DERLEME REVIEW

DOI: 10.5336/medsci.2016-54153

# Bağışıklık Yanıtından Genom Tasarımına; CRISPR-Cas9 Sistemi

## From the Immune Response to the Genome Design; CRISPR-Cas9 System: Review

Vildan BOZOK ÇETİNTAŞ,[a]
Mustafa KOTMAKÇI,[b]
Burçin TEZCANLI KAYMAZ[a]

[a]Tıbbi Biyoloji AD,
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi,
[b]Farmasötik Biyoteknoloji AD,
Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi,
İzmir

Geliş Tarihi/*Received:* 29.12.2016
Kabul Tarihi/*Accepted:* 23.03.2017

Yazışma Adresi/*Correspondence:*
Vildan BOZOK ÇETİNTAŞ
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Biyoloji AD, İzmir,
TÜRKİYE/TURKEY
vildanbcetintas@gmail.com

**ÖZET CRISPR** (düzenli aralıklarla bölünmüş kısa palindromik tekrar kümeleri)/**Cas9** (CRISPR-ilişkili nükleaz-9), kılavuz bir RNA (gRNA) eşliğinde özgül bir genomik bölgeye hedeflenen Cas9 nükleaz enziminin kullanıldığı bir genom düzenleme sistemidir. Son yıllarda bu RNA aracılı genom düzenleme teknolojisi "moleküler cerrahi" yöntemi olarak tanımlanmış, farklı alanlardaki birçok yenilikçi uygulamada kullanılmış ve elde edilen sonuçlar moleküler biyoloji için devrim yaratıcı nitelikte olmuştur. CRISPR/Cas sistemi ökaryot genomlarında bulunmamakta, fakat prokaryot organizmaların genomlarında viral istilacılara karşı güçlü bir savunma stratejisi olarak kullanılmaktadır. Doğal CRISPR/Cas sistemleri, yabancı bir DNA'nın parçalanmasından sorumlu olan çeşitli enzimlere ve endonükleaz işlevi için gerekli RNA kılavuzlarına sahiptir, ancak ökaryotlarda genom düzenleme çalışmaları için kullanıldığında, gereken tek CRISPR proteini Cas9 endonükleaz enzimi ya da bunun bir varyantıdır. Genom düzenleme yöntemi olarak CRISPR sisteminin kullanımı aslında Cas9 proteinin kısa bir rehber RNA molekülü ile birlikte DNA'ya bağlanarak çift zincir kırıkları oluşturabilme yeteneğine dayanmaktadır. CRISPR teknolojisi, kanser araştırması da dâhil olmak üzere yaşam bilimleri araştırmalarında karşılaşılan karmaşık moleküler biyoloji problemlerini çözmeye aday gözükmektedir. Bu derlemede, öncelikle bağışıklık sistemi olarak CRISPR/Cas sistemleri ele alınacak ve prokaryot organizmalarda bağışıklık yanıtının oluşum aşamaları tanımlanacaktır. CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak genom düzenlenmesinde DNA zincir kırıklarının tamir mekanizmaları ile kılavuz RNA'lar tanımlanarak, etkin ve hedef dışı etkilerin en aza indirgendiği transfeksiyon yöntemleri tartışılacaktır. Son olarak kanserde CRISPR uygulamaları ile genom düzenleme teknolojisinin terapötik etkinliği değerlendirilecektir.

**Anahtar Kelimeler:** Kazanılmış bağışıklık; genom

**ABSTRACT** The **CRISPR** (clustered regularly interspaced short palindromic repeat) /**Cas9** (CRISPR -associated nuclease-9) system is a versatile tool for genome engineering that uses a guide RNA (gRNA) to target Cas9 to a specific genomic region. In recent years, this RNA-guided genome-editing technology has become a revolutionary tool in molecular biology and has many innovative applications in different fields. CRISPR /Cas system is not found in eukaryotic genomes, whereas a powerful defence strategy against viral invaders in the genomes of prokaryotic organisms. Native CRISPR/Cas systems have a variety of enzymes responsible for degradation of foreign DNA as well as the RNA guides required for endonuclease function, however when used for genome editing in eukaryotes, the only CRISPR protein required is the Cas9 endonuclease or a variant thereof. Using CRISPR system as a tool for altering genomes is due to the ability of Cas9 protein to cause double-stranded breaks in DNA after binding with short guide RNA molecules. CRISPR technology is candidate to solve several complex molecular biology problems faced in life science research including cancer research. In this review, CRISPR-Cas will be handled as an immune system regulator and immune system response steps will be defined in prokaryotic organisms. Repair mechanisms of DNA strand breaks and guide RNAs will be defined in means of using CRISPR-Cas9 system in genome editing and efficient transfection methods minimalized for off target effects will be discussed. Finally, CRISPR applications in cancer and therapeutic efficiency of genome editing technology will be evaluated.

Copyright © 2017 by Türkiye Klinikleri

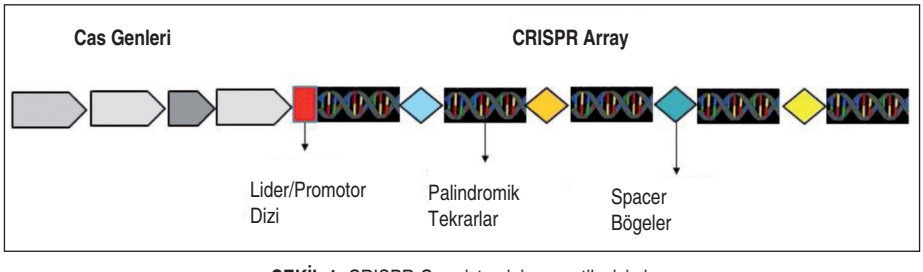
**Keywords:** Adaptive immunity; genome

## BAĞIŞIKLIK SİSTEMİ OLARAK CRISPR-Cas

Patojenler, özellikle virüsler, gelişmiş canlılarda olduğu kadar tek hücreli canlılar için de tehdit oluşturmaktadır. Bu bakımdan tek hücreli canlıların da virüslere karşı genomlarını korumak için bir savunma sistemine sahip olmaları gerekmektedir. Yirmi yıl öncesine kadar, bakterilerin bağışıklık sistemi olarak sadece doğal restriksiyon enzimlerine sahip olduğu biliniyordu. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda, bakterilerin de karşılaştıkları patojenlere karşı kazanılmış bağışıklık sistemi geliştirebildikleri gösterildi. Günümüzde CRISPR-Cas olarak adlandırılan bu sistemin arkelerin %84'ünde ve bakterilerin ise yaklaşık %45'inde bulunduğu bilinmektedir.[1]

Prokaryot canlılarda "**düzenli aralıklarla bölünmüş kısa palindromik tekrar kümeleri**" (CRISPR: clustered regularly interspaced short palindromic repeats) adı verilen belirli DNA bölgeleri kazanılmış bağışıklık sisteminin temelini oluşturmaktadır.[2,3] CRISPR bölgelerinin tekrarlayan palindromik dizileri ilk olarak Ishino ve ark. tarafından *Escherichia coli*'de Apoptoz inhibitör protein (IAP: The inhibitory of apoptosis protein) gen dizisi çalışılırken bulunmuştur.[4] IAP geninin dizi analizi sırasında, aşağı akış bölgesinde 29 nükleotit (nt) tekrar kümeleri ve bu tekrarların arasında 32 nt ara DNA bölgeleri belirlenmiş ancak fonksiyonları anlaşılamamıştır. Sonraki yıllarda yapılan çalışmalar tekrarlayan DNA bölgelerinin çok sayıda bakteri ve arkelerde bulunduğunu, ayrıca bu bölgelerdeki DNA dizilerinin plazmitler, transpozonlar ve bakteriyofajlar gibi ekzojen mobil genetik elementlerle özdeş olduğunu göstermiştir.[5] Biyoinformatik analizler CRISPR bölgelerinin, yakınlarında bulunan **Cas** (CRISPR associated) genleri ile ilişkili olduğunu göstermekle birlikte, birçok Cas geninin nükleaz ve helikaz gen ailelerine benzer diziler içerdiğinin keşfedilmesini sağlamıştır.[3] Bu bulgular CRISPR/Cas sisteminin RNA-aracılı bir savunma sistemi olabileceği hipotezini ortaya çıkartmıştır. Bu hipotez Barrangou ve ark.nın 2007 yılında yapılan çalışmasında doğrulanmış, CRISPR sekanslarının ve ilişkili Cas proteinlerin bakteriyofaj enfeksiyonuna karşı müdahale yönelttiğini kanıtlamıştır.[2] Son 10 yılda RNA-aracılı müdahale olarak CRISPR/Cas mekanizması büyük oranda aydınlatılmıştır.

