



CRISPR-CAS UYGULAMALARI, POTANSİYEL RİSKLER VE YASAL DÜZENLEMELER

Özge KILIÇ TOSUN* Zülal KESMEN

Erciyes Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Kayseri, Türkiye

MAKALE BİLGİSİ

Geliş tarihi: 24 Kasım 2022
Düzeltilme tarihi: 24 Aralık 2022
Kabul tarihi: 26 Aralık 2022

Anahtar Kelimeler:
CRISPR-CAS, etik, potansiyel riskler, yasal düzenleme

Keywords:
CRISPR-Cas, ethic, potential risks regulation

ÖZET

CRISPR-Cas teknolojisi, canlı bir organizmanın genomunu, endojen genlerin modifikasyonu veya eksojen genlerin entegrasyonu ile düzenleyen bir genetik mühendisliği tekniğidir. Prokaryotlardaki adaptif bağışıklıktan sorumlu olan CRISPR-Cas sisteminin keşfi ve bir genom düzenleme aracına dönüştürülmesi genetik mühendisliği alanında devrim etkisi yapmıştır. CRISPR-Cas sisteminde CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) “kümelenmiş düzenli aralıklı kısa palindromik tekrarlar” olarak adlandırılan bir seri DNA dizisini, Cas (CRISPR-associated protein) ise spesifik DNA zincirlerini tanımak ve kesmek için CRISPR dizilerini bir kılavuz gibi kullanan endonükleazları tanımlamaktadır. CRISPR-Cas teknolojisini, önceki tekniklerden farklı kılan, hemen her organizmanın genomuna kolaylıkla uygulanabilen hassas, verimli ve düşük maliyetli bir yöntem olmasıdır. Keşfinden günümüze kadar geçen süreçte bu teknolojinin tıp, biyomedikal, tarım ve hayvancılık gibi pek çok alanda kullanılabilir umut verici bir araç olduğu kanıtlanmıştır. Öte yandan CRISPR-Cas teknolojisinin geniş uygulama potansiyeli, kolaylığı ve düşük maliyeti, kötü amaçlarla veya sorumsuzca kullanılma olasılığını artırmaktadır. Bu teknolojinin negatif yönlü kullanım olasılığı ve yaşanabilecek teknik başarısızlıklar, başta germ hattı genom düzenlemeleri olmak üzere birçok alandaki uygulamalarına yönelik etik ve ahlaki kaygıları artırmış ve biyogüvenlik tartışmalarını gündeme getirmiştir. CRISPR-Cas ve diğer genom düzenleme tekniklerinin kullanımına yönelik politikalar ülkeden ülkeye farklılık göstermekle birlikte birçok ülkede genom düzenlemelerini özel olarak ele alan yasal bir mevzuat henüz bulunmamakta veya geliştirilme aşamasındadır. Bu derleme çalışmasında, CRISPR-Cas teknolojisinin temel mekanizması açıklanarak tıp, biyomedikal, tarım ve hayvancılık gibi çeşitli alanlardaki uygulamalarına örnekler verilmiş ve potansiyel riskler ile farklı ülkelerdeki yasal düzenlemeler üzerinde durulmuştur.

CRISPR-CAS APPLICATIONS, POTENTIAL RISKS and LEGAL ARRANGEMENTS

ABSTRACT

CRISPR-Cas technology is a genetic engineering technique that edits the genome of a living organisms by modification of endogenous genes or integration of exogenous genes. The discovery of the CRISPR-Cas system, which is responsible for adaptive immunity in prokaryotes, and its conversion

*Sorumlu Yazar: Özge KILIÇ TOSUN, E-mail: ozge.kilic@omu.edu.tr, Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-2024-6959>
Zülal KESMEN Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-4505-6871>

into a genome editing tool revolutionized genetic engineering area. In the CRISPR-Cas system, CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) defines a series of DNA sequences called "clustered regularly spaced short palindromic repeats" while Cas (CRISPR-associated protein) describes endonucleases that use CRISPR sequences as a guide to recognize and cleave specific strands of DNA. The difference between CRISPR-Cas technology from previous techniques is that it is a sensitive, efficient, and low-cost method that can be easily applied to the genome of almost all organisms. It has proven to be a promising tool that can be used in many areas such as medicine, biomedicine, agriculture, and animal husbandry, from its discovery to the present time. The wide application potential, simplicity, and low cost of CRISPR-Cas technology increase the possibility of malicious or irresponsible use. The possibility of negative use of this technology and potential technical failures has increased ethical and moral concerns about its applications in many areas, especially in germline genome editing, and made biosecurity discussions a current issue. Policies for the use of CRISPR-Cas and other genome editing techniques vary from country to country, but many countries do not yet have legislation that specifically for genome editing or is under development. In this review, the mechanism of the CRISPR-Cas system is described, examples of applications in medicine, biomedicine, agriculture, and animal husbandry are presented, and their potential risks and legal regulations in various countries are emphasized.

1. Giriş

Tüm organizmalar; kendi yaşamını bağımsız olarak sürdüremeyen virüsler gibi yabancı genetik elementlerin potansiyel hedefleridir. Organizmalar, özellikle litik virüsler tarafından istila edildiğinde, metabolizmaları ciddi derecede etkilenmekte ve bu süreç genelde konak hücrenin parçalanmasıyla son bulmaktadır. Doğada patojenlerin istilasına uğrayan konak hücreler, kendilerini korumak için iki farklı bağışıklık sistemi geliştirmiştir. Genetik olarak kodlanan ve patojenlere karşı genel bir mekanizma ile koruma sağlayan bağışıklık sistemi ‘doğuştan gelen bağışıklık’ olarak tanımlanırken, patojenik etkene karşı özel olarak oluşturulan bağışıklık yanıtıyla karakterize edilen immünolojik hafıza yeteneğine ‘adaptif (edinilmiş) bağışıklık’ adı verilmektedir (Van der Oost vd.,2009; Birkard ve Marraffini, 2012).

CRISPR-Cas sistemi, bakterilerin (~%47) ve arkelerin (~%87) büyük kısmında tanımlanmış, hücreye yabancı genetik elementlere karşı korunma sağlayan adaptif bir bağışıklık sistemidir (Barrangou vd.,

2007). CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) düzenli aralıklarla bölünmüş palindromik tekrar kümelerini, Cas (CRISPR associated protein) ise CRISPR sisteminde yabancı DNA’nın tanınması ve parçalanması aşamalarında görev alan enzimleri tanımlamaktadır (Wilkinson ve Wiedenheft, 2014).

Prokaryotlarda CRISPR-Cas sisteminin keşfi genetik çalışmalarda yeni bir dönem başlatmıştır. CRISPR-Cas teknolojisinin başlıca avantajı, spesifik olarak genleri modifiye edebilmesi veya tamamen değiştirebilmesidir. Günümüzde Çinko Parmak Nükleazı (ZFN), Transkripsiyon Aktivatör Benzeri Efektör Nükleaz (TALEN) ve CRISPR-Cas sistemi olmak üzere nükleaz tabanlı üç yeni nesil genom düzenleme teknolojisi mevcuttur. Bu nükleaz tabanlı genom düzenleme teknolojilerinin temeli, belirli bir bölgede çift zincirli DNA’nın kırılması (DSB) ile indüklenen DNA onarım mekanizmalarına dayanmaktadır. ZFN ve TALEN tekniklerinin genomik manipülasyonlarda yeterince etkili olduğu, ancak hedeflenen her DNA bölgesi için spesifik bir

protein tasarımına ihtiyaç duyulması ve hedef dışı DNA bölgelerinde de aktivite göstermesi nedeniyle kullanımları sınırlıdır. ZFN ve TALEN ile karşılaştırıldığında, CRISPR-Cas teknolojisi hedef bölgenin seçiminde daha yüksek bir spesifiteye sahiptir. Ayrıca tek bir rehber RNA sayesinde nükleaz enzimi herhangi bir DNA bölgesine yönlendirilerek hızlı ve etkili bir şekilde kesim işlemi gerçekleştirmektedir. Böylece bu teknoloji sayesinde DNA'da bozuk olduğu dşnlen ve istenmeyen gen parçalarının genomdan çıkarılması veya yenisi ile değiştirilmesine dayanan genom düzenlemeleri yüksek verim ve doğrulukta gerçekleştirilebilmektedir (Bogdanove ve Voytas, 2011; Jinek vd., 2012). Bu derleme çalışmasında CRISPR-Cas sisteminin bileşenleri etki mekanizması ve uygulamalarına yönelik bilgiler verilmiş ve potansiyel riskleri ile etik yönü değerlendirilmiştir.

2. CRISPR-Cas Sisteminin Keşfi

1987 yılında *Escherichia coli* bakterisinde bulunan alkalın fosfataz geninin (*iap* geni) araştırıldığı bir çalışmada, aynı baz dizisine ve uzunluğuna sahip belirli dizilerin tekrarlandığı ve bu tekrarların birbirine benzemeyen kısa 'aralık (spacer)' dizileriyle bölündüğü gözlenmiştir (Ishino vd., 1987). Daha sonra 2000 yılına kadar *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella enterica*, *Shigella dysenteriae*, *Haloferax mediterranei* gibi birçok bakteri ve arkede de benzer şekilde düzenli aralıklarla tekrarlayan DNA dizilerinin varlığı keşfedilmiştir (Na-

kata vd., 1989; Hermans vd., 1991; Mojica vd., 1993; Mojica vd., 2000). Jansen vd. (2002) prokaryotlarla yaptığı çalışmada bu tekrar ve aralık dizilerinin bulunduğu lokusu, "Düzenli aralıklarla tekrarlanan kısa palandromik tekrarlar (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)"

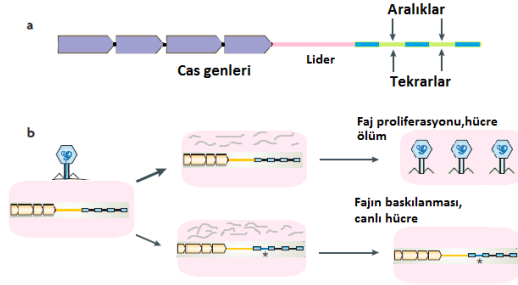
olarak tanımlamış ve bu tanımlı kısıltarak CRISPR olarak adlandırmıştır. Farklı araştırma grupları tarafından 2005 yılında yapılan çalışmalarda, aralık dizilerinin faj DNA'sı gibi yabancı genetik materyaller ile aynı dizilime sahip olduğu, dolayısıyla dış kaynaklı olduğu dşnlen bu dizilerin prokaryotlara ait bağışıklık sisteminin bir parçası olabileceği fikri ortaya atılmıştır (Mojica vd., 2005). Nitekim farklı fajlarla enfekte edilen *Streptococcus thermophilus*'un mutant suşlarını inceleyen Barrangou vd. (2007), CRISPR-Cas sisteminin, Cas9 enzimi ile yönetilen nükleik asit temelli adaptif bir bağışıklık sistemi olduğunu göstermişlerdir.

Daha sonra yapılan çalışmalarda Cas9 dışında sistemde görev alan farklı Cas enzimlerinin de olduğu gösterilmiş ve buna göre CRISPR-Cas sistemlerinin farklı tipleri ve mekanizmaları tanımlanmıştır. Doğal CRISPR-Cas sistemleri başlangıçta filogenetik çalışmalar ve faja dirençli suşların üretimi gibi amaçlarla kullanılmıştır (Horvath vd., 2008; Garneau vd., 2010; Deltcheva vd., 2011). İlerleyen yıllarda iki farklı araştırma grubu tarafından sistemin mekanizması aydınlatılmış ve Cas9 enziminin spesifik olarak hedef bir DNA'yı kesmek için yönlendirilebileceği dolayısıyla CRISPR/Cas9 teknolojisinin RNA güdümlü basit ve çok yönlü genom düzenleme aracı olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (Jinek vd., 2012; Fineran ve Charpentier, 2012; Doudna ve Charpentier, 2014).

3. CRISPR-Cas Sisteminin Yapısı ve Etki Mekanizması

Bakteri ve arkeaların genomunda bulunan CRISPR dizileri Cas genleri ile birlikte CRISPR Cas sistemini oluşturmaktadır. CRISPR lokusu mikrobiyal türler arasında farklılıklar göstermekle birlikte temelde

benzer bölgeleri içerir. Bu bölgeler; Cas genleri, lider bölge, aralık dizileri ve bu dizilerle ayrılmış tekrar dizileridir (şekil 1) (Sorek vd., 2008; Wright vd., 2016).



şekil 1. CRISPR lokusunun temel bileşenleri (a) ve çalışma mekanizması (b)

CRISPR dizileri, tekrarlanmayan dizilerin tekrarlayan diziler içerisine girmesi ile oluşmuştur. CRISPR lokusundaki tekrarlanmayan diziler aralık dizileri (spacer) olarak bilinir ve bu diziler genellikle 26-72 baz çifti (b) uzunluğundadır. Tekrar dizileri ise aralık dizileri arasında konumlanmış genellikle daha kısa (21-48 b) ve palindromik dizilerdir. Aralık dizilerinin kaynağı genellikle bakteriyi enfekte eden fajlar veya diğer mobil genetik elementlerdir. Bir CRISPR lokusunda bulunan aralık dizileri uzunluk bakımından birbirine benzerlik gösterse de baz dizilimleri birbirinden farklıdır (Makarova vd., 2006; Rath vd., 2015).

Faj genomundan seçilerek CRISPR lokusuna yerleştirilen dizi, ön-aralık (protospacer) olarak adlandırılmaktadır. Ön aralık dizilerinin hemen bitişiğinde bulunan ve PAM (protospacer adjacent motif) olarak adlandırılan birkaç nükleotidlik (2-5 nt) kısa bir tanıma motifi bu dizilerin Cas enzimleri tarafından tanınmasını sağlamaktadır. Örneğın, CRISPR/Cas9 sistemindeki PAM dizisi "5'-NGG-3'", hedef DNA'yı tanıma ve bağlanma aşamasında Cas9'un aktivitesi için kritik role sahiptir. Öyleki

tanıma motiflerindeki mutasyon istilacı fajın yok edilememesine neden olmaktadır. Farklı Cas enzimlerinin tanıma motiflerindeki diziler farklılık göstermekle birlikte Tip III CRISPR-Cas sisteminde olduğu gibi tanıma motifine ihtiyaç duymaksızın aktivite gösteren Cas enzimleri de bulunmaktadır (Jiang ve Doudna, 2015; Nishimasu vd., 2014).

Bakterilerin büyük çoğunluğunun CRISPR lokusunda yaklaşık 550 b uzunluğunda bir lider dizi bulunmaktadır. Lider dizi, ilk tekrar dizisinin 5' ucuna bitişik Adenin ve Timin bakımından zengin bir dizidir. Lider dizinin aralık dizilerinin ekleneceği konumu belirleyen bir tanıma dizisi olduğu düşünölmektedir. Bir kromozomda birden fazla CRISPR lokusu bulunabilir. Aynı kromozomdaki lider diziler çoğunlukla korunmuş olduğu halde türler arasında bu diziler değişkenlik gösterebilmektedir (Jansen vd., 2002; Pourcel vd., 2005; Rath vd., 2015).

