



DERLEME
REVIEW ARTICLE
CBU-SBED, 2021, 8(3): 574-580

Gen Terapisinde CRISPR-Cas9

CRISPR-Cas9 In Gene Therapy

Elif Tuğçe Samsunlu^{1*}

¹Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Medikal Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Afyonkarahisar,
Türkiye

e-mail: elifugcesamsunlu@hotmail.com

ORCID: 0000-0001-5443-6430

*Sorumlu yazar/ Corresponding Author: Elif Tuğçe Samsunlu

Gönderim Tarihi / Received: 29.03.2021

Kabul Tarihi / Accepted: 30.07.2021

DOI: 10.34087/cbusbed.905029

Öz

Gen tedavisi, kanser ve genetik bozukluklar olmak üzere birçok ciddi hastalığın tedavisi için umut verici bir teknik olmuştur. Bunun nedenine gelecek olursak semptomları iyileştirmek yerine hastalıkların sebeplerini tedavi etmek için bir çözüm olmuş olmasıdır. Gen terapisi ilk olarak 1990 senesinde başarıya ulaşıp ADA hastalığı görülen bir çocuğun tedavisi için kullanılmıştır. Gen terapisi son on yılda genetik hastalıkları tedavi etmede çığır açan bir yöntem haline gelmiştir. Günümüzde popülaritesini arttırmış olan yöntemlerden biri de CRISPR yani kümelenmiş düzenli aralıklı kısa palindromik tekrarlar olarak isimlendirilir. Aynı zamanda Cas9 nükleazlarını kullanan bir genom düzenleme teknolojisidir. Hedeflenen bölgelerde DNA'da çift sarmallı kopmalar sağlamak için kullanılır. Bu teknoloji DNA parçalarını çıkarmak, değiştirmek veya eklemek içindir. CRISPR/Cas9 etkili bir gen düzenleme aracı olmasının yanı sıra maliyet açısından da uygundur. Çünkü kesme işlemi protein yerine bir RNA dizisi tarafından yönlendirilir. CRISPR/Cas sistemi mekanizmalarındaki kayda değer ilerleme, temel bilim, tarım ve biyoteknoloji üzerindeki potansiyel uygulamalarını anlamamıza yardımcı olmaktadır. Genlerin fonksiyonlarının çözülmesi ve hastalıkların genetik olarak temellendirilmesi ile CRISPR'ın kullanımının artması beklenmektedir. CRISPR ile hastaların sağlık durumları iyileşebilir. Yaşam kaliteleri artabilir. CRISPR teknolojisinin birçok avantajının olması yanı sıra güven ve etik problemlerini de beraberinde getirmiştir. İnsan embriyolarının tedavi amaçlı olarak ya da bilimsel amaçlarla araştırmalarda kullanılması bu etik sorunlardan ilk akla geleni olmuştur. Bu derlemede gen tedavi çalışmaları yapılırken, terapötik ve bilimsel konularla birlikte, etik ve çevresel birçok konu da ele alınmıştır.

Anahtar Kelimeler: CRISPR, CRISPR-Cas9, Gen tedavisi.

Abstract

Gene therapy has been a promising technique for the treatment of many serious diseases, including cancer and genetic disorders. The reason for this is that there has been a solution to treat the causes of diseases rather than cure the symptoms. Gene therapy was first successful in 1990 and was used to treat a child with ADA. Gene therapy has become a groundbreaking method for treating genetic diseases in the last decade. One of the methods that have increased its popularity today is called CRISPR, that is, clustered regularly spaced short palindromic repeats. It is also a genome editing technology that uses Cas9 nucleases. It is used to provide double-strand breaks in DNA at targeted regions. This technology is for removing, replacing or inserting DNA fragments. Besides being an effective gene-editing tool, CRISPR / Cas9 is also cost-effective. This is because the cutting process is directed by an RNA sequence rather than a protein. Significant progress in CRISPR / Cas system mechanisms helps us understand their potential applications in basic science, agriculture and biotechnology. It is expected that the use of CRISPR will increase as the functions of genes are resolved and diseases are genetically based. With CRISPR, the health status of patients can improve. Their quality of life may increase. In addition to the many advantages of CRISPR technology, it has also brought along trust and ethical problems. The use of human embryos in research for therapeutic or scientific purposes has been the first to come to mind of these ethical problems. In this review, while conducting gene therapy studies, many ethical and environmental issues are discussed along with therapeutic and scientific issues.

