



Genom Düzenlemede CRISPR/Cas9 Çağı ve Lösemideki Uygulamaları

CRISPR/Cas9 Age in Genome Editing and Leukemia Applications

Nurcan Gümüő, Burçin Tezcanlı Kaymaz

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

ABSTRACT

The CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR-associated nuclease-9) system which adapted from the prokaryotic immune system, is the latest RNA/protein complex to be included among genomic engineering tools. CRISPR/Cas9 technology catalyzes the formation of double-strand breaks in DNA, according to the Watson-Crick base pairing in a interested region of the genome, via endonuclease Cas9 and guide RNA (sgRNA). Genomic regulation is performed by repairing these fractures using (Homologous Recombination or HDR: Homology-Directed Repair) and (NHEJ: Non-Homologous End-Joining) DNA repair mechanisms. CRISPR/Cas9 technology is used on a wide range of platforms, starting from identification of bacterial strains, identification of gene and miRNA functions, genomic DNA fragment insertion/deletion, gene silencing, transcriptional and epigenetic targeting to creation of disease models. Leukemia, a malignancy characterized by leukocytosis in the blood/bone marrow, is caused by chromosomal rearrangements or mutations. Nowadays, genomic engineering is gaining an accelerating importance in order to elucidate the pathogenesis and molecular biology of leukemia; thus to provide more effective and personalised treatment opportunities in the future. The widely used CRISPR/Cas9 genome design technology represent a new functional object for treatment of leukemia an the beginning of a therapeutic new era by being applied in areas such as creation of disease models, gene insertion and silencing, epigenetic regulation. In this review, CRISPR/Cas9 technology; locus components, subtypes, stages of development of the adaptive immune response, Cas9 specificity and therapeutic gains obtained via using this technology in various types of leukemia will be discussed. Also In this review, the evaluation of CRISPR/Cas9 technology in terms of ethics will be included.

Key words: CRISPR/Cas9; genome editing technology; leukemia; ethics

ÖZET

Prokaryotik canlıların immün sistemden adapte edilmiş olan CRISPR/Cas9 (Düzenli aralıklarla bölünmüş kısa palindromik tekrar kümeleri/CRISPR ilişkili nukleaz 9) sistemi genom mühendisliği araçlarının arasına en son eklenen RNA/protein kompleksidir. CRISPR/

Cas9 teknolojisi, endonukleaz Cas9 ve kılavuz RNA (sgRNA) aracılığı ile genomun istenen bir bölgesinde çift zincir kırıklarının oluşumunu katalizler. Bu kırıkların (HR: Homolog Rekombinasyon [Homologous Recombination ya da HDR: Homology-Directed Repair]) ve (NHEJ: Non-Homolog Uç Birleşmesi [Non-Homologous End-Joining]) DNA tamir mekanizmaları kullanılarak, genom düzenlemesi gerçekleştirilmektedir. CRISPR/Cas9 teknolojisi; bakteri suşlarının tanımlanması, gen ve miRNA fonksiyonlarının belirlenmesi, genoma DNA fragmenti eklenmesi/çıkartılması, gen susturma, transkripsiyonel ve epigenetik hedefleme ya da hastalık modellerinin oluşturulması gibi çok geniş bir platformda kullanılmaktadır. Kan/Kemik iliği hastalıklarında lökositöz ile karakterize olan malignite gösteren lösemiler, kromozomal yeniden düzenlemeler ya da mutasyonlar sonucunda gelişmektedir. Günümüzde lösemnin moleküler biyolojisi ile patogenezinin anlaşılması, gelecekte çok daha etkin ve kişiye özgül tedavi imkanları sağlayacağından; genom mühendisliği bu noktada önem kazanmaktadır. Çok geniş kullanım alanına sahip olan CRISPR/Cas9 genom tasarımı teknolojisi, hastalık modellerinin oluşturulması, gen ekleme ve susturulması, epigenetik regülasyon gibi alanlarda kullanılarak, lösemi tedavisinde yeni bir fonksiyonel hedef ve tedavi çağı başlangıcı olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu derlemede, CRISPR/Cas9 teknolojisinin; tarihçesi, lokus birleşenleri, alt tipleri, adaptif bağışıklık yanıtının oluşum aşamaları, Cas9 özgülüğü ile bu teknolojinin çeşitli lösemi tiplerinde kullanımıyla elde edilen tedavi kazanımlar ele alınacaktır. Ayrıca bu derlemede CRISPR/Cas9 teknolojisinin, etik açısından değerlendirilmelerine de yer verilecektir.

Anahtar kelimeler: CRISPR/Cas9; genom düzenleme teknolojisi; lösemi; etik

CRISPR/Cas Araştırmalarının Kısa Tarihçesi

Bakteri ve arkealar çeşitli koşullarda yaşayabilen canlılar olmalarına rağmen; fajlar tarafından enfekte edilmekte^{1,2} ve bunların %4-%50'sinin ölümüne sebep olmaktadır^{3,4}. Bakteri ve arkealar, fajların bu yıkıcı etkisinden korunmak için çok sayıda direnç mekanizması geliştirmişlerdir. Bakteriyel direnç mekanizmaları sıklıkla; adsorbsiyon inhibisyonu, faj genomunun alınımının engellenmesi, restriksiyon modifikasyonu ve abortif enfeksiyonlar⁵ gibi çok sayıda doğal bağışıklık

Nurcan Gümüő, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye, Tel. 0232 390 22 60 Email. wcn.gumus@gmail.com
Geliş Tarihi: 16.08.2018 • Kabul Tarihi: 16.11.2018

sağlayan sistemlerden oluşmaktadır. Bu bağışıklık sistemlerinin yanısıra küçük RNA temelli CRISPR/Cas sistemi^{6,7} ile bakterilerin virüs ve plazmitlere karşı kazanılmış bağışıklık sistemi geliştirdikleri tespit edilmiştir. Bu bağışıklık sistemi; RNA (CRISPR: Düzenli Aralıklarla Bölünmüş Kısa Palindromik Tekrar Kümeleri [*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*]) ve protein (Cas: CRISPR İlişkili Genler [*CRISPR Associated*]) bileşenlerinden oluşmaktadır⁸.

CRISPR/Cas olarak adlandırılan bu sistem, arkeaların %84, bakterilerin ise yaklaşık %45'inde bulunan⁹, birbirinin tekrarı olan DNA dizilerinden oluşan özel bir DNA ailesidir. Bu diziler ilk kez 1987'de Ishino ve ark.¹⁰ tarafından *E.coli* K12 suşunda alkalik fosfatın izoenzim dönüşümünden sorumlu olan (IAP: Apoptoz İnhibitör Proteinin [*The Inhibitory Of Apoptosis Protein*]) gen dizisi çalışılırken tanımlanmıştır. IAP geninin dizi analizi sırasında, akış aşağı (*downstream*) bölgede 29 nükleotit (nt) uzunluğunda 14 tane tekrar kümeleri ile bu tekrarların arasında 32–33 nt. lik ara DNA bölgelerinin olduğu belirlenmiş ancak fonksiyonları tanımlanamamıştır. Daha sonraki yıllarda benzer tekrar dizileri *Mycobacterium tuberculosis*, *Haloferax mediterranei*, *Methanocaldococcus jannaschii*, *Thermotoga maritima* ve diğer bakteri-arkealarda da bulunmuştur². Mojica ve ark., 2000 yılında, 9 tane arkea ve 11 tane bakteri olmak üzere toplamda 20 farklı prokaryotun genomunda tekrar dizilerini tanımlamışlardır¹¹. 2002 yılında Jansen ve ark., Mojica'nın çalışma ekibi ile anlaşma sağlayarak, literatürde oluşabilecek karışıklığı önlemek amacıyla bu tekrar dizilerini CRISPR olarak adlandırmışlardır¹². Yaptıkları çalışmalarla Cas genlerini Cas 1–4 olarak tanımlayarak, bu genlerin CRISPR bölgeleriyle ilişkili olduğunu göstermişler, Cas 3 geninin helikaz ve Cas 4 geninin ise endonukleaz gen ailelerine benzer diziler içerdiğini tespit etmişlerdir.

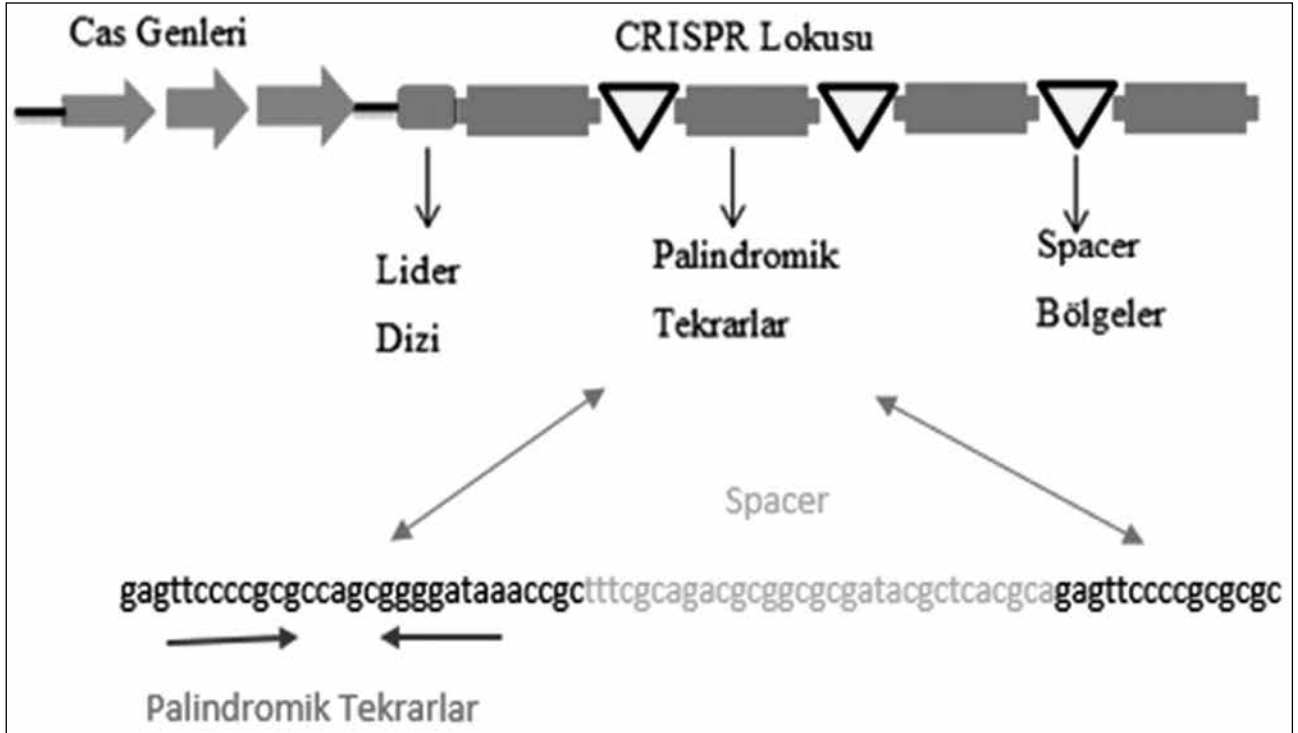
CRISPR'in biyolojik fonksiyonları 2005 yılına kadar net olarak saptanamamış olmakla birlikte; farklı araştırma grupları arasında işlevsellik tartışmaları da devam etmiştir¹³. Aynı yıl bağımsız üç araştırma grubu, çoğu CRISPR aralayıcı (spacer) bölgenin; bakteriyofaj DNA'sı, plazmit ya da transpozonlar gibi hareketli genetik elemanlarla homolog olduğunu göstermiştir^{14–16}. Bu bulgular CRISPR/Cas sisteminin RNA aracılı bir savunma sistemi olabileceği hipotezini doğrulamıştır^{17,18}. CRISPR'lerin kazanılmış bağışıklık ile bağlantılı olduğuna ilişkin ilk deneysel çalışma ise

2007 yılında bildirilmiştir. Barrangou ve ark., yoğurt ve peynir üretiminde kullanılan *Streptococcus thermophilus* suşları üzerinde yaptıkları çalışmada, bu suşları fajlarla enfekte ettiklerinde CRISPR1 lokusunda 1–4 yeni aralayıcı DNA kazanımının olduğunu tespit etmişlerdir¹. Ayrıca, aralayıcı DNA sayısı ile suşun faja karşı direnci arasında bir korelasyon olduğunu bildirmişlerdir. Böylece CRISPR dizilerinin ve ilişkili Cas proteinlerinin bakteriyofaj enfeksiyonuna karşı etkin bir prokaryotik bağışıklık sistemi olduğu kanıtlanmıştır; yabancı genomlara karşı savunmanın CRISPR lokusundan transkribe edilen RNA'lar vasıtasıyla gerçekleştiği ortaya konmuştur¹⁹.

