



Selcuk Journal of Agriculture and Food Sciences

Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi

Çiftlik Hayvanlarında CRISPR/Cas9 Uygulamaları

Özge Şebnem ÇILDIR^{1,*}, Özge ÖZMEN¹

¹Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

MAKALE BİLGİSİ

Makale Geçmişi:

Geliş tarihi: 29.03.2017

Kabul tarihi:06.06.2017

Anahtar Kelimeler:

CRISPR/Cas9

Genom düzenleme

Çiftlik hayvanları

ÖZET

Kümelenmiş düzenli aralıklı kısa palindromik tekrarlar ve bunlar ile ilişkili endonükleaz (CRISPR/Cas) sisteminin 2012 yılında in vitro yeniden yapılandırılmasının ardından genom düzenleme aracı olarak kullanılabilirliği düşünülmüştür. Çiftlik hayvanlarında genom düzenleme et, süt, yumurta, yapağı, tiftik, deri gibi verim özelliklerinin geliştirilmesi ve kalitesinin artırılmasında uzun bir süreç isteyen klasik ıslah yöntemlerine bir alternatif olarak düşünülebilir. Kısa vadede verim ve kalite yönünden ilerleme sağlama potansiyeli olan bu tekniğin çiftlik hayvanlarında uygulandığı çalışmaların derlendiği bu yayın, tekniğin tanınması ve hayvancılıkta kullanımına ilişkin bir altyapı oluşturması amacıyla gerekli görülmüştür.

CRISPR/Cas9 Applications in Livestock

ARTICLE INFO

Article history:

Received date: 29.03.2017

Accepted date: 06.06.2017

Keywords:

CRISPR/Cas9

Genome editing

Livestock

ABSTRACT

After its in vivo reconstruction, the clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) and the CRISPR associated endonucleases (Cas) system thought for as a genome editing tool. Genome editing in livestock can be thought as an alternate and faster way to classical breeding methods to development of quality and efficiency traits as meat, milk, egg, wool, mohair and leather yields. This review, includes the researches about the usage of the technique in the livestock, have seen important to introduce the technique and as a basis to its usage for animal breeding.

1. Giriş

Genom düzenleme, canlı bir organizmanın sahip olduğu genoma çeşitli manipülasyonlar ile istenilen bir nükleotid dizisi eklenmesi, çıkartılması ve yer değişikliği yapılmasını kapsamaktadır.

Genom düzenleme araçları etkili ve doğru genom manipülasyonunu mümkün kılmaktadır. Çiftlik hayvanlarında genom düzenleme hastalıklara karşı direncin, üretim veya yetiştiriciliğin geliştirilmesinde; yeni biyomedikal modellerin oluşturulmasında zenginleştirilmiş bir yöntem olarak kullanılabilir (Proudfoot ve ark., 2015). Et, süt, yumurta, yapağı, kürk, deri, post gibi verim özelliklerinin geliştirilmesi ve kalitesinin artırılmasında; direnç, çevreye uyum kabiliyeti, döl verimi gibi özelliklerin geliştirilmesinde; yemden yararlanma oranının artırılmasında; çeşitli hastalıklarda predispozisyona

neden olan faktörlerin elimine edilmesinde, kalıtsal hastalıkların tedavisinde veya yavruya aktarımının önlenmesinde kullanılacak bu teknikler, uzun bir süreç isteyen klasik ıslah yöntemlerine bir alternatif olarak düşünülebilir.

Kümelenmiş düzenli aralıklı kısa palindromik tekrarlar (CRISPR) ve bunlar ile ilişkili endonükleazlar (Cas) olarak bilinen CRISPR/Cas sistemi, bazı bakteri ve arke (prokaryot) genomlarında doğal olarak bulunmaktadır. Ayrıca virus ve plazmidlere karşı geliştirilmiş bir immun yanıt sistemi görevi görmektedir (Yamamoto, 2015).

İlk olarak Ishino ve ark. (1987) tarafından *Escherichia coli* genomunda tespit edilmiş olan CRISPR bölgelerinin sıralı tekrarlar (tandem repeats) ve ara bölümlerden (spacer) oluştuğu; bu ara bölümlerin yabancı DNA'lara (virus veya plazmid DNA'sı) özgü farklı diziler içerdiği keşfedilmiş

* Sorumlu yazar email: oscildir@ankara.edu.tr

(Mojica ve ark., 2005; Pourcel ve ark., 2005) (Şekil 1-A), bakteriyel adaptif immün yanıt sistem mekanizması olarak görev yaptığı anlaşılmıştır (Wiedenheft ve ark., 2012; Westra ve ark., 2014).

Jinek ve ark. (2012) tarafından *in vitro* yeniden yapılandırılmasının ardından model organizmalar, bitkiler ve hayvanlar üstünde yapılan denemeler sonrasında CRISPR/Cas9 tekniği genom düzenleme amaçlı çalışmalarda kullanılmaya başlanmıştır (Kim, 2016). Genom düzenleme amaçlı kullanılan bu sistem RNA rehberli bir endonükleaz sistemidir (Yamamoto, 2015).

Bu derleme sığır, koyun, keçi ve tavuklarda CRISPR/Cas9 tekniği ile yapılmış çalışmaları kapsamaktadır. Her geçen gün geliştirilmekte olan bu yöntemin giderek yaygınlaşması nedeniyle, çiftlik hayvanlarında kullanımına ilişkin bir temel oluşturması amacıyla bu derleme gerekli görülmüştür.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. CRISPR/Cas9 Sistemi

