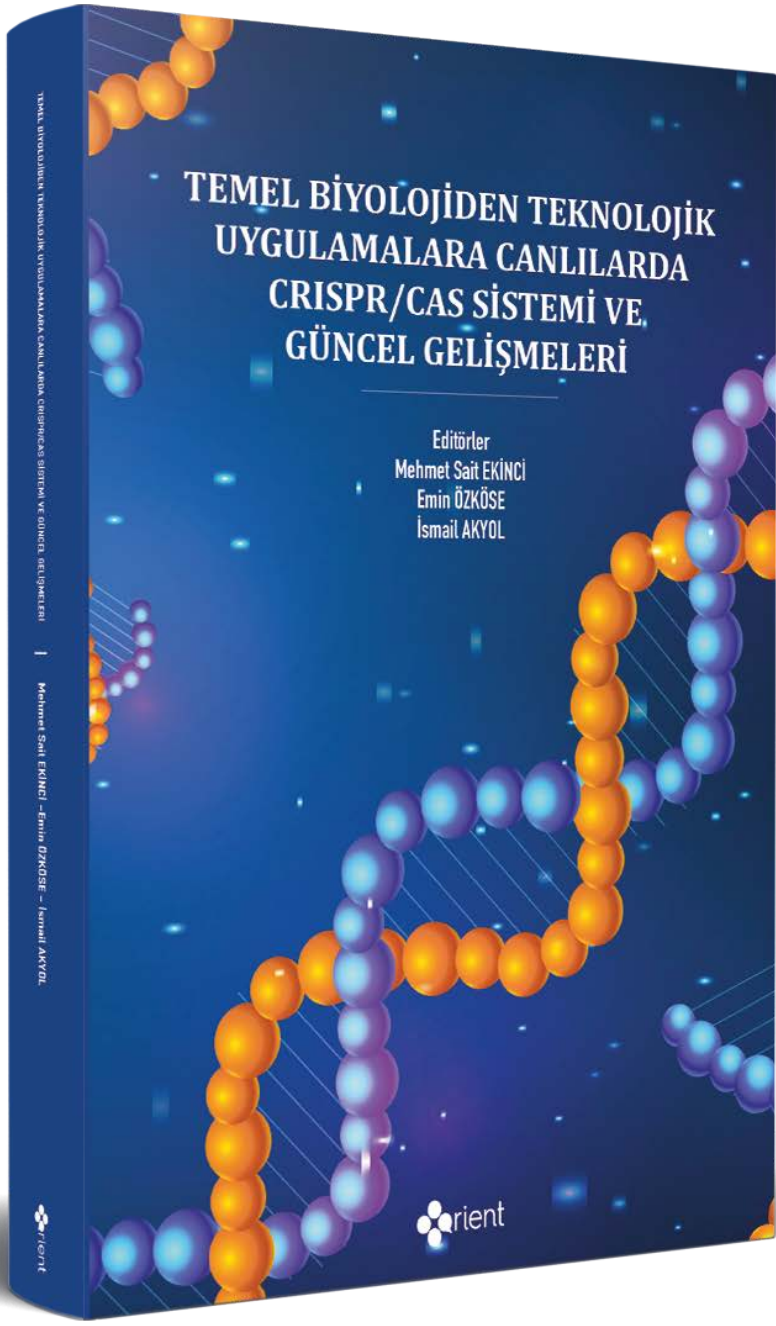

TEMEL BİYOLOJİDEN TEKNOLOJİK UYGULAMALARA CANLILARDA CRISPR/CAS SİSTEMİ VE GÜNCEL GELİŞMELERİ
Editörler
Mehmet Sait EKİNCİ
Emin ÖZKÖSE
İsmail AKYOL
orient
TEMEL BİYOLOJİDEN TEKNOLOJİK UYGULAMALARA CANLILARDA CRISPR/CAS SİSTEMİ VE GÜNCEL GELİŞMELERİ | Mehmet Sait EKİNCİ – Emin ÖZKÖSE – İsmail AKYOL
orient

TEMEL BİYOLOJİDEN TEKNOLOJİK UYGULAMALARA CANLILARDA CRISPR/CAS SİSTEMİ VE GÜNCEL GELİŞMELERİ

Editörler
Mehmet Sait EKİNCİ
Emin ÖZKÖSE
İsmail AKYOL

Orient

TEMEL BİYOLOJİDEN TEKNOLOJİK UYGULAMALARA CANLILARDA CRISPR/CAS SİSTEMİ VE GÜNCEL GELİŞMELERİ

Editörler
Mehmet Sait EKİNCİ
Emin ÖZKÖSE
İsmail AKYOL

© Orient Yayınları. Bu kitabın tüm hakları saklıdır. Yayın Hakları Editörler ve Orient Yayınları'na aittir. Kitabın hiçbir bölümü yayıncının izni olmadan fotokopi ve bilgisayar ortamında yeniden üretilemez, çoğaltılamaz ve yayınlanamaz.

TEMEL BİYOLOJİDEN TEKNOLOJİK UYGULAMALARA CANLILARDA CRISPR/CAS SİSTEMİ VE GÜNCEL GELİŞMELERİ

Editörler
Mehmet Sait EKİNCİ
Emin ÖZKÖSE
İsmail AKYOL

Orient Yayınları
1. Baskı, 2024.

Genel Yayın Yönetmeni: Serhat Buhari BAYTEKİN
Genel Koordinatör: Üzeyir TEKİN
Yayın Yönetmeni: Ayşen ALPASAR
İç ve Kapak Tasarım: Sevim ALTAY

Orient Yayınları
Sertifika No: 17590
Cevizlidere Mahallesi, 1245. Sokak, 8/A
Çankaya/ANKARA
www.orientyayinlari.com

KÜTÜPHANE KARTI

EKİNCİ Mehmet Sait , ÖZKÖSE Emin, AKYOL İsmail
TEMEL BİYOLOJİDEN TEKNOLOJİK UYGULAMALARA CANLILARDA CRISPR/CAS SİSTEMİ VE GÜNCEL GELİŞMELERİ
16x24 cm
150 sayfa kaynakça var.
e-ISBN: 978-625-6598-27-0
1. Sağlık, 2. Biyoloji, 3. CRISPR/CAS Sistemi

Orient Yayınları Enderun Tanıtım Hizmetleri Ltd. Şti. markasıdır.
Makalelerin bilimsel ve hukuki sorumluluğu yazarlara aittir.

TEMEL BİYOLOJİDEN TEKNOLOJİK UYGULAMALARA CANLILARDA CRISPR/CAS SİSTEMİ VE GÜNCEL GELİŞMELERİ

Editörler
Mehmet Sait EKİNCİ
Emin ÖZKÖSE
İsmail AKYOL

rient

KATKIDA BULUNANLAR

Doç. Dr. Neslihan TAŞAR Munzur Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı	**Dr. Öğr. Üyesi Bülent KAR** Munzur Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Dr. Öğr. Üyesi Fadime YAZDIÇ Munzur Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, Acil Yardım ve Afet Yönetimi Bölümü	**Dr. Öğr. Üyesi Ferit Can YAZDIÇ** Munzur Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Dr. Öğr. Üyesi Altuğ KARAMAN Munzur Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı	**Dr. Halit YÜCEL** Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü
Arş. Gör. Kübra EKİNCİ Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü	**Hamza AVCI** Munzur Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı
Hülya KARATON Munzur Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı	**Mustafa KARAKAYA** Munzur Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı

İÇİNDEKİLER

BAKTERİYEL BAĞIŞIKLIKTAN GENOM DÜZENLEMEYE CRISPR SİSTEMİNİN BAKTERİLERDEKİ ROLÜ VE BİYOTEKNOLOJİDEKİ POTANSİYELİ 1
FADİME YAZDIÇ

CRISPR/CAS9 TEKNOLOJİSİNİ FUNGUSLARDAKİ UYGULAMALARI, GELİŞMELERİ VE ZORLUKLARI 18
FERİT CAN YAZDIÇ

BİTKİLERDE CRISPR/CAS9 SİSTEMİNİN KULLANIMI 33
NESLİHAN TAŞAR

KANATLILARDA CRISPR CAS9 GENOM DÜZENLEME SİSTEMİNİN GÜCÜNDEN YARARLANILMASI 56
ALTUĞ KARAMAN

YENİ NESİL GENETİK MODELLEME CRISPR/CAS9 SİSTEMİ YARDIMI İLE KOYUN VE KEÇİLERDE VERİM ARTTIRMA 71
HALİT YÜCEL
KÜBRA EKİNCİ
ALTUĞ KARAMAN

SIĞIRLARDA CRISPR/CAS9 UYGULAMALARI VE SON GELİŞMELER 81
FERİT CAN YAZDIÇ
BÜLENT KAR

CRISPR TEKNOLOJİSİ: İNSAN HASTALIKLARININ GENETİK TEMELLERİNE YÖNELİK YENİLİKÇİ YAKLAŞIMLAR VE TEDAVİ STRATEJİLERİ 98
HAMZA AVCI
HÜLYA KARATON
MUSTAFA KARAKAYA

DÜZENLİ ARALIKLARLA KÜMELENMİŞ KISA PALİNDROMİK TEKRARLAR VE İLGİLİ PROTEİN (CRISPR/CAS) SİSTEMİNİN BİBLİYOMETRİK ANALİZİ 108
HALİT YÜCEL
KÜBRA EKİNCİ
BÜLENT KAR

CRISPR ANALİZİNİ DESTEKLEYEN VERİ TABANLARI VE BİYOENFORMATİK ARAÇLARI 120
FADİME YAZDIÇ
FERİT CAN YAZDIÇ

BAKTERİYEL BAĞIŞIKLIKTAN GENOM DÜZENLEMEYE CRISPR SİSTEMİNİN BAKTERİLERDEKİ ROLÜ VE BİYOTEKNOLOJİDEKİ POTANSİYELİ

FADİME YAZDIÇ*

İ. Giriş

İlk olarak bakteri genomlarında tanımlanan CRISPR (Kümelenmiş Düzenli Aralıklı Kısa Palindromik Tekrarlar) sistemi, bakteri ve arkelerde bulunan bağışıklık sisteminin gelişimin temsil eder (1). Bu adaptif bağışıklık sistemleri, viral DNA parçalarını yakalayıp kullanarak viral istilacıları tanır, bilgileri CRISPR dizileri içinde depolar ve etkisiz hale getirir (2). Bu diziler, bakterilerin aynı virüs ile karşılaştığında tanımasına ve etkisiz hale getirmesine olanak sağlayan hassas bir mekanizmanın genetik hafıza görevini üstlenmesini sağlarlar (3). CRISPR-Cas sistemi, istilacı DNA'nın genoma entegrasyonunu kolaylaştırılan Cas proteinlerinden oluşur (3). CRISPR-Cas sistemlerinin keşfiyle birlikte biyoteknoloji ve genetik mühendisliğinde, özellikle de genom düzenleme alanında devrim niteliğinde bir araç olarak karşımıza çıkmıştır (4). Araştırmacılar, bakterilerin viral DNA'yı hedeflemek için kullandıkları mekanizmaların, çeşitli organizmaların genomlarını benzeri görülmemiş bir verimlilik ve hassasiyetle değiştirebileceğini fark ettiler (5). Bunun sonucunda basit, hassas ve çok yönlü kullanılabilirliği nedeniyle genom düzenleme araştırmalarında yaygın olarak kullanılmaya başlandı. Önceki teknolojilerin aksine CRISPR-Cas9 sistemi, RNA kılavuzlu bir endonükleaz kullanarak DNA bölünmesini yönlendirebilmektedir. Bu da gerek zaman gerek maliyet açısından diğer sistemlerin önüne geçmesini sağlamıştır. Bu teknoloji, tarım, tıp ve sentetik biyoloji gibi çeşitli alanlardaki araştırmalar için yeni yollar ortaya çıkarmıştır (6). Kitabın bu bölümünde, bakterilerdeki CRISPR sisteminin kökenini ve biyolojik fonksiyonunu inceleyerek, bu mikrobiyal bağışıklık mekanizmasının modern bilim dallarına etkilerini incelemeye çalışacağız.

* fadimeyazdic@munzur.edu.tr

CRISPR-Cas Sistemlerinin Tarihi ve Biyolojisi

CRISPR-Cas sistemleri, başlangıçta bakterilerde ve arkealarda bulunan bir adaptif bağışıklık mekanizmasıdır. Bu sistemler, organizmaların geçmişte karşılaştıkları virüslerin ve plazmidlerin genetik materyalinin parçalarını saklayarak, gelecekteki istilalara karşı savunma sağlayan mekanizmalardır. CRISPR dizileri "Düzenli Aralıklarla Kümelenmiş Palindromik Tekrarlar" anlamına gelir ve ilk olarak 1987'de *Escherichia coli* genomunda bir dizi kısa doğrudan tekrar olarak tanımlanmıştır, ancak işlevleri 2005 yılına kadar tam olarak anlaşılamamıştır (7). CRISPR dizileri daha sonra çok sayıda bakteri ve arkeada tespit edilmiş ve DNA onarımında veya gen düzenlemesinde rol alabileceği gibi görüşler öne sürülmüştür. 2005 yılında, CRISPR dizilerindeki bazı bölgelerin plazmid ve viral kökenli olduğunun belirlenmesiyle önemli bir eşik aşılmıştır. CRISPR lokusları ilk olarak bakteri genotipini belirlemek için kullanılmıştır (8, 9). Sistemin daha detaylı anlaşılmasıyla, CRISPR lokuslarına dayalı genotipleme yöntemi, *Yersinia pestis* gibi patojenlerin sınıflandırılmasında yararlanılmıştır (8, 10, 11). CRISPR lokuslarının transkribe edildiği ve cas (CRISPR ile ilişkili) genlerinin nükleaz ve helikaz alanlarına sahip proteinleri kodladığı bulgusuyla birlikte, CRISPR-Cas'ın geçmiş istilaların hafıza imzaları olarak antisens RNA'ları kullanabilecek adaptif bir savunma sistemi olduğu öne sürülmüştür (7).

CRISPR/Cas9 sistemi, belirli mikropların yabancı genetik materyale yanıt vermesini ve onu ortadan kaldırmasını sağlayan prokaryotik bir nükleik asit bazlı adaptif bağışıklık sistemidir (12). Transdüksiyon, konjugasyon ve transformasyon yoluyla yabancı genetik materyale maruz kalan mikroorganizmalar, yabancı DNA'yı tanımlayan ve genom istilacılarına karşı koruyan savunma mekanizmaları oluşturmak üzere uyarılırlar. Savunma, yabancı DNA'nın kısa parçalarının CRISPR bölgesine entegre edilmesiyle kazanılır. CRISPR bölgesi, aralayıcı olarak adlandırılan değişken dizi uzantılarıyla ayrılmış kısa tekrarlayan baz dizileri içerirler. Bu aralayıcı bölgeler, bakteriyofaj ve plazmit dahil olmak üzere yabancı elementlerle dizi homolojileri ortaktır. Bu bölgelerin eklenmesi veya silinmesi durumunda CRISPR lokusu değişir, böylelikle patojene karşı direnç ve duyarlılık belirlenir. Cas proteinlerini kodlayan gen bölgeleri, genellikle AT bakımından zengin lider dizi tarafından takip edilen CRISPR dizisini çevrelerler (12). CRISPR sisteminde depolanan yabancı DNA dizileri RNA'ya kopyalanır ve bunun sonucunda Cas proteinlerini yabancı DNA'ya yönlendirir. Daha sonra Cas proteinleri yabancı DNA'yı keserek tehdidi etkisiz hale getirir. CRISPR-Cas sistemleri, her biri benzersiz Cas proteinleri ve mekanizmalarına sahip farklı tiplere (I, II, III, vb.) ayrılır. Bilimsel çalışmalarda en çok kullanılan sistem *Streptococcus pyogenes*'ten elde edilen CRISPR-Cas9 sistemidir. DNA dizilerini hedeflemedeki hassasiyeti ve uyarlana bilirliğiyle dikkat çeken bu sistem, tıp ve biyoteknoloji alanlarında gen düzenleme için devrim niteliğinde bir araç olarak benimsenmesini sağlamıştır (12).

CRISPR/Cas Sistemi Temel Bileşenleri

Prokaryotların 'bağışıklık sistemi' olarak bilinen kümelenmiş düzenli aralıklı palindromik tekrarlar (CRISPR) ve CRISPR ilişkili sistem (Cas) proteinleri (CRISPR-Cas sistemi), genellikle bakteriyofajlardan veya plazmitlerden türetilen ekstrakromozomal nükleik asitlere karşı prokaryotik adaptif savunma mekanizmalarıdır (13). DNA veya RNA'yı kesmek suretiyle faj ve diğer hareketli genetik elementlere karşı koruma sağlayan bu sistem çeşitli ekolojik çevrelerde yaşayan mikroorganizmalarda bulunmaktadır (14). CRISP-Cas sistemleri, arkelerin yaklaşık % 85'inde, bakterilerin ise % 40'ında bulunur. Bakteriler içerisinde çoğunlukla laktik asit bakterilerinde (LAB) bulunan bu sistemler, *Lactobacillus* cinsinin % 63'ünde, *Bifidobacterium* cinsinin % 77'si ve *S. thermophilus* türünün ise % 100'ünde bulunur (15). Çeşitli prokaryotların CRISPR-Cas sistemleri, üç ortak evrimleşmiş bileşen içermektedir: CRISPR tekrarları, CRISPR liderleri ve virüslerde ve karşılaştıkları diğer mobil genetik elementlerde bulunan ayrık PAM›ler (protospacer bitişik elementler) üzerinde işlev gören ilişkili Cas proteinleridir (16).

Bir CRISPR/Cas lokusunun temel kısımları şunlardır:

Tekrar Dizileri (DR): CRISPR lokusları, benzer büyüklükteki değişken dizileri ayıran kısa, doğrudan tekrar dizileri (tipik olarak 30-40 nt) ile karakterize edilir. Diziler ve ikincil yapıyalar dikkate alındığında 12 farklı CRISPR ailesi belirlenmiştir. CRISPR lokuslarından oluşturulan transkriptler, patojen dizi türevlerini ve istilacıların dizilerinin hedefleyen küçük crRNA'lar üretmek üzere işlenir. Böylelikle CRISPR'ler istilacı dizisinin parçalarını yakalar, saklar ve istilacılara karşı kalıtsal bağışıklık kazandıran küçük RNA'ların oluşumuna yol açar (17).

Aralık (spacer) DNA bölgeleri: Bu diziler eşit derecede değişken dizilerle iç içe geçen kısa, kısmen palindromik, tekrarlayan ve kodlanmayan DNA dizileridir. PAM dizilerine bitişik olarak bulunurlar (18).

Lider dizisi: CRISPR lokusunun hemen yukarı akışında (upstream), adaptasyon için önemli olan düzenleyici elementleri içerir. Lider dizilerin büyüklükleri bazı bakterilerde 47 bp'den bazı hipertermofilik arkelerde birkaç yüz bp'ye kadar değişir ve sınırlı dizi koruması gösterir (19).

Cas Genleri: 45'in üzerinde cas gen ailesi tanımlanmıştır, ancak belirli bir organizma, bunların yalnızca bir alt kümesine sahiptir. Birkaç "temel" cas geni (cas1–10) çeşitli organizmalarda mevcuttur (20,21).Ancak her bir organizma bu altı genden yalnızca bazılarına sahiptir. Şimdilik sadece cas1 ve cas2 evrensel olduğu belirlenmiştir. Prokaryotlar arasında bulunan Cas sistemlerindeki farklılık, şimdiye kadar incelene organizmaların bazılarında cas genleri üzerinden gösterilmiştir (17). Cas9 proteini, hedef DNA dizilerini tanımak ve kesmek için görevli, tracrRNA:crRNA dupleksi içindeki bir kılavuz diziyi kullanan bir endonükleazdır. *S. pyogenes* Cas9'un yapısal analizi, mekanizması hakkında daha fazla bilgi sağlamıştır. Elektron mikroskobu ve X-ışını kristalografisi ile belirlenen Cas9'un moleküler yapısı incelendiğinde, kılavuz RNA'ya bağlandığında proteinin yapısında farklı bir

şekilde düzenlenirken hedef çift sarmallı DNA (dsDNA) ile ilişkilendirildiğinde farklı bir şekilde düzenlenmiştir (22).

CRISPR/Cas Sistemi Tipleri ve Fonksiyonları

CRISPR/Cas sistemleri, işaretli Cas genleri (23) ve etki mekanizmalarına bağlı olarak farklı sınıf, tür ve alt türlere göre kategorize edilirler (24). Sınıfsal farklılık Cas proteinine dayalıdır. Sınıf 1, Sınıf 2, 6 tip ve 33 alt tip olarak sınıflandırılırlar (14, 25). Sınıf 1 sistemler, tip I, III ve IV sistemleri ve bunların ilgili alt tiplerini kapsar, sınıf 2 sistemler ise tip II, V ve VI sistemleri ve bunların ilgili alt tiplerini kapsar (15, 23). Tip II CRISPR-Cas sistemleri şu anda üç alt tipte (II-A, II-B ve II-C) sınıflandırılmaktadır (26, 27). Bunlar arasında, II-A tipi CRISPR-Cas9 ve V-A tipi CRISPR-Cas12a (daha önce Cpf1 olarak anılıyordu) bakterilerde genetik araçlar olarak en yaygın şekilde çalışılmış ve geliştirilmiş olan tipleridir (28). Tablo 1'de CRISPR-Cas sınıflandırması özetlenirken, tablo 2'de Cas proteinlerinin yapısal ve işlevsel özellikleri anlatılmaya çalışılmıştır.

Sınıf 1 CRISPR/Cas Sistemleri (Tip I, III ve IV)

Tip I sistemler, doğada en yaygın bulunan tip olmakla beraber, Cas 3 imza proteini (nükleaz), tek sarmallı bir DNA nükleaz ve ATP bağlımlı bir helikaza sahiptir ve Cas protein kompleksi içerirler (15, 25). I-A'dan I-G'ye kadar yedi tipe ve üç varyanta (I-F1, IF2, IF3) sahiptir (25 Tip 1-A'da Cas3 imza proteini Cas8a, Tip 1-B'de Cas8b ve Tip 1-E'de Cas8 şeklinde iken, Tip 1-D'de Cas10 ve Tip 1-C'de Cas5 kesme yapar (14). Cas 8 endonükleazlar, Tip 1 sistemlerde hedef DNA'nın yukarı akış (upstream) bölgesindeki kısa ve spesifik dizi olan PAM dizisini tanır. PAM dizisi, protospacer'a bitişiktir ve hedef DNA'nın Cas nükleaz tarafından ayrılması ve bölünmesi için gereklidir.

Tip III sistemler, IIIA-IIIF'ye altı tipe sahiptir. Bunların içerisinde en çok karakterize edileni IIIA ve IIIB tipleridir. Tip IIIA efektör kompleksi beş farklı Csm proteini ve tip IIIB altı farklı Cmr proteininden oluşur (29). Tip IIIA Csm ve Tip IIIB Cmr efektör kompleksleri yapı olarak birbirlerine çok benzerdirler. Bu benzerlikleri her birinin oluşturduğu protein kompleksinin çekirdeğinde Cas10 ailesi olan Csm1 veya Cmr2'den birisinin bulunmasıdır (30). Hem III-A hem de III-B alt tipleri, efektör kompleksi ve Cas-olmayan nükleazlar tarafından tekrardan türetilen 3'uçta bağlanan ve yaklaşık 55 nt uzunluğunda olgun crRNA ara maddelerini üretmek için genellikle endoribonükleaz Cas6'yı kullanır (31). Tip I sistemlerden farklı olarak, tip III sistemleri PAM'den bağımsız bir şekilde çalışır. Bunun yerine aralayıcı ve protospacer arasındaki tamamlayıcılık ve kendini hedeflemeyi önlemek için crRNA 5′-uç ile hedef RNA arasındaki tamamlayıcılığın eksikliğine dayanır (32). Tip IV sistemler, sınıf 1 sistemlerin küçük bir örneği gibidir. Bu sitem diğer sistemlerde kıyaslandığında en az gen kompozisyonuna sahip sistem olarak karşımıza çıkar. Genellikle CRISPR lokuslarının yokluğunda meydana gelmeleri, adaptasyon modülleri ve nükleazlardan yoksun olmaları, adaptif bağışıklığın dışında farklı rolleri olduğunu göstermektedir (15). Bu sistemler, profaj ve plazmit gibi hareketli

genetik elmentlerde kodlanır ve bu elementler arasındaki rekabetle ilgilidir (33). Tip IV sistemleri, IV-A, IV-B ve IV-C olmak üzere üç alt tipe ayrılır. Csf1 proteinleri IV-A ve IV-B alt tiplerinde bulunurken, IV-C alt tipinde henüz tanımlanmamış bir proteinine sahiptir (25). *Aromatoleum aromaticum* tip IV efektör kompleksinin yapısının Csf5, Csf3 ve Csf1 bağlanması için Cas7 benzeri bir Csf2 sarmal omurgasına sahip olduğu ve tip I Cas protein kompleksine benzerlik gösterdiği ortaya çıkmıştır (34) (Tablo 1-2).

Tablo 1. *CRISPR-Cas tiplerinin sınıflandırılması ve özellikleri (35, 36).*

CRISPR Sistem Tipi	Alt Tipi	Etkili Kompleksi	İmza Proteini	Hedef Molekülü	Karakteristik Özellikleri	Ek Özellikleri
Tip I	I-A	Çoklu alt ünite (Sınıf 1)	Cas3, Cas8a2, Csa5	DNA	ssDNA ipliklerini ayırır	Cas3 genellikle helikaz ve nükleaz alanlarına ayrılır. Hibrit sistemli varyantlar gözlemlenmiştir.
	I-B	Çoklu alt ünite (Sınıf 1)	Cas3, Cas8b	DNA	ssDNA ipliklerini ayırır	Bazen bölünmüş genlerle farklı kladlarda bulunur.
	I-C	Çoklu alt ünite (Sınıf 1)	Cas8c	DNA	ssDNA ipliklerini ayırır	Cas6 geninden yoksundur; Cas5 onun işlevini yerine getirir.
	I-D	Çoklu alt ünite (Sınıf 1)	Cas10d	DNA	ssDNA ipliklerini ayırır	Büyük alt ünite ile ilişkili HD domaini.
	I-E	Çoklu alt ünite (Sınıf 1)	Cse1, Cse2	DNA	ssDNA ipliklerini ayırır	Cas4 geni bulunmaz.
	I-F	Çoklu alt ünite (Sınıf 1)	Csy1, Csy2, Cas6f	DNA	ssDNA ipliklerini ayırır	Cas4 geninden yoksun, cas2 cas3'e birleşmiş durumda.
	I-F varyantı	N/A	Csy1/Csy2 fusion	DNA	ssDNA ipliklerini ayırır	Cas1-cas2-cas3 olmadan benzersiz gen düzenlemesi.

Tip II	II-A	Tek ünite (Sınıf 2)	Cas9, Csn2	DNA	Kör DSB'yi başlatır	Cas1_2_9 genleri ve en az beş farklı Csn2 ailesi içeren operonlar.
	II-B	Tek ünite (Sınıf 2)	Cas9 (Csx12 subfamily)	DNA	Kör DSB'yi başlatır	Dört genli operonlara sahip cas4 içerir.
	II-C	Tek ünite (Sınıf 2)	Cas9	DNA	Kör DSB'yi başlatır	Operonda sadece üç gen mevcuttur (cas1_2_9).
Tip III	III-A	Çoklu alt ünite (Sınıf 1)	Cas10, Csm2	RNA/ DNA	Yeni oluşan RNA moleküllerine bağlanır	Genellikle csm6 ve Cas1-Cas2 gen çiftleri ile bağlantılıdır.
	III-A varyantı	Çoklu alt ünite (Sınıf 1)	Csx10	RNA/ DNA	Yeni oluşan RNA moleküllerine bağlanır	Kapsamlı gen modifikasyonları içerir.
	III-B	Çoklu alt ünite (Sınıf 1)	Cmr5	RNA/ DNA	Yeni oluşan RNA moleküllerine bağlanır	Cas1-cas2 gen çifti ile nadiren bağlantılıdır.
Tip IV	IV	Çoklu alt ünite (Sınıf 1)	Csf1, DinG	?	En bilinmeyen CRISPR sistemi	Csf1 ve DinG benzeri helikaz genleri genellikle bulunur.
Tip V	V	Tek ünite (Sınıf 2)	Cas12	DNA	Kademeli DSB oluşturur	-
Tip VI	VI	Tek ünite (Sınıf 2)	Cas13	RNA	RNA-güdümlü RNaz	-

Sınıf 2 CRISPR/Cas Sistemleri (Tip II, V ve VI)

Tip II sistemleri, tip I ve III sistemlerine göre doğada daha nadirdir görülürler. II-A, II-B, II-C olmak üzere üç alt tipe ve bu sistemlerin çoğunlukla imza (işaretli) proteini olarak kullanılan Cas9 proteinini bulunduran II-C1 ve II-C2 olmak üzere iki varyanta sahiptir (25). Cas9 endonükleaz, tasarlanmış tek bir kılavuz RNA (sgRNA) dizisi aracılığıyla DNA bağlanmasını ve bölünmesini sağlayabilir (37). Tracr-RNA'nın crRNA tekrar bölgesi ile bir tamamlayıcılık bölgesine sahip olması, bazların birbiri ile eşleşmesine ve Cas9 tarafından stabilize edilmiş bir pre-crRNA:tracrRNA dubleksinin oluşmasına izin verir (38). Tip I ve tip III sistemlerin Cas6 aracılı pre-crRNA işlemesinden farklı olarak, tip II sistemler, pre-crRNA'yı tekrarında bölen RNAse III aktivitesine dayanır (26). crRNA'nın 5'-ucu, komşu tekrar dizisinden ve boşluk dizisinin bir kısmından bilinmeyen bir faktör tarafından kırpılır ve kırpılmış crRNA:tracrRNA kompleksi birlikte kılavuz RNA'yı (gRNA) oluşturur. Cas9 proteinleri, iki ayrı loba sahiptir: Ruv-C benzeri HNH nükleaz

domainleri ve PAM ile etkileşen C-terminal domaini içeren nükleaz lobu ve iki lobu birbirine bağlayan gRNA ile hareket eden iki lobu bir köprü sarmalı yoluyla birbirine bağlayan alfa-sarmal (heliks) lobudur (39). Bir gRNA-yönelimli Cas9 PAM'ı arar ve bulduktan sonra DNA çözülmesini başlatır (40). Uygun bir PAM dizisi bulunduğunda Cas9, DNA'yı PAM-upstream bölgesinden açar ve spacer dizisinin yaklaşık 6-8. bazları arasına denk gelen DNA hedefi kesilir (41). Tip V sistemler, V-A ila V-I, V-K ve V-U olmak üzere 11 alt tipe ve dokuz varyanta sahiptir: V-B1 ve V-B2, V-F1 ila V-F3 ve V-U1 ila V-U4 (25). Tip V efektör proteini Cas12, hem hedef hem de hedef olmayan ipliklerin kesilmesinde görev aldığı düşünülen bir RuvC alanına sahiptir (42). Cas12a, Cas9'lardaki 3′-proksimal bölgesindeki G açısından zengin PAM bölgelerinden farklı olarak, 5' ucunda T açısından zengin bir PAM bölgesinden oluşur (43). Cas12a sistemlerinde pre-crRNA'lar, crRNA saç tokası bağlanmasına benzer bir şekilde ribonükleolitik aktivitesi tarafından işlenir (44). İşlenmiş crRNA, Cas9›unkine benzer bir şekilde hedef bölgenin 5› uç ile kademeli çift sarmallı kırılmalara yol açar (45). Tip VI sistemleri dört alt tipten (VI-A, B, C ve D) ve iki varyantından (VI-B1 ve VI-B2) oluşur (25). Tip VI imza proteini Cas13 ise RNase aktivitesine sahiptir. Bunun bir sonucu olarak da pre-crRNA'yı olgun crRNA'ya bağlayarak ve işlenmesini sağlar (46). Cas13 efektörleri, diğer sınıf 2 tipleriyle uzaktan ilişkilidir ve tip VI sistemlerinin RNA yönlendirmeli RNA hedefleme girişimine izin veren RNase aktivitesine sahip iki HEPN domainine sahiptir (25, 47) (Tablo 1-2).

Tablo 2. *CRISPR-Cas sistemlerinin temel bileşeni Cas proteinlerinin işlevi ve yapısal özellikleri (35).*

Protein Ailesi	İşlevi	Yapısal Özellikler
Cas1	DNA hasar yanıtında rol oynayan metale bağımlı deoksiribonükleaz	N-terminal β-sarmal alan, C-terminal α-helikal katalitik alan
Cas2	U-zengin bölgelere özgü RNase, çift sarmallı DNase	RRM (ferredoksin) katlama
Cas3	Tek zincirli DNA nükleaz, ATP-bağımlı helikaz	HD (helikaz ve nükleaz) alanı
Cas4	5'-ssDNA ekzonükleaz aktivitesine sahip PD-(DE)xK süperfamilya nükleazı	Üç sistein C-terminal kümesi
Cas5	Cascade kompleksinin alt birimi, Cas7 ile etkileşime girer ve crRNA'nın 5'-kulbuna bağlanır	İki RRM (ferredoksin) katlama alanı
Cas6	crRNA'ları üreten metalden bağımsız endoribonükleaz	İki RRM (ferredoksin) katlama alanı, RAMP süper ailesi
Cas7	Cas protein komplekslerinin alt birimi, crRNA'ya bağlanır	Alt alanlarla RRM (ferredoksin) katlanması, RAMP üst ailesi
Cas8a, b, c, e, f (büyük alt ünite)	PAM tanınmasında rol oynayan Cascade kompleksinin alt birimi	RRM (ferredoksin) katlama
Cas10 (büyük alt ünite)	PAM tanınmasında rol oynayan Cas protein (Cmr) kompleksinin alt birimi	PAM domain polimerazlarına ve siklazlara homolog iki domain, RRM (ferredoksin) kıvrımı, Zn parmak içeren domain, C-terminal alfa helezon domain
Küyük alt ünite	Küçük, çoğunlukla alfa helisel protein, Cas protein kompleksinin alt birimi	Alfa helikal demet benzeri alanlar
Cas9	Tip II CRISPR-Cas sistemlerinde crRNA üretir ve hedef DNA'yı keser	RuvC ve HNH nükleaz alanlarına sahip iki loblu yapı

Bakterilerde CRISPR/Cas Sisteminin İşleyişi

CRISPR-Cas sisteminin genom düzenleme potansiyeli, bilim insanlarının bu bakteri savunma mekanizmasını daha yüksek ökaryotların genomlarını düzenlemek için kullanabileceklerini fark etmeleriyle ortaya çıkmıştır. Daha sonrasında bu sistem herhangi bir yüksek ökaryotun genomunu düzenlemek için çok yönlü ve iki bileşenli bir araç haline getirilmiştir. Sistem programlanabilir bir kılavuz RNA'dan (sgRNA) ve herhangi bir Cas enziminden oluşur. sgRNA, hedef DNA'ya bağlanırken, Cas enzimi DNA'nın her iki ipliğini de kesmektedir. Bu DNA'nın çift zincirindeki kırılma, hücrenin kendi DNA onarım mekanizmalarının çalışmasını sağlar. Bu durum bilim

insanlarına genetik materyale yeni DNA barçalarının eklenmesine, silmesine veya değiştirilmesine olanak tanır (7, 48). Bakterilerde CRISPR/Cas sisteminin işleyişi, üç temel fazda gerçekleşir: (i) istilacının gelecekte tanınması (bağışıklığın oluşması) için CRISPR lokusuna kısa bir istilacı DNA parçasının yerleştirildiği adaptasyon; (ii) kılavuz RNA birimlerinin (crRNA) biyogenezini ve bunların büyük RNA-protein efektör komplekslerine entegrasyonunu içeren ekspresyon ve (iii) bu efektör komplekslerinin önceden tanımlanmış ve entegre edilmiş istilacı genetik materyali dikkatli bir şekilde taradığı ve CRISPR-Cas sistemi içine girişim (49). Adaptasyon sırasında protospacer olarak adlandırılan yabancı DNA'nın bir kopyası oluşturularak CRISPR lokusuna entegre edilir. Bu yabancı DNA'lar yani protospacer'lar genellikle CRISPR'nin bir ucundaki lider dizinin hemen bitişiğinde bulunurlar. Protospacer bitişik motif'ler (PAM'ler) olarak adlandırılan yabancı nükleik asit dizileri de protospacer'e bitişik bulunan kısa yaklaşık 3-6 nülkeotid uzunluğunda yapılardır. Bu yapılar protospacer'lerin CRISPR lokuslarına üretilmesi ve/veya entegrasyonunda kritik öneme sahiptirler (50). Çalışmalarda elde edilen genetik kanıtlar, alt tipe özgü Cas proteinlerinin adaptasyonda Cas1 ile hareket edebileceğini göstermektedir. *Streptococcus thermophilus*'ta elde edilen Csn2'yi (Cas7 olarak da adlandırılır) buna iyi bir örnektir (Tablo 2). Ekspresyon basamağı, crRNA'ların üretimi ile başlar. crRNA'ların üretimi genellikle, tipik olarak CRISPR dizisinin üst kısmındaki lider bölgede bulunan bir promotörden, birkaç tekrar aralayıcı birimi (Şekil 1b) içeren uzun bir öncül crRNA'nın (pre-crRNA) transkripsiyonu ile başlar (18). Pre-crRNA'nın müteakip olgunlaşmasının mekanik olarak nasıl koordine edildiği, özel bir endoribonükleaz kullanan sınıf 1 sistemleri (tip I ve III) ile hedef imha gerçekleştiren aynı mekanizma ile olgunlaşmayı yürüten sınıf 2 sistemler (tip II, V ve VI) olan CRISPR sınıfına özgüdür (51). Tip I sistemlerde crRNA'lar oluşurken, olgunlaşma prosesinde Cas5 ve Cas 6 görev alır (52). Tip I sistemlerin imza proteini olan Cas3 nükleaz, pre-crRNA'ları kesmek suretiyle kısa crRNA'lar oluşturur (53). Oluşan crRNA'lar kaskat kompleksi ile birleşerek hedef DNA'da yer alan komplementer protospacer dizisini bulmaya yarar. Bu dizide tek zincirli bir DNA kırığı oluşturulur ve parçalanma başlar (14). Tip II sistemlerde, öncü cr-RNA (5'-3'), tracrRNA (trans aktive edici crRNA) ile kompleks yapmaktadır. Bu kompleks RNaz III enzimi ile 5' uçtan kesilerek, küçük crRNA rehberleri (guide crRNA) meydana gelir. crRNA-tracrRNA kompleksine Tip II sistemin imza proteini olan Cas9'un bağlanmasıyla, karşılıklı iki DNA ipliğinden DNA kesilir (54). Tip III sistemlerde, öncü crRNA, Cas6 ile kök ilmek yapısında bulunan bazdan keser. crRNA'lar, Cas10/Csm veya Cas/10 Cmr kompleksine katılır. 3' ucundaki 6 nükleotit aralıklarla kesilerek istilacı DNAveya RNA sistemden bertaraf edilir. Tip II sistemde, Cas10 kompleksi hem endoribonükleaz hem de endodeoksiribonükleaz aktivitesi gösterir (53,54) (Tablo 2).

Bakterilerde CRISPR-Cas Sisteminin Biyoteknolojik Uygulamaları

CRISPR-Cas tabanlı biyoteknolojik uygulamalar çok çeşitli bakteri türlerinde geniş bir uygulama yelpazesine sahiptir. CRISPR-Cas9 ve CRISPR-Cas12a sistemleri, bakterilerde yaygın olarak incelenen ve genetik araçlar olarak geliştirilen CRISPR sistemleridir. Bu sistemler, özellikle metabolik ve sentetik biyoloji alanlarında, çok çeşitli uygulamalar için bakterilerde kapsamlı bir şekilde tasarlanmış ve optimize edilmiştir. Bakterilerde CRISPR sistemleri kullanılarak farklı ürünler için, hücre fabrikaları gibi hizmet verebilir. Bunun için rekombinasyon sistemlerine dayalı geleneksel yöntemler hala kullanımda olsa da, bunlar zaman alıcı ve maliyeti yüksek sistemlerdir (55). Bu açıdan günümüzde, CRISPR-Cas9/Cas12a tabanlı biyoteknolojiler, daha yüksek düzenleme verimliliği ve özgüllüğü için model ve model olmayan bakteriler üzerindeki genetik manipülasyonu büyük ölçüde kolaylaştırmıştır (56).

Model bir canlı olarak laboratuvarda yaygın olarak kullanılan *E.coli* bakterisindeki CRISPR-Cas sistemleri, mühendislik kapasitemizi büyük ölçüde ilerletmiştir. Metabolik mühendisliği büyük ölçüde kolaylaşmıştır. CRISPR öncesi genom düzenleme araçları ile karşılaştırıldığında, bu sistemlerin çeşitli uygulamalarda birçok avantajı bulunmaktadır. Öncelikle, CRISPR-Cas sistemi hedef diziyi bölmede oldukça etkilidir. İkinci olarak, CRISPR-Cas sistemleri çok yönlüdür ve gen ekspresyonunu transkripsiyonel olarak baskılamak veya aktive etmek için kullanılabilmektedir. *E.coli*'de CRISPRi (CRISPR interferans) ve genom düzenleme, likopen, izopren, 4,4'-dihidroksibifenil (4HB), malat, n-butanol, naringenin 7-sülfat, üridin, adipik asit dahil olmak üzere çeşitli moleküllerin üretimi için başarıyla uygulanmıştır (57). Siyanobakterilerde de (*Synechococcus elongatus*, *S. elongatus* ve *Synechocystis* sp. PCC 6803) CRISPR-Cas9 ve CRISPR-Cas12a sistemleri başarı ile uygulanmıştır. Li ve arkadaşları (58), yüksek performanslı bir süksinat üreten *Synechococcus* suşu geliştirmişlerdir. Süksinat oranı genom düzenlemeden sonra başlangıca göre 11 kat artmıştır. Ayrıca, Xiao ve arkadaşları (59), *Synechocystis* sp. PCC 6803'teki endojen plazmitlerde heterolog genlerin kararlı ekspresyonunu geliştirmek için indüklenebilir bir Cas9 sistemi geliştirdiler. *Streptomyces* suşlarında CRISPR-Cas tekniği, gen silinmesi, tek/çift bölgeli mutasyonlar, tersinir gen ekspresyon kontrolü ve sessiz BGC'lerin aktivasyonu için güçlü bir araç olarak kullanılmıştır. CRISPR-Cas genom düzenleme sisteminin *S. ablus, S. viridochromogenes* ve *S. coelicolor*'da %66-100 verimlilik ile çalıştığı gösterilmiştir (60). Ayrıca bazı çalışmalarda, *S. albus, S. lividans, S. roseosporus, S. venezuelae* ve *S. viridochromogenes* dahil olmak üzere farklı türlerdeki sessiz BGC'leri aktive etmek için verimli bir CRISPR-Cas9 ve CRISPR-Cas12a aracılı promotör knock-in stratejisi bildirilmiştir (61). Ekzojen CRISPR-Cas9 sistemleri, laktik asit bakterilerinde **(**LAB) genom düzenlemesi için yaygın olarak uyarlanmıştır. Bu da bu organizmaların metabolik yollarının ve endüstriyel uygulamalarının anlaşılmasını kolaylaştırmıştır. Stout ve arkadaşları (62), *L. gasseri*'de doğal CRISPR hedefleme kaçış mekanizmasını bildirmişlerdir. Bu da tip II sisteminde meydana gelen başarısızlıkların daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır.

Öte yandan, *Lactobacillus reuteri*'de spCas9 aracılı tek sarmallı DNA rekombinasyonu %90'nın üzerinde verimlilikle gerçekleştirilmiştir. Song ve arkadaşları (63), *L. casei*'de gen silme ve ekzojen genlerin kromozomal olarak yerleştirilmesi için %25 ila %62 arasında değişen verimliliğe sahip bir Cas9 sistemi geliştirmişlerdir. CRISPR/Cas9 teknolojisinin LAB'nin metabolik mühendisliğindeki uygulamaları hala erken aşamalarındadır. Bununla birlikte, bu alandaki hızlı ilerleme, insan sağlığını ve refahını iyileştirecek daha sağlıklı ve daha sürdürülebilir gıda sistemlerine katkıda bulunacak yenilikçi fonksiyonel gıdaların geliştirilmesi için heyecan verici olanaklar sunmaktadır. Sürekli araştırma ve geliştirme ile CRISPR tabanlı metabolik mühendisliğinin, konakçı fizyolojik dengesini ve bağırsak mikrobiyotasını korumak için fermente fonksiyonel gıdalar ve LAB kullanılarak geliştirilen nutrasötikaller gibi daha fazla uygulamanın geliştirilmesinde çok önemli bir rol oynaması beklenmektedir. LAB suşlarının fermentasyon yoluyla fonksiyonel gıda üretimi için güvenliği ve işlevselliği de değerlendirilmelidir (64). İleri gıda ürünleri yaklaşımları kullanılarak yapılan araştırmalar, yeni fonksiyonel gıdaların üretimi ve ticarileştirilmesi için heyecan verici fırsatlara yol açabilir. *Clostridium* türlerinde kullanılan CRISPR araçları, *Clostridium beijerinckii* 'de verimli bir şekilde kromozomal gen silinmesine olanak sağlamıştır (65). Sistem daha sonra optimize edilmiş ve aynı suşta tek nükleotid modifikasyonu yapılar bir hale getirilmiştir. İndüklenebilir Cas ekspresyonu stratejisi kullanılarak, Wang ve arkadasları (65) *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* da uygulayarak butanol üretebilen bir çift delesyonlu mutant bir suş elde etmişlerdir. Huang ve arkadaşları (66), *C. ljungdahlii*'de benzer bir sistem geliştirmişlerdir. Tüm genetik elementleri tek bir plazmit vektöründe yapılandırarak elektroporasyon yoluyla *C. ljungdahlii*'ye aktarmışlardır. Hassas bir şekilde tek bir geni silme verimliliğinin %50 ile %100 arasında değiştiğini belirtmişlerdir. CRISPR-Cas genom düzenleme yöntemleri, amino asitler ve çeşitli bileşiklerin üretimi için önemli bir bakteri olan *Corynebacterium*'da da geliştirilmiştir. Bu sistemler, özellikle γ-aminobütirik asit ve 1,2-propanediol üretimiyle ilgili olarak *Corynebacterium glutamicum*'da başarılı birşekilde kullanılmıştır (67). Ayrıca CRISPRi sistemi, *C. glutamicum*'da L-lizin, L-glutamat ve homobütirat üretimini geliştirmek için uygulanmıştır (68). *Bacillus* sp.'ler, serbest yaşayan ve parazitik patojenik türler de dahil olmak üzere gram pozitif bir bakteridi. Birçok Bacillus türü genellikle güvenli mikroorganizmalar olarak kabul edilir. Bu nedenle, *Bacillus* türleri özellikle rekombinant proteinler olmak üzere, endüstriyel katma değerli yüksek ürünlerin üretim için yaygın olarak kullanılmaktadır (69). *Bacillus* türleri için CRISPR araçları özellikle endüstriyel olarak rekombinant proteinlerin üretimini kolaylaştırmak için geliştirilmiştir. CRISPR-Cas9 genom düzenleme özellikle *Bacillus subtilis*'te uygulanmıştır (70). Bu bakteride L-valin, hiyalüronik asit ve N-asetilglukozamin (GlcNAc) üretimi için CRISPR-Cas9 sistemi başarılı bir şekilde kullanılmıştır (71). Yukarıda bahsedilen bakterilerden farklı olarak dikkat çeken noktası ise, CRISPR tabanlı araçların, *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoni* ve *Yersinia pestis* gibi patojenik bakterilerle ilgili araştırmaları kolaylaştırmasıdır. Bu sistemler, ilaç direncinin incelenmesi, virülans faktörlerinin tanımlanması ve yeni antimikrobiyal stratejilerin geliştirilmesi için kullanılabilmektedir (72).

Bakteriyel CRISPR-Cas Sisteminden Gelecek Beklentileri ve Zorlukları

CRISPR-Cas sistemi teknolojisi, bakteriyel genetik, fizyoloji ve endüstriyel süreçlerde gelecekteki uygulamalar için önemli bir umut vaat etmektedir. Bakterilerde hassas genom düzenleme ve gen regülasyonu her geçen gün daha da kolaylaştırmaktadır (73). Bu süreç önümüzdeki yıllarda yüksek verimli fonksiyonel genomik ve metabolik mühendisliğe inanılmaz kolaylıklar ve olanaklar sağlayacaktır. Devre dışı bırakılmış Cas9 (dCas9) ile CRISPR müdahalesi (CRISPRi), gen susturma için güçlü bir araç olarak ortaya çıkacak ve hücre ölümüne neden olmadan gen fonksiyonunun incelenmesine izin verecektir (74). CRISPR-Cas sistemleri kullanılarak, antimikrobiyal direnç (AMR) genlerinin bakteri popülasyonlarından seçici olarak çıkarabilir ve AMR ile mücadele için yeni bir yaklaşım suna bilme potansiyeline sahiptir (75). Programlanabilir CRISPR-Cas antimikrobiyalleri belirli bakteri türlerini hedefleyebilir, bunun sonucu olarak da potansiyel olarak patojenik ve faydalı mikroorganizmalar arasında ayrım yapan "akıllı" antibiyotikler olarak hizmet edebilecektirler (75). CRISPR-Cas teknolojisi, biyoyakıtlar ve farmasötikler gibi endüstriyel açıdan önemli metabolitlerin üretimini artırmak için bakteriyel metabolik mühendisliğene yeni kapılar açabilir (57). Bu teknoloji ayrıca bakteri suşlarının tiplendirilmesi, izlenmesi ve aşılanması da dahil olmak üzere bakteri suşu geliştirmesinde büyük kolaylık sağlayacaktır (57). Tabi bu beklentilerin gerçekleşmesi için baz zorlukların üstesinden gelinmesi gereklidir. Şimdiye kadar yapılan çoğu çalışmada CRISPR/Cas9 genom düzenleme, in vivo olarak bölgeye yönelik mutagenez için kullanılan bir araç olarak karşımıza çıksa da, bakterilere düzensiz bir şekilde uygulanmıştır (76). Proteobakterilerindeki CRISPR/Cas9 çalışmaları, mevcut genom düzenleme teknolojisine göre daha iyi olsa da Firmicutes ve Actinobacteria gibi mikroorganizmalarda hala yeterli düzeye erişememiştir. CRISPR düzenlemesinin temel protokolü, Cas9'un neden olduğu çift sarmallı DNA kırılmalarının çoğu bakteri genomunda ölümcül olaylara neden olmaktadır (77). Bu gerçeğin değiştirilmesi için CRISPR sistemin tüm bakterilerde aydınlatılması gereklidir.

Sonuç

CRISPR-Cas sistemi, bakterilerdeki doğal bir savunma mekanizmasını hassas genetik manipülasyon ve kontrol için güçlü bir araca dönüştürerek genom düzenlenmesinde devrim yaratmıştır. Gen düzenlemedeki temel rolünün ötesinde, CRISPR teknolojisi artık sentetik biyoloji ve metabolik mühendislikte, özellikle de biyoyakıt, ilaç ve gıda üretimi gibi endüstriler için kritik öneme sahip mikroorganizmaların geliştirilmesine öncülük etmektedir. CRISPR-Cas9 ve CRISPR-Cas12a gibi sistemler, *E. coli*, *Corynebacterium glutamicum*, Bacillus ve laktik asit bakteri türleri gibi endüstriyel organizmalarda değerli bileşiklerin üretim verimliliğini artırarak önemli birçok yeniliğin kapısını açmıştır. Bu uygulamalar, CRISPR-Cas'ın biyoyakıt, ilaç ve işlevsel gıdaları geliştirmedeki dönüştürücü potansiyelini vurgulamaktadır. Yine de CRISPR'ın potansiyelinin önünde engeller yok değil: özellikle bazı bakteri türlerinde ölümcül olan çift sarmallı DNA kırılmaları ve *Mycobacterium tuberculosis*

ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi patojenik bakterileri hedeflemedeki sınırlamalar önemli zorluklar olarak görülmektedir. CRISPR gelişmeye devam ettikçe, antimikrobiyal dirençle mücadele, biyo-üretimi optimize etme ve bakteriyel işlevleri keşfetme konusundaki etkileri her geçen gün artacaktır. Gelişmeler devam ettikçe, CRISPR-Cas sistemleri, hem bilimsel araştırmalarda hem de pratik uygulamalarda vazgeçilmez araçlar haline gelecektir.

Kaynaklar

1. Pinilla-Redondo, R., Russel, J., Mayo-Muñoz, D., Shah, S. A., Garrett, R. A., Nesme, J., ... & Sørensen, S. J. (2022). CRISPR-Cas systems are widespread accessory elements across bacterial and archaeal plasmids. *Nucleic acids research*, *50*(8), 4315-4328.
2. Koonin, E. V., & 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.
3. Gong, B., Shin, M., Sun, J., Jung, C. H., Bolt, E. L., Van Der Oost, J., & Kim, J. S. (2014). Molecular insights into DNA interference by CRISPR-associated nuclease-helicase Cas3. Proceedings of the National Academy of Sciences, 111(46), 16359-16364.
4. Macarrón Palacios, A., Korus, P., Wilkens, B. G., Heshmatpour, N., & Patnaik, S. R. (2024). Revolutionizing in vivo therapy with CRISPR/Cas genome editing: breakthroughs, opportunities and challenges. Frontiers in Genome Editing, 6, 1342193.
5. Xu, Y., & Li, Z. (2020). CRISPR-Cas systems: Overview, innovations and applications in human disease research and gene therapy. Computational and structural biotechnology journal, 18, 2401-2415.
6. Akanmu, A. O., Asemoloye, M. D., Marchisio, M. A., & Babalola, O. O. (2024). Adoption of CRISPR-Cas for crop production: present status and future prospects. PeerJ, 12, e17402.
7. Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, *346*(6213), 1258096.
8. Choi, K. R., & Lee, S. Y. (2016). CRISPR technologies for bacterial systems: current achievements and future directions. *Biotechnology Advances*, *34*(7), 1180-1209.
9. Groenen, P. M., Bunschoten, A. E., Soolingen, D. V., & Errtbden, J. D. V. (1993). Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of Mycobacterium tuberculosis; application for strain differentiation by a novel typing method. *Molecular microbiology*, *10*(5), 1057-1065.
10. Cui, Y., Li, Y., Gorgé, O., Platonov, M. E., Yan, Y., Guo, Z., ... & Yang, R. (2008). Insight into microevolution of Yersinia pestis by clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *PloS one*, *3*(7), e2652.
11. 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
12. Lone, B. A., Karna, S. K. L., Ahmad, F., Shahi, N., & Pokharel, Y. R. (2018). CRISPR/Cas9 system: a bacterial tailor for genomic engineering. Genetics research international, 2018(1), 3797214.

13. Zaayman, M., & Wheatley, R. M. (2022). Fitness costs of CRISPR-Cas systems in bacteria. Microbiology, 168(7), 001209.

14. Ilıkkan, Ö. K. (2020). Laktik Asit Bakterilerinde CRISPR/Cas Sisteminin Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliğinde Kullanımı. Akademik Gıda, 18(3), 303-311.

15. Roberts, A., & Barrangou, R. (2020). Applications of CRISPR-Cas systems in lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Reviews, 44(5), 523-537.

16. McKitterick, A. C., LeGault, K. N., Angermeyer, A., Alam, M., & Seed, K. D. (2019). Competition between mobile genetic elements drives optimization of a phage-encoded CRISPR-Cas system: insights from a natural arms race. Philosophical Transactions of the Royal Society B, 374(1772), 20180089.

17. Terns, M. P., & Terns, R. M. (2011). CRISPR-based adaptive immune systems. *Current opinion in microbiology*, *14*(3), 321-327.

18. Nussenzweig, P. M. (2020). Cas9-Primed Adaptive Immunity During the CRISPR-Cas Response.

19. Shah, S. A., & Garrett, R. A. (2011). CRISPR/Cas and Cmr modules, mobility and evolution of adaptive immune systems. Research in Microbiology, 162(1), 27-38.

20. Jansen, R., Embden, J. D. V., Gaastra, W., & Schouls, L. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. Molecular microbiology, 43(6), 1565-1575.

21. Haft, D. H., Selengut, J., Mongodin, E. F., & Nelson, K. E. (2005). A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. PLoS computational biology, 1(6), e60.

22. Tsui, T. K. M., & Li, H. (2015). Structure principles of CRISPR-Cas surveillance and effector complexes. Annual review of biophysics, 44(1), 229-255.

23. Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Alkhnbashi, O. S., Costa, F., Shah, S. A., Saunders, S. J., ... & Koonin, E. V. (2015). An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. *Nature reviews microbiology*, *13*(11), 722-736.

24. Hidalgo-Cantabrana, C., O'Flaherty, S., & Barrangou, R. (2017). CRISPR-based engineering of next-generation lactic acid bacteria. Current opinion in microbiology, 37, 79-87.

25. Makarova, K. S., Gao, L., Zhang, F., & Koonin, E. V. (2019). Unexpected connections between type VI-B CRISPR-Cas systems, bacterial natural competence, ubiquitin signaling network and DNA modification through a distinct family of membrane proteins. FEMS microbiology letters, 366(8), fnz088.

26. Chylinski K, Makarova KS, Charpentier E, Koonin EV (2014) Classifi cation and evolution of type II CRISPR-Cas systems. Nucleic Acids Res 42:6091–6105

27. Fonfara I, Le Rhun A, Chylinski K, Makarova KS, Lecrivain AL, Bzdrenga J, Koonin EV, Charpentier E (2014) Phylogeny of Cas9 determines functional exchangeability of dual- RNA and Cas9 among orthologous type II CRISPRCas systems. Nucleic Acids Res 42:2577–2590

28. Yao, R., Liu, D., Jia, X., Zheng, Y., Liu, W., & Xiao, Y. (2018). CRISPR-Cas9/Cas12a biotechnology and application in bacteria. *Synthetic and systems biotechnology*, *3*(3), 135-149.

29. Smith, E. M., Ferrell, S., Tokars, V. L., & Mondragón, A. (2022). Structures of an active type III-A CRISPR effector complex. *Structure*, *30*(8), 1109-1128.

30. Pyenson, N. C., & Marraffini, L. A. (2017). Type III CRISPR-Cas systems: when DNA cleavage just isn't enough. Current opinion in microbiology, 37, 150-154.

31. Ganguly, C., Rostami, S., Long, K., Aribam, S. D., & Rajan, R. (2024). Unity among the diverse RNA-guided CRISPR-Cas interference mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, 107295.

32. Silas, S., Lucas-Elio, P., Jackson, S. A., Aroca-Crevillén, A., Hansen, L. L., Fineran, P. C., ... & Sánchez-Amat, A. (2018). Correction: Type III CRISPR-Cas systems can provide redundancy to counteract viral escape from type I systems. *Elife*, *7*, e36853.

33. Pinilla-Redondo, R., Mayo-Muñoz, D., Russel, J., Garrett, R. A., Randau, L., Sørensen, S. J., & Shah, S. A. (2020). Type IV CRISPR–Cas systems are highly diverse and involved in competition between plasmids. Nucleic acids research, 48(4), 2000-2012.

34. Özcan, A. (2019). Characterization of the Type IV CRISPR-Cas system of Aromatoleum aromaticum EbN1 (Doctoral dissertation, lmu).

35. Makarova, K. S., & Koonin, E. V. (2015). Annotation and classification of CRISPR-Cas systems. CRISPR: methods and protocols, 47-75

36. Loureiro, A., & da Silva, G. J. (2019). Crispr-cas: Converting a bacterial defence mechanism into a state-of-the-art genetic manipulation tool. Antibiotics, 8(1), 18.

37. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA–guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. science, 337(6096), 816-821.

38. Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A., ... & Charpentier, E. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, *471*(7340), 602-607.

39. Anders, C., Niewoehner, O., Duerst, A., & Jinek, M. (2014). Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. Nature, 513(7519), 569-573.

40. Sternberg, S. H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E. C., & Doudna, J. A. (2014). DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. Biophysical Journal, 106(2), 695a.

41. Szczelkun, M. D., Tikhomirova, M. S., Sinkunas, T., Gasiunas, G., Karvelis, T., Pschera, P., ... & Seidel, R. (2014). Direct observation of R-loop formation by single RNA-guided Cas9 and Cascade effector complexes. Proceedings of the National Academy of Sciences, 111(27), 9798-9803.

42. Swarts, D. C. (2019). Making the cut (s): how Cas12a cleaves target and non-target DNA. Biochemical Society Transactions, 47(5), 1499-1510.