2008'de Brouns ve ark., yaptıkları çalışmada, *E. coli* de CRISPR lokusundan ilk olarak ~120–180 nt. lik büyük öncül RNA'ların (pre-crRNA) sentezlendiğini ve bunların Cas genlerinin etkinliğiyle ~57 nt. lik küçük olgun RNA'lara (crRNA) kesildiklerini belirlemişlerdir²⁰. İlerleyen yıllarda yapılan çalışmalarla CRISPR/Cas sisteminin tipleri ve işleyiş mekanizmaları araştırılmaya devam edilmiştir.

2010 yılında, Garneau ve ark., *Streptococcus thermophilus* bakterisinde faj ve plazmit kullanarak yaptıkları çalışmada, daha önce Cas5 ve csn1; ancak günümüz literatüründe Cas9 olarak tanımlanmış genin; Cas genleri arasında hedef DNA'nın kesimini gerçekleştirebilen bir enzimi kodladığını bildirmişlerdir²¹. CRISPR/Cas9 sisteminde genetik kompozisyon ve Cas geni spesifitesine göre yapılan tiplendirmelerden; Tip II sistemindeki (tracrRNA: trans-aktive edici crRNA'nın) varlığını 2011 yılında Deltcheva ve ark. tanımlamıştır²². Aynı yıl Sapranauskas ve ark., ise *S. thermophilus*'un Tip II CRISPR bölgesinin *E.coli*'ye transferini gerçekleştirerek, CRISPR/Cas sistemlerinin bakteriler arasında aktarılabilceğini ilk kez göstermişlerdir²³.

2012 yılına kadar yapılan çalışmalarla Cas proteinlerinin, crRNA'ların hedefi tanımasında ve yabancı genomlara ait dizilerin susturulmasında görev yaptığı belirlenmiştir²⁴. Bu bilgiler ışığında Jinek ve ark., CRISPR Tip II sisteminde, hedef DNA'nın özgül olarak tanınması için; RNase III'ün gerekli olmadığını, Cas9, tracrRNA ve crRNA'ların bir arada olmasının yeterli olduğunu tespit etmişlerdir²⁵. Bunun üzerine çalışma ekibi tracrRNA ve crRNA'lardan oluşan RNA hairpin (saç tokası) yapısında, kimerik (single-guided RNA-sgRNA) yeni bir RNA oluşturmuşlardır. Cas9 kimerik RNA'yı tanıyıp bağlandıktan sonra, hedef DNA'ya yönlendirebilmektedir. Böylece Cas9 endonukleazının, ilgili herhangi (dsDNA: çift zincirli DNA



Şekil 1. CRISPR/Cas lokusu.

[*double-stranded DNA*]) dizimini hedeflemek için artık tek bir transkript olarak tasarlanmış klavuz/rehber RNA'ya (sgRNA) ihtiyacı vardır. Sistemin sgRNA'daki DNA hedef bağlama dizisini değiştirerek programlanabilir olması, gen hedefleme ve genom düzenleme uygulamalarının önünü açmıştır²⁵.

Bilim insanları çalışmaları ile CRISPR/Cas sistemiyle ilgili bilinmeyenleri birer birer ortaya çıkarırken, sistemin 2013 yılına kadar genom düzenleme aracı olarak kullanılabileceği tam anlamıyla aydınlatılmamıştır²⁶. 2013 yılında, *Streptococcus pyogenes* SF370'nun Tip II CRISPR/Cas sisteminin 4 bileşeninden (SpCas9, SpRNase III, tracrRNA ve pre-crRNA) oluşan kombinasyonları, insan embriyonik böbrek hücre hattı olan 293FT hücrelerinde, EMX1 (*Empty Spiracles Homeobox 1*) lokusunu hedeflemede kullanılmıştır. İlk kez CRISPR/Cas sistemi ile memeli hücresinde genom düzenlenmesi yapılan bu çalışmada, SpRNase III olmadan da sistemin çalıştığı ve EMX1 lokusunun hedeflendiği belirlenmiştir. Böylece genom düzenleme için, SpCas9, tracrRNA ve pre-crRNA şeklinde 3 bileşenin yeterli olduğu kesin olarak ortaya konmuştur. Bunun üzerine hem insan hem de fare hücrelerinde kimetik RNA'lar (crRNA: tracrRNA) ile hedef DNA'da

delesyonlar oluşturulmuştur. Çalışma ekibi hem *S.pyogenes* hem de *S.thermophilus* CRISPR sistemleri ile memeli genomunun düzenlenmesinin yapılabileceğini göstermişlerdir²⁷. 2013 yılında Mali ve ark., yaptıkları çalışmalar ile, Tip II CRISPR/Cas sisteminin; memeli hücrelerinde RNA rehberliğinde, özgül genom düzenleme aracı olduğunu raporlamışlardır²⁸. Bu çalışmalar sonrasında CRISPR/Cas9, sadece adaptif bağışıklık sistemi olmaktan çıkmış ve bir genom düzenleme aracı olarak bilim dünyasında yerini alarak; gündene etkinliğini ve spesifitesini arttıran bir proses olarak kabul görmüştür.

CRISPR Lokusunun Bileşenleri

CRISPR/Cas sistemi bakteri ve arkealarda adaptif bağışıklık sisteminden geliştirilmiş olup, genom mühendisliği araçlarının arasına en son eklenen özel bir RNA/protein kompleksidir^{26,29}. Mikrobiyal türler arasında CRISPR dizileri ve Cas genleri büyük farklılıklar göstermesine rağmen² CRISPR lokusu; i) Palindromik tekrar sekasları, ii) Aralayıcı (spacer) DNA bölgeleri, iii) Lider dizisi için açık okuma çerçevesinin (ORF) bulunmayışı ve iv) Cas genlerinin varlığı ile evrensel bir anatomiye sahiptir¹³ (Şekil 1).

i) Palindromik tekrar dizileri

Belirli bir CRISPR lokusunda palindromik tekrar dizilerinin dizi uzunluğu ve dizi içeriği büyük oranda korunmuş olmasına rağmen; türler arasında farklılık gösterebilmektedir^{2,4,12}. Tekrar dizilerinin uzunlukları 24–47 baz çifti (bç) arasında değişmekte^{2,30} ve içeriğinde çoğunlukla kısa 5–7 nt. lik palindromik tekrar dizileri bulunmaktadır³¹. Palindromik diziler, RNA stem-loop ikincil yapısının (*hairpin*) oluşumuna katkıda bulunan stabil, yüksek oranda korunmuş diziler^{18,31,32} iken; CRISPR bölgesindeki tekrar bölgeleri birkaç tane veya yüzlerce olabilmektedir¹³.

ii) Aralayıcı (Spacer) DNA bölgeleri

Tekrar dizileri “Aralayıcı DNA” olarak isimlendirilen özgül benzersiz dizilerce birbirinden ayrılmaktadır^{2,13}. CRISPR lokusunun hiper değişken elemanları olan¹⁸ bu dizilerin uzunluğu 26–72 bç arasında değişmektedir^{2,30}. Aralayıcı DNAlerin kaynağı plazmitlerin veya virüslerin nükleik asitleridir^{14–16}; bu proto-aralıklar tipik olarak, korunmuş kısa 2–5 nt. lik PAM (*Protospacer Adjacent Motif*) dizilerine bitişiktir³². Bir genomda bulunan aralayıcı DNA lokusu, tek veya daha fazla sayıda olabilmektedir³³. Bu aralayıcı DNA’lar prokaryotlardaki adaptif bağışıklık sisteminin merkezi bileşenidir; özgül DNA dizilerinden oluşurlar ve kazanılmış bağışıklık mekanizmasının belleğini oluştururlar. Özelleşmiş bir genetik bellek olarak işlev yapan aralayıcı DNA dizileri, tanıma dizisi bulunan virüslerin, konakçıyı enfekte etmesini engellemekle yükümlüdür²⁰.

iii) Lider dizisi

Lider dizisi, kodlanmayan, yaklaşık 500 nt içeren CRISPR lokusunun 5’ ucunda bulunan Adenin ve Timin nükleotidlerince zengin bir dizidir; dolayısıyla transkripsiyonun başlama noktasıdır³⁵. Lider dizisinin açık okuma çerçevesi yoktur ve türler arasında korunmaz^{12,33}. CRISPR lokusuna yeni eklenecek olan Aralayıcı DNAleri, lider dizisinin bulunduğu proksimal uçtan eklenmektedir^{1,34}.

iv) Cas genleri

Cas genleri genellikle CRISPR dizilerinin yakınında konumlanmış olup, Cas proteinlerini kodlarlar. Cas proteinleri endonukleaz, ekzonukleaz, helikaz özellikleri ve nükleik asit bağlanma bölgeleri (*domainleri*) taşımaları sayesinde, DNA dizilerini açıp kesebilirler^{23,32}. Cas genleri, aralayıcı DNA’ların CRISPR lokusuna entegrasyonu, crRNA’ların transkripsiyonu ve

işlenmesi, crRNA’ların hedef DNA’ya yönlendirilmesi ve sonuç olarak istilacı hedef DNA’yı degrade etmesi gibi CRISPR aracılı immünitenin çeşitli basamaklarında görev alırlar^{32,36}.

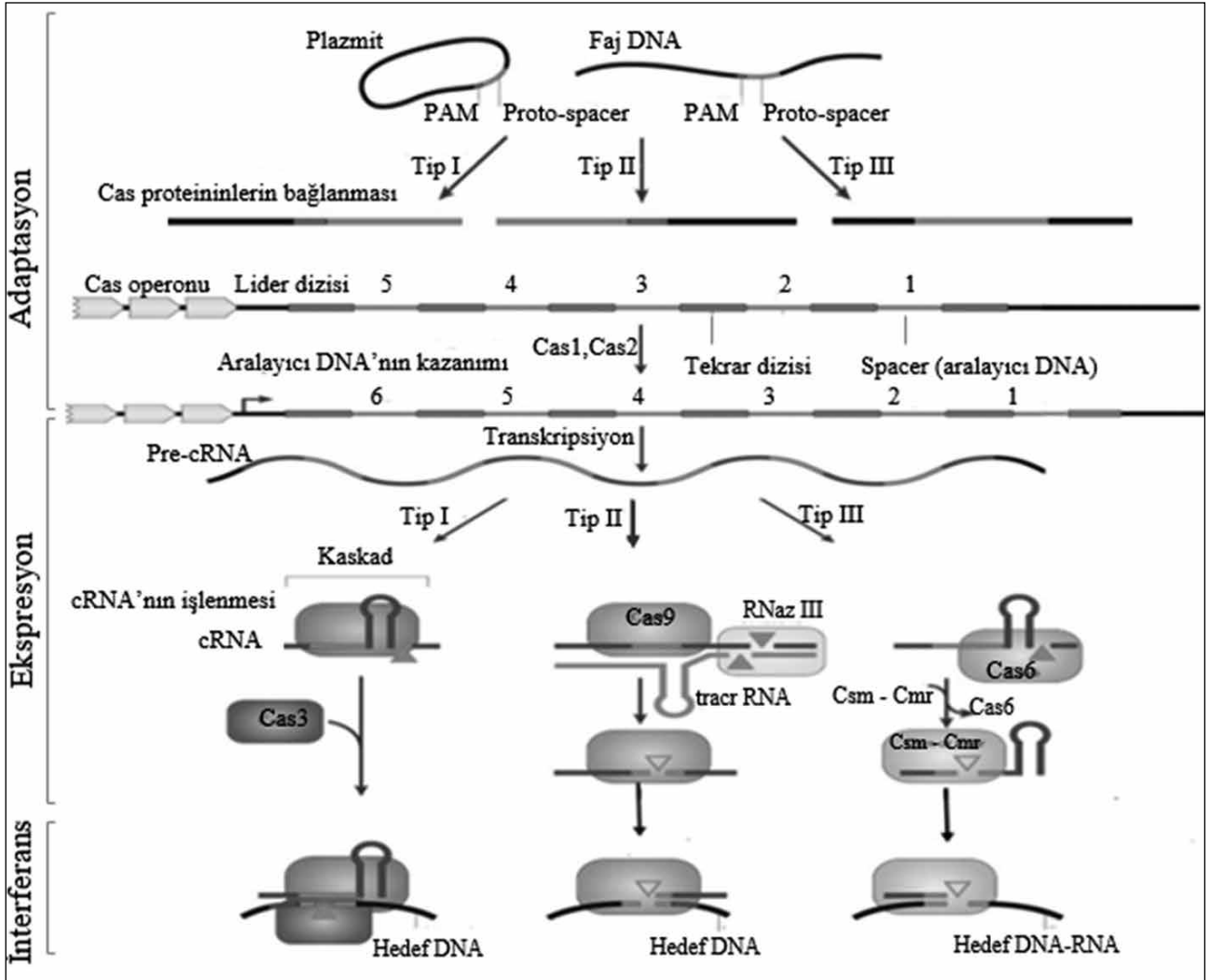
2002 yılında Jansen ve ark., ilk 4 Cas genini tanımlamışlar¹², sonraki yıllarda Haft ve Makarova çalışma ekipleri ile bu sayıyı 45’in üzerine çıkarmıştır^{37,38}. CRISPR/Cas sistemleri, genetik birleşenlere ve Cas genlerinin farklılığına göre, Tip I, Tip II ve Tip III olmak üzere üç ana ve 11 alt tip (I-A/I-F, II-A/II-C, III-A/III-B) olarak sınıflandırılmaktadır^{6,39,40}.

