

CRISPR-Cas9 Teknolojisi, Güvenliliği ve Etik Açından Değerlendirilmesi

CRISPR-Cas9 Technology, Safety and Evaluation from an Ethical Perspective

^aSelinay Başak ERDEMLİ KÖSE^{a,b}, ^bÜnzile SUR^{a,c}, ^dAnıl YİRÜN^{a,d}, ^eAylin BALCI^a,
^fBelma KOÇER GÜMÜŞEL^e, ^gPınar ERKEKOĞLU^a

^aHacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji ABD, Ankara, TÜRKİYE

^bBurdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Burdur, TÜRKİYE

^cAtatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji ABD, Erzurum, TÜRKİYE

^dÇukurova Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji ABD, Adana, TÜRKİYE

^eLokman Hekim Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji ABD, Ankara, TÜRKİYE

ÖZET Günümüzde bir genom mühendisliği aracı olan “Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)–Cas9 (CRISPR associated) sistemi, biyolojik bilimlerde yepyeni bir dönem başlatmıştır. CRISPR-Cas9 sistemi; ilk olarak bakteri ve arkealar gibi prokaryotlarda keşfedilen, bakteriyofaj enfeksiyonları, istilacı plazmidler ve yabancı nükleik asitlere karşı hücreyi korumayı amaçlayan RNA ve protein tabanlı bir sistemdir. DNA sekanslarını kolayca ve hassas bir şekilde yerleştirme, çıkarma ve hatta düzenleme yeteneği, tıp, enerji ve hatta çevre çalışmaları gibi geniş bir yelpazedeki biyoteknoloji alanlarında bilim çevrelerinin ilgisini çekmektedir. Tıbbi açıdan bakıldığında bu teknoloji, klinik öncesi ve klinik çalışmalarla çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılabilir. Bilim adamlarının herhangi bir organizmada herhangi bir geni teorik olarak hedeflemesine ve değiştirmesine olanak sağlayan hedeflenebilir nükleazlar, bu tedavilerin yolunu açmaktadır. Bu sistem embriyoloji, kanser, nörolojik hastalıklar ve enfeksiyon hastalıklarında araştırma aşamasında kullanıma girmiştir. Ancak CRISPR-Cas9 sisteminin güvenliği ile ilgili konular henüz çözülememiştir. Ayrıca, bu sistemin başta insan embriyolarında kullanımı olmak üzere birçok alanda kullanımı üzerine etik kaygılar devam etmektedir. Bu derleme kapsamında CRISPR-Cas9 teknolojisinin dayandığı prensiplerden ve bu teknolojinin güvenliğinden söz edilecek; sistemin kullanımı ile ortaya çıkabilecek etik kaygılar irdelenecektir.

ABSTRACT Today, a genomic engineering tool “Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)–Cas9 (CRISPR associated) system has started a new era in biological sciences. CRISPR-Cas9 system was first discovered in prokaryotes like bacteria and archaea as an RNA and a protein-based system that protects the cell against bacteriophage infections, invading plasmids and foreign nucleic acids. The ability of easy and sensitive replacement of DNA sequences, deletion and most of all arrangement have attracted attention of scientists in a wide range of biotechnology study fields including medicine, energy and environment studies. From a medical perspective, this technology can be used in pre-clinical and clinical studies to treat several diseases. Targetable nucleases that enable the scientist to target and change a gene in an organism can pave the way for these treatments. This system is now being used in researches in embryology, cancer, neurological and infectious diseases. However, problems have not solved for the safety issues of CRISPR-Cas9 system. In addition, ethical concerns are still continuing for the use of this system in several fields, particularly in human embryos. In this review we will mention the main principles and safety issues of CRISPR-Cas9 technology as well as the ethical concerns and toxicological problems.

Anahtar Kelimeler: CRISPR-Cas9; etik; güvenlilik; nörodejeneratif hastalıklar; kanser

Keywords: CRISPR-Cas9; ethics; safety; neurodegenerative diseases; cancer

İlk olarak 1953’te DNA çift sarmalının keşfi, biyolojik bilimlerde büyük bir ilerlemeyi beraberinde getirmiştir. Son 60 yılda, bu konudaki gelişmelerin çoğunu DNA’da veya ilgili makromoleküllerde yapısal değişiklikler elde etmek için kullanılan teknoloji-

ler sağlamıştır. Son 20 yılda ise DNA ve RNA sentezi için yeni yöntemler geliştirilmiş ve bu yöntemler genom organizasyonunun keşfine giden yolu açmıştır. Enzimler (polimerazlar, ligazlar ve restriksiyon endonükleazlar dâhil) ve polimeraz zincir reaksiyonu

Correspondence: Pınar ERKEKOĞLU

Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji ABD, Ankara, TÜRKİYE/TURKEY

E-mail: erkekp@yahoo.com



Peer review under responsibility of Türkiye Klinikleri.

Received: 05 Jul 2019

Received in revised form: 10 Oct 2019

Accepted: 05 Nov 2019

Available online: 20 Nov 2019

2630-5569 / Copyright © 2020 by Türkiye Klinikleri. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

(PCR)'nin keşfi, genleri ve gen fragmanlarını izole etmenin yanı sıra hücrelerde, model organizmalarda ve in vitro çalışmalarda gen mutasyonlarını tanımlamak için de imkân sağlamıştır. Genomik dizileme teknolojilerinin ortaya çıkışı ile insanlar dâhil olmak üzere birçok organizma için hızlı bir şekilde bütün genom dizileme verileri elde edilmiştir. Günümüzde ise "Watson-Crick DNA Modeli" prensiplerine dayanan bir genom mühendislik aracı olan "Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)"-Cas9 (CRISPR associated) sistemi, biyoloji biliminde yepyeni bir dönem başlatmıştır.^{1,2}

CRISPR NEDİR?

CRISPR-Cas9 sistemi ilk olarak bakteri ve arkealar gibi prokaryotlarda keşfedilen, bakteriyofaj enfeksiyonları, istilacı plazmidler ve yabancı nükleik asitlere karşı hücreyi korumayı amaçlayan RNA ve protein tabanlı bir sistemdir.^{2,3}

İstilacı patojen kökenli kısa DNA sekansları enfekte hücrelerde, konakçı genomun CRISPR dizilerinde "spacer (aralayıcı)" formunda depolanır. CRISPR-Cas sisteminde DNA'nın palindromik (tama dizileri DNA zincirinin her ikisinde de aynı olan) tekrar kümelerinin kopyası "trans-aktive edici RNA (tracr RNA)" ve "spacer" bölgelerin kopyası "CRISPR RNA (crRNA)" olarak adlandırılır.² CRISPR dizisi kopyalanır ve CRISPR RNA (crRNA) olarak bilinen tek "spacer" içeren küçük RNA'lara dönüşür. Bu crRNA'lardaki "spacer" sekansları, yabancı DNA ya da RNA sekanslarını baz eşleşmesi ile tanıyan efektör kompleksler oluşturmak için Cas proteinlere ve tracrRNA molekülüne bağlanır. Cas proteinler, DNA'nın palindromik tekrar kümelerinden kopyalanan RNA'ya bağlanabilen ya da RNA "spacer"ları ile eşleşmiş DNA'yı kesen helikazlardır. TracrRNA ve crRNA, proto-aralayıcı bitişik motif [protospacer adjacent motifs (PAM)] bölgelerinde çift sarmallı DNA kesilmesini indüklemek amacıyla Cas9'u yönlendirebilen tek rehberli RNA'yı (sgRNA) oluşturmak için birleşirler.² Cas9 gibi Cas proteinleri, adaptif bir immün yanıt oluşturmak için işgal edilmiş hedef nükleik asidi böler.³ Bunu yaparak, kesildiği yerden DNA içine ekleme ya da çıkarmalar yapılabildiğini mümkün kılar.²

CRISPR sistemlerinde görev alan çok sayıda farklı Cas proteini bulunmaktadır. Bütün CRISPR-Cas sistemlerinde bulunan Cas1 ve Cas2 proteinleri adaptasyonda rol oynamaktadır. Diğer Cas proteinleri ise sadece belli tip CRISPR-Cas sistemleri ile ilişkilendirilmektedir. CRISPR bölgesinin yapılanmasına ve Cas proteinlerinin içeriğine göre CRISPR-Cas sistemleri basitçe Tip I, II ve III olarak 3 ana sınıfa ayrılmaktadır. CRISPR-Cas sistemlerinin 3 tip hâlinde sınıflandırılması, esas olarak bu sistemlerin farklı Cas gen içeriğini yansıtır. Cas proteinleri crRNA biyogenezinden, istilacı nükleik asidin tanınmasından ve tahrip edilmesinden sorumludur; bu nedenle her bir CRISPR tipi, benzersiz bir moleküler etki mekanizması göstermektedir. Tip I ve Tip III sistemlerinde Cas6, Cas3 ve Cas10 proteinleri farklı görevleriyle sistemin çalışmasını sağlamaktadır. Bu sistemler arasında çalışma mekanizması en iyi aydınlatılmış olan, en çok çalışılan ve ökaryot organizmalara uyarlanması en mümkün görünen Tip II sistemidir. Tip II CRISPR-Cas sisteminde görev yapan endonükleaz Cas9'dur.⁴

DNA sekanslarını kolayca ve hassas bir şekilde yerleştirme, çıkarma ve hatta düzenleme yeteneği, tıp, enerji ve hatta çevre çalışmaları gibi geniş bir yelpazedeki biyoteknoloji alanlarında bilim çevrelerinin ilgisini çekmektedir. Tıbbi açıdan bakıldığında, yeni ortaya çıkan alan, klinik öncesi ve klinik çalışmalarla kombinasyon hâlinde çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılabilir. Bilim adamlarının herhangi bir organizmada herhangi bir geni teorik olarak hedeflemesine ve değiştirmesine olanak sağlayan hedeflenebilir nükleazlar, bu tedavilerin yolunu açmaktadır.⁵ Nükleazlar, bölgeye özgü DNA bağlama alanları ile programlanarak, artırılmış performansla, hızlandırılmış nükleaz birleşmesine ve önemli ölçüde daha düşük genom düzenleme maliyetine sahip olabilir. Çinko-parmak nükleazları [zinc finger nucleases (ZFN)], transkripsiyon aktivatör benzeri efektör nükleazlar [transcription activator-like effector nucleases (TALENs)] ve meganükleazlar olarak da bilinen mühendislik güdümlü endonükleazlar, günümüzde genom mühendisliği için kullanılan araçlardır.

