



Genom Düzenleme Teknikleri ve Hayvan İslahında Kullanılabilirliği

Vasfiye KADER ESEN^{1*}, İbrahim CEMAL², Cengiz ELMACI³

¹ T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Koyunculuk Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Bandırma, Balıkesir

² Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü, Aydın

³ Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü, Bursa

MAKALE BİLGİSİ

ÖZET

Derleme

Geliş : 15.09.2020

Kabul : 05.11.2020

Anahtar Kelimeler

ZFN

TALEN

CRISPR

Çiftlik hayvanları

* Sorumlu Yazar

vasfiye.esen@gmail.com

Dünya nüfusunun hızla artmasıyla ortaya çıkan gıda ihtiyacını karşılayamayan tarımsal ürünlerin stok yetersizliği, iklim değişiklikleri sebebiyle çiftlik hayvanlarında ortaya çıkan adaptasyon güçlükleri ve yaygınlaşan çeşitli hastalıklar gibi problemler için her geçen gün yeni çözümler üretilmektedir. Son zamanlarda geliştirilen genom düzenleme tekniklerinin kullanımı ile bu sorunlara çözüm bulunabileceği bilim insanları tarafından kabul edilmektedir. Genom düzenleme, nükleazlar sayesinde genomda belirlenmiş bir yerden bölgeye özel DNA çift zincir kırıkları (DSB) oluşturduktan sonra homolog rekombinasyon (HDR) veya homolog olmayan rekombinasyon (NHEJ) yöntemlerinden biriyle çift zincir kırıkları tamir edilerek genom değişimini meydana getirebilme metodudur. Bu metotlar ile embriyo transfer teknolojisi birleştirilerek hayvan ıslahına uygulanmasında temel amaç, verim ve kaliteyi artırmanın yanında hayvan refahının artırılması ve hastalıklara karşı direnç sağlanmasıdır. Bu çalışmada, genom düzenleme yöntemlerinin ve hayvancılıkta uygulama alanlarının açıklanması amaçlanmıştır.

Genome Editing Techniques and Their Usability in Animal Breeding

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Review

Received : 15.09.2020

Accepted : 05.11.2020

Keywords

ZFN

TALEN

CRISPR

Farm animals

* Corresponding Author

vasfiye.esen@gmail.com

New solutions are being produced for problems such as inadequate stock of agricultural products that can't satisfy the food need due to rapid increase of the world population, adaptation difficulties arising in livestock due to climate change and various diseases spreading each day. The use of genome editing techniques which is developing recently, has been recognized by scientists as a solution to these problems. Genome editing is the method of genomic modification which is generating double strand breaks with nucleases in a specific locus of the genome by repairing these double chain breaks with one of homologous recombination or nonhomologous recombination methods. By combining these methods with embryo transfer technology, the main purpose in animal breeding is increasing yield and quality of products as well as to increase animal welfare and resistance to diseases. In this study, it is aimed to explain the methods of genome editing and their application areas in animal breeding.

Lütfen aşağıdaki şekilde atf yapınız / Please cite this paper as following;

Kader Esen, V., Cemal, İ., Elmacı, C., 2020. Genom düzenleme teknikleri ve hayvan ıslahında kullanılabilirliği, Journal of Animal Science and Products (JASP) 3 (2):189-209.

Giriş

İnsanlığın başlangıcından beri hayvanlar insan hayatında birçok açıdan önemli yer tutmaktadır. Yiyecek ve giyecek gibi temel ihtiyaçlarını hayvanlar sayesinde elde eden insan, yıllar içerisinde hayvanları evciltmeyi başarmış, onlarla hem dostça yaşamış hem de yaşamsal gereksinimlerini daha kolay yöntemlerle elde etmek için uğraşmıştır. Günümüzden on bin yıl önce tarımın ortaya çıkmasından bugüne, evciltme süreci ile başlayan ve zaman içinde geliştirilerek uygulanan selektif yani seçici yetiştiricilik ve son yıllarda sıkça adından söz ettiren genomik seleksiyon gibi yöntemler çiftlik hayvanlarında oldukça önemli ve etkili bir değişim sağlamıştır. Son dönemlerde geliştirilen transgenik canlı elde etme ve genom düzenleme teknolojileri daha sağlıklı ve üretken çiftlik hayvanlarının üretimi açısından heyecan verici olanaklar sağlamaktadır. Bu makalede, genom düzenleme teknikleri ve çiftlik hayvanlarındaki uygulamaları üzerinde durulacaktır.

Hayvan Yetiştiriciliği Evreleri

Hayvan yetiştiriciliğinin geçmişi binlerce yıl öncesine dayanmaktadır. Arkeolojik kazılar, ilk evciltmenin Paleolitik dönemde köpek, koyun ve keçi ile başladığını ve erken Neolitik dönemde ise domuzların evcilleştirilmesiyle devam ettiğini ortaya çıkarmıştır (yaklaşık olarak 8000-10000 yıl önce). Evciltme ile beraber hayvan yetiştiriciliği dönemine de adım atılmıştır. Böylece hayvanlar insan hayatında önemli bir yer edinmiş ve insanların günlük hayatında beslenme,

giyim ve işgücü gibi ihtiyaçlarını karşılamak amacıyla kullanılmıştır. Bu anlamda hayvan yetiştiriciliğinin Paleolitik dönemde başlayan evciltme sürecinden sonra günümüze kadar dört önemli evresi bulunmaktadır (Ruan ve ark., 2017).

İlk başlarda geleneksel yöntemlere dayanan hayvan yetiştiriciliğinde zamanla daha fazla verim elde etmek, istenilen bazı özelliklerin korunmasını ve sonraki generasyonlara aktarılmasını yani sürekliliğini sağlamak amacıyla bazı yöntemler kullanılmıştır. Böylece modern hayvan yetiştiriciliği (selektif yetiştiricilik) olarak tanımlayabileceğimiz bir evre ortaya çıkmıştır. Seleksiyon yöntemini temel alan modern hayvan yetiştiriciliğindeki ıslah çalışmaları ilk olarak 1700’lerde Robert Bakewell ile başlamıştır (Wood, 1973; Oldenbroek, 2014). Bu dönemde “iyi özellikte olanı koru” düşüncesiyle fenotipik seleksiyon yöntemleri kullanılmaya başlamıştır. Çiftçi olan Bakewell, Avrupa’da ilk kez gelecek generasyona en iyi özellikleri aktarabilmek için hayvanların kaydını tutmuştur. Belirli özellikleri geliştirmek için benzer özellikte olan hayvanları çiftleştirme (akrabalı yetiştirme) ve ilk yavru grubundaki özelliklere bakarak bir sonraki generasyonda kullanılacak baba hattı seçme yöntemini de ilk defa Bakewell kullanmıştır. Genetik bilgisi ve hiçbir eğitimi olmadan bunları yapan Bakewell’in bu uygulamaları, zamanla insanlar arasında bir hayvan yetiştirme sistemi olarak giderek yaygınlaşan bir kullanım alanı bulmuş ve bu bir ıslah yöntemi haline gelmiştir (Oldenbroek, 2014). Daha sonraları, R. Fisher (1890-1962), S. Wright (1889-1988) ve Jay

Lush (1896-1982) tarafından istatistik ve popülasyon genetiği alanında yapılan önemli çalışmalarla, ıslah çalışmaları yeni ivme ve bakış açısı kazanmıştır. 20. Yüzyılın ilk yarısında birçok bilim insanı tarafından hayvanların morfolojik görünüşü yerine sayısal verilere ve genetik bilgisine dayanarak yapılan seleksiyon uygulamaları ile hayvan ıslahında ikinci evre olarak tanımlayabileceğimiz yeni bir süreç başlamıştır. Özellikle 1960'lerden sonra bilgisayar uygulamalarının yaygınlaşması ve popülerleşmesiyle ekonomik özelliklere odaklı fenotipik seleksiyon uygulamaları damızlık değeri tahminlerine dayalı seleksiyona dönüşerek birçok istatistik metot geliştirilmiş ve hayvan ıslahında hesaplama teknikleri ortaya çıkarılmıştır (Mackay, 2004). J. Watson & F. Crick tarafından DNA molekülünün iki eksenli sarmal yapısının ortaya çıkarılması ıslah çalışmalarına farklı bir boyut kazandırmıştır. Böylece yeni bir alan olan moleküler yetiştiricilik (ıslah) hayvan ıslahında üçüncü evreyi oluşturmuştur. Bu evre hayvanların iyileştirilmesinde / geliştirilmesinde moleküler genetik ve moleküler kantitatif teoriler ile rekombinant DNA teknolojilerinin kullanımına dayanmaktadır (Ruan ve ark., 2017). Kullanılan moleküler genetik yöntemlerin artması ve çeşitlenmesi, hayvan ıslahında genomik seleksiyon kavramını ortaya çıkarmış ve böylece hayvan ıslahında genomik ıslah olarak tanımlayabileceğimiz dördüncü evre ortaya çıkmıştır. Genomik seleksiyon, DNA yapısı ile hayvanların verim özellikleri, performans ve hastalıklara direnç arasındaki ilişkinin tahmini

damızlık değerine katkısının olabileceği hatta onun yerine geçebileceği bir yöntemdir. Genomik seleksiyon tam olarak, bir canlının hücre, doku veya organından alınan örneklerden moleküler biyoloji teknikleri kullanılarak bireyin DNA dizisinin incelenmesi, başka bireylerle ya da referans DNA dizisi ile karşılaştırılarak, bireyin genotip farklılıklarını belirleme işlemidir. İlk başlarda basit ve ucuz yöntemlerin kullanımı ile başlayan bu süreç dizi analiz yöntemleri ve genlerin ekspresyon seviyelerini ölçmek ya da bir genomda birden fazla gen bölgesinin genotiplendirilmesinde kullanılan DNA mikroarray (DNA-chips, Gene-Chips, SNP-chips) teknolojisinin kullanımı ile günümüzde gelişerek devam etmektedir.

