



CRISPR ve Nanoteknoloji

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi
Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji

Dr. Tuba Kuruođlu



Antibiyotik Direncinin Tehditi



Sessiz Pandemi

10 Milyon

2050 yılına kadar her yıl gerçekleşmesi beklenen tahmini ölüm sayısı.

2019



4.95 Milyon ölüm (AMR ile ilişkili).
1.27 Milyon ölüm (Doğrudan AMR kaynaklı).

2016



BM Genel Kurulu Onayı.

AMR resmen küresel bir kriz olarak kabul edildi.

Kardiyovasküler hastalıklardan sonra üçüncü büyük ölüm nedeni konumunda.

DSÖ Kritik Öncelikli Patojenler (2024)



Enterobacterales

(Karbapenem ve üçüncü kuşak sefalosporin dirençli)



Acinetobacter baumannii

(Karbapenem dirençli)

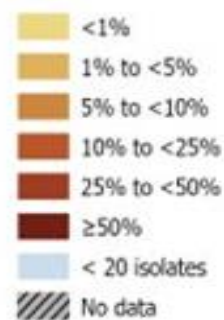


Mycobacterium tuberculosis

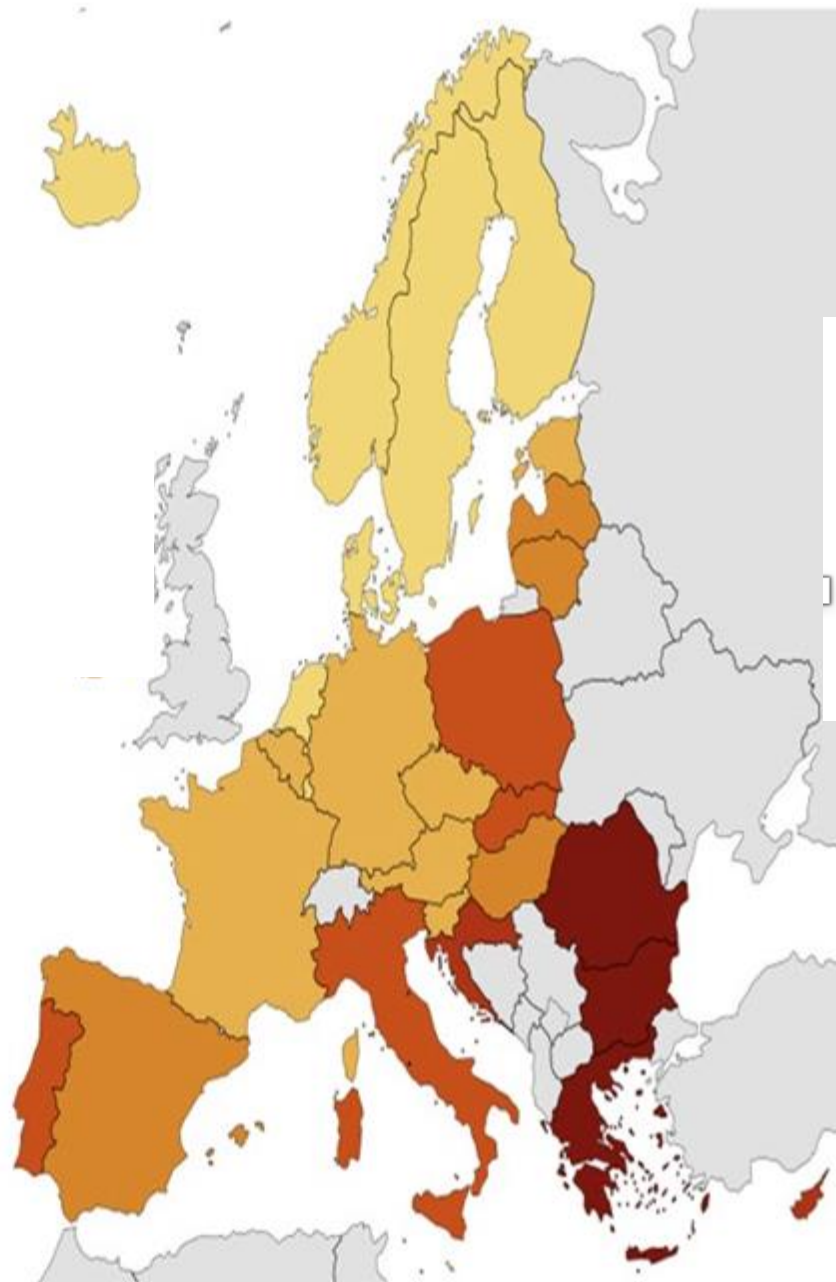
(Rifampisin dirençli)

Bu patojenler, geleneksel antibiyotiklerin yetersiz kaldığı "Kritik Grup"tır ve yeni nesil tedavilerin birincil hedefidir.

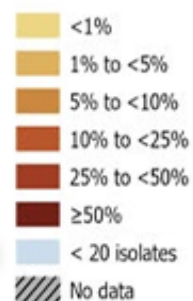
Klebsiella pneumoniae. Percentage of invasive isolates resistant to carbapenems (imipenem/meropenem), by country, EU/EEA, 2024



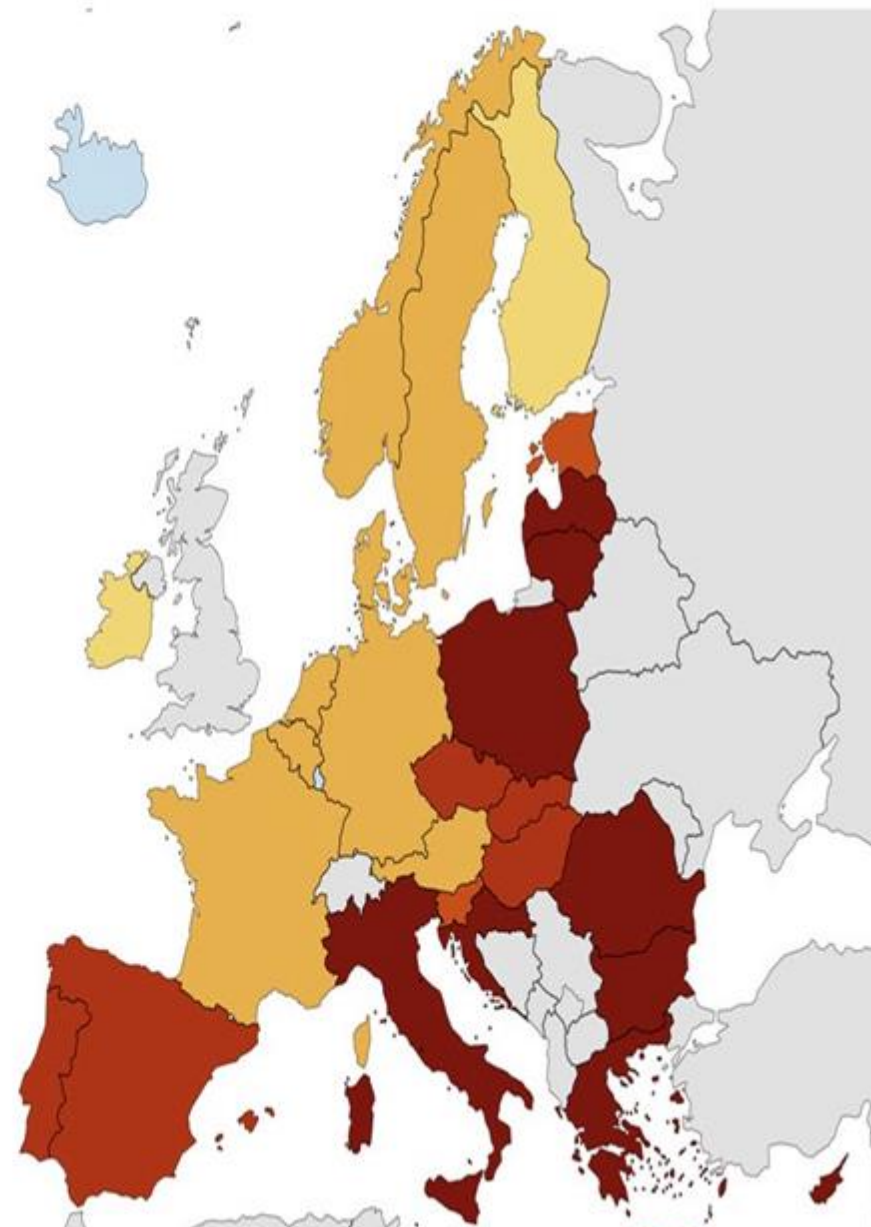
Countries not visible at the current map scale



Acinetobacter species. Percentage of invasive isolates with resistance to carbapenems (imipenem/meropenem), by country, EU/EEA, 2024

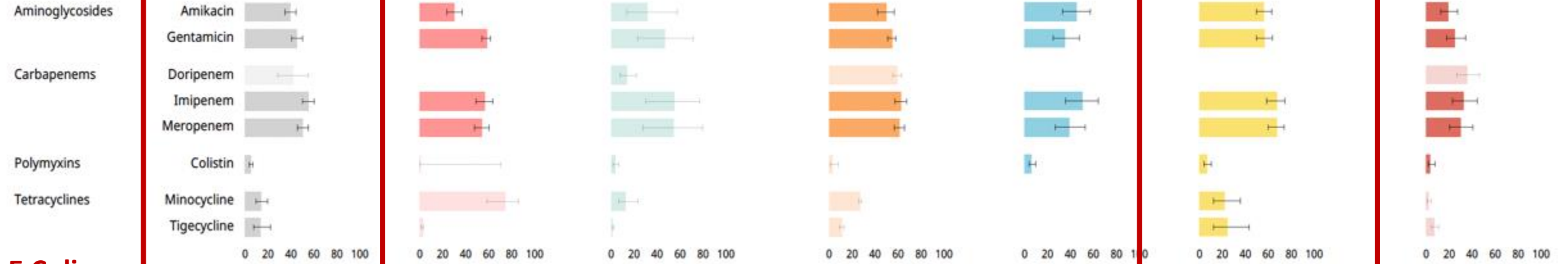


Countries not visible at the current map scale

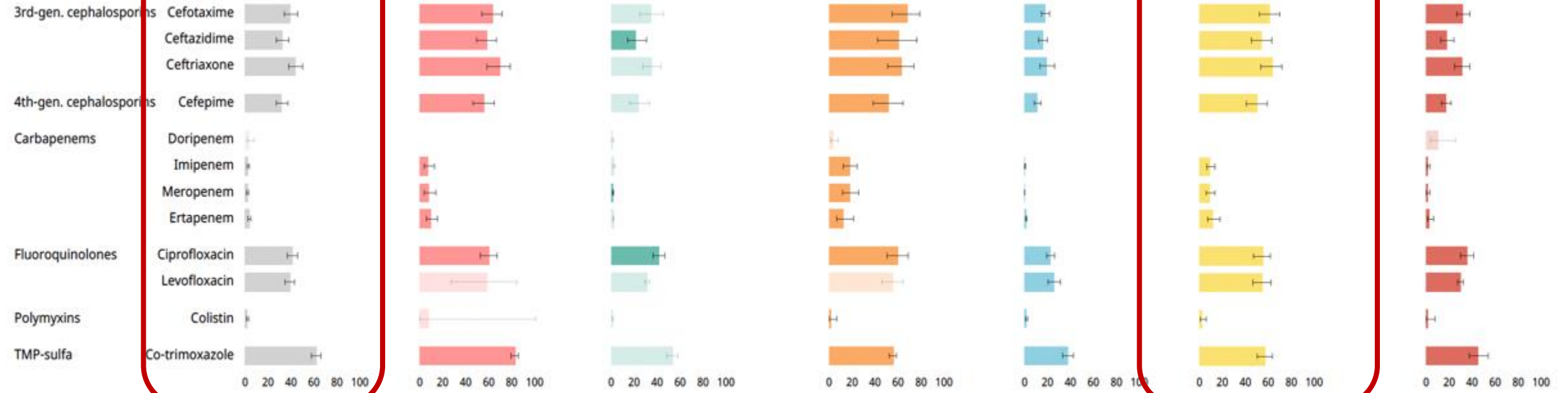


Percentage AMR in bloodstream infections: global and regional estimates, 2023

Acinetobacter spp.