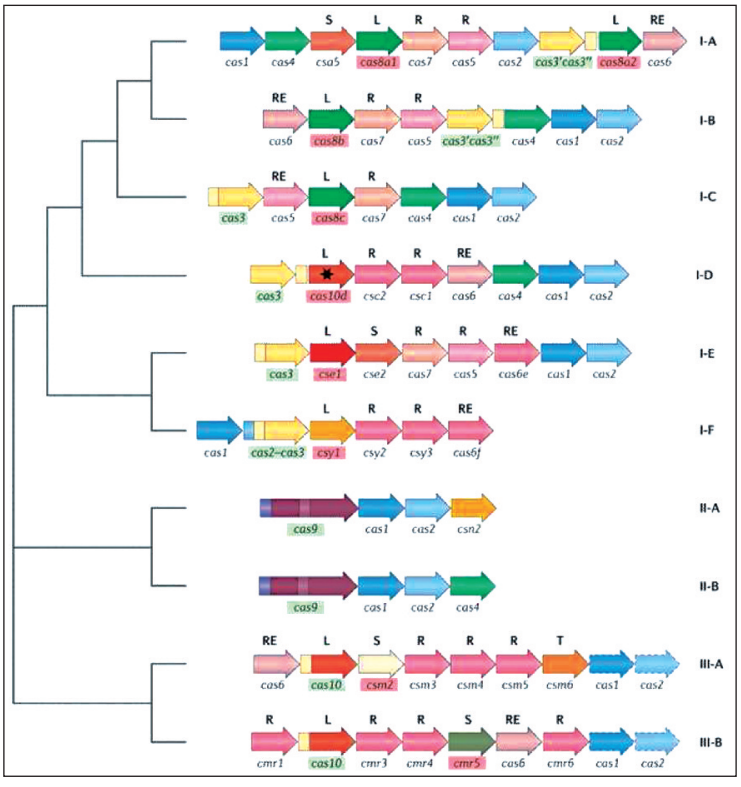
CRISPR bölgelerinin en belirgin özelliği, içerdikleri tekrarlayan kısa DNA dizileridir (Şekil 1). Palindromik olan bu kısa DNA bölgeleri 5'den 3'e ve 3'den 5'e, her iki yönde de aynı okunan dizilerdir. Palindromik DNA dizi tekrarlarının arasında ise aralayıcı (spacer) adı verilen DNA bölgeleri bulunur. Özgün DNA dizilerinden oluşan aralayıcı bölgeler, kazanılmış bağışıklık sisteminin belleğini oluşturan temel öğelerdir. Bu bölgeler genellikle bir virüsün veya plazmitin nükleik asitlerinden prokaryot genomuna alınır. Prokaryot bir organizma aynı virüs ile tekrar karşılaştığında ise aralayıcı diziler tanıma bölgesi olarak çalışır ve istilacı genomu parçalamak üzere harekete geçilmesini sağlar. CRISPR lokusunda bulunan tekrar bölgelerinin dizileri ve uzunlukları büyük oranda korunmuş olmakla birlikte farklı genomlarda bu oranlar değişebilmektedir. Tekrar dizilerinin uzunlukları 21-48 baz çift arasında değişirken, aralayıcı bölgeler 26-72 baz çift aralığındadır.[5] Bir genomda bulunan CRISPR lokusu ise tek veya daha fazla sayıda olabilmektedir. CRISPR lokusun yukarı akış bölgesinde bulunan ve "**lider dizi**" adı verilen korunmuş bölgeler transkripsiyonun yönünün belirlenmesini sağlamaktadır.[3]




**ŞEKİL 1:** CRISPR-Cas sisteminin şematik çizimi.

CRISPR sisteminin diğer önemli bileşeni **Cas** gen bölgeleridir (Şekil 1). Prokaryot bağışıklık sistemi için fonksiyonları çok önemli olan Cas genleri genellikle CRISPR sisteminin yakınında bulunurlar. Cas proteinlerinin helikaz ve nükleaz özelliklerinin bulunması DNA dizilerini açma ve kesmesine imkân sağlamaktadır. Bu sayede Cas proteinleri nükleik asitlerle etkileşim kurarak nükleaz, helikaz veya RNA bağlanma proteini şeklinde aktivite gösterebilirler.[6] Bağışıklık yanıtın her bir aşaması için özgünleşmiş farklı Cas proteinleri bulunmaktadır. CRISPR lokusunun sayısı, görev alan Cas proteinlerinin farklılığı göz önüne alınarak Tip I, Tip II ve Tip III CRISPR-Cas sistemleri tanımlanmıştır (Şekil 2).[6]

**Tip I CRISPR-Cas sistemi:** İlk olarak *Escherichia coli*'de tanımlanan bu sistem Cas3 proteininin fonksiyon görmesi ve kaskad kompleksinin oluşumu ile karakteristiktir.[7] Cas3, helikaz ve DNaz bölgeleri içeren büyük bir proteindir ve istilacı genomun parçalanarak yok edilmesini sağlamaktadır.[8] Multimerik ribonükleoprotein yapıda olan kaskad kompleksi (Cascade; **C**RISPR associated **c**omplex for antiviral defense) Cse1, Cse2, Cas7, Cas5 ve Cas6e proteinlerinin birleşmesi oluşur ve CRISPR dizilerinin işlenerek hedef DNA'ya bağlanmasından sorumludur.[7] Tip I CRISPR sistemi kaskad kompleksinin içerdiği proteinler göz önünde bulundurularak 6 farklı alt tipe ayrılmış ve A'dan F'ye isimlendirilmiştir.[9] Cas8a, cas8b ve cas8c, I-A, I-B ve I-C alt tiplerinde kaskad kompleksine katılan genlerdir.[10] Tip I-E CRISPR-Cas sisteminde, Cas3 proteininin hedef DNA dizisini kesebilmesi için Cse1 proteini ile etkileşmesi gereklidir.[11] *Escherichia coli* K12 suşu 8 farklı Cas geni (cas1, cas2, cas3, cse1, cse2, cas7, cas5, cas6e) içerir.[12] Pre-crRNA'n1n Cas6e proteini ile kesilmesinden sonra 61 nt içeren olgun crRNA oluşur ve kaskad kompleksi tarafından tu-




**ŞEKİL 2:** Tip I, Tip II ve Tip III CRISPR-Cas sistemlerinin alt grupları ve bileşenleri. Ortolog genler renk koduyla gösterilmiştir. CRISPR-Cas tipini belirleyici olan genler yeşil kutucuk içerisinde, bu genlerin alt tipleri ise kırmızı kutucuk içerisinde belirtilmiştir. Genlerin üzerindeki harfler Cas proteinlerinin başlıca kategorilerini göstermektedir. (**L:** antiviral savunma için büyük CRISPR-ilişkili kompleks (kaskad) alt-birimleri (large CRISPR-associated complex for antiviral defence (Cascade) subunits), **S:** küçük kaskad alt-birimleri (small Cascade subunits), **R:** tekrar- ilişkili gizemli protein (RAMP) kaskad alt-birimleri (repeat-associated mysterious protein (RAMP) Cascade subunits), **RE:** crRNA işlenmesinde gerekli RAMP ailesi RNase'ları (RAMP family RNases involved in crRNA processing); **T:** transkripsiyonel düzenleyiciler. Yıldız (*) işareti, HD domaini içeren tahmini inaktif polimerazı göstermektedir.[10,17]

tulur.[7] crRNA, kaskadın çift zincirli DNA moleküllerine baz eşleşmesi yoluyla özgül olarak bağlanmasını yönlendirir.[7] Tip I CRISPR-Cas sisteminin diğer alt gruplarının bileşenleri Şekil 2'de gösterilmiştir.

**Tip II CRISPR-Cas sistemi:** İlk olarak *Streptococcus thermophiles'*de tanımlanmış ve kazanılmış bağışıklık sistemindeki rolü gösterilmiştir.[2] Cas1, Cas2, Cas9 ve bazı durumlarda (Csn2 veya Cas4) proteinleri de işlev görür (Şekil 2). Bu sistemde bulunan kodlamayan trans-aktive edici crRNA (non-coding trans-activating crRNA: **tracrRNA**), crRNA ile hibridize olarak iskele yapısı oluşturur ve bu şekilde Cas9'un rehberlik etmesini kolaylaştırır. Cas9 adaptasyon aşamasına yardım eder, crRNA'nın işlenmesine katılır, crRNA ve tracrRNA'nın yardımıyla hedef DNA'nın kesilmesini sağlar.[13]

Tip II CRISPR-Cas sisteminin memelilerde kullanıma uyarlanabilmesi için crRNA ve tracrRNA ile birlikte kombine edilerek sentetik tek bir kılavuz kimerik RNA (gRNA) oluşturulur. Bu şekilde efektif olarak tek bir transkript şeklinde transkribe edilmesi sağlanır.[14]

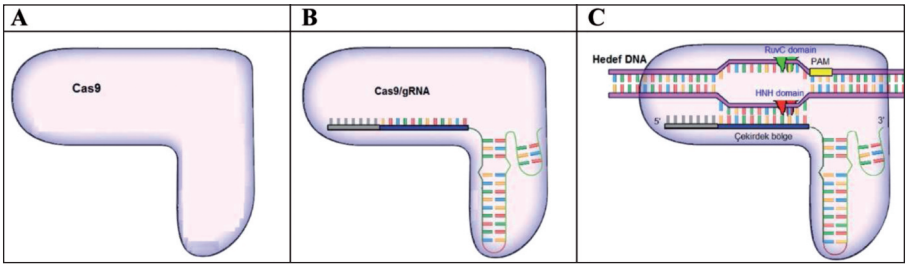
Birçok Cas proteini arasında endonükleaz aktiviteye sahip olması açısından Cas9'un ayrı bir önemi bulunmaktadır (Şekil 3). *Streptococcus pyogenes*'den elde edilen Cas9 proteininin (SpCas9) moleküler ağırlığı yaklaşık 150 kDa' dur ve 2 ana bölgeden oluşmaktadır; REC ilmek ve NUC ilmek. REC ilmek, DNA-RNA helikslerinin tanınması için, NUC ilmek ise hedef DNA'nın kesilmesi için gereklidir. NUC ilmek, iki bağımsız endonükleaz bölgesine sahiptir; HNH domain ve RuvC domain.[14] Her bir domain hedef genomik bölgede DNA'nın bir ipliğini keser. HNH bölgesi komplamenter olunan DNA ipliğini keserken, RuvC bölgesi ise komplamenter olmayan karşı zinciri keser. Ancak gRNA'ya bağlanmamış olan Cas9 proteininin endonükleaz aktivitesi yoktur. Cas9 proteininin kesim bölgelerine ilave olarak, NUC ilmeğinin C terminal bölgesinde bir de PAM (Protospacer Adjacent Motif) tanıma bölgesi bulunmaktadır. Bu bölgede bulunan iki korunmuş arjinin rezidü (R1333 ve R1335), GG nükleotidlerinin tanınmasında önemli rol oynamaktadır.[15]

**Tip III CRISPR-Cas sistemi:** Cas10 proteininin işlev gördüğü bilinmekle birlikte fonksiyonu tam olarak belirlenememiştir. Kaskada benzer şekilde Csm/Cmr komplekslerinin oluşumu ile karakterizedir.[16] Tip I ve Tip II sistemleri DNA'yı hedef alırken, Tip III CRISPR/Cas sistemi DNA ile birlikte RNA'yı da hedef alabilmektedir. Tip II sistem sadece bakterilerde bulunurken, Tip I ve III sistemleri hem bakterilerde hem arkelerde bulunmaktadır.[10]

CRISPR-Cas sisteminde bağışıklık yanıtının oluşması üç aşamada gerçekleşmektedir;[1]

**Adaptasyon:** Yeni bir aralayıcı DNA bölgesinin CRISPR sistemi içerisine alınmasıdır. CRISPR adaptasyonu, ekspresyon ve interferans aşamalarından önce genetik hafızanın oluşturulması için gereklidir.