Bu listeye en yeni eklenen genom düzenleme aracı CRISPR-Cas9 sistemidir.⁶ ZFN ve TALEN, DNA çift iplikli kırılmaları indüklemek için modüler

DNA bağlayıcı proteinlere bağlanan nükleazları kullanırken, CRISPR-Cas9 sistemi, hedef DNA'ya bağlanmak için 20 nükleotid içeren küçük RNA'lar tarafından yönlendirilen bir nükleaz kullanır.⁷ Bu, CRISPR-Cas9 sisteminin ZFN ve TALEN'e olan üstünlüğünün nedenlerindedir.

CRISPR-CAS9 SİSTEMİNİN TARİHÇESİ

Geçtiğimiz 20 yıl boyunca çok sayıda araştırmacı, CRISPR-Cas9 sistemi üzerine çalışmalar gerçekleştirmiştir. İlk olarak Japonya Osaka Üniversitesinden Ishino ve ark. *Escherichia coli*'ye ait gende alışılmadık bir DNA dizilimi olduğunu bildirmiş; ancak CRISPR dizilerinin biyolojik fonksiyonu 2005'e kadar anlayamamıştır.⁸ 2005 yılında 3 farklı çalışma ile ilk kez CRISPR dizilerinin adaptif immüniteye kilit bir rolü olduğu öne sürülmüştür.⁹⁻¹¹ Barrangou ve ark., yoğurt ve peynir yapımında kullanılan bir tür bakteri olan *Streptococcus thermophilus* kültürlerinde CRISPR odaklarını görüntüleyerek bakterilerdeki adaptif immüniteye kanıt sunmuşlardır.⁴ Buna ek olarak, Horvath ve Barrangou CRISPR olarak belirli bir virüs sekansı barındıran bakterilerin bu belirli virüse karşı dirençli olduğunu ve CRISPR dizilerinin Cas genleriyle birlikte çalışarak istilacı virüslere karşı koruma sağlamakla yükümlü olduğunu bildirmişlerdir.¹² RNA aracılı DNA hedeflemeye dayanan bu immün sistemin mekanizması kısa süre sonra gösterilmiştir. Daha sonra, Jinek ve ark.'nın önderliğindeki araştırma grubu, genom düzenleme için *Streptococcus pyogenes*'ten Tip II CRISPR sistemini tasarlamışlardır.¹³ Araştırmacılar çalışmalarında, bakterilerde gen düzenlemesi için CRISPR-Cas9'un genel olarak kullanılabilirliğini göstermiş; crRNA ve tracrRNA'nın bir araya gelerek kimerik sgRNA'yı oluşturduğunu göstermişlerdir. Cong ve ark. ise insan hücrelerinde Cas9 tabanlı genom düzenlemesinin ilk başarılı örneğini rapor etmişlerdir.¹⁴

Genom düzenleme alanında gerçekleşen hızlı ilerlemeler, ticari olarak tasarlanmış çeşitli hedeflenmiş nükleazların ortaya çıkmasına neden olmuştur. Ancak hiçbir yöntem hatasız değildir ve her birinin kendi artıları ve eksileri vardır. Genel olarak genom mühendisliği için güncel yaklaşımlarda karşılaşılan en önemli engeller, düşük verimlilik ve sınırlı sayıda hücre tipi ve organizmasının hedeflenebilmesidir.¹⁵

Hedef dışı mutasyona sebep olmaması, nükleazların hızlı ve etkili bir şekilde birleşmesini sağlaması ve hedef hücre popülasyonunda istenen dizinin yüksek frekansı ideal bir genom düzenleme aracında aranan özelliklerdir.⁷

CRISPR-Cas9 sisteminin aydınlatılmaya başlanması ve genom yapılandırmanın ökaryot memeli hücrelerinde denenmesini takiben çok geniş ölçüde CRISPR tabanlı araçlar geliştirilmeye başlanmıştır. Farklı araştırma alanlarındaki kullanımı genişletebilmek amacıyla çok sayıda Cas9 mutant ya da analogları ve çoklu CRISPR-Cas vektörleri [lentiviral (LV), adenoviral (AV) ve adenovirüs ilişkili viral (AAV) plazmidler gibi] geliştirilmektedir.^{2,3} Zetsche ve ark. ise araştırma ve tedavi için önemli etkilere sahip gibi görünen farklı bir sistem olan "Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats from *Prevotella* and *Francisella* 1, Cpf1"i tanımlamış, daha basit ve daha kesin genom mühendisliği potansiyeli olan ve CRISPR-Cpf1 olarak adlandırılan ikinci bir sistemden başarıyla yararlanmışlardır. Cpf1 sisteminin, sadece tek bir RNA gerektirdiğinden daha basit olduğu ve Cpf1 enziminin ayrıca standart *Streptococcus pyogenes* Cas9 (spCas9)'dan daha küçük olduğundan hücreler ve dokulara daha kolay ulaştığı bildirilmiştir.¹⁶ 2016 yılında Slaymaker ve ark. ile Massachusetts Hastanesinden Kleinstiver ve ark., bağımsız olarak espCas9 ve spCas9-HF olarak adlandırılan oldukça spesifik spCas9 varyantlarını geliştirmişlerdir.^{17,18} Bu varyantlar, Cas9 proteini ve hedef DNA arasındaki spesifik olmayan etkileşimleri azaltmak için mutasyonlar içermektedir. SpCas9 nükleazının, nikaz (Cas9n) veya nükleaz eksikliği olan mutanta (dCas9) dönüştürülebildiği bildirilmiştir.¹³ Bir diğer önemli fonksiyonel dönüşüm de O'Connell ve ark. tarafından rapor edilen RNA'yı hedefleyen Cas9 (RCas9) sistemidir.¹⁹

CRISPR sistemlerine karşı organizmaların geliştirdiği anti-CRISPR stratejiler olduğu ve CRISPR sistemlerinin yüksek çeşitliliğine karşı bu anti-CRISPR genlerin de çok çeşitli olabileceği bilinmekle birlikte sağlayacakları koruma oldukça sınırlıdır. Bakteriler ve fajlar arasındaki bu strateji yarışı moleküler bir savaşı izlemek gibidir ve bu savaşlar, genom mühendisliği için hayal bile edilemeyecek araçların ortaya çıkışını sağlayabilir.²⁰ CRISPR sis-

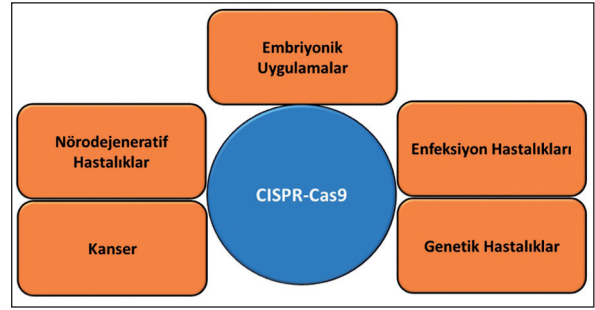
temlerinin uygulama alanları Şekil 1’de görülmektedir.

CRISPR-CAS9 UYGULAMALARI

EMBRİYOLAR ÜZERİNDEKİ ÇALIŞMALAR

Gen düzenleme üzerindeki her yeni gelişme, kalıtsal hastalıklar için yeni çareler üretilmesi konusunda umut vadetmektedir. İnsanın kalıtım maddesi olan genomu yapılacak müdahalelerle hastalıklara neden olan gen mutasyonlarının onarılması, etkisiz hâle getirilmesi ve en önemlisi de her ne kadar etik tartışmaların odağı olsa da bu yöntemler sayesinde insan da dâhil canlı organizmaların embriyolarında istenen herhangi bir özelliğin değiştirilebilmesi hatta istenen özelliklere sahip bebeklerin tasarlanması bile mümkün olabilir.

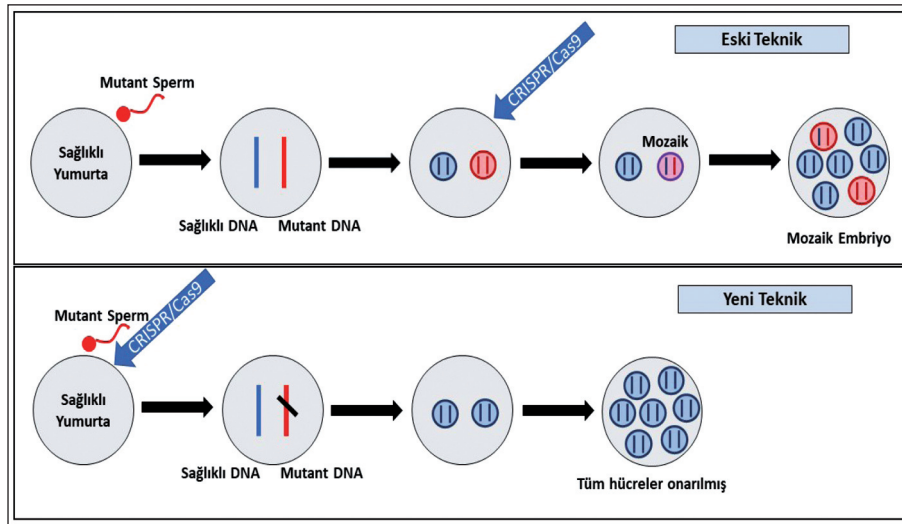
2015 yılında Sun Yat-Sen Üniversitesindeki bilim insanları, Akdeniz ülkelerinde yaygın görülen bir kan hastalığının tedavisi için belli sayıda geni DNA’dan çıkarıp, yerine sağlıklı genler koymayı denemişlerdir. Bunun, genetiği değiştirilmiş insan embriyoları üretme yolunda atılan ilk adımlardan biri olduğuna inanılmaktadır.²¹ Amerika Birleşik Devletleri (ABD)’nde bu konuda yapılan ilk çalışma, Oregon Sağlık ve Bilim Üniversitesinde Ma ve ark. tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu ekip, CRISPR kullanarak, kalp duvarının kalınlaşmasına ve kalp yetmezliğine neden olan genetik bir mutasyonu düzeltmeyi hedeflemişlerdir. Araştırmada, bu mutasyonu taşıyan bir erkek gönüllüden alınan sperm ile bağışlanmış yumurta hücrelerinin döllenerek embriyolar oluşturulduğu ve CRISPR-Cas9 düzeneğinin yumurta hücreleri döllenmekteyken enjekte edildiği bildirilmiştir. Araştırmacıların embriyolarda istenmeyen genetik değişiklikler oluştuğuna ilişkin bulgulara rastlamadığı, mozaikleşme ve hedef dışı etkilerin görülmediği belirtilmiştir.²² Ancak bu durum, tekniğin güvenliğiyle ilgili tartışmalara neden olmuştur. İsveç Karolinska Enstitüsünden Winblad ve Lanner, bu çalışma ile ilgili ayrıntılı incelemeler yapmış ve sonuçta, bu tekniğin incelenmeyen genler üzerinde istenmeyen değişikliklere yol açmadığından emin olunamayacağı yönünde görüş bildirmişlerdir. Araştırmacılar, bu tekniğin tedavi amaçlı kullanımının hâlâ uzak bir hedef olduğunu, ancak bu çalışmanın bilim dünyasını bu hedefe bir adım da olsa



ŞEKİL 1: CRISPR-Cas9 sisteminin kullanım alanları.

yaklaştırdığını belirtmişlerdir.²³ CRISPR-Cas9 sistemi ile sperm hücrelerinde gen düzenlenmesi Şekil 2’de gösterilmiştir.