CRISPR lokusunda lider dizisinden önce Cas proteinlerini kodlayan Cas genleri bulunur. Prokaryotik immün yanıtın oluşturulabilmesi için bu genlerin mutlaka bulunması gerekmektedir. Cas genlerinin kodladığı proteinler, yabancı (ekzojen) genetik materyali spesifik olarak tanımakta ve nükleaz aktivitesi ile kesmektedir. Cas proteinleri, CRISPR-Cas sisteminde; yeni aralık dizilerinin edinilmesi, CRISPR ön transkriptinin (pre-crRNA) küçük olgun crRNA'lara işlenmesi ve istilacı genomun hedeflenerek kesilmesi görevlerini yerine getirmektedir. (Dominguez vd., 2016; Zhang vd., 2021). Cas proteinlerinde tanımlanan spesifik fonksiyonel alanlar arasında; endonükleaz ve ekzonükleaz alanları, helikazlar, RNA ve DNA bağlama alanları ve transkripsiyon regölasyonunda

işlevi olan alanlar bulunmaktadır (Rath vd., 2015; Sorek vd., 2008).

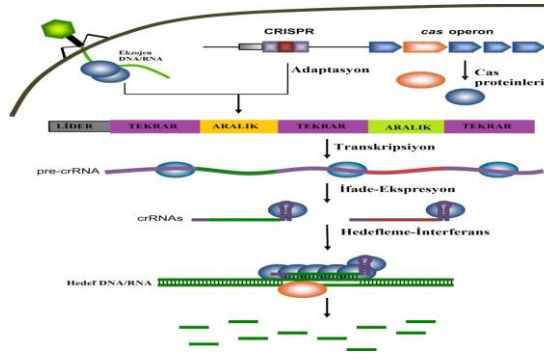
CRISPR-Cas sistemleri Cas enzimlerinin özelliklerine göre sınıflandırılmaktadır. Nükleaz aktivitesini gerçekleştirmek için çoklu Cas komplekslerine ihtiyaç duyan sistemler Sınıf I CRISPR-Cas sistemine dâhil edilirken, tek bir Cas proteininin gerekli olduğu sistemler Sınıf II'de yer almaktadır. Bu sınıflarda bulunan Cas enzimleri de spesifik (cis-kesim) veya spesifik olmayan (trans-kesim) kesim şekli ve hedeflenen nükleik asit çeşidine (DNA veya RNA) göre altı alt tipe ayrılmaktadır. Tip I, III ve IV Sınıf 1'de, Tip II, V ve VI ise Sınıf 2'de yer almaktadır. Tip II'de Cas9, Tip V'de Cas12 ve Cas14, Tip VI'da Cas13 genom düzenlemelerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu Cas enzimlerinden bazıları hem spesifik hem de spesifik olmayan etkiye sahiptirler. Tip VI'da görev alan Cas13 enziminin RNA'yı hedeflemesi ve parçalamasından dolayı özellikle RNA virüslerin tespitinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Rautela vd., 2021; Xie vd., 2021; Zhang vd., 2021).

İstilacı yabancı bir genetik materyalin hücreye girmesiyle birlikte CRISPR-Cas sistemi aktive olmakta ve adaptasyon-ifade-interferans olarak adlandırılan üç aşamalı bir immün yanıt oluşturmaktadır (Zhang vd., 2021) (Şekil 2). Adaptasyon adımı yabancı genetik materyalden seçilen spesifik bir dizi CRISPR lokusuna eklenmektedir. Bu aşamada yabancı genetik materyalden seçilen bu dizi ön-aralık (protospacer) olarak adlandırılmaktadır. Adaptasyon aşamasında transkribe edilen Cas1 ve Cas2 genleri, PAM dizisini tanıyan ve ön-aralık dizisini kopyalayan bir protein kompleksi oluşturur. Bu ön-aralık, CRISPR lokusundaki lider dizisinin bitişinde bulunan tekrar genlerinin arasına yeni bir aralık dizisi

olarak yerleşmektedir (Barrangou ve Marraffini, 2014; Leung vd., 2021).

İfade olarak adlandırılan ikinci adımda, CRISPR lokusuna daha önceden yerleştirilmiş aralık dizilerinden herhangi biri ile eşleşen bir diziyi içeren yabancı genetik bir materyal hücreye girdiğinde, hücre tarafından bu aralık dizisi transkribe edilerek öncül CRISPR RNA'lar (pre-crRNA) üretilmektedir. Bu şekilde oluşan pre-crRNA'lar, Tip I,III ve IV sistemlerde Cas6 benzeri endoribonükleazlar, Tip II, V ve VI sistemlerde ise RNase III tarafından tekrar dizileri çıkarılarak olgun crRNA'lara dönüştürülmektedir. Ancak Tip II sistemlerde, pre-crRNA transkripti tekrar dizisine tamamlayıcı olan küçük bir trans-aktive edici crRNA (tracrRNA) ile hibrit bir yapı oluşturmakta ve RNase III bu hibrit yapıyı parçalamaktadır. Daha sonra olgun crRNA'lar, çoklu protein kompleksleri (Tip I, III ve IV sistemlerde) veya çok alanlı bir Cas proteini (Tip II, V ve VI sistemlerde) ile birleşerek CRISPR ribonükleoprotein (crRNP) komplekslerini oluşturmaktadır (Jiang ve Doudna, 2015; Butiuc-Keul vd., 2021).

İnterferans ya da hedefleme olarak adlandırılan son adımda, crRNA'lar yabancı genetik materyaldeki hedef dizilerle eşleşmekte ve eşleşen diziler crRNP komplekslerindeki nükleaz aktivitesine sahip Cas enzimleri ile kesilerek yabancı genetik materyalin replikasyonu önlenmektedir (Nishimasu vd., 2014).

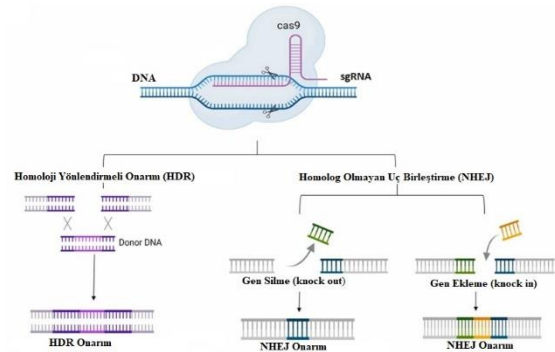


Şekil 2. CRISPR Sistemi Temel Mekanizması (Fineran ve Charpentier, 2012)

4. CRISPR-Cas Sisteminin Genetik Çalışmalarda Kullanılması

CRISPR-Cas teknolojisi ile herhangi bir organizmanın genomunda istenilen genlerin eklenmesi, çıkartılması ya da değiştirilmesi gibi değişiklikler yapılabilmektedir. Genomda düzenleme yapmak için tasarlanmış ilk Cas nükleaz *Streptococcus pyogenes*'den elde edilen sınıf 2 tip II CRISPR-Cas sistemine ait “SpCas9”dur. Bugün de yaygın olarak kullanılmaya devam edilen bu Cas nükleaz kompleksinde, tracrRNA'nın 5' ucu crRNA'nın 3' bölgesi ile birleştirilerek oluşturulmuş “tek rehber RNA (sgRNA)” adı verilen hibrit bir RNA bulunmaktadır. Doğal CRISPR-Cas9 sistemindeki crRNA ve tracrRNA'nın yerine alan sgRNA, aynı mekanizma ile Cas nükleaz kompleksine rehberlik ederek hedef DNA bölgesindeki çift zincirin kesilmesine aracılık etmektedir. sgRNA'nın nükleotid dizisi herhangi bir DNA dizisini hedefleyecek şekilde tasarlanabilir. Cas9/sgRNA kompleksinde, sgRNA'nın nükleotid dizisinin 3' ucunda Cas9'un hedefe bağlanmasında önemli işleve sahip PAM (NGG) dizisi de bulunmaktadır. Cas9 enzimi RuvC ve His-Asn-His (HNH) olarak adlandırılan iki nükleaz alanını içerir. Cas9 hedef DNA bölgesine spesifik olarak bağlandıktan sonra HNH domaini, gRNA'nın bağlandığı zincirin tamamlayıcısı olan

DNA zincirini keserken, RuvC domaini, bu zincirin antisensisi olan zinciri keser. Bu şekilde her iki zincirde oluşan DNA kırıkları (DSB) hücrenin tamir mekanizmaları ile onarılır (Fineran ve Charpentier, 2012; Doudna ve Charpentier, 2014). Hücrenin doğal tamir mekanizmaları olan homoloji yönlendirmeli onarım (homology-directed repair; HDR) ya da homolog olmayan uç birleştirme (non-homologous end joining; NHEJ) sürecinde genomda farklı modifikasyonlar meydana gelebilmektedir (Şekil 3). Ökaryot organizmalar ağırlıklı olarak DSB'leri NHEJ aracılığıyla onarır. Bu tamir mekanizması hataya eğilimli olup tekrarlanan kırılma ve onarım döngüleri delesyonlar ya da insersiyonların birikmesine ve dolayısıyla genin işlevini tamamen kaybetmesine neden olur. HDR'ye dayalı tamir mekanizmasında ise, çift zincir kırıklarına homolog olan donör DNA varlığında hedef bölgede hatasız modifikasyonlar oluşturmak mümkündür. Bu tamir mekanizmalarından NHEJ, genin silinmesi (knock out) için kullanılırken, HDR gen değiştirme veya gen ekleme (knock in) gibi modifikasyonlar oluşturmak için kullanılmaktadır. (Petersen ve Niemann, 2015; Leung vd., 2021).



Şekil 3. CRISPR/Cas9 aracılı DSB onarım mekanizması (Wani vd., 2022)

CRISPR/Cas9 sisteminin hedef organizmaya aktarılması ve işlevsel hale getirilme-

sinde çeşitli vektörler kullanılır. Başlan-gıçta Cas ve sgRNA dizilerinin ayrı ayrı iki vektöre yerleştirildiği ikili vektör sistemi kullanılırken son yıllarda aynı vektör üze-rine hem sgRNA ve hem de Cas9 dizileri-nin birlikte yerleştirildiği tekli sistemler geliştirilmiştir. Bir vektör birden fazla sgRNA taşıyabilir ve böylece birçok hedef genin eş zamanlı olarak modifikasyonu gerçekteştirilebilir. Bu yöntem maliyetin düşürülmesine ve zamandan tasarruf edil-mesine olanak sağlamaktadır. (Bogdanove ve Voytas, 2011; Pickar-Oliver ve Gers-bach, 2019). CRISPR-Cas kompleksini içeren vektörler, yapılacak modifikasyo-nun amacı ve hedef organizmaya bağlı ola-rak biyolistik, *Agrobacterium* aracılı gen aktarımı, mikroenjeksiyon, elektroporas-yon, hidrodinamik taşıma gibi aktarım yön-temlerinden biri kullanılarak hedef hücreye aktarılabilmektedir. CRISPR bileşenlerini taşıyan vektör hücre içerisine girdikten sonra hedef bölgeye özđü tasarlanmış sgRNA, Cas9 nükleazı ile birleşerek Cas9/sgRNA kompleksini oluşturur ve Cas9'u hedef DNA dizisine karşı aktif hale getirir. Cas9 proteini hedef bölgeye bağlan-dıktan sonra yapısal değişikliğe uğrar ve RuvC ve HNH nükleaz alanları aktiveleşe-rek çift zincirli DNA'da kırıklar (DSBs) meydana getirir. Daha sonra, bu çift zincir kırıklarının NHEJ ya da HDR gibi hücre-nin farklı DNA onarım mekanizmaları ile onarılması istenilen genom düzenlemesi-nin gerçekteştirilmesine olanak sağlamak-tadır (Doudna ve Charpentier, 2014; Tang vd., 2019).

5. CRISPR-Cas Sisteminin Uygulama Alanları

CRISPR-Cas sistemi, hedef DNA dizisinde çift zincir kırıklarını indükleyerek NHEJ veya HDR gibi genetik onarım mekaniz-malarını etkinleştiren verimli ve yüksek

doğrulukta genetik modifikasyona imkân sağlayan yöntemlerinden biridir. ZFN ve TALEN'e göre özđüllüđü ve etkinliği daha yüksek olduğu düşünölen CRISPR-Cas teknolojisi, düzgün çalışmayan veya hasta-lığa neden olan genlerin yapısını bozarak protein sentezlenmesini engellemek (gen susturma-knock out) veya organizmaya yeni özellik kazandırmak (knock in) için kullanılmaktadır (Tang vd., 2019; Leung vd., 2021).

CRISPR-Cas teknolojisinin bugüne kadar en önemli uygulamaları gen terapisi ala-nında olmakla birlikte, biyomedikal amaçlı hayvansal ürünlerin üretimi, bitkisel ve hayvansal üretimde verimliliğin ve daya-nıklılığın artırılması, gıda fermentasyonla-rında görev alan mikroorganizmaların ta-nımlanması ve modifikasyonu gibi birçok farklı alanlarda da uygulanma potansiyeli-nin olduğu gösterilmiştir. Aşağıda uygula-malara yönelik bazı örnekler verilmiştir (Brokowski ve Adli, 2019).

5.1. Tıp alanındaki uygulamalar

Gen tedavisi, hastanın genomundaki fonk-siyonunu kaybeden bir geni onaran veya hastalığa neden olan mutant genin etkile-rini ortadan kaldırmak için genetik yapının bir bölümünü değiştiren tekniklerdir. Gen tedavilerinde HDR'ye dayalı genetik modi-fikasyon yöntemi, hastalığa neden olan mutasyonları onarmak için sıklıkla kulla-nılmaktadır (Li ve diğerleri, 2019a; Zhang, 2021).

Son yıllarda insan kök hücrelerinde veya model hayvanlar üzerinde yapılan çalışma-lar, birçok kalıtsal hastalığın tedavisi için CRISPR-Cas teknolojisinin kullanılabil-ceğini göstermiştir. Kalıtsal monogenik bir hastalık olan Orak Hücre Hastalığının (Sickle Cell Disease-SCD) tedavisinde, SCD mutasyonlarının düzeltilmesi için

CRISPR-Cas9 teknolojisinden yararlanılmıştır (Hoban vd., 2016). Kistik fibroz (CF), kistik fibrozis transmembran regülatör (CF transmembrane conductance regülatör- CFTR) genindeki mutasyonların neden olduğu en yaygın genetik hastalıklardan biridir. *CFTR* genindeki mutasyonu onarmak için CRISPR-Cas9 sistemi, kullanılmış ve CF hastalığını taşıyan doku ve hayvan modellerinde umut verici sonuçlar elde edilmiştir (Marangi ve Pistritto, 2018). Hemofili B (HB), Faktör IX (*FIX*) genindeki mutasyonların neden olduğu anormal kan pıhtılaşmasına yol açan kalıtsal bir hastalıktır. HB, monogenik yapısı dolayısıyla gen tedavilerinde sıklıkla çalışılan hastalıkların başında gelmektedir. Hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda, *FIX* genindeki mutasyonların CRISPR-Cas9 teknolojisi ile düzeltici genler eklenerek onarılabilceğinin gösterilmesi HB'nin tedavisine yönelik umut verici sonuçlar ortaya koymuştur (Stephens vd., 2019).