E.Coli



Percentage (%)

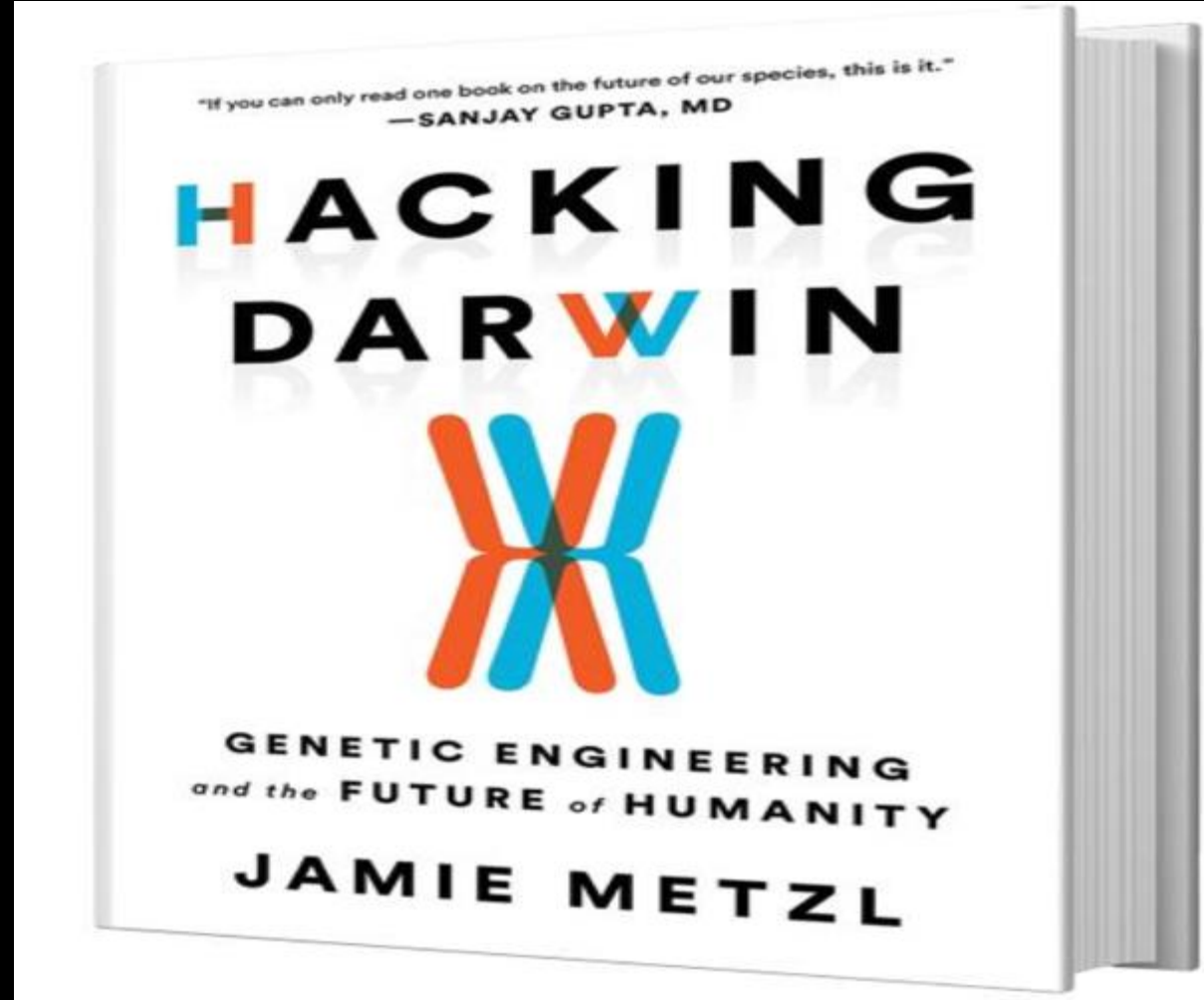
K.pneumoniae



Antibiyotik Geliştirme Süreçlerinin Çıkmazı



Geleneksel ilaç geliştirme hızı, bakterilerin mutasyon hızına yenik düşmektedir.



“İnsanlar artık evrim tarafından şekillendirilen varlıklar olmaktan çıkıp, evrimi şekillendiren varlıklar haline geliyor.”

GATTACA



N SERIES

unnatural selection

Limited Series



Bakteriyel hafızadan moleküler silaha



1987

Tesadüfi Keşif

E. coli'de düzenli aralıklı tekrar dizileri bulundu.



2007

Bağışıklık Fonksiyonu

CRISPR'ın bakterilerde eksojen DNA'ya karşı adaptif bağışıklık sağladığı kanıtlandı.



2012

Hassas Kesim

CRISPR-Cas9'un çift sarmallı DNA'yı programlanabilir şekilde kestığı gösterildi.



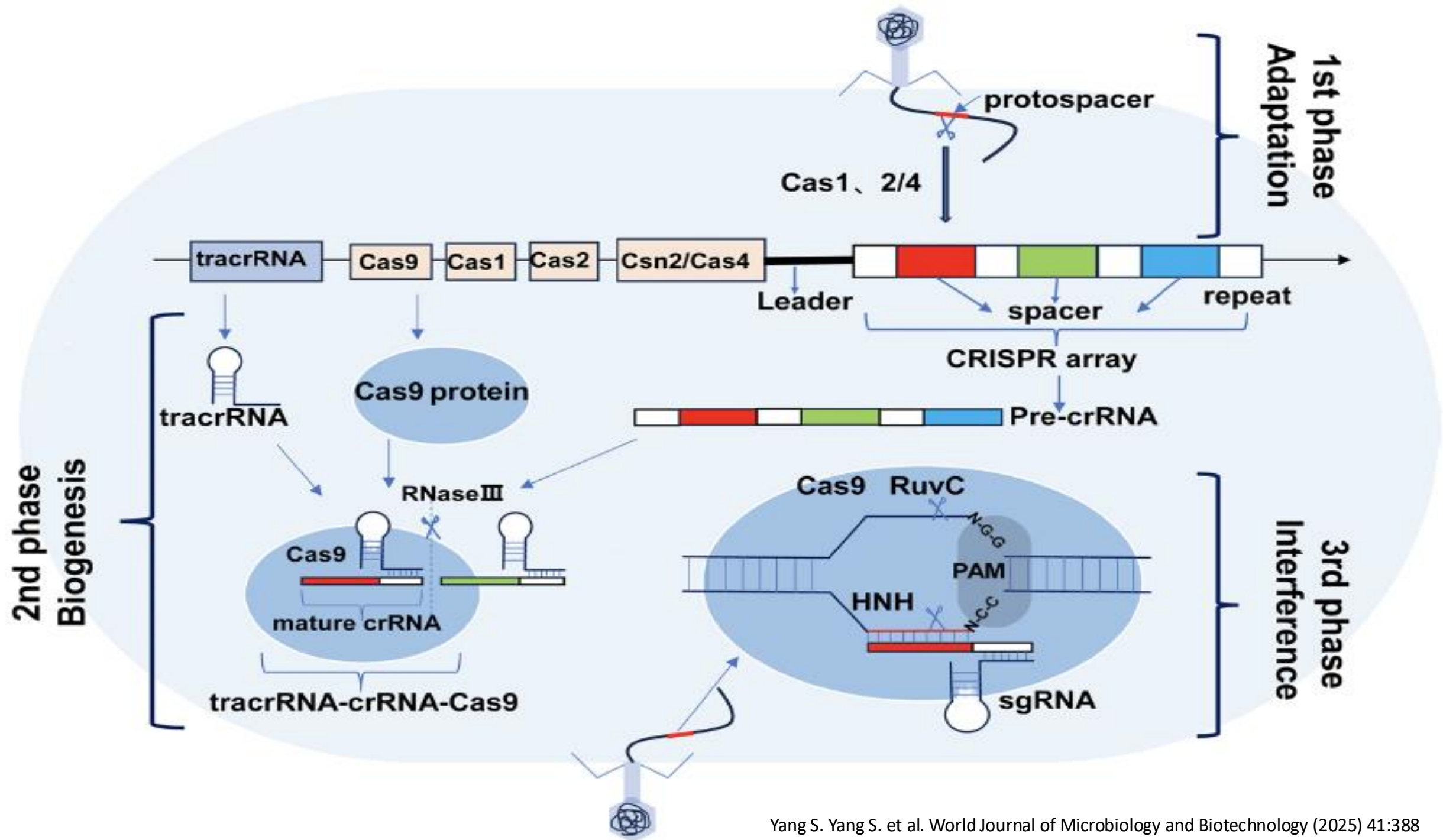
2020

Klinik Gerçeklik

CRISPR-Cas9 teknolojisinin insan hastalıklarında ilk klinik deneyleri başladı.

CRISPR-CAS Sistemi Nedir?

- Kümelenmiş Düzenli Aralıklı Kısa Palindromik Tekrarlar (**Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats**) ve CRISPR-ilişkili proteinler.
- Prokaryotlarda bilinen tek kalıtsal ve adaptif bir bağışıklık sistemidir
- Prokaryotlara saldıran plazmid ve virüslerin DNA/RNA'sını yok ederek genetik elementlerine karşı bağışıklık sağlar
- İstilacı genomların “**ara parçalar = spacer**” olarak bilinen kısa dizilerini kendi genomlarına entegre ederek önceki enfeksiyonları hafızaya almaktadır.
- İki temel bileşeni kılavuz RNA (gRNA) ve Cas9 proteindir.
- Monogenik hastalıklardan immünoterapiye kadar hastalıkların tedavisinde kullanılabilir.



Crispr-Cas9 Yapısı: Moleküler Makas

1

Cas9 Proteini (Makas)

HNH ve RuvC domainlerine sahip nükleaz. DNA'nın iki ipliğini keser.

2

gRNA (Rehber)

Hedef DNA dizisini bulmak için Cas9'u yönlendiren RNA dizisi.