43. Yamano, T., Nishimasu, H., Zetsche, B., Hirano, H., Slaymaker, I. M., Li, Y., ... & Nureki, O. (2016). Crystal structure of Cpf1 in complex with guide RNA and target DNA. Cell, 165(4), 949-962.

44. Fonfara, I., Richter, H., Bratovič, M., Le Rhun, A., & Charpentier, E. (2016). The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA. *Nature*, *532*(7600), 517-521.

45. Swarts, D. C., van der Oost, J., & Jinek, M. (2017). Structural basis for guide RNA processing and seed-dependent DNA targeting by CRISPR-Cas12a. *Molecular cell*, *66*(2), 221-233.
46. East-Seletsky, A., O'Connell, M. R., Knight, S. C., Burstein, D., Cate, J. H., Tjian, R., & Doudna, J. A. (2016). Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2 enable guide-RNA processing and RNA detection. *Nature*, *538*(7624), 270-273.
47. Shmakov, S., Smargon, A., Scott, D., Cox, D., Pyzocha, N., Yan, W., ... & Koonin, E. V. (2017). Diversity and evolution of class 2 CRISPR–Cas systems. Nature reviews microbiology, 15(3), 169-182.
48. Hossain, M. A. (2021). CRISPR-Cas9: A fascinating journey from bacterial immune system to human gene editing. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, *178*, 63-83.
49. Barrangou, R. (2013). CRISPR-Cas systems and RNA-guided interference. Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA, 4(3), 267-278.
50. Lillestøl, R. K., Shah, S. A., Brügger, K., Redder, P., Phan, H., Christiansen, J., & Garrett, R. A. (2009). CRISPR families of the crenarchaeal genus Sulfolobus: bidirectional transcription and dynamic properties. Molecular microbiology, 72(1), 259-272.
51. Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Iranzo, J., Shmakov, S. A., Alkhnbashi, O. S., Brouns, S. J., ... & Koonin, E. V. (2020). Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. Nature Reviews Microbiology, 18(2), 67-83.
52. Rath, D., Amlinger, L., Rath, A., & Lundgren, M. (2015). The CRISPR-Cas immune system: biology, mechanisms and applications. Biochimie, 117, 119-128.
53. Golubov, A. (2016). CRISPR: bacteria immune system. In *Genome stability* (pp. 87-98). Academic Press.
54. Nidhi, S., Anand, U., Oleksak, P., Tripathi, P., Lal, J. A., Thomas, G., ... & Tripathi, V. (2021). Novel CRISPR–Cas systems: an updated review of the current achievements, applications, and future research perspectives. *International journal of molecular sciences*, *22*(7), 3327.
55. Xia, Y., Li, Y., Shen, W., Yang, H., & Chen, X. (2023). CRISPR-Cas Technology for Bioengineering Conventional and Non-Conventional Yeasts: Progress and New Challenges. International Journal of Molecular Sciences, 24(20), 15310.
56. Meliawati, M., Schilling, C., & Schmid, J. (2021). Recent advances of Cas12a applications in bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *105*, 2981-2990.
57. Liu, Z., Dong, H., Cui, Y., Cong, L., & Zhang, D. (2020). Application of different types of CRISPR/Cas-based systems in bacteria. Microbial Cell Factories, 19. https://doi.org/10.1186/s12934-020-01431-z.
58. Li, H., Shen, C. R., Huang, C. H., Sung, L. Y., Wu, M. Y., & Hu, Y. C. (2016). CRISPR-Cas9 for the genome engineering of cyanobacteria and succinate production. Metabolic engineering, 38, 293-302.
59. Xiao, Y., Bowen, C. H., Liu, D., & Zhang, F. (2016). Exploiting nongenetic cell-to-cell variation for enhanced biosynthesis. Nature chemical biology, 12(5), 339-344.
60. Cobb, R. E., Wang, Y., & Zhao, H. (2015). High-efficiency multiplex genome editing of Streptomyces species using an engineered CRISPR/Cas system. ACS synthetic biology, 4(6), 723-728.
61. Zhang, M. M., Wong, F. T., Wang, Y., Luo, S., Lim, Y. H., Heng, E., ... & Zhao, H. (2017). CRISPR–Cas9 strategy for activation of silent Streptomyces biosynthetic gene clusters. Nature chemical biology, 13(6), 607-609.

62. Stout, E. A., Sanozky-Dawes, R., Goh, Y. J., Crawley, A. B., Klaenhammer, T. R., & Barrangou, R. (2018). Deletion-based escape of CRISPR-Cas9 targeting in Lactobacillus gasseri. Microbiology, 164(9), 1098-1111.

63. Song, X., Huang, H., Xiong, Z., Ai, L., & Yang, S. (2017). CRISPR-Cas9D10A nickase-assisted genome editing in Lactobacillus casei. Applied and Environmental Microbiology, 83(22), e01259-17.

64. De Souza, E. L., de Oliveira, K. Á., & de Oliveira, M. E. (2023). Influence of lactic acid bacteria metabolites on physical and chemical food properties. Current Opinion in Food Science, 49, 100981.

65. Wang, Y., Zhang, Z. T., Seo, S. O., Choi, K., Lu, T., Jin, Y. S., & Blaschek, H. P. (2015). Markerless chromosomal gene deletion in Clostridium beijerinckii using CRISPR/Cas9 system. Journal of biotechnology, 200, 1-5.

66. Huang, H., Chai, C., Li, N., Rowe, P., Minton, N. P., Yang, S., ... & Gu, Y. (2016). CRISPR/Cas9-based efficient genome editing in Clostridium ljungdahlii, an autotrophic gas-fermenting bacterium. *ACS synthetic biology*, *5*(12), 1355-1361.

67. Park, J., & Lim, S. (2024). Review of the Proteomics and Metabolic Properties of Corynebacterium glutamicum. Microorganisms, 12(8), 1681.

68. Cleto, S., Jensen, J. V., Wendisch, V. F., & Lu, T. K. (2016). Corynebacterium glutamicum metabolic engineering with CRISPR interference (CRISPRi). ACS synthetic biology, 5(5), 375-385.

69. Zhang, K., Su, L., & Wu, J. (2020). Recent advances in recombinant protein production by Bacillus subtilis. *Annual review of food science and technology*, *11*(1), 295-318.

70. Altenbuchner, J. (2016). Editing of the Bacillus subtilis genome by the CRISPR-Cas9 system. Applied and environmental microbiology, 82(17), 5421-5427.

71. Westbrook, A. (2018). A comprehensive CRISPR-Cas9 toolkit for Bacillus subtilis: development for biomanufacturing applications.

72. Gholizadeh, P., Köse, Ş., Dao, S., Ganbarov, K., Tanomand, A., Dal, T., ... & Samadi Kafil, H. (2020). How CRISPR-Cas system could be used to combat antimicrobial resistance. Infection and drug resistance, 1111-1121.

73. Luo, M., Leenay, R., & Beisel, C. (2016). Current and future prospects for CRISPR-based tools in bacteria. Biotechnology and Bioengineering, 113. https://doi.org/10.1002/bit.25851.

74. Zhang, R., Xu, W., Shao, S., & Wang, Q. (2021). Gene Silencing Through CRISPR Interference in Bacteria: Current Advances and Future Prospects. Frontiers in Microbiology, 12. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.635227.

75. Gomaa, A., Klumpe, H., Luo, M., Selle, K., Barrangou, R., & Beisel, C. (2014). Programmable Removal of Bacterial Strains by Use of Genome-Targeting CRISPR-Cas Systems. mBio, 5. https://doi.org/10.1128/mBio.00928-13.

76. Jacinto, F. V., Link, W., & Ferreira, B. I. (2020). CRISPR/Cas9-mediated genome editing: From basic research to translational medicine. Journal of cellular and molecular medicine, 24(7), 3766-3778.

77. Maltseva, E. A., Vasil'eva, I. A., Moor, N. A., Kim, D. V., Dyrkheeva, N. S., Kutuzov, M. M., ... & Lavrik, O. I. (2023). Cas9 is mostly orthogonal to human systems of DNA break sensing and repair. Plos one, 18(11), e0294683.

CRISPR/CAS9 TEKNOLOJİSİNİ FUNGUSLARDAKİ UYGULAMALARI, GELİŞMELERİ VE ZORLUKLARI

FERİT CAN YAZDIÇ*

Giriş

Funguslar sağlık, gıda ve hayvancılık gibi insan yaşamının çeşitli yönlerinde önemli bir rol oynamaktadır. Bitkilerin beslenmesini ve korunmasını arttırırken, enzim, antibiyotik ve tedavi edici molekül üretmek gibi mekanizmalarla da sayısız faydalar sağlarlar. Funguslar, alkaloitler, polisakkaritler, steroidler ve terpenler gibi endüstriyel ve farmasötik (antibakteriyel ve anti-tümör) önemi olan değerli doğal bileşikler üreten çok yönlü organizmalardır (1). Bitki-fungus etkileşimleri, biyolojik çeşitlilik ve küresel karbon döngüsünün moleküler ekolojinin en önemli halini bizlere gösterir (2). Fungus hücreleri tıpkı bir fabrika gibi çalışarak, ikincil metabolitlerin, proteinlerin ve organik asitlerin büyük ölçekli sentezinde kullanılabilirler. Ancak bu molekülerin funguslar tarafından üretilmesi ve yenilikçi molekülerin sentezi için bazı zorlukların üstesinden gelmek gereklidir (3). Funguslarda, bu zorlukların üstesinden gelmek için son zamanlarda moleküler genetikler birlikte yeni yaklaşımlar ortaya çıkmıştır. Bunların en önemlilerinden birisi genom düzenleme yöntemleridir. Farklı fungus türlerindeki genom bilgileri önemli bulgulara yol açmıştır (4, 5). Örneğin, 1 kb'lik bölgeleri kapsayan gen susturma çalışmaları, funguslardaki çok hücreli aseksüel spor gelişimi gibi fizyolojik süreçleri incelemek için kullanılmıştır. Ancak moleküler yaklaşımların eksikliği, fungus türlerinde metabolik düzenlemenin anlaşılmasını sınırlamış ve genetik yöntemler kullanılarak yeni türlerin geliştirilmesini geciktirmiştir (6-8). Geleneksel genom düzenleme yaklaşımları CRISPR-Cas9 yöntemi ile kıyaslandığında daha verimsiz kalmaktadır. CRISPR/Cas9 sistemi, funguslarda genetik manipülasyon için güçlü bir araç olarak ortaya çıkmış, gen silme, yer değiştirme ve ekleme işlemlerini mümkün kılmıştır (9). Ayrıca Cas9'un enzimatik olarak inaktif versiyonu kullanılarak, transkripsiyonel baskılama ve aktivasyon alanlarıyla birleşmesiyle, genomik diziyi değiştirmeden gen ekspresyonunun modülasyonunu kolaylaştırmıştır. CRISPR inhibisyonu (CRISPRi)

* fcanyazdic@munzur.edu.tr

olarak bilinen bu yaklaşımın, transkripsiyon uzamasını bloke ederek, transkripsiyon faktörü bağlanmasını engelleyerek veya RNA polimeraz transkripsiyon başlangıcına müdahale ederek spesifik genomik lokusların transkripsiyonunu etkili bir şekilde azalttığı gösterilmiştir (10 -12). Bunun tersine, CRISPR aktivasyonu (CRISPRa), transkripsiyonel aktivasyonu arttırmak için dCas9'un VP64/p65/HSF1 gibi aktivasyon alanlarıyla doğrudan birleşmesini içerir (13-15). Bu yaklaşım, funguslar da dahil olmak üzere çeşitli organizmalarda endojen kodlayıcı ve kodlayıcı olmayan genleri aktive etmek için başarıyla kullanılmıştır (16). Örnek verilecek olursa Roux ve arkadaşların (19) yaptıkları bir çalışmada, mikroperfuranon bileşiğinin üretimini artırmak ve dehidromikroperfuranon gibi yeni metabolitleri tanımlamak için *A. nidulans*'ta bir CRISPRa sistemi geliştirdiler. Bu strateji, fungusların, biyofarmasötikler için biyoaktif ürünler veya türevlerin geliştirilmesinde kullanılabilecek değerli ikincil metabolitler üretme konusundaki genetik potansiyelini keşfetme konusunda umut vaat etmektedir (9). Bunu sonucu olarak çeşitli funguslar üzerinde sistematik araştırmalar için hızlı, basit ve uyarlanabilir bir araç olarak görülebilir (18). Bu yöntem, endüstriyel açıdan önemli birçok organizmada genetik mühendisliği mümkün kılmış ve daha önce genomlarında yapılamayan işlemlerin yapılmasını sağlamıştır (17). Kitabın bu bölümü, funguslara yönelik CRISPR-Cas9 yönteminin mevcut ilerlemesine ve bunun endüstriyel açıdan önemli funguslardaki potansiyel uygulamalarına odaklanmayı amaçlamaktadır.

Funguslarda CRISPR/Cas9 Araçlarını Geliştirmeye Yönelik Çeşitli Çalışmalar

Yakın bir zamana kadar, CRISPR/Cas9 sistemi genetik transaformasyon ve moleküler analiz için son derce kullanışlı bir araç olmasının yanında *Basidiomycetes* mantarlarında yapmak son derece zordu (20). Örnek vermek gerekirse bu mantarlardaki gen çalışmalarında düşük verimli homolog rekombinasyon işlemi kullanılıyordu (21). Ancak son zamanlarda bazı *Basidiomycetes* mantarları *Agaricus bisporus, Ganoderma lucidum, Coprinopsis cinerea, Ustilago maydis, Schizophyllum commune, Pseudozyma antarctica ve Rhodosporidium toruloides* gibi örneklerde CRISPR/Cas9'u kullanan protokoller geliştirilmiştir (20). Yine de, *Basidiomycetes* gibi mantarlardaki CRISPR/Cas9 sisteminin kullanımı bakterilere göre çok daha karmaşıktır. Bunun en önemli nedenlerinden birisi sistemde kullanılacak olan Cas9'un hem kodon optimizasyonuna hem de bir nükleer lokalizasyon sinyaline sahip olması gereklidir. Ancak funguslarda CRISPR/Cas9 sistemi, transkripsiyon aktivatörü benzeri efektör nükleazlar (TALEN) ve çinko parmak nükleazları (ZFN) gibi tekniklerle karşılaştırıldığın da daha hızlı, hassas ve çok yönlüdür (18). Dahası, eş zamanlı birden fazla gen düzenlemesi için uygun olması, gerekli bileşenlerin sentetik kılavuz (sg)RNA ve Cas9 ana parçalarından oluşması bu sistemi kullanışlı bir hale getirmektedir. Şimdiye kadar manatarlarla ilgili CRISPR/Cas9 sistemine yönelik yapılan çalışmalar da, birbirinden farklı CRISPR/Cas9 versiyonları geliştirilmiştir (Tablo 1). *S. cerevisiae* mayası, genomu değiştirmek için CRISPR/Cas9'un uygulandığı ilk mantar türüdür (22). Bu mantarın plazmidleri stabil bir şekilde muhafaza

etme yeteneği, CRISPR/Cas9 için araçların geliştirilmesini kolaylaştırmıştır (16). Genellikle çalışmalarda kullanılan bu plazmidler, Cas9 genini içerir ve geçici sgRNA kompleksi transformasyonu ile birleştiğinde çift zincir kırıklar oluşturarak homolog rekombinasyon oranlarını artırmaktadırlar (16). Klinik açıdan önemli olan diğer bir mantar türü olan *Candida albicans*'ta gen manipülasyonu, diğer türlere göre daha zor olmuştur. Bunun nedeni diploid bir yapıya sahip olan bu mantar türünde CRISPR/Cas9 yöntemlerinin geliştirilmesi, homozigot mutasyonlar oluşturmak için etkili bir yol sağlamış ve bu organizmada genom mühendisliğini kolaylaştırmıştır (23).

Tablo 1. *CRISPR gen düzenleme teknolojisinin kullanıldığı bazı fungus örnekleri (Wang ve Coleman'in (16) çalışmasından uyarlanmıştır).*

Stratejiler	Filamentli mantar türleri	Genom düzenleme	
		NHEJ*	**HDRI****
Ekspresyonu için mantar genomuna *Cas9* entegrasyonu	*Beauveria bassiana, Sporisorium scitamineum ve Ustilaginoidea virens*		+
	Blastomyces dermatitidis, Coprinopsis cinerea, Cordyceps militaris, Leptosphaeria maculans, Nodulisporium sp., *Rhizopus delemar ve Ganoderma* spp.	+	
	Fusarium graminearum, Trichoderma reesei ve Myceliophthora spp.	+	+
Cas9 geçici ekspresyonu	*Sclerotinia sclerotiorum*	+	
	Neurospora crassa		+
	Ustilago tricophora ve Fusarium fujikuroi	+	+
Kendini kopyalayan plazmidler (örn. AMA1 tabanlı)	*Alternaria alternata, Aspergillus aculeatus, A. brasiliensis, A. carbonarius, A. luchuensis, A. nidulans, A. niger ve Ustilago maydis*	+	
	Penicillium chrysogenum ve Talaromyces atroroseus		+
	Aspergillus oryzae	+	+
Cas9 RNPs	*Aspergillus fumigatus, Penicillium chrysogenum ve Penicillium decumbens*		+
	Trichoderma reesei	+	
	Fusarium oxysporum, Magnaporthe oryzae, Mucor circinelloides	+	+

Not: *NHEJ (Non-homologous end joining): Homolog olmayan uç birleştirme mekanizması, ** HDRI (Homology-directed repair): Homoloji yönlendirmeli tamir mekanizması.

Basidiomycetes mantarlarında CRISPR/Cas9'un kullanılması, 2016'da yapılan bir çalışmada Yinong Yang ve arkadaşları, *Agaricus bisporus*'ta polifenol oksidazı kodlayan genlerden birini çıkartarak, esmerleşme sürecini yavaşlatıp ve raf ömrünü uzatmalarıyla birlikte gerçekleşmiştir (24). Ancak *A. bisporus*'u tasarlamak için kullanılan CRISPR/Cas9 yöntemi herhangi bir yerde yayınlanmamıştır. Daha

sonrasında yapılan bir çalışmada *Ganoderma lingzhi ve G. lucidum* mantarlarında CRISPR/Cas9 tabanlı bir genom düzenleme protokolü yayınlanmıştır (7). Bu protokolde ura3 geninin CRISPR/Cas9 kılavuzu çift zincirde kırılmaya neden olur ve ardından homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) yoluyla onarım sağlanır, bunun sonucu olarak da hedef bölgelerde kısa eklemeler ve silmeler yapılmasına olanak sunar. Yine aynı yıl CRISPR/Cas9, promotörleri değerlendirmek için *Coprinopsis cinerea*'ya lusiferaz ve GFP'yi başarıyla yerleştiren yüksek verimli bir transformasyon tekniğinin geliştirildi (25). Bu sonuçlara rağmen, sgRNA ve/veya Cas9 ekspresyonu nedeniyle hedeflenen verimlilik yeterli seviyeye ulaşamamıştır. Ancak bu çalışmalar *Basidiomycota* filumunun mantarları için gen düzenleme çalışmalarında CRISPR/Cas9'un kullanılabilir olduğunu göstermiştir (25). Buradaki verimliliği artırmak için, sgRNA'nın transkripsiyonunda tRNA promotörleri kullanılarak sağlanmıştır. Bu yöntem *Aspergillus niger* fungusunda başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Yöntemdeki başarının ana sebebi olarak Cas9 ve sgRNA'nın aynı plazmid üzerinde bulunması gösterilmiştir. Bu durumunda, gen mutasyonları oluşturulmasındaki başarı yaklaşık % 97'lik bir verimliliğe ulaşmaktadır (20, 26). Daha sonraki çalışmalarda, *Schizophyllum commune* mantarlarında gen silinmesinde kullanılmak üzere önceden birleştirilmiş Cas9-sgRNA yapısı başarıyla kullanılmıştır. sgRNA, Cas9 ve bir onarım şablonu, PEG aracılı transformasyon kullanılarak protoplastlara yerleştirilmiştir. Bunun sonucunda başka yöntemlerin aksine, konakçı içinde sgRNA ve Cas9 ifadesini optimize etme ihtiyacı ortadan kaldırılmıştır (27). Rekombinasyon mekanizmasında selektif bir bölge onarım şablonuna dahil edilmiştir. Bu sistem, homolojiye yönelik onarım olarak bilinmektedir. Genellikle, genlerin hassas bir şekilde değiştirilmesi veya ilgilenilen diğer dizilerin yerleştirilmesi için kullanılabilir. Araştırmacılar, 250 bç'lik homoloji dizilerinin, hedef genin etkili bir şekilde değiştirilmesini indüklemek için yeterli olduğunu göstermiştir. Bu sistem kullanılarak *Pseudozyma antarctica*'nın protoplastları verimli bir şekilde dönüştürülmüştür. Cas9 proteini ve seçilebilir bir işaretleyici içeren donör DNA'ya sahip tek bir sgRNA'dan oluşan bir ribonükleoprotein kompleksi ile inkübasyon yoluyla hedeflenen genlerde rekombinasyon gerçekleştirilmiştir (28). Araştırmacılar, ribonükleoprotein karışımının hacminin arttırılmasının dönüşüm verimliliğini arttırdığını ve 100 baz çiftinin üzerinde homoloji dizisine sahip olmanın, bu sistemle verimli homolog rekombinasyonu teşvik etmek için en iyi uygulama olduğunu göstermişlerdir. Ancak homoloji dizilerinin donörü yerleştirmek için aslında gerekli olmadığı belirlenmiştir. *Ustilago maydis*, yakın zamanda başarılı CRISPR/Cas9 tabanlı multipleks gen düzenlemesine kullanılan bir başka model organizmadır; burada virülansı teşvik eden salgılanan efektörleri kodlayan beş gen, tek bir CRISPR plazmidi kullanılarak başarıyla etkisiz hale getirilmiştir (29). İlginç bir şekilde, cas9 geninin yukarısına bir intron ekleyerek, rekombinasyon verimliliğini intron olmadan görülen oranların on katından fazla artırmanın mümkün olduğu ve nihai gen silme oranının %36,7'ye ulaştığı gösterilmiştir (30). Bu yöntem *Armillaria mellea*, *A. bisporus* ve *C. Cinerea* gibi *Basidiomycetes* mantarlarında heterolog gen ekspresyonu elde etmek için kullanılmıştır (31, 32). *Basidiomycetes* mantarlarındaki CRISPR sorunu sadece düşük verimlilik oranları ve yukarıda bahsedildiği gibi dizi eklenmesi değil, aynı zamanda

hedef dışı etkiler, tarama ve seçim sorunları, devam eden genom modifikasyonu durum gibi görünmektedir. Hatta geni onarıldıktan sonra NHEJ'deki değişiklikler, kontrol edilemeyen çerçeve kaymalarına yol açar (20). Scr7 gibi küçük moleküller kullanılarak doğal homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ)'yi engellemek için teknikler geliştirilmiş ve eklediğimiz dizilerde homolojiye yönelik onarımın baskın olmasına izin verilmiştir (33). Bunun gibi teknikler geliştirilmeye devam edecek ve sonunda sadece mantarlara özgün bir CRISPR sistemi geliştirilecektir. PEM-seq adı verilen, yüksek hassasiyete ve verime sahip yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntem de Cas9'un hedef dışı bölgeleri tanımlayabilmesi, hedef bölgedeki CRISPR/Cas9'un kesme verimliliğinin ölçebilir olması ve dolayısıyla da daha verimli Cas9 kesme sahaları bulmak için kullanılabilir olduğu belirtilmiştir (34). Bu teknik henüz *Basidiomycota* filumunun mantarlarında kullanılmamıştır, ancak bunun veya buna benzer bir yöntemin ilerdeki çalışmalarda kullanım potansiyeli bulunmaktadır. CRISPR/Cas9 gelişmeye devam ettikçe kullanım olanağı da gelişecektir ve elinde sonunda bu yöntemi kullanamadığımız canlılarda da özellikle de mantarlarda doğrudan kullanım olanağı bulacaktır. Örneğin, *Aspergillus nidulans* AMA1 dizisini içeren bir plazmidin, *Aspergillus oryzae*'de kullanılmak üzere üretilmiştir, burada ki amaç çoklu kopya ile verimliliği artırmak bunun bir sonucu olarak da Cas9 ve sgRNA'da bir artış sağlamaktır. Ancak burada dikkat edilmesi gereken nokta AMA1 bazlı plazmitlerin özelliği, birkaç tur seçici olmayan alt kültürleme sonrasında hücrelerden 8atılmalarıdır, bu da teorik olarak her alt kültürden sonra işlemin tekrarlanmasını gerektirmektedir (35, 36). Mantarla da CRISPR/Cas9 sisteminin geliştirilmesi, sadece doğal ürünlerin biyosentetik yollarının incelenmesine değil, aynı zamanda endüstriyel uygulamaya sahip mantar türlerinin üretilmesine de yardımcı olacaktır.

Anaerobik Gut Funguslarının CRISPR/Cas9 Uygulamarında Kullanılma Potansiyelleri

Anaerobik gut funguslar (AGF) *Neocallimstigomycota* filumunun tek üyeleridir. Bu şubede yalnızca bir sınıf (*Neocallimastigomycetes*) ve bir takım (*Neocallimastigales*) bulunmaktadır. Şimdiye kadar 22 anaerobik gut fungus cinsi tanımlanmıştır *(Neocallimastix , Piromyces , Caecomyces , Orpinomyces , Anaeromyces , Cyllamyces , Buwchfawromyces , Oontomyces , Pecoramyces , Feramyces , Liebetanzomyces , Agriosomyces , Aklioshbomyces , Capellomyces , Ghazallomyces , Joblinomyces , Khoyollomyces , Tahromyces , Aestipascuomyces , Paucimyces , Astrotestudinimyces ve Testudinimyces),* ancak hepsi bir familyaya altında toplanmaktadır. Bunun en önemli nedeni, tek bir cins ve türe dayalı yeni bir familya önermesinin tavsiye edilmemesidir. *Aklioshbomyces* , *Khoyollomyces* , *Astrotestudinimyces* ve *Testudinimyces* cinsleri bu durumun için en iyi örneklerdir. Ayrıca, *Buwchfawromyces*, *Joblinomyces*, *Tahromyces* ve *Agriosomyces* cinsleri için transkriptomik/genomik bilginin eksikliği de bunları şu anda bir familyaya yerleştirilmesini zorlaştırmaktadır (37, 38). Her ne kadar AGF'ların taksonomik sorunları devam etse de gelişen genomik bilgileri enzim ve metabolik özellikleri açısından son derece zengin olduklarını ortaya çıkarmıştır. AGF'ların benzersiz genomik ve proteomik özellikleri, biyoteknolojide kullanımları için hem

zorluklar hem de fırsatlar sunmaktadır (39). Bitki biyokütlesini değerli ürünlere parçalayabilen geniş karbonhidrat-aktif enzim (CAZymes) repertuarları nedeniyle önemli biyoteknolojik umut vaat etmektedirler. Ancak AGF genomlarının aşırı AT zenginliği, CRISPR ve diğer genetik mühendisliği stratejileri için önemli zorluklar oluşturmaktadır (40). GC içeriği, CRISPR-Cas sistemlerinde olduğu gibi genom düzenleyici nükleazların tanınmasını ve bağlanma verimliliğini etkiler (41). CRISPR tabanlı genom düzenleme yöntemlerinin AGF'lara uyarlanması hassas genetik değişikliklere olanak sağlayabilir. Böylelikle istenen özellikler AGF'lara kazandırılabilir. Son yapılan çalışmalarda incelendiğinde, AGF'larla doğrudan ilişkili CRISPR uygulamasına rastlanmamıştır. Bu açıdan araştırmacılar, kodon optimizasyonu ve CRISPR tabanlı genom düzenlemesinden yararlanarak, endüstriyel uygulamalar için bu organizmaların tüm potansiyelini ortaya çıkarabilirler.

Funguslarda CRISPR/Cas9 Araçlarının Geliştirilmesindeki Zorluklar

Çok sayıda filamentli mantar genomunun dizilenmesine ve mantar çeşitliliğinin ve evriminin anlaşılmasına büyük katkı sağlamasına rağmen, ilgilenilen genleri işlevsel olarak karakterize etmek için gerekli olan ters genetik teknikler, çoğu filamentli mantar için geliştirilebilir. CRISPR/Cas9 aracılı genom düzenlemeyle birlikte, fonksiyonel genomik gibi omik teknolojiler için yeni bir dönemden söz edebiliriz. Filamentli mantar genomlarını düzenlemek için bu teknolojinin kullanılması, genom manipülasyonu için muazzam potansiyelinin habercisi gibi görünmektedir. Mantar krallığındaki canlı çeşitliliği, gen düzenlenme için gerekli olan evrensel bir yöntemin geliştirilmesini zorlaştırmaktadır. Ancak bazı mantar cinsleri için özel olarak CRISPR/Cas9 sistemleri geliştirilmiş ve optimize edilmiştir. Araştırmacılar mantar türlerine özgün bir CRISPR/Cas9 sistemi geliştirme sürecinde birçok zorluklarla karşılaşabilmektedir. Bu zorlukların başında promotör seçimi ve Cas9 geni için en uygun ekspresyon yönteminin belirlenmesi gelmektedir. Cas9 tarafından istenmeyen hedef dışı bölünmenin önüne geçmek için çekirdeğe aktarılması gereklidir. CRISPR/Cas9 sistemlerinin geliştirilmesi sırasında karşılaşılan bu ortak zorlukların üstesinden gelmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır (16). CRISPR-Cas9 sisteminin, mantar türlerinde başarılı bir şekilde uygulanması için Cas9'un ifadesi, kodon optimizasyonu ve proteinin nükleer lokalizasyonu dahil olmak üzere birkaç temel faktöre bağlıdır. Ek olarak, Cas9 ile etkileşim için uygun bir tek kılavuzlu RNA'nın (sgRNA) ekspresyonu esastır. Bununla birlikte, bu unsurları tanıtmak için tüm mantar türlerinde uygulanabilir evrensel bir yöntem henüz belirlenmemiştir (42). Örneğin, insan hücreleri için optimize edilmiş kodonlara sahip Cas9 versiyonlarının *Cryptococcus neoformans* ve *Aspergillus fumigatus*'ta kullanılabilir olduğu gösterilmiş olsa da, CTG kodonunun serin olarak çevrildiği birçok *Candida* türü için daha fazla modifikasyon gereklidir (43, 44). Cas9 ve sgRNA›nın ifadesini yönlendirmek için, düzenleyici unsurların seçimi bir başka önemli husustur. Yakın akraba türler arasında bir miktar kullanım esnekliği olsa

da, türe özgü promotorların kullanılması genellikle daha etkilidir (45). Örneğin, sgRNA, çekirdek lokalizasyonlu kodlamayan RNA yapısı nedeniyle tipik olarak bir RNA polimeraz III (RNA pol III) promotöründen ifade edilir. RNA pol III promotörleri bazı türlerde karakterize edilmiş olsa da, bir genomdaki yeni RNA pol III promotörlerini tanımlamak, transkriptom verileriyle kısmen mümkün olsa da zahmetli bir süreçtir (23). Ayrıca, funguslarda seçilen dağıtım sistemi başka bir karmaşıklık katmanı ekler. Saccharomyces cerevisiae›nin aksine, fungal patojenler doğal olarak plazmid barındırmaz ve dairesel vektörler her zaman stabil değildir. *Candida albicans* ve *C. neoformans* gibi bazı türlerde, vektörlerin transformasyondan önce doğrusallaştırılması gerekir. Ancak, *Candida glabrata*, *C. parapsilosis* ve *A. fumigatus* gibi mantarlardaki otonom olarak replike olan diziler, epizomal plazmidlerin kullanımına izin verir. *Mucorales, zigomycete* mantarlarının en büyük ve en iyi çalışılan takımlarından birisidir. *Mucorales*'te plazmidler genellikle entegre olmazlar. Ancak plazmidler entegre olmayı başarırlarsa, beklenmedik genomik değişikliklere neden olurlar. Bir alternatif, hücrelerin Cas9-sgRNA kompleksi ile doğrudan dönüştürüldüğü, türe özgü ifade veya dağıtım uyarlama ihtiyacını atlayarak in vitro monte edilmiş ribonükleoprotein kompleksleri (RNP'ler) kullanmaktır. Ancak bu yaklaşım daha maliyetlidir ve büyük ölçekli çalışmalar için uygun olmayabilir (46, 47).

Çift zincir kırıkların indüklenmesini takip eden onarım stratejisi de çok önemlidir. Mantar türleri DNA onarım mekanizmaları bakımından farklılık gösterir; bazıları çoğunlukla homolojiye yönelik onarıma (HDR), diğerleri ise homolog olmayan uç birleştirmeye (NHEJ) dayanır. NHEJ ile ilişkili genlerin bozulması bazı türlerde HDR verimliliğini artırabilir, ancak NHEJ-defektif suşlar virülansta azalma gösterebileceğinden bu ideal olmayabilir. CRISPR-Cas9, daha kısa homoloji kollarının kullanılmasına izin vererek homolojiye yönelik onarıma verimliliğini önemli ölçüde artırabilir. Örneğin, *C. albicans*'ta, 50 baz çifti (bp) kadar kısa homoloji kolları, adenin biyosentetik yolunda yer alan bir gen olan ADE2'nin silinmesi için %61 verimlilikle sonuçlanmıştır. Benzer şekilde, *Candida parapsilosis*'te, 30 bp'lik homoloji bölgeleri neredeyse %100 gen düzenleme verimliliği göstermiştir. ADE2 mutantları, sürecin kesintiye uğraması kolonilerde kırmızı ila pembe pigment birikimine yol açtığından, kolay taranmaları nedeniyle genellikle sistemin çalıştığını göstermek için hedef olarak seçilirler (48, 49). Son olarak bu mantarlarda da diğerlerinde olduğu gibi hedef dışı etkileri azaltmak ve verimliliği sağlamak için kılavuz tasarımına yönelik genel önerilere dikkat edilmesi gereklidir. Bazıları EUPaGDT (http://grna.ctegd.uga.edu) veya CHOPCHOP (http://chopchop.cbu.uib.no/) gibi özel genomların yüklenmesine izin veren çok sayıda kılavuz tasarım yazılım programı mevcuttur (42). Günümüzdeki genom düzenleme yöntemlerindeki son gelişmeler canlı hücrelerin bile genomunda hedef bölgelerin değiştirilmesini mümkün kılmıştır (50). Burada daha önceden kullanılmış olan bazı yöntemler özetlenecektir.

Funguslarda CRISPR/Cas9 Tabanlı Gen Silme Yöntemi

Fusarium proliferatum, dünya çapında ekonomik açıdan önemli birçok bitkiyi enfekte eden ve aynı zamanda insanları da etkileye bilen bir bitki patojenidir. Fumonisinler gibi çeşitli mikotoksinler üretirler (51). Günümüzde, mikotoksinlerin biyosentezinden sorumlu anahtar genlerin silinmesi, zahmetli ve zaman alıcı bir işlemdir. *F. proliferatum* protoplastlarında doğrudan kullanılması için yeni bir CRISPR/Cas9 tabanlı genom düzenleme aracı geliştirilmiştir (52). CRISPR-Cas9 sistemi, bölgeye özgü iki Cas9 ribonükleoproteininin aracılık ettiği, hedef geni çevreleyen yalnızca 50 bp'lik bölgeler gerektiren mikrohomoloji rekombinasyonu kullanılan bir sistemdir. Bu yöntem hedef dışı mutasyon riski azaltılmakta ve bunun sonucunda hedef bölgeye bitişik herhangi bir genin değiştirilmesini en az seviyeye indirmektedir. Bu sistem, fumonisin biyosentezinden sorumlu bir gen olan poliketit sentaz genini (FUM1) silmek için kullanmıştır. Üretilen mutant mantarlar fumonisin üretme yeteneğini kaybetmiş ve bunun sonucunda FUM1'in fumonisin biyosentezindeki rolü doğrulanmıştır (53).

Suş ve kültür koşulları: Tüm deneyler için *Fusarium proliferatum* suşu FRC M-3125 kullanılmalıdır. Bu mantarlar spor elde etmek için patates dekstroz agar (PDA) plakaları üzerinde 25°C'de 7 gün boyunca yetiştirilmelidir.

Protoplastların hazırlanması: Sporlar PDA plakalarından toplanmalı ve 10 mL steril su içinde süspanse edilmelidir. Spor süspansiyonu, miselyumu uzaklaştırmak için steril filtreden süzülmelidir. Süzüntü 3.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmeli ve pelet 10 mL enzim solüsyonu (0,6 M KCl, 0,1 M Tris-HCl pH 7,5, 10 mM CaCl2 ve %0,5 (w/v) Trichoderma harzianum'dan elde edilen parçalayıcı enzimle) içinde yeniden süspanse edilmelidir. Süspansiyon 30°C'de 3 saat boyunca hafifçe çalkalanarak inkübe edilmelidir. Protoplastlar yaklaşık 3.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek toplanmalı ve sonrasında 10 mL 0,6 M KCl ile iki kez yıkanmalıdır.

CRISPR-Cas9 plazmidlerinin hazırlanması: Cas9 genini ve sgRNA ekspresyon bölgesini içeren pFC332 plazmidi kullanılmalıdır. FUM1 genini hedefleyen sgRNA dizisi tasarlanmalıdır ve pFC332 plazmidine klonlanmalıdır. Plazmid *Escherichia coli* DH5α hücrelerine transfer edilmeli ve sonrasında pozitif klonlar 50 μg/mL kanamisin içeren LB agarlı petrilerden seçilmelidir. Plazmid, bir plazmid ekstraksiyon kiti kullanılarak pozitif klonlardan ekstrakte edilmelidir.

Protoplastların transformasyonu: Protoplastlar, 1 mL STC tamponu (1,2 M sorbitol, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM $CaCl_2$) içinde süspanse edilmelidir. Protoplast süspansiyonuna pFC332 plazmidi eklenmelidir (1 mL protoplast başına 10 μg plazmid). Süspansiyon buz üzerinde 10 dakika inkübe edilmeli ve ardından 1 mL PEG solüsyonu (%40 (w/v) PEG 4000, 0,6 M sorbitol, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM CaCl2) ile karıştırılmalıdır. Süspansiyon oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilmeli ve ardından rejenerasyon ortamına (0,6 M sorbitol, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM CaCl2, %1,5 (w/v) agar) yayılmalıdır. Plakalar 3 gün boyunca 25°C'de inkübe edilmeli ve transformantlar higromisin B'ye (100 μg/mL) dirençlerine göre seçilmelidir.

Gen düzenlemesinin doğrulanması: Genomik DNA, bir genomik DNA ekstraksiyon kiti kullanılarak transformantlardan ekstrakte edilmelidir. FUM1 geni spesifik primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılmalıdır. PCR ürünleri mutasyonların varlığını doğrulamak için DNA dizileme yapılmalıdır.

Gen ifadesinin analizi: Toplam RNA, bir RNA ekstraksiyon kiti kullanılarak transformantlardan ekstrakte edilmelidir. cDNA, bir cDNA sentez kiti kullanılarak RNA'dan sentezlenmelidir. FUM1 geninin ekspresyonu, spesifik primerler kullanılarak kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) ile analiz edilmelidir.

İstatistiksel analiz: Veriler uygun bir istatistik yöntem ile analiz edilmelidir.

Funguslarda CRISPR/Cas9 Tabanlı Gen Düzenlemesi Yöntemi

Mantar genom verilerindeki artış, yeni metabolitlerin veya ikincil metabolitlerin (SM) biyosentetik olarak üretilmelerindeki karanlık noktaları ortaya çıkarmaktadır. Heterojen ekspresyon metabolitlerden yararlanmak için en etkili yöntemlerden birisi olarak görülmektedir. Bu yöntemde biyosentetik gen kümelerini (BGC'ler) hatasız bir şekilde klonlamak zorunludur. Günümüzde hala mantarlarda büyük DNA bölgelerini manipüle etmeye yönelik çok az etkili teknoloji bulunmaktadır (54). Son yıllarda filamentli mantarlarda hedef gen kümelerindeki değişikliklerin in vitro CRISPR/Cas9 bölünme sistemi geliştirmiştir (54). Bu sistem de dairesel ve doğrusal DNA'lar verimli bir şekilde bölünebilmektedir. Bölge/yer seçimi sınırlaması olmaması nedeniyle restriksiyon enzimlerinin yerine kullanılabilecek bir sistemdir. Bu sistem *N. fischeri* funguslarında gen kümelerinin (*Nrc*) yakalanmasında başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Böylelikle filamentli mantarlardan PCR amplifikasyon adımları olmadan BGC'leri incelemek ve üretmek için önemli bir adım olarak görülmektedir. Sonuç olarak bu sistem funguslarda genomik DNA'ları manipüle etmek için CRISPR/Cas9 tabanlı gen düzenleme yöntemi olarak görülmektedir.

1. **Suşlar ve plazmidler:** *E. coli* Rosetta 2 (DE3) (Merck Millipore) ve *E. coli* EPI300 (Epicentre) bakteri örneği olarak kullanılırken, homolog rekombinasyon için konak olarak *S. cerevisiae* BJ5464-NpgA mayası kullanılmalıdır. Mantar örnekleri olarak da *Neosartorya fischeri* ve *Pestalotiopsis fici*'den yararlanılmalıdır. Hedef bölgeye ve kullanılan plazmidlere (pX330, pYPZ37, pET-28a, pCC1BAC ve pYJF) özgün primerler dizayn edilmelidir.
2. **Cas9'un ekspresyonu ve saflaştırılması:** Cas9 ORF'nin pX330'dan PCR amplifikasyonu ve pET-28a(+) vektörüne eklenmesi yoluyla Cas9 eksprese eden pYJF22 plazmidini oluşturulmalıdır. pYJF22'yi *E. coli* Rosetta 2 (DE3) içine yerleştirin ve rekombinant proteinini saflaştırın.
3. **sgRNA'nın sentezi ve saflaştırılması:** CRISPR kılavuz dizilerini tanımlamak için CRISPR tasarım aracını kullanılmalıdır. Antisens şablonu oligonükleotidinin ileri primer olarak T7 promoter dizisi ve ters primer olarak antisens şablonunun 3' ucu ile PCR amplifikasyonu yoluyla çift sarmallı bir transkripsiyon şablonu hazırlayın. Sentezlenen DNA'yı saflaştırın. Daha sonra bir T7 Yüksek Verimli Transkripsiyon Kiti kullanarak in vitro

transkripsiyon olayını gerçekleştirin. Sentezlenen sgRNA'yı saflaştırın ve RNaz içermeyen su ile 300 -1.000 nM konsantrasyona kadar seyreltin.

4. **Plazmidlerde (pX330 ve pYPZ) için Cas9 endonükleaz basamağı:** İlk basamakta Cas9-sgRNA kompleksleri oluşturulmalıdır. Bunun için, elde edilen sgRNA'lar ile 5X ayrışma tamponu (100 mM HEPES [pH 7.5], 500 mM KCl, 25% glycerol, 5 mM DTT, 2.5 mM EDTA [pH 8.0], 10 mM $MgCl_2$) karıştırılarak, elde edilen reaksiyon karışımını inkübe ediniz. İkinci olarak hedef DNA örnekleri reaksiyon karışımına eklenmeli ve ayrışma reaksiyonu başlatılmalıdır. Doğrusal hale getirilmiş pX330 için Pulsed-Field Jel Electroforez (PFGE) ve dairesel pX330 ve HMW plazmid pYPZ37 için agaroz jel elektroforezi kullanarak ayrışma verimliliğini ve hedef dışı etkiler değerlendirilmelidir.
5. **Mantar DNA'sının Hazırlanması:** *N. fischeri* ve *P. fici* mantar suşlarını patates dekstroz agar ortamında (PDA) 3 gün boyunca kültüre edin. Fenol: kloroform: izoamil alkol kullanarak liyofilize misellerden mantar genomik DNA'sını çıkarın.
6. **Mekik pCC1BAC Vektörlerinin Oluşturulması:** PyrG ve ribo auxotrophy markörleri Nrc-PyrG-F/R ve riboWA-F/R primer çiftleri kullanılarak *A. fumigatus* genomik DNA'sından PCR işlemiyle çoğaltılmalıdır. Daha sonrasında wA geni wAup-Nrc-F/R primerleri kullanılarak *A. nidulans* genomik DNA'sından amplifikasyonu gerçekleştirilmelidir. PCR amplifikasyonu ile hedef gen kümelerinin (Nrc ve Pfma) terminal sekans en az 35 bp örtüşen bazlar içermelidir. pYJF27 ve pYJF28 yapılarını elde etmek için maya homolog rekombinasyon yöntemiyle mekik pCC1BAC vektörlerine terminal dizi örtüşmeleri kullanılarak ligasyon yapılmalıdır. İn vivo Cas9 ayrışmasının uygulaması ve bu iki yapının transformasyon oranını artırmak için NheI ve BamHI restriksiyon enzimleri ile doğrusal bir hale getirin.
7. **Fungal Genomik DNA'sının Cas9 ile Bölünmesi:** Fungal genomik DNA'sı yani *N. fischeri* gDNA'sı yaklaşık 400ng, Nrc-sgRNA1 (30 nM), Nrc-sgRNA2 (30 nM) ve Cas9 endonükleaz (60 nM) bölünme reaksiyonun toplam hacmi 100 µl olacak şekilde ayarlanmalıdır. *P. fici* gDNA'nın bölünme reaksiyonu toplam 100 µl olacak şekilde ayarlanmalıdır. Bunun için reaksiyonda sırasıyla, 7101-sgRNA1 (30 nM), 7101-sgRNA2 (30 nM), Cas9 endonükleaz (60 nM) ve son konsantrasyonlarda farklı miktarlarda DNA (1, 2, 5, 10 ve 20 µg) eklenmelidir. Elde edilen DNA örnekleri yüksek devirde etanol çöktürmesi kullanılarak konsantre edilmelidir [27]. Daha sonrasında, Cas9 tarafından parçalanan *N. fischeri* ve *P. Fici* gDNA'larının tamamının üzerine, 1 µg doğrusal mekik vektörleri pYJF27 veya pYJF28, taze hazırlanmış maya kültürü (BJ5464-NpgA) hücrelerinden (~10^8) 200 µl ve 600 µl solüsyon III (Zymo Research, ABD) reaksiyona eklenmelidir. Homolog rekombinasyon standart protokole göre gerçekleştirilmelidir (Zymo Research). Kolonilerden plazmid izolasyonu yapılarak, Nrc F5/R5

tanı primerleri kullanılarak PCR ile doğrulanmalıdır. Yine *E. coli* transformantlarından ekstrakte edilmiş plazmidler ise restriksiyon enzimleri (KpnI ve NcoI) ile kesilerek doğrulanmalıdır.

8. **Yüksek molekül ağırlıklı (HMW) DNA'nın hazırlanması:** *P. fici* protoplast hücreleri daha önceden Wu ve arkadaşları (2016) tarafından önerilen protokole göre hazırlanmalıdır. Yaklaşık 5×10^8 protoplast peletlerinden gDNA elde edilmelidir.
9. **Jelde Cas9 Kesimi:** Daha önceki basamaktan elde dilen agaroz jel blokları her bir hedef dizi için Cas9 sindirim reaksiyonu gerçekleştirilmelidir. EDTA'yı seyreltmek için Cas9 sindiriminden hemen önce 0,1X yıkama tamponu ile ek yıkama yapılmalıdır. Yıkama tamponu atıldıktan sonra, her tüpe 100 µl 1X bölünme tamponu eklenmeli ve agaroz bloklar 30 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilmelidir. Cas9'un sgRNA'larla reaksiyonları, 60 µl 5X bölünme tamponu, 15 µl DTT (10 mM), 30 µl Pfma-sgRNA1 (300 ng/µl), 30 µl Pfma-sgRNA2 (300 ng/µl), 3 µl Cas9 (20 µM) ve toplam hacim 300 µl olacak şekilde steril su eklenilmeli ve sıcak su banyosunda 37°C'de 20 dakika inkübe edilmelidir. Ardından, hazırlanan ayrışma çözeltisinden 50 µl her bir mikro santrifüj tüpüne eklenmeli ve 37°C'de 2 saat inkübe edilerek Cas9 tarafından agaroz matriksinde difüzyon ve sindirimin gerçekleşmesi sağlanmalıdır. Son olarak, 1 µl GELaz enzimi agaroza yavaşça eklenmeli ve uzun DNA parçalarının kesilmesini önlemek için 10 µl'lik bir uçla çok nazikçe karıştırılarak 45°C'de 30 dakika daha inkübe edilmelidir.
10. **Son İşlemler:** GELaz kesiminden sonra, numune 5 dakika boyunca oda sıcaklığına soğutulmalı ve agaroz hafifçe fiske edilmelidir. Numunelerde sıvı kalırsa, kesilmiş agarozlara eşit hacimde (~170 µl) 5 M $CH_3COO(NH_4)_2$ eklenmeli ve iyice karıştırmalıdır. Ardından, mikro santrifüj tüpüne 4 kat hacimde (~680 µl) oda sıcaklığında etanol eklenmeli ve iyice karışması için birkaç kez hafifçe ters çevrilmelidir. Oda sıcaklığında 2 saat inkübasyondan sonra DNA, oda sıcaklığında 12.000 g'de 15 dakika santrifüj edilerek pelet halinde toplanmalıdır. 70 etanol ile iki kez yıkandıktan sonra, pelet üzerine 20 µl ultra saf su eklenmelidir.

Sonuç

CRISPR/Cas9 sistemi, hedeflenen gen manipülasyonu, genom ve gen ifadesi düzenlemesi için çok yönlü araçlar sunarak mantar genetiği araştırmalarını dönüştürmüştür. Gerek aerobik gerekse anaerobik funguslardaki hedef dışı etkileri ve türlere özgün optimizasyonuna duyulan ihtiyaç gibi zorluklara rağmen, CRISPR/Cas9 mantarlarda –omik süreçlerin ilerlemesi için umut verici bir sistem sunmaktadır. CRISPR-Cas9 gen düzenleme mekanizması, mantarlarda genetik mühendisliğinde devrim yaratarak endüstriyel olarak ilgili suşların geliştirilmesine ve yeni genetik yöntemlerin keşfedilmesine olanak sağlamıştır. Sonuç olarak, CRISPR-Cas9 mekanizması, endüstriyel biyoteknoloji açısından önemli sonuçlar doğuracak şekilde mantarlarda genom düzenleme için yeni olanaklar açmıştır.

Mantarlar aleminde bu teknolojinin tam potansiyelini keşfetmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Kaynaklar

1. Qin, H., Xu, J. W., Xiao, J. H., Tang, Y. J., Xiao, H., & Zhong, J. J. (2016). Cell factories of higher fungi for useful metabolite production. Bioreactor Engineering Research and Industrial Applications I: Cell Factories, 199-235.
2. Zhou, Z., Wang, C., & Luo, Y. (2018). Effects of forest degradation on microbial communities and soil carbon cycling: a global meta-analysis. *Global Ecology and Biogeography*, *27*(1), 110-124.
3. Meyer, V., Andersen, M. R., Brakhage, A. A., Braus, G. H., Caddick, M. X., Cairns, T. C., ... & Head, R. M. (2016). Current challenges of research on filamentous fungi in relation to human welfare and a sustainable bio-economy: a white paper. *Fungal biology and biotechnology*, *3*, 1-17.
4. Ma, L. J., & Fedorova, N. D. (2010). A practical guide to fungal genome projects: strategy, technology, cost and completion. Mycology, 1(1), 9-24.
5. Pohl, C., Kiel, J. A., Driessen, A. J., Bovenberg, R. A., & Nygard, Y. (2016). CRISPR/Cas9 based genome editing of Penicillium chrysogenum. *ACS Synthetic Biology*, *5*(7), 754-764.
6. Wenderoth, M., Pinecker, C., Voß, B., & Fischer, R. (2017). Establishment of CRISPR/Cas9 in Alternaria alternata. Fungal Genetics and Biology, 101, 55-60.
7. Qin, H., Xiao, H., Zou, G., Zhou, Z., & Zhong, J. J. (2017). CRISPR-Cas9 assisted gene disruption in the higher fungus Ganoderma species. Process Biochemistry, 56, 57-61.
8. Satish, L., Shamili, S., Muthubharathi, B. C., Ceasar, S. A., Kushmaro, A., Singh, V., & Sitrit, Y. (2020). CRISPR-Cas9 system for fungi genome engineering toward industrial applications. In *Genome Engineering via CRISPR-Cas9 System* (pp. 69-81). Academic Press.
9. Jiang, C., Lv, G., Tu, Y., Cheng, X., Duan, Y., Zeng, B., & He, B. (2021). Applications of CRISPR/Cas9 in the synthesis of secondary metabolites in filamentous fungi. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 638096.
10. Larson, M. H., Gilbert, L. A., Wang, X., Lim, W. A., Weissman, J. S., and Qi, L. S. (2013). CRISPR interference (CRISPRi) for sequence-specific control of gene expression. Nat. Protocols 8, 2180–2196. doi: 10.1038/nprot.2013.132
11. Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science 346:1258096. doi: 10.1126/ science.1258096
12. Piatek, A., Ali, Z., Baazim, H., Li, L., Abulfaraj, A., Al-Shareef, S., ... & Mahfouz, M. M. (2015). RNA-guided transcriptional regulation in planta via synthetic dC as9-based transcription factors. *Plant biotechnology journal*, *13*(4), 578-589.
13. Bikard, D., Jiang, W., Samai, P., Hochschild, A., Zhang, F., and Marraffini, L. A. (2013). Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system. Nucleic Acids Res. 41, 7429–7437.doi: 10.1093/nar/gkt520

14. Jia, Y., Xu, R. G., Ren, X., Ewen-Campen, B., Rajakumar, R., Zirin, J., ... & Ni, J. Q. (2018). Next-generation CRISPR/Cas9 transcriptional activation in Drosophila using flySAM. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(18), 4719-4724.

15. Strezoska, Ž., Dickerson, S. M., Maksimova, E., Chou, E., Gross, M. M., Hemphill, K., ... & van Brabant Smith, A. (2020). CRISPR-mediated transcriptional activation with synthetic guide RNA. Journal of Biotechnology, 319, 25-35.

16. Wang, Q., & Coleman, J. J. (2019). Progress and challenges: development and implementation of CRISPR/Cas9 technology in filamentous fungi. *Computational and structural biotechnology journal*, *17*, 761-769.

17. Donohoue, P. D., Barrangou, R., & May, A. P. (2018). Advances in industrial biotechnology using CRISPR-Cas systems. *Trends in biotechnology*, *36*(2), 134-146.

18. Deng, H., Gao, R., Liao, X., & Cai, Y. (2017). CRISPR system in filamentous fungi: current achievements and future directions. *Gene*, *627*, 212-221.

19. Roux, I., Woodcraft, C., Hu, J., Wolters, R., Gilchrist, C. L., & Chooi, Y. H. (2020). CRISPR-mediated activation of biosynthetic gene clusters for bioactive molecule discovery in filamentous fungi. *ACS synthetic biology*, *9*(7), 1843-1854.

20. Alberti, F., Kaleem, S., & Weaver, J. A. (2020). Recent developments of tools for genome and metabolome studies in basidiomycete fungi and their application to natural product research. *Biology Open*, *9*(12), bio056010.

21. Ohm, R. A., de Jong, J. F., Berends, E., Wang, F., Wösten, H. A., & Lugones, L. G. (2010). An efficient gene deletion procedure for the mushroom-forming basidiomycete Schizophyllum commune. World journal of microbiology and biotechnology, 26, 1919-1923.

22. DiCarlo, J. E., Norville, J. E., Mali, P., Rios, X., Aach, J., & Church, G. M. (2013). Genome engineering in Saccharomyces cerevisiae using CRISPR-Cas systems. Nucleic acids research, 41(7), 4336-4343.

23. Ng, H., & Dean, N. (2017). Dramatic improvement of CRISPR/Cas9 editing in Candida albicans by increased single guide RNA expression. *Msphere*, *2*(2), 10-1128.

24. Waltz, E. (2016). Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation. *Nature*, *532*(7599), 293.

25. Sugano, S. S., Suzuki, H., Shimokita, E., Chiba, H., Noji, S., Osakabe, Y., & Osakabe, K. (2017). Genome editing in the mushroom-forming basidiomycete Coprinopsis cinerea, optimized by a high-throughput transformation system. *Scientific reports*, *7*(1), 1260.

26. Song, L., Ouedraogo, J. P., Kolbusz, M., Nguyen, T. T. M., & Tsang, A. (2018). Efficient genome editing using tRNA promoter-driven CRISPR/Cas9 gRNA in Aspergillus niger. *PloS one*, *13*(8), e0202868.

27. Jan Vonk, P., Escobar, N., Wösten, H. A., Lugones, L. G., & Ohm, R. A. (2019). High-throughput targeted gene deletion in the model mushroom Schizophyllum commune using pre-assembled Cas9 ribonucleoproteins. *Scientific reports*, *9*(1), 7632.

28. Kunitake, E., Tanaka, T., Ueda, H., Endo, A., Yarimizu, T., Katoh, E., & Kitamoto, H. (2019). CRISPR/Cas9-mediated gene replacement in the basidiomycetous yeast Pseudozyma antarctica. *Fungal Genetics and Biology*, *130*, 82-90.

29. Schuster, M., Schweizer, G., & Kahmann, R. (2018). Comparative analyses of secreted proteins in plant pathogenic smut fungi and related basidiomycetes. *Fungal Genetics and Biology*, *112*, 21-30.

30. Liu, K., Sun, B., You, H., Tu, J. L., Yu, X., Zhao, P., & Xu, J. W. (2020). Dual sgRNA-directed gene deletion in basidiomycete Ganoderma lucidum using the CRISPR/Cas9 system. *Microbial biotechnology*, *13*(2), 386-396.

31. Burns, C., Gregory, K. E., Kirby, M., Cheung, M. K., Riquelme, M., Elliott, T. J., ... & Foster, G. D. (2005). Efficient GFP expression in the mushrooms Agaricus bisporus and Coprinus cinereus requires introns. *Fungal Genetics and Biology*, *42*(3), 191-199.

32. Ford, K. L., Baumgartner, K., Henricot, B., Bailey, A. M., & Foster, G. D. (2016). A native promoter and inclusion of an intron is necessary for efficient expression of GFP or mRFP in Armillaria mellea. *Scientific Reports*, *6*(1), 29226.

33. Maruyama, T., Dougan, S. K., Truttmann, M., Bilate, A. M., Ingram, J. R., & Ploegh, H. L. (2015). Inhibition of non-homologous end joining increases the efficiency of CRISPR/Cas9-mediated precise [TM: inserted] genome editing. *Nature biotechnology*, *33*(5), 538.

34. Yin, J., Liu, M., Liu, Y., Wu, J., Gan, T., Zhang, W., ... & Hu, J. (2019). Optimizing genome editing strategy by primer-extension-mediated sequencing. *Cell discovery*, *5*(1), 18.

35. Gems, D., Johnstone, I. L., & Clutterbuck, A. J. (1991). An autonomously replicating plasmid transforms Aspergillus nidulans at high frequency. *Gene*, *98*(1), 61-67.

36. Katayama, T., Nakamura, H., Zhang, Y., Pascal, A., Fujii, W., & Maruyama, J. I. (2019). Forced recycling of an AMA1-based genome-editing plasmid allows for efficient multiple gene deletion/integration in the industrial filamentous fungus Aspergillus oryzae. *Applied and Environmental Microbiology*, *85*(3), e01896-18.

37. Hess, M., Paul, S. S., Puniya, A. K., Van der Giezen, M., Shaw, C., Edwards, J. E., & Fliegerová, K. (2020). Anaerobic fungi: past, present, and future. Frontiers in Microbiology, 11, 584893.

38. Hanafy, R. A., Wang, Y., Stajich, J. E., Pratt, C. J., Youssef, N. H., & Elshahed, M. S. (2023). Phylogenomic analysis of the Neocallimastigomycota: proposal of Caecomycetaceae fam. nov., Piromycetaceae fam. nov., and emended description of the families Neocallimastigaceae and Anaeromycetaceae. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *73*(2), 005735.

39. Pratt, C. J., Meili, C. H., Jones, A. L., Jackson, D. K., England, E. E., Wang, Y., ... & Youssef, N. H. (2024). Anaerobic fungi in the tortoise alimentary tract illuminate early stages of host-fungal symbiosis and Neocallimastigomycota evolution. *Nature Communications*, *15*(1), 2714.

40. Seppälä, S., Lankiewicz, T. S., Saxena, M., Henske, J. K., Salamov, A. A., Grigoriev, I. V., & O'Malley, M. A. (2020). Genomic and proteomic biases inform metabolic engineering strategies for anaerobic fungi. *Metabolic engineering communications*, *10*, e00107.

41. Sander, J. D., & Joung, J. K. (2014). CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. Nature biotechnology, 32(4), 347-355.

42. Morio, F., Lombardi, L., & Butler, G. (2020). The CRISPR toolbox in medical mycology: State of the art and perspectives. *PLoS pathogens*, *16*(1), e1008201.

