



Yeni Genomik Teknikler ve CRISPR-Cas9 Teknolojisi

New Genomic Techniques and CRISPR-Cas9 Technology

Batuhan Berk YILMAZ¹, Ufuk Tansel ŞİRELİ²

^{1,2}Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni ve Teknolojisi AD, Ankara

¹ORCID: 0009-0005-5478-9195  ²ORCID: 0000-0001-6180-0755 

*Sorumlu Yazar: berkyilmaz0681@gmail.com

Geliş Tarihi: 25.03.2025

Kabul Tarihi: 30.09.2025

ÖZET

Genom düzenleme teknolojileri alanında CRISPR-Cas9 (Düzenli Aralıklı Palindromik Tekrar Kümeleri) teknolojisi devrim niteliğinde bir yenilik olup, tüm canlı hücrelerin genomları üzerinde düzenleme yapmaya imkân tanıyan bir uygulamadır. Bu çığır açıcı genom düzenleme yöntemi 2020 yılında, bu alandaki keşiflerinden ötürü Fransız mikrobiyolog Emmanuelle Charpentier ve Amerikalı biyokimyager Jennifer Doudna'ya Nobel Kimya Ödülü'nü kazandırdı. CRISPR-Cas9 teknolojisi, tıp, tarım ve biyoteknoloji gibi birçok alanda geniş bir uygulama potansiyeline sahiptir. Tarım uygulamalarında, bitkilerin besin değerlerinin iyileştirilmesini sağlarken, tıp alanında kanser, HIV ve Orak Hücre Anemisi gibi önemli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Bunların yanı sıra CRISPR teknolojisi, gen düzenlemeleri ile gen aktivasyonu veya baskılaması gibi işlevsel değişiklikler yapmak için de uygulanabilmektedir. Ancak teknolojinin klinik alanda kullanılmasını engelleyen bazı zorluklar mevcuttur; immün yanıtlar, hedef dışı etkiler ve etik sorunlar bu zorluklar arasında yer almaktadır. Avrupa Birliği Komisyonu'nun bu alanda henüz net bir yaklaşım geliştirememesi ve teknolojinin pratikteki uygulamaları için daha fazla iyileştirme gerekliliği, bu sorunların başlıcalarıdır. Bu derleme, CRISPR-Cas9 teknolojisinin potansiyelini ve karşılaştığı zorlukları ele alarak, gelecekteki gelişim ve uygulamalarına dair bilgiler sunmaktadır.

Anahtar kelimeler: CRISPR-Cas9, Yeni Genomik Teknikler, Gen Düzenleme, Genetik Mühendisliği Tekniği, Gen Terapisi

ABSTRACT

In the field of genome editing technologies, CRISPR-Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) technology is a revolutionary innovation that enables editing the genomes of all living cells. This groundbreaking genome editing method earned French microbiologist Emmanuelle Charpentier and American biochemist Jennifer Doudna the Nobel Prize in Chemistry in 2020 for their discoveries in this field. CRISPR-Cas9 technology has a wide range of potential applications in areas such as medicine, agriculture, and biotechnology. In agricultural applications, it helps improve the nutritional value of plants, while in medicine, it is used in the treatment of major diseases such as cancer, HIV, and sickle cell anemia. In addition to these, CRISPR technology can also be applied to make functional changes such as gene activation or repression through gene editing. However, there are some challenges that prevent the clinical use of this technology, including immune responses, off-target effects, and ethical issues. The European Commission's lack of a clear approach in this area and the need for further improvements for the practical applications of the technology are among the main challenges. This review discusses the potential of CRISPR-Cas9 technology and the challenges it faces, providing insights into future developments and applications.

Keywords: CRISPR-Cas9, New Genomic Techniques, Gen Editing, Genetic Engineering Technique, Gene Therapy

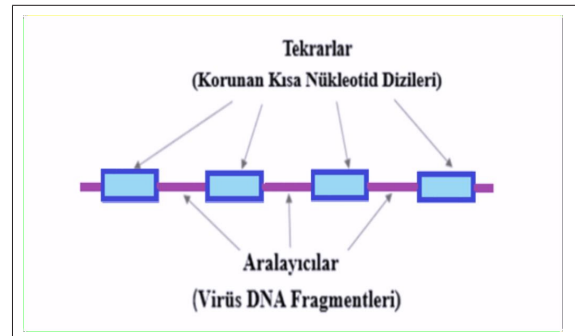
GİRİŞ

Çağımızın yeni ve en ilgi çekici genomik teknolojilerinden birisi olan CRISPR-Cas9 yani Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats-Cas9 (Kümelenmiş Düzenli Aralıklı Kısa Palindromik Tekrar Dizileri) Teknolojisi, tüm canlı hücrelerin genomlarında düzenleme yapmaya imkân tanıyan, yüksek verimliliğe sahip ve çok yönlü uygulama alanı bulunan bir genom düzenleme teknolojisidir. Kılavuz RNA (gRNA) ve CRISPR ilişkili proteinler (Cas9), CRISPR- Cas9 sisteminin iki ana bileşenidir. CRISPR-Cas9 genom düzenleme mekanizması sırasıyla; tanıma, kesme ve onarım olmak üzere üç adımdan oluşur (Doudna ve Charpentier, 2014). Tasarlanan gRNA, tamamlayıcı bir baz çifti aracılığıyla ilgili gendeki hedef diziyi tanır. Cas9 nükleazı, Protospacer Bitişik Motifine (Protospacer Adjacent Motif) göre 3 baz çifti yukarı akışta çift sarmallı kırılmalar (Double-strand Brake) yaparken; çift sarmallı kırılma, "Homolog Rekombinasyon (HR)", "Klasik, Homolog Olmayan Uç Birleştirme (cNHEJ)", "Mikrohomoloji Aracılı Uç Birleştirme (MMEJ)" ve "Tek İplikli Tavlama (SSA)" gibi çeşitli onarım mekanizmalarıyla onarılır (Xue ve Greene, 2021). CRISPR-Cas9 genom düzenleme teknolojisinin; tıp, tarım ve biyoteknoloji başta olmak üzere birçok alanda çok sayıda uygulaması bulunmaktadır. Tarım alanında; meyve, sebze ve tahılların besin değerlerini iyileştirmek için yardımcı olabilir. Tıp alanında; kanserler, HIV, Orak Hücre Anemisi, KVH (Kardiyovasküler Hastalık) ve Niemann-Pick gibi hastalıkları engellemek ve tedavi etmek için kullanılabilir. CRISPR teknolojisi aynı zamanda Cas9 proteininin modifikasyonu ile bir genin hedefini yapay olarak düzenlemek yani aktive etmek veya işlevini bastırmak için kullanılabilir (Ansori vd., 2023). Ancak immünogenite etkili iletim sistemleri, hedef dışı etki ve etik sorunlar, teknolojinin klinik uygulamalarda kullanılmasındaki en büyük engeller olarak karşımıza çıkmaktadır. CRISPR-Cas9 teknolojisi, moleküler biyolojide yeni bir çağ başlatmasına ve temel moleküler araştırmalardan klinik uygulamalara kadar sayısız uygulama alanına sahip olmasına rağmen, Avrupa Birliği Komisyonu (AB)'nun bu teknolojiye tam olarak net bir bakış açısının olmaması, pratik uygulamalarda hala aşılması gereken önemli zorluklar ve zorlukları aşmak için çeşitli iyileştirmelere ihtiyaç duyulması