CRISPR/Cas Sisteminin Alt Tipleri

Adaptif bağışıklık yanıtının oluşum basamaklarından birincisi olan ‘Adaptasyon’ sürecinde görevli⁴¹ olan Cas1 ve Cas2 genleri, tüm CRISPR/Cas sistemlerinde bulunmaktadır³⁹. CRISPR/Cas sistemlerinde bu iki Cas genin dışında, o tipe özgü Cas genleri de bulunabilmektedir^{13,37}. CRISPR/Cas sistemi tiplerinin crRNA işleme mekanizmaları birbirinden farklıdır⁴². Bu sistemlerden Tip II sistemi sadece bakterilerde bulunurken, Tip I ve III sistemleri hem bakterilerde hem de arkealarda bulunmaktadır^{6,39}.

Tip I ve III sistemleri benzerlik sergilemektedir. Her iki sistemde de pre-crRNA’dan olgun crRNA’ların elde edilmesinde, endonukleaz özelliğine sahip olan Cas6 proteini kullanılmaktadır^{20,41,42}. Tip I sistemine özgül olarak ise, saldırgan yabancı genomu parçalamak için helikaz ve DNaz domainleri içeren Cas3 proteini kullanılmaktadır^{6,20,42}. CRISPR/Cas Tip III sistemi; Tip III-A ve Tip III-B olmak üzere iki alt tipe ayrılmakta⁴⁰; Tip III-A DNA moleküllerini parçalarken, Tip III-B ise RNA molekülünü parçalamakla yükümlüdür. Her iki durumda da hedefleme, RAMP süper ailesi üyesi (*Repeat-Associated Mysterious Proteins Super Family*), özel bir Cas gen grubuna dahil olan Csm-Cmr proteinleriyle gerçekleşmekte³⁷; Tip III-A’da Cas10-Csm kompleksi görev alırken, Tip III-B’de Cas RAMP modüle (CMR) kompleksi görev yapmaktadır^{32,43,44}.

Tip II sistemi, diğer tiplerin aksine daha az bileşene ihtiyaç duymakta ve pre-crRNA’dan olgun crRNA’ların oluşum aşamaları da diğer iki tipe göre farklılık göstermektedir. pre-crRNA’lardan olgun crRNA’lar oluşturulması için, pre-crRNA’daki tekrar dizilerine komplementer olan tracrRNA, pre-crRNA’nın ve tracrRNA’nın oluşturduğu hibrit yapıyı tanıyarak bağlanan bir ribonukleaz olan RNazIII²² ve Cas9 proteini gerekmektedir^{39,45,46}.



Şekil 2. CRISPR/Cas sistemi, adaptasyon, ekspresyon, interferans olmak üzere üç temel aşamadan oluşmaktadır⁴⁹. CRISPR/Cas tüm sistemlerinde Cas1, Cas2 bulunur. Tip I sisteminde DNA'yı kesen özgül gen Cas3 iken; Tip II'de Cas9, Tip III'te Cas10'dur⁴⁷. Cas6 proteini Tip I ve Tip III sisteminde pre-crRNA'dan olgun crRNA'ların elde edilmesinde görevlidir^{20,41,42}.

Tüm bu veriler ışığında Cas9'un yabancı DNA'nın crRNA rehberliğinde degrade edilmesinden sorumlu tek protein olduğunun anlaşılması²⁵, Tip II sisteminin genom düzenleme aracı olarak kullanılmaya başlamasına olanak vermiştir.

CRISPR-Cas Sisteminde Adaptif Bağışıklık Yanıtının Oluşum Aşamaları

CRISPR/Cas sisteminin dizi özgül olarak istilacı DNA veya RNA'yı tanıyıp, parçalayarak etkisiz hale getirdiği savunma mekanizması, (i) adaptasyon (ii) ekspresyon ve (iii) interferans olmak üzere 3 aşamada gerçekleşmektedir^{48,49} (Şekil 2).

(i) **Adaptasyon:** İstilacı nükleik asitlerden yeni aralayıcı DNA bölgelerinin CRISPR lokusuna kazandırılması basamağıdır. CRISPR adaptasyonunun gerçekleşmesi için; birer nukleaz olan Cas1 ve Cas2 proteinleri gerekmektedir^{48,50} Tip II-A sisteminde, adaptasyon için Csn2, Cas9 ve tracrRNA, Tip II-B sisteminde ise Cas4 fonksiyoneldir⁴⁸. 2-5 bç. lik kısa diziler olan PAM dizileri hem adaptasyon hem de interferans basamağı için önemli ve gereklidir⁵¹. Cas9'un PAM dizisini tanıma domaini, yeni aralayıcı DNA'nın seçiminden sorumludur⁴⁸. PAM dizileri; Tip I sisteminde protoaralık 5'ucunda 2-3 nt ve Tip II sisteminde protoaralık 5'ucunda 2-5 nt arasında değişen korunmuş dizi

motifleridir⁶. Bu PAM dizisi sayesinde hedef dizi analiz edilerek, genomun kendinden olan ve olmayan ayırımının yapılarak, yeni aralayıcı bölgenin seçilebilmesi mümkün olmaktadır. CRISPR'ın adaptasyon basamağı, ekspresyon ve interferans aşamaları öncesinde genetik belleğin oluşturulması için vazgeçilmezdir.

(ii) *Ekspresyon*: Temel olarak CRISPR bölgesinden pre-crRNA sentezi sonrasında, Cas genlerinin aktivasyonu ile pre-crRNA'dan olgun ve fonksiyonel crRNA oluşturulması basamağıdır. Bu bağlamda öncelikle CRISPR lokusundan uzun transkript formu olan pre-crRNA sentezlenir ve işlendikten sonra, hedef DNA'nın tanınmasında rolü olan CRISPR ile ilişkili antiviral savunma kompleksi kaskadı (*CRISPR-associated complex for antiviral defense cascade*)³² sayesinde olgun crRNA'nın oluşturulduğu crRNA biyogenezi gerçekleştirilir⁴⁹. Bu basamak CRISPR/Cas sistemlerine göre, crRNA biyogenezinde yer alan enzimatik mekanizmalar ve gerekli olan proteinler bakımından farklılıklar gösterebilmektedir.

Tip II sisteminde daha farklı seyreden ekspresyon basamağında, CRISPR lokusundan üretilen pre-crRNA ile 89 veya 171-nt olan tracrRNA, 25 nt. lik baz eşleşmesi yaparak RNA-RNA hibritini oluştururlar. İki RNA da birlikte işlenir; tracrRNA işleme sonrasında ~75 nt uzunluğuna gelir²². dsRNA'yı 3' ucundan bir endoribonukleaz olan RNaz III tanıır ve Cas9 eşliğinde pre-crRNA'daki tekrar dizilerini keserek, içerisinde 20 nt aralayıcı DNA içeren 39–42 nt uzunluğunda olgun crRNA'ları oluştururlar⁵⁵.

(iii) *İnterferans*: Ekspresyon basamağında oluşturulan olgun crRNA'nın Cas proteinleri ile oluşturduğu ribonükleoprotein yapısı crRNP'nin^{52,53}, hedef DNA'daki PAM dizisini ve aralayıcı DNA'nın 5' ucundaki 7–8 bç. lik bir bölgeyi ifade eden çekirdek dizisini (*seed sequence*) tanımasıyla, hedef dizinin parçalanıp degrade edildiği basamaktır⁵³. Başarılı bir interferans için PAM dizisinin varlığı ve proto-aralayıcı DNA=crRNA komplementerliği mutlaka gerekmektedir. PAM dizisi, DNA bağlanması için kritik önem taşımaktadır; çünkü Tip I ve Tip II sistemlerinde PAM dizisinin varlığı, kendi CRISPR bölgelerine saldırılmaktan korumakla yükümlüdür. PAM dizisi yokluğunda, kılavuz RNA dizisi ile tamamen eşleşen hedef diziler olsa bile Cas9 tarafından tanınmaz⁵⁴ ve kesim gerçekleşmez. Çekirdek dizisinin dışında birkaç eşleşmemiş baz tolere edilebilir ve daha sonra baz eşleşmesi yolu ile crRNA hedef DNA'ya bağlanır ve Cas proteinleri (Tip I: Cas3 Tip II: Cas9 ve Tip III: Cas 10) hedef DNA'nın hem kodlanan

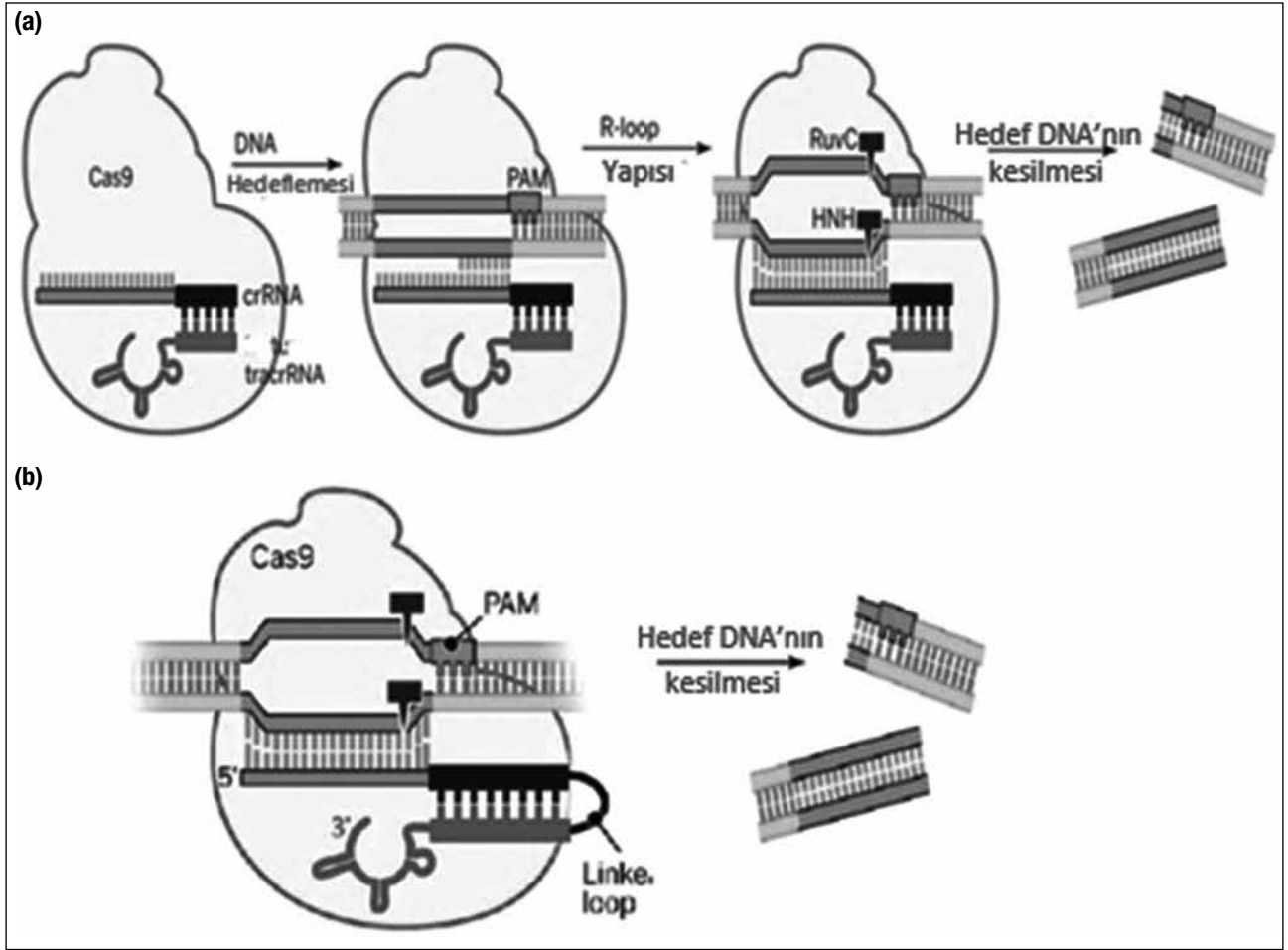
hem de kodlanmayan dizisinde çentikler oluşturur⁵⁵. Tip III sistemi için ise PAM dizisi tespit edilememiş ve sistem kendini degradasyondan korumak için, olgun crRNA'nın 5' ucundaki etiketten yararlanmaktadır^{9,52}.