43. Fuller, K. K., Chen, S., Loros, J. J., & Dunlap, J. C. (2015). Development of the CRISPR/Cas9 system for targeted gene disruption in Aspergillus fumigatus. *Eukaryotic cell*, *14*(11), 1073-1080.

44. Wang, F., Wang, C., Liu, P., Lei, C., Hao, W., Gao, Y., ... & Zhao, K. (2016). Enhanced rice blast resistance by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the ERF transcription factor gene OsERF922. *PloS one*, *11*(4), e0154027.

45. Norton, E. L., Sherwood, R. K., & Bennett, R. J. (2017). Development of a CRISPR-Cas9 system for efficient genome editing of Candida lusitaniae. *MSphere*, *2*(3), 10-1128.

46. Krappmann, S. (2016). CRISPR-Cas9, the new kid on the block of fungal molecular biology. *Medical mycology*, myw097.

47. Al Abdallah, Q., Ge, W., & Fortwendel, J. R. (2017). A simple and universal system for gene manipulation in Aspergillus fumigatus: in vitro-assembled Cas9-guide RNA ribonucleoproteins coupled with microhomology repair templates. *Msphere*, *2*(6), 10-1128.

48. Vyas, V. K., Bushkin, G. G., Bernstein, D. A., Getz, M. A., Sewastianik, M., Barrasa, M. I., ... & Fink, G. R. (2018). New CRISPR mutagenesis strategies reveal variation in repair mechanisms among fungi. *MSphere*, *3*(2), 10-1128.

49. Lombardi, L., Oliveira-Pacheco, J., & Butler, G. (2019). Plasmid-based CRISPR-Cas9 gene editing in multiple Candida species. *Msphere*, *4*(2), 10-1128.

50. Hsu, P. D., Scott, D. A., Weinstein, J. A., Ran, F. A., Konermann, S., Agarwala, V., ... & Zhang, F. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. Nature biotechnology, 31(9), 827-832.

51. Greeff-Laubscher, M. R., Beukes, I., Marais, G. J., & Jacobs, K. (2020). Mycotoxin production by three different toxigenic fungi genera on formulated abalone feed and the effect of an aquatic environment on fumonisins. *Mycology*, *11*(2), 105-117.

52. Ferrara, M., Haidukowski, M., Logrieco, A. F., Leslie, J. F., & Mulè, G. (2019). A CRISPR-Cas9 system for genome editing of Fusarium proliferatum. *Scientific reports*, *9*(1), 19836.

53. Yu, F., Zhu, X., & Du, L. (2005). Developing a genetic system for functional manipulations of FUM1, a polyketide synthase gene for the biosynthesis of fumonisins in Fusarium verticillioides. *FEMS microbiology letters*, *248*(2), 257-264.

54. Xu, X., Feng, J., Zhang, P., Fan, J., & Yin, W. B. (2020). A CRISPR/Cas9 cleavage system for capturing fungal secondary metabolite gene clusters. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *31*(1), 8.

BİTKİLERDE CRISPR/CAS9 SİSTEMİNİN KULLANIMI

NESLİHAN TAŞAR*

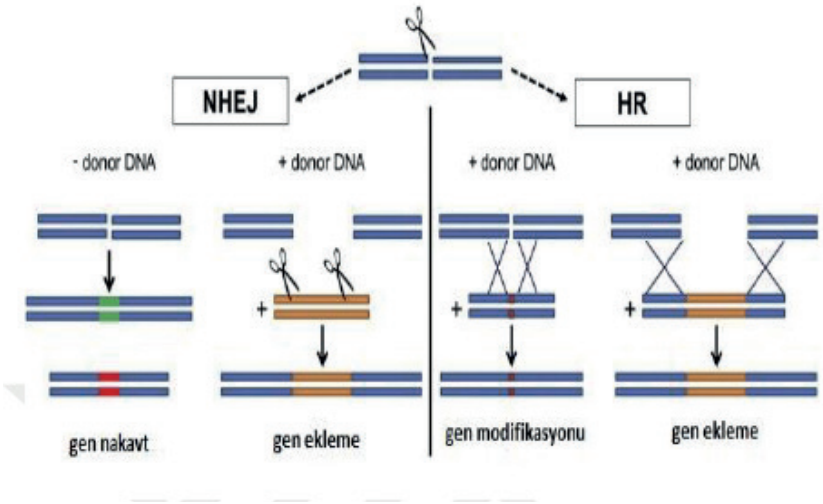
Giriş

Hızla artan dünya nüfusunun besin ihtiyacını karşılamak için, tarım alanlarındaki ürün verimliliğini arttırmak çok önemlidir. 2050 yılına gelindiği zaman dünya nüfusunun 9 milyardan daha fazla olması beklenmektedir. Bu artışla birlikte tarımsal ürün isteklerinin karşılanamamasının, dünyanın her yerinde büyük sorun haline gelmesi beklenmektedir (1). Sadece klasik metotlarla bitki yetiştirme yöntemlerini kullanmak, bu problemleri çözmek için mümkün değildir. Genetik mühendisliği, tarım alanındaki verimliliği ve sürdürülebilirliği geliştirmek için benzersiz fırsatlar sunabilmektedir. Gelecekteki tarım uygulamalarının en önemli anahtarlarından biri yetiştirilen bitkilerdeki genetik çeşitliliktir. Bununla birlikte genetik mühendisliği, değişen çevre koşullarına ve biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı adaptasyonu arttırabilen ürünler yetiştirmeye imkân sağlar. Tarım alanındaki mevcut zorluklarla başa çıkabilmek için, Genetik olarak modifiye edilmiş bitkileri başarılı bir şekilde yetiştirmek gerekmektedir. Bugünkü biyolojik araştırmalar için en güçlü yöntemlerden bir tanesi genom düzenleme teknolojisini kullanmaktır. Daha fazla araştırma ve geliştirme ile bu genom düzenleme yöntemleri, verimli bitkiler elde etmek için hedeflenen geni ekleme gibi yöntemleri kullanarak bitki genetiği ile ilgilenen mühendisler tarafından kullanılacak ve bilime katkı sağlayacaktır.

Genetik mühendisliği için birden fazla genom düzenleme aracı kullanılabilir. Bunlar; dizi spesifik nükleazlar, ZFNs yani Zinc Finger Nuclease olarak adlandırılan Çinko parmak proteinler; TAL efector nuclease şeklinde tanımlanan TAL effektör

* ntasar@munzur.edu.tr

nükleaz ve CRSPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) sistemleri şeklinde sıralanabilir. Her sistemin ayrıntıları farklı olmakla birlikte, bu üç nükleaz grubunun temel yaklaşımı benzerdir. Her durumda nükleazlar, DNA restriction (kesme) enzimleri gibi, genom üzerinde değişiklik meydana getirilecek bölgede DNA'yı çift iplikli olacak şekilde kırarlar. Elde edilen bu çift zincirli DNA kırıkları (DSB'ler) öncelikle hücre içinde DNA tamir mekanizmalarından HR, Homolog Rekombinasyon ya da NHEJ, Homolog Olmayan Uçların Birleşmesi ile tamir edilir. Bu tamir mekanizmalarından hangisinin kullanılacağı hedeflenen gen replasmanına, hedeflenen yabancı genin eklenmesi veya hedeflenen gen silinmesi gibi farklı sonuçlar oluşturacağından genomda farklı modifikasyonlar meydana getirir. Bu olay şekil 1 de anlatılmıştır. Tamir sırasında homolog olmayan uçların birleşmesi (NHEJ) homolog rekombinasyona (HR) baskın olduğundan tamir olaylarının neredeyse tamamı Homolog Olmayan Uçların Birleşmesi yoluyla gerçekleşir. Bu yöntemle DNA'nın kesilen bölgesinde nükleotid kayıpları ve fazladan nükleotid kazanımı oldukça yaygındır. Homolog Olmayan Uçların Birleşmesiyle meydana gelen bu hatalı tamir neticesinde DNA molekülleri üzerinde büyük bölgelerin silinmesine, nükleotid artışı ve azalması nedeniyle okuma yönünün kaymasına (frame-shift) ve oluşan mutasyon nedeniyle hedef bölgedeki gen ifadesinin farklılaşmasına neden olmaktadır (2, 3).



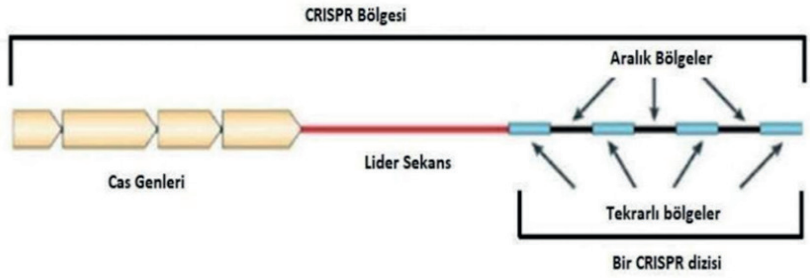
Şekil 1. Ökaryotik hücrelerde, nükleazlar tarafından oluşturulan çift sarmallı kırılmaların (DSB'ler) NHEJ ve HR mekanizmaları ile onarımı (4).

Gen aktarım olayı, gen üzerindeki nükleotid dizisinin değiştirilmesi, , DNA eklenerek genin baskılanması gibi olayları gerçekleştirmek için Homolog rekombinasyondan yararlanmak suretiyle yapılmak istenen modifikasyon çalışmalarında genom üzerinde hücre içinde hedeflenen bölgeyle homolog diziler bulunduran bir donör parça gönderilir ve HR mekanizması sayesinde bu parça genom içerisine

yerleştirilebilir. Bununla birlikte somatik hücrelerde kesilen kromozomların tamiri NHEJ yoluyla gerçekleştirilmektedir. NHEJ yöntemi insanlar ve bitkiler gibi ileri yapılı ökaryotik canlılarda baskın olan tamir mekanizmasıdır (5). CRSPR/Cas9 teknolojisi de temelde bu tamir mekanizmalarının oluşumuna dayanır.

Crspr/Cas9 Sistemi, Mekanizması ve Fonksiyonları

Son zamanlarda hızla çığır açan, hızlı ve verimli bir şekilde genom düzenlemesi imkanı sağlayan bitkilerde dâhil olmak üzere farklı organizmalar üzerinde kullanılabilen CRISPR / Cas9 olarak adlandırılan yeni bir genom düzenleme teknolojisi geliştirildi. Bu teknolojinin istenilen hedefe odaklanması, özgün ve özellikli mutasyonlara imkan sağlaması genom düzenleme çalışmalarında etkili bir şekilde kullanılmasını sağlamaktadır (6). Bu yeni teknolojinin detaylı bir şekilde tanımı şöyledir. Canlı organizmalarda hastalık meydana getiren virüsler ve diğer patojenler ile bunların konakları arasındaki etkileşimin bir sonucu olarak bağışıklık sistemi (immün sistem) oluşmaktadır. Bağışıklık sistemi, canlının kendi hücrelerini organizmaya giren yabancı hücrelerden ayırt edebilmesi ve bu yabancı hücreleri etkisiz hale getirebilmek için spesifik hücre, protein ve etki mekanizmalarının tümüne verilen isimdir. Organizmaya nüfuz eden patojenlerin (hastalık yapan organizmalar) yapısını tanıyan doğuştan gelen bağışıklık sisteminin yanı sıra, sonradan organizmaya giren istilacılara karşı immünolojik hafıza oluşturma yeteneğindeki kazanılmış (edinilmiş) bağışıklık sistemi de mevcuttur. CRISPR sistemi bakteri ve arkealarda virüs ve patojenlere karşı savunma oluşturmak için geliştirdiği kazanılmış bağışıklık sisteminde görev alan proteinler olarak keşfedilmiştir Yani dilimize Düzenli Aralıklarla Bölünmüş Palindromik Tekrar Kümeleri olarak geçen CRISPR (clustered regularly interspaced palindromic repeats) teknolojisi, organizmaların genetik materyali üzerinde CRISPR bölgesini oluşturan gen dizileridir şeklinde tanımlanır. Bu lokuslar sırasıyla cas genleri, ardından gelen lider sekans onu takip eden tekrarlı bölgeler ve aralıklı bölgelerden oluşur. Tekrar eden bu bölgeler bir organizma için tamamen aynı olabilirken, tekrarlı dizilerin arasına yerleşen aralıklı bölgeler farklılık göstermektedir. Cas olarak adlandırılan bölge ise bağışıklık sisteminde görev yapan proteinlere verilen isimdir.



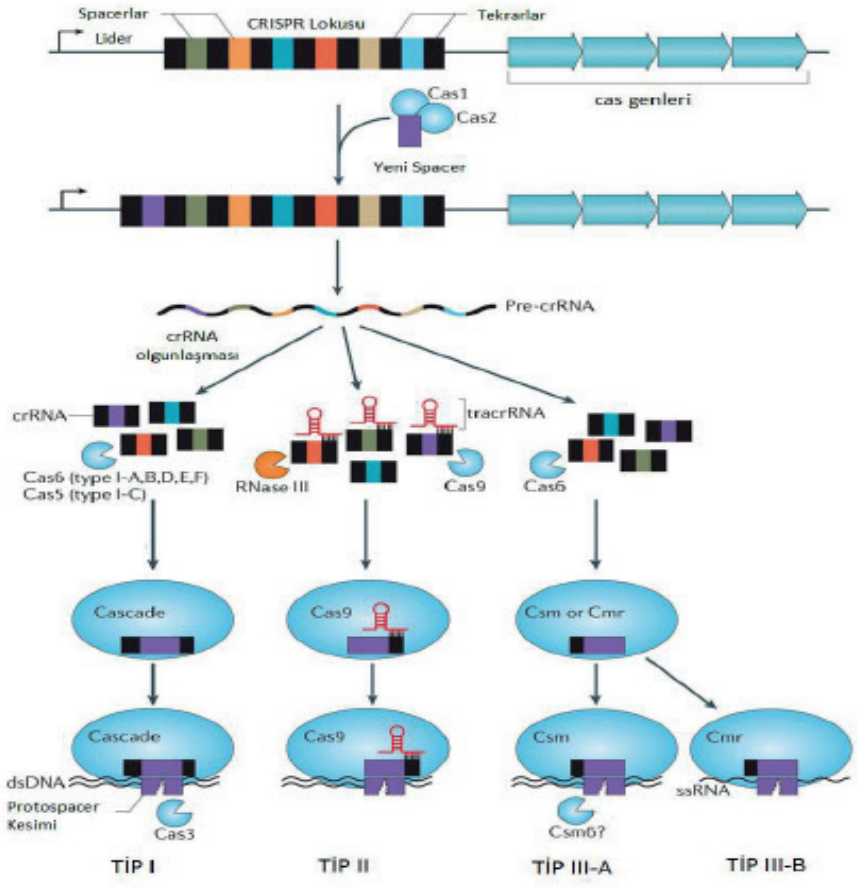
Şekil 2. CRISPR bölgesinin yapısı

Bu sistemde Cas proteinlerini 4 grupta inceleyebiliriz.

- Nükleaz ve rekombinaz proteinleri; bu proteinler ilk olarak yeni bir virüsle karşılaşıldığında aralık bölgelerinin oluşmasını sağlar.
- ribonükleaz enzimleri; RNA (crRNA) tanımlanmasında ve işlenmesinde görev alır.
- Sentezlenen crRNA'lar ile iletişime geçip crRNA oluşturulmasını sağlayan ve ortamdaki yabancı DNA'nın belirlenmesinde görev yapan proteinler bulunmaktadır.
- Nükleazlar; ortamdaki yabancı DNA'ların parçalanmasını sağlar.

Farklı yapıdaki bu Cas proteinlerinin varlığı birden fazla CRISPR-Cas alt tipinin tanımlanmasını sağlamıştır. (7). CRISPR-Cas sistemleri farklı yapıda Cas proteinlerinin bulunmasına ve CRISPR lokusunun sayısına göre Tip I, Tip II ve Tip III şeklinde üç ana başlıkta ve 11 alt başlıkta gruplandırılmıştır (8,9).

Aşağıdaki şekilde CRISPR-Cas sistemlerinin crRNA biyogenez ve hedeflendirme mekanizmaları verilmiştir.



Şekil 3. CRISPR sistemlerinin moleküler mekanizması (10).

Cas proteinleri; crRNA'yı meydana getirip, yabancı nükleik asitlerin belirlenmesi ve parçalanmasında görev aldığı için her CRISPR tipinin moleküler mekanizması farklılık göstermektedir (11). Tip I ve Tip III CRISPR mekanizmasında, küçük crRNA'ları oluşturmak üzere pre-crRNA'ların tekrar eden dizilerinin endoribonükleolitik kesimi Cas6 nükleaz proteinleri tarafından yapılmaktadır. (12). Tip I CRISPR mekanizmasında, sentezlenen crRNA, Cas3 ve Kaskat proteinleri ile bir araya gelerek yabancı DNA'yı kesmektedir, Tip III CRISPR mekanizmasında ise pre-crRNA'dan meydana gelen crRNA, Cmr/Cas10 veya Csm/Cas10 proteinleri ile birleşerek, yabancı DNA'yı kesmektedir. Tip II sistemi, mekanizması en iyi bilinen CRISPR sistemdir. Bu sistemde, kodlama yapmayan trans-aktive edici CRISPR

RNA olarak adlandırılan ikinci bir RNA (tracrRNA)), endonükleaz Cas9 enzimi ile birlikte bir ribonükleoprotein kompleksi oluşturur. Bu protein birleşmesi ile istilacı DNA tanımlanır ve kesilir (13). Tek bir canlı üzerinde farklı tip CRISPR-Cas sistemleri birlikte çalışabilir. (14).

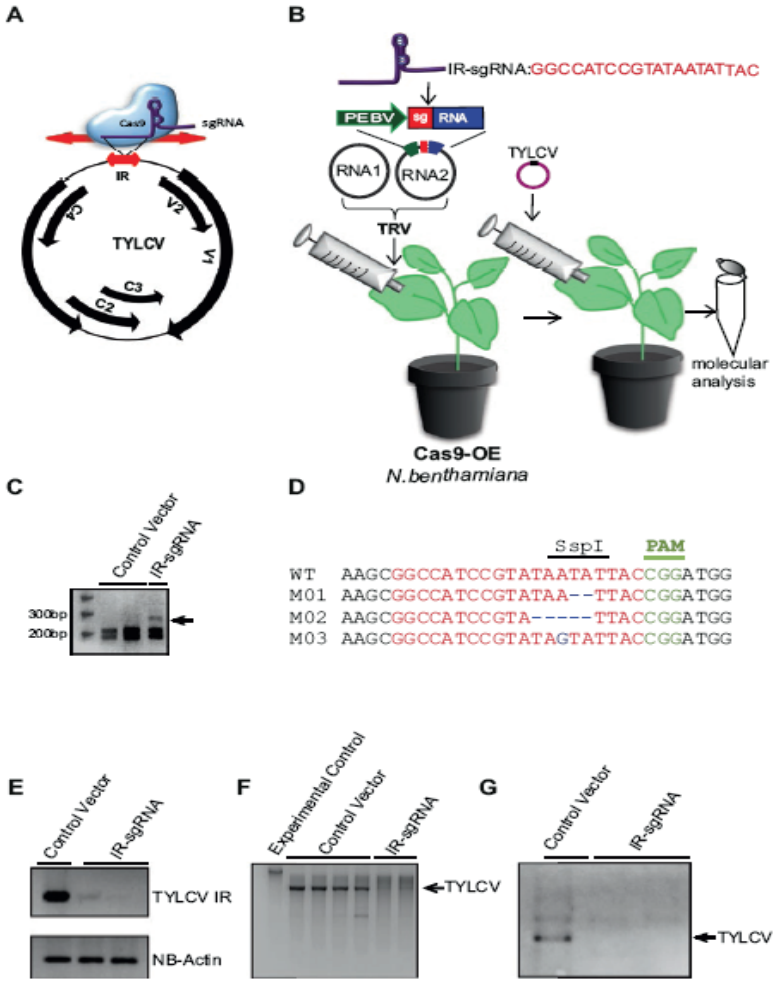
Çalışma mekanizması bu şekilde aydınlatılan bu teknoloji ilk olarak 1987 yılında, E. coli bakterisi üzerinde K12 genomunda alkalin fosfataz izozim dönüşümünden sorumlu iap genine yakın intergenik bölgede keşfedilmiş ve bu iap geni klonlanıp dizilenmiştir (15) tanımlanan bu lokusun, arkea ve bakteri genomuna yerleştiği anlaşılmıştır. Daha sonra, birçok araştırıcı tarafından farklı türdeki prokaryotlarda da benzer şekilde bu tekrar bölgelerin bulunduğu anlaşılmıştır. (16). CRISPR/Cas sistemi çalışma yapılan bakterilerin %40'ında arkeaların ise %90'ında belirlenmiştir. İncelenen organizmalar üzerinde CRSPR/Cas mekanizmasının, bağışıklık sistemine adaptasyon sağladığı ve yabancı kaynaklı genetik faktörlere karşı organizmayı koruduğu ispatlanmış ve CRSPR/Cas sistemini oluşturan sistem aydınlatılmıştır (17). Ayrıca bu teknoloji diğer yöntemlerle kıyaslandığında daha basittir ve maliyet olarak daha düşük paralar gerektirir. Ayrıca genetik mühendisliği ile ilgili araştırmalar için yeni fırsatlar ortaya çıkarmaktadır (18).

Bitkilerde Crispr/Cas9 Aracılı Genom Düzenleme Uygulamaları

Botanik insanları son zamanlarda CRISPR/Cas9 adı verilen yeni teknoloji üzerinde detaylı araştırmalar yapmaktadır. Bu sistem DNA tanıma bölgesi için RNA-DNA baz komplementerliğini kullanır. Böyle bir teknolojinin ortaya çıkarılması ile birlikte, bitki gen aktivitelerinde hassas manipülasyonların yapılabilmesi yönünde iyileştirmeler yapılmaktadır (19-21). CRISPR / Cas9, basitliği, çok yönlülüğü ve özgüllüğü nedeniyle özellikle çeşitli tarımsal bitkilerde uygulanan güçlü bir genom düzenleme teknolojisidir. 2013 yılından beri bilim insanları tarafından mekanizması aydınlatılan CRISPR-Cas9 sistemi, ilk olarak bazı bakteriler ve arkealarda keşfedilmiş, bakterileri enfekte eden virüslerin sebep olduğu hastalıkları ve yabancı nükleik asitlere karşı hücreyi korumayı sağlayan RNA ve protein tabanlı bir teknoloji olarak bilinmektedir. Bu yeni teknolojinin uygulanma yöntemi, CRISPR/Cas9 aracılı geminivirüs direnci örnek verilerek adım adım şu şekilde açıklanabilir.

METOT

Tasarım ve sgRNA'nın klonlanması



Yukarıdaki şekilde anlatıldığı gibi öncelikle hedeflenen geminivirüsün genomik bölgesini seçin. Örnekte genler arası bölge (IR) seçilmiştir.

- Dört-nükleotit 5' uzantılı bir XbaI tanıma bölgesi, 20-nükleotit hedef sekansı ve bir adet 84-nükleotit Cas9-bağlayıcı sgRNA iskelesi içeren bir ileri primer ve sgRNA 3' ucuna tamamlayıcı sekans, 7-T tekrarı (sonlandırıcı) ve dört-nükleotid 5′ uzantılı bir Xma1 tanıma bölgesi içeren bir ters primer tasarlayın. Bu primerler ile; 5x Phusion HF tamponlu Phusion polimeraz ve bir şablon olarak 84 bp sgRNA Cas9 bağlama iskelesi içeren bir omurga kullanarak, 125-bp'lik bir PCR parçasını büyütmek için PCR uygulayın. Bu kısım; dört-nükleotid uzantısı, altı-nükleotid XbaI tanıma

bölgesi, 20-nükleotit hedef sekansı, yedi-T tekrarı, altı-nükleotit XmaI tanıma bölgesi ve 5-nükleotid uzantısı dahil, sgRNA için 84-bp Cas9 bağlama döngüsü içermelidir

Amplifiye edilmiş parçayı; TRV RNA2 vektörü PEBV promotörünün aşağı akış yönünde TYLCV IR bölgesini hedefleyen bir sgRNA'ya sahip olmak için, bir kısıtlama ligasyonu prosedürü kullanarak klonlayın. Hem PCR ürününü hem de RNA2 vektörünü XbaI ve XmaI ile kesin ve jel ile saflaştırın.

- T4 ligaz kullanarak, TYLCV hedefi için sgRNA'nın jel ile saflaştırılmış 116-bp kısıtlama fragmanını TRV RNA2 vektörüne yerleştirin.
- *E. coli* ve plakayı 50 mg/L kanamisin içeren LB agar plakasına aktarın.
- Birkaç tek koloni toplayın, bunları 50 mg/L kanamisin içeren LB ortamında büyütün ve bir mini hazırlık kiti kullanarak plazmid DNA'sını çıkartın.
- Tüm klonlanmış dizileri doğrulamak için Sanger dizilimini gerçekleştirin.
- Cas9'un Klonlanması
- Tamamlanmış 3XFlag–NLS-Cas9-NLS kasetini Cas9-GW-F ve Cas9-R primerleri ile Phusion 5× HF tamponlu Phusion polimeraz ve bir şablon olarak pX330 plazmidi kullanarak, PCR ile amplifiye edin.
- Jel ile saflaştırılmış PCR ürününü, üreticinin protokolüne göre, pENTR/D-TOPO'ya klonlayın. *E. coli* ve plakayı 50 mg/L kanamisin içeren LB agar plakasına aktarın. Birkaç klondan plazmid DNA'sını çıkartın.
- Klonların gerçekliği ve çerçeve içi translasyon füzyonları için Cas9-seq serisi primerleri kullanarak ,Sanger dizilimi ile klonları onaylayın.
- Üreticinin protokolüne göre, LR Klonaz reaksiyonuyla, bir *35S::Cas9-T35S* yapısı oluşturmak için *Cas9* kodlama dizisini pK2GW7 ikili vektörüne taşıyın. *E. coli* ve plakayı 100 mg/L spektinomisin içeren LB agar plakasına aktarın. Birkaç tek koloni alın, 100 mg/L spektinomisin içeren LB ortamında büyütün ve bir mini-hazırlama kiti kullanarak plazmid DNA'sını çıkarın. Kısıtlama sindirimi ile klonları onaylayın. *N. benthamiana Cas9*-OE hattının üretimi için bu yapıyı kullanın

Cas9 aşırı ekspresyonunda *N.benthamiana* Bitkilerinin Üretimi (Cas9-OE)

- Elektroporasyon ile önceki adımdaki pK2GW7.Cas9 ikili vektörünü *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 suşuna sokun. Bakterileri 100 mg/L spektinomisin, 30 mg/L gentamisin ve 25 mg/L rifampisin içeren LB agar plakasına yerleştirin.
- 100 mg/L spektinomisin, 30 mg/L gentamisin ve 25 mg/L rifampisin içeren 5 mL LB ortamında 28°C'de gece boyunca T-DNA vektörü taşıyan tek kolonileri toplayın ve büyütün.
- Aynı besiyerden 50 mL inoküle etmek için gecelik kültürü kullanın.

- Hücreleri 1,0'lık bir OD_{600} de toplayın, transformasyon ortamında 0,4'lük bir OD_{600} e yeniden süspanse edin ve bir petri kabına dökün.
- Aseptik olarak yetiştirilmiş 2 haftalık *N. benthamiana* bitkilerinden yaprak dokularını küçük (yaklaşık 1 cm) yaprak diskleri halinde kesmek için cerrahi bir bıçak kullanın. *Agrobacterium*'un hücrelerle temasını maksimize etmek için neşter ile yaprak yüzeyinde küçük kesikler yapın.
- Ara sıra sallayarak 30 dakika boyunca bir *Agrobacterium* kültürü ile yaprak diskleri inkübe edin.
- Ekstra *Agrobacterium* hücrelerini steril filtre kağıdı ile çıkarın ve MS birlikte-yetiştirme ortamı üzerindeki büyüme odasında *Agrobacterium* ile birlikte-yetiştirme için yaprak disklerini 2 gün boyunca tutun.
- 2 gün sonra yaprak diskleri MS rejenerasyon ve seçim ortamına aktarın.
- 3-4 hafta sonra ortaya çıkan sürgün dokuları kesin ve kök-indükleyici ortam üzerine yerleştirin.
- Uygun kökler oluştuktan sonra (2-3 hafta), agar besiyerini köklerden dikkatlice çıkarın, bitkicikleri toprağa aktarın ve plastik kubbelerde ortam atmosferine alıştırın.
- Bitkileri tohum ayarına kadar büyütün ve T1 tohumlarını toplayın.

Cas9 Doğrulama ve Ekspresyon Analizi

Bitki Büyümesi

- MS orta fide seçim plakalarında *N. benthamiana Cas9-OE* bitkilerinin T1 neslini büyütün.
- Bir miktar kanamisin-dirençli bitkileri toprağa aktarın ve analiz için daha fazla büyütün.
- Yarı Kantitatif RT-PCR ile T1 Bitkilerinde Cas9 Ekspresyonunun Doğrulanması
- RNAeasy mini kiti veya eşdeğerini kullanarak toplam RNA yı *N. benthamiana Cas9-OE* bitkilerinin yapraklarından çıkarın.
- Oligo-dT primer ile SuperScript 3 ters transkriptaz kullanarak birinci-kordon cDNA yı sentezleyin.
- 5× Phusion HF tamponlu Phusion polimeraz ile bir primer çifti (Cas9-seqF6 ve Cas9-R) kullanarak Cas9 un C-terminal ucuna karşılık gelen bir fragmanını büyütün.
- Giriş PCR koşulları: 98˚C - 1 dakika 30 saniye, 98˚C de 30 döngü - 15 saniye, 60˚C - 30 saniye, ve 72˚C - 15 saniye, ardından 72˚C - 5 dakikadır
- PCR ürününü bir agaroz jel üzerinde analiz edin.
- PCR ürününün beklenen boyutu 471 bp olmalıdır.

Anti-Flag Antikoru Kullanılarak Western Blot ile Cas9 Protein Varlığının Doğrulanması

- Toplam proteinleri *N. benthamiana Cas9-OE* bitkilerinin 100 µg yaprak dokusundan 100 µL ekstraksiyon tamponu ile ekstrakte edin, ekstraktı 4˚C'de 5 dakika boyunca 10,000 x g de santrifüjleyerek temizleyin.
- Proteinleri bir numune tamponunda denatüre edin ve standart bir protokol ile %6 lık bir SDS poliakrilamid jel elektroforezi üzerinde ayırın.
- Proteinleri, standart bir protokole göre elektrikli blotter kullanarak PVDF zarına aktarın.
- Standart bir protokole göre immünoblot analizi yapın. %5 yağsız sütte birincil fare anti-FLAG antikoru (1:1000) ve %1 yağsız sütte ikincil keçi anti-fare (1:1000) kullanın.
- Reaksiyona giren proteinleri, üreticinin protokolüne göre ECL saptama reaktifi ve bir kemilüminesans görüntüleme sistemi kullanarak kemilüminesans ile tespit edin.
- *İyi Cas9 protein ekspresyonuna sahip transgenik hatları seçin ve T2 tohumlarını toplamak için bunları büyütün.*

TYLCV ye Karşı Cas9 için TRV-Aracılı sgRNA Sevkiyatı

- *N. benthamiana Cas9-OE* bitkilerini bir serada toprakta 6-8 yaprak aşamasına kadar büyütün (2-3 hafta).
- TRV RNA1 ve TRV RNA2 genomlarını ayrı ayrı *A. tumefaciens GV3101* suşuna sokun ve 50 mg/L kanamisin, 30 mg/L gentamisin ve 25 mg/L rifampisin içeren LB agar plakalarına yayın.
- TYLCV nin (veya deney altındaki herhangi bir geminivirüsün) bulaşıcı klonunu içeren vektörlerini *A. tumefaciens GV3101* suşuna sokun ve uygun seçim plakalarına yayın.
- Dönüştürülen tek kolonileri 36-48 saat boyunca seçici besiyerinde OD_{600} 1,2 olacak şekilde büyütün, döndürün, yeniden süspanse edin ve infiltrasyon ortamı ile OD_{600} 0,3 e seyreltin.
- Kültürleri ortam sıcaklığında karanlıkta 2-4 saat inkübe edin.
- Süzmeden önce bakteri kültürlerini OD_{600} de TRV-RNA1:TRV-RNA2:-TYLCV için 1:1:0,05 oranında karıştırın.
- Bakteri kültürü karışımını, iğnesiz 1 mL lik bir şırınga kullanarak 3-4 haftalık *Cas9-OE N. benthamiana* bitkilerinin iki alt yaprağının alt (eksensiz) tarafına süzün.
- Alternatif olarak, CRISPR/Cas9 sistemini 5 gün boyunca önceden oluşturmak için önce TRV-RNA 1:TRV-RNA2 karışımını 1:1 oranında süzün ve ardından TYLCV yi 0,05 OD_{600} de bir alt yaprağa agroinfiltrasyon ile bindirin.

- Süzme sonrası 5, 10, 15 ve 30. günlerde süzülmüş ve süzülmemiş üst yapraklardan yaprak disk örnekleri toplayın ve homolog olmayan uç birleştirme yolu ile çift-zincirli kırılma onarımından kaynaklanan Cas9 endonükleaz mutasyonlarının aktivitesini belirlemek ve ölçmek için hedeflenen genom modifikasyon analizine tabi tutun.

T7EI Testiyle Mutasyon Tespiti, Kısıtlama Bölgesi Kaybı Testi ve Sanger Sekanslaması

Hedef Sahayı İçeren DNA Fragmanlarının PCR Amplifikasyonu

- DNA ekstraksiyon tamponu, PCI ekstraksiyonu, kloroform ekstraksiyonu ve etanol çökeltmesi kullanılarak standart bir protokolle yukarıda bahsedildiği gibi toplanan numunelerden genomik DNA yı ekstrakte edin. NanoDrop spektrofotometri kullanarak DNA yı ölçün.
- Hedef sekansı kapsayan fragmanı PCR ile amplifiye edin. Bu örnekte, IR yan bölgesinin 560 bp lik bir fragmanı, 5x Phusion HF tamponlu Phusion Polimerazlı TYLCV2.3-IR-T-F ve TYLCV2.3-IR-T-R primerleri kullanılarak amplifiye edilmiştir.
- Giriş PCR koşulları: 98˚C - 1 dakika 30 saniye, 98˚C de 30 döngü - 15 saniye, 60˚C - 30 saniye, ve 72˚C - 15 saniye, ardından 72˚C - 5 dakikadır
- Parçaların bir agaroz jeli üzerinde amplifikasyonunu onaylayın, bir PCR saflaştırma kiti kullanarak DNA parçalarını saflaştırın ve NanoDrop kullanarak miktarlarını belirleyin. Mutasyon çoğu durumda T7EI testi ile tespit edilebilir. Hedef DNA'ya bir kısıtlama enzimi tanıma bölgesi dahil edilmişse, mutasyonları tespit etmek için bir kısıtlama bölgesi kaybı testi kullanılabilir. Her iki durumda da tespit edilen mutasyonlar Sanger Sekanslaması ile doğrulanmalıdır.

T7EI Testiyle Mutasyon Tespiti

- 200 ng saflaştırılmış PCR ürünleri, 1.8 µL NEBuffer-2 ve steril suyu, 18 µL toplam hacme karıştırarak heterodubleks formasyon reaksiyonunu hazırlayın. Aşağıdaki döngü programını kullanarak heterodubleks oluşumuna izin vermek için PCR ürünlerini bir termal döngüleyicide (*thermal cycler*) denatüre edin ve yeniden ısıl işleme tutun: 95˚C 10 dakika, 85˚C 2 dakika, 75˚C 3 dakika, 65˚C 3 dakika, 55˚ C 3 dakika, 45˚C 3 dakika, 35˚C 3 dakika, 25˚C 3 dakika ve 4˚C.
- Yeniden ısıl işlem gören PCR ürünlerini 0,5 µL T7EI ve 0,2 µL Tampon-2 ve 1,3 µL steril su ekleyerek T7EI ile işleme sokun, 37˚C'de 1 saat inkübe edin. İnkübasyon reaksiyonu için termal döngüleyici kullanılacaksa, ayarlanan sıcaklık 37˚C den fazla olmamalıdır.
- Reaksiyon ürününü bir agaroz jel üzerinde analiz edin, jel görüntüsünü yakalayın ve ImageJ kullanarak kesilmiş ve kesilmemiş bantların miktarlarını

belirleyin. Kesilen fragmanların toplam fragmanlara olan molar oranını hesaplayın.

- Mutasyon oranları aşağıdaki formül ile hesaplanır:
- Mutasyon oranı (%) = 100 x (1 – (1 – kesilmiş fragman oranı) ^{½}).

Kısıtlama Bölgesi Kaybı Testiyle Mutasyon Tespiti

- TYLCV için IR, bir SspI kısıtlama enzimi tanıma bölgesi içermektedir ve kısıtlama enzimi koruma analizinde kullanılabilir. 20 µL lik bir reaksiyonda, IR komşu PCR ürünlerinin 300 ng si SspI kısıtlamasına tabi tutulmuş ve sonuçları (***Şekil 1c***)'de gösterilmiştir. Tam sindirimin sağlanması için reaksiyon, 37°C de 8 saat boyunca sürdürülmelidir. İnkübasyon reaksiyonu için termal döngüleyici kullanılacaksa, ayarlanan sıcaklık 37°C den fazla olmamalıdır.
- Reaksiyon ürününü bir agaroz jel üzerinde analiz edin, jel görüntüsünü yakalayın ve ImageJ kullanarak kesilmiş ve kesilmemiş bantların miktarlarını ölçün. Kesilmemiş bantlar, modifiye edilmiş hedef diziyi temsil eder ve bu nedenle, kesilmemiş parçaların molar oranı, mutasyon oranıdır.

Sanger Sekanslaması ile Tespit Edilen Mutasyonların Doğrulanması

- PCR ürünlerini T4 DNA ligaz kullanarak pJET2.1 e bağlayınKısıtlama bölgesi kaybı analizinde sindirilmemiş DNA fragmanlarının jel ile saflaştırılması ve klonlanması tercih edilir.
- *E. Coli* yi aktarın ve bakterileri 50 mg/L Ampisilin içeren LB agar plakasına yayın.
- Numune başına 8 veya daha fazla koloni toplayın, bakterileri 50 mg/L Ampisilin içeren LB ortamında büyütün ve bir mini-hazırlama kiti kullanarak plazmid DNA'sını çıkarın.

Yarı-kantitatif PCR, Rolling Circle Amplifikasyon ve Southern Blot Analizi ile Viral Kantifikasyon

TYLCV için Yarı-kantitatif PCR

- TYLCV nin IR sini kapsayan DNA fragmanını, 5x Phusion HF tamponlu Phusion Polimerazlı TYLCV2.3-IR-TF ve -R primerlerini ve Alt-Başlık 3.6.1 dekiler şablon olarak kontroller dahil tüm örneklerden ekstrakte edilen 50 ng genomik DNA kullanarak büyütün.
- Deneysel kontrol olarak, 5× Phusion HF tamponlu Phusion Polimerazlı NbActin-F ve -R primerlerini, tüm örneklerden ekstrakte edilen genomik DNA yı kullanarak *N. benthamiana* Actin geninin kısmi bir fragmanını çoğaltın.
- Aşağıdaki koşullarla 20–23 döngü bir PCR çalıştırın:

98˚C - 1 dakika 30 saniye, 98˚C de 20 - 23 döngü - 15 saniye, 60˚C - 30 saniye, ve 72˚C - 15 saniye, ardından 72˚C - 5 dakika.

TYLCV için Rolling Circle Amplifikasyonu

- Rolling Circle amplifikasyon kiti protokolünü izleyerek TYLCV genomik DNA sını yükseltin. Amplifiye edilmiş DNA, kısıtlama sindirimi ile birim boyutlu moleküller halinde kesildikten sonra bir agaroz jel elektroforezi üzerinde tespit edilebilir.
- 50 ng genomik DNA yı numune tamponunda 95˚C de 3 dakika inkübe edin ve 5 dakika buz üzerine yerleştirin.
- Numunelere enzim karışımı ve reaksiyon tamponu ekleyin ve amplifikasyon için 30˚C de 12–18 saat inkübe edin.
- Enzimi 65˚C de 15 dakika boyunca inaktive edin.
- NcoI i örneklere ekleyin ve amplifiye DNA yı doğrusallaştırmak için 37˚C de 1 saat inkübe edin.

TYLCV Genom için DIG-Tabanlı Southern Blot Analizi

- DNA DIG etiketleme ve saptama kitini kullanarak ve TYLCV2.3-IR-T-F ve -R primerlerini kullanarak TYLCV genomunun IR dizisinin bir fragmanını (yaklaşık 560 bp lik bir fragman) PCR ile çoğaltın
- 2 µg toplam genomik DNA yı, DNA DIG-etiketli boyut markörü-II ile birlikte %1 agaroz jel üzerinde çözün.
- Gece boyunca standart bir kapiler transfer prosedürü ve ardından UV çapraz bağlama ile DNA fragmanlarını bir naylon membran üzerine aktarın. Membranı bloke edin ve ilgili IR-DIG-etiketli prob ile hibridizasyonunu gerçekleştirin
- Bir kemilüminesans görüntüleme sisteminde alkalin fosfataz konjuge anti-DIG (1:10,000) ve CDP-yıldız kemilüminesans substrat kullanarak DNA bantlarını görselleştirin.
- ImageJ kullanarak virüs titresini ölçün.

Bu yöntemde, Geminivirüs örneği olarak TYLCV kullanılmıştır. Herhangi bir Geminivirüs veya DNA virüsü, açıklanan yöntem kullanılarak hedeflenebilir.

Bitkilerde crıspr/cas9 aracılı geminivirüs direncinin detaylı olarak açıklandığı bu yeni teknolojinin bitki biyoteknolojisindeki kullanım alanları genellikle bitkilerin verim ve kalite özelliklerinin iyileştirilmesi, biyotik ve abiyotik streslere dayanıklı bitki geliştirilmesi, bitkilerin fitoremediasyon ve biyofortifikasyon amacıyla kullanılmasını içermektedir. CRISPR/Cas9 teknolojisi bitki çeşitlerinin genomunda istenilen her mutasyonun oluşturulmasını sağlayan bir bitki ıslahı yöntemidir. Dolayısıyla klasik bitki ıslahı yöntemleriyle bitkiler üzerinde modifikasyon oluşturmanın dışında bir yöntemle yapılmaktadır. Bu yönüyle bilinen GDO yöntemleri dışında, çok daha basit, ucuz ve teknik yollarla yeni bitki çeşitleri meydana getire-

rek tarıma kazandırmak mümkün olabilmektedir. Keşfedilmesiyle birlikte genom mühendisliğindeki gelişmelerin de yardımıyla bitki biyoteknolojisinde yaygın olarak kullanılmaya başlanan CRISPR'ların çalışması, RNA tabanlı nükleazlara dayanır. (22). Örneğin *Streptococcus pyogenes* üzerinde çalışılan CRISPR/Cas9 sistemi en yaygın olarak kullanılan şeklidir. Günümüze kadar birçok bitki örneğinin genomu üzerinde CRISPR teknolojisi kullanılarak değişikliğe uğratılmıştır. Modifiye edilen bitki türleri ve hedeflenen gen bölgesi tabloda gösterilmiştir.

Tablo 1. Bitkilerdeki CRISPR tamir yöntemleri

Tür	Hedef gen	Tamir yöntemi	Referans
Arabidopsis thaliana	Co-transfected *GUUS*	NHEJ	(23)
A. thaliana	*TT4, CHLI1, CHLI2*	NHEJ	(23)
A. thaliana	*GUUS*	HDR	(23)
A. thaliana	*BRI1, GAI, JAZ1*	NHEJ	(24)
Oryza sativa	*OsPDS, OsBADH2*	NHEJ	(25)
O. sativa	*OsMYB1*	NHEJ	(23)
O. sativa	*CAO1, LAZY1*	NHEJ	(23)
O. sativa	*ROC5, SPP, YSA*	NHEJ	(24)
Sorghum bicolor	*Co-transfected DsRed*	NHEJ	(26)
A. thaliana	*ADH1, TT4, RTEL1*	NHEJ	(27)
A. thaliana	*GUUS, UGUS*	HDR	(27)
A. thaliana	*ADH1*	NHEJ	(28)
A. thaliana	*ADH1*	HDR	(28)
A. thaliana	co-transfected GFP	NHEJ	(26)
A. thaliana	*Ap1*	NHEJ	(24)
O. sativa	*PDS, PMS3, EPSPS, DERF1, MSH1, MYB5, MYB1, ROC5, SPP, YSA*	NHEJ	(29)
O. sativa	*BAL*	NHEJ	(30)
O. sativa	*SWEET1a-1b-11-13*	NHEJ	(31)
Solanum lycopersicum	*GFP, SHR*	NHEJ	(17)
S. lycopersicum	*SlAGO7, Solyc08g041770, Solyc07g021170, Solyc12g044760*	NHEJ	(17)
Triticum. aestivum	*MLO-A1*	NHEJ	(17)
Nicotiana tabacum	*PDS, PDR6*	NHEJ	(32)
Marchantia polymorpha	*ARF1*	NHEJ	(34)
Glycine max	*bar, GmFEI2, GmSHR*	NHEJ	(32)
O. sativa	*OsAOX1a, OsAOX1b, OsAOX1c, OsBEL,*	NHEJ	(30)
Populus sp	*PDS*	NHEJ	(38)
Solanum tuberosum	*StIAA2*	NHEJ	(40)
G. max	*GFP, Glyma07g14530, Glyma01g38150 (01gDDM1), Glyma11g07220 (11gDDM1)*	NHEJ	(41)
Zea mays	*LIG, MS26, MS45, ALS1, ALS2*	HDR	(34)

Sistem yukarıda verilen bitki türleri üzerinde başarıyla uygulanmıştır. Türe özgü karakterler üzerinde nokta atışı mutasyon meydana getirmek için yapılan çalışmalar pek çok yönden farklılık gösterir. Bitkiler üzerinde yapılan ıslah çalışmalarında CRSPR/Cas9 teknolojisi ile istenilen yeni karakterlerin oluşturulması, stres oluşturan durumlarda dayanıklı bitkilerin elde edilmesi, istenmeyen özellikleri meydana getiren karakterlerin ortadan kaldırılması ve özellikle çalışma mekanizması aydınlatılamayan genlerin fonksiyonlarının belirlenmesine yönelik çok başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Sistemin uygulama basamaklarının, detaylı bir şekilde anlatıldığı, yukarıdaki örneğe ilave bazı örnekler vererek CRSPR/Cas9 genom düzenleme teknolojisini

detaylı bir şekilde açıklayalım. CRSPR/Cas9 teknolojisinin kullanıldığı araştırmaların %89 unda *Arabidopsis thaliana* türü kullanılmıştır (35-37).

Bitkilerde CRSPR/Cas9 teknolojisi model organizma olduğu için ilk olarak *Arabidopsis thaliana* ve *Nicotiana benthamiana* türlerinin yaprakları kullanılarak Cas9 ve sgRNA'nın *Agrobacterium* aracılı geçici ekspresyonu ve çeltik bitkisinin kalluslarında fitoen desaturaz enzimini amaçlayarak çalışılmıştır. Bu örneklerle yapılan ilk uygulamalar, sistemin çalışılabilirliğinin anlaşılması üzerine olmuştur. Yapılan araştırmalarda daha çok Phytoene desaturase sentase, PDS, genininde mutasyon oluşturmak hedeflenmiştir. PDS geni, karotenoid biyosentez tepkimesinde görev yapan ve birçok biyosentetik olayla ilişkili olan önemli bir gendir (33). Bitkilerde klorofil yapısında bulunan fitol halkasının ve plastokinonun meydana gelmesini sağlayan genlerdendir. Bu nedenle CRSPR/Cas9 sistemi ile yapılan genom düzenleme çalışmalarında mekanizmanın çalışılabilirliğinin belirlenebilmesi ve sistemin tam olarak açığa çıkarılması için PDS geni geniş çapta kullanılmıştır (38.)

Başka bir *Arabidopsis* çalışmasında, bitkinin protoplastlarında tasarlanmış CRISPR / Cas sisteminin işlevselliğini test etmek için YF-FP olarak ta bilinen bölünmüş sarı floresan bir protein olan (YFP) haber sistemi kullanılmıştır. Sonuçlar göstermiştir ki tasarlanmış CRISPR / Cas sistemi bitkilerde hedef DNA sekansları üzerinde ve DSB lerin gen düzenlemelerini sağlamak için HR tarafından onarılabileceği konusunda oldukça işlevseldir. Bitkinin Protoplastları üzerinde bir haberci geni başarılı bir şekilde oluşturulduktan sonra, bitkilerdeki endojen lokusları hedeflemeye başlanmıştır. *Arabidopsis* genleri üzerinde CRISPR / Cas tabanlı bozulma için BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1 (BRI1), JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 1 (JAZ1) ve GIBBERELLIC ACID INSENSITIVE (GAI) ve pirinç genleri (ROC5), Stromal İşleme Peptidazı (SPP) ve Young Seedling Albino (YSA) genleri seçilmiştir. Bu genler, bitkinin büyüme fenotipleri üzerinde işlevsiz oldukları için seçilmiştir. Bu genleri hedeflemek için sgRNA'lar tasarlanmıştır. Cas9 içeren vektör ve sgRNA ekspresyon kaseti, *Arabidopsis*'te çiçek daldırma ve pirinçte doku kültürü kullanılarak *Agrobacterium* aracılı transformasyon yöntemiyle yapılmıştır. 50'den fazla T1 ve 20 T0 transgenik bitki, sırasıyla *Arabidopsis* ve pirinçteki her hedef için üretilmiştir. *Arabidopsis' in T1 transgenik bitkilerinin* büyük bir kısmında toprağa ekildikten bir hafta sonra gibi çok genç bir aşamada fenotipinde büyümeler olduğu kanıtlanmıştır. BRI1 için, mutant bitkiler üzerinde % 50'den fazla oranda büyüme yaprakları gösterdiği belirlenmiştir. Daha sonraki aşamalarda mutant BRI1bitkilerinin fenotiplerinde cücelik sergilemeye devam ettiği görülmüştür. GAI'nin DELLA alanındaki amino asit yerleşmelerinin veya delesyonlarının, GA'nın neden olduğu bozunmaya karşı duyarsızlıkla sonuçlanarak cüce bir fenotipe yol açacağı bilinmektedir. Bu çalışmada RFLP analizi ile transgenik bitkiler ilk defa genotipik olarak analiz edilmiştir. Temiz sindirilmemiş bantlar gözlenmiştir. Bu iki testin sonuçları, hem *Arabidopsis* hem de pirinçte,% 26 (31 üzerinden 8) ile% 84 (31 üzerinden 19), SPP sgRNA1 hedefi hariç (% 5, 21'de 1) mutasyon sıklığının olduğunu göstermiştir.

Bu bitki ile Yapılan başka bir çalışmada bir çalışmadab CRISPR / Cas sisteminin bitkilerde hedeflenen gen mutasyonları ve gen üzerindeki düzeltmeleri verimli bir şekilde oluşturmak için nasıl kullanılabileceği anlatılmıştır. *Bu çalışmada* CaMV 35S promotörü tarafından yönlendirilen optimize edilmiş hSpCas99 kodlama dizisi kullanılmıştır. CaMV 35S promotörü tarafından yönlendirilen optimize edilmiş hSpCas99 kodlama dizisini kullandık.We used the optimized hSpCas99 coding sequence driven by the CaMV 35S promoter.Bu cins üzerinde CRISPR'nin kodlamayan RNA bileşenleri üzerinde, U6 RNA'lar için doğal promotörler kullanarak sgRNA oluşturulmuştur. Birlikte dağıtımı iyileştirmek için hem sgRNA hem de hSpCas9 genleri belirlenen vektör içine klonlanmıştır.

Tekrar denTekrar deneniyor..Tekrar deneniyor...

Bir başka çalışmada yine model bitki olan *Arabidopsis* ve *M. truncatula'da* (Mt) bitkilerinde CRISPR / Cas9 sisteminin işlevselliğini analiz edilmeye çalışılmış ve bunun için iki model dikotil bitki örneğinde, fitoen desatüraz (PDS) genlerini hedefleyen dört farklı promotör tarafından yönetilen Cas9 sistemi tasarlanmıştır. *Arabidopsis* ve *M. truncatula'da* (Mt) bitkilerinde transformasyonu sağlamak için *Agrobacterium* bakterisi kullanılmıştır. Yapılan Fenotipik ve genotipik analizler neticesinde *Arabidopsis'te% 95 ve M. truncatula'da% 70'e kadar* UBQ10 promoter geninin Cas9'un etkili mutasyon geliştirdiği açıklanmıştır. Ayrıca, *Arabidopsis* bitkisinin T1 neslindeki mutant bitkilerin genotipik analizlerinde, UBQ10-Cas9 sisteminin % 11oranında homozigot bitki oluşturduğu belirlenmiştir.

Mutasyon olaylarının dizileme analizleri, Arabidopsis'te tek nükleotid eklemelerinin sık görülen olaylar olduğunu, buna karşın *M. truncatula*'daki homozigot mutant örneklerinde bi-allelik ve monoallelik olaylarının baskın olduğunu göstermiştir.

Birlikte ele alındığında, PDS gen düzenlemesinde CRISPR / Cas9 un etkisi EC1.2 geninden sonra en iyi UBQ10 promotörü tarafından sağlanır. Sonuç olarak geliştirilmiş UBQ10-Cas9 vektörü her iki dikotil bitki türünde de yaygın olarak kullanılan 35S promotörüne göre mutasyon verimini dört kat daha yüksek bir oranda arttırmıştır.

Arabidopsis ile yapılan başka bir araştırmada ise

- brassinosteroid insensitive1 **BRI1**
- jasmonate-zim-domain protein1 **JAZ1**
- gibberellic acid insensitive **GAI** genleri kullanılmıştır.

CRISPR / Cas9 genom düzenleme tekniği kullanılarak sistem oluşturulmuş ve genetik marker olarak çok yeni bir anılmama olan Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) kullanılarak genotip yapı açığa çıkarılmıştır. (39).

Bunlardan başka yapılan farklı bir *Arabidopsis* çalışmasında ise nesiller boyunca 12 bölgenin kodlanmasını sağlayan 7 genin akışı incelenmek suretiyle yapılmıştır. T1 ile T3 nesillerinde yaklaşık olarak %58-79 mutasyona uğrayan, ağırlıklı olarak 1bp eklemeler yani insersiyonlar ve ufak çıkarmalar yani delesyonlar şeklinde gözlenmiştir. Homozigot mutant bitkiler, değişikliğe uğramadan bir sonraki nesile

aktarılmıştır. Yine analiz sonuçlarına göre hedef dışı mutasyonuna rastlanmadığı belirlenmiştir. Bu çalışma, bitkiler üzerinde yapılan CRISPR / Cas9 genom düzenleme teknolojisinin kalıtsal değişiklikler oluşturduğunu ispatlanmıştır.

Yapılan çalışmalar temel organizmalarda verimi arttırmak amamacıyla yapılan analizlerin olumlu sonuçlandığını göstermiştir. Bunun ardından insan beslenmesinde önemli bir gıda olan ve parasal olarakta kaynak oluşturan pirinç (*Oriza sativa*) ve ekmeklik buğdayda da (*Triticum aestivum* L.) bu teknoloji denenmeye başlanmıştır. Buğdayda MLO, NAC2 ve PDS, gibi bazı genler üzerinde nokta atışı mutasyonların meydana getirilmesi hedeflenmiştir. *Triticum aestivum* L. Üzerinde CRSPR/Cas9 teknolojisi uygulanarak MLO geni üzerinde oluşturulan mutasyon sonucu sarı pas hastalığına karşı dayanıklı olan ekmeklik buğdayların elde edildiği bildirilmiştir (37, 40).

Buğday dünya genelinde önemli bir tahıl ürünü olduğu için başka araştırmacılar tarafından da bu bitki ile CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak çalışmalar yapılmıştır. Buğday bitkisinin protoplastlarında küf direncine karşı lokus oluşturan TaMLO geni kullanılmıştır. CRISPR TaMLO gen baskılanmasının, bitkilerde oldukça yaygın olarak görülen külleme hastalığına karşı direnç sağladığı da belirlenmiştir (33)

Hızla artan dünya nüfusunun besin ihtiyacını karşılamak için bu nüfusun yarısından fazlası için önemli bir gıda kaynağı olan ve monokotil bitkiler için iyi bir model olması gerekçesiyle çeltik bitkisi üzerinde de birçok crspr çalışması yapılmıştır. . Çeltik bitkisinin genomunda oldukça fazla potansiyel PAM bölgesi bulunmaktadır (41). Bu bitki ile yapılan ilk çalışmalarda bitkinin farklı abiyotik streslere maruz kaldığı zaman aktifleştirdiği

- **OsPDS**, Fitoen desatüraz
- **OsBADH2** tain aldehit dehidrogenaz
- **OsMPK2** mitojenle aktive edilmiş protein kinaz

İsimli genleri kullanılmıştır. Bu genlerin kallus ve protoplasta özgü CRISPR/Cas9 kullanılarak genomlar üzerinde modifikasyon yapılmıştır. Oluşturulan bu sistemin başka bitkiler üzerinde de kullanılabileceği belirtilmiştir.

Bu sonuca dayanarak çeltik bitkisinde, pRGE3 ve pRGE6'da genom düzenlemesi yapabilmek için uygun iki vektör oluşturarak rehber RNA (gRNA) ile genom düzenlemesi yapılabileceğini belirtmişlerdir. Üç tane gRNA kullanarak mutasyon oluşturmak için biyotik ve abiyotik streslerin negatif düzenleyicisi olan OsMPK5 geni hedeflenmiştir ve çeltik bitkisinin hücrelerinde analiz edilmiştir. Bu analiz sonucu da göstermiştir ki daha düşük seviyede hedef dışı mutasyon gerçekleştirmek için daha hassas bir gRNA tasarımı yapılmalıdır.

Çeltik ile yapılan başka bir çalışmada tarımsal mücadelede kullanılan herbisitlere karşı dayanıklılık geninin baz düzenleme tekniği için DSB genleri sisteme eklenmeden önce sitidin deaminaz yöntemi kullanılarak kompleks oluşturulmuş vebu durum da dCas9 (dead Cas9) ‹un kullanılmasıyla mümkün olmuştur. (Shi-

matani ve ark., 2017). Bu çalışmadan sonra mısır ve buğday bitkilerinde bu teknikle genom düzenleme tekniğinin kullanılabileceği belirtilmiştir (42).

Patates (*Solanum tuberosum*), gıda güvenliği için önemli bir tarım bitkisidir ve küresel ısınma nedeniyle oluşan iklim değişiklikleri ve tarımı yapılan alanların artırılması hedeflenerek bu bölgelere adaptasyon sağlanması için ıslah edilmesi gereken bir bitkidir. Patates ile yapılan bir çalışmada hadtalık yapan mikroorganizmalara karşı dayanıklılığın geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bunun için Acetolactate Synthase1(ALS) geni üzerinde mutajenez oluşturulmaya çalışılmıştır. Crspr genom düzenleme teknolojisi ile Acetolactate Synthase1 geninde istenilen mutasyon oluşturulmuş ve patates bitkisinin Geminivirüs saldırılarına karşı dayanıklılık kazandığı bildirilmiştir. Patates ile yapılan başka bir araştırmada ise GBSS (granule-bound starch synthase) geni mutasyona uğratılarak elde edilmiştir (43). Bunun sonucunda patates üzerinde multiallellik sağlanmıştır.

İnsanlar ve hayvanlar için gıda bitkisi olarak kullanılan bir başka tarım bitkisi olan *Cucumis sativus* L. (hıyar) bitkiside CRSPR teknolojisi kullanılarak çalışılmıştır. Bunun için resesif bir gen olan eIF4E (eukaryotic translation initiation factor4E) geni üzerinde mutasyon oluşturulmuştur. Nokta mutasyonlar eIF4E geninin N′ ve C′ uçlarında hedeflenmiş ve üzerinde mutasyon meydana gelen bitkiler seçilerek geliştirilmiştir. Yetiştirilen bitkilerin Papaya Halkalileke Virüsü (PRSV-W) ve Kabak Sarı Mozaik Virüs (ZYMV) enfeksiyonlarına karşı dayanıklılık gösterdiği bildirilmiştir. (44).