gibi durumlar da göz ardı edilmemelidir (Asmamaw ve Zawdie, 2021).

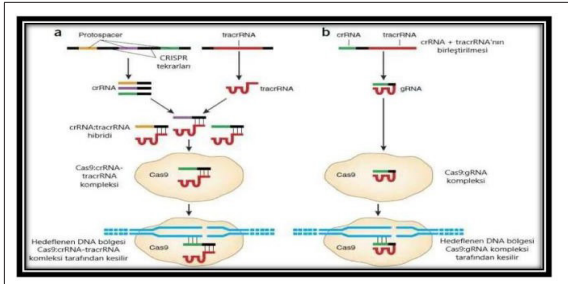
CRISPR-CAS9 Teknolojisinin Çalışma Mekanizması

CRISPR-Cas9 teknolojisinin çalışma mekanizmasının temelinde, bakterilerin virüsleri tespit etmek için kullanmış olduğu bağışıklık mekanizması yer almaktadır. Bakteriler bir virüs tarafından enfekte edildiğinde, enfekte olan bakteri, virüsün DNA'sının bir parçasını (aralayıcı: spacer) alarak kendi DNA'sına kopyalar. Böylelikle aynı virüsle tekrar karşılaştığı zaman, o virüsü tanıyarak etkisiz hâle getirebilir. Bu uygulama ilk kez Kuzey Carolina Eyalet Üniversitesinde Probiyotik Araştırmaları alanında görev yapan Rodolphe Barrangou ile gıda malzemeleri üretimi yapan dev bir şirketin araştırmacı ekibi tarafından deneysel olarak kanıtlanmıştır (Barrangou vd., 2007). Bu uygulamada araştırmacılar, başta yoğurt olmak üzere çeşitli süt ürünlerinde yaygın olarak bulunan *Streptococcus thermophilus* bakterisini kullandıklarını bildirmişlerdir. Araştırmalarında deneysel amaçlı bir virüs saldırısından sonra CRISPR bölgesine yeni aralayıcıların (spacers) dâhil edildiğini gözlemlemişlerdir. Bununla da kalmayıp bu aralayıcıların DNA diziliminin, virüs genomunun bazı kısımlarıyla aynı olduğunu belirlemişlerdir (Cao vd., 2018). Ayrıca aralayıcıları çıkararak veya yeni viral DNA dizileri yerleştirerek bakterinin belirli bir virüsün saldırısına karşı direncini değiştirmeyi başarmışlardır. Antiviral savunma mekanizması, virüslerden gelen DNA parçalarının bakteri DNA'sına dâhil edilmesi esasına dayanır. DNA'nın bu ilgili kısmına CRISPR denir. CRISPR dizisi içerisinde, edinilen virüs DNA parçaları korunan kısa nükleotid dizisi tekrarlarıyla ayrılır (Şekil 1).



Şekil 1. CRISPR Tekrar Aralayıcı Dizisinin Şematik Görünümü

Bakterilerdeki bu sisteme biraz daha yakından bakacak olursak; bakteriyi istila eden yabancı DNA'nın parçalanması işlemi sırasında, "Trans-Aktive Edici RNA (tracrRNA)" adı verilen izleyici RNA, crRNA'daki tekrar dizisiyle hibrit bir RNA yapısı oluşturmak için eşleşmektedir. Bu ikili RNA yapısı (tracrRNA+crRNA) kılavuzluk yaparak, Cas9'u bir hedef sekansa ve hedef sekansa bitişik olan hedef DNA'yı parçalamaya yönlendirmektedir (Şekil 2) (Sander ve Joung, 2014).



Şekil 2. tracrRNA+crRNA'nın Kılavuzluğu Eşliğinde Hedeflenen DNA Bölgesinin Kesilmesi

Bu yöntemde Cas9 enzimi, *Streptococcus pyogenes* bakterisinden ekstrakte edilmiştir. Bu enzim, hedef DNA'nın çift sarmallı bir kırılma oluşturacak şekilde bölünmesinden sorumlu olan ve yabancı DNA'yı kesen genetik bir makas görevi görmektedir. Cas9 enzimi tipik olarak iki RNA molekülüne bağlanır. Bu moleküller crRNA ve tracrRNA (veya "trans- aktive edici crRNA") olarak adlandırılmaktadır. Cas9 enzimi, tracrRNA'yı bir tutamaç olarak kullanırken, crRNA ayırıcı dizisi, kompleksi eşleşen bir viral diziyeye yönlendirir. Kısaca tracrRNA ve crRNA, Cas9 enzimini yabancı DNA üzerinde keseceği hedef bölgeye yönlendirmektedir (Ran vd., 2013). Yapısında iki ayrı bölge bulunan Cas9 enzimi, DNA çift sarmalının her iki şeridini de keserek Çift Sarmallı Kopma (Double-strand Break) adı verilen olayı gerçekleştirmektedir. Cas9 enziminin, genomun rastgele herhangi bir yerini kesmemesini sağlayan özel bir mekanizması vardır. PAM'ler (Protospacer Adjacent Motif) olarak bilinen kısa DNA dizileri, etiket görevi görür ve hedef DNA dizisine bitişik olarak oturur. Cas9 kompleksi hedef DNA dizisinin yanında bir PAM görmezse kesilmez. Cas9 enziminin bakterilerdeki CRISPR bölgesini hedef almamasının sebeplerinden biride bu PAM DNA dizileridir (O'Connell vd., 2014).

