection of 2019 Novel Coronavirus SARS-CoV-2 Using a CRISPR-based DETECTR Lateral Flow Assay. *medRxiv : the preprint server for health sciences*, 2020. 20032334.

Yu C.Y. ve diğ. Nucleic Acid-Based Diagnostic Tests for the Detection SARS-CoV-2: An Update. Diagnostics. 2021. 11: 53.

Geiger JD. ve diğ. Possible Role of Adenosine in COVID-19 Pathogenesis and Therapeutic Opportunities. Front. Pharmacol. 2020. 26;11:594487.

Chiu Y.-L. ve diğ. Multifaceted antiviral actions of APOBEC3 cytidine deaminases. Trends Immunol. 2006.27,291–297.

Yu X.-F.Innate cellular defenses of APOBEC3 cytidine deaminases and viral counter-defenses. Curr. Opin. 2006. HIV AIDS 1,187–193.

Abbott TR. ve diğ. Development of CRISPR as an Antiviral Strategy to Combat SARS-CoV-2 and Influenza. Cell. 2020.181(4):865-876.

Nalawansha D. ve diğ. Double-Barreled CRISPR Technology as a Novel Treatment Strategy For COVID-19. ACS Pharmacol. Transl. Sci. 2020. 3, 790−800.

Lundstorm K. ve diğ. Viral and Non-viral Vectors in Gene Theraphy: Technology Development and Clinical Trials. Technology in Cancer Research & Treatment. 2003. ISSN 1533-0346 Volume 2, Number 5.