Dikotil bir bitki olan *Gossypium hirsutum* (pamuk), Hem lifi hem de tohumlarının içerdiği büyük miktardaki yağı için yetiştirilmektedir ve lifleri sanayinin ham maddesini oluşturur. Bu bitkide GFP geni yani Yeşil floresan proteini kullanılarak oluşturulan transgenik pamuğun fenotipik analizi için GFP dizisinde üç hedef bölge seçilmiş ve genomu yeniden oluşturmak için belirlenmiştir. gRNA tarafından gen baskılanması için çalışılan dokuz T0 bitkisinde homozigot değişiklikler görülürken, diğer bitklerde delesyon, biallelik veya insersiyon olduğunu bildirmişlerdir. (45)

CRISPR / CAS9 SİSTEMİNİN AVANTAJLARI

CRISPR / Cas9'un genom düzenleme teknolojisi olarak geliştirilmesinden önce, en yaygın olarak kullanılan genom düzenleme araçları ZFN'ler ve TALEN'lerdi. hem ZFN'ler hem de TALEN'ler çalışma prensibi olarak, DNA bağlayıcı proteinler tarafından DNA dizisini tanımaya dayanırken CRISPR /Cas9 teknolojisi, yeni bir RNA kılavuzlu hedefleme yaklaşımı kullanır. Bu benzersiz yaklaşım nedeniyle, CRISPR /Cas9 teknolojisinin diğer genom düzenleme teknolojilerine göre tasarımı ve uygulaması daha basit ve daha ucuzdur aynı zamanda sistemin çok yönlü olduğu zaten kanıtlanmıştır.

Bu sisteminin en önemli avantajlarından biri, tek bir sgRNA kullanılarak homolog olan genlerin aynı anda baskılanabilmesidir (46). Bir başka avantajı ise, çoklu sgRNA'lar içeren Cas9/sgRNA ekspresyon vektörlerinin kullanılmasıyla bir gen ailesi üyelerinin görev aldıkları yolaklardaki fonksiyonları incelenebilir (47).

ZFN'lerin ve TALEN'lerin genom düzenleme aracı olarak kullanılmasında protein tasarımı ve sentezinin karmaşıklığı ve zorlukları, bilimsel araştırmacıların önündeki başlıca engellerden biridir. Buna karşılık, basit bir Watson-Crick modeline dayanan hedef DNA dizisi üzerinde sadece 20-nt bir alanı tanımak ve değiştirme yoluyla uygulanan CRISPR /Cas9 daha pratik bir metot olarak karşımıza çıkmaktadır. CRISPR / Cas9 teknolojisinin avantajlarına ek olarak mevcut sistemler birden fazla gen üzerinde mutasyon yapılarak bitki üretmeyi sağlayabilirken bu teknoloji ile bir gen üzerinde mutasyon oluşturularak bitki üretimini sayabiliriz.

Birden fazla mutasyon barındıran bitkiler oluşturmak gen ailesi üyelerinin işlevlerini analiz etme güçlüğünden dolayı kritiktir. Ayrıca çoklu mutasyona uğramış genleri kullanarak oluşturulan genom düzenleme teknolojileri çok zaman alıcıdır ve yoğun bir çalışma ortamı gerektirir. Bununla birlikte, CRISPR / Cas9 ile çoklu lokuslar üzerinde genom tasarlayarak farklı dizileri taşıyan birden fazla gRNA' lar ile yüksek verimde karmaşık genom elde etmek mümkündür.

Multiplex genom tasarımı zaten Arabidopsis, pirinç ve domates bitkilerinde oluşturulmuştur. Son zamanlarda bitkilerde multiplax genom oluşturmak için CRISPR / Cas9 tabanlı ikili vektör kümesi ve bir gRNA modül vektör seti geliştirilmektedir. Bu kit mısır protoplastlarında ve Arabidopsis transgenik çizgilerinde multiplex genom oluşturularak hem yüksek verimlilik hem de özgüllük sağlamıştır. Birden çok gRNA'yı aynı anda tanıtma yeteneği, verimli bir şekilde büyük kromozomal delesyonlar oluşturmak için de kullanılabilir.

CRISPR sistemiyle bitki genetik materyalinde hedef bölgeye Homology Directed Recombination yani HDR yoluyla DNA parçası eklemek yapılabilse bile (48), bunun başarılı bir şekilde yapıldığı çalışma sayısı oldukça azdır (49). Literatürdeki makalelerde daha çok bitkinin kendi genomu üzerindeki bir genin bozularak baskılanmasına çalışılmıştır.

En uygun genom düzenleme yöntemlerini belirlemek için CRISPR teknolojisi ile yapılan çalışmalar devam etmekte olup, bu sistem ile genom mühendisliği çalışmalarına her gün bir yenisi daha eklenmektedir.

SONUÇ

Küresel ısınma, mevsimlerin değişmesi, tatlı su kaynaklarının eksilmesi ve verimli bir şekilde tarım yapılabilecek arazilerin azalması gibi olumsuzluklar devam ederken dünya üzerinde yaşayan canlı sayısı her geçen gün hızlı bir şekilde artmaktadır. Bitkiler ve hayvanlarda verim artışını gen aktarımı yoluyla sağlayabilme metodunu uygulayan biyoteknolojinin de yetersiz kaldığı bu dönemde, çok hızlı bir şekilde artan dünya nüfusunun besin ihtiyacını geleneksel ıslah yöntemleriyle karşılamak mümkün olmamaktadır. Bununla birlikte gen aktarılarak yani GDO teknolojisi kullanılarak üretilen ürünlerin tüketimi ile ilgili ortaya çıkabilecek problemlerin netleşmemesinden kaynaklanan endişeler de tam olarak giderilememiştir. Yeni nesil genom düzenleme tekniklerinden olan CRSPR/Cas9 teknolojisi, belirlenen hedefte, gen veya DNA bölgelerinde in vivo olarak kesin bir şekilde kırıklar mey-

dana getiren, ileri yapılı hücrelerde basitçe uygulanabilen yüksek potansiyelli bir teknolojidir. Tekniğin önemli özelliklerinden birisi de şimdiye kadar kullanılan genetik mühendisliği çalışmalarına göre daha güvenli, daha hızlı ve ekonomik olarak daha ucuz bir şekilde üretim yapma imkânı sağlamasıdır. Bu avantajlı üretim sayesinde, bitki iyileştirmede çok büyük avantajlar sağlanmakta, bitki üretim teknolojilerine başarılı üretim yöntemleri kazandırılmaktadır. CRSPR/Cas9 teknolojisi ile etkili ve spesifik mutasyonların meydana gelmesi mümkün olmaktadır. Oluşan bu mutasyonlar bitki ıslahında kolaylıkla kullanılabilmektedir. Yeni bir teknoloji olan genom düzenleme programları yakın bir geçmişte kullanılmaya başlamasına rağmen ilerleyen zamanlarda daha da gelişeceği bilinmekte ve bu yöntemlerle bitkiler üzerinde geniş bir yenilik potansiyeli oluşturacağı düşünülmektedir. CRSPR/Cas9 teknolojisi ile elde edilen bitkilerin GDO'lu organizmalardan farklı olduğu anlaşıldığında güvenilirliklerinin kanıtlanmasıyla insanlar tarafından kabul edileceği ve bu teknikle üretilen ürünlerin güvenli bir şekilde tüketileceği bilinmektedir. Kısaca, bitkilerde de kullanılabilen yeni bir genom düzenleme yöntemi olan CRISPR/Cas9, hızlı, güvenilir, ucuz ve istenen dizilere uygun sgRNA oluşumuna imkan sağlar. Bu özellikleri sayesinde bitkiler üzerinde çeşitli amaçlar için yaygın bir şekilde kullanılabilir.

Kaynaklar

1. Cohen, J. E. (2003). Human population: the next half century. *Science,* 302(5648): 1172-1175.
2. Belhaj, K. Chaparro-Garcia, A. Kamoun, S. Patron, N. J. & Nekrasov, V. (2015). Editing plant genomes with CRISPR/*Cas9*. *Current opinion in biotechnology,* 32: 76-84.
3. Zhang, D. Li, Z. & Li, J. F. (2016). Targeted gene manipulation in plants using the CRISPR/Cas technology. *Journal of Genetics and Genomics,* 43(5): 251-262.
4. Bortesi, L. & Fischer, R. (2015). The CRISPR/*Cas9* system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology advances,* 33(1): 41-52.
5. Ray, D. K. Mueller, N. D. West, P. C. & Foley, J. A. (2013). Yield trends are insufficient to double global crop production by 2050. *PLoS One,* 8(6): e66428.
6. Van Der Oost J. Westra, E. R. Jackson, R. N. & Wiedenheft, B. (2014). Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology,* 12(7): 479-492.
7. Haft, D. H. Selengut, J. Mongodin, E. F. & Nelson, K. E. (2005). A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS computational biology,* 1(6): e60.
8. Makarova, K. S. Aravind, L. Grishin, N. V. Rogozin, I. B. & Koonin, E. V. (2002). A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and bacteria predicted by genomic context analysis. *Nucleic Acids Research,* 30(2): 482-496.
9. Makarova, K. S. Haft, D. H. Barrangou, R. Brouns, S. J. Charpentier, E. Horvath, P. Moineau, S. Mojica, F. Wolf, Y. & Yakunin, A. F. (2011). Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology,* 9(6): 467-477.

10. Westra, E. R. Buckling, A. & Fineran, P. C. (2014). CRISPR-Cas systems: beyond adaptive immunity. *Nature Reviews Microbiology,* 12(5): 317-326.

11. Barrangou, R. & Marraffini, L. A. (2014). CRISPR-Cas systems: prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Molecular cell,* 54(2): 234-244.

12. Jiang, F. & Doudna, J. A. (2015). The structural biology of CRISPR-Cas systems. *Current opinion in structural biology,* 30: 100-111.

13. Savić, N. & Schwank, G. (2016). Advances in therapeutic CRISPR/*Cas9* genome editing. *Translational Research,* 168: 15-21.

14. Ray, D. K. Mueller, N. D. West, P. C. & Foley, J. A. (2013). Yield trends are insufficient to double global crop production by 2050. *PLoS One,* 8(6): e66428.

15. 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(12): 5429-5433.

16. Raja, N. İ., Bano, A. Rashid, H. Chaudhry, Z. & İlyas, N. (2010). Improving *Agrobacterium* Mediated Transformation Protocol for Integration of *Xa21* Gene in Wheat (T*riticum aestivum* L.) *Pakistan Journal of Botany*, 42(5): 3613-3631.

17. Brouns, S. J. Jore, M. M. Lundgren, M. Westra, E. R. Slijkhuis, R. J. Snijders, A. P. Dickman, M. Makarova, K. S. Koonin, O. V. & Van Der Oost, J. (2008). Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science,* 321(5891): 960-964.

18. Bortesi, L. & Fischer, R. (2015). The CRISPR/*Cas9* system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology advances,* 33(1): 41-52.

19. Belhaj, K. Chaparro-Garcia, A. Kamoun, S. Patron, N. J. & Nekrasov, V. (2015). Editing plant genomes with CRISPR/*Cas9*. *Current opinion in biotechnology,* 32: 76-84.

20. Schaeffer, S. M. & Nakata, P. A. (2015). CRISPR/*Cas9*-mediated genome editing and gene replacement in plants: transitioning from lab to field. *Plant Science,* 240: 130-142.

21. Weeks, D. P. Spalding, M. H. & Yang, B. (2016). Use of designer nucleases for targeted gene and genome editing in plants. *Plant Biotechnology Journal,* 14(2): 483-495.

22. Bortesi, L. & Fischer, R. (2015). The CRISPR/*Cas9* system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology advances,* 33(1): 41-52.

23. Mao, Y. Zhang, H. Xu, N. Zhang, B. Gou, F. & Zhu, J. K. (2013). Application of the CRISPR–Cas system for efficient genome engineering in plants. Molecular plant, 6(6), 2008-2011.

24. Feng, Z. Zhang, B. Ding, W. Liu, X. Yang, D. L. Wei, P. & Zhu, J. K. (2013). Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. Cell research, 23(10), 1229-1232.

25. Shan, Q. Wang, Y. Li, J., & Gao, C. (2014). Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system. Nature protocols, 9(10), 2395-2410.

26. Jiang, W. Zhou, H. Bi, H. Fromm, M. Yang, B. & Weeks, D. P. (2013). Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice*. Nucleic acids research, 41(20), e188-e188.

27. Fauser, F. Schiml, S. & Puchta, H. (2014). Both CRISPR/C as-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal, 79(2), 348-359.

28. Shimatani, Z. Kashojiya, S. Takayama, M. Terada, R. Arazoe, T. Ishii, H. & Ezura, H. (2017). Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion. Nature biotechnology, 35(5), 441-443.

29. Zhang, Z. Ge, X. Luo, X. Wang, P. Fan, Q. Hu, G. & Wu, J. (2018). Simultaneous editing of two copies of Gh14-3-3d confers enhanced transgene-clean plant defense against *Verticillium dahliae* in allotetraploid upland cotton. Frontiers in plant science, 9, 842.

30. Xie, K. & Yang, Y. (2013). RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR–Cas system. Molecular plant, 6(6), 1975-1983.

31. Zhou, H. Liu, B. Weeks, D. P. Spalding, M. H. & Yang, B. (2014). Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice. Nucleic acids research, 42(17), 10903-10914.

32. Gao, Y. & Zhao, Y. (2014). Self-processing of ribozyme-flanked RNAs into guide RNAs in vitro and in vivo for CRISPR-mediated genome editing. Journal of integrative plant biology, 56(4), 343-349.

33. Wang, Z. P. Xing, H. L. Dong, L. Zhang, H. Y. Han, C. Y. Wang, X. C. & Chen, Q. J. (2015). Egg cell-specific promoter-controlled CRISPR/Cas9 efficiently generates homozygous mutants for multiple target genes in Arabidopsis in a single generation. Genome biology, 16(1), 144.

34. Svitashev, S. Young, J. K. Schwartz, C. Gao, H, Falco, S. C. & Cigan, A. M. (2015). Targeted mutagenesis, precise gene editing, and site-specific gene insertion in maize using Cas9 and guide RNA. Plant physiology, 169(2), 931-945.

35. Belhaj, K. Chaparro-Garcia, A. Kamoun, S. Patron, N. J. & Nekrasov, V. (2015). Editing plant genomes with CRISPR/Cas9. Current opinion in biotechnology, 32: 76-84.

36. Li, L. Qu, R. Kochko, A. D. Fauquet, C. & Beachy, R. N. (1993). An Improved Rice Transformation System Using The Biolistic Method. Plant Cell Reports, 12: 250-255.

37. Zhang, D. Li, Z. & Li, J. F. (2016). Targeted gene manipulation in plants using the CRISPR/Cas technology. Journal of Genetics and Genomics, 43(5): 251-262.

38. Fan, D., Liu, T., Li, C., Jiao, B., Li, S., Hou, Y. and Luo, K. (2015). Efficient CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in Populus in the first generation. Scientific reports, 5

39. Feng, Z. Zhang, B. Ding, W. Liu, X. Yang, D. L. Wei, P. Cao, F. Zhu, S. Zhang, F. & Mao, Y. (2013). Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. Cell research, 23(10): 1229.

40. Wang, W. Pan, Q. He, F. Akhunova, A. Chao, S. Trick, H. & Akhunov, E. (2018). Transgenerational CRISPR-Cas9 activity facilitates multiplex gene editing in allopolyploid wheat. The CRISPR journal, 1(1), 65-74.

41. Xie, K. & Yang, Y. (2013). RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR–Cas system. Molecular plant, 6(6), 1975-1983.

42. Zong, Y. Wang, Y. Li, C. Zhang, R. Chen, K. Ran, Y. & Gao, C. (2017). Precise base editing in rice, wheat and maize with a Cas9-cytidine deaminase fusion. Nature biotechnology, 35(5), 438.

43. Jaganathan, D. Ramasamy, K. Sellamuthu, G. Jayabalan, S. & Venkataraman, G. (2018). CRISPR for crop improvement: an update review. Frontiers in plant science, 9, 985.

44. Chen, K. & Gao, C. (2013). TALENs: customizable molecular DNA scissors for genome engineering of plants. Journal of Genetics and Genomics, 40(6), 271-279.

45. Li, F. Fan, G. Lu, C. Xiao, G. Zou, C. Kohel, R. J. & Liang, X. (2015). Genome sequence of cultivated Upland cotton (*Gossypium hirsutum* TM-1) provides insights into genome evolution. Nature biotechnology, 33(5), 524-530.

46. Engler, C. Kandzia, R. & Marillonnet, S. (2008). A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. PloS one, 3(11), e3647.

47. Xing, H. L. Dong, L. Wang, Z. P. Zhang, H. Y. Han, C. Y. Liu, B. & Chen, Q. J. (2014). A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. BMC plant biology, 14(1), 327

48. Schiml S. Fauser F. & Puchta H. (2014). The CRISPR/Cas system can be used as nuclease for in planta gene targeting and as paired nickases for directed mutagenesis in *Arabidopsis* resulting in heritable progeny. Plant Journal, 80(6):1139-1150 (DOI: 10.1111/ tpj.12704)

49. Ma, X. Zhu, Q. Chen, Y. & Liu, Y. G. (2016). CRISPR/Cas9 platforms for genome editing in plants: developments and applications. Molecular plant, 9(7), 961-974.

KANATLILARDA CRISPR CAS9 GENOM DÜZENLEME SİSTEMİNİN GÜCÜNDEN YARARLANILMASI

ALTUĞ KARAMAN*

Giriş

Tavuk hayvancılık için önemli bir model organizma ve biyoreaktördür (1). Her yıl hayvancılık için 60 milyardan fazla tavuk yetiştiriliyor ve bu da tavuğun önemli bir besin kaynağı olduğunu bize gösteriyor (1). Tavuk sağlığını incelemek ve anlamak biyogüvenliğin önemli bir parçasıdır. Tavuk önemli bir embriyonik model organizmadır çünkü incelenmesi daha geniş anlamlara da sahiptir. Civciv embriyosu canlılık korunurken kolayca erişilebilir, gözlemlenebilir ve değiştirilebilir. Tavuk; Xenopus ve zebra balığı gibi yumurtada gelişen diğer model organizmalarda bulunmayan veya takip edilemeyen uzuv ve akciğer gibi yapıların gelişimini incelemek büyük kolaylık sağlar.

Tavuğun gelişimi moleküler biyoloji, fizyoloji ve genetik alanlarında yaygın olarak araştırılmasına yol açmıştır. Tavuk hızla ölçeklendirilebilir olduğundan hayvancılık alanında kullanılan teknolojilerin geliştirilmesinde model organizma olabilir. Mevsimsel grip aşısı 70 yılı aşkın süredir tavuk yumurtasında üretilmektedir. Tavuklar aynı zamanda yeni antikorlar ve terapötik proteinler üretecek şekilde de uyarlanabilir (2). Transgenik tavuklar, tavuğun biyoreaktör olarak kullanışlılığını artırabilir. Tavuğun bu alanların her birindeki kullanışlılığı, genomundaki genetik modifikasyonların getirilmesinde ki zorluk nedeniyle sınırlanmıştır. Civciv embriyosu yaklaşık 60.000 hücreden oluşur ve bu, tek hücreli kolayca erişilebilen embriyolarla karşılaştırıldığında genomun kalıtsal bir şekilde değiştirilmesini zorlaştırır (3). Bu zorluk, birçok faydaya rağmen az sayıda araştırma grubunun transgenik tavuklar yapmaya çalışmasına neden olmuştur (4).

* altugkaraman@munzur.edu.tr

Tavuğun, özellikle kanatlıların transgenezi ve genom düzenlemesi çeşitli araştırma alanları için değerli bir modeldir. Bugün, genetiği değiştirilmiş tavukların (5) üretimi her zamankinden çok daha fazla ulaşılabilir durumda ve kesin genom hedeflemesine ihtiyaç bulunmaktadır. Tavuk modelinin özgünlüğü, istenen sonuçların elde edilmesini kolaylaştıran kısa üretim sürelerine ve çok sayıda soya dayanmaktadır. Bu açıdan genom modifikasyon sistemleri günümüz teknolojisi ile birleştirildiğinde tavuk gibi kanatlılar da dahil olmak üzere organizmalarda değişiklik yapılmasını kolaylaştırmaktadır. CRISPR/Cas9 Sistemi bu teknolojilerin başında gelmektedir.

Bu bölüm, çeşitli amaçlar için genetiği değiştirilmiş kanatlılar üretmek için CRISPR/Cas9 aracılı gen düzenleme teknolojisindeki son ve güncel gelişmelere odaklanarak, kümes hayvanlarında genom düzenleme için CRISPR/Cas9 teknolojisinin çeşitli uygulamalarını tartışmaktadır. Bu bölüm aynı zamanda kümes hayvanı türlerinde gen ve genom mühendisliği için CRISPR/Cas9 teknolojisinin uygulanmasına ilişkin zorlukların, olası yaklaşımların ve gelecekteki perspektiflerin bir özetini ve tartışmasını da sağlamaktadır. Kümelenmiş düzenli aralıklı kısa palindromik tekrarlar (CRISPR) tekniği, genlerin işlevini anlamamızı veya hayvan fenotipini belirli bir bilimsel veya üretim hedefine uyacak şekilde değiştirmemizi sağlar. Tavuk genom mühendisliği uygulamalarını kolaylaştırmak için, tavuklarda CRISPR/Cas9 teknolojisinin mevcut uygulaması değerlendirilecektir.

Tavuklarda Genom Düzenleme ve CRISPR/Cas9 Sistemi

Ontogenez ve gen ekspresyon modellerindeki benzerlik nedeniyle, kanatlıların, insanlar dahil memelilerde genetik, moleküler ve biyokimyasal süreçleri izole etmek için mükemmel bir model olarak hizmet edebileceği düşünülmektedir (6). Bir yüzyıldan fazla bir süredir, başta tavuk (Gallus gallus domesticus) ve bıldırcın (Coturnix japonica) olmak üzere kuş embriyoları, omurgalı embriyolojisini, morfogenezde hücre hareketini, indüksiyon ve farklılaşma mekanizmalarını, embriyonik hastalıkların patogenezini ve toksikolojiyi incelemek için temel oluşturmuştur (6). Kanatlı hayvan endüstrisi, kanatlı türlerinin gen düzenlenmesi yoluyla yakın gelecekte kanatlı genomunu değiştirecek bir gen düzenleme devriminden geçmektedir (7). Transgenik kanatlılar, biyoteknolojideki en güçlü araştırma araçlarından biri olmaya devam ediyor. Bir in vivo model olarak bir tavuk embriyosu üzerinde hedeflenen genetik manipülasyonlar, CRISPR/Cas9 sistemi ile mümkün hale gelmiştir. CRISPR/Cas9 sistemi, hem kanatlı yetiştiriciliği hem de gıda üretimi amaçları için kanatlı genomiklerinde hızlı bir değişim yaratan gen düzenleme teknolojileri arasındadır (8).

Genom modifikasyonu ve mühendisliği, genetik bilgiyi değiştirmek için genlerin eklenmesine, silinmesine veya değiştirilmesine dayanır (9). Gen fonksiyonunu ve üretim fenotiplerini incelemede tavuk genomunu tam olarak düzenlemek için yeni araçlar belirlenmiştir. Kanatlılar yönünden bu araçlar arasında gösterilen, CRISPR (kümelenmiş düzenli aralıklarla kısa palindromik tekrarlar)/Cas9 (CRISPR ile ilişkili protein 9 sistemi) sisteminin kuşların somatik hücrelerine ve dokularına uygulandığı bilinmektedir (10).

Genom düzenleme teknolojisinin kanatlı endüstrisinde uygulanması ve genel olarak hayvancılık üretimi, hassas genom mühendisliği araçlarının mevcudiyeti nedeniyle son yıllarda gelişmiştir (11). CRISPR ile ilişkili protein 9 (CRISPR/Cas9), genom düzenleme için en yaygın ve gelişmiş tekniktir. CRISPR/Cas sistemi, kaynaşmış proteinler yerine DNA bağlanması için belirli bir RNA dizisi molekülünün kullanılmasını gerektirir (12). CRISPR/Cas9 teknolojisi, başka bir hedef DNA dizisine bağlanan ve ardından bağlanmanın gerçekleştiği Cas9'un bölünmesini sağlayan kılavuz RNA adı verilen özel bir RNA dizisini kullanır. Bu, CRISPR/Cas9 sistemi, genetiği değiştirilmiş hayvanların genom modifikasyonlarını kolaylaştırdığı için en uygun gen düzenleme aracı olarak öne çıkmaktadır (13). CRISPR tabanlı sistem sürekli olarak geliştirilmektedir. CRISPR sisteminin en son gelişimi, CRISPR ile ilişkili nükleaz 9 ve 12a'nın birlikte ekspresyonunu kullanır, bu nedenle farklı genlerin işlevlerde nasıl işbirliği yaptığını araştırmaya yardımcı olmak için aynı anda genomdaki birden fazla hedef bölgeyi düzenleme yeteneğine sahiptir (14). Bu nedenle gen fonksiyonlarının belirlenmesinde bu sistem çok önemlidir (15). CRISPR teknolojisi, geleneksel yetiştirme sisteminin yerini almayı amaçlamamaktadır ancak, genetik kazanç için geleneksel ıslahın kullanılmasının, belirli bir kanatlı sürüsü popülasyonu içinde genetik varyasyonu tanıtma sınırlamaları olduğundan, yetiştiriciye seçim yapması için daha fazla genetik varyasyon vererek tamamlayıcı bir seçenek sunmaktadır.

CRISPR/Cas9 sisteminin birçok avantajı bulunmaktadır. Amaçlanan mutasyonlar, işaretçi seçimleri olmadan geleneksel Sanger dizilimi ile hızlı bir şekilde taranabilir. Aynı lokustaki birçok lokus veya birkaç bölgeyi hedeflemek için tek bir CRISPR dizisine birden fazla gRNA yerleştirilebilir (16). Ek olarak, konakçı bir organizmada genom ölçeğinde susturulmuş hücreler oluşturmak için büyük gRNA kütüphaneleri üretilebilir (17). Ayrıca, lentiviral vektörler hem in vitro (17) hem de in vivo (18) verimli transdüksiyon elde etmek için başarıyla kullanılmıştır (19). Böylece, lentivirüs bazlı CRISPR vektör sistemimiz hem susturulmuş kuş hücrelerini hem de türlerini oluşturmak için uygulanabilir.

CRISPR/Cas9 sistemi genetik varyasyonların tanıtılması, kümes hayvanları gibi çiftlik hayvanlarının performansını iyileştirme amacı için kullanılır. CRISPR/Cas9 sisteminin kanatlı büyümesini ve üretim performansını iyileştirmek için kullanılabilecek çeşitli faydaları vardır. Bu faydalar, sindirilebilirliği ve genel büyümeyi geliştirerek artan kanatlı performansını, artan yumurta üretimini, artan kanatlı bağışıklığını ve hastalık direncini, daha iyi beslenme profilleri için kanatlı etinde az veya hiç yağ birikimi olmayan daha yağsız kanatlıların üretilmesini içerir. Buna en uygun örnek, yağ asidi bileşiminin yüzdesini değiştirerek karın yağı birikimini azaltan ve karkas etinin yağsız yüzdesini artıran tavuklar yaratmaya yönelik girişimdir (20). CRISPR/Cas9, yumurta içi cinsiyetlendirme yoluyla hayvan refahı iyileştirmelerinde de kullanılmıştır (21). Kanatlı endüstrisinde hem ticari üreticilerin hem de tüketicilerin faydalarını karşılayan kanatlıların üretilmesine yönelik artan bir ihtiyaç vardır. Kanatlı endüstrisindeki çeşitli talepleri karşılamak için transgenik kuşların üretilmesi için çeşitli stratejiler önerilmiştir.

Yıllar içinde, genetik mühendisliği araçları kullanılarak tavuklarda hedeflenen etkilerin elde edilmesinde önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Yakın zamanda geliştirilen CRISPR/Cas9 sistemi, çeşitli disiplinlerde paha biçilmez bir araçtır ve yüksek verimliliğe sahip gen-düzenlenmiş tavukların üretilmesini kolaylaştırmıştır. CRISPR/Cas9 teknolojisi aracılığıyla genleri düzenlemek için farklı stratejiler ve CRISPR/Cas9 bileşenlerini hedef hücrelere ulaştırmak için çeşitli yöntemler vardır. Gösterilen yeni gesicle stratejisi, manipüle edilmiş tavuk PGC'lerinin etkili bir şekilde zenginleştirilmesine izin verir ve uygulamasının yalnızca ön aşamalarda olmasına rağmen, gelecek nesil genleri inaktive edilmiş tavuk hatları için temel oluşturur. Bir CRISPR/Cas9 sisteminin uygulanması, tavukların gelişiminin daha iyi anlaşılmasına yol açabilir ve tavuk genomunun düzenlenmesi için sağlam bir araçtır. Modifiye edilmiş CRISPR/Cas9 PGC'lerin kullanımı, tavuk üretkenliğini ve sağlığını iyileştirmek için biyomühendislik yöntemlerinin etkisini temelden genişletiyor. Bu genom düzenleme teknolojisinin daha da geliştirilmesi bekleniyor ve tarım endüstrileri, biyoteknoloji ve biyomedikal uygulamalar için geliştirilmiş gen eklenmiş tavukların üretimi için fırsat sağlıyor (22).

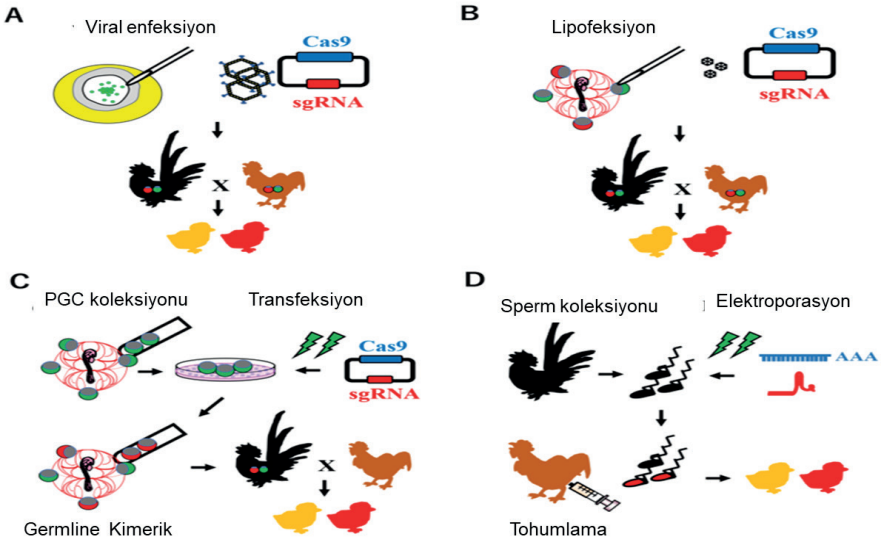
CRISPR/Cas9 Sistemine Dayalı Kuş Genom Düzenlemesine Yönelik Yaklaşımlar

Kanatlı hayvanlarda geleneksel yöntemlerle mücadele edilemeyen ALV-J (Avian leukosis virus subgroup J) gibi virüslere direncini geliştirmesi için homolojiye yönelik onarım sistemi (HDR) ile birlikte CRISPR/Cas9 sistemini kullanarak kanatlılarda bulunan NHE1 reseptöründe bulunan triptofan W38'in hassas bir şekilde silinmesiyle ticari tavuk hatlarında bu strateji doğrulanmıştır (23). Bu örnekler, CRISPR/Cas9 genom düzenleme teknolojisinin, viral enfeksiyona karşı istenen direnç özelliklerini gösteren bir kanatlı hattı üretmek için kümes hayvanı türlerini değiştirmek için yaygın olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Bu, kümes hayvanlarında virüse dirençli bir kanatlı hattı geliştirmenin ilk adımı olabilir. Bu tür CRISPR aracılı genom düzenlenmiş kümes hayvanlarının kullanımı, kümes hayvanı endüstrisinde üretim maliyetini düşürmenin yanı sıra çok sayıda ekonomik kaybın önemli ölçüde azaltılabileceğini göstermiştir.

Birçok transgenik tavuğun viral vektörlerin genomlarına rastgele entegre edilmesiyle üretilmiş olmasına rağmen transgen ekspresyonunun yetersiz olduğu yada başlangıç kohortuyla sınırlı olduğu kanıtlanmıştır. Yapılan bir araştırmada Transgenik tavukların, potansiyel olarak yumurta beyazındaki rekombinant proteinlerinin ticari üretimi için biyoreaktör olarak hizmet etmesi amaçlanmıştır (24). Bu amaçla insan interferon betasının (hIFN-β) tavuk ovalbumin lokusuna entegre edilmesi ve yumurta beyazında hIFN-β üretilebileceği CRISPR-Cas9 teknolojisi kullanılarak gösterilmiştir. CRISPR/Cas9 protokolü kullanarak hIFN-β'yı ilkel germ hücrelerine aktarmış ve ardından alıcı embriyolara hücre nakli yoluyla germ hattı kimerik horozlar üretmiştir. İki nesil sıfır kurucu horozlar, hIFN-β genleri susturulmuş yavrular üretmiş ve bu dişi yavruların tümü, bol miktarda yumurta beyazı hIFN-β (~3,5 mg/ml) üretmiştir. Birinci neslin dişi yavruları kısır olmasına

rağmen, erkek muadilleri verimli olduğu ve yumurta beyazı hIFN-β üretiminin birinci neslinkiyle karşılaştırılabilir olan ikinci nesil genleri susturulmuş tavukları üretmişlerdir. hIFN-β biyoaktivitesinin, toplam yumurta beyazı hIFN-β'nın yalnızca ~%5'ini temsil ettiği, ancak hIFN-β'nın yumurta beyazında açılması ve yeniden katlanması, biyoaktiviteyi tamamen geri kazandığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar, tavuk ovalbumin lokusuna transgen yerleştirilmesinin, yumurta akında biriken hedef proteinin yüksek verim ve stabil ekspresyonla sonuçlanabileceğini ve endüstriyel uygulamalara uygun olması gerektiğini göstermektedir.

Kanatlılarda crispr sistemi, transgenesis yoluyla yada gen susturma/ekleme olarak bilinen yollar yaygın olarak kullanılmaktadır. Tavuklarda ve bıldırcınlarda çoklu yerleştirme/silme işlemleri yüksek düzeyde başarı sağlamaktadır. Transgenesis yoluyla enfeksiyona sebep olan mikroorganizmalarda önlenmesi amacıyla kullanılırken, gen susturma yoluyla ilgili genleri inaktif duruma getirmek için kullanılmaktadır (25). Kuş genomu düzenleme teknolojisi, transgenik tavuk soylarının oluşturulmasına yönelik bir prosedüre dayanmaktadır. Transgenik kuşlar yaratmak için viral enfeksiyon, kimerik yöntem ve sperm aracılı gen transferi dahil olmak üzere çeşitli yaklaşımlar denenmiştir. Viral enfeksiyon, transgenin dahil edilmesindeki yüksek verimliliği nedeniyle en güvenilir yöntemdir. Viral gen dağıtım sistemi, transgenin blastodermdeki germ hattı hücrelerinin genomuna uyarılması amacıyla öncelikli olarak blastoderm aşama-X embriyolarına uygulanmıştır (26).



Şekil 1. Kanatlı hayvanlarda CRISPR-Cas9 sistemi aracılı genom düzenlemesinin şematik gösterimi (27).

Kuş türlerinde CRISPR/Cas9 aracılı gen nakavtına yönelik mevcut yöntemler, yumurtanın ekstraembriyonik kan damarına daha sonra enjeksiyon için in vitro ilkel germ hücrelerinin izolasyonunu, kültürünü ve genom modifikasyonunu gerektirir.

Bu işlemler yüksek vasıflı teknikleri ve optimize edilmiş koşulların oluşturulmasını gerektirir. CRISPR işlemi ise kuş hücrelerinde gRNA ve Cas9 geninin ekspresyonu için optimize edilmiş CRISPR/Cas9 vektörü, yeni bırakılan yumurtalardaki kuş blastodermine enjekte edilmiştir. Ortaya çıkan yavrular, gende hedeflenen mutasyonlara sahip yavrular üretmiş ve sonuçta homozigot mutant kuşlar oluşmuştur. Bu basitleştirilmiş kuş gen susturulması sürecinin uygulanmasını, çeşitli araştırma alanlarındaki kuşların gen susturulması çalışmalarını hızlandırabilir ve gelecekteki tarımsal uygulamaların ilerlemesine yol açabileceği düşünülmektedir.

Genomu düzenlenmiş bıldırcınların üretimi, başlangıçta melanofilin (MLPH) genini hedef alan CRISPR/Cas9 sistemini içeren bir adenovirüs enjeksiyonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. MLPH tüy pigmentasyonunda görev yaptığı için genomu düzenlenmiş bıldırcınların tüyleri gri iken yapılan çalışmada, germ hattı kimerik G0 bıldırcınları genomu düzenlenmiş nesil üretmiş ve germ hattı aktarımının etkinliği %2,4 ila %10 arasında değişmiştir; bu, adenovirüs enfeksiyonunun blastodermal hücrelerin çoğalmasına yönelik CRISPR/Cas9 sistemini dönüştürmek için bir gen dağıtım sistemi olarak etkinliğini ortaya koymuştur. Ek olarak, aynı adenovirüs enjeksiyonu kullanılarak daha yüksek vücut ağırlığına ve kas kütlesine sahip, miyostatin geni düzenlenmiş bıldırcınlar başarıyla üretilmiştir (28). CRISPR/Cas9 sisteminin lokal dokuya adenoviral transdüksiyonunun etkileri civciv bacak kasında da gösterilmiştir (29). Daha yakın zamanlarda, genomu düzenlenmiş ördek yavruları, blastodermlere adenoviral enfeksiyon yoluyla başarılı bir şekilde üretilmiş; bu, tavuk ve bıldırcın dışındaki kümes hayvanlarında ve su kuşlarında adenovirüslerle genom düzenleme teknolojisinin etkinliğini göstermiştir (30). Önceki çalışmalar ayrıca tavuk, bıldırcın ve hindi hücrelerinde adenovirüs tip 5'in transdüksiyon potansiyelini doğrulamıştır (31). Ancak bu yöntem bir devreye sokma sistemi olarak uygun olmayabilir çünkü CRISPR/Cas9 sistemi ve donör şablonunun her ikisinin de aynı hücrelere verilmesi gerekir, bu da verimliliğin düşük olduğunu gösterir (Şekil-1A).

PGC (Primordial germ cell: İlkel germ hücresi) transplantasyon yöntemini kullanan Van De Lavoir ve ark. (32), germ hattı kimeralarında (Kimera: birden fazla genotipe sahip hücrenin veya dokunun bir arada canlılıklarını devam ettirebilme durumu) raportör gen olan yeşil floresan proteinin başarılı bir şekilde ekspresyonunu bildirmiştir. Transpozon sistemi o zamandan beri transgenesis için en etkili sistem olarak tanımlanmıştır (33). Transpozon elemanları, amaçlanan yabancı genin entegrasyonuna aracılık eden bir genom içindeki konumlarını değiştirme yeteneğine sahiptir. Park ve Han, piggyBac ve Tol2 transpozonunu kullanarak yaklaşık %50 germ hattı kimerizmi bildirmişlerdir (34). Başka bir yöntem, transpozon plazmidlerinin lipofektamin ile embriyonik kan damarlarına doğrudan enjeksiyonunu, dolaşımdaki PGC'lerin dönüştürülmesini ve ardından transgenik tavukların üretilmesini içermektedir (35). Zhu ve ark. insan immünoglobulin kodlu genleri aşama X'ten türetilmiş embriyonik kök hücrelere başarılı bir şekilde entegre etmiştir (36), bu da transgenik kümes hayvanlarının tarım ve biyotıp gibi endüstrilerde kullanılabilirliğine işaret etmektedir (ŞEKİL- B).

PGC yöntemini kullanan genom düzenleme teknolojileri, son on yılda embriyogenez üzerine temel araştırmaların yanı sıra tarım ve biyotıp için geliştirildi. 2016 yılında, iyi bilinen alerjen gen proteinleri olan iki yumurta beyazı gen, ovalbumin ve ovomukoid, kültürlenmiş tavuk PGC'lerinde px330 plazmitinin lipofeksiyonu ile verimli bir şekilde mutajenize edilmiş ve ovomukoid geni düzenlenmiş germ hattı kimerik horoz oluşturulmuştur (37) (Şekil 1C). Aynı yıl, immünoglobulin ağır zincir geninde bir loxP bölgesi taşıyan transgenik tavuklar, CRISPR/Cas9 aracılı HDR kullanılarak PGC'ler tarafından başarıyla üretilmiştir (38). HDR, CRISPR/Cas9 sistemindeki sgRNA hedefli bölgede eksojen bir donör dizisi mevcut olduğunda hedef genom dizisini değiştiren homolog rekombinasyon yolu tarafından gerçekleştirilen bir hücresel onarım mekanizmasıdır. Daha sonra ovalbumin lokusunda yeniden birleştirilen insan interferon-(hIFN-) genini taşıyan bir germ hattı kimera, CRISPR/Cas9 aracılı HDR yöntemiyle üretilmiş ve yumurta beyazında yüksek hIFN protein seviyeleri üretilmiştir (24). Temel araştırma alanlarında bile yakın zamanda yapılan bir çalışma, testis belirleyici gen olarak çift cinsiyet ve mab-3 ile ilişkili transkripsiyon faktörü 1'i (DMRT1) hedef alan, genomu düzenlenmiş bir tavuğu başarıyla üretmiştir (39) (ŞEKİL-1C).

Her ne kadar PGC'leri kullanan kimera üretim yöntemi, genomu değiştirilmiş kuşları verimli bir şekilde üretse de, PGC'lerin in vitro uzun süreli kültürü yalnızca tavuklarda mevcuttur. Ek olarak, hem somatik hem de germ hatları dahil olmak üzere genetiği değiştirilmiş kuşlara ulaşmak için iki nesil gerekmektedir. Bu dezavantajların üstesinden gelmek için, sperm transfeksiyonu destekli gen düzenleme (STAGE) yöntemi yakın zamanda oluşturulmuştur (40) (Şekil 1D). Bu yöntem suni tohumlama öncesinde spermatozoanın Cas9 mRNA ve sgRNA ile doğrudan transfekte edilmesini içermektedir. Bu çalışmada, DMRT1 gen lokusunu hedef alan genomu düzenlenmiş tavuk yavruları bir nesilde başarıyla üretildi; ancak mRNA stabilitesi gibi birçok faktör nedeniyle verimlilik düşüktü. Bununla birlikte, bu protokoldeki iyileştirmeler, bunun çok çeşitli kuş türlerine uygulanmasıyla sonuçlanabilir ve bu da yeni araştırma fırsatları sağlayacaktır (ŞEKİL-1D).

Tablo 1. *Kanatlı hayvanlarda kullanılmış olan CRİSPR yöntemleri ve genler*

Hedef gen	Gen susturma/ gen aktifleşme	Kullanılan yöntem	Fenotip	Referans
G0S2	Gen susturma	CRISPR-Cas9	Yağ birikiminin azaltılması	41
MSTN	Gen susturma	CRISPR-Cas9	Artan kas büyümesi ve yağ birikiminin azaltılması	42-tavuk 43-bıldırcın
tva, tvc, tvj	Gen susturma	CRISPR-Cas9	ALV direnci	44
OVM	Gen susturma	CRISPR-Cas9	Yumurta beyazında ovomukoid birikimi yok	45
DMRT1	Gen susturma	CRISPR-Cas9	DMRT1 cinsiyet belirleme işlevi	46
OV	Gen aktifleşme	CRISPR-Cas9	hIFN-β'nın yumurta beyazında birikmesi	24
Z chr-hedefli	Gen aktifleşme	CRISPR-Cas9	Erkeğe özgü GFP ekspresyonu	47

(OV, ovalbumin; TALEN, transkripsiyon aktivatörü benzeri efektör nükleazlar; G0S2, G0/G1 anahtar geni 2; CRISPR-Cas9, düzenli aralıklarla kümelenmiş kısa palindromik tekrar-CRISPR ilişkili protein 9; MSTN, miyostatin; OVM, ovomusin; DMRT1, doublesex ve mab-3 ilişkili transkripsiyon faktörü 1; hIFN-β, insan interferonu β; GFP, yeşil floresan proteini)(48).

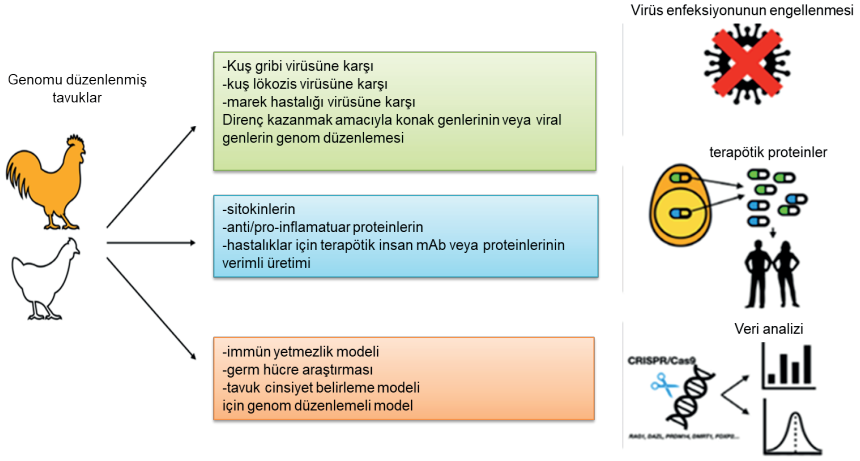
Her ne kadar homolog rekombinasyon yoluyla nakavt tavuklar üretilmiş olsa da kuş türlerinde bu süreç karmaşık ve zaman alıcıdır. Germ hücre özellikleri kaybı olmadan in vitro olarak muhafaza edilebilen germline yetkin tavuk primordial germ hücreleri kullanılarak, eksojen transgenlerin genomik entegrasyonu olmadan spesifik genlere göre tasarlanmış tavuklar üretmek mümkündür. İlkel germ hücresi aracılı germline iletim sistemi, genleri düzenlenmiş tavuklar üretmek için geliştirilmiştir (34). Primordial germ hücreleri, cinsiyet farklılaşması ve olgunlaşmasından sonra spermlerin veya oositlerin progenitörleridir (34,41). Tavuk PGC'leri embriyolardan izole edilebilir ve bunları in vitro olarak genişletilebilir. Kültürlenmiş tavuk PGC'lerinin Cas9 ve kılavuz RNA (gRNA) plazmitleri ile birlikte transfeksiyonundan sonra gene göre uyarlanmış PGC'ler, alıcı embriyoların kan damarlarına nakledilir. Son olarak gen düzenlemesi yapılmış yavrular, test çapraz analizi ve genotipleme yoluyla taranabilir ve seçilebilir. Park ve arkadaşları, CRISPR-Cas9 sistemini kullanarak G0/G1 geçiş geni 2 (G0S2) ile düzenlenmiş tavuklar üretti. G0S2, lipolizin ilk adımını (triasilgliserollerin diasilgliserollere hidrolizi) katalize eden adipoz trigliserit lipazın (ATGL, aynı zamanda patatin benzeri fosfolipaz alanı içeren protein 2

olarak da bilinir) bir inhibitörüdür (41). Bu nedenle, G0S2 inhibisyonunun ortadan kaldırılması nedeniyle ATLG enziminin sürekli reaktivitesinin, yağ dokusunda triasilgliserollerin sürekli hidrolizi ile sonuçlanacağı, lipit içeriğinin ve yağ birikiminin azalacağı hipotezi ileri sürülebilir. Tavuğun aşırı vücut yağı, sağlık ve üretimle ilgili sorunlara neden olabilir; gerçekten de şişman etlik piliçlerin bacaklarında sıklıkla zayıflık görülür. Damızlıklarda üreme performansının azalması gibi diğer problemler, artan yağ birikiminden kaynaklanabilir. Karkastaki yağın türü her durumda garanti edilmez ve sağlık açısından tehlikelere yol açabilir. Gelecek çalışmalar, tavuk yağındaki düzenleyici yolları ve metabolizma mekanizmalarını araştırmak için tasarlanabilir. Ek olarak, G0S2 nakavt tavuklar, fare modelleriyle karşılaştırma yapmak amacıyla, soydan gelen bir hayvan modeli olarak obeziteyi araştırmak için kullanılabilir. Genleri değiştirilmiş tavukların çeşitli endüstrilerde uygulamaları olabilir. Koslová ve arkadaşları (43), CRIPSR-Cas9 sistemini kullanarak kuş lökozis virüsüne (ALV) dirençli tavuklar üretmişlerdirler. Erken durdurma kodonu olan ALV'ye dirençli tavuklar, ALV reseptörlerinde mutasyona uğramıştır ve ALV'nin tüm alt gruplarına duyarlı değildir (45). Genleri değiştirilmiş olan hayvanlar yakın gelecekte hayvancılık endüstrisine fayda sağlayabilir. Genomuna uygun tavukların geliştirilmesi yalnızca kuş biyolojisini ilerletmekle kalmayacak, aynı zamanda temel araştırmaların da ötesine geçecektir. Aday gen hedefli platform, hassas ve verimli genom mühendisliğini kolaylaştırmakta ve genomu düzenlenmiş tavukların diğer endüstrilere ve insan hastalıklarına yönelik hayvan modelleri olarak uygulama aralığını genişletebileceği düşünülmektedir.

PGC aracılı germline iletim sistemi, daha önce transgenik kuş üretimi için açıklanan yönteme benzer şekilde, CRISPR/Cas9 sistemi aracılığıyla genomu düzenlenmiş tavukların geliştirilmesine yol açmış ve CRISPR/Cas9 aracılı genom düzenleme sistemi, kuş türlerine etkili bir şekilde uygulanmıştır (37). Oishi ve ark. CRISPR/Cas9 sistemini kullanarak PGC'lerin genomunda başlıca yumurta alerjenleri olan tavuk OV'sini ve ovomukoid'i (OVM) yok etmiştir. Tavuk IgH değişken bölgesine (V bölgesi) CRISPR/Cas9 aracılı hedefli gen yerleştirilmesi de bildirilmiştir (37). Özellikle, CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak hedef bölgede çift sarmallı kırılmalar indüklenmiş, ardından homolog rekombinasyonla hedef gen yerleştirilmiştir. Şaşırtıcı bir şekilde, rekombinasyon verimliliği, tavuk PGC'leri için geleneksel homolog rekombinasyon yöntemlerinin verimliliği ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde iyileştirmiştir (%9'a kadar) (49). Ek olarak, doku büyümesini ve gelişimini kontrol eden miyostatin (MSTN) geni ve yağ birikimini düzenleyen G0/G1 anahtar geni (G0S2) hedeflenerek kas kütlesi artan genomu düzenlenmiş tavuk üretilmiştir (41,42). Benzer bir çalışmada, CRISPR/Cas9 içeren rekombinant adenovirüs bıldırcın blastodermine enjekte edilmiş ve MSTN genindeki sistein 42'nin silinmesiyle homozigot mutantlarda vücut ağırlığında ve kas kütlesinde önemli artışlara neden olmuştur (50). Benzer şekilde bıldırcın melanofilinin (MLPH) hedeflenen silinmesi gösterilmiştir. Kuş türlerinde CRISPR/Cas9 aracılı in vivo genom düzenleme de tanıtılmıştır. Cas9 eksprese eden tavuklar, lenfositlerde ve embriyonik beyinlerde başarılı in vivo gen bozulması göstermiştir (51).

Kanatlı Modeli Geliştirmede Genom Düzenlemenin Potansiyel Uygulamaları

Kuşların germ hattı iletimi ve genom düzenleme teknolojisindeki ilerlemeler, araştırmacıların hastalığa dirençli bir model, etkili bir biyoreaktör ve bilimsel kullanıma yönelik akademik bir model de dahil olmak üzere genomu düzenlenmiş çeşitli kuş modelleri geliştirmesine olanak tanır (Şekil 2).



Şekil 2. Genomu düzenlenmiş kuşların temsili örnekleri (52)

Virüsler, yaşam döngülerini başarılı bir şekilde tamamlamak için konakçı proteinleri kullanmalıdır ve konakçı geni düzenlenmiş kuşlar, kuş gribi virüsleri, kuş lökozis virüsleri ve Marek hastalığı virüsleri dahil olmak üzere çeşitli virüs türlerine karşı dirençlidir. Terapötik proteinleri kodlayan hedef gen, kuş biyoreaktörü üretmek için ovalbumin geni gibi tavuk genomuna eklenir. Yumurta akı, tıbbi amaçlarla kullanılabilecek yüksek miktarda hedef protein içerir. Tavuktaki spesifik gen nakavt veya gen etiketleme, araştırmacıların gen fonksiyonunu incelemesi için uygun bir model sağlamaktadır.

Kanatlılarda hastalıkların kontrolü ve önlenmesi, sürdürülebilir kümes hayvanı endüstrisi için temel bir ön koşuldur. Bu bağlamda, kuş gribi, Marek hastalığı ve kuş lökozu gibi kuş hastalıklarını kontrol etmek için genom düzenleme teknolojileri kullanılmıştır (53). Bazı durumlarda kuş viral hastalıklarının etkili bir şekilde önlenmesi, virüse özgü reseptörlerin düzenlenmesiyle sağlanmıştır. Örneğin, ALV'nin bir alt grubu tavuklarda kansere yol açabilir ve bu, konakçıya özgü ALV reseptörlerinin düzenlenmesiyle önlenebilir (54). Tavuk NHE1, TVA, TVB ve TVC'nin (ALV'nin spesifik reseptörleri) kesin genom düzenlemesi ALV-J, ALV-A, ALV-B ve ALV-C alt grupları) tavuk DF1 hücre hattında elde edilmiştir (44). Bu tür gen düzenleme, viral enfeksiyonu etkili bir şekilde azaltarak genomu düzenlenmiş tavukların gelişmesine yol açar. Hücre seviyesinin ötesinde, ALVJ girişi için kritik bir kalıntı olan NHE1'in triptofan 38'i (W38), ALV-J'ye dirençli tavuk üretmek için ticari bir tavuk hattında tam olarak silinmiştir (39).

Sonuç

Yıllar içinde CRISPR teknolojisinin geliştirilmesi ve iyileştirilmesi, esas olarak gıda amaçlı et veya yumurta üretimi için transgenik kuş hatları üretmeye imkan sağlamıştır. CRISPR teknolojisinin etkisi, evrensel gıda güvenliğiyle ilişkili zorlukların ele alınmasına yardımcı olacak kümes hayvanı ürünlerinin verimli bir şekilde iyileştirilmesine ve sürdürülebilirliğine yol açabilir. CRISPR teknolojisi kullanılarak et ve yumurta üretimi için yetiştirilen kuşlar, yem dönüşümü, sindirilebilirlik, artan yumurta üretimi, büyüme ve kuşların genel olarak iyileştirilmiş performansı gibi kümes hayvanlarıyla ilgili özelliklerin ilerlemesi üzerinde muazzam bir etkiye sahip olabilir. CRISPR teknolojisinden kaynaklanan yenilikler, hastalık direnci, bağışıklık fonksiyonu ve aşılar gibi alanlarda da gelişmelere yol açabilir. Bu da kümes hayvanı sağlığını iyileştirecek, tavuk yumurtaları kullanılarak üretilen aşıların güvenliğini, gıda güvenliğini ve üretimini artıracaktır.

CRISPR teknolojisinin kümes hayvanlarında gelecekteki uygulamaları, hastalık tedavisi ve önlenmesi için geniş fırsatlar nedeniyle insanlığa fayda sağlayabilecek biyomedikal araştırmalarda umut verici potansiyellere sahiptir. Bu uygulamaların çoğu, biyomedikal araştırmalarda büyük potansiyel gösteren kanatlılara odaklanmıştır. CRISPR/Cas9 gen düzenleme teknolojilerindeki son gelişmeler, yasal süreçlerde onay alma zorlukları ve gıda hayvanlarının üretiminde CRISPR teknolojisinin halk tarafından algılanması ve kabul edilebilirliği gibi engellerin azaltılmasına veya ortadan kaldırılmasına yardımcı olabilir.

Kaynaklar

1. Ballantyne, M., Woodcock, M., Doddamani, D., Hu, T., Taylor, L., Hawken, R.J., & McGrew, M.J. (2021). Direct allele introgression into pure chicken breeds using Sire Dam Surrogate (SDS) mating. Nat Commun 12, 659.
2. Mukae, T., Okumura, S., Watanobe, T., Yoshii, K., Tagami, T., & Oishi, I. (2020). Production of Recombinant Monoclonal Antibodies in the Egg White of Gene-Targeted Transgenic Chickens. Genes (Basel) 12.
3. Woodcock, M.E., Idoko-Akoh, A., & McGrew, M.J. (2017). Gene editing in birds takes flight. Mamm Genome 28, 315-323.
4. Lee, J., Kim, D.H., Karolak, M.C., Shin, S., & Lee, K. (2022). Generation of genome-edited chicken and duck lines by adenovirus-mediated in vivo genome editing. Proc Natl Acad Sci U S A 119, e2214344119.
5. Song, Y., Duraisamy, S., Ali, J., Kizhakkayil, J., Jacob, V.D., Mohammed, M.A., Eltigani, M.A., Amisetty, S., Shukla, M.K., Etches, R.J., & van de Lavoir, M.C. (2014) Characteristics of long-term cultures of avian primordial germ cells and gonocytes. Biol. Reprod. 90, 15. (CrossRef)
6. Korshunova, L.G., Karapetyan, R.V., Ziadinova, O.F., & Fisinin, V.I. (2019). Transgenic poultry: derivation and areas of application. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya (Agricultural Biology),* 54(6), 1080-1094.

7. Hwang, Y.S., & Han, J.Y. (2018) Transgenesis and Genome Editing in Poultry. In Application of Genetics and Ge nomics in Poultry Science. IntechOpen.
8. Doran, T., Challagulla, A., Cooper, C., Tizard, M., & Jenkins, K. (2017). Genome editing in poultry—opportunities and impacts. Natl. Inst. Biosci. J. 1, 1–8. doi: 10.2218/natlinstbiosci.1.2016.1742
9. Brown, W.R., Hubbard, S.J., Tickle, C., & Wilson, S.A. (2003) The chicken as a model for large-scale analysis of vertebrate gene function. Nat Rev Genet 4:87–98. https://doi.org/10.1038/nrg998
10. Daly, O.M., Gaboriau, D., Karakaya, K., King, S., Dantas, J.T., Lalor, P., Dockery, P., Krämer, A., & Morrison, C.G. (2016) CEP164-null cells generated by genome editing show a ciliation defect with intact DNA repair capacity. J Cell Sci 129:1769–1774. https://doi.org/10.1242/jcs. 186221
11. Cooper, C. A., Doran, T. J., Challagulla, A., Tizard, M. L. V., & Jenkins, K. A. (2018). Innovative approaches to genome editing in avian species. J. Anim. Sci. Biotechnol. 9:15. doi: 10.1186/s40104-018-0231-7
12. Razzaq, A., & Masood, A. (2018). CRISPR/Cas9 system: a breakthrough in genome editing. Mol. Biol. 7:210. doi: 10.4172/2168-9547.100021
13. Chu, V. T., Weber, T., Wefers, B., Wurst, W., Sander, S., Rajewsky, K., & Kühn, R. (2015). Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. Nat. Biotechnol. 33, 543–548. doi: 10.1038/nbt.3198
14. Pennisi, E. (2013). The CRISPR craze. Science 341, 833–836. doi: 10.1126/science.341.6148.833
15. Gonatopoulos-Pournatzis, T., Aregger, M., Brown, K. R., Farhangmehr, S., Braunschweig, U., Ward, H. N., Ha, K.C., Weiss, A., Billmann, M., Durbic, T., Myers, C.L., Blencowe, B.J., & Moffat, J. (2020). Genetic interaction mapping and exon-resolution functional genomics with a hybrid Cas9–Cas12a platform. Nat. Biotechnol. 38, 638–648. doi: 10.1038/s41587-020-0437-z
16. Li, J., Shou, J., Guo, Y., Tang, Y., Wu, Y., Jia, Z., Zhai, Y., Chen, Z., Xu, Q., & Wu, Q. (2015). Efficient inversions and duplications of mammalian regulatory DNA elements and gene clusters by CRISPR/Cas9. J. Mol. Cell Biol. 7, 284–298. doi: 10.1093/jmcb/mjv016
17. Shalem, O., Sanjana, N. E., Hartenian, E., Shi, X., Scott, D. A., Mikkelsen, T. S., Heckl, D., Ebert B.L., Root, D.E., Doench, J.G., & Zhang, F. (2014). Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. Science, 343(6166), 84-87.
18. Ahn, J., Shin, S., Suh, Y., Park, J.Y., Hwang, S., & Lee, K. (2015). Identification of the avian RBP7 gene as a new adipose-specific gene and RBP7promoter-driven GFP expression in adipose tissue of transgenic quail. PLoS One. 10:e0124768.
19. Chen, P. R., Shin, S., Choi, Y.M., Kim, E., Han, J.Y., & Lee, K. (2016). Overexpression of G0/G1 Switch Gene 2 in Adipose Tis sue of Transgenic Quail Inhibits Lipolysis Associated with Egg Laying. Int. J. Mol. Sci. 17:384.
20. Park, T. S., Park, J., Lee, J. H., Park, J. W., & Park, B. C. (2019). Disruption of G0/G1 switch gene 2 (G0S2) reduced abdominal fat deposition and altered fatty acid composition in chicken. FASEB J. 33, 1188–1198. doi: 10.1096/fj.201800784r

21. Lee, H. J., Yoon, J. W., Jung, K. M., Kim, Y. M., Park, J. S., Lee, K. Y., Park, K.J., Hwang, Y.S., Park, Y.H., Rengaraj, D., & Han, J.Y (2019b). Targeted gene insertion into Z chromosome of chicken primordial germ cells for avian sexing model development. FASEB J. 33, 8519–8529. doi: 10.1096/fj.201802671R

22. Ahn, J., Lee, J., Park, J. Y., Oh, K. B., Hwang, S., Lee, C. W., & Lee, K. (2017). Targeted genome editing in a quail cell line using a customized CRISPR/Cas9 system. Poultry science, 96(5), 1445-1450.

