

CRISPR-Cas9 Teknolojisi ile Genetik Hastalıkların Tedavisi: Yeni Bir Devrim

Sebile Azırak  Ahmet Genç 

Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Adıyaman Üniversitesi, Adıyaman, Türkiye

ÖZET

Günümüzde, genetik hastalıkların artması sonucu tedavide yaşanan zorluklar bilim insanlarını yeni tedavi arayışlarına yöneltmiştir. Bu konuda en önemli bilimsel gelişmelerden biri düzenli aralıklarla kümelenmiş kısa palindromik tekrarlarla (CRISPR)/CRISPR ilişkili enzim (Cas) tabanlı genom düzenleme teknolojisinin uygulanmaya başlaması sonucu birçok genetik hastalığın tedavi edilmesinde umut vadeden araçlardan biri haline gelmiştir. CRISPR/Cas daha önce bakterilerde ve arkelerde viral enfeksiyonlara karşı adaptif bağışıklık savunma sisteminden uyarlanmış bir genom düzenleme aracı olarak bilinmekteydi. Bu incelemede CRISPR-Cas9 teknolojisinin kökenini, bugünü ve geleceğini, uygulama alanlarını, genetik hastalıkların tedavisindeki yeri ve önemini, zorluklarını, sınırlıklarını ve bu teknolojinin kullanımı ile ilgili etik kaygıları tartışıyoruz.

Anahtar Kelimeler: CRISPR, Gen Düzenlenmesi, Genetik Hastalıklar

* ahmetgenc@gmail.com

Copyright © 2024 by author(s), DergiPark and JOEBS. This work is licensed under (CC BY-NC-SA 4.0). [Deed](#) | [Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](#) | [Creative Commons](#)

Received :18.02.2025

Accepted :03.03.2025

How to cite this article: Ahmet Genç, Treatment of Genetic Diseases with CRISPR-Cas9 Technology: A New Revolution, Toros University Journal of Engineering and Basic Sciences, JOEBS, 2025,03, 1641221.

1. GİRİŞ

Dünya genelinde birçok mikroorganizma ile onları enfekte eden bakteriyofajlar (veya fajlar) yaygın görülmektedir. Bu nedenle, prokaryotlar ile virüsler arasında sürekli bir mücadele bulunmakta ve bununla birlikte mikroorganizmaların faj nükleik asitlerinin kesilmesini sağlayan restriksiyon enzimleri, toksin-antitoksin modülleri, düşük enfeksiyon (bir virüsün bir hücreye girdikten sonra normal bir enfeksiyon sürecinin tamamlanamadığı durum) ve son zamanlarda tanımlanan CRISPR-Cas sistemi gibi bir dizi savunma yöntemleri bulunmaktadır (1). Bu savunma mekanizmalarından en sonuncusu olan CRISPR-Cas, bakteri ve arkealarda adaptif bağışıklık sağlar (2). Adaptif bağışıklığın yalnızca omurgalılara özgü bir özellik olduğu düşünülüyordu. Ancak prokaryotların da hedefe yönelik bir bağışıklık formuna sahip olduğunun keşfi, hastalıklarının tedavisinde radikal bir değişikliğe yol açabilecek teknolojilerin geliştirilmesine yol açmıştır (3). CRISPR, sadece virüslere karşı etkili bir savunma aracı olarak değil, aynı zamanda genel olarak moleküler

biyolojide yaygın olarak kullanılan bir teknoloji olarak da yaygınlaşmıştır (2).

CRISPR literatürünün 1980'lerin sonlarına dayanması birçok kişi için bir sürpriz olabilir. Bir grup araştırmacı, bakteri ve arkeaların genomlarında DNA tekrar dizilerini gözlemlemiştir. Aslında, CRISPR kısaltmasının ortaya çıkmasından yıllar önce, birkaç mikrobiyal genetikçi, öncelikle model organizmalar ve patojenik bakterilere odaklanarak, mikroorganizmaların genomlarındaki tekrar eden dizilere rastlamıştır. Başlangıçta, bu aralıklı ve kısmen palindromik DNA tekrar dizileri, *Escherichia coli*'deki iap geninin yukarı kısmında (upstream) bir ara gen bölgesi olarak gözlemlenmiştir. Benzer tekrarlı DNA dizileri, *Mycobacterium tuberculosis* ve *Streptococcus pyogenes* gibi insan patojenlerinde, ayrıca iki *Haloferax* türü ve bir filamentöz siyanobakterinin genomlarında da gözlemlenmiştir. Bu yıllarda, DVR (direct variable repeats: doğrudan değişken tekrarlar), TREP (tandem repeats: ardaşık tekrarlar), LTRR (long tandemly repeated repetitive sequences: uzun ardaşık tekrarlı tekrar dizileri), SRSR (short regularly spaced repeats: kısa düzenli aralıklı tekrarlar), LCTR (large clusters of tandem repeats: büyük ardaşık tekrar kümeleri), SPIDR (spacer interspersed direct repeats: araya serpiştirilmiş tekrarlar) gibi, birçok kısaltma farklı yazarlar tarafından kısmen palindromik DNA tekrar dizilerini içeren ve görünüşte rasgele dizilerle aralanan lokuslara atıfta bulunmak için kullanılmıştır. 1990'ların başında gen dizileme teknolojilerinin ortaya çıkması ile birlikte bunların kökeni ve işlevi bilinmese de, bu dizilere sahip

birçok mikrobiyal genom verisinin elde edilmesi bir dönüm noktası olmuştur (2).

2000'li yılların başlarında, birçok farklı bakteri ve arkeanın genom dizilerinin belirlenmesiyle, iki grup organizmada sürekli ve tekrarlı olarak CRISPR dizileri tespit edilmiş ve bu durum 2002'de 'CRISPR' teriminin ortaya çıkmasına yol açmıştır. Bu yaygın genetik özelliklerin biyolojik işlevi, ilk keşiflerinden neredeyse 20 yıl sonra hala gizemini korumuş, ancak bununla ilgili çeşitli hipotezlerde öne sürülmüştü; bunlar, replikon bölünmesinden DNA onarımına kadar geniş bir yelpazeye yayılmaktaydı (2).

CRISPR'ın biyolojik işlevine dair ilk ipucu, 2005 yılında üç ayrı araştırma grubunun neredeyse aynı gözlemi yapmasıyla ortaya çıkmıştır. Bu gözlem, görünüşte rasgele dizilerin benzer CRISPR tekrarlarını ayıran dizilerin, virüsler ve plazmidler gibi invaziv DNA dizileri ile homoloji gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu durum, CRISPR'ın prokaryotlarda, Cas proteinleri ile RNAi mekanizması bileşenleri arasında homologları bulunmamasına rağmen, ökaryotik RNA interferans (RNAi) sistemine benzer bir şekilde işlev görebilecek muhtemel bir savunma sistemi oluşturabildiği öne sürülmüştür (2).

CRISPR'ın prokaryotlardaki bir bağışıklık sistemi olarak önerilmesinden sonra, ilk biyolojik işlevi belirlendi. 2000'li yılların başında yoğurt bakterisi *Streptococcus thermophilus*'un suş farklılaştırma için moleküler yöntemler geliştirmeye yönelik çalışma sırasında bu türün genom diziliminde CRISPR'ın (o zamanlar SPIDR olarak adlandırılıyordu) varlığı keşfedilmiştir. 2002'nin sonlarına doğru, *S. thermophilus*'un başka suşları ile CRISPR dizilerinin karşılaştırılması sonucunda, CRISPR genotiplerinin ile faj direnci fenotiplerinin korele olduğu tespit edilmiştir. Daha sonra, bakteri kültürleri ve litik fajları kullanarak:

(1) CRISPR lokuslarının adaptasyon aşamasında faj DNA'sını yeni spacerlar olarak alabilme yeteneği olduğu;
(2) CRISPR spacer içeriğini değiştirmek, sırasıyla spacer ekleyerek, silerek veya naklederek faj direncinin kazanılmasından, kaybedilmesinden veya değiştirilmesinden doğrudan sorumlu olduğu;

(3) cas genleri, hem adaptasyon aşamasında (yeni spacerların *csn2* bağımlı entegrasyonu) hem de müdahale sürecinde (litik fajlara karşı *cas9* bağımlı direnç) rol oynadığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, CRISPR-Cas'ın bakterilerin adaptif bağışıklık sistemini oluşturduğunu gösteren çalışma 2007 yılında yayımlanmıştır (4).

Bir yıl içinde, iki önemli keşif yapılmıştır: CRISPR dizilerinin transkribe edildiği ve CRISPR RNA'ların (crRNA'lar) işlendiği, bu crRNA'ların Cas etki proteinlerini, örneğin Cascade (CRISPR ile ilişkilendirilmiş antiviral savunma kompleksi) gibi yönlendirdiği ve DNA'nın CRISPR-kodlu bağışıklığın hedefi olduğu, bu sistemin bakteriler arasındaki plazmid transferine bir engel oluşturabilen bir sistem olduğu bulunmuştur (2).

CRISPR'ı, bir DNA kodlu, RNA aracılı ve DNA hedefli bir bağışıklık sistemi olarak tanımlandıktan sonra, etki

mekanizmasının temelinde yatan biyokimyasal ve genetik süreçler araştırılmıştır. Bu konudaki en önemli bulgu, hedeflenen faj dizilerini çevreleyen bir CRISPR motifi olan ve daha sonra protospacer yan motif (PAM) olarak adlandırılan motifin varlığının keşfi olmuştur. Ayrıca, Cas9'un, protospacer dizisinin 3' ucundan tam olarak 3 nükleotit uzaklıkta düz DNA kesimi oluşturan bir endonükleaz varlığının gösterilmesi olmuştur. Cas9 aracılı kesimin, bir çekirdek dizi tarafından yönlendirildiği ve hedef RNA: hedef DNA dubleksindeki hedeflemenin özgüllüğünü ve yakınlığını sürdürdüğü gösterilmiştir. Daha sonra 2011 yılında, tip II sistemlerinde bir ikincil RNA olan trans-kodlu crRNA (tracrRNA) kullanılarak Cas9 için çift RNA rehberi oluşturmak için gerekli olduğu gösterilmiştir. Bu aynı zamanda, CRISPR-Cas sistemlerinin uzak bakteri türlerine transfer edilebileceği, plazmidlere ve fajlara hedeflenmek üzere yeniden programlanabileceğinin ilk tespitinin yapıldığı yıl olmuştur (2).