Etik ve yasal kısıtlamalara rağmen, insan embriyosundaki patojenik gen mutasyonlarını düzeltmek için CRISPR-Cas9 teknolojisinin kullanımında da önemli ilerleme kaydedilmiştir. CRISPR-Cas9 gen düzenlemesi, insan embriyosundaki hipertrofik kardiyomiyopati ile ilişkili *MYBPC3* mutasyonlarının onarılmasında kullanılmış ve bu süreçte embriyolarda beklenmeyen herhangi bir genetik farklılık, hedef olmayan gen mutasyonu veya başka bir anormallik gözlenmemiştir (Ma vd., 2017).

Kanser tedavisinde CRISPR-Cas teknolojisinin kullanımına yönelik ilk çalışmalar model hayvanlarda yapılmıştır. Kanser ile ilişkili *ASXL1* (Additional sex combs-like 1) geninin hedef olarak seçildiği bir çalışmada, CRISPR-Cas9 teknolojisi kullanılarak gerçekleştirilen düzenlemelerin, lösemi hücrelerinde *ASXL1* geninin fonksiyonunu

geri kazandırarak farelerde sağ kalım oranını artırdığı ve mutasyonun gerçekleştirildiği farelerin kontrol grubu farelere göre daha uzun süre yaşadığı bildirilmiştir (Valletta vd., 2015). Akciğer kanserini tedavi etmek amacıyla yapılan bir çalışmada, T hücrelerindeki “programlanmış hücre ölüm proteini-1 (Programmed cell death protein, *PDI*)” geni CRISPR-Cas teknolojisi ile silindikten sonra hastalara enjekte edilerek immunolojik veriler değerlendirilmiştir (Cyranoski, 2016). Bu ve benzeri klinik uygulama modelleri kanserin tedavisinde CRISPR-Cas teknolojisinin umut verici bir yöntem olduğunu göstermiştir (Weber vd., 2015).

5.2. Hayvansal üretimdeki uygulamalar

Hayvancılıkta genom düzenleme yöntemleri, daha çok hastalık direncini, üretim verim ve kalitesini artırmak ve biyomedikal amaçlı hayvansal ürünler üretmek için kullanılmaktadır (Proudfoot vd., 2015). Örneğin, domuzlarda üreme ve solunum sendromu virüsüne (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus-PRRSV) karşı geliştirilen aşıların hastalığı kontrol etmede başarısız olması üzerine, PRRSV'nin konak hücrelere girişinde rol oynayan CD163 (Cluster of Differentiation 163) reseptöründe değişiklik yapılarak virüse karşı bağışıklık elde edilmiştir. CRISPR-Cas9 teknolojisi kullanılarak *CD163* geninin ekzon 7 bölgesinde düzenleme yapıldıktan sonra PRRSV virüsüne maruz bırakılan domuzlarda hiçbir klinik belirti (ateş veya solunum belirtileri), akciğer patolojisi, viremi veya antikor yanıtı gözlenmemiştir (Whitworth vd., 2016).

Kanatlı endüstrisinde, CRISPR-Cas aracılı yaklaşımlar, başka bir yöntemle kazanılması mümkün olmayan genetik özelliklerin elde edilmesini böylece kanatlı popülasyonunda ihtiyaç duyulan birçok genetik

varyasyonun geliştirilmesini mümkün kılmaktadır. Kümes hayvanlarında aşılama gibi geleneksel stratejilerle kontrol edilemeyen Avian leucosis virus (ALV) gibi retrovirüsler ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Hellmich vd., (2020), bu soruna çözüm üretmek amacıyla yaptıkları bir çalışmada CRISPR-Cas teknolojisinin retrovirüslerle mücadele etmek için kullanılabilirliğini göstermişlerdir. ALV-J (Avian leukosis virus subgroup J) virüsünün konak hücreye girişinde aracılık eden chNHE1 (chicken Na⁺/H⁺ exchanger type 1) reseptöründe bulunan triptofan 38 (W38), virüsün girişi için önem taşımakta ve hastalığa direnç geliştirmek için yapılan çalışmalarda bu aminoasit dizisi hedef alınmaktadır. CRISPR-Cas9 teknolojisi ve HDR onarım mekanizması kullanılarak chNHE1 reseptöründeki W38'in silinmesi, tavukların ALV-J virüsüne karşı direnç geliştirmesini sağlamıştır. Çalışma sonunda elde edilen transgenik tavukların enfeksiyondan tamamen korunduğu ve bu gen düzenlemesinin tavukların gelişimi ve genel sağlık durumu üzerinde herhangi bir olumsuz etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Bu çalışma CRISPR-Cas teknolojisinin kümes hayvanlarında alternatif bir hastalık kontrol stratejisi olarak kullanılabilirliğini göstermiştir.

CRISPR-Cas teknolojisi bazı biyomedikal ürünlerin hayvanlar tarafından üretilmesine de imkân sağlamaktadır. Örneğin; insan serum albümini, insan fizyolojisinde kritik fonksiyonları olan bir plazma proteini olup karaciğer yetmezliği ve travmatik şok gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. İnsan albümini üretmekte kullanılan kanın yetersiz olması ve bazı hastalık risklerini taşıması nedeniyle, alternatif üretim kaynaklarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle araştırmacılar insan

albüminini domuzlara ürettirmek için CRISPR-Cas9 teknolojisini kullanmışlardır. İnsanlarda serum albümini üretiminden sorumlu rHSA lokusu, domuz genomuna CRISPR-Cas teknolojisini kullanılarak eklenmiştir. Sonuçlar domuz zigotlarında homolog rekombinasyonun oldukça verimli bir şekilde gerçekleştiğini göstermiştir. Ayrıca manipüle edilmiş zigotlardan doğan 16 domuz yavrusunun da aynı geni taşıdığı ve bu yavruların kanında insan albüminin bulunduğu gösterilmiştir (Peng vd., 2015). Başka bir çalışmada ise insan interferon proteinlerinin ticari olarak üretimi için transgenik tavukların kullanımı amaçlanmıştır. Bu amaçla tavuk ovalbümin lokusuna *hIFN-β* (*human interferon beta*) geni CRISPR-Cas9 teknoloji kullanılarak yerleştirilmiş (integrating) ve yumurta akında hIFN-β proteinlerinin üretilebileceği gösterilmiştir. Çalışma sonuçları, yumurta akında hedef proteinin yüksek verim ve stabilitede üretilebileceğini ve bu üretim stratejisinin endüstriyel uygulamalar için de uygun olduğunu göstermiştir (Oishi vd., 2018).

Yukarıda verilen örneklerin dışında çiftlik hayvanlarında üretkenlik özelliklerini geliştirme (Crispo vd., 2015; Van Eenennaam vd., 2019), bulaşıcı veya bulaşıcı olmayan hastalıklara karşı direnç kazandırma (Liu vd., 2014; Gao vd., 2017; Whitworth vd., 2019) ve hayvan refahını artırma (Yunes vd., 2019; Kurtz ve Petersen 2019) gibi çiftlik ortamında hayvanların adaptasyon ve dayanıklılığını iyileştirmeye yönelik ihtiyaç duyulan diğer ıslah çalışmalarında da CRISPR-Cas teknolojisinden faydalanılabileceği gösterilmiştir.

5.3. Bitkisel üretimdeki uygulamalar

CRISPR-Cas sisteminin bitki hücrelerinde hedef DNA dizileri üzerinde DSB'ler üretmede oldukça işlevsel olduğu ve hücresel

tamir mekanizmaları ile onarılan DSB'lerin hem dikot hem de monokot bitkilerde hedeflenen genom modifikasyonlarını elde etmek için kullanılabileceği bildirilmiştir. Örneğin; Feng vd., (2013), *Arabidopsis* ve pirinçte çoklu genlerin yüksek verimde hedeflenmiş mutajenezi için CRISPR-Cas teknolojisinin kullanılabileceğini göstermişlerdir. Bu çalışmanın hemen ardından Li vd. (2013), *Arabidopsis* ve *Nicotiana* bitkilerinde 7 farklı hedef bölge üzerinde çalışmış ve sentetik rehber RNA:Cas9 tabanlı genom düzenleme teknolojisinin birden çok hedef için uygulanabilirliğini göstermişlerdir. Pirinçte verimi artırmak için yapılan bir çalışmada, *DEP1* (*Dense and Erect Panicle 1*) genini hedefleyen çoklu CRISPR sgRNA'lar tasarlanmış ve hedef gende üretilen delesyonlar sayesinde daha kısa, daha dik ve yoğun çiçek salkımları olan mutant bitkiler elde edilmiştir (Wang vd., 2017). CRISPR-Cas9 teknolojisi kullanılarak olumsuz çevre koşullarına karşı yüksek hassasiyeti olan çeltiğin çeşitli stres faktörlerine karşı dayanıklılığını artırmayı amaçlayan birçok çalışma yapılmıştır. Yine pirinçte yaygın bir sorun olan *Xanthomonas oryzae*'nin neden olduğu bakteriyel yanıklık hastalığını önlemeye yönelik olarak yapılan bir çalışmada, CRISPR-Cas9 teknolojisi kullanılarak hastalığa yatkınlık geni olan OsSWEET13'ün promotörü hedef alınmış ve hastalığa dirençli iki knock-out mutant üretilmiştir (Zhou vd., 2015). Çin'de CRISPR-Cas sistemi kullanılarak yapılan bir çalışmada, soya fasulyelerinde fotoperiyot çiçeklenme zamanını kontrol eden *GmFT2a* geninde mutasyonlar yapılmıştır. Böylece hem uzun gün hem de kısa gün koşullarında geç çiçeklenen vejetatif büyüme süresi daha uzun mutantlar elde edilmiş ve bu özelliğin sonraki nesillere istikrarlı bir şekilde aktarıldığı gösterilmiştir (Cai ve diğerleri, 2018).

Wang vd., (2014), CRISPR-Cas9 sisteminin, hekszaplloid ekmeklik buğdayda faydalı genetik özellikler oluşturmak için kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Mısırdada dört farklı gen hedeflenerek yapılan bir çalışmada da CRISPR-Cas9 teknolojisi ile TALEN yöntemi karşılaştırılmıştır. Araştırmacılar, mısırdada genom düzenlemesi için iki tekniğin de kullanılabileceğini ancak CRISPR/Cas sisteminin, klonlama ve multipleks genom düzenleme açısından daha avantajlı olduğunu tespit etmişlerdir (Liang vd., 2014).

Son yıllarda kakao üretiminde zararlılara karşı daha dirençli, yüksek verimli, kuraklığa dayanıklı, aroma ve çekirdek kalitesi artırılmış çeşitler elde etmek amacıyla çok sayıda genom düzenleme çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla yapılan bir çalışmada, savunma yanıtını baskılayan *TcNPR3* (Non-Expressor of Pathogenesis-Related 3) geni CRISPR-Cas9 teknolojisi kullanılarak başarılı bir şekilde silinmiştir (Fister vd., 2018). Ancak genom düzenlemesi yoluyla elde edilen bu mutant kakao çeşitlerinin küresel kakao pazarına uyumu, üretici ve tüketici tarafından kabul edilebilirliği hala tartışılmaktadır (Etaware, 2021).

CRISPR-Cas teknolojisinin en fazla uygulandığı ürünlerden birisi olan domates; basit diploid kalıtımı, yüksek üreme verimi, kısa büyüme periyodu, genetik dönüşüm kolaylığı nedeniyle kapsamlı araştırmalara konu olmuş model bir bitkisel üründür. Domateste yaprak şekilleri üzerinde yapılan çalışmalar, CRISPR-Cas teknolojisi ile elde edilen genetik mutasyonların kalıtsal olduğunu göstermiştir (Wang vd., 2019). Brooks vd. (2014) tarafından yürütölen bir çalışmada, domates yapraklarının tipik birleşik ve yassı görünümünden sorumlu olan *SIAGO7* (*Argonaute7*) geni hedef alınmış

ve bu genin CRISPR-Cas9 teknolojisi kullanılarak silinmesi ile iğne veya sırım benzeri yaprak görünümünün ortaya çıktığı bildirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, CRISPR-Cas teknolojisinin domatesin fenotipik özelliklerinin değiştirilmesinde başarıyla kullanılabileceğini ve bu teknoloji ile yapılan genom düzenlemelerinin kalıtsal olduğunu göstermiştir.

Cermák vd. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada domates genomunda geleneksel DNA aktarım yöntemlerine kıyasla (örneğin *Agrobacterium*) daha yüksek frekanslarda kalıtsal modifikasyonlar oluşturmak için geminivirüs replikonlarını kullanmışlardır. Antosiyanin biyosentezini kontrol eden *ANTI* (*Anthocyanin Mutant 1*) geninin baş kısmına güçlü bir promotör yerleştirilmiş ve böylece domates dokularında antosiyaninin yüksek miktarda üretimi ile mor renkli domatesler elde edilmiştir. Çalışmada hem TALEN hem de CRISPR-Cas9 teknolojisi kullanılmış ve her iki yöntemin de geminivirüs replikonları ile kombinasyonunun gen hedefleme etkinliğini artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca domateslerdeki modifikasyonun kalıtsal olduğu ve replikon dizilerinin hedef bölge dışında entegrasyonuna dair bir kanıt bulunmadığı bildirilmiştir.

CRISPR-Cas teknolojisi bitkisel ürünlerin besin içeriğini artırmak için de kullanılmıştır. Örneğin Andersson vd., (2017) tarafından yapılan bir çalışmada tetraploid patates türü olan *Solanum tuberosum*'un besin içeriğini artırmak için patates protoplastlarında amiloz sentezinden sorumlu *GBSS* (*Granule-Bound Starch Synthase*) enzimini kodlayan gen silinerek nişasta kalitesi artırılmıştır.

Yukarıda verilen örneklerin dışında bitkisel üretimde; herbisit toleransı (Sun vd.,

2016), kuraklık direnci (Shi vd., 2017), tane verimi (Zhou vd., 2019), bitki büyüklüğü ve ağırlığının (Rodríguez-Leal vd., 2017; Wang vd., 2018) artırılması, biyotik ve abiyotik streslere direnç kazandırılması (Pyott vd., 2016; Xu vd., 2019; Ren vd., 2016), duyuusal ve besinsel özelliklerin (Sun vd., 2017; Dong vd., 2020) geliştirilmesi gibi verimi ve kaliteyi artırmaya yönelik ıslah çalışmalarında da CRISPR-Cas teknolojisinden yararlanılabileceği gösterilmiştir.

5.4. Gıda endüstrisindeki uygulamalar

Gıda mühendisliğinde CRISPR sistemlerinin uygulamaları arasında; starter kültürlerin virüslere karşı aşılması, genotiplendirme, antibiyotik direnç genlerinin bakteriler tarafından alınmasının ve yayılmasının kontrol edilmesi ve probiyotik kültürlerin modifikasyonu yer almaktadır (Barrangou ve Doudna 2016). Süt ürünlerinin fermentasyonunda kullanılan *Streptococcus thermophilus* starter kültürünün virüslere karşı aşılmasında elde edilen başarı, gıda endüstrisinde CRISPR-Cas sistemlerinin kullanımının yolunu açmıştır (Selle ve Barrangou 2015). Ayrıca gıda güvenliğini artırmak ve raf ömrünü uzatmak amacıyla gıda kaynaklı patojen mikroorganizmaların kontrolüne yönelik yapılan çalışmalarda da CRISPR-Cas sisteminin kullanılabileceği bildirilmiştir (Barrangou ve Notebaart, 2019; Eş vd., 2019). Gomaa vd. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada, Tip I-E Cas3 enzimi kullanılarak tasarlanan CRISPR-Cas sistemi spesifik olarak *E. coli* strainlerini yok etmek için kullanılmıştır. Bu yaklaşım kısa bir süre sonra Tip II Cas9 kullanılarak *E. coli* ve *Staphylococcus aureus*'ta da denenmiş ve CRISPR-Cas9 sistemlerinin antibakteriyel potansiyeli değerlendirilmiştir (Citorik vd., 2014; Bikard vd., 2014).