Adaptasyon süreci temel olarak; i.) öncül aralayıcı bölgesinin seçilerek aralayıcı materyalin oluşturulması, ii.) Aralayıcı bölgenin CRISPR sistemine birleştirilmesi ve sentezi aşamalarından oluşmaktadır.[18] Cas1 ve Cas2 proteinleri aralayıcı bölge kazanımı için gerekli anahtar faktörlerdir.




**ŞEKİL 3:** Cas9 endonükleaz enziminin DNA çift zincir kesimini başlatması için model.[24] **A)** Serbest Cas9 enzimi, **B)** gRNA ile yüklenmiş Cas9 enzimi, **C)** Cas9/gRNA kompleksinin hedef DNA dizisine bağlanması, RuvC ve HNH domainleri ile DNA çift ipliğini kesmesi.

Her ikisi de nükleaz olan bu proteinlerden Cas1'in aktif bölgesindeki bir mutasyonun aralayıcı bölge kazanımını bozduğu gösterilmiştir.[19] *Escherichia coli*'de Cas1 ve Cas2 dimerleri birbirine bağlanarak bir kompleks oluşturur. Aralayıcı bölgenin transportu ve integrasyonu için bu kompleksin oluşumu gereklidir. Aralayıcı bölge kazanımı için gerekli diğer faktörler Cas9, Csn2, tracrRNA (Tip IIA) ve Cas4 (Tip IIB) olarak sıralanabilir.[2]

Aralayıcı bölgenin seçiminde hedef nükleik asit üzerinde bulunan belli diziler rehberlik etmektedir. Hedef dizilerin analizi ile hedef bölgenin komşusu olan kısa bir motifin kendinden olanı ve olmayanı ayırt etmek için kritik olduğu belirlenmiş ve bu dizi PAM olarak isimlendirilmiştir.[20] PAM dizisi hem interferans, hem de adaptasyon aşaması için gereklidir.[1]

**Ekspresyon:** CRISPR bölgesinden RNA sentezi ile pre-crRNA oluşturulması ve Cas genlerinin ifade edilmesi ile birlikte pre-crRNA'dan olgun crRNA oluşturulmasını kapsamaktadır.

CRISPR-Cas lokusunun transkripsiyonu ile oluşturulan **RNA-protein rehber kompleksi** sonraki aşamalarda birçok organizmada benzer yolları izlese de spesifik farklılıklar bulunabilmektedir. Bütün sistemlerde öncelikle CRISPR lokusu transkribe edilir, RNA Cas-ribonükleazlarla işlenerek CRISPR-ribonükleoprotein (crRNP) kompleksi oluşturulur. CRISPR transkripsiyonu *Escherichia coli, Pyrococcus furiosus* ve *Sulfolobus* sp. gibi bazı türlerde lider dizi bölgesinden başlar.[21] Lider dizi, promotör bileşenlerini ve aralayıcı kazanımı için düzenleyici proteinlerin bağlanma bölgelerini içerir. Oluşturulan ilk primer transkript (pre-crRNA) uzundur ve içerdiği palindromik tekrarlara bağlı olarak çok sayıda ikincil saç tokası yapısı oluşturabilir.[1]

**İnterferans:** Hedef dizinin parçalanarak yok edilmesi olarak tanımlayabileceğimiz interferans aşamasının temeli; crRNA'nın Cas proteinlerine bağlanarak protoaralığa (protospacer) eş bölgede lokalize olması ve hedef dizinin degradasyonunu tetiklemesidir. Degradasyon, spesifik Cas nükleazlar tarafından yapılmaktadır.[7]

Tip I ve II CRISPR sistemlerinde interferans için PAM dizisinin bulunması ve eksiksiz protoaralık-crRNA eşleşmesi gerekmektedir.[22] PAM dizisinin bulunması, sistemi kendi CRISPR bölgesine saldırmaktan korur. Kritik öneminden dolayı protoaralık - crRNA komplamenter bölgesine **çekirdek bölge** (seed region) adı verilmektedir.[22] Çekirdek bölgenin dışında bulunan birkaç eşleşmemiş baz tolere edilebilmekte ve interferansı etkilememektedir.[23]

CRISPR teknolojisinin kullanıldığı in vitro çalışmalarda genomda belli bir bölgeden DNA'nın kesilmesini sağlamak için Cas9 enzimini yönlendirecek kılavuz RNA'ları içeren yapıların oluşturulması gerekir. Bunun için crRNA ve tracrRNA birleştirilerek tek bir kılavuz RNA (gRNA) oluşturulur.[14] Cas9/gRNA kompleksinin hücreye transfeksiyonu sonrasında hedeflenen genomik bölgede DNA ipliklerinin kesilmesi sağlanır (Şekil 3).

## CRISPR-Cas9 SİSTEMİ İLE GENOM DÜZENLENMESİ

### DNA KIRIKLARININ TAMİR MEKANİZMALARI

CRISPR-Cas9 teknolojisi kullanılarak genom düzenlenmesi için, öncelikle RNA molekülünün kılavuzluk ettiği endonükleaz enzim (Cas9) ile DNA'nın belirli bir bölgeden çift zincir ya da tek zincir kırığı şeklinde kesilmesi gerekmektedir. Bu bakımdan CRISPR-Cas9 sisteminin prensibini anlayabilmek için öncelikle ökaryot genomunda DNA kırıklarının nasıl tamir edildiğini anlamak önemlidir. DNA hasarlarının en zarar verici formunu çift zincir kırıkları (Double Strand Break, DSB) oluşturmaktadır. Genomun bütünlüğünün korunması açısından bu kırıkların tamir edilmesi oldukça önemlidir. Ökaryot hücrelerde DNA çift zincir kırıklarının tamirinde iki mekanizma kullanılmaktadır;[25-27]

1) Homolog rekombinasyon (HR: homologous recombination ya da HDR: homology-directed repair)

2) Homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ: non-homologous end-joining)

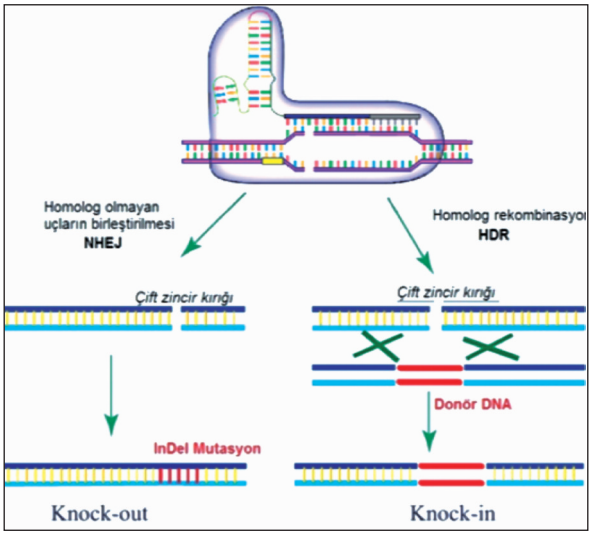
HR, mitotik hücrelerin bölünmesi sırasında kendiliğinden oluşan DNA hasarlarının tamirinde gereklidir. Bunun için kırık kromozomun ucunun bozulmamış kromozoma invazyonu gerekmekte-

dir. HR birkaç mekanizma ile yapılabilmektedir.[28] Basit bir gen dönüştürme (conversion) durumunda hasarlı bölgenin tamiri için sağlam DNA ipliğinden küçük bir miktar hasarlı bölge kopyalanarak yama yapılır. Hataya açık olmasına rağmen, gen dönüştürme ile HR tamiri, çift zincir kırıklarının tamirinde en sık kullanılan yoldur. Alternatif olarak HR sırasında Holiday Kavşağı adı verilen yapılar oluşturularak krossing over ile sonuçlanan DNA tamiri yapılabilmektedir. Ancak krossing over kardeş kromatidler arasında oluştuğu zaman (sister cromatid exchange) genetik olarak sessiz kalır. Homolog kromozomlar arasındaki krossing over ise heterozigotluk kaybı (Loss of heterozygosity, LOH) ile sonuçlanabilmekte ve resesif bir alelin kaybı ile zararlı etkileri ortaya çıkabilmektedir. Çift zincir kırıklarının hangi mekanizma ile tamir edileceği hücrenin içinde bulunduğu evreye ve çevresel faktörlere bağlı olarak değişebilmektedir. Hücre döngüsünün $G_0/G_1$ evresinde HR faktörleri henüz ifade edilmediğinden ve kardeş kromatidler oluşmadığından HR aktive edilmez.[28]

NHEJ ilk olarak linear plazmit DNA'sının homoloji göstermediği halde açık uçlarının birleşerek sirküler hale getirilmesi sırasında yapılan çalışmalarda DNA tamir sistemi olarak tanımlanmıştır.[29] Sonraki çalışmalarda NHEJ'nin bağışıklık sisteminde antijen reseptörlerinin yeniden düzenlemesi sırasında gen segmentlerinin birleştirilmesinde kullanıldığı belirlenmiştir.[30]

Cas9 enzimi ile indüklenen çift zincir kırıkları HR ya da NHEJ ile tamir edilebilmektedir (Şekil 4).[31] NHEJ ile tamir hataya meyilli olduğundan çerçeve kayması mutasyonları (Frameshift mutations) ve **InDel** mutasyon adı verilen insersiyon/delesyon mutasyonlarına neden olur. Bu mutasyonların kazanılması ile gen ürünü bozulduğundan, NHEJ gen çıkarma (**knock-out, KO**) uygulamaları için oldukça uygundur. CRISPR/Cas9 teknolojisinin kullanıldığı uygulamalarda Cas9 ve gRNA'nın transfeksiyonu sırasında hedef DNA dizisiyle homoloji gösteren bir verici (donör) DNA dizisinin de hücreye verilmesiyle HR yoluyla genom içine bu DNA dizisinin eklenmesi (**knock-in**) sağlanabilmektedir. Farklı çalışma grupları tarafından yapılan uygulamalarda homolog rekombinasyon yoluyla insersiyon, delesyon ya da dizi değişikliği yapabilmek mümkün olmuştur.[32, 33]

Çentikleme (nicking) adı verilen bir yöntem ile spesifik olarak HR'un uyarılması sağlanabil-




