



**KOYUNLARDA CRISPR-CAS9 YÖNTEMİ
KULLANILARAK VERİM ARTIRMA
OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI**

Enver SEÇER
Yüksek Lisans Tezi
Danışman: Prof. Dr. Metin ERDOĞAN
Tez No: 2022-042
Afyonkarahisar



**T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
MEDİKAL BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KOYUNLARDA CRISPR-CAS9 YÖNTEMİ KULLANILARAK
VERİM ARTIRMA OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Enver SEÇER**

**Danışman
Prof. Dr. Metin ERDOĞAN**

Tez No:2022-042

AFYONKARAHİSAR

**Bu tez çalışması; Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Proje Araştırmaları
Koordinasyon Birimi (BAPK) Tarafından Desteklenmiştir. Proje No:
“21.SAĞ.BİL.06”**

KABUL VE ONAY SAYFASI

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Medikal Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**'nda Enver SEÇER tarafından hazırlanan “**Koyunlarda Crispr-Cas9 Yöntemi Kullanılarak Verim Artırma Olanaklarının Araştırılması**” başlıklı tez çalışması Afyon Kocatepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca .../.../..... tarihinde aşağıdaki jüriler tarafından **oy birliği / oy çokluğu ile YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan

.....

İmza

Üye

.....

İmza

Üye

.....

İmza

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

...../...../..... tarih ve sayılı kararıyla

onaylanmıştır.

Prof. Dr. Esmâ KOZAN

Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bilimsel Yayın Etiği İlkeleri ve Tez Yazım

Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğime,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Afyon Kocatepe Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,

beyan ederim.

.../.../.....

İmza

Enver SEÇER

ÖZET

KOYUNLARDA CRISPR-CAS9 YÖNTEMİ KULLANILARAK VERİM ARTIRMA OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI

Kümelenmiş Düzenli Aralıklı Kısa Palindromik Tekrarlar (CRISPR)/Cas9 teknolojisi, özellikle biyomedikal araştırmalarda olmak üzere çok sayıda uygulamaya sahip, kolay erişilebilir, programlanabilir ve hassas bir gen düzenleme aracıdır. Bu genom düzenleme sistemi, bakterilerde doğal olarak oluşan bir bağışıklık sisteminden elde edilmektedir. Ancak, son dönemde ökaryotik hücrelerde de genom düzenleme amacıyla kullanılmaya başlanmıştır. CRISPR/ Cas9 genom düzenleme yöntemini kullanarak hayvanlarda verimini artırmak amacıyla kullanılabilir. Koyunlarda et, süt ve döl verimini etkileyen bazı genleri düzenleyerek, verimliliğin artırılması ve ıslah çalışmalarında kullanılabilirliği mümkün hale gelmiştir. Bu çalışmada, koyunlarda ve diğer hayvanlarda kaslarda artış sağlayarak et verimini etkileyen *MSTN* genini knock-out etmek amaçlanmıştır. Çalışmada koyun oositleri kullanılmış ve mikroyenjeksiyon ile gen CRISPR/Cas9 yöntemi uygulanmıştır. Sekans analizleri sonucu *MSTN* geninin knock-out edilebildiği gözlemlenmiştir. Özellikle nüfusun giderek arttığı ve gıda sektöründe kısıtlılıkların yaşandığı dönemlerde, hayvansal gıdaların yeterliliği önem taşımaktadır. Türkiye’de yetiştirilen yerli koyun ırklarının genetik yapısını bozmadan et verimlerinin artırılması, birim koyun başına verimin artırılması ve et açığının kapatılması bakımından yapılan bu çalışma önem taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: CRISPR, Cas9, *MSTN*, Koyun

SUMMARY

INVESTIGATION OF YIELD IMPROVEMENT POSSIBILITIES IN SHEEP USING THE CRISPR-CAS9 METHOD

Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/cas9 technology is an easily accessible, programmable and precision gene editing tool that has a great number of applications, especially in biomedical research. This genome editing system, is obtained from the immune system that naturally occurring in bacteria. However, it has recently been used for genome editing in eukaryotic cells as well. It can be use to increase efficiency in animals using the CRISPR/Cas9 genome editing method. With the help of editing some genes that affect meat, milk and fertility in sheep, it has become possible to increase productivity and usability in reclamation works. In this study, it is aimed to “knock-out” the *MSTN* gene, which affects meat yield by increasing muscle in sheep and other animals. In the study, sheep oocytes were used and gene CRISPR/Cas9 method was applied by microinjection. After the sequence analysis result, it has been observed that the *MSTN* gene can be knocked out. The adequacy of foods of animal origin is essential matter, especially in times of increasing population and experiencing constraints in the food sector. This study is important in terms of increasing meat yields, increasing the yield per unit sheep and closing the meat deficit without disturbing the genetic structure of domestic sheep breeds bred in Turkey.

Keywords: CRISPR, Cas9, *MSTN*, Sheep.

ÖNSÖZ

Gelişen dünya sektöründe ve yaşanan iklim değişikliğinde dünyada gıda sektöründe bir azalma beklenmektedir. Bu nedenle et ve süt olmak üzere temel gıdalarımızdan maksimum verim alma mecburiyetindeyiz. Bu tez Crispr-Cas9 yöntemini kullanarak et üretiminin büyük bir kaynağı olan koyunlarda *MSTN* genini susturarak daha yüksek kapasite de et üretilmesini sağlamak amacıyla planlanmıştır.

Tezim de danışmanım olan bana yol gösteren ve verdiği bilgilerle doğru sonuçlar almama sebep olan değerli hocam Prof. Dr. Metin ERDOĞAN'a ve bu süreçte yer alan saygıdeğer öğretim üyelerimiz Prof. Dr. Cevdet UĞUZ, Prof. Dr. Mine DOSAY ve Dr. Öğretim Üyesi Ömer Faruk Lenger'e teşekkür ederim. Deneylerimin ilerlemesinde ve karşılaştığım problemleri aşmamda emeği geçen çalışma ekibim Mstlab Biyoteknoloji ailesine, Bursa Uludağ Üniversitesi öğretim üyesi Prof. Dr. Hakan SAĞIRKAYA ve Prof. Dr. Mustafa TEKERLİ'ye teşekkürü bir borç bilirim. Tez çalışma sürecimde finansal olarak destek sağlayan Afyon Kocatepe Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimine de teşekkür ederim. Her daim yanımda olan, hayatta ki tüm konularda olduğu gibi tezimde de en büyük destekçim, hayat arkadaşım Merve Nur Şahan SEÇER ve bu süreçte yaşamımıza katılmış biricik kızım Doğa SEÇER'e en içten duygularla teşekkür ederim.

Enver SEÇER

Afyonkarahisar

2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET	I
SUMMARY	II
ÖNSÖZ	III
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VII
RESİMLER DİZİNİ.....	IX
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Miyostatin Geni	1
1.1.1.Miyostatin Geninin Koyunlardaki Önemi.....	3
1.2.Genetik Manipülasyon.....	4
1.2.1.CRISPR Gen Terapisinin Verilmesi	8
1.3.CRISPR Sistemi.....	10
1.3.1.CRISPR Sisteminin Mekanizması	13
1.4.Gen Transfer Yöntemleri	15
1.4.1.Elektroporasyon	18
1.4.2.Hidrodinamik Gen Transfeksiyonu.....	19
1.4.3.Gen Tabancası Aracılığıyla Parçacık Bombardımanı	20
1.4.4.Mikroenjeksiyon.....	21
1.4.5.Sonoporasyon (Ultrason) Aracılı Gen Transfeksiyonu	22
1.4.6.İyontoforez	23
2. MATERYAL METOT	24
2.1 Oositlerin Elde Edilmesi ve Olgunlaştırılması	24
2.2 Oositlerin Fertilizasyonu ve Zigotların Kültürü	24
2.3.Cas9 mRNA ve sgRNA üretimi.....	25
2.4 Zigotların Kültürü	27
2.5 DNA İzolasyonu	27
2.6 DNA Miktarının Ölçülmesi	28
2.7 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	29
2.8 PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Kontrolü.....	30
2.8.1 Agaroz Jelin Hazırlanması.....	30
2.9 Dizileme Analizi	30