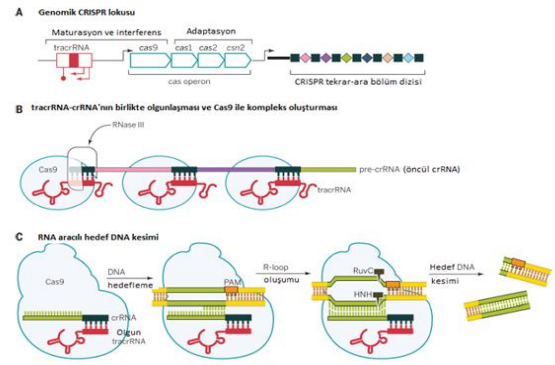
Prokaryotlarda CRISPR/Cas sisteminde hücre içine ilk kez giren yabancı DNA parçalanmakta ve bunun sonucunda meydana gelen DNA parçaları ara bölümler olarak bakteri/arke genomundaki tekrar dizilerinin aralarına dahil edilmektedir (Barrangou ve Oost, 2013). Bu sayede oluşan CRISPR dizileri, aynı dizileri genomunda barındıran bir başka virus veya plazmidin hücre içine girmesi halinde adaptif immün yanıt mekanizması olarak Cas9 enzimi (tip II sistemde) aracılığıyla yabancı DNA'yı parçalayarak etkisiz hale getirir (Barrangou ve Oost, 2013). Sistem kısaca CRISPR dizisinden yabancı pre-crRNA (öncül CRISPR RNA) sentezlenmesi, pre-crRNA'nın ilgili yabancı DNA'ya komplementer olan crRNA'ya işlenmesi (Şekil 1-B), crRNA'ya komplementer bir tracrRNA (trans CRISPR RNA) sentezlenmesi, crRNA ve tracrRNA'nın kompleks oluşturması; crRNA'nın yabancı DNA'da komplementer olduğu bölgeye bağlanması ve Cas9 endonükleazın ilgili bölgede DNA'da çift zincir kırığı oluşturması ile özetlenebilir (Yamamoto, 2015) (Şekil 1-C).

Genom düzenlemede CRISPR/Cas sisteminin çift zincir kırığı yaratma özelliği ile DNA tamir mekanizmaları (homolog rekombinasyon -HR- ve homolog olmayan uçların birleşimi -NHEJ-) tetiklenmektedir (Gaj ve ark., 2013). CRISPR/Cas sistemini ökaryotlarda uygularken yalnızca crRNA-tracrRNA kompleksini taklit eden kimerik rehber RNA (gRNA) ve nükleaz aktivitesi olan bir Cas9 proteinine ihtiyaç duyulur (Yamamoto, 2015) (Şekil 2). Hedefleme özgüllüğü esas olarak yaklaşık 20 baz

uzunluğundaki gRNA dizisine bağlıdır ve bu dizideki bir kaç bazlık değişim spesifikiteyi etkileyebilmektedir. Cas9'un çalışabilmesi için enzimin tanıdığı protospasere komşu motif (PAM) olarak bilinen birkaç belirli baz gereklidir (Yamamoto, 2015). Cas9-sgRNA (Cas9-tekli rehber RNA) kompleksi genomdaki PAM dizilimini araştırır, daha sonra çift sarmallı DNA'yı çözer ve DNA-RNA baz eşleşmesi oluşur (Yamamoto, 2015). Çift zincir kırığı oluşması esnasında iki nükleaz alt birimi (HNH ve RuvC) devreye girerek birbirlerinden bağımsız olarak DNA iplikçiklerini keserler (Yamamoto, 2015).

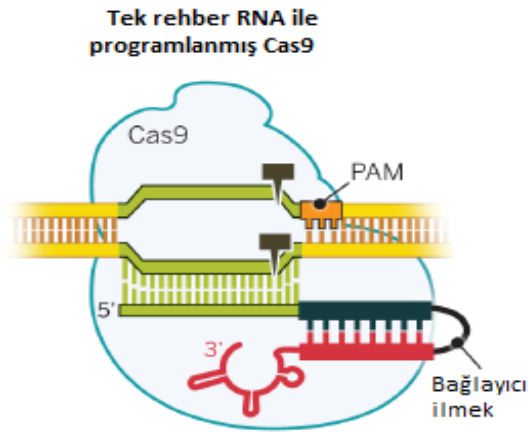
CRISPR/Cas9 tekniği çeşitli amaçlarla kullanılabilir. Knock-out veya knockdown ile gen susturma veya gen ifadesinin baskılanması, genom boyu fonksiyon kaybı kütüphanelerinin oluşturulması, knock-in ile transgenik çalışmalar, gen tedavisi, kromozomal delesyon ve insersiyonlar, transkripsiyon kontrolü, epigenetik damgaların modifikasyonu, belirteç hücre hatlarının oluşturulması, enChIP ile belirli bir DNA bölgesinin çekilmesi yapılabilecek çalışmalardan bazılarıdır (Yamamoto, 2015).

Tekniğin belirli bir genomik lokusu hedeflemede nasıl başarılı bir şekilde kullanılacağını tanımlanmasının ardından CRISPR/Cas9 ile yapılan çalışmalarda önemli bir artış görülmüştür (Petersen ve Niemann, 2015). Yüksek oranda spesifikite ve etkinliğe sahip olduğu düşünülen ve mali açıdan daha önce aynı amaçla kullanılmakta olan ZFN ve TALEN gibi benzer yöntemlere nazaran daha uygun olan bu yöntem 2013 yılından itibaren çiftlik hayvanlarında da uygulanmaya başlanmıştır (Petersen ve Niemann, 2015). Bu derleme sığır, koyun, keçi ve tavuklarda yapılmış çalışmaları kapsamaktadır. Yapılmış olan çalışmalar tür ayrımı yapılarak kronolojik olarak aktarılmaya çalışılmıştır.



Şekil 1

Tip II CRISPR/Cas sistemi biyolojisi *S. pyogenes*'in tip II-A sistemi örnek olarak gösterilmiştir. (A) tracrRNA ve CRISPR dizisi ile cas geni operonu. (B) Antiviral savunma yoluyla Cas9 ile ribonükleaz III tarafından birlikte işlenmiş, düzeltilmiş ve R-loop formasyonu almış tracrRNA-crRNA çiftlerinin birlikte çalışması ve DNA kesimini hedeflemesini içerir. (C) tracrRNA-crRNA çifti ile doğal DNA kesiminin ayrıntıları (Doudna ve Charpentier, 2014)



Şekil 2

Tek rehber RNA (sgRNA) ve Cas9 yapısı (Doudna ve Charpentier, 2014)

2.2. Sığırlarda Yapılmış Olan Çalışmalar

CRISPR/Cas9 tekniğinin sığırlarda ilk denemesi Choi ve ark. (2015) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada ilk önce eGFP (endojen yeşil floresan proteini) ifade eden primer fibroblast hücreleri klonlanmış, sonrasında bu geni hedefleyen CRISPR/Cas9 sistemi bu hücelere nakledilmiş; yapılan dizi analizi sonucunda hedef dizide çeşitli boyutlarda (6-203 baz çifti) indeller saptanmış; bu hücrelerden SCNT (somatik hücre çekirdek transferi) ile embriyolar elde edilmiş fakat embriyoların en fazla 40. güne kadar gelişebildiği tespit edilmiştir.