Bu çalışmaların sonucunda, doğada birçok ve çeşitli CRISPR-Cas sistemlerinin bulunduğu, ortak özelliklere sahip oldukları (DNA kodlu, RNA aracılı, nükleik asit hedefli) ve özgünlükleri (çeşitli rehber RNA türleri ve yapıları, ayrıca kesme sonuçları) olduğu sonucuna varılmıştır. Güncel olarak, CRISPR-Cas sistemleri, iki ana sınıfa ayrılır: sınıf 1, çoklu protein etki kompleksine sahiptir, sınıf 2 ise tek bir etki proteinine sahiptir. Sınıflandırma ayrıca, CRISPR ve Cas mekanizması ve etki şekline göre, 6 ana tip (I-VI) ve 19'dan fazla alt tip içerir (2).

2012 yılında yayımlanan çalışmada, Cas9'un hedef DNA'da çift kesik oluşturmak için RuvC ve HNH motiflerini kullanan ve ikili crRNA:tracrRNA kompleksini taklit eden tek kılavuzlu RNA (sgRNA: single guide RNA) kullanılarak yeniden programlanabileceğini göstermiştir (2).

Daha sonraki birkaç laboratuvar çalışması CRISPR-Cas9 moleküler mekanizmasının temelinde, çift sarmal kırıklar oluşturmak ve DNA onarım sistemlerini kullanarak genom düzenlemesi yapmak için yeniden tasarlanabildiğini neredeyse eşzamanlı olarak göstermiştir (2).

Bu verileri takiben, bir dizi Cas tabanlı moleküler mekanizmaya [yani, Cas9, Cpf1, dCas9 (Cas9'un devre dışı bırakılmış varyantları)] dayanan CRISPR tabanlı teknolojiler, genom düzenleme, transkripsiyonel kontrol ve epigenetik değişiklikleri mümkün kılmıştır. Cas proteinlerinin birçok avantajı ve özelliği (programlanabilirlik, transfer edilebilirlik, uygun maliyet, özgüllük ve etkinlik gibi birçok özellik), dünya genelindeki genetikçilere ve şimdiye kadar test edilen tüm genetik karakterize edilmiş türlerin genomunu ve transkriptomunu istedikleri gibi değiştirmelerini sağlamıştır (2).

CRISPR genellikle bir genom düzenleme teknolojisi olarak benimsenmiş olsa da genetik dizileri değiştirmek için kullanılan araçlarda kendine özgü olarak kümelenmiş düzenli aralıklı kısa palindromik tekrarlar yoktur; bunun yerine DNA'nın diziyeye özgü hedefleme

için Cas9 (veya diğer) nükleazları yönlendiren tek kılavuz RNA'lar (single guide RNAs: sgRNA) vardır. Özellikle, CRISPR genellikle bir genom düzenleyici olarak algılansa da, Cas9 sadece DNA'yı keser (bakterilerdeki bakteriyofaj DNA'sını hedeflediğinde başlangıçta amaçlandığı gibi), asıl düzenleme işlemi endojen DNA onarım yolları tarafından oluşturulur (2).

1.1 CRISPR'ın Etki Mekanizması

CRISPR dizisi tek bir RNA olarak transkript edilir ve ardından tekrarlanan yerlerde daha kısa CRISPR RNA'ları (crRNA'lar) haline getirilir, her biri tek bir spacer içerir. crRNA'lar, küçük bir transaktivasyon crRNA'sı (tracrRNA: trans activating CRISPR RNA) ile hibritleşir ve ardından Cas9 tarafından tanınarak bağlanabilir, böylece bir ribonükleoprotein (RNP) kompleksi oluşturur. RNP kompleksi, bir faj genomu ile ilişkilendirilir ve crRNA üzerinde kodlanan spacer ile eşleşen dizileri arar. Benzerlik bulunduğu, Cas9 nükleaz olarak işlev görerek DNA'yı keserek çift iplikli bir kırık (DSB: double strand break) oluşturur ve böylece fajın yaşam döngüsünü engeller (3).

Bu basit mekanizma, DNA düzenleme ve hastalıkları tedavi etme konusunda umut verici bir araç olabileceği fark edilmiştir. CRISPR-Cas9'u basitleştirmek ve gen düzenlemesi için daha elverişli hale getirmek amacıyla crRNA ve tracrRNA iki bileşenli bir sistem oluşturmak üzere tek bir kılavuz RNA (sgRNA) halinde birleştirilmiş: Cas9 proteini DSB oluşturur ve sgRNA, nükleazı kullanıcının belirlediği genomik bir diziyeye yönlendirir. Memeli hücrelerinde, sistem ilk olarak doğal DNA onarım mekanizmalarını kullanarak gen düzenleme yapmak için daha verimli olmayan homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ: non homologous end joining) ve daha az verimli olan homolog yönlendirilmiş onarım (HDR: homology directed repair) süreçlerini gerçekleştirmek amacıyla kullanılmıştır. NHEJ, hatalı indel (insersiyon ve delesyon) oluşumuna yol açarken, HDR genellikle düzenlemenin hassas bir şekilde yapılması nedeniyle daha arzu edilen bir terapötik sonuç elde edilmiştir. CRISPR tarafından indüklenen DSB'leri onarmak için NHEJ yolunun baskınlığı, monojenik Mendel hastalıklarında zararlı etkilere sahip olan mutant genlerin yok edilmesiyle sonuçlanmıştır. Ancak, birçok hastalık basit bir gen nakavtı ile tedavi edilemez ve daha detaylı genom mühendisliği gerektirir (3).

1.2 CRISPR ile Gen Düzenlenmesi

Memeli hücreler, öncelikle DSB'leri NHEJ aracılığıyla hasarlı iplikleri birleştirip onarmak için evrimleşmiştir. Bu DNA onarım sürecinde nükleotidler araya eklenir veya çıkarılır (indel'ler), ligasyon yapılan DNA dizisinde rasgele mutasyonlara yol açar ve genoma kalıcı bir düzenleme yapar. Çinko parmağı nükleazları (ZFN'ler: zinc finger nucleases) ve transkripsiyon aktivatör-benzeri efektör nükleazları (TALEN'ler: transcription activator-like effector nucleases) geliştirmeye yönelik onlarca yıl süren araştırmalar, NHEJ mekanizmasını kullanarak

memeli hücrelerinde genetik hastalıkların üstesinden gelme yeteneğini göstermiştir. Bir hastalığa neden olan lokus, nükleazlar tarafından hedef alınarak, çerçeve kayması mutasyonları yoluyla geni devre dışı bırakır veya rastgele indel'in mutasyonunu düzeltmesi yoluyla gen onarımına yol açmak için indel'ler oluşturulur. Belli bir lokusu hedeflemek için ZFN'ler ve TALEN'ler üretmek, istenen genomik dizine seçici olarak bağlanan amino asit değişikliklerini belirlemek için laboratuvarlarda zorlu tasarım, dizayn ve test döngüleri gerektirir. Amino asit değişikliklerinden DNA bağlanmasını doğru bir şekilde tahmin etmek zor olduğundan, kesin bir genomik konumu hedeflemek zor olabilir (3).

CRISPR hedeflenme mekanizmasının basitliği ve öngörülebilirliği, gen düzenleme işlemini karmaşık bir protein mühendisliği probleminden bir RNA kodlama problemine dönüştürdü, bu da CRISPR'ı anında temel araştırma ve klinik uygulamalar için çekici bir araç haline getirmiştir. Bu ilerleme, CRISPR ile ilgili yayınların hızlıca artmasına ve iyi tanımlanmış Mendel hastalıklarına yönelik ön klinik çalışmalarda ve erken klinik denemelerde kullanılan CRISPR tabanlı tedavi protokollerinin sayıya artmasına yol açmıştır. Ön klinik modellerde, metabolik ve nörolojik bozukluklar, kanserin tedavisi gibi birçok alanda gen inaktivasyonunu sağlamak için CRISPR tabanlı tedaviler kullanılmıştır. Ancak, çoğu hastalık monogenik bozukluklardan daha karmaşıktır ve sadece mutasyona uğramış bir alleli düzenleyerek düzeltilmez. Bu hastalıkları tedavi etmek için, nokta mutasyonlarının kesin olarak düzeltilmesi, transkripsiyonun dikkatlice ayarlanması veya kodlamayan bölgelerin daha ince bir şekilde düzenlenmesini gerektirebilir (3).