23. Hellmich, R., Sid, H., Lengyel, K., Flisikowski, K., Schlickenrieder, A., Bartsch, D., Thoma, T., Bertzbach, L.D., Kaufer, B.B., Nair, V., Preisinger, R., & Schusser, B. (2020). Acquiring resistance against a retroviral infection via CRISPR/Cas9 targeted genome editing in a commercial chicken line. Front. Genome Ed. 2:3. doi: 10.3389/fgeed.2020.00003

24. Oishi, I., Yoshii, K., Miyahara, D., & Tagami, T. (2018). Efficient production of human interferon beta in the white of eggs from ovalbumin gene–targeted hens. Sci. Rep. 8:10203. doi: 10.1038/s41598-018-28438-2

25. Salter, D.W., Smith, E.J., Hughes, S.H., Wright, S.E., Crittenden, L.B. (1987). Transgenic chickens: Insertion of retroviral genes into the chicken germ line. Virology 157, 236–240. (CrossRef)

26. Lillico, S.G., Sherman, A., McGrew, M.J., Robertson, C.D., Smith, J., Haslam, C., Barnard, P., Radcliffe, P.A., Mitrophanous, K.A., Elliot, E.A., Sang, H.M. (2007). Oviduct-specific expression of two therapeutic proteins in transgenic hens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2007, 104, 1771–1776. (CrossRef)

27. Mizushima, S., Sasanami, T., Ono, T., & Kuroiwa, A. (2023). Current Approaches to and the Application of Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) for Avian Genome Editing. Genes, 14(3), 757.

28. Lee, J., Kim, D.H., & Lee, K. (2020) Muscle Hyperplasia in Japanese Quail by Single Amino Acid Deletion in MSTN Propeptide. Int. J. Mol. Sci. 21, 1504. (CrossRef)

29. Xu, K., Han, C.X., Zhou, H., Ding, J.M., Xu, Z., Yang, L.Y., He, C., Akinyemi, F., Zheng, Y.M., Qin, C., Luo, H.X., & Meng, H. (2020) Effective MSTN Gene Knockout by AdV-Delivered CRISPR/Cas9 in Postnatal Chick Leg Muscle. Int. J. Mol. Sci. 21, 2584. (CrossRef) (PubMed)

30. Lee, J., Kim, D.H., Karolak, M.C., Shin, S., & Lee, K. (2022). Generation of genome-edited chicken and duck lines by adenovirus-mediated in vivo genome editing. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 119, e2214344119. (CrossRef)

31. Shin, J., Bae, D.R., Latshaw, J.D., Wick, M.P., Reddish, J.M., & Lee, K. (2009). Technical note: A gene delivery system in the embryonic cells of avian species using a human adenoviral vector. J. Anim. Sci. 87, 2791–2795. (CrossRef)

32. van de Lavoir, M.C., Diamond, J.H., Leighton, P.A., Mather-Love, C., Heyer, B.S., Bradshaw, R., Kerchner, A., Hooi, L.T., Gessaro, T.M., Swanberg, S.E., Delany, M.E., & Etches, R.J. (2006). Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. Nature 441, 766–769. (CrossRef)

33. Macdonald, J., Taylor, L., Sherman, A., Kawakami, K., Takahashi, Y., Sang, H.M., & McGrew, M.J. (2012). Efficient genetic modification and germ-line transmission of

primordial germ cells using piggyBac and Tol2 transposons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109, 1466–1472. (CrossRef)

34. Park, T.S., & Han, J.Y. (2012) A piggyBac transposition into primordial germ cells is an efficient tool for transgenesis in chickens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 109, 9337–9341. (CrossRef)
35. Tyack, S.G., Jenkins, K.A., O'Neil, T.E., Wise, T.G., Morris, K.R., Bruce, M.P., McLeod, S., Wade, A.J., McKay, J., Moore, R.J., Schat, K.A., Lowenthal, J.W., & Doran, T.J. (2013). A new method for producing transgenic birds via direct in vivo transfection of primordial germ cells. Transgenic Res. 22, 1257–1264. (CrossRef) (PubMed)
36. Zhu, L., van de Lavoir, M.C., Albanese, J., Beenhouwer, D.O., Cardarelli, P.M., Cuison, S., Deng, D.F., Deshpande, S., Diamond, J.H., Green, L., Halk, L.E., Heyer, B.S., Kay, R.M., Kerchner, A., Leighton, P.A., Mather, C.M., Morrison, S.L., Nikolov, Z.L., Passmore, D.B., Pradas-Monne, A., Preston, B.T., Rangan, V.S., Shi, M., Srinivasan, M., White,S.G., Winters-Digiacinto, P., Wong, S., Zhou, W., & Etches, R.J. (2005). Production of human monoclonal antibody in eggs of chimeric chickens. Nat. Biotechnol. 23, 1159–1169. (CrossRef) (PubMed)
37. Oishi, I., Yoshii, K., Miyahara, D., Kagami, H., & Tagami, T. (2016). Targeted mutagenesis in chicken using CRISPR/Cas9 system. Sci. Rep. 2016, 6, 23980. (CrossRef)
38. Dimitrov, L., Pedersen, D., Ching, K.H., Yi, H., Collarini, E.J., Izquierdo, S., van de Lavoir, M.C., & Leighton, P.A. (2016). Germline Gene Editing in Chickens by Efficient CRISPR-Mediated Homologous Recombination in Primordial Germ Cells. PLoS ONE 11, e0154303. (CrossRef)
39. Lee, H.J., Seo, M., Choi, H.J., Rengaraj, D., Jung, K.M., Park, J.S., Lee, K.Y., Kim, Y.M., Park, K.J., Han, S.T., Lee, H.K., Yao, H.H., & Han, J.Y (2021). DMRT1 gene disruption alone induces incomplete gonad feminization in chicken. FASEB J. 35, e21876. (CrossRef)
40. Cooper, C.A., Challagulla, A., Jenkins, K.A., Wise, T.G., O'Neil, T.E., Morris, K.R., Tizard, M.L., & Doran, T.J. (2017). Generation of gene edited birds in one generation using sperm transfection assisted gene editing (STAGE). Transgenic Res. 26, 331–347. (CrossRef)
41. Park, T.S., Park, J., Lee, J.H., Park, J., & Park, B. (2019) Disruption of G0/G 1 switch gene 2 (G0S2) reduced abdominal fat deposition and altered fatty acid composition in chicken. FASEB J. 33:1188-98. https://doi.org/10.1096/fj.201800784R
42. Kim G, Lee JH, Song S, Kim, S.W., Han, J.S., Shin, S.P., Park, B., & Park, T.S. (2020). Generation of myostatin-knockout chickens mediated by D10A-Cas9 nickase. FASEB J. 34:5688-96. https://doi.org/10.1096/fj.201903035R
43. Lee J, Kim D, & Lee K. (2020). Muscle hyperplasia in Japanese quail by single amino acid deletion in MSTN propeptide. Int J Mol Sci. 21:1504. https://doi.org/10.3390/ijms21041504
44. Koslová, A., Kučerová, D., Reinišová, M., Geryk, J., Trefil, P., & Hejnar, J. (2018). Genetic resistance to avian leukosis viruses induced by CRISPR/ Cas9 editing of specific receptor genes in chicken cells. Viruses. 10:605. https://doi.org/10.3390/v10110605

45. Mukae, T., Yoshii, K., Watanobe, T., Tagami, T., & Oishi, I. (2021). Production and characterization of eggs from hens with ovomucoid gene mutation. Poult Sci. 100:452-60. https://doi.org/ 10.1016/j.psj.2020.10.026

46. Ioannidis J, Taylor G, Zhao D, Liu, L., Idoko-Akoh, A., Gong, D., Lovell-Badge, R., Guioli, S., McGrew M.J., & Clinton, M. (2021). Primary sex determination in birds depends on DMRT1 dosage, but gonadal sex does not determine adult secondary sex characteristics. Proc Natl Acad Sci 118:e2020909118. https://doi.org/10.1073/pnas.2020909118

47. Lee, H.J., Yoon, J.W., Jung, K.M., Kim, Y.M., Park, J.S., Lee, K.Y., Park, K.J., Hwang, Y.S., Park, Y.H., Rengaraj, D., & Han, J.Y. (2019). Targeted gene insertion into Z chromosome of chicken primordial germ cells for avian sexing model development. FASEB J. 33:8519- 29. https://doi.org/10.1096/fj.201802671R

48. Park, T. S. (2023). Gene-editing techniques and their applications in livestock and beyond. Animal Bioscience, 36(2), 333.

49. Dimitrov, L., Pedersen, D., Ching, K.H., Yi, H., Collarini, E.J., Izquierdo, S., van de Lavoir, M.C., & Leighton, P.A. (2016). Germline Gene Editing in Chickens by Efficient CRISPR-Mediated Homologous Recombination in Primordial Germ Cells. PLoS ONE 11, e0154303. (CrossRef)

50. Lee, J., Kim, D.H., & Lee, K. (2020). Muscle Hyperplasia in Japanese Quail by Single Amino Acid Deletion in MSTN Propeptide. Int. J. Mol. Sci. 21, 1504. (CrossRef)

51. Rieblinger, B., Sid, H., Duda, D., Bozoglu, T., Klinger, R., Schlickenrieder, A., Lengyel, K., Flisikowski, K., Flisikowska, T., Simm, N., Grodziecki, A., Perleberg, C., Bähr, A., Carrier, L., Kurome, M., Zakhartchenko, V., Kessler, B., Wolf, E., Kettler, L., Luksch, H., Hagag, I.T., Wise, D., Kaufman, J., Kaufer, B.B., Kupatt, C., Schnieke, A., & Schusser, B. (2021). Cas9-expressing chickens and pigs as resources for genome editing in livestock. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 118, e2022562118. (CrossRef)

52. Kim, Y. M., Woo, S. J., & Han, J. Y. (2023). Strategies for the Generation of Gene Modified Avian Models: Advancement in Avian Germline Transmission, Genome Editing, and Applications. Genes, 14(4), 899.

53. Koslová, A.; Trefil, P.; Mucksová, J.; Reinišová, M.; Plachý, J.; Kalina, J.; Kuˇ cerová, D.; Geryk, J.; Krchlíková, V.; Lejˇ cková, B.; et al. Precise CRISPR/Cas9 editing of the NHE1 gene renders chickens resistant to the J subgroup of avian leukosis virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2020, 117, 2108–2112. (CrossRef)

54. Fadly, A.M. Isolation and identification of avian leukosis viruses: A review. Avian Pathol. 2000, 29, 529–535. (CrossRef) (PubMed)

YENİ NESİL GENETİK MODELLEME CRISPR/ CAS9 SİSTEMİ YARDIMI İLE KOYUN VE KEÇİLERDE VERİM ARTTIRMA

HALİT YÜCEL*
KÜBRA EKİNCİ **
ALTUĞ KARAMAN***

Giriş

Hayvan yetiştiriciliğinde bazı zorlukların bulunması et ve süt gibi ürünlerin üretim verimliliği üzerinde sorunlar ortaya çıkarmaya başlamıştır (1).

Aynı zamanda geleneksel yetiştiriciliğin insan popülasyonunun aşırı artışını karşılayamadığı görülmektedir (2). İnsan nüfusunun artışını karşılamak için yapılan bazı geleneksel yöntemler çevre kirliliği ve küresel ısınmaya kadar etkileri bulunmaktadır (3). Ek olarak yetiştiricilikte hem klasik ıslah hem de moleküler ıslah çalışmaları değişen çevresel koşullardan dolayı ortaya çıkan patojen durumlara karşı dirençli genotiplerin yeterli düzeyde olamayacağı ön görülmekte ve genom düzenlemelerine doğru bir geçişinolması gerektiği düşünülmektedir (4). Proundfoot ve ark.'larına (5) göre genom düzenlemesinin yetiştiricilik, üretim ve patojenite sonucu oluşan hastalıklara karşı kullanılabilir bir yöntem olduğunu vurgulamışlardır. Çiftlik hayvanlarındaki genetik modifikasyon işlemleri sonucu istenilen özellikte ürün oluşturma ve bu oluşan ürünler hem hayvan hemde insan sağlığı için kaliteli bir ürün olmaktadır (6,7). Geçmiş yıllarda genetik mühendisliğinin hayvancılıkta kullanılması oldukça zor ve genelikle somatik hücrenin direkt transfer yöntemi kullanılmaktaydı (8). Bu yöntem ilk olarak 1997 yılında Wilmut ve ark. (9) tarafından bir koyunun meme bezi hücresinden *Dolly*'in üretilmesiyle kullanılmaya başlanmıştır. Ancak genetik mühendisliği olarak sadece somatik hücre transferi kullanılmamış, gelişen teknoloji ile birlikte genom düzenlemesi olarak ZFN (çinko parmak nüklea-

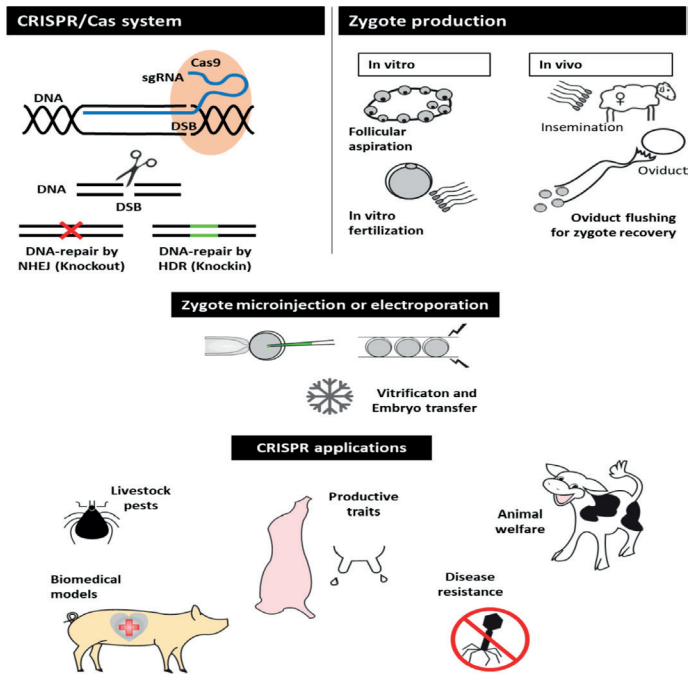
* halit_ksu@hotmail.com
** kubraekinci@atauni.edu.tr
*** altugkaraman@munzur.edu.tr

zları), TALEN (transkripsiyon aktivatör benzeri efektör nükleazlar) ve CRISPR / Cas9 (düzenli aralıklarla dizilen kısa palindromik tekrarlar / CRISPR ile ilişkili protein 9) gibi yöntemler ön plana çıkmaya başlamıştır (8).

Özellikle CRISPR sistemi hayvancılıkta üretimi artırmak, hastalıklara karşı dirençlilik sağlamak ve tarımsal kirliliği azaltmak için tercih edilen bir yöntem olmaya başlamıştır (10). Kısaca DNA veya genetik modifikasyon reaksiyonlarının indüklenmesi için çeşitli enzimler, virüsler, transpozonlar, RNA teknolojileri, rekombinant enzimler ve endonükleaz enzimleri aktif görev almaktadır (11). Ancak günümüzde endonükleaz enzimlerinin kullanılması sonucu oluşan ürünün tespiti CRISPR sisteminde de aktif olarak kullanıldığı bilinmektedir (12). Bu bölümde CRISPR sisteminin koyun ve keçilerde kullanılabilme potansiyeli ve önemi açıklanmıştır.

Koyun ve Keçilerde Crispr Sistemi

Düzenli Aralıklarla Dizilen Kısa Palindromik Tekrarlar (CRISPR) sistemi bakteri ve arkea gibi prokaryotik mikroorganizmaların yabancı nükleik asitlere karşı geliştirmiş olduğu doğal bir savunma şeklidir (13). Bu sistem genom düzenlemede ise CRISPR sisteminde bulunan Cas endonükleazını belirli bölgeye yönlendirmek için Crispr RNA (crRNA) ile trans aktive edici RNA (tracrRNA) ile bir kompleks oluşturmakta ve oluşan bu yapı Cas9 enzimini istenilen bölgeye yönlendirerek DNA (Deoksiribonükleik asit)'da istenilen bölge üzerinde klavuz RNA (sgRNA) yardımı ile düzenleme yapılabilmektedir (14). Sistemin çalışması şekil.1'de özetlenmiştir.



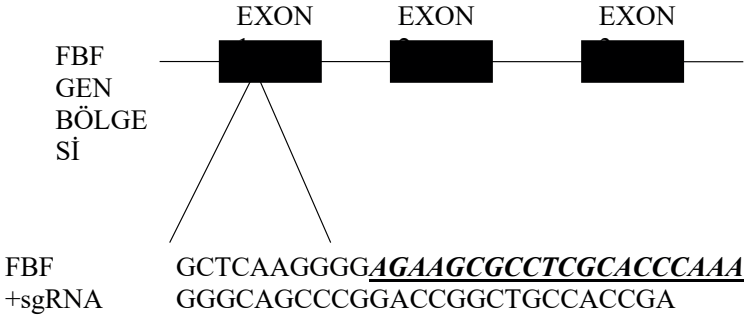
Şekil 1. CRISPR-Cas9 sisteminin çalışması şematize edilmiştir.

Cas9'u İstenen DNA bölgesine yönlendirmek ve çift sarmal kırılmalarını (DSB) indüklemek için tasarlanmış tek bir kılavuz RNA'dan (sgRNA) oluşur. DNA bölünmesi, homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) veya homoloji yönlendirmeli onarım (HDR) gibi farklı gen onarım mekanizmalarına sahiptir (14).

CRISPR sisteminin genom düzenlemede etkinliğinin artmaya başlaması ile koyun ve keçilerde çok farklı amaçlı kullanılmaya başlanmıştır ve ilk olarak MSTN (miyostatin) olarak bilinen ve et verimi üzerinde etkili olan gen bölgesinde çalışma yapılmıştır (15,16). MSTN gen bölgesi çizgili kas hücrelerinin gelişimini sınırlayıcı özelliğine sahip olmasından dolayı kas hücresi üretimini üzerinde inhibe edici bir yapıya sahiptir.

Bu özelliğinden dolayı CRISPR sistemi kullanılarak MSTN gen knockout (organizmanın genlerinden birinin çalışmadığı genetik bir teknik) vektörü oluşturularak bu bölgenin etkinliği azaltılmaya çalışılmıştır (17).

Diğer bir ifade ile hedeflenen MSTN gen bölgesine uygun bir tek kılavuz RNA (sgRNA) tasarlanarak şekli 1 de temsil edildiği gibi sgRNA ve Cas9 proteinleri fibroblast hücreleri üzerinden aktarımı sağlanarak MSTN geni mutasyona uğratılmış (18) ve miyostatin gen bölgesi ile ilgili çalışmalardan sonra ise farklı bölgeler üzerinde uygulamalar devam etmiştir. Bu çalışmalar arasında, fibroblast büyüme faktörü (FBF-lif verimliliği)'de bulunmaktadır (19,20). FBF genellikle insanlarda saç, koyun, keçi gibi hayvanlarda ise yün (tüy, kıl vb) oluşumunu kontrol eden bir bölgedir. Bu bölgenin CRISPR sistemi yardımı ile mutasyona uğratılması yün verimini olumlu yönde etkilemiştir. Bu çalışmada da klasik hale gelen gen bölgesi için özel olarak tasarlanmış sgRNA ile ilgili gen bölgesin mutasyona uğratılması ile gerçekleştirilmiş ve şekil 2 de gösterilmiştir (21).



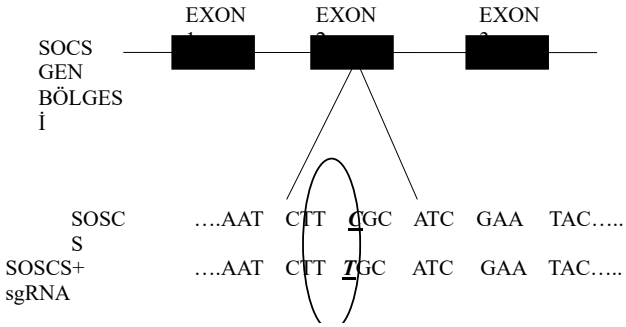
*Şekil 2.Fibroblast Büyüme Faktörü (FBF) ile ilgili aktif gen bölgeleri (Exon) ve bu bölgelerden yün üretimine etkili olduğu bilinen exon 1 bölgesinin mutasyonu için uygun olarak tasarlanmış sgRNA (tek kılavuzlu RNA) gösterilmektedir. Oluşan yeni dizide multiple nükleotit değişimi yapılmıştır (sgRNA dizisi **italik,altı çizili ve kalın puntolar** ile gösterilmiştir) (21).*

BLG (beta laktoglubulin) olarak bilinen ve allejisiz süt üretimi üzerine çalışma (22), keçilerin epitelyum dokusundaki yağ asidi metabolizması üzerine etkisinin araştırılması (23) ve büyüme geni üzerine etki mekanizması (24) gibi çalışmalarda

ilgili gen bölgelerine özel olarak tasarlanmış sgRNA yardımı ile mutasyona uğratılması ile CRISPR sistemi gerçekleştirilmiştir.

Bu tür genomik düzenlemelere ek olarak tek nükleotitlik baz eklenmesi veya çıkarılması üzerine aynı zamanda patojen karakterli nokta mutasyonların giderilmesi için potansiyel bir çalışma prensibi bulunmaktadır (25).

Ek olarak bu uygulamalara en iyi örnek ise koyun ve keçilerde bulunan vücut büyüklüğü ve kaşmir üzerinde etkili olan SOCS2 (Sitokinin sinyalleyicisini baskılayıcı) ve FGF5 (Fibroblast büyüme faktörü) genlerinde tek nükleotitlik bir mutasyon çalışması yapılmış ve şekil 3'de gösterilmiştir (25,26).



*Şekil.3. Sitokinin sinyalleyicisini baskılayıcı gen bölgesi (exon 2) ve bu gen bölgesi için tasarlanan tek kılavuzluk RNA (sgRNA). Gen bölgesi ile tasarlanan sgRNA arasında tek nükleotitlik fark bulunmaktadır. Bu fark sayesinde yeni sentezlenen protein yapısıda farklı olmaktadır. Çünkü SOSCS gen bölgesindeki CGC dizilimine karşılık gelen aminoasit arjinin R iken sgRNA sonucu TGC dizilimine karşılık gelen amino asit ise Sisteindir (sgRNA bölgesine tek nükleotitlik ekleme **italik,altı çizili ve kalın punto** ile gösterilmiştir). (25)*

Koyun ve Keçilerde kas kütlesi (27), lif uzunluğu (28), tüy rengi (29) ve yağ rengi (30) gibi ekonomik değeri yüksek olan özelliklerin verimini artırmak için kullanılan CRISPR/Cas9 sistemi yardımıyla gerçekleştirilen DNA modifikasyonu sonucu elde edilen yeni gen regülasyonu ile basit ve kesin sonuçlar elde edilmektedir (11). Bu sistem içerisinde genin inhibisyonu (gene knouck out), çoklu gen inhibisyonu (multiplex gene knouck out), DNA bölgesine yeni bir dizi ekleme (gene knouck in), baz temelli değişim (base editing) ve nokta mutasyon (point mutation) gibi farklı modifikasyon çeşitlerini içermektedir (31). CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak üretilen genetiği değiştirilmiş koyun ve keçi örnekleri tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. *CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak üretilen genetiği değiştirilmiş koyun ve keçi örnekleri (11).*

Örnek	Modifikasyon Tipi	Gen Bölgesi	Kaynak
Koyun	KO	*MSTN*	(15)
	MKO	*MSTN*	(30)
	PM	*BMPR-1B*	(32)
	KI	*ASMT* *AANAT*	(33) (34)
Keçi	KO	*MSTN*	(35)
	BE	*FGF 5*	(28)
	PM	*GDF 9*	(36)
	KI	*MSTN*	(17)

KO,Knouck out; MKO Multiplex knouck out; PM, Point mutation;KI, Knouck IN; BE,Base editinig;MSTN, Miyositatin gen bölgesi;BMPR-1B,Kemik morfogenetik reseptör bölgesi; ASMT, Asetil serotonin metiltransferaz bölgesi; AANAT, Arilalkilamin N-asetiltransferaz bölgesi; GDF9,büyüme faktörü;FGF5,Fibroblast büyüme faktörü.

Koyun ve Keçilerde *MST, BMPR-1B, GDF9* ve *FGF 5* gibi gen bölgelerin CRISPR modifikasyonu için transferaz enzimleri, uygun klavuz RNA (37) ve onarım şablonu (38) belirlenmelidir. Daha sonra elde edilen CRISPR bileşenleri mikroenjeksiyon yöntemi ile *in vitro* embriyo üretim (IVEU) basamağına geçiş yapılmaktadır. Kullanılan bileşenler sayesinde klasik mikroenjeksiyonun getirdiği bazı sorunlar ortadan kalkarak kısa sürede yüksek bir başarı oranı yakalanmaktadır (39).

Modifikasyonu planlanan gen bölgesi IVEU işleminden sonra gelişimini tamamlayan bireyden DNA izolasyonu yapılarak o bölgenin PZR (Polimere Zincir Reaksiyonu) yardımıyla amplifikasyonu yapılarak mutant ve yabani formları CRISPR sisteminde kullanılan Surveyor endonükleaz veya T7 endonükleaz enzimleri yardımıyla kesme işlemine tabi tutularak modifiye olan bölgenin tespiti gerçekleştirilmektedir (12). Fan ve ark.(40) koyunlarda kistik fibröz (CF) adı verilen genetiksel hastalığın kontrolünü sağlayan CFTR gen bölgesini somatik hücre nükleer transfer (SCNT) yöntemi ile IVEU işlem basamaklarına uygun olarak CRISPR sistemi yardımı ile modifikasyon işlemini gerçekleştirmişlerdir. Özellikle büyüme geni üzerinde yapılan çalışmalar ile doğurganlık ve yumurtalık kontrolü bağlantısı (41), Awassi ve Assaf gibi koyun ırklarında kuzu üretimini önemli ölçüde arttıracak bölgelerin (42) düzenlemesi sağlanmıştır.

CRISPR sistemi sadece diploid yapılı genetik materyalin *in vitro* koşularda hücresel transferi olarak değerlendirilmemelidir. Çünkü memeli hayvanların üremesinde görevli olan haploit yapılı gamet hücrelerinde de genetik modifikasyon işlemi gerçekleşebilmektedir (43). CRISPR sisteminin giderek yaygınlaşmaya başlaması sayesinde genetik modifikasyon ile verimi yükseltmeye yönelik çalışmaları üzerine yeni bakış açıları etkili olamaya başladı.

Sonuç

CRISPR ile ilişkili olan hedef gen bölgesi ve klavuz RNA (sgRNA)'ların tasarımı ve seçimi için gerek çevrim içi gerekse çevrim dışı yazılımlar mevcuttur (44). Yazılımlar kullanılarak elde edilen CRISPR bileşenleri koyun ve keçiler için en yaygın olarak kullanılan eksprasyon vektörlerine aktarımı ve embriyonik mikroenjeksiyon yöntemi ile hücreye transferi gerçekleştirilmektedir (45). İn vitro somatik hücre transferinde fibroblast hücreleri (35), glia hücreleri (46), epitelyum hücreler (33), çizgili kas hücreleri (17) ve yağ doku hücreleri (17) gibi hücreler tercih edilmektedir. Koyun ve Keçilerde kullanılan bu sistem genellikle gen bozulmalarının tanımı ve aday genlerin pozitif anlamla işlevinin arttırılmasını sağlamaktadır.

CRISPR sisteminin uygulama alanlarının her geçen gün artması bu sistemin güvenirliğinin ve etkisininin artacağı şeklinde düşünülebilir (47). Ancak sistemin yeni olması ve potansiyel hedef dışı etkileri olabilmesinden dolayı bazı aksaklıklara sebep olabilir (17,48). Koyun ve keçide hedef dışı etkileri üzerinde yapılan araştırmalar bu etkilerin önem derecesinin çok düşük olduğunu göstermiştir (27,28). CRISPR sisteminin verimliliğini artırmak ve herhangi bir aksaklığın giderilebilmesi için metabolik yolunda bulunan ve önemli bir basamak olan homoloji yönlendirme onarım (HDR) siteminin iyileştirilmesi amaçlanmaktadır (49,50). Bu sistem üzerindeki araştırma ve iyileştirmeler sayesinde teknik olanakların artmasına yardımcı olurken verimliliğe olumlu anlamda etkiliyor (51). Sonuç olarak bu sistem canlıların gen diziliminde bulunan potansiyel etkilerin ortaya çıkarılmasında ve canlının verimliliğini artırıcı etkiye sahip olduğu görülmektedir. CRISPR sistemi günümüzde genom düzenlemede kullanılması rağmen gelecekte gen terapi yöntemlerinin önemli bileşenleri arasında olması kaçınılmaz gibi gözükmektedir.

Kaynaklar

1. Jiang, Y., Xie, M., Chen, W., Talbot, R., Maddox, J.F., Wu, C., …..& Dalrymple, B. (2014). The sheep genome illuminates biology of the rumen and lipid metabolism. Science.;344:1168e1173
2. Hoekstra, A.Y., & Wiedmann, T.O. (2014). Humanity's unsustainable environmental footprint. Science 344: 1114–1117
3. Eisler, M.C., & Lee, M.R.F. (2014). Steps to sustainable livestock. Nature 507: 32–34.
4. Vince, G. (2014). Adventures in theAnthropocene: A Journey to the Heart of the Planet We Made. London: Chatto&Windus
5. Proudfoot, C., Carlson, D.F., Huddart, R., Long, C.R., Pryor, J.H., King, T.J., Lillico, S.G., Mileham, A.J., McLaren, D.G., Whitelaw, C.B.A., & Fahrenkrug, S.C. (2015). Genome edited sheep and cattle. TransgenicResearch. 24 (1): 147-153.
6. Tan, W.S., Carlson, D.F., Walton, M.W., Fahrenkrug, S.C., & Hackett, P.B. (2012). Precision editing of largeanimalgenomes. Advances in Genetics 80:37-97. Doi: 10.1016/B978-0-12-404742-6.00002-8

7. Bishop, T.F, & Van Eenennaam, A.L. (2020). Genome editing approaches to augment livestock breeding programs. Journal of Experimental Biology. 223: jeb207159. Doi:10.1242/jeb.207159
8. Larkina, T.A., Krutikova, A.A., & Kozikova, L.V.(2018). Editing the genome of farm animals using CRISPR / Cas9 technology. Dairy Farming Journal. 3(31):24-35. (In Russian)
9. Wilmut, I.,Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J., & Campbell, K. H. S. (1997). Viable off spring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature 385, 810–813. doi: 10.1038/385810a0
10. Menchaca, A., Dos Santos-Neto, P.C., Mulet, A.P., & Crispo, M. (2020). CRISPR in livestock: From editing toprinting. Therio genology. 150:247-254. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2020.01.063
11. Kalds, P., Zhou, S., Cai, B., Liu, J., Wang, Y., Petersen, B., Sonstegard, T., Wang, X., & Chen, Y. (2019). Sheep and goat genome engineering: from random transgenesis to the CRISPR era. Frontiers in Genetics, 10, 750.
12. Van Eenennaam, A. L. (2019) Application of genome editing in farm animals: Cattle. In Transgenic Research (Vol. 28, No. 2, pp. 93-100). Springer International Publishing.
13. Horvath, P., & Barrangou, R. (2010). CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. Science (New York, NY);327:167e70.
14. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., & Charpentier, E. A. (2012). Programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptivebacterial immunity. Science (New York, NY);337:816e21.
15. Han, H., Ma, Y., Wang, T., Lian, L., Tian, X., Hu, R., Deng, S., Li, K., Wang, F., Li, N., Liu, G., Zhao, Y., & Lian, Z. (2014). One-step generation of myostatin gene knockout sheep via the CRISPR/Cas9 system. Front AgricSci Eng;1:2e5. https://doi.org/10.15302/J-FASE-2014007.
16. Ni, W., Qiao, J., Hu, S., Zhao, X., Regouski, M., Yang, M., Polejaeva, I.A., & Chen, C. (2014). Efficient gene knockout in goats using CRISPR/Cas9 system. PloSOne;9:e106718. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106718.
17. Zhang, J., Liu, J., Yang, W., Cui, M., Dai, B., Dong, Y., Yang,J., Zhang, X., Liu,D., Lian,H., & Cang, M. (2019). Comparison of gene editing efficiencies of CRISPR/Cas9 and TALEN forgeneration of MSTN knock-out cashmere goats. Theriogenology 2019;132:1e11. https://doi.org/10.1016/ j.theriogenology. 03.029.
18. Gim, G. M., Kwon, D. H., Eom, K. H., Moon, J. H., Park, J. H., Jung, D. J.,Kim J.K., Ha J.J., Lim K.Y., Kim J.S. & Jang, G. (2021). Production of MSTN mutated cattle using CRISPR--Cas9. Authorea Preprints.
19. Wang X, Yu H, Lei A, Zhou J, Zeng W, Zhu H, …. & Chen,Y. (2015). Generation of genemodified goats targeting MSTN and FGF5 via zygote injection of CRISPR/Cas9 system. SciRep;5:13878. https://doi.org/10.1038/srep13878.
20. Hu, R., Fan, Z.Y., Wang, B.Y., Deng, S.L., Zhang, X.S., Zhang, J.L., Han,H.B., & LİAN, Z.X. (2017). Rapid communication: generation of FGF5 knockout sheep via the CRISPR/Cas9 system. J Anim Sci;95. https://doi.org/10.2527/jas.2017.1503. 2019e24.

21. Li, W. R., Liu, C. X., Zhang, X. M., Chen, L., Peng, X. R., He, S. G. Lin, J., Han B.,Wang Li.,Huang H., & Liu, M. J. (2017). CRISPR/Cas9-mediated loss of FGF5 function increases wool staple length in sheep. The FEBS journal, 284(17), 2764-2773.

22. Zhou W, Wan Y, Guo R, Deng M, Deng K, Wang Z, Zhang, Y., & Wang, F. (2017). Generation of beta lactoglobulin knock-out goats using CRISPR/Cas9. PloSOne;12: e0186056. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186056.

23. Huang, L., Tian, H., Luo, J., Song, N., & Wu, J. (2020). CRISPR/Cas9 Based Knockout of miR-145 Affects Intra cellular FattyAcid Metabolism by Targeting INSIG1 in Goat Mammary Epithelial Cells. Journal of agricultural and food chemistry, 68(18), 5138-5146.

24. Kumar, S., Punetha, M., Jose, B., Bharati, J., Khanna, S., Sonwane, A., Green, J.A., Whitworth, K., & Sarkar, M. (2020). Modulation of granulos a cell function via CRISPR-Cas fuelled editing of BMPR-IB gene in goats (Capra hircus). Scientific Reports, 10(1), 1-17.

25. Zhou, S., Cai, B., He, C., Wang, Y., Ding, Q., Liu, J., Liu, Y., Ding,Y., Zhao, X., Li, G., Li,C.,Yu,H., Kou,Q., Niu,W., Petersen, B., Sonstegard, T., Ma, B., Chen, Y., & Wang, X. (2019). Programmable base editing of the sheep genome revealed nogenome-wide off-target mutations. Front Genet;10:215. https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00215.

26. Li, G., Zhou, S., Li, C., Cai, B., Yu, H., Ma, B., Huang,Y., Ding, Y., Liu,L., Ding, Q., He, C., Zhou, J., Wang, Y., Zhou, G., Li, Y., Yan, Y., Hua, J., Petersen, B., Jiang, Y., Sonstegard, T., Huang, X., Chen, Y., & Wang, X. (2019). Base pair editing in goat: non sense codon introgression into FGF5 results in longer hair. FEBS J;286:4675e92. https://doi.org/10.1111/febs.14983.

27. Wang, X., Niu, Y., Zhou, J., Zhu, H., Ma, B., Yu, H., Yan, J., Hua, X., Huang, L.Q & Chen, Y. (2018). CRISPR/Cas9-mediated MSTN disruption and heritable mutagenesis in goats causes increased body mass. Animal genetics, 49(1), 43-51.

28. Li, C., Zhou, S., Li, Y., Li, G., Ding, Y., Li, L., Li, J., Qu, L., Sonstegard, T., Huang, X., Jiang, Y., Chen, Y., Petersen, B., & Wang, X. (2018).Trio-based deep sequencing reveals a low incidence of off-target mutations in the offspring of genetically edited goats. Front Genet;9:499. https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00449.

29. Zhang, X., Li, W., Liu, C., Peng, X., Lin, J., He, S., Li, X., Han, B., Zhang, N., Wu, Y., Chen, L., Wang, L., Yila, M., Huang, J., & Liu, M. (2017). Alteration of sheep coat color pattern by disruption of ASIP gene via CRISPR Cas9. Scientific Reports, 7(1), 1-10.

30. 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. (2016). Multiplex gene editing via CRISPR/Cas9 exhibits desirable muscle hypertrophy without detectable off-target effects in sheep. Scientific Reports, 6(1), 1-11.

31. Ma, Y., Zhang, L., & Huang, X. (2014). Genome modification by CRISPR/Cas9. The FEBS journal, 281(23), 5186-5193.

32. Zhou, S., Yu, H., Zhao, X., Cai, B., Ding, Q., Huang, Y., Li, Y., Li, Y., Niu, Y., Lei, A., Kou, Q., Huang, X., Petersen, B., Ma, B., Chen, Y., Wang, X. (2018). Generation of gene-edited sheep with a defined Booroola fecundity gene (FecBB) mutation in bone morphogenetic protein receptor type 1B (BMPR1B) via clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR-associated (Cas) 9. Reprod. Fertil. Dev. 30, 1616–1621. doi: 10.1071/RD18086

33. Ma, T., Tao, J., Yang, M., He, C., Tian, X., Zhang, X., Zhang, J., Deng, S., Feng, J., Zhang, Z., Wang, J., Ji, P., Song, Y., He, P., Han, H., Fu, J., Lian, Z., & Liu, G. (2017). An AANAT/ASMT transgenic animal model constructed with CRISPR/Cas9 system serving as the mammary gland bioreactor to produce melatonin-enriched milk in sheep. Journal of Pineal Research, 63(1), e12406.

34. Tian, H., Luo, J., Zhang, Z., Wu, J., Zhang, T., Busato, S., Huang, L., Song, N., & Bionaz, M. (2018). CRISPR/Cas9-mediated Stearoyl-CoA Desaturase 1 (SCD1) deficiency affects fatty acid metabolism in goat mammary epithelial cells. Journal of agricultural and food chemistry, 66(38), 10041-10052.

35. Ni, W., Qiao, J., Hu, S., Zhao, X., Regouski, M., Yang, M., Polejaeva, I.A., Chen, C. (2014). Efficient gene knockout in goats using CRISPR/Cas9 system. PLoS One 9, e106718. doi:10.1371/journal.pone.0106718

36. Niu, Y., Zhao, X., Zhou, J., Li, Y., Huang, Y., Cai, B., Liu, Y., Ding, Q., Zhou, S., Zhao, J., Zhou, G., Ma, B., Huang, X., Wang, X., & Chen, Y. (2018). Efficient generation of goats with defined point mutation (I397V) in GDF9 through CRISPR/Cas9. Reproduction, Fertility and Development, 30(2), 307-312.

37. Sung, Y. H., Kim, J. M., Kim, H. T., Lee, J., Jeon, J., Jin, Y., Choi, J.H., Ban, Y.H., Ha, S.J., Kim, C.H., Lee, H.W., & Kim, J. S. (2014). Highly efficient gene knockout in mice and zebrafish with RNA-guided endonucleases. Genome research, 24(1), 125-131.

38. Chen, F., Pruett-Miller, S. M., Huang, Y., Gjoka, M., Duda, K., Taunton, J., Collingwood, T.N., Frodin, M., & Davis, G. D. (2011). High-frequency genome editing using ssDNA oligonucleotides with zinc-finger nucleases. Nature methods, 8(9), 753-755.

39. Menchaca, A., Anegon, I., Whitelaw, C. B. A., Baldassarre, H., & Crispo, M. (2016). New insights and current tools for genetically engineered (GE) sheep and goats. Theriogenology, 86(1), 160-169.

40. Fan, Z., Perisse, I. V., Cotton, C. U., Regouski, M., Meng, Q., Domb, C., Wettere, A.J.V., Wang, Z., Harris, A., White, K.L., & Polejaeva, I. A. (2018). A sheep model of cystic fibrosis generated by CRISPR/Cas9 disruption of the CFTR gene. JCI insight, 3(19).

41. Juengel, J.L., Davis, G.H., & McNatty, K.P. (2013). Using sheep line swith mutations in single genes to beter understand ovarian function. Reproduction.;146:R111eR123.

42. Gootwine, E., Reicher, S., & Rozov, A. (2008). Prolificacy and lamb survival at birth in Awassi and Assaf sheep carrying the FecB (Booroola) mutation. Anim ReprodSci.;108:402e411.

43. Yao, X., Liu, Z., Wang, X., Wang, Y., Nie, Y. H., Lai, L., Sun, R., Shi, L., Sun, Q., & Yang, H. (2018). Generation of knock-in cynomolgus monkey via CRISPR/Cas9 editing. Cell research, 28(3), 379-382.

44. Cui, Y., Xu, J., Cheng, M., Liao, X., & Peng, S. (2018). Review of CRISPR/Cas9 sgRNA design tools. Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences, 10(2), 455-465.

45. Glass, Z., Lee, M., Li, Y., & Xu, Q. (2018). Engineering the delivery system for CRISPR-based genome editing. Trends in biotechnology, 36(2), 173-185.

46. Crispo, M., Mulet, A. P., Tesson, L., Barrera, N., Cuadro, F., dos Santos-Neto, P. C., Nguyen, T.H., 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.

47. Petersen, B., & Niemann, H. (2015). Molecular scissors and their application in genetically modified farm animals. Transgenic research, 24, 381-396.

48. Liu, H., Liu, C., Zhao, Y., Han, X., Zhou, Z., Wang, C., Li,R., & Li, X. (2018). Comparing successful gene knock-in efficiencies of CRISPR/Cas9 with ZFNs and TALENs gene editing systems in bovine and dairy goat fetal fibroblasts. J IntegrAgric;17: 406e14. https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61748-9.

49. Liu, M., Rehman, S., Tang, X., Gu, K., Fan, Q., Chen, D., & Ma, W. (2019). Methodologies for improving HDR efficiency. Front Genet 2019;9:691. https://doi.org/10.3389/ fgene. 00691.

50. Tang, X.D., Gao, F., Liu, M.J., Fan, Q.L., Chen, D.K., & Ma, W.T., (2019). Methods for enhancing clustered regularly inter spaced short palindromic repeats/Cas9-mediated homology-directed repair efficiency. Front Genet; 10:551. https:// doi.org/10.3389/ fgene.2019.00551

51. Wang, X.,Chen, Y., Sonstegard, T. S., Hackett, P. B., Fan, Z., &Li, K. (2020). Meeting report on the 2019 international symposium of molecular design breeding in animals (Yangling, China) with the consensus on genome-editing agricultural animals and the irregulation.

SIĞIRLARDA CRISPR/CAS9 UYGULAMALARI VE SON GELİŞMELER

FERİT CAN YAZDIÇ*
BÜLENT KAR**

Giriş

Son yıllardaki gen düzenleme teknolojilerindeki ilerlemeler, genetiği değiştirilmiş çiflik hayvanlarının (et ve süt verimi yüksek sığır ırkları) olasılığını her zamankinden daha yüksek hale getirmiştir. Çoğumuz gen düzlenmenin nelere yol açacağını duymuşdur. Artan dünya nüfüsuna paralel olarak gıdaya olan ihtiyaçta her geçen gün artmaktadır. FAO, BM ve Dünya Bankası›na göre, bu tüketim düzeyi yalnızca 2050›de 9 milyarı aşan küresel nüfus artışına bağlı olarak daha da artacaktır (1, 2). Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerdeki aşırı yoksulluk oranları son yıllarda önemli ölçüde azaldı ve insanlar daha kaliteli gıdaya daha fazla erişebilir hale geldi (3). Artan bu talep şimdiden hayvancılık üretiminin en önemli problemlerinden birisi olmuştur (4). Bu açıdan insalığın geleceği için en büyük hedefler, daha fazla gıda üretimi, küresel sürdürülebilirlik, iklim değişikliğini, biyolojik çeşitliliği ve hayvan refahına korumanın yanında küresel gıda erişiminde eşitliği garanti etmek olacaktır (2). Şüphesiz hayvan sağlığı, beslenmesi, genetiği, üremesi ve yönetiminin geliştirilmesine yönelik klasik yaklaşımlar verimliliği artırılarak katkı sağlanacaktır. Ancak görünen o ki, bu katkı istenilen düzeyde olmayacaktır (2). Sığırları hastalıklara karşı daha dirençli hale getirerek, sağlıklarını ve refahlarını iyileştirme potansiyeline sahip olduğunu, bunun yanında daha iyi üretim verimene yol açarak ekonomik açıdan daha etkili olabileceğini görüşü ön plana çıkarılmaktadır. Hala ticarileşme potansiyeleni sahip olmasada, araştırmacılar somatik hücre nükleer transferi kullanarak genetiği değiştirilmiş sığırlar dünyaya getirmektedir. Hayvanlardaki hastalık direnci başka bir ifadeyle bağışıklık sistemi,

* fcanyazdic@munzur.edu.tr
** bkar@munzur.edu.tr

konakçının genetiğinden ve patojenden etkilenen, vücut içinde istilacı patojenlerin büyümesini engelleme yeteneğinin genel adıdır. Dirençli hayvanların ıslahı, hastalık direncinden veya immün yetmezlikten sorumlu genomik özelliklerin belirlenemesi ve sonrasında moleküler ıslah yöntemleriyle hızlıca yapılabilir. Genomik bölgeler belirlendikten sonra, genom düzenleme gibi ileri üreme biyoteknolojisi uygulanarak hastalığa dirençli hayvanların üretilmesinde uygulanabilir (5). TALEN ve CRISPR-Cas9 gibi teknolojiler kullanılarak boynuzsuz sığırlar ve ısı toleransına sahip inekler üretilmiştir. Bu uygulamalardaki düzenlenmiş olan genler kalıtsal özelliktedir. Güncel çalışmalarda ise araştırmacılar, gen düzenleme yöntemlerinin mastit ve Bovin Süngerimsi Ensefalopati (BSE) gibi hastalıkları önleyip önleyemeyeceği sorusu üzerine yoğunlaşmaktadırlar. Ayrıca bu yeni teknolojilerin sığır tüberkülozu karşı direnç oluşma potansiyelleride incelenmektedir. Bu çalışmalar başarılı olursa sığırların sağlık refahında dolayısla insan sağlığı açısındanda son derece önemli olacaktır. Bu açıdan, yeni fikirlere ve etkili teknolojilere ihtiyaç duyulacaktır. Son gelişmeler dikkate alındığında CRISPR teknolojisi, küresel hayvancılığın dönüşümüne katkı sağlayacak güçlü bir araç olarak görünmektedir. Çiflik hayvanlarında CRISPR dönemine girmek için, fırsatlar ve tehditler, faydalar ve riskler, etik ve bilim yeniden ele alınmalı, tartışmalı ve fikir birliğine varılmalıdır (2). Kitabın bu bölümünde, hayvan yetiştiriciliğinde özelliklede büyük baş çiflik hayvanlarında CRISPR/Cas9 aracılı hedeflenen genom düzenleme uygulama ilkeleri ve kapsamları anlatılmaktadır.

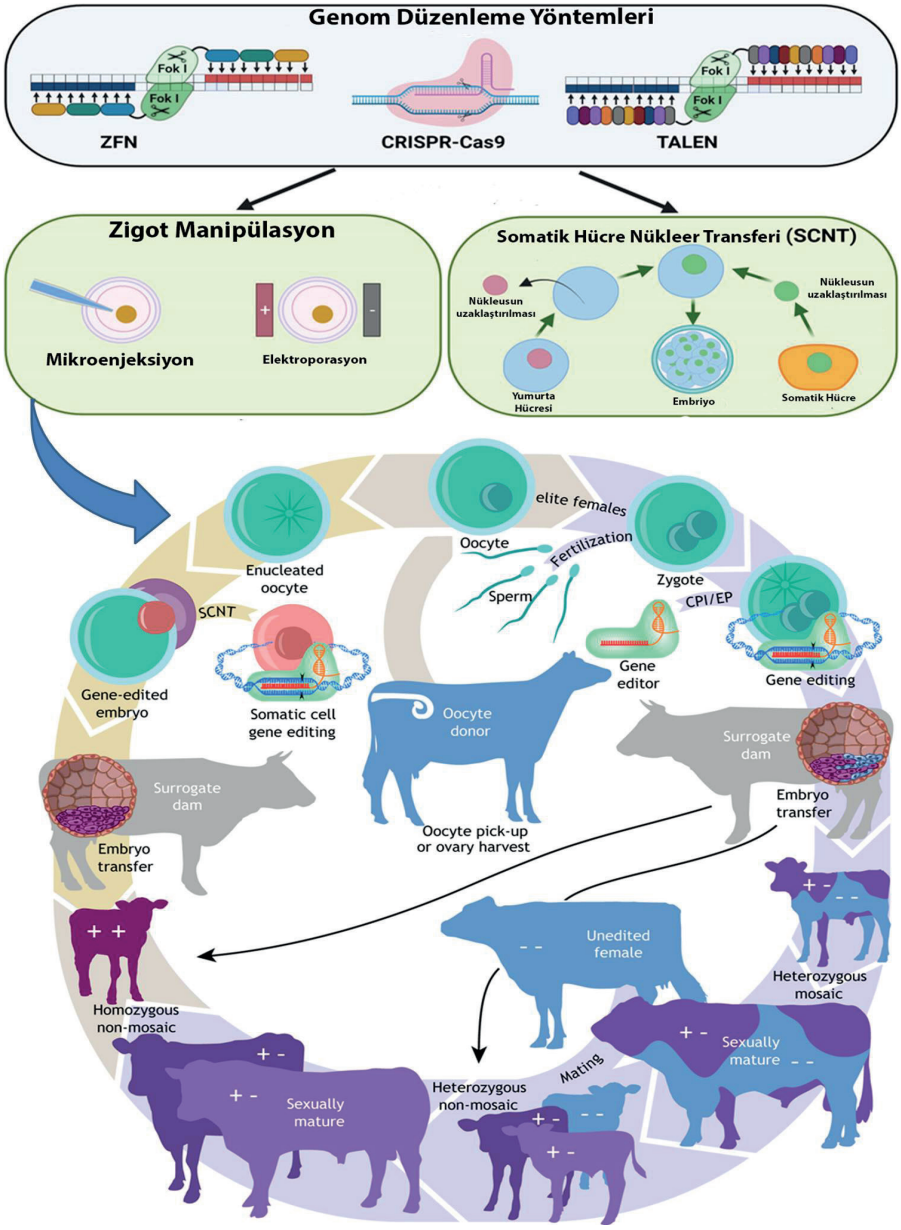
Büyükbaş Hayvanlarda Genom Düzenleme Teknolojilerinin Tarihsel Gelişimi

Tarihsel olarak düşünüldüğünde, büyükbaş hayvancılıktaki genetik modifikasyonlar kullanılan teknolojilerin verimsizlikleri nedeniyle sınırlıydı. Pronükleer enjeksiyon ve transdüksiyon gibi yöntemler, öngörülemeyen sonuçlara yol açan rastgele DNA eklemeleriyle sonuçlanmaktaydı (6, 7). Homolog rekombinasyonun (HR) ortaya çıkmasıyla birlikte, daha hedefe yönelik genetik değişiklik elde edinmeye başlandı. Ancak, bu yöntemdeki düşük verimlilik (sadece yaklaşık %0,1 başarı oranı) doğrudan hayvan embriyolarında uygulanmasını zorlaştırmaktaydı (8). 30 yıl önce ilk transgenik canlılar, yabancı DNA genomunun eklenmesiyle elde edilmiştir (9). Kullanılan bu yabancı DNA'lar promotor ve protein kodlama bölgesi (protein regülasyonu veya inhibitörü) içeren bir rekombinant DNA (rDNA) yapısı formundaydı. Bu süreçteki yabancı DNA'lar konakçı DNA'sına rastgele entegre olduğu için transgenik hayvanlar üzerindeki etkilerin tamamını bilmek çok zor bir süreç olarak karşımıza çıkmaktaydı. Bu aynı zamanda kullanılan yöntem ile elde edilen genetiği değiştirilmiş her hayvanın genomunda genin farklı bir konuma yerleştidiği anlamına geliyordu. Genom düzenleme sistemleri, yabancı DNA kullanılmadan, konakçıdaki mevcut genlerin hedeflenen modifikasyon için kullanılan sistemler olarak karşımıza çıkmaktadır (10). Memeli genomunda yapılan ilk genomik değişikliği 1988 yılında Palmiter ve Brinster adlı araştırmacılar tarafından gerçekleştirilmiştir (11). Metallothionein-I adı verilen bir büyüme hormonu genine ait yabancı bir DNA fragmanının, pronükleer mikroenjeksiyonuyla fare embriyolarına eklenmesi

ve hayvanların hedeflendiği gibi hızlı büyümesiyle sonuçlanmıştır (11). Hücrelere dayalı bu genom tekniği, embriyonun pronükleusuna plazmidler veya gen fragmanları enjekte etme şekilinde uygulanmaktaydı. Genom mühendisliğindeki ilerlemeler, transpozonların veya retroviral vektörlerin tanıtılmasıyla ilk adımı atarken, ardından 14-40 bp hedef bölgelerinde çift sarmal kırılmaları sağlayabilen doğal meganükleaz olan hedef endonükleazın (HE'ler) geliştirilmesiyle elde edilmiştir (12, 13). Ancak in vivo uygulamalarda HE tabanlı modifikasyonun kullanılması hedef dışı kesmelere neden olduğu için sınırlandırılmıştır. Genel olarak, modern genom düzenleme sistemleri, programlanabilir nükleaz tabanlı düzenleyiciler kullanılarak canlı bir organizmanın genomuna DNA eklenmesini, silinmesini veya susturulmasını içerir. Son zamanlara kadar çinko parmak nükleazlar (ZFN'ler) ve transkripsiyon aktivatörü benzeri efektör nükleazlar (TALEN'ler) en yaygın kullanılan genom düzenleme aracı olarak karşımıza çıkmaktadır (14). Çinko parmaklar (ZF'ler), herhangi bir hedef genomun doğru bir şekilde kesilmesine ve onarılmasına olanak tanıyan, doğada bulunan en iyi karakterize edilmiş DNA bağlayıcı protein alanlarıdır (15). Benzer bir şekilde, bir DNA bağlama alanı içeren ve *Xanthomonas* cinsinin proteobakterileri tarafından oluşturulan, ikinci bir doğal protein grubu olan transkripsiyon aktivatörü benzeri efektörü (TALE) bulunmaktadır (14). Gerek ZFN gerekse TALE çift sarmalda bir kırılmayı indüklemek için FokI nükleaz ile birlikte bulunmak zorundadır (5). Bununla birlikte, hem ZFN'ler hem de TALEN'ler, aynı genomdaki birden çok bölgeyi hedeflemesi kullanıl olanaklarını sınırlar. Buda yeni genom düzenleme araçlarının belirlenmesini zorunlu kılar. Bakterilerde bulunan doğal bir antiviral mekanizma olarak karşımıza çıkan kümelenmiş düzenleyici aralıklı kısa palindromik tekrarlar (CRISPR)/Cas9 sistemi genom düzenleme araçlarının sonuncusudur (16). Klasik genetik modifikasyon yöntemleri ile karşılaştırıldığında CRISPR/Cas9 sistemi, hedef DNA dizilerindeki değişikliklerin oluşturulması için moleküler 'makas' kullanımına dayanan kolay ve hızlı bir yöntemdir (17). CRISPR/Cas9 sistemi, genomdaki belirli dizileri tanımak için proteinler kullanan ZFN'ler ve TALEN'lerin aksine, Cas9 nükleazının belirli bir genomik diziyi tanımlaması için, tek bir kılavuzlu RNA (sgRNA)'ya ihtiyacı vardır. sgRNA tamamlayıcı ve Porto-spacer bitişik motif (PAM) sekanları varlığında, Cas9 proteini sgRNA yapı iskelesine bağlanır ve çift zincirde bir kırılma oluşturur (5). Bu kırılma sonrasında DNA'nın onarımı için gerek duyulan homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) veya homoloji doğrudan onarımı (HDR) hızlıca katalize edilir. DNA onarım bölgesinde küçük eklemeler veya silmelerle sonuçlanan ve çoğu hücre tipi tarafından kullanılan NEHJ yolu hataya açık bir mekanizmadır. Ayrıca NEHJ mutasyon üretebilir ve böylelikle bir genin kodlama dizisinde DNA kırılmalarına yol açarak, bu bölgeden üretilen proteinin parçalanmasına veya fonksiyonunun kaybolmasına neden olabilir. Yani gen nakavtını indükleyebilir. Diğer taraftan HDR yolu, kesim bölgesine proksimal olarak spesifik dizi değişikliklerine izin veren bir DNA onarım şablonu ile doldurularak etkinleştirilebilir. Küçük değişiklikler yapabilmek için, daha büyük modifikasyon plazmid/dsDNA gerektirir. Transkripsiyonel bölgeler ya düzenleyici elemanların çıkarılmasıyla ya da eksonların silinmesiyle değiştirilebilir. Bu süreçte protein alanları silinsebile ve okuma çerçevesi bozulmadan kalır (18). CRISPR/

Cas9 sisteminin en önemli avantajlarından biri, Cas9 nükleazının çift sarmallı kırılma bölgesine kovalent olarak kaynaşmamış olmasıdır, dolayısıyla aynı proteini farklı bir sgRNA paketiyle birleştirerek birden çok hedef bölgeyi hedef almak için kullanmak mümkündür. Ayrıca gerekli reaktiflerin çoğu moleküler biyoloji laboratuvarında oluşturulabilmekte yada Cas9 nükleaz ve sgRNA gibi ticari olarak satın alınabilmektedir. Dahası CRISPR/Cas9 sisteminin metodolojik basitliği, performansı, esnekliği ve yüksek doğruluk derecesi nedeniyle genom düzenleme yöntemini pratik hale getirmiştir.