Londra’daki Francis Crick Enstitüsünden Fogarty ve ark., tüp bebek kliniklerinde in vitro dölleme sonucu üretilen ve araştırma için bağışlanan 58 embriyoyu kullanarak yaptıkları çalışmada, CRISPR-Cas9 sistemini döllenmiş yumurtalara, henüz tek hücre formundayken enjekte etmiş ve gelişim sürecini laboratuvarında bir hafta boyunca izlemişlerdir. Bu yolla embriyo gelişiminde son derece önemli olan oktamere bağlanan transkripsiyon faktörü 4 (OCT4) isimli proteinin doğru üretimini engellemeyi amaçlayan grup, OCT4’ün normal seviyede olmadığı hücrelerde gelişim sürecinin sekteye uğradığını gözlemlemiş ve kontrol grubunun neredeyse yarısında blastokistlere dönüşüm gerçekleşirken, OCT4 seviyesine müdahale edilenlerin sadece %19’unun bunu başarabildiğini bildirmişlerdir. Birleşik Krallık İnsan Fertilizasyonu ve Embriyoloji Yetkili Makamı da çalışmaya izin vermiş ve bu, ulusal bir makamın insan embriyoları üzerinde gen müdahalesine izin verdiği ilk örnek olmuştur.²⁴ Kang ve ark., Cas9 mRNA, gRNA’lar ve donör DNA’yı birlikte enjekte ederek, doğal olarak oluşan C-C kemokin reseptör 5(CCR5)-Δ32 allelini erken insan tripronükleer (3PN) embriyolarına başarıyla yerleştirmişlerdir.²⁵ Bununla birlikte, değiştirilmiş CCR5Δ32 alleli içeren embriyolarda, aynı lokustaki diğer alleller tam olarak kontrol edilememiş; bu allellerin ya yabancı tipte kaldığı ya da insersiyon-delesyon (indel) mutasyonları içerdiği bildirilmiştir. Tang ve ark., insan 3PN zigotlarını kullanarak yaptıkları çalışmalarda, CRISPR-Cas9 sisteminin hastalığa neden olan mutasyonların düzeltilmesinde bir araç olabileceğinin



ŞEKİL 2: CRISPR-Cas9 sistemi ile gen düzenlenmesi.

gösterildiğini belirtmiş ve yaptıkları çalışmayla, CRISPR-Cas9'un normal insan (çift pronükleer, 2PN) zigotlarında da bir gen düzenleme aracı olarak etkili olduğunu göstermişlerdir. Tek hücreli insan embriyolarına, uygun sgRNA'lar ve homoloji donörleriyle komplekslenen Cas9 proteini enjekte edilerek, insan beta hemoglobin (HBB) ve glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (G6PD)'daki nokta mutasyonlarının etkin homolog rekombinasyon aracılı düzeltilmesini uygulamışlardır. Araştırmacılar, sonuçların yöntemin sınırlarını ortaya koyduğunu belirtmiş ve daha fazla araştırma yapılması gerektiğini vurgulamışlardır.²⁶

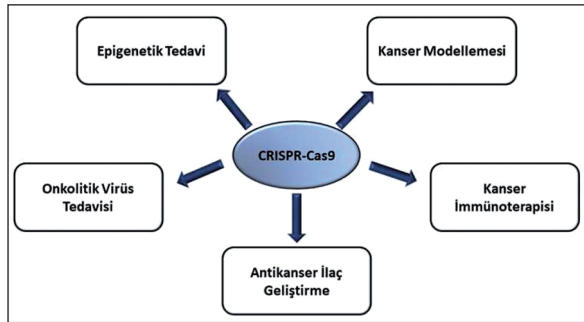
Tüm bu araştırmalar devam ederken, etik kaygıların da ana odağı olan embriyonik düzenlemeler konusunda bilim dünyasını karıştıran bir araştırma ortaya çıkmıştır. Güney Şenzen Bilim ve Teknoloji Üniversitesinden He Jiankui'nin 2018 yılı Kasım ayında CRISPR-Cas9 teknolojisini kullanarak ikiz kız bebeklerin genlerini değiştirdiği, insan immün yetmezlik virüsü [human immunodeficiency virus (HIV)]'nün hücrelere girmesine izin veren bir protein oluşturan CCR5 geninin tüp bebek tedavisi sırasında devre dışı bırakılarak bebeklerin HIV dirençli olarak dünyaya geldikleri iddia edilmiştir. Araştırmacının HIV pozitif erkek bireylerden hamile kalmış olan 7 kadını araştırmaya dâhil ettiği ve katılımcıların gönüllü olduğu açıklanmıştır. Ancak, herhangi bir akademik makaleye dönüştürülmediğinden sonuçlar teyit edilememiştir. Araştırmacı, 2019 yılında çalıştığı üni-

versiteden uzaklaştırılmıştır ve yetkililer, ilgili tüm araştırmaların askıya alındığını duyurmuştur.

KANSER

Günümüzde CRISPR sistemi, kanser alanında epigenetik kanser tedavisi; kanser gelişimine katılan genlerin açılması ve kapatılması; kanser modellemesi; ilaç hedeflerini değerlendirmek için kanser sürecinde görev alan protein yapılarının incelenmesi; kromozomal bozukluklar ve yeniden düzenlemelerin neden olduğu ya da çok sayıda genin dâhil olduğu kanserlerin incelenmesi ve modellenmesi; kanser gelişiminde rol oynayan genlerin tanımlanması gibi çok sayıda uygulama için önemli bir potansiyele sahiptir.²⁷ CRISPR sisteminin kanser tedavisinde uygulama alanları Şekil 3'te görülmektedir.

CRISPR sistemleri, kanserin tanı ve tedavisi için büyük umut vadetmektedir, ancak uygulanma şekilleriyle ilgili üstesinden gelinmesi gereken birtakım sorunlar olduğu da bilinmektedir. CRISPR ile ilgili önemli endişelerden biri, sistemin spesifik olup olmadığıdır. Çalışmalarda birkaç adetten binlere dek değişen oranlarda hedef dışı sgRNA bağlanmaları olduğu rapor edilmiştir.²⁸⁻³⁰ Ancak, Cas9 ile düzenleme, bu bağlanmaların sadece küçük bir yüzdesinde oluşmaktadır. sgRNA hedef dizileri, hedef dışı bağlanma olasılığını en aza indirebilmek için çevrim içi yazılım kullanılarak seçilebilir. In vivo taşınma için güvenli, hedefe yönelik ve verimli metotların geliştirilmesi de gerekmektedir. AAV aracılı taşıma,



ŞEKİL 3: CRISPR-Cas9 sisteminin kanser tedavisinde uygulama alanları.

paketleme kapasitesinin sınırlı olması ve spCas9'un büyüklüğü nedeni ile zorlayıcı olabilmektedir. CRISPR sistemi için alternatif ve ilgi çekici bir taşıma metodu da nanopartiküller aracılığıyla "vurkaç" yaklaşımıdır. Ek olarak, plazmid DNA'sı yerine Cas9-sgRNA ribonükleoproteinlerin kullanılması, ev sahibi genomu plazmid integrasyonu riskini ve hedef dışı etki potansiyelini de azaltmaktadır.²⁸⁻³⁰

Genetiği değiştirilmiş fareler, aktif onkojenlerin ekspresyonu ya da tümör baskılayıcıların inaktivasyonu yoluyla farklı tipteki kanser türlerini modellemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Normal fare gelişiminde ortaya çıkabilecek potansiyel bozulmaların üstesinden gelmek için bu onkojenik olayların indüklenebilmesi ve/veya şartlı kontrolünün sağlanabilmesi için stratejiler geliştirilmiştir. Bu stratejiler son derece güçlü olmakla birlikte, germ hattında kesin bir genom düzenleme (istenen genotipe sahip fare kolonilerinin elde edilmesi ve LoxP gibi spesifik rekombinaz dizilerinin ilavesi gibi) gerektirmektedir. Yüksek verimliliği ve uygulanabilirliği nedeni ile, CRISPR-Cas9 teknolojisi, erişkin somatik hücrelerinde genomun direkt olarak modifiye edilmesi fırsatını sunmaktadır.³¹ Bu strateji ilk kez Koch Enstitüsü Kanser Araştırmaları Merkezi Yöneticisi Tyler Jacks'in laboratuvarında, Cas9 ve sgRNA'ları kodlayan plazmidin hidrodinamik kuyruk ven enjeksiyonu ile yabancı farelerin karaciğer fosfat ve tensin analogu (Pten) ve transformasyon ilişkili protein 53 (Trp53, p53) tümör baskılayıcı genlerinin hedeflenmesinde kullanılmıştır.³² Cre-Lox sistemi, rekombinasyon olaylarının düzenlenmesi için kullanılan bir teknolojidir. Bu sistem, P1 bakteriyofajından türetilmiş Cre rekombinaz ve X üzeri P1 lokusu (LoxP) ta-