Her geçen gün moleküler genetik bilginin bir yenisinin elde edildiği son yıllarda bilim insanları tarafından belki de canlıyı yeniden şekillendirebilecek bir buluş ile canlı bir organizmanın genetik bilgisini taşıyan genomunda düzenleme veya değişiklik yapılabileceği ortaya çıkarılmıştır. Bu düzenlemenin de başka bir organizmadan gen aktarımı sayesinde değil de, zaten organizmada var olan protein ve enzimler sayesinde olması da bu olaya ayrı bir heyecan katmıştır. Canlıların genetik materyalinin değiştirilmesine karşı insanlar arasında yaygın bir inanış olan ve uygulamasına çok da sıcak bakılmayan genetiği değiştirilmiş organizmalardan (GDO) farklı bir şekilde, genomda yanlış giden bir takım işlerin düzenlenebileceği fikrinin meydana getirilmesi bilim camiasında çok fazla yankı uyandırmıştır. Organizmada var olan genin anlatım şeklinin değiştirilmesi veya baskılanması ile genetik yapının

iyileştirilmesi son zamanlarda epey önem kazanmıştır. Bu yeni biyoteknolojik uygulamalar tarım (bitki ve hayvan yetiştiriciliği) alanında da kendine sağlam bir zemin oluşturmaya başlamıştır.

Dünya üzerinde insan nüfusunun giderek artmasına paralel olarak yükselen gıda ihtiyacı, tarımsal ürünlerin yetersizliği, iklim değişiklikleri sebebiyle ortaya çıkan adaptasyon güçlükleri ve yaygınlaşan çeşitli hastalıklar, bilim insanlarını bu sorunların çözümüne odaklı çalışmalara yöneltmektedir. Son zamanlarda geliştirilen genom düzenleme tekniklerinin kullanımı ile bu sorunlara çözüm bulunabileceği bilim insanları tarafından kabul edilmektedir. Hayvan ıslahı açısından genom düzenleme uygulamalarına baktığımızda temel amaç verim ve kaliteyi artırmanın yanında hastalıklara karşı da direnç sağlanmasıdır.

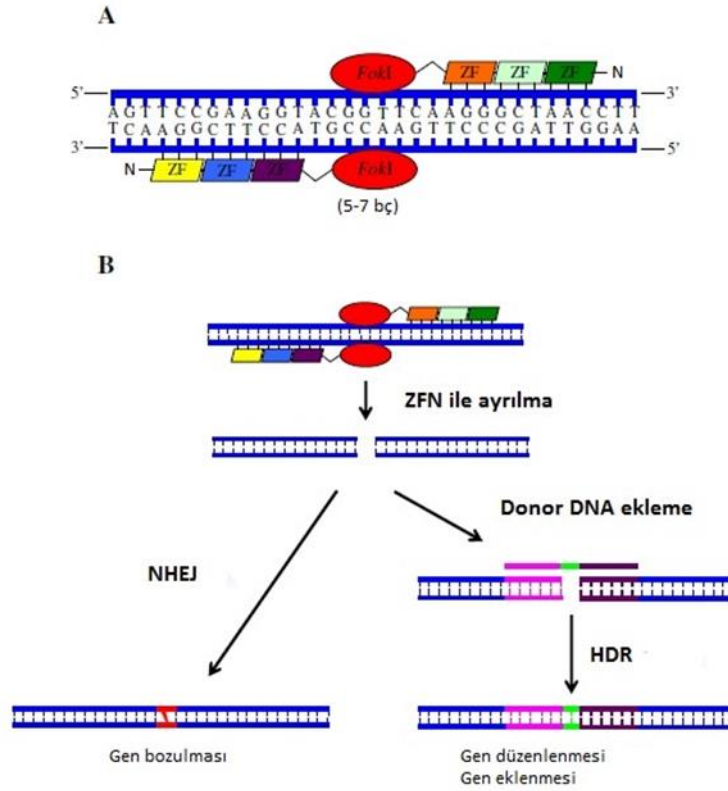
Genom Düzenleme Teknikleri

Son yıllarda sıkça gündeme gelen ve başta insanlar olmak üzere diğer canlılar için de ilerleyen yıllarda zararları olabileceğinden endişe duyulan transgen uygulamaları konusundaki şüpheler günümüzde tam olarak giderilmiş değildir. Bu nedenle transgenik olmayan canlıların geliştirilmesinde genom düzenleme teknikleri bir seçenek olarak ortaya çıkmıştır. Yakın geçmişte, ZFN (Zinc Finger Nucleases: Çinko Parmak Nükleazları), TALEN (Transcription Activator Like Effector Nucleases: Transkripsiyon Efektör Benzeri Nükleazlar) ve CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic

Repeats/CRISPR associated Cas 9: Düzenli Aralıklarla Bölünmüş Palindromik Tekrar Kümeleri/CRISPR ilişkili Cas 9) sistemlerinin herhangi bir genomda, hedeflenen bölgenin değiştirilmesinde uygulanabilir yöntemler olduğu kanıtlanarak bitki ve hayvanlarda kullanılmaya başlanmıştır.

Genom düzenlemenin ilk temelleri 1991 yılında ZFN'lerin keşfiyle başlayıp, TALEN buluşu bunu takip ederken, son bir kaç yılda da yerini daha kolay uygulanabilen ve maliyeti daha düşük olan CRISPR/Cas9 yöntemine bırakmıştır. 2015 yılında CRISPR yöntemi SCIENCE tarafından yılın buluşu seçilmesiyle de bu yöntem araştırmacıların yeni gözdesi haline almıştır. Bu tekniklerde kullanılan nükleazların ortak özelliği genomda belirlenmiş bir yerden bölgeye özel DNA çift zincir kırıkları (DSB) oluşturduktan sonra homolog rekombinasyon (HDR) veya homolog olmayan rekombinasyon (NHEJ) yöntemlerinden biriyle çift zincir kırıkları tamir edilerek genom değişimini meydana getirebiliyor olmalarıdır (Ruan ve ark., 2017).

İlk olarak 1996 yılı başlarında in vitro ortamda ZF (çinko parmak) protein domeni ile *FokI* endonükleaz domeninin birleşmesiyle DNA'nın belirli bölgesine özel kesme işleminde rol oynadığı tanımlanmıştır (Kim ve ark., 1996). Bu kimerik protein, her bir çinko parmak domeninin bir nükleotid üçlüsü tarafından tanınmasından dolayı birbirini tamamlayan elemanlardan oluşan bir yapıya sahiptir (Şekil 1).



Şekil 1. Çinko parmak proteininin yapısı ve mekanizması.

Figure 1. Zinc Finger Nuclease Protein structure and mechanism.

A) Herbir ZFN'nin amino ucunda bir çinko parmak protein ve karboksi ucunda *FokI* nükleaz enzimi içermektedir. Sağ ve sol ZFN çiftinin hedef sırası yaklaşık 18-36 baz çifti uzunluğundadır. Her bir ZF, 3 nükleotide bağlanarak, nükleazı genomda hedef bölgelere yönlendirmektedir. DNA dizisiyle ZFN çifti interaksiyona girerek *FokI* Nükleazların dimerizasyonu sağlanır. B) *FokI* enzimlerinin dimerizasyonu hedef bölgede çift zincirli DNA kırığı oluşturur. Homolog olmayan rekombinasyon (NHEJ) gen sırasının bozulmasına sebep olurken, ortama DNA tamir dizisi ilave edildiğinde homolog rekombinasyon (HDR) aracılığıyla gen düzenlenmesi veya ilavesi gerçekleşmektedir (Wijshake ve ark., 2014).

Çinko parmak protein metodu hücre kültürü, pluripotent kök hücreler de dahil olmak üzere bitki ve hayvan modellerinin düzenlenmesinde temel oluşturmuştur (Bibikova ve ark., 2003). Ancak, ZFN tabanlı bu teknolojinin her bir genom lokusu için protein domenlerinin oluşturulmasının yüksek maliyeti ve karmaşıklığının yanında, hazırlanması için uzun süre gerektirmesi, tek nükleotid süstitüsyonu veya domenler arası yanlış etkileşim nedeniyle hedef DNA'nın hatalı kesilme

ihtimali gibi dezavantajları bulunmaktadır (Nemudryi ve ark., 2014; Ruan ve ark., 2017). Bu sebeplerden dolayı, ilerleyen zamanlarda genom düzenlemede farklı metotlar deneme ve geliştirme ihtiyacı ortaya çıkmıştır. Araştırmacılar, ZFN teknolojisinin geliştirilmesiyle TALEN'ler ile tanışma fırsatı bulmuş ve bu metot ile genom düzenlemede biraz daha fazla ilerleme elde edilmiştir.