Cas9 genom düzenleyi sistemi, tür ve hücre tipine bağlı olarak genetiği değiştirilmiş hayvanları üretmek için çeşitli teknikler mevcuttur (Harwood ve diğerleri tarafından gözden geçirilmiştir (19). Sperm aracılı gen transferi (SMGT) tekniği, genom tarafından düzenlenen reaktifleri bir zigota iletmek için kullanılır. Çoğunlukla araştırmacılar genomu düzenlenmiş organizmaları geliştirmek için spermatogonial kök hücreleri (SSC'ler) veya primordial germ hücreleri (PGC'ler) tercih etmektedirler. Genomla manipüle edilmiş hayvanların gelişimi için, genom editörlerinin zigotlara pronükleer ve intrasitoplazmik enjeksiyonu, ya doğrudan vekillere transfer ya da in vitro olgunlaşma ve embriyo transferi ile birlikte uygulanabilir. Ek olarak, somatik hücre nükleer transferi (SCNT), vekillere nükleer transfer veya in vitro olgunlaşmadan önce somatik hücrelerde kesin düzenlemelerin seçilmesini sağlayan başka bir yaklaşımdır. Klonlama olarak da bilinen somatik hücre nükleer transferi (SCNT), genetik olarak değiştirilmiş somatik hücrelerin nükleer donör olarak kullanılmasına izin vererek kısmi bir çözüm sağladı (20). Ancak SCNT'nin düşük başarı oranları (en iyi vakalarda %5) ve büyük yavru sendromu (21, 22) gibi gelişimsel anormallikler de dahil olmak üzere önemli sınırlamaları vardı. Dahası, süreç telomeraz ekspresyonunun eksikliği nedeniyle somatik hücrelerin yaşlanması nedeniyle daha da güçleşmektedir (26). Kimerik hayvanları elde etmek için düzenlenmiş embriyolar veya iPSC'nin blastosist enjeksiyonu kullanılabilir (19). CRISPR, ZFN'ler ve TALEN'ler gibi diğer bölgeye özgü endonükleazlarla birlikte, doğrudan zigotlara uygulanan tek bir adımda hassas genom düzenlemesini mümkün kılarak önemli bir sıçrama sunar. Bu, embriyonik kök hücreler veya fibroblastlar gibi aracıların ihtiyacını ortadan kaldırır (23-25). Bu teknolojiler arasında, CRISPR RNA kılavuzlu olduğu için öne çıkar ve bu da onu daha çok yönlü ve mühendisliği daha kolay hale getirir (26). Genom düzenleyici aracının kullanımı gibi, takip edilen teknikler de genomu düzenlenmiş hayvan türlerinin üretilmesinde amaçlanan verimlilik ve kesinliği elde etmek için önemlidir. Hayvan hastalıkları yönetiminde CRISPR/Cas9 tekniklerinin geliştirilmesi, insan hastalıklarının tedavisi için araştırmalarda kullanılan hayvanı modellerindeki genom düzenleme sistemlerinde büyük ilerlemelere neden olmuştur. Son incelemeler, insan hastalıklarını incelemek için model hayvanların yaratılmasına odaklanarak büyük hayvanlarda (domuzlar, maymunlar, köpekler, tavşanlar, fareler, sıçanlar) CRISPR/Cas-9 aracılı genom düzenlemesinin metodolojik ilerlemelerini hızlıca olduğunu göstermiştir (27) (Şekil 1).



Şekil 1. ZFN, TALEN ve CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak hayvanların genom modifikasyonu. Hücre manipülasyonu ya zigotun mikromanipülasyonu (mikroenjeksiyon veya elektroporasyon), somatik hücre nükleer transferi (SCNT) veya zigot düzenleme yoluyla genomu düzenlenmiş büyükbaş hayvanların üretim adımlarının şematik gösterimi (10, 63).

Sığırlarda CRISPR/Cas Yapısının Temelleri ve Bileşenleri

CRISPR/Cas sistemi doğada bakteri ve arkea bağışıklık sisteminin temelini oluşturur ve bu canlılar istilacı türlere karşı korur (28). Canlılardaki genom düzenleme yöntemleri arasında en yaygın kullanılan CRISPR/Cas tip II sistemidir. Bu sistem kesim özgünlüğü CRISPR RNA (crRNA)'dan alır. Bu molekülün kullanılabilmesi için, CRISPR ile ilişkili (Cas) nükleazı belirli bölgelere yönlendirerek bir crRNA_tracrRNA dubleksi oluşturması gerekir. crRNA ve tracrRNA dizileri, tek bir kılavuz RNA (sgRNA) ile birleşerek Cas9'u istenen bölgeye yönlendirebilir ve böylelikle DNA bölünmesi gerçekleşmiş olur. Bu bileşenler hücre içine veya zigota dahil edildiği takdirde, Cas9 genomda hedef bölgeye yönlenecek ve o bölgede bir çift sarmal kırılması yaratacaktır (29). Oluşturulan bu çift sarmallı kırılmalar yukarıda da bahsedildiği gibi ya homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) yada homolojiye yönelik onarım (HDR) mekanizmaları aracılığıyla onarılacaktır. NHEJ onarım mekanizması genelikle küçük eklemelere, silmelere veya kromozomal düzenlemelere neden olmaktadır. Çoğu zaman bu mekanizma açık okuma çerçevelerini bozarak etkili bir şekilde gen nakavtlarının ana kaynağını oluşturmaktadır. Bu mekanizma çiftlik hayvanlarında (koyun, keçi, inek ve domuzlarda) endojen genlerin CRISPR/Cas sistemi tarafından başarılı şekilde bozulmasına ve üretilmesine yol açmıştır (2). Öte yandan, HDR yolu, çift sarmallı bir kırılmayı düzeltmek için homolog bir onarım şablonu kullanır. Bu mekanizma, hedeflenen ekleme veya modifikasyonu içeren onarım şablonunun eklenmesine aracılık ederek, DNA'da spesifik değişikliklerin oluşturulmasına izin verir. Bu özellik genom düzenlemede tek bir nükleotit veya diziyi eklemek, hatta mevcut genleri değiştirmek veya silmek için bu mekanizmanın kullanılabilir olduğunu göstermektedir. NHEJ tarafından bildirilen ilk gen nakavtına sahip doğumlardan sonra, koyunlarda, keçilerde ve domuzlarda HDR tarafından başarılı bir şekilde gerçekleştirilen gen nakavtları ile gelişmiş hayvanlar elde edilmiştir (30, 31).

CRISPR teknolojisi son zamanlarda daha da dikkat çekiçi olmuştur. Cas9'un aktif olmayan bir formunun bir sitidin deaminaz enzimiyle füzyonu , C→T ikamelerini gerçekleştiren baz düzenleyiciler adı verilen yeni bir CRISPR aracının geliştirilmesine olanak sağlamıştır (32). Ayrıca, bir ters transkriptaz ile kaynaşmış katalitik olarak bozulmuş bir Cas9 endonükleazdan oluşan umut verici yeni bir CRISPR varyantı, çift sarmallı bir kırılmalar veya donör DNA şablonları gerektirmeden hassas hedefli eklemeler, silmeler ve nokta mutasyonları gerçekleştirmeye olanak tanır hale gelmiştir. Birincil düzenleme olarak bilinen bu yaklaşım, önceki alternatiflere göre daha düşük hedef dışı etkinlik ve daha az yan ürün olarak ortaya çıkmıştır (33).

CRISPR teknolojisinin sığırlarda kullanıla bilmesi, efektör nükleazlara, sgRNA'lara, onarım şablonuna, embriyo modifikasyonuna ve embriyodaki genlerin analizine bağlıdır.

Efektör nükleazlar; çalışmalarda kullanılmak üzere belirlenmesi gereken ana bilşenlerden ilki hangi nükleazın kullanılacağıdır. SpCas9 nükleaz en yaygın olarak

kullanılandır ancak farklı amaçlar için kullanılan başka nükleazlarda bulunmaktadır. Cas12a veya CasX gibi nükleazlar genom düzenleme uygulamaları için benzersiz yapısal ve işlevsel özelliklere sahiptir. Cas proteinleri, DNA ekspresyon plazmidi, in vitro transkript veya ribonükleoprotein partikülünde (RNP) sgRNA›ya bağlı rekombinant protein olarak tanıtılabilir. En kolay sistem olmasına rağmen plazmit DNA›sı genoma rastgele entegre olabilme ihtimali nedeniyle dikkatlice değerlendirilmesi gereklidir. RNA reaktiflerinin üretilmesi kolaydır ve klonlama gerektirmez. Ancak araştırmalar RNP kompleksinin mutasyonları mRNA+ sgRNA kompleksinden daha hızlı tetiklediğini ortaya koymuştur (35). Üstelik hücre içerisinde ne kadar uzun süre kalırlarsa, karmaşık modifikasyonlar, mozaikler oluşturma ve daha fazla hedef dışı etki oluşturma olasılıkları o kadar yüksek olur.

sgRNA'lar; CRISPR tarafından genom düzenleme için ikinci unsur, hedef bölge seçimini ve sgRNA tasarımını içerir. NGG dizisini içeren herhangi bir DNA lokusu, protospacer bitişik motif (PAM) olarak adlandırılır ve CRISPR/Cas9 sistemi için potansiyel bir hedef bölgesini temsil eder.Bununla birlikte, tüm diziler aynı verimlilik ve özgüllükle kesme işlemine neden olmaz. sgRNA dizileri, kısmen tamamlayıcı dizilerde istenmeyen çift zincirli bozulmaların olasılığını sınırlamak için mümkün olduğunca benzersiz olmalıdır. 20 nükleotidlik bir crRNA'da özgüllük için gerekli olan, tohum dizileri (PAM'a bitişik ilk 12 nükleotid) benzersiz olan crRNA'ların seçilmesi tercih edilir.

Gebelik süresinin uzun olduğu ve yüksek maliyetli projelerin gerekli olduğu çiftlik hayvanlarında, düzenlenmiş yavru elde edilememesi nedeniyle sistemdeki verimsizlikler engelleyici etkiye sahiptir ve en aza indirilmelidir. Bu tür projelerde, dikkatli bir deney tasarım ve sgRNA'ların önceden doğrulanması esastır. *In silico* tasarımı için , birçok web aracı ve yazılım paketi (https://portals.broadinstitute.org/gppx/crispick/public;https://www.idtdna.com/site/order/designtool/index/CRISPR_SEQUENCE;https://www.atum.bio/eCommerce/cas9/input?multipleContacts=false), sgRNA'ların etkinliğinin ve özgüllüğünün tahmin edilmesine olanak tanır. Hayvansal çalışmalarda kullanılmadan önce mutlaka seçilen dizilerin doğruluklarının kontrol edilmesi gereklidir. Bu doğrulama süreci hedef canlının in vitro kültürlenmiş hücrelerinde veya doğrudan embriyolarında yapılabilir. Ancak hücrelerdeki kromatin yapısı CRISPR/Cas sisteminin kesme verimliliğini etkilediğinden, sgRNA'ların embriyolarda analiz edilmesi bizlere daha güvenilir sonuçlar verecektir. Embriyo dizilemesi tüm embriyoda gerçekleştirilebilir veya embriyo transferi için embriyo üretim basamaklarına geçilebilir.Transfer edilecek aynı blastosistlerde biyopsi yapmak mümkün olsa da, mozaikçiliğin ortaya çıkması nedeniyle biyopsi yapılan blastomerlerin implantasyon öncesi analizi her zaman doğan hayvanların genotipini temsil etmeyebilir (34).

Onarım şablonu; DSB onarımında HDR'nin görülme oranı NHEJ'e kıyasla daha düşüktür. Bu nedenle DNA şablonlanlarının tasarımları kullanılarak HDR frekansları artırılabilir. dsDNA'dan daha kısa homoloji bölgelerine ihtiyaç duyan ssDNA şablonları daha yüksek rekombinasyon oranın sahiptir. Belirli mutasyonları veya küçük dizi eklemelerini ararken en çok kullanılan şablonlar tek zincirli donör

oligonükleotidlerdir (ssODN'ler). ssODN donörü için homoloji kolları her biri yaklaşık 60-70 bp olmalıdır. Bazı çalışmalarda asimetrik bölgelerin verimliliğini artırdığı belirtilmiş olsa da, bu stratejinin uygunluğu hala tartışma konusudur (36). Daha büyük eklemeler, DSB bölgelerinin her iki tarafında 1-3 kb'lik homoloji kollarına sahip dsDNA şablonları veya uzun ssDNA'lar gerektirir. dsDNA ile plazmid aracılı HDR'nin ekleme verimliliği, ssDNA ile olduğundan çok daha düşüktür (37). Nükleazlara knock-in dizisi eklendikten sonra hedef lokusu istenilen yerden kesebilir. Tekrarlayan DSB'leri önüne geçebilmek için PAM bölgesine veya hedef bölgeye sessiz bir mutasyon eklenmesi zorunludur. Uyumsuz bir PAM veya hedef bölge dizisi genoma entegre olursa, sgRNA-Cas9 kompleksi hedef bölgeye bağlanamaz ve herhangi bir düzenleme yapamaz. Son zamanlarda geviş getiren hayvanlarda (koyunlar, keçiler ve inekler) knock-in'i başlatmak veya knockout etkinliğini artırmak için ssODN kullanımı bildirilmiştir (29, 38, 39).

Embriyo modifikasyonu; üreme teknolojilerindeki gelişmeler genomu değiştirilmiş hayvanların üretimi ve çoğaltılmasında önemlidir. İn vitro embriyo üretimi (IVEP), yukarıda değindiğimiz CRISPR bileşenleri ile birlikte mikroenjekte edilebilecek yeterli miktarda zigot elde etmek için tercih edilen yöntemlerin başında gelmektedir. Bu yöntemde kullanılacak oositler, canlı dişilerden veya mezbahanelerdeki örneklerin yumurtalıklarından foliküler aspirasyondan sonra toplanmaktadır. Dikkat edilmesi gereken nokta ise, zigotlar yumurta kanalından toplanabilse de, in vivo zigot üretimi, IVEP teknolojisinin geliştirilmesiyle üstesinden gelse de birkaç sorun içerir (40). Ancak buna rağmen, IVEP'nin in vitro üretimin başarısı, optimum kültür koşullarında ~%80-90 iyi döllenme ve bölünmenin yanında ~%30-40 blastosist in vitro gelişim oranlarıyla dikkat çekmektedir (41). Standart mikroenjeksiyon protokolleri, CRISPR sisteminin pronükleusu görüntülemeye gerek kalmadan hayvan türlerinin karanlık sitoplazmasına kolayca enjekte edilebilmesi nedeniyle hayvan zigotlarına uyarlanmış ve kullanılmıştır. CRISPR teknolojisinin bir diğer büyük avantajıda, sitoplazmik enjeksiyon (pronükleer enjeksiyon yerine) kullanım olasılığını artırmasıdır. Çiftlik hayvanlarında pronükleer enjeksiyon için gereken zigotların santrifüjlenmeden kullanılmasını sağlar. Bu nedenle, bu teknik embriyonun hayatta kalma şansını artıran ve daha zararsız bir mikroenjeksiyona olanak tanımlanır. Bundan dolayı zigot hücrelerinin sitoplazmasına CRISPR mikroenjeksiyon yönteminin kullanılması memeli hücrelerinde genom düzenleme için tercih edilen yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır (39). Diğer taraftan bu yönteme alternatif olarak somatik hücre çekirdek transferi (SCNT) farklı hayvan türlerinde de kullanılmaktadır. Ancak SCNT kullanılarak elde edilen embriyolardan genomu düzenlenmiş hayvanların üretimi zorlu bir süreçtir (Şekil 1). Buna ayrıca genom düzenlemedeki prosedürlerin de karmaşıklığı eklenince ne kadar zor bir süreç olduğu ortaya çıkmaktadır. Donör hücrelerde CRISPR başarısı yüksek olsa da, SCNT prosedürünün verimliliği düşüktür. Şöyleki bu yöntemde transfer edilen embriyoların düşük bir oranında canlı yavrular elde edilir. CRISPR'ın yüksek verimliliği, SCNT prosedürünün koyunlar, keçiler ve domuzlarda daha kolay uygulanır bir hale getirmiştir (29). Tüm bu yöntemler aslında, CRISPR ile farklı

türlerin zigotlarına doğrudan mikroenjeksiyon yapılabileceğini ve kabul edilebilir homozigot oranı ile yüksek düzenleme oranı sağlanabileceğini göstermiştir (2). Zigot mikroenjeksiyonunda kullanılmak üzere CRISPR bileşenlerinin oluşturduğu karışım laboratuvar şartlarında hazırlanır. Cas9, sgRNA ve ssODN'lerin saflığı, kalitesi ve konsantrasyonları, embriyonun hayatta kalmasını ve hedeflenen genetik değişiklik oranı arasında iyi bir denge olmalıdır. Bu dengeyi sağlayan tam bir oran olmadığı için kullanılan hayvan ve şartlara göre reaktifler ve konsantrasyonlarını test etmelidir, çünkü yavrularda negatif sonuçların ortaya çıkması yüksek maliyet ile sonuçlanacaktır (2). Yine de reaktif konsantrasyonu için genellikle 50–500 ng/µl'de Cas9 RNP, 5–200 ng/µl'de sgRNA'lar ve 200 ng/µl'de ssODN'ler kullanılmaktadır. Bu konsantrasyonlarla, kuzularda %40–50'lik kabul edilebilir düzenleme oranlarına sahip olduğu belirlenmiştir (42). Genellikle laboratuvarlarda mikroenjeksiyon yöntemleri iki mikromanipülatöre bağlı invört bir mikroskop altında gerçekleştirilir. Ancak son zamanlardaki çalışmalarda elektroporasyon yöntemi, fare ve sıçan zigotlarına küçük CRISPR reaktiflerini eklemek için alternatif bir yaklaşım olarak tanımlanmıştır (43, 44). Bu prosedür, teknik olarak zorlu mikroenjeksiyon tekniğine nazaran laboratuvarlarda yüksek verimlilik sağlayabilir. Elektroporasyon kendine özgün bir cihaz gerektirir, ancak mikroskop ve mikromanipülatörler kadar pahalı değildir. Ayrıca prosedür çok daha kolaydır, hızlı ve birçok zigotun birkaç dakika içinde elektropore edilebilmesine olanak sağlar. Bu yöntem mikroenjeksiyona kıyasla belirgin avantajlara sahip olsa da, bugüne kadar hayvancılıkta çok az kullanılmıştır (45, 46). Sığırlarda bu protokolün geliştirilmesi, farelerde olduğu gibi mikroenjeksiyonun elektroporasyonla değiştirilmesine olanak tanıyacaktır (2). Mikroenjeksiyon veya elektroporasyon süreçlerinden sonra elde edilen zigotlar, diğer çalışmalarda kullanılana kadar in vitro olarak kültürlenebilir (Şekil 1). Ya da bu hücreler embriyo transferine kadar saklanabilir. Bunu içinde kriyoprezervasyon yapılabilir. Çiftlik hayvanlarında in vitro üretilen embriyolardaki en büyük zorluklardan birisi, in vivo türetilen embriyolarla karşılaştırıldığında düşük kriyotoleransa sahip olmalarıdır. Ayrıca, genom düzenlemesi için embriyolar mikroenjeksiyona tabi tutulur ve böylece hayatta kalma oranı ve kriyotolerans daha da etkilenebilmektedir. Bu nedenle, mikroenjeksiyon içeren yöntemlerin çoğunda embriyolar taze olarak transfer edilmektedir.

Genom değişiklik analizi; doğumdan sonra genomu değiştirilen hayvanlar mutlaka fenotipik ve genotipik analizlere tabi tutulmalıdır. CRISPR/Cas sisteminin kullanıldığı hayvanlarda, bazı durumlarda mozaik formunda olabilen farklı bir mutasyona uğramış alel kombinasyonları ortaya çıkmaktadır. Bunun önüne geçmek için, NHEJ hayvanlarda rastgele ve heterojen indeller ürettiğinden, sgRNA, kesimin sonraki genotiplemeyi kolaylaştırmak için bir kısıtlama bölgesine müdahale edecek şekilde tasarlanabilir, ancak bu yaklaşım mevcut lokus sayısını sınırlar. Herhangi bir lokustaki mutasyonların genotiplenmesine olanak tanıyan bazı yöntemler (PAGE, heterodupleks hareketlilik testi, surveyor nükleaz ve T7 endonükleaz I testleri) olsa da, hedeflenen mutasyonun doğasını tam olarak ortaya koyamaz. Hedeflenen mutasyonları tam olarak görmek için mutlaka bölgeyi dizilemek gereklidir. Ancak

hayvan hücrelerinden elde edilen PCR amplikonlarının direk Sanger dizilimi bazı hatalara neden olabilir. Bu açıdan PCR amplikonların klonlanıp dizilenmesi alellerin belirlenmesinde son derece önemlidir. Yeni nesil DNA dizilemede kullanılabilir. Bu süreci daha hızlı hale getirecektir. Diğer taraftan CRISPR/Cas sisteminin önemli bir avantajı, Cas9 nükleazı tarafından üretilen hedef dışı bölgelerin sıklığı ve sayısı, in vitro kültürlenmiş hücrelere kıyasla canlı hayvanlarda çok daha düşüktür (47). Ek olarak istenmeyen veya hedef dışı bölgeler, hayvanlardaki seçim ile ortadan kaldırılabilir. Kural olarak, öngörülen hedef dışı bölgelerden kaçınmak için hedef dizilerin dikkatli bir şekilde seçilmesi zorunludur; aynı kromozom üzerinde olası hedef dışı bölgelere sahip kılavuzlardan kaçınılmalıdır (2).

Büyükbaş Hayvanlarda Verime Yönelik Genom Düzenleme Uygulamaları

Genom düzenleme teknolojileri,besi hayvanı yetiştiricileri için umut verici bir dizi araçlar sunmaktadır. İlk olarak, bu araçlar genomik özelliklerin aydınlatması için genlerin foksiyonlarını belirlemeye yardımcı olabilir ve monogenik özelliklerin altında yatan sebeplerin belirlenmesinde kullanılabilir. İkinci olarak, besicilik programlarında kullanılmak için yararlı genetik varyasyonlar ıslah programlarında kullanılarak hızlı çözümler sağlayabilir. Bu tür bir varyasyonlar, genetik kusurların ortadan kaldırılmasını, istenmeyen genlerin susturulmasını, herhangi bir ilişkisi olmayan ırklar arasındanda faydalı alellerin ve haplotiplerin taşınmasını kapsayabilir. Gelecekte, in vitro gamet oluşumu, ticari olarak kullanılan hayvanların eşey hücre soyunun, yüksek verimli genetik olarak elit hatlardan türetilen hücrelerle değiştirilmesi genetik ilerleme oranını hızlandıracaktır (10). Son yıllarda, hayvan genom verilerinin sağladığı genomik analizler ve ucuz genotipleme platformları sayesinde çiftlik hayvanlarının geliştirilmesinde bizlere ek bilgi kaynağı sağlamıştır (48). Yeni nesil dna dizileme yöntemleri ile birlikte çiftlik hayvanlarındaki genom dizilerinin tamamlanmasıyla, farklı ırklar ve hatlar arasında genetik çeşitlilik bolluğunu ortaya çıkardı. Örneğin, sığır genetikçileri dünyanın dört bir yanından farklı ırklardan 2700'den fazla boğayı sıraladıklarında, farklı sığır ırkları arasında 86,5 milyondan fazla varyanttın olduğu ortaya çıkartıldı. Bu varyantlarda, bir veya daha fazla baz DNA çiftinin 2,5 milyon ekleme ve delesyonunu, 84 milyon tek nükleotit varyantı içerdiği belirlenmiştir (49). Bu varyasyonlar genetik iyileştirmenin anahtarıdır. Hayvan yetiştiriciliğinde en iyi hayvanlardaki varyasyonların kullanılması yada yagınlaştırılması genetik kazanç oranını hızlandırmaktır. Tipik olarak, genetik iyileştirme, bir cins içinde zaten var olan doğal varyantların seçilmesiyle ilişkilidir. Farklı ırklardaki daha etkili varyantların bir cinsden diğerine geçirebilme teknolojisi, genetik gelişme oranını daha da hızlandırabilir. Geçmişte bu, diğer cinsten seleksiyon sürüklenmesi olarak içeri giren istenmeyen özellikleri ortadan kaldırmak için melezleme ve ardından tekrarlanan geri çaprazlama yoluyla başarılmıştır (50). Genom düzenleme, çiftlik hayvanlarında genetik kazanç oranını daha da hızlandırmak için yeni fırsatlar sunmaktadır. Düzenleme, yararlı mevcut genetik varyantları, hayvan yetiştirme programlarına tam olarak dahil etmek için önemli bir fırsat sunar. Bu varyantlar sayesinde genetik kusurları onarabilir, istenmeyen genler etkisiz hale

getirebilir veya devre dışı bırakabilir, ırklar arasında faydalı alellerin ve haplotiplerin elde edilmesi kolaylaşır.

Modern hayvancılıkta boynuzlu sığırlar, çiftçiler tarafından istenmeyen bir durumdur. Boynuz kesme gerek yetiştirici gerekse hayvanlar açısından stresli, ağrılı, zaman alıcı ve hayvan refahı konusunda endişelere yol açan bir süreçtir. Boynuzsuzluğa neden olan doğal varyantların çoğu et sığırlarında bulunurken süt sığır popülasyonlarında bu varyantlar nadir olarak görülür (51). Boynuzsuz sığırlarda en yaygın varyantlardan birisi olan 202 bazlık bir bölgeyi kapsayan bölgeyi Angus inek genomundan izole edilerek, boynuzlu Holstein-Friesian boğasından boynuzsuz yavruların üretimi için CRISPR/Cas12a sistemi (eski adıyla Cpf1) kullanılmış ve buda başarılı olunmuştur (51).

Yüksek verim özelliğine sahip Holstein Friesian süt sığırlarının vücutları büyük oranda siyah olmakla birlikte, siyah beyaz bir dış görüntüye sahiptirler. Açık bir deri rengiyle karşılaştırıldığında siyah, sığırlarda ısı stresine katkıda bulunan bir faktör olarak karşımıza çıkmkatadır. Süt sığırlarının hızla ısınan iklimlere daha iyi adapte olabilmesi için, genom düzenlemesi ile tüylerinin renginin daha açık hale getirilmesi için yapılan bir çalışmada, gRNA/Cas9 sistemi kullanarak, Galloway ve Highland sığırlarında gözlemlenen yarı baskın renk seyreltme fenotipi için melanozom öncesi protein 17 geninde (*PMEL*) üç bp'lik bir silme eklenmiştir. Homozigot özelliklere sahip hücrelerden üretilen buzağılar, güçlü bir renk seyreltme etkisi ortaya çıkarmıştır (gri ve beyaz deri özellikleri) (52).

Büyükbaş Hayvanlarda Hastalıklara Yönelik Genom Düzenleme Uygulamaları

CRISPR/Cas9 tabanlı genom düzenleme sisteminin şimdiye kadar çiftlik hayvanlarında sınırlı olarak uygulanmıştır. Bu uygulamalar, model hayvanlardaki hedef gen bölgelerinin ekspresyonunun etkisiz hale getirilmesi veya değiştirilmesinde, hedeflenen genlerin fonksiyonlarının belirlenmesinde, insan hastalığı patogenezini incelemek ve potansiyel tedavileri değerlendirmesinde, endüstriyel, farmasötik ve biyoteknolojik uygulamalar için genetiği değiştirilmiş hayvanların üretiminde kullanılmıştır (53). Bununla birlikte, hayvan hastalıklarını kontrol etmedeki başarısı gen düzenleme sistemlerinin yaygınlaşmasına yol açarak çeşitli faktörleri etkileyecektir. Örneğin, genetiği değiştirilmiş hayvanların oranı populayon içindeki artışlarını ve dağılımlarını etkileyecektir (54). Genom düzenlemede CRISPR/Cas9 gibi programlanabilir nükleazların kullanılabilmesi gibi son ilerlemeler, hayvan yetiştiriciliği için çalışan araştırmacılara hastalık direncini hedefleyen yeni yollar sunmaktadır. Farklı hayvan türleri arasında genom düzenlemedeki etkinin oranı üreme fizyolojisindeki farklılıklar nedeniyle değişmektedir. Genom düzenlemesi sığırlar açısından incelendiğinde, sığırların yüksek pazar değerleri, az sayıda yavru, diğer çiftlik hayvanlarına göre daha uzun gebelik süresi (9 aylık gebelik, ergenliğe ulaşmaya 12-18 ay) nedeniyle büyük zorluklarla karşılaşmaktadır. Ancak zamanla, genom düzenleme sistemleri, büyüme, üretim performansı ve belirli hastalıklara karşı direnç gibi farklı özellikleri iyileştirmek için çiftlik hay-

vanlarında başarıyla uygulanabilme potansiyeline sahiptir. Çiftlik hayvanlarındaki myostatin (*MSTN)* geni büyüme ve iskelet kasının gelişimiyle ilişkilendirilmiştir. Bu açıdan bu gendeki genetik manipülasyon ekonomik açıdan önemli bir özellik olan et üretimi üzerinde önemli etkilere sahiptir. Bugüne kadar genom düzenleme sistemi kullanılarak, *MSTN* geni sığır, domuz, koyun ve keçi genomlarında başarıyla inaktif hale getirilmiştir (55). Sığırlarda mastitise neden olan bakteri *Staphylococcus aureus'a* karşı bakterisidal aktiviteye sahip süt proteininin üretilmesinde SCNT ile antibiyotik lizostafin verilmesi yöntemi başarıyla uygulanmıştır (56). Yine sütte yoğun olarak bulunan ve baskın bir alerjen olan sığır peynir altı suyu proteini ß-laktoglobulin geni, ZFN tekniği kullanılarak sığır genomunda başarılı bir şekilde devre dışı bırakılmıştır (57). Sığır tüberkülozu, sığırlarda *Mycobacterium bovis'in* neden olduğu ve sakat bırakan kronik bakteriyel bir hastalıktır. Hayvancılık üreticileri için önemli zorluklar yaratan *M. bovis* enfeksiyonu, dünya çapında 50 milyondan fazla sığırın enfekte olduğu tahmin edilmektedir (58). Bu zoonotik enfeksiyon, genellikle insanlara pastörize edilmemiş süt ürünlerinin yenilmesi yoluyla bulaşırken insan tüberküloz›sinin %10-15 prevalansına neden olmaktadır (59). Testi pozitif çıkan hayvanların yok edilmesi büyük bir ekonomik kayıp anlamına gelmektedir. Sığır tüberkülozunun, ekonomik ve zoonotik önemi dikkate alındığında, geleneksel kontrol stratejilerinin başarısızlığı nedeniyle, tüberküloza dirençli sığır üretimi genom düzenleme için çok önemli bir hedef haline gelmektedir. Tüberküloz direnci için güçlü bir aday gen olarak görülen ve çeşitli çalışmalarda rapor edilen, hücre içi patojenlerle enfeksiyona karşı doğal direnç 1 (*NRAMP1*) geni bu hedef için en önemli adımlardan birisidir. Son zamanlarda bilim adamları *NRAMP1* genini sığır fetal fibroblast hücre genomuna entegrasyonu için Cas9 nickaz (nCas9) kullanmıştır (60). Bu tasarlanmış fibroblast hücreleri daha sonrasın da inek yumurta hücrelerine transfer edilmiştir. Bu hücreler alıcı ineklere transfer edilmeden önce fizyolojik olarak doğal bir östrus döngüsünün ardından, yumurtalar laboratuvarda embriyolara kadar büyütülmüştür. Eklenen *NRAMP1* geninin hücrelerde doğru bir şekilde ifade edildi tespit edilmesinin ardından, *M. bovis* enfeksiyonuna karşı daha yüksek derecede direnç gösteren sığır örnekleri yetiştirilmiştir (60). Ayrıca, sığırlarda *M. bovis* enfeksiyonuna karşı direncin, sığır genomunun intergenik bir bölgesine fare SP110 geninin TALEN aracılığı ile eklenmesi yoluylada elde edilebileceği bildirilmiştir (62).

Sığırlarda nakliye ateşi veya enzootik pnömoni olarak da adlandırılan pastörelloz, çoğunlukla yeni sütten kesilmiş veya yeni bir yere nakledildikten sonra ortaya çıkan solunum yolu hastalığı kompleksidir. *P. hamelytica* enfeksiyon sırasında sitotoksik olan bir lökotoksin salgılar ve bu salgılar lökositlerin yüzeyindeki CD18 proteininin sinyal peptid bölgelerine bağlanırlar. Örneğin fare ve insanların olgun lökositlerindeki CD18'ler sinyal peptidinden yoksundur. ZFN'ler kullanılarak sığır CD18 proteinlerinde tek bir amino asit değişikliğe neden olan genom düzenlemesi başarıyla uygulanmıştır. Daha sonrasında elde edilen sığırlardan alınan lökositler, *P. hamelytica* lökotoksin kaynaklı sitotoksisiteyi inhibe edebildikleri bildirilmiştir (61).

Sonuç

Sığırlarda genom düzenleme için CRISPR'ın geliştirilmesi, hayvan sağlığı, refahı, çevre koruma ve insan sağlığı üzerindeki etkiler dahil olmak üzere modern hayvancılıkla ilişkili zorlukların üstesinden gelebilmek için önemli bir teknolojidir. Teknik zorluk aşıldığında, bu teknoloji küreselleşmenin bir parçası olarak bir çok canlıda uygulanacaktır. Hastalığa dirençli suşlar ve verimliliği artıran özellikler gibi uygulamalar, sistemin hayvan refahını iyileştirme, antibiyotiklere olan bağımlılığı azaltma ve sürdürülebilir tarımı destekleme potansiyelini vurguluyor. Bağışıklığı güçlü sağlıklı çiftlik hayvanlarının yetiştirilmesi, günümüzde güvenli gıdanın sürdürülebilir üretimi için çok önemlidir. Biyoteknolojik ve omik araçlarındaki gelişmeler, çiftlik hayvanlarında hastalık direnci için genom düzenlemeyi her geçen gün daha da kolaylaştırmaktadır. CRISPR/Cas9 gibi genom düzenleme sistemlerinin, modern üreme biyoteknoloji uygulanmalarıyla birleştirildiğinde, çiftlik hayvanlarında hastalık direncini iyileştirmek için çığır açan bir araç haline getirmektedir. CRISPR/Cas9 teknolojisi, hayvancılık genetiğinde dönüştürücü bir ilerlemeyi temsil etmektedir. Bu güçlü genom düzenleme sistemi, sığır verimliliğini, hastalık direncini ve çevresel streslere uyumu önemli ölçüde artırabilme potansiyeline sahiptir.

Kaynaklar

1. Gerland, P. (2023, December). What's beneath the future: World population prospects. In Semaine Data-SHS.
2. Menchaca, A., Dos Santos-Neto, P. C., Mulet, A. P., & Crispo, M. (2020). CRISPR in livestock: From editing to printing. Theriogenology, 150, 247-254.
3. WB, P., & Prosperity, S. (2018). Piecing Together the Poverty Puzzle., 2018.
4. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2009). High Level Expert Forum—How to Feed the World in 2050.
5. Islam, M. A., Rony, S. A., Rahman, M. B., Cinar, M. U., Villena, J., Uddin, M. J., & Kitazawa, H. (2020). Improvement of disease resistance in livestock: application of immunogenomics and CRISPR/Cas9 technology. Animals, 10(12), 2236.
6. Jaenisch, R. (1976). Germ line integration and Mendelian transmission of the exogenous Moloney leukemia virus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **73**, 1260–1264.
7. Brinster, R. L., Chen, H. Y., Trumbauer, M., Senear, A. W., Warren, R., & Palmiter, R. D. (1981). Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs. Cell, **27**, 223–231.
8. Brinster, R. L., Braun, R. E., Lo, D., Avarbock, M. R., Oram, F., & Palmiter, R. D. (1989). Targeted correction of a major histocompatibility class II E alpha gene by DNA microinjected into mouse eggs. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **86**, 7087–7091.
9. Hammer, R. E., Pursel, V. G., Rexroad Jr, C. E., Wall, R. J., Bolt, D. J., Ebert, K. M., ... & Brinster, R. L. (1985). Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. Nature, 315(6021), 680-683.

10. Bishop, T. F., & Van Eenennaam, A. L. (2020). Genome editing approaches to augment livestock breeding programs. Journal of Experimental Biology, 223(Suppl_1), jeb207159.
11. Palmiter, R. D., Brinster, R. L., Hammer, R. E., Trumbauer, M. E., Rosenfeld, M. G., Birnberg, N. C., & Evans, R. M. (1982). Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein–growth hormone fusion genes. Nature, 300(5893), 611-615.
12. Ivics, Z., Hackett, P. B., Plasterk, R. H., & Izsvák, Z. (1997). Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells. Cell, 91(4), 501-510.
13. Chevalier, B. S., & Stoddard, B. L. (2001). Homing endonucleases: structural and functional insight into the catalysts of intron/intein mobility. Nucleic acids research, 29(18), 3757-3774.
14. Joung, J. K., & Sander, J. D. (2013). TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. Nature reviews Molecular cell biology, 14(1), 49-55.
15. Belfort, M., & Bonocora, R. P. (2014). Homing endonucleases: from genetic anomalies to programmable genomic clippers. Homing Endonucleases: Methods and Protocols, 1-26.
16. Ran, F. A. F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. Nature protocols, 8(11), 2281-2308.
17. Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science, 346(6213), 1258096.
18. Shao, Y., Guan, Y., Wang, L., Qiu, Z., Liu, M., Chen, Y., ... & Li, D. (2014). CRISPR/Cas-mediated genome editing in the rat via direct injection of one-cell embryos. Nature protocols, 9(10), 2493-2512.
19. Proudfoot, C., & Tait-Burkard, C. (2017). Genome editing for disease resistance in livestock. Emerging Topics in Life Sciences, 1(2), 209.
20. Schnieke, A. E., Kind, A. J., Ritchie, W. A., Mycock, K., Scott, A. R., Ritchie, M., ... & Campbell, K. H. (1997). Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. Science, 278(5346), 2130-2133.
21. Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J., & Campbell, K. H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature, 385(6619), 810-813.
22. Kato, Y., Tani, T., & Tsunoda, Y. (2000). Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. Journal of reproduction and fertility, 120(2), 231-238.
23. Geurts, A. M., Cost, G. J., Freyvert, Y., Zeitler, B., Miller, J. C., Choi, V. M., ... & Buelow, R. (2009). Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. Science, 325(5939), 433-433.
24. Tesson, L., Usal, C., Ménoret, S., Leung, E., Niles, B. J., Remy, S., ... & Cost, G. J. (2011). Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs. Nature biotechnology, 29(8), 695-696.
25. Shen, B., Zhang, J., Wu, H., Wang, J., Ma, K., Li, Z., ... & Huang, X. (2013). Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting. Cell research, 23(5), 720-723.

26. Lamas-Toranzo, I., Guerrero-Sánchez, J., Miralles-Bover, H., Alegre-Cid, G., Pericuesta, E., & Bermejo-Álvarez, P. (2017). CRISPR is knocking on barn door. Reproduction in Domestic Animals, 52, 39-47.

27. Lee, H., Yoon, D. E., & Kim, K. (2020). Genome editing methods in animal models. Animal cells and systems, 24(1), 8-16.

28. Horvath, P., & Barrangou, R. (2010). CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. Science, 327(5962), 167-170.

29. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA–guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. science, 337(6096), 816-821.

30. Williams, D. K., Pinzón, C., Huggins, S., Pryor, J. H., Falck, A., Herman, F., ... & Gaddy, D. (2018). Genetic engineering a large animal model of human hypophosphatasia in sheep. Scientific reports, 8(1), 16945.

31. Eaton, S. L., Proudfoot, C., Lillico, S. G., Skehel, P., Kline, R. A., Hamer, K., ... & Wishart, T. M. (2019). CRISPR/Cas9 mediated generation of an ovine model for infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (CLN1 disease). Scientific reports, 9(1), 9891.

32. Komor, A. C., Kim, Y. B., Packer, M. S., Zuris, J. A., & Liu, D. R. (2016). Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. Nature, 533(7603), 420-424.

33. Anzalone, A. V., Randolph, P. B., Davis, J. R., Sousa, A. A., Koblan, L. W., Levy, J. M., ... & Liu, D. R. (2019). Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. Nature, 576(7785), 149-157.

34. Vilarino, M., Suchy, F. P., Rashid, S. T., Lindsay, H., Reyes, J., McNabb, B. R., ... & Ross, P. J. (2018). Mosaicism diminishes the value of pre-implantation embryo biopsies for detecting CRISPR/Cas9 induced mutations in sheep. Transgenic research, 27, 525-537.

35. Sung, Y. H., Kim, J. M., Kim, H. T., Lee, J., Jeon, J., Jin, Y., ... & Kim, J. S. (2014). Highly efficient gene knockout in mice and zebrafish with RNA-guided endonucleases. Genome research, 24(1), 125-131.

36. Richardson, C. D., Ray, G. J., DeWitt, M. A., Curie, G. L., & Corn, J. E. (2016). Enhancing homology-directed genome editing by catalytically active and inactive CRISPR-Cas9 using asymmetric donor DNA. Nature biotechnology, 34(3), 339-344.

37. Chen, F., Pruett-Miller, S. M., Huang, Y., Gjoka, M., Duda, K., Taunton, J., ... & Davis, G. D. (2011). High-frequency genome editing using ssDNA oligonucleotides with zinc-finger nucleases. Nature methods, 8(9), 753-755.

38. Niu, Y., Zhao, X., Zhou, J., Li, Y., Huang, Y., Cai, B., ... & Chen, Y. (2018). Efficient generation of goats with defined point mutation (I397V) in GDF9 through CRISPR/Cas9. Reproduction, Fertility and Development, 30(2), 307-312.

39. Perota, A., Lagutina, I., Duchi, R., Zanfrini, E., Lazzari, G., Judor, J. P., ... & Galli, C. (2019). Generation of cattle knockout for galactose-α1, 3-galactose and N-glycolylneuraminic acid antigens. Xenotransplantation, 26(5), e12524.

40. Menchaca, A., Anegon, I., Whitelaw, C. B. A., Baldassarre, H., & Crispo, M. (2016). New insights and current tools for genetically engineered (GE) sheep and goats. Theriogenology, 86(1), 160-169.

41. Menchaca, A., Barrera, N., dos Santos Neto, P. C., Cuadro, F., & Crispo, M. (2018). Advances and limitations of in vitro embryo production in sheep and goats. Animal Reproduction (AR), 13(3), 273-278.
42. Crispo, M., Mulet, A. P., Tesson, L., Barrera, N., Cuadro, F., dos Santos-Neto, P. C., ... & Menchaca, A. (2015). Efficient generation of myostatin knock-out sheep using CRISPR/Cas9 technology and microinjection into zygotes. PloS one, 10(8), e0136690.
43. Remy, S., Chenouard, V., Tesson, L., Usal, C., Ménoret, S., Brusselle, L., ... & Anegon, I. (2017). Generation of gene-edited rats by delivery of CRISPR/Cas9 protein and donor DNA into intact zygotes using electroporation. Scientific reports, 7(1), 16554.
44. Menchaca, A., dos Santos-Neto, P. C., Cuadro, F., Souza-Neves, M., & Crispo, M. (2018). From reproductive technologies to genome editing in small ruminants: An embryo's journey. Animal Reproduction, 15(Suppl 1), 984.
45. Miao, D., Giassetti, M. I., Ciccarelli, M., Lopez-Biladeau, B., & Oatley, J. M. (2019). Simplified pipelines for genetic engineering of mammalian embryos by CRISPR-Cas9 electroporation. Biology of reproduction, 101(1), 177-187.
46. Hirata, M., Tanihara, F., Wittayarat, M., Hirano, T., Nguyen, N. T., Le, Q. A., ... & Otoi, T. (2019). Genome mutation after introduction of the gene editing by electroporation of Cas9 protein (GEEP) system in matured oocytes and putative zygotes. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal, 55, 237-242.
47. Montoliu, L., & Whitelaw, C. B. A. (2018). Unexpected mutations were expected and unrelated to CRISPR-Cas9 activity. Transgenic research, 27, 315-319.
48. Georges, M., Charlier, C., & Hayes, B. (2019). Harnessing genomic information for livestock improvement. Nature Reviews Genetics, 20(3), 135-156.
49. Hayes, B. J., & Daetwyler, H. D. (2019). 1000 bull genomes project to map simple and complex genetic traits in cattle: applications and outcomes. Annual review of animal biosciences, 7(1), 89-102.
50. Wu, Z., Bosse, M., Rochus, C. M., Groenen, M. A., & Crooijmans, R. P. (2023). Genomic insight into the influence of selection, crossbreeding, and geography on population structure in poultry. Genetics Selection Evolution, 55(1), 5.
51. Schuster, F., Aldag, P., Frenzel, A., Hadeler, K. G., Lucas-Hahn, A., Niemann, H., & Petersen, B. (2020). CRISPR/Cas12a mediated knock-in of the Polled Celtic variant to produce a polled genotype in dairy cattle. Scientific reports, 10(1), 13570.
52. Laible, G., Cole, S. A., Brophy, B., Wei, J., Leath, S., Jivanji, S., ... & Wells, D. N. (2021). Holstein Friesian dairy cattle edited for diluted coat color as a potential adaptation to climate change. BMC genomics, 22(1), 1-12.
53. Shrock, E., & Güell, M. (2017). CRISPR in animals and animal models. Progress in molecular biology and translational science, 152, 95-114.
54. Anderson, R. (1991). Infectious diseases of humans: dynamics and control. Cambridge Univer-sity Press.
55. Petersen, B. (2017). Basics of genome editing technology and its application in livestock species. Reproduction in Domestic Animals, 52, 4-13.
56. Wall, R. J., Powell, A. M., Paape, M. J., Kerr, D. E., Bannerman, D. D., Pursel, V. G., ... & Hawk, H. W. (2005). Genetically enhanced cows resist intramammary Staphylococcus aureus infection. Nature biotechnology, 23(4), 445-451.

57. Yu, S., Luo, J., Song, Z., Ding, F., Dai, Y., & Li, N. (2011). Highly efficient modification of beta-lactoglobulin (BLG) gene via zinc-finger nucleases in cattle. Cell research, 21(11), 1638-1640.

58. Michel, A. L., Müller, B., & Van Helden, P. D. (2010). Mycobacterium bovis at the animal–human interface: A problem, or not?. Veterinary microbiology, 140(3-4), 371-381.

59. Lillico, S. G., Proudfoot, C., King, T. J., Tan, W., Zhang, L., Mardjuki, R., ... & Whitelaw, C. B. A. (2016). Mammalian interspecies substitution of immune modulatory alleles by genome editing. Scientific reports, 6(1), 21645.

60. Tuggle, C. K., & Waters, W. R. (2015). Tuberculosis-resistant transgenic cattle. Proceedings of the National Academy of Sciences, 112(13), 3854-3855.

61. Shanthalingam, S., Tibary, A., Beever, J. E., Kasinathan, P., Brown, W. C., & Srikumaran, S. (2016). Precise gene editing paves the way for derivation of Mannheimia haemolytica leukotoxin-resistant cattle. Proceedings of the National Academy of Sciences, 113(46), 13186-13190.

62. Wu, H., Wang, Y., Zhang, Y., Yang, M., Lv, J., Liu, J., & Zhang, Y. (2015). TALE nickase-mediated SP110 knockin endows cattle with increased resistance to tuberculosis. Proceedings of the National Academy of Sciences, 112(13), E1530-E1539.

63. Wani, A. K., Akhtar, N., Singh, R., Prakash, A., Raza, S. H. A., Cavalu, S., ... & Hashem, N. M. (2023). Genome centric engineering using ZFNs, TALENs and CRISPR-Cas9 systems for trait improvement and disease control in Animals. Veterinary research communications, 47(1), 1-16.

CRISPR TEKNOLOJİSİ: İNSAN HASTALIKLARININ GENETİK TEMELLERİNE YÖNELİK YENİLİKÇİ YAKLAŞIMLAR VE TEDAVİ STRATEJİLERİ

HAMZA AVCI*
HÜLYA KARATON**
MUSTAFA KARAKAYA***

Giriş

CRISPR; Kümelenmiş düzenli aralıklı kısa palindromik tekrarlar (CRISPR)olarak adlandırılır. Bakterilerde doğal olarak bulunan ve bir adaptif bağışıklık savunma mekanizmasıdır. Bir diğer tanımı ise Cas9 nükleazları ile yapılan bir gen düzenleme teknolojisidir. CRISPR teknolojisi ile DNA parçalarını çıkarmak, değiştirmek veya ekleme özelliğinden dolayı genetik mühendisliğinde çığır açıcı bir yöntemdir. CRISPR güçlü bir gen düzenleme aracı olmasıyla birlikte diğer gen düzenleme yöntemlerinden (ZFN, TALEN) daha ucuz, hızlı ve kullanımı kolaydır ve bunun sonucunda dünya çapındaki laboratuvarlarda daha fazla kullanılmıştır. Araştırmacıların CRISPR/Cas9 teknolojisi ile hastalıkları ortadan kaldırmak, daha dayanıklı bitkiler yaratmak, patojenleri yok etmek ve insan genlerini ayarlamak gibi birçok hedefleri vardır. Genlerin görev ve işlevlerinin çözümlenmesi ve birçok hastalığın genetik olarak sınıflandırması ile CRISPR teknolojisinin yaygın bir şekilde kullanılması ön görülmektedir. Crispr'ın buluşu, potansiyel faydaları ile riskleri arasında dengeli bir şekilde değerlendirme yapılması önemlidir. CRISPR teknolojisinin birçok yararlarının olmasının yanında etik problemleri de ortaya çıkmıştır. Hastalık tedavilerinde insan emriyosu kullanımı ya da bilimsel amaçlarla araştırmalarda kullanılması akla gelen etik sorunlardan biridir. Bu çalışmada CRISPR/CAS 9 Teknolojisinin insanlar için yapılan bazı çalışmaları inceleyeceğiz.

* Hunterbattal9@gmail.com
** hkaraton@gmail.com
*** mkaraya2323@gmail.com

Gen Tedavisi

Genel anlamda genetik hastalıkların tedavisi için veya hastaların klinik durumunu iyileştirilmesi amacı ile genetik materyallerin hücrelere aktarılmasıyla yapılan teknolojik tedavi yöntemidir. Gen tedavisinin ilk hedefi; bir vektör aracılığı ile terapötik genin hedef hücrelere taşınmasıdır. 1 Gen tedavisinin hedeflerinden biri de hücresel işlevleri yeni baştan düzenlemek, hedef hücrelerde mutasyonla değişime uğramış, eksik olan genlerin yerine düzenlenmiş genleri yerleştirmek (2). Genlerin hedef hücreye taşınması in vivo ile ex vivo yöntemleri ile olur (3-4).

İn vivo yönteminde CRISPR/CAS-9 bileşenleri, yerinde gen düzenlemesi için viral veya viral olmayan vektörler kullanılarak doğrudan hastaya verilir. Ex vivo yönteminde genler, hastadan türetilen hücrelerde düzenlenir. Bunlar yeniden programlama yapılarak (iPSC›ler) veya somatik kök/progenitör hücrelerin doğrudan genişletilmesiyle oluşturulur ve düzeltmenin ardından aynı hastaya tekrar nakledilebilir. Gen tedavisi çeşitli etkilerle değişime uğramış hücre tiplerine göre iki bölüme ayrılır bunlar somatik hücre gen tedavisi ve germ hücre gen tedavisi (4). Somatik Hücre Gen Tedavisinin amacı hastalığın ortadan kalkması için hedef hücrelerde ya da dokularda genetik değişiklikleri sağlamaktır. Gen tedavisinde bu tedavi yaygın bir şekilde kullanılır (5).

Germ Hücre Gen Tedavisinin amacı tedavi edici olan geni yumurtalık ve sperm hücreleri gibi kalıtımsal hücrelere taşımak. Germ hücre gen tedavisi ile oluşan kalıcı değişiklikler nesiller boyunca aktarılır. Kalıtımsal olduğu için erken embriyonik dönemde kalıcı değişiklikler yapabilir (6). Germ hücre gen tedavisi etik açısından yasaklanmıştır. Dünyada yasal olarak sadece somatik hücre gen tedavisi kullanılmaktadır. Yakın zamanda gen tedavisi, birçok farklı hastalık için yaygın kullanılan bir tedavi halini alabilecek, çok fazla terapötik potansiyele sahip olan bir teknolojidir. Bölgeye özgü gen düzenleme tedavi yöntemlerine göre CRISPR teknolojisi daha basit ve faydalı bir alternatif olarak geleneksel gen terapisinde ortaya çıkan bazı endişeleri azaltır ve daha fazla güven verir.

Crıspr-Cas9 basitliği, hızı ve geleneksel olarak tedavisi en zor organizmalarda bile herhangi bir hücre veya hedef dokudaki endojen genleri değiştirmedeki etkinliği nedeniyle diğer (ZFN, TALEN) sistemlere göre daha çok kullanılmaktadır. ZFN'ler ve TALEN'ler CRISPR/CAS9'dan çok daha fazla emek gerektirir ve daha pahalıdır. CRISPR/Cas9'un diğer bir avantajı, eşzamanlı çoklu lokus düzenleme potansiyeline sahip olmasıdır; bu da bu teknolojiyi ZFN VE TALEN teknolojilerine göre daha kolay, faydalı ve daha ölçeklenebilir hale getirir. CRISPR-Cas9'un görünür avantajları olmasına rağmen dezavantajları da vardır, bunlardan biri DNA dizisi kesimi yaparken yanlış bölgelerde kesik oluşturma bunun sonucunda hedef dışı mutasyon oluşumu. CRISPR/CAS9'un klinik olarak uygulanması için hala uzun bir yol var. CRIPSR'ın gelişimi için CRISPR/CAS9'un yüksek özgüllüğünü sağlamalı ve olumsuz etkileri olan olası hedef dışı mutasyonları ortadan kaldırılmalıdır. Hedef bölgelerin dikkatli seçimi, hassas gRNA tasarımı ve potansiyel hedef dışı bölgelerin genom çapında araştırılması gereklidir.

CRISPR/CAS9 tabanlı gen tedavisinin tıbbi uygulamalarda kullanılması insan sağlığı açısından çok önemli bir yere sahip, etkili ve potansiyeli yüksek bir gen tedavisidir.

CRISPR'in Keşfi

CRISPR-Cas9 sisteminin keşfi ve gelişimi genom mühendisliğinin ilerlemesinde büyük rol oynamıştır. Crıspr teknolojisinin tarihsel gelişimi ve keşfinde birçok önemli adım ve keşif bulunmaktadır.ilk olarak CRISPR teknolojisinin temelinin atılmasına katkıda bulunan 1987 yılında bilim adamı Yoshizumi Ishino E.coli bakterisinin DNA'sında tekrarlayan kısa palindromik diziler keşfetti, fakat bu dizilerin işlevi hakkında bir bilgi yoktu (7).

2002 yılında bilim adamları çalışmalarında CRISPR bölgelerinin yakınında bulunan Cas genlerinin, bu tekrarlayan dizilerin işlevselliğinde önemli roller oynadığını buldular. Bu genlerin, yabancı genetik materyali tanıma, hedefleme ve kesmede önemli görevlere sahip olduğu bulundu. CRISPR-Cas sisteminin bakteriyel ve arkeal bağışıklık sisteminin bir parçası olduğunu ve bu sistemin, bakterilerin viral enfeksiyonlara karşı savunmasında önemli bir rol üstlendiği görüldü. Bu yılda CRISPR adlandırıldı (8).

2005 yılında Francisco J. Mojica ve ekibi, bu tekrarların mikroorganizmaların adaptif bağışıklık sisteminin bir parçası olarak işlev gördüğünü ve virüsler ile plazmidlere karşı savunma yaptığını keşfetmişlerdir. Bu bilgiler doğrultusunda CRISPR dizilerinin bakteriyel ve arkeal genomlarda önemli bir rol oynadığını ve genetik bilgiyi düzenleyen ve koruyan mekanizmaların anlaşılmasına katkıda bulunmuştur (9).

2012 yılında yapılan çalışmalarda CRISPR-Cas9 sisteminin işleyişini ve genetik mühendislikteki potansiyel uygulamalarını detaylandırmaktadır. Martin Jinek ve ekibi, CRISPR-Cas9 kompleksinin nasıl çalıştığını ve bu sistemin gen düzenleme aracı olarak nasıl kullanılabileceğini anlatmışlardır.

Araştırmacılar, Cas9 proteinini ve iki tip RNA molekülü (crRNA ve tracrRNA) ile bir kompleks oluşturduğunu ve bu kompleks, hedef DNA dizisini tanıyarak çift sarmallı DNA'da spesifik bir noktada kesik oluşturur. Cas9 proteini, bu kesme işlemini gerçekleştirirken, RNA molekülleri hedef DNA dizisini tanımada rehberlik eder.

Bu özellik, Cas9'un DNA'nın istenilen yerinde hassas bir şekilde düzenleme yapmasına imkân sağlar.

Bu çalışmanın sonuçları, CRISPR-Cas9 sisteminin genetik materyali belirli ve programlanabilir bir şekilde düzenleyen bir araç olduğunu göstermiştir. Bu sistem, genetik calışmalarda devrim niteliğinde bir ilerleme kaydederek hastalıkların tedavisinde, tarımda, bitki ve hayvanların genetik olarak iyileştirilmesi gibi daha birçok alanda uygulama potansiyeline sahiptir (10).

2013 yılında Feng Zhang ve George Church bağımsız olarak CRISPR-Cas9 sistemini memeli hücrelerinde gen düzenlemesi yapmak için kullanmayı başardılar. Bu, CRISPR teknolojisinin artık biyomedikal araştırmalarda ve terapötik uygu-

lamalarda yapılabileceğini gösterdi (11). 2020 yılına geldiğimizde Emmanuelle Charpentier ve Jennifer Doudna CRISPR-Cas9 gen düzenleme teknolojisi ile ilgili uzun süren başarılı çalışmaları ile Nobel Kimya Ödülünü kazandılar.

CRISPR-Cas9 Teknolojisi Nedir?

CRISPR "Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats" olarak tanımlanır. Bu terim, bakterilerin ve arkeaların adaptif bağışıklık sistemlerinde var olan ve virüslerin ve diğer yabancı genetik materyallerin yok edilmesinde rol oynayan tekrarlayan DNA dizilerini tanımlar.

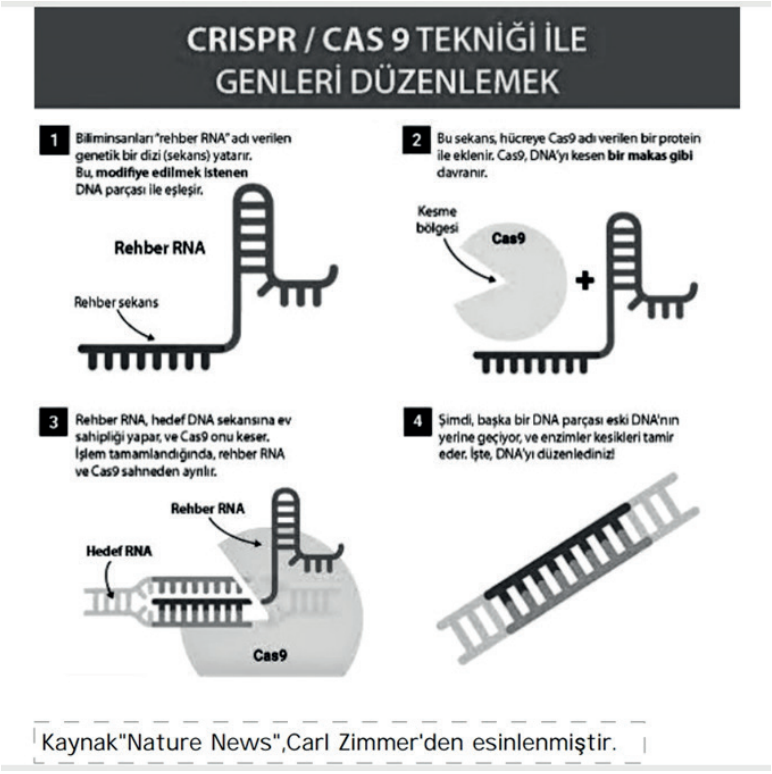
CRISPR/Cas9; bir hedeflenmiş hedef geni eşleştirmek için bir rehber RNA ve bir endonükleaz olan Cas9 olmak üzere iki temel molekülden oluşan bir gen düzenleme teknolojisidir.Bu teknoloji ile bakterilerin viral saldırılara karşı kendilerini savunmak için kullanır. Cas9 enzimi; hedef gende DNA dizilerini tanıma ve kesme işleminde DNA'da çift sarmallı kırıklar oluşturarak genomda değişikliklerin oluşmasını sağlayan bir endonükleazdır.

Rehber RNA;CAS9 enzimini hedeflenen doğru DNA dizilimine yönlendirerek rehberlik eder.

CRISPR/CAS9 sisteminin bakterilerde çalışma mekanizması şu şekilde olur:

Virüs bakteriye saldırarak bakteriye nükleikasitini aktarır. Bakteri virüsün saldırısına karşı Cas enzimleri üretir. Cas enzimleri viral nükleik asit parçalarını keser ve bunları CRISPR bölgelerinde kendi genomuna alır. Cas enzimlerinin sayesinde bakteri bazı yararlı kazanılmış bağışıklık sağlar.Aynı virüs türünün tekrar saldırısında , viral nükleik asitle ile birlikte CRISPR DNA dizilimleri kısa RNA moleküllerine kopyalanır. Kısa RNA molekülleri önce Cas9 enzimine bağlanır daha sonra oluşan CAS9 kompleksini eşleşen bir diziye sahip olan istilacı virüs nükleik asidine yönlendirirler. Cas9 daha sonra hedeflenen viral nükleik asidi keserek DNA 'da çift sarmallı kopmalar (DSB'ler) oluşturur böylece virüsün bakteri içinde çoğalmasını engeller.12 DNA'da oluşan kırılma olayından dolayı DNA kendini onarmaya çalışır. Bu tamir işlemi sırasında iki ana mekanizma devreye girer: homolog olmayan uç birleştirme; NHEJ ve homoloji yönlendirmeli tamir; HDR'dir.