1.3 Cas Araçları

1.3.1. Doğal olarak bulunan Cas proteinleri:

İki farklı CRISPR sistemi sınıfı mevcuttur: sınıf I ve sınıf II. Cas9'u içeren sınıf II Cas proteinlerinin hedefleme ve nükleaz fonksiyonları, birçok prokaryotik türde evrimleşmiş büyük bir RNA kılavuzlu nükleaz grubunu kapsayan tek bir proteinde kodlanmıştır. En yaygın kullanılan iki Cas9 proteini, Streptococcus pyogenes (SpCas9) ve Staphylococcus aureus'ta (SaCas9) keşfedilmiştir. Bu farklı ortamlardaki evrim, bu proteinlere, gen terapisinde kullanılırken benzersiz özellikler kazandırmıştır. Örneğin, bilinen tüm DNA hedefli Cas nükleazları, hedeflenen bir lokusun, protospacer bitişik motif (PAM) adı verilen spesifik bir diziyeye çevrenmesini gerektirir. PAM'lar, bir Cas proteininin, DNA erimesi (melting) ve hedefe bağlanma sürecini başlatmak için tanınması gereken, crRNA üzerinde kodlanmayan kısa DNA bölümleridir. SpCas9, bir NGG PAM ile çevrili olmayı gerektirirken, SaCas9 bir NNGRRT PAM'ını tanır. DNA'yı kesmenin verimlilik ve özgüllüklerinin yanı sıra, PAM dizileri, belirli bir Cas proteini tarafından hedeflenebilecek genomik alanı belirleyebilen önemli bir faktördür. Örneğin, SpCas9'un PAM'ı basittir ve SaCas9'un

PAM'ına göre genomda daha sık temsil edilir, bu da gen düzenleme için bir hedef bölge belirlemenin daha kolay olduğu anlamına gelir. Cas proteininin boyutu, dikkate alınması gereken bir diğer önemli faktördür. SaCas9'un kodlama dizisi (3.2 kb), SpCas9'un kodlama dizisinden (4.1 kb) önemli ölçüde daha küçüktür, bu da SaCas9'un gen taşıma vektörlerine (örneğin adeno-ilişkili virüsler (AAV'ler)) daha uygun olmasını sağlar. Çünkü AAV'lerin yaklaşık 4.7 kb'lik bir paketleme sınırı vardır (3).

Sınıf II sistemlerin benzersiz özelliklere sahip olabileceği gözlemi, araştırmacıları yeni CRISPR proteinleri bulmak için metagenom alanında arama yapmaya yöneltmiştir. Doğal prokaryotik CRISPR lokuslarının tekrarlayan, palindromik özelliği, prokaryotlardan gelen dizileme verilerinden Cas genlerini tanımlamak ve potansiyel gen düzenleme proteinlerinin doğasını anlamak için kullanılmıştır. Bunun sonucunda, insan genomunda DSB'ler (çift iplikli kırıklar) oluşturabilen Cas12a'nın (başlangıçta Cpf1 olarak adlandırılan) keşfine yol açmıştır. Cas12a'nın PAM'ı, SpCas9 ve SaCas9'un PAM'larından farklıdır, bu da yeni genomik konumların hedeflenmesini sağlar ve SpCas9'un PAM'ından daha küçüktür (Lachnospiraceae bakterisi Cas12a yaklaşık 3,7 kb'dir). En önemlisi, Cas12a bir CRISPR dizisini bireysel crRNA'lara işleyebilir, böylece tek bir transkriptten birden çok crRNA'nın ifadesi aracılığıyla kolay şekilde çoklu hedeflemeyi sağlar. Buna karşılık, Cas9 çoklu hedefleme, her sgRNA'nın kendi promotörüne sahip olmasını gerektirir, bu da birden çok sgRNA'nın ifadesini zorlaştırır. Bu bulgu, Cas12b, Cas12c, Cas12d (önceden CasY olarak bilinen), Cas12e (önceden CasX olarak bilinen), hiperkompakt Cas12f (önceden Cas14, yaklaşık 1,4–1,6 kb), Cas12g, Cas12h, Cas12i ve Cas12j (önceden CasΦ olarak bilinen) gibi yeni Cas12 proteinlerinin keşfini ve karakterizasyonunu sağlamıştır. Bu sistemlerden bazıları (Cas12b, Cas12e, Cas12f ve Cas12j), insan hücrelerinde gen düzenleyiciler olarak kullanılabilme umudu vermiştir (3).

2018'de, tek iplikli RNA'ya bağlanma ve onu kesme yeteneğine sahip, Cas13 olarak bilinen bir grup sınıf II protein keşfedildi. Cas13 mekanizması, RNA interferansı (RNAi) gibi transkript baskılanmasıyla sonuçlanır, belirli mRNA'nın yok edilmesini ve transkriptom üzerinde hedeflenmiş değişiklikler yapılmasını sağlar. Dahası, birçok Cas13 proteini, belirli bir kenar dizisi gereksiniminden bağımsız olarak transkripti esnek bir şekilde hedefleyebilir. Bu özellik, Cas13'ü bir hücrenin fenotipini değiştirmek için kalıtılan değişiklikler oluşturmadan çok yönlü bir araç haline getirir (3).

Sınıf I CRISPR-Cas sistemleri, hedefleme ve nükleaz fonksiyonlarını birden fazla proteine ayırırlar. Örneğin, Kaskad kompleksi, crRNA'yı bağlayan ve direk kompleksi hedef DNA'ya yönlendiren Cas5, Cas6, Cas7, Cas8 ve Cas11'in birden fazla alt birimini içerir. Kompleks, nükleaz fonksiyonunu yerine getirmek için Cas3'ü daha da çeker. Sınıf I sistemlerin büyük, çok bileşenli doğası, hücreye ulaştırılması ve ekspresyonu açısından bir zorluk oluşturur, bu da onların insan

hücrelerindeki faydalılığını azaltır. Ancak, daha uzun crRNA (ve dolayısıyla artan spesifiklik potansiyeli) ve sınıf I sistemlerin (bilinen CRISPR sistemlerinin %80'inden fazlası sınıf I'ye aittir) geniş çeşitliliği, onları gen düzenleme için çekici bir seçenek haline getirir. Örneğin, Kaskad, insan embriyonik kök hücrelerinde büyük genomik delesyonlar oluşturmak için kullanılmıştır (3).

Hedeflenmiş genomik insersiyonlar yapabilen birden çok Cas proteini de keşfedilmiştir. Örneğin, bir sınıf I sistem (tip I-F) ve bir sınıf II sistem (Cas12k), CRISPR aracılı transpozisyon mekanizmasının aracılığıyla spesifik bir alana DNA parçalarını ekleyebilir. Bu hedefli insersiyonlar hem in vitro hem de prokaryotik konaklarda olduğu gösterilmiştir. Cas aracılı transpozonların henüz insan hücrelerine aktarılmamış olmasına rağmen, bu ve diğer Cas sistemleri, CRISPR sistemlerinin geniş çeşitliliğini ve biyolojik fonksiyonlarını göstermektedir (3).

1.3.2. Mühendislik Cas proteinleri.

CRISPR, insan hücreleri gibi daha karmaşık genomik ortamda ekspresye edildiği zaman, prokaryotlara kıyasla çoğu Cas sistemi optimum performans göstermez ve bu da düşük düzenleme verimliliği veya özgüllüğüne yol açar. Protein mühendisliğindeki ilerlemeler, yapı kılavuzlu mutasyonlar, yönlendirilmiş evrim ve bakteriyofaj yardımcı evrim gibi teknikler kullanılarak geliştirilmiş Cas proteinlerinin geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Örneğin, Cas12a ve Cas12f'nin DNA bağlanma cebinin yapı-kılavuzlu mühendisliği, indel sıklığını arttırarak daha etkili insan genom düzenleyicilerine dönüştürülmüştür. Özellikle, Cas12f, in vivo ulaştırılması ve ekspresyonu için diğer Cas proteinlerinden daha uygun olan hiperkompakt bir Cas etkisini (~1.4–1.6 kb) oluşturmak için tasarlanmıştır (3). Genom düzenlemenin ötesinde Cas uygulamalarını genişletmek için, SpCas9'un katalitik aktivitesi kaldırılarak proteinin nükleazsız bir versiyonu olan dCas9 adı verilen bir proteini üretilmiştir. Bu mühendislik tasarımı sonucunda, Cas9'u bir RNA kılavuzlu nükleazdan bir RNA kılavuzlu bağlanma proteine dönüştürmüştür. E. coli'de, dCas9'un bir kodlama dizisine veya promotörüne yönlendirilmesi geni kesmez ancak RNA polimerazı bloke ederek transkripsiyonu inhibe eder. Bu yaklaşım, CRISPR interferansı (CRISPRi) olarak adlandırılır ve CRISPR'in kullanım şeklini derinden değiştirmiş, gen düzenleme ve gen düzenlemesi için bir dizi CRISPR teknolojisini katalize etmiştir (3).

CRISPRi'yi memeli hücrelerinde proteine dönüştürülmesi için dCas9'u bir kodlama dizisine hedeflemek ve bunun sonucunda direk olarak transkripsiyonu engellemek için yeterli değildir. Memeli hücrelerinde gen baskılanması (konockdown) sağlamak için, dCas9 örneğin, spesifik bir lokusa yaklaşıldığında lokal gen baskısını indüklemek için KRAB (Krüppel ile ilişkilili kutu) gibi bir repressör domaini ile

birleştirilmiştir. Burada, dCas9, açık bir genomik konumu hedefler ve birleştirilmiş KRAB domaini sadece dCas9–KRAB füzyon proteininin bağlandığı yerde gen ekspresyonunu susturmak için lokalize eder. Bu keşiften bu yana, epigenom mühendisliği için genişletilmiş bir araç kutusu (toolbox) oluşturmak için bir dizi füzyon üretilmiştir. Nükleazsız Cas proteinleri, spesifik genleri yukarı yönlü regüle etmek için CRISPR aktivasyonu (CRISPRa) adı verilen bir yöntemle transkripsiyonel aktivatörlere füzyonu yapılmıştır. CRISPRa'nın ilk örneği, transkripsiyonu indükleyen herpes simplex virüsü VP16 domainin dört ardaşık (tandem) tekrarının dCas9'a ve memeli hücrelerinde spesifik genleri yukarı yönlü regüle etmek için promotörlere yakın bölgelere hedeflenmesi için füzyon yapılmış VP64 ile birleştirilmiştir. Daha sonra dCas9, RTA, VP64, HSF1 ve p65 gibi birçok çeşitli transkripsiyonel aktivatör domainleri ile birleştirilmiş ve multiple hücre tiplerinde yüksek derecede spesifik gen yukarı yönlü regülasyonunu mümkün kılmak için kullanılmıştır. DNA metilasyon domainleri olan DNMT3A ve DNMT3L'yi içeren epigenetik DNA modifiye domainleri ve ayrıca DNA demetilasyon domaini olan TET de dCas9'a füzyonu yapılabilmektedir. Ayrıca, H3K27 asetilasyonu veya metilasyonu, H3K4 metilasyonu, H3K9 metilasyonu veya H3K79 metilasyonunu sağlayan histon modifiye edicileri, histon epigenomundaki değişiklikleri sağlamak veya silmek için tek başına veya kombinasyon halinde füzyonu yapılabilmektedir. Bu CRISPR aracılı epigenetik modifikasyonlar, transkriptomu yeniden programlamak ve geleneksel CRISPRi veya CRISPRa ile karşılaştırıldığında uzun süreli hedeflenmiş gen susturma veya aktivasyon gibi yeni fonksiyonlar elde etmek için kullanılabilir (3).