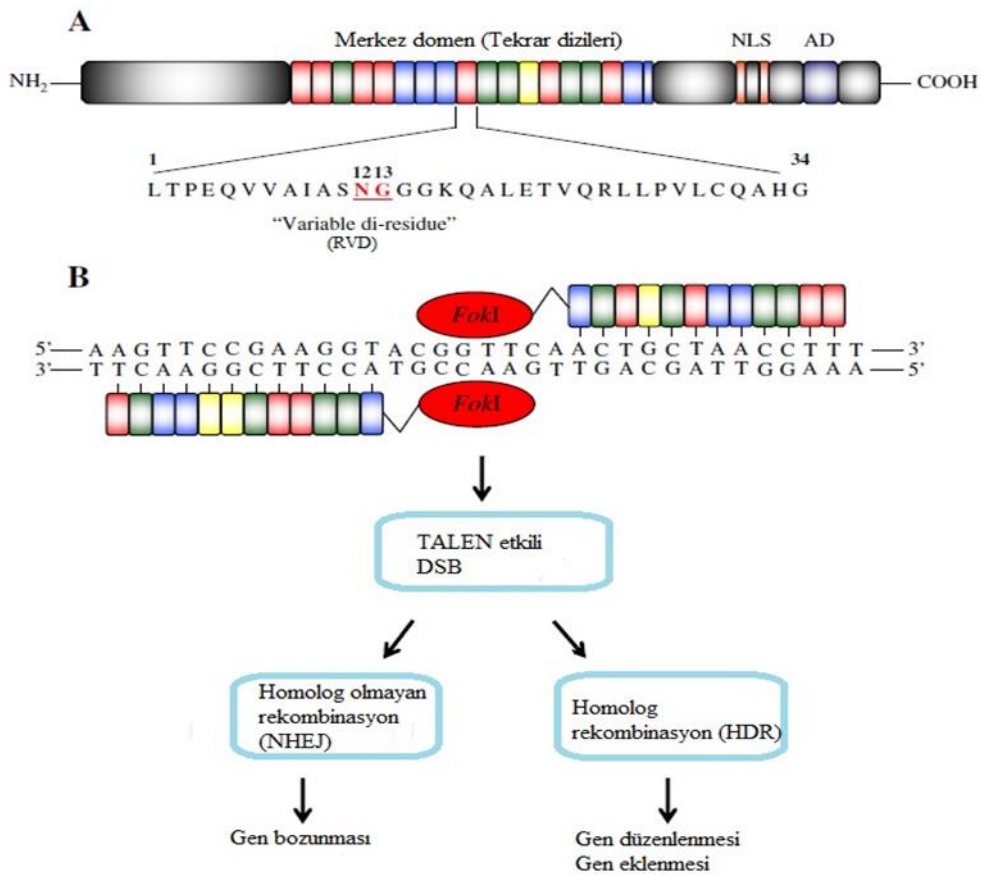
TALEN sistemi, *Xanthomonas* cinsi bakterilerde yapılan çalışmalar

sonucu geliştirilmiştir. Bu bakteriler pirinç, biber, domates gibi bitkilerde patojen olarak bulunmakta ve tarımda ciddi zararlara yol açmaktadır. Bu bakterilerin bitki hücresi içindeki süreçleri etkileyen ve patojeniteye duyarlılığını artıran sitoplazmaya salgıladığı TALE (transcription activator like effectors) adı verilen efektör proteinlerin bulunmasıyla birlikte bu efektör proteinlerin mekanizması daha ayrıntılı incelenmeye başlanmıştır. Bunun sonucunda ökaryot transkripsiyon faktörlerini taklit ederek yine ZFN'ler gibi DNA'ya bağlanma yeteneğinde oldukları ve hedef genlerin ekspresyonunu aktive edebildikleri ortaya konulmuştur (Nemudryi ve ark., 2014).

TALE proteinleri, DNA'ya bağlanmak için bir merkez domen ve hedef genin transkripsiyonunu aktive eden bir domen olmak üzere iki domene sahiptir (Şekil 2). DNA'ya bağlanma domeninin her bir monomeri hedef nükleotid dizisindeki bir nükleotide bağlanmaktadır. Monomerler 34 aminoasidin art arda tekrarlanmasıyla bir araya gelmiş olup, 12. ve 13. pozisyondakiler çok yüksek değişkenlikte olup bunlar RVD (repeat variable diresidue) olarak bilinmekte ve hedef dizideki nükleotidin tanınmasını bu aminoasitler sağlamaktadır. Ancak bu dejenere bir koddur, bazı RVD'ler farklı etkilerle de nükleotidlere bağlanabilmektedir (Nemudryi ve ark., 2014). Bu yönde yapılan çalışmalarda genellikle A, T, G, C nükleotidlerine bağlanmak için sırasıyla NI (Asn ve İle), NG (Asn ve Gly), NN (Asn ve Asn), HD (His ve Asp) RVD'leri kullanılmaktadır

(Akbudak ve Kontbay, 2017). Ancak, NN RVD'si hem Adenin hem de Guanin nükleotidlerine bağlanabildiğinden dolayı, daha fazla spesifik olabilecek monomer geliştirme çalışmaları yapılmıştır. Böylelikle hedef DNA dizisine göre her bazı farklı olarak tanıyan RVD'lerden oluşturulan TALE proteinleri tasarlanabilir duruma gelmiştir.

Genel olarak, bu genom düzenleme tekniğinde yapay TALE nükleazları kullanılarak DNA bağlama domenlerinin bilinen tanıma bölgeleriyle, genomun herhangi bir bölgesinde çift zincirli kırık oluşturulabilmektedir. TALE nükleazlarının tek sınırlanma durumu ise hedef dizinin 5' ucundan önce bir T bazına ihtiyaç duymasıdır (Nemudryi ve ark., 2014). Ancak, bu sınırlanma olayının da A, G ve C'ye bağlanabilen TALEN N-terminal domeninin mutant varyantlarının seçilmesiyle üstesinden gelinebilmektedir (Lamb ve ark., 2013).



Şekil 2. TALEN yapısı ve mekanizması

Figure 2. TALEN structure and mechanism

A) TALE proteininde N-terminal uç, merkezi DNA bağlanma bölgesi ve C- terminal ucunda Nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) ve aktivasyon bölgesi bulunmaktadır. Her bir tekrar 34 aminoasit uzunluğunda ve 12 inci ve 13 üncü pozisyonlarda çok değişken iki aminoasit (RVD) (kırmızı renkli) içerir. Her bir RVD, özgün DNA çiftini tanıyarak aktivasyon bölgesi ile özgün genlerin sentezini uyarır. B) Her biri tek nükleotide bağlanan 12 özgün tekrar içeren *FokI* nükleazla birleşik TALEN molekülü. TALEN moleküllerinin karşılıklı bağlanmasıyla *FokI* dimerizasyonu gerçekleşmektedir (Wijshake ve ark., 2014)

TALEN sisteminin geliştirilmesinden birkaç yıl sonra 2013'de *Streptococcus pyogenes* ve *Streptococcus thermophiles* bakterilerinden elde edilen enzimler kullanılarak memeli hücrelerinde bir diğer genom düzenleme tekniği olan CRISPR/Cas 9 sistemi Jennifer Doudna ve Emmanuelle Charpentier tarafından geliştirilmiştir (Cong vd., 2013). Başlangıçta, 1987 yılında *E.coli* bakterisinin DNA'sında bazı tekrarlı

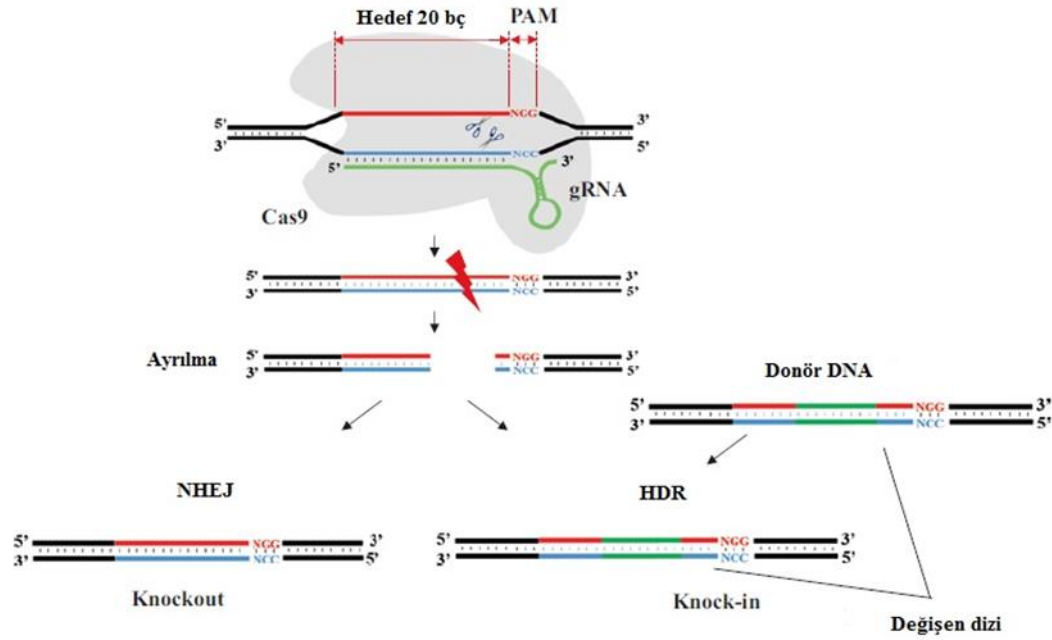
sıraların olduğu Japon bilim insanı Yoshizumi Ishino ve arkadaşları tarafından keşfedildiğinde bunun henüz savunma mekanizması olarak kullanıldığı bilinmiyordu (Ishino ve ark., 2018). Daha sonraki yıllarda kendilerini virüs veya plazmitler gibi dış etkenlerden korumak amacıyla geliştirdikleri bağışıklık sisteminin savunma mekanizmalarını Cas adı verilen enzimler yoluyla yapmakta oldukları keşfedildi. Genom yapıları