3. BULGULAR	33
3.1 Cas9 mRNA ve sgRNA Üretimi.....	30
3.2 Yumurtalara sgRNA Verilmesi.....	30
3.3 DNA izolasyonu	30
3.4 PCR Ürünlerinin AgaroZ Jel Elektroforezi ile Kontrolü.....	30
3.5 Dizileme Analizi	30
4. TARTIŞMA.....	38
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	42
6. KAYNAKLAR.....	43
7. EKLER	54
7.1 Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı	54
8. ÖZGEÇMİŞ	55

SİMGELER VE KISALTMALAR

AAV: Adeno-iliskili vektör

BSA: Bovine Serum Albümin

Bç: Baz Çifti

CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats

crRNA: CRISPR RNA

dk: Dakika

FCS: Fluorescence Correlation Spectroscopy

gRNA: Guide RNA

mg: Miligram

mL: Mililitre

mM: Milimolar

mRNA: Mesajcı RNA

MSTN: Miyostatin

µg: Mikrogram

µL: Mikrolitre

ng: Nanogram

°C: Santigrat Derece

OTE: Potential of target effect

PBS: Phosphate buffered saline

PCR: Polimeraz Chain Reaction

sgRNA: Single Guide RNA

sn: Saniye

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

SOF: Synthetic Oviductal Fluid

TBE: Tris-Borat-EDTA

TE Buffer: Tris EDTA

tracrRNA: Trans Activating crRNA

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1: Miyoblast proliferasyonu ve farklılaşması sırasında myostatin etkisi	1
Şekil 1.2: Gen düzenleme teknolojilerinde kullanılan dört endonükleazın şematik diyagramı	6
Şekil 1.3: CRISPR terapisinin uygulanmasının şematik gösterimi	10
Şekil 1.4: CRISPR sisteminin tarihsel gelişimi.....	12
Şekil 1.5: CRISPR/Cas bakteriyel adaptif bağışıklık sisteminin üç aşaması: adaptasyon, crRNA biyogenezi ve viral DNA'nın etkileşimi.....	14
Şekil 1.6: Elektroporasyon yöntemi uygulaması şematik görüntüsü	19
Şekil 1.7: Gen tabancası yöntemi uygulaması şematik görüntüsü	21
Şekil 1.8: Mikroenjeksiyon yöntemi uygulaması şematik görüntüsü	22

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1: Gen transfer yöntemleri karşılaştırması	17
Çizelge 2.1: Cas9 nükleaz bileşeninin içerik listesi	25
Çizelge 2.2: gRNA PCR reaksiyonu	26
Çizelge 2.3: gRNA PCR reaksiyon koşulları	26
Çizelge 2.4: <i>MSTN</i> genini içeren hedef dizi	26
Çizelge 2.5: <i>MSTN</i> geni için tasarlanan primer dizileri	26
Çizelge 2.6: <i>MSTN</i> geni için referans sekans ve çerçeve kaydırma frekans oranı	27
Çizelge 2.7: <i>MSTN</i> genine ait PCR reaksiyon koşulları	29
Çizelge 2.8: <i>MSTN</i> gen bölgesine ait Sekans PCR reaksiyonu	31
Çizelge 2.9: DNA dizileme analizi PCR koşulları	31

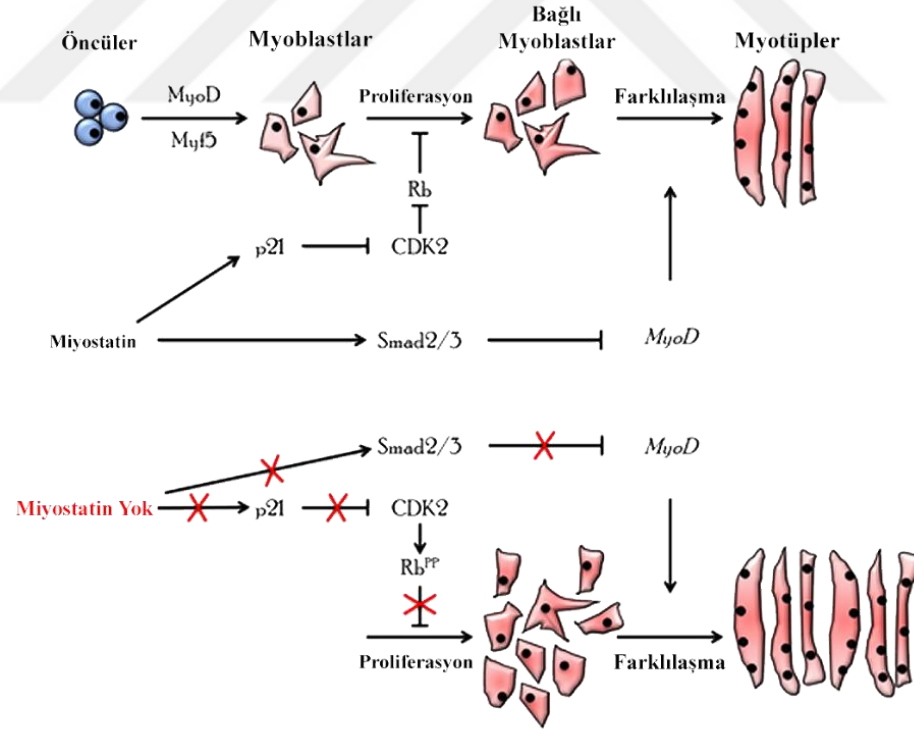
RESİMLER DİZİNİ

Resim 3.1: sgRNA miktarının Nanodrop Spektrometre ölçüm sonuçları	33
Resim 3.2: Mikroenjeksiyon iğnesi ile yumurtalara boşlukların açılması	34
Resim 3.3: DNA miktarlarının nanodrop spektrometre ölçümü	34
Resim 3.4: PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile doğrulanması.....	35
Resim 3.5: Delesyon meydana gelmiş olan 48 numaralı örneğin sekans sonuçları	36
Resim 3.6: 41 numaralı <i>MSTN</i> geni değiştirilmemiş örneğinin sekans sonuçları	36
Resim 3.7: 48 numaralı örneğinin değiştirilen <i>MSTN</i> gen bölgesinin alignment sonuçları	37
Resim 3.8: Değişim olmamış <i>MSTN</i> geninin alignment sonuçları	37

1.GİRİŞ

1.1 Miyostatin Geni

Büyüme ve farklılaşma faktörü 8 (GDF8) olarak da bilinen miyostatin (*MSTN*), iskelet kası gelişiminin ana düzenleyicilerinden biridir. *MSTN* geni, memeli türleri arasında yüksek oranda korunmuştur ve kas boyutunu küçültmek için neredeyse benzersiz bir şekilde hareket etmektedir. *MSTN* eksikliği olan hayvanlarda, çift kaslanma (double muscling) olarak bilinen iskelet kası kütlesinde bir artış göstermektedir. *MSTN*'deki mutasyonlar, insanlarda olduğu gibi köpek, koyun, sığır, domuz dahil olmak üzere çok sayıda türde tanımlanmıştır. Miyostatin birçok dokuda (meme bezi dahil) eksprese edilmektedir, ancak en belirgin olarak iskelet kasında sentezlenmektedir. *MSTN* geni, evrim boyunca yüksek oranda korunmuştur ve üç ekson ile iki intron içermektedir (Aiello vd., 2018; Saitoh vd., 2020).