Tip II sisteminin interferans aşamasında, işlenerek fonksiyonel hale getirilmiş olgun crRNA: tracrRNA: Cas9 kompleksinin; hedef DNA dizisini PAM dizisinin yakınından tanımasıyla, RNA-DNA kompleksinin oluşumu gerçekleşir. Memeli gen düzenlenmesi için sık kullanılan PAM dizisi 5'-NGG-3'dir²⁹. Bunun yanı sıra çok verimli olmamakla birlikte, Cas9 5'-NAG-3' veya 5'-NGA-3' PAM dizilerini de tanıır^{56,57}. Kesim, tamamlayıcı yani komplementer olan DNA ipliğinde PAM dizisinin 3 nt akış yukarı (*upstream*) dizisinden gerçekleşirken; komplementer olmayan DNA ipliğinde PAM dizisinin 3–8 nt akış yukarı dizisinin birçok bölgesinden olmaktadır²⁵. DNA ipliklerindeki kesim işlemleri büyük bir protein olan Cas9 tarafından gerçekleştirilmektedir. Cas9 proteini, α -heliks yapıda olup, hedef diziyi tanımada görevli REC ilmeği ve endonukleaz özellik gösterip HNH-RuvC alt domainleri bulunan NUC ilmeğinden oluşmaktadır⁴⁷. Hedef DNA'nın komplementer ipliğini HNH keserken, komplementer olmayan DNA ipliklerini RuvC kesmekle yükümlüdür^{32,47,58} (Şekil 3A).

Cas9'un sgrRNA ile programlanarak hedef bölgede çentikler oluşturabileceği, Jinek ve ark. nın, crRNA'nın 3' ucunu tracrRNA'nın 5' ucuna etkili bir şekilde birleştirerek oluşturdukları çift-RNA; yani sgrRNA veya grRNA yapısının interferans basamağıyla aydınlatılmıştır²⁵. Buna göre, kimerik RNA'nın 3' ucundaki çift sarmal yapıya Cas9 bağlanır ve sgrRNA'yı yönlendirerek 5' uç ile hedef DNA dizisi arasında 20 nt. lik baz eşleşmesi gerçekleştirir. Cas9 enziminin hedefi tanınması için gerekli olan, hem crRNA'daki çekirdek dizi hem de hedef DNA ile crRNA-bağlama bölgesine bitişik GG dinükleotidi içeren PAM dizisinin (NGG) varlığıdır. DNA-RNA arasındaki eşleşme gerçekleştikten sonra, Cas9'un HNH ve NUC domainleri PAM dizisinin 3 nt yukarisından hedef DNA'yı keserek çift zincir kırığı oluştururlar^{25,54} (Şekil 3B).

Efektif Bir Genom Dizayını: Tip II CRISPR/Cas9 Sistemi

CRISPR/Cas sistemi temelde, RNA yönlendirmeli bir DNA hedefleme sistemidir. Aslında CRISPR/Cas sisteminin DNA zincirini kesmek için kullanılması bilimsel bir araştırma değildir. Bunun yerine, CRISPR'ın DNA ipliklerindeki nükleotidlerin genetik dizilimini

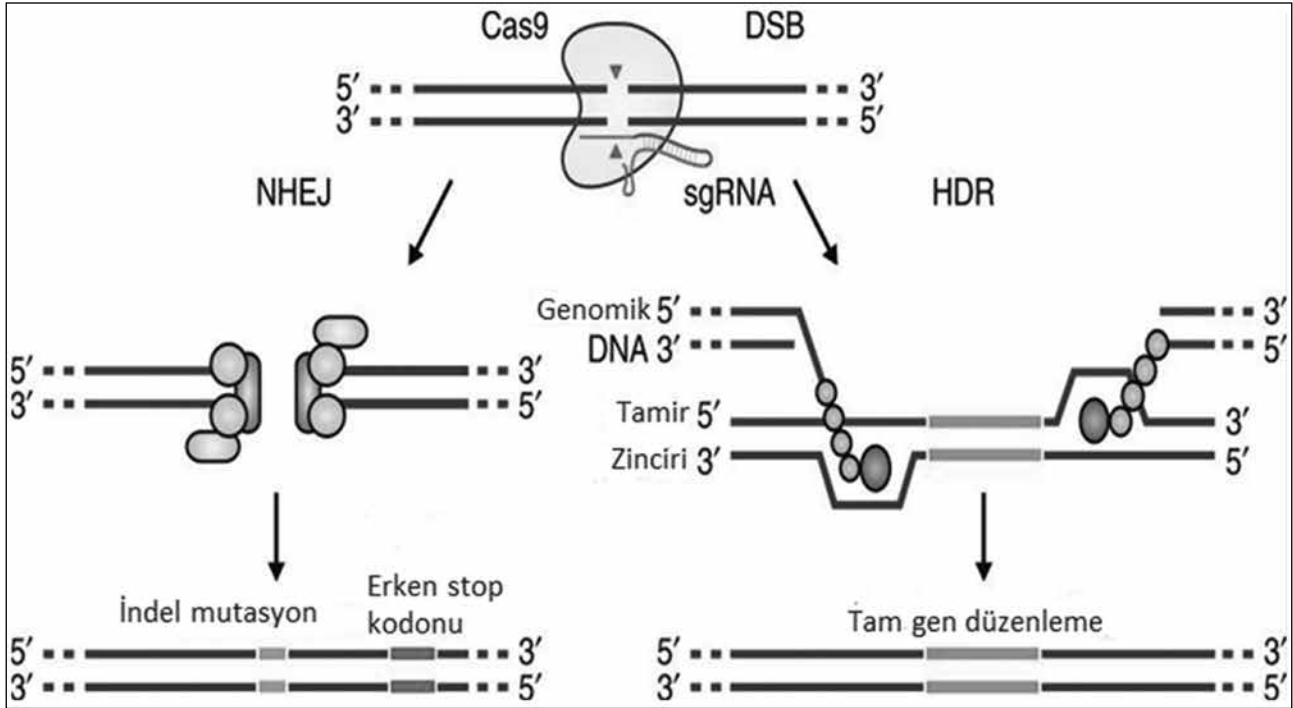


Şekil 3. a, b. Cas9 crRNA: tracrRNA tarafından programlanarak hedef bölgede çentikler oluşturulabilir (a). Cas9 sgRNA tarafından programlanarak hedef bölgede çentikler oluşturulabilir (b). R loop yapısı RNA-DNA kompleksinin sağlamlığını sağlamaktadır⁶⁴.

değiştirmek için kullanılması asıl teknolojidir⁵⁹. Hedeflenen DNA dizilerinde değişiklikler yapılabilmesi için, NHEJ ve HR DNA tamir mekanizmaları kullanılmaktadır⁶⁰. Bu mekanizmalar genomun bütünlüğüne en büyük zararı verecek çift zincir kırıklarının tamirinde kullanılmaktadır. Çift iplik kırıklarının DNA'nın her iki ipliğini de etkilemesinden dolayı, hasarlı bölgenin karşısındaki komplementer DNA zincirinden sentezi gerçekleştiren mekanizmalar ile tamir yapılamaz. Bunun yerine çift iplik kırıkları, kırık iplikleri birleştiren rekombinasyonel tamir mekanizmasıyla onarılır. Çift zincir kırıklarının hangi yöntem seçilerek tamir edileceği ise, hücre döngüsünün hangi evresinde bulunduğuyla ilişkilidir: G_0/G_1 evresinde henüz sentez fazı gerçekleşmeyip kardeş kromatidler oluşmadığından HR aktive edilmez ve NHEJ kullanılır. Kardeş

kromatitlere kolayca erişilebildiği hücre döngüsünün S ve G2 evrelerinde homolog rekombinasyon kullanılır. Kardeş kromatitler birbirlerinin tam bir kopyası olduklarından homolog rekombinasyon için ideal birer substrattır.

NHEJ'nin temelde çalışma prensibi, kırık olan iki DNA ipliğinin direkt olarak ligazlarla birbirine bağlanmasıdır. Tamir esnasında kırık iki uç Ku, XLF: XRCC4, DNA ligaz IV⁶¹ gibi çeşitli proteinlerle işlenerek rastgele birleştirilirken, bazı nükleotidlerin kaybı sonucu orijinal DNA dizisinin kalıcı olarak değişmesi gerçekleşebilmektedir. Delesyon sonucu kaybolan nükleotidler kontrol edilemediği için NHEJ hataya meyilli bir sistemdir ve dolayısıyla, bu tamir mekanizmasında beklenmedik mutasyonlar oluşabilir^{59,62} (Şekil 4).



Şekil 4. Cas9 tarafından indüklenen çift zincir kırıkları (DSB) iki farklı mekanizma ile tamir edilebilir. NHEJ hata eğilimli bir mekanizma iken, HR kalıp dizi sayesinde doğru ve hassas düzenleme olanağı sunar⁶³.

NHEJ'in basit, sade ve rastgele olmasının aksine, HDR daha karmaşık ve hedeflenen organizmanın genetik dizilimini düzenlemek için daha doğru bir araçtır. Düzenlenmenin doğruluğunu sağlayan, kullanılacak belirli bir kalıp dizisinin yani kardeş kromatidlerin varlığıdır^{27,59}. Bu tamir mekanizmasında çift zincir kırığı (DSB: *Double Strand Break*) hazırlanmış olan kalıp diziye göre yeniden sentezlenir. Böylece hedef bölge, istenilen nükleotit dizisine çevrilmiş olur⁵⁹.

Cas9 enzimi ile oluşturulan çift zincir kırıklarında iki ucun rastgele birleştirildiği hata eğilimli NHEJ sistem, *insersiyon* (ekleme) ve *deleksyon* (silme): indel mutasyonlara neden olmaktadır. İndel mutasyonları, bir genin kodlama bölgesi içinde meydana gelirse çerçeve kaymasına neden olarak ya da erken stop kodunu oluşturarak genlerin susuturulmasını sağlamaktadır⁶³. Gen düzenleme aracı olarak çift zincir kırıklarının kullanıldığı çalışmalarda, nakavt mutasyonları oluşturmak için NHEJ kullanılırken, gen düzeltilmesi ve *knock-in* (dizi ekleme) çalışmalarında daha hassas olan HR kullanılmaktadır⁶⁰ (Şekil 4).

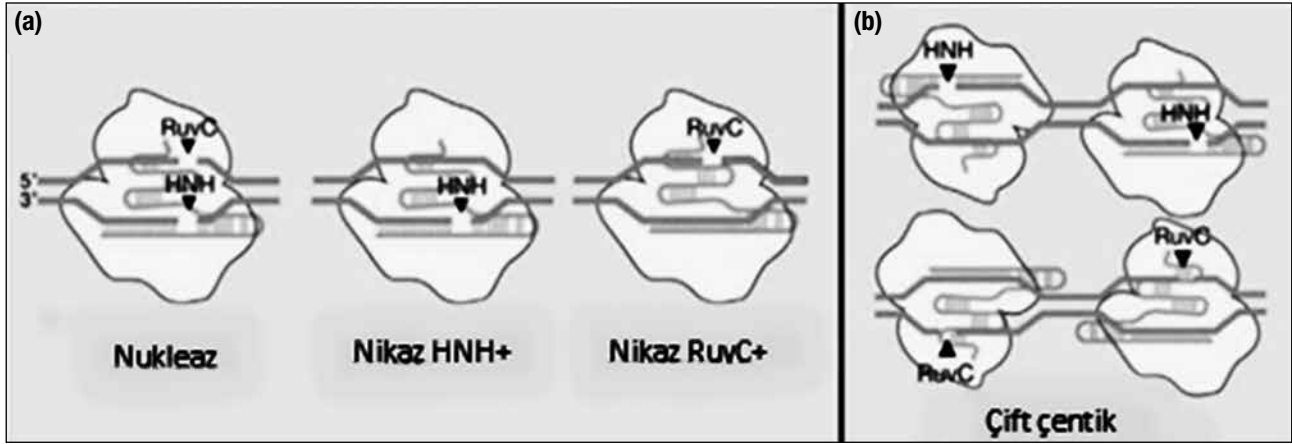
CRISPR genom düzenleme teknolojisi ile NHEJ ya da HR DNA onarım mekanizmalarının herhangi bir

organizmada istenilen bölgede knock out, knock in gibi düzenlemeler yapılabilmesi için⁵⁹; düzenleme yapılacak bölgeye özgül olarak tasarlanmış olan sgRNA ile viral, non-viral, plazmit gibi farklı transfeksiyon yöntemlerinin kullanılabilceği Cas9 vektörleri ile⁶⁴ verilmesi gerekmektedir.