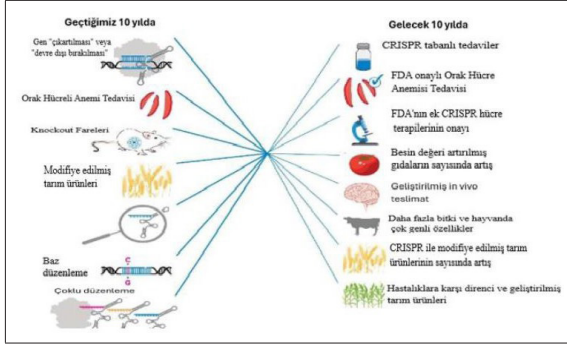
CRISPR-Cas9 Genom Düzenleme Mekanizmaları

CRISPR-Cas9 genom düzenleme mekanizması; tanıma, bölünme ve onarım olarak sıralanır. Hazırlanan sgRNA (Single-Guide RNA) Cas9'u yönlendirir ve crRNA tamamlayıcı baz çifti bileşeni aracılığıyla ilgilenilen gendeki hedef diziyi tanıyarak Cas9 enzimi sgRNA'nın yokluğunda etkisiz bir haldedir. Cas9 nükleazı, PAM'ın (Protospacer Adjacent Motif) 3 baz çifti yukarıdaki bir bölgede çift sarmallı kırılmalar (Double-Strand Break/DSB) yapar. PAM dizisi, kesim bölgesine doğru uzanan kısa, korunmuş bir DNA dizisidir. Genom düzenleme aracında en yaygın kullanılan nükleaz olan Cas9 enzimi, PAM dizisini tanıyarak (Hsu vd., 2013). Cas9, uygun PAM'a sahip bir hedef bölge bulduğunda, lokal DNA erimesini ve ardından RNA-DNA hibritinin oluşumunu tetikler, ancak Cas9 enziminin hedef DNA dizisini nasıl erittiğinin mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Daha sonra Cas9 proteini DNA bölünmesi için aktive edilir. İki önemli nükleazdan biri olan HNH tamamlayıcı ipliği keserken RuvC nükleazı, hedef DNA'nın tamamlayıcı olmayan ipliğini böler (Jinek vd., 2012). Son olarak DSB, hücresel onarım yöntemleriyle onarılır. Bu onarım yöntemleri: Homolog Rekombinasyon (HR), Klasik Homolog Olmayan Uç Birleştirme (cNHEJ), Mikrohomoloji Aracılı Uç Birleştirme (MMEJ) ve Tek İplikli Tavlama (SSA) şeklinde sıralanabilir (Xue ve Greene, 2021).

CRISPR-Cas9 Uygulamaları

CRISPR-Cas9 teknolojisinin keşfinden hemen sonra, birçok sahada uygulanması için araştırmalara başlanmıştır. Tıp, tarım ve biyoteknoloji gibi alanlar başta olmak üzere diğer birçok alanda dünya üzerinde büyük bir etki yaratmıştır. Bilim insanları bu teknolojinin hastalıkları tedavi etmek, genetik bozuklukları ortadan kaldırmak, verimi yüksek mahsuller geliştirmek ve bulaşıcı hastalıkları tamamen ortadan kaldırmak için ilerlemeye devam edeceğini öngörmektedir (Wang ve Doudna, 2023) (Şekil 3). Tıp alanında, CRISPR-Cas9 gen düzenleme teknolojisine dayanan ilk tedavi, 16 Kasım 2023 tarihinde Birleşik Krallık İlaç ve Sağlık Ürünleri Düzenleme Kurumu (MHRA) tarafından verilen izin ile "Orak Hücreli Anemi" ve kan nakline bağımlı "Akdeniz Anemisi" tedavisinde başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Parums,

2024). Bakterilerde farklı antibiyotik gruplarına karşı fenotipik direnç profillerinin belirlenmesi ve CRISPR-Cas9 teknolojisinin antibiyotik direncinin kontrolündeki potansiyel rolü konusundaki çalışmalar da tüm hızıyla devam etmektedir (Acar vd., 2023).



Şekil 3. CRISPR-CAS9 Teknolojisinin Geçtiğimiz On Yıl İçerisindeki Gelişimi ve Önümüzdeki On Yılda Beklenen Hedefleri

TIP ALANINDAKİ UYGULAMALARI VE ÖNEMİ

Kanser

Kanser, çağımızın oldukça önem arz eden ve karmaşık yapıya sahip bir hastalıktır. CRISPR-Cas9, tedavi edici bağışıklık hücrelerinin üretimini desteklemek için kullanılabilir. Kimerik Antijen Reseptörü T (CAR-T) hücrelerinin yanı sıra programlanmış hücre ölümü proteininin elimine edilmesini de sağlar (Mintz vd., 2018). T hücreleri, kanserli hücreleri yok ederken sağlıklı hücrelere zarar vermez. CRISPR-Cas9 tedavisi, kanser immünoterapisinde CAR-T hücrelerinin üretimiyle bilinir. Bu kimerik sinyalleme alanları, T hücresi aktivasyonunu artırma kapasitesine sahiptir ve hücre dışı tek zincirli değişken bir fragman yoluyla tümöre özgü antijenleri tanıyabilir. Lenfoma ve lösemnin, genetiği değiştirilmiş T hücreleriyle tedavi edilmesi için yapılan klinik çalışmalar günümüzde hâlâ devam etmektedir (Rabaan vd., 2023).

Kardiyovasküler Hastalıklar

Kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde öncelik, hastalık semptomlarını hafifletmek ve kalpteki morfolojik kusurları düzeltmektir. CRISPR-Cas9 teknolojisi, patojenik KVH (Kardiyovasküler Hastalık) genlerinin moleküler mekanizmalarının derinlemesine analiz edilmesini sağlayarak, gen terapisinin belirli gen fonksiyonlarını iyileştirme potansiyeli hakkında bilgi

edinilmesini sağlar. Genom düzenleme, kardiyovasküler hastalıklar için birden fazla tedavi yönteminin geliştirilmesine olanak sağlamıştır (Liu ve Olson, 2022).