Şekil 1.1: Miyoblast proliferasyonu ve farklılaşması sırasında myostatin etkisi (Aiello vd., 2018).

Miyostatin, dönüştürücü büyüme faktörü (TGF- β) süper ailesinin bir üyesidir. Hayvan ve insan iskelet kası hücreleri tarafından ifade edilmekte ve kas büyümesini sınırlamakta ve protein yıkımını desteklemektedir. Transkripsiyonel ve epigenetik düzenleme ile hücre dışı bağlayıcı proteinlerin modülasyonu da dahil olmak üzere karmaşık mekanizmalardan etkilenmektedir. Kas atrofisi ve kaşeksiyi teşvik etmedeki rolünden dolayı, miyostatin, deneysel modellerde ve farklı kas kaybı koşullarından etkilenen hastalarda kas kütlesi kaybını önlemek için umut verici bir terapötik hedef olarak denenmektedir. Yapılan çalışmalar, miyostatinin iskelet kası büyümesini düzenlemenin ötesinde, obezite, insülin direnci, kardiyovasküler ve kronik böbrek hastalığı gibi birçok fizyolojik ve patolojik süreçte rol oynayabileceğini göstermektedir (Esposito vd., 2022; Hill vd., 2012; Monestier vd., 2012).

Diğer TGF- β süper aile üyelerine benzer şekilde miyostatin, salgılama için bir sinyal dizisi görevi gören hidrofobik amino asitlerin bir N-terminali (NH₂) çekirdeğini taşıyan bir öncü protein (375 amino asit) olarak sentezlenmektedir. Miyostatinin C-terminali (COOH) bölgesi, homodimerizasyon ve TGF- β süper aile üyelerinin ayırt edici bir özelliği olan "sistein düğümü" yapısının oluşumu için kullanılan dokuz korunmuş sistein amino asidine sahiptir. 52 kDa miyostatin öncü proteininin proteolitik işlenmesi, serin proteaz furin veya proprotein dönüştürücü ailesinin diğer üyelerinin etkisiyle RSRR bölgesindeki golgide meydana gelmektedir (Mosler vd., 2011; Sharma vd., 2015).

Miyostatin (*MSTN*), gelişmiş glikoz homeostazıyla bağlantılı fiziksel egzersiz gibi fizyolojik uyaranlara metabolik adaptasyonda rol oynar (Dutra vd., 2012).

Miyostatin, iskelet kası kütlesinin bilinen negatif düzenleyicisidir. İskelet kası katabolizması dönemlerinde miyostatin ekspresyonu artmakta ve bu da ubikuitin proteazom yolunun artan aktivitesi ile sonuçlanmaktadır. İskelet kası anabolizması dönemlerinde miyostatin, uydu hücre aktivasyonuna ve hipertrofi ile sonuçlanan nihai farklılaşmaya izin vererek azaltmaktadır. Bununla birlikte, son çalışmalar, miyostatinin yokluğunda hipertrofinin, uydu hücrelerinden çok az veya hiç girdi olmadan meydana gelebileceğini ve dolayısıyla yapısal kas lifi proteinlerinin sentezini ve dönüşümünü modüle ederek miyonükleer alanı artırabileceği bildirilmiştir (Dalbo vd., 2012; Lu vd., 2012).

MSTN'nin ifadesi kas fibrili tipine özgüdür ve en büyük *MSTN* miktarı, miyozin ağır zincir (MHC) tip IIB'den oluşan fiberde bulunmaktadır. *MSTN*, kas atrofisinde rol oynayan gen transkripsiyonunda bir artışa yol açan smad2/3'ü aktive etmek için aktivin reseptörü IIB üzerinden hareket etmektedir. Kas hipertrofisi, kalsiyuma bağımlı proteolitik sistem kalpainleri ve kalpastatin gibi proteolizin inhibisyonu ile Akt/mTOR/p70s6K yoluyla protein sentezinde artışa neden olan iki mekanizma sonucu şekillenmektedir (Hadj vd., 2012).

1.1.1.Miyostatin Geninin Koyunlardaki Önemi

Memelilerde, insan, keçi, koyun, domuz ve inek *MSTN* promotörlerinin dizi hizalaması, beş korunmuş diziyi ortaya çıkarmıştır. *MSTN* ekspresyonunun çeşitli fizyolojik koşullar altında düzenlenmesi kapsamlı bir şekilde incelenmiş ve daha yüksek omurgalılarla karşılaştırıldığında, teleostlarda *MSTN* promotörlerinin transkripsiyon düzenlemesi yeterince anlaşılmamıştır (Xue vd., 2012).

Miyostatinin kuzu ve koyunların üzerindeki etkileri kas kütlesini artırmaktadır. Yapılan çalışmalarda miyostatinin ekspresyonu azalan kuzu ve koyunlar da yağsız kas kütlesinin arttığı tespit edilmiştir. Haynes vd. (2013), Miyostatin g+6723G>A alleli olan kuzularda allelik durum ile miyostatin içeriği arasında ilişkisi incelenmiştir. Miyostatin (*MSTN*) g+6723G>A mutasyonuna sahip kuzuların daha büyük bir kas kütlesine sahip olduğu ve bunun miyostatin miktarındaki azalma ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Yapılan bir araştırmada (Hickford JG., 2009) Poll Dorset X Beyaz Suffolk koç (*MSTN* A/G), 35 White Suffolk X Border Leicester koyunuyla (*MSTN* A/G, n=21 ve *MSTN* G/G, n=14) çiftleştirilmiş ve bu çiftleştirme sonucu A/A (n=9), A/G (n=21) ve G/G (n=14) genotiplerine sahip 44 kuzu elde edilmiştir. Bir haftalık kuzulardan elde edilen kas örneklerinde miyostatin proteini düzeyi A/A ve A/G genotiplerinde G/G yapısındaki kuzulara kıyasla daha az olduğu bildirilmiştir. Miyostatinin plazmadaki düzeyinin genotipler arasında farklılık göstermediği ancak kuzuların yaşları ilerledikçe arttığı ifade edilmiştir. *MSTN* A/A genotipindeki kuzularının 12. ve 13. kaburga arasındaki belgözü kasının enine kesitinde daha fazla kas lifi (P=0.02) olduğu belirlenmiştir. Bilgisayarlı tomografi taraması sonucu A/A genotipindeki kuzuların G/G genotipindeki

kuzulardan daha fazla karkas ($P=0,002$), daha az yağ ($P=0,009$) ve daha düşük organ (kalp, karaciğer, dalak ve böbrekler) kütlesine sahip olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışma sonucu, *MSTN* g+6723G>A mutasyonu bakımından homozigot kuzuların karkas özelliklerinde, organ ağırlıklarında ve kas lifi sayısında değişiklikler olduğunu göstermektedir (Hickford JG., 2009)

Koyunlarda miyostatin etkilerini incelemek için yapılan bir diğer çalışmada (Tang vd. 2012), *MSTN* gen ekspresyonunun genetik manipülasyon ile kontrol edilmesi, koyunlarda kas büyümesini ve et üretimini hızlandırabileceği üzerine kurgulanmıştır. Tang vd. (2012) yaptığı çalışmada, koyun *MSTN* genini hedef alan birkaç siRNA tasarlanmış ve bunların interferans etkinlikleri in vitro olarak değerlendirilmiş ve siRNA'lerden biri olan PSL1'in, *MSTN* ekspresyonunu önemli ölçüde aşağı (down) regüle edebildiği gösterilmiştir. Tang vd. (2012) yaptığı bu çalışmada PSL1, bir siRNA ekspresyon lentivirüs vektörü oluşturmak için lentivirüs vektörü GP-Supersilencing'e bağlanmıştır. Fibroblast hücreleri, lentivirüs partikülleri ile enfekte edilmiş ve pozitif hücreler akış sitometrisi ile izole edilmiştir. Pozitif hücrenin çekirdeği, çekirdeksiz koyun oositlerine aktarılmıştır. Oositlerin mikroyeksiyonla enükleasyonundan sonra, yeniden yapılandırılmış embriyoların yaklaşık % 20'si morulalara dönüştürülerek bir floresan mikroskobu kullanılarak güçlü yeşil floresan gözlemlenmiştir. Bu yöntemin, transgenik hayvanlar için somatik hücre çekirdeği transferi için transgenik hücre dizisi üretmek için kullanılabileceği ifade edilmiştir (Tang vd. 2012).