**ŞEKİL 4:** Cas9/gRNA genom düzenleme sisteminin şematik olarak gösterimi. gRNA dizisinin baz eşleşmesi yoluyla DNA'ya bağlanması ile Cas9 nükleaz enzimi genomdaki hedefine ulaşmış olur. Cas9 enziminin kesim bölgesini tanıması ve nükleaz aktivitesini göstermesi için gRNA bağlanma bölgesinin aşağı akış bölgesinde PAM motifinin bulunması gerekmektedir. Cas9/gRNA kompleksinin hedef DNA zincirinin her iki ipliğini de kesmesi ile endojen DNA tamiri başlatılmış olur. Hedef genin çıkarılması amaçlı deneylerde çift zincir kırığının hataya meyilli olan homolog olmayan uçların birleştirilmesi-NHEJ yoluyla tamir edilmesi sağlanır. Bu sırada meydana gelen InDel mutasyonlar gen ürünlerinin kaybolmasına neden olur. Cas9/gRNA kompleksi ile birlikte dışarıdan bir verici (donör) DNA dizisi verildiğinde, verici dizinin homolog rekombinasyon yoluyla genoma entegre olması sağlanmış olur.[31]

mektedir. Bu yöntemde genomda çift zincir kırığı oluşturmak yerine DNA'nın tek ipliğinde bir çentik (nick) oluşturulur.[34] Oluşan bu çentik bölgesi NHEJ nin substratı değildir. Meganükleazlar, Çinko parmak nükleaz (Zinc-finger nuclease: ZFN) ve Cas9 nükleaz enzimlerinin katalitik bölgeleri mutasyona uğratılarak çentikleyici enzim nikaz (nickase) şekline dönüştürülebilmektedir. Cas9 enzimi iki farklı nükleaz domain içermektedir. Bu domainlerin birinde mutasyon yapıldığında, katalitik bölge nikaz olarak etki etmektedir.[14] Ancak çentik bölgeleri kolaylıkla kapatılabildiği için, HR'u indüklemede çift zincir kırıkları kadar etkili olmamaktadır.[35] Cas9'un spesifik olmayan etkilerini azaltmak amacıyla karşıt zincirlerde meydana getirilen 2 çentik bölgesi ile çift zincir kırığı oluşturulmuştur.[36] Cas9 nikaz yöntemi ile iki kılavuz RNA'nın oldukça yakın bağlanması gerektiğinden istenmeyen hedef dışı etkilerin azaltılarak özgünlüğün artması sağlamıştır.

CRISPR/Cas9 aracılığıyla genom düzenleme sisteminin 3 temel bileşeni bulunmaktadır;

1) Nükleer lokalizasyon sinyali içeren Cas9 proteini,

2) gRNA molekülü (yaklaşık 20 nükleotidden oluşan 5' ucu hedef genomik bölgedeki dizi ile eşleşir, 3' ucu içerdiği sap ilmek (stem loop) ile Cas9'un bağlanması için iskele görevi yapar)

3) Hedef genomik dizinin aşağı akış yönünde PAM dizisi olarak isimlendirilen DNA motifidir.

gRNA'nın kılavuzluk ettiği Cas9, PAM dizisinin yaklaşık 3 nt yukarısından DNA'yı keserek çift zincir kırığı oluşturur. Cas9 ile indüklenen DNA kırığı sonucunda DNA tamir mekanizmaları aktive edilir. CRISPR teknolojisi ile genom düzenleme çalışmalarında ana kısıtlayıcı faktör hedef dizinin yanında bir PAM motifine ihtiyaç duyulmasıdır. gRNA ya da PAM dizisinin yokluğunda Cas9 hedef diziye bağlanamaz ve kesemez.

Farklı bakteri türlerinden farklı PAM dizilerini tanıyabilen Cas9 enzimleri izole edilerek farklı motifleri tanıyabilen enzimler geliştirilmeye çalışılmıştır (Tablo 1). *S. pyogenes* Cas9 mutantları ile alternatif PAM motifleri yaratılarak farklı kesim bölgeleri (NGA motifi) oluşturulabilmiştir.[37]

## KILAVUZ RNA'LAR

*Streptococcus pyogenes*'in Cas9 proteini iki tip kılavuz RNA ile fonksiyon görebilmektedir;

1. crRNA ve tracrRNA (crRNA:tracrRNA): CRISPR sisteminden sentezlenen doğal RNA'lar

2. single guide RNA (sgRNA): DNA vektörlerinden eksprese edilen ya da kimyasal yollarla sentezlenerek in vitro- in vivo deneylerde kullanılan RNA'lardır.

Jinek ve ark. crRNA ve tracrRNA'nın tek bir RNA molekülü şeklinde eksprese edilerek memelilerde gen düzenlenmesinde kullanılabileceğini göstermişlerdir.[14] Bu kimerik RNA molekülü crRNA ve tracrRNA'nın bir ilmek ile birleştirilerek kombine edilmesi ile oluşturulmuş, **sgRNA** veya **gRNA** (single guide RNA) olarak isimlendirilmiştir. crRNA ve tracrRNA'ı ayrı ayrı eksprese etmek yerine, tek bir kılavuz RNA'nın klonlanması ve ekspresyonu daha kolay olduğundan, literatürde kimerik RNA'ların kullanıldığı çalışmalar daha fazladır. gRNA, Cas9 enzimini spesifik bir genomik bölgeye yönlendirmek için gerekli 20 nt den oluşan bir hedef dizi ve Cas9'un bağlanabilmesi için gerekli iskele dizisini (scaffolding sequence) içermektedir.[14]

CRISPR-Cas9 sisteminde kullanmak üzere gRNA tasarlamak için öncelikle hedef genomik bölge ya da genin belirlenmesi, kullanılacak olan Cas9 protein varyantının tanıdığı PAM dizilerinin

**TABLO 1:** Farklı türlerden elde edilmiş olan Cas9 varyantları ve tanıdıkları PAM dizileri (www.addgene.org)

| Tür/Cas9 varyantı | PAM dizisi |
|---|---|
| ***Streptococcus pyogenes* (SP); SpCas9** | NGG |
| **SpCas9 D1135E** | NGG |
| **SpCas9 VRER** | NGCG |
| **SpCas9 EQR** | NGAG |
| **SpCas9 VQR** | NGAN veya NGNG |
| ***Staphylococcus aureus* (SA); SaCas9** | NNGRRT veya NNGRR(N) |
| ***Neisseria meningitidis* (NM)** | NNNNGATT |
| ***Streptococcus thermophilus* (ST)** | NNAGAAW |
| ***Treponema denticola* (TD)** | NAAAAC |
| **Cpf1 (from various species)** | TTN |

tanımlanması, gRNA'nın in vitro ya da in vivo ekspresyonu için kullanılacak olan promotör ve klonlama stratejisinin belirlenmesi gerekmektedir.[25]

gRNA dizaynı, hangi uygulamada ne amaçla kullanılacağı düşünülerek yapılmalıdır [(NHEJ ile gen çıkarılması, gen eklenmesi, CRISPR aktivasyonu (CRISPRa), CRISPR interference (CRISPRi)]. CRISPRa ya da CRISPRi gibi uygulamalarda, gRNA'nın uygun pozisyonu hedef genin transkripsiyon ya da translasyon başlangıç bölgesine göre, amaçlanan genetik değişikliğe bağlı olarak farklı olmaktadır. Bazı yaklaşımlarda tek bir hedef için birden fazla gRNA gerekebilir. Örneğin; Cas9 proteinin nikaz versiyonu için bir çift gRNA, CRISPR aktivasyonu için transkripsiyon başlangıç bölgesinin yukarısında iki ya da daha fazla gRNA dizayn edilmelidir.[38]

CRISPR temelli uygulamalar için araştırmacılar minimal hedef dışı etki ve en yüksek etkinlik gibi özellikleri önceden belirleyebilmek için bazı kurallar ve algoritmalar geliştirmişlerdir. gRNA tasarımı için geliştirilmiş çok sayıda web uygulaması bulunmaktadır. Araştırmacıların en uygun uygulamayı kullanması için AddGene (www.addgene.org) bütün uygulamaların listesini yayınlamaktadır. Ayrıca Google docsbased 'navigator' ile kullanıcıların gRNA dizaynındaki öncelikleri ve mevcut software programları eşleştirilerek taranmaktadır (http://tinyurl.com/matchcrispr). Akademik laboratuvarlar tarafından geliştirilen bir uygulama ise çok sayıda farklı türde gRNA tasarımı yapılabilmesini destekleyebilmektedir; E-CRISP, CHOP-CHOP, CRISPR Direct ve CRISPR-ERA.[39-42] Bu uygulamaların çoğunda gRNA'ların diziye özgül potansiyel hedef dışı etkileri ve gRNA'ya bitişik uygun bir PAM dizisinin olup olmadığı taranmaktadır.

Web tabanlı uygulamalar kullanılarak gRNA tasarımı yapılabilmekle birlikte, birçok durumda uygun gRNA pozisyonunun seçimi genin özelliklerine göre değişmektedir;[43] CRISPRa için transkripsiyon başlangıç bölgesinde 50-500 bp içinde, CRISPRi için transkripsiyon başlangıç bölgesinin yanında, NHEJ ile gen çıkartılması için en sık kodlanan ekzonda veya farklı amaçlar için özgül bir ekzon, intron ya da protein domain olabilir. İnsan genomu ile ilgili olarak NCBI, Ensembl ve UCSC gibi genom bilgi bankalarında genler hakkında yüksek kalitede veriler bulunmakta ve bu veriler sürekli güncellenmektedir.

## CRISPR-Cas9 SİSTEMİNİN TRANSFEKSİYON VE TAŞINMA STRATEJİLERİ

Genom düzenleme amacıyla kullanılacak olan deneysel yaklaşımlarda CRISPR-Cas9 sisteminin bileşenleri etkin bir şekilde hücreye verilmelidir. Bu amaçla sistemin işleyişini sağlayacak olan genetik kod birkaç farklı türdeki vektörle kodlanabilir (Tablo 2). Vektörleri CRISPR-Cas dizisinin kodlandığı nükleik asit iskelet yapısını temel alarak, **viral** ve **plazmit** vektörler olarak iki temel grupta incelemek mümkündür.[24]

**TABLO 2:** CRISPR-Cas9 sisteminin uygulanmasında kullanılan transfeksiyon yöntemlerinin karşılaştırılması.[44,59,62,63]

| | LV | AV | AAV | Plazmit taşıyan sistemler | Elektroporasyon | Hidrodinamik injeksiyon | Mikro injeksiyon |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Elde ediliş zorluğu | ** | ** | *** | * | ud | ud | ud |
| Taşınabilen gen boyutu | < 7 kb | ~ 4.5 kb | 5-37 kb | > 37 kb geniş aralıkta | geniş aralıkta | geniş aralıkta | geniş aralıkta |
| Genoma entegre olma | + | - | -/+a | - | - | - | - |
| Mutajenite riski | + | - | -/+a | - | - | - | - |
| İmmünojenite riski | + | + | + | - | - | - | - |
| In vivo uygulama | + | + | + | + | (sınırlı) | + | + |
| Yüzey ve boyut özellikleri tasarımı | - | - | - | + | ud | ud | ud |

[a] AAV'lerin çok düşük bir yüzdeyle genoma entegre olabildiği bilinmektedir. ud-uygulanabilir değil.