nıma bölgesi olarak adlandırılan iki bileşenden oluşur. P1 bakteriyofajı, bu bileşenleri doğal viral hayat döngüsünün bir parçası olarak kullanır ve araştırmacılar, genom manipülasyonunda bu bileşenleri manipüle ederek kullanmaktadır. Çalışmada CRISPR aracılı Pten mutasyonu hepatositlerde yüksek Akt fosforilasyonu ve lipid birikimine neden olmuş ve karaciğerde tümör oluşumuyla sonlanmıştır. Özgüllüğün kontrolü için aynı koşullarda "green fluorescent protein (GFP)"i hedef alan sgRNA hiçbir etki göstermemiştir.³² Vogelstein ve ark., tek bir bağırsak kök hücresinin, bir "mini-gut", yani bağırsak epitelinin tipik morfolojik ve fonksiyonel karakteristik özelliklerini gösteren bir organoid yapıya dönüşebileceği 3 boyutlu bir kültür sistemi geliştirmişlerdir.³³ Bağırsak organoidlerinde, *Adenomatous polyposis coli* (APC) tümör baskılayıcı genini kesmek amacıyla CRISPR-Cas9 teknolojisi kullanılarak kolorektal kanser gelişiminde iyi karakterize edilmiş erken bir olay taklit edilmiş, böylelikle normal intestinal epiteliumdan küçük adenomların oluşumu tetiklenmiştir. Matano ve ark. ile Drost ve ark., protoonkojen Wnt (Wnt) sinyal aktivatörlerini kültür ortamından çekerek, APC geninin kesilmesinin b-katenin stabilizasyonu ve Wnt regülasyonunda değişime sebep olduğu insan bağırsak kök hücrelerini pozitif kontrol olarak seçmişlerdir.^{34,35} Araştırmacılar daha sonra kültür ortamından sırasıyla epidermal büyüme faktörü [epidermal growth factor (EGF)] veya transforme edici büyüme faktörü beta [transforming growth factor beta (TGF β)] sinyal inhibitörünü çekerek, KRAS onkojen aktive edici mutasyonu ve SMAD family member 4, Mothers against decapentaplegic homolog 4 (SMAD4)'ün işlev kaybı mutasyonunu içeren hücreleri üretmek için benzer bir yaklaşım kullanmışlardır. CRISPR-Cas9 tarafından inaktive edilen Trp53 genine sahip olan hücrelerin seçilmesi için ortama Nutlin-3 eklenmiştir. Her adımda, istenen yeni mutasyonun elde edilmesi, dizi analizi ile doğrulanmıştır. Bu strateji sayesinde, ilgili mutasyonların farklı kombinasyonları ile kültürler elde edilmiş ve böylece tümör evresinin farklı aşamaları tekrarlanmıştır. Çok evreli bir tümör gelişimi modeliyle tutarlı olarak, immün yetmezliği olan farelerde, hastalık etkeni ile enfekte edildikten sonra normal organoidleri invaziv karsinomlara dönüştürmek amacıyla dörtlü

mutasyonlar gerekirken, APC ve Trp53 genlerinin olmaması, kolorektal tümör ilerlemesinde ayırt edici özellik olan kromozomal instabilitenin indüklemesinde yeterlidir. Farklı mutasyonların rastgele olarak mı yoksa kronolojik bir sıra ile mi meydana geldiğinin doğrudan gösterilmesi ilk kez bu model ile mümkün olmuştur. CRISPR-Cas9 vektörü, homoloji yönlendirmeli onarım [homology directed repair (HDR)] için bir DNA donörüyle birlikte verildiğinde, β -katenin kodlayan gende bir spesifik nokta mutasyonu olduğu ve bu stratejinin daha kesin genom düzenleme süreçlerinde kullanılabileceği bildirilmiştir.^{34,35} Kanser modellemesi için CRISPR-Cas9 plazmidleri kullanılarak yapılan somatik transfeksiyona başka bir örnek olarak Zuckermann ve ark., geliştirmekte olan fare beyninde polietilenimin ve in utero elektroporasyon kullanarak farklı tümör baskılayıcılarını ["protein patched homolog 1 (Ptch1)", Trp53, Pten ve nörofibromin 1 (Nf1)] hedef almış, farelerde bir dizi mutasyona bağlı medullablastoma ve/veya glioblastomalar geliştiğini bildirmişlerdir.³⁶

Çinli araştırmacı onkolog You ve ark., metastatik akciğer kanseri olan bir hasta üzerinde denenen klinik aşamadaki bir terapi yöntemi ile hastadan kendi bağışıklık hücrelerini izole edip CRISPR ile modifiye ederek tekrar nakletmiş, bu şekilde kanserli hücrelere karşı etkili bir saldırı meydana getirmeyi amaçlamışlardır.³⁷ Kanserli hücreler bir savunma mekanizması olarak, bağışıklık sistemi hücrelerini (sitotoksik T-hücreleri) kısa zamanda etkisizleştirebilmek için hücre yüzeylerinde "programlı ölüm ligandı-1 [programmed death ligand-1 (PD-L1)] molekülleri üretmektedirler. PD-L1, T-hücreleri üzerinde yer alan "programlı ölüm-1 [programmed death-1 (PD-1)]" reseptörlerine bağlanıp, T-hücrelerinin programlı ölüm fazına girmesine neden olurlar. Bu çalışmada, hastadan izole edilen T-hücrelerinde PD-1 geni CRISPR sistemi ile spesifik olarak mutasyona uğratarak etkisizleştirilmiş ve PD-1 molekülü üretmeyen T-hücreleri hastaya tekrar nakledilerek kanserli hücrelere karşı daha etkili olması amaçlanmıştır.

Mintz ve ark., CRISPR-Cas9 sisteminin meme kanserinin tanı aşamasında, RNA-öзgün tekli efektör protein C2c2 sisteminin kullanımı ile yüksek hassasiyetle nükleik asit saptamaya olanak sağlaya-

bileceğini, mutasyon repertuarını ve transkripsiyonel meme kanseri işaretlerini karakterize etmek için kullanılabileceğini bildirmişlerdir.³⁸ Hastalık modellemesinde, CRISPR-Cas9 teknolojisi ile hastalık patogeneğinde rol oynayan onkojenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin seçici olarak yapılandırılabilceğini, tedavi aşamasında ise hem gen terapisini geliştirmek, hem de katalitik olarak ölü varyant (dCas9) ile malign hücrelerin epigenetik manzarasını yeniden programlamak için uygulanabileceğini belirtmişlerdir. CRISPR-Cas9 ile bağışıklık hücreleri, kanser hücrelerine yönlendirilebilir ve antitümör bağışıklık tepkilerini güçlendirmek için tasarlanabilirler; kanser tedavisinde immünoterapinin önemi gün geçtikçe arttığından bu gelişmeler son derece değerlidir.

SİNİR SİSTEMİ

CRISPR-Cas9, birçok hücre türünde genom modifikasyonuna olanak sağladığından, nöronal hücrelerde de kullanılabilmesi için çalışmalar yapılmaktadır. Ancak, genetik modifiye edici ajanların beyne ulaştırılması zorlu bir süreçtir ve bunun için viral vektörlerin kullanılabileceği düşünülmektedir. CRISPR-Cas9 modifikasyonları için kullanılan viral vektörler olan LV, AV ve AAV arasında, genomik integrasyona izin vermediği ve güvenli bir nonimmün yanıt oluşturduğu için AAV öne çıkmaktadır. AAV'nin insan klinik denemelerinde kullanılması Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi [Food and Drug Administration (FDA)] tarafından onaylanmıştır.³⁹

In vivo gen düzenleme için tek bir AAV vektörüne paketlenildiklerinden, spCas9 ve "*Staphylococcus aureus* Cas9 (saCas9)" gibi küçük Cas9 ortologlarının beyin çalışmalarında kullanılması daha caziptir. CRISPR-Cas9 ekspresyonu yapan viral vektörlerin fare beynine enjeksiyonu ile başarılı bir şekilde nöronlarda spesifik genlerin modifikasyonunu başarmış çalışmalar bulunmaktadır.^{40,41} Viral vektörler yerine nonviral taşıma yöntemlerinin (polietilenimin, biyoindirgenabilir lipid, lipozom aracılı transfeksiyon ve in utero elektroporasyon) kullanılmasının da mümkün olduğu, ancak bu sistemlerin kararlı bir ekspresyon yaratamadığı ve beyne enjeksiyonları konusunda güvenlikle ilgili kaygılar olduğu bildirilmiştir.³⁹ Bir diğer yöntem ise zigot içine cas9 mRNA ve sgRNA'nın enjeksiyonu ile

erken embriyoda genlerin modifikasyonunun sağlanması yaklaşımıdır. Bu yöntemin kullanılması ile yapılan çalışmalarda (zebra balığı, sinek, kurbağa, fare, sıçan ve tavşanlarda) başarılı sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir.^{29,42-46} Dolayısıyla CRISPR-Cas9'un herhangi bir geni doğrudan hedef alabilme yeteneği, nörodejeneratif hastalıklarla ilgili çalışmalarda kullanılmak üzere hayvan modelleri oluşturmayı mümkün kılabilir. Örneğin Parkinson hastalığı ile ilişkili olduğu bilinen Pten ile indüklenen kinaz 1 (PINK1) ya da Parkin genlerindeki mutasyonlar sebebiyle gözlenen fonksiyon kaybını gösterebilmek için ilgili fenotipi taklit eden hayvan modelleri, CRISPR-Cas9 ile kolaylıkla oluşturulabilir. Ayrıca sistem, erişkin hayvanlarda da sinir hücreleri üzerine hedeflenerek kullanılabilir. 2016 yılında CRISPR-Cas9 sistemi ilk kez Alzheimer hastalığı mutasyonlarını [amiloid prekürsör protein (APP) İsveç tipi ve Presenilin-1 (PSEN1) M146V mutasyonları ile ko-transfeksiyon] modellemek için kullanılmış ve benzer nörodejeneratif hastalıkların patogenezinin aydınlatılmasıyla ilgili yapılacak çalışmalarda yeni verilerin elde edilmesini kolaylaştırabileceği gösterilmiştir.⁴⁷