Heo ve ark. (2015) sığır somatik fibroblast hücrelerinden indüklenmiş pluripotent kök hücreler üretmiş ve bu hücreler ile embriyolarda pluripotensite ile ilişkili NANOG lokusunu hedefleyerek CRISPR/Cas9 sisteminin etkinliğini denemişlerdir. Bu çalışmada CRISPR/Cas9 sisteminin embriyo ve pluripotent hücelere aktarımı için farklı aktarım metodları kullanılmıştır.

Bevacqua ve ark. (2016) PRPN (prion protein) üstünde CRISPR/Cas9 tekniği ile knock-in veya knock-out yapma amacıyla beş farklı rehber RNA tasarlanmış, bu RNA'lar Cas9 ile birlikte somatik hücelere her bir gRNA için iki farklı konsantrasyonda aktarılmıştır. In vitro fertilizasyondaki zigotlarda yapılan çalışmada plazmid veya gRNA'lar farklı yoğunluklarda olacak şekilde, doğrudan sitoplazmaya enjekte edilmiştir. Somatik hücrelerde yüksek yoğunluktaki aktarım indeller ve büyük delesyonlarla sonuçlanmış; embriyo enjeksiyonlarında RNA enjeksiyonlarında plazmidlere göre daha yüksek oranda blastosist oluşumu görülmüş, dizi analizinde blastosistlerin %46'sında spesifik gen düzenlenmesi tespit edilmiştir. Yüksek konsantrasyondaki RNA grubunda üç blastosiste birden fazla modifikasyona (indeller ve büyük delesyonlar) rastlanmıştır.

Gao ve ark. (2017) sığırlarda tekli Cas9 nikaz (tek zincir kırığı yaratan Cas9 mutanı) ile NRAMP1 (doğal direnç ilişkili makrofaj protein-1) geninin sığır genomunda istedikleri bölgeye insersiyonunu sağlamışlardır. Öncelikle sığır fotal fibroblast hücrelerinde uygulamış oldukları Cas9'un bağlanma bölgelerini tespit eden araştırma grubu daha sonra tekli Cas9 nikaz uygulamasıyla tek zincir kırığı yaratarak NRAMP1 geninin genoma insersiyonunu sağlamıştır. Elde edilen veriler hedef dışı etkinin azaldığını fakat hala mevcut olduğunu göstermiştir. Hücre kültüründe yapılan çalışmaların ardından SCNT ile tüberküloza karşı direnci artırılmış transgenik yavrular elde edilmiştir. Doğan 20 buzağıdan üç aydan fazla yaşayan 11 adetinin NRAMP1 genini heterozigot olarak bulundurduğu ve kontrol grubuyla karşılaştırıldıklarında tüberküloza karşı daha dirençli oldukları görülmüştür.

2.3. Keçilerde Yapılmış Olan Çalışmalar

Keçilerde yapılan ilk çalışma Ni ve ark. (2014) tarafından CRISPR/Cas9 aracılı gen susturma yaklaşımının dört gen üstünde ayrı ayrı denemesini kapsamaktadır. MSTN (myostatin), NUP (nükleoporin 155), BLG (beta-laktoglobulin) ve PrP (prion protein) genlerini hedefleyen gRNA'lar tasarlanmış, primer fibroblastlarda gen susturma ardından SCNT ile yavru elde edilmiştir. Elde edilen yavruların monoallel (tek bir allelde) ve biallel (her iki allelde) mutasyonları taşıdıkları görülmüştür.

Wang ve ark. (2015)'nin yaptıkları çalışmada Cas9 mRNA'sı, MSTN ve FGF5 (fibroblast büyüme faktörü-5) genlerini hedef alan gRNA'ları tek hücre aşamasındaki embriyolara birlikte enjekte etmişlerdir. Bir ya da her iki gende modifikasyon yapılmış keçiler elde edilmiştir. Kültüre edilmiş primer fibroblastlarda MSTN ve FGF5'in hedefleme etkinliği % 60 iken, 98 test hayvanında MSTN ve FGF5'in verim sırasıyla % 15; % 21 ve her iki gendeki modifikasyonları için % 10 olarak tespit edilmiştir. Hedef genlerin fibroblastların yanı sıra, kurucu hayvanlar (germ hattında transgen taşıyan ve saf transgenik hat elde etmek amacıyla damızlık olarak kullanılacak hayvanlar) ve ölü hayvanların somatik dokuları ve testisindeki hedef ve hedef dışı mutasyonları dikkatle analiz edilmiştir. Çalışmanın sonuçları CRISPR/Cas9 sisteminin çiftlik hayvanlarında güçlü ve verimli bir gen mühendisliği aracı olma potansiyeline sahip olduğunu ve bu nedenle yetiştirme için oldukça önemli ve uygulanabilir olacağını göstermiştir.

Guo ve ark. (2016)'ın çalışmalarında tavşan ve keçilerde MSTN geninde CRISPR/Cas9 tekniği ile gen susturma yaklaşımı denemiş, teknik başarılı olmuş

fakat MSTN geninin susturulmasının çeşitli sağlık problemlerine yol açtığı bildirilmiştir.

Wang ve ark. (2016a) çalışmalarında gen susturma yaklaşımı ile FGF5 geninin keçilerde kıl uzunluğu üstüne etkisini incelemiştir. Bu çalışmada fenotipik ve genotipik veriler kullanılarak genetik modifikasyonun etkisi ve sonraki nesillere aktarılmasındaki başarı araştırılmaya çalışılmıştır. FGF5'in CRISPR/Cas9 tekniği aracılığıyla susturulması ile sekonder folliküllerin sayısında ve kıl uzunluklarında anlamlı artış tespit edilmiş ve yapılan modifikasyonun sonraki nesillere aktarılabilceği gösterilmiştir.