Viral vektörler tamamen biyolojik temele dayandıkları için hem sistemin işleyişini sağlayan genetik kodları içermekte, hem de bu kodun etkin bir şekilde hücrelere girebilmesini sağlamaktadır. Temel olarak üç tip viral vektör genom düzenleme çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır;[44] Lentiviral vektörler (LV), adenoviral vektörler (AV) ve adeno ilişkili viral vektörler (AAV). LV vektörler nispeten büyük dizilerin taşınmasını sağlamaktadırlar. Bu bakımdan CRISPR-Cas9 gibi büyük gen dizisine sahip olan sistemlerin taşınması için uygundurlar. Ayrıca, taşınan CRISPR-Cas9 genlerinin hücrenin genomuna yerleşmesini sağlayarak uzun süreli stabil transfeksiyon oluştururlar.[45,46] Ancak, lentiviral vektörler öngörülemeyen ve özgül olmayan insersiyonlara sebep olabilmektedir. Böyle bir insersiyonun meydana gelmesi halinde uzun süreli ekspresyon istenmeyen bir durumdur. Bunun yerine entegraz-defektli lentiviral vektörler (IDLV) geliştirilerek denenmiş ve genom düzenleme çalışmalarında kullanılmıştır.[44,47] Bu vektörler genoma entegre olmadan transdüksiyon sağladıkları için, hızlı çoğalan hücrelere kazandırdıkları geçici Cas9 ekspresyonu sayesinde güvenlik açısından avantajlı olarak tanımlanmaktadır. Ancak yavaş çoğalan hücrelerde Cas9 ekspresyonu kalıcı olabilir ve bu da hedef dışı kesimin daha yüksek olması gibi dezavantajlar ortaya çıkarabilir.[48] Adenovirüsler ve adeno ilişkili virüsler genoma entegre olmadan CRISPR-Cas9 genlerini taşıyabildiği için daha avantajlı olarak görülmektedir.[49-51] AAV vektörlerle oldukça yaygın bir şekilde in vivo genom düzenleme çalışmaları yapılmış olmasına karşın bu vektöre klonlanan genin büyüklüğü sınırlıdır. Bu nedenle, CRISPR-Cas9 gibi büyük gen dizisine sahip olan sistemlerin AAV ile taşınması zorlaşmakta ve genellikle ayrı ayrı gRNA ve Cas9 klonlanmış iki adet AAV'ün birlikte kullanılmasını gerektirmektedir.[48,52] Çoğunlukla bir viral vektör tek başına gen taşınmasında kullanılabildiği için bunlar doğrudan uygulama yapmak üzere tasarlanırlar. Transfeksiyon etkinliği yüksek olan ve birçok hücreyi transfekte edebilme kapasitesi olan bu vektörler klinik öncesi deneysel çalışmalarda tercih edilmektedir. Fakat virülans kazanarak hastalık etmenine dönüşme ihtimallerinin olması ve immün reaksiyonlara sebep olabilmeleri bakımından viral vektörlerin klinik uygulanabilirlikleri hala tartışma konusudur.[44,49,53,54] Bu bakımdan plazmit vektörler daha güvenilir görünmektedir.

Plazmit vektörlerle genom düzenleme gerçekleştirmek üzere ilk çalışmalarda ayrı ayrı Cas9 proteinini, crRNA ve tracrRNA kodlayan plazmitler aynı anda kullanılmıştır.[55] Buna verici DNA da eklendiğinde toplam dört adet plazmitin uygulanması gerekmektedir. Bunun yanında crRNA ve tracrRNA'nın füzyon transkripti olan gRNA'yı kodlayan plazmitler de geliştirilmiş ve Cas9 bağlanması ve DNA hedef bölgesini tanıma etkinliği gösterilmiştir.[14] Hem Cas9 hem de gRNA yı bir arada kodlayan plazmitlerin de kullanılmaya başlanmasıyla genom düzenleme çalışmaları daha da kolaylaşmıştır.[33,51] Viral vektörlere nazaran daha güvenilir olmalarına ve gittikçe geliştirilen yapısal tasarımlara rağmen plazmitlerin de bazı dezavantajları vardır. Plazmit vektörler fosfat iskeletinden kaynak lanan negatif elektriksel yüke sahiptir. Diğer yandan, hücre membranlarının ana bileşeni olan fosfolipitler de yine negatif yüke sahiptir. Bu nedenle plazmitlerle hücre membranı elektrostatik olarak birbirini itmekte ve böylece plazmitin hücre içerisine girişi zorlaşmaktadır. Bunun yanında plazmitler nükleazlar tarafından kolayca yıkıma uğramaktadır.[56] Dolayısıyla özellikle in vivo uygulanacakları zaman vücutta stabil bir şekilde taşınmalarını salayacak ve hedef hücrelere etkin bir şekilde ulaşıp internalize olabilecek ikincil bir taşıyıcı sisteme gereksinim duyarlar. Günümüzde nanoteknoloji ve nanofarmasötik bilimindeki ilerlemeler sayesinde, diğer genetik materyaller de dahil olmak üzere CRISPR-Cas sisteminin farklı nanotaşıyıcılarla hücrelere verilebilmesi mümkündür. Bu taşıyıcı sistemler yapısal olarak nükleik asitlerden ve Cas9'dan ayrı olarak tasarlanır ve sonradan bunlarla birleştirilerek kompleksler elde edilir. Bu şekilde elde edilmiş [nükleik asit: taşıyıcı sistem] komplekslerine **viral olmayan vektörler** (non-viral vektörler) denir. Potansiyel olarak CRISPR-Cas9 sisteminin taşınmasında kullanılabilecek taşıyıcı sistemler arasında katyonik lipitlerin kullanımına dayalı lipozomlar ve katı lipit nanopartiküller; katyonik polimerler

(poli etilenimin, poli(L-lizin), Poli[2-(dimetilamino) etil metakrilat); dendrimerler; doğal katyonik polimer olan kitozan sayılabilir.[57] Miller ve ark. dipolar (zvitteriyonik) aminolipidler sentezleyerek nanopartikül hazırlanmasında kullanmışlardır.[58] Elde ettikleri nanopartikülleri CRISPR-Cas9 sistem elementlerinden Cas9 mRNA ve sgRNA taşınmasında denemişler ve lusiferaz geni çıkartılmış hücrelerde ve in vivo farelerde deneyerek sentezlenen bu lipitlerin genom düzenleme çalışmalarında uygulanabilirliğini kanıtlamışlardır. Sonuç olarak araştırmacılar geliştirdikleri sistemi yüksek verimli ilk non-viral CRISPR taşıyıcı sistem olarak tanımlamışlardır. Bunlarla birlikte ticari olarak bulunan transfeksiyon kitleri de değişen oranlardaki verimlilikle CRISPR-Cas9 sisteminin taşınmasında kullanılmıştır.[59] Non-viral gen aktarımı yöntemleri arasında, fiziksel yöntemler olarak bilinen yöntemler de CRISPR-Cas9 sisteminin hücrelere aktarılmasında kullanılabilir. Bunlar arasında elektroporasyon, mikroinjeksiyon ve hidrodinamik injeksiyon bulunmaktadır.[51,60,61]

Genel olarak viral ve viral olmayan vektörler karşılaştırılacak olursa Tablo 2'deki gibi bir durum ortaya çıkmaktadır.[44,59,62,63] Buna göre viral vektörler yüksek verimle CRISPR-Cas9 sisteminin taşınmasında kullanılma potansiyeline sahiptir. Ancak bunun yanında mutajenite ve immunojenite riski taşımalarından dolayı viral olmayan transfeksiyon ve gen taşıma yöntemlerinin önemi ortaya çıkmaktadır. Gelecekteki çalışmalarda kolay hazırlanabilen, özellikleri amaca göre uyarlanabilen, güvenli, etkin ve ucuz non-viral gen taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi in vivo genom düzenleme çalışmaları için bir kazanım olacaktır.

## CRISPR-Cas9 ÖZGÜNLÜĞÜ VE HEDEF DIŞI ETKİLERİN AZALTILMASI

CRISPR-Cas9 çalışmalarında genomik bölge lokasyonunun doğru belirlenmesi ve Cas9/gRNA kompleksinin genomdaki diğer bölgelerle reaksiyona girmemesi çok önemlidir. gRNA'ların genomda hedef dışı bölgelere bağlanması istenmeyen sonuçların oluşmasına neden olabilir.[64] Genomda homolog bir dizinin bulunması, nükleaz ekspresyonun fazla olması, nükleaza uzun süre maruz kalma gibi faktörler hedef dışı etkilerin artmasına neden olmaktadır. Hedef dışı etkilerin azaltılması amacıyla son zamanlarda *S. pyogenes*'ten izole edilen Cas9 modifiye edilerek kullanılmaktadır.[65] Modifikasyonlar ile Cas9 nükleazın gRNA ve hedef DNA arasındaki yapısal belirleyiciler temel alınarak yüksek doğrulukta kesim yapılması sağlanmaktadır.

Cas9 nükleaz aktivitesi, hedef DNA ve gRNA dizileri arasında kusurlu tamamlayıcılık ile hedef bölgede kısıtlanmaktadır. Bu bölgeler, hedef DNA ve gRNA arasında eşlenmemiş bazlar, insersiyon veya delesyonlar içeren kusurlu eşlenmiş bölgelerdir.[66] Eşlenmemiş bölgelerin toleransı diziye bağlıdır ve 20 nükleotid dizi boyunca pozisyon, sayı ve dağılımdan etkilenmektedir. gRNA hedef bölgesinin 5' ucunda bulunan tek eşlenmemiş baz genellikle iyi tolere edilirken, PAM dizisinin proksimal ucundaki eşlenmemiş baz daha az tolere edilmektedir.