Miyostatin geninin az üretilmesi koyun ve kuzular da yağsız kas miktarını arttırdığı tespit edilmiştir (Buehring ve Binkley, 2013). Bu genin çalışmasının yavaşlatılması veya durdurulması çiftlik hayvan üretimine de katkı sağlayabilir.

1.2. Genetik Manipülasyon

Gen düzenleme teknikleri, transgenik hayvanlar oluşturma, gen fonksiyonunu analiz etme, hastalık modelleri geliştirme veya ilaç geliştirme dahil olmak üzere çok çeşitli araştırmaları kapsamaktadır. Monoklonal antikorlar, enzimler ve büyüme hormonları gibi belirli proteinlerin taşınması, boyutları nedeniyle bazı engellerle karşılaşmaktadır.

Bu zorluklar, bilim insanlarını alternatif yaklaşımları keşfetmeye ve gen düzenlemede ilerlemelere yol açmaktadır. Farklı araştırmalar, canlı hücrelerin genetik yapısını değiştirebilecek yöntemler sunmaktadır (Yeo vd., 2018). Genom düzenleme stratejileri son otuz yılda gelişmiştir ve günümüzde bu alanda meganükleazlar, çinko parmak nükleazları, transkripsiyon aktivatörü benzeri efektör nükleazlar ve kümelenmiş düzenli aralıklı kısa palindromik tekrarlar (CRISPR)/CRISPR ile ilişkili protein 9 (Cas9) (CRISPR/Cas-9) sistemi gibi dört tip programlanabilir nükleaz bulunmaktadır (Long vd., 2016).

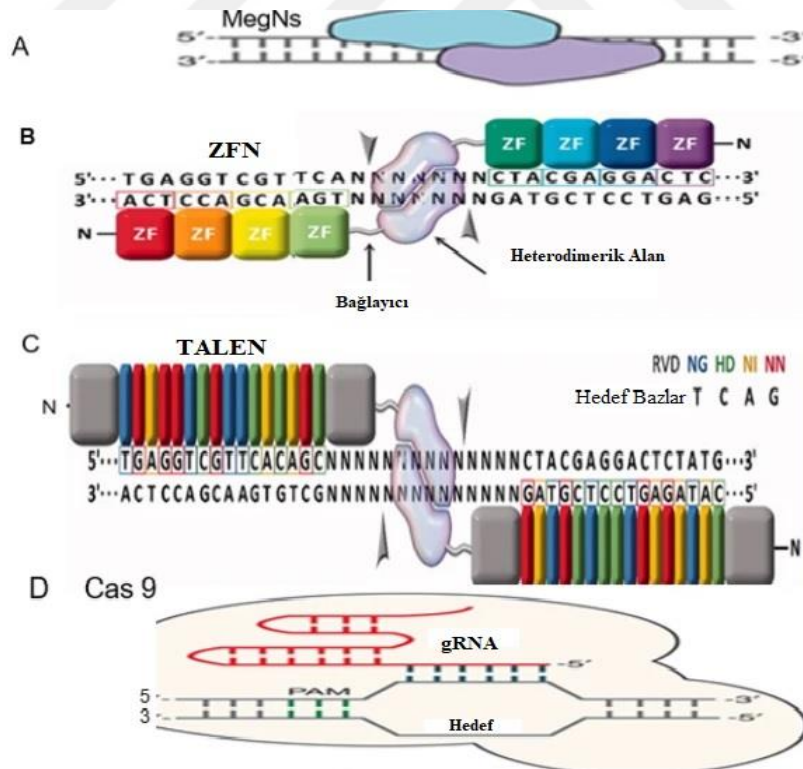
Her programlanabilir nükleazın kendine has özelliği bulunmaktadır. Bu da araştırmacılara geniş bir uygulama yelpazesi için gen düzenleme araçları için en uygun yöntemi seçmesine olanak sağlamaktadır (Khalil, 2020). Genom düzenleme/mühendislik teknolojisi, belirli bir özelliği değiştirmek için tam olarak manipüle edilen hücre veya organizma genomlarının oluşturulmasında devrim niteliği taşımaktadır (Yi ve Li 2016). Potansiyel uygulamalar, insan sağlığı ve tarım uygulamalarını içermektedir. Yapıların hedef hücre veya organizmaya sokulması, genom mühendisliğinde önemli bir adımlardandır.

Doğru ve verimli genom düzenleme, gen mühendisliği için çok önemlidir. Teknolojideki gelişmeler, genom modifikasyonunda yeni tekniklerin ortaya çıkmasına olanak sağlamaktadır. Genom düzenleme için en temel araçlar arasında transkripsiyon aktivatör benzeri efektör nükleazlar (TALEN'ler) ve çinko parmak nükleazları (ZFN'ler) gibi enzimler bulunmaktadır. Genom düzenleme araçları ortak bir özellik tarafından tanımlanmakta ve genomda istenen yerlere DNA çift zincir kırıkları (DSB'ler) eklemek için tasarlanabilir. DSB, hücrenin doğal DNA onarım mekanizmasını aktive etmektedir ve bu mekanizma, değişikliklerin genoma uygulanmasının etkinliğini arttırmak için kullanılabilir (Rodríguez vd., 2019). Kümelenmiş Kısa Palindromik Tekrarların Keşfi (CRISPR); ekzojen ve mobil genetik faktörlere karşı spesifik ve kazanılmış bağışıklık sağlayan adaptif bir prokaryotik bağışıklık sistemi (CRISPR-Cas) olarak tanımlanmaktadır (Janik vd., 2020).

Üç ana gen düzenleme tekniği, belirli DNA dizilerini tanıyan ve bunlara bağlanan molekülleri içermektedir. Araştırmacılar, hemen hemen her gende genetik ve epigenetik değişiklikleri yapabilmek için özel moleküller kullanabilmektedir (Cho vd., 2013). Bu

moleküller endonükleazlarla birleşerek homolog olmayan uç bağlantılar (NHEJ) kullanılarak onarılabilen DSB'ler üretebilir, bu da genellikle küçük rastgele indel mutasyonlarına veya DNA'nın her iki tarafında homolog bir donör DNA'nın varlığında HDR'lere neden olmaktadır. Bir bölünme bölgesi mevcutsa, hedef genin yeni veya onarılmış versiyonlarını oluşturmak için kullanılabilir. Bölgeye özgü DNA tanıma molekülü, gen ekspresyonunu yukarı veya aşağı regüle etmek için bir efektör molekül ile de birleştirilebilir (Rothschild, 2020).

Genom düzenleme araçları, genomun verimli ve hassas şekilde işlenmesini sağlar. Hayvanların genom modifikasyonunu geliştirme yeteneği, hastalık direncini, üretkenliği veya doğurganlığı iyileştirmenin yanı sıra yeni biyomedikal modeller oluşturmak için kullanılabilir (Carlson vd., 2012). Bugüne kadar, genom düzenleyici mRNA'nın çiftlik hayvanları zigotlarına doğrudan enjeksiyonu ile ilgili olarak, bu teknoloji, düzenlenmiş genomlara sahip domuzların üretilmesiyle sınırlı kalmıştır.