2.4. Koyunlarda Yapılmış Olan Çalışmalar

Brooks ve ark. (2015) koyunlarda embriyo gelişimi üstünde çalışmışlardır. Gebelikte embriyodan interferon tau, prostaglandinler ve kortizol salınımı olmaktadır. HSD11B1 (Hidroksisteroid 11-beta dehidrojenaz) ve HSD11B2 enzimleri kortizon ve kortizolün birbirine dönüşümünü sağlamaktadır. Kortizol, glukokortikoid reseptörü (NR3C1 veya GR) ve mineralokortikoid reseptörü (NR3C2 veya MR) için biyolojik açıdan aktif bir glukokortikoid ve ligandır. Koyunlarda yapılan bu çalışma iki aşamada yürütülmüş, ilk aşamada HSD11B1 ve HSD11B2 enzimlerinin morfolino antisens oligonükleotitlerle fonksiyon kaybı analizi yapılmış; ikinci aşamada NR3C1'in embriyo gelişimine etkisi CRISPR/Cas9 sistemiyle gen susturma yaklaşımı ile anlaşılmasına çalışılmış, HSD11B1 enziminin embriyonun gelişiminde etkili olduğu fakat HSD11B2 ve NR3C1'in etkili olmadığı gözlenmiştir.

Crispo ve ark. (2015) MSTN üstünde yaptığı çalışmada koyunlarda CRISPR/Cas9 aracılı gen susturma yaklaşımı denenmiştir. İlk bölünme aşamasındaki koyun embriyosuna CRISPR/Cas9 mRNA'sı enjekte edilmiş ve tekniğin embriyo gelişimine zarar vermediği görülmüştür. Çalışma sonucunda manipülasyon yapılmış olan zigotlardaki gen düzenleme oranı % 50 olarak tespit edilmiş; transfer edilen 53 blastositten 22 yavru alınmıştır. Yapılan analizler sonucunda bu yavrulardan 10 tanesinde indel mutasyonları görülmüş, diğer yavrularda ise genom modifikasyonu gerçekleşmemiştir. Mutasyon görülen yavruların sekizinde teknik her iki allelde de başarılı olmuş; iki yavrunun hem mutant hem de yabancı tip alleli içerdiği tespit edilmiştir. Sekiz mutant yavrudan beşinin, taşıdıkları mutasyonlar bakımından heterozigot oldukları görülmüştür.

Niu ve ark. (2016)'nın çalışmasında koyunlarda B-karoten oksijenaz-2 (BCO2) geninde CRISPR/Cas9 aracılığıyla gen susturma yaklaşımı izlenmiştir. BCO2, β-karoten metabolizmasının ilerlemesinde önemli bir

enzimdir ve koyunda sarı yağ dokusu rengi ile ilişkilidir. BCO2 hedeflenerek CRISPR/Cas9 içeriğinin tek hücre aşamasındaki zigota enjeksiyonu ile çoklu mutasyonlar oluşturulmuştur. Meydana gelen biallelik modifikasyonların yabancı tip ve monoallelik mutasyonlarla kıyaslandığında sarı yağ ile sonuçlandığı görülmüştür. Koyunlarda yağ renginin belirlenmesinde BCO2 geninin önemini vurgulanması için dizi analizi ve Western blot kullanılarak genetik düzeydeki gen modifikasyonlarının etkileri karakterize edilmeye çalışılmıştır. Bu sonuçlar, CRISPR/Cas9 vasıtasıyla genetik modifikasyonun, gen işlevlerini doğrulamak için ve ayrıca hayvancılıkta ekonomik açıdan önemli nitelikler için arzu edilen fenotipler üretmek için büyük potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

Wang ve ark. (2016b) çalışmalarında Cas9 mRNA'sı ve üç geni (MSTN, ASIP-agouti sinyal yolağı ve BCO2) hedefleyen gRNA'ları tek hücre aşamasındaki embriyolara birlikte enjekte edilerek koyunlarda gen hedefleme başarıyla gerçekleştirilmiştir. Enjeksiyon yapılan embriyolarda somatik dokular ve gonadlarda (gametlerin ilgili modifikasyonu taşıyıp taşımayacağına anlaşılması açısından) Cas9 aracılı hedefleme etkileri klonlama ve dizi analiziyle incelenmiştir. Hedeflenen üç gen için tekniğin verimliliği elde edilen kuzularda % 27-33 aralığında görülmüş, aynı anda üç gende birlikte modifikasyon görülme oranı ise % 5.6 olarak bulunmuştur. sgRNA'ların hedef dışı etkilerinin kurucu hayvanlarda gözlenmediğinden emin olmak için, mikroenjeksiyon öncesi fibroblastlar üzerinde önceden tarama yapılmıştır. Yapılan çalışma ve elde edilen bulgular CRISPR/Cas9 yönteminin ekonomik açıdan önemli özelliklerden sorumlu birden fazla geni aynı anda hedefleyerek hayvancılık gelişimi için güçlü bir araç olarak kullanılabileceğini önermektedir.

Wu ve ark. (2016) bir çok organizmada raportör gen (Reporter gene; gen ifadesinin saptanmasını veya ölçülmesini sağlayan genlerdir. İfade yerini veya düzeylerini bildirmek için düzenleyici dizilere veya ilgi genlere kaynaşabilirler. Raportör genler, floresan proteini kodlayan genleri ve görünmez substratları parlak veya renkli ürünlere dönüştüren enzimleri içerir.) aktarımı için bir çok organizmada çalışılmış olan ve kodlanmayan RNA sentezleyen Rosa26 genini hedefleyerek ekzojen bir gen olan tGFP (turbo yeşil floresan proteini) genini koyun genomuna entegre etmeye çalışmışlardır. Rosa26 hedeflenerek tasarlanmış beş gRNA test edilmiş ve en yüksek etkinlik gösteren gRNA seçilerek plazmid aracılığıyla tek hücreli koyun embriyolarına aktarılmıştır. 35 embriyodan 30 sağlıklı embriyo taşıyıcı annelere nakledilmiş ve sekiz yavru alınmıştır. Bu yavrulardan birinin istenen mutasyonu gösterdiği bildirilmiştir.