Hedef dışı etkilerin tahmin edilerek önlenmesi için gRNA tasarımı yapılırken bilgisayar programları kullanılmakta ve özgüllüğün arttırılması sağlanmaktadır. Bilgisayar tahmini ile gösterilen birçok hedef dışı noktası deneysel olarak da doğrulanmıştır. Ancak bütün hedef dışı bölgelerin bu yaklaşımla belirlenmesi de mümkün değildir. Hedef dışı bölgelerin değerlendirilmesi genellikle eşlenmemiş baz bölgeleri temel alınarak yapılmaktadır. Ancak bazı hedef dışı bölgeler eşlenmemiş bazlara değil gRNA ve hedef DNA arasında bulunan gap bölgelerine bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. COSMID tool ve Dharmacon CRISPR specificity tool, hedef dışı bölgelerin tahmin edilmesi için en sık kullanılan web tabanlı programlardır.[67]

Hedef dışı etkilerin azaltılması için kullanılan potansiyel uygulamalardan birisi gRNA ve Cas9 konsantrasyonlarının azaltılmasıdır. Ancak bu uygulama hakkında çelişkili sonuçlar bildirilmektedir. Bazı gruplar gRNA konsantrasyonunun azaltılması ile hedef dışı etkilerin büyük ölçüde azaldığını bildirirken, farklı bir grubun çalışmasında bu doğrulanmamıştır.[68,69] 3' uçları kısaltılarak modifiye edilmiş gRNA'lar (tracrRNA dizisinin olduğu

bölge) ya da 5' ucuna ekstra iki guanin ilave edilmesi gibi modifikasyonların hedef/hedef dışı oranını arttırdığı bildirilmekle birlikte genom düzenleme etkinliği düşük bulunmuştur.[38]

Hedef dışı etiklerin azaltılması ve özgünlüğün arttırılmasını sağlayan yaklaşımlardan birisi çift nikaz enzimi kullanılacak şekilde iki komşu gRNA'nın tasarlanmasıdır.[36,38] Nikaz enzimleri, aralarında 4-100 baz olacak şekilde DNA'nın zıt zincirlerine hedeflendirilmeli ve her iki zincirin de kesilmesi sağlanmalıdır.

## CRISPR/Cas9 UYGULAMALARI

CRISPR/Cas9 uygulamaları için farklı gRNA'lar (kimyasal olarak sentezlenmiş, in vitro transkribe veya eksprese edilmiş) ve Cas9 formları (protein, mRNAi eksprese edilmiş) kullanılabildiğinden bu sistem birçok genetik mühendisliği çalışması için uygundur. Kimyasal sentez yöntemi kullanılarak hızlı ve kolay bir şekilde elde edilen crRNA ve tracrRNA'lar hücrelere direkt olarak transfer edilebilmektedir. CRISPR/Cas9 gen düzenleme sistemi olarak keşfedildikten kısa bir süre sonra vektör bazlı gRNA havuzları oluşturularak genom düzeyinde fonksiyon kaybı taramalarında kullanılmıştır.[45]

CRISPR/Cas9 teknolojisi ilk bakışta gen çıkarılması/gen eklenmesi gibi düzenlemelere odaklanmış olarak görülmekle birlikte aslında kro mozom yeniden düzenlenmeleri (EML4-ALK inversiyonu, BCR-ABL translokasyonu), transkripsiyonun aktivasyonu/baskılanması ve epigenetik düzenleme gibi amaçlarla da kullanılabilmektedir.[70] Cas9 sisteminin terapötik olarak kullanılabilmesi potansiyeli de bulunmaktadır. Antimikrobiyal ajan olarak geliştirilen Cas9, bakterilerde antibiyotik dirençli ya da yüksek suşların virulansını hedeflemede kullanılmaktadır.[71] Gen tedavisi uygulamalarında ise kistik fibrozlu bir hastanın kültüre edilen hücrelerinde CFTR geninin tamir edilebildiği gösterilmiştir.[72] Fare germline hücrelerinde dominant katarakt ve Duchenne kas distrofisinin tedavi edilmesi için DNA dizi değişikliği yapılmıştır.[73,74] CRISPR/Cas9 sisteminin maymunlardaki ilk uygulamasında, Cas9 mRNA ve sgRNA'lar kullanılarak tek hücreli aşamada olan embriyolarda gen tedavisi yapılmıştır.[75] Bu çalışmada tek uygulamada 2 gen (Ppar-g ve Rag1) hedeflenmiş, hedef dışı mutasyon belirlenmemiştir.

CRISPR/Cas9 sisteminin yoğun olarak kullanıldığı uygulamalardan birisi de gen ifadesinin düzenlenmesidir. Cas9 proteininin her iki nükleaz domaininde meydana getirilen mutasyonlar ile nükleaz aktivitesi tamamen inhibe edilebilmektedir. Bu şekilde mutant dCas9 ile oluşturulan Cas9/gRNA kompleksi genomda hedeflenen bölgeye bağlanmakta, ancak endonükleaz aktivitesini gösterememektedir. Bu özellik hedef gen bölgesinde RNA polimerazın bağlanmasını veya uzamanın engellenmesi ile gen susturmada (knock-down) kullanılmaktadır.[9] dCas9 ile birlikte transkripsiyonal bir aktivatör domain veya repressör'ün genomda belirli bir bölgeye taşınması yoluyla gen ifadesinin arttırılması veya baskılanması sağlanabilmektedir.[70]

## KANSERDE CRISPR UYGULAMALARI

Kanser genetik ve epigenetik değişikliklerin neden olduğu transformasyon, tümör büyümesi, invazyon ve metastaz gibi hücresel olaylar ile karakterize kompleks bir hastalıktır. Farklı kanser tiplerinde nokta mutasyonları, kopya sayısı değişiklikleri, kromozomal yeniden düzenlemeler gibi çok sayıda genomik değişiklik belirlenmiştir. DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları gibi değişiklikler, kanseri daha karmaşık bir hastalık haline getirmektedir. Değişikliğe uğrayan genler fonksiyonları aşırı derecede artarak fonksiyonel hale gelmekte ya da fonksiyonlarını kaybederek sessizleşmektedir.

Yirmi yıl kadar önce başlayan genom mühendisliği çalışmalarında homolog rekombinasyon noktalarının kullanılmasının gen hedeflemenin etkinliğini arttırdığı belirlenmiştir. Araştırıcılar ilk çalışmalarda çift zincir kırıkları oluşturmak amacıyla Çinko Parmak Nükleazları (Zinc finger nucleases, ZFNs) ve Transkripsiyon Aktivatör Benzeri Efektör Nükleazlar (transcription-activator-like effector nucleases, TALENs) gibi programlanabilir nükleazları kullanmışlardır.[76,77] Bu nükleazlar bazı çalışmalarda

başarılı bir şekilde kullanılmış olmakla birlikte maliyeti yüksek, uygulanması zor ve etkinliği düşük kalmaktadır. Gen susturma çalışmalarında RNA interferans kullanılarak çok sayıda önemli keşif yapılmıştır. Ancak bu yöntemde mRNA'lar belli bir seviyeye kadar yıkılabilmekte ve bir miktar mRNA hala fonksiyonel olarak çalışabilmektedir. CRISPR/Cas9 teknolojisi kullanılarak yapılan genetik değişiklikler ise kalıcı olarak etki etmektedir.

CRISPR teknolojisinin kanserdeki potansiyel uygulamaları tümör baskılayıcı genlerin ve onkogenlerin fonksiyon kazandıran (GOF: Gain of Function) & kaybettiren (LOF: Loss of Function) mutasyonlarının düzeltilmesini hedeflemektedir. Matano ve ark., kolorektal kanser modeli hazırlamak amacıyla transforme olmamış intestinal organoid hücrelerinde üçü LOF, ikisi GOF olmak üzere 5 farklı mutasyon oluşturmuşlardır.[78] Ancak bu mutasyonların oluşturulması ile kolorektal kanser modeli tam olarak tümorijenik ve metastatik özellikleri göstermediğinden ikincil genetik & epigenetik değişikliklerin gerekli olduğunu bildirmişlerdir. Multipleks CRISPR/Cas9 uygulamaları ile oluşturulan kanser modelleri, kanser hücrelerinin oluşum mekanizmasında yer alan mutasyonların kombine edilerek çalışılabilmesine fırsat vermektedir.[79]

İlk kez Platt ve ark. tarafından Cas9 geninin Cre-bağımlı alelinin oluşturulmasıyla Cas9'un geçici olarak dokuya özgül ekspresyonu sağlanmıştır.[80] Adeno ilişkili virüs kullanılarak transfekte edilen gRNA'lar ile yapılan bu çalışmada, p53 ve Lkb1 genlerinde heterozigotluk kaybı oluşturulmuştur. İlk başarılı gen düzenleme çalışması Jacks ve grubu tarafından Cas9/gRNA plazmitlerinin transfeksiyonu ile karaciğer hücrelerinde Pten ve p53 genleri hedeflenerek yapılmış ve hepatoselüler kanser oluşumu sağlanmıştır.[51] Pten, Nkx2.1, Apc gibi tümör baskılayıcı genlerde LOH oluşturularak tümörlerin farklılaşma ve çoğalma kapasitelerinde çarpıcı değişiklikler ortaya çıktığı gösterilmiştir.[81] CRISPR/Cas sisteminin insan üzerinde yapılan ilk uygulaması birkaç ay önce Çin'li bir grup tarafından bildirilmiştir.[82] Bu grubun çalışmasında metastatik akciğer kanserli bir hastanın kanından elde edilen lenfositlerde PD-1 (Programmed cell death protein-1) geni çıkartıldıktan sonra kültür ortamında çoğaltılan hücreler enjeksiyonla hastaya geri verilmiştir