NHEJ, hata yapma olasılığı yüksek bir tamir mekanizmasıdır ve genellikle indel (ekleme veya silme) mutasyonlarına sebep olur.



Şekil 1 CRISPR / Cas9 Tekniğiyle Genleri Düzenlemek

HDR ise doğru bir şekilde tamir yapılmasını sağlar ve bilim adamları tarafından yeni DNA dizileri eklemek için kullanılabilir. Bilim adamları bu onarma mekanizmalarını kullanarak çalışma yaptıkları hücrenin genomunda DNA parçaları ekleme veya çıkarma yaparak değişiklikler yapabilirler.

CRISPR/Cas9, genetik araştırmalardan tıbbi uygulamalara kadar farklı alanlarda büyük potansiyele sahip büyük bir teknoloji devrimidir. CRİSPR teknolojisinin farklı alanlarda kullanımı şu şekilde sıralayabiliriz:

a. **Tarım ve Gıda:** CRISPR, bitkilere zarar veren hastalık yapıcı etkenlere karşı ve iklim değişikliğine dayanıklılığını artırabilir, verimliliği artırabilir ve gıda üretimini olumlu yönde etkiler. Ek olarak, besin değeri yüksek bitkilerin geliştirilmesinde de kullanılmasına olanak sağlar.

b. **Hayvancılık:** CRISPR, hayvanların genetik yapısını düzenleyerek, hastalıklara karşı dirençlerini artırabilir, et verimliliğini yükseltir ve genetik olarak modifiye edilmiş organizmaların üretilmesine olanak sağlar.

c. İlaç teknolojisi ve Biyoteknoloji Uygulamaları: CRISPR, ilaç buluşu ve geliştirme aşamalarında kullanılabilir. Hastalıkların sebep olduğu genetik mutasyonların düzeltilmesi ya da etkisiz hale getirilmesi için hücre

kültürlerinde ve hayvan çeşitlerinde CRISPR kullanımı alanını genişletmektedir.

d. **Enerji ve Çevre Sağlığı:** CRISPR, biyoyakıt üretimini artırmak, biyosensörlerin gelişimini artırmak, kirleticileri ortadan kaldırmak ve biyolojik olarak parçalanabilir materyaller üretmek gibi çeşitli çevresel uygulama alanlarında kullanılabilir.

e. **Genetik Çalışma Teknolojileri:** CRISPR, genetik çalışmalarda kullanılan bir ana araç olmuştur. Genetik temelli hastalıkların teşhisi, gen işlevlerinin keşfedilmesi ve gen düzenlemesinin temellerinin anlaşılması gibi geniş alanlarda kullanılmaktadır.

f. **Tıp ve Sağlık Alanındaki Uygulamalar:** CRISPR çeşitli genetik hastalıkların tedavisi, kanser tedavisi, organ nakli ve nörolojik hastalıkların araştırılması gibi birçok tıbbi uygulama için yüksek potansiyel taşımaktadır.

Hastalıkların Tedavisinde CRISPR

Gen düzenleme teknolojilerinden özellikle CRISPR-Cas sistemi, hastalık tedavisinde uygulama araştırmalarında son yıllarda önemli ilerlemeler kaydetmiştir. CRISPR-Cas sistemi, hastalık tedavisinde geniş uygulama alanlarına sahip büyük bir potansiyele sahiptir. Teknolojinin sürekli ilerlemesi ve güvenlik araştırmalarının derinleşmesiyle birlikte, gelecekte birçok genetik ve edinsel hastalık için yenilikçi ve etkili tedavi yöntemleri geliştirilebilir.

İşte bazı önemli alanlardaki gelişmeler:

1. Tek Genetik Hastalıkların Tedavisi

Tek genetik hastalıklar, tek bir gen mutasyonundan kaynaklanan hastalıklardır, örneğin orak hücreli anemi, beta-talasemi ve kistik fibroz. CRISPR-Cas9 teknolojisi bu hastalıkların araştırmalarında büyük bir potansiyel göstermiştir.

Beta-Talasemi: β-talasemi, hemoglobin beta genindeki, hemoglobin üretimini azaltan ve dolayısıyla anemiyi tetikleyen mutasyonlardan kaynaklanır. Şu anda β-talaseminin tek tedavisi sağlıklı, donörden alınan histo-uyumlu hematopoietik kök hücrelerin naklidir. Hastadan türetilen iPSC'ler, nakledilebilir hematopoietik kök hücrelerin üretilmesi için alternatif bir kaynak olabilir. Hastanın fibroblastlarından iPSC'ler oluşturularak CRISPR/Cas9 bazlı vektörlerle hastalığa neden olan alele transfekte edierek gen mutasyonu onarıldı. Bu, gelecekteki kliniklerde monogenik bozukluklara karşı kök hücre bazlı gen terapisine yönelik kritik bir terapötik yaklaşım olabilir (13).

Orak Hücreli Anemi: Kanla ilgili bir bozukluk olan hastalık orak hücreli (SC) anemidir, β-globin genindeki anormal hemoglobin S (HbS) proteininin artmasıyla sonuçlanan bir mutasyondur.

SC hastasının kanından alınan hematopoietik kök ve progenitör hücrelerdeki (HSPC'ler) Hbs geninin CRISPR-Cas9 bazlı düzeltilmesi ile hemoglobinin akti-

vitesinin düzelmiştir (14). Ayrıca SC anemi hastalarının kemik iliğinden türetilen CD34 + HSPC'lerin CRISPR-Cas9 teknolojisi yoluyla düzeldiği görülmüştür (15).

Kistik Fibroz: Otozomal resesif monogenik bir hastalık olan kistik fibroz (CF), kistik fibrozis transmembran iletkenlik düzenleyici (CFTR) genindeki mutasyonlardan kaynaklanır ve akciğerlere ve sindirim sistemine zarar verir (16).

CRISPR-Cas9 teknolijisi ile CFTR genindeki mutasyonların düzeltilmiştir (17). CRISPR teknolojisi gelecekte KF tedavisinde potansiyel bir tedavi yöntemi olabilir.

2. Kanser Tedavisi

Kanser, onkogenlerde ve tümör baskılayıcı genlerde birden çok genetik ve epigenetik değişikliklerle karakterize edilen bir grup hastalıktır. Kanser hücrelerindeki mutasyona uğramış onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin akıllı terapötik hedefler olarak hareket edeceği; bu da tümör baskılayıcı genlerin modülasyonunun tümör hücrelerinde apoptozu indükleyebileceğini göstermiştir.Yapılan bir çalışmada mesane kanseri hücresi çoğalmasının etkili bir şekilde durdurulduğu, hücre hareketliliğinin azaldığını ve tümör baskılayıcı genlerin CRISPR-Cas9 aracılı regülasyonu yoluyla apoptozun indüklendiğini görülmüştür (18).

CRISPR-Cas9 sistemi aynı zamanda insan Burkitt lenfoma (BL) hücrelerinde ortaya çıkan B hücreli lenfoma 2 (BCL2) gen ailesinin bir üyesi olan miyeloid hücreli lösemi-1 (MCL-1) genini silmek için de kullanıldı (19).

CRISPR-Cas9 sistemi ayrıca meme kanseri,Akut miyoleid lösemi(AML),Akut lenfositik lösemi(ALL), böbrek ,özfagus gibi birçok kanser hastalıklarında kullanımı her geçen gün artmaktadır.

3. Nadir Hastalıkların Tedavisi

Nadir hastalıklarda genellikle etkili tedavi yöntemleri çok azdır ve gen düzenleme teknolojisi ile bu hastalıklara yeni umutlar doğmuştur.

Duchenne Kas Distrofisi (DMD): DMD genindeki distrofin proteininin eksikliğinde küçük mutasyonların neden olduğu proksimal kas zayıflığı ile ortaya çıkar. CRISPR teknolojisi, DMD hastalarının kas hücrelerinde distrofini üretimini geri kazandırmak için kullanılmaktadır. Bilim adamlarını yaptığı çalışmalarda CRISPR-Cas9 teknolojisi ile DMD gen düzeltmesinin etkinliğini önemli ölçüde artırabileceği öne sürüldü (20).

Retinal Hastalıklar: Araştırmacılar, gen mutasyonlarından kaynaklanan retinal dejeneratif hastalıkların (örneğin; Leber konjenital amorozisi) tedadisi için CRISPR teknolojisini kullanmaktadır. İlerleyen çalışmalarda , bu yöntemin bazı hastaların görme yetisini geri kazandırabileceğini göstermektedir.

4. Enfeksiyon Hastalıklarının Tedavisi

CRISPR teknolojisi, viral enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır.

HIV: HIV, insan bağışıklık sistemine saldıran ve edinilmiş bağışıklık yetersizliği sendromuna (AIDS) neden olan bir patojenden kaynaklanan hastalıktır.Yapılan

araştırmalarda HIV hedefli CRISPR/Cas9 ile tasarlanmış olan insan kaynaklı pluripotent kök hücrelerinin, HIV rezervuar hücre tiplerini verimli bir şekilde farklılaştırılabileceğini ve HIV-1 tehdidine karşı direnç sağladıkları görülmüştür (21). Bu sonuçlar, CRISPR/Cas9 sisteminin viral enfeksiyonlara karşı yeni bir tedavi metodu olarak potansiyelini ortaya koyuyor ve HIV'in fonksiyonel olarak tedavi edilmesi için umut verici bir yöntem olarak görülmektedir.

Hepatit B: CRISPR teknolojisi, Hepatit B virüsü (HBV) genomunu düzenleyerek virüs enfeksiyonunu kalıcı olarak yok etme yöntemlerini araştırmaktadır.

Wuhan Üniversitesi'nden bazı bilim insanlarının geliştirdiği CRISPR/Cas9 sistemi ile HBV'yi hedefledier. Böylece CRISPR/Cas9 sisteminin özellikle karaciğer hücrelerini hedeflemesini sağlamak için karaciğere özgü promotörler tasarlayarak diğer dokular üzerindeki istenmeyen etkileri en aza indirdiler. HBV genomunun korunan bölgelerini hedefleyen kılavuz RNA'lar (gRNA'lar) kullanılarak HBV replikasyonunu hem in vitro hem de in vivo modelleri kullanımıyla azaltılmıştır (22).

Ayrıca diğer bir çalışmada Xi'an Jiaotong Üniversitesi'nden Bo Cai ve arkadaşları, HBV tedavisi için çeşitli CRISPR/Cas9 stratejilerini gözden geçirmiş ve bu teknolojinin viral genleri yok etmek ve virüsün kalıcılığı için kritik olan cccDNA'yı inaktive etmek için çalışmalar yapmışlardır (23).

Bu yapılan çalışmalar, CRISPR teknolojisinin HBV için uygulanabilir bir tedavi geliştirme konusunda umut vaat etmiştir. Ancak, bu teknolojinin yaygın kullanım için güvenlik ve etkinliğini sağlamak amacıyla çok fazla araştırma ve klinik denemeler yapılmalıdır.

CRISPR İnsan Germ Hattı Projesi

CRISPR teknolojisini kullanarak 2018 yılında insan germ hücrelerinde yapılan çalışmada Çinli biyofizikçi He Jiankui tarafından genetiği değiştirilmiş. Lulu ve Nana adını verdiği ikiz kız bebeklerin doğduğu duyuruldu.He Jiankui, CRISPR-Cas9 teknolojisini kullanarak bebeklerin CCR5 genini değiştirdiğini iddia etti. Bu genetik değişiklik, bebeklerin HIV enfeksiyonuna karşı dirençli olmalarını amaçlıyordu.

He Jiankui'nin çalışması, etik ve bilimsel açıdan büyük tepki topladı ve etkinliği ve güvenliği konusunda bilim camiasında ciddi endişeler ve tartışmalar ortaya çıktı. Birçok bilim insanı ve etikçi, bu tür genetik müdahalelerin insan embriyolarında çalışılmasını henüz güvenli olmadığını ve ciddi etik sonuçlar doğurabileceğini savundu. Çin hükümeti ve uluslararası bilim topluluğu, He Jiankui'yi eleştirdi ve Çin'deki üniversitesinden kovuldu. 2019 yılında, He Jiankui ve iki meslektaşı, yasa dışı tıbbi uygulamalar nedeniyle Çin'de hapis cezasına çarptırıldı.

Sonuç

Yapılan bu bilimsel çalışma CRISPR teknolojisinin insan genetik mühendisliği için bir dönüm noktası olmuştur ancak teknolojinin henüz güvenli ve etik bir şekilde kullanıma hazır olmadığı görüldü. İnsan embriyolarında genetik düzenlemelerin yapılması, ciddi etik sorunlar doğurmuştur. Bu türde bilimsel çalışmalar uzun

vadeli sonuçları belirsizdir ve genetik değişikliklerin sonraki nesillere aktarılması gibi konular, etik açıdan büyük tartışmalara yol açmaktadır. Bu teknolojinin sadece zengin veya ayrıcalıklı insanların kullanması, eşitsizlik, adalet ve ayrımcılık sorunlarına yol açabilir. Genetik düzenlemeler doğal dengeyi bozabilir ve biyoçeşitliliği olumsuz etkileyebilir.

Sonuç olarak; CRISPR teknolojisi önümüzdeki yıllarda gelişmeye ve yaygınlaşmaya devam edecek. Yeni donanımlara sahip yeni CRISPR sistemleri hala keşfedilmektedir. CRISPR gibi devrim yaratan buluşların potansiyelleri yüksek olduğu için sağladıkları faydaları çok fazladır. Bunlarla beraber ahlak ve etik açısından kaygılandıran bazı önemli riskleri de bulunur. Faydaları ve kaygı veren riskleri konusundaki belirsizlikler devam ediyor. Ana hedef farklı toplulukların ve farklı disipliner çalışmaların katılımları ile tüm dünyadaki uluslararası kuruluşlardan gelen görüşlerle CRISPR teknolojisi tedavisinin mevcut potansiyel risklerini minimum düzeye indirmek ve sağlamış olduğu potansiyel kazançları en üst seviyelere çıkarmaktır.

Kaynaklar

1. Rashnonejad, A., Durmaz, B., & Özkınay, F. (2014). Gen tedavisinin temel ilkeleri ve son gelişmeler. Ege Tıp Dergisi, 53(4), 231-240.
2. Mehier-Humbert, S., & Guy, R. H. (2005). Physical methods for gene transfer: improving the kinetics of gene delivery into cells. Advanced drug delivery reviews, 57(5), 733-753.
3. Özcan, A. G. (2007). Gen tedavisi ve biyogüvenlik. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 64(1), 35-50.
4. Kasımoğlu, Y., Koruyucu, M. ve Seymen, F. (2019). DİŞ HEKİMLİĞİNDE GEN TEDAVİSİ (DERLEME). Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi, 29 (4), 691-700.
5. Griffiths, A.J.F, Miller, J.H, et al., An Introduction to Genetic Analysis, 7th edition, W. H. Freeman and Company, New York, 2000. 28. Matthews, Q.L, Curiel, D.T, Gene Therapy Human Germli
6. Soofiyani, S. R., Baradaran, B., Lotfipour, F., Kazemi, T., & Mohammadnejad, L. (2013). Gene therapy, early promises, subsequent problems, and recent breakthroughs. Advanced pharmaceutical bulletin, 3(2), 249.
7. 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(12), 5429-5433
8. Jansen, R., Embden, JDV, Gaastra, W. ve Schouls, LM (2002). Prokaryotlarda DNA tekrarlarıyla ilişkili genlerin tanımlanması. Moleküler mikrobiyoloji, 43 (6), 1565-1575.
9. Mojica, F. J., Díez-Villaseñor, C., Soria, E., & Juez, G. (2000). Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. Molecular microbiology, 36(1), 244-246.

10. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA–guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. science, 337(6096), 816-821.
11. Konermann, S., Brigham, M. D., Trevino, A. E., Hsu, P. D., Heidenreich, M., Cong, L., ... & Zhang, F. (2013). Optical control of mammalian endogenous transcription and epigenetic states. Nature, 500(7463), 472-476.
12. A controversial new technology is making gene editing far cheaper and easier – too easy, perhaps? Biology | UNDERSTAND. Image courtesy of Nicola Graf. Page
13. Xie, F., Ye, L., Chang, JC, Beyer, AI, Wang, J., Muench, MO ve Kan, YW (2014). CRISPR/Cas9 ve piggyBac kullanılarak hastaya özel iPSC'lerde γ-talasemi mutasyonlarının kusursuz gen düzeltmesi. Genom araştırması, 24 (9), 1526-1533.
14. Wen, J., Tao, W., Hao, S. ve Zu, Y. (2017). CRISPR genom düzenlemesi sonrası orak hücre hastalığı hastasının kanından klonlanan yavru kırmızı kan hücrelerinin hücresel fonksiyonunun yeniden tesisi Hematoloji ve Onkoloji Dergisi, 10 , 1-11.
15. Hoban, MD, Lumaquin, D., Kuo, CY, Romero, Z., Long, J., HO, M., ... ve Kohn, DB (2016). İnsan CD34+ hücrelerindeki orak mutasyonunun CRISPR/Cas9 aracılı düzeltilmesi. Moleküler Terapi, 24 (9), 1561-1569.
16. Skov, M., Hansen, CR ve Pressler, T. (2019). Kistik fibroz – kişiselleştirilmiş ve hassas tıbbın bir örneği. Apmis, 127 (5), 352-360.
17. Marangi, M. ve Pistritto, G. (2018). Kistik fibroz için yenilikçi tedavi stratejileri: CRISPR tekniğine doğru ilerlemek. Farmakolojide sınırlar, 9, 358517.
18. Liu, Y., Zeng, Y., Liu, L., Zhuang, C., Fu, X., Huang, W. ve Cai, Z. (2014). Mesane kanseri hücrelerinin tanımlanması için CRISPR-Cas9'a dayalı VE geçit genetik devrelerinin sentezlenmesi. Doğa iletişimi, 5 (1), 5393.
19. Aubrey, BJ, Kelly, GL, Kueh, AJ, Brennan, MS, O'Connor, L., Milla, L., ... ve Herold, MJ (2015). Uyarılabilir bir lentiviral kılavuz RNA platformu, tümör için gerekli genlerin ve tümörü teşvik eden mutasyonların in vivo olarak tanımlanmasını sağlar. Hücre raporları, 10 (8), 1422-1432.
20. Zhang, Y., Li, H., Min, YL, Sanchez-Ortiz, E., Huang, J., Mireault, AA, ... & Olson, EN (2020). Kendi kendini tamamlayan bir AAV dağıtım sistemi ile farelerde Duchenne kas distrofisinin geliştirilmiş CRISPR-Cas9 düzeltmesi. Bilim ilerlemeleri, 6 (8), eaay6812.
21. Liao, HK, Gu, Y., Diaz, A., Marlett, J., Takahashi, Y., Li, M., ... ve Belmonte, JCI (2015). CRISPR/Cas9 sisteminin insan hücrelerinde HIV-1 enfeksiyonuna karşı hücre içi savunma olarak kullanılması. Doğa iletişimi, 6 (1), 6413.
22. Devlet Anahtar Viroloji Laboratuvarı, Modern Viroloji Araştırma Merkezi, Yaşam Bilimleri Fakültesi, Wuhan Üniversitesi, Wuhan, Çin
23. Cai, Bo ve diğerleri. "Hepatit B virüsü enfeksiyonu tedavisi için CRISPR/Cas9." Bağışıklık, Enflamasyon ve Hastalık 11.5 (2023): e866.

DÜZENLİ ARALIKLARLA KÜMELENMİŞ KISA PALİNDROMİK TEKRARLAR VE İLGİLİ PROTEİN (CRISPR/CAS) SİSTEMİNİN BİBLİYOMETRİK ANALİZİ

HALİT YÜCEL*
KÜBRA EKİNCİ **
BÜLENT KAR***

Giriş

CRISPR (Düzenli aralıklarla kümelenmiş kısa palindromik tekrarlar)

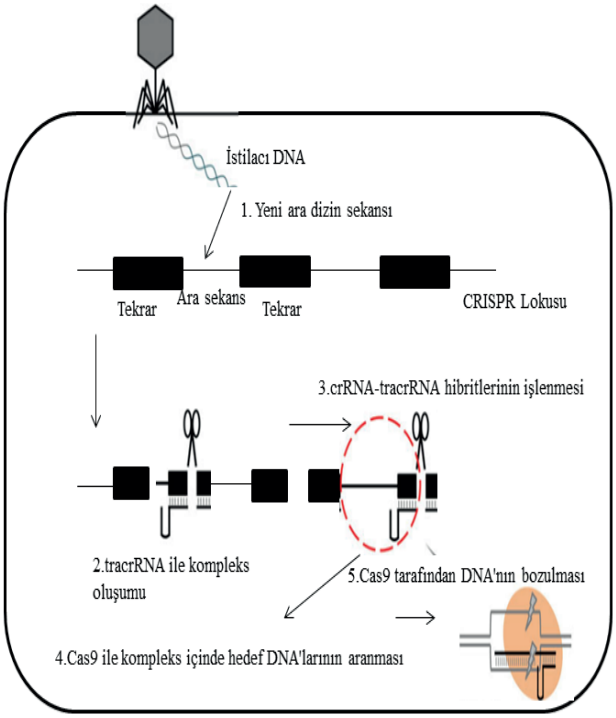
CRISPR (Düzenli aralıklarla kümelenmiş kısa palindromik tekrarlar) sistemi prokaryotların çoğunda patojen özelliğe sahip olan virüs ve plazmidlerekarşı kendini koruma işlemi olarak bilinir (1, 2). Bu sistem hücreye giren genom parçalarını tanıyarak, elde edilen bilgiye göre RNA sentezi gerçekleşir ve patojen karakterli genomuendonükleaz yardımı ile hidrolize eder (3).Bu özelliği sayesinde prokaryotlarda bulunan CRISPR lokusu yabancı DNA (Deoksiribonükleik asit)'ya karşı bağışıklık sitemi gibi gibi işlev görmektedir (4,5). Diğer bir ifade ile bakteri ve arkealar için yabancı olarak kabul edilen DNA dizilerinde bulunan kısa sekans tekrar bölgeleri konakçıya ait olan CRISPR lokusuna"spacer" olarak eklenir. CRISPR/Cas sistemi de DNA'ların tekrar dizilerini trans aktive edici RNA (trancrRNA) ve ara sekans (spacer) bölgelerini ise CRISPR RNA (crRNA) olacak şekilde sentezler. Bu bölgelerin herhangi bir kodlama özelliği bulunmamaktadır (6,7).Oluşan crRNA ile traccrRNA molekülleri Cas proteinleri yardımı ile bir kompleks oluşturur (3) ve bu oluşan yapı patojen DNA veya RNA'lara karşı efektör bir karaktere dönüşmüştür (6).cRNA ile tracrRNA bileşeni proto-arayıcı bitişik motif [proto spacer adjacent motifs (PAM)] bölgelerinde DNA'nın kesilmesi için Cas proteinini yönlendiren tek rehberli RNA (sgRNA) oluşturur (8) (Şekil.1).

Prokaryotların sahip olduğu bu doğal bağışıklık CRISPR/Cas sistemi olduğu kabul edildikten sonra (9) Jinek ve ark *Streptecoccus sp.*üzerinde bu sistemi kullanarak

* halit_ksu@hotmail.com
** kubraekinci@atauni.edu.tr
*** bkar@munzur.edu.tr

genom düzenlemesini başarmışlar (10) ve 2012 yılında sisteminin mekanizması ve genomu üzerine araştırmalar yoğunlaşarak (10,11) CRISPR'ın2 alt birime ayrıldığı netleşmiş ve buna göre Tip I ve II şeklinde ayrılan bu sistemde TipI CPISPR'ı bir takım endonükleazların görev aldığı, Tip II CRISPR sisteminde ise tek bir endonükleaz yönetimi olduğu rapor edilmiştir (12).

Bu rapora göre Tip II'nin en önemli endonükleazı 160 kilodalton ağırlığındaki Cas (CRISPR ile ilişkili protein) proteini olup (11), bu protein ile birlikte CRISP/Cassistemi hedef gen bölgesine bağlanarak parçalama ve birleştirme gibi işlemleri RNA kılavuzluğunda yapan eşsiz bir yapıyı oluşturmuştur. Endonükleazı tek kılavuz RNA (sgRNA) ile hedef lokusa göndermesi genomik hedeflemede yeni yöntemlerin gelişmesine yardımcı olmuş (13) ve insan hücrelerinde dahi Cas9 temelli genom düzenlemeleri gerçekleşmesi (14) bu sitemin değerini ön plana çıkarmıştır. CRISPR/Cas sisteminin insanlar (15) ve hayvanlarda uygulanabilirliği (16) tespit edildikten sonra mısır (17), soya (18) ve domates (19) gibi canlılar üzerinde de çalışmalar artmaya başlamıştır. Önemi her geçen gün artan bu sistemin değerini vurgulamak için bu çalışmada SCOPUS veri tabanı kullanılarak bibliyometrik bir analiz yapılmıştır.



Şekil 1. CRISPR/Cas Sisteminin Bakterilerdeki Doğal Çalışma Prensibi. Yabancı Bir Virüs Veya Plazmite Ait Olan Nükleotitler CRISPR Lokus Bölgesine Entegre Edilir. Trans Aktive Edici RNA (tracrRNA) İle Bu Nükleotitler Kompleks Oluşturmaya Başlar. Yeni Ara Sekans Bölgeleri Ardından, crRNA Kopyalanarak tracrRNA İle Hibridize Olur. Daha Sonra, crRNA – tracrRNA Kompleksi, Cas9 Proteini İle Birlikte Hedef DNA Sekansına Dahil Edilir Ve Parçalama İşlemi Gerçekleştirilir (4,5).

Bibliyometrik Analiz

Matematik, istatistik ve filoloji uygulaması olan Bibliyometri, kapsamlı ve çapraz bilim metodu yardımı ile yazarların, dergilerin, ülkelerin ve kurumların akademik çalışmalarını ve bu araştırmaları kendi aralarında değerlendirmek için uygulanana bir analiz çalışmasıdır (20,21,22).

Bu analiz korelasyon ve regresyon gibi yöntemleri temel almaktadır. Bibliyometrik analiz farklı veri tabanlarını kullanarak akademik literatürü nicel olarak sentezleyen ve konu hakkında kapsamlı bir rapor oluşmasını sağlayan bir sistemdir (23).

Bibliyometrik Harita

Ağ verilerine bağlı olarak oluşturmak istenen haritalamada genellikle VOSviewer adı verilen yazılım kullanılır. Bu yazılım sonucu oluşturulan bağlantılar çizgiler ile ifade edilmektedir. Çizgilerin kalınlığı veriler arası bağlantı ile orantılıdır (24).Veri tabanındaki oluşumun eş olması ile oluşan matris sistemin temelini oluşturur (25). Birbiri ile yakında ilgili olan verileri üç boyutlu olarak sonuç gösterir (26).

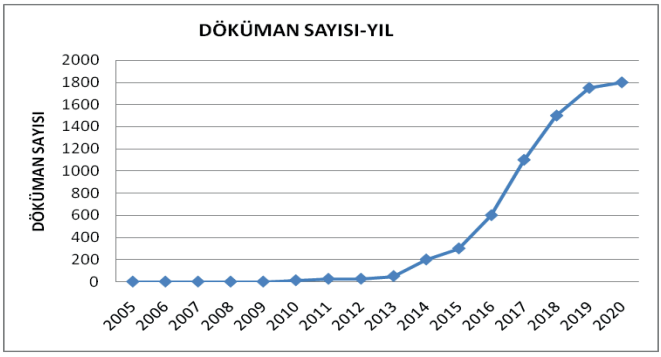
Materyal-Metot

Bibliyometrik analiz yapılırken Scopus veri tabanı kullanılmıştır.Araştırma yapılırkenkullanılan anahtar kelimelerise (TITLE-ABS-KEY (crispr) AND TITLE-ABS-KEY (crispr/cas) AND TITLE-ABS-KEY (crispr/cas9) AND TITLE-ABS-KEY (cas9)) şeklinde girilmiştir. Ocak 2021 ile Temmuz 2021 tarihleri arasında düzenli olarak yapılan analiz sonucunda 8000'den fazla sayıda çalışma bulunmuştur. Bu çalışmalar arasında araştırma makaleleri, dergiler ve derleme gibi alanlarda çalışma yapıldığı aynı zamanda 2010 ile 2021 yılları arasındaki artışın gözlemlendiği görülmüştür. Analiz sonucunda çalışma sahaları ve ülkelerin katkısı da gözlemlenmiştir.

Elde edilen bütün veriler SCOPUS veri tabanına uygun olan Vosviewer yazılımı sayesinde ülkelerin katkısı, anahtar kelimeler ve bununla ilgili çalışma noktalarının bağlantısı yapılmıştır.

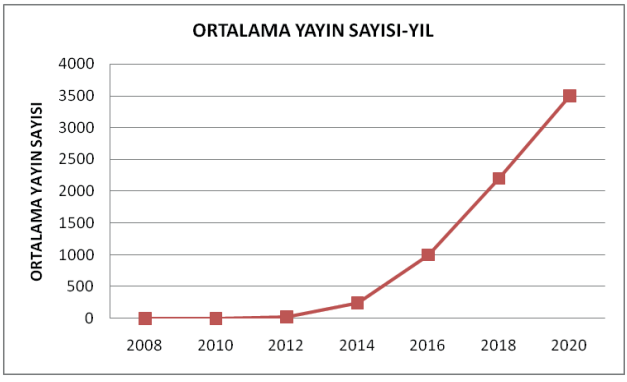
Sonuç ve Tartışma

Scopus veri tabanı yardımı ile yapılan analiz sonuçlarına göre CRISPR/Cas sisteminin yıllara göre dağılımına bakıldığı zaman 2010 yılında çalışmaların başladığı ve 2014 yılından sonra ortalama olarak her yıl en az300 ile 500 arasında çalışma eklendiği gözlemlenmiştir (Şekil 2).



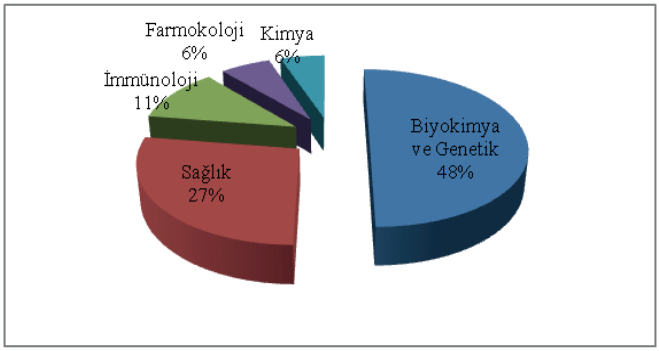
Şekil.1.Yıllara göre verilen şekilte 2015 ile 2020 yılları arasında CRISPR/Cas sistemi ile ilgili yapılan araştırmalarda artış olduğu görülmektedir (https://www.scopus.com/term/analyzer).

Crispr-Cas9 sistemi ile ilgili olarak insanlar üzerinde yapılan çalışmaların yıllara göre dağılımı şekil 2'de verilmiştir. Özellikle 2020 yılında Scopus veri tabanına kayıtlı 3500'ün üzerinde çalışma olduğu görülmektedir. Bu dönemde Beck ve ark. (27) yaptığı somatik mutasyon hastalıkları teşhisinde, Gurney ve ark.(28) antijen reseptörlerinde Cas9 sisteminden faydalanılması gibi çalışmalara katkı sağlamıştır. Buna benzer yayınların fazla olduğu görülmekte olup bu sistem sayesinde hastalık teşhisi ve tedavisinde kalıcı bir yöntem olacağı düşünülmektedir. 2021 yılının Ocak-Ağustos ayları arasında yaklaşık olarak 1900'e yakın araştırma makalesi ile Crispr sisteminin önemi ön plana çıkmaya devam etmektedir.



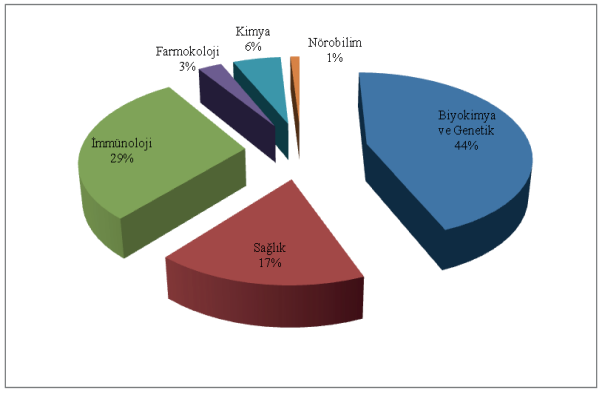
Şekil2.Scopus veri tabanına kayıtlı olan İNSAN-CRISPR sistemi ile ilgili yapılan çalışmaların yıllara göre dağılımı verilmiştir. 2010 yılında sonra giderek artan yayın sayıları özellikle 2020 yılında yaklaşık 3500'e ulaşmıştır (https://www.scopus.com/term/analyzer).

Crispr-Cas9 sistemi gen terapisi, hastalık teşhisi, ilaç sanayi ve immunolojik sistem gibi farklı alanlarda insanları sağlığı üzerinde olumlu katkı sağlamaya devam etmektedir. Bu alanlar ile ilgili olarak şekil3'de verilen yüzdelere bakıldığı zaman genetik ve biyokimya alanında yayınlanan çok fazla sayıda araştırma olduğu bunlar arasında gen terapisi gibi yayınlarında olduğu bilinmektedir.



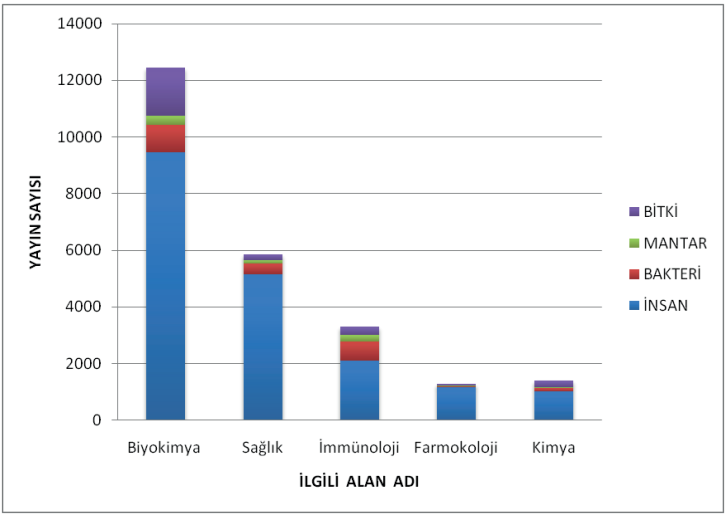
Şekil 3.Scopus veri tabanına kayıtlı olan İNSAN-CRISPR sistemi ile ilgili yapılan araştırmalarda en fazla %48'lik oranla biyokimya ve genetik(9465 yayın) dalında çalışma yapıldığı, Sağlık (5159 yayın) alanında yapılan çalışmalar %26'lık katkı ile ikinci sırada yer aldığı görülmektedir (https://www.scopus.com/results/results.uri).

Crispr-Cas9 sistemi prokaryot canlıların savunmasında görev alan bir sistem olduğu bilinmektedir. Bu sistemin geliştirilmesi ile bakteriler üzerinde de çalışmalar artmıştır. Okana ve ark. (29) yaptığı çalışmada E.coli bakterisine ait enzim sisteminin Crispr sistemi ile yeniden düzenlenmesi ile Lee ve Lee (30) yaptığı araştırmada mikrobiyal genom düzenlemesinde Crispr sisteminin kullanılması gibi bakteriler alanında da farklı çalışmalar ortaya çıkmıştır. Bu sistem ile bakteriler arasındaki çalışmalar her geçen gün artmaktadır. 2010 ile 2021 yılları arasında yaklaşık olarak 1600'e yakın araştırma bulunmakta ve bununla ilgili olarak yapılan çalışma alanları şekil 4'de verilmiştir.



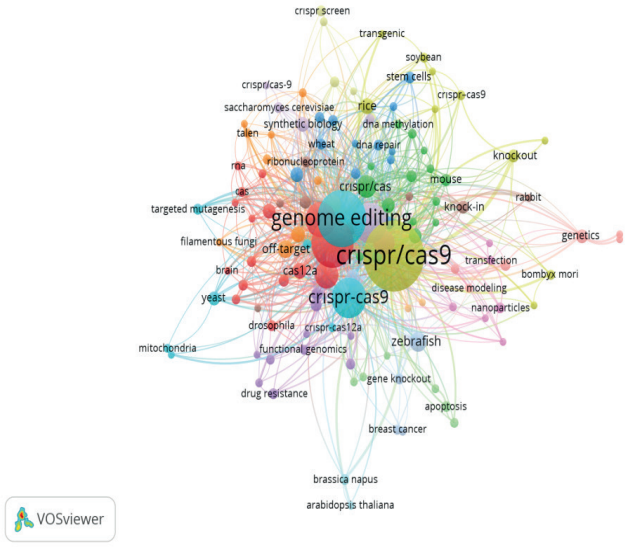
Şekil 4.Scopus veri tabanına kayıtlı olan BAKTERİ-CRISPR sistemi ile ilgili yapılan araştırmalarda en fazla çalışma alanı %44'lük oranla biyokimya ve genetik (Scopus veri tabanında bulunan 1600 araştırıma arasında 970'e yakın yayın ile en fazla katkı sağlanan) alanıdır.

Scopus veri tabanı kullanılarak yapılan bitki, mantar ve virüsler ile ilgili bibliyometrik analizler sonucunda Zhang ve ark. (31) yabani elma üzerinde CRISPR teknoloji yardımı ile gen düzenlenmesi, Florea ve ark (32) yavaş büyüyen aseksüel poliploid mantarlarda gen kümelerinin düzenlenmesi ve 2019 yılından bugüne kadar bütün dünyada etisini gösteren covid19 salgının teşhisinde crispr sisteminin de kullanılmaya başlaması (33), bu sistemin en ilkel yapılı prokaryotlardan en gelişmiş memelilere kadar bütün canlılar için önemli bir yere sahip olduğunu göstermektedir. Bu sistem ile ilgili olarak 2010-2021 yılları arasında İNSAN-MANTAR-BİTKİ gibi ökaryot, BAKTERİ gibi prokaryot mikroorganizmalar ile ilgili ortak alanda çok sayıda araştırma ile katkı sağlanmıştır (Şekil 5).



Şekil 5.Scopus veri tabanına kayıtlı olan 2010-2021 yılları arasındaki İNSAN-MANTAR-BİTKİ-BAKTERİ ile ilgili ortak alanlarda yayınlanan araştırmalar. En fazla çalışma biyokimya (ve genetik) alanında olmuştur.

CRISPR/Cas9 sisteminin önemini vurgulamak için SCOPUS veri tabanına girilen anahtar kelimeler sonucu oluşan analiz raporu, anahtar kelimeler arasındaki bağlantının önemini ve bu kelimeler ile bağlantılı olan çalışmaları vurgulamaktadır. VOSviwer programı yardımı ile yapılan haritalamaya göre bu sistem merkezinde yapılan çalışmalar arası analizi vermektedir. Analiz sonucu ortaya çıkan Şekil 6 verilerine göre CRISPR sistemi ağırlıklı olarak "genome editing" yani genom düzenlemede de kullanıldığı görülmüştür. Aynı analize göre en fazla çalışmanın CRISPR/Cas9 sistemi üzerinde olduğu kapladığı alan sayesinde anlaşılmaktadır.



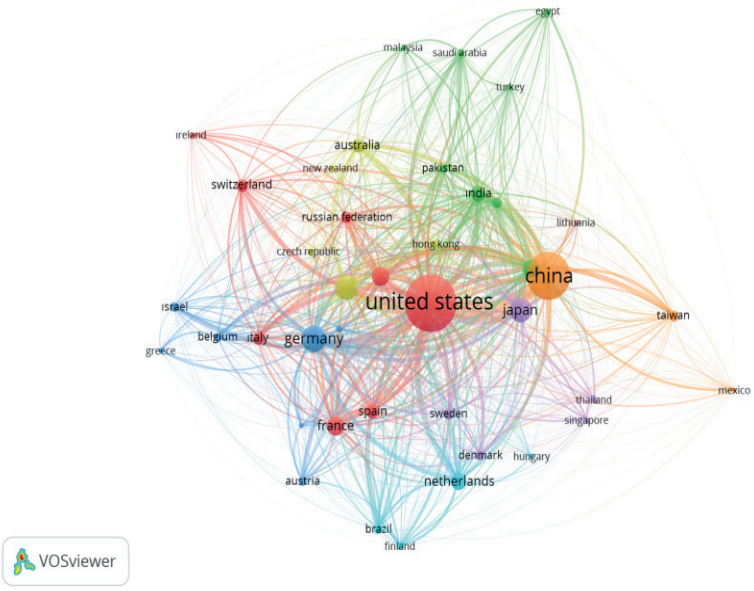
Şekil 6. Vosviewer programı kullanılarak yapılan analiz sonucuna göre SCOPUS veri tabanı üzerinde CRISPR/CAS9 başlığı altında daha fazla çalışma olmuştur. Bu başlık GENOME EDITING konu başlığı ile bağlantılı olup, bu başlık altında eklenen yayınlar ise ikinci sırada yer almaktadır. Konu başlıklarını gösteren dairesel ifadelerin kapladığı alanın genişliği ile bu sisteme eklenen makale başlıkları orantılıdır. Dairesel arası bağlantılarda koyu renk ile ifade edilen çizgiler ortak çalışma bağlantılarının daha fazla olduğunu ifade etmektedir.

Yapılan analize ülkelerin katkısı şeklinde düşünüldüğü zaman Amerika Birleşik Devletlerinin (United States) 3000'den fazla çalışma yaparak en fazla katkı sağladığı görülmüştür. Aynı zamanda 2000'den fazla çalışma ile Çin devleti bu alanda çalışma yaptığı görülmüştür (Tablo 1).

Tablo 1: *Ülkelerin CRISPR/Cas İle İlgili Olarak Yaptığı Çalışma Sayıları*

Ülke	Doküman Sayısı
Amerika Birleşik Devletleri	3621
Çin	2072
Japonya	639
Almanya	619
Birleşik krallık	611
Fransa	313
Güney Kore	303
Kanada	290
Hollanda	265
Avustralya	204
Türkiye	29

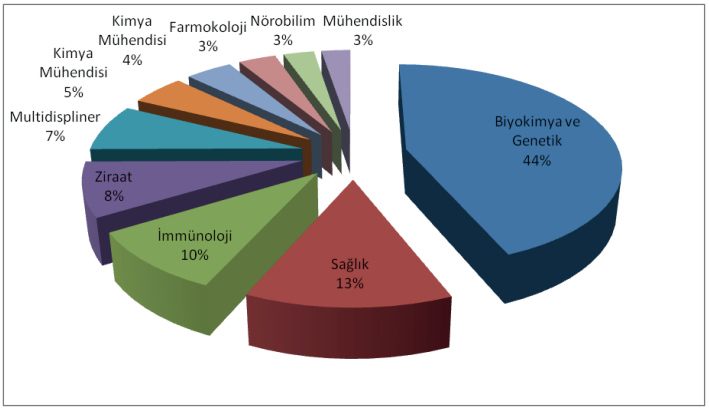
Ülkelerin bu konu üzerindeki etkisini ve birbirleri ile olan bağlantısını göstermek için Vosviewer programı yardımı ile haritalama yapılmıştır (Şekil 7). Amerika Birleşik Devletlerin Mısır, Türkiye, Meksika ve Macaristan gibi ülkelerle beraber ortak çalıştığı ama özellikle Çin, Avustralya ve Japonya gibi ülkeler ile daha fazla ortak yayın yaptıkları aralarındaki korelasyon bağlantıları sayesinde gözlemlenmektedir. Türkiye'nin ise ağırlıklı olarak Mısır, Hindistan, Pakistan gibi ülkeler ile çalıştığı tespit edilmiştir.



Şekil 7. Vosviewer haritalama sonuca göre United States(Amerika Birleşik Devletleri)'in kapladığı alanın fazla olması çok sayıda araştırma yaptığını, çizgiler ise diğer ülkeler arasındaki bağlantısını göstermektedir (https://www.scopus.com/term/analyzer).

CRISPR sisteminin çalışma alanları kapsamında yapılan inceleme sonucu elde edilen verilere göre en fazla çalışma biyokimya ve genetik alanında olduğu tespit edilmiştir. Bu alanda genellikle çalışma prensibi, etki alanları ve alternatif kullanım kaynakları gibi farklı konu başlıklarında çalışmalar yapılmıştır. Nörobilim dalında yapılan çalışmaların bulunması bu sistemin gelecekte daha farklı alanlarda çalışma

sahası açacağına gösterge olabilmektedir. Scopus veri tabanı kullanılarak yapılan analize göre çalışma alanları şekil 8'da gösterilmiştir.



Şekil 8. Scopus veri tabanına kayıtlı analiz sonuçlarına göre en fazla biyokimya ve genetik alanında CRISPR/Cas sistemi üzerinde çalışmalar yapıldığı en az ise farklı mühendislik alanları ve nörobilim dalında çalışmalar yapıldığı tespit edilmiştir (https://www.scopus.com/term/analyzer).

Bibliyometrik analiz çalışmaları günümüzde çalışılan konunun değerini ortaya koymak için en çok tercih edilen yöntemlerden birisi olmaya başlamıştır. Bu analiz biyoinformatik çalışmalarda her geçen gün etkisini ortaya koyarak etkinliğini göstermiştir. Bibliyometrik çalışmalar küresel bir sorun haline gelen Covid-19 üzerinde bile çok sayıda analiz yapılması ile ön plana çıkmıştır. Covid-19 için Chahrour ve ark (34)'nın yaptığı analize göre terapötik ve patojenik özelikleri üzerine yoğunlaşmış, Fan ve ark (35) Vosviewer yazılımı kullanarak İngiltere ve Çin üzerinde Covid-19 ile ilgili yapılan çalışmalarının bibliyometrik bir haritalamasını yapmışlardır. Dehghanbanadaki ve ark (36) ise Covid-19 için yaptığı bibliyometrik analiz sonucunu Vosviewer yazılımı kullanarak ülkelerin birbiri ile olan bağlantılarını, yazar katkı paylarını ve Covid anahtar kelimesi ile bağlantılı çalışma alanları üzerindeki etkisini göstermişledir.

Sadece küresel bir sorun olan patojeniteler için değil farklı alanlarda da bibliyometrik analiz kullanımı gerçekleşmektedir. Yücel ve ark (37) sakız koyunlarında çoklu doğumlara yol açan major genler üzerinde yaptığı analize göre de major genler üzerindeki mutasyonlarının önemini vurgulamışlardır.

Bu çalışmamızda CRISPR/Cas sisteminin önemini vurgulamak için Covid-19 üzerinde yapılan bibliyometrik analizlere benzer bir yol izlenmiştir. Sonuç olarak ülkelerin katkısı, çalışma alanları ve etki mekanizması gibi yapılar analiz edilerek CRISPR sisteminin önemi vurgulandı ve farklı canlılarında sahip olduğu bu siste-

min hızlı bir şeklide değerlendirilmesi ve çoğu genetiksel hastalıkların tedavisinde de kullanılabileceği düşünülmüştür.

Kaynaklar

1. Koonin, E.V., & Makarova, K.S. (2009) CRISPR-Cas: an adaptive immunity system in prokaryotes. F1000 BiologyReports1:95.
2. Koonin, E.V., & Makarova, K.S. (2013). CRISPR-Cas: evolution of an RNA-based adaptive immunity system in prokaryotes. RNA Biol 10(5):679–686
3. Bhaya, D., Davison, M., & Barrangou, R. (2011). CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile smallRNAs for adaptive defense and regulation. Annu Rev Genet 45:273–297
4. Wiedenheft, B., Sternberg, S. H., & Doudna, J. A. (2012). RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. Nature, 482(7385), 331-338.
5. Westra, E. R., Buckling, A., & Fineran, P. C. (2014). CRISPR–Cas systems: beyond adaptive immunity. Nature Reviews Microbiology, 12(5), 317-326.
6. Chen, S., Yu, X., & Guo, D. (2018). CRISPR-cas targeting of host genes as an antiviral strategy. Viruses. 10(1).pii: E40. [Crossref] [PubMed] [PMC]
7. Cao J, Xiao Q, & Yan Q. (2018). The multiplexed CRISPR targeting platforms. Drug Discov Today Technol. 28:53-61. [Crossref] [PubMed] [PMC]
8. Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A., & Ehrlich, S.D. (2005). Clustered regularly inter spaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extra chromosomal origin. Microbiology 151: 2551–2561
9. Horvath, P., & Barrangou, R. (2010). CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. Science. 327(5962):167-70.
10. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A, & Charpentier, E.A. (2012). programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science.
11. Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C.M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z.A., Eckert, M.R., Vogel, J., & Charpentier, E. (2011) CRISPR RNA maturationby trans-encoded small RNA and host factor RNase III. Nature 471(7340):602–607
12. Makarova, K. S.,Wolf, Y. I., Alkhnbashi, O. S., Costa, F., Shah, S. A., Saunders, S. J., Barrangou, R., Brouns, S.J.J., Charpentier, E., Haft, D.H., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F.J.M., Terns, R.M., Terns, M.P., White, M.F., Yakunin, A.F., Garrett, R.A., van der Oost, J., Backofen R., & Koonin, E. V. (2015). An update devolutionary classification of CRISPR–Cas systems. Nature Reviews Microbiology, 13(11), 722-736.
13. Mali, P., Esvelt, K. M., & Church, G. M. (2013). Cas9 as a versatile tool for engineering biology. Nature methods, 10(10), 957-963.
14. Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N.,Hsu, P.D., Wu, W., Jiang, W., Marraffini, L.A., & Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science.

15. Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. Nature Protocols, 8(11), 2281–2308.
16. Hwang, W. Y., Fu, Y. F., Reyon, D., Maeder, M. L., Tsai, S. Q., Sander, J. D., Peterson, R. T., Yeh, J. R. J., & Joung, J. K. (2013). Efficient genome editing in zebra fishusing a CRISPR-Cas system. Nature Biotechnology, 31(3), 227–229.
17. Liang, Z., Zhang, K., Chen, K., & Gao, C. (2014). Targeted mutagenesis in Zea mays using TALENs and the CRISPR/Cas system. Journal of Genetics and Genomics, 41(2), 63-68.
18. Sun, X. J., Hu, Z., Chen, R., Jiang, Q. Y., Song, G. H., Zhang, H., & Xi, Y. J. (2015). Targeted mutagenesis in soybean using the CRISPR-Cas9 system. Scientific Reports, 5, 10342.
19. Pan, C. T., Ye, L., Qin, L., Liu, X., He, Y. J., Wang, J., Chen, L. F., & Lu, G. (2016). CRISPR/Cas9-mediated efficient and heritable targeted mutagenesis in tomato plants in the first and later generations. ScientificReports, 6, 24765.
20. Abramo, G.,D'Angelo, C. A., & Viel, F. (2011). The field standardized average impact of national research systems compared to world average: the case of Italy. Scientometrics, 88(2), 599–615
21. Chiu, W. T., & Ho, Y. S. (2007). Bibliometric analysis of tsunami research. Scientometrics, 73(1), 3–17.
22. Shakiba, M., Zavvari, A., Aleebrahim, N., & Singh, M. J. (2016). Evaluating the academic trend of RFID technology based on SCI and SSCI publications from 2001 to 2014. Scientometrics, 109(1), 591–614.
23. Subramanyam, K., (1983). Bibliometric Studies Of Research Collaboration: A Review. Journal of information Science,
24. vanEck, N. J., & Waltman, L. (2016). VOSviewer 1.6.5. http:// www.vosviewer.com/.
25. vanEck, N. J.,Waltman, L., Dekker, R., & van den Berg, J. (2010). A comparison of two techniques for bibliometric mapping: Multi dimensional scaling and VOS. Journal of the American Society for Information Science and Technology, 61(12), 2405–2416.
26. Borg, I., & Groenen, P. J. F. (2005). Modern multi dimensional scaling (2nd ed.). Springer.
27. Beck, D. B., Ferrada, M. A., Sikora, K. A., Ombrello, A. K., Collins, J. C., Pei, W., ... &Grayson, P. C. (2020). Somatic mutations in UBA1 and severe adult-onset auto inflammatory disease. New England Journal of Medicine, 383(27), 2628-2638.
28. Gurney, M., Stikvoort, A., Nolan, E., Kirkham-McCarthy, L., Khoruzhenko, S., Shivakumar, R., Zweegman, S., van de Donk, N.W.C.J., Mutis, T., Szegezdi, E., Subhashis, Sarkar., & O'Dwyer, M. (2020). CD38 knockout natural killer cell sex pressing an affinity optimized CD38 chimeric antigen receptor success fully target acute myeloid leukemia with reduced effector cell fratricide. Haematologica.

29. Okano, K., Sato, Y., Hizume, T., & Honda, K. (2021). Genome editing by miniature CRISPR/Cas12f1 enzyme in Escherichia coli. Journal of Bioscience and Bioengineering.
30. Lee, H. J., & Lee, S. J. (2021). Advances in Accurate Microbial Genome-Editing CRISPR Technologies
31. Zhang, Y., Zhou, P., Bozorov, T. A., & Zhang, D. (2021). Application of CRISPR/Cas9 technology in wild apple (Malussieverii) for paired sites gene editing. Plantmethods, 17(1), 1-9.
32. Florea, S., Jaromczyk, J., & Schardl, C. L. (2021). Non-Transgenic CRISPR-Mediated Knockout of Entire Ergot Alkaloid Gene Clusters in Slow-Growing Asexual Polyploid Fungi. Toxins, 13(2), 153.
33. Rahimi, H., Salehiabar, M., Barsbay, M., Ghaffarlou, M., Kavetskyy, T., Sharafi, A., Davaran, S., Chauhan, S.C., Danafar, H., Kaboli, S., Nosrati, H., Yallapu, M.M., & Conde, J. (2021). CRISPR systemsfor COVID-19 diagnosis. ACS sensors, 6(4), 1430-1445.
34. Chahrour, M., Assi, S., Bejjani, M., Nasrallah, A. A., Salhab, H., Fares, M., & Khachfe, H. H. (2020). A bibliometric analysis of COVID-19 research activity: a call for increased out put. Cureus, 12(3).
35. Fan, J.,Gao, Y., Zhao, N., Dai, R., Zhang, H., Feng, X., Shi, G., Tian, J., Chen, C., Hambly, B.D., & Bao, S. (2020). Bibliometric analysis on COVID-19: a comparison of researchbetween English and Chinesestudies. Frontiers in PublicHealth, 8, 477.
36. Dehghanbanadaki, H., Seif, F., Vahidi, Y., Razi, F., Hashemi, E., Khoshmirsafa, M., & Aazami, H. (2020). Bibliometric analysis of global scientific research on Coronavirus (COVID-19). Medical journal of the IslamicRepublic of Iran, 34, 51.
37. Yucel, H., Ekinci, K, Karaman, A., (2021). Koyunlarda çoğuzluğa neden olan major genlerin bibliyometrik analizi. ISPEC 7th international conference on agriculture, animal sciences and rural development. Mus/Turkey.

CRISPR ANALİZİNİ DESTEKLEYEN VERİ TABANLARI VE BİYOENFORMATİK ARAÇLARI

FADİME YAZDIÇ*
FERİT CAN YAZDIÇ**

Giriş

Son zamanlarda moleküler biyoloji alanında devrim düzeyindeki yenilikler, yaşamın moleküler alfabesinin çözülmesini sağlamıştır. Bu çözüm gelişimi yönlendiren ve hastalıkları yöneten hücresel süreçleri açıklamak için yeni araçlar ve bilgiler sağlamıştır. Ancak son yıllarda moleküler ve genetik veriler çoğaldıkça, biyologlar benzeri görülmemiş bir veri karmaşıklığı dönemine girmiştir. Bu büyüme, büyük ölçekli biyolojik veri kümelerinden anlamlı ve doğru bilgilerin çıkarılmasında hem fırsatları hem de zorlukları ortaya çıkarmıştır. Bu veri karmaşasının içerisinde biyoloji, istatistik, matematik ve bilgisayar bilimlerinin birleştiği disiplinler arası bir bilim olan biyoenformatiğin doğmasına neden olmuştur (1). Biyoenformatik, gerek araçları gerekse yöntemleri aracılığıyla bilim insanlarının genomik, transkriptomik, proteomik ve epigenomik gibi verileri işleyip yorumlamasına, bu yüksek boyutlu veri kümelerini biyolojik bilgiye dönüştürülmesine ve nihayetinde farklı bilimsel uygulamalarda kullanılmasına olanak tanımıştır (2, 3). Biyoenformatik, yaşam bilimindeki bilimsel buluşları büyük ölçüde hızlandırmaktadır. Dizileme teknolojisinin yardımıyla araştırmacılar, proteom , transkriptom , metabolom ve hatta metabolik yollar gibi çeşitli canlı türlerinin genetik mimarisini ortaya çıkarmışlardır (4, 5). Modern bilimde dizi analizleri, bir organizmanın genomunda var olan DNA, RNA ve protein dizilerini veya tüm genom dizisini elde etmek için en temel yaklaşımdır. Canlıların tüm genomlarının dizilenmesi yapısal

* fadimeyazdic@munzur.edu.tr
** fcanyazdic@munzur.edu.tr

organizasyonlarını ve fonksiyonlarını anlamamız için bize bir başlangıç noktası sağlar. Tüm genom verileri organizmaların sahip olduğu benzersiz özelliklerin ortaya çıkmasını sağlarken, herhangi bir işlevsel gen için gerekli bir öncü görevi görebilen kodlama ve kodlamayan bölgelerin tam verilerinin belirlenmesini kolaylaştırır. Ancak ortaya çıkan diziler genellikle çok büyük miktarda genom bilgisini içeren ekzon, intron, düzenleyici bölgeler ve promotor gibi bölgeleri içerir (5, 6).