1. Giriş

Kalıtımın başlıca unsuru olan, özel bir polipeptid zincirinin amino asit dizisini şifreleyen DNA paketine gen denir[1]. DNA çift zincirli yapıda olup şeker ve azot ile birlikte fosfat içeren baz gruplarının toplanması ile meydana gelen kalıtsal bilgiyi içeren moleküldür. DNA üzerindeki belli nükleotid dizilerinin kendilerine özgü işlevleri vardır[2]. Her bir DNA molekülü, nükleotidler olarak adlandırılan molekül ünitelerinin birleşmeleri ile oluşur ve bükülmüş bir merdiven benzeri yapıdadır. Bu yapı fermuarın iki tarafı gibi bir araya gelir. Hidrojen bağlarıyla birbirlerine bağlanan adenin ve timin ile sitozin ve guanin birbirleri ile eşlenir. Böylece her basamak DNA merdivenindeki bir nükleotidin eşleniğidir[3]. Kromozom üstünde lokalize olmuş genler, yaşamın devamı için gereken proteinlerin, enzimlerin, diğer makro ve mikro moleküllerin kodlarını taşıyan DNA dizileridir. Bir kromozom üstünde, prokaryotlarda 2000-3000 ve ökaryotlarda da 50.000-100.000 arası gen bulunmaktadır. Genlerin kromozom üstündeki sayısı ve sırası organizmalara göre belirli düzen ve sıra içindedir. Aynı şekilde büyüklüğü de kodladığı proteinin büyüklüğüne göre değişir. Canlılardaki tüm genetik olayların denetlenmesini, doğru biçimde ilerlemesinin kontrolü genler tarafından sağlanır[4]. Genler; hücre içindeki ve dışındaki görevlerin yerine getirilmesi, hücreler arasında iletişimin korunması ve fiziksel özelliklerin belirlenmesinde görevli olan proteinin sentezlenmesi için gerekli bilgiyi içerir[2]. Aynı zamanda belirli bir proteini yahut bir RNA molekülünü kodlayan bir nükleotid dizisinden meydana gelir[5]. Fakat her amino asidin kodonlarla belirlenmesi, çok sayıda replikasyonların oluşması, yanlış bazların sıralanması veya ortamda mutasyonları indükleyici faktörlerin bulunması mutasyonların gelişmesine sebep olmaktadır[4]. Bu mutasyonlar sonucunda ise geri dönüşümü olmayan hasarlar oluşabilir. Bu hasarların oluşmasını minimum düzeyde tutabilmek için çeşitli tedavi yöntemleri arasında yer alan gen tedavisi günümüzde kullanılmaktadır.

2. Gen Tedavisi

Genetik materyalin bir hastalığın tedavisi için veya bir hastanın klinik durumunu iyileştirebilmek amacı ile hücrelere aktarılması olarak tanımlanmaktadır. Gen tedavisinin asıl amacı, bir vektör aracılığı ile terapötik genin hedef hücrelere aktarılmasıdır[6]. Ayrıca bu tedavi metodu, doğru hücreler fonksiyonları yeniden düzenlemek, hedef hücrelere mutasyona uğramış ya da eksik genlerin yerine iyi olan kopyaları geçirmek, ifadesini normal olan proteine yönlendirmek amaçlarını gütmektedir[7]. Gen tedavisinin başarısının anahtarı, güvenli ve etkili gen sağlama araçları oluşturmaktır[8]. Gen tedavisi teorikte, gerekli proteini ifade edebilmek için eksik bir genin tamamlanmasına veya bir hedef olarak

terapötik tedaviye sahip sahaya özgü gen geliştirme kapasitesi olarak anlaşılmaktadır[9,10]. Pratikte ise hedeflenen hücre çekirdeğine ulaşmak için transgen tarafından doğru biçimde ifade edilmesi gereken bazı engeller sebebiyle kompleks bir işlemdir. Bir transgenin bozulmadan bir hücre çekirdeğine gelmesini sağlamak için, transgeni muhafaza edebilen ve plazma membranından çekirdeğe girebilen bir gen dağıtım sisteminin kullanılması gereklidir[11-13]. Hastalıkların tedavi edilmesi amacıyla bireyin hücrelerine genlerin yerleştirilerek mutasyona uğramış allellerin fonksiyonel alleller ile rotasyon yapması gen tedavisi aracılığıyla gerçekleştirilir[14-16]. Genomun, kalıtımın temel birimi olan DNA bilgisinin ortaya çıkmasından bu yana lokal modifikasyonlar yapma yeteneği bilimin amacı olmuştur[17].

Gen tedavisi için çeşitli yaklaşımlar söz konusudur:

- 1) Kusurlu genin sağlıklı genle yer değiştirmesi,
- 2) Hastalıklarla mücadele için vücuda yeni genin tanıtılması,
- 3) Kusurlu genin, seçici ters mutasyon yoluyla geni onarması
- 4) Anormal genin yerini almak için genom içindeki non-spesifik bir konuma sağlıklı gen eklenmesi yaygın yaklaşımlardan en çok kabul görenidir[18, 19].

Gen tedavisi çalışmalarında rastlanılan en önemli problem; hedef hücrelere DNA moleküllerinin ulaştırılmasıdır. DNA transfeksiyonu, hücrelere DNA'nın girme kabiliyetinin sınırlı olması ve DNA'nın enzimatik bozunmaya uğrama olasılığı sebebi ile çoğunlukla bir vektör yardımıyla gerçekleştirilir. Bunlar, viral vektörler ve non-viral vektörler olmak üzere iki gruptan oluşmaktadır. Başta gelen viral vektörler; herpes simpleks virüs, retrovirüs, adenovirüs ve adeno-ilişkili virüstür. Blaese ve arkadaşları, 1990 yılında adenozin deaminaz eksikliği (ADA) hastalığının tedavisi için retrovirüs aracılı aktarımı ile ilk başarılı gen tedavisi olarak tarihe geçmiştir[20]. Viral olmayan vektörler ise fiziksel ve kimyasal yöntemler olarak ikiye ayrılırlar. Fiziksel yöntemler; mikroenjeksiyon, gen tabancası, elektroporasyon, sonoporasyon, lazer ışınması ve magnetofeksiyondur. Kimyasal yöntemler de lipozomları kapsamaktadır[21]. Genlerin hedef hücreye transfer edilmesi, ex vivo ya da in vivo gerçekleştirilmektedir[22-25]. Gen tedavisi, somatik hücre gen tedavisi ve germ hücre gen tedavisi olarak değişime uğrayan hücrelerin tipine göre iki ana sınıfa ayrılır[25].