incelendiğinde DNA'daki tekrar eden sıraların daha önceden saldıran virüs DNA'ları ile birebir eşleştiği ve bu eşleşme ile direnç mekanizmasının meydana geldiği anlaşılmıştır. Saldırgan her yeni virüsün genetik materyali bakteri içinde bu CRISPR sisteminde kodlanarak ona karşı bir savunma mekanizması sağlanmış olmaktadır. Bu şekilde de bakteriler saldırganlara karşı genetik bilgiyi sonraki nesillere de aktarabilmektedir. Virüs bakteriyi enfekte ettiğinde bakterideki Cas proteinleri virüs DNA'sına yapışarak yaklaşık 30 baz çifti uzunluğunda bir parçayı kesip kendi bünyesindeki tekrar kümelerinin olduğu yapıya getirir. Bu DNA sırası RNA sırasına çevrilerek ve Cas proteinleri ile birlikte Ribonükleoprotein kompleks molekül oluşmasını sağlar. Dolayısıyla virüs DNA'sı bakteride tanınmış olacağından bu kompleks sayesinde bir daha ki saldırıda virüs DNA'sı parçalanmış olacaktır (Sert, 2017). Bakteri sistemi içerisinde meydana gelen bu basit olay tam olarak memeli genom düzenleme sistemine uyarlanmış halidir. Hücre içerisinde de mekanizma basit olarak bu şekilde çalışmaktadır.

CRISPR/Cas9 sisteminin ZFN ve TALEN'den temel farkı RNA tabanlı olmasıdır. Bütün sistem Cas9 proteini ve bir rehber RNA'dan (gRNA) oluşmaktadır (Cho ve ark., 2013). Bakterilerdeki orijinal CRISPR sisteminde Cas9 proteiniyle birlikte crRNA ve tracrRNA gözlenirken, genom düzenlemede ise crRNA'nın 3' ucu ile tracrRNA'nın 5'ucunun birleşmesiyle enzime rehberlik eden gRNA elde edilmiştir (Akbudak ve Kontbay, 2017).

Şekil 3'de gösterildiği gibi hücre içerisinde hedef dizinin tanınması ve Cas9/gRNA kompleksinin çift iplikli kesik oluşturabilmesi için sıranın 3' ucunda PAM (Protospacer Associated Motif) olarak adlandırılan NGG sırasına ihtiyaç vardır (Jinek ve ark., 2012).

CRISPR /Cas9'un diğer genom düzenleme tekniklerine göre daha uygulanabilir, basit ve daha az maliyetli oluşu nedeniyle bilim insanları bu yöntemi sürekli geliştirmeye yönelik çaba göstermişler ve hatta bazı şirketler patent alma konusunda sıkıntılardan dolayı da Cas9 haricinde yeni enzimler geliştirmeye başladıklarını duyurmuşlardır. Özellikle insan sağlığı açısından genetik hastalıklara çare olabilecek olması tıp camiasında geniş yankı uyandırırken, tarımsal alanda da kendine yer edinmiştir. İklim değişikliklerine uyum sağlayabilen tarımsal ürünler geliştirilmeye ve hayvancılık alanında ekonomik verim özelliklerini artırmada kullanılabilirlik çalışmaları yapılmaya başlanmıştır. Önümüzdeki süreçte genomik ıslaha dayalı seleksiyonun yanında genom düzenleme tekniklerinin de bu alanda yerini alacağı muhtemeldir.



Şekil 3. CRISPR/Cas9 sistemi

Figure 3. CRISPR/Cas9 system

Cas9 endonükleazı ve gRNA kompleksi hedef olan 20 bazlık sırayı PAM (Protospacer adjacent motif) yardımıyla tanıyarak ayırmaktadır. PAM (NGG) sırası 20 bazlık hedef sırasının 3' ucunda bulunmaktadır. Hedeflenen ayrılmanın ardından NHEJ veya HDR tamir yöntemlerinden biriyle tamir edilecektir. NHEJ sonucunda hedef bölgeye nükleotid eklenmesi veya çıkarılması meydana gelirken, HDR ile donör DNA varlığında hedef bölgede yeni dizi oluşturulacaktır (Hatada, 2017).

Genom Düzenlemenin Hayvan Islahına Entegrasyonu

Genom düzenleme, aslında teorik açıdan kolaylıkla anlaşılabilir ve basit bir kavramdır. Zira genom düzenleme denildiğinde özgün bir bölgedeki baz çiftlerinin çıkarılması, değiştirilmesi veya eklenmesi akla gelmektedir. Gen düzenleme metotlarının genetik değişimin önemli bir unsuru olabilmesi için, seleksiyonda germ hattı hayvanların elde edilmesine yardımcı olacak geleneksel hayvan ıslah programlarına sorunsuz bir şekilde entegre edilebilmelidir (Bhat ve ark., 2017). Düzenlemeler, SCNT (Somatik hücre çekirdek aktarımı) klonlama yöntemiyle

somatik hücrelerde gen düzenleme veya bir sonraki generasyonun zigot sitoplazmasına gen düzenleme ajanını enjekte ederek zigot aşamasında düzenleme şeklinde yapılmaktadır (Wei ve ark., 2015). Bu zamana kadar bu iki yöntem ile çeşitli çiftlik hayvanlarında çok sayıda genom düzenleme araştırmaları yapılmıştır.

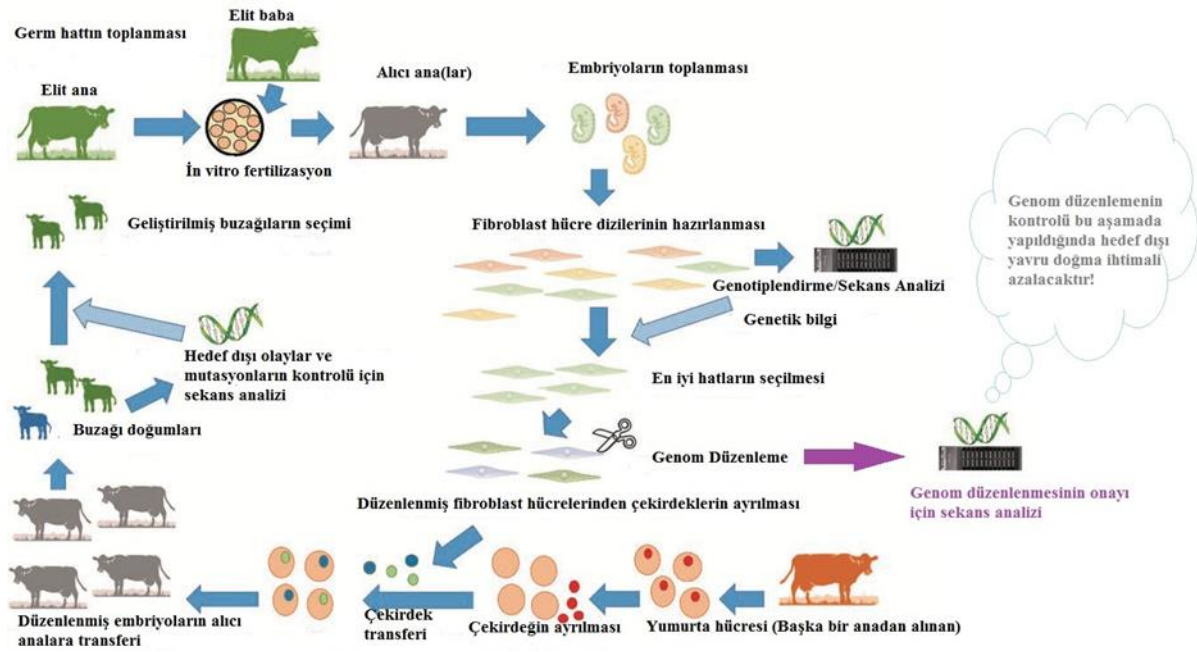
SCNT yöntemi, hayvancılıkta çekirdek aracılığıyla genetik değişim tekniklerinden başlıca kullanılanıdır (Tan ve ark., 2016). Bu yöntemin en önemli avantajı gen düzenlenmiş hücre hattında istenmeyen bir durum oluşup olmadığını veya istenen düzenlemenin gerçekleştiğini kontrol edebilmek

amacıyla oosit hücresinin içine aktarılmadan önce genotiplendirme yapılabilme imkânı bulunmasıdır. Öte yandan, klonlama ile ilişkili erken embriyonik kayıplar, postnatal ölümler ve doğum kusurlarının meydana gelme olasılığı bu yöntemin bir dezavantajı olarak karşımıza çıkar (Van Eenennaam, 2017).