Kalıtsal Hastalıklar

Kalıtsal sağlık, Wilson Hastalığı (Organlarda biriken bakırın yol açtığı kalıtsal bir hastalık), Niemann-Pick Hastalığı (Karaciğer ve/veya dalağın aşırı büyümesi ile karakterize kalıtsal bir hastalık) ve Netherton Sendromu (Cildi, saç ve bağışıklık sistemini etkileyen kalıtsal bir hastalık) gibi kalıtsal hastalıkların mekanizmalarının araştırılmasında ve genom düzenleme teknolojileri kullanılarak tedavilerin geliştirilmesi üzerine çalışmalar yapılmaktadır (Mani, 2021).

Hematolojik Hastalıklar

CRISPR-Cas9 sistemi, kemik iliği kök hücrelerinin DNA'sını değiştirerek Orak hücre Anemisi ve Beta-Talasemi gibi rahatsızlıkları tedavi edebilir. CRISPR-Cas9 sistemi ayrıca hematolojik maligniteleri içeren moleküler mekanizmaları belirlemek için de oldukça yararlı bir araçtır (Zhang ve McCarty, 2016). Lösemi, lenfomalar ve Multiple Miyelomun tedavisi için CRISPR-Cas9 teknolojisini baz alan tedavi yöntemleri ile ilgili klinik çalışmalar devam etmektedir (Rabaan vd., 2023).

Nörodejeneratif Hastalıklar

Alzheimer, Huntington, Parkinson ve Ataksi gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavileri henüz bulunmadığı için günümüzün önemli nörodejeneratif hastalıkları olarak kabul edilirler. Bu hastalıklara çeşitli genetik faktörlerin ve karmaşık etkileşimlerinin sebep olduğu bilinmektedir. CRISPR-Cas9 gibi gen düzenleme yöntemlerinin ortaya çıkmasıyla gelişimsel bozukluklarla ilgili gen fonksiyonlarını incelemek mümkün hale gelmiştir (Yan vd., 2018). CRISPR-Cas9 sistemleri kullanılarak bir genin belirli bölgelerinin hedeflenmesi, nörodejeneratif hastalıklara neden olan veya bu hastalıklarla ilişkili olan genlerin ifade düzeylerinin modüle edilmesine olanak tanır (Shin ve Lee, 2017).

Viral Hastalıklar

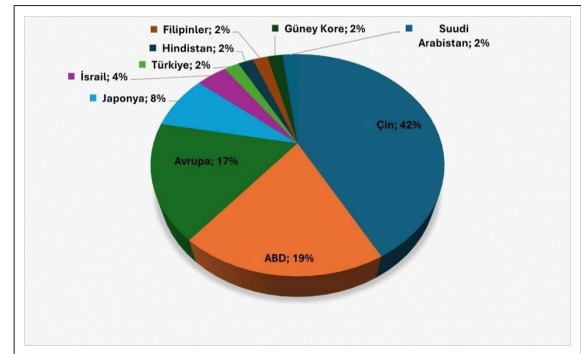
CRISPR-Cas9 teknolojisi önemli bulaşıcı hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır. Virüslerdeki konakçı genleri hedefleyerek veya hücre replikasyonu için gerekli viral genleri

değiştirerek etkinliğini göstermektedir. CRISPR-Cas9 teknolojisiyle yapılan genom düzenlemesi ile enfeksiyonla ilişkili genlerin düzenlenerek HIV'e dirençli CD4+T hücrelerinin gelişimine yardımcı olabileceği saptanmıştır. Human Papilloma Virus (HPV) onkogenleri olan (Kontrolünü kaybetmiş protein kodlayan genlerdir ve kanser gelişiminin başlangıcında rol oynarlar) E6 ve E7, rahim ağzı kanseriyle doğrudan ilişkilidir. Bu sebeple, bu riskli HPV genlerini değiştirmeye yönelik genetik mühendisliği, rahim ağzı kanserini yerinde tersine çevirecek bir sistem olabilir ve gelecekte tedavi edici bir seçenek olarak kullanılabilir (Wei vd., 2022).

TARIM ALANINDAKİ UYGULAMALARI VE ÖNEMİ

Gün geçtikçe artan dünya nüfus ve buna bağlı gittikçe artan gıda talebi tarım alanındaki kıtlık riskinin gitgide artmasına neden olmaktadır. Bu sebepten dolayı doğal gıda üretiminin artırılması ve iyileştirilmesi için yeni teknolojilere ivedi ihtiyaç duyulmaktadır. Bitki genom düzenlemesinde kullanılan ana teknolojiler olan ZFN ve TALEN gibi her hedef gen bölgesi için yeni proteinlerin tasarlanmasını gerektiren yöntemler oldukça uzun ve pahalı bir işleme sahiptir (Cong vd., 2013). Bu yöntemlere kıyasla CRISPR-Cas9; programlanabilir olması, verimlilik ve özgülüğünün yanı sıra erişilebilirlik, kullanım kolaylığı gibi nedenlerden dolayı diğer yöntemlere göre bir adım öne çıkmaktadır (Scheben vd., 2017). CRISPR-Cas9 teknolojisinin bitki genom mühendisliği için uygun bir yöntem olduğu ilk kez 2013 yılında ortaya atılmıştır (Shan vd., 2013). CRISPR-Cas9 teknolojisi, gıdaların besin değerlerini iyileştirmek, raf ömürlerini artırmak, kuraklık gibi koşullara daha dayanıklı hale getirmek ve hastalıklara karşı direncini artırmak amacıyla kullanıldığından, tarım alanında adeta bir devrim niteliğindedir (Wolt vd., 2016). CRISPR-Cas9 teknolojisinin küresel çaptaki gıda krizini çözümüne yönelik üç şekilde öneri getirebilmektedir (Asmamaw ve Zawdie, 2021). Bu üç öneri sırasıyla; gıda kaynaklarını yenilenebilir, bitkilerin zorlu koşullarda hayatta kalmasına yardımcı olabilir ve bitkilerin genel sağlığını iyileştirebilir hale getirebilmesidir. Bu amaçlar doğrultusunda, CRISPR-Cas9 teknolojisinin tarımdaki rolüne daha ayrıntılı bir şekilde bakılacak olursa: Son on yıl içerisinde CRISPR-Cas9 teknolojisi,