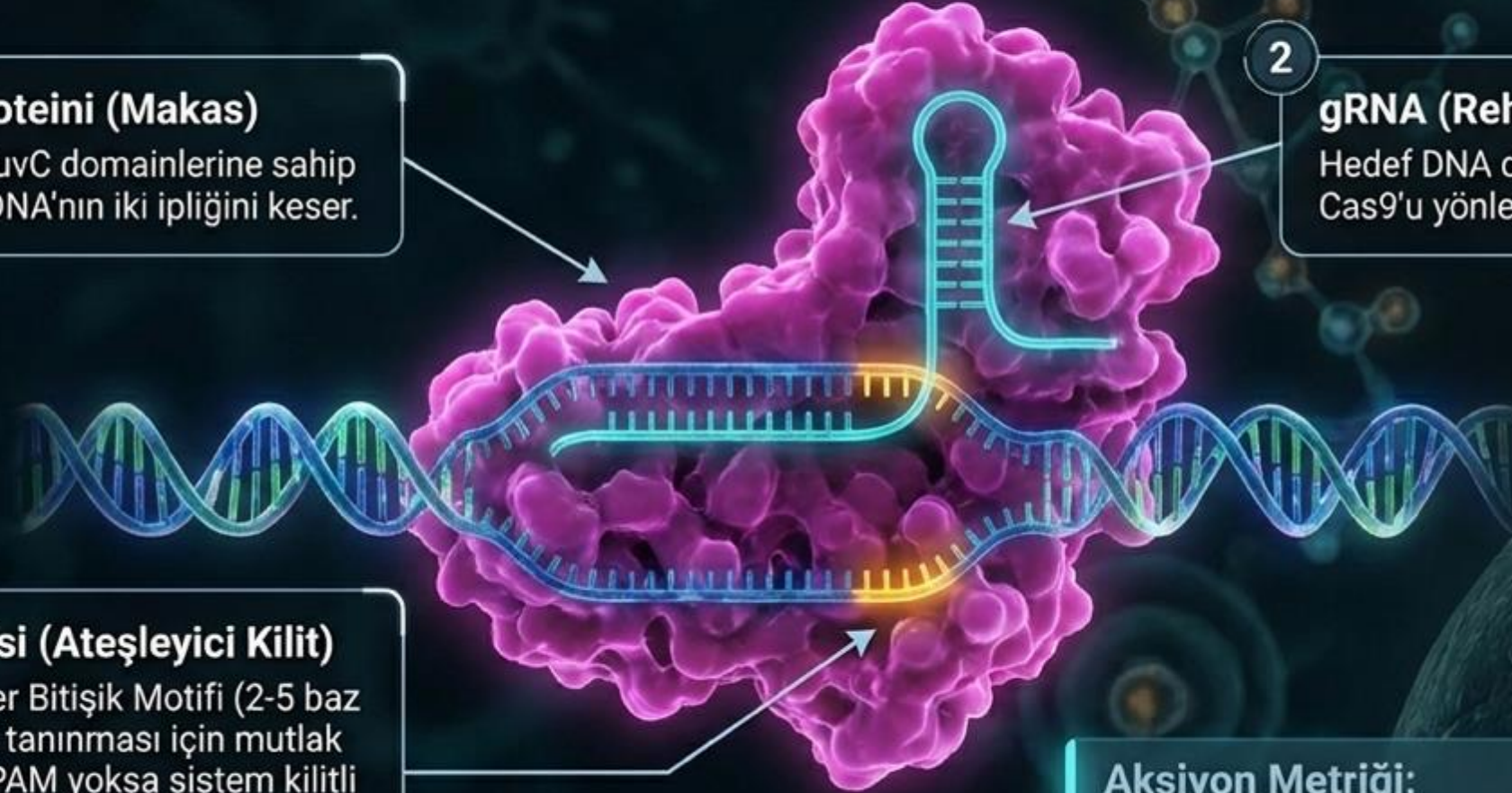
3

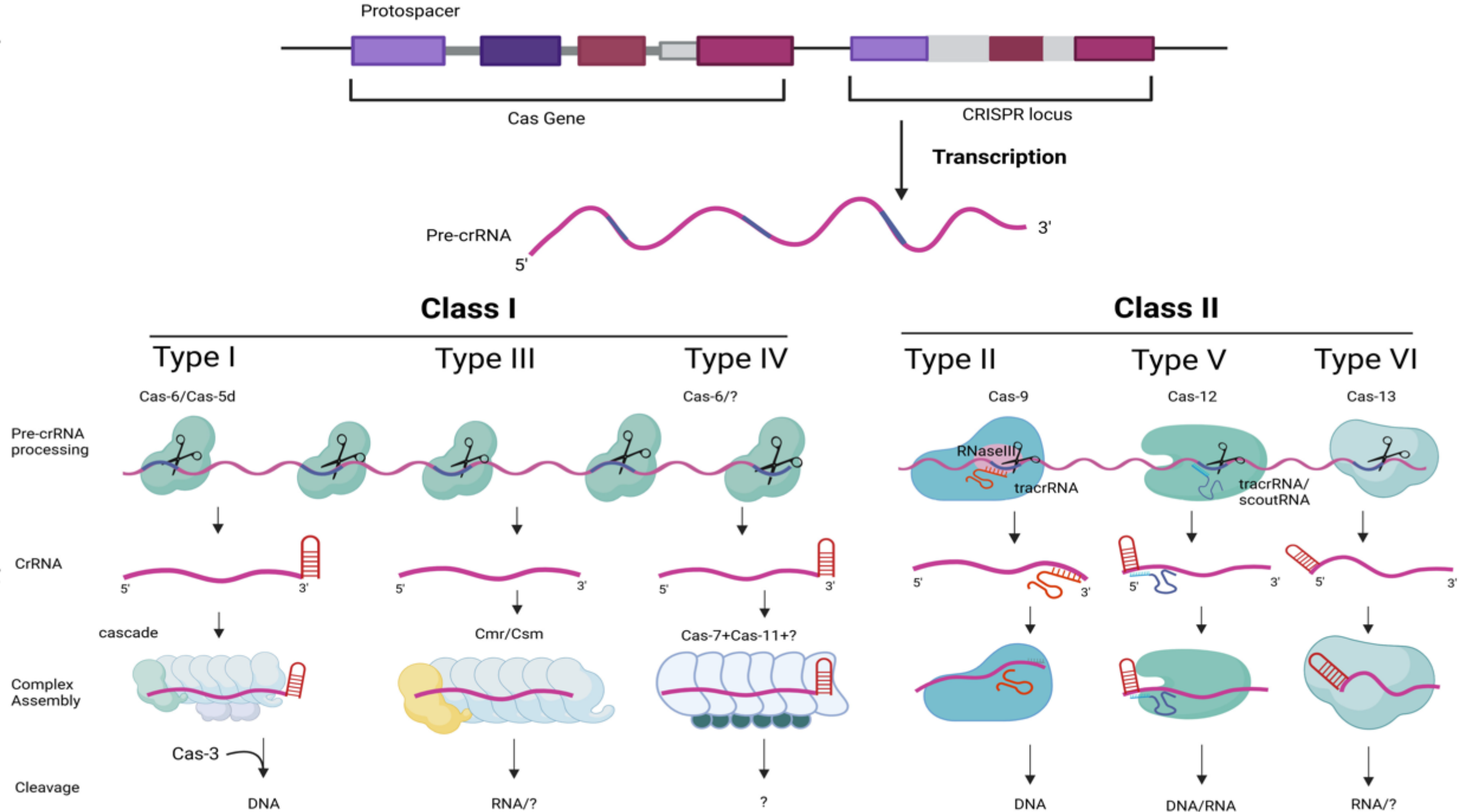
PAM Dizisi (Ateşleyici Kilit)

Protospacer Bitişik Motifi (2-5 baz çifti). Cas9 tanınması için mutlak gereklilik. PAM yoksa sistem kilitli kalır; bu durum benzersiz bir özgüllük sağlar.

Aksiyon Metriği:

Kesim işlemi genellikle PAM dizisinden tam 3 baz çifti geride gerçekleşir.

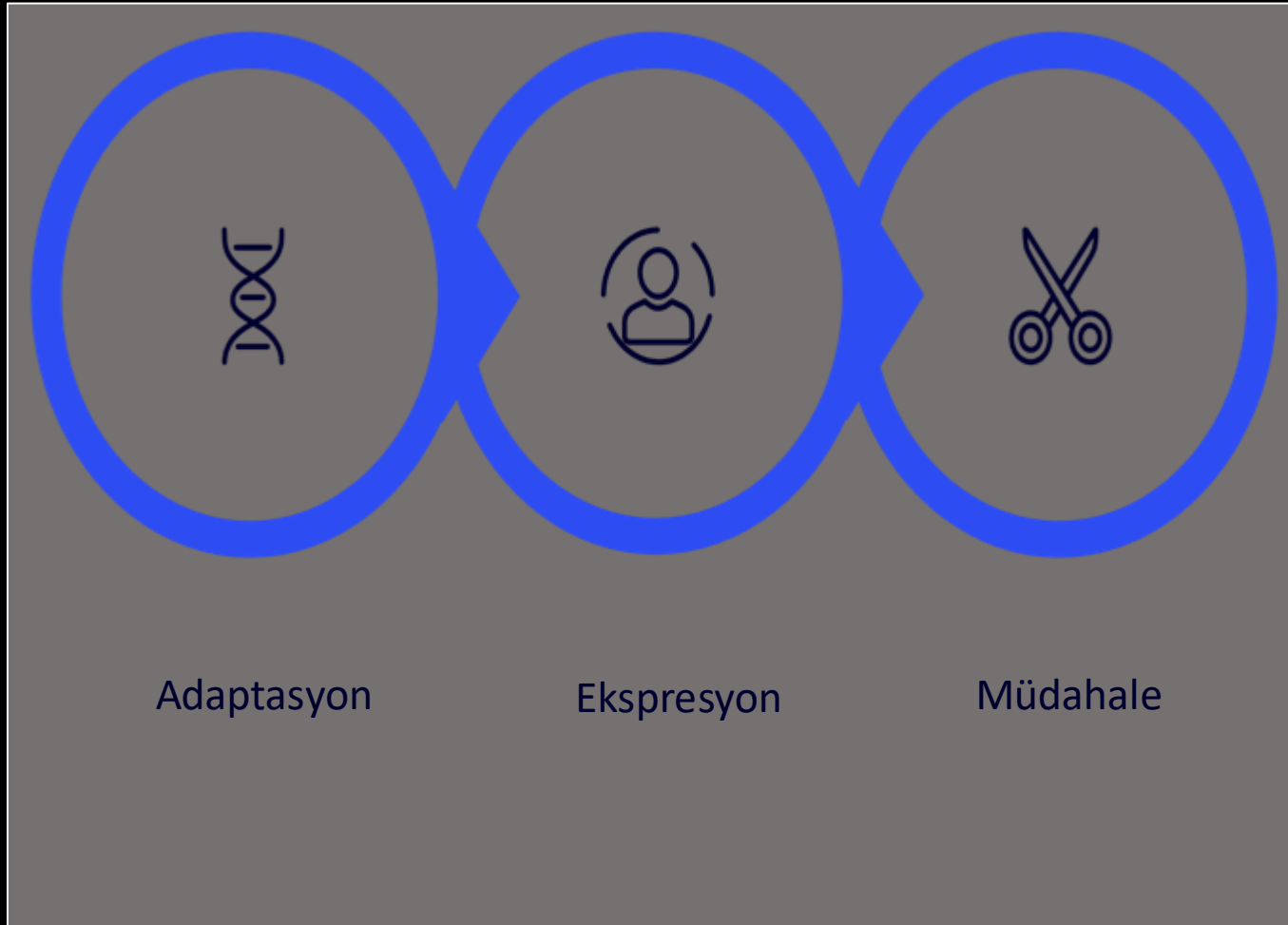




CRISPR-CAS Nasıl Çalışır?