Cas9 Özgüllüğü

CRISPR/Cas9 sistemi bakterilere direnç kazandırmada, biyotiplendirmede, tarımda, hastalık modelleri oluşturmada, tedavide, gen düzenlenmesi gibi birçok alanda uygulanıyor olmasına rağmen; Cas9 özgüllüğünün eksikliği nedeniyle hedeflenen genomik bölgenin haricinde, istenmeyen hedef dışı DNA bölgelerinin kesime uğraması (*off-target effect*) ve etik problemler sistemin kısıtlayıcılığını oluşturmaktadır⁵⁹.

Genom düzenleme teknolojisi, genomda kalıcı değişikliklere neden olduğundan, özellikle klinik uygulamalar ve gen tedavisi için Cas9 nukleazlarının hedefleme özgüllüğü oldukça önemlidir; hedefe yönelik kesim yapılmalıdır⁴⁷. Cas9 hedef bölgelerinin seçiminde tek ihtiyaç, hedef bölgenin hemen akış aşağısında bulunan PAM motifinin varlığıdır. Son zamanlarda yapılan



Şekil 5. a, b. Cas9 nukleaz, RuvC ve HNH domainlerinin nukleaz aktivitesi sayesinde DNA'yı keserek DSB'leri oluşturur. RuvC ve HNH domainlerinden birisinin katalitik aktivitesi inhibe edilerek tek iplik DNA kırıklarına neden olan nickaz mutantları üretilir (a). Hedef dizilerine sahip iki Cas9 nickaz kompleksi birlikte DNA'da çift zincir kırıkları oluşturabilir (b); kesim verimliliğinde düşüş olmaksızın, hedefi tanıma süresi iki katına çıkmaktadır⁴⁷.

çalışmalarda, Cas9 özgülüğünü genel olarak rehber diziyile PAM dizisinin 5'ucunun ilk 8–12 nt. i arasındakiki tam eşleşmenin (baz komplementerliği) belirlediği tespit edilmekle birlikte²⁷, hedef bölgede ilk 20 nt.'in özgülüğe farklı derecelerde katkıda bulunduğu tespit edilmiştir⁴⁷. Cas9 özgülüğünde PAM'ın 5'ucuna yani proksimal dizilerine göre daha az efektif olan PAM distal dizilerinin de spCas9 aracılı DNA kesiminin özgülüğüne katkıda bulunduğu bildirilmiştir^{47,56}.

Cas9'un hedef DNA'da kesim yapabilmesi için, rehber RNA ve hedef DNA arasında geniş bir homoloji gerektirmektedir⁴⁷. Bununla birlikte, rehber RNA ile hedef DNA dizisi arasındaki birden fazla baz uyumsuzluğunun, eşleşmemiş bazların konumuna, sayısına ve dağılımına bağlı olarak tolere edilebileceği de gösterilmiştir⁶⁵. Özgülükte daha az öneme sahip rehber dizinin PAM distal bölgesindeki tekli baz uyumsuzlukları PAM proksimal bölgede olanlara kıyasla daha iyi tolere edilmektedir. Bu bölgedeki hatalı eşleşmeler nedeni ile özgülük azalsa da, Cas9 aktivitesi yok olmaz. Genel olarak, rehber RNA ve hedef DNA arasında 5 baza kadar eşleşmemenin tolere edilebildiği rapor edilmekle birlikte; bu baz uyumsuzlukları hedef dışı etkilere ivme kazandırıp, çift zincir kırıklarına ve indel oluşumuna sebep olmakta⁵⁶, genomda instabilite ve istenmeyen mutasyon oluşumu ile sonuçlanmaktadır.

Bu istenmeyen mutasyonlar, in vivo ve ex vivo genom düzenleme temelli tedavi stratejilerin geliştirilmesi ya da genetik varyasyonları taşıyan izogenik hücre hatlarının üretilmesi gibi, yüksek düzeyde Cas9 özgülüğü ve

hassasiyeti gerektiren genom düzenleme uygulamalarının kullanımını sınırlayabilmektedir. Mutasyonların engellenmesi, Cas9 spesifitesinin artırılması, yüksek etkinlikte hedef DNA'nın kesilmesi ve hedef dışı etkilerin azaltılması amacı ile gerçekleştirilen diğer bir strateji, *S. pyogenes*'ten izole edilen modifiye Cas9'un (SpCas9) kullanılmasıdır⁶⁶. Bu bağlamda yapılan çalışmalar şu şekildedir: Yabanıl tip Cas9'un RuvC ve HNH domainlerinin nukleaz aktivitesi aracılığıyla, hedef DNA'da çift zincir kırıkları oluşturur. Bu çift zincir kırıkları önceden de açıklandığı gibi NHEJ ve HR tamir mekanizmalarınca onarılmaktadır⁶⁰. Cas9 özgülüğünü artırmak için, RuvC veya HNH nukleaz domainlerinden birinin katalitik aktivitesini nokta mutasyonu yolu ile inaktive ederek, DNA tek sarmal kırıklarını (SSB: *single strand break*) oluşturan Cas9 nickazlar [nickase Cas9n-D10ACas9, (Şekil 5A)] elde edilmiştir^{25,27}. Çift sgRNA tarafından yönlendirilen iki Cas9n enzimi, DNA'nın karşılıklı ipliklerinde çentikler oluşturarak, çift zincir kırıklarına benzer şekilde etkili bir indel mutasyon oluşumunu da sağlamaktadır⁶⁶. Hedef dışı oluşan çentik bölgeleri, yüksek spesifiteye sahip baz eksizyon tamiri (BER) yolu ile tam olarak tamir edildiğinden⁴⁷; bu multipleks çentikleme stratejisi, yabanıl tip Cas9'lara göre spesifiteyi 1,500× kat artırabilmektedir (Şekil 5B).

Fu ve ark., nın yaptıkları çalışmada; 17–18 nt uzunluğundaki sgRNA'ların, hedefleme verimliliğinde değişim olmaksızın; 20 nt uzunluğundaki sgRNA'lara göre 5000 kata kadar daha az hedef dışı bölgeye bağlanarak,

çok daha özgül etkinlik gösterdikleri belirlenmiştir⁶⁷. Cho ve ark., diğer çalışma ekiplerinden farklı olarak sgRNA'ların hem nükleotit sayısını hem de başlangıç nükleotid tipini değiştirerek Cas9'un özgüllüğü üzerine çalışmalar yapmışlardır⁶⁸. Bu çalışmanın sonucunda, genelde kullanılan sgRNA'ya (5'-GX19) kıyasla, tercih ettikleri 5'-GGX20 veya 5'-GGGX19 sgRNA'ların, hedef dışı bölgeleri efektif bir şekilde ayırt ettiği ancak; hedefleme verimliğinde düşüş olduğu tespit edilmiştir. Hsu ve ark., nın 2013 yılında yaptıkları çalışmada ise, yüksek özgüllük için enzim miktarının da önemli olduğu bildirilmiştir. Çalışmalarında SpCas9-sgRNA kompleksinin miktarını azalttıklarında, spesifikitenin 4-7 kat arttığı belirlenirken; hedef DNA üzerindeki kesimin ise azaldığı saptanmıştır⁶⁶.

Diğer çalışmalarda; sgRNA üzerinde yapılan değişikliklerin yanı sıra Cas9-sgRNA'nın hücreye verilme yöntemlerine göre de özgüllüğün değiştiği tespit edilmiştir. Bu bağlamda, Cas9 kodlayıcı plazmitten ziyade, rekombinant DNA teknolojisi ile Cas9 ve sgRNA'nın birleştirilmesiyle oluşturulan RNP kompleksinin kullanımının, hedef dışı etkiler nedeniyle oluşan mutasyonları azalttığı belirlenmiştir⁵⁷. Kim ve ark., elektroporasyon yoluyla ve Ramakrishna ekibi ise hücre penetrant peptidler (CPP: *Cell Penetrating Peptides*) kullanarak hücreleri RNP kompleksi ile transfekte ettikleri çalışmalarında Koo ve ark., sonuçlarını destekler nitelikte veriler elde etmişlerdir^{69,70,57}.

Yapılan çalışmalar ışığında elde edilen verilere göre, RNP kompleksleri plazmitlerin aksine konak hücrenin genomunda istenilmeyen yerlere entegre olmamakta^{69,70} ve bu nedenle, insan embriyonik kök hücre çalışmaları için plazmit transfeksiyonundan daha az sitotoksik ve en az iki kat daha fazla koloni oluşumu sağladığından, tercih edilecek bir kompleks olarak yerini almıştır⁶⁹. Spesifitenin artırılması için Cas9 ve sgRNA'nın modifiye edilmesi çalışmalarının yanı sıra, potansiyel hedef dışı bölgelerin tahmin edilerek, hedef dışı etkilerin minimale indirilmesi amacı ile, Off-Spotter (<https://cm.jefferson.edu/Off-Spotter>)⁷¹, Cas-Offinder (<http://www.rgenome.net/Casoffinder>)⁷², CHOP-CHOP (<https://chopchop.rc.fas.harvard.edu/>)⁷³ ve COSMID (<http://crispr.bme.gatech.edu/>)⁷⁴ gibi web tabanlı bilgisayar yazılımları geliştirilmiştir⁵⁷. Bu programlarla tüm hedef dışı bölgeler saptanamıyor olsa da, tespit ettiği birçok hedef dışı bölge deneysel olarak da gösterilerek, veri tabanlarının güvenilirliğinin artması sağlanmıştır¹⁷.

Cas9 proteininde gerçekleştirilen modifikasyonlar sadece CRISPR/Cas9 sisteminin spesifitesini

artırmamış; aynı zamanda genoma istenilen baz dizisinin eklenip çıkartılmasını sağlamış, hatta transkripsiyonel ve epigenetik hedefleme ile düzenlemeyi sağlayabilen ucuz, kullanışlı, etkin bir sistem haline getirmiştir. Genomdaki epigenetik düzenlemeler, dead Cas9 (dCas9) ile gerçekleştirilmiştir. dCas9, Cas9 endonukleaz enziminin RuvC (D10A) ve HNH (H840A) katalitik bölgelerinin mutasyona uğratarak inaktifleştirilmiş biçimidir. Katalitik olarak inaktif olmasına rağmen, DNA'ya bağlanma özelliğini korumaktadır. dCas9 ile oluşturulan CRISPR/Cas9 sistemi, CRISPR interferans (CRISPRi) olarak adlandırılmıştır^{75,76}. Modifiye edilmiş bu sistem, genom dizaynı yerine RNA rehberliğinde transkripsiyon regülasyonu amacı ile kullanılmaktadır⁷⁷. Transkripsiyon regülasyonunu dCas9 iki şekilde gerçekleştirmektedir: (i) RNA polimeraz'ı engelleyip onun yerine promotör bölgeye bağlanarak, transkripsiyonun başlamasını durdurur (ii) açık okuma çerçevesine bağlanarak, transkripsiyonu uzama basamağında durdurarak gen ekspresyonunu baskılar. Bunun yanı sıra, transkripsiyonun tetiklenmesinin amaçlandığı başka çalışmalarda, RNA Polimeraz alt birimi omega (ω) ile dCas9'un füzyonu ile oluşturulan dCas9- ω yapısının, promotör bölgeye optimal bir mesafede bağlanması ile gen ekspresyonunun indüklendiği rapor edilmiştir⁷⁸.

Epigenetik regülasyon bazında yapılan çalışmaların etkin olanlarından birisi, Vojta ve ark. nın özgül olarak CpG metilasyonunu sağlayan CRISPR/Cas9 tabanlı epigenom düzenleme aracı dCas9-DNMT3A'yı oluşturarak, human embriyonik böbrek hücre hattı HEK293'te BACH2 ve IL6ST genlerinin promoterini hedefledikleri çalışmadır⁷⁹. Çalışmalarının sonucunda; BACH2 ve IL6ST genlerinin promoterlerinde artmış metilasyona bağlı olarak, hedef genlerin ekspresyon seviyesinde 2'şer kat azalma saptanmıştır. Böylelikle, dCas9-DNMT3A ile DNA metilasyonunu artırıp, gen susturulmasının indüklenebileceğini göstermişlerdir.

dCas9, epigenetik uygulamaların yanı sıra spesifitenin artırılması için de kullanılmıştır. dCas9 ile FokI nukleaz dan 'fCas9' füzyonları üretilmiştir. Sistemin aktivitesi için iki adet fCas9 gerekmektedir. Oluşturulan fCas9, HEK293 hücrelerinde *CLTA*, *EMX* ve *VEGF* genlerini hedef alarak, yabancıl tip Cas9 ve nick Cas9'a göre spesifitesi kıyaslanmış ve değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda, fCas9'un hedef dışı bölgeleri hedefleme kapasitesinin Cas9'a göre 140 kat, nCas9'a göre 1,3-8,8 kat daha düşük olduğu tespit edilmesi⁸⁰

sonucunda, fCas9'un daha özgül bir enzim olduğu belirlenmiştir^{80,81}. dCas9'a farklı foksionel domainler eklenerek, onu sadece gen ekspresyonu düzenleme aracı olmaktan çıkarıp, farklı alanlarda da kullanılabilir mi düşüncesiyle yeni çalışmalar planlanmıştır. Buna göre, dCas9'a GFP domainin eklenmesi ile kromozom içindeki özgül lokusların görüntülenmesi hedeflenmiştir. Metiletazlar, rekombinazlar, ve histon modifiye edici enzimler gibi diğer proteinlerin de dCas9'la birleştirilmesinin, bu teknoloji için yeni fırsatlar yaratacağı öngörülmektedir⁶.