tarımsal düzenlemelerde oldukça popüler bir uygulama haline gelmiştir. Bu alanda bitkiler üzerinde yapılan uygulamalar daha çok bitkilerin verim performansı, biyolojik zenginleştirme ve abiyotik ve biyotik strese toleransları üzerine olmuştur (Ricroch vd., 2017). Son birkaç yıl içerisinde, CRISPR multipleks genom düzenlemesi, tek bir nesilde yeni mahsul genotipleri ve tarımsal açıdan faydalı özellikler oluşturmak için başarılı bir stratejik plan haline gelmiştir. CRISPR-Cas9 uygulaması ile başarılı sonuçlar alınan alanlardan biri de mahsulün evcilleştirilmesi ve iyileştirilmesidir (Scheben vd., 2017). Bunlara örnek olarak evcilleştirme genlerini bozma, herbisit direnci gibi özellikleri tanıtmak ve mahsul verimini ve kalitesini artırma verilebilir. Tarımsal alanda CRISPR-Cas9 teknolojisinin kullanımı ve geliştirilmesi adına yapılan çalışmalar hala devam etmekte olup, bu alanda en çok çalışmayı yapan Çin'i sırasıyla ABD ve Avrupa takip etmektedir (Ricroch vd., 2017), (Şekil 4).



Şekil 4. Tarımsal Alanda Ülkelere Göre CRISPR-Cas9 Çalışmaları

GIDA BİLİMİNDEKİ UYGULAMALARI VE ÖNEMİ

Bakterilerin gıda ürünlerinde yaygın olarak bulunması; gıda kaynaklı hastalıklar ve gıda bozulmaları gibi olumsuz durumlara neden olmasının yanı sıra, bağırsak sağlığının iyileştirilmesi ve gıdaların saklanması gibi olumlu durumları da beraberinde getirmektedir. Gıdanın son kullanma tarihini uzatmak ve güvenilir bir şekilde tüketilmesini sağlamak için tuzlama, kurutma ve fermente etme gibi gıda işleme ve muhafaza etme teknikleri, yüzlerce yıldır bilinen yöntemlerdir. CRISPR-Cas9 teknolojisinin keşfiyle gıda sektörü de kendi payına düşeni almış ve bu sektördeki araştırma ve kaynaklarını bu teknolojiye yönlendirmiştir (Selle ve Barrangou, 2015). CRISPR tekrar- aralayıcı

dizileri, Cas proteinleri aracılığıyla bakteri ve arkelerde DNA veya RNA bölünmesi yoluyla fajlara ve diğer istilacı Mobil Genetik Elementlere (MGE) karşı koruma sağlayan DNA kodlu, RNA aracılı tuhaf adaptif bağışıklık sistemleri oluştururlar (Koonin ve Makarova, 2017). Fermente edilmiş gıdalar, gıda bilimi ve teknolojisinin temelini oluşturmakta ve et, süt, sebzeler ve tahıllar en yaygın substratlardan sayılmaktadır. Başlangıç kültürleri bu substratları ilgili ürünlere dönüştürmede önemli bir rol almaktadır. Son yıllarda üzerinde yoğunlaşılan mikroorganizmalar ise probiyotiklerdir. Başlangıç kültürleri ve probiyotikler yüzlerce yıldır kullanılmaktadır ancak bazı durumlarda bakteriyofaj probleminden dolayı fermentasyon işlemi aksayabilmektedir (Barrangou vd., 2013). Yapılan araştırmalarda laktik asit üreten mikroorganizmalarda analiz edilen laktobasil genomlarının %62,9'unda ve bifidobakteri genomlarının %77'sinde CRISPR-Cas9 lokuslarının olduğu tespit edilmiştir. CRISPR-Cas9 sistemlerinin bu mikroorganizmalarda bulunuyor olması faj kaynaklı fermentasyon işlemlerindeki başarısızlıklara engel olmak için bir bakış açısı sağlamaktadır (Barrangou ve Horvath, 2012). Buna ek olarak plazmid aşılama, suş tipleme, genom düzenleme ve antimikrobiyal aktivite uygulamalarıyla fermentasyon süreçlerinde de rol almaktadır. Bu uygulamaların çoğu, her yıl gıda kayıplarının oluşmasına neden olan zararlı mikroorganizmaların kontrolünde ve yararlı mikroorganizmaların yönetilmesinde CRISPR-Cas9 sisteminin kullanımı ile yapılabileceği düşünülmektedir (Eş vd., 2019). Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) insan tüketimi için AquaBounty Technologies isimli ABD menşeli bir şirket tarafından üretilmiş hızlı büyüyen somon balıklarını onaylamış ve bu hayvanlar CRISPR-Cas9 sistemi ile üretilmiş ilk transgenik hayvanlar olarak kayıt altına alınmıştır. Fakat bu üretim etik açıdan tartışılmakta ve bazı bilim insanları bu transgenik hayvanların bulundukları yerden kaçması durumunda doğal ekolojik dengeyi bozabileceklerini düşünmektedir. Bu tür endişeleri gidermek için ABD-Alabama'da bulunan Auburn Üniversitesi'nde bir grup araştırmacı transgenik balıklar üzerinde üreme hormonlarını kontrol eden genleri CRISPR-Cas9 ile etkisiz hale getirmek için çalışmalar yapmış, sonuç olarak kısırlaştırılmış balıkların doğalekolojikdenge üzerinde istenmeyen herhangi bir genetik