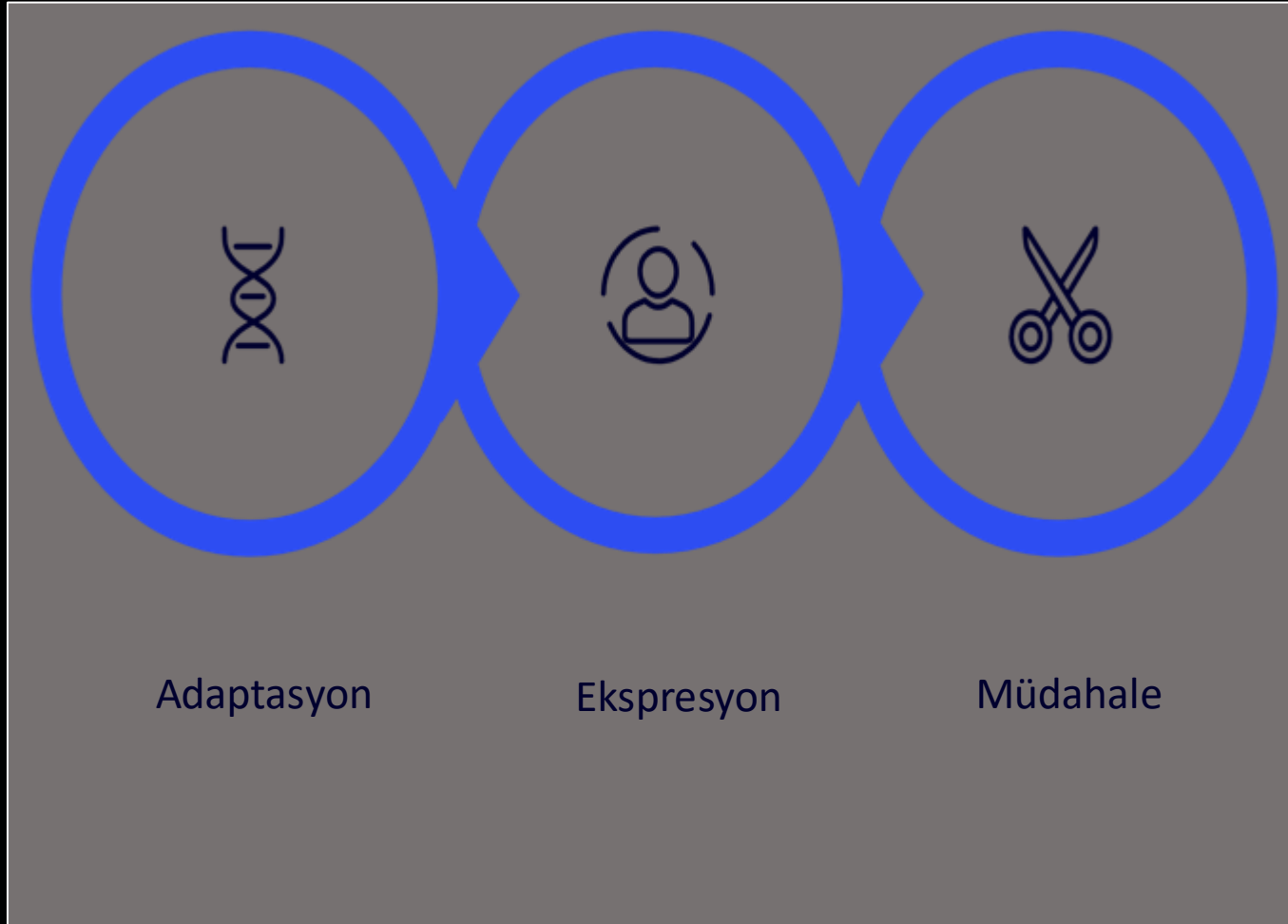
- gRNA tarafından yönlendirilerek önceden belirlenmiş hedef bölgelerde DNA'yı moleküler bir makas görevi gören Cas9 ile keser.
- DNA dizilerinde kritik bir tanıma elementi olan protospacer bitişik motif (PAM), Cas9 tanınması için gerekli olan hassas hedeflemeyi sağlar
- PAM, istilacı genomda protospacer dizisini çevreleyen, 2-5 baz çifti uzunluğunda kısa, korunmuş bir DNA dizisidir.
- PAM yoksa → Cas9 durur
- Kesim yeri genelde PAM'dan 3 baz önce olur.
- Cas9 **HNH domaini** (gRNA ile eşleşen DNA ipliğini keser) ve **RuvC domaini gibi** (karşı ipliği keser) iki farklı kesici bölgeye sahiptir.

CRISPR-Cas Sistemi- Adaptasyon



- Bakteride bulunan Cas1 ve Cas2 nükleaz enzimleri, bakteri içerisine giren “protospacer” denilen virüs DNA’sından küçük bir parçalar keser.
- Kesilen bu viral DNA parçası, bakterinin genomundaki CRISPR (genom bölgesi) dizisine eklenir.
Repeat–Spacer–Repeat–Spacer
- Bakteri virüsün bir “kimlik kartını” kaydederek bağışıklık hafızasını oluşturmuş olur.

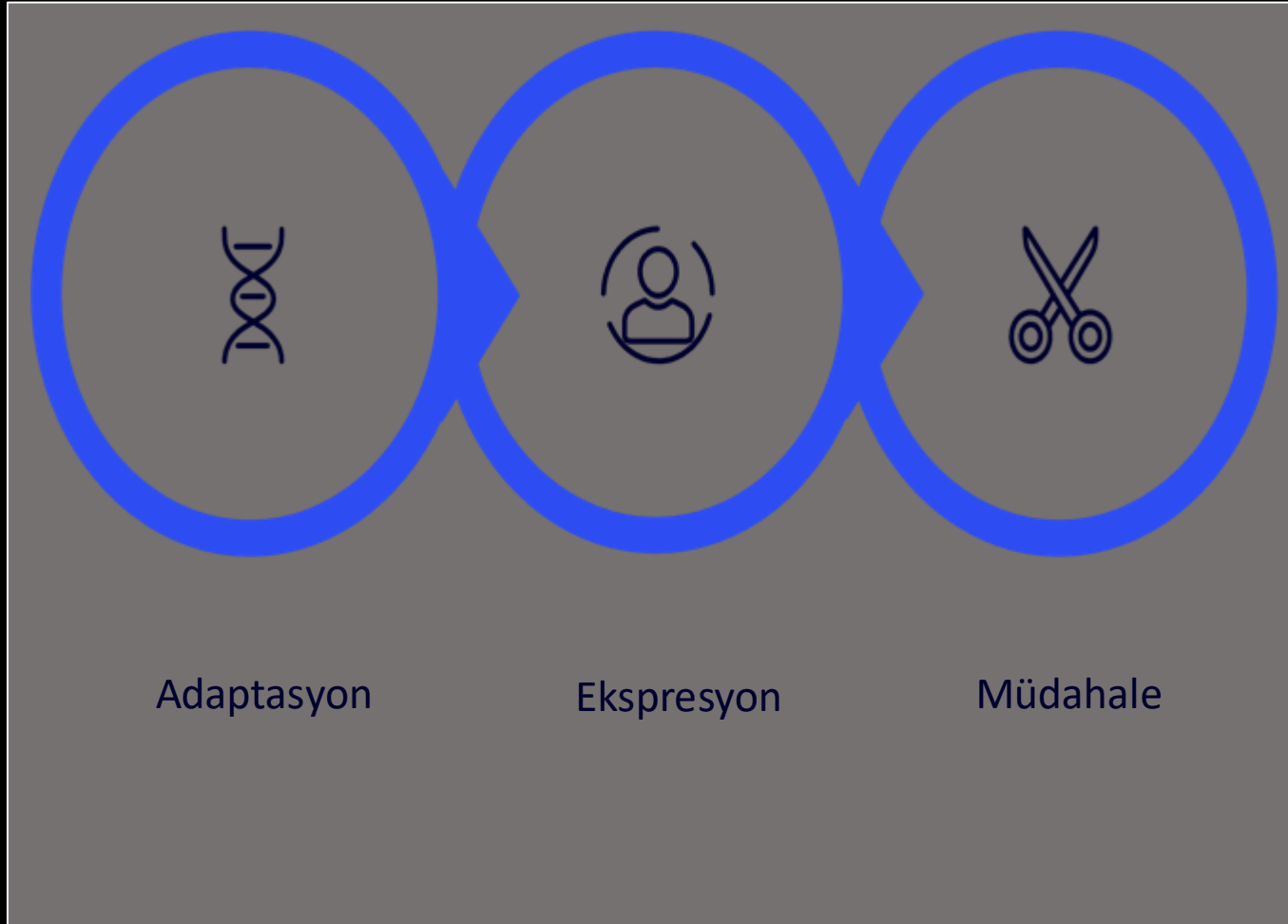
CRISPR-Cas Sistemi- Ekspresyon



• Ekspresyon:

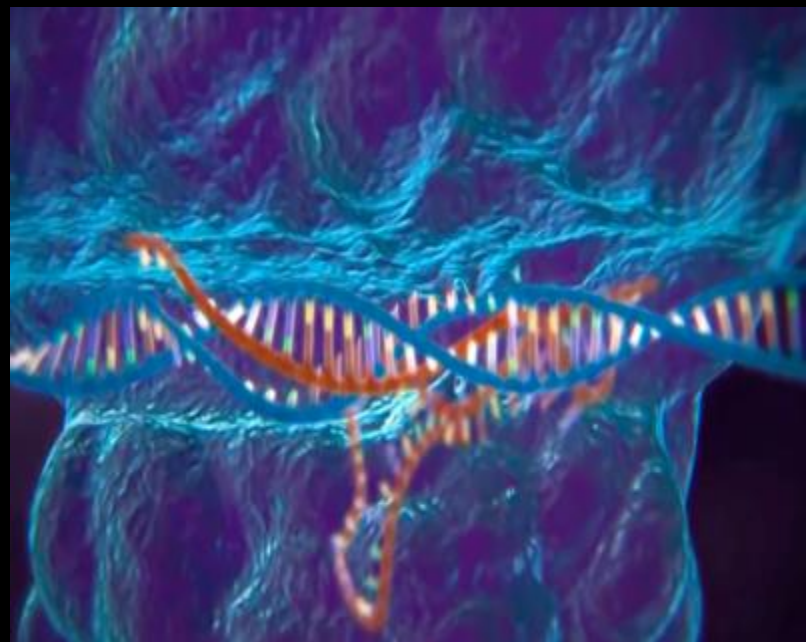
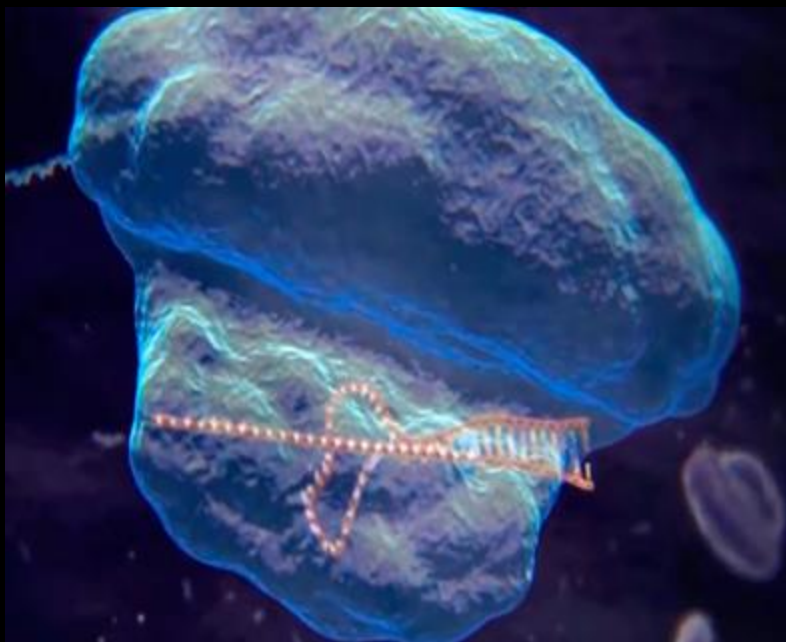
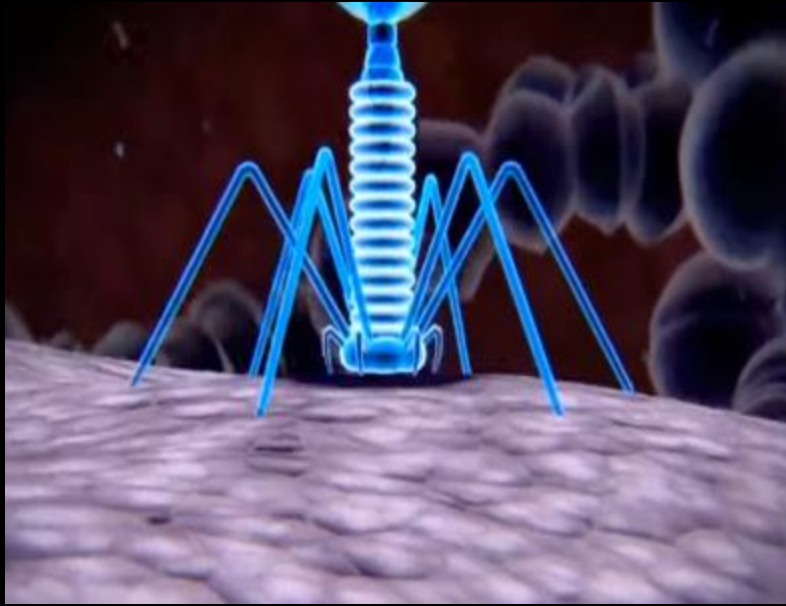
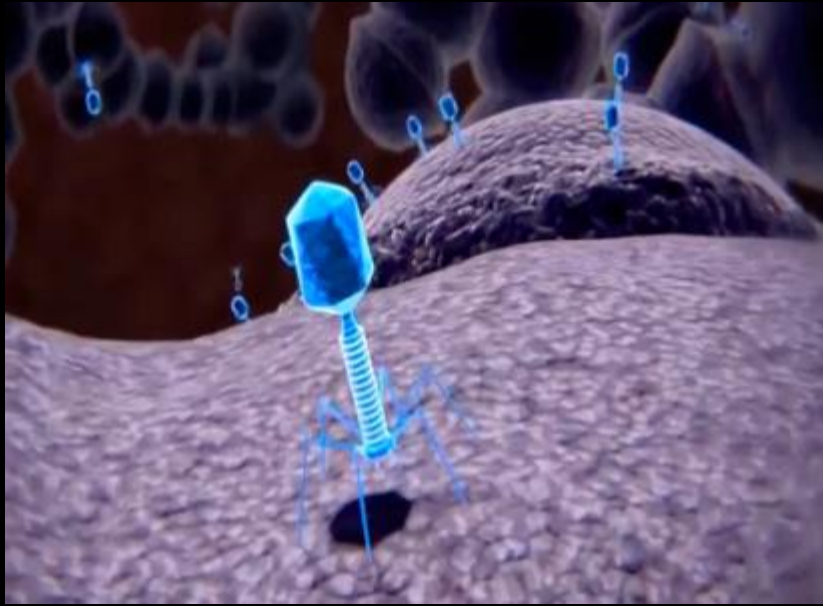
- **Transkripsiyon:** CRISPR dizisi RNA'ya çevrilir. Bu **pre-crRNA** denilen uzun bir RNA dır.
- Küçük parçalara bölünür ve **tracrRNA** (yardımcı RNA) ile birleşerek **gRNA**'yı oluşturur.
- Bu RNA'nın içinde virüs DNA'sına özgü kısım ile Cas9'a bağlanacak kısım vardır.