2.1. Somatik Hücre Gen Tedavisi

Somatik hücre gen tedavisi çalışmalarında, tedavi edici gen kalıtsal hücreler hariç somatik hücrelere nakledilir. Bu gen tedavisi kategorisinde hastanın deri, kemik iliği ve kan hücrelerine gen transferi yer alır. Gen tedavisinin farklı etkileri ve genler düzeyinde yapılan değişiklikleri gelecek nesillere

aktarılmaz[26]. Tedavi edici genin somatik hücrelerde yaptığı değişiklik yalnızca ilgili bireyi etkilemektedir. Bu tedavide amaç, hastalığın iyileşmesi için hedef hücrelerde ya da dokularda genetik değişimlere sebep olmaktır. Bu yöntem gen tedavisinde tercih edilmektedir[27]. Gelecek nesilleri etkilemeden yalnızca bireyin genomunda değişiklik oluşturulmaktadır, kalıtsal değildir. Somatik hücreye uygulanan gen tedavileri dört gruptan oluşmaktadır:

1) *Gen ilavesi*: Kusurlu genin fonksiyonel kopyasının ve mutasyona uğramış genin kaldırılmadan işlevsel gen eklenmesi hedeflenmektedir.

2) *Gen değişimi*: Mutasyona uğramış genin fonksiyonel kopyasıyla değiştirilmesi sonucu mutasyonun doğrudan ilgili dokuya iletilmesidir.

3) *Gen ekspresyonunun baskılanması*: Hedef patojenin fonksiyonunun baskılanmasıdır.

4) *Spesifik hücrelerin öldürülmesi*: Ön ilaç tedavisi de denilmektedir, ön ilaç vücuda verilirken, ilacı aktive eden enzimi kodlayan gen hastalıklı hücrelere transfer edilmektedir.

Günümüzdeki tüm gen tedavisi denemeleri ve protokolleri somatik hücre tedavileri için yapılmıştır[22].

2.2. Germ Hücre Gen Tedavisi

Germ hücre gen tedavisinde, tedavi edici gen yumurtalık, sperm hücreleri gibi kalıtsal hücrelere aktarılır. Bu gen tedavisi ile oluşan değişiklikler nesiller boyunca aktarılmaktadır. Erken embriyonik dönemde değişiklikler yapılabilmektedir, kalıtsaldır[23, 27-29]. Çekirdek gen transferi sadece mitokondrial hastalıklar için etik açıdan kabul görmektedir. İn vitro fertilizasyonu amaçlayan bu süreçte bütün hücrelerin çekirdekleri izole edilerek, mitokondri DNA'sı çekirdeği çıkarılmış yumurta hücrelerine yerleştirilmektedir. Bu yöntem teknik açıdan klonlamadır[22]. Bu yaklaşım teorik genetik hastalıklar ve kalıtsal bozukluklarda oldukça etkili olduğu belirtilmektedir[29]. Çoğu ülkede gelecek nesilleri etkilemesi nedeniyle germ hücre tedavisi etik açısından yasaklanmıştır[23].

3. Gen Tedavisinde Geline Nökt

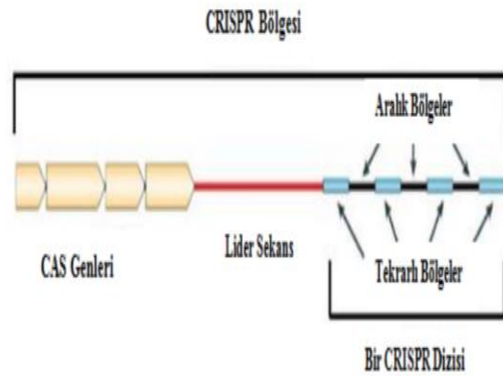
Gen tedavisi söz konusu olduğunda globalleşen dünyada, insanların inançları ve kaygılarına saygı duymak önemli bir gerekliliktir. Germline hücrelerinde, şiddetli bağışıklık tepkileri ve genom manipülasyonu konusunda büyük endişeler vardır[10]. Bu nedenle günümüzde, var olan yasal düzenlemeler gen tedavisinin yalnızca somatik hücrelere yapılmasına izin vermektedir[30]. Somatik hücrelerde yapılan in vivo çalışmalar, klinik çalışmalarda onaylanmış protokollerle tatmin edici sonuçlar doğurmuştur. İnsan somatik hücrelerinin genom modifikasyonu, hâlâ kullanımda olan veya klinik uygulamalar için geliştirilmekte olan mevcut gen tedavisi tekniklerinin etkinliğini ve güvenliğini arttırmak için birçok hastalığın önlenmesinde ya da tedavisinde yararlı olabilir[31]. Yakın gelecekte gen tedavisi, farklı hastalık çeşitleri için standart bir tedavi halini alabilecek, terapötik potansiyeli çok yüksek bir