Gıda endüstrisinde starter kültür veya probiyotik olarak kullanılan laktobasillerin genomlarının %62,9'unda ve bifidobakterlerin ise genomlarının %77'sinde CRISPR lokusları bulunmaktadır. Özellikle fermentasyonla üretilen karışık mikrobiyotaya sahip ürünlerde farklı türleri ayırmak için CRISPR lokuslarının genotipleme amacıyla kullanılabileceği gösterilmiştir (Stout vd., 2017). Bu alanda ilk çalışmalardan biri turşularda bozulmaya neden olan, özellikle salatalık turşularında aromayı bozarak üretimi olumsuz etkileyen *Lactobacillus buchneri* üzerinde yapılmıştır. *L. buchneri* genomlarında CRISPR-Cas sistemlerinin oluşumu ve çeşitliliği belirlendikten sonra, 36 nükleotidlik Tip II-A CRISPR lokusunun tanımlama için kullanımı başarılı sonuçlar vermiştir (Briner ve Barrangou, 2014). CRISPR lokusları ayrıca fermente etlerde sıklıkla kullanılan *Enterococcus faecalis* ve probiyotik rolleri ile bilinen *Lactobacillus gasseri* ve *Bifidobacterium*'un genotiplemesi amacıyla da kullanılmıştır (Hullahalli vd., 2015; Sanozky-Dawes vd., 2015; Briner vd., 2015).

6. Potansiyel Riskler ve Yasal Düzenlemeler

CRISPR-Cas sistemi bir genom düzenleme aracı olarak tanınmasının ardından birçok model organizma üzerinde denenmiş, verimliliği, hassasiyeti ve geniş uygulama alanı nedeniyle kısa sürede oldukça popüler bir yöntem haline gelmiştir (Ledford, 2015). CRISPR teknolojisinin farklı genom tiplerini benzeri görülmemiş bir kolaylıkla düzenleme yeteneği, uluslararası bilim camiasında büyük bir heyecan oluştururken potansiyel olarak birçok ahlaki, etik, politik ve güvenlik risklerini de beraberinde getirmiştir (Memi vd., 2018; Brokowski ve Adli, 2019).

6.1. Tedavi amaçlı uygulamalardaki riskler ve yasal düzenlemeler

CRISPR-Cas genom düzenleme tekniğinin en önemli uygulaması, şüphesiz genetik hastalıkların tedavisine yönelik tıbbi amaçlı kullanımlarıdır. Genel olarak, gen tedavisi; somatik ve germ hattı gen tedavisi olarak iki şekilde kategorize edilebilir. Somatik gen tedavisi, bir insanın germ (üreme) hücreleri dışındaki hücrelerin DNA dizilerini hedef alan düzenlemeleri ifade eder. Somatik hücre gen tedavisi, tedavi edilen kişiyle sınırlı olan ve sonraki nesillere aktarılmayan kemik iliği, kan ve deri gibi hücrelerdeki değişiklikleri içerir (Smith, 2003). CRISPR ile ilgili asıl tartışmalar genlerin kalıcı olarak modifiye edilmesini hedefleyen germ hattı düzenlemeleridir. Germ hattı gen tedavisi, gelişimin erken evrelerinde yumurta hücreleri, sperm hücreleri ve embriyonik kök hücreler üzerinde yapılan düzenlemelerdir (Kalidasan vd., 2021).

CRISPR-Cas sistemi oldukça başarılı bir genom düzenleme tekniği olsa da tedavi amaçlı uygulamalarda bazı teknik sorunlar yaşanabilmektedir. Bunlardan en önemlisi CRISPR-Cas tekniğine dayalı genom düzenlemesinin hedef dışı (off-target editing) etkileridir. CRISPR-Cas9 tabanlı genom düzenlemesinin, insan, fare ve sıçan hücre hatlarında hedef dışı değişikliklere neden olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Anderson vd., 2018; Aryal vd., 2018; Fu vd., 2013). Terapötik amaçlı CRISPR-Cas uygulamalarında hedef dışı düzenleme, fonksiyonel genlerde fonksiyon kaybı ile sonuçlanan mutasyonlara (off-target mutation) veya hedef DNA dizisi dışındaki sitelere bağlanma ve kırılma nedeniyle hastalık indükleyen genin yanlış onarımı gibi sorunlara neden olabilmektedir. Dahası bu

hedef dışı mutasyonlar, genomu dzenlenen bireylerde bugünden ongörülemeyen ancak gelecekte ortaya çıkabilecek kanser veya diğer ciddi komplikasyonlara neden olabilecek etkiler oluşturma potansiyeline sahiptir (Zhang vd., 2020). CRISPR-Cas uygulamalarında ortaya çıkan diğer bir önemli problem de mozaiklikdir. CRISPR-Cas uygulaması ile hedeflenen genom dzenlemeleri, embriyonik gelişimin farklı aşamalarındaki hücrelerin yalnızca bir kısmında gerçekleşirse “mozaiklik” oluşabilmektedir. Mozaiklik, genomu dzenlenen birçok hayvan modeli ve insan embriyolarında oldukça sık rastlanan bir durumdur. Bu tür heterojen dzenlemeler, hastalığa neden olan mutasyonun onarılmasında sıklıkla başarı sağlayamadığı gibi bir takım istenmeyen mutasyonlara da neden olabilmektedir (Mehravard vd., 2019).

Teknik başarısızlıklar yaşanmasa bile germ hattı genom dzenleme teknolojisinin bireyi, aileyi ve toplumu olumsuz etkileyecek bir takım sonuçlar üretme potansiyeli mevcuttur. Özellikle öjeni, sosyal adalet ve tedaviye eşit erişim konusunda önemli endişeler vardır. Öjeni, olumlu özellikleri koruyan fakat olumsuz özellikleri ortadan kaldıran bir kavramdır. Bu bağlamda, germ hattı modifikasyonu, genetik çeşitliliğin kaybolmasına neden olabileceği gibi mükemmel özelliklere sahip çocukların (tasarım bebekler) doğmasına da yol açabilecektir. Dolayısıyla yalnızca belirli bir sosyoekonomik sınıftan insanların elde edebileceği fiziksel ve zihinsel yeteneklerin, toplumdaki bazı bireylere haksız bir üstünlük kazandırma ihtimali endişe oluşturmaktadır (Coller, 2019).

2015 yılında, MIT Technology Review’de basılan “Mükemmel Bebeği Tasarlamak” başlıklı makalede, Çin ve Birleşik Krallık’taki bilim adamlarının yanı sıra

ABD’deki üç araştırma merkezinin insan germ hattı hücreleri ve embriyolarının modifikasyonu üzerinde çalıştığı açıklanmıştır (Regalado, 2015). Bu makaledeki açıklamalar, aynı yıl Çin’li bir araştırma grubu tarafından insan embriyolarında genom dzenleme amacıyla CRISPR-Cas sisteminin başarılı bir şekilde kullanıldığını bildiren çalışma (Liang vd., 2015) ile doğrulanmıştır.

Bu gelişmeler karşısında harekete geçen ve 2015 yılında Napa Valley toplantısında bir araya gelen bir grup bilim insanı ve etik uzman, CRISPR-Cas’ın bilimsel, yasal, etik ve biyomedikal sonuçlarını tartışmışlardır (Baltimore vd., 2015). Bu toplantının ardından ABD Ulusal Bilim, Mühendislik ve Tıp Akademileri (NASEM) tarafından Çin Bilimler Akademisi ve İngiltere Kraliyet Cemiyeti’nin de katıldığı “Uluslararası İnsan Geni Dzenleme Zirvesi” organize edilmiştir (Ormond vd., 2017). Bu uluslararası organizasyonda gen dzenleme teknikleri ve yasal dzenlemeleri tartışmak üzere birçok uzman bir araya gelmiştir. Programın ardından kararları özetleyen “İnsan Genom Dzenleme: Bilim, Etik ve Yönetim” adlı bildiri yayınlanmıştır. Bu bildiriye göre insan geni dzenleme çalışmaları; 1) temel klinik araştırmalar, 2) somatik hücre uygulamaları, 3) germ hücrelerindeki (gamet, zigot ve embriyolar) uygulamalar olmak üzere sınıflandırılmıştır. Tedavi amaçlı CRISPR-Cas teknolojilerinin kullanımında asıl tartışma konusu germ hattına yönelik dzenlemeler olmuştur. Somatik hücrelerde genom dzenlemesi, yalnızca uygulamaya maruz kalan hücrelerle sınırlı kaldığından kalıtsal etkileri bakımından daha düşük bir risk oluşturmaktadır. Ancak germ hattının dzenlemesinde, dzenleme bireyin üreme hücresinde yapıldığı için genetik modifikasyon kalıcı olmakta ve sonraki nesillere taşınmaktadır.

Bu nedenle germ hattı modifikasyonu, genetik hastalıkların tedavisi veya tamamen ortadan kaldırılması bakımından büyük bir potansiyele sahip olsa da sosyal, etik ve politik etkileri ve suistimal riski nedeniyle eşine az rastlanır tartışmalara neden olmuştur (NASEM, 2017; Memi vd., 2018). NASEM raporu, bugüne kadar, insan genomunun düzenlenmesiyle ilgili endişelerin analizini yapan belki de en kapsamlı rapor olmuştur. NASEM raporunda, germ hattı düzenlemesini içeren klinik denemelerin, teknik ve güvenlik ile ilgili riskler ancak çok daha iyi anlaşıldığında başlayabileceği ön görülmüştür (NASEM, 2017).

2018 yılında, Çinli araştırmacı He Jiankui tarafından ilk “CRISPR bebekleri”nin dünyaya geldiğini duyurulması tartışmaları daha da tırmandırmıştır. Anne karnındaki HIV’li bebeklere HIV virüsüne karşı bağıklık kazandırmak amacıyla CCR5 (CC chemokine receptor 5) genini silmek için CRISPR-Cas9 tekniğini uygulayan He Jiankui, Lulu ve Nana takma adları ile bilinen ilk genetik olarak düzenlenmiş ikizleri üretmiştir. Bilim insanları, kapsamlı bir şekilde araştırılmamış veya henüz tam olarak tespit edilmemiş riskler nedeniyle embriyo üzerinde bu tip modifikasyonların insan genomunu kalıcı olarak değiştirebileceği dahası beklenmeyen sonuçlara yol açabileceği düşüncesiyle riskli olduğunu bildirmişlerdir (Normile, 2018).

Bu gelişmeler üzerine 2019 yılında Emmanuelle Charpentier’in de yer aldığı bir grup araştırmacı germ hattı düzenlemelerinin klinik kullanımlarıyla ilgili küresel bir moratoryum çağrısında bulunmuştur. Araştırmacılar küresel moratoryum ile kalıcı bir yasağın kastedilmediğini ancak ulusların belirli koşullar karşılancaya kadar “klinik germ hattı düzenlemelerinin” herhangi bir amaçla kullanımını onaylamaması için

çağrıda bulunmuşlardır. Önerilen moratoryumun, germ hattı düzenlemelerinin klinik kullanımına izin verilmeyen "sabit bir süre" ile sınırlı olduğunu ve bu sürenin teknik, bilimsel, tıbbi, toplumsal, etik ve ahlaki konular üzerinde tartışmalar yapmak ve uluslararası bir çerçeve oluşturmak için gerekli zamanı kazandıracağını ifade etmişlerdir. Ayrıca moratoryumun, embriyo transferini içermemesi koşuluyla, araştırma amaçlı germ hattı düzenlemeleri ile DNA modifikasyonlarının kalıcı olmadığı insan somatik hücrelerine uygulanan tedavi amaçlı genom düzenlemelerini kapsamadığını bildirmişlerdir (Lander vd., 2019).

Burada erken evre insan embriyolarının, gametlerinin veya onların öncül hücrelerinin genetik olarak düzenlenmesinde, amaçları ve sonuçları birbirinden farklı olan iki uygulama karşımıza çıkmaktadır. Bunlardan ilki, genetiği değiştirilmiş embriyoların, embriyo transferi yoluyla genomu değiştirilmek istenen bir insanın doğumuna yönelik süreçlerde kullanımına dayanan ve germ hattı genom düzenlemelerinin klinik kullanımını ifade eden “kalıtsal genom düzenlemesi”dir. Diğeri ise, gamet öncü hücreleri, eşey hücreleri veya erken evre embriyolarda genetik modifikasyonlar oluşturmayı hedeflemekle birlikte ortaya çıkan genetiği değiştirilmiş embriyoların kalıtsal genom düzenlemesinden farklı olarak üreme amaçlı kullanılmadığı araştırma amaçlı “germ hattı genom düzenlemesi”dir (Ormond vd., 2017). Araştırma amaçlı germ hattı genom düzenlemeleri, çoğulukla insan embriyolarının gelişiminin izlenmesi, embriyonun DNA onarım mekanizmalarının ve hücre kaderini belirleyen anahtar genlerin oynadığı rolün anlaşılmasına yönelik çalışmalarda kullanılmaktadır (Baylis vd., 2020).

Bugün birçok ülkede insan genomunu düzenleme tekniklerinin kullanımıyla ilgili düzenleyici politikalar (mevzuat, yönetmelikler, yönergeler ve uluslararası anlaşmalar) mevcuttur. Baylis vd. (2020), dünya genelinde insan genomunun düzenlenmesine ilişkin politikaları analiz etmek için 2020 yılında 106 ülkeyi kapsayan bir tarama yapmışlardır. Araştırmacılar, analiz ettikleri ülkelerin 96'sında erken evre insan embriyolarını, gametlerini veya onların öncül hücrelerini kalıtsal olarak değiştirmeyi amaçlayan genom düzenleme tekniklerinin kullanımıyla ilgili politikaların mevcut olduğunu tespit etmişlerdir. Ancak bu ülkelerin hiçbirinde genetiği değiştirilmiş embriyoların in vitro kullanımına (kalıtsal genom düzenlemesi) açıkça izin verilmediğini bildirmişlerdir. Diğer taraftan araştırma amaçlı insan germ hattı genom düzenlemelerine yönelik politikaların ülkeden ülkeye farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Amerika Birleşik Devletleri, Birleşik Krallık, Japonya, Çin, İrlanda ve Hindistan'ın da içinde bulunduğu 11 ülkede bu araştırmalara izin verilirken, Brezilya, Almanya, Kanada, İsveç, İsviçre, Yunanistan, Malezya ile birlikte toplam 23 ülkede yasaklandığı tespit edilmiştir. Ancak analiz edilen ülkelerin büyük çoğunluğunda araştırma amaçlı germ hattı genom düzenlemelerini özel olarak ele alan yasal düzenlemelerin henüz bulunmadığı rapor edilmiştir.