1.3.3. CRISPR/Cas9 Teknolojisinin Uygulama Alanları

CRISPR/Cas9 Teknolojisi; biyomedikal araştırmalar, hücre ve gen terapisi, bitkisel üretimde verimlilik ve dayanıklılığın artırılması, hayvansal üretimde verimlilik ve dayanıklılığın artırılması ile gıdaları güçlendirme gibi birçok alanda uygulanmaktadır (5).

2. CRISPR/Cas9 TEKNOLOJİSİ İLE BAZI GENETİK HASTALIKLARIN TEDAVİ EDİLMESİNDE UYGULANAN STRATEJİLER

Gen terapisi, 10.000'den fazla insan monogenik hastalığını tedavi etme ve daha da fazla sayıda karmaşık poligenik duruma fayda sağlama potansiyeline sahiptir. Son yıllarda CRISPR/Cas9'un bir gen düzenleme teknolojisi haline dönüştürülmesi, araştırmacılara gen terapisi için devrim niteliğinde bir araç sağlamıştır (6). CRISPR-Cas sistemi ilk olarak plazmidlerden ve fajlardan korunmak için bakteri ve arkelerde adaptif bağışıklık sisteminin bir parçası olarak keşfedilmiştir. CRISPR'ın, gen düzenlemesi için uygulanmaya

başlaması çinko parmak nükleazlarına (ZFN) ve transkripsiyon aktivatörü benzeri efektör nükleazlarına (TALEN) karşı gelişmiş bir alternatif olmuştur (7). Bugüne kadar uygulanan genetik tedaviler üç geniş kategoriye ayrılmıştır: etkilenen genetik bölmelerin toplu olarak yeni bir ekzojen genomla değiştirilmesi, genetik hataları telafi etmek için hedeflenmeyen ekzojen genetik materyal eklenmesi ve en son olarak, gen düzenleme kullanılarak nedensel genetik değişikliklerin doğrudan düzeltilmesidir (8).

CRISPR-Cas teknolojilerinin keşfedilmesi ise genetik hastalıkların tedavisine yeni bir bakış açısı sağlamıştır. Bu teknoloji ile kalıtsal bozukluktan sorumlu genetik mutasyonların hassas DNA düzenleme yoluyla düzeltilebileceği gözlenmiştir. Genetik bozuklukların tedavisinde CRISPR-Cas teknolojisi ile hastanın genomundaki hastalığa neden olan mutasyonları hedeflemek ve düzenlemek için belirli kılavuz RNA (CRISPR-Cas9, CRISPR-Cas12, CRISPR-Cas13 vb.)'lar kullanılmıştır (9). Aşağıda CRISPR-Cas9 teknoloji ile tedavi edilen bazı genetik hastalıklara yer verilmiştir.

Huntington hastalığı (HD), striatumdaki nöronların kaybıyla karakterize ölümcül bir nörodejeneratif genetik hastalıktır. Huntingtin proteinini (mHTT) kodlayan Huntingtin genindeki (mHTT) bir mutasyondan kaynaklanır. HD için transgen taşıyan YAC128 farelerinin kemik iliğinden çıkarılan mezencefal kök hücrelerde CRISPR-Cas9 aracılığıyla ekzon1-intron sınırı bozularak mHTT'nin translasyonu olumsuz etkilenmiş ve huntingtin protein seviyesinin sırasıyla %58 ile %79 oranında azaldığı gözlenmiştir (10). Başka bir çalışmada CRISPR/Cas9 aracılı inaktivasyon kullanılarak mHTT ekspresyonu gösteren farelerin (HD140Q-knockin fareler) striatumunda endojen mHTT ekspresyonunun kalıcı olarak baskılanmasının erken nöropatolojiyi zayıflattığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak; CRISPR/Cas9 aracılı gen düzenlemenin yetişkin beyninde poliglutamin genişlemesine bağlı nöronal toksisiteyi etkili ve kalıcı bir şekilde ortadan kaldırmak için uygulanabileceğini göstermiştir (11).

Beta-talasemi (β -talasemi), insan hemoglobin beta (HBB) gen kümesindeki nokta mutasyonları, insersiyonlar ve delesyonlar nedeniyle oluşan ve β -globin zincirlerinin yetersiz üretimine yol açan otozomal resesif bir hastalıktır. β -talasemi tedavileri arasında kan nakli, splenektomi ve allojeneik hematopoietik kök hücre nakli (HSCT) bulunur. Bu geleneksel tedaviler önemli zorluklarla karşı karşıyadır. Son yıllarda, gen düzenleme teknolojisinin gelişi ve ilerlemesiyle, hassas genom düzenleme ile β -talasemi tedavisi için üç globin genini (HBB, HBG ve HBA) ve hücre seçimlerini hedefleyen CRISPR/Cas9'un uygulanabilir stratejileri temel ve klinik çalışmalarda cesaret verici başarılar elde etmiştir (12). Başka bir çalışmada ise hasta kaynaklı pluripotent kök hücrelerin (iPSC)'lerdeki HBB mutasyonlarını düzeltmek için piggyBac transpozonuyla birleştirilmiş en

son gen düzenleme aracı olan CRISPR/Cas9 teknolojisi kullanılmıştır. Sonuç olarak düzeltilmiş iPSC'lerde hedef dışı etki saptanmış, hücreler tam pluripotansiyeli korumuş ve normal karyotipler sergilemiştir. CRISPR/Cas9 teknolojisi, HBB mutasyonlarını düzeltmek için etkili bir yaklaşım sunarak, kök hücre tabanlı gen terapisinin monogenik hastalıklara gelecekte uygulanmasına yönelik kritik bir adım olduğunu göstermiştir (13). Yapılan başka bir çalışmada iki hasta (β -talasemi ve orak hücre hastalığı) BCL11A (eritroid hücrelerde γ -globin ekspresyonunu ve fetal hemoglobini baskılayan bir transkripsiyon faktörü) güçlendiriciyi hedefleyen CRISPR-Cas9 ile düzenlenen otolog CD34+ hücreleri almıştır. Bir yıldan fazla bir süre sonra, her iki hastada da kemik iliği ve kanda yüksek seviyelerde allelik düzenleme, panselüler olarak dağılan fetal hemoglobinde artışlar, transfüzyon bağımsızlığı ve vazooklüzif epizotların ortadan kalkması (SCD'li hastada) görülmüştür (14).

Marfan sendromu, FBN1 genindeki patojenik varyantlardan kaynaklanan kardiyovasküler, oküler, iskelet, deri ve solunum organ sistemlerindeki bulgularla karakterize otozomal dominant bir genetik bozukluktur. Marfan sendromlu bir hastadan FBN1'de heterozigot bir varyant c.7754 T > C (p.Ile2585Thr, yanlış anlamlı) taşıyan bir iPSC hattı ile patojenik varyantın CRISPR-Cas9 kullanılarak onarıldığı bir izogenik kontrol üretilmiştir. Sonuç olarak, bu iPSC hatları, Marfan sendromu ile ilişkili kardiyomiyopati ve aortopati gibi hastalıkların tedavisi için önemli bir sonuç göstermiştir (15). Diğer bir çalışmada ise hastaya özgü hiPSC'ler (NCCDFWi001-A), bileşik heterozigot varyant (c.684_736 + 4del, p.Pro228fs ve c.2613A>C, p.Leu871Phe) taşıyan Marfan sendromlu bir hastadan üretilmiştir. Burada, normal karyotipi, pluripotansiyel belirteçleri koruyan ve üç soy farklılaşması için potansiyel gösteren bir hiPSC hattı (NCCDFWi001-A-1) üreten FBN1 c.2613A>C varyantını düzeltmek için CRISPR/Cas9 kullanılmıştır. Sonuç olarak, CRISPR/Cas9, kök hücre kimliğini koruyarak hiPSC'lerin c.2613A>C varyantını (NCCDFWi001-A) başarıyla düzelttiği gösterilmiştir (16).

Down Sendromu (DS), nörolojik sorunların da dahil olduğu, semptomlar arasında yer alan karmaşık bir kromozomal bozukluktur. Kromozom 21'deki trizomi nedeniyle oluşan DS, her 800 canlı doğumdan 1'inde görülür. DS'de artmış aktivite gösteren DSCAM/PAK1 yolunun CRISPR/Cas9, CRISPR interferansı (CRISPRi) veya küçük molekül inhibitör tedavisi kullanılarak baskılanması sunucu anormal nörogenezi tersine çevirmiştir (17).