yaklaşımdır. Buna karşın tedavi amaçlı yapılan denemeler sonucunda birçok güven ve etik problemleri ile karşılaşmıştır. Tartışmaya açık bir yaklaşım olması, gen tedavisine karşı oluşan belirsizliklerin ve beklenen sonuçların ortaya çıkarılması bakımından çok fazla önem taşımaktadır[30]. Geleneksel gen tedavisi, terapötik transgenlerin viral vektör aktarımına dayanması hem yerleştirme onkogeneze hem de immünojenik toksisiteye sebep olabileceğinden bazı endişeleri artırmıştır. Viral vektörler önemli bir dağıtım aracı olarak kalırken, CRISPR teknolojisi, bölgeye özgü gen düzenleme için nispeten basit ve verimli bir alternatif sunarak geleneksel gen tedavisinin ortaya çıkardığı bazı endişeleri ortadan kaldırır.

Görünür avantajları olmasına rağmen CRISPR-Cas9, güvenli ve verimli klinik çeviri için ele alınması gereken kendi sınırlamalarını da beraberinde getirir[32]. Karaciğer hastalarında indüklenmiş pluripotent kök hücreler, kimerik antijen reseptörü T hücreli immünoterapi ve CRISPR-Cas9 ile genomik düzenleme gibi yeni biyoteknolojik gelişmeler ele alınmıştır. Bu çalışmalar Amerika Birleşik Devletleri, Avrupa, Avustralya ve Çin'de gerçekleştirilmiştir[10]. 2003 yılında gen tedavisi için hazırlanan bir ilacın klinik uygulamasını kabul eden ilk ülke Çin olmuştur[30]. Klinik uygulamalarına sayısal açıdan baktığımızda ise gen tedavisinde en fazla çalışma Amerika Birleşik Devletleri tarafından yapılmıştır. ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) 2025 yılına kadar yılda 10-20 tane yeni gen tedavisi ilaçlarının üretileceğini ve piyasaya çıkacağını tahmin etmektedir[33]. Bu gen tedavi ilaçları ve teknolojileri, küresel sağlık yönetimini de geliştirme ve değiştirme potansiyeline sahiptir. Tabii ki gen düzenleme teknikleri biyolojik çeşitlilikleri ortadan kaldıramaz, fakat cinsiyetler arasında eşitlik sağlamak için bir grup üstündeki potansiyel zararlı etkileri, onları doğru biçimde dikkate alan bir araştırma stratejisiyle engellenebilir[31].

4. CRISPR Ve Gen Tedavisindeki Rolü

CRISPR, düzenli aralıklarla bölünmüş kısa palindromik tekrar kümeleridir, Cas 9 ise CRISPR



ilişkili arkeal ve bakteriyel nükleaz 9'dur. Özgül bir

genomik bölgeye hedeflenen Cas9 nükleaz enziminin kullanıldığı, kılavuz RNA (sgRNA) ile de genom düzenleme sistemi CRISPR-Cas9 oluşturulmuştur[34](Şekil 1).

Şekil 1. CRISPR bölgesinin bakteriyel kromozomdaki yapısı[38]

Bu sistemin en önemli avantajlarından biri, homolog genlerin tek bir kılavuz RNA ile eş zamanlı susturulabilmesidir[35,36]. CRISPR teknolojisinden yararlanabilmek için de Cas9 olarak isimlendirilen DNA endonükleaz ve genomda hangi bölge hedeflendirilecek ise ona göre dizaynı yapılan 20 nükleotidlik bir RNA dizini yeterli görülmektedir[37].

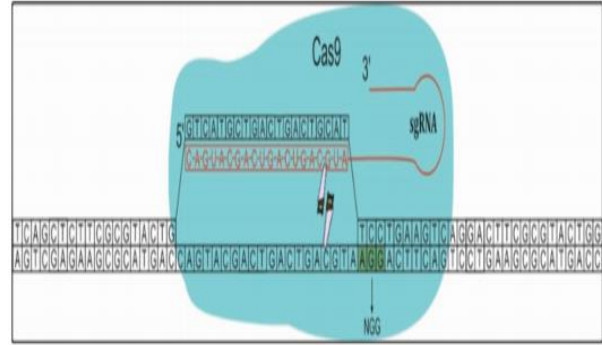
Bir genom düzenleme aracı haline getirilmesi ile CRISPR-Cas9 nükleazları ilk defa moleküler biyoloji alanında kullanılmış ve bu alanda devrim yaratmıştır[39]. CRISPR-Cas9 genom düzenleme aracının bu büyük başarısının ardında CRISPR-Cas9 aracılı DNA kırılmalarının yüksek özgüllük ve verimlilikte olması buna ek olarak Cas9'u istenilen DNA lokusuna hedefleyen kılavuz RNA'nın tasarımının sadeliği yatmaktadır. CRISPR-Cas9 sistemi, bölgeye özgü nükleazlar kullanarak çeşitli hücrelerin ve organizmaların tüm genomlarını değiştirmektedir[40].