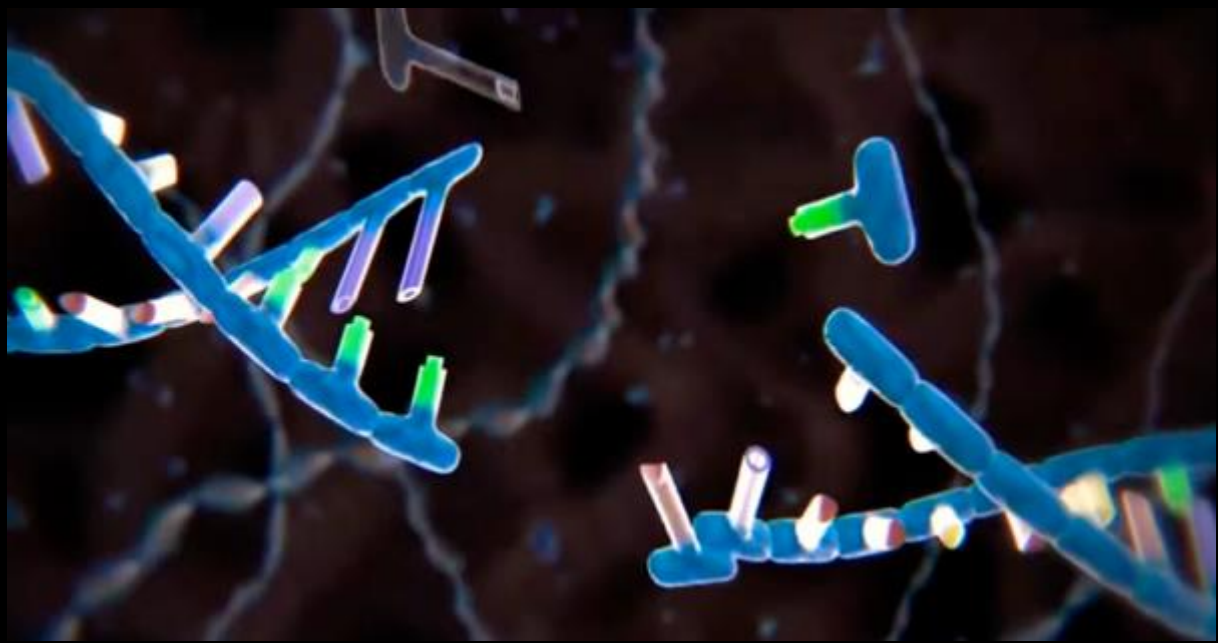
CRISPR-Cas Sistemi-Müdahale

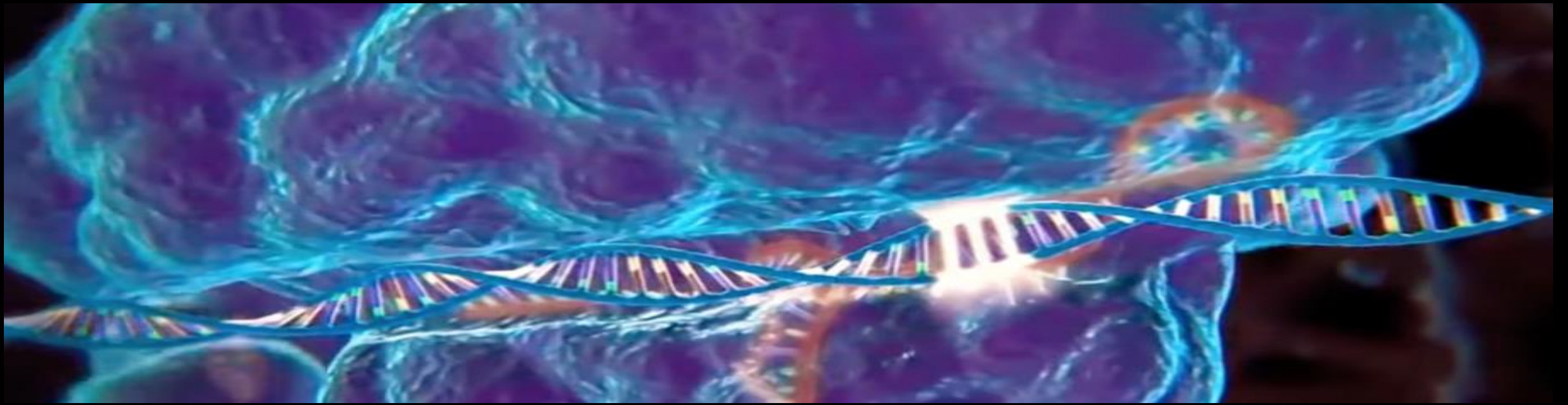


- Virüsle tekrar enfekte olduğunda, gRNA virüs DNA'sını tanır;
- Cas9 gRNA'ya bağlıdır; Cas9 viral DNA'yı keserek virüsü etkisiz hale getirir.











NOBELPRISET I KEMI 2020 THE NOBEL PRIZE IN CHEMISTRY 2020



KUNGL.
VETENSKAPS
AKADEMIEN

THE ROYAL SWEDISH ACADEMY OF SCIENCES

Photo: Halbauer/Fonelli



Emmanuelle Charpentier

Photo: UC Berkeley/Coudane Lab



Jennifer A. Doudna

"för utveckling av en metod för genomeditering"

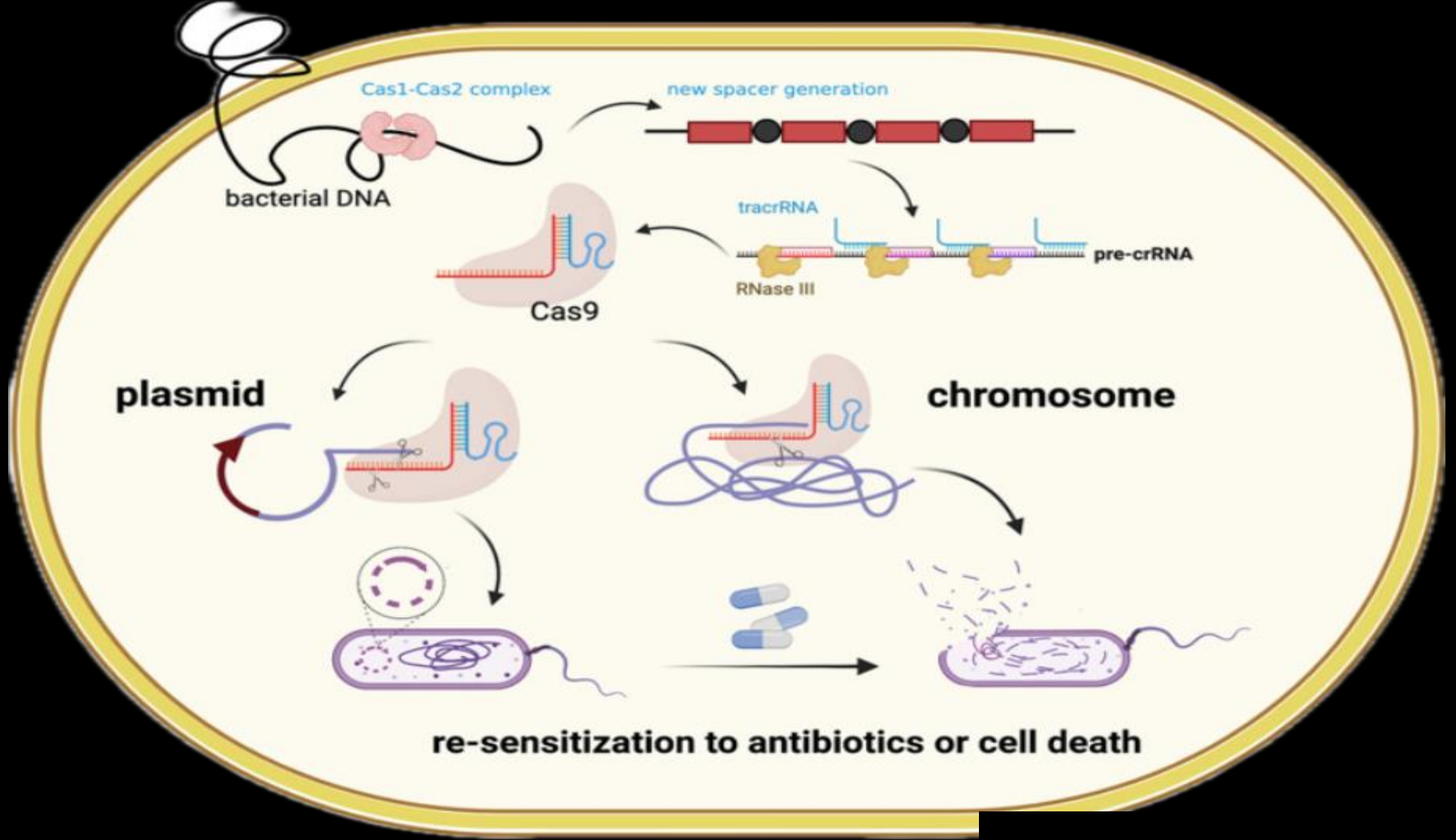
"for the development of a method for genome editing"

#nobelprize

THE
NOBEL
PRIZE

Antibakteriyel Dirençte Crispr Tekniđi

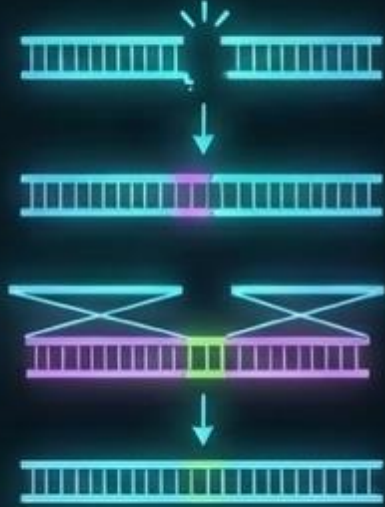
- CRISPR-Cas ise bakteriyel DNA'yı hedefleyip deđiřtirebilen hassas bir genom dűzenleme aracıdır.
- CRISPR/Cas9, bakteriyel genleri hedefleyerek belirli suşları yok edebilir veya direnç plazmidlerini hedefleyerek duyarlılığı artırabilir.
- Patojen odaklı yöntemler belirli bakterileri hedeflerken, gen odaklı yaklařımlar plazmidler űzerindeki direnç genlerini hedefler; etkinlikleri deđiřir.