Zhang ve ark. (2017a) fonksiyon kaybı çalışmalarıyla koyunda ovulasyon oranı ve yavru büyüklüğü ile ilişkilendirilmiş olan BMPR-IB (FecB/Boorola mutasyonu) genini hedeflemiştir. Tasarlanan gRNA'lar 88 adet tek hücreli embriyoya transfer edilmiş, 33 embriyoda mutasyonlar gerçekleşmiş, 33 embriyonun 12'sinin homozigot; 21'inin heterozigot olduğu bildirilmiştir. Pozitif embriyoların PCR ürünlerinin dizi analizi sonucunda, çerçeve kayması ve kesilmiş proteinlerle sonuçlanan 10'dan fazla modifikasyon formunun olduğu ortaya konmuştur. Yapılan çalışmalar sonucu hedef dışı etki gözlenmediği bildirilmiştir.

2.5. Tavuklarda Yapılmış Olan Çalışmalar

CRISPR/Cas9 tekniği ile genom düzenleme çalışmalarının tavukta ilk kez uygulanması Véron ve ark. (2015) tarafından, tekniğin tavuklarda uygulanabilirliğinin tespiti amacıyla yapılmıştır. Tavuk embriyolarında transkripsiyon faktörü olan Pax7 geni uyarılabilir bir vektör aracılı sistem ve in ovo elektroporasyon kullanılarak CRISPR/Cas9 tekniği ile hedeflenmiş, knockdown sağlanmış ve mozaik mutasyonlar gözlemlenmiştir. Gelişimin moleküler mekanizması üstünde yapılacak araştırmalarda kanatlılarda CRISPR/Cas9 tekniğinin fonksiyon kaybı çalışmaları için uygun bir teknik olduğu görülmüştür.

Bai ve ark. (2016) DF-1 hücre hattında PPAR- γ (peroksizom proliferatör aktive edilmiş reseptör- γ), ATP5E (ATP sentaz epsilon alt ünitesi) ve OVA (ovalbumin) genlerinde iki vektör kullanımı ve yer değiştiren bir belirteç sistemi ile mutasyon yaratılmaya çalışılmıştır. Aktarım gerçekleşen hücrelerde çoğunluğu delesyon olan; insersiyon ve indel gibi farklı çeşitlerde mutasyonlar tespit edilmiştir. Üç gen için transfeksiyonun başarılı olduğu hücrelerin sekans analizine göre tekniğin genlerde mutasyon oluşturma etkisi sırasıyla %94,7; %95 ve %95 olarak görülmüştür. Hedef dışı çalışma tespiti için her bir gen için seçilen olası üçer farklı gen T7E1 ile kontrol edilmiştir. Sonuç olarak CRISPR/Cas9 tekniğinin yapılacak olan araştırmalarda kuvvetli bir teknik olduğu görülmüş, tekniğin geliştirilmesi için daha çok çalışma yapılması gerektiği vurgulanmıştır.

Oishi ve ark. (2016) çalışmalarında primordial germ hücre kültüründe yumurta akındaki potansiyel alerjen proteinlerin sentezinden sorumlu olan OVM (ovomukoid) ve OVA genleri tek bir gRNA içeren vektör aracılı bir CRISPR/Cas9 yaklaşımı ile gen susturma gerçekleştirilmiştir. Bu hücrelerden OVM mutasyonu görülenler embriyolara transfer edilerek (Daha önce OVA üstünde yapılan çalışmalarda OVA mutanti yavrular elde edildiğinden (Bai ve ark., 2016) embriyoya hücre aktarımı yalnızca OVM için

yapılmıştır) germ hattında kimerizm görülen horozlar elde edilmiş ve bu horozların mutant spermelerinden elde edilen döllerin yaklaşık olarak yarısında OVM açısından heterozigot mutant yavrular alınmıştır. Bu heterozigot yavruların aynı mutasyonu sonraki jenerasyona da aktardığı ve bu sayede homozigot mutant yavrular elde edildiği görülmüştür.

Zuo ve ark. (2016) tavuk DF-1 fibroblast hücrelerinde, ESC (embriyonik kök hücreleri) ve embriyolarında yaptıkları bir çalışmada primordial germ hücrelerinde ifadesi özellikle fazla olan C2EIP genini üç rehber RNA ile hedeflemiş ve CRISPR/Cas9 sistemi ile gen susturma denemiştir. Çalışmada ESC'lerin erkek germ hücrelerine farklılaşmasının tanımlanması ve bu sayede yüksek kalite ve verimde tavuk hatlarına ulaşılması hedeflenmiştir. Homozigot ve heterozigot mutant hücreler elde edilmiş, delesyonlar farklı şekillerde ortaya çıkmıştır.

Dimitrov ve ark. (2016)'nın yapmış oldukları çalışmada primordial germ hücrelerinde immunoglobulin ağır zinciri lokusu CRISPR/Cas9 tekniği ile hedeflenerek gen susturma yaklaşımı denemiştir. Primordial germ hücrelerine transfeksiyon yapılmış ve bu hücrelerin embriyolara aktarımı enjeksiyon ile gerçekleştirilmiştir. Dört farklı gRNA plazmid aracılı aktarımla hücrelere taşınmıştır. Beş hedeflenmiş hücre hattı embriyolara aktarılmış ve sonuçta germ hücreleri açısından kimerik bireyler elde edilmiştir. Bu bireylerden erkek olanlar yabanıl tip (wt) dişilerle çiftleştirilmiş ve sağlıklı yavrular elde edilebildiği görülmüştür.

Cooper ve ark. (2016) farklı bir transfeksiyon metodu uygulamışlardır. Memelilerde oositler üstünde yapılan manipülasyonların kanatlılarda uygulanması imkan dahilinde değildir. Kanatlılarda uygulanan mevcut transfeksiyon yöntemlerinde gen düzenleme veya transgenik hayvan üretimi için iki nesil gerekirken yani manipülasyon yapılan hayvanın yavrusunda ancak istenen sonuç elde edilebilmektedir. Bu çalışma hayvan sayısı, zaman ve sarfların aza indirgenmesi açısından tek bir nesilde üretilebilecek sperm transfeksiyonu aracılı gen düzenleme (STAGE) tekniğinin doublesex ve mab-3 ilişkili transkripsiyon faktörü-1 (DMRT1) geninde uygulanmasını kapsamaktadır. Tekniğin dişiye ait genomda da etkili olup olmayacağı daha önce genomuna eGFP geni aktarılmış olan horozlar ve hemizigot tavuklarda eGFP geninin hedeflenmesi ile de kontrol edilmeye çalışılmıştır. CRISPR/Cas9 araçları spermelere lipofektamin aracılığıyla transfekte edilmiş, suni tohumlama ile seçilen tavuklarda döllenme sağlanmıştır. Metodun etkinliğinin çeşitli faktörlere bağlı olarak %0-26 arasında değiştiği görülmüştür.