CRISPR-Cas9 tabanlı genom düzenleme, kardiyovasküler hastalıklar, nöronal bozukluklar ve kanserler de dahil olmak üzere insan genetik hastalıklarının tedavisi için en umut verici araçlardan biri haline geliyor. Genomu düzenleme, genetik bozukluklarını, özellikle nokta mutasyonlarıyla ilişkili hastalıkları incelemek ve tedavi etmek için de sağlam bir araçtır[41]. Yakın zamanda yapılan bazı çalışmalarda, örneğin; kanser immunoterapisi, Orak hücre anemisi (SCD), β -talasemi, hemoglobinopatiler, ex vivo somatik ve uyarılmış pluripotent kök hücrelerinde, in vivo hayvan modellerinde ve hastalığa sebep olan allellerin düzenlenmesinde CRISPR-Cas9 sistemi başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Terapötik genom düzenlenmesinin klinik çalışmaları için de umutları arttırmıştır[42].

Tasarlanmış kılavuz RNA'larla sekans tamamlayıcılıklarına dayanarak son yıllarda, binlerce çalışma transkripsiyonel olarak ya da kişiye özgü genetik lokusları düzenlemek için CRISPR-Cas9 teknolojilerini kullanmıştır[43]. Etkili bir genom düzenleme aracı olarak CRISPR-Cas9'un yüksek yeterliliği ve düşük maliyeti düşünüldüğünde, yakın gelecekte genetik olarak tasarlanmış bir dizi biyomedikal, tarım ve hayvancılık ürünlerinin üretilmesi muhtemeldir. Bu nedenle genom düzenleme teknolojilerinin artılarını ve eksilerini kapsamlı bir şekilde değerlendirmek önemlidir[40]. İnsan genomunu düzenlemek ve insan hastalıklarını tedavi etmek ve için CRISPR-Cas9'un birçok potansiyeli mevcuttur. Bunlar; genetik hastalıkların

mekanizmalarının tanımlanması ve anlaşılması, hastalık hedeflerinin doğrulanması, hayvan hastalıkları modellerinin geliştirilmesi, bitkilerde genetik mühendisliğinin kolaylaştırılması gibi pek çok alanda biyolojik araştırmaların hızını değiştirmiştir[44,45].

Yeni CRISPR-Cas9 teknolojisinin belli hedef DNA sekanslarını tanımlamaya izin verdiğini ve müdahalenin amacına bağlı olarak hastalıkla ilişkili DNA özelliklerini ve yeni DNA sekanslarını ekleyip silebilmektedir. Önce kullanılan benzer teknolojilerin aksine, değişik elementlerin hızlı ve güvenilir bir biçimde kurulabileceği göz önüne alındığında, kullanımı kolay bir sistemdir[46](Şekil 2).



Şekil 2. DNA'nın CRISPR sistemiyle kesilmesi[37]

CRISPR-Cas9 sistemi, sunduğu devrim niteliğindeki avantajlara rağmen, bu teknolojilerin etkinliği ve güvenliği için bazı zorluklar devam etmektedir. Örneğin, in vivo veya ex vivo düzenleme sırasında hücrelerdeki Cas nükleaz aktivitesi, hedef dışı etkilere, hücre toksisiteye ve immünojeniteye yol açabilir. Bunların hepsinin güvenli genom düzenleme uygulamalarının geliştirilmesi için ele alınması gerekir[46]. Bu yeni teknolojilerin geliştirilmesi, çok farklı bilim adamlarının yönlendirmesi ile günlük çalışma ve araştırmalar çeşitli uygulamalara yol açmıştır[47]. CRISPR-Cas9 gen terapisi için daha fazla araştırmaya, yüksek spesifik gRNA'lar tasarlayarak ve Cas enzimlerinin yüksek özgüllüğünü kullanarak bu etkileri sınırlamaya odaklanılmalıdır[41].

5. CRISPR'ın Geleceği Ve Etik Sorunlar

Genom düzenleme teknikleri, hastalıkla ilişkili sekansların hastalığa neden olan proteinler üretmesini engelleyerek DNA seviyesinde genetik hastalığın tedavisi için umut vaat etmektedir. Şu anda, bilim adamları değiştirmek istedikleri geni seçebilir, Cas9'u kesmek için bir "moleküler kesici" olarak kullanabilir ve daha arzu edilen bir versiyona dönüştürebilir[48]. Genlerin fonksiyonlarının çözülmesi ve hastalıkların genetik olarak temellendirilmesi ile CRISPR'ın kullanımının artması beklenmektedir. Hastaların sağlık durumları CRISPR ile iyileşebilir ve yaşam kaliteleri artabilir. İnsanlar çevre koşullarının düzelmesi ve yaşam kalitesinin artması ile de daha

fazlasını isteyebilirler. Daha zeki, daha güçlü, daha uzun, X hastalığına karşı dirençli olmak ya da çocuklarında farklı özelliklerin olmasını istemek gibi. Bu da CRISPR'ın preimplantasyon öncesinde kullanım alanlarında değişiklikler meydana getirecektir. Yalnızca tedavi olmayacak bunun yanında yapay seçilim de olacaktır. Hatta yumurta, sperm ve para verdikten sonra bebek, istenilen özelliklere göre sipariş edilebilecektir. Gelecekte ise bebek sepeti, genom bank vb. kurumlar kurulabilir. Bu nedenle de ciddi etik tartışmalara yol açacak gibi görünmektedir. CRISPR'ın mitokondriyal DNA'da kullanılarak hatalı gen veya bazı çıkarılması ile şimdilerde güncel olarak tartışılan 3 ebeveynli bebek konusunda da ilerleyen zamanlarda tamamen bu etik sorunu ortadan kaldıracaktır[49]. Embriyo kök hücreleri ile yapılacak çalışmalar, günümüzde tedavisi imkânsız nörodejeneratif hastalıklardan Alzheimer, Parkinson hastalığı, Multiple Skleroz, kemik ve kırıkda hastalıkları, enfarktüs gibi çok sık görülen hastalıklarla mücadele etmede önemli çözümler gösterebilecek bir metot olmaya adaydır. Diğer taraftan, insan embriyolarının bir araç olarak görülmesi, hastalıklar ile mücadele amaçlı bile olsa bu tür tıbbi uygulamaların yaygınlaşabileceği dünya genelindeki etik kaygıları meydana çıkarmıştır[50,51].