Seçici Toksisite: İnsanlar İçin Güvenli, Bakteriler İçin Ölümcül

Ökaryotik Hücre (İnsan) - Onarım

- **Mekanizma:** Gelişmiş onarım yolları mevcuttur.
 - **NHEJ (Uç Uca Ekleme):** Hedeflenen gen bozular veya susturular.
 - **HDR (Şablonla Onarım):** Yeni gen eklenebilir veya mutasyon düzeltilebilir.
- **Sonuç:** Hücre hayatta kalır, genetik düzenleme gerçekleşir.



Bakteri Hücresi - Yıkım

- **Mekanizma:** NHEJ veya HDR gibi sağlam çift zincir kırığı onarım mekanizmaları yoktur.
- **Sonuç:** Kromozomal bozunma ve kesin hücre ölümü.
- **Mikrobiyota Etkisi:** Geniş spektrumlu antibiyotiklerin aksine, konak mikrobiyotasına zarar vermez.



Direnç Genlerini Hedefleme

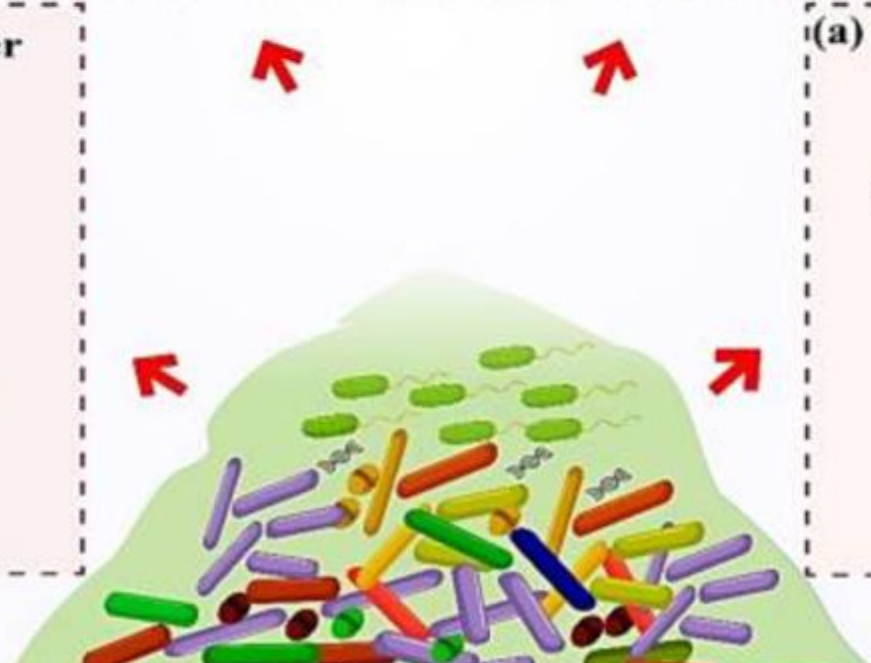
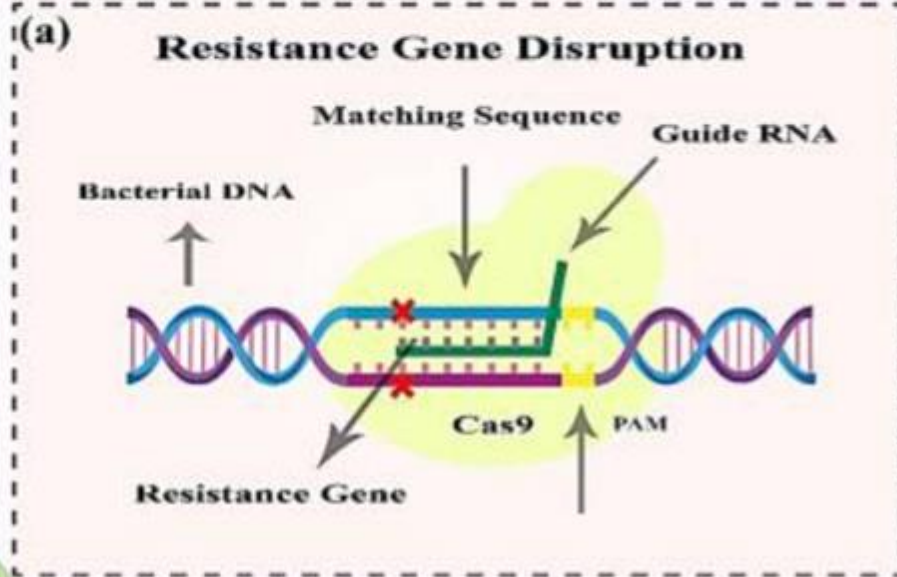
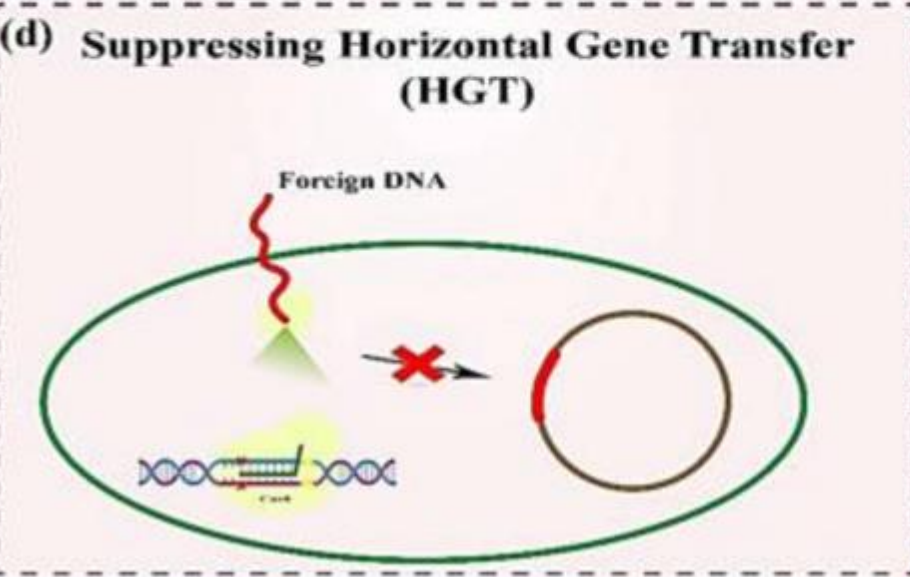
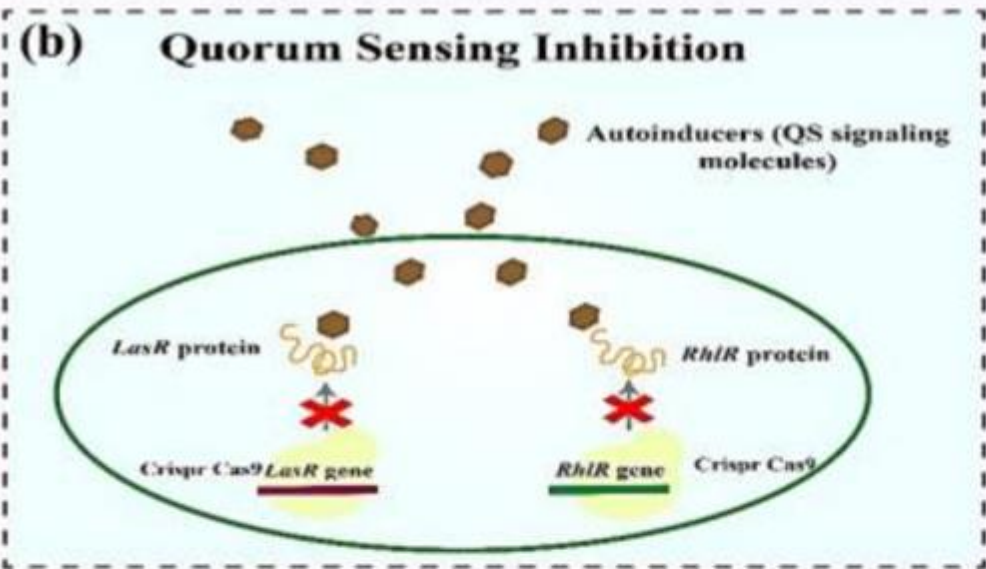
- Birçok direnç plazmidler gibi mobil genetik elementler üzerinde taşınır.
- CRISPR-Cas, bu direnç elementlerini tanıyıp keserek kaldırabilir veya işlevsel bölgelerini devre dışı bırakabilir.

Klinik Başarı Örneği

- Karbapenem direncinden sorumlu **blaNDM-1 genini** hedeflemek için kullanılmış ve klinik izolatlarda son çare antibiyotiklere duyarlılık yeniden sağlanmıştır.

Seçici Antibakteriyel Ajanlar

- Özgüllük, bakteriyel türe ve genetik içeriğe bağlıdır geniş spektrumlu
- Antibiyotiklerin aksine konak mikrobiyotasına minimum zarar verir.



Taşıyıcı vektör	Cas	Hedef bakteri	Hedef gen	Sonuç	Kaynak
Faj M13 kapsidi	Cas13	E. coli	blaIMP-1	Bakteriyel popülasyonda 2–3 log azalma	(Kiga ve ark., 2020)
Faj 80α kapsidi	Cas13	S. aureus	mecA	Büyümenin inhibisyonu	(Kiga ve ark., 2020)
Temperat fajlar (vB_365)	Cas9	E. coli	Plazmidler (blaNDM-1)	Bakteriyel popülasyonda 5–6 log azalma	(Liu ve ark., 2020)
Plazmid (pGLO-cas3)	Cas3	E. coli	mcr-1, blaNDM-1, Tet(X)	Antibiyotik direnç genlerinin (ARG) transferinin kısıtlanması	(Fang ve ark., 2024)
Plazmid (pCas9, pCas9-oriT, pBAD-Cas9-oriT)	Cas9	E. coli	Plazmidler (blaNDM-5)	MIK'de (meropenem) 8 kat azalma	(Li ve ark., 2022)
Plazmid	Cas9	E. coli	mcr-1	Kolistine duyarlılığın geri kazanılması; plazmid transferinin inhibisyonu	(Wan ve ark., 2020)
Plazmid	Cas9	E.coli	fosA3	Fosfomisine duyarlılık %100'e geri kazandırıldı	(Wang et al. 2022)
Plazmid	Cas9	E.coli	luxS, fimH, bolA	Biyofilm oluşumunda azalma	(Alshammar i et al.2023)