etkiye neden olmayacağını ileri sürmüşlerdir (Okoli vd., 2022). Kırmızı et endüstrisinde genellikle besi hayvanı olarak erkek hayvan tercih edilmektedir. Araştırmacılar bu konu ile ilgili olarak üretimde ya sadece erkek hayvanların ya da daha kaslı dişi sığırların doğması konusunda çalışmalar yapmaktadır. Ayrıca uzun boynuzlarından dolayı yaralanmalara sebep olan sığır ırklarında olası sağlık problemlerine engel olmak için boynuz kesimleri yapıldığı bilinmektedir. Boynuz kesim işleminin önüne geçmek için CRISPR-Cas9 teknolojisini kullanarak boynuzsuz hayvan üretme çalışmaları yapılmış ve doğan iki adet buzağı bu konuda araştırmalara konu olmuştur (Schuster vd., 2020). Kanatlı hayvan endüstrisinde ise yumurtacı olarak kullanılan tavukların erkek civciv yumurtalamasına karşın, erkek embriyolarının ultraviyole ışık altında parlaması için tavukların cinsiyet kromozomlarına yeşil floresan proteini içeren bir gen eklenmektedir. Bu sayede, erkek civcivler daha yumurtadan çıkmadan tespit edilebilmekte ve başta aşı üretimi gibi farklı alanlarda kullanabilmektedirler. Hayvan ıslahında yapılan çalışmalarda karşılaşılan bazı ekonomik sorunlar bulunmaktadır. Bunlardan biri ekonomik özellikleri kontrol eden gen bölgeleri arasındaki negatif korelasyonlardır. Örneğin et verimi iyi olan bir sığırın süt verimindeki zayıflık ya da yumurta verimi iyi olan bir tavuğunun ömrünün kısa olması gibi durumlar yıllardır bilinmektedir. CRISPR-Cas9 teknolojisi sayesinde bu gibi istenmeyen durumların ıslahının mümkün olabileceği düşünülmektedir. Bunların yanı sıra çiftlik hayvanlarında yapılacak olan genom düzenleme çalışmaları ile hastalıklara karşı direnç geliştirmede, ürün verimini ve ürünlerin kalitesini artırmada, ortama adaptasyon kabiliyetini arttırmada, döl verimini yükseltmede, yemden yararlanım gücünü artırmada, kalıtsal hastalıkları tedavisinde ve yeni nesile aktarımına engel olmada bir yöntem olarak kullanılmaktadır (Liu ve Olson, 2022). CRISPR-Cas9 teknolojisi, genom düzenleme yeteneğinden başka, Cas9 proteininin modifikasyonu ile bir genin hedefini yapay olarak düzenlemek yani aktive etmek veya işlevinin bastırılması için kullanılabilir. Bilim insanları bunu dCas9 nükleaz adı verilen gelişmiş bir modifiye Cas9 endonükleazı kullanarak HNH ve RuvC alanlarını etkisiz hale getirerek gerçekleştirmiştir (Dominguez vd., 2016).

AVRUPA BİRLİĞİ'NİN YGT'LERE BAKIŞ AÇISI

Avrupa Birliği (AB), biyoteknoloji alanındaki gelişmeleri, özellikle Yeni Genomik Teknikler (YGT) konusundaki düzenlemeleri güncelleyerek, tarımsal üretimde verimi artırmayı ve iklim değişikliğine karşı daha dayanıklı ürünler elde etmeyi hedeflemektedir. AB, "Avrupa Yeşil Mutabakatı" ve "Tarladan Sofraya" stratejilerini ortak bir potada eriterek, genetik özellikleri geliştirilmiş bitkilerle ilgili mevcut düzenlemeleri gözden geçirmek amacıyla YGT'ler için yeni bir taslak teklifi hazırlamıştır. Hazırlanan bu teklif, AB dışındaki bölgelerde kendisine hızla kullanım alanı bulan CRISPR-Cas9 gibi tekniklerin, Avrupa Birliği ülkelerinde daha etkin kullanımına olanak tanımayı amaçlamaktadır (Kahrman ve Leggewie, 2024). Yeni Genomik Teknikler, bitkilerin genetik yapısını hassas bir şekilde değiştirerek, tarımda verimlilik, hastalıklara ve zararlı organizmalara karşı direnç, olumsuz hava koşullarına karşı dayanıklılık ve yüksek besin değeri gibi özellikleri iyileştirmektedir. Fakat AB'nin mevcut düzenlemeleri, YGT'lerin ilerlemesine engel olmaktadır (Şireli, 2024). AB, eski düzenlemelerin YGT'lerin potansiyelini sınırladığını ve bu alandaki yenilikçi gelişmelerin önünü kapattığını vurgulamaktadır. Dolayısıyla günümüzde, biyoteknoloji alanındaki yenilikleri destekleyen daha esnek ve çağdaş düzenlemelere olan ihtiyaç giderek artmaktadır (Roger vd., 2024).

CRISPR-CAS9 TEKNOLOJİSİ VE ETİK SORUNLAR

Genom düzenleme teknolojileri alanında adeta yeni bir çağ başlatan CRISPR-Cas9 teknolojisi, günümüzde böceklerin, hayvanların, bitkilerin ve mikroorganizmaların genetiğini değiştirmek ve insanlara yönelik tedavi edici maddeler üretmek için kullanılmasına rağmen pek çok etik tartışmayı da beraberinde getirmektedir (Ledford, 2015). CRISPR-Cas9 teknolojisi, biyoteknoloji alanında hızlı ve düşük maliyetli genetik değişiklikler yapabilme kabiliyeti ile öne çıkarken, aynı zamanda çevre ve toplum üzerinde de önemli etik sorulara yol açmaktadır. Öncelikle, CRISPR-Cas9'un insan germ hattını (genetik materyalin nesiller boyu aktarılması) değiştirme potansiyeli, insan embriyosundaki ölümcül genetik hastalıkların tedavi edilmesi gibi büyük fırsatlar sunsa da, bu tür

müdahalelerin uzun vadeli etkileri üzerine ciddi endişeler bulunmaktadır. Genetik değişikliklerin, insanlığın geleceği üzerindeki olası sonuçları hala büyük bir merak konusudur. Bununla birlikte bilim insanları, germ hattı üzerinde yapılan değişikliklere yönelik çalışmaların, daha kapsamlı etik ve bilimsel analizler yapılana kadar sınırlı tutulmasını savunmaktadır (Coller, 2019). CRISPR-Cas9 teknolojisi, hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalar üzerinde de kullanılmaktadır. Ancak bu kullanım, özellikle genetiği değiştirilmiş organizmalar (GDO) konusunda kamuoyunun güvensizlik ve yanlış anlamalarına yol açmaktadır. CRISPR-Cas9'un potansiyeli, GDO'ların üretiminde devrim yaratabilirken, bu durumun çevreye etkileri ve düzenlemelere dair endişeler de artmaktadır. GDO'ların test edilmesi ve doğaya salınması için küresel çapta bir düzenlemeye ihtiyaç duyulmaktadır. CRISPR-Cas9 teknolojisinin hayvanlar üzerinde yaptığı değişiklikler de etik kaygılar doğurmaktadır. Örneğin, çiftlik hayvanlarında kas kütlesinin artırılması veya hastalıklara karşı direnç geliştirilmesi gibi uygulamalar, hem hayvan hakları hem de insanların bu hayvanları tüketmeye ilişkin güvenlik sorularını gündeme getirmektedir. Ayrıca, CRISPR-Cas9'un hastalık vektörlerini ortadan kaldırma potansiyeli de tartışılmaktadır. Sivrisinekler gibi hastalık taşıyıcılarının genetik olarak değiştirilmesi, ekolojik dengenin bozulmasına yol açabilir (Oye vd., 2014). Son olarak, CRISPR-Cas9'un yanlış ellerde, tehlikeli patojenleri (Kuş Gribi Virüsü, SARS, COVID-19 vs.) manipüle etmek ve biyolojik silahlar üretmek için kullanılma potansiyeli de büyük bir tehdit oluşturmaktadır. Bu durum, genom düzenleme teknolojilerinin sorumlu bir şekilde yönetilmesi ve düzenlenmesi gerektiğini vurgulamaktadır (Caplan vd., 2015).