Etik Problemler

Özgüllüğün yanı sıra, CRISPR/Cas9 sisteminin karşı karşıya kaldığı diğer bir sorun da etik problemidir. Birçok ülke tarım ve diğer biyolojik alanlarda genom dizayn teknolojisinin önünü açmak için organizmalar üzerinde genetik düzenlemelere izin verirken; sistemin insan genomunda düzenleme yapmak için kullanılması hala çok tartışmalıdır⁵⁹. Tartışmalı olmasının sebebi, sistemin faydasının risklerinden daha fazla olması gerekliliğidir⁸². Bu risklerin en başında, insanlarda genom düzenleme için yapılan tüm tedavi müdahalelerinin somatik hücrelerde gerçekleştirilmiş olması ve çalışmalarda hedef dışı mutasyonların gelişmiş olması gelmektedir⁸².

Yakın zamana kadar yapılan çalışmalarda insan embriyolarında CRISPR/Cas9 sistemiyle nasıl veriler elde edileceği bilinmiyordu. 2015 yılında Çin araştırma grubu, insan embriyosunda CRISPR/Cas9 aracılı gen düzenlenmesini gerçekleştirmişlerdir. Ekip çalışmalarını, etik problemleri sınırlandırmak için, normalde hayatta bağdaşmayan iki spermle döllenmiş yumurta yani triploid (triponuklear) zigotlar kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada hedef olarak, β -talasemide mutant olan β -globin (HBB) geni seçilmiştir. Çalışmalarının sonucunda, düşük genom düzenleme etkinliği, hedef dışı kesim, mutasyon gelişimi ve son olarak da mozaik embriyoların oluşumu bildirilmiştir⁸³. Hedef dışı kesimler, genomda istenmeyen mutasyonlara sebep olabilir ve bu mutasyonlar zararlı etkiler oluşturarak, hücrenin transforme olmasına ve hatta hücre ölümüne sebep olabilir⁸⁴. Bunun dışında, germ hücrelerinde yapılan modifikasyonlar gelecek kuşaklara aktarılacaktır. İstem dışı oluşan bu mutasyonlar, gelecek nesillerde bugün öngörülemeyen değişikliklere ve modifikasyonlara neden olabilir⁸². Araştırmanın henüz prematüre aşamalarında bile, yöntemin insanda uygulanmasını engelleyecek ve uzak durulmasını sağlayacak birçok

sorun ile karşılaşmıştır⁷. Embriyolar ile yapılan çalışmalarda son güncel durum, ilk defa canlı insan embriyolarının kullanıldığı Mart 2017'de yayınlanan çalışmadır. Bu çalışmada Çin'de yaygın görülen Favizm hastalığıyla ilişkilendirilmiş G6PD genindeki G1376T mutasyonu taşıyan sperm donörü kullanılarak oluşturulan embriyolardan birinde mutasyon başarılı şekilde tamir edilirken; diğer embriyoda bazı hücrelerde mutasyon düzeltilmiş, bazı hücrelerde ise G6PD geni tamamen inaktif hale gelmiş; mozaik bir embriyo elde edilmiştir⁸⁵. Yine 2017 yılında Çin dışında ilk kez ABD'de yapılan çalışmada, insan embriyolardaki hipertrofik kardiyomyopati hastalığına neden olan MYBPC3 genindeki Δ GAGT mutasyonunun düzeltilmesi hedeflenmişti. Yöntemsel açıdan önceki Çin bazlı çalışmalardan farklı yapılan, CRISPR bileşenlerinin embriyonun gelişiminin ilk aşamalarında değil de; daha erken yani döllenme öncesinde sperm ile birlikte M fazı oosite intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu yöntemiyle yerleştirilmesidir. Bu sayede mozaizm oluşumunun azaltılması ya da önlenmesi hedeflenmiş; oluşturulan 58 embriyodan 42'sinde (%72,4) MYBPC3 genindeki mutasyonu düzeltildiği, rapor edilmiştir. Ancak yine de klinik uygulamaların iyi tasarlanması ve planlanması gerektiği, tekniğin hala başka heterozigotik mutasyonlar oluşturduğu sonucuna varılmıştır⁸⁶. Bu nedenle CRISPR/Cas9 aracılı gen düzenlenmesi insan embriyoları için henüz tam mükemmellikte bir teknoloji değildir.

CRISPR/Cas9 insan embriyolarında genom düzenleme aracı olarak kullanılmasını Almanya ve İtalya yasaklamışken; bildirildiği üzere Çin hükümeti ve ABD izin vermektedir⁷.

Ülkemizde ise doğrudan CRISPR/Cas9 teknolojisinin organizmalar üzerinde kullanımına dair bir düzenleme bulunmamasına rağmen, 2010 yılında düzenlenen 27671 sayılı genetik yapısı değiştirilmiş organizmalar ve ürünlerine dair yönetmeliğin 5. Maddesinin c fıkrasında Genetiği değiştirilmiş bitki ve hayvanların üretiminin yasaklandığı belirtilmiştir⁸⁷.

Bir başka etik problem ise, CRISPR/Cas9 sisteminin germ hücrelerinde kullanımının toplumsal çatışmaya neden olabileceği öngörüsüdür⁵⁹. İnsanların çocuklarını kendi istekleri doğrultusunda tasarlamaları sonucunda, bu çocukların diğerlerine kıyasla daha uzun yaşam süresine sahip olma, fiziksel ve zihinsel üstünlükte olma gibi istenmeyen sorunlarla karşılaşılabilir. Bu durum bireyler hatta toplumlar arasında pozitif ayrımcılık problemlerine neden olabilir^{59,84}. Bunun dışında,

germ hücrelerinde genom düzenleme aslında maliyeti oldukça yüksek bir süreçtir ve gelişmiş ülkelerde yaşayan aileler bu maliyeti karşılayabilirken, gelişmekte olan ülkelerdeki aileler bunu karşılayamayacaktır. Bu durum, refah düzeyi yüksek ülkelerde doğan çocukların, diğer ülkelerdeki çocuklara karşı avantaj sağlarken, dünya güç dengesizliğini de artırabilecektir⁸⁴. Gerçekte, genler üzerinde değişiklik ile daha zeki, daha kaslı ya da renkli gözlü insanlar oluşturmak şu anki teknoloji ile gerçekleştirilmesi çok mümkün olmayan düşüncelerdir. Çünkü zeka ve güç gibi multifaktöryel kalıtılan özellikler tek bir gen ile değil yüzlerce genin karmaşık etkileşimi ile meydana gelmektedir. Genomik alandaki bilgi ve tecrübe, bu tür karmaşık yapıda yönlendirmeler yapmaktan şu an için oldukça uzaktadır. Yine de etik bilimciler, CRISPR teknolojisi ile insan genom dizaynına izin verilmesi için hala süre gerekli olduğunu ve toplumun, CRISPR ile getirilen yeniliklere yavaş yavaş uyum sağlaması gerektiğini düşünmektedirler⁵⁹.

Lösemide CRISPR/Cas9 Uygulamaları

Lösemi, kan ve/veya kemik iliği'nde artmış lökosit sayısı ile karakterize malign hastalıkların genel ismidir⁸⁸. Lösemiler, hastalığın biyolojik davranışına göre akut ve kronik, hücrelerin morfolojik, immünofenotipik ve sitogenetik özelliklerine göre lenfoid veya miyeloid lösemiler olarak sınıflandırılır⁸⁹. Bunlar da kendi aralarında; akut lenfoid (ALL), akut miyeloid (AML), kronik lenfoid (KLL), kronik miyeloid lösemiler (KML) olarak gruplara ayrılır. Lösemi çeşitlerinin her biri çeşitli kromozomal yeniden düzenlemeler ve mutasyonlar sonucunda gelişmektedir. Kromozomal yeniden düzenlemeleri; resiprokal translokasyonlar, inversiyonlar, insensiyonlar oluşturmaktadır⁹⁰. Bu düzenlemelerin tümörigenezde erken, hatta başlatıcı mekanizmalar olduğuna dair önemli kanıtlar bulunmaktadır^{90,91}. Genetik yeniden düzenlenmelerin en sık görülen tiplerinden olan resiprokal translokasyonlar, tüm hematolojik malignitelerin %50'sinden fazlasında⁹² bulunmakla birlikte; çok sayıda gen mutasyonu, gen ekspresyonu düşüklüğü ya da aşırı gen amplifikasyonu da lösemilerin etiyojisindedir.

Günümüzde lösemi patogenezi etki eden mekanizmaların anlaşılması ve kişiye özgül tedavi stratejilerinin geliştirilebilmesi için, genom tasarımı teknolojisi çağı oldukça önem kazanmaktadır. Bu bağlamda yapılan çalışmalar ve CRISPR/Cas9 teknolojisinin, çeşitli lösemi tiplerinde kullanımıyla rapor edilen tedavi kazanımları aşağıda özetlenmektedir.

Genom dizaynı çalışmaları kapsamında hastalıkların seyrinin ve patogenezinin daha iyi anlaşılabilmesi için, etiyojisinde yer alan translokasyonları ve mutasyonları barındıran hastalık modellerinin oluşturulması gerekmektedir⁹². Torres ve ark., çalışmalarında, CRISPR/Cas9 teknolojisiyle non-homolog kromozomlarda çift zincir kırıkları oluşturarak, HEK293A embriyonik böbrek hücre hattı ile insan mezenkimal ve hematopoietik kök hücrelerinde t (11; 22) Ewing Sarkomu ve CD34+ insan hematopoietik kök hücrelerinde t (8; 21) AML'yi indüklemeyi başarmışlardır⁹². Mutasyonlara sahip hastalık modellerini geliştirmek için ilk çalışmalar ise Heckl ve Brabetz'in ekipleri tarafından yapılmıştır. Heckl ve ark.⁹³ CRISPR/Cas9 teknolojisi kullandığı çalışmalarının sonucunda; kemik iliği histolojisi verileri AML ile tutarlı olan, *Dnmt3a*, *Ezh2*, *Smc3* ve *Nf1* genleri mutasyonlu olan AML fare modelleri geliştirmişlerdir (Tablo 1). Brabetz ve ark., ise AML olgularında sık görülen IDH2 (İzositrat dehidrogenazlar) genindeki R140Q mutasyonunu CRISPR/Cas9 teknolojisi kullanılarak K562 hücrelerinde oluşturmuşlardır⁹⁴.