Zigotun direkt olarak düzenlenmesi bir sonraki generasyona uygulandığından avantajlıdır, ancak bütün embriyolar düzenlenememektedir. Bütün türlerde zigotun direkt düzenlenmesinde allel süstitüsyonları her zaman başarılı olmuştur (Tan ve ark.,

2016). Zigotun düzenlenmesinde tek problem bir gene etki eden başka bir gen olması ihtimalidir (Van Eenennaam, 2017).

Üreme teknolojileri aracılığıyla genom düzenleme sistemlerinin çiftlik hayvanlarında bu güne kadar gerçekleştirilen çalışmalar azımsanamayacak kadar fazladır. Geleneksel ıslah programlarına uygulanabilirlikleri ve sürdürülebilir olabilmeleri açısından hayvan refahı, performans artırma, hastalıklara direnç ve biyomedikal gibi temel alanlara yönelik Faz 1 aşamasında çalışmalar giderek artmaktadır.



Şekil 4. Yetiştirme sürüsünde genom düzenleme aşamaları (Eriksson ve ark., 2018'den uyarlanmıştır)

Figure 4. *Genome editing steps in breeding flocks*

Temel olarak, Şekil 4'de de şematize edildiği gibi hayvan yetiştiriciliği faaliyetlerinde elit verici ana ve babadan alınan üreme hücreleri (germ hat) in vitro ortamda fertilizasyon (döllenme) işlemine tabi tutularak alıcı

analara aktarılır (her dişi için mümkün olduğunca fazla embriyo aktarılması sağlanmalıdır). Çoklu embriyoların aktarılmasından yaklaşık 3 haftalık bir süreç geçtikten sonra embriyolar toplanarak fibroblast hücreleri

oluşturulmaktadır. Bu hücre dizileri genotipleme testine tabii tutularak en iyi özellikte olanlar seçilerek belirli özelliği geliştirmek üzere genom düzenleme yapılır. Genom düzenlemesi yapılan fibroblast hücreleri tekrardan genetik analizi yapılarak hedeflenen bölgenin etkilenip etkilenmediğinin takibi yapılır. Ardından başarılı bir şekilde genom düzenlemesi gerçekleştirilen hücre çekirdekleri fibroblast yapısından ayrılarak başka bir verici çekirdeği çıkarılmış yumurtanın içine bırakılarak çekirdek transferi gerçekleştirilmiş olur. Genomu düzenlenmiş bu yeni embriyolar yeni alıcı annelere aktararak doğumun gerçekleşmesi beklenir. Doğumlar ile elde edilen yeni yavrular yüksek genetik kabiliyetteki genomu değiştirilmiş buzağılar olacaktır (Eriksson ve ark., 2018).

Hayvan yetiştiriciliğinde genom düzenleme çalışmaları

Artan dünya nüfusuyla beraber hayvansal gıda ihtiyacının da giderek arttığı günümüzde mevcut kaynakların da genetik sınırlarını sonuna kadar değerlendirerek ve günümüz teknolojilerini kullanarak çiftlik hayvanlarının verim performansını artırıcı çalışmalar yapılmasına sürekli ihtiyaç duyulmaktadır. Genom düzenleme çalışmaları hayvan yetiştiriciliğinde ıslah programlarıyla henüz bütünleşmiş (entegre edilmiş) olmasa da literatürde çiftlik hayvanlarının verimini artırıcı, hastalıklara direnci artırma ve hayvan refahına yönelik çalışmalar mevcuttur. Gen düzenleme tekniklerinin uygulamaları 30 yıl kadar öncesinde ilk

olarak basit organizmalarda başlamıştır. Ardından yüksek organizmalarda denenme çalışmaları ile Yu ve ark. (2011) ZFN teknolojisini kullanarak sığırlarda temel peynir altı suyu (whey) proteini olan β -lactoglobulin geni için hedeflenmiş gen mutasyonu oluşturmuşlardır. β -laktoglobulin genin aynı zamanda inek sütündeki temel süt alerjenlerinden birisi olması sebebiyle BLG lokusunda nakavt (geni susturma) meydana getirerek, bu zamana kadar meyve sineği *Drosophila*, nematod *Caenorhabditis elegans*, zebrafish (*Danio rerio*) ve ratlar gibi küçük organizmalardan ziyade büyük hayvanlarda da ZFN'nin uygulanabileceğini göstermişlerdir. Buna benzer bir çalışmayla, Wei ve ark. (2015), ZFN ve TALEN teknolojilerinin ikisiyle de sığır embriyolarının beta laktoglobulin (BLG) genini yüksek oranda modifiye etmeyi başarmışlardır.

Et verimini artırmada en fazla çalışılan genlerden biri de kas büyümesinin negatif düzenleyicisi olan miyostatindir. Bu genin biyolojik fonksiyonu ve tanımlanması fareler üzerinde yapılan bir çalışmayla ilk olarak McPherron ve ark. (1997) tarafından keşfedilmiştir. Miyostatin üzerindeki varyasyon, çift kaslılık fenotipine sebep olmaktadır (McPherron ve ark., 1997). Luo ve ark. (2014) ZFN teknolojisiyle sığırlarda MSTN genini baskılamayı hedeflemişlerdir. Miyostatin geninin çalışmasının durdurulması veya Belçika Mavisisi sığırlarda olduğu gibi gen mutasyonları meydana geldiğinde çift kaslılık meydana gelmekte, bu canlılarda diğerlerine göre yaklaşık % 20 daha fazla kas yapısı bulunmaktadır

(Kambadur ve ark., 1997). Luo ve ark. (2014) Çin Sarı Sığır ırklarında, ZFN ile ilgili gen bölgesi ayrılıp NHEJ tabanlı DNA tamir mekanizmasıyla, fibroblast hücrelerinde MSTN geninin ORF (open reading frame) dizisi bozunmaya uğratılarak SCNT kullanılarak miyostatin biallelik mutant yavrular üretilmiştir. Bu yeni üretilen çift kaslı fenotipe sahip mutant yavruların miyostatin mRNA ve protein seviyeleri belirgin bir şekilde düşük olduğu gözlenmiştir. Miyostatin genini baskılayarak çift kaslılık sağlayan bir diğer çalışma da Ni ve ekibine aittir. Ni ve ark. (2014) keçilerle gerçekleştirdikleri bu çalışmada CRISPR/Cas9 sistemini kullanarak kas miktarında ciddi artış gözlenen oğlaklar elde etmişlerdir. Yine aynı şekilde Proudfoot ve ark. (2015) TALEN sistemini kullanarak miyostatin geninin hem koyunlarda hem de sığırlarda baskılanmasını sağlayarak çift kaslı yavruların üretilmesini sağlamışlardır.

Çiftlik hayvanlarının et ve süt gibi ürünlerinden besin olarak faydalanmanın yanında koyunların yapağısından, keçilerin tiftiğinden tekstil ve dokuma sanayi alanında çok fazla faydalanılmaktadır. Özellikle kaşmir üretiminin artırılmasına yönelik Wang ve ark. (2015a) Shannbei keçilerinde, kıl uzunluğu ile ilişkilendirilmiş olan FGF5 (Fibroblast growth factor 5) geni üzerinde çalışmışlardır. FGF5'in kıl büyüme döngüsü esnasında salgılanan bir protein olduğu ve dermal papilla hücrelerinin aktivasyonunu bloke ederek kıl büyümesini inhibe ettiği bilinmektedir (Ota, 2002; Wang, 2015a).

Yapılan ilk çalışmada CRISPR/Cas9 sistemi ile %26,5 oranında keçilerde hem MSTN hem de FGF5 bakımından genom düzenleme başarılarının ardından yaptıkları bir diğer çalışmada ise FGF5 geninin bozunmaya uğratılması, fenotipik ve morfolojik ölçümlerle ilişkili bulunmuş, ekonomik anlamda bir keçiden daha uzun kıl elde etmek için CRISPR/Cas9 tekniği ile keçilerde gen düzenlenmesi yapılabileceğini ortaya koymuşlardır (Wang, 2016).

İklim değişiklikleri ile canlılarda görülen hastalıklar da zaman zaman evrilmekte, şekil değiştirmekte ve canlılar dünyasında bu yeni yaygın hastalıklara karşı direnç sağlanması kaçınılmaz olmaktadır. Yabani hayvanların kendiliğinden buldukları ortama adapte olabilme güçleri fazla iken, bu durum çiftlik hayvanlarında biraz daha farklı olabilmektedir. Özellikle endemik olmayan ırklar yani melez ırklarda yaygın hastalıklara direnç konusunda daha hassasiyet gözlenebilmektedir. Ortaya çıkan bu tablo ile birlikte, tarımsal alanda hayvancılığın önemli bir ekonomik değere sahip olduğu gelişmekte olan ülkeler, hayvansal ürünlerinin yaklaşık % 30'unu hastalıklar sebebiyle kaybetmektedir (Şentürk, 2015).