SONUÇ

21.YY'de CRISPR-Cas9 teknolojisinin keşfi; bireye ve etkene özgü tedavi ve genomik manipülasyonlar alanında bir devrime yol açmıştır. Enfeksiyöz ve enfeksiyöz olmayan hastalıkların moleküler tanısı, örneğin; bakteri suşlarının genotiplenmesi, virüslerin tespiti ve akciğer kanserli hastalarda dolaşımdaki hücre dışı DNA'daki genetik mutasyonların tanımlanması gibi biyotibbin birçok alanında yeni fırsatlar açılmıştır. Ayrıca potansiyel olarak yeni bir bağıklık kazandırma yöntemi

olan DNA aşlarının geliştirilmesinde de rol oynamıştır. Ancak yöntemin, genetik ve/veya sonradan oluşan hastalıkların tedavisinde kullanımı için aşılması gereken çok sayıda engel ve çözülmesi gereken sorunlar vardır. Özellikle insan germ hücreleri üzerinde genom düzenleme tekniğinin kullanımının sosyal, etik ve yasal sonuçları üzerine ciddi tartışmalar yapılmakta ve bu konu henüz etik olarak bilim insanları tarafından uygun görülmemektedir. Bununla birlikte CRISPR-Cas9 tekniği sadece insanlar için değil, diğer canlı organizmalar ve çevre ile ilgili risk değerlendirmelerinde de zararsızlık ilkesi gereği güvenlik sorunlarını beraberinde getirmektedir. Genetik düzenlemelerin güvenli bir şekilde yapılmasını sağlayacak stratejilerin geliştirilememiş olması ekolojik bozulma gibi birçok kaygıyı da beraberinde getirmektedir. CRISPR-Cas9 teknolojisinin, gıda güvenliğini sağlamak amacıyla hazırlanmış yasal mevzuat çerçevesinde ve bilimsel araştırmaların çizdiği ölçüde kullanılması durumunda faydalı olacağı düşünülmektedir. Fakat günümüzde teknolojik uygulamaların toplum üzerinde kolay kabul görmemesi ve yöntemin kullanımı konusundaki etik tartışmalar devam etmektedir.

KAYNAKLAR

- Acar, B. O., Cengiz, G. ve Göncüoğlu, M. (2023). Vancomycin-Variable Enterococci in Sheep and Cattle Isolates And Whole-Genome Sequencing Analysis of Isolates Harboring vanM and vanB Genes. *Iranian Journal of Veterinary Research*, (24), 182-192. <https://doi.org/10.22099/ijvr.2023.47465.6855>
- Ansori, A. N., Antonius, Y., Susilo, R. J., Hayaza, S., Kharisma, V. D., Saklani, T., Rebezov, M., Ullah, M. E., Maksimiuk, N., Derkho, M. ve Burkov, P. (2023). Application of CRISPR-Cas9 genome editing technology in various fields: a review. *Narra J*, 3(2), e184. <https://doi.org/10.52225/narra.v3i2.184>
- Asmamaw, M. ve Zawdie, B. (2021). Mechanism and applications of CRISPR-Cas9-mediated genome editing. *Biologics*, (15), 353-361. <https://doi.org/10.2147/BTT>

- S326422
- Barrangou, R. ve Horvath, P. (2012). CRISPR: New horizons in phage resistance and strain identification. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3, 143-162. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101134>
- Barrangou, R., Coûté-Monvoisin, A., Stahl, B., Chavichvily, I., Damange, F., Romero, D. A., Boyaval, P., Fremaux, C. ve Horvath, P. (2013). Genomic impact of CRISPR immunization against bacteriophages. *Biochemical Society Transactions*, 41(6), 1383-1391. <https://doi.org/10.1042/bst20130160>
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A. ve Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 315(5819), 1709-1712. <https://doi.org/10.1126/science.1138140>
- Cao, J., Xiao, Q. ve Yan, Q. (2018). The multiplexed CRISPR targeting platforms. *Drug Discovery Today: Technologies*, 28, 53-61. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2018.01.001>
- Caplan, A. L., Parent, B., Shen, M. ve Plunkett, C. (2015). No time to waste--the ethical challenges created by CRISPR: CRISPR/Cas, being an efficient, simple, and cheap technology to edit the genome of any organism, raises many ethical and regulatory issues beyond the use to manipulate human germ line cells. *Embo Reports*, 16(11), 1421-1426. <https://doi.org/10.15252/embr.201541337>
- Coller, B. S. (2019). Ethics of human genome editing. *Annual Review of Medicine*, 70, 289-305. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-112717-094629>
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A. ve Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339(6121), 819-823. <https://doi.org/10.1126/science.1231143>