Etik tartışmalar iç içe girmiş iki noktanın üzerinde odaklanmıştır bunlardan ilki; tedaviye yönelik ya da bilimsel çalışmalarda kullanılmak amacıyla insan embriyolarının üretilmesinin diğeri ise insan embriyolarının kullanılmasının etik açıdan kabul edilebilir olup olmadığıdır. Farklı ülkelerdeki hukuksal yaptırımlara bakıldığında, kabul edilebilirlik skalası geniştir. Örneğin, İrlanda'da embriyo kullanılarak araştırma yapmak kanunlara göre uygun bulunmamıştır ve embriyonun yaşama hakkı anneye eş değer olarak kabul edilmiştir. İspanya'da fazla üretilmiş ancak anneye transferi düşünülmemeyen ve hayatlarına son verilen embriyoların tüp bebek araştırmaları amacıyla kullanılmasına izin verilmiştir. Bu araştırmalar, embriyonun oluşturulmasını isteyen çiftlerin izinleri alınarak yapılmalıdır. İngiltere'de ise embriyo kök hücreleri araştırmaları ve tedavi amaçlı insan klonlanması çalışmalarına en çok serbestlik sağlayan ülke olmuştur. 1990'da çıkan İnsan Dölleni ve Embriyoloji Yasası, tedavi amaçlı olarak insan embriyolarının üretilmesine izin veren bir yasa olmuştur[50].

6. Sonuç

Gen tedavisinin kabul edilebilir olması için yapılan çalışmaların sonucunda öğrenilen bilgiler erişilebilir olmalıdır. Sonuç olarak, gen tedavi çalışmaları yapılırken, gen tedavisinin geleceği, uygulanabilirliği ve kabul edilebilirliği için terapötik ve bilimsel konularla birlikte, etik ve çevresel birden fazla konuyu da kapsayan sorulara yanıt aramaya çalışmak izlenilmesi gereken yol

olmalıdır. Klinik ya da prelinik denemelerde kullanılan gen tedavi protokolleri, yıllardır süre gelen çalışmalar ve beraberindeki tartışmalara rağmen, oldukça umut vadeden sonuçlar doğurmaktadır. Rejeneratif tıp alanında, gen ve hücre tedavilerinde kullanılabilecek güçlü bir potansiyel araç olarak kabul edilmiş ve hastaya özel tedavi geliştirilmesi için somatik hücrelerin yeniden programlanabilmesi bir dönüm noktası olmuştur[30].

CRISPR-Cas9, programlanabilir gen düzenleme için kapsamlı fırsatlar sağlar ve modern tıp için güçlü bir varlık haline gelmektedir. Bununla birlikte, geleneksel gen terapisinden öğrenilen dersler, olumsuz olaylardan ve klinik olarak yararlı olabilecek benzersiz bir teknolojinin geliştirilmesindeki aksaklıklardan kaçınmak için CRISPR sistemleriyle ilerlemede daha fazla dikkat göstermelidir. Bu derslerin dikkate alınmaması, CRISPR-Cas9 gelişimine karşı daha fazla tepkiye neden olabilir ve potansiyel olarak iyileştirici gen düzenleme teknolojilerine ulaşma yolunda ilerlemeyi yavaşlatabilir[32].

Sentetik biyoloji alanında CRISPR genom düzenleme sistemi, son 30 yılın en iyi gelişmesi olarak isimlendiriliyor. CRISPR-Cas9 sistemi, DNA'yı daha kolay ve daha hassas bir biçimde düzenleyebildiği gibi, önce geliştirilen gen düzenleme sistemleriyle kıyaslandığında daha az maliyetle ve zamanda hastalık mutasyonlarını tamir edebilme ya da silbilme kabiliyetine de sahiptir. Bu nedenle, tıbbi terapi çalışmalarında da başrol olmayı başarmıştır[52].

CRISPR-Cas9 sistemi kullanılmasıyla daha etkili ve kesin sonuç alınabilecek genom modifikasyonu için bu teknolojinin optimize edilmesine yönelik çalışmalar sürdürülmekte olup her geçen gün yenileri ilave edilmektedir[37]. Yeni ve güçlü bir gen düzenleme aracı olan CRISPR-Cas9 sistemi, spesifik yöntemler sayesinde insan hücrelerinin genomlarını düzenlemek için devrim yaratarak insan gen terapi çalışmalarına yarar sağlamaktadır[31]. Ayrıca şu günlerde genom modifikasyonu çalışmalarının gündemde olduğu Çin'de ise CRISPR yöntemi ile HIV virüsüne karşı dayanıklı hale getirilmiş olan bebeklerin Dünya'ya gelmesi konusuna ilgili tartışmalarda artarak devam etmektedir. Gelecekte olabilecekler düşünüldüğünde bu tedavi metodunun çok fazla alanda çığır açacak bir teknik olduğu belli fakat bir kısım endişeleri de ortaya çıkarmaktadır[49,32]. Endişelerinde ortadan kalkıp kalkmayacağını da zaman gösterecek olup bu teknolojiyle yapılacak olan çalışmaların daha fazla artması bizleri aydınlatacaktır.