Küresel ısınmanın hızla arttığı ve ciddi iklim değişikliklerinin meydana geldiği dünyamızda yetiştirilen hayvanların da bu koşullara uyum sağlayabilmeleri için genetik yapılarında var olan ancak ortaya çıkmayan, ifade edilemeyen genleri genom düzenleme ile ortaya çıkarılıp, hastalıklara direnç sağlanarak bunun sürü ıslah programlarına entegre edilmesi gerekir.

Bu konuda yapılan çalışmalardan biri de Afrika Domuz Gripi hastalığına dirençle ilişkili olduğu tespit edilen domuz RELA genidir. TALEN teknolojisi ve direkt zigota muamele yöntemleri ile RELA geni bakımından istenen mutasyonlara (dirence neden olan) sahip, yaşayan canlı domuzlar elde edilmiştir (Lillico ve ark., 2013). Bu hastalık genellikle yaban domuzlarından daha çok evcil domuzlarda rastlandığı için domuz yetiştiriciliğinde ekonomik kayıplara neden olan önemli bir tehdidi oluşturmaktadır. Bir diğer önemli çalışma da, domuzlarda üreme ve solunum sendrom virüsü (PRRSV) hastalığıyla ilişkisi olduğu bilinen CD163 geni ile ilgili çalışmadır. PRRS virüsü, enfekte ettiği yetişkin bireylerde düşük sperm kalitesiyle üreme kabiliyetinin yok olmasına sebep olmaktadır. Büyümekte olan gençler de ise, solunum hastalıkları ve büyüme geriliği ile sonuçlanmaktadır. Bu hastalığın üreticilere her yıl verdiği kayıp Kuzey Amerika'da 664 milyon Euro, Avrupa'da ise 1.5 Milyar Euro'dur (Whithworth ve Prather, 2017). PRRSV başarılı bir aşılama bile kurtulmaya devam ederken, tek etkili metot bu salgın sırasında sürünün sterilizasyonu, azaltılması, yeniden oluşturulması gibi yetiştiriciye duygusal ve mali açıdan zararlı bir süreç olarak ortaya çıkmaktadır (Whithworth ve Prather, 2017). Bu doğrultuda CRISPR/Cas9 kullanılarak CD163 geninin hedeflenen ekzon 7 bölgesi susturulmuştur. Fertilizasyondan 18 saat sonra, CD163 geninin hedeflenen ekzon 7 bölgesi için dizayn edilen sgRNA ve Cas9 mRNA zigota direkt enjekte edilerek, blastosist

aşamasına gelen embriyolar alıcı anaya aktarılmış ve gebelik sürecinin ardından fenotipik olarak normal, ancak PRRSV'ye dirençli yavrular elde edilmiştir (Whitworth ve ark., 2014).

Bir diğer önemli yaygın hastalık, Sığır tüberkülozudur. Türkiye ve Avrupa'da yaygın olarak görülmekte olan bu hastalık subklinik bir seyir izlemesi sebebiyle klinik muayene ile teşhisi mümkün olmayıp, histopatolojik, bakteriyolojik veya DNA prob vb. teknikler ile teşhis edilebilmektedir (Özbey, 2008). Mycobacterium bovis bakterisinin sebep olduğu hastalık solunum ve sindirim yoluyla özellikle porsuk gibi yabani hayvanlardan çiftlik hayvanlarına bulaşmakta olup, inek sütünün doğru bir yöntemle pastörize edilmemesi, iyi pişmemiş et veya direkt enfekte olmuş bir sığıra açık yara ile temas durumunda insanlara da bulaşabilmektedir. Sığır tüberkülozu 5996 sayılı Veteriner Hizmetleri Bitki Sağlığı ve Yem Kanuna göre ihbarı mecburi bir hastalık olup, enfekte olmuş hayvanlar mecburi kesime gönderilir ve sürü hastalıktan arı olana kadar gözlem altında tutulur (Anonim, 2010). Ekonomik kayıpların azami düzeyde yaşanabildiği sığır tüberkülozu hastalığına karşı Gao ve ark. (2017) CRISPR/Cas9 sistemini kullanarak Salmonella ve Mycobacterium gibi patojenlere doğal olarak dirençle ilişkilendirilen, makrofajlarda bulunan NRAMP1 (Doğal Direnç İlişkili Makrofaj Proteini-1) geninde yapılan düzenlemelerin sonucunda, NRAMP1 geni düzenlenmiş doğan yavruların sığır tüberkülozu hastalığına dirençli olduklarını saptayarak, bu uygulamanın

hayvancılıkta kullanılabilirliğini göstermişlerdir.

Sığırlarda BSE, koyun ve keçilerde Skrapi (Scrapie) nakledilebilir beyin hastalıklarından sayılmakta olup, hastalığı teşhis edilen hayvanların imha edilmesi ve hatta hastalıktan etkilenmiş olabilecek sürüdeki diğer hayvanların da itlaf ve imhasının yapılması gerekmektedir. Bu hastalıkların öldürücü olması sebebiyle insan sağlığı açısından da hayvansal ürünlerin tüketimi tehlike arz etmektedir. BSE ve skrapiye sebep olan prion proteinin tek bir gen (Prp) tarafından kodlandığı bilinmektedir. Bu proteinin mutasyonları sonucunda ortaya çıkan bu hastalık bakımından bireylerin genetik yöntemlerle (SNP) belirlenerek sürüden uzaklaştırılması mümkün olmakla birlikte CRISPR/Cas9 tekniğiyle zigotta PRNP geni üzerinde hedeflenen bölgenin (sığırlarda ekzon 3, keçide ekzon 1) kaldırılmasıyla sağlıklı yavru buzağılar ve oğlaklar elde edildiği bildirilmiştir (Ni ve ark., 2014, Bevacqua ve ark., 2016).

Medikal alanda da insan sağlığına katkı gösterebilecek pek çok çalışma yapılmıştır. TALEN ile Lee ve ark. (2014) domuz RAG2 genini düzenleyerek medikal çalışmalarda kullanılacak bağışıklığı yetersiz (immun deficient) domuz üretmişlerdir. Yine, medikal çalışmalarda kullanılabilmesi amacıyla GGTA1, Parkin, DJ-1 genleri domuz fibroblast genomunda TALEN teknolojisi SCNT ile birlikte kullanılmıştır (Yao ve ark., 2014). Ayrıca, domuz GGTA1, CD163, CD1D, H11, MSTN genlerine yönelik olarak CRISPR/Cas9 teknolojisi kullanılarak yapılan çalışmalar ile de

başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Sato, 2014; Hai, 2014; Whitworth, 2014; Wang, 2015b).

Hayvansal ürünlerin insan sağlığı açısından faydalı olması için hayvan sağlığının korunması yanında hayvan refahının korunması da çok önemlidir. Çiftlik hayvanları yetiştiriciliğinde hayvanlardan alınan verim miktarı ve kalitesiyle, refah yakından ilişkilidir. Hayvan refahı, hayvanın acı çekmesi veya memnuniyet durumlarını incelemektedir. Yetiştirme

barınaklarındaki ısı, ışık, ses ve gürültü gibi durumlar bile onların refahını etkileyip sağladıkları süt, et gibi ürünlerin verim ve kalitesinde değişiklikler olurken, daha acı verici boynuz köreltme, kastrasyon gibi uygulamalarda hayvanlar geri dönüşümü zor büyük stres altına girmektedirler. Ancak, boynuz köreltme işlemi de hayvanları birbirlerinden ve yetiştiricilerini korumak amacıyla özellikle sığır işletmelerinde uygulanmaktadır. Boynuz darbeleri, memelerde, karkasta, deride, büyük yaralara sebep olmakta ve bu da ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Bu sebeple Carlson ve ark. (2016), TALEN genom düzenleme tekniği ile boynuzluluğa sebep olan POLLED allelini baskılayarak ve etçi sığırlardan homoloji gösteren tamamlayıcı DNA dizisi sayesinde hayvan refahı açısından önemlilik arz eden boynuzsuz sığır üretmişlerdir (Ruan ve ark., 2017).