Duchenne kas distrofisi (DMD), kas lifi bütünlüğü için gerekli bir protein olan distrofin kodlayan gendeki mutasyonlar sonucu oluşan ölümcül bir hastalıktır. Duchenne kas distrofisinden sorumlu mutasyonlar esas olarak ekzon delesyonlarını (%70 hasta) ve nokta

mutasyonlarını (%30 hasta) içerir. Yapılan çalışmada in vitro ve DMD hayvan modellerinde distrofin ekspresyonunu geri kazandırmak için DMD geninde bulunan farklı mutasyonların düzeltilmesinde CRISPR-Cas9 teknolojisinin klinikte kullanımına yol açabileceği öngörülmüştür (18). Başka bir çalışmada ise DMD için bir model olan mdx farelerinin germ hattındaki distrofin gen (Dmd) mutasyonunu düzeltmek için CRISPR/Cas9 aracılı genom düzenlemesini kullanılarak kas yapısı ve işlevi incelenmiştir. Genom düzenlemesi, Dmd geninin %2 ila %100'ünü düzelten genetik olarak mozaik hayvanlar üretilmiştir. Mozaik farelerde kaslar yenilenerek gen düzenlemesini göstermiştir. Sonuç olarak; beklenen teknolojik gelişmelerle birlikte, CRISPR/Cas9 teknolojisi DMD'li hastaların kas dokusundaki hastalığa neden olan mutasyonların düzeltilmesine olanak tanıyabileceğine işaret etmektedir (19).

Kalıtsal tirozinemi tip I (HTI), fumarilasetoasetat hidrolazın (FAH) mutasyonu nedeniyle oluşan metabolik bir genetik bozukluktur. Toksik metabolitlerin birikmesi nedeniyle HTI, ciddi karaciğer sirozu, karaciğer yetmezliği ve hatta hepatosellüler karsinoma neden olur. CRISPR/Cas9 aracılı gen terapisi, HTI fare modelinde tekrarlanamayan bir fenotip olan karaciğer sirozunun ilerlemesini önlenmiştir. Bu sonuçlar, Cas9 nickase aracılı genom düzenlemesinin bu genetik hastalık için değerli ve güvenli bir gen terapisi stratejisi olduğunu güçlü bir şekilde ortaya koymuştur (20).

Fenilketonüri (PKU), resesif kalıtımla geçen fenilalanin hidroksilaz (PAH) eksikliğinden kaynaklanan, merkezi sinir sistemi için toksik olan hiperfenilalaninemiye neden olur. Bir çalışmada, CRISPR/Cas9 teknolojisi ile PKU'lu farelerin tedavi edilen hepatositlerinin bir kısmında PAH^{enu2} allelinin ömür boyu, kalıcı olarak düzeltilmesine olanak tanıyarak karaciğer PAH aktivitesinin kısmen geri kazanılmasını, kan fenilalanininde önemli bir azalmayı ve üreme sırasında maternal PKU etkilerinin önlenmesini sağlamıştır. Aynı çalışmada, CRISPR/Cas9 gen düzenlemesinin kalıcı PKU gen düzenlemesi için umut verici bir araç olduğunu ortaya koymuştur (21). Yapılan başka bir çalışmada ise PAH genindeki en yaygın varyantı (allel sıklığı %21,4) düzeltmek için inaktif Cas9 (dCas9) ve FokI endonükleaz (FokI-dCas9) füzyonunu kullanan modifiye edilmiş bir CRISPR sistemi kullanılmıştır. Tek bir kılavuz RNA plazmidinin, bir FokI-dCas9-zsGreen1 plazmidinin ve PAH_c.1222C>T COS-7 hücrelerinde tek zincirli bir oligodeoksinükleotid ile PKU için bir in vitro model oluşturulmuştur. PAH varyantı düzeltilmiş ve PAH aktivitesini geri kazanmıştır. Bu sonuçlar, FokI-dCas9 sisteminin hassas tıp, özellikle PKU ve diğer monogenik metabolik hastalıkları hedefleme potansiyeli olduğunu göstermiştir (22).

Kistik fibroz (KF), dünya çapında yaklaşık 70.000 kişiyi etkileyen yaşamı sınırlayan bir genetik

bozukluktur. Tedavi maliyeti oldukça yüksektir. Tedavi için çeşitli DNA düzenleme tabanlı stratejiler geliştirilmektedir. Mutasyonların konumuna (intronik veya ekzonik), düzenleme mekanizmasının dağıtım mekanizmasına ve hedeflenen hücre tipine bağlı olarak farklı stratejiler gereklidir. Ayrıca KF akciğerinin benzersiz fizyolojisi, CRISPR-Cas9 mekanizmasını çeşitli şekillerde engellemektedir. Bu nedenle gelecekteki araştırmaların CRISPR-Cas9'un KF tedavisinde, homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) tabanlı yaklaşımların geliştirilmesinin bu hastalığın tedavisinde oldukça umut verici sonuçlara neden olacağı öngörülmüştür (23).

Orak hücre hastalığı (SCD), homolog HbS geninin genetik kalıtımı nedeniyle anormal hemoglobin-S (HbS) ifade eden kırmızı kan hücrelerinin bir bozukluğudur. Ancak, orak hücre özelliği olan kişiler HbS'nin tek bir allelini taşır ve genellikle SCD semptomlarından muzdarip olmazlar, bu da SCD'yi tedavi etmek için bir gerekçe sağlar. Gen terapisi potansiyelini doğrulamak için hematopoietik kök hücreler SCD hastasının kanından izole edilmiş ve CRISPR/Cas9 yaklaşımıyla işlenmiştir. Genotipleme ve dizi analizi, genomu düzenlenen eritroid progenitör kolonilerinin SCD genotipinden orak hücre özelliği genotipine dönüştürüldüğünü ortaya koymuştur. HPLC protein analizleri, klonlanmış genomu düzenlenen eritroid progenitör hücrelerde HbS ile benzer düzeyde normal hemoglobinin yeniden kurulduğunu doğrulamıştır (24).

Retinitis pigmentosa, farklı gen tiplerindeki mutasyonlar sonucu fotoreseptörlerin ölümüne ve görme fonksiyon kaybına yol açtığı bilinen kalıtsal bir hastalıktır. Yapılan bir çalışmada CRISPR/Cas9'un şiddetli otozomal dominant retinitis pigmentosa modelinde baskın S334ter mutasyonunu [Rho(S334)] taşıyan sıçanların rodopsin geninin seçici olarak yok edilmesinde kullanılabileceği gösterilmiştir. Elektroporasyonla birlikte kılavuz RNA/Cas9 plazmidinin tek bir subretinal enjeksiyonu, Rho(S334)'ün allel-spesifik bozulmasını sağlayarak retina dejenerasyonunu önlediği ve görsel işlevi iyileştirdiği tespit edilmiştir (25).

α 1-antitripsin (AAT), karaciğerden salgılanan ve öncelikle akciğerlerde proteolitik nötrofil elastaz ile ilişkili doku hasarını önlemede önemli olan bir serin proteaz inhibitörüdür. İnsanlarda AAT, P1ZZ alleli olarak adlandırılan bir nokta mutasyonunda AAT geninin 342. pozisyonunda glutamat yerine lizin girmesi sonucu oluşur. Hepatositlerde yanlış katlanmış proteinin agregasyonuna neden olduğu ve bunun karaciğer hasarına yol açan hSERPINA1 geni tarafından kodlandığı bilinmektedir. AATD (insan AAT eksikliği) fare modeli patolojik karaciğer fenotipini kurtarma girişiminde, Cas9 ve hSERPINA1'i hedef alan bir kılavuz RNA (gRNA) molekülü sağlamak için adenovirüs kullanılmıştır. Tek dozluk terapötik gen

düzenleme yaklaşımı, dolaşan transaminaz ve insan AAT protein seviyeleri, karaciğer fibrozu ve protein agregasyonu dahil olmak üzere P1ZZ mutasyonu ile ilişkili fenotipi tamamen tersine çevirmiştir. Ayrıca karaciğer histolojisi iltihaplanma ve genel morfoloji açısından önemli ölçüde iyileşmiştir. Sonuç olarak; hepatositlerde terapötik gen düzenlemesinin bir AATD fare modelinde mümkün olduğunu gösterilmiştir (26).

Tay-Sachs hastalığı (TSD), metabolik enzim HexA'yı etkisizleştiren HEXA mutasyonları nedeniyle oluşan ölümcül bir nörodejeneratif hastalıktır. En yaygın mutasyon, çerçeve kaymasıyla HEXA ekspresyonunu bozan bir tandem 4-bp duplikasyonu olan c.1278insTATC'dir. Tasarlanmış bir hücre modelinde, c.1278insTATC'nin terapötik düzenlenmesi için CRISPR-Cas9 kullanımı araştırılmıştır. Düzeltme için c.1278insTATC'yi kapsayan 19 bp'lik bir dizi boyunca açık bir okuma çerçevesini geri yüklemek için kısa eklemeler veya silmeler gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak mutasyon düzeltilse de oluşan amino asit eklemelerinin yapısal uyumsuzluğundan dolayı enzim HexA'nın işlevini geri kazanmadığı vurgulanmıştır (27). Başka bir çalışmada ise HEXA genindeki monogenik mutasyonlar nedeniyle oluşan TSD için in vitro modeller kullanarak GM2 gangliozidozlarını tedavi etmek için potansiyel bir yaklaşım olarak Cas9 nickazına (nCas9) dayanan bir CRISPR/Cas9 tabanlı gen düzenleme stratejisi kullanılmıştır. β -heksosaminidaz aktivitesi, glikozaminoglikan seviyeleri, lizozom kütlesi ve oksidatif strese iyileşme gözlenmiştir. Bu sonuçlar, CRISPR/nCas9'un GM2 gangliozidozlarını tedavi etmek için yeni bir alternatif olarak dikkate değer potansiyelini ve bu terapötik yaklaşımın gücünü artırmada viral olmayan vektörlerin üstün performansını göstermiştir (28).