Ailevi amyotrofik lateral skleroz vakalarında süperoksit dismutaz 1 ve RNA bağlanan protein FUS (Fused in Sarcoma/Translocated in Sarcoma, sarkomada füze olmuş/sarkomada transloke olmuş) dâhil birçok gende mutasyonlar bulunmaktadır. CRISPR-Cas9 kullanılarak, SOD A272C ve FUS G1566A gibi patojenik allellerin, indüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPSC'ler)'de patojenik olmayan normal allellere dönüştürülebildiği bildirilmiştir. Onarım şablonunun, yabancıl tip allel ve homoloji kolu içeren bir donör plazmid veya lineer bir tek sarmallı oligodeoksinükleotid (ssODN) ile sağlandığı belirtilmiştir.⁴⁸ Benzer CRISPR/Cas yaklaşımlarının, frontotemporal demans ve Alzheimer hastalığında da hastalık modellerinin izojenik bir hücre panelinin oluşturulması amacıyla kullanıldığı belirtilmiştir.⁴⁹

GENETİK HASTALIKLAR

CRISPR-Cas9 gen düzenleme sistemi için en uygun görünen genetik hastalıklar, tek allelin hedeflenmesiyle çözüm bulunabilecek olanlardır; biallelik hedeflemede etkinliğin daha düşük olduğu bilinmektedir.⁵⁰ Ancak, birçok genetik hastalıkta kompleks

çoklu mutasyonlar daha sık görülmekte ve eş zamanlı hedeflemelerin yapılması gerekmektedir. CRISPR-Cas9'un birden fazla sgrRNA kullanarak aynı anda birden fazla genomik lokusun değiştirilmesi konusundaki başarısı sayesinde, yakın gelecekte bu eş zamanlı hedeflemenin de gerçekleştirilebileceği düşünülmekle birlikte, henüz tedavi aşamasında bir ilerleme kaydetmek pek mümkün görünmemektedir.¹⁴

Beta-talasemi, kistik fibrozis, HIV-1, Duchenne kas distrofisi, kalıtsal tirozinemi, polisitemi vera, katarakt, Epstein-Barr virüsü, düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol günümüze kadar CRISPR-Cas9 ile tedavisi hedeflenmiş hastalıklardan bazılarıdır. Patojenik gen ürünlerinin üretimi nedeni ile oluşan hastalıklarda CRISPR-Cas9, "homolog olmayan uç birleştirme [non-homologous end joining (NHEJ)] yöntemiyle dominant alleli bozmak için kullanılabilir. Eğer hastalık bir genin işlev kaybetmesi ile oluşuyorsa, HDR ile donör kalıp üzerinde genin düzgün işleve sahip olanının kopyası kullanılarak düzeltilebilir.⁷ Gen terapisi, mutasyon onarıldığında hücrelerin seçici bir avantaj sağladığı durumlarda idealdir. Erişkin farelerde fumaril asetoasetat hidrolaz (FAH) enzimini kodlayan gendeki bir mutasyonun (insan kalıtsal tirozinemi tip I modeli) düzeltilmesiyle bu durum başarılı biçimde kanıtlanmıştır. Çalışmanın başında hepatositlerin %0,4'ünün onarıldığı, ancak FAH-pozitif hücrelerinin tedavi ile arttığı ve önemli terapötik etkinlik sağladığı bildirilmiştir.⁵¹

Science dergisinde 2016 yılında yayımlanan eş zamanlı 3 çalışmada, "Duchenne kas distrofisi"ne sahip farelerin postnatal genom düzenlemesi yoluyla başarılı bir şekilde tedavi edildiği bildirilmiştir.⁵²⁻⁵⁴ Araştırmacılar, farelerde kas distrofisi tedavisi için CRISPR genom düzenleme araçları olan sgrRNA ve Cas9'u bir adenovirüs taşıyıcı yardımıyla kas içine transfer ederek hastalıkta görülen kusurlu ekzonu çıkartmayı ve kaslardaki başlıca proteinlerden birinin üretimini sağlamayı başarmışlardır. Ayrıca CRISPR'nin yanlış ekzonu kaldırarak, eşlenik zinciri doğru kodlamasıyla proteinin normal versiyonunu üretmeyi başardıkları bildirilmiştir. Bu çalışmaların sonuçları, genetik hastalığı olan erişkin hayvanlarda CRISPR yöntemi kullanılarak elde edilen ilk başarıdır.

Huntington hastalığı (HD), mutant proteinin dominant kalıtım ile hastalığa neden olduğu birçok genetik bozukluktan biridir. HD mutasyonu, Huntingtin geninde (HTT), çok sayıda (35'ten fazla) CAG dizisi tekrarı olan kişilerde görülmektedir. Bunun sonucunda ilgili gen bölgesi kullanılarak üretilen sitoplazmik Huntingtin proteininde oldukça uzun bir poliglutamin kuyruğu oluşur. Bu mutasyon, insanlarda çoğu kez bağımsız olarak ortaya çıkar ve HD popülasyonundaki birçok farklı DNA haplotipinde bulunur. HD'de istemsiz hareketler, bilişsel düşüş ve psikiyatrik rahatsızlıklar dâhil olmak üzere 35 belirgin karakteristik klinik semptom görülebilir.⁵⁵ Yapılan bir çalışmada araştırmacılar, CRISPR-Cas9 gen düzenleme teknolojisini kullanarak sadece mutant HTT DNA'yı hedef alan bir strateji geliştirerek mutant alleli silmeyi hedeflemişlerdir. İlk olarak, en sık görülen 8 HTT geni haplotipinde görülen allelleri PAM sekansları oluşturan veya ortadan kaldıran DNA varyasyonlarını tek tek ortaya çıkarmışlardır. Daha sonra, mutant kromozom haplotipinde bulunan fakat belirli bir HD hastasında normal kromozom haplotipinde bulunmayan PAM dizilerinin çiftlerini belirlemişlerdir. Normal alleli değiştirmeden, mutant allelin promotor bölgesini, transkripsiyon başlangıç bölgesini ve CAG genleşme mutasyonunu ortadan kaldırmak için eş zamanlı olarak 2 hastaya özgü PAM bölgesini hedeflemek için kişiselleştirilmiş CRISPR-Cas9 stratejisini kullanmışlardır. Özel olarak tasarlanmış mutant haplotipe özgü PAM değiştirici tek nükleotid polimorfizmi varyasyon çiftlerini kullanan bu CRISPR-Cas9 stratejisinin, tamamen allel spesifik bir şekilde kaynağından mutant allelleri etkisiz hâle getirmeyi sağlayacağı ve arka plandaki haplotip hakkında yeterli bilgi ile insan genomundaki herhangi bir mutasyonun ortaya çıkmasını inaktive edebileceği bildirilmiştir.⁵⁶

ENFEKSİYON HASTALIKLARI

CRISPR-Cas9, viral dirençli genler ya da proviral DNA'yı hedefleyerek antiviral stratejilerde kullanılabilir. Üçüncü kromozomda çeşitli kemokin reseptörlerini kodlayan genlerle birlikte bulunan CCR5 geninin HIV-1 için koreseptör olarak davrandığı ve beyaz ırkta genin tek kodlayıcı ekzonunda bir 32 lup delesyonu bulunduğu belirlenmiştir. CCR5 Δ32 ola-

rak adlandırılan ve bu mutant allele sahip olan bireylerin, HIV-1 enfeksiyonuna dirençli olduğu bildirilmiştir.⁵⁷ Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, insan iPSC hücrelerinde bu mutasyonu tetiklemek için CRISPR-Cas9 kullanılmış ve böylece ilgili mutasyona sahip hücrelerde HIV-1 enfeksiyonuna direnç sağlandığı belirlenmiştir.⁵⁰ CRISPR-Cas9, enfekte insan hücre dizilerinde Epstein-Barr virüsü ve HIV-1'in genomlarını parçalamak ve etkisizleştirmek amacıyla da kullanılmıştır.^{58,59} Bu ümit verici sonuçlar ile iPSC'lerin kullanımı birleştiğinde, HIV-1 enfeksiyonunu tedavi etmek için daha güvenli ve transplant bazlı bir yöntem geliştirilebilecektir.

Lyme hastalığı, *Borrelia burgdorferi*'nin etken olduğu spiroketal bir hastalıktır. Normalde yumurta- dan yeni çıkmış keneler bir bakteri taşımadıklarından tehlike oluşturmamaktadır. Ancak, genç keneler beyaz ayaklı farelerin üstünde yaşayıp onlardan beslenirken bu bakteriyi vücutlarına almakta ve bu bakteriler de insanlara bulaştığında Lyme hastalığına neden olmaktadır. "Massachusetts Institute of Technology"den evrimsel biyolog Kevin Esvelt ve ekibinin beyaz ayaklı farelerin genetiğini değiştirerek hayvanların bakteriye karşı bağışıklık kazanmasını sağlamaya çalıştıkları bildirilmiştir. Araştırmacılar önce antikor üretimini başlatmak için beyaz ayaklı farelere Lyme aşısını enjekte etmiş, daha sonra antikor kodlayan DNA'yı izole edip CRISPR aracılığıyla dirençsiz farelere yerleştirmişlerdir. Genetik olarak değiştirilen bu farelerin serbest bırakılması, vahşi popülasyonlarla üremelerine izin verilmesi ve bu süreçte Lyme hastalığına direnç göstermeleri amaçlanmıştır.⁶⁰

ANTİMİKROBİYAL AJANLAR

Antimikrobiyal ajanlara dirençli bakteriler, günümüzde dünya çapında ciddi bir sağlık sorunu oluşturmaktadır. Bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmek için antibiyotiklerin bilinçsiz ve aşırı kullanımı, en yaygın FDA onaylı tedavilere karşı hızla gelişen bakteriyel adaptasyon ve direnç ile sonuçlanmıştır. Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri tarafından hazırlanan 2013 raporuna göre, antimikrobiyallere dirençli bakterilerin yılda 2 milyondan fazla insana bulaştığı ve bu kişilerin en az 23.000'inin enfeksiyon sebebiyle öldüğü bildirilmiştir.⁶¹