Şekil 1.2: Gen düzenleme teknolojilerinde kullanılan dört endonükleazın şematik diyagramı. (Khalil 2020)

Gen düzenleme teknolojilerinde kullanılan dört endonükleazdan Meganükleaz (MegN), genellikle DNA substratını bir homodimer olarak ayırmaktadır (Şekil 1.2-A). Çinko parmak nükleazında (ZFN), FokI bölünme alanı tarafından tanınan, kısa bir aralayıcı diziyi çevreleyen, iki çinko parmak monomerinden oluşan hedef bölgeleri tanımaktadır (Şekil 1.2-B). Transkripsiyon aktivatör benzeri efektör nükleaz (TALEN) iki monomerden oluşmakta ve DNA'yı kesmek için bir fokI nükleaz alanını çevreleyen hedef bölgeleri tanımaktadır (Şekil 1.2-C). CRISPR/Cas9 sisteminde ise, iki nükleaz alanına sahip bir Cas9 proteininden oluşmaktadır (Şekil 1.2-D).

Hastalık modellemeden tarımsal tedaviye kadar çok çeşitli gen düzenleme uygulamalarını yakalamak için, teknolojinin çeşitli yaklaşımlar kullanarak çok farklı türlere kolayca uygulanabilir olması gerekmektedir. TALEN yönteminde, mRNA'nın zigota enjeksiyonu ile transgenik sığır ve koyun üretebileceği gösterilmiştir. Ayrıca, yumurta toplama, in vitro fertilizasyon ve zigot mikroenjeksiyonunun belirtilen özellikte genetiği değiştirilmiş buzağların üretilmesine olanak sağlayan hayvancılık endüstrisinde gen düzenleme uygulaması için önemli bir yenilik içermektedir. Bu yenilik, gen susturma için somatik hücre nükleer transferine veya istenen allellerin hedef genetik çizgiye gen aktarımına pratik olarak bir alternatif sağlamaktadır (Proudfoot vd., 2015).

Çinko parmak nükleazları (ZFN'ler) ve transkripsiyon aktivatör benzeri efektör nükleazlar (TALEN), geçmişte birçok hücre hattını ve organizmayı modifiye etmek için kullanılmıştır (Wang vd., 2016). CRISPR/Cas teknolojisindeki en son gelişmeler, hedeflenen lokusların genom düzenlemesi için verimli bir araç sağlamaktadır. Bu sistem, aynı anda birkaç yeri değiştirme avantajına sahiptir. Spesifik genetik değişikliklere sahip koyunlar üremeye yardımcı olabilir (Niu vd., 2017).

CRISPR/Cas9 sisteminin geliştirilmesinin büyük bir bilimsel atılım olduğu ve gen düzenlemeyi daha erişilebilir hale getirdiği bildirilmektedir. TALEN'ler ve ZF'ler tarafından kullanılan protein güdümlü DNA bölünmesinden farklı olarak, CRISPR/Cas9, bölgeye özgü bir DSB'yi tanıtmak için küçük bir RNA'ya bağlanmaktadır (Jo vd., 2015). Endonükleaz Cas9'un DNA hedef dizisiyle eşleşmesi için 20 nükleotidlik bir kılavuz RNA'nın (sgRNA) ve hedef DNA ile baz çiftleri oluşturan bir protospacer contig DNA'nın varlığı gerekmektedir. Motif (PAM),

kullanılan Cas9 proteininin bakteri türlerine göre değişen tamamlayıcı bölgesine bitişik kısa bir DNA dizisidir. sgRNA'nın Cas9 nükleazını ilgili herhangi bir DNA dizisini hedeflemesi için yönlendirdiği bu iki yönlü sistem, ZF ve TALEN'i içeren zahmetli protein tasarım sürecinin yerini aldığı ifade edilmektedir (Jacinto vd., 2020).

Genom düzenleme hedefine ulaşmak için prokaryotların adaptif bağışıklık sistemini kullanan bir dizi yeni keşif, biyolojik bilimler üzerinde dönüştürücü bir etki yaratmaktadır. Kısa düzenli aralıklı palindromik tekrarların (CRISPR) ve CRISPR bağlayıcı proteinlerin (Cas) keşfi, dünya çapında binlerce laboratuvar da genetik araştırma uygulamalarını değiştirmiş ve gen tedavisine yaklaşım yeniden tanımlanmaktadır (Basu vd., 2015). Terapötik olarak transgenik viral vektörlere bağımlılık hem insersiyonel onkogeneze hem de immünojenik toksisiteye neden olabileceğinden, geleneksel gen tedavisi bazı endişeleri gündeme getirmektedir. Viral vektörler önemli bir dağıtım aracı olmaya devam ederken, CRISPR teknolojisi, bölgeye özgü gen düzenlemeye nispeten basit ve verimli bir alternatif sunarak geleneksel gen tedavisinin ortaya çıkardığı bir dizi endişeyi ortadan kaldırmaktadır. Avantajlarına rağmen, CRISPR/Cas9 yönteminin de dezavantajları bulunmaktadır (Salsman ve Dellaire 2017).

1.2.1.CRISPR Gen Tedavisinin Verilmesi

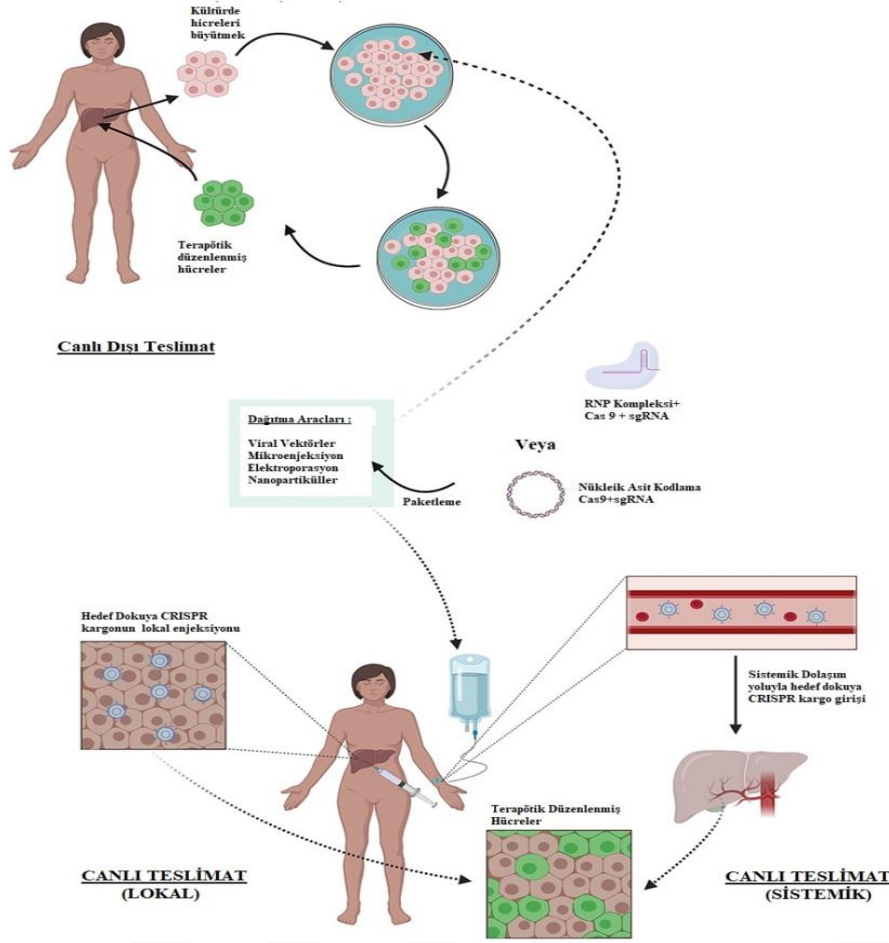
CRISPR araçlarının uygulanma şekli, güvenliklerini ve tedavinin etkinliğini büyük ölçüde etkilemektedir. Virüsleri kullanan geleneksel gen tedavisi yöntemleri, immünotoksisite ve istilacı kanser riski açısından araştırılmış olsa da, AAV vektörleri, CRISPR gen tedavisi için önemli bir dağıtım aracı olmaya devam etmektedir ve yüksek verimlilikleri nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. CRISPR uygulama seti, Cas9 ve gRNA dahil olmak üzere bileşenlerini kodlayan bir DNA plazmidi olarak paketlenir veya Cas9 mRNA ve gRNA olarak temin edilebilmektedir (Uddin vd., 2020).