Abu-Bonsrah ve ark. (2016), embriyonik gelişim ve embriyonik hastalıkların patogeneğinde rol alan DROSHA, DICER, MBD3, KIAA1279, CDKN1B, EZH2, HIRA, TYRP1, STMN2, RET ve DGCR8 genleri üstünde çalışmışlardır. DROSHA, DICER, MBD3, KIAA1279, CDKN1B ve EZH2 genlerinin transkripsiyon başlatma bölgeleri hücre hatlarında hedeflenerek sistemin aktivitesi kontrol edilmiştir. Spesifik bir genin hedeflenmesi amacıyla RET geninin 10 ve 16'ncı ekzonları hedeflenerek MEN2A ve MEN2B mutasyonları oluşturulmaya çalışılmıştır. Büyük genomik delesyonlar oluşturmak amacıyla STMN2, RET, DGCR8 ve HIRA genleri iki gRNA ile hedeflenmiştir. Hücre kültürü çalışmalarında herhangi bir hedef dışı etki görülmemiş; DGCR8 genini hedefleyen CRISPR/Cas9 sistemi primordiyal germ hücrelerine aktararak embriyolarda sistemin in vivo çalışması incelenmiştir.

Wang ve ark. (2017)'in çalışmaları homolog rekombinasyonda etkin rol oynayan Rad51'in yüklenmesinde anahtar rol oynayan maya Rad52 geni (yRad52) ile Cas9 proteinini birleştirerek sistemin etkinliğini artırmayı hedeflemiştir. Hücre kültüründe, 50 bazlık tek zincirli donör DNA ile MSTN geninde substitüsyon yaratılması hedeflenmiş, yRad52-Cas9 sistemin donör DNA entegrasyonunda sıradan Cas9'dan üç kat daha fazla başarılı olduğu tespit edilmiştir.

Zhang ve ark. (2017b) çalışmalarında CRISPR/Cas9 aracılığıyla tavuk embriyonik kök hücrelerinin spermatogonial kök hücrelere farklılaşma sürecinde gen fonksiyonunu araştırmayı amaçlamışlardır. Stra8 genini hedefleyen üç gRNA tasarlanarak DF-1 hücre hattında denedikten sonra, etkili bulunan iki gRNA embriyonik kök hücrelere aktarılmış; Stra8 geninin knockdown edilmesinin ardından embriyonik kök hücrelerden spermatogonial kök hücre oluşmasının engellendiği bildirilmiştir.

3. Araştırma Sonuçları ve Tartışma

CRISPR/Cas9 tekniği ile yapılan çalışmaların sayısı gün geçtikçe yaygınlaşmaktadır. ZFN ve TALEN gibi diğer hedef spesifik genom düzenleme yöntemleri karşısında maliyet, tasarım kolaylığı ve çoklu gen modifikasyonuna imkan sağlayabilmesi nedeniyle (Petersen ve Niemann, 2015) avantajları bulunan bu yöntemin bitkiler ve hayvanlarda kullanımını kısıtlayıcı bazı faktörler de mevcuttur. Hedefleme spesifitesini sağlayan yaklaşık 20 baz uzunluğundaki gRNA'ların yaklaşık altı milyar baz çiftinden oluşan genomun (memeliler için) muhtelif yerlerine bağlanabilmesi söz konusudur. Bu da aktarımı gerçekleşen CRISPR/Cas9 sisteminin genomun farklı bölgelerinde hedef dışı etkileri olabileceğini; çeşitli hastalıklar, kanser,

genlerin regülatör bölgelerinin zarar görmesi, hedef bölgeye komşu genlerin etkilenmesi gibi bir çok problemin oluşmasına sebep olabileceğini akla getirmektedir. İlerleyen dönemde tekniğe ilişkin yapılan çalışmaların çoğu hedef spesifitesini artırmak için yeni yöntemler geliştirmek ve hedef dışı etkiyi azaltarak istenilen modifikasyonları gerçekleştirmeyi amaçlamıştır (O'Geen ve ark., 2015). Sistemin DNA hasarı yaratmak üstüne kurulu olması, DNA tamir mekanizmalarında herhangi bir eksiklik veya bozukluk olması durumunda organizmaya yarar sağlamak yerine zarar verecektir. CRISPR/Cas9 sisteminin hücre ve organizmalara aktarımı çeşitli transfeksiyon metodlarıyla sağlanmaktadır (Yamamoto, 2015). Sistemin etkinliği için farklı transfeksiyon metodları geliştirilmiş (Yamamoto, 2015) ve farklı hücre gruplarına uygulanmıştır (somatik hücreler (Heo ve ark., 2015; Bevacqua ve ark., 2016), fetal fibroblastlar (Ni ve ark., 2014; Choi ve ark., 2015; Bai ve ark., 2016; Zuo ve ark., 2016), spermatozoidler (Cooper ve ark., 2016), tek hücre aşamasındaki embriyolar (Crispo ve ark., 2015; Wang ve ark., 2015; Véron ve ark., 2015; Bevacqua ve ark., 2016; Niu ve ark., 2016; Wang ve ark., 2016a, Wang ve ark., 2016b; Zuo ve ark., 2016), primordiyal germ hücreleri (Dimitrov ve ark., 2016; Oishi ve ark., 2016)). Çiftlik hayvanlarında yapılmış çalışmaların hiç birinde yetişkin bir hayvana sistemin aktarımı denenmemiştir; denenebileceği herhangi bir transfeksiyon metodu üstünde çalışılmamıştır. Sistem günümüzde yalnızca istenilen modifikasyonları barındıran yavrular elde etmeyi mümkün kılmaktadır. Diğer bir dezavantaj da embriyolar üstünde yapılan çalışmalarda aktarımı gerçekleşen sistemin her hücrede bir örnek olarak ve aynı zamanlamada çalışmamasıdır (Crispo ve ark., 2015; Véron ve ark., 2015; Wang ve ark., 2015; Bevacqua ve ark., 2016; Niu ve ark., 2016; Wang ve ark., 2016a; 2016b; Zuo ve ark., 2016). Örneğin tek hücre aşamasındaki bir embriyoda yapılan knock-out çalışmasını ele aldığımızda blastosist seviyesine gelen embriyonun hücrelerinin monoallelik veya biallelik olarak modifikasyon taşıdığı ve gerçekleşen delesyonların değişken uzunluktaki baz çiftlerini kapsadığı; bazı hücrelerde ise herhangi bir modifikasyon gözlenmediği durumlarla karşılaşılması; yani yavrunun mozaik olması düşündürücüdür. Dezavantajlar giderildiği takdirde ise yöntemin kullanımını için halihazırda gündemde olan etik tartışmaların büyümesi muhtemeldir. Halen tartışılmakta olan GDO'ların tespitinin mümkün olması bu alanda yapılan çalışmaların her türlü tartışmaya karşın sağlam bir zeminde ilerlemesine olanak sağlamaktadır, fakat CRISPR/Cas9 sistemi ile yapılacak olan modifikasyonların tespiti mümkün olmayacaktır.