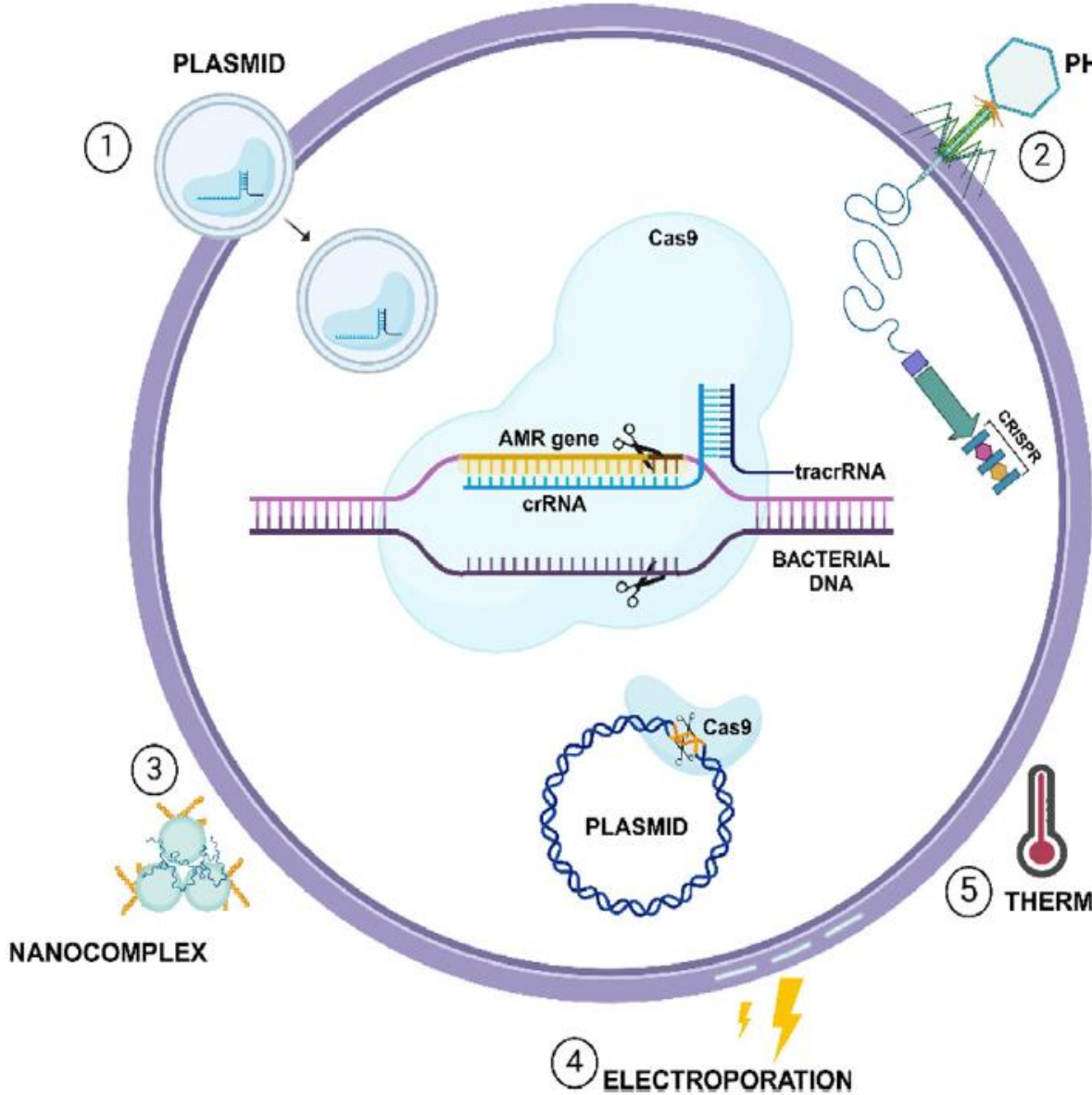
Taşıyıcı vektör	Cas	Hedef bakteri	Hedef gen	Sonuç	Kaynak
Plazmid	Cas9	E. coli	AcrA, AcrB, TolC	Antibiyotik duyarlılığı geri kazandırıldı ve biyofilm oluşumu ↓	(Wan et al. 2022)
Plazmid	dCas9	K. pneumoniae	blaNDM-1	Meropenem MİK'inde >1000 kat ↓	(Yao et al. 2022)
	dCas9	K. pneumoniae E.coli	blaNDM-1, blaSHV-12 blaKPC-2	Meropenem ve aztreonam MİK'lerinde sırasıyla 16 kat ve 8 kat azalma Meropenem MİK'i 8'den 0.125 µg/mL'ye düştü	
Plazmid (pCasCure)	Cas9	Karbapenem dirençli Enterobacteriaceae	blaKPC, blaNDM, blaOXA-48	Karbapenem MİK'lerinde >8 kat azalma	(Hao et al. 2020)
CRISPR-nanokompleks	Cas9	MRSA	mecA	MRSA büyümesinde anlamlı inhibisyon	(Kang et al. 2017)
Plazmid (pHERD20T)	dCas9	P. aeruginosa	PA0715	Antimikrobiyal direnç, piyosiyenin ve biyofilm oluşumunda azalma	(Zhou et al. 2022)

Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of LBP-EC01, a CRISPR-Cas3-enhanced bacteriophage cocktail, in uncomplicated urinary tract infections due to *Escherichia coli* (ELIMINATE): the randomised, open-label, first part of a two-part phase 2 trial

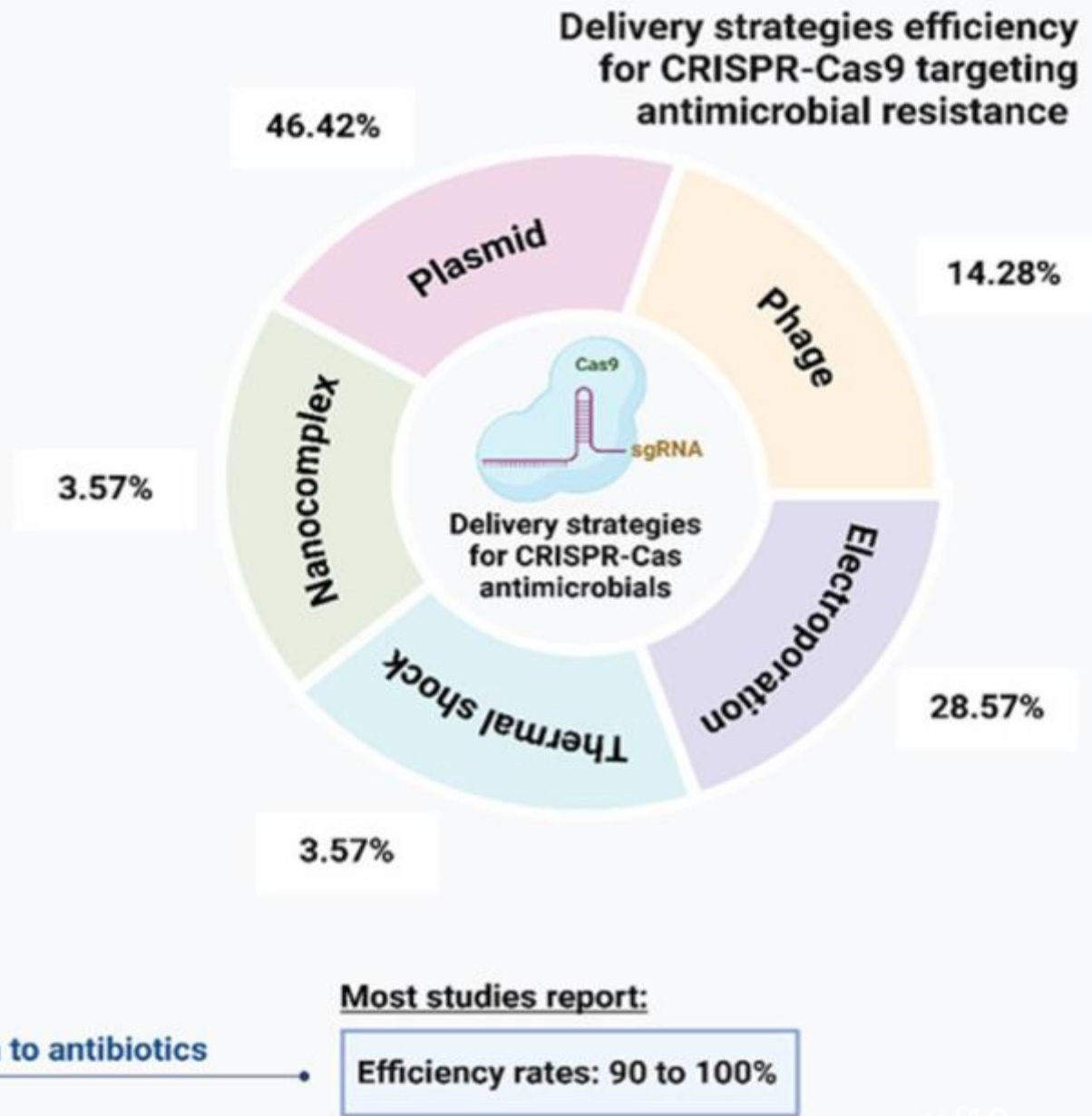
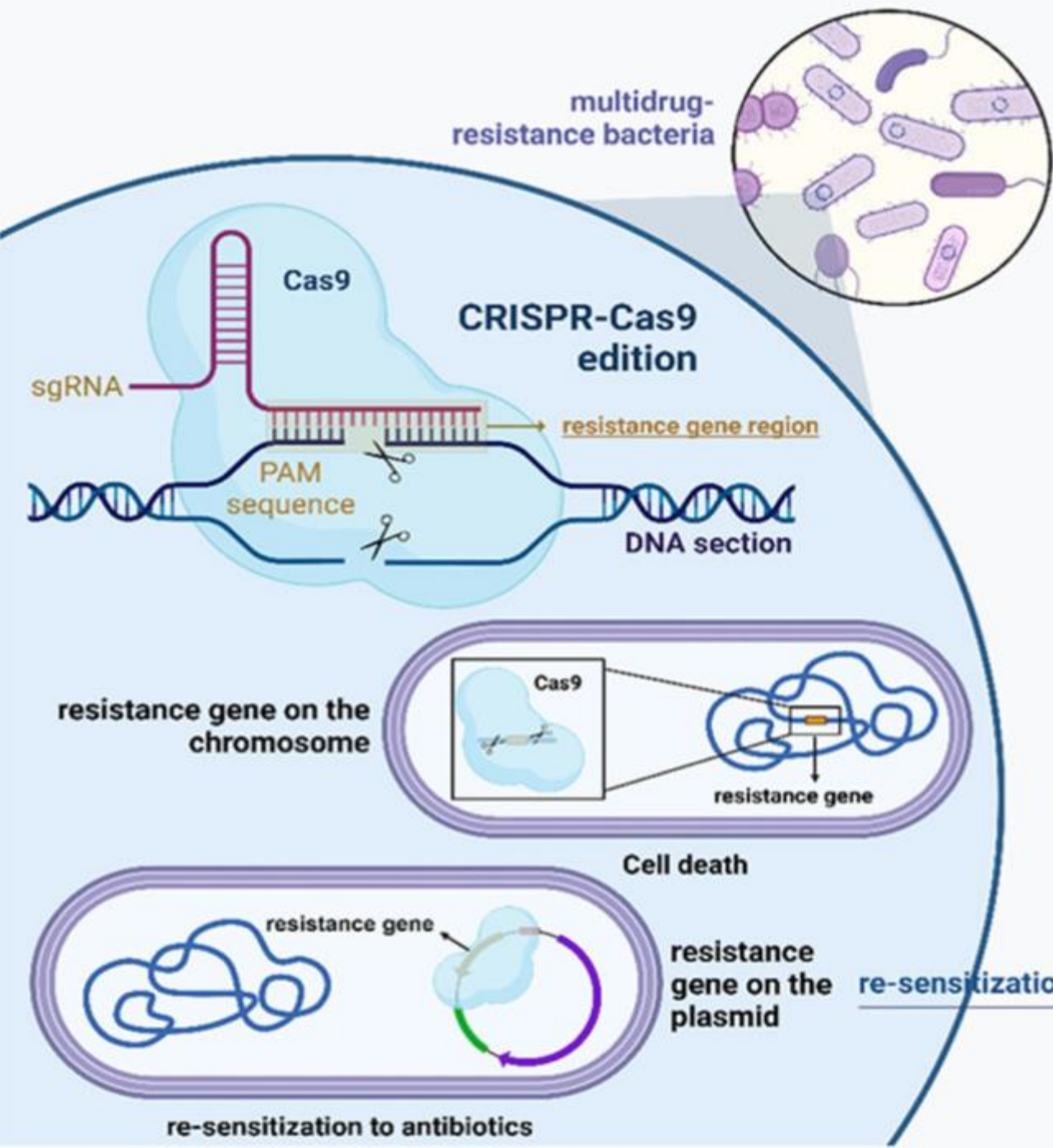


- LBP-EC01, CRISPR-Cas3 ile güçlendirilmiş, *E. coli*'ye özgü, genom hedefli bakterisidal etki gösteren deneysel bir faj terapisi.
- Daha çok doz seçimi, güvenlik, PK ve PD çalışmasıdır.
- Tamamında semptomlarında düzelme görülmüş
- 16 hastanın 14'ünde mikrobiyolojik iyileşme
- 10. gün yapılan değerlendirmede idrarda 1×10^3 CFU/mL'nin altına düşme gözlemlenmiştir.