6.2. Bitkisel üretimdeki riskler ve yasal düzenlemeler

Bitkisel ürünlerin hastalık direnci, verim, stres adaptasyonu ve besin bileşiminin iyileştirilmesi gibi önemli genetik özelliklerini geliştirmeye yönelik çalışmalarda CRISPR-Cas sistemi etkin bir şekilde kullanılmıştır (Pfeiffer, 2018). Ancak bu yöntemle genomu düzenlenen ürünlerin oluşa-

bileceği riskler, bu ürünlerin GDO'lardan hangi yönlerden farklı olduğu ve yasal olarak nasıl düzenlenmesi gerektiği gibi konular hâlâ tartışılmaya devam etmektedir. Bu tartışmalar genel olarak; hedef dışı mutasyonların varlığı ve sıklığı, CRISPR-Cas ürünleri için kullanılan risk değerlendirme yöntemlerinin uygun veya yeterli olup olmadığı ve GDO ile ilgili mevcut düzenlemelerin CRISPR-Cas ile düzenlenen ürünlere uygulanıp uygulanamayacağı üzerinde odaklanmıştır (Ran vd., 2013; Ahmad vd., 2021).

Hedef dışı mutasyonlar, CRISPR-Cas uygulamalarında ortaya çıkan en önemli risklerden biridir. Bitki genomunda hedef dışı mutasyonların oluşma oranı ve bunların nasıl ortadan kaldırılacağına yönelik yoğun araştırmalar yapılmaktadır (Zischewski vd., 2017). Son araştırmalar, CRISPR-Cas sistemi ile genomu düzenlenen bitkilerde hedef dışı mutasyonların oldukça düşük sıklıkta veya nadiren görüldüğünü ortaya koymuştur (Anderson vd., 2016; Li vd., 2019b). Bu çalışmalar, CRISPR-Cas sisteminin bitki genomunda beklenmeyen hedef dışı etkilerinin çok az olduğunu gösterse de, herhangi bir CRISPR-Cas uygulamasında tüm hedef dışı etkilerin saptanmasının kritik önem taşıdığı vurgulanmaktadır (Manghwar vd., 2020).

Diğer bir önemli tartışma konusu ise, CRISPR-Cas ile düzenlenen ürünlerin genetiği değiştirilmiş organizmalar (GDO) kapsamına girip girmediğidir (Barrangou ve Notebaart, 2019). Biyoteknolojik ürünlerin resmi kontrolü, takibi ve sağlık yönünden kontrolü konusunda ilk düzenleme 1990 yılında Uluslararası Gıda Biyoteknoloji Konseyi tarafından yapılmıştır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Gıda ve Tarım Örgütü (FAO), birlikte çalışarak, rekombi-

nant DNA teknolojisi ile üretilen ürünler için dünyaca kabul görmüş yasal düzenlemeler getirmiştir. Bugün rekombinant DNA teknolojisine dayalı ürünlere yönelik yasal düzenlemelerin CRISPR-Cas uygulamaları için de geçerli olup olmayacağı tartışmalıdır. Bu tartışmanın odak noktasını ise, NHEJ onarım mekanizmasına dayalı CRISPR teknolojisi ile üretilen ürünlerin yabancı DNA içermediği için GDO kapsamında değerlendirilip değerlendirilmeyeceği oluşturmaktadır (Charo ve Greely, 2015).

GDO'lar, yabancı kaynaklı bir genin konakçı genomuna eklenmesine dayanan transgenik bir yaklaşımla üretilirken, NHEJ onarım mekanizmasının kullanıldığı CRISPR-Cas sisteminde, değişiklikler endojen genler üzerinde yabancı bir DNA'ya ihtiyaç duyulmaksızın organizmanın kendi DNA tamir mekanizmaları etkinleştirilerek (knock out) yapılmaktadır (Globus ve Qimron, 2018; Li vd., 2019c) Dolayısıyla, bu şekilde genomu düzenlenmiş bitkilerin genetik özellikleri, geleneksel genetiği değiştirilmiş organizmalardan (GDO'lar) farklı, ancak doğal veya mutajenez yaklaşımıyla üretilen ürünlere benzemektedir. Bu bakış açısı ile değerlendirildiğinde CRISPR ile üretilen ve transgen içermeyen bitkiler, nihai üründe ekzojen DNA'ya sahip olmadığı için, ortaya çıkan bitkisel ürünler GDO düzenlemesi kapsamına girmemektedir. Ayrıca, CRISPR-Cas'ın knock out mekanizması kullanılarak düzenlenen bitkiler, önceki genetik modifikasyon tekniklerinden farklı olarak yabancı DNA içermedikleri için, nispeten daha az riskli ve etik olarak daha kabul edilebilir bulunmaktadır (Bartkowski vd., 2018; Li vd., 2019c; Schulman vd., 2020). Bunun aksine CRISPR-Cas'ın knock-in mekanizması ile düzenlenen bitkilerin, ya-

bancı DNA içermeleri nedeniyle potansiyel olarak GDO'lara benzer riskler taşıdığı düşünülmektedir. Bu ürünlerle ilgili endişelerin başında, genetiği değiştirilmiş (GD) ürünlerdeki gibi transgenlerin doğal türlere geçerek biyolojik çeşitliliği ve çevreyi olumsuz etkileme riski gelmektedir. Özellikle bu ürünlerle beslenen böcek ve zararlılarda pestisitlere karşı direnç gelişimi ile ilgili ciddi endişeler duyulmaktadır (Zhang vd., 2020; Turnbull vd., 2021).

Bugün birçok bilim insanı, CRISPR kullanılarak yapılan değişikliklerin doğal veya geleneksel ıslahtan farklı olmadığını ve bu nedenle CRISPR tarafından düzenlenen çeşitlerin mevcut GDO düzenlemelerine tabi olmaması gerektiğini savunmaktadır. Buna karşılık bazı bilim insanları ise bu teknolojiler tarafından geliştirilen ürünlerin genetiğinin değiştirilmiş olduğu bu nedenle potansiyel olarak GDO düzenlemelerine tabi olması gerektiğini düşünmektedir. Bu görüşler ülkelerin politikalarına da yansımıştır. Örneğin ABD'de, knock-out tekniği kullanılarak üretilen ürünler GDO'lara uygulanan düzenlemelerin dışında tutulurken, AB'de bu ürünler için mevcut GDO düzenlemeleri geçerliliğini korumuştur (Ahmad vd., 2021). Avrupa Adalet Divanı (The European Court of Justice-ECJ) tarafından, 25 Temmuz 2018'de CRISPR-Cas gibi genom düzenleme teknolojileri kullanılarak üretilen ürünler, genetiği değiştirilmiş organizmalar (GDO'lar) olarak kabul edilmiş ve CRISPR-Cas ile düzenlenen bütün ürünler için geleneksel GDO ürünlerine uygulanan kuralların uygulanmasına karar verilmiştir. Diğer taraftan birçok ülkede bu konularla ilgili tartışmaları hâlâ devam etmekte ve yasal düzenlemelerde sıklıkla değişiklik yapılmaktadır (Ishii, 2017; Ahmad vd., 2021).

ABD’de transgen içermeyen CRISPR-Cas kaynaklı düzenlemelerin (knock-out) yasal statüsü GDO mevzuatından farklıdır. Tarım Bakanlığı (USDA), CRISPR-Cas’in knock-out mekanizması ile düzenlenmiş bitkisel ürünleri, GDO’lara uygulanan ağır kısıtlamaların dışında bırakarak serbestçe yetiştirilip satılabileceğini bildirmiştir (Waltz, 2018). Bugüne kadar ABD’de CRISPR-Cas teknolojisi ile üretilen 5 ürüne GDO’lara uygulanan yasal düzenlemelerden muaf tutularak onay verilmiştir. Bunlardan ilki, yenilebilir mantarlarda esmerleşmeye neden olan polifenol oksidaz geninin CRISPR-Cas teknolojisiyle silinmesi ile elde edilmiş esmerleşmeye karşı dirençli beyaz kültür mantarı (*Agaricus bisporus*)’dır. İkinci ürün mısırdaki (*Zea mays*) endojen bir gen olan *Wx1*’in inaktivasyonu ile üretilmiş amilopektin açısından zengin mumlu mısır olarak adlandırılan üründür (Waltz, 2016). Yasal sınırlamaya tabi olmayan CRISPR teknolojisiyle modifiye edilmiş ürünlerin listesine, 2017 yılında, omega-3 içeriği artırılmış bir yağ bitkisi olan ketencik (*Camelina sativa*), *Drb2a* ve *Drb2b* genleri inaktive edilerek kuraklığa ve tuzluluğa karşı dayanıklılık kazandırılan soya fasulyesi (*Glycine max*) ve *IDI* (*Inhibitor Of DNA Binding 1*) geninin inaktivasyonunun neden olduğu gecikmeli çiçeklenme ile karakterize edilen yeşil tilki kuyruğu (*Setaria viridis*) bitkisi eklenmiştir (Waltz, 2018; Kuluev vd., 2019).

GDO’lar için yasal düzenlemeler, ürün veya süreç bazlı yaklaşımlar olarak kategorize edilmektedir. Ürün temelli yasal düzenlemeler, ürünleri geliştirmek için kullanılan süreçleri dikkate almadan yeni bitki çeşitlerine odaklanmaktadır. Bu yaklaşımda, sağlık veya çevre ile ilgili oluşabilecek herhangi bir riskin, bitkinin üretiminde kullanılan genetik mühendisliği tek-

niklerinden değil de nihai üründen kaynaklandığı kabul edilir. ABD, Hindistan, Japonya, Arjantin, Rusya, Avustralya ve Şili GDO ürünlerin kontrolünde ürün bazlı düzenleyici yaklaşımları kullanmaktadır. Ürün tabanlı yaklaşımlar Dünya Ticaret Örgütü (WTO) serbest ticaret anlaşmalarıyla da uyumludur. Sürece dayalı yasal düzenlemelerde ise, GDO ürünler ile GDO olmayan ürünler arasında farklılık, bitkinin üretiminde kullanılan yöntemlere göre belirlenir. Ürün bazlı düzenlemelerin aksine süreç bazlı düzenlemelerde, potansiyel risklerin kaynağı kullanılan yöntemlerdir. Bu yaklaşımda, genomunda doğal olarak bulunmayan genleri içeren bitkinin, genetik mühendisliği teknikleri kullanılarak üretildiği kabul edilir. AB ve Yeni Zelanda’da GDO ürünler için süreç bazlı düzenlemeler geçerlidir. Sonuç olarak CRISPR-Cas ile düzenlenen ürünlerin güvenliği ve yasal düzenlemesi konusundaki küresel anlamda ortaya çıkan farklı uygulamalar, çoğunlukla GDO ve CRISPR süreçleri arasındaki benzerlik ve farklılıklardan kaynaklanmaktadır. Bunun yanı sıra GDO’lara ait yasal düzenlemelerin kendi içinde ürün veya süreç bazlı yaklaşımlar olarak kategorize edilmesi durumu daha da karmaşık hale getirmektedir (Ishii ve Araki, 2016; Lassoued vd., 2019; Mubarik vd.,2021).

6.3. Hayvansal üretimdeki riskler ve yasal düzenlemeler

Genom düzenleme teknolojileri, çiftlik hayvanlarında verimi artırma, çiftçilik faaliyetlerinin çevre üzerindeki olumsuz etkisini azaltma, hastalıkların kontrolü, hayvan refahını ve sağlığını iyileştirme gibi hayvancılık sektörünün geliştirmesine katkı sağlayacak çözümler sunmaktadır (Wei vd., 2015; Carlson vd., 2016). Geleneksel

ıslah yöntemlerinde, üstün bir özelliğın geliştirilmesi, uzun zaman alan, yüksek maliyetli ve zahmetli bir süreçtir. Buna karşılık genom düzenleme teknolojisi kullanarak, hedef özellikleri etkileyen anahtar genler hızlı bir şekilde düzenlenebilir ve sadece tek bir neslin düzenlenmesi ile istenilen özelliklere sahip yeni bir genotip elde edebilir (Ruan vd., 2017). Diğer düzenleme araçlarına (ZFN'ler, TALEN'ler) kıyasla spesifikliğı ve verimi çok daha yüksek olan CRISPR/Cas9'un popolaritesi göz önüne alındığında, yakın bir gelecekte genomu düzenlenmiş çok sayıda çiftlik hayvanın üretilmesi kaçınılmaz olacaktır (Raza vd., 2021). Bu durum CRISPR/Cas9'un besicilik sektörüne getireceğı artıları kadar eksilerininin de kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesini zorunlu kılmaktadır.

Hedef dışı düzenleme, genomu düzenlenmiş hayvanlar ile ilgili en önemli endişe kaynaklarından birisidir. Mevcut genom düzenleme teknolojilerinin tümü, genomda hedef dışı mutasyonları indüklemeye potansiyeline sahiptir. Bu mutasyonlar genomu düzenlenmiş hayvanın sağığı üzerinde potansiyel bir risk oluşturmakla kalmayıp aynı zamanda bu hayvanlara ait ürünlerin tüketimi ile ortaya çıkabilecek uzun vadeli etkiler konusunda da belirsizliklere neden olmaktadır (Ishii, 2017). Örneğın, CRISPR/Cas9 ile miyostatin geni düzenlenen hayvanlar, çift kas fenotipine sahip olmakla birlikte ölü doğum, erken evre ölüm, omurga deformitesi ve anormal yağ, şeker ve protein metabolizması gibi istenmeyen bazı etkiler de sergileyebilmektedirler (Yeh vd., 2017; He vd., 2018). Genomdaki istenmeyen değişiklikler, ürünün ticari değerini düşüren veya hayvan sağığını ve refahını açıkça etkileyecek bir olumsuzlukla sonuçlanabileceğı gibi bu değişiklikler her zaman bu kadar belirgin de olmayabilir.

Özellikle tümör baskılayıcı genlerin (örneğin *p53* geni) CRISPR/Cas düzenlemelerinden etkilenerek kanser riskini artırma potansiyeli bulunmaktadır (Haapaniemi vd., 2018). Hayvan sağığına yönelik endişelerin yanısıra, "kasıtlı genomik değişikliklerin (IGA)" veya herhangi bir istenmeyen değişikliğın, hayvansal gıdaların bileşiminde veya besin içeriğında birtakım değişiklikler oluşturup oluşturmadığı dikkate alınması gereken başka bir faktördür. Örneğın, sütün bileşiminde istenmeyen değişiklikler oluşturan IGA'lar, insanların özellikle bebeklerin sağığını olumsuz etkileyebilir (Epstein vd, 2021).

Genomu düzenlenmiş hayvanlarla ilgili endişe oluşturan diğer bir konu da biyogüvenlik için kritik önem arz eden izlenebilirliktir. CRISPR-Cas9'un knock-in mekanizması kullanılarak genomu düzenlenmiş hayvanlarda değişiklikler, ekzojen gen içeren geleneksel transgenik hayvanların aksine genellikle ayak izi bırakmamaktadır. Bu durum genomu düzenlenmiş hayvanlar ve ürünlerinin üretim ve dağıtım aşamalarında izlenmesi ve kayıt altına alınmasını zorlaştırmakta ve izlenebilirliğı sağlamak için yeni teknolojilere ihtiyaç duyulmaktadır (Ruan vd., 2017).