Tablo 1. Çiftlik hayvanları üzerinde başarılı gen düzenleme çalışmaları (Van Eenennam, 2017'den uyarlanmıştır)

Table 1. Successful gene editing studies on farm animals

	Tür	Hedef	Amaç	Metod	Kaynak
Hayvan Refahı	Sığır	Pc alleli	Boynuzsuzluk	TALEN	Carlson, 2016 Tan, 2013
	Sığır	Miyostatin	Kas verimini arttırmak	TALEN/ZFN	Proudfoot, 2015 Luo, 2014
Performans	Keçi	Miyostatin	Kas miktarını arttırmak	CRISPR/Cas9	Ni, 2014
		FGF5	Kıl uzunluğunu arttırmak	CRISPR/Cas9 Zigot enj.	Wang, 2015a
	Domuz	Miyostatin	Kas veriminde artış	CRISPR/Cas9 ZFN	Wang, 2015b Qian, 2015
	Koyun	Miyostatin	Kas veriminde artış	TALEN CRISPR/Cas9	Proudfoot, 2015 Crispo, 2015
Hastalıklara Direnç	Sığır	Beta laktoglobulin	Süt alerjenlerinin yok edilmesi Yumurtada	ZFN	Yuo, 2011
	Tavuk	Ovalbumin	ovalbuminin yok edilmesi	TALEN	Park, 2014
		İmmünoglobulin	Germ hatta gen düzenlenmesi	CRISPR	Dimitrov, 2016
	Keçi	Prion protein	Prion proteini yok etmek	CRISPR/Cas9	Ni, 2014
		Beta laktoglobulin	Süt alerjenleri yok etmek	CRISPR/Cas9	Ni, 2014
	Domuz	CD163	PRRSS Virüs direnci	CRISPR/Cas9	Whithworth, 2014
RELA		Afrika Domuz Gribi Virüsüne Direnç	ZFN	Lilico, 2013	

Öte yandan genom düzenleme teknikleri kullanılarak transgenik (başka bir canlıdan gen aktarılmış canlı) çiftlik hayvanı elde etme denemeleri de bu alanda başarılı olmuştur. Liu ve ark. (2013) tarafından ZFN teknolojisiyle insan lizozim (Hlyz) geni sığırın β -kazein lokusuna aktarılmış, böylece

transgenik oluşan sığırın meme bezlerinde insan lizozim geni salgılanmış ve transgenik sığırın sütü de mastitis hastalığına sebep olan *S. Aureus* bakterisini öldürebilme yeteneği kazanmıştır (Liu ve ark., 2014). Wu ve ark. (2015) TALEN teknolojisi ile insan SP110 genini sığır genomuna aktararak,

tüberküloza daha az duyarlı transgenik sığır elde etmişlerdir. Bir organizmadan bir organizmaya gen aktarım çalışmalarını ayrı tutarak, bu güne kadar çiftlik hayvanları üzerinde yapılan gen düzenleme araştırmaları Tablo 1’de özetlenmiştir.

Doğal olarak gen düzenleme ile gen aktarma çalışmalarını birbirinden ayrı tutmakta fayda vardır. Gen aktarma çalışmaları genomik ıslahın prensiplerinden biraz uzaklaşmaktadır. Genomik ıslahın temel ilkesine baktığımızda, DNA marker teknikleri kullanılarak önemli verim özelliğine sahip gen lokuslarının seçilmesine dayalı ilerleme anlamını taşımaktadır. Bu da seçilecek özelliğin zaten ırk içinde var olması demektir. Bu yöntem de başlangıçta var olmayan yeni bir özellik yaratılmaz. Örneğin, miyostatin geninin sığırlarda zaten doğal olarak mutantlara sahip olduğu bilinmektedir (McPherron ve ark., 1997). Bu genin mutasyonuna sahip bireylerde fazla miktarda kas gelişimi görülmektedir. Genom düzenlemeleri ile bu genin mutasyonları elde edilebilir. Öte yandan domuzlar miyostatin geninin mutantlarına sahip olmadıklarından, genomik ıslah ile mutant miyostatin genine sahip bireyler elde edemeyeceğimiz anlamı taşımaktadır (Ruan ve ark., 2017).

Sonuç

Transgenik hayvanların insan sağlığı açısından medikal alanda kullanım olanaklarının bile hala tartışmalı olduğu günümüzde, çiftlik hayvanlarında verimi artırmak, hastalıklara direnç sağlamak veya

hayvan refahı açısından ıslah programlarına genom düzenlemenin bütünleşmesi durumunda ise daha fazla tartışmanın olması demektir. Ancak artan dünya nüfusu göz önüne alındığında mevcut ıslah programlarının yeterli gelmediği de açıktır. Şöyle ki, mevcut kullanılan ıslah programları verim miktarını, hayvan ve ürün kalitesini artırmaktadır, fakat uygulanmakta olan bu programlar hem yavaş hem de pahalı metotlar olmalarıyla birlikte kesinlikleri de olmayabilmektedir. Genom düzenleme teknikleri geleneksel ıslah yöntemlerine dahil edilirse, hızlı, kesin ve daha az maliyetli sonuçlar ortaya çıkarıp ekonomik anlamda yetiştiriciye daha fazla kazanç sağlayacaktır.

Genom düzenleme tekniklerinin ıslahın bir parçası olabilmesi için, en önemli nokta genetik dar boğazları önlemek adına birden fazla kurucu bireylere, hatta hatlara uygulanması olacaktır. İyi tasarlanmış hayvan yetiştirme programlarında her yeni nesil bir öncekinden daha üstün nitelikte olduğu prensibiyle, bu genomik düzenlemelerin de ebeveynler ve sonraki generasyonda doğarlarda (örneğin yapay tohumlama programlarına katılacak olan bütün yavrulara) uygulanması gerekmektedir (Van Eenenaam, 2017).

Genom düzenleme, istenmeyen özelliklerin baskılandığı, arzu edilenler için ise allellerin kesin olarak genoma nakledilebildiği veya değişikliğe uğratılabildiği, organizma genomunda genetik değişimler yaparak hangi açıdan bakarsak bakalım faydalı fırsatlar ortaya koymaktadır. Yetiştirme programları için tüm dünyada yetiştiricilerin talep

ettikleri verim artışı, daha kaliteli ürün ya da hastalık, kuraklık, hava değişkenliği, gibi sorunlar veya hayvansal endüstrinin sebep olduğu sera gazı etkisinin azaltılması, alerjenlerin uzaklaştırılması, gıda atıklarının azaltılması gibi tüketici özelliklerine göre genom düzenleme ile ıslah programlarının tasarlanması mümkün olacaktır.

Sonuç itibariyle hayvan ıslahında gerçek anlamda en iyiye ulaşmak için çok yönlü birçok unsurun birlikte uyum içinde çalışması gerekmektedir. Bu bağlamda yetiştirici birliklerinin bir araya gelmesi, ıslah hedeflerinin ortaya konulması, performans kayıtlarının tutulması, döl kontrolü testleri ile ayrıca ilerleyen teknolojiyle birlikte yapay tohumlama, embriyo transferi ile genomik seleksiyonun ıslah programını tamamlayıcı unsurları olduğunu kabul edilmesi zorunlu hale gelmiştir. Genom düzenlemelerinin istenen özellikleri taşıyan allellerin ortaya çıkarılmasıyla veya istenmeyenlerin susturulmasıyla, hayvancılığı iyileştirmek ve geliştirmek adına faydalı yepyeni genetik çeşitlilik ortaya koyacağı düşünülmektedir. Ayrıca genom düzenleme sayesinde hayvanlardan elde edilen verim miktarının artırılması, hayvan sağlığı açısından hastalıklara dirençli ırkların geliştirilmesi ve hayvan refahı açısından daha iyi bakım koşullarının sağlanması adına büyük kazanımlar sağlanacaktır. Bu kazanımlarla beraber genetik iyileştirmenin amaçları doğrultusunda genom düzenleme uygulamaları geliştirildiğinde ve uygulandığında, genomik ıslah ile genom düzenleme ortak paydada buluşturulmuş olacaktır.

Kaynaklar

- Akbudak, M.A., Kontbay, K., 2017. Yeni Nesil Genom Düzenleme Teknikleri: ZFN, TALEN, CRISPR'lar ve Bitkilerde Kullanımı. Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi, 26(1), 111–111.
- Anonim, 2010. Veteriner Hizmetleri, Bitki Sağlığı, Gıda ve Yem Kanunu. 13.06.2010 tarih ve 27610 sayılı Resmi Gazete.
- Bevacqua, R.J., Fernandez-Martín, R., Savy, V., Canel, N.G., Gismondi, M.I., Kues, W.A., Carlson D.F., Fahrenkrug, S.C., Niemann, H., Taboga, O.A., Ferrais, S., Salamone, D.F., 2016. Efficient edition of the bovine PRNP prion gene in somatic cells and IVF embryos using the CRISPR/Cas9 system. Theriogenology, 86(8), 1886–1896.
- Bhat, S.A., Malik, A.A., Ahmad, S.M., Shah, R.A., Ganai, N.A., Shafi, S.S., & Shabir, N., 2017. Advances in genome editing for improved animal breeding: A review. Veterinary World, 10(11), 1361–1366.
- Bibikova, M., Beumer, K., Trautman, J.K. & Carroll, D., 2003. Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. Science 300, 764.
- Carlson, D.F., Lancto C.A., Zang B., Kim E.S., Walton M., Oldeschulte D., Seabury C., Sonstegard T.S., Fahrenkrug S.C., 2016. Production of hornless dairy cattle from genome edited cell lines. Nat

- Biotechnol 34: 479–481.
- Cho, S.W., Kim S., Kim J.M. 2013. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nature Biotechnology*, 31(3): 230-232.
- Cong, L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., Zhang F., 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339:819–823
- Crispo, M., Mulet A.P., Tesson L., Barrera N., Cuadro F., dos Santos-Neto P.C., Nguyen T.H., Creneguy A., Brusselle L., Anegon I., 2015. Efficient generation of myostatin knock-out sheep using CRISPR/Cas9 technology and microinjection into zygotes. *PLOS ONE*, DOI:10.1371/journal.pone.013669 0 August 25, 2015
- Dimitrov, L., Pedersen D., Ching K.H., Yi H., Collarini E.J., Izquierdo S., van de Lavoie M-C., Leighton P.A., 2016. Germline gene editing in chickens by efficient CRISPR-mediated homologous recombination in primordial germ cells. *PLOS ONE*, :e0154303.
- Eriksson, S., Jonas E., Rydhmer L., Röcklinsberg H., 2018. Invited review: Breeding and ethical perspectives on genetically modified and genome edited cattle. *Journal of Dairy Science*, 101(1), 1–17.
- Gao, Y., Wu, H., Wang, Y., Liu, X., Chen, L., Li, Q., Cui, C., Liu, X., Zhang, J., Zhang, Y., 2017. Single Cas9 nickase induced generation of NRAMP1 knockin cattle with reduced off-target effects. *Genome Biology*, 18(1), 1–15.
- Hai, T., Teng F., Guo R., Li W., Zhou, Q., 2014. One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system. *Cell Res* 24:372–375.
- Hatada, I., 2017. *Genome Editing in Animals*. Vol. 1630. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7128-2>
- Ishino, Y., Krupovic, M., & Forterre, P., 2018. History of CRISPR-Cas from encounter with a mysterious repeated sequence to genome editing technology. *Journal of Bacteriology*, 200 (7): 1-17.
- 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*, 337:816–821.
- Kambadur, R., Sharma, M., Smith, T.P.L., Bass, J.J., 1997. Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Research*, 7(9), 910–916.
- Kim, Y.G., Cha J., Chandrasegaran, S., 1996. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(3):1156–1160
- Lamb, B.M., Mercer, A.C., & Barbas, C.F., 2013. Directed evolution of the TALE N-terminal domain for recognition of all 5' bases. *Nucleic Acids Research*, 41(21), 9779–9785.