Hematolojik kanserlerde yapılan farklı çalışmalarda $Arf^{-/-}$Eμ-Myc lenfoma farelerde tümör baskılayıcı p53 geninde mutasyonlar oluşturulduğu ve mixed-lineage leukemia 3 (MLL3) tümör baskılayıcı geninin CRISPR aracılığıyla bozulduğu bildirilmiştir.[83,84] Heckl ve ark., fare hematopoetik kök progenitör hücrelerde yaptıkları CRISPR temelli genom düzenleme çalışmaları ile hızlı bir şekilde akut miyeloid lösemi geliştirebildiklerini göstermiştir.[85] Prostat kanseri hücre serisinde (DU145) NANOG ve NANOGP8 genlerinin CRISPR/Cas9 ile çıkartılması, hücrelerin tümörijenik potansiyellerini önemli ölçüde zayıflatmış, ayrıca küre formasyonu, göç yeteneği, ilaç direnci gibi malignite ile ilişkili in vitro fenotipik özelliklerin azalmasını sağlamıştır.[86] CRISPR/Cas9 sistemi ile aynı veya farklı kromozom bölgelerinde iki kırık bölgesi oluşturularak inversiyon, delesyon, translokasyon gibi kromozom anomalileri in vitro ya da in vivo olarak meydanda getirilebilmektedir.[87,88]

### *Çıkar Çatışması*

*Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması veya finansal destek bildirmemiştir.*

### *Yazar Katkıları*

***Derlemenin Genel Tasarımı ve Yazımı:*** *Vildan Bozok Çetintaş,* ***Transfeksiyon ve Taşınma Stratejilerinin Araştırılması:*** *Mustafa Kotmakçı,* ***CRISPR/Cas9 Uygulamaları:*** *Burçin Tezcanlı Kaymaz.*

CRISPR Sözlüğü.

| Kısaltma | Orijinal Açılımı | Açıklama |
|---|---|---|
| **Cas** | CRISPR associated | Nükleik asitlerle etkileşim kurarak helikaz ve nükleaz aktiviteleri gösterebilen protein ailesi |
| **CRISPR** | Clustered Regularly Interspaced Short Palendromic Repeat | **"düzenli aralıklarla bölünmüş kısa palindromik tekrar kümeleri"** Prokaryotik canlıların bağışıklık sisteminin temelini oluşturan DNA bölgeleri |
| **CRISPRa** | CRISPR activation | dCas9 veya dCas9-aktivatör kullanılarak hedef bir genin transkripsiyonun arttırılması |
| **CRISPRi** | CRISPR interference | dCas9 veya dCas9-repressör kullanılarak hedef bir genin transkripsiyonun azaltılması veya baskılanması |
| **DSB** | Double Strand Break | Cas9 veya iki Cas9-nikaz kullanılarak DNA çift zincirinde kırık oluşturulması |
| **dCas9** | defected Cas9 | Nükleaz domainlerinde mutasyon oluşturularak nükleaz aktivitesi inhibe edilmiş Cas9. |
| **gRNA, sgRNA** | guide RNA single guide RNA | crRNA ve tracrRNA'nın birleştirilmesi ile oluşturulmuş sentetik kimerik RNA'lar. Cas9 nükleaz enzimini hedef genomik bölgeye yönlendirir |
| **crRNA** | crispr RNA | pre-crRNA'dan işlenen olgun cripsr-RNA molekülü |
| **HR** | homologous recombination | Homolog rekombinasyon, |
| **HDR** | homology-directed repair | Kalıp bir dizi kullanılarak DNA tamirinin yapıldığı mekanizma |
| **InDel** | Insertion/Deletion | Okuma çerçevesini kaydırarak ya da erken stop kodonu oluşturarak bir genin bozulmasına neden olan mutasyon |
| **NHEJ** | nonhomologous end-joining | Homolog olmayan uç birleştirme, Genellikle InDel mutasyonların oluşmasına neden olan DNA tamir mekanizması |
| **Nick** | | DNA'nın sadece tek bir zincirinin kesilmesi, DNA ipliğinin çentiklenmesi |
| **Nikaz** | Nickase | İki nükleaz domaininden herhangi birinin inaktive edilmesiyle oluşturulan ve DNA'nın sadece tek bir zincirinin kesilmesini sağlayan Cas9 |
| **Hedef dışı etkiler** | Off-target effects | Hedeflenen genomik bölgenin dışında, istenmeyen bir bölgede DNA molekülünün kesilmesi |
| **Hedef aktivitesi** | On-target activity | gRNA hedefleme dizisinin, Cas9'u istenen genomik bölgeye yönlendirmesi ile DNA kesimi oluşturulması |
| **PAM** | Protospacer Adjacent Motif | Cas9'un hedef DNA'ya bağlanabilmesi için gerekli motif |
| **pre-crRNA** | pre-crispr RNA | CRISPR array'den transkribe edilen, uzun, işlenmemiş primer transkript RNA |
| **tracrRNA** | trans-activating crRNA | Tip II CRISPR-Cas sisteminde RNase III ile birlikte crRNA'nın işlenmesini sağlayan RNA |

## KAYNAKLAR


1. Rath D, Amlinger L, Rath A, Lundgren M. The CRISPR-Cas immune system: biology, mechanisms and applications. Biochimie 2015;117: 119-28.
2. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. Science 2007;315(5819):1709-12.
3. Jansen R, van Embden JD, Gaastra W, Schouls LM. Identification of a novel family of sequence repeats among prokaryotes. OMICS 2002;6(1):23-33.
4. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product. J Bacteriol 1987;169(12):5429-33.
5. Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. Microbiology 2005; 151(Pt 8):2551-61.
6. Makarova KS, Aravind L, Grishin NV, Rogozin IB, Koonin EV. A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and bacteria predicted by genomic context analysis. Nucleic Acids Res 2002;30(2):482-96.
7. Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuis RJ, Snijders AP, et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. Science 2008;321(5891):960-4.
8. Sinkunas T, Gasiunas G, Fremaux C, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Cas3 is a single-stranded DNA nuclease and ATP-dependent helicase in the CRISPR/Cas immune system. EMBO J 2011;30(7):1335-42.
9. Rath D, Amlinger L, Hoekzema M, Devulapally PR, Lundgren M. Efficient programmable gene silencing by Cascade. Nucleic Acids Res 2015;43(1):237-46.
10. Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Horvath P, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. Nat Rev Microbiol 2011;9(6):467-77.
11. Westra ER, van Erp PB, Künne T, Wong SP, Staals RH, Seegers CL, et al. CRISPR immunity relies on the consecutive binding and degradation of negatively supercoiled invader DNA by Cascade and Cas3. Mol Cell 2012; 46(5):595-605.
12. Kunin V, Sorek R, Hugenholtz P. Evolutionary conservation of sequence and secondary structures in CRISPR repeats. Genome Biol 2007;8(4):R61.
13. Ran FA. Adaptation of CRISPR nucleases for eukaryotic applications. Anal Biochem 2016. Doi: 10.1016/j.ab.2016.10.018. [Epub ahead of print].
14. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science 2012;337 (6096):816-21.
15. Lee SH, Bae S. Structural and dynamic views of the CRISPR-Cas system at the single-molecule level. BMB Rep 2016;49(4):201-7.
16. Rouillon C, Zhou M, Zhang J, Politis A, Beilsten-Edmands V, Cannone G, et al. Structure of the CRISPR interference complex CSM reveals key similarities with cascade. Mol Cell 2013;52(1):124-34.
17. Makarova KS, Grishin NV, Shabalina SA, Wolf YI, Koonin EV. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. Biol Direct 2006;1:7.
18. Fineran PC, Charpentier E. Memory of viral infections by CRISPR-Cas adaptive immune systems: acquisition of new information. Virology 2012;434(2):202-9.
19. Yosef I, Goren MG, Qimron U. Proteins and DNA elements essential for the CRISPR adaptation process in Escherichia coli. Nucleic Acids Res 2012;40(12):5569-76.
20. Mojica FJ, Diez-Villaseñor C, García-Martínez J, Almendros C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. Microbiology 2009;155(Pt 3):733-40.
21. Lillestøl RK, Shah SA, Brügger K, Redder P, Phan H, Christiansen J, et al. CRISPR families of the crenarchaeal genus Sulfolobus: bidirectional transcription and dynamic properties. Mol Microbiol 2009;72(1):259-72.
22. Semenova E, Jore MM, Datsenko KA, Semenova A, Westra ER, Wanner B, et al. Interference by clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) RNA is governed by a seed sequence. Proc Natl Acad Sci U S A 2011;108(25):10098-103.
23. Fineran PC, Gerritzen MJ, Suárez-Diez M, Künne T, Boekhorst J, van Hijum SA, et al. Degenerate target sites mediate rapid primed CRISPR adaptation. Proc Natl Acad Sci U S A 2014;111(16):E1629-38.
24. Shui B, Hernandez Matias L, Guo Y, Peng Y. The Rise of CRISPR/Cas for Genome Editing in Stem Cells. Stem Cells Int 2016;2016: 8140168.
25. Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. Nat Biotechnol 2014;32(4):347-55.
26. Ceasar SA, Rajan V, Prykhozhij SV, Berman JN, Ignacimuthu S. Insert, remove or replace: A highly advanced genome editing system using CRISPR/Cas9. Biochim Biophys Acta 2016;1863(9):2333-44.
27. Sánchez-Rivera FJ, Jacks T. Applications of the CRISPR-Cas9 system in cancer biology. Nat Rev Cancer 2015;15(7):387-95.
28. Jasin M, Rothstein R. Repair of strand breaks by homologous recombination. Cold Spring Harb Perspect Biol 2013;5(11):a012740.
29. Roth DB, Wilson JH. Nonhomologous recombination in mammalian cells: role for short sequence homologies in the joining reaction. Mol Cell Biol 1986;6(12):4295-304.
30. Roth DB, Nakajima PB, Menetski JP, Bosma MJ, Gellert M. V(D)J recombination in mouse thymocytes: double-strand breaks near T cell receptor delta rearrangement signals. Cell 1992;69(1):41-53.
31. Ding Y, Li H, Chen LL, Xie K. Recent Advances in Genome Editing Using CRISPR/Cas9. Front Plant Sci 2016;7:703.
32. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science 2013; 339(6121):819-23.
33. Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. Science 2013; 339(6121):823-6.
34. Metzger MJ, McConnell-Smith A, Stoddard BL, Miller AD. Single-strand nicks induce homologous recombination with less toxicity than double-strand breaks using an AAV vector template. Nucleic Acids Res 2011;39(3):926-35.
35. Vriend LE, Prakash R, Chen CC, Vanoli F, Cavallo F, Zhang Y, et al. Distinct genetic control of homologous recombination repair of Cas9-induced double-strand breaks, nicks and paired nicks. Nucleic Acids Res 2016;44(11): 5204-17.
36. Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. Cell 2013;154(6): 1380-9.
37. Kleinstiver BP, Prew MS, Tsai SQ, Topkar VV, Nguyen NT, Zheng Z, et al. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. Nature 2015;523(7561):481-5.
38. Cho SW, Kim S, Kim Y, Kweon J, Kim HS, Bae S, et al. Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. Genome Res 2014;24(1): 132-41.