Bugün birçok ülkede CRISPR/Cas dâhil olmak üzere genom düzenleme teknolojileri kullanılarak geliştirilen hayvanlar ve onların ürünlerini özel olarak ele alan risk değerlendirme mevzuat veya yönergeleri mevcut değildir. Bu nedenle, genomu düzenlenmiş hayvanların değerlendirilmesi hâlihazırda GDO'lu hayvanlar için geliştirilmiş olan risk değerlendirme yönergelerine göre yapılmaktadır (Van Eenennaam 2018). Bununla birlikte, NHEJ mekanizması kullanılarak bir veya birkaç baz çiftinin silinmesi veya eklenmesi ile gerçekleştir-

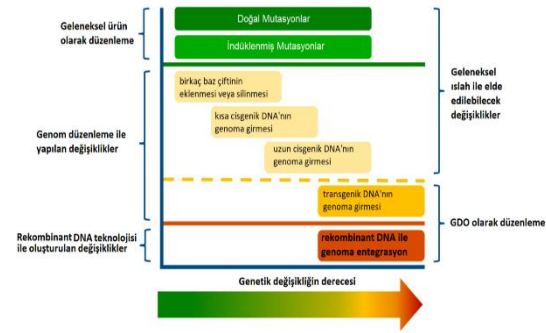
tirilen mutasyonlar yoluyla genomu dzenlenen çiftlik hayvanlarının ekzojen gen içermediği için geleneksel GDO'lu hayvanlardan farklı olduğu ve aynı riskleri taşımadığı dolayısıyla mutajenez ile üretilen ürünler için geçerli olan düzenlemelerin uygulanması gerektiği düşüncesi oldukça yaygındır (Fan vd., 2021). Ancak buna rağmen Avrupa Adalet Divanı (ECJ) 2018 tarihli kararında, AB'nin mutajenez muafiyetinin yalnızca geçmişte geleneksel olarak kullanılan ve güvenli kullanım geçmişine sahip mutajenez yöntemleriyle elde edilen organizmalar için geçerli olduğu açıkça belirtmiştir. Dolayısıyla CRISPR/Cas ve diğer genom düzenleme teknikleri, henüz güvenli kullanım geçmişine sahip olmadıkları için bu muafiyet kapsamına girmemiştir (Eriksson vd., 2019).

Genomu düzenlenmiş bir ürünün, mevcut GDO düzenleme süreçleri kapsamına hangi durumda dâhil edilmesi gerektiği ile ilgili farklı seçenekler bulunmaktadır (Şekil 4). Düzenleyici kurumlar genellikle doğal mutasyonlar ve mutajenezle üretilen ürünlerin, geleneksel ürünler olarak düzenlenmesi gerektiği konusunda hemfikirdir. Yine birçok ülkede yasal düzenleyiciler, transgenik eklemeler yapılan ürünlerin, GDO yasaları kapsamındaki düzenlemelere tabi olması gerektiği konusunda da ortak düşünceye sahiptirler. Buradaki sorun, Şekil 4'te (1) ekleme veya silme yoluyla yapılan küçük değişiklikler; (2) kısa, cisgenik eklemeler; (3) uzun, cisgenik eklemeler; ve (4) transgenik eklemeler olarak gruplandırılan değişikliklerin hangi kategoride değerlendirileceği yani kesikli sarı çizginin nereden çekileceği ile ilgilidir (Wray-Cahen vd., 2022). Arjantin ve Brezilya gibi ülkelerde, Şekil 4'te gösterildiği gibi kesikli çizginin üzerindeki cisgenik değişiklikleri içeren ürünler, geleneksel

ürünler kapsamında değerlendirilirken çizginin altında kalan transgenik ürünler, GDO yasalarına göre düzenlenmektedir.

ABD'de FDA'ya bağlı Veterinerlik Merkezi (CVM) tarafından 2017'de "Hayvanlarda Kasıtlı Olarak Değiştirilmiş Genomik DNA'nın Düzenlenmesi" başlıklı, revize edilmiş bir kılavuz taslağı yayınlanmıştır. Bu yeni kılavuzda, bir öncekinde bulunan "rekombinat DNA" tanımlaması çıkarılarak yerine modern moleküler teknolojiler kullanılarak oluşturulan "kasıtlı genomik değişiklikler (IGA)" getirilmiştir (FDA, 2017). Bu kılavuza göre üründe CRISPR veya başka bir gen düzenleme aracı kullanılarak oluşturulmuş bir IGA mevcutsa, riskin derecesi veya genomik değişikliğin özelliğinden bağımsız olarak pazarlama öncesi yeni bir hayvan ilacı için uygulanan değerlendirmelere tabi tutulması zorunludur (Van Eenennaam, 2018). FDA/CVM, IGA'yı oluşturmak için kullanılan teknolojiden bağımsız olarak, riske dayalı değerlendirme yapmakta, IGA'dan kaynaklanan potansiyel tehlikenin/tehlikelerin oluşturduğu riskin düşük olduğu durumda, bu ürünleri geliştirenlerin ürünlerini pazarlamak için FDA onayı almalarına gerek kalmamaktadır (Epstein vd., 2021). Nitekim Mart 2022'de CVM, Acceligen Şirketi tarafından genomu düzenlenmiş, sıcaklığa toleranslı sığırları "insanlar, hayvanlar, gıda arzı ve çevre için düşük riskli" olarak tanımlanmıştır. Prolaktin reseptör geninde (*PRLR*) yapılan "kasıtlı genomik değişiklik (IGA)" nedeniyle kısa ve pürüzsüz kıllara sahip olan bu sığırlar "PRLR-SLICK sığırları" olarak adlandırılmıştır. Geleneksel olarak yetiştirilen sığırlarda doğal olarak meydana gelen mutasyonları taklit eden bu IGA sayesinde PRLR-SLICK sığırlarına, vücut ısısını daha etkili bir şekilde düzenleme yeteneği kazandırıl-

mıştır. Bu fenotipin, tropik veya subtropikal iklimlerde yetiştirilen sığırların adaptasyon yeteneğini artırması ve iklim değişikliğinin hayvanların verimliliği üzerindeki olumsuz etkisini azaltması beklenmektedir (Van Eenennaam ve Mueller 2022). PRLR-SLICK sığırları, FDA'nın "düşük riskli" olarak tanımladığı IGA içeren ilk gıda amaçlı hayvansal üründür. Bu tanımlama FDA'nın geleneksel yöntemle yetiştirilen sığır ile genomu düzenlenmiş PRLR-SLICK sığırları arasında son ürün açasından uygulamada bir farklılık olmadığını kabul ettiği anlamına gelmektedir (FDA, 2022).



Şekil 4: Mutasyon, cisgenik (sarı) ve transgenik (turuncu) genom düzenleme uygulamaları ve rekombinant DNA tekniği ile gerçekteştirilen genetik değişiklikler için uygulanan düzenlemeler (Wray-Cahen vd., 2022)

Genetiği değiştirilmiş hayvancılık ürünlerinin tüketimi yasal olarak onaylansa bile, bu hayvanlar ve ürünleri toplum tarafından kabul edilmedikçe yapılan yatırımlar karşılıksız kalacaktır. Nitekim FDA tarafından 2015 yılında gıda olarak tüketimi onaylanan transgenik somon, halk tarafından yeterince kabul görmemiş ve çevreci grupların tepkisiyle karşılaşmıştır (Ishii, 2017). Tüketici davranışlarını inceleyen araştırmalar, GDO'lu hayvanların GDO'lu bitkilerden daha az kabul gördüğünü ortaya koymuştur (Siegrist, 2000). Dolayısıyla

benzer tepkilerin CRISPR-Cas ile üretilen çiftlik hayvanları ve ürünleri için de gösterilmesi muhtemeldir.

7. Ulusal Güvenliğe Yönelik Riskler

CRISPR-Cas sistemiyle ilgili diğer bir önemli tehlike, bu teknolojinin yasa dışı veya sorumsuz şekilde denenmesi ve kötüye kullanılmasıdır (Zhang et al., 2020). En çok korkulan durum ise, CRISPR-Cas teknolojinin insanları veya tarımsal ürünleri enfekte eden ve bilinen bir tedavisi olmayan veya olağandışı virülanslık sergileyen patojenlerin veya biyolojik silahların üretiminde kullanılma olasılığıdır (Sarchet ve Le Page, 2015). Genel olarak, CRISPR-Cas ve diğer genom düzenleme tekniklerinin araştırma, tedavi veya tarımsal amaçlar için kullanımının yaygınlaşması ve uluslararası ticaretinin artması, bu teknolojiye çok çeşitli aktörlerin erişimini kolaylaştırmakta ve biyogüvenliğe yönelik bir dizi tehdit oluşturmaktadır (Wani vd., 2022).

ABD İstihbarat Teşkilatı tarafından 2016 yılında ABD Senatosuna sunulan "Dünya Çapında Tehdit Değerlendirmesi" isimli bir raporda, iyi ve kötü amaçlı kullanımı olan biyolojik ve kimyasal malzeme ve teknolojilerin kasıtlı veya kasıtsız yanlış kullanımının büyük çaplı ekonomik ve ulusal güvenlik sorunlarına yol açabileceği bildirilmiştir. Raporda ayrıca, bu çift kullanımlı malzeme ve teknolojilerin ve bunları tasarlamak veya kullanmak için bilimsel uzmanlığa sahip kişilerin küreselleşmiş dünyada kolayca hareket edebildiğine de dikkat çekilmiştir. Bu bağlamda CRISPR-Cas uygulamalarının insana veya çevreye zarar verebilecek olası risklerini kontrol altına almak için güvenlik önlemleri geliştirmenin kritik önemine vurgu yapılmıştır (Regalado, 2016).

8. Sonuç ve Öneriler

CRISPR-Cas farklı genom tiplerine uygulanabilen çok yönlü bir genom düzenleme tekniğidir. CRISPR teknolojisi ilk keşfedildiğinde genom düzenleme potansiyeline yönelik ortaya atılan soyut varsayımlar bugün somut birer gerçek halini almıştır. Genetik hastalıkların tedavisi, CRISPR teknolojisinin en çok ilgi uyandıran uygulama alanı olmuş ve kanserden nörolojik bozukluklara kadar pekçok hastalığın tedavisine yönelik hâlihazırda devam eden klinik denemelerin yolunu açmıştır. Genetik hastalıkların özellikle mutasyonlarla oluşan bozuklukların incelenmesi ve bu hastalıkların henüz bilinmeyen yönlerinin aydınlatılmasına yönelik hayvan modellerinin oluşturulmasında CRISPR-Cas teknolojisinin kullanımı hız kazanmıştır. Bununla birlikte CRISPR-Cas bileşenlerine karşı oluşabilecek hücrel toksisite ve immünojenite ile potansiyel hedef dışı etkiler, bu teknolojinin klinikte rutin olarak kullanımını sınırlandırabilecek çözüm bekleyen sorunlar arasındadır. CRISPR-Cas teknolojisinin somatik hücre genomunu düzenleyen uygulamalarına yönelik önemli bir kamuoyu desteği mevcut olmasına rağmen, germ hattı genom düzenlemeleri etik ve güvenlik kaygıları nedeniyle bu teknolojinin en çok tartışılan uygulama alanı olmuştur. Bu konuda hazırlanmış birçok rapor bulunmasına rağmen, çoğunlukta olan görüş kalıtsal germ hattı araştırmalarına ancak belirli gereksinimlerin karşılanması durumunda izin verilmesi gerektiği yönündedir. Ayrıca genom düzenlemeleri ile ilgili etik/ahlaki tartışmaların yalnızca bilim camiasının hâkimiyetinde olmaması, bunun yerine bilim insanları ve farklı kuruluşlardan oluşan bir organizasyon tarafından yürütülmesi gerektiği düşünülmektedir. Farklı disiplinlerden ulusal ve uluslararası

kuruluşların katkısı ile oluşturulacak yönergeler doğrultusunda yapılacak düzenlemelerin, CRISPR teknolojisinin farklı alanlardaki uygulamalarında ortaya çıkabilecek risklerin azaltılması veya önlenmesine önemli düzeyde katkı sağlayacağı açıktır.

CRISPR teknolojisinin özellikle insan ve hayvan hücrelerini hedef alan uygulamalarında düşük düzenleme verimliliği, eksik düzenleme (mozaiklik) veya hedef dışı düzenleme gibi teknik sorunlar yaşanabilmektedir. Ancak daha verimli ve hassas CRISPR araçlarının geliştirilmesine yönelik çalışmalar benzeri görülmemiş bir hızla devam etmekte ve yakın bir gelecekte yaşanan teknik sorunların büyük ölçüde çözümleneceği düşünülmektedir. Nitekim son yıllarda yapay zekâ uygulamalarının, CRISPR-Cas aracılı genom düzenlemelerinde özgülüğün ve verimliliğin artırılması ve başarı oranlarının iyileştirmesine önemli oranda katkısı olmuştur.

CRISPR-Cas teknolojisi, bitkisel üretimde stres toleransı, hastalık direnci, besin kalitesi ve verimin artırılması gibi birçok genetik özelliği iyileştirmek için büyük bir potansiyele sahiptir. Yine hayvancılıkta başta hastalıklara karşı direnç kazanımı olmak üzere üretimde verimin ve kalitenin artırılmasına yönelik iyileştirmeler klasik ıslah yöntemlerine göre çok daha kısa bir sürede sağlanabilmektedir. Ancak bu heyecan verici gelişmelere rağmen, genomu düzenlenmiş ürünlerin GDO olup olmadığı, dolayısıyla GDO'lar için uygulanan yasal düzenlemelerden muaf tutulup tutulmayacağı ile ilgili küresel çapta belirsizlikler hâlâ devam etmektedir. Diğer taraftan CRISPR-Cas aracılı genom düzenlemesi ile üretilen gıdaların tüketiciler tarafından kabul edilip edilmeyeceği de yine tartışmalı bir konu-

dur. Bunun başlıca nedenini CRISPR-Cas ürünlerinin halk sağlığı ve çevre üzerindeki etkilerine ilişkin kaygılar oluşturmaktadır. Konuyla ilgili başka bir görüşte, artan gıda ihtiyaçını karşılamak için genomu düzenlenmiş bitki ve hayvanların onaylanmasının ileride bir zorunluluk haline gelebileceğine vurgu yapılmaktadır. Zira iklim değişlikleri ve tarım arazilerindeki azalmaya bağlı olarak azalan kaynakların artan dünya nüfusunu ihtiyaçlarını karşılamakta yetersiz kalabileceğine yönelik görüşler, giderek daha çok ciddiyet kazanmaktadır. Böyle bir durumda, biyogüvenlik endişesiyle bazı ülkelerdeki genomu düzenlenmiş ürünlere yönelik aşırı derecede kısıtlayıcı düzenlemeler, diğer ülkeler için bir fırsat haline gelebilecek ve kısıtlayıcı ülkeler, ihtiyaç duyacakları ürünler için yüksek maliyetler ödemek zorunda kalabilecektir.

9. Kaynaklar

Ahmad, S., Shahzad, R., Jamil, S., Tabasum, J., Chaudhary, M. A. M., Atif, R. M., ... & Tang, S. (2021). Regulatory aspects, risk assessment, and toxicity associated with RNAi and CRISPR methods. In *CRISPR and RNAi Systems* (pp. 687-721). Elsevier.