CRISPR bazlı antibakteriyeller, patojenik bakterileri hedef alma potansiyeli taşıyan bir antibakteriyel takımı oluşturulması için yeni ve uyarlanabilir bir metottur. CRISPR-Cas sisteminin önemli bir özelliği, patojenik veya kommensal bakteriyel türler arasında kolayca ayırt edilmesine izin verecek şekilde diziye özel hedefleme kabiliyetidir. Bakterilerin kendilerini savunmak için kullandığı CRISPR-Cas sistemlerini onlara atak yapacak hâle dönüştürmek için CRISPR kılavuz RNA'ları patojenlere özgü virülans veya temel kromozomal genleri hedeflemek için tasarlanabilir. Bakterilerde çift sarmallı DNA kırıklarının indüklenmesi, ölümle sonuçlanır. Potansiyel bir antibakteriyelin üretilmesi için CRISPR-Cas9 gen düzenleyici olarak kullanılabilir. CRISPR-Cas9 ile üretilen antibakteriyeller yaklaşık 160-kDa protein-RNA kompleksinden oluşur ve bu büyüklükte bir kompleksin bakteri membranından etkili şekilde geçmesi oldukça zorludur. CRISPR-Cas9 içeren antibakteriyellerin verilmesi, türe özgü faj veya mühendislik faj iskeleleri kullanılarak çözülebilir ve tedavi henüz sadece metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) gibi dış ve topikal olarak tedavi edilebilir enfeksiyonlarda sağlanabilmektedir. Sistemik hücre içi enfeksiyonları veya doku ve/veya organ spesifik enfeksiyonları ele almak için ek stratejilere ihtiyaç vardır.⁶²

Umeyama ve ark., uzun süre vorikonazol tedavisi alan bir hastadan cyp51A mutasyonları Gly138Ser ve Asn248Lys ile pan-azole dirençli bir *Aspergillus fumigatus* suşu izole etmiş ve mutasyonlarla birlikte cyp51A içeren PCR fragmanlarını, Cas9 proteini ve tek kılavuz RNA ile birlikte azole dirençli/duyarlı suşlara eklemiştir.⁶³ Rekombinant suşların, Ser138'in glisin ile yer değiştirmesiyle duyarlılığın artmış olduğu gösterilmiştir. CRISPR-Cas9 genom düzenlemesi kullanılarak klinik izolatlarda engellenen genetik rekombinasyonun gerçekleştirilebileceği bildirilmiştir.

Shabbir ve ark., *Campylobacter jejuni* NCTC 11168'de Cas9 geni ve antimikrobiyal direnç arasındaki ilişkiyi bulmayı amaçladıkları çalışmada, Cas9 geninin *Campylobacter jejuni*'nin antimikrobiyal direncine katılımını, minimum inhibitör konsantrasyonunu, standart suşlarda CRISPR-Cas gen eks-

presyonunu ve in vitro direnç gelişimini bir cas9 delesyon mutantının ve yabancı suşların transkriptom analizinin değerlendirilmesiyle belirlemiştir.⁶⁴ Standart suşlarda CRISPR ile ilişkili genlerin artan ekspresyonunu ve cas9 mutant suşunun antibiyotiklere karşı vahşi suştan daha duyarlı olduğunu gözlemlemiştir. Transkriptom analizinde, cas9 geninin, *C. jejuni*'de antimikrobiyal direnci artırmak için birkaç geni düzenlediği ortaya konmuş ve CRISPR-Cas sisteminin *C. jejuni*'de antimikrobiyal direncin artırılmasında rol oynadığı bildirilmiştir.

GÜVENLİK ENDİŞELERİ: HEDEF DIŞI ETKİLER

CRISPR ile ilgili ilk endişe, teknolojinin gücü ve teknik sınırlamaları konusundadır. Hedef üzerinde sınırlı düzenleme etkinliği, eksik düzenleme (mozaikleşme) ve yanlış hedefe yönelik veya hedef dışı düzenlemeler bu endişeler arasında yer almaktadır. Hayvanları ve insan hücre hatlarını içeren CRISPR deneylerinde bu sınırlamalarla karşılaşıldığı bildirilmiştir.⁶⁵ 2001 yılında yürütülen bir çalışmada, "X-linked severe combined immunodeficiency" tedavisi için uygulanan gen terapi çalışması sonucunda, viral vektörün yapıma bölgesinde meydana getirdiği onkojeneze bağlı olarak hastalarda lösemi geliştiği bildirilmiştir.⁶⁶ Bu nedenle, hedef genomda zararlı değişikliklere sebep olabilecek CRISPR-Cas9 riskini dikkatle değerlendirmek gerekmektedir. Yakın zamandaki çalışmalarda, CRISPR-Cas9'un hedef dışı mutasyonları tetikleyebileceğine dair veriler bildirilmiştir.^{29,67} CRISPR-Cas9 sistemi birçok hastalık ve durumda genetik modifikasyona olanak sağlaması açısından uygun görünse de hedef dışı etkiler [off-target effects (OTE)]'in meydana gelme ihtimali ve OTE'lerin ortaya çıkmasını engelleyebilecek bir stratejinin geliştirilememiş olması, bu sistemler kullanılarak tedavi uygulamalarının yapılabilmesini olanaksız kılmaktadır. OTE düzeyleri, DNA'daki guanin-sitozin (GC) içeriği ve kromatin erişilebilirliği gibi faktörlere bağlı olmakla birlikte, dışarıdan yapılacak bir müdahalenin bu etkilerin sayısını ve ortaya çıkma ihtimalini artırabileceği düşünülmektedir.^{30,68} Ancak teknoloji, benzeri görülmemiş bir hızla gelişmektedir. Daha verimli ve hassas CRISPR araçları geliştirildikçe, bu konuların çözüleceği muhakkaktır. Diğer endişeler ise değiştirilmiş organizmaların süresiz olarak etkile-

nip etkilenmeyeceği, düzenlenmiş genlerin gelecek nesillere aktarılıp aktarılmayacağı ve potansiyel olarak bu organizmaları beklenmeyen şekillerde etkileyip etkilemeyeceğidir. Teknik kısıtlamalar ve biyolojik sistemlerin karmaşıklığı ile birlikte, düzenlenen bir organizmanın geleceği hakkında kesin tahminlerde bulunmanın ve olası risk ve yararları ölçmenin imkânsız olmasa bile oldukça zor olabileceği bildirilmiştir. Ayrıca genomun beklendiği gibi düzenlenmesi ve istenen işlevsel çıktı verilen zamanda elde edilmesine rağmen genetik bilgi ile biyolojik fenotip arasındaki karmaşık ilişkinin tam olarak anlaşılabilmesi diğer bir tereddüt konusudur.⁶⁵

GÜVENLİĞİ ARTIRMAK İÇİN ÖNERİLER

CRISPR-Cas9 sisteminin güvenliğini artırabilmek amacıyla ilk hedeflenen olay, özgün ve daha spesifik sgRNA'ların geliştirilmesiyle OTE'leri en aza indirmektir ve bu amaçla bir dizi biyoinformatik sistem geliştirilmiştir. Elde edilen bu veriler ile aynı zamanda potansiyel hedef dışı sahaları da hızlı ve ucuz bir şekilde tespit etmek mümkün olabilecektir.⁶⁹ En sık kullanılan stratejilerden biri, daha spesifik tasarım yaparak OTE düzeylerini indirebilmek için sgRNA'nın çeşitli parametrelerini değiştirmektir. Bunun için, 5' ucunda iki ek guanin nükleotidi ve daha kısa tamamlayıcı bölgeleri olan kesilmiş sgRNA'ların kullanımı, spesifikliği artırmakla birlikte hedef üzerindeki verimliliğin azalmasına da sebep olabilir.²⁸ sgRNA'nın GC içeriğinin düşürülmesi daha yüksek spesifite sağlayabilir, ancak bunun yapılabilmesi hedeflenen gen lokusu ile doğrudan ilgilidir.⁶⁸

Genom düzenlemelerini optimize etmek ve OTE'leri en aza indirmek için Cas9 proteininde de modifikasyonlar yapılabilir. Bu modifikasyonların gerçekleştirilebilmesi için yapılan bir çalışmada, katalitik domaine sahip bir Cas9 nikaz mutanlığı geliştirilmiştir. Bu protokol ile araştırmacılar, hedef bölgelerin seçimi, bölünme etkinliğinin değerlendirilmesi ve hedef dışı faaliyetlerin analizi için deneysel olarak türetilmiş kılavuzlar sağlamayı amaçlamışlardır. Cas9 nikaz mutanlığı, DNA'da yabancı Cas enzimleri tarafından oluşturulan çift iplikli kırılmalar yerine gRNA-hedefli tek iplikli kırılmalar mey-

dana getirerek hedef bölgede bir çentik oluşturur. Karşıt ipliklerde çift iplik kırıkları oluşturan eşleşmiş Cas9 nikazların kullanılmasıyla bu metod, etkin bir şekilde düzenlemenin özgüllüğünü iki katına çıkarılmaktadır.⁷ Eşleştirilmiş nikazların kullanılması ile HDR etkinliği artacağı için ilgili bölgeye düzeltilmiş bir allel yerleştirildiğinde olumlu sonuçlar alınabileceği gösterilmiştir.²⁸

Optogenetik sistemler, hücre davranışının mekânsal ve zamansal kontrolünü sağlar. Polstein ve Gersbach, mavi ışık varlığında endojen genlerin transkripsiyonunu indükleyen ışıkla aktive olan bir CRISPR-Cas9 efektör (LACE) sistemi tasarlamışlardır. Bu teknoloji, *Arabidopsis thaliana*'nın CRY2 ve CIB1 proteinlerinden elde edilmiştir ve Cas9'un aktivasyonu mavi ışığa maruz kaldıktan sonra gerçekleşmektedir. Çok yönlü LACE sisteminin, endojen genlerin dinamik düzenlenmesi için yeni DNA dizilerine kolayca yönlendirilebileceği bildirilmiştir.⁷⁰