CRISPR nükleik asitleri, elektroliz/nükleofeksiyon veya mikroyenjeksiyon yoluyla hedef hücrelere aktarılmakta veya bu amaçla AAV vektörlerine paketlenerek virüsle bağlantılı riskler önlenmektedir. Bununla birlikte, mikroyenjeksiyon teknik olarak zor

olsa da ve sadece ex-vivo uygulama için kullanılabilir. Elektromiyografi, yaygın olarak ex-vivo tercih edilmekle birlikte belirli hedef dokular için in-vivo olarak da kullanılabilir. Bununla birlikte, elektrik akımı ile hücre zarına nüfuz etmek için gereken yüksek voltaj şoku toksik olabilmekte ve tedavi edilen hücrelerin kalıcı olarak stabilizasyonuna yol açabilmektedir. Viral toksisiteye ek olarak, CRISPR bileşenlerinin AAV ile aktarımı, ekspresyonun uzun ömürlü olmasını sağlayarak daha yüksek OTE insidansı ile sonuçlanmaktadır. Ek olarak, Cas9 proteini ve gRNA'nın bir RNP kompleksi (sgRNA ribonükleoprotein) olarak teslimi, geçici ekspresyon ve hızlı hücre temizliği yoluyla düzenleyici verimliliği korurken OTE'yi azaltmaktadır (Uddin vd., 2020).

CRISPR/Cas9 düzenlemeleri, hücrelerin hastanın dışında genetik olarak değiştirilerek yeniden verildiği ex-vivo veya CRISPR bileşenlerinin doğrudan hücrelerin düzenlendiği hastaya iletilmesiyle in vivo olarak yapılmaktadır (Şekil 1.3). Her iki sistem de avantajları ve zorlukları ortaya bulunmaktadır (Bolotin vd., 2005). CRISPR/Cas9 veya RNP kompleksini kodlayan nükleik asitler, dağıtım araçlarına paketlenabilir. Ex-vivo düzenleme, hastadan hedef hücrelerin çıkarılmasını, hücre kültürünü ve in vitro genişletmeyi, istenen düzenlemeleri sağlamak için CRISPR bileşenlerinin verilmesini, düzenlenmiş hücrelerin seçilmesini, genişletilmesini ve son olarak da terapötik olarak düzenlenmiş hücrelerin hastaya yeniden verilmesini içermektedir. Canlılarda, CRISPR kargosu hastaya intravenöz infüzyonlar yoluyla sistemik olarak veya doğrudan hedef dokuya enjeksiyonlarla lokal olarak verilebilmektedir (Uddin vd., 2020).

Ex-vivo aktarımın, gen düzenleme aracına maruz kalmadıkları için düzenlenmiş hücrelere göre daha fazla güvenlik, teknik fizibilite ve daha sıkı kalite kontrolünü gibi avantajları bulunmaktadır. Bununla birlikte bu yaklaşım, kapsamlı genetik manipülasyon ve kültürden sonra hastanın dışındaki hücrelerin in vivo hayatta kalması ve fonksiyonel bakımı gibi zorlukları da içermektedir. Bunlara ilaveten, etkili bir engraftasyon için yeterli bir hücre kaynağı gerekmektedir. Hematopoietik kök ve progenitor hücreler (HSPC'ler) ile T hücreleri hematopoietik progenitor hücreler gibi kültürde hayatta kalabilen ve büyüeyen belirli hücre tipleri bu yöntemi sınırlandırmaktadır (Uddin vd., 2020).



Şekil 1.3: CRISPR terapisinin uygulanmasının şematik gösterimi (Uddin vd., 2020).

1.3. CRISPR Sistemi

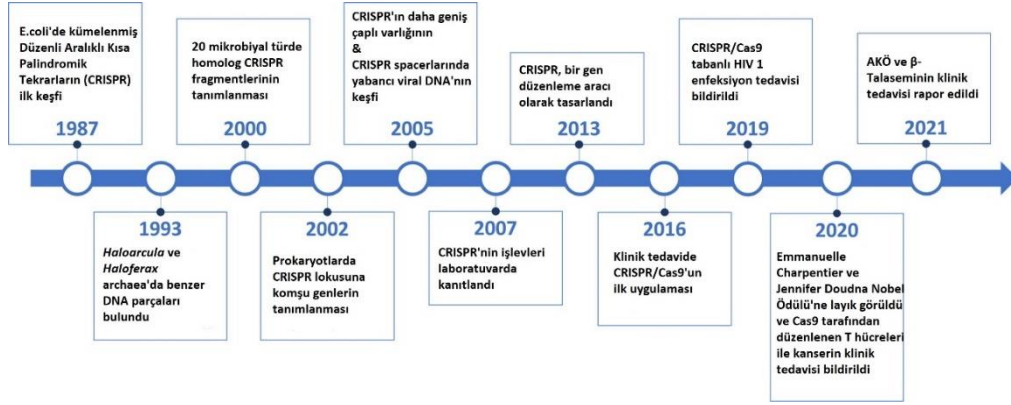
Genom düzenleme teknolojileri aracılığıyla meydana getirilen mutasyonlar ile doğal olarak meydana gelen genetik mutasyonlar ve varyasyonlar arasında herhangi bir fark bulunmadığından dolayı günümüzde bu teknolojilerin genom düzenleme amacıyla farklı alanlarda kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır.

Son yıllarda, yeni nesil genom düzenleme araçları olan ZNF, TALEN ve CRISPR/Cas sistemleri yaygın olarak kullanılan güçlü genom düzenleme teknolojileri olarak bilinmektedir. Bu teknolojiler arasında özellikle CRISPR/Cas (Düzenli Aralılarla Kümelenmiş Kısa Palindromik Tekrarlar/CRISPR İlişkili Proteinler) teknolojisi, ZNF ve TALEN'den farklı olarak basit olması, uygulanabilirliği, daha az zaman alması ve

uygun maliyeti sebebiyle ökaryotik genom düzenlemesine izin vermesi bakımından bu alanda devrim niteliği taşımaktadır (Topçu ve Duran, 2021).

Bakteriler ve çoğu arke tarafından kullanılan CRISPR/Cas9 sistemi, yabancı bir genetik materyalin tanınması ve RNA aracılı nükleazlar ile yüksek özgüllükle kesilmesine imkan veren, spesifik ve dış kaynaklı genetik elementlere karşı adaptif immünite sağlamaktadır. Böylelikle, bakteri ve arkeler kendi genomlarını yabancı genetik materyallere karşı koruyabilmektedir. Son zamanlarda CRISPR dizileri ve Cas proteinlerinin adaptif immünite haricinde hücre içerisinde farklı mekanizmalar ile gen ve genom düzenlemede aktif rol aldığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Gök ve Tunalı, 2016).