Anderson, J. E., Michno, J. M., Kono, T. J., Stec, A. O., Campbell, B. W., Curtin, S. J., & Stupar, R. M. (2016). Genomic variation and DNA repair associated with soybean transgenesis: a comparison to cultivars and mutagenized plants. *BMC biotechnology*, 16(1), 1-13.

Anderson, K. R., Haeussler, M., Watanabe, C., Janakiraman, V., Lund, J., Modrusan, Z., ... & Warming, S. (2018). CRISPR off-target analysis in genetically engineered rats and mice. *Nature methods*, 15(7), 512-514.

Andersson, M., Turesson, H., Nicolia, A., Fält, A. S., Samuelsson, M., & Hofvander, P. (2017). Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. *Plant cell reports*, 36(1), 117-128.

Aryal, N. K., Wasylishen, A. R., & Lozano, G. (2018). CRISPR/Cas9 can mediate high-efficiency off-target mutations in mice in vivo. *Cell death & disease*, 9(11), 1-3.

Baltimore, D., Berg, P., Botchan, M., Carroll, D., Charo, R. A., Church, G., ... & Yamamoto, K. R. (2015). A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. *Science*, 348(6230), 36-38.

Barrangou, R., & Doudna, J. A. (2016). Applications of CRISPR technologies in research and beyond. *Nature biotechnology*, 34(9), 933-941.

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

Barrangou, R., & Notebaart, R. A. (2019). CRISPR-directed microbiome manipulation across the food supply chain. *Trends in microbiology*, 27(6), 489-496.

Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., ... & Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 315(5819), 1709-1712.

Bartkowski, B., Theesfeld, I., Pirscher, F., & Timaeus, J. (2018). Snipping around for

food: economic, ethical and policy implications of CRISPR/Cas genome editing. *Geoforum*, 96, 172-180.

Baylis, F., Darnovsky, M., Hasson, K., & Krahn, T. M. (2020). Human germline and heritable genome editing: the global policy landscape. *The CRISPR Journal*, 3(5), 365-377.

Bikard, D., & Marraffini, L. A. (2012). Innate and adaptive immunity in bacteria: mechanisms of programmed genetic variation to fight bacteriophages. *Current Opinion in Immunology*, 24(1), 15-20.

Bikard, D., Euler, C. W., Jiang, W., Nussenzweig, P. M., Goldberg, G. W., Duportet, X., ... & Marraffini, L. A. (2014). Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials. *Nature biotechnology*, 32(11), 1146-1150.

Bogdanove, A. J., & Voytas, D. F. (2011). TAL effectors: customizable proteins for DNA targeting. *Science* 333: 1843–1846. *in vivo effects of binding site variants*.

Briner, A. E., & Barrangou, R. (2014). *Lactobacillus buchneri* genotyping on the basis of clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) locus diversity. *Applied and environmental microbiology*, 80(3), 994-1001.

Briner, A. E., Lugli, G. A., Milani, C., Duranti, S., Turrone, F., Gueimonde, M., ... & Barrangou, R. (2015). Occurrence and diversity of CRISPR-Cas systems in the genus *Bifidobacterium*. *PLoS one*, 10(7), e0133661.

Brokowski, C., & Adli, M. (2019). CRISPR ethics: moral considerations for applications of a powerful tool. *Journal of molecular biology*, 431(1), 88-101.

Brooks, C., Nekrasov, V., Lippman, Z. B., & Van Eck, J. (2014). Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated9 system. *Plant physiology*, 166(3), 1292-1297.

Butiuc-Keul, A., Farkas, A., Carpa, R., & Iordache, D. (2021). CRISPR-Cas System: The Powerful Modulator of Accessory Genomes in Prokaryotes. *Microbial Physiology*, 1-16.

Cai, Y., Chen, L., Liu, X., Guo, C., Sun, S., Wu, C., ... & Hou, W. (2018). CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of GmFT2a delays flowering time in soya bean. *Plant biotechnology journal*, 16(1), 176-185.

Carlson, D. F., Lancto, C. A., Zang, B., Kim, E. S., Walton, M., Oldeschulte, D., ... & Fahrenkrug, S. C. (2016). Production of hornless dairy cattle from genome-edited cell lines. *Nature biotechnology*, 34(5), 479-481.

Cermák, T., Baltés, N. J., Čegan, R., Zhang, Y., & Voytas, D. F. (2015). High-frequency, precise modification of the tomato genome. *Genome biology*, 16(1), 1-15.

Charo, R. A., & Greely, H. T. (2015). CRISPR critters and CRISPR cracks. *The American Journal of Bioethics*, 15(12), 11-17.

Citorik, R. J., Mimee, M., & Lu, T. K. (2014). Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases. *Nature biotechnology*, 32(11), 1141-1145.

- Coller, B. S. (2019). Ethics of human genome editing. *Annual Review of Medicine*, 70, 289-305.
- Crispo, M., Mulet, A. P., Tesson, L., Barrera, N., Cuadro, F., dos Santos-Neto, P. C., ... & Menchaca, A. (2015). Efficient generation of myostatin knock-out sheep using CRISPR/Cas9 technology and microinjection into zygotes. *PloS one*, 10(8), e0136690.
- Cyranoski, D. (2016). CRISPR gene-editing tested in a person for the first time. *Nature news*, 539(7630), 479.
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A., ... & Charpentier, E. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 471(7340), 602-607.
- Dominguez, A. A., Lim, W. A., & Qi, L. S. (2016). Beyond editing: repurposing CRISPR-Cas9 for precision genome regulation and interrogation. *Nature reviews Molecular cell biology*, 17(1), 5-15.
- Dong, O. X., Yu, S., Jain, R., Zhang, N., Duong, P. Q., Butler, C., ... & Ronald, P. C. (2020). Marker-free carotenoid-enriched rice generated through targeted gene insertion using CRISPR-Cas9. *Nature communications*, 11(1), 1-10.
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213).
- Epstein, L. R., Lee, S. S., Miller, M. F., & Lombardi, H. A. (2021). CRISPR, animals, and FDA oversight: Building a path to success. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(22), e2004831117.
- Eriksson, D., Kershen, D., Nepomuceno, A., Pogson, B. J., Prieto, H., Purnhagen, K., ... & Whelan, A. (2019). A comparison of the EU regulatory approach to directed mutagenesis with that of other jurisdictions, consequences for international trade and potential steps forward. *New Phytologist*, 222(4), 1673-1684.
- Eş, I., Gavahian, M., Marti-Quijal, F. J., Lorenzo, J. M., Khaneghah, A. M., Tsatsanis, C., ... & Barba, F. J. (2019). The application of the CRISPR-Cas9 genome editing machinery in food and agricultural science: Current status, future perspectives, and associated challenges. *Biotechnology advances*, 37(3), 410-421.
- Etaware, P. M. (2021). The effects of the phytochemistry of cocoa on the food chemistry of chocolate (s) and how disease resistance in cocoa can be improved using CRISPR/Cas9 technology. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 3, 100043.
- Fan, Z., Mu, Y., Li, K., & Hackett, P. B. (2021). Safety evaluation of transgenic and genome-edited food animals. *Trends in biotechnology*. 40(4), 371-373.
- Feng, Z., Zhang, B., Ding, W., Liu, X., Yang, D. L., Wei, P., ... & Zhu, J. K. (2013). Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Research*, 23(10), 1229-1232.
- Fineran, P. C., & Charpentier, E. (2012). Memory of viral infections by CRISPR-Cas adaptive immune systems: acquisition of new information. *Virology*, 434(2), 202-209.
- Fister, A. S., Landherr, L., Maximova, S. N., & Gultinan, M. J. (2018). Transient expression of CRISPR/Cas9 machinery

targeting TcNPR3 enhances defense response in *Theobroma cacao*. *Frontiers in plant science*, 9, 268.

FDA (2017). US Food and Drug Administration. Regulation of Intentionally Altered Genomic DNA in Animals, Draft Guidance for Industry. *Rockville: US Food and Drug Administration*.

FDA (2022). (Food and Drug Administration). *Risk Assessment Summary – V-006378 PRLR-SLICK cattle*. <https://www.fda.gov/media/155706/download>. Erişim tarihi: 3 Ekim 2022.

Fu, Y., Foden, J. A., Khayter, C., Maeder, M. L., Reyon, D., Joung, J. K., & Sander, J. D. (2013). High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nature biotechnology*, 31(9), 822-826.

Gao, Y., Wu, H., Wang, Y., Liu, X., Chen, L., Li, Q., ... & Zhang, Y. (2017). Single Cas9 nickase induced generation of NRAMP1 knockin cattle with reduced off-target effects. *Genome biology*, 18(1), 1-15.

Garneau, J. E., Dupuis, M. È., Villion, M., Romero, D. A., Barrangou, R., Boyaval, P., ... & Moineau, S. (2010). The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 468(7320), 67-71.

Globus, R., & Qimron, U. (2018). A technological and regulatory outlook on CRISPR crop editing. *Journal of cellular biochemistry*, 119(2), 1291-1298.

Gomaa, A. A., Klumpe, H. E., Luo, M. L., Selle, K., Barrangou, R., & Beisel, C. L. (2014). Programmable removal of bacterial strains by use of genome-targeting

CRISPR-Cas systems. *MBio*, 5(1), e00928-13.

Haapaniemi, E., Botla, S., Persson, J., Schmierer, B., & Taipale, J. (2018). CRISPR–Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. *Nature medicine*, 24(7), 927-930.

He, Z., Zhang, T., Jiang, L., Zhou, M., Wu, D., Mei, J., & Cheng, Y. (2018). Use of CRISPR/Cas9 technology efficiently targeted goat myostatin through zygotes microinjection resulting in double-muscle phenotype in goats. *Bioscience reports*, 38(6). BSR20180742.

Hellmich, R., Sid, H., Lengyel, K., Flisikowski, K., Schlickerrieder, A., Bartsch, D., ... & Schusser, B. (2020). Acquiring resistance against a retroviral infection via CRISPR/Cas9 targeted genome editing in a commercial chicken line. *Frontiers in genome editing*, 2, 3.

Hermans, P. W., Van Soolingen, D., Bik, E. M., De Haas, P. E., Dale, J. W., & Van Embden, J. D. (1991). Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Infection and Immunity*, 59(8), 2695-2705.

Hoban, M. D., Lumaquin, D., Kuo, C. Y., Romero, Z., Long, J., Ho, M., ... & Kohn, D. B. (2016). CRISPR/Cas9-mediated correction of the sickle mutation in human CD34+ cells. *Molecular Therapy*, 24(9), 1561-1569.

Horvath, P., Romero, D. A., Coûté-Monvoisin, A. C., Richards, M., Deveau, H., Moineau, S., ... & Barrangou, R. (2008). Diversity, activity, and evolution of

CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of bacteriology*, 190(4), 1401-1412.

Hullahalli, K., Rodrigues, M., Schmidt, B. D., Li, X., Bhardwaj, P., & Palmer, K. L. (2015). Comparative analysis of the orphan CRISPR2 locus in 242 *Enterococcus faecalis* strains. *PloS one*, 10(9), e0138890.

Ishii, T. (2017). Genome-edited livestock: Ethics and social acceptance. *Animal Frontiers*, 7(2), 24-32.

Ishii, T., & Araki, M. (2016). Consumer acceptance of food crops developed by genome editing. *Plant cell reports*, 35(7), 1507-1518.

Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of bacteriology*, 169(12), 5429-5433.

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

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

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

Kalidasan, V., & Theva Das, K. (2021). Is Malaysia Ready for Human Gene Editing:

A Regulatory, Biosafety and Biosecurity Perspective. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 649203.

Kuluev, B. R., Gumerova, G. R., Mikhaylova, E. V., Gerashchenkov, G. A., Rozhnova, N. A., Vershinina, Z. R., ... & Chemeris, A. V. (2019). Delivery of CRISPR/Cas components into higher plant cells for genome editing. *Russian Journal of Plant Physiology*, 66(5), 694-706.

Kurtz, S., & Petersen, B. (2019). Pre-determination of sex in pigs by application of CRISPR/Cas system for genome editing. *Theriogenology*, 137, 67-74.

Lander, E. S., Baylis, F., Zhang, F., Charpentier, E., Berg, P., Bourgain, C., ... & Winnacker, E. L. (2019). Adopt a moratorium on heritable genome editing. *Nature*, 567, 165-168.

Lassoued, R., Macall, D. M., Smyth, S. J., Phillips, P. W., & Hessel, H. (2019). Risk and safety considerations of genome edited crops: expert opinion. *Current Research in Biotechnology*, 1, 11-21.

Ledford, H. (2015). CRISPR, the disruptor. *Nature*, 522(7544), 20-25.

Leung, R. K. K., Cheng, Q. X., Wu, Z. L., Khan, G., Liu, Y., Xia, H. Y., & Wang, J. (2021). CRISPR-Cas12-based nucleic acids detection systems. *Methods*, 203, 276,281

Li, G., Liu, Y.G. and Chen, Y. (2019c) Genome-editing technologies: the gap between application and policy. *Science China Life Sciences*, 62, 1534-1538.

Li, J. , Manghwar, H. , Sun, L., Wang, P. , Wang, G., Sheng, H., & Zhang,

- X. (2019b) Whole genome sequencing reveals rare off-target mutations and considerable inherent genetic or/and somaclonal variations in CRISPR/Cas9-edited cotton plants. *Plant Biotechnology Journal*, 17 (5), 858–868.
- Li, J. F., Norville, J. E., Aach, J., McCormack, M., Zhang, D., Bush, J., ... & Sheen, J. (2013). Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nature biotechnology*, 31(8), 688-691.
- Li, Y., Li, S., Wang, J., & Liu, G. (2019a). CRISPR/Cas systems towards next-generation biosensing. *Trends in biotechnology*, 37(7), 730-743.
- Liang, P., Xu, Y., Zhang, X., Ding, C., Huang, R., Zhang, Z., ... & Huang, J. (2015). CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein & cell*, 6(5), 363-372.
- Liang, Z., Zhang, K., Chen, K., & Gao, C. (2014). Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system. *Journal of Genetics and Genomics*, 41(2), 63-68.
- Liu, X., Wang, Y., Tian, Y., Yu, Y., Gao, M., Hu, G., ... & Zhang, Y. (2014). Generation of mastitis resistance in cows by targeting human lysozyme gene to β -casein locus using zinc-finger nucleases. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1780), 20133368.
- Ma, H., Marti-Gutierrez, N., Park, S. W., Wu, J., Lee, Y., Suzuki, K., ... & Mitalipov, S. (2017). Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature*, 548(7668), 413-419.
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., ... & Mills, D. (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(42), 15611-15616.
- Manghwar, H., Li, B., Ding, X., Hussain, A., Lindsey, K., Zhang, X., & Jin, S. (2020). CRISPR/Cas systems in genome editing: methodologies and tools for sgRNA design, off-target evaluation, and strategies to mitigate off-target effects. *Advanced science*, 7(6), 1902312.
- Marangi, M., & Pistrutto, G. (2018). Innovative therapeutic strategies for cystic fibrosis: moving forward to CRISPR technique. *Frontiers in pharmacology*, 9, 396.
- Mehravar, M., Shirazi, A., Nazari, M., & Banan, M. (2019). Mosaicism in CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *Developmental biology*, 445(2), 156-162.
- Memi, F., Ntokou, A., & Papangelis, I. (2018, December). CRISPR/Cas9 gene editing: Research technologies, clinical applications and ethical considerations. In *Seminars in perinatology* (Vol. 42, No. 8, pp. 487-500). WB Saunders.
- Mojica, F. J., Díez-Villaseñor, C., Soria, E., & Juez, G. (2000). Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Molecular Microbiology*, 36(1), 244-246.
- Mojica, F. J., García-Martínez, J., & Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of molecular evolution*, 60(2), 174-182.