Hastalık modellerinin oluşturulmasının yanı sıra CRISPR/Cas9 teknolojisi gen susturulması, genin yeniden işlevsel hale getirilmesi, gen ekleme, genin ve miRNA'ların hücredeki görevini belirleme gibi çeşitli biyolojik prosesler için de kullanılmaktadır. Gen mutasyonu tamiri yapılan bir çalışmada, fonksiyonel yabanıl tip *ASXL1* proteinini eksprese edemeyen KML hücre hattı KBM5 kullanılmıştır. Mutasyon tamiri için, CRISPR/Cas9 aracılı homolog rekombinasyon kullanılarak, KBM5 hücrelerinde *ASXL1* proteini yeniden sentezlenmeye başlamıştır. Böylece CRISPR/Cas9 teknolojisi ile işlevliğini kaybetmiş olan herhangi bir genin tekrardan fonksiyonel olabileceği gösterilmiştir⁹⁵ (Tablo I). Tuñón ve ark., Boff-p210 hücre hattında KML'de hiperaktif olan *p210* onkoproteininde CRISPR/Cas9 sistemi ile delesyon oluşturmuşlardır. Bu sayede onkoprotein ekspresyonu inhibe edilmiş ve lösemik hücre apoptozu indüklenmiştir⁹⁶. B-ALL hücre hattı olan NALM6 ile yapılan bir başka çalışmada, yüksek düzeyde eksprese edilen CXCR4 kemokin reseptörünün, CRISPR/Cas9 teknolojisi ile susturulmasıyla; lösemik proliferasyon azalmış, kemosensitizasyon gelişmiş ve fare ksenografalarında yaşam süresi artmıştır⁹⁷. KML hücreleri ile yapılan epigenetik faktörlerin dahil olduğu farklı bir çalışma, lösemi kök hücrelerinin koloni oluşturmada ve hayatta kalmasında gerekli olan Polycomb Baskılayıcı Kompleks 2 (PRC2) geninin katalitik altbirimi olan EZH2'yi ekspresyon

Tablo 1. CRISPR-Cas9 sistemiyle hematolojik maliniterde gerçekleştirilmiş bazı uygulamalar¹¹²

Hedef genler	Hücre tipi	Gen düzenleme	Sonuçlar/yorumlar	Referanslar
Runx1, etc.	Fare HSPCs	NHEJ ile knock-out	CRISPR-Cas9 ile AML fare modeli geliştirilmesi	93
KMT2C (MLL3)	Fare HSPCs	NHEJ ile knock-out	AML'de tümör supresör bir gen olarak görev yapan KMT2C (MLL3) geninin keşfi	100
EPAS1 (HIF-2 α)	İnsan AML Hücre hattı	NHEJ ile knock-out	EPAS1'in tek başına kaybının, hipoksik koşullar altında insan AML hücreleri üzerinde etkisi gözlemlenmemiştir	104
Ly6 c2, etc.	Murin AML Hücre hattı	NHEJ ile knock-out	AML'de sitarabin direnci ile ilişkili genlerin belirlenmesi	105
Cebpa (enhancer)	Murin miyeloid Hücre hattı	HDR ile knock-in	Enhansırda oluşmuş mutasyon C/EBPa geninin ekspresyonunu azaltmaktadır. Böylece, miyeloid Cebpa gen regülasyonu için enhansırların önemi tespit edilmiştir.	106
ASXL1	İnsan KML Hücre hattı	HDR ile düzeltme	ASXL1 proteini yeniden sentezlenmeye başlanması, fare ksenograftlarının sağkalımını artırmıştır	95
TAL1	İnsan T-ALL Hücre hattı	HDR ile knock-in	TAL1 geninde epigenetik düzenlemeler	107
TRIB1	İnsan T-ALL Hücre hattı	NHEJ-ile knock-out	TRIB1'in kaybı interleukin-2 ekspresyonunu azaltmıştır	108
CNB1, CNB2	İnsan T-ALL, AML, KML Hücre hattı	NHEJ ile knock-out	THC'nin pro-apoptotik etkinliğinin değerlendirilmesi	109
sgRNAs pool	İnsan miyeloid lösemi Hücre hattı	NHEJ ile knock-out	İnsan hücrelerinde tam genom analizi için sgRNA aracılı kütüphaneler oluşturulması	110
sgRNAs pool	Murin AML Hücre hattı	NHEJ ile knock-out	Protein bölgelerinin CRISPR-Cas9 taraması ile murin AML hücrelerinde bilinen 6 ilaç hedefi ve 19 yeni bağlama alanı belirlenmesi	111

miktarı fazlalığı üzerinedir. Bu çalışmada KML hastalık modeli oluşturulmuş farelerde, CRISPR/Cas9 yöntemi ile EZH2'nin ekspresyonel inaktivasyonu gerçekleştirildiğinde, BCR/ABL1 mutasyonel statüsünden bağımsız olarak lösemi kök hücreleri kaynaklı hastalığın başlaması ve devam etmesi engellenmiş, KML hücre sayısı azalmış ve farelerin sağkalım süresi uzamıştır⁹⁸. CRISPR/Cas9 aracılı epigenetik regülasyon araştırmaları kapsamında Tzelepis ve ark., nın AML için tedavi hedef genlerini belirlemek için yaptıkları çalışmalarında, transkripsiyon aktivatörü bir HAT (*Histon Asetil Transferaz*) olan *KAT2A*'nın, sgRNA ile hedeflenerek inhibe edilmesi ile myeloid farklılaşması ve lösemik hücre apoptoz indükleyerek anti-AML aktivitesi gösterilmiş, farelerde hayatta kalım süresi artmıştır⁹⁹.

2014 yılında Chen ve ark., CRISPR/Cas9 teknolojisi ile 7. Kromozomun q koluna lokalize, tümör baskılayıcı gen olan *MLL3* (*Mixed Lineage Leukemia 3 Gene*) genini keşfettiler. Bir histon metil transferaz olan ve *KMT2C* (*Lizin Metiltransferaz 2C*) olarak isimlendirilen *MLL3*'ün ekspresyonundaki azalma, belirli AML formlarının daha agresif hale gelmesine neden olmaktadır¹⁰⁰ (Tablo I). Farklı bir çalışmada, akut monositik lösemi hücre hatları olan MOLM-13

ve MV4-11 hücrelerinde *ENL* geninin CRISPR-Cas9 ile inhibe edilmesi hedeflenmiştir. Bunun sonucunda, bir miyeloid farklılaşma belirteci olan Integrin alfa M'nin (ITGAM veya CD11b) yüzey ekspresyonu artmış ve makrofaj benzeri yapılar oluşmuş, *in vitro-in vivo*'da lösemik hücre proliferasyonu azalmıştır. Çalışma ekibi *ENL* genini, AML'de onkojenik transkripsiyonel prosesleri düzenleyen bir histon asetilasyon okuyucusu olarak tanımlamışlardır¹⁰¹.

miRNA'larla yapılan çalışmalar, genom tasarım teknolojisinde gelinen en heyecan verici yaklaşımlardandır. KML hücre hattı K-562'de miR182-5p'nin, tirozin kinaz inhibitörlerine (TKI) karşı gelişen direnç üzerine etkisi araştırmak amacı ile CRISPR/Cas9 teknolojisi ile miR182 lokusu homozigot olarak inhibe edilerek; miR182-5p ekspresyonu azaltılmıştır. Böylelikle, myeloid hücre proliferasyonu engellenerek, hücre farklılaşması sağlanmış, eritrosit çoğalması indüklenmiş ve kemoterapi direnci kırılarak, TKI sensitizasyonu sağlanmıştır¹⁰². Akut monositik lösemi hücre hattı MV4-11 ile yapılan farklı bir çalışmada, lösemi hücre büyümesi üzerinde etkili miRNA'ları belirlemek için CRISPR/Cas9 kütüphanesi (lentiCRISPRv2 kütüphanesi) oluşturulmuştur. Ekip miR-155'in, hücre

büyümesini çoğaltan bir miRNA olduğunu bildirmiştir¹⁰³. Bunların dışında, CRISPR-Cas9 sistemi ile hematolojik maliniterde gerçekleştirilmiş uygulamalar, Tablo I'de özetlenmektedir.

Sonuç olarak, CRISPR/Cas9 teknolojisi hematolojik hastalıkların moleküler patogenezinin anlaşılmasında ve henüz bilinmeyenlerin ayırınlatılmasında potent ve heyecan verici bir faktör olarak hayatımıza girmiştir. Daha ileri hedef olarak ise hem hastalık modellerinin oluşturulabilmesi hem de genetik ve epigenetik düzenlemelerle, henüz üstesinden net olarak gelinemeyen ve kemoterapi etkinliğinin en büyük kısıtlayıcısı olan ilaç dirençliliğinin aydınlatılmasında kullanılacak bir metodoloji haline gelecektir. Bununla birlikte, bir gen düzenleme teknolojisi olarak CRISPR/Cas9, bilim dünyasında çığır açan bir gelişme olmasına rağmen, insan embriolarında kullanımının etik boyutu ve sonuçları aktif olarak tartışılmalı ve değerlendirilmelidir.

Kaynaklar

- Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, et al. CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science*(80-)2007;315(5819):1709–12.
- Sorek R, Kunin V, Hugenholtz P. CRISPR — a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nat Rev Microbiol* 2008;6(3):181–6.
- Breitbart M, Rohwer F. Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? *Trends Microbiol* 2005;13(6):278–84.
- Karginov F V., Hannon GJ. The CRISPR System: Small RNA-Guided Defense in Bacteria and Archaea. *Mol Cell*;2010;37(1):7–19.
- Hyman P, Abedon ST. Bacteriophage host range and bacterial resistance. *Advances in applied microbiology*. Elsevier Inc.;2010;70:217–48.
- Barrangou R, Marraffini LA. CRISPR-Cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Molecular Cell* 2014;54(2):234–44.
- Singh V, Braddick D, Dhar PK. Exploring the potential of genome editing CRISPR-Cas9 technology. *Gene* 2017;599:1–18.
- Terns MP, Terns RM. CRISPR-based adaptive immune systems. *Curr Opin Microbiol* 2011;14(3):321–7.
- Rath D, Amlinger L, Rath A, Lundgren M. The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. *Biochimie* 2015;117:119–28.
- 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.
- Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, Soria E, Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol Microbiol* 2000;36(1):244–6.
- Jansen R, Embden JD, Gaastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol* 2002;43(6):1565–75.
- Al-Attar S, Westra ER, Van Der Oost J, Brouns SJJ. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs): The hallmark of an ingenious antiviral defense mechanism in prokaryotes. *Biol Chem* 2011;392(4):277–89.
- Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology* 2005;151(8):2551–61.
- Mojica FJM, 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.
- 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(3):653–63.
- Bozok Çetintaş V, Kotmakçı M, Tezcanlı Kaymaz B. From the Immune Response to the Genome Design; CRISPR-Cas9 System: Review. *Türkiye Klin J Med Sci* 2017;37(1):27–42.
- Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea. *Science* 2010;327(5962):167–70.
- Hale CR, Zhao P, Olson S, Duff MO, Graveley BR, Wells L, et al. RNA-Guided RNA Cleavage by a Cris RNA-Cas Protein Complex. *Cell* 2009;139(5):945–56.
- Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuys RJH, Snijders AP, et al. Small CRISPR RNAs Guide Antiviral Defense in Prokaryotes. *Science* 2008;321(5891):960–4.
- Garneau JE, Dupuis M-È, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature* 2010;468(7320):67–71.
- Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K. CRISPR RNA maturation by trans -encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* 2011;471(7340):602–7.
- Sapranaukas R, Gasiunas G, Fremaux C, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 2011;39(21):9275–82.
- Zhang J, Rouillon C, Kerou M, Reeks J, Brugger K, Reimann J, et al. Structure and mechanism of the CMR complex for CRISPR-mediated antiviral immunity. *Mol Cell* 2012;45(3):303–13.
- 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.
- Ju X Da, Xu J, Sun ZS. CRISPR Editing in Biological and Biomedical Investigation. *J Cell Biochem* 2018;119(1):52–61.

27. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Hsu PD, et al. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science* 2013;339(6121):819–23.
28. Mali PL, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, Dicarlo JE, et al. RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. *Science* 2013;339(6121):823–6.
29. Osborn MJ, Belanto JJ, Tolar J, Voytas DF. Gene editing and its application for hematological diseases. *Int J Hematol* 2016;104(1):18–28.
30. Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinformatics* 2007;8(1):172.
31. Kunin V, Sorek R, Hugenholtz P. Evolutionary conservation of sequence and secondary structures in CRISPR repeats. *Genome Biol* 2007;8(4): R61.
32. Barrangou R. CRISPR-Cas systems and RNA-guided interference. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2013;4(3):267–78.
33. Lillestøl R, Redder P, Garrett RA, Brügger K. A putative viral defence mechanism in archaeal cells. *Archaea* 2006;2(1):59–72.
34. Hale CR, Majumdar S, Elmore J, Pfister N, Compton M, Olson S, et al. Essential Features and Rational Design of CRISPR RNAs that Function with the Cas RAMP Module Complex to Cleave RNAs. *Mol Cell* 2012;45(3):292–302.
35. Pul Ü, Wurm R, Arslan Z, Geissen R, Hofmann N, Wagner R. Identification and characterization of *E. coli* CRISPR-Cas promoters and their silencing by H-NS. *Mol Microbiol* 2010;75(6):1495–512.
36. Spilman M, Cocozaki A, Hale C, Shao Y, Ramia N, Terns R, et al. Structure of an RNA Silencing Complex of the CRISPR-Cas Immune System. *Mol Cell* 2013;52(1):146–52.
37. Haft DH, Selengut J, Mongodin EF, Nelson KE. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput Biol* 2005;1(6):474–83.
38. Makarova KS, Grishin N V, Shabalina SA, Wolf YI, Koonin E V. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol Direct* 2006;16(1):7.
39. Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Horvath P, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol* 2011;9(6):467–77.
40. Jiang F, Doudna JA. The structural biology of CRISPR-Cas systems. *Curr Opin Struct Biol* 2015;30:100–11.
41. Makarova KS, Wolf YI, Koonin E V. The basic building blocks and evolution of CRISPR-Cas systems. *Biochem Soc Trans* 2013;41(6):1392–400.
42. Hatoum-Aslan A, Maniv I, Marraffini LA. Mature clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats RNA (crRNA) length is measured by a ruler mechanism anchored at the precursor processing site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108(52):21218–22.
43. Staals RHJ, Agari Y, Maki-yonekura S, Zhu Y, David W Taylor, Duijn E Van, et al. Structure and activity of the RNA-targeting Type III-B CRISPR- Cas complex of *Thermus thermophilus*. *Molecular Cell* 2013;52(1):135–45.
44. Hatoum-Aslan A, Samai P, Maniv I, Jiang W, Marraffini LA. A ruler protein in a complex for antiviral defense determines the length of small interfering CRISPR RNAs. *J Biol Chem* 2013;288(39):27888–97.
45. Karvelis T, Gasiunas G, Miksys A, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. crRNA and tracrRNA guide Cas9-mediated DNA interference in *Streptococcus thermophilus*. *RNA Biol* 2013;10(5):841–51.
46. Carte J, Christopher RT, Smith JT, Olson S, Barrangou R, Moineau S, et al. The three major types of CRISPR-Cas systems function independently in CRISPR RNA biogenesis in *Streptococcus thermophilus*. *PLoS One* 2014;9(1):98–112.
47. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell* 2014;157(6):1262–78.
48. Hille F, Charpentier E. CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2016;371(1707).
49. Oost J, Jore MM, Westra ER, Lundgren M, Brouns SJ. CRISPR-based adaptive and heritable immunity in prokaryotes. *Trends Biochem Sci* 2009;34(8):401–7.
50. Fineran PC, Charpentier E. Memory of viral infections by CRISPR-Cas adaptive immune systems: Acquisition of new information. *Virology* 2012;434(2):202–9.
51. Yosef I, Goren MG, Qimron U. Proteins and DNA elements essential for the CRISPR adaptation process in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 2012;40(12):5569–76.
52. Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature* 2012;482(7385):331–8.
53. Barrangou R, Horvath P. CRISPR. *New Horizons in Phage Resistance and Strain Identification. Annu Rev Food Sci Technol* 2012;3(1):143–62.
54. Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 2014;346(6213):1258096.
55. Westra ER, Swarts DC, Staals RHJ, Jore MM, Brouns SJJ, van der Oost J. The CRISPRs, They Are A-Changin': How Prokaryotes Generate Adaptive Immunity. *Annu Rev Genet* 2012;46(1):311–39.
56. 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.
57. Koo T, Lee J, Kim JS. Measuring and Reducing Off-Target Activities of Programmable Nucleases Including CRISPR-Cas9. *Mol Cells* 2015;38(6):475–81.
58. Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, Dohmae N, et al. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell* 2014;156(5):935–49.
59. Shen S, Loh TJ, Shen H, Zheng X, Shen H. CRISPR as a strong gene editing tool. *BMB Rep* 2017;50(1):20–4.

60. Tsai SQ, Joung JK. Defining and improving the genome-wide specificities of CRISPR-Cas9 nucleases. *Nat Rev Genet* 2016;17(5):300–12.
61. Riballo E, Woodbine L, Stiff T, Walker SA, Goodarzi AA, Jeggo PA. XLF-Cernunnos promotes DNA ligase IV-XRCC4 re-adenylation following ligation. *Nucleic Acids Res* 2009;37(2):482–92.
62. Chu VT, Weber T, Wefers B, Wurst W, Sander S, Rajewsky K, et al. Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nat Biotechnol* 2015;33(5):543–8.
63. 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.
64. Gori JL, Hsu PD, Maeder ML, Shen S, Welstead GG, Bumcrot D. Delivery and Specificity of CRISPR/Cas9 Genome Editing Technologies for Human Gene Therapy. *Hum Gene Ther* 2015;26(7):443–51.
65. Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol* 2013;31(9):822–6.
66. Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell* 2013;154(6):1380–9.
67. Fu Y, Sander JD, Reyon D, Cascio VM, Joung JK. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat Biotechnol* 2014;32(3):279–84.
68. 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.
69. Kim S, Kim D, Cho SW, Kim J, Kim J-S. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Res* 2014;24(6):1012–19.
70. Ramakrishna S, Kwaku Dad AB, Beloor J, Gopalappa R, Lee SK, Kim H. Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA. *Genome Res* 2014;24(6):1020–7.
71. Pliatsika V, Rigoutsos I. “Off-Spotter”: very fast and exhaustive enumeration of genomic lookalikes for designing CRISPR/Cas guide RNAs. *Biol Direct* 2015;10(1):4.
72. Bae S, Park J, Kim JS. Cas-OFFinder: A fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinformatics* 2014;30(10):1473–5.
73. Montague TG, Cruz JM, Gagnon JA, Church GM, Valen E. CHOPCHOP. A CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing. *Nucleic Acids Res* 2014;42(W1):401–7.
74. Cradick TJ, Qiu P, Lee CM, Fine EJ, Bao G. COSMID. A Web-based Tool for Identifying and Validating CRISPR/Cas Off-target Sites. *Mol Ther - Nucleic Acids* 2014;3: e214.
75. Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell* 2013;152(5):1173–83.
76. Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, Liu Z, Brar GA, Torres SE, et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell* 2013;154(2):442–51.
77. Khatodia S, Bhatotia K, Passricha N, Khurana SMP, Tuteja N. The CRISPR/Cas Genome-Editing Tool: Application in Improvement of Crops. *Front Plant Sci* 2016;7:1–13.
78. Bikard D, Jiang W, Samai P, Hochschild A, Zhang F, Marraffini LA. Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system. *Nucleic Acids Res* 2013;41(15):7429–37.
79. Vojta A, Dobrinic P, Tadic V, Bockor L, Korac P, Julg B, et al. Repurposing the CRISPR-Cas9 system for targeted DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 2016;44(12):5615–28.
80. Guilinger JP, Thompson DB, Liu DR. Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification. *Nat Biotechnol* 2014;32(6):577–582.
81. Wyvekens N, Topkar V V., Khayter C, Joung JK, Tsai SQ. Dimeric CRISPR RNA-Guided FokI-dCas9 Nucleases Directed by Truncated gRNAs for Highly Specific Genome Editing. *Hum Gene Ther* 2015;26(7):425–31.
82. Rodriguez E. Ethical Issues in Genome Editing using CRISPR/Cas9 System. *J Clin Res Bioeth* 2016;7(2):7–10.
83. 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.
84. Otrieno MO. CRISPR-Cas9 Human Genome Editing: Challenges, Ethical Concerns and Implications. *J Clin Res Bioeth* 2015;06(06):5–7.
85. Tang LE. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human zygotes using Cas9 protein. *Molecular Genetics and Genomics* 2017;292, 525–533.
86. Ma, H. Gutierrez NM, Park ZW. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature* 2017;548, 413–419.
87. T. C. Resmi Gazete <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2010/08/20100813-4.htm>; 2018 [accessed 04 11 18]
88. Juliusson G, Hough R. Leukemia. *Prog Tumor Res* 2016;43:87–100.
89. Wagner G, Fenchel K, Back W, Schulz A, Sachse MM. Leukemia cutis - epidemiology, clinical presentation, and differential diagnoses. *J Dtsch Dermatol Ges* 2012;10(1):27–36.
90. Fröhling S, Döhner H. Chromosomal Abnormalities in Cancer. *N Engl J Med* 2008;359(7):722–34.
91. Mitelman F, Johansson B, Mertens F. The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nat Rev Cancer* 2007;7(4):233–45.
92. Torres R, Martin MC, Garcia A, Cigudosa JC, Ramirez JC, Rodriguez-Perales S. Engineering human tumour-associated chromosomal translocations with the RNA-guided CRISPR-Cas9 system. *Nat Commun* 2014;5:3964.
93. Heckl D, Kowalczyk S M, Yudovich D, Belizaire RP, Rishi VP, McConkey EM, et al. Generation of mouse models of myeloid malignancy with combinatorial genetic lesions using CRISPR-Cas9 genome editing 2014;32(9):941–6.

94. Brabetz O, Alla V, Angenendt L, Schliemann C, Berdel WE, Arteaga MF, et al. RNA-Guided CRISPR-Cas9 System-Mediated Engineering of Acute Myeloid Leukemia Mutations. *Mol Ther - Nucleic Acids* 2017;6:243–8.
95. Valletta S, Dolatshad H, Bartenstein M, Yip BH, Bello E, Gordon S, et al. ASXL1 mutation correction by CRISPR/Cas9 restores gene function in leukemia cells and increases survival in mouse xenografts. *Oncotarget* 2015;6(42):44061–71.
96. García-Tuñón I, Hernández-Sánchez M, Ordoñez JL, Alonso-Pérez V, Álamo-Quijada M, Benito R, et al. The CRISPR/Cas9 system efficiently reverts the tumorigenic ability of BCR/ABL in vitro and in a xenograft model of chronic myeloid leukemia. *Oncotarget* 2017;8(16):26027–40.
97. Randhawa S, Cho BS, Ghosh D, Sivina M, Koehrer S, Müschen M, et al. Effects of pharmacological and genetic disruption of CXCR4 chemokine receptor function in B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2016;174(3):425–36.
98. Xie H, Peng C, Huang J, Li BE, Kim W, Smith EC, et al. Chronic myelogenous leukemia-initiating cells require polycomb group protein EZH2. *Cancer Discov* 2016;6(11):1237–47.
99. Tzelepis K, Koike-Yusa H, De Braekeleer E, Li Y, Metzakopian E, Dovey OM, et al. A CRISPR Dropout Screen Identifies Genetic Vulnerabilities and Therapeutic Targets in Acute Myeloid Leukemia. *Cell Rep* 2016;17(4):1193–205.
100. Chen C, Liu Y, Rappaport AR, Kitzing T, Schultz N, Shroff AS, et al. MLL3 Is a Haploinsufficient 7q Tumor Suppressor in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell* 2014;25(5):652–65.
101. Wan L, Wen H, Li Y, Lyu J, Xi Y, Hoshii T, et al. ENL links histone acetylation to oncogenic gene expression in acute myeloid leukaemia. *Nature* 2017;543:265–9.
102. Arya D, Sachithanandan SP, Ross C, Palakodeti D, Li S, Krishna S. MiRNA182 regulates percentage of myeloid and erythroid cells in chronic myeloid leukemia. *Cell Death Dis* 2017;8(1): e2547.
103. Wallace J, Hu R, Mosbrugger TL, Dahlem TJ, Stephens WZ, Rao DS, et al. Genome wide CRISPR-Cas9 screen identifies microRNAs that regulate myeloid leukemia cell growth. *PLoS One* 2016;11(4):1–11.
104. Vukovic M, Guitart A V., Sepulveda C, Villacreces A, O'Duibhir E, Panagopoulou TI, et al. Hif-1 α and Hif-2 α synergize to suppress AML development but are dispensable for disease maintenance. *J Exp Med* 2015;212(13):2223–34.
105. Rathe SK, Moriarity BS, Stoltenberg CB, Kurata M, Aumann NK, Rahrman EP, et al. Using RNA-seq and targeted nucleases to identify mechanisms of drug resistance in acute myeloid leukemia. *Sci Rep* 2014;4:1–9.
106. Cooper S, Guo H, Friedman AD. The +37 kb Cebpa enhancer is critical for Cebpa myeloid gene expression and contains functional sites that bind SCL, GATA2, C/EBP α , PU 1, and additional Ets factors. *PLoS One* 2015;10(5):1–18.
107. Navarro JM, Touzart A, Pradel LC, Loosveld M, Koubi M, Fenouil R, et al. Site- and allele-specific polycomb dysregulation in T-cell leukaemia. *Nat Commun* 2015;6.
108. Miyajima C, Itoh Y, Inoue Y, Hayashi H. Positive Regulation of Interleukin-2 Expression by a Pseudokinase, Tribbles 1, in Activated T Cells. *Biol Pharm Bull* 2015;38(8):1126–33.
109. Kampa-Schittenhelm KM, Salitzky O, Akmut F, Illing B, Kanz L, Salih HR, et al. Dronabinol has preferential antileukemic activity in acute lymphoblastic and myeloid leukemia with lymphoid differentiation patterns. *BMC Cancer* 2016;16(1):1–12.
110. Wang T, Wei J, Sabatini D, Lander E. Genetic screens in human cells using the CRISPR/Cas9 system. *Science* 2014;343(6166):80–4.
111. Shi J, Wang E, Milazzo JP, Wang Z, Kinney JB, Vakoc CR. Discovery of cancer drug targets by CRISPR-Cas9 screening of protein domains 2015;33(6):661–7.
112. Zhang H, McCarty Nami. CRISPR-Cas9 technology and its application in haematological disorders. *Br J Haematol* 2016 Oct; 175(2):208–25.