CRISPR-Cas9 sisteminde güvenliği artırmak için transpozonlar gibi küçük moleküller de potansiyel olarak aktiviteyi indüklemek için kullanılabilir.⁷¹ Bu, istenen ekspresyonun kistik fibrozis gibi hastalıklarda spesifik organlara hedeflenmesi gerektiğinde yararlı olabilir. Transpozonlar, bir hücre genomunda farklı yerlere, transpozisyon olarak adlandırılan bir süreçle hareket edebilen DNA dizileridir. Memelilerde kullanılan transpozon sistemlerinden biri Piggy-Bac (PB) transposaz aracıdır. PB'nin transpozon aktivitesi yüksek olduğundan, PB transposaz aracı "kusursuz" düzenlemeye izin verir ve bu düzenleme sonucunda donör vektörünün hedef genomda hiçbir izi kalmaz.⁷² PB transposaz aracının insan iPSC'lerinde yapılan çalışmalarda, Cas9 ile birlikte kullanımın kusursuz bir gen düzeltilmesi için uygun olduğu gösterilmiştir ve öngörülemez etkilere sahip hiçbir sekansın hedef bölgeye eklenmemesi de bu yöntemin güvenli bir çözüm olabileceğini düşündürmektedir.^{50,69} Bu bilgiler ışığında yapılacak olan terapötik uygulamalar için önce, seçilen sgRNA tarafından indüklenen hedef dışı mutajenez düzeyinin değerlendirilmesi ve ardından gerekirse düzenleme prosedüründe değişikliklerin yapılması strateji olarak uygun görünmektedir. Tedavilerin daha güvenli olabilmesi için özgünlük ve verimlilik arasında uygun

bir dengenin bulunması önemlidir.⁷³ Özgünlük, sgRNA ve hedef DNA arasındaki uyumsuzlukların sayısı ile doğrudan ilişkili olduğu için potansiyel hedef dışı alanlar sayısal olarak hesaplanarak belirlenebilir.²⁹ Bu hedef dışı alanlar daha sonra Cas9'un neden olduğu mutasyonları tespit etmek için geliştirilmiş stratejiler kullanılarak analiz edilebilir.⁷³

ETİK KAYGILAR

CRISPR-Cas9 teknolojisinde neredeyse her gün yepyeni bilimsel gelişmeler yaşanırken, bir yandan da ciddi etik kaygılar ortaya çıkmaktadır. Çok sayıda hastalığın tedavisinde yeni bir umut olacağı düşüncesiyle heyecanlandırırken, insan embriyoları üzerinde genom düzenleme fırsatının kötüye kullanılabileceği düşüncesiyle bilimsel çevrelerde çekinceler yaratmaktadır. CRISPR'nin kullanımına ne ölçüde izin verilmesi gerektiği, CRISPR uygulamalarına erişim, insan denekler içeren klinik araştırmalar için yasal çerçevelerin insan germ hattının düzenlenmesi de dâhil olmak üzere her tür insan genomu düzenlenmesini içermesi ve uygun olmayan CRISPR kullanımının uluslararası regülasyonlarla belirlenmesi gerektiği üzerinde tartışılan en temel etik sorunlardır.⁶⁵

Etik tartışmalar, öncelikle CRISPR sistemlerinin biyomedikal, yasal ve etik yönlerini incelemek için CRISPR-Cas9 sistemlerini geliştirenler, bilim adamları ve etik ekibinin bir araya geldiği 2015 Napa Vadisi toplantısında başlamıştır.⁷⁴ Daha sonra ABD Ulusal Bilim, Mühendislik ve Tıp Akademisi, Çin Bilimler Akademisi ve Birleşik Krallık Kraliyet Cemiyeti daha kapsamlı görüşmeler için Uluslararası İnsan Geni Düzenleme Zirvesi'nde bir araya gelerek, insanlarda teknolojinin ne zaman, nerede ve nasıl uygulanabileceğini incelemişlerdir. Etik kaygılar üzerine tartışmalar, NASEM'in multidisipliner bir komitesinin, insan genom düzenlemesinin sayısız sonucunu inceleyen kapsamlı bir rapor yayımladığı Şubat 2017 tarihinde de devam etmiştir. NASEM raporu bugüne kadar, insan genom kurgusu hakkındaki geniş kapsamlı endişeleri inceleyen belki de en etkili ve kapsamlı analizi sunmaktadır. Komite, somatik genom düzenlemesinin önemini desteklemiş, ancak mevcut durumda herhangi bir geliştirme için genomik modifikasyona izin vermemiştir. Ayrıca şu anda izin veril-

memesine rağmen komite, dikkatli bir şekilde, insan genom düzenlemesinin, germ hücrelerinin modifiye edilmesinin, genomik düzenlemeyi gelecek kuşaklara potansiyel olarak aktarabilecek yeni bir kişi yaratma amacıyla belirli koşullar altında izin verilebileceği sonucuna varmıştır ve bu koşulları, "İlgili teknik ve sosyal kaygılar ışığında kalıtsal genom düzenleyici araştırma denemelerine, yalnızca klinik denemelerin yetkilendirilmesi için mevcut risk/fayda standartları karşılanabiliyorsa, sadece zorlayıcı nedenler söz konusuysa ve denemeler sıkı gözetim altında gerçekleştirilecekse izin verilebilir." şeklinde açıklamıştır.⁷⁵

CRISPR teknolojisi her geçen gün gelişmeye devam etmektedir. Var olan sistemler yenilikçi ilerlemeler içerecek şekilde yeniden tasarlanmakta ve heyecan verici biçimde yeni işlevlere sahip yeni CRISPR sistemleri keşfedilmektedir. Bu tür devrimci araçların potansiyel yararları sonsuzdur. Bununla birlikte, güçlü yeni bilimsel araç olarak ahlaki kaygıları artıran riskler de vardır. Etik tartışmaların sonuca varabilmesi için iyi kontrol edilen, tekrarlanabilir deneyler yapılması ve klinik denemeler hakkında bilinçli kararlar alınması gerekmektedir. Şu aşamada birçok uluslararası yasa bu tür araştırmaları yasaklamakta ve/veya belirli araştırma türleri için finansmanı engellemektedir. Bu nedenle, faydalar ve risklerle ilgili geniş veriler henüz mevcut değildir. Farklı toplum disiplinlerinin katkıda bulunduğu ulusal ve uluslararası kuruluşların araştırma ve etik kuralları, federal fon kuruluşları ve kurumsal yönetim kurulları için potansiyel riskleri en aza indirmek ve CRISPR teknolojisinin potansiyel faydalarını en üst düzeye çıkarmak için kritik öneme sahiptir.⁶⁵

SONUÇ

CRISPR-Cas9 sisteminin keşfi ile bireye ve etkene özgü tedavide yeni ufukların açılması söz konusu olmuştur. Ancak yöntemin, genetik ve/veya sonradan oluşan hastalıkların tedavisinde kullanımı için aşılması gereken çok sayıda engel ve çözülmesi gereken sorunlar vardır. Özellikle insan germ hücreleri üzerinde genom düzenleme tekniğinin kullanımının sosyal, etik ve yasal sonuçları üzerine ciddi tartışmalar yapılmakta ve bu konu henüz etik olarak da uygun

görülmemektedir. Bununla birlikte, CRISPR-Cas9 tekniği sadece insanlar için değil, diğer canlı organizmalar ve çevre ile ilgili risk değerlendirmelerinde de zararsızlık ilkesi gereği güvenlik sorunlarını beraberinde getirmektedir. Genetik düzenlemelerin güvenli bir şekilde yapılmasını sağlayacak stratejilerin geliştirilememiş olması ekolojik bozulma gibi birçok kaygıyı da beraberinde getirmektedir.

Finansal Kaynak

Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından, tıbbi alet, gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.

Çıkar Çatışması

Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyeliği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.

Yazar Katkıları

Fikir/Kavram: Pınar Erkekoğlu; **Tasarım:** Selinay Başak Erdemli Köse, Anıl Yürün, Pınar Erkekoğlu; **Denetleme/Danışmanlık:** Pınar Erkekoğlu, Belma Koçer Gümüşel; **Veri Toplama ve/veya İşleme:** Selinay Başak Erdemli Köse, Ünzile Yaman Sur, Anıl Yürün; **Analiz ve/veya Yorum:** Pınar Erkekoğlu, Aylin Balcı; **Kaynak Taraması:** Selinay Başak Erdemli Köse, Ünzile Yaman Sur; **Makalenin Yazımı:** Selinay Başak Erdemli Köse, Ünzile Yaman Sur, Aylin Balcı, Anıl Yürün, Pınar Erkekoğlu; **Eleştirel İnceleme:** Pınar Erkekoğlu, Belma Koçer Gümüşel; **Kaynaklar ve Fon Sağlama:** Pınar Erkekoğlu.

KAYNAKLAR

- Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 2014;346(6213):1258096. [Crossref] [PubMed]
- Chen S, Yu X, Guo D. CRISPR-cas targeting of host genes as an antiviral strategy. *Viruses*. 2018;10(1):pii: E40. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Cao J, Xiao Q, Yan Q. The multiplexed CRISPR targeting platforms. *Drug Discov Today Technol*. 2018;28:53-61. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*. 2007;315(5819):1709-12. [Crossref] [PubMed]
- Provasi E, Genovese P, Lombardo A, Magrani Z, Liu PQ, Reik A, et al. Editing T cell specificity towards leukemia by zinc finger nucleases and lentiviral gene transfer. *Nat Med*. 2012;18(5):807-15. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Segal DJ, Meckler JF. Genome engineering at the dawn of the golden age. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2013;14:135-58. [Crossref] [PubMed]
- Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*. 2013;8(11):2281-308. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol*. 1987;169(12):5429-33. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*. 2005;151(Pt 8):2551-61. [Crossref] [PubMed]
- Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol*. 2005;60(2):174-82. [Crossref] [PubMed]
- Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology*. 2005;151(Pt 3):653-63. [Crossref] [PubMed]
- Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*. 2010;327(5962):167-70. [Crossref] [PubMed]
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012;337(6096):816-21. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013;339(6121):819-23. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Walsh RM, Hochedlinger K. A variant CRISPR-Cas9 system adds versatility to genome engineering. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(39):15514-5. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, Makarova KS, Essletzbichler P, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*. 2015;163(3):759-71. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Slaymaker IM, Gao L, Zetsche B, Scott DA, Yan WX, Zhang F. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*. 2016;351(6268):84-8. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Kleinstiver BP, Pattanayak V, Prew MS, Tsai SQ, Nguyen NT, Zheng Z, et al. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*. 2016;529(7587):490-5. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- O'Connell MR, Oakes BL, Sternberg SH, East-Seletsky A, Kaplan M, Doudna JA. Programmable RNA recognition and cleavage by CRISPR/Cas9. *Nature*. 2014;516(7530):263-6. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Taştan C, Sakartepi E. T101 CRISPR Genom Modifikasyonları. *AddGene CRISPR 101*. Taştan C, çeviri editörü. 2018.
- Liang P, Xu Y, Zhang X, Ding C, Huang R, Zhang Z, et al. CRISPR-Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell*. 2015;6(5):363-72. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Ma H, Marti-Gutierrez N, Park SW, Wu J, Lee Y, Suzuki K, et al. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature*. 2017;548(7668):413-9. [Crossref] [PubMed]