- Mojica, F. J., Juez, G., & Rodriguez-Valera, F. (1993). Transcription at different salinities of *Haloflex mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Molecular Microbiology*, 9(3), 613-621.
- Mubarik, M. S., Khan, S. H., & Sajjad, M. (2021). Key Applications of CRISPR/Cas for Yield and Nutritional Improvement. In *CRISPR Crops* (pp. 213-230). Springer, Singapore.
- Nakata, A. T. S. U. O., Amemura, M. I. T. S. U. K. O., & Makino, K. O. Z. O. (1989). Unusual nucleotide arrangement with repeated sequences in the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Journal of bacteriology*, 171(6), 3553-3556.
- NASEM (2017). National Academies of Sciences, Engineering and Medicine. *Human Genome Editing: Science, Ethics, and Governance*. Washington, DC: The National Academies Press.
- Ni, W., Qiao, J., Hu, S., Zhao, X., Reguski, M., Yang, M., Chen, C., 2014. Efficient gene knockout in goats using CRISPR/Cas9 system. *PLoS ONE*, 9(9), 1-8.
- Nishimasu, H., Ran, F. A., Hsu, P. D., Konermann, S., Shehata, S. I., Dohmae, N., ... & Nureki, O. (2014). Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 156(5), 935-949.
- Normile, D. (2018). Shock greets claim of CRISPR-edited babies. *Science*, 362(6418), 978-979.
- Oishi, I., Yoshii, K., Miyahara, D., & Tagami, T. (2018). Efficient production of human interferon beta in the white of eggs from ovalbumin gene-targeted hens. *Scientific reports*, 8(1), 1-12.
- Ormond, K. E., Mortlock, D. P., Scholes, D. T., Bombard, Y., Brody, L. C., Faucett, W. A., ... & Young, C. E. (2017). Human germline genome editing. *The American Journal of Human Genetics*, 101(2), 167-176.
- Ouyang, B., Gu, X., & Holford, P. (2017). Plant genetic engineering and biotechnology: a sustainable solution for future food security and industry. *Plant Growth Regulation*, 83(2), 171-173.
- Peng, J., Wang, Y., Jiang, J., Zhou, X., Song, L., Wang, L., ... & Zhang, P. (2015). Production of human albumin in pigs through CRISPR/Cas9-mediated knockin of human cDNA into swine albumin locus in the zygotes. *Scientific reports*, 5(1), 1-6.
- Petersen B, Niemann H (2015). Molecular scissors and their application in genetically modified farm animals. *Transgenic research*, 24(3), 381-396.
- Pfeiffer, M., Quétier, F., & Ricroch, A. (2018). Genome editing in agricultural biotechnology. In *Advances in Botanical Research* (Vol. 86, pp. 245-286). Academic Press.
- Pickar-Oliver, A., & Gersbach, C. A. (2019). The next generation of CRISPR-Cas technologies and applications. *Nature reviews Molecular cell biology*, 20(8), 490-507.
- Pourcel, C., Salvignol, G., & Vergnaud, G. (2005). CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology*, 151(3), 653-663.

- Proudfoot, C., Lillico, S., & Tait-Burkard, C. (2019). Genome editing for disease resistance in pigs and chickens. *Animal Frontiers*, 9(3), 6-12.
- Pyott, D. E., Sheehan, E., & Molnar, A. (2016). Engineering of CRISPR/Cas9-mediated potyvirus resistance in transgene-free *Arabidopsis* plants. *Molecular plant pathology*, 17(8), 1276-1288.
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Lin, C. Y., Gootenberg, J. S., Konermann, S., Trevino, A. E., ... & Zhang, F. (2013). Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 154(6), 1380-1389.
- Rath, D., Amlinger, L., Rath, A., & Lundgren, M. (2015). The CRISPR-Cas immune system: biology, mechanisms and applications. *Biochimie*, 117, 119-128.
- Rautela, I., Uniyal, P., Thapliyal, P., Chauhan, N., Sinha, V. B., & Sharma, M. D. (2021). An extensive review to facilitate understanding of CRISPR technology as a gene editing possibility for enhanced therapeutic applications. *Gene*, 145615.
- Raza, S. H. A., Hassanin, A. A., Pant, S. D., Bing, S., Sitohy, M. Z., Abdelnour, S. A., ... & Zan, L. (2021). Potentials, prospects and applications of genome editing technologies in livestock production. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(4), 1928-1935.
- Regalado, A. (2015). Engineering the perfect baby. *MITS Technol Rev*, 118(3), 27-33.
- Regalado, A. (2016). Top US intelligence official calls gene editing a WMD threat. *MIT Technology Review*.
- Ren, C., Liu, X., Zhang, Z., Wang, Y., Duan, W., Li, S., & Liang, Z. (2016). CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis in Chardonnay (*Vitis vinifera* L.). *Scientific reports*, 6(1), 1-9.
- Ricroch, A., Clairand, P., & Harwood, W. (2017). Use of CRISPR systems in plant genome editing: toward new opportunities in agriculture. *Emerging Topics in Life Sciences*, 1(2), 169-182.
- Rodríguez-Leal, D., Lemmon, Z. H., Man, J., Bartlett, M. E., & Lippman, Z. B. (2017). Engineering quantitative trait variation for crop improvement by genome editing. *Cell*, 171(2), 470-480.
- Ruan, J., Xu, J., Chen-Tsai, R. Y., & Li, K. (2017). Genome editing in livestock: Are we ready for a revolution in animal breeding industry?. *Transgenic research*, 26(6), 715-726.
- Sanozky-Dawes, R., Selle, K., O'Flaherty, S., Klaenhammer, T., & Barrangou, R. (2015). Occurrence and activity of a type II CRISPR-Cas system in *Lactobacillus gasseri*. *Microbiology*, 161(9), 1752-1761.
- Sarchet, P., & Le Page, M. (2015). Starting gun fired on gene editing. *Newscientists*, 226(3019), 8-9.
- Schulman, A. H., Oksman-Caldentey, K. M., & Teeri, T. H. (2020). European Court of Justice delivers no justice to Europe on genome-edited crops. *Plant biotechnology journal*, 18(1), 8.
- Selle, K., & Barrangou, R. (2015). CRISPR-Based technologies and the future of food science. *Journal of food science*, 80(11), R2367-R2372.
- Shi, J., Gao, H., Wang, H., Lafitte, H. R., Archibald, R. L., Yang, M., ... & Habben,

- J. E. (2017). ARGOS 8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. *Plant biotechnology journal*, 15(2), 207-216.
- Siegrist, M. (2000). The influence of trust and perceptions of risks and benefits on the acceptance of gene technology. *Risk analysis*, 20(2), 195-204.
- Smith, K. R. (2003). Gene therapy: theoretical and bioethical concepts. *Archives of medical research*, 34(4), 247-268.
- Sorek, R., Kunin, V., & Hugenholtz, P. (2008). CRISPR—a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nature Reviews Microbiology*, 6(3), 181-186.
- Stephens, C. J., Lauron, E. J., Kashentseva, E., Lu, Z. H., Yokoyama, W. M., & Curiel, D. T. (2019). Long-term correction of hemophilia B using adenoviral delivery of CRISPR/Cas9. *Journal of Controlled Release*, 298, 128-141.
- Stout, E., Klaenhammer, T., & Barrangou, R. (2017). CRISPR-Cas technologies and applications in food bacteria. *Annual review of food science and technology*, 8, 413-437.
- Sun, Y., Jiao, G., Liu, Z., Zhang, X., Li, J., Guo, X., ... & Xia, L. (2017). Generation of high-amylose rice through CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of starch branching enzymes. *Frontiers in plant science*, 8, 298.
- Sun, Y., Zhang, X., Wu, C., He, Y., Ma, Y., Hou, H., ... & Xia, L. (2016). Engineering herbicide-resistant rice plants through CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination of acetolactate synthase. *Molecular plant*, 9(4), 628-631.
- Tang, X. D., Gao, F., Liu, M. J., Fan, Q. L., Chen, D. K., & Ma, W. T. (2019). Methods for enhancing clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9-mediated homology-directed repair efficiency. *Frontiers in Genetics*, 10, 551.
- Turnbull, C., Lillemo, M., & Hvoslef-Eide, T. A. (2021). Global regulation of genetically modified crops amid the gene edited crop boom—a review. *Frontiers in Plant Science*, 12, 630396.
- Valletta, S., Dolatshad, H., Bartenstein, M., Yip, B. H., Bello, E., Gordon, S., ... & Boltwood, J. (2015). ASXL1 mutation correction by CRISPR/Cas9 restores gene function in leukemia cells and increases survival in mouse xenografts. *Oncotarget*, 6(42), 44061.
- Van der Oost, J., Jore, M. M., Westra, E. R., Lundgren, M., & Brouns, S. J. (2009). CRISPR-based adaptive and heritable immunity in prokaryotes. *Trends in biochemical sciences*, 34(8), 401-407.
- Van Eenennaam, A. L. (2018). The importance of a novel product risk-based trigger for gene-editing regulation in food animal species. *The CRISPR Journal*, 1(2), 101-106.
- Van Eenennaam, A. L. (2019, August). Application of genome editing in farm animals: Cattle. In *Transgenic Research* (Vol. 28, No. 2, pp. 93-100). Springer International Publishing.
- Van Eenennaam, A. L., & Mueller, M. L. (2022). CURRENT STATE OF GENOME EDITING AND WHAT IT MEANS TO BEEF PRODUCERS. Proceedings, Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle August 30-31, 2022; San Antonio, TX

- Waltz, E. (2016). Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation. *Nature News*, 532(7599), 293.
- Waltz, E. (2018). With a free pass, CRISPR-edited plants reach market in record time. *Nature biotechnology*, 36(1), 6-8.
- Wang, T., Zhang, H., & Zhu, H. (2019). CRISPR technology is revolutionizing the improvement of tomato and other fruit crops. *Horticulture research*, 6.
- Wang, W., Pan, Q., He, F., Akhunova, A., Chao, S., Trick, H., & Akhunov, E. (2018). Transgenerational CRISPR-Cas9 activity facilitates multiplex gene editing in allopolyploid wheat. *The CRISPR journal*, 1(1), 65-74.
- Wang, Y., Cheng, X., Shan, Q., Zhang, Y., Liu, J., Gao, C., & Qiu, J. L. (2014). Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nature biotechnology*, 32(9), 947-951.
- Wang, Y., Geng, L., Yuan, M., Wei, J., Jin, C., Li, M., ... & Li, X. (2017). Deletion of a target gene in Indica rice via CRISPR/Cas9. *Plant Cell Reports*, 36(8), 1333-1343.
- Wani, A. K., Akhtar, N., & Shukla, S. (2022). CRISPR/Cas9: Regulations and challenges for law enforcement to combat its dual-use. *Forensic science international*, 111274.
- Weber, J., Öllinger, R., Friedrich, M., Ehmer, U., Barenboim, M., Steiger, K., ... & Rad, R. (2015). CRISPR/Cas9 somatic multiplex-mutagenesis for high-throughput functional cancer genomics in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(45), 13982-13987.
- Wei, J., Wagner, S., Lu, D., Maclean, P., Carlson, D. F., Fahrenkrug, S. C., & Laible, G. (2015). Efficient introgression of allelic variants by embryo-mediated editing of the bovine genome. *Scientific reports*, 5(1), 1-12.
- Whitworth, K. M., Rowland, R. R., Ewen, C. L., Tribble, B. R., Kerrigan, M. A., Cino-Ozuna, A. G., ... & Prather, R. S. (2016). Gene-edited pigs are protected from porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Nature biotechnology*, 34(1), 20-22.
- Whitworth, K. M., Rowland, R. R., Petrovan, V., Sheahan, M., Cino-Ozuna, A. G., Fang, Y., ... & Prather, R. S. (2019). Resistance to coronavirus infection in amino peptidase N-deficient pigs. *Transgenic research*, 28(1), 21-32.
- Wilkinson, R., & Wiedenheft, B. (2014). A CRISPR method for genome engineering. *F1000prime reports*, 6.
- Wray-Cahen, D., Bodnar, A., Rexroad, C., Siewerdt, F., & Kovich, D. (2022). Advancing genome editing to improve the sustainability and resiliency of animal agriculture. *CABI Agriculture and Bioscience*, 3(1), 1-17.
- Wright, A. V., Nuñez, J. K., & Doudna, J. A. (2016). Biology and applications of CRISPR systems: harnessing nature's toolbox for genome engineering. *Cell*, 164(1-2), 29-44.
- Xie, S., Ji, Z., Suo, T., Li, B., & Zhang, X. (2021). Advancing sensing technology with CRISPR: From the detection of nucleic acids to a broad range of analytes—A review. *Analytica Chimica Acta*, 1185, 338848.

- Xu, Z. S., Yang, Q. Q., Feng, K., & Xiong, A. S. (2019). Changing carrot color: insertions in DcMYB7 alter the regulation of anthocyanin biosynthesis and modification. *Plant physiology*, 181(1), 195-207.
- Yeh, Y. C., Kinoshita, M., Ng, T. H., Chang, Y. H., Maekawa, S., Chiang, Y. A., ... & Wang, H. C. (2017). Using CRISPR/Cas9-mediated gene editing to further explore growth and trade-off effects in myostatin-mutated F4 medaka (*Oryzias latipes*). *Scientific reports*, 7(1), 1-13.
- Yunes, M. C., Teixeira, D. L., von Keyserlingk, M. A., & Hötzel, M. J. (2019). Is gene editing an acceptable alternative to castration in pigs?. *PloS one*, 14(6), e0218176.
- Zhang, B. (2021). CRISPR/Cas gene therapy. *Journal of Cellular Physiology*, 236(4), 2459-2481.
- Zhang, D., Hussain, A., Manghwar, H., Xie, K., Xie, S., Zhao, S., ... & Ding, F. (2020). Genome editing with the CRISPR-Cas system: an art, ethics and global regulatory perspective. *Plant biotechnology journal*, 18(8), 1651-1669.
- Zhang, Y., Wu, Y., Wu, Y., Chang, Y., & Liu, M. (2021). CRISPR-Cas systems: from gene scissors to programmable biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 137, 116210.
- Zhou, J., Peng, Z., Long, J., Sosso, D., Liu, B. O., Eom, J. S., ... & Yang, B. (2015). Gene targeting by the TAL effector PthXo2 reveals cryptic resistance gene for bacterial blight of rice. *The Plant Journal*, 82(4), 632-643.
- Zhou, J., Xin, X., He, Y., Chen, H., Li, Q., Tang, X., ... & Zhang, Y. (2019). Multiplex QTL editing of grain-related genes improves yield in elite rice varieties. *Plant cell reports*, 38(4), 475-485.
- Zischewski, J., Fischer, R., & Bortesi, L. (2017). Detection of on-target and off-target mutations generated by CRISPR/Cas9 and other sequence-specific nucleases. *Biotechnology advances*, 35(1), 95-104.