CRISPR/Cas9 sistemi, ilk olarak 1987 yılında, *Escherichia coli* bakterisinin genomunda keşfedilmiştir. CRISPR ifadesi *E. coli* genlerinde keşfedilen tekrarlayıcı olmayan DNA uzantılarıyla çevrili ardışık tekrarlar anlamını nitelerken, Cas9 ifadesi de CRISPR ile ilişkili DNA endonükleaz enzimlerini nitelemektedir. İlerleyen yıllarda bu tekrar dizileri farklı bakteri ve arkelerde de gözlemlenmiş, fakat bu dizilerin işlevleri, 2005 yılına kadar detaylı bir şekilde aydınlatılamamıştır (Gök ve Tunalı, 2016). Üç farklı araştırma ekibinin yaptığı çalışmalar sonucunda, CRISPR bölgesindeki tekrar sekanslarının bir bakteriyi önceden enfekte etmiş olan bakteriyofaj genomları ve plazmid dizileri ile büyük oranda aynı olduğu ortaya koyulmuştur. Yapılan bu gözlemler neticesinde, CRISPR dizilerinin aslında bakteri ve arkelerin, kendilerini virüs ve diğer parazitlerin sebep olduğu enfeksiyonlara karşı korumak için tasarlanmış nükleik asit tabanlı yeni bir immün sistemin parçası olabileceği fikrini meydana getirmiştir (Peter vd., 2015). Yapılan bir çalışmada *Streptococcus thermophilus* bakterisi farklı fajlar ile kültüre alınmış ve fajlara dirençli olan mutantları tespit etmişlerdir. Faja direnç gösteren *S. thermophilus* suşlarının DNA'sının CRISPR bölgesinin dizilenmesi sonucu bu bölgenin bakteriyi enfekte eden fajın DNA'sından gelen yeni aralıklı parçaları kapsadığı gösterilmiştir (Barrangou vd., 2007). Ayrıca, bu yeni aralıklı parçaların sayısının da bakterinin faja olan direnç derecesiyle ilişkili olduğu ortaya konulmuştur.



Şekil 1.4: CRISPR sisteminin tarihsel gelişimi.

CRISPR'ın bakteri bağışıklığındaki yeri yapılan çalışmalar ile kanıtlandıktan sonra 2010'da diğer işlevleri ve mekanizmaları da aydınlatılmaya başlanmıştır. Genom düzenleme çalışmaları araştırma safhasında olsa da, araştırmacılar birçok biyoteknoloji uygulamasında doğal olarak gerçekleşen CRISPR sisteminden faydalanmıştır (Horvath vd., 2008). CRISPR Tip II sisteminin, işlevsel mekanizmalarının gösterildiği iki çalışma ile genom düzenlemede kullanılabilecek basit bir yöntem olduğu gösterilmiştir (Hsu vd., 2014). İlk kez *S. thermophilus*'da Cas9'un Cas genlerindeki hedeflenen DNA bölgesinde kesim yapabilen tek enzim olduğunun ispatlanmasından sonra, Cas9 enziminin RNA hedeflemesinde yardımcı olan kodlayıcı olmayan tracrRNA (trans-aktif edici CRISPR RNA)'lar keşfedilmiştir. Cas9 ve endojen RNAaz III'ün birleşimi ile meydana gelen bu tracrRNA'lar, CRISPR dizilerinin olgun crRNA'ya transkripsiyonunda işlev görmektedir (Deltcheva vd. 2011). Cas9, olgun crRNA ve tracrRNA'lar CRISPR Tip II'nin üç ana elemanıdır.

CRISPR Tip II'nin taşınabilir bir sistem olduğunun gösterilmesinin ardından tip II bölgesi *E. coli*'ye aktarılmış ve böylece CRISPR sisteminin diğer bakteri suşlarında tekrar düzenlenebilir olduğu ispatlanmıştır (Sapranauskas vd., 2011). Bir çalışma ekibin 2012 yılına kadar yaptığı biyokimyasal deneyler sonucunda, iki farklı *Streptococcus* suşunun Cas9 enzimi, hedeflenen DNA bölgesinde in vitro kesim için crRNA tarafından yönlendirilebilmiştir (Jansen vd, 2002). Ayrıca, bu çalışmalar ile alınan sonuçların doğruluğu daha önce yapılan çalışmalar tarafından da desteklenmektedir (Deltcheva vd., 2011; Gasiunas vd., 2012).

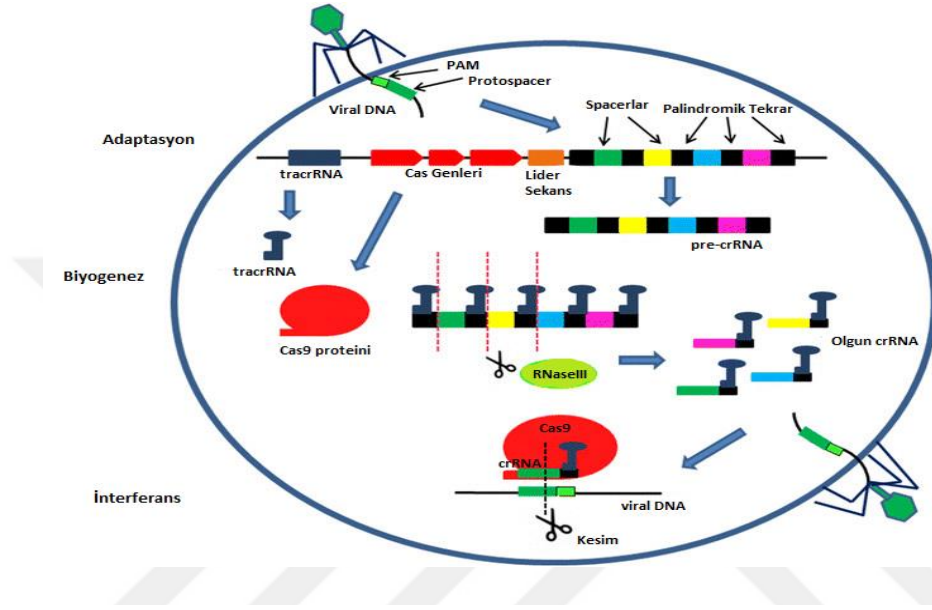
Yapılan bir başka çalışmalarda memeli hücrelerinde genom düzenlemesi amacıyla *S. thermophilus* ve *Streptococcus pyogenes* bakterilerinde CRISPR sistemi kusursuz bir şekilde yapılmasının ardından genom düzenlemede CRISPR/Cas9 sisteminin kullanımı yaygınlaşmıştır (Cong vd., 2013). Cas9 tabanlı bu sistemler birçok genom düzenleme uygulaması için yüzlerce laboratuvarında kullanılmaya başlanmış ve 2016 yılının başlarına kadar bu alanda çeşitli veri bankalarında çok sayıda çalışma yayınlanmıştır (Hsu vd., 2014). Günümüzde diğer genom düzenleme sistemlerine kıyasla spesifik ve kompleks protein mühendisliği olmadan klasik Watson-Crick baz eşleşmesi modeline göre çalışan bu sistemin etkinliği hakkında giderek artan bir yoğunlukta çalışılmaktadır (Wilkinson ve Wiedenheft, 2014).

1.3.1. CRISPR Sisteminin Mekanizması

CRISPR/Cas9 sisteminde ilk olarak, CRISPR dizisine eksojen bir gen entegre edilmektedir. Bu gen protospacer olarak adlandırılmaktadır. Fajdan konakçıya eksojen bir gen enjekte edildiğinde, birkaç DNA parçasına işlenmektedir. Bu, CRISPR sisteminde her yerde bulunan Cas1, Cas2 ve Csn2 proteinlerinin katılımını gerektirmektedir (Makarova vd., 2006). Protospacer'ler, bir CRISPR dizisi oluşturmak için tekrar dizileriyle çevrili yeni aralayıcılar olarak seçilmekte ve entegre edilmektedir. Protospacerlerin seçimi çoğunlukla, protospacer bitişik motifler (PAM) olarak adlandırılan ekzojen genom içindeki hedef dizilere bitişik olarak yerleştirilmiş kısa diziler tarafından belirlenmektedir (Mojica vd., 2009). PAM'ler, her bir CRISPR/Cas alt tipine özgüdür ve kendi kendine olmayan gen dizisinin bir sinyali olarak tanınmaktadır. Bu entegrasyon, eksojen genlerden gelen benzer saldırıları tanımanın bir yolunu sunmaktadır (Wu vd., 2020).