- Dominguez, A. A., Lim, W. A. ve Qi, L. S. (2016). Beyond editing: repurposing CRISPR- Cas9 for precision genome regulation and interrogation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17, 5-15. <https://doi.org/10.1038/nrm.2015.2>
- Doudna, J. A. ve Charpentier, E. (2014). The New Frontier of Genome Engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213). Article ID: 1258096. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
- Eş, İ., Gavahian, M., Marti-Quijal, F. J., Lorenzo, J. M., Khaneghah, A. M., Tsatsanis, C., Kampranis, S. C. ve Barba, F. J. (2019). The application of the CRISPR-Cas9 genome editing machinery in food and agricultural science: current status, future perspectives, and associated challenges. *Biotechnology Advances*, 37(3), 410-421. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.02.006>
- Hsu, P. D., Scott, D. A., Weinstein, J. A., Ran, F. A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E. J., Wu, X., Shalem, O., Cradick, T. J., Marraffini, L. A., Bao, G. ve Zhang, F. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature*, 31, 827-832. <https://doi.org/10.1038/nbt.2647>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A. ve Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816-821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Kahrmann, J. ve Leggewie, G. (2024). European commission's plans for a special regulation of plants created by new genomic techniques . *European Papers*, (9), 21-38. <https://doi.org/10.15166/2499-8249/740>
- Koonin, E. V. ve Makarova, K. S. (2017). Mobile genetic elements and evolution of CRISPR- Cas systems: all the way there and back. *Genome Biology and Evolution*, 9(10), 2812-2825. <https://doi.org/10.1093/gbe/evx192>
- Ledford, H. (2015). CRISPR, the disruptor. *Nature*, 522(7554), 20-24. <https://doi.org/10.1038/522020a>
- Liu, N. ve Olson, E. N. (2022). CRISPR modeling and correction of cardiovascular disease. *Circulation Research*, 130(12), 1827-1850. <https://doi.org/10.1161/circresaha.122.320496>
- Mani, I. (2021). CRISPR-Cas9 for treating hereditary diseases. *Progress In Molecular Biology and Translational Science*, 181, 165-183. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2021.01.017>
- Mintz, R. L., Gao, M. A., Lo, K., Lao, Y., Li, M. ve Leong, K. W. (2018). CRISPR technology for breast cancer: diagnostics, modeling, and therapy. *Advanced Biosystems*, 2(11), 1800132. <https://doi.org/10.1002/adbi.201800132>
- O'Connell, M. R., Oakes, B. L., Sternberg, S. H., East-Seletsky, A., Kaplan, M. ve Doudna, J. A. (2014). Programmable RNA recognition and cleavage by CRISPR/Cas9. *Nature*, 516, 263-266. <https://doi.org/10.1038/nature13769>
- Okoli, A. S., Blix, T., Myhr, A. I., Xu, W. ve Xu, X. (2022). Sustainable use of CRISPR/Cas in fish aquaculture: the biosafety perspective. *Transgenic Research*, 31, 1-21. <https://doi.org/10.1007/s11248-021-00274-7>
- Oye, K. A., Esvelt, K., Appleton, E., Catteruccia, F., Church, G., Kuiken, T., Lightfoot, S. B., Mcnamara, J., Smidler, A. ve Collins, J. P. (2014). Biotechnology. Regulating gene drives. *Science*, 345(6197), 626-628. <https://doi.org/10.1126/science.1254287>
- Parums, D. V. (2024). First regulatory approvals for CRISPR-Cas9 therapeutic gene editing for sickle cell disease and transfusion-dependent β -thalassemia. *Medical Science Monitor*, 30, e944204. <https://doi.org/10.12659/MSM.944204>
- Rabaan, A. A., Alsaihati, H., Bukhamsin, R., Bakhrebah, M. A., Nassar, M. ve Alsaleh, A. (2023). Application of CRISPR/Cas9 Technology in Cancer Treatment: A Future Direction. *Current Oncology*, 30(2), 1954-1976. <https://doi.org/10.3390/>

- curroncol30020152
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A. ve Zhang, F. (2013). Genome engineering using the crispr-cas9 system. *Nature Protocols*, 8, 2281–2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>
- Ricroch, A., Clairand, P. ve Harwood, W. (2017). Use of crispr systems in plant genome editing: toward new opportunities in agriculture. *Emerging Topics in Life Sciences*, 1(2), 169-182. <https://doi.org/10.1042/etls20170085>
- Roger, C. R., Thibier, M. ve Toppan, A. (2024). It is time to review the EU's outdated rules on GMOs. Erişim adresi (12 Kasım 2024): <https://www.europeanscientist.com/en/features/it-is-time-to-review-the-eus-outdated-rules-on-gmos-interview>.
- Sander, J. D. ve Joung, J. K. (2014). CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature Biotechnology*, 32(4), 347-355. <https://doi.org/10.1038/nbt.2842>
- Scheben, A., Wolter, F., Batley, J., Puchta, H. ve Edwards, D. (2017). Towards CRISPR/Cas crops - bringing together genomics and genome editing. *The New Phytologist*, 216(3), 682-698. <https://doi.org/10.1111/nph.14702>
- Schuster, F., Aldag, P., Frenzel, A., Hader, K., Lucas-Hahn, A., Niemann, H. ve Petersen, B. (2020). Crispr/cas12a mediated knock-in of the polled celtic variant to produce a polled genotype in dairy cattle. *Scientific Reports*, 10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70531-y>
- Selle, K. ve Barrangou, R. (2015). CRISPR-based technologies and the future of food science. *Journal of Food Science*, 80(11), R2367-R2372. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13094>
- Shan, Q., Wang, Y., Li, J., Zhang, Y., Chen, K., Liang, Z., Zhang, K., Liu, J., Xi, J. J., Qiu, J. ve Gao, C. (2013). Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*, 31, 686-688. <https://doi.org/10.1038/nbt.2650>
- Shin, J. W. ve Lee, J. (2017). The prospects of CRISPR-based genome engineering in the treatment of neurodegenerative disorders. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*. <https://doi.org/10.1177/1756285617741837>
- Sireli, U. T. (2024). Avrupa Birliği'nin Yeni Genomik Tekniklere Bakışı.
- Wang, J. Y. ve Doudna, J. A. (2023). CRISPR technology: a decade of genome editing is only the beginning. *Science*, 379(6629), eadd8643. <https://doi.org/10.1126/science.add8643>
- Wei, Y., Zhao, Z. ve Ma, X. (2022). Description of CRISPR-Cas9 development and its prospects in human papillomavirus-driven cancer treatment. *Frontiers in Immunology*, 13, 1037124. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1037124>
- Wolt, J. D., Wang, K. ve Yang, B. (2016). The regulatory status of genome-edited crops. *Plant Biotechnology Journal*, 14(2), 510-518. <https://doi.org/10.1111/pbi.12444>
- Xue, C. ve Greene, E. C. (2021). DNA repair pathway choices in CRISPR-Cas9-mediated genome editing. *Trends in Genetics*, 37(7), 639-656. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2021.02.008>
- Yan, S., Tu, Z., Li, S. ve Li, X. J. (2018). Use of CRISPR/Cas9 to model brain diseases. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 81(2), 488-492. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.04.003>
- Zhang, H. ve Mccarty, N. (2016). CRISPR-Cas9 technology and its application in haematological disorders. *British Journal of Haematology*, 175(2), 208-225. <https://doi.org/10.1111/bjh.14297>