Referanslar

1. Özkul, Y, Moleküler Hematoloji Sözlüğü, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Kayseri, 2007.
2. Anonim, Gen İfadesi Nedir? <http://www.bilimgenc.tubitak.gov.tr>, (Erişim Tarihi: 08.12.2019).
3. Anonim, What is a Gene? <https://genetics.thetech.org/about-genetics>, (Erişim Tarihi: 08.12.2019).

4. Arda, M, Bölüm 2: Genel Bakteriyoloji, 12-Genler ve Fonksiyonları, Genlerin Yapısı, Temel Mikrobiyoloji Kitabı, Medisan Yayınevi, 4. Baskı, 2011, 117.
5. Anonim, DNA, Genes And Chromosome, www2.le.ac.uk/projects/vgec/highereducation/topics, (Erişim Tarihi: 08.12.2019).
6. Rashnonejad, A, Durmaz, B, ve ark, Gen Tedavisinin Temel İlkeleri Ve Son Gelişmeler, *Ege Tıp Dergisi*, 2014, 53(4), 231-240.
7. Mehier-Humbert, S, Guy, R.H, Physical Methods For Gene Transfer: Improving The Kinetics Of Gene Delivery Into Cells, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005, 57, 733-753. Doi:10.1016/j.addr.2004.12.007.
8. Ibraheem, D, Elaissari, A, et al, Gene Therapy And DNA Delivery Systems, *International Journal of Pharmaceutics*, 2014, 459, 70-83.
9. Zhang, S, Xu, Y, et al, Cationic Compounds Used In Lipoplexes And Polyplexes For Gene Delivery, *Journal of Controlled Release*, 2004, 100, 165-180.
10. Gonçalves, G.A.R, Paiva, R.M.A, Gene Therapy: Advances, Challenges And Perspectives, *Einstein*, 2017, 15(3), 369-75.
11. Wong, S.Y, Pelet, J.M, et al., Polymer Systems For Gene Delivery-Past, Present, And Future, *Progress in Polymer Science*, 2007, 32, 799-837.
12. Luo, D, Saltzman, W.M, Synthetic DNA Delivery Systems, *Nature Biotechnology*, 2000, 18, 33-37.
13. Gao, X, Kim, K.S, et al, Nonviral Gene Delivery: What We Know And What Is Next, *The AAPS Journal*, 2007, 9, E92-E104.
14. Friedmann, T, Robin, R, Gene Therapy For Human Genetic Disease? *Science*, 1972, 175, 949-55.
15. Bayertz, K, Paslack, R, et al, Summary Of Gene Transfer Into Human Somatic Cells, State Of The Technology, Medical Risks, Social And Ethical Problems: A Report, *Human Gene Therapy*, 1994, 5, 465-8.
16. Al, D.M.S, Gao, X, Nonviral Gene Delivery: Principle, Limitations, And Recent Progress, *The AAPS Journal*, 2009, 11, 671-81.
17. Tebas, P, Stein, D, et al, Gene Editing Of CCR5 In Autologous CD4 T Cells Of Persons Infected With HIV, *The New England Journal of Medicine*, 2014, 370(10), 901-10.
18. Patil, P.M, Chaudhari, P.D, et al, Review Article On Gene Therapy, *International Journal Of Genetics*, Issn: 0975-2862 & E-Issn: 0975-9158, Volume 4, Issue 1, 2012, 74-79.
19. Anonim, Gene Therapy The Genetics Home Website. <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/therapy/genetherapy>, (Erişim Tarihi: 15.01.2020).
20. Şimşek, F, Gen Tedavisi. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatri AD, Ankara, *Türkiye Klinikleri Pediatri Dergisi*, 1997, 6, 81-86.
21. Attar, A, Gen Tedavisi Yöntemleri: Fiziksel ve Kimyasal Metotlar, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 2017, 74(1), 103-112. Doi: 10.5505.
22. Günel Özcan, A, Gen Tedavisi Ve Biyogüvenlik, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 2007, 64: 35-50.
23. Soofiyani, S.R, Baradaran, B, et al., Gene Therapy, Early Promises, Subsequent Problems, And Recent Breakthroughs, *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 2013, 3, 249-55.
24. Gupta, K, Singh, S, et al., Gene Therapy In Dentistry: Tool Of Genetic Engineering, Revisited, *Archives of Oral Biology*, 2015, 60, 439-46.
25. Kasımoğlu, Y, Koruyucu, M, ve ark, Diş Hekimliğinde Gen Tedavisi, *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, Cilt:29, Sayı:4, 2019, 691-700, Makale Kodu: 3561.
26. Haritha, P.N, Devi, S.K.U, et al., Gene Therapy-A Review, *International Journal of Biopharmaceutics*, 2012, 3(1), 55-64.
27. 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 Germline Genetics Modifications-Assessing The Scientific, Socioethical, And Religious Issues, *Southern Medical Journal*, 2007, 100, 98-100.