Canlılardaki CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats: Düzenli Aralıklarla Bölünmüş Palindromik Tekrar Kümeleri) DNA segmentleri ile ilişkili dizilerin transkripsiyonu kılavuz RNA (cr-RNA) oluşturur. Ribonükleik protein (RNP) kompleksi yapımında görevli olan trans-aktifleştirilmiş RNA (tracrRNA), cr-RNA veya gRNA, Cas9'a bağlanarak kompleksi aktifleştirir. Viral enfeksiyon sırasında cr-RNA, RNP komplekslerinin Cas9 ile birlikte NGG'den oluşan bir protospacer bitişik motifi (PAM) bitişiğinden keserek çift zincir kırıkları oluşturur. Cas9 moleküler bir makas görevi görürken, PAM dizisi Cas9 proteinin nereden keseceğini gösterir (7). Başka bir ifadeyle PAM dizileri yabancı DNA ile konakçı DNA arasındaki ayrımda kritik rol oynar. Crispr sisteminin ayrıntıları ortaya çıkmaya başladıkça, kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve salgınlar gibi daha karmaşık biyolojik süreçlerin oluşturduğu problemleri çözmek için değiştirilmiştir (8, 9). CRISPR/Cas9 sistemi düşük maliyeti, yüksek verimliliği ve özgünlüğü nedeniyle hem temel hem de uygulamalı bilimlerde devrim yaratmış durumdadır. Laboratuvar ortamında kullanılan crRNA veya gRNA yalnızca 20 nükleotid içermektedir. Nükleotid sayı organizmanın genomda değişiklik yapılacak bölgeye veya bölgelere göre farklılık gösterir. Ancak kullanılan Cas9, Cas12 veya diğer Cas nükleazları cr-RNA veya gRNA ile birleştirildiğinde trans-aktive RNA (tracrRNA) dizileri sabit kalmaktadır (10). Aslında daha da basitleştirmek gerekirse CRISPR/Cas9 sisteminin gRNA ve Cas9 nükleazı (yada herhangi bir Cas nükleazı) olmak üzere iki temel bileşe bulunmaktadır (11). Bu bileşenlerden crRNA'nın 20 nükleotidleri değiştirilerek herhangi bir canlı organizmanın genomundaki herhangi bir lokusun da çift zincir kırklar (DSB'ler) üretebilecek şekilde düzenlenebilir. CRISPR/Cas9 yönteminde spesifiklik, gRNA'nın hedef bölgedeki dizilerle tamamlayıcı baz eşleşmesine bağlıdır. Ancak gRNA'nın hedef genomda hatalı bir yere bağlanması hedef genlerde veya genomlarda ekzon veya intron bölgelerinde ölümcül mutasyonlara neden olabilmektedir (12). Bu nedenle son yıllarda da artan bir şekilde gerek gRNA tasarlamak gerekse yeni Crispr bölgelerinin tespiti için birçok biyoinfromatik araç geliştirilmiştir. Ek olarak, Sanger veya yeni nesil dizileme (NGS) analizlerinden elde edilen verilerin değerlendirilmesinde kullanılmak üzere özelleştirilmiş başka bir biyoenfromatik araç sınıfı geliştirilmiştir (13). CRISPR için biyoenformatik alanında çeşitli analizleri gerçekleştirmek için kullanılabilen çeşitli veri tabanı bulunmaktadır. Son yıllarda canlı genomları üzerinde yapılan yeni nesil dizileme (NGS) ve biyoenformatik analizler büyük miktarda veri üretmiş ve üretmeye de devam etmektedir. Yeni nesil DNA dizileme teknolojilerindeki (NGS ve RNA dizilemesi-scRNA) gelişmelerle birlikte biyoenformatik yaklaşımlar için çok büyük veri kümeleri oluşturulmuştur. FASTQC, BWA veya Bowtie gibi biyoenformatik

araçları bu verilerin verimli bir şekilde analiz edilmesine yardımcı olmaktadır. Tüm bu veriler halka açık olacak şekilde çevrimiçi olarak çeşitli veri tabanlarında sunulmaktadır. Her veri tabanı kendine özgü bir odak noktasına sahiptir (14). Örneğin CRISPRdb, arkebakteri ve bakterilerden elde edilen CRISPR dizilerini içerirken, CRISPRCasdb CRISPR dizileri ve Cas proteinlerini bir araya getiren veri tabanlardır (15). Ancak bazı veri tabanları kendine özgün bir noktaya odaklanmak yerine tüm özelliklerin incelenebilmesi için kurulmuş ve tasarlanmıştır. Bunun en önemli ve en tanınmış temsilcisi Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi olarak bilenen (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) kısaca adı NCBI olan veri tabanıdır. NCBI gibi veri tabanları belirli bir cins veya türe odaklanmak yerine araştırmacıların tek bir veri tabanını kullanarak her türden genetik veriye erişimini sağlamaktadırlar. Tüm araştırmacılar ve özelliklede biyologlar için NCBI veri tabanı, moleküler biyoloji, biyokimya ve genetik hakkında bilgi toplamak ve analiz etmek için tam bir hazine gibidir. NCBI veri tabanında (https://www.ncbi.nlm.nih.gov), ilgi duyulan canlı türünün genom bilgileri, gen ifadesi veya dizi verileri arama çubuğuna bilimsel adı girilerek indirilebilir ve ardından istenen tüm genom bilgileri elde edilebilir. Dizi hizalanması biyoenformatik çalışmalarda ve türler arasında evrimsel ilişkileri belirlemede DNA, RNA veya protein dizilerini karşılaştırmasını sağlayan biyoenformatiğin temelini oluşturan bir analizdir. BLAST (Temel Yerel Hizalama Arama Aracı) ve Clustal Omega gibi araçlar dizi verilerinin hizalamasını kolaylaştırarak, hedef bölgelerin korunan veya farklılık içeren bölgelerini homolojiye dayan bir yöntemle tahmin etmemizi sağlar. Dahası elde edilen bu bilgileri araştırmacıların, Temel Yerel Hizalama Arama Aracı (BLAST) (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) gibi farklı linkler kullanılarak çalışma konusunu daha fazla analiz etmelerine olanak tanır. Genomu veri tabanına erişim için kullanılabilecek bir diğer veri tabanı Ensembl'dır (https://www.ensembl.org/index.html). Avrupa Biyoenformatik Enstitüsü tarafından geliştirilen Ensembl genom veri tabanı omurgalıların ve model organizmaların genomlarını incelemek isteyen genetikçiler, moleküler biyologlar ve diğer araştırmacılar için merkezi bir kaynak sağlamaktadır. Bu veri tabanında tıpkı NCBI gibi bir canlı genomu tamamen dizilendiğinde veya yenilendiğinde sürekli güncellenmektedir. Her iki veri tabanı da kullanıcı dostu platformlardır. Ayrıca biyoenformatik proteinlerin yapısını tahmin etmemizi ve modellerini oluşturmamızı kolaylaştırır. AlphaFold ve SWISS-MODEL gibi araçlar araştırmacıların amino asit dizilerinden protein yapılarını tahmin etmelerine, ilaç tasarımına ve yeni biyomolekülerin ortaya çıkarılmasına olanak tanır (16). Cytoscape ve STRING gibi araçlar ise gen ve protein ağlarının analizini kolaylaştırır. Gen düzenleme teknolojilerinin gelişimi özellikle de CRISPR/Cas'ın etkisi, model organizmalardan, biyolojik evrim süreçlerine, tarımdan tıp alanlarındaki teşhis ve tedaviye birçok biyolojik bilim alanında kendini hissettirmiştir (17). CRISPR ile ilişkili dizilerin transkripsiyonu, CRISPR-RNA (cr-RNA) veya kılavuz RNA bilgileri, trans-aktifleştirilmiş RNA (tracrRNA), gRNA, Cas proteinleri ve PAM dizileri gibi ve hatta epigenetik verilerin dahil edilmesine kadar uzanan süreçteki dataların bir şekilde depolanması gereklidir (18). İşte biyoenformatik bu alanda karşımıza çıkarak CRISPR gibi geleceğe yön verecek araçların kullanılasını daha da kolaylaştırmaktadır.

Kitabın daha önce ki bölümlerinde ayrıntılı bir şekilde tanımlanan CRISPR sistemi ve oluşturan yapıların ana görevi, viral enfeksiyonlardaki viral bilgileri CRISPR dizileri adı verilen genetiksel bilgiyi genomik segmentler şekilde bakterin genomumda depolamasıdır. Kitabın bu bölümünde biyoenformatiğin ve CRISPR'ın birlikte moleküler biyolojide nasıl bir devrim yarattığını, biyoenformatik datalardan yeni keşiflere kadar olan süreci anlatmaya çalışacağız. Dizi hizalamadan yapısal biyoenformatik gibi temel yöntemleri tartışırken, genom düzenlemesini kolaylaştıran CRISPR'a özgün araçların tanımlayacağız. Ek olarak makine öğrenimi gibi ortaya çıkan teknolojilerin CRISPR teknolojisinin biyoenformatik yeteneklerini geliştirme potansiyelini inceleyeceğiz.

CRISPR-Cas Teknolojisinin Keşfinde ve Geliştirilmesinde Biyoenformatik

Biyoenformatik birçok moleküler biyoloji alanına etki yaptığı gibi CRISPR-Cas teknolojisinin keşfinde ve geliştirilmesinde önemli bir rol oynamıştır. Başlangıçta, biyoenformatik araçlar bilim insanlarının bakteri genomlarındaki tekrarlayan dizilerin varlığını belirlemesini sağlayarak CRISPR sistemlerinin keşfinin ilk basamağını oluşturmuştur. İlk olarak, 1987'de Yoshizumi Ishino, bakteri genomlarında tanımlayamadığı DNA tekrarlarının varlığına işaret etti (19). Ancak genomik veri tabanlarında bu gizemli tekrarları analiz edecek biyoenformatik veri seti araçlarının bulunmaması nedeniyle ne oldukları anlaşılamadı. Farklı genom verilerinden elde edilen dataların NCBI'da toplanmasıyla birlikte araştırmacılar dizi setlerinin birbiri ile karşılaştırmak için bir yol aramaya başladılar. Bunu sonucu olarak BLAST analizlerinin ortaya çıkmaya başladı. BLAST analizini kullanan Francis Mojica, bakterilerde bulunan ve CRISPR dizileri olarak adlandırılan tekrarların bakterilere ait olmadığını bunların bazı yabancı genlere ait diziler olduğunu keşfetti (20). Daha sonrasında yapılan birçok biyoenformatik analizler bize bu dizilerin bakteriyofajlara ait olduğunu ortaya çıkardı. Araştırmacılar bu bulgulardan yola çıkarak bakteriler tarafından virüslerle savaşmak için geliştirilen edinilmiş bir bağışıklık sistemine sahip olabileceği teorisini öne sürdüler (21). CRISPR-Cas Teknolojisi olarak tanımlanan bu teori ile Jennifer Doudna ve Emmanuelle Charpentier 2020 yılında Nobel ödüllüne sahip olmuşlardır. Bu araştırmacılar, prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde istenen genomik bölgeleri hedeflemek ve genomlarını özel olarak düzenlemek için CRISPR dizisiyle üretilen RNA'yı (gRNA) modüle edilebilecek olduğunu ortaya çıkardılar. Yani hassas bir RNA kılavuz kullanılarak gen düzenlemenin mümkün olduğunu göstererek CRISPR/cas9 sisteminin geliştirilmesine yol açtılar (22). Daha sonrasında biyoenformatik araçlar kullanılarak tıpkı Crispr bölgeleri gibi moleküler bir makas olan Cas nükleazlarının tanımlamak ve bulmak için kullanıldı. Buradan da anlaşılacağı üzerine biyoenformatik, CRISPR/Cas9 teknolojisinin gerek keşfinde gerekse geliştirilmesinde önemli görevler üstlenmiş ve üstlenmeye de devam edecek gibi görünmektedir.

CRISPR-Cas Sistemi ile İlgili Veri Tabanları

CRISPR-Cas sistemlerin araştırılmasını kolaylaştırmak amacıyla çeşitli veri tabanları geliştirilmiştir. Bu veri tabanları sadece CRISPR dizileri ve Cas proteinlerinin verilerinin depolandığı yerler değildirler. Aynı zamanda bu bölgelerin tahmininde ve analizinde kullanılabilen araçlar sunarlar. Bu kapsamda, CRISPRdb ve CRISPRCasdb veri tabanları arkebakteri ve bakteriden elde edilen CRISPR dizileri ve Cas proteinlerine odaklanmaktadır (15). CRISPRone sahte CRISPR dizilerini de tanımlamayı hedefleyen bir veri tabanıyken, Anti-CRISPRdb anti-CRISPR proteinleri (Acr) için tek genel veri tabanıdır (Tablo 1). Bu veri tabanları CRISPR-Cas sistemlerinin çeşitliliğini, işlevselliğini ve potansiyel uygulamalarını keşfetmek için yeterli olmakla birlikte yeni veri tabanları için çalışmalar devam etmektedir.

Tablo 1. CRISPR-Cas Sistemi ile ilgili veri tabanları.

Veri tabanı Adı	Özellikleri	Web Sayfası	Kaynak
CRISPRdb	Mikroorganizmalardan elde edilen CRISPR dizilerini içeren ilk halka açık veri tabanıdır. Taksonomi, genom bilgileri, CRISPR lokus detayları, direkt tekrar ve spacer dizileri içeriken doğrudan BLAST analizi yapılabilir.	https://crispr.i2bc.paris-saclay.fr/	23
CRISPRCasdb	CRISPR dizileri ve Cas proteinlerini bir araya getiren bir veri tabanıdır. CRISPRCasFinder ile bağlantılıdır.	https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/MainDb/Index	23
CRISPRone	Özellikle sahte CRISPR dizilerini tanımlamaya olanak tanıyan bir veri tabanıdır. CRISPR dizilerini tahmin eder (MetaCRT), Cas proteinlerini tanımlar (HMMER), tracrRNA'da anti-tekrar tahmini yapılabilmektedir.	https://omics.informatics.indiana.edu/CRISPRone/	24
Anti-CRISPRdb	Anti-CRISPR proteinleri (Acr) için tek halka açık veri tabanıdır. Acr proteinlerini tanımlama ve analizlerine imkan sunar.	http://guolab.whu.edu.cn/anti-CRISPRdb	25

CRISPR-Cas Sistemlerini Tahmin ve Tanımlama Araçları

Genel olarak CRISPR-Cas sistemlerinin tahmin ve tanımlanmasında Cas gen bölgeleri ve CRISPR dizileri kullanılır. Cas genleri klasik protein homoloji arama araçlarıyla (Pfam/HMMer3) belirlenebilir veya tahmin edilebilirken, CRISPR dizileri daha az korunumlu bir yapıya sahip olduğundan farklı stratejiler gerektirmektedir. Aşağıdaki tablodaki tanımlama araçlarının temel fikri, tekrar uzunlukları,

aralıkları, benzerlik veya sayısal verileri gibi belirli özellikleri karşılayan ve tekrarlayan dizileri tanımlamaktır (Tablo 2). CRISPR-Cas sisteminin belirlenmesinin iki önemli noktası bulunmaktadır. Bunlarda ilki CRISPR dizisinin tanınması ve Cas proteininin tespitidir yani özgünlüktür. İkincisi CRISPR-Cas sisteminin düzenleme verimliliği üzerine etkisinin belirlenmesidir (26). Şu ana kadar bu iki önemli özelliği tanımlayabilmek bilmek için birçok hesaplamalı yaklaşımlara dayalı in-silico yöntem geliştirilmiştir. Aşağıdaki tablo 2'de CRISPR dizileri ve Cas proteinlerinin tanımlanması için kullanılan popüler araçları kısaca açıklanmıştır.

Tablo 2. *CRISPR-Cas sistemlerinin tahmin ve tanımlama araçları*

Araç Adı	Özellikleri	Web Sayfası	Referans
BLAST	Homoloji aramaları ile CRISPR dizilerini tespit edebilen bir araçtır. Ancak CRISPR'a zit özgün özellikleri atlayabilir.	https:// blast. ncbi. nlm. nihgov/ Blast. cgi	27
CasOrientation	CRISPR dizisi ve ilişkili Cas geninin yönlerini tahmin edebilen bir araçtır.	-	28
CRASS	Metagenomik verilerden CRISPR dizilerini tespit edebilir, doğrudan tekrarları ve spacer dizilerini yeniden oluşturabilen bir araçtır. Çok uzun okuma dizilerini işleyebilir.	http:// ctske nnert on. github. com/crass	29
CRISPR-CasFinder	CRISPRFinder, CRISPRleader ve MacSyFinder kullanarak Cas proteinlerini CRISPR ve lider dizilerini belirlemeye yarayan bir araçtır.	https:// crisp rcas. i2bc. paris- saclay. fr	30
CRISPRcasIdentifier	Cas proteinlerini ve alt tiplerini tahmin etmek için regresyon ve sınıflandırma modelleri kullanabilen bir araçtır.	https:// github. com/ Backo fenLab/ CRISP RcasI denti fier	31
CRISPR-classify	Cas geni bilgisi olmadan CRISPR lokuslarını sınıflandıran ve tanımlayan makine öğrenmesi tabanını kullanan bir araçtır.	-	32
CRISPRDetect	CRISPR dizilerini, yönlerini ve spacer-tekrar sınırlarını tespit edebilen bir araçtır.	http:// crispr. otago. ac. nz/ CRISP RDete ct/ predi ct_ crispr_ array. html	33
CRISPR-Direction	CRISPR dizisinin yönünü belirleme aracıdır.	http:// bioanalysis. otago. ac	34
CRISPRdisco	Minced ve BLAST kullanarak CRISPR dizilerini ve Cas proteinlerinin tanımlanmasında.	http:// github. com/ crisp rlab/ CRISP Rdisco	35

CRISPRFinder	GenBank veri tabanını kullanarak, BLAST aramaları ile CRISPR dizilerini tespit eden bir araçtır.	https:// crispr. i2bc. paris- saclay. fr/ Server/	23
CRISPR-identify	CRISPR dizilerini tespit etmek için makine öğrenmesi tabanlı bir araçtır. Gerçek CRISPR dizilerini doğru bir şekilde ayırt edebilme özelliğine sahiptir.	https:// github. com/ Backo fenLab/ CRISP Riden tify	36
CRISPRleader	CRISPR dizilerinin uçlarındaki lider dizileri tespit etemeye yarayan bir araçtır.	http:// www. bioinf. uni- freib urg. de/ Softw are/ CRISP Rlead er/	37
CRISPRloci	CRISPR dizi tahmini, lider dizi tespiti ve Cas geni tanımlaması için ML araçları kullanan bir araçtır.	https:// rna. infor matik. uni- freib urg. de/ CRISP Rloci/	38
CRISPRmap	CRISPRFinder ve CRT kullanarak CRISPR dizileri tespit ederken, HMMER ile Cas proteinlerini tespit eder.	http:// rna. infor matik. uni- freib urg. de/ CRISP Rmap	39
CRISPRminer	CRISPR-Cas sistemlerinin sınıflandırılması, hedef etkileşimlerini ve anti-CRISPR'yi tespit eden bir araçtır.	http:// www. micro biome- bigda ta. com/- CRISP Rminer	40
CRT	Tam k-mer eşleşmeleri arayarak CRISPR dizilerini tespit edebilen bir araçtır.	http:// www. room220.com/crt	41
metaCRISPR	K-mer eşleşmeleri ve okuma kümelenmesini kullanarak CRISPR dizilerini tespit edebilen bir araçtır.	https:// github. com/ hange lwen/ metaC RISPR	42
PILER-CR	Tekrar çiftlerini tespit etmek için lokal genom hizalama algoritmasını kullanarak CRISPR dizilerini oluşturabilen bir araçtır.	http:// www.drive5. com/pilercr	43
Potential-Orientation	Lider dizisindeki AT dizilerini kullanarak CRISPR dizisinin yönünü tahmin edebilen bir araçtır.	-	28

PAM Dizilerini Tanımlanma Araçları

CRISPR-Cas sisteminin uygun şekilde çalıştırıla bilmesi için PAM (Protospacer Adjacent Motif) dizilerinin belirlenmesi önemlidir.Benzersiz bir PAM dizisine sahip hedef bölge CRISPR sisteminde kolaylıkla kesilebilmektedir. Bu nedenle, benzersiz PAM motiflerinin varlığı veya yokluğu, CRISPR-Cas sistemleri için hedef bölge ve hedef dışında olanları ayırt edebilmesini sağlayan sistem olarak kaşımıza çıkmaktadır. Bir CRISPR-Cas sistemini biyoteknolojik uygulamalarda kullanabilmemiz PAM dizileri hakkındaki bilgilerimize bağlıdır. Bu nedenle, özellikle model olmayan organizmalarda CRISPR-Cas sistemini kullanabilmemiz için PAM dizilerinin sistematik bir tahmini bilmemiz önemlidir. Son yıllardaki çalışmalarda farklı Cas proteinleri için spesifik PAM motiflerinin karakterizasyonu amacıyla yüksek verimli PAM belirleme testi (HT-PAMDA) geliştirilmiştir (44). Aslında in silico PAM tahmininin temeli BLASTn yöntemine dayanmaktadır. Bu açıdan son yıllarda belirlenmiş olan CASPERpam algoritması önemli bir gelişme olarak görülmektedir (45) . Bu algoritma ile çalışan ve CRISPR-Cas mekanizmasına sahip prokaryotik genomlardan PAM dizisi tahmini için kullanılan bir biyoenformatik aracın adı da CASPERpam (45)'dır. Bu araç %95 doğrulukta bu dizilerin tahmin edilmesine olanak sağlar. Yine Spacer2PAM aracı, PAM dizilerini tahmin etmek üzere kullanılan bir diğer araç olarak karşımıza çıkar (46). Son yıllarda PAM dizi tahminlerinde metagenomik veri tabanlı bir yaklaşım kullanılmaktadır ve bunun sonucunda 200'den fazla benzersiz PAM dizisinin belirlenmiştir (47).

CRISPR Tasarımı ve Analizi için Biyoenformatik Araçları

CRISPOR ve CRISPR-CasFinder gibi araçlar araştırmacıların hedef dışı etkileri en aza indirmesi için çalışmalarda kullanılacak gen dizilerini hedefleyen kılavuz RNA'lar (gRNA'lar) tasarlamalarını kolaylaştırmaktadır. CRISPResso ve GUIDEScan gibi diğer araçlar ise CRISPR sonuçlarının analizine yardımcı olmaktadır. Yani hedeflenen değişikliklerin doğruluğunu kontrol etmemize katkı sağlamaktadırlar.

Kılavuz RNA Tasarım Araçları

Mümkün olan en iyi kılavuz RNA'yı (gRNA) tasarlamak için CRISPR/Cas genom düzenleme yönteminin iki ana kriteri verimlilik ve spesifikliktir (48). Verimlilik ile bahsedilen bir gRNA'nın belirli diziyi ne kadar iyi hedefleyebildiği ve bir Cas enziminin hedeflenen dizileri düzenlemesine ne kadar iyi rehberlik ettiğinin göstergesi olarak bilinir (7). Spesifiklik ise, CRISPR/Cas düzenleme yollarındaki benzersizlik ve hedef dışı etkileri anlamına gelir. Minimum hedef dışı etkiyle belirli bir lokusu hedefleyen kılavuz RNA tasarlarken, verimlilik ve spesifikliğin birçok faktör tarafından etkilendiği göz ardı edilmemelidir. Bu faktörler arasında hedef dizi, yapısal ve epigenetik özellikler sayılabilir (48). Çok sayıda CRISPR/Cas çalışmalarındaki veriler kullanılarak gRNA'lar için web tabanlı veri tabanları oluşturulmuştur (49, 50). Yapılan analizlere göre, bu veri tabanları yalnızca gRNA seçimi için pratik kaynaklar sağlamakla kalmaz, aynı zamanda gRNA etkinliğini ve

özgüllüğünü etkileyen temel faktörleri de ortaya koyarak gRNA tasarımının daha da geliştirmeyi kolaylaştırır. gRNA tasarımı için çok sayıda araç bulunmakla birlikte en popüler olanları E-CRISP, CHOPCHOP, CRISPR-ERA, CRISPOR ve GuideScan olarak sayılabilir (51-55). Bunlardan başka bir çok gRNA tasarım aracı bulunmaktadır. Tüm kılavuz RNA tasarım araçları doğrudan araştırmacılar tarafından kullanılması amaçlanmıştır. Bu nedenle hepsine gelişmiş web ara yüzlerine sahiptir. İlgi duyulan genom ve gen verilerine kolaylıkla her yerden erişilmesini sağlarlar. Araçların birçoğunda büyük ölçekli analizlerde örneğin genom çapında gRNA kütüphanelerinin tasarımı kolay ve kullanışlıdır. Bunlar tablo 3'de ayrıntılı olarak verilmiştir. Hepsi aynı temel prensip ve benzer algoritmaları kullanırlar. İlk adım hedef gene uygun uygulamanın (örneğin nakavt, baskılama veya aktivasyon) belirlenmesidir. Aday hedef bölgeler daha sonra yüksek hedef içi verimlilik ve düşük hedef dışı aktivite olmak üzere iki amaç açısından değerlendirilir. İkincisi ise puanlama esasına dayanan uyumsuzluk pozisyonlarıdır. Buradaki tahmin gücü veya güvenilirlik düzeyi yaklaşık %98 seviyelerindedir. Hedef verimliliğine ilişkin puanlar daha az ayırt edicidir (54). Ancak bu puanlar yalnızca deneysel olarak belirlenmiş hedef dışı kurallara dayanmaktadır. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, hedef dışı tahmin algoritmalarını daha iyi bir hale getirmek için mekanik kökenlerinin ortaya çıkartılması gerektiğini bildirmiştir (56). Bu çalışmada hibridizasyon kinetiğinin altında yatan etkinin biyofiziksel bir etki olduğu sonucuna varılmıştır. Kısaca bu modelde efektör kompleksinin metastabil durumlarının (yani PAM bağlanması ve R-döngüsü oluşumunun ilerlemeleri) parametreleri serbest enerjiye bağlanmıştır (57). Bu yüzden bu değerlere de dikkat edilmesi gerektiği vurgulanmıştır.

Tablo 3. Yaygın olarak kullanılan gRNA tasarım araçları.

Araç Adı	Öne Çıkan Özellikleri	Web sitesi	Kaynak
AsCRISPR	Aleller ve spesifik genetik elementler için sgRNA'ları tasarlama aracı.	https://www.genemed.tech/ascrispr/ascrispr/	58
CCTop	Hedef dışı etkilerin olasılıklarını hesaplar, uyumsuzluk sayısını gösterir, CRISPRater kullanarak sgRNA verimliliğini değerlendiren bir araçtır.	https://cctop.cos.uni-heidelberg.de/	59
CHOP CHOP	Eşleşmelere ve uyumsuzluklara dayalı gRNA tasarlamak için kullanılan bir web tabanlı aracıdır. Çoklu tahmin modelleri; hedeflerin ve genlerin genomik konumunu görselleştirme; primer dizaynı gibi uygulamaları vardır.	https://chopchop.cbu.uib.no/	52
CRISPOR	gRNA'ları tasarlamak ve değerlendirmek, vektör inşası için primerler, uyumsuzluk oranı, hedef dışı verileri genom tarayıcılarına bağlayabilen bir araçtır.	https://crispor.tefor.net/	54
CRISPR RGEN Tools	Cas-OFFinder modeline dayalı olarak birden fazla hedef dışı ve hedef içi etkiyi tahmin eden bir algoritmaya sahiptir. Bağımsız ve indirilebilir bir araçtır.	https://www.rgenome.net/cas-designer/	60
CRISPRDo	Hedef dışı ve hedef içi etkileri aynı anda tahmin etmeye yarayan bir araçtır.	N/A	54
CRISPR-GE	Destekleyici araç takımlarının yanında vektör oluşturma için primer tasarımı, hedefteki amplifikasyon ve PCR dizileme sonuçlarının analiz edilmesi gibi özellikler sağlayan bir araçtır.	https://skl.scau.edu.cn/	61
CRISPRlnc	IncRNA'lar için doğrulanmış sgRNA veri tabanını sağlayan bir araç.	https://www.crisprlnc.org/	62

CRISPR-P	Çeşitli bitki türleri için hedef içi ve hedef dışı tahmin için web tabanlı bir araçtır. Ayrıca gRNA dizi analizi yapılmasına olanak sağlar.	https://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2/	63
CRISPR-PLANT V2	Temel tarımsal ürünleri destekleyen, kromozomlar ve bölgelerin seçimine olanak tanıyan bir araçtır.	https://www.genome.arizona.edu/crispr2/	64
CRISPRPOR	Temel bölgelerdeki eşleşme/eşleşmeme durumuna göre gRNA veri kümesini tasarlamaya yarayan araçtır.	https://crispor.tefor.net/	65
CRISPRscan	Protein kodlayan genler için gRNA'ları tasarlamanın yanında genom tarayıcı özelliğine sahiptir. Tüm genomda hedef dışı etkileri değerlendiren bir araçtır.	https://www.crisprscan.org/	65
CRISPRz	Zebra balığı, insan ve farelerden oluşan büyük veri kümeleri üzerinde daha önceden kullanılmış olan bir gRNA veri kümesi yani doğrulanmış gRNA veri tabanıdır.	https://research.nhgri.nih.gov/CRISPRz/	66
CRISTA	Hedef dışı ve hedef içi etkileri aynı anda tahmin etmek için makine öğrenimi tabanlı bir araçtır. Ayrıca DNA/RNA genomik özellikleri ve RNA termodinamik verilerinin sağlar.	https://crista.tau.ac.il/	67
DeepCRISPR	Hedef dışı etkileri tahmin etmek için epigenetik bilgilerin birleştirilerek analiz edilmesini sağlayan bir araçtır.	https://www.deepcrispr.net/	68
DeepHF	gRNA tasarımı ve verimlilik tahminini yapmaya yarayan bir araçtır.	https://www.DeepHF.com/	69
EuPaGDT	Ökaryotik patojenlerin genomlarıyla uyumlu, hedef içi ve hedef dışı etkileri aynı anda tahmin etmek için makine öğrenimine dayalı bir araçtır.	https://grna.ctegd.uga.edu/	70

FORECasT	Mutasyon sonuçlarını tahmin etmeye yarayan bir araçtır.	https://partslab.sanger.ac.uk/FORECasT/	71
GPP sgRNA Designer	200 yakın transkript kimliği veya gen kimliğinin girilmesine izin veren, hedef dışı aktiviteyi en aza indirirken hedefteki aktiviteyi en üst düzeye çıkarabilen bir uygulama aracıdır.	https://portals.broadinstitute.org/gpp/public/analysis-tools/sgrna-design	72
GuideScan	Sıra ve yapısal özelliklere dayalı olarak hedef dışı etkilerin olasılıklarını hesaplamaya yaran bir araçtır.	https://guidescan.com/	49
inDelphi	Mutasyon sonuçlarını analiz eden bir araçtır.	https://www.crisprindelphi.design/	73
PhytoCRISPRx	Hedef dışı etkileri tahmin etmek için kullanılan web tabanlı bir araçtır.	http://www.phytocrispex.biologie.ens.fr/CRISP-Ex/	52
PnB Designer	Primerler için pegRNA'lar ve baz değişimleri için sgRNA'lar üretilmesine olanak sağlayan bir araçtır.	https://fgcz-shiny.uzh.ch/PnBDesigner/	74
sgRNACas9	Hedef dışı etkileri tahmin etmek için kullanılan bir araçtır.	http://www.biootools.com/software.html	75
SNP-CRISPR	SNP'leri veya Indel varyantlarını hedeflemek için sgRNA'ları tasarlamaya yarayan bir araçtır.	https://www.flyrnai.org/tools/snp_crispr/web/	76
SSC	Hem CRISPR gen nakavtını hem de CRISPRa/CRISPRi'yi destekleyen bir uygulamadır.	https://cistrome.org/SSC/	77
WU-CRISPR	20 ila 30.000 bç arasındaki dizi verilerini sağlayarak, hedef dışı etkileri tahmin eden makine öğrenimi tabanlı bir araçtır. Ayrıca sonuçlar farklı formatlarda indirilebilmektedir.	https://crispr.wustl.edu/	78

gRNA Tasarımı Dikkate Alınması Gereken Özellikler

gRNA tasarımından önce mutlaka Cas9 tarafından kesilmeyi sağlamak için PAM (protospacer bitişik motif, 5′NGG3′) dizi kompozisyonuna bakılmalıdır. PAM'daki tek bir uyumsuzluk hedef dışı etkilere yol açabilmektedir (79). gRNA'nın optimizasyonu için PAM'ın ilk iki pozisyonunda "G"den kaçınılması gerektiği bildirilmiştir. gRNA'nın poli-N motifleri içerisinde AAAA veya CCCC gibi dizilerin bulunması gRNA'nın kesme verimliliği azaltmaktadır. Bu proksimal bölgenin uzunluğu yaklaşık 16 ila 20 nt arasındadır. Bu bölgede "U" nt tercih edilmez. 20 pozisyonda "G veya A" nt, 19. pozisyonda bir pürin (C, G), 18. Pozisyonda "C", 16. Pozisyonda "G" tercih edilmektedir. 17. pozisyonda, nükleotid tercihi hala belirsizliğini korumaktadır bazı çalışmalarda "C" tercih edilirken bazılarında "G" tercih edilmektedir (80, 81). RNA ikincil yapısı, gRNA'nın bölgeye özgün kesilebilmesi için önemlidir. gRNA'nın ikincil yapısını etkileyen en önemli nükleotid poazisyonları 18 ila 20 ve 51 ila 53. pozisyonlarıdır. Bunlar ikincil yapıda değişikliklere yol açar ve gRNA'nın verimliliğini azaltır (82). gRNA'nın termodinamik özellikleri hedeflenen nükleotidlerle moleküler etkileşimi için önemlidir. gRNA'nın termostabilitesi üzerindeki GC nükleotidlerinin yüzdesi aracılığıyla belirlenir. Optimal GC içeriği, daha yüksek veya daha düşük GC içeriğinden daha önemlidir. %65'in üzerindeki GC içeriklerinin gRNA'yı etkisiz hale getirirken, %40'tan az GC içeriklerinin gRNA'yı inaktif hale getirdiği bildirilmiştir (83). İdeal GC oranı %40-60 arasında olmasıdır. gRNA'nın uzunluğu da etkinliği açısından önemli bir faktördür. gRNA'nın uzunluğunun 20 nükleotidden 17 nükleotide düşürülmesiyle hedef dışı etkilerin 500 kat azaldığı bildirilmiştir. Memeli hücrelerde kullanılan kısaltılmış gRNA'ların Cas enzimler ile birleştirilmesi, memeli hücrelerinde hedef dışı etkileri önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir (84).

Crispr/Cas9 Sistemin Hedef Dışı Etkisin Tespit Edilmesi

CRISPR/Cas9 sistemi bakterilere özgün bir sistem olmasından dolayı ökaryotlarda kullanılmasının bazı zorlukları vardır. En önemli zorluklardan birisi Cas9'un hedefleme özgüllüğüdür. Cas9'un özgünlüğü bakteriler genomlarda daha yüksektir. Bunun nedeni ökaryotlara göre daha küçük genoma sahip olmaları gösterilebilir. Bakterilerdeki ve arkelerdeki Cas9 seçilim baskısı olmadan evrimleşmiştir, bu nedenle bakteri ve arkelere kıyasla memeli genomunda hedef dışı etki olasılığı daha yüksektir (85). Hedef dışı etkilerin gerek deney öncesi gerekse deney sonrası kantifikasyonu ve bunlardan kaynaklanan genetik hasarların değerlendirilmesi önemlidir. CRISPR/Cas9'un keşfinden bu yana gen düzenleme çalışmalarında kullanılmak üzere hedef dışı etkileri tespit etmek ve tanımlamak için birçok algoritma tabanlı biyoenformatik araç geliştirilmiştir. Bunların bazıların özellikleri ve linkleri tablo 1 verilmiştir.

Tablo 1. Hedef Dışı Etkileri Deney Öncesi ve Sonrası Tespit Araçları

	Araç Adı	Özellikleri	Linki	Kaynaklar
Deney Öncesi	***DeepCRISPR***	sgRNA hedef ve hedef dışı bölgelerin tahminini derin öğrenme ile tek bir çerçevede birleştiren kapsamlı bir hesaplama platformudur. Ayrıca sgRNA etkinliğini veri odaklı bir şekilde etkileyebilecek dizi ve epigenetik özelliklerin tanımlanmasını tamamen otomatikleştirme özelliğine sahiptir.	http://www.deepcrispr.net/.	68
	MOFF	Kılavuz-içsel uyuşmazlık toleransı, epigenetik faktörlerin dizi özellikleri ve yapı özellikleri gibi diğer faktörleri de dahil ederek hedef dışı etkileri tahmin etmek için çok katmanlı regresyon tabanlı bir modeldir.	https://github.com/MDhewei/MOFF	86
	PEM-Seq	Düzenlenen fare ve insan hücrelerinde genomik translokasyonları ve endojen DSB'leri tespit etmede oldukça hassas olan hedef dışı tespit yöntemi	https://github.com/liumz93/PEM-Q	87
	TAPE-Seq	Birincil düzenleyiciler tarafından oluşturulan hem hedefteki hem de hedef dışındaki olayları tespit etmek için canlıda kullanılan yöntem	https://github.com/PhyzenInc/TAPE-seq_flanking_depth	88

Deney sonrası	***CRISPResso2***	Genom düzenleme deneylerinden dizileme verilerinin kapsamlı analizi, görselleştirilmesi ve karşılaştırılması için bir yazılım aracıdır.	http://crispresso2.pinellolab.org	89
	CasAnalyzer	NGS verilerini kullanarak genom düzenleme sonuçlarını değerlendirmek için çevrimiçi kullanılan bir araçtır.	http://www.rgenome.net/cas-analyzer/.	90
	CRISPR-GA	Gen düzenleme sonuçlarının kolay, ekonomik, hassas (tespit sınırı <%0,1) ve kapsamlı analizini sağlayan bir araçtır.	http://crispr-ga.net.	91
	TIDE/ TIDER	Çift sarmallı kırılmalardan (DSB'ler) sonra ortaya çıkan ekleme ve silmeleri doğru bir şekilde tanımlayıp ölçebilen TIDE uygulamasıyken, nokta mutasyonlar da dahil olmak üzere şablon aracılı düzenleme olayları için uygun olan TIDER'dır.	https://tide.nki.nl veya https://deskgen.com	92
	ICE	gRNA'ların düzenlenebilmesi için olası sonuç önerilerinde bulunarak, regresyon analizi kullanarak veriler tarafından hangisinin desteklendiğini gösterir. Transfeksiyon sonrası CRISPR deneylerini analiz etmek için kullanılabilir.	https://github.com/synthego-open/ice.	93

Sonuç

Sonuç olarak, biyoenformatikteki hızlı gelişmeler birlikte CRISPR-Cas araştırmalarında da bir dönüm noktası ortaya çıkmıştır. Benzersiz ölçeklendirilebilen, doğru, hassas ve etkili genom düzenleme yöntemlerin kullanılmasına olanak tanımıştır. CRISPOR, CRISPR-CasFinder, CRISPResso ve diğerleri gibi biyoenformatik araçlar yalınca CRISPR deneylerinin tasarımını ve analizini geliştirmekle kalmamış, aynı zamanda sonuçların tahmininde ve genom düzenlemenin biyolojik etkilerinin öngörüsünde önemli sonuçlar elde edilmesini sağlamıştır. Bu önemli ilerlemelere rağmen, hala veri kümelerinin sorunsuz bir şekilde analiz edebilen ve yüksek düzeyde genetik çeşitliliğe sahip türlerdeki CRISPR uygulamaları için yeni araçlara duyulan ihtiyaç da dahil olmak üzere bazı zorluklar devam etmektedir. Makine öğrenimi ve yapay zekanın ortaya çıkışı bu zorlukların üstesinden geline bileceğini bize göstermiş olsa da bu teknolojileri henüz deneme aşamasındadır. Ancak şu bir gerçektir CRISPR gibi genom düzenleme sistemlerinin kullanılması

için gerekli olan biyoenformatik araçlar en hızlı bu yeni teknolojilerle gelişecektir. Biyoenformatik gelişmeye devam ettikçe ve CRISPR-Cas teknoloji ile etkileşimi artıkça, organizmaları moleküler düzeyde manipüle etme konusunda yeni yollar bulacağımız aşikârdır.

Kaynaklar

1. Bayat, A. (2002). Science, medicine, and the future: Bioinformatics. *BMJ: British Medical Journal*, *324*(7344), 1018.
2. Manzoni, C., Kia, D. A., Vandrovcova, J., Hardy, J., Wood, N. W., Lewis, P. A., & Ferrari, R. (2018). Genome, transcriptome and proteome: the rise of omics data and their integration in biomedical sciences. *Briefings in bioinformatics*, *19*(2), 286-302.
3. Clark, A. J., & Lillard Jr, J. W. (2024). A Comprehensive Review of Bioinformatics Tools for Genomic Biomarker Discovery Driving Precision Oncology. *Genes*, *15*(8), 1036.
4. Gomez-Casati, D. F., Busi, M. V., Barchiesi, J., Peralta, D. A., Hedin, N., & Bhadauria, V. (2018). Applications of bioinformatics to plant biotechnology. *Current issues in molecular biology*, *27*(1), 89-104.
5. Tan, Y. C., Kumar, A. U., Wong, Y. P., & Ling, A. P. K. (2022). Bioinformatics approaches and applications in plant biotechnology. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, *20*(1), 106.
6. Normand, E. A., & Van den Veyver, I. B. (2019). Next-generation sequencing for gene panels and clinical exomes. *Human Reproductive and Prenatal Genetics*, 553-575.
7. Naeem, M., & Alkhnbashi, O. S. (2023). Current bioinformatics tools to optimize CRISPR/Cas9 experiments to reduce off-target effects. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(7), 6261. https://doi.org/10.3390/ijms24076261
8. Albadri, S., Del Bene, F., & Revenu, C. (2017). Genome editing using CRISPR/Cas9-based knock-in approaches in zebrafish. *Methods*, *121*, 77-85.
9. Rezaei, H., Farahani, N., Hosseingholi, E. Z., Sathyapalan, T., & hossein Sahebkar, A. (2020). Harnessing CRISPR/Cas9 technology in cardiovascular disease. *Trends in cardiovascular medicine*, *30*(2), 93-101.
10. Bhatia, S., & Yadav, S. K. (2023). CRISPR-Cas for genome editing: classification, mechanism, designing and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, *238*, 124054.
11. Jiang, F., & Doudna, J. A. (2017). CRISPR–Cas9 structures and mechanisms. *Annual review of biophysics*, *46*(1), 505-529.
12. Naeem, M., Majeed, S., Hoque, M. Z., & Ahmad, I. (2020). Latest developed strategies to minimize the off-target effects in CRISPR-Cas-mediated genome editing. *Cells*, *9*(7), 1608.
13. Prykhozhij, S. V., Rajan, V., & Berman, J. N. (2016). A guide to computational tools and design strategies for genome editing experiments in zebrafish using CRISPR/Cas9. Zebrafish, 13(1), 70-73.
14. Lee, T. J., Pouliot, Y., Wagner, V., Gupta, P., Stringer-Calvert, D. W., Tenenbaum, J. D., & Karp, P. D. (2006). BioWarehouse: a bioinformatics database warehouse toolkit. *BMC bioinformatics*, *7*, 1-14.

15. Pourcel, C., Touchon, M., Villeriot, N., Vernadet, J. P., Couvin, D., Toffano-Nioche, C., & Vergnaud, G. (2020). CRISPRCasdb a successor of CRISPRdb containing CRISPR arrays and cas genes from complete genome sequences, and tools to download and query lists of repeats and spacers. *Nucleic acids research*, *48*(D1), D535-D544.
16. Varadi, M., Bertoni, D., Magana, P., Paramval, U., Pidruchna, I., Radhakrishnan, M., ... & Velankar, S. (2024). AlphaFold Protein Structure Database in 2024: providing structure coverage for over 214 million protein sequences. *Nucleic acids research*, *52*(D1), D368-D375.
17. Gostimskaya, I. (2022). CRISPR–cas9: A history of its discovery and ethical considerations of its use in genome editing. *Biochemistry (Moscow)*, *87*(8), 777-788.
18. Son, H. (2024). Harnessing CRISPR/Cas Systems for DNA and RNA Detection: Principles, Techniques, and Challenges. *Biosensors*, *14*(10), 460.
19. 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*(12), 5429-5433.
20. Mojica, F. J., Díez-Villaseñor, C., Soria, E., & Juez, G. (2000). Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Molecular microbiology*, *36*(1), 244-246.
21. Mojica, F. J., Díez-Villaseñor, C. S., 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.
22. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA–guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *science*, *337*(6096), 816-821.
23. Grissa, I., Vergnaud, G., & Pourcel, C. (2007). The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC bioinformatics*, *8*, 1-10.
24. Zhang, Q., & Ye, Y. (2017). Not all predicted CRISPR–Cas systems are equal: isolated cas genes and classes of CRISPR like elements. *BMC bioinformatics*, *18*, 1-12.
25. Dong, C., Hao, G. F., Hua, H. L., Liu, S., Labena, A. A., Chai, G., ... & Guo, F. B. (2018). Anti-CRISPRdb: a comprehensive online resource for anti-CRISPR proteins. *Nucleic acids research*, *46*(D1), D393-D398
26. Zhang, S., Li, X., Lin, Q., & Wong, K. C. (2019). Synergizing CRISPR/Cas9 off-target predictions for ensemble insights and practical applications. *Bioinformatics*, *35*(7), 1108-1115.
27. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, *215*(3), 403-410.
28. Milicevic, O., Repac, J., Bozic, B., Djordjevic, M., & Djordjevic, M. (2019). A simple criterion for inferring CRISPR array direction. *Frontiers in microbiology*, *10*, 2054.
29. Skennerton, C. T., Imelfort, M., & Tyson, G. W. (2013). Crass: identification and reconstruction of CRISPR from unassembled metagenomic data. *Nucleic acids research*, *41*(10), e105-e105.

30. Couvin, D., Bernheim, A., Toffano-Nioche, C., Touchon, M., Michalik, J., Néron, B., ... & Pourcel, C. (2018). CRISPRCasFinder, an update of CRISRFinder, includes a portable version, enhanced performance and integrates search for Cas proteins. *Nucleic acids research*, *46*(W1), W246-W251.

31. Padilha, V. A., Alkhnbashi, O. S., Shah, S. A., de Carvalho, A. C., & Backofen, R. (2020). CRISPRcasIdentifier: Machine learning for accurate identification and classification of CRISPR-Cas systems. *GigaScience*, *9*(6), giaa062.

32. Nethery, M. A., Korvink, M., Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Koonin, E. V., & Barrangou, R. (2021). CRISPRclassify: repeat-based classification of CRISPR loci. *The CRISPR journal*, *4*(4), 558-574.

33. Biswas, A., Staals, R. H., Morales, S. E., Fineran, P. C., & Brown, C. M. (2016). CRISPRDetect: a flexible algorithm to define CRISPR arrays. *BMC genomics*, *17*, 1-14.

34. Biswas, A., Fineran, P. C., & Brown, C. M. (2014). Accurate computational prediction of the transcribed strand of CRISPR non-coding RNAs. *Bioinformatics*, *30*(13), 1805-1813.

35. Crawley, A. B., Henriksen, J. R., & Barrangou, R. (2018). CRISPRdisco: an automated pipeline for the discovery and analysis of CRISPR-Cas systems. *The CRISPR Journal*, *1*(2), 171-181.

36. Mitrofanov, A., Alkhnbashi, O. S., Shmakov, S. A., Makarova, K. S., Koonin, E. V., & Backofen, R. (2021). CRISPRidentify: identification of CRISPR arrays using machine learning approach. *Nucleic acids research*, *49*(4), e20-e20.

37. Alkhnbashi, O. S., Shah, S. A., Garrett, R. A., Saunders, S. J., Costa, F., & Backofen, R. (2016). Characterizing leader sequences of CRISPR loci. *Bioinformatics*, *32*(17), i576-i585.

38. Alkhnbashi, O. S., Mitrofanov, A., Bonidia, R., Raden, M., Tran, V. D., Eggenhofer, F., ... & Backofen, R. (2021). CRISPRloci: comprehensive and accurate annotation of CRISPR–Cas systems. *Nucleic Acids Research*, *49*(W1), W125-W130.

39. Lange, S. J., Alkhnbashi, O. S., Rose, D., Will, S., & Backofen, R. (2013). CRISPRmap: an automated classification of repeat conservation in prokaryotic adaptive immune systems. *Nucleic acids research*, *41*(17), 8034-8044.

40. Zhang, F., Zhao, S., Ren, C., Zhu, Y., Zhou, H., Lai, Y., ... & Huang, Z. (2018). CRISPRminer is a knowledge base for exploring CRISPR-Cas systems in microbe and phage interactions. *Communications Biology*, *1*(1), 180.

41. Bland, C., Ramsey, T. L., Sabree, F., Lowe, M., Brown, K., Kyrpides, N. C., & Hugenholtz, P. (2007). CRISPR recognition tool (CRT): a tool for automatic detection of clustered regularly interspaced palindromic repeats. *BMC bioinformatics*, *8*, 1-8.

42. Lei, J., & Sun, Y. (2016). Assemble CRISPRs from metagenomic sequencing data. *Bioinformatics*, *32*(17), i520-i528.

43. Edgar, R. C. (2007). PILER-CR: fast and accurate identification of CRISPR repeats. *BMC bioinformatics*, *8*, 1-6.

44. Walton, R. T., Hsu, J. Y., Joung, J. K., & Kleinstiver, B. P. (2021). Scalable characterization of the PAM requirements of CRISPR–Cas enzymes using HT-PAMDA. *Nature protocols*, *16*(3), 1511-1547.

45. Mendoza, B. J., & Trinh, C. T. (2018). In silico processing of the complete CRISPR-Cas spacer space for identification of PAM sequences. *Biotechnology Journal*, *13*(9), 1700595.

46. Rybnicky, G. A., Fackler, N. A., Karim, A. S., Köpke, M., & Jewett, M. C. (2022). Spacer2PAM: A computational framework to guide experimental determination of functional CRISPR-Cas system PAM sequences. *Nucleic acids research*, *50*(6), 3523-3534.

47. Vink, J. N., Baijens, J. H., & Brouns, S. J. (2021). PAM-repeat associations and spacer selection preferences in single and co-occurring CRISPR-Cas systems. *Genome biology*, *22*, 1-25.

48. Li, C., Chu, W., Gill, R. A., Sang, S., Shi, Y., Hu, X., ... & Zhang, B. (2023). Computational tools and resources for CRISPR/Cas genome editing. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, *21*(1), 108-126.

49. Doench, J. G., Fusi, N., Sullender, M., Hegde, M., Vaimberg, E. W., Donovan, K. F., ... & Root, D. E. (2016). Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nature biotechnology*, *34*(2), 184-191.

50. Labuhn, M., Adams, F. F., Ng, M., Knoess, S., Schambach, A., Charpentier, E. M., ... & Heckl, D. (2018). Refined sgRNA efficacy prediction improves large-and small-scale CRISPR–Cas9 applications. *Nucleic acids research*, *46*(3), 1375-1385.

51. Heigwer, F., Kerr, G., & Boutros, M. (2014). E-CRISP: fast CRISPR target site identification. *Nature methods*, *11*(2), 122-123.

52. Montague, T. G., Cruz, J. M., Gagnon, J. A., Church, G. M., & Valen, E. (2014). CHOPCHOP: a CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing. *Nucleic acids research*, *42*(W1), W401-W407.

53. Liu, H., Wei, Z., Dominguez, A., Li, Y., Wang, X., & Qi, L. S. (2015). CRISPR-ERA: a comprehensive design tool for CRISPR-mediated gene editing, repression and activation. *Bioinformatics*, *31*(22), 3676-3678.

54. Haeussler, M., Schönig, K., Eckert, H., Eschstruth, A., Mianné, J., Renaud, J. B., ... & Concordet, J. P. (2016). Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR. *Genome biology*, *17*, 1-12.

55. Perez, A. R., Pritykin, Y., Vidigal, J. A., Chhangawala, S., Zamparo, L., Leslie, C. S., & Ventura, A. (2017). GuideScan software for improved single and paired CRISPR guide RNA design. *Nature biotechnology*, *35*(4), 347-349.

56. Klein, M., Eslami-Mossallam, B., Arroyo, D. G., & Depken, M. (2018). Hybridization kinetics explains CRISPR-Cas off-targeting rules. *Cell reports*, *22*(6), 1413-1423.

57. Alkhnbashi, O. S., Meier, T., Mitrofanov, A., Backofen, R., & Voss, B. (2020). CRISPR-Cas bioinformatics. *Methods*, *172*, 3-11.

58. Zhao, G., Li, J., & Tang, Y. (2020). AsCRISPR: a web server for allele-specific single guide RNA design in precision medicine. *The CRISPR Journal*, *3*(6), 512-522.

59. Stemmer, M., Thumberger, T., del Sol Keyer, M., Wittbrodt, J., & Mateo, J. L. (2015). CCTop: an intuitive, flexible and reliable CRISPR/Cas9 target prediction tool. *PloS one*, *10*(4), e0124633.

60. Park, J., Bae, S., & Kim, J. S. (2015). Cas-Designer: a web-based tool for choice of CRISPR-Cas9 target sites. *Bioinformatics*, *31*(24), 4014-4016.

61. Xie, X., Ma, X., Zhu, Q., Zeng, D., Li, G., & Liu, Y. G. (2017). CRISPR-GE: a convenient software toolkit for CRISPR-based genome editing. *Molecular plant*, *10*(9), 1246-1249.

62. Chen, W., Zhang, G., Li, J., Zhang, X., Huang, S., Xiang, S., ... & Liu, C. (2019). CRISPRlnc: a manually curated database of validated sgRNAs for lncRNAs. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), D63-D68.

63. Lei, Y., Lu, L., Liu, H. Y., Li, S., Xing, F., & Chen, L. L. (2014). CRISPR-P: a web tool for synthetic single-guide RNA design of CRISPR-system in plants. *Molecular plant*, *7*(9), 1494-1496.

64. Minkenberg, B., Zhang, J., Xie, K., & Yang, Y. (2019). CRISPR-PLANT v2: An online resource for highly specific guide RNA spacers based on improved off-target analysis. *Plant Biotechnology Journal*, *17*(1), 5.

65. Moreno-Mateos, M. A., Vejnar, C. E., Beaudoin, J. D., Fernandez, J. P., Mis, E. K., Khokha, M. K., & Giraldez, A. J. (2015). CRISPRscan: designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting in vivo. *Nature methods*, *12*(10), 982-988.

66. Varshney, G. K., Zhang, S., Pei, W., Adomako-Ankomah, A., Fohtung, J., Schaffer, K., ... & Burgess, S. M. (2016). CRISPRz: a database of zebrafish validated sgRNAs. *Nucleic acids research*, *44*(D1), D822-D826.

67. Abadi, S., Yan, W. X., Amar, D., & Mayrose, I. (2017). A machine learning approach for predicting CRISPR-Cas9 cleavage efficiencies and patterns underlying its mechanism of action. *PLoS computational biology*, *13*(10), e1005807.

68. Chuai, G., Ma, H., Yan, J., Chen, M., Hong, N., Xue, D., ... & Liu, Q. (2018). DeepCRISPR: optimized CRISPR guide RNA design by deep learning. *Genome biology*, *19*, 1-18.

69. Wang, D., Zhang, C., Wang, B., Li, B., Wang, Q., Liu, D., ... & Wang, Y. (2019). Optimized CRISPR guide RNA design for two high-fidelity Cas9 variants by deep learning. *Nature communications*, *10*(1), 4284.

70. Peng, D., & Tarleton, R. (2015). EuPaGDT: a web tool tailored to design CRISPR guide RNAs for eukaryotic pathogens. *Microbial genomics*, *1*(4), e000033.

71. Allen, F., Crepaldi, L., Alsinet, C., Strong, A. J., Kleshchevnikov, V., De Angeli, P., ... & Parts, L. (2019). Predicting the mutations generated by repair of Cas9-induced double-strand breaks. *Nature biotechnology*, *37*(1), 64-72.

72. Fusi, N., Smith, I., Doench, J., & Listgarten, J. (2015). In silico predictive modeling of CRISPR/Cas9 guide efficiency. *BioRxiv*, 021568.

73. Shen, M. W., Arbab, M., Hsu, J. Y., Worstell, D., Culbertson, S. J., Krabbe, O., ... & Sherwood, R. I. (2018). Predictable and precise template-free CRISPR editing of pathogenic variants. *Nature*, *563*(7733), 646-651.

74. Siegner, S. M., Karasu, M. E., Schröder, M. S., Kontarakis, Z., & Corn, J. E. (2021). PnB Designer: a web application to design prime and base editor guide RNAs for animals and plants. *BMC bioinformatics*, *22*, 1-12.

75. Doench, J. G., Hartenian, E., Graham, D. B., Tothova, Z., Hegde, M., Smith, I., ... & Root, D. E. (2014). Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9–mediated gene inactivation. *Nature biotechnology*, *32*(12), 1262-1267.

76. Chen, C. L., Rodiger, J., Chung, V., Viswanatha, R., Mohr, S. E., Hu, Y., & Perrimon, N. (2020). SNP-CRISPR: a web tool for SNP-specific genome editing. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, *10*(2), 489-494.

77. Xu, H., Xiao, T., Chen, C. H., Li, W., Meyer, C. A., Wu, Q., ... & Liu, X. S. (2015). Sequence determinants of improved CRISPR sgRNA design. *Genome research*, *25*(8), 1147-1157.

78. Wong, N., Liu, W., & Wang, X. (2015). WU-CRISPR: characteristics of functional guide RNAs for the CRISPR/Cas9 system. *Genome biology*, *16*, 1-8.

79. Zhang, J. H., Adikaram, P., Pandey, M., Genis, A., & Simonds, W. F. (2016). Optimization of genome editing through CRISPR-Cas9 engineering. *Bioengineered*, *7*(3), 166-174.

80. Listgarten, J., Weinstein, M., Kleinstiver, B. P., Sousa, A. A., Joung, J. K., Crawford, J., ... & Fusi, N. (2018). Prediction of off-target activities for the end-to-end design of CRISPR guide RNAs. *Nature biomedical engineering*, *2*(1), 38-47.

81. Liu, G., Zhang, Y., & Zhang, T. (2020). Computational approaches for effective CRISPR guide RNA design and evaluation. *Computational and structural biotechnology journal*, *18*, 35-44.

82. Josephs, E. A., Kocak, D. D., Fitzgibbon, C. J., McMenemy, J., Gersbach, C. A., & Marszalek, P. E. (2015). Structure and specificity of the RNA-guided endonuclease Cas9 during DNA interrogation, target binding and cleavage. *Nucleic acids research*, *43*(18), 8924-8941.

83. Nazipova, N. N., & Shabalina, S. A. (2020). Understanding off-target effects through hybridization kinetics and thermodynamics. *Cell Biology and Toxicology*, *36*, 11-15.

84. Fu, Y., Reyon, D., & Joung, J. K. (2014). Targeted genome editing in human cells using CRISPR/Cas nucleases and truncated guide RNAs. In *Methods in enzymology* (Vol. 546, pp. 21-45). Academic Press.

85. Pattanayak, V., Lin, S., Guilinger, J. P., Ma, E., Doudna, J. A., & Liu, D. R. (2013). High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nature biotechnology*, *31*(9), 839-843.

86. Fu, R., He, W., Dou, J., Villarreal, O. D., Bedford, E., Wang, H., ... & Xu, H. (2022). Systematic decomposition of sequence determinants governing CRISPR/Cas9 specificity. Nature communications, 13(1), 474.

87. Liu, Y., Yin, J., Gan, T., Liu, M., Xin, C., Zhang, W., & Hu, J. (2022). PEM-seq comprehensively quantifies DNA repair outcomes during gene-editing and DSB repair. *STAR protocols*, *3*(1), 101088.

88. Kwon, J., Kim, M., Bae, S., Jo, A., Kim, Y., & Lee, J. K. (2022). TAPE-seq is a cell-based method for predicting genome-wide off-target effects of prime editor. *Nature Communications*, *13*(1), 7975.

89. Clement, K., Rees, H., Canver, M. C., Gehrke, J. M., Farouni, R., Hsu, J. Y., ... & Pinello, L. (2019). CRISPResso2 provides accurate and rapid genome editing sequence analysis. Nature biotechnology, 37(3), 224-226.

90. Park, J., Lim, K., Kim, J. S., & Bae, S. (2017). Cas-analyzer: an online tool for assessing genome editing results using NGS data. Bioinformatics, 33(2), 286-288.

91. Güell, M., Yang, L., & Church, G. M. (2014). Genome editing assessment using CRISPR Genome Analyzer (CRISPR-GA). Bioinformatics, 30(20), 2968-2970.

92. Brinkman, E. K., & van Steensel, B. (2019). Rapid quantitative evaluation of CRISPR genome editing by TIDE and TIDER. CRISPR Gene Editing: Methods and Protocols, 29-44.

93. Conant, D., Hsiau, T., Rossi, N., Oki, J., Maures, T., Waite, K., ... & Stoner, R. (2022). Inference of CRISPR edits from Sanger trace data. The CRISPR journal, 5(1), 123-130.



TEMEL BİYOLOJİDEN TEKNOLOJİK UYGULAMALARA CANLILARDA CRISPR/CAS SİSTEMİ VE GÜNCEL GELİŞMELERİ

Editörler
Mehmet Sait EKİNCİ
Emin ÖZKÖSE
İsmail AKYOL

BAKTERİYEL BAĞIŞIKLIKTAN GENOM DÜZENLEMEYE CRISPR SİSTEMİNİN BAKTERİLERDEKİ ROLÜ VE BİYOTEKNOLOJİDEKİ POTANSİYELİ / FADİME YAZDIÇ

CRISPR/CAS9 TEKNOLOJİSİNİ FUNGUSLARDAKİ UYGULAMALARI, GELİŞMELERİ VE ZORLUKLARI / FERİT CAN YAZDIÇ

BİTKİLERDE CRISPR/CAS9 SİSTEMİNİN KULLANIMI / NESLİHAN TAŞAR

KANATLILARDA CRISPR CAS9 GENOM DÜZENLEME SİSTEMİNİN GÜCÜNDEN YARARLANILMASI / ALTUĞ KARAMAN

YENİ NESİL GENETİK MODELLEME CRISPR/CAS9 SİSTEMİ YARDIMI İLE KOYUN VE KEÇİLERDE VERİM ARTTIRMA / HALİT YÜCEL, KÜBRA EKİNCİ, ALTUĞ KARAMAN

SIĞIRLARDA CRISPR/CAS9 UYGULAMALARI VE SON GELİŞMELER / FERİT CAN YAZDIÇ, BÜLENT KAR

CRISPR TEKNOLOJİSİ: İNSAN HASTALIKLARININ GENETİK TEMELLERİNE YÖNELİK YENİLİKÇİ YAKLAŞIMLAR VE TEDAVİ STRATEJİLERİ / HAMZA AVCI, HÜLYA KARATON, MUSTAFA KARAKAYA

DÜZENLİ ARALIKLARLA KÜMELENMİŞ KISA PALİNDROMİK TEKRARLAR VE İLGİLİ PROTEİN (CRISPR/CAS) SİSTEMİNİN BİBLİYOMETRİK ANALİZİ / HALİT YÜCEL, KÜBRA EKİNCİ, BÜLENT KAR

CRISPR ANALİZİNİ DESTEKLEYEN VERİ TABANLARI VE BİYOENFORMATİK ARAÇLARI / FADİME YAZDIÇ, FERİT CAN YAZDIÇ

rient

ISBN 978-625-6598-27-0