İkinci olarak, CRISPR lokusu bir tracrRNA-crRNA kompleksi üretmektedir. Tipik bir CRISPR lokusu, trans-aktif edici CRISPR RNA (tracrRNA) dizisinden, birkaç Cas geninden, bir lider diziden ve bir CRISPR dizisinden oluşmaktadır. CRISPR sistemi, CRISPR dizisindeki tekrar dizisini tamamlayıcı olan trans-aktif edici CRISPR RNA'yı (tracrRNA) kopyalamaktadır. Bu arada, CRISPR dizisi, eksojen gen içindeki hedef dizilere tamamlayıcı olan öncü crRNA (pre-crRNA) üretmek için dizileri

kopyalamakta ve aralamaktadır. Pre-crRNA, tracrRNA'yı birleştirmekte ve RNase III ile diğer nükleazlar tarafından işlenen olgun bir tracrRNA-crRNA kompleksi oluşturmaktadır (Marraffini ve Sontheimer, 2010). Bu kompleks, eksojen genlerin daha sonra tanınması ve bölünmesi için Cas9 proteini ile birleşmektedir.



Şekil 1.5: CRISPR/Cas bakteriyel adaptif bağışıklık sisteminin üç aşaması: Adaptasyon, crRNA biyogenez ve viral DNA'nın etkileşimi (Hryhorowicz vd., 2017).

Son olarak, CRISPR/Cas9 sistemi, ekzojen genomun saldırısına müdahale etmektedir (Jinek vd., 2012; Chylinski vd., 2013). Cas9 proteini, tracrRNA ve crRNA kombinasyonu ile nükleazları aktive etmektedir. Eksojen bir gen tekrar istila ettiğinde, Cas9 proteini, spesifik PAM'ları bulmak için eksojen geni taramaktadır. PAM'lar tanımlandığında, 20 nükleotidlik crRNA, spesifik hedef diziyi tanımak için aralayıcı diziyi kullanmakta ve çift sarmallı DNA ise PAM'lerin 3 nükleotid yukarı akışında ayrılmaktadır (Chen vd., 2014). Her iplikçik, ayrı bir Cas9 nükleaz alanı (HNH veya RuvC) tarafından bölünmektedir (Garneau vd., 2010). Bu olay, organizmaları eksojen genomun saldırısından korumakta ve ayrıca tipik CRISPR/Cas9 sistemi çift sarmallı DNA'da bir kırılma meydana getirdiğinden gen düzenlemesi için bir olanak vermektedir.

Ökaryotlar, hasarlı gen dizisi bölünmeden sonra homolojiye yönelik onarım (HDR) ve homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) ile onarılmaktadır. NHEJ, çoğu memeli hücresi ve dokusu için ana onarım yöntemidir. Bu onarım, hedef geni nakavt etme veya nakavt etme amacına ulaşmak için çerçeve kayması mutasyonuna ve gen fonksiyonunun kaybına neden olan bazı eklenmesine veya kaybolmasına neden olmaktadır (Jiang vd., 2017). HDR’de ise eksojen DNA donör şablonunun hedef bölge ile rekombinasyonu yoluyla ilgili genleri genoma sokulmaktadır (Zhang vd., 2020).

1.4.Gen Transfer Yöntemleri

Hücrelere gen transferi ve genom düzenleme mekanizmaları, uzun süredir mevcut biyoteknoloji ve moleküler biyoloji araştırmalarının odak noktası olmuştur. Son yirmi yılda, genomun yapısını araştırmayı hedefleyen ve genom parçalarının iletimini hedefleyen teknolojiler in vitro, in vivo ve klinik deneylerde etkili gen transfer metodlarının keşfi ile hızla ilerlemiştir. Bu yöntemler, çeşitli genetik hastalıkların tedavileri için geliştirilmekle birlikte, özellikle ıslah ve sentetik biyoloji alanlarında da önemli gelişmelere yol açmaktadır (Verma ve Somia, 1997). Gen transfer yöntemleri, hedeflenen hücreye özgü olan farklı geni, genleri veya gen düzenleme araçlarını hedef hücreye başarı ile taşıması gerekmektedir. Bunun yanında düzenleme araçlarının hücreler arası matriste bulunan nükleazlar ve bağışıklık hücrelerinin saldırılarından korunması ve taşıdığı paketi başarılı bir şekilde hedef hücre çekirdeğine aktarması gerekmektedir. Ayrıca gen transfer sistemi bu işlevleri başarı ile yerine getirirken hücre ve dokular ile yüksek uyumluluğa sahip olmalı ve minimum yan etkilerle görevini yerine getirebilmelidir (Takeshita ve Isner, 1999; Jinturkar vd., 2011).

Gen düzenleme sistemleri tedavi, ıslah ve sentetik biyoloji alanlarında büyük umutlar vadeden, moleküler biyoloji alanındaki gelişmeleri yakından ilgilendirmektedir. Bununla birlikte gen düzenleme mekanizmalarının ve genlerin başarılı bir şekilde iletilmesi için uygun gen transfer araçlarının geliştirilmesi araştırmacılar için zorlayıcı bir problem olmaya devam etmektedir. Tüm transfeksiyon uygulamaları öncesinde uygun hedefleme yeteneği ve yüksek transfeksiyon etkinliği olan güvenli gen düzenleme prosedürleri oluşturulması gerekmektedir (Hamann vd., 2019). Eksojen

DNA'nın in vitro veya in vivo olarak istenen hücrelere etkin bir şekilde verilebilmesi ve ekspresyonu için biyolojik ve biyolojik olmayan (kimyasal/fiziksel) iki temel yaklaşım bulunmaktadır (Jinturkar vd., 2011). Viral ve bakteriyel vektörleri kullanan biyolojik yöntemler, yüksek transfeksiyon etkinlikleri sebebiyle pek çok uygulamada tercih edilmektedir. Bu vektörler hücre transfeksiyonu için hücre reseptörlerini ve biyolojik giriş mekanizmalarını hedeflemektedirler (Young vd., 2006). Adenovirüsler ve retrovirüsler klinik çalışmalarda en sık kullanılan biyolojik vektörlerdendir. Bununla birlikte metodoloji oluşturma sorunları ve alerjik tepkiler, konak reddi, mutajenite ve onkogenesite gibi yan etkiler nedeniyle viral vektörlerin uygulamalardaki kullanımını sınırlamaktadır. Bu nedenle, viral vektörlerin uzun vadeli güvenlik çalışmalarından geçmesi gerekmektedir (Jinturkar vd., 2011).

Biyolojik olmayan gen transfer yöntemleri, hücrelerin kimyasal ve fiziksel manipülasyonu ile gerçekleşmektedir. Katyonik lipidler ve polimerler gibi kimyasal ajanların kullanıldığı DNA iletimi kimyasal yaklaşımlardan biridir. Ayrıca bu ajanlar, hücrelerin hedeflenmesi arttırmak için özel moleküller ile birlikte kullanılabilir. Biyolojik olmayan gen transfer yöntemleri özellikle in vitro uygulamalarda hücreleri yüksek verimlilikle ve stabil bir şekilde transfekte edebilmektedir (Rettig ve Rice, 2007). Ancak, in vivo uygulamalar için hücre dışı ve içi gen transfer inhibitörleri ile klinik uygulamalardaki transfekte edilmesi gereken doku boyutu nedeniyle biyolojik yöntemlerin gerisinde kalmaktadır. Kimyasal vektörlerin üretim ölçeğinin biyolojik yöntemlere kıyasla daha kolay büyütülebilmesi ve organizmalardan bağımsız bir şekilde üretilibilmeleri en büyük