- Lee, K., Kwon D.N., Ezashi T., Choi Y.J., Park C., Ericsson A.C., Brown A.N., Samuel M.S., Park K.W., Walters E.M., Kim D.Y., Kim J.H., Franklin C.L., Murphy C.N., Roberts R.M., Prather R.S., Kim J.H., 2014. Engraftment of human iPS cells and allogeneic porcine cells into pigs with inactivated RAG2 and accompanying severe combined immunodeficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:7260–7265
- Lillico, S.G., Proudfoot, C., Carlson, D.F., Stverakova, D., Neil, C., Blain, C., King, T.J., Ritchie, W.A., Tan, W., Mileham, A.J., McLaren, D.G., Fahrenkrug, S.C., Whitelaw, C.B.A., 2013. Live pigs produced from genome edited zygotes. *Scientific Reports*, 3, 10–13.
- Liu, X., Wang Y., Guo W., Chang B., Liu J., Guo Z., Quan F., Zhang Y., 2013. Zinc-finger nickase-mediated insertion of the lysostaphin gene into the beta-casein locus in cloned cows. *Nat Commun* 4:2565.
- Luo, J., Song, Z., Yu, S., Cui, D., Wang, B., Ding, F., Li, N., 2014. Efficient generation of myostatin (MSTN) biallelic mutations in cattle using zinc finger nucleases. *PLoS ONE*, 9(4).
- Mackay, T.F.C. 2004. The genetic architecture of quantitative traits: Lessons from *Drosophila*. *Curr Opin. Genet. Dev.* 14:253–257.
- McPherron, A.C., Lawler A.M., Lee S.J., 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature*,1;387(6628):83-90.
- Nemudryi, A.A., Valetdinova, K.R., Medvedev, S.P., Zakian, S.M., 2014. TALEN and CRISPR / Cas Genome Editing Systems : Tools of Discovery. *Acta Naturae*, 6(22), 19–40.
- Ni, W., Qiao, J., Hu, S., Zhao, X., Regouski, M., Yang, M., Chen, C., 2014. Efficient gene knockout in goats using CRISPR/Cas9 system. *PLoS ONE*, 9(9), 1–8.
- Oldenbroek, K., 2014. Textbook Animal Breeding and Genetics For BSc Students, Wageningen University and Research Centre, Netherlands. pp:21-40.
- Ota, Y., Saitoh, Y., Suzuki, S., Ozawa, K., Kawano, M., Imamura, T., 2002. Fibroblast growth factor 5 inhibits hair growth by blocking dermal papilla cell activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 290(1), 169–176.
- Özbey, G., Kalender, H., Muz, A., 2008. Sığır Tüberkülozu'nun Epidemiyolojisi ve Teşhisi. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 22, 307-314.
- Park, T.S., Lee H.J., Kim K.H., Kim J-S., Han J.Y., 2014. Targeted gene knockout in chickens mediated by TALENs. *Proc Natl Acad Sci*,111:12716-12721.
- Proudfoot, C., Carlson, D.F., Huddart, R., Long, C. R., Pryor, J.H., King, T.J., Fahrenkrug, S.C., 2015. Genome edited sheep and cattle. *Transgenic Research*, 24(1), 147–153.

- Qian, L., Tang M., Yang J., Wang Q., Cai C., Jiang S., Li H., Jiang, K., Gao P., Ma, D., Chen, Y., An X., Li K., Cui, W., 2015. Targeted mutations in myostatin by zinc-finger nucleases result in double-muscled phenotype in Meishan pigs. *Sci Rep* 5:14435.
- Ruan, J., Xu, J., Yanru, R., Li C.K., 2017. Genome editing in livestock: Are we ready for a revolution in animal breeding industry? *Transgenic Research*, 26(6), 715–726.
- Sato, M., Miyoshi K., Nagao, Y., Nishi Y., Ohtsuka, M., Nakamura, S., Sakurai, T., Watanabe, S., 2014. The combinational use of CRISPR/Cas9-based gene editing and targeted toxin technology enables efficient biallelic knockout of the alpha-1,3-galactosyltransferase gene in porcine embryonic fibroblasts. *Xenotransplantation*, 21:291–300.
- Sert, F., 2017. Genetik Cerrahi (DNA Ameliyatı) CRISPR-Cas9 Sistemi. *Bezelye Popüler Genetik Bilim Dergisi*, 2:20-21.
- Şentürk, B., 2015. Türkiye’de Salgın Hayvan Hastalık Sorunu ve Yeni Model Önerileri, *Harran Üniv Vet Fak Derg*, 4(1) 27-29.
- Tan, W., Proudfoot, C., Lilloco, S.G., Whitelaw, C.B.A., 2016. Gene targeting, genome editing: From Dolly to editors. *Transgenic Res*. 25:273–287.
- Van Eenennaam, A.L., 2017. Genetic modification of food animals. *Current Opinion in Biotechnology*, 44, 27–34.
- Wang, X., Yu, H., Lei, A., Zhou, J., Zeng, W., Zhu, H., Dong, Z., Niu, Y., Shi, B., Cai, B., Liu, J., Huang, S., Yan, H., Zhao, X., Zhou, G., He, X., Chen, X., Yang, Y., Jiang, Y., Shi, L., Tian, X., Wang, Y., Ma, B., Huang, X., Qu, L., Chen, Y., 2015a. Generation of gene-modified goats targeting MSTN and FGF5 via zygote injection of CRISPR/Cas9 system. *Scientific Reports*, 5(September), 1–9.
- Wang, K., Ouyang, H., Xie, Z., Yao, C., Guo, N., Li, M., Jiao, H., Pang, D., 2015b. Efficient generation of myostatin mutations in pigs using the CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep* 5:16623.
- Wang, X., Cai, B., Zhou, J., Zhu, H., Niu, Y., Ma, B., Yu, H., Lei, A., Yan, H., Shen, Q., Shi, L., Zhao, X., Hua, J., Huang, X., Qu, L., Chen, Y., 2016. Disruption of FGF5 in cashmere goats using CRISPR/Cas9 results in more secondary hair follicles and longer fibers. *PLoS ONE*, 11(10), 1–13.
- 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, 1–12.
- Whitworth, K.M., Prather, R.S., 2017. Gene editing as applied to prevention of reproductive porcine reproductive and respiratory syndrome. *Mol Reprod Dev*, 84:926-933.
- Whitworth, K.M., Lee, K., Benne, J.A., Beaton, B.P., Spate, L.D.,

- Murphy, S.L., Samuel, M.S., Mao, J., O’Gorman, C., Walters, E.M., Murphy, C.N., Driver, J., Mileham, A., McLaren, D., Wells K.D., Prather, R.S., 2014. Use of the CRISPR/Cas9 system to produce genetically engineered pigs from in vitro-derived oocytes and embryos. *Biology of Reproduction*, 91(3), 78.
- Wijshake, T., Baker, D.J., & van de Sluis, B., 2014. Endonucleases: New tools to edit the mouse genome. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1842(10), 1942–1950.
- Wood, R.J., 1973. Robert Bakewell (1725–1795), pioneer animal breeder, and his influence on Charles Darwin. *Folia Mendeliana* 58:231–242.
- Wu, H., Wang, Y., Zhang, Y., Yang, M., Lv J., Liu, J., Zhang, Y., 2015. TALE nickase-mediated SP110 knockin endows cattle with increased resistance to tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 112:E1530–E1539.
- Yao, J., Huang, J., Hai, T., Wang, X., Qin G., Zhang, H., Wu, R., Cao, C., Xi J.J., Yuan, Z., Zhao, J., 2014. Efficient bi-allelic gene knockout and site-specific knock-in mediated by TALENs in pigs. *Sci Rep* 4:6926.
- Yu, S., Luo, J., Song, Z., Ding, F., Dai, Y., Li, N., 2011. Highly efficient modification of beta-lactoglobulin (BLG) gene via zinc-finger nucleases in cattle. *Cell Research*, 21(11), 1638–1640.