39. Heigwer F, Kerr G, Boutros M. E-CRISP: fast CRISPR target site identification. Nat Methods 2014;11(2):122-3.
40. Liu H, Wei Z, Dominguez A, Li Y, Wang X, Qi LS. CRISPR-ERA: a comprehensive design tool for CRISPR-mediated gene editing, repression and activation. Bioinformatics 2015;31(22):3676-8.
41. Montague TG, Cruz JM, Gagnon JA, Church GM, Valen E. CHOPCHOP: a CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing. Nucleic Acids Res 2014;42(Web Server issue):W401-7.
42. Naito Y, Hino K, Bono H, Ui-Tei K. CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites. Bioinformatics 2015;31(7):1120-3.
43. Mohr SE, Hu Y, Ewen-Campen B, Housden BE, Viswanatha R, Perrimon N. CRISPR guide RNA design for research applications. FEBS J 2016;283(17):3232-8.
44. Chen X, Gonçalves MA. Engineered Viruses as Genome Editing Devices. Mol Ther 2016;24(3):447-57.
45. Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, Lander ES. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. Science 2014; 343(6166):80-4.
46. Koike-Yusa H, Li Y, Tan EP, Velasco-Herrera Mdel C, Yusa K. Genome-wide recessive genetic screening in mammalian cells with a lentiviral CRISPR-guide RNA library. Nat Biotechnol 2014;32(3):267-73.
47. Lombardo A, Genovese P, Beausejour CM, Colleoni S, Lee YL, Kim KA, et al. Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and integrase-defective lentiviral vector delivery. Nat Biotechnol 2007;25(11): 1298-306.
48. Gori JL, Hsu PD, Maeder ML, Shen S, Welstead GG, Bumcrot D. Delivery and Specificity of CRISPR-Cas9 Genome Editing Technologies for Human Gene Therapy. Hum Gene Ther 2015;26(7):443-51.
49. Wang D, Mou H, Li S, Li Y, Hough S, Tran K, et al. Adenovirus-Mediated Somatic Genome Editing of Pten by CRISPR/Cas9 in Mouse Liver in Spite of Cas9-Specific Immune Responses. Hum Gene Ther 2015;26(7):432-42.
50. Maggio I, Holkers M, Liu J, Janssen JM, Chen X, Gonçalves MA. Adenoviral vector delivery of RNA-guided CRISPR/Cas9 nuclease complexes induces targeted mutagenesis in a diverse array of human cells. Sci Rep 2014; 4:5105.
51. Xue W, Chen S, Yin H, Tammela T, Papagiannakopoulos T, Joshi NS, et al. CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver. Nature 2014;514(7522):380-4.
52. Wang L, Li F, Dang L, Liang C, Wang C, He B, et al. In Vivo Delivery Systems for Therapeutic Genome Editing. Int J Mol Sci 2016;17(5).
53. Ran FA, Cong L, Yan WX, Scott DA, Gootenberg JS, Kriz AJ, et al. In vivo genome editing using Staphylococcus aureus Cas9. Nature 2015;520(7546):186-91.
54. Nguyen TH, Anegon I. Successful correction of hemophilia by CRISPR/Cas9 genome editing in vivo: delivery vector and immune responses are the key to success. EMBO Mol Med 2016;8(5):439-41.
55. Jinek M, East A, Cheng A, Lin S, Ma E, Doudna J. RNA-programmed genome editing in human cells. Elife 2013;2:e00471.
56. Chen ZY, He CY, Ehrhardt A, Kay MA. Minicircle DNA vectors devoid of bacterial DNA result in persistent and high-level transgene expression in vivo. Mol Ther 2003;8(3):495-500.
57. Li L, He ZY, Wei XW, Gao GP, Wei YQ. Challenges in CRISPR/CAS9 Delivery: Potential Roles of Nonviral Vectors. Hum Gene Ther 2015;26(7):452-62.
58. Miller JB, Zhang S, Kos P, Xiong H, Zhou K, Perelman SS, et al. Non-Viral CRISPR/Cas Gene Editing In Vitro and In Vivo Enabled by Synthetic Nanoparticle Co-Delivery of Cas9 mRNA and sgRNA. Angew Chem Int Ed Engl 2017;56(4):1059-63.
59. Steyer B, Carlson-Stevermer J, Angenent-Mari N, Khalil A, Harkness T, Saha K. High content analysis platform for optimization of lipid mediated CRISPR-Cas9 delivery strategies in human cells. Acta Biomater 2016;34:143-58.
60. Wang W, Kutny PM, Byers SL, Longstaff CJ, DaCosta MJ, Pang C, et al. Delivery of Cas9 Protein into Mouse Zygotes through a Series of Electroporation Dramatically Increases the Efficiency of Model Creation. J Genet Genomics 2016;43(5):319-27.
61. Nakagawa Y, Sakuma T, Sakamoto T, Ohmuraya M, Nakagata N, Yamamoto T. Production of knockout mice by DNA microinjection of various CRISPR/Cas9 vectors into freeze-thawed fertilized oocytes. BMC Biotechnol 2015;15:33.
62. Ramamoorth M, Narvekar A. Non viral vectors in gene therapy- an overview. J Clin Diagn Res 2015;9(1):GE01-6.
63. Kreiss P, Cameron B, Rangara R, Mailhe P, Aguerre-Charriol O, Airiau M, et al. Plasmid DNA size does not affect the physicochemical properties of lipoplexes but modulates gene transfer efficiency. Nucleic Acids Res 1999; 27(19):3792-8.
64. Yee JK. Off-target effects of engineered nucleases. FEBS J 2016;283(17):3239-48.
65. Kleinstiver BP, Pattanayak V, Prew MS, Tsai SQ, Nguyen NT, Zheng Z, et al. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. Nature 2016;529(7587):490-5.
66. Lin Y, Cradick TJ, Brown MT, Deshmukh H, Ranjan P, Sarode N, et al. CRISPR/Cas9 systems have off-target activity with insertions or deletions between target DNA and guide RNA sequences. Nucleic Acids Res 2014;42(11): 7473-85.
67. Cradick TJ, Qiu P, Lee CM, Fine EJ, Bao G. COSMID: A Web-based Tool for Identifying and Validating CRISPR/Cas Off-target Sites. Mol Ther Nucleic Acids 2014;3:e214.
68. Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. Nat Biotechnol 2013;31(9):827-32.
69. Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. Nat Biotechnol 2013;31(9):822-6.
70. Sayin VI, Papagiannakopoulos T. Application of CRISPR-mediated genome engineering in cancer research. Cancer Lett 2017;387:10-7.
71. Citorik RJ, Mimee M, Lu TK. Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases. Nat Biotechnol 2014;32(11):1141-5.
72. Schwank G, Koo BK, Sasselli V, Dekkers JF, Heo I, Demircan T, et al. Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. Cell Stem Cell 2013;13(6):653-8.
73. Wu Y, Liang D, Wang Y, Bai M, Tang W, Bao S, et al. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. Cell Stem Cell 2013;13(6):659-62.
74. Long C, McAnally JR, Shelton JM, Mireault AA, Bassel-Duby R, Olson EN. Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA. Science 2014;345(6201):1184-8.
75. Niu Y, Shen B, Cui Y, Chen Y, Wang J, Wang L, et al. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. Cell 2014;156(4): 836-43.
76. Bibikova M, Beumer K, Trautman JK, Carroll D. Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. Science 2003; 300(5620):764.
77. Li T, Huang S, Jiang WZ, Wright D, Spalding MH, Weeks DP, et al. TAL nucleases (TALNs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain. Nucleic Acids Res 2011;39(1):359-72.
78. Matano M, Date S, Shimokawa M, Takano A, Fujii M, Ohta Y, et al. Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids. Nat Med 2015;21(3):256-62.

79. Maresch R, Mueller S, Veltkamp C, Öllinger R, Friedrich M, Heid I, et al. Multiplexed pancreatic genome engineering and cancer induction by transfection-based CRISPR/Cas9 delivery in mice. Nat Commun 2016;7:10770.

80. Platt RJ, Chen S, Zhou Y, Yim MJ, Swiech L, Kempton HR, et al. CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. Cell 2014;159(2):440-55.

81. Mazur PK, Herner A, Mello SS, Wirth M, Hausmann S, Sánchez-Rivera FJ, et al. Combined inhibition of BET family proteins and histone deacetylases as a potential epigenetics-based therapy for pancreatic ductal adenocarcinoma. Nat Med 2015;21(10):1163-71.

82. Cyranoski D. CRISPR gene-editing tested in a person for the first time. Nature 2016; 539(7630):479.

83. Malina A, Mills JR, Cencic R, Yan Y, Fraser J, Schippers LM, et al. Repurposing CRISPR/Cas9 for in situ functional assays. Genes Dev 2013;27(23):2602-14.

84. Chen C, Liu Y, Rappaport AR, Kitzing T, Schultz N, Zhao Z, et al. MLL3 is a haploinsufficient 7q tumor suppressor in acute myeloid leukemia. Cancer Cell 2014;25(5): 652-65.

85. Heckl D, Kowalczyk MS, Yudovich D, Belizaire R, Puram RV, McConkey ME, et al. Generation of mouse models of myeloid malignancy with combinatorial genetic lesions using CRISPR-Cas9 genome editing. Nat Biotechnol 2014;32(9):941-6.

86. Kawamura N, Nimura K, Nagano H, Yamaguchi S, Nonomura N, Kaneda Y. CRISPR/Cas9-mediated gene knockout of NANOG and NANOGP8 decreases the malignant potential of prostate cancer cells. Oncotarget 2015;6(26):22361-74.

87. Choi PS, Meyerson M. Targeted genomic rearrangements using CRISPR/Cas technology. Nat Commun 2014;5:3728.

88. Blasco RB, Karaca E, Ambrogio C, Cheong TC, Karayol E, Minero VG, et al. Simple and rapid in vivo generation of chromosomal rearrangements using CRISPR/Cas9 technology. Cell Rep 2014;9(4):1219-27.