29. Misra, S, Human Gene Therapy: A Brief Overview Of The Genetic Revolution, *JAPI: Journal of the Association of Physicians of India*, 2013, 61, 127-33.
30. Şanlıoğlu, S, Gen Tedavisi, Tıbbi Genetik ve Klinik Uygulamaları, Bölüm 20, Cilt 1, 2016, 508.
31. Zullo, S, Caenazzo, L, Gene Editing And Gender-Specific Medicine: A Challenge For Dementia Research, *Palgrave Communications*, Volume 6, Article number: 39, 2020. <https://doi.org/10.1057/s41599-020-0416-5>.
32. Uddin, F, Rudin, C.M, et al., CRISPR Gene Therapy: Applications, Limitations, and Implications for the Future, *Frontiers in Oncology*, Volume 10, Article 1387, 2020. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01387>.
33. Dedeoğlu, Y, Gen Tedavisi Tarihsel Bir Bakış ve Gelecekteki Beklentiler, <https://populerbiyoloji.com>, (Erişim Tarihi: 08.12.2019).
34. Bozok Çetintaş, V, Kotmakçı, M, ve ark, Bağışıklık Yanıtından Genom Tasarımına; CRISPR-Cas9 Sistemi, *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 2017, 37(1), 27-42.
35. Endo, M, Mikami, M, et al, Multigene Knockout Utilizing Off-Target Mutations Of The CRISPR/Cas9 System in Rice, *Plant and Cell Physiology*, 2015, 56(1), 41-47.
36. Zhang, D.D, Li, Z.X, et al, Targeted Gene Manipulation in Plants Using the CRISPR/ Cas Technology, *Journal of Genetics and Genomics*, 2016, 43(5), 251-62.
37. Akbudak, M.A, Kontbay, K, Yeni Nesil Genom Düzenleme Teknikleri: ZFN, TALEN, CRISPR'lar ve Bitkilerde Kullanımı, *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 2017, 26 (1), 111-126.
38. Anonim, "Six Questions About CRISPRs, Microbial Embraces", <http://schaechter.asmblog.org/schaechter/2011/04>, (Erişim Tarihi: 20.01.2016).
39. Taylor, D.W, The Final Cut: Cas9 Editing, *Nature Structural & Molecular Biology*, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41594-019-0267-1>.
40. Ahmad, H.I, Yasir, M, et al, CRISPR/Cas9 System: A Broadly Applicable Tool For Targeted Genome Engineering, *Journal Innovation Bio-Research*, 2017, 1(1), 13-23.
41. Zhang, B, CRISPR/Cas Gene Therapy, *Journal of Cellular Physiology*, 2020, 1-23.
42. Gün Gök, Z, Çağdaş Tunali, B, CRISPR-Cas İmmün Sisteminin Biyolojisi, Mekanizması ve Kullanım Alanları, *Uluslararası Mühendislik Araştırma ve Geliştirme Dergisi*, Cilt/Volume:8, Sayı/Issue:2, 2016.
43. McCarty, N.S, Graham, A.E, et al, Multiplexed CRISPR Technologies For Gene Editing And Transcriptional Regulation, *Nature Communications*, 2020, 11, 1281. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15053-x>.
44. Scott, A, How CRISPR Is Transforming Drug Discovery, *Nature*, 2018, 555, 10-1.
45. Wilkinson, R.A, Martin, C, et al, CRISPR RNA-Guided Autonomous Delivery Of Cas9, *Nature Structural & Molecular Biology*, 2019, 26, 14-24.
46. Marino, N.D, Redondo, R.P, et al, Anti-CRISPR Protein Applications: Natural Brakes For CRISPR-Cas Technologies, *Nature Methods*, Volume 17, 2020, 471-479.
47. Zhang, F, Wen, Y, et al, CRISPR/Cas9 For Genome Editing: Progress, Implications And Challenges, *Human Molecular Genetics*, 2014, 15(2), 40-46.
48. Ahmad, H.I, Ahmad, M.J, et al, A Review of CRISPR-Based Genome Editing: Survival, Evolution and Challenges, *Current Issues in Molecular Biology*, 2018, 28, 47-68.
49. Altınbaş, I.D, Engin, A.S, ve ark, Genom Düzenleme ve CRISPR Teknolojisi, <http://www.yesilscience.com/tr/bilim>, (Erişim Tarihi: 03.02.2020).
50. McCall-Smith, A, Revel, M, UNESCO Report Of The IBC On The Ethical Aspects Of Human Embryonic Stem Cell Research, *The Use Of Embryonic Stem Cells In Therapeutic Research*, 2001, BIO-7/00/GT-1/2 (Rev. 3) Paris.
51. Matur, İ, Solmaz, S, Kök Hücre Üretiminde Güncel Yaklaşımlar, *Arşiv*, 20, 2011, 168.
52. Taştan, C, Biyoendüstri 2.0: CRISPR Genom Modifikasyonu, *Popular Science*, 2017, 98-100.

<http://edergi.cbu.edu.tr/ojs/index.php/cbusbed> isimli yazarın CBU-SBED başlıklı eseri bu Creative Commons Atıfı-GayriTicari4.0 Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.