Eksiklikleri her geçen gün yeni teknolojiler ve yöntemlerle giderilmekte olan yöntemin dezavantajları ve etik tartışmalar bir kenara bırakıldığında, temel hayvansal gıda kaynaklarımız olan çiftlik hayvanlarında bu yöntemin olası avantajlarına da değinmek gerekmektedir. Çiftlik hayvanlarında verim ve kalite özelliklerinin artırılması, çevreye uyum kabiliyetinin geliştirilmesi, hastalıklara dirençli hatlar elde edilmesi gibi ıslah çalışmalarının tek bir nesilde başarılı bir şekilde elde edilerek yavru hatlarına aktarılabilmesi bu teknikle mümkün olabilecektir.

CRISPR/Cas9 kalıtsal hastalıkların tedavisi; hastalığa predispozisyona neden olabilecek genlerin düzenlenmesi, genoma entegre olabilen viral enfeksiyonların gelecek nesillere aktarımının önlenmesi; istenmeyen özelliklerin knock-out ile elimine edilmesi; popülasyon genelinde yapılacak çalışmalar ile (belki yeni alleller oluşturularak gen havuzunun zenginleştirilmesi gibi) biyoçeşitliliğin korunması veya artırılması; genom-proteom-metabolom ilişkilerinin aydınlatılması ve bu sayede üretime katkıda bulunacak çalışmaların desteklenmesi; farmakolojik alanda yapılacak araştırmalar gibi çok farklı ve geniş çalışma sahaları sunabilecek potansiyele sahiptir.

4. Kaynaklar

- Abu-Bonsrah KD, Zhang D, Newgreen DF (2016). CRISPR/Cas9 Targets Chicken Embryonic Somatic Cells *In Vitro* and *In Vivo* and Generates Phenotypic Abnormalities. *Scientific Reports* **6**: 34524.
- Bai Y, He L, Li P, Xu K, Shao S, Ren C, Liu Z, Wei Z, Zhang Z (2016). Efficient Genome Editing in Chicken DF-1 Cells Using the CRISPR/Cas9 System. *G3 Genes Genomes Genetics* **6** (4): 917-923.
- Barrangou R, van der Oost J (2013). CRISPR-Cas Systems: RNA-Mediated Adaptive Immunity in Bacteria and Archaea. Springer. Verlag Berlin Heidelberg.
- Bevacqua RJ, Fernandez-Martín R, Savy V, Canel NG, Gismondi MI, Kues WA, Carlson DF, Fahrenkrug SC, Niemann H, Taboga OA, Ferraris S, Salamone DF (2016). Efficient edition of the bovine PRNP prion gene in somatic cells and IVF embryos using the CRISPR/Cas9 system. *Theriogenology* **86** (8): 1886-1896.
- Brooks K, Burns G, Spencer TE (2015). Biological Roles of Hydroxysteroid (11-Beta) Dehydrogenase 1 (HSD11B1), HSD11B2, and Glucocorticoid Receptor (NR3C1) in Sheep Conceptus Elongation. *Biology of Reproduction* **93** (2): 38, 1–12.
- Choi W, Yum S, Lee S, Lee W, Lee J, Kim S, Koo O, Lee B, Jang G (2015). Disruption of exogenous eGFP gene using RNA-guided endonuclease in bovine transgenic somatic cells. *Zygote* **23** (6): 916-923.
- Cooper CA, Challagulla A, Jenkins KA, Wise TG, O'Neil TE, Morris KR, Tizard ML, Doran TJ (2016). Generation of gene edited birds in one generation using sperm transfection assisted gene editing (STAGE). *Transgenic Research*. DOI: 10.1007/s11248-016-0003-0.
- Crispo M, Mulet AP, Tesson L, Barrera N, Cuadro F, dos Santos-Neto PC, Nguyen TH, Crénéguy A, Brusselle L, Anegón I, Menchaca A (2015). Efficient Generation of Myostatin Knock-Out Sheep Using CRISPR/Cas9 Technology and Microinjection into Zygotes. *PLoS One* **10** (8): e0136690. DOI:10.1371/journal.pone.0136690.
- Dimitrov L, Pedersen D, Ching KH, Yi H, Collarini EJ, Izquierdo S, van de Lavoie MC, Leighton PA (2016). Germline Gene Editing in Chickens by Efficient CRISPR-Mediated Homologous Recombination in Primordial Germ Cells. *PLoS One* **11** (4). DOI:10.1371/journal.pone.0154303.
- Doudna JA, Charpentier E (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9 *Science* **346**: 1258096. DOI: 10.1126/science.1258096.
- Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF III (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology* **31** (7): 397-405.
- Gao Y, Wu H, Wang Y, Liu X, Chen L, Li Q, Cui C, Liu X, Zhang J, Zhang Y (2017). Single Cas9 nickase induced generation of NRAMP1 knockin cattle with reduced off-target effects. *Genome Biology*. **18**: 13.
- Guo R, Wan Y, Xu D, Cui L, Deng M, Zhang G, Jia R, Zhou W, Wang Z, Deng K, Huang M, Wang F, Zhang Y (2016). Generation and evaluation of Myostatin knock-out rabbits and goats using CRISPR/Cas9 system. *Scientific Reports* **6**. DOI: 10.1038/srep29855.
- Heo YT, Quan X, Xu YN, Baek S, Choi H, Kim NH, Kim J (2015). CRISPR/Cas9 Nuclease-Mediated Gene Knock-In in Bovine-Induced Pluripotent Cells. *Stem Cells and Development* **24** (3): 393-402.
- Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A (1987). Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*. **169**: 5429–5433.
- Jinek, M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E (2012). A programmable dual-

- RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**: 816–821.
- Kim JS (2016). Genome editing comes of age. *Nature Protocols* **11** (9): 1573-1578.
- Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution*. **60**: 174–182.
- Ni W, Qiao J, Hu S, Zhao X, Regouski M, Yang M, Polejaeva IA, Chen C (2014). Efficient Gene Knockout in Goats Using CRISPR/Cas9 System. *PLoS One* **9**(9): e106718. DOI: 10.1371/journal.pone.0106718.
- Niu Y, Jin M, Li Y, Li P, Zhou J, Wang X, Petersen B, Huang X, Kou Q, Chen Y (2016). Biallelic beta-carotene oxygenase 2 knockout results in yellow fat in sheep via CRISPR/Cas9. *Animal Genetics*. DOI: 10.1111/age.12515.
- O'Geen H, Yu AS, Segal DJ (2015). How specific is CRISPR/Cas9 really? *Current Opinion in Chemical Biology* **29**: 72-78.
- Oishi I, Yoshii K, Miyahara D, Kagami H, Tagami T (2016). Targeted mutagenesis in chicken using CRISPR/Cas9 system. *Scientific Reports* **6**. DOI: 10.1038/srep23980.
- Petersen B, Niemann H (2015). Molecular scissors and their application in genetically modified farm animals. *Transgenic Research* **24** (3): 381-396.
- Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G (2005). CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology*. **151**: 653–663.
- Proudfoot C, Carlson DF, Huddart R, Long CR, Pryor JH, King TJ, Lillico SG, Mileham AJ, McLaren DG, Whitelaw CBA, Fahrenkrug SC (2015). Genome edited sheep and cattle. *Transgenic Research*. **24** (1): 147-153.
- Véron N, Qu Z, Kipen PAS, Hirst CE, Marcelle C (2015). CRISPR mediated somatic cell genome engineering in the chicken. *Developmental Biology*. **407** (1): 68-74.
- Wang X, Yu H, Lei A, Zhou J, Zeng W, Zhu H, Dong Z, Niu Y, Shi B, Cai B, Liu J, Huang S, Yan H, Zhao X, Zhou G, He X, Chen X, Yang Y, Jiang Y, Shi L, Tian X, Wang Y, Ma B, Huang X, Qu L, Chen Y (2015). Generation of gene-modified goats targeting MSTN and FGF5 via zygote injection of CRISPR/Cas9 system. *Scientific Reports* **5**: 13878. DOI: 10.1038/srep13878
- Wang X, Cai B, Zhou J, Zhu H, Niu Y, Ma B, Yu H, Lei A, Yan H, Shen X, Shi L, Zhao X, Hua J, Huang X, Qu L, Chen Y (2016a). Disruption of FGF5 in Cashmere Goats Using CRISPR/Cas9 Results in More Secondary Hair Follicles and Longer Fibers. *PLoS One* **11** (10). DOI: 10.1371/journal.pone.0164640.
- Wang X, Niu Y, Zhou J, Yu H, Kou Q, Lei A, Zhao X, Yan H, Cai B, Shen Q, Zhou S, Zhu H, Zhou G, Niu W, Hua J, Jiang Y, Huang X, Ma B, Chen Y (2016b). Multiplex gene editing via CRISPR/Cas9 exhibits desirable muscle hypertrophy without detectable off-target effects in sheep. *Scientific Reports* **6**. DOI: 10.1038/srep32271.
- Wang L, Yang L, Guo Y, Du W, Yin Y, Zhang T, Lu H (2017). Enhancing Targeted Genomic DNA Editing in Chicken Cells Using the CRISPR/Cas9 System. *PLoS ONE* **12** (1): e0169768. doi:10.1371/journal.pone.0169768
- Westra ER, Buckling A, Fineran PC (2014). CRISPR-Cas systems: beyond adaptive immunity. *Nature Reviews Microbiology* **12**:317–326.
- Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA (2012). RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature*. **482**:331–338.
- Wu M, Wei C, Lian Z, Liu R, Zhu C, Wang H, Cao J, Shen Y, Zhao F, Zhang L, Mu Z, Wang Y, Wang X, Du L, Wang C (2016). *Rosa26*-targeted sheep gene knock-in via CRISPR-Cas9 system. *Scientific Reports*. **6**: 24360; DOI: 10.1038/srep24360.
- Yamamoto T (2015). Targeted Genome Editing Using Site-Specific Nucleases : ZFNs, TALENs and the CRISPR/Cas9 System. Springer, Japan. DOI: 10.1007/978-4-431-55227-7
- Zhang X, Li W, Wu Y, Peng X, Lou B, Wang L, Liu M (2017a). Disruption of the sheep BMPR-IB gene by CRISPR/Cas9 in *in vitro*-produced embryos. *Theriogenology*. **91**: 163-172.
- Zhang Y, Wang Y, Zuo Q, Li D, Zhang W, Wang F, Ji Y, Jin J, Lu Z, Wang M, Zhang C, Li B (2017b). CRISPR/Cas9 mediated chicken Stra8 gene knockout and inhibition of male germ cell differentiation. *PLoS ONE*. **12**(2): e0172207. DOI:10.1371/journal.pone.0172207.
- Zuo Q, Wang Y, Cheng S, Lian C, Tang B, Wang F, Lu Z, Ji Y, Zhao R, Zhang W, Jin K, Song J, Zhang Y, Li B (2016). Site-Directed Genome Knockout in Chicken Cell Line and Embryos Can Use CRISPR/Cas Gene Editing Technology. *G3 Genes Genomes Genetics* **6** (6): 1787-1792.