23. Winblad N, Lanner F. Biotechnology: at the heart of gene edits in human embryos. *Nature*. 2017;548(7668):398-400. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
24. Fogarty NME, McCarthy A, Snijders KE, Powell BE, Kubikova N, Blakeley P, et al. Genome editing reveals a role for OCT4 in human embryogenesis. *Nature*. 2017;550(7674):67-73. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
25. Kang X, He W, Huang Y, Yu Q, Chen Y, Gao X, et al. Introducing precise genetic modifications into human 3PN embryos by CRISPR/Cas-mediated genome editing. *J Assist Reprod Genet*. 2016;33(5):581-8. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
26. Tang L, Zeng Y, Du H, Gong M, Peng J, Zhang B, et al. CRISPR-Cas9-mediated gene editing in human zygotes using Cas9 protein. *Mol Genet Genomics*. 2017;292(3):525-33. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
27. Mahmoudian-sani MR, Farnoosh G, Mahdavinizhad A, Saidijam M. CRISPR genome editing and its medical applications. *Biotechnol Biotechnol Equip*. 2018;32(2):286-92. [[Crossref](#)]
28. Cho SW, Kim S, Kim Y, Kweon J, Kim HS, Bae S, et al. Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res*. 2014;24(1):132-41. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
29. Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol*. 2013;31(9):827-32. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
30. Wu X, Scott DA, Kriz AJ, Chiu AC, Hsu PD, Dadon DB, et al. Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells. *Nat Biotechnol*. 2014;32(7):670-6. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
31. Guernet A, Grumolato L. CRISPR-Cas9 editing of the genome for cancer modeling. *Methods*. 2017;121-122:130-7. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
32. Xue W, Chen S, Yin H, Tammela T, Papiannakopoulos T, Joshi NS, et al. CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver. *Nature*. 2014;514(7522):380-4. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
33. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA Jr, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science*. 2013;339(6127):1546-58. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
34. Matano M, Date S, Shimokawa M, Takano A, Fujii M, Ohta Y, et al. Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids. *Nat Med*. 2015;21(3):256-62. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
35. Drost J, van Jaarsveld RH, Ponsioen B, Zimmerlin C, van Boxtel R, Buijs A, et al. Sequential cancer mutations in cultured human intestinal stem cells. *Nature*. 2015;521(7550):43-7. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
36. Zuckermann M, Hovestadt V, Knobbe-Thomsen CB, Zapata M, Northcott PA, Schramm K, et al. Somatic CRISPR-Cas9-mediated tumour suppressor disruption enables versatile brain tumour modelling. *Nat Commun*. 2015;6:7391. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
37. You L, Jianxin X, Tao D, Xiaojun Z, Kun Y, Meijuan H, et al. A phase I trial of PD-1 deficient engineered T cells with CRISPR-Cas9 in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2018;36(15 Suppl):3050. [[Crossref](#)]
38. Mintz RL, Gao MA, Lo K, Lao YH, Li M, Leong KW. CRISPR technology for breast cancer: diagnostics, modeling, and therapy. *Adv Biosys*. 2018;2(11):1800132. [[Crossref](#)]
39. Yan S, Tu Z, Li S, Li XJ. Use of CRISPR-Cas9 to model brain diseases. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2018;81:488-92. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
40. Heidenreich M, Zhang F. Applications of CRISPR-Cas systems in neuroscience. *Nat Rev Neurosci*. 2016;17(1):36-44. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
41. Walter JM, Chandran SS, Horwitz AA. CRISPR-Cas-Assisted Multiplexing (CAM): simple same-day multi-locus engineering in yeast. *J Cell Physiol*. 2016;231(12):2563-9. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
42. Yu Z, Ren M, Wang Z, Zhang B, Rong YS, Jiao R, et al. Highly efficient genome modifications mediated by CRISPR/Cas9 in drosophila. *Genetics*. 2013;195(1):289-91. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
43. Nakayama T, Fish MB, Fisher M, Oomen-Hajagos J, Thomsen GH, Grainger RM. Simple and efficient CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Xenopus tropicalis*. *Genesis*. 2013;51(12):835-43. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
44. Li D, Qiu Z, Shao Y, Chen Y, Guan Y, Liu M, et al. Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*. 2013;31(8):681-3. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
45. Wang H, Yang H, Shivaila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*. 2013;153(4):910-8. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
46. Song Y, Yuan L, Wang Y, Chen M, Deng J, Lv Q, et al. Efficient dual sgRNA-directed large gene deletion in rabbit with CRISPR/Cas9 system. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(15):2959-68. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
47. Giau VV, Lee H, Shim KH, Bagyinszky E, An SSA. Genome-editing applications of CRISPR-Cas9 to promote in vitro studies of Alzheimer's disease. *Clin Interv Aging*. 2018;13:221-33. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
48. Vance C, Rogelj B, Hortobágyi T, De Vos KJ, Nishimura AL, Sreedharan J, et al. Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science*. 2009;323(5918):1208-11. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
49. Shin JW, Lee JM. The prospects of CRISPR-based genome engineering in the treatment of neurodegenerative disorders. *Ther Adv Neurol Disord*. 2018;11:1756285617741837. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
50. Ye L, Wang J, Beyer AI, Teque F, Cradick TJ, Qi Z, et al. Seamless modification of wildtype induced pluripotent stem cells to the natural CCR5Δ32 mutation confers resistance to HIV infection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111(26):9591-6. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
51. Yin H, Xue W, Chen S, Bogorad RL, Benedetti E, Grompe M, et al. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat Biotechnol*. 2014;32(6):551-3. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
52. Long C, Amoasii L, Mireault AA, McAnally JR, Li H, Sanchez-Ortiz E, et al. Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy. *Science*. 2016;351(6271):400-3. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
53. Nelson CE, Hakim CH, Ousterout DG, Thakore PI, Moreb EA, Castellanos Rivera RM, et al. In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Science*. 2016;351(6271):403-7. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
54. Tabeordbar M, Zhu K, Cheng JKW, Chew WL, Widrick JJ, Yan WX, et al. In vivo genome editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. *Science*. 2016;351(6271):407-11. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
55. Lee JM, Gillis T, Mysore JS, Ramos EM, Myers RH, Hayden MR, et al. Common SNP-based haplotype analysis of the 4p16.3 Huntington disease gene region. *Am J Hum Genet*. 2012;90(3):434-44. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
56. Shin JW, Kim KH, Chao MJ, Atwal RS, Gillis T, MacDonald ME. Permanent inactivation of Huntington's disease mutation by personalized allele-specific CRISPR/Cas9. *Hum Mol Genet*. 2016;25(20):4566-76. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
57. Erkekoğlu P. [Entry inhibitors for the treatment of human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) and their toxic effects]. *FABAD J Pharm Sci*. 2018;43(1):41-58.
58. Yuen KS, Chan CP, Wong NH, Ho CH, Ho TH, Lei T, et al. CRISPR-Cas9-mediated genome editing of Epstein-Barr virus in human cells. *J Gen Virol*. 2015;96(Pt 3):626-36. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]

59. Zhu W, Lei R, Le Duff Y, Li J, Guo F, Wainberg MA, et al. The CRISPR-Cas9 system inactivates latent HIV-1 proviral DNA. *Retrovirology*. 2015;12:22. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
60. Buchthal J, Evans SW, Lunshof J, Telford SR 3rd, Esvelt KM. Mice against ticks: an experimental community-guided effort to prevent tick-borne disease by altering the shared environment. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2019;374(1772):20180105. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
61. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Antibiotic Resistance Threats in the United States. CDC; 2013. p.112. [[Link](#)]
62. Greene AC. CRISPR-based antibacterials: transforming bacterial defense into offense. *Trends Biotechnol*. 2018;36(2):127-30. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
63. Umeyama T, Hayashi Y, Shimosaka H, Inukai T, Yamagoe S, Takatsuka S, et al. CRISPR-Cas9 genome editing to demonstrate the contribution of Cyp51A Gly138Ser to azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62(9). pii:e00894-18. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
64. Shabbir MA, Wu Q, Shabbir MZ, Sajid A, Ahmed S, Sattar A, et al. The CRISPR-cas system promotes antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni*. *Future Microbiol*. 2018;13:1757-74. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
65. Brokowski C, Adli M. CRISPR ethics: moral considerations for applications of a powerful tool. *J Mol Biol*. 2019;431(1):88-101. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
66. Kohn DB, Sadelain M, Glorioso JC. Occurrence of leukaemia following gene therapy of X-linked SCID. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(7):477-88. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
67. Wang X, Wang Y, Wu X, Wang J, Wang Y, Qiu Z, et al. Unbiased detection of off-target cleavage by CRISPR-Cas9 and TALENs using integrase-defective lentiviral vectors. *Nat Biotechnol*. 2015;33(2):175-8. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
68. Ren X, Yang Z, Xu J, Sun J, Mao D, Hu Y, et al. Enhanced specificity and efficiency of the CRISPR-Cas9 system with optimized sgRNA parameters in *Drosophila*. *Cell Rep*. 2014;9(3):1151-62. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
69. Xie F, Ye L, Chang JC, Beyer AI, Wang J, Muench MO, et al. Seamless gene correction of β -thalassaemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR-Cas9 and piggyBac. *Genome Res*. 2014;24(9):1526-33. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
70. Polstein LR, Gersbach CA. A light-inducible CRISPR-Cas9 system for control of endogenous gene activation. *Nat Chem Biol*. 2015;11(3):198-200. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
71. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*. 2014;157(6):1262-78. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
72. Li X, Burnight ER, Cooney AL, Malani N, Brady T, Sander JD, et al. PiggyBac transposase tools for genome engineering. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(25):E2279-87. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
73. Lockyer EJ. The potential of CRISPR-Cas9 for treating genetic disorders. *Bioscience Horizons: The International Journal of Student Research*. 2016;9:hzw012. [[Link](#)]
74. Baltimore D, Berg P, Botchan M, Carroll D, Charo RA, Church G, et al. A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. *Science*. 2015;348(6230):36-8. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
75. National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine (NASEM). *Human Genome Editing: Science, Ethics, and Governance*. The National Academies Press. Washington, DC, 2017. [[PubMed](#)]