Biyotidinaz eksikliği (BD); otozomal resesif kalıtılan nörokutanöz bir hastalıktır. Klinik olarak tedavi edilmeyen BD hastaları nöbetler, beslenme sorunları, optik atrofi, işitme kaybı, hipotoni, ataksi, gelişimsel gecikme, alopesi ve cilt döküntüsü gibi değişken nörolojik ve dermatolojik belirtilerle ortaya çıkabilir (29). Ekzom dizilimi, biyotin (B7 vitamini) de dahil olmak üzere vitaminleri taşımaktan sorumlu hücre sel sodyum bağımlı multivitamin taşıyıcısını (SMVT) kodlayan gen olan SLC5A6'da bileşik heterozigot anlamsız varyantlar ortaya çıkardı. Biyotin eksikliğinin, kusurlu B hücresi farklılaşması ve antikor eksikliğiyle sonuçlanan SLC5A6 varyantlarından kaynaklandığı gösterilmiştir. Biyotinin yenilenmesi, plazma hücresi olgunlaşmasını iyileştirmiş ve hastada ve hastaya özgü bir SLC5A6 varyantı taşıyan bir CRISPR-Cas9 gen düzenlemeli fare modelinde antikor üreten aktiviteyi geri kazandırdığı ileri sürülmüştür (30).

Konjenital adrenal hiperplazi (CAH), monogenetik defektler içeren steroidojenik enzimlerin neden olduğu otozomal resesif bir hastalıktır. Bir çalışmada, 21-

hidroksilaz eksikliği (CYP21A2D) (n=4), 17 α -hidroksilaz/17,20 liyaz eksikliği (CYP17A1D) (n=1) ve 11 β -hidroksilaz eksikliği (CYP11B1D) (n=1) olan hastaların primer fibroblastları adeno-ilişkili virüs tip 2 (AAV2) vektörleri ile enfekte edilmiştir. Aynı çalışmada, CYP11B1D'nin adrenal bezlerinde gen indüksiyonuyla iyileştirilebileceğini göstermiş; bu da CAH için kusurlu enzime bağlı bir tedavi stratejisinin gerekli olduğunu düşündürmüştür. CYP21A2D ve CYP17A1D dahil olmak üzere mikrozomal P450'deki defektlerin adrenal dışı gen indüksiyonuyla tedavi edilebileceği gösterilmiştir (31).

Spinal kaslar atrofi (SMA), omurilikte ilerleyici motor nöron kaybıyla karakterize bir tür genetik nöromusküler hastalıktır. Survival motor nöron 1 (SMN1) genindeki mutasyonlardan kaynaklanır. SMN1, insanlarda hemen hemen tüm SMA hastalarında bulunan paralog bir gene, survival motor nöron 2'ye (SMN2) sahiptir. SMA hastasına özgü iPSC'lerin üretimi ve genetik düzeltilmesi, hastalık için uygulanabilir, otolog bir tedavi stratejisidir. Burada, c-Myc içermeyen ve entegre olmayan iPSC'ler, bir SMA hastasının idrar hücrelerinden epizomal iPSC yeniden programlama vektörü kullanılarak üretilmiş ve insan referans genomunda benzer dizilere (≤ 3 uyumsuzluk) sahip olmayan benzersiz bir crRNA tasarlanmıştır. SMA-iPSC'lerde SMN2 geninin SMN1 benzeri bir gene dönüştürülmesi, CRISPR/Cpf1 ve tek zincirli oligodeoksinükleotid kullanılarak %4/36'lık yüksek bir verimlilikle gerçekleştirilmiştir. Sorunsuz bir şekilde geni dönüştürülmüş iPSC hatları hiçbir ekzojen dizi içermemiş ve normal bir karyotipi korumuştur. Bu, insan hücrelerinde Cpf1 homoloji yönlendirmeli onarım tarafından aracılık edilen verimli bir gen dönüşümünün ilk raporu olduğu ve çoğu SMA hastası için evrensel bir gen terapötik yaklaşımı sağlayabileceği ileri sürülmüştür (32). Kas distrofileri, ilerleyici kas kaybına ve kas-iskelet sisteminin dejenerasyonuna yol açan heterojen bir monogenik nöromusküler bozukluklar grubudur. Başka bir çalışmada ise genom düzenlemedeki CRISPR/Cas sistemi ile çeşitli kas distrofilerini düzeltmek için olası CRISPR/Cas tabanlı terapiler önerilmiştir. Ayrıca CRISPR/Cas genom düzenlemesini kas distrofilerinin kalıcı olarak düzeltilmesi için uygulanabilir bir terapiye dönüştürülebileceği bildirilmiştir (33).

Facioscapulohumeral kaslar distrofi (FSHD), hastalık lokusunun eksik susturulması sonucu oluşur ve iskelet kasında DUX4'ün patojenik yanlış ifadesine yol açar. Yapılan çalışmada *Staphylococcus aureus*'tan HP1 α , HP1 γ , MeCP2 transkripsiyonel baskılama alanı veya SUV39H1 SET alanına kaynaştırılmış dCas9'un iskelet kasına özgü ifadesini yönlendirmek için FSHD için optimize edilmiş bir düzenleyici tasarlanmıştır. Her bir düzenleyiciyi DUX4 promoteri/ekson 1'e hedeflemek, lokustaki kromatin baskılanmasını artırmış ve özellikle FSHD miyositlerinde ve hastalığın bir fare modelinde DUX4 ve hedef genlerini baskılamıştır. Bu sonuçlardan

hareketle gen terapisi için adeno ilişkili virüs vektörleriyle uyumlu kas-spesifik bir epigenetik CRISPR tasarlanmasının iskelet kası bozukluklarında dCas9 tabanlı kromatin efektörlerinin klinik olarak kullanımında temel oluşturabileceği ileri sürülmüştür (34).

Facioscapulohumeral distrofi (FSHD), kromozom 4'teki D4Z4 makrosatelit tekrarlarını içeren DUX4 retrogeninin kısmi kromatin gevşemesi ve iskelet kasında DUX4'ün transkripsiyonel de-represyonu ile ilişkilidir. FSHD'nin yaygın formu olan FSHD1, bir D4Z4 tekrar dizisi kasılmasıyla oluşur. Daha az yaygın form olan FSHD2, genellikle SMCHD1'deki heterozigot varyantlar tarafından oluşur. Hasta miyoblastlarından patojenik bir intronik SMCHD1 varyantını onarmak için CRISPR-Cas9 genom düzenlemesi kullanılmıştır. CRISPR-Cas9 aracılı genom düzenlemesiyle psödo-eksonu silmek, vahşi tip SMCHD1 ekspresyonunu DUX4'ün etkili bir şekilde baskılanması, terapötik stratejiler için önem teşkil ettiği bildirilmiştir (35).

Hutchinson-Gilford progeria sendromu (HGPS), çocukluk çağı progeria veya progeria olarak da bilinir ve doğumdan kısa bir süre sonra ortaya çıkan erken yaşlanma ile karakterize nadir, hızlı, otozomal dominant genetik bir bozukluktur. HGPS, nükleer zarfın yapısal bileşenleri olan Lamin A proteini ve Lamin C proteini olmak üzere iki proteini kodlayan LMNA geni olarak bilinen gende de novo nokta mutasyonu sonucu oluşur. Yapılan bir çalışmada CRISPR/Cas teknolojisi ile belirli lokuslarda genleri yeniden düzenleyerek dominant negatif mutasyonların yer aldığı HGPS gibi genetik bozuklukların tedavisinde umut vadeden bir yaklaşım olduğu tespit edilmiştir (36). Başka bir çalışmada ise HGPS hücrelerinde ve farelerde çeşitli değişiklikleri geri döndüren CRISPR/Cas9 tabanlı bir yaklaşımın etkinliği araştırılmıştır. Sonuç olarak progeria fare modelinde genom düzenlemenin klinik öncesi etkinliği gösterilmiş ve HGPS ve şu anda tedavisi olmayan diğer sistemik hastalıklarda bile CRISPR/Cas9 teknolojisinin uygulamalarının önemine dikkat çekilmiştir (37).

Fanconi anemisi (FA), kemik iliği yetmezliği ve gelişimsel anomalilerle karakterize nadir bir kalıtsal hastalıktır. Yapılan bir çalışmada Fanconi anemisi olan bir hastadan türetilen fibroblastlarda CRISPR/Cas9 nükleazının FANCC geninin normalizasyonu ile sonuçlanan doğrudan c.456+4A>T mutasyon onarımını aracılık ettiğini, bu sentetik molekülleri insan hücrelerinde genetik hastalığın düzeltilmesi için kullanılabileceği gösterilmiştir (38).

Tübülöz skleroz kompleksi (TSC), TSC1 veya TSC2 genlerindeki mutasyonlardan kaynaklanan otozomal dominant bir hastalıktır. Vakaların üçte ikisinde TSC sporadik olarak ortaya çıkar ve TSC2 patojenik varyantları, TSC1 patojenik varyantlarından yaklaşık üç kat daha yaygındır. Burada, iki izogenik hat üreten iki tip

TSC2 patojenik varyantını düzeltmek için hasta kaynaklı iPSC'ler CRISPR-Cas9 aracılı homoloji yönlendirilmiş onarımı için kullanılmıştır. Sonuç olarak CRISPR-Cas9 ile mutasyonlar düzeltilmiş ve bu teknolojinin terapötiklerin geliştirilmesi için önemli bir araç olduğu bildirilmiştir (39).