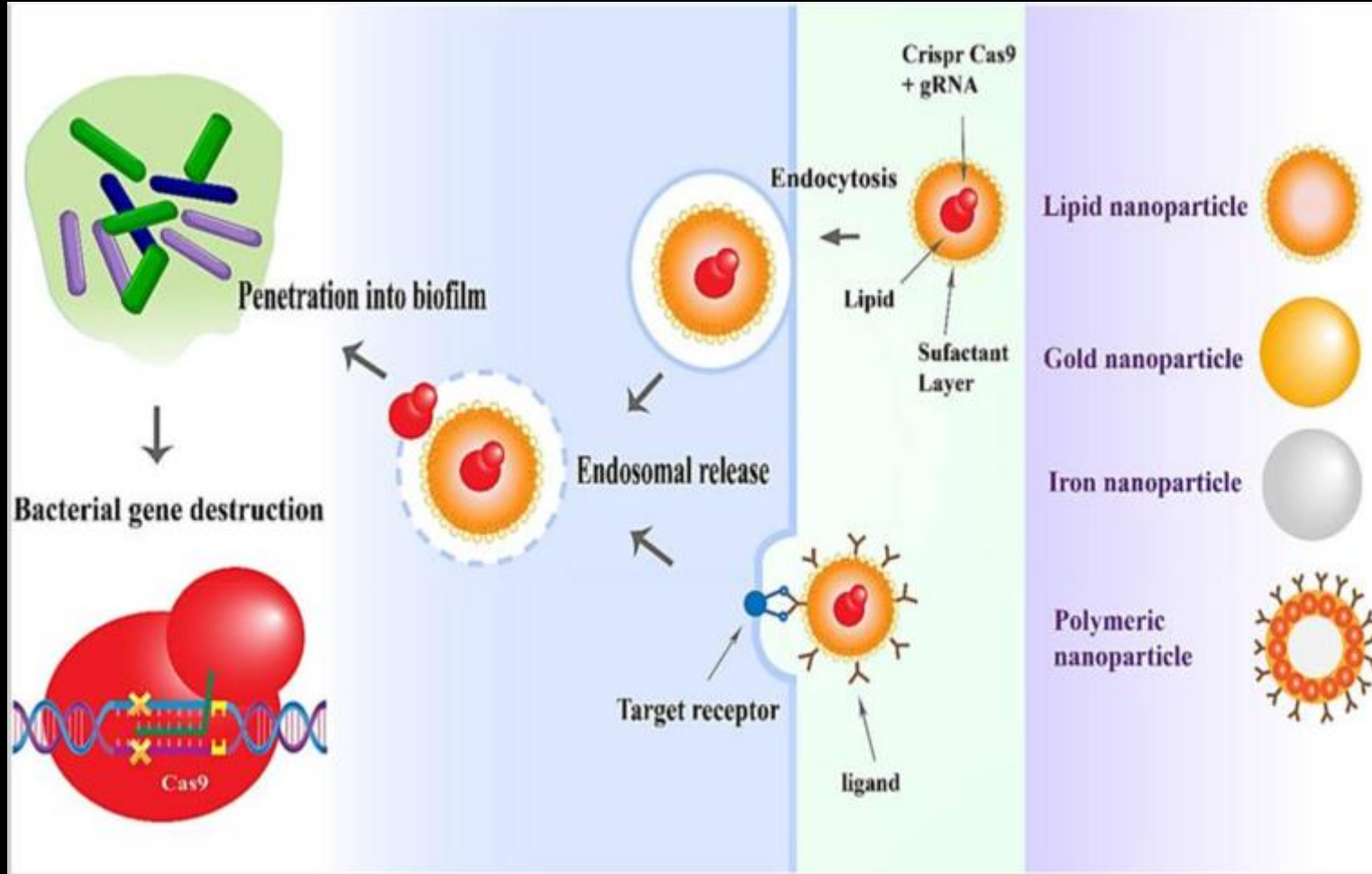
Delivery strategies for CRISPR-Cas antimicrobials



- ① Plasmid
- ② Phage-CRISPR-Cas
- ③ Nanocomplex
- ④ Electroporation
- ⑤ Thermal shock

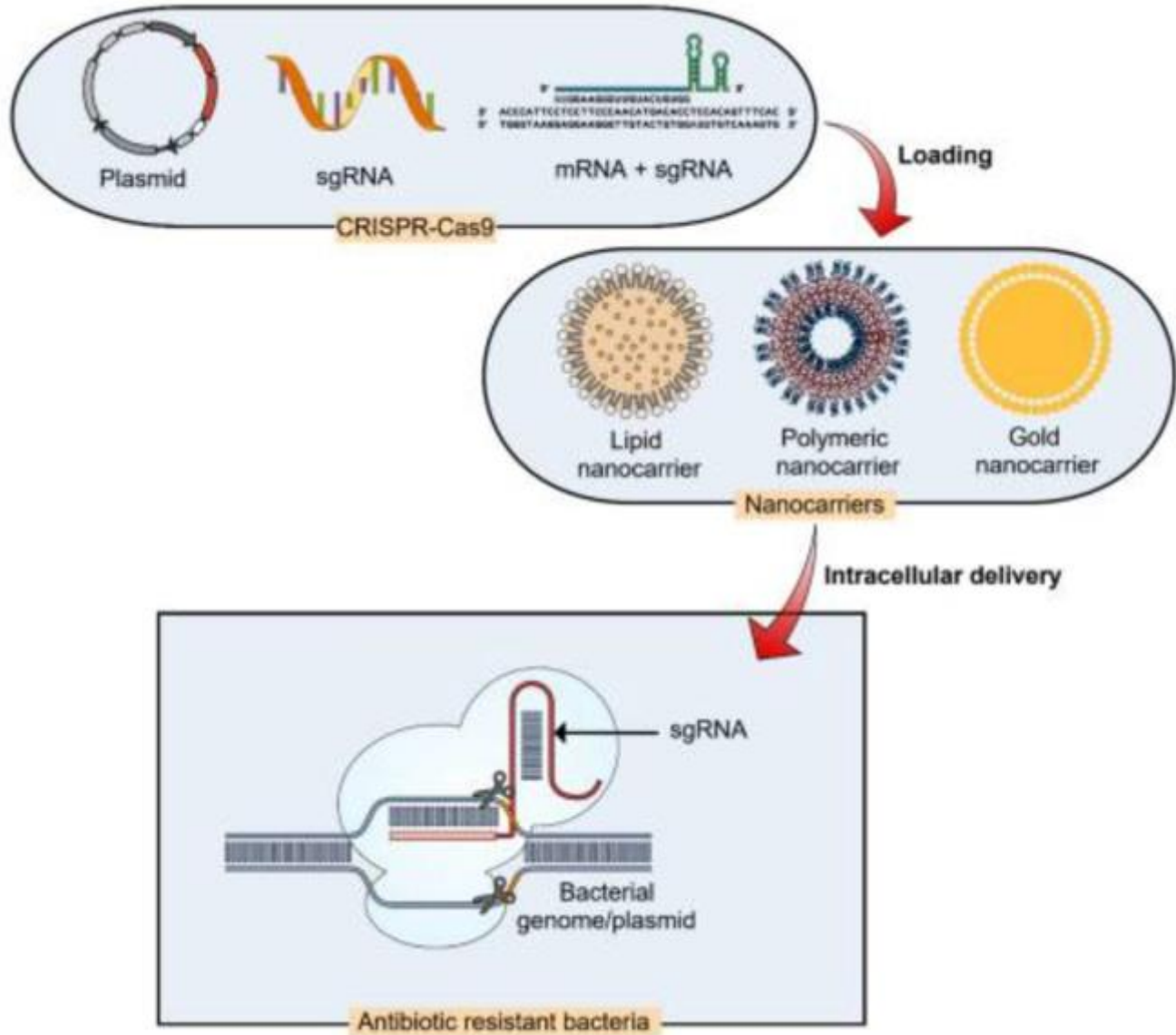


Bakteriyel Enfeksiyonlar ve Nanoteknoloji



Antimikrobiyallerin iletilmesi nanoteknolojinin önemli fonksiyonlarından biridir

- Altın, polimerik, lipit yapısındadır
- Boyutları 1-100 nm arasında değişir
- Yüksek yüzey-hacim oranına sahiptirler.



CRISPR, plazmid DNA ve mRNA nanotaşıyıcılarla kapsüllenebilir

- Hücre zarlarını geçmesini kolaylaştırır
- Koruma sağlar

Nanotaşıyıcıların Avantajları



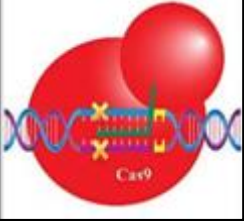
Hedefli İletim

Yüzey liganları ile enfeksiyon bölgesine özgü iletim sağlanır; yan etkiler azalır.



Kontrollü Salım

Hidrofobik özelliği ile artan dolaşım süresi, uzayan yarı ömür, azalan uygulanma sıklığı ve sistemik yan etkiler



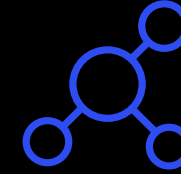
Crispr stabilitesi ve iletimi

RNazlar yoluyla bozulmadan, daha az immunojenik, Gelişmiş biyouyumluluk, daha hızlı ve basit iletim sağlar.



Biyofilmden Korunma

Biyofilm içerisine ilerleme ve biyofilm yapısını bozma **abilir**.



Hücre

Diyar Mekanizmalarını Aşma
duvarı kalınlaşması,
Beta-laktamaz aracılı bozunma ve efluks pompası gibi antibiyotik direnç mekanizmalarını aşabilir.

Nanotaşıyıcı	CRISPR-Cas	Model	Sonuç
Lipid	Cas13a/gRNA	In vitro + in vivo	Polimiksin B ile kombinasyonda E. coli enfeksiyonu kontrol edildi
Altın kaplı manyetik	dCas9/sgRNA	In vitro + in vivo	ÇİD bakterilerin hızlı ve hassas tespiti
Polimer türevli	SpCas9/sgRNA	In vitro	mecA geni hedeflenerek MRSA'ya etkili iletim
pH duyarlı manyetit/gümüş	CRISPR-Cas9 plazmid	In vitro	Bakteriyel hücreleri dönüştürerek direnç yayılımını kontrol etti
Azot ile modifiye edilmiş karbon nanopartiküller	Cas9/çoklu sgRNA	In vitro + in vivo	E. coli'de direnç genlerinin kalıcı eliminasyonu

„Tasarım Bebek”

Yüksek IQ

Kellik yok

Mükemmel işitme

Mükemmel görme

Düşük risk
Alzheimer
Meme kanseri
İnme

Atletik performans



- CRISPR sadece bakterileri değil, biyolojiyi şekillendirme gücü sunuyor. Bu gücün sınırını “etik” belirleyecektir.



Teşekkürler