Rett sendromu (RTT), genç kadınlarda X kromozomunda metil CpG bağlayıcı protein 2'nin (MECP2) fonksiyon kaybına neden olan heterozigot mutasyonlarından kaynaklanan X'e bağlı bir nörogelişimsel bozukluktur. Yapılan çalışmada RTT insan embriyonik kök hücrelerinde (hESC'ler) ve türetilmiş nöronlarda Xi'den MECP2'yi yeniden aktive etmek için bir multipleks epigenom düzenleme yaklaşımı uygulanmıştır. Hedef tek kılavuz RNA ile dCas9-Tet1 tarafından MECP2 promotörünün demetilasyonu, transkripsiyonel düzeyde tespit edilebilir hedef dışı etkiler olmaksızın RTT hESC'lerinde Xi'den MECP2 yeniden aktive edilmiştir. Bu sonuç RTT ve potansiyel olarak diğer baskın X'e bağlı hastalıkları tedavi etmek için epigenom düzenlemeye yönelik bir bakış açısı sağlamıştır (40). Başka bir çalışmada, CRISPR-Cas9 teknolojisinin transfeksiyon verimliliğini, biyoyoumluluğunu ve genom düzenleme doğruluğunu önemli ölçüde iyileştiren bir Manyetik Nanopartikül Destekli Genom Düzenleme (MAGE) platformu sunmuştur. Geliştirilen teknolojinin uygulanabilirliğini göstermek için, MAGE, bir Rett sendromu hastasından alınan indüklenmiş pluripotent kök hücre türevi nöral progenitor hücrelerde (iPSC-NPC'ler) mutasyona uğramış MeCP2 genini düzeltmek için uygulanmıştır. Onarılan iPSC-NPC'ler nöronlara farklılaştıklarında vahşi tip nöronlarla benzer özellikler göstermiş ve bu da MAGE'in gelecekteki klinik uygulamalar için potansiyelini daha da doğrulamıştır. Kısacası, geliştirilen nanobiyo-kombine CRISPR-Cas9 teknolojisi, özellikle farklı genetik hastalıkları hedefleyen kök hücre terapilerinde çeşitli klinik uygulamalar için potansiyel sunmaktadır (41).

Osteogenesis imperfecta (OI), kemik kırılabilirliği ve tekrarlayan kırıklarla karakterize genetik bir hastalıktır. OI ile ilişkili kemik kırılabilirliği, COL1A1 veya COL1A2 mutasyonu nedeniyle oluşan kollajen oluşumundaki bir kusurdan kaynaklanır. OI'yi tedavi etmek için kullanılan mevcut stratejiler tedavi edici değildir. Yapılan bir çalışmada, COL1A1 geninde mutasyon barındıran OI hastasından alınan kan hücrelerinden iPSC'ler üretilmiştir. Sonuç olarak; CRISPR/Cas9 kullanılarak COL1A1 geninin gen düzeltilmesi, OI-iPSC'lerden farklılaştırılmış osteoblastlarda azalmış tip I kollajen ekspresyonunu ve osteogenik potansiyeli geri kazandırarak yeni bir tedavi olasılığını gündeme getirmiştir (42). Başka bir çalışmada ise insan tip III OI'nin şiddetli baskın bir formuna benzeyen bir OIM fare modelinde bir Col1a2 mutasyonunu düzeltmek için rekombinant adeno-ilişkili bir virüs (rAAV) kullanarak, iskeletteki kemik oluşturan osteoblast soyundan

hücrelere homoloji yönlendirmeli onarım (HDR) aracılı CRISPR-Cas9 verilmiştir. Bu strateji, kemik mimarisi, kütlesi, mineralizasyonu, iskelet deformiteleri, kavrama gücü ve kendiliğinden oluşan kırıkları önemli ölçüde iyileştirmiştir. Sonuç olarak; AAV aracılı iletim yoluyla HDR aracılı gen düzenlemesinin OI osteoblastlarındaki bir kollajen mutasyonunu etkili bir şekilde düzelttiğinin ve OIM farelerinde iskelet fenotiplerini tersine çevirdiğinin ilk göstergesi olarak kabul edilmiştir (43).

3. CRISPR/Cas9 TEKNOLOJİSİNİN AVANTAJ VE DEZAVANTAJLARI

CRISPR/Cas9 sistemi, kullanım kolaylığı, düşük maliyet ve gen nakavtları veya daha küçük mutasyonlar üretme yeteneği gibi diğer gen düzenleme araçlarına (çinko parmak nükleazları veya transkripsiyon aktivatörü benzeri efektör nükleazları) göre avantajlara sahiptir. CRISPR/Cas9'un potansiyel uygulamaları, çok çeşitli hücre ve organizmaların genomik lokuslarını hassas ve etkili bir şekilde hedefleme, düzenleme, değiştirme, işaretleme yeteneği de dahil olmak üzere çok geniş kapsamlıdır. Genom çapındaki çalışmaların artması ile insan hastalıklarının anlaşılmasına fayda sağlayacak tasarlanmış hayvan modellerinin oluşturulmasını kolaylaştıracaktır. (44). Bununla birlikte bu yeni teknoloji bazı dezavantajlara sahiptir. Bunlar arasında özellikle memelilerde germ hattıyla ilişkili modifikasyondaki hedef dışı mutasyonlar oluşması ve bir sonraki nesile aktarılması, beklenmeyen olası etkiler hassas genom düzenleme, transgen ekspresyonunda çeşitlilik, işlevsel gen susturulması ve potansiyel onkogenik dönüşüm dahil olmak üzere birçok çeşitli bilinmeyen değişkenler yer almaktadır (45).

4. CRISPR/Cas TEKNOLOJİSİNİN ZORLUKLARI

CRISPR/Cas genom düzenleme, özellikle nokta mutasyonlarıyla ilişkili hastalıklar başta olmak üzere insan genetik bozukluklarını incelemek ve tedavi etmek için ayrıca hayvan genetik modelleri oluşturmak için de sağlam bir araçtır. Ancak, CRISPR/Cas teknolojisinin zorlukları da bulunmaktadır. Bunlar arasında, tedavi edilen hücrelerin CRISPR/Cas bileşenine karşı toksisitesi ve bağışıklık tepkisi, genom düzenleme sürecinin gerçek verimliliği ve potansiyel hedef dışı etkiler yer almaktadır. Hedef dışı etki, CRISPR/Cas9 gen terapisi için en büyük endişelerden biridir. Yapılacak birçok araştırma ile yüksek özgüllüğe sahip gRNA'lar tasarlayarak ve Cas enzimlerinin yüksek özgüllüğünü kullanarak bu etkinin sınırlandırılmasına odaklanmalıdır (46).

5. CRISPR/Cas9 TEKNOLOJİSİNİN UYGULANMASINDA ETİK DEĞERLENDİRMELER

CRISPR-Cas9, tarım ve çevreden klinik tedavilere kadar uzanan basit, kesin ve en hızlı genom düzenleme teknolojisi olarak ortaya çıkmıştır. Ancak, bu teknolojinin çekici uygulamalarıyla ilgili belirli etik, ahlaki ve

güvenlik endişeleri bulunmaktadır. İnsan germ hattı modifikasyonları ile ilgili yapılan çalışmalarda özellikle genetik hastalıkları düzeltmek veya önlemek için klinik uygulamalarda öngörülemeden, istenmeyen etkilerin gerçekleşme riski, bilgilendirilmiş onam meselesi ve öjeni (genetik olarak istenilen özelliklere sahip bireylerin çoğalmasını teşvik etmeyi amaçlayan bir bilim dalı) için istismar riski gibi insan güvenliği ve ahlaki açısından en tartışmalı konulardan biri haline gelmiştir. Somatik hücrelere uygulanan gen terapisi gelecek nesillere aktarılmayacağı için ve tek bir hastayla sınırlı kalacağı için etik açıdan uygun kabul edilmektedir. Ancak somatik hücrelerin genetik olarak geliştirilmesi ve gen terapisi veya germ hattı hücrelerinin genetik olarak geliştirilmesi çeşitli düzeylerde tartışmalara neden olmaktadır. Bu nedenle CRISPR aracılı genom düzenleme teknolojisinin sorumlu ve akıllıca kullanılmasını sağlamak için sıkı düzenlemeler ve yönergelerin yanı sıra dünya çapında bu konu hakkında daha fazla tartışma ve farkındalık oluşturulması gereklidir (6, 47).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

CRISPR-Cas9 sisteminin geliştirilmesi genetik hastalıkların tedavisinde genom düzenlemeyi uygulanabilir hale getirmiştir. CRISPR-Cas9 sistemleri hücre kültürleri ve hastalık modellerinde başarılı sonuçlar göstermiş olsa da, CRISPR tabanlı tedavilerin, immünojenisite ve genotoksisite riskleri göz önünde bulundurulmalıdır. CRISPR-Cas9 teknolojisinin uygulanabilmesi için hassas gen düzenleme biçimleri, bölünen hücrelerdeki fonksiyonu, doğru bir şekilde doku hedefleme ve CRISPR kaynaklı genomik hasarın azaltılması ya da ortadan kaldırılması için daha fazla araştırma yapılarak geliştirilmesi ve iyileştirilmesi gerekmektedir.

REFERENCES

1. Labrie SJ, Samson JE, Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature reviews Microbiology*. 2010;8(5):317-27.
2. Barrangou R, Horvath P. A decade of discovery: CRISPR functions and applications. *Nature microbiology*. 2017;2:17092.
3. Chavez M, Chen X. Advances in CRISPR therapeutics. 2023;19(1):9-22.
4. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science (New York, NY)*. 2007;315(5819):1709-12.
5. Brokowski C, Adli M. CRISPR Ethics: Moral Considerations for Applications of a Powerful Tool. *Journal of molecular biology*. 2019;431(1):88-101.
6. Memi F, Ntokou A, Papangeli I. CRISPR/Cas9 gene-editing: Research technologies, clinical applications and ethical considerations. *Seminars in perinatology*. 2018;42(8):487-500.
7. Janik E, Niemcewicz M, Ceremuga M, Krzowski L, Saluk-Bijak J, Bijak M. Various Aspects of a Gene Editing System-CRISPR-Cas9. 2020;21(24).
8. Roth TL, Marson A. Genetic Disease and Therapy. *Annual review of pathology*. 2021;16:145-66.
9. Singh S, Raj D, Mathur A, Mani N, Kumar D. Current approaches in CRISPR-Cas systems for hereditary diseases. *Progress in molecular biology and translational science*. 2025;210:205-29.
10. Kolli N, Lu M, Maiti P, Rossignol J, Dunbar GL. CRISPR-Cas9 Mediated Gene-Silencing of the Mutant Huntingtin Gene in an In Vitro Model of Huntington's Disease. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(4).
11. Yang S, Chang R, Yang H, Zhao T, Hong Y, Kong HE, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing ameliorates neurotoxicity in mouse model of Huntington's disease. *The Journal of clinical investigation*. 2017;127(7):2719-24.
12. Zeng S, Lei S, Qu C, Wang Y, Teng S, Huang P. CRISPR/Cas-based gene editing in therapeutic strategies for beta-thalassemia. *Human genetics*. 2023;142(12):1677-703.
13. Xie F, Ye L, Chang JC, Beyer AI, Wang J, Muench MO, et al. Seamless gene correction of β -thalassemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and piggyBac. *Genome research*. 2014;24(9):1526-33.
14. Frangoul H, Altshuler D, Cappellini MD, Chen YS, Domm J, Eustace BK, et al. CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and β -Thalassemia. *The New England journal of medicine*. 2021;384(3):252-60.
15. Aalders J, Léger L, Demolder A, Muiño Mosquera L, Coucke P, Menten B, et al. Generation of human induced pluripotent stem cell line UGENTi001-A from a patient with Marfan syndrome carrying a heterozygous c.7754 T > C variant in FBN1 and the isogenic control UGENT001-A-1 using CRISPR/Cas9 editing. *Stem cell research*. 2023;67:103036.
16. Li T, Ma B, Yang H, Zhu G, Shu C, Luo M, et al. Generation of a CRISPR/Cas9-corrected-hiPSC (NCCDFWi001-A-1) from a Marfan syndrome patient hiPSC with a heterozygous c.2613A > C variant in the fibrillin 1 (FBN1) gene. *Stem cell research*. 2021;56:102543.
17. Tang XY, Xu L, Wang J, Hong Y, Wang Y, Zhu Q, et al. DSCAM/PAK1 pathway suppression reverses neurogenesis deficits in iPSC-derived cerebral organoids from patients with Down syndrome. *The Journal of clinical investigation*. 2021;131(12).
18. Happi Mbakam C, Lamothe G, Tremblay G, Tremblay JP. CRISPR-Cas9 Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. 2022;19(3):931-41.

19. Long C, McAnally JR, Shelton JM, Mireault AA, Bassel-Duby R, Olson EN. Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA. *Science (New York, NY)*. 2014;345(6201):1184-8.
20. Shao Y, Wang L, Guo N, Wang S, Yang L, Li Y, et al. Cas9-nickase-mediated genome editing corrects hereditary tyrosinemia in rats. *The Journal of biological chemistry*. 2018;293(18):6883-92.
21. Richards DY, Winn SR, Dudley S, Nygaard S, Mighell TL, Grompe M, et al. AAV-Mediated CRISPR/Cas9 Gene Editing in Murine Phenylketonuria. *Molecular therapy Methods & clinical development*. 2020;17:234-45.
22. Pan Y, Shen N, Jung-Klawitter S, Betzen C, Hoffmann GF, Hoheisel JD, et al. CRISPR RNA-guided FokI nucleases repair a PAH variant in a phenylketonuria model. *Scientific reports*. 2016;6:35794.
23. Graham C, Hart S. CRISPR/Cas9 gene editing therapies for cystic fibrosis. *Expert opinion on biological therapy*. 2021;21(6):767-80.
24. Wen J, Tao W, Hao S, Zu Y. Cellular function reinstatement of offspring red blood cells cloned from the sickle cell disease patient blood post CRISPR genome editing. *Journal of hematology & oncology*. 2017;10(1):119.
25. Bakondi B, Lv W, Lu B, Jones MK, Tsai Y, Kim KJ, et al. In Vivo CRISPR/Cas9 Gene Editing Corrects Retinal Dystrophy in the S334ter-3 Rat Model of Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2016;24(3):556-63.
26. Bjursell M, Porritt MJ, Ericson E, Taheri-Ghahfarokhi A, Clausen M, Magnusson L, et al. Therapeutic Genome Editing With CRISPR/Cas9 in a Humanized Mouse Model Ameliorates α 1-antitrypsin Deficiency Phenotype. *EBioMedicine*. 2018;29:104-11.
27. Hung JE, Brewer RA, Elbakr L, Mollica A, Forgon G, Chan WS, et al. Precise template-free correction restores gene function in Tay-Sachs disease while reframing is ineffective. *Molecular therapy Nucleic acids*. 2025;36(1):102401.
28. Leal AF, Cifuentes J. CRISPR/nCas9-Based Genome Editing on GM2 Gangliosidosis Fibroblasts via Non-Viral Vectors. 2022;23(18).
29. Canda E, Kalkan Uçar S, Çoker M. Biotinidase Deficiency: Prevalence, Impact And Management Strategies. 2020;11:127-33.
30. Hsieh CH, Lee J, Sung HH, Huang YF, Ding YS, Li CY, et al. Novel SLC5A6 mutations lead to B lymphocyte maturation defects with metabolic abnormality rescuable by biotin replenishment. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. 2023;257:109855.
31. Naiki Y, Miyado M, Shindo M, Horikawa R, Hasegawa Y, Katsumata N, et al. Adeno-Associated Virus-Mediated Gene Therapy for Patients' Fibroblasts, Induced Pluripotent Stem Cells, and a Mouse Model of Congenital Adrenal Hyperplasia. *Human gene therapy*. 2022;33(15-16):801-9.
32. Zhou M, Hu Z, Qiu L, Zhou T, Feng M, Hu Q, et al. Seamless Genetic Conversion of SMN2 to SMN1 via CRISPR/Cpf1 and Single-Stranded Oligodeoxynucleotides in Spinal Muscular Atrophy Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Human gene therapy*. 2018;29(11):1252-63.
33. Zhang Y, Nishiyama T, Olson EN, Bassel-Duby R. CRISPR/Cas correction of muscular dystrophies. *Experimental cell research*. 2021;408(1):112844.
34. Himeda CL, Jones TI, Jones PL. Targeted epigenetic repression by CRISPR/dSaCas9 suppresses pathogenic DUX4-fl expression in FSHD. *Molecular therapy Methods & clinical development*. 2021;20:298-311.
35. Goossens R, van den Boogaard ML. Intronic SMCHD1 variants in FSHD: testing the potential for CRISPR-Cas9 genome editing. 2019;56(12):828-37.
36. Rajeev M, Ratan C. Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome (Hgps) and Application of Gene Therapy Based Crispr/Cas Technology as A Promising Innovative Treatment Approach. 2021;15(4):266-85.
37. Santiago-Fernández O, Osorio FG, Quesada V. Development of a CRISPR/Cas9-based therapy for Hutchinson-Gilford progeria syndrome. 2019;25(3):423-6.
38. Osborn MJ, Gabriel R, Webber BR, DeFeo AP, McElroy AN, Jarjour J, et al. Fanconi anemia gene editing by the CRISPR/Cas9 system. *Human gene therapy*. 2015;26(2):114-26.
39. Guo G, Moser M, Chifamba L, Julian D, Teierle S, Rajappa P, et al. CRISPR-Cas9-Mediated Correction of TSC2 Pathogenic Variants in iPSCs from Patients with Tuberous Sclerosis Complex Type 2. 2024.
40. Qian J, Guan X. Multiplex epigenome editing of MECP2 to rescue Rett syndrome neurons. 2023;15(679):eadd4666.
41. Cho HY, Yoo M, Pongkulapa T. Magnetic Nanoparticle-Assisted Non-Viral CRISPR-Cas9 for Enhanced Genome Editing to Treat Rett Syndrome. 2024;11(24):e2306432.
42. Jung H, Rim YA. Restoration of Osteogenesis by CRISPR/Cas9 Genome Editing of the Mutated COL1A1 Gene in Osteogenesis Imperfecta. 2021;10(14).
43. Yang YS, Sato T, Chaugule S, Ma H, Xie J, Gao G, et al. AAV-based gene editing of type 1 collagen mutation to treat osteogenesis imperfecta. *Molecular therapy Nucleic acids*. 2024;35(1):102111.
44. Rohn TT, Kim N, Isho NF, Mack JM. The Potential of CRISPR/Cas9 Gene Editing as a Treatment Strategy for Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease & Parkinsonism*. 2018;8(3).
45. Liang P, Xu Y, Zhang X, Ding C, Huang R, Zhang Z, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing

in human tripronuclear zygotes. *Protein & cell*. 2015;6(5):363-72.

46. Zhang B. CRISPR/Cas gene therapy. *Journal of cellular physiology*. 2021;236(4):2459-81.

47. Shinwari ZK, Tanveer F, Khalil AT. Ethical Issues Regarding CRISPR Mediated Genome Editing. *Current issues in molecular biology*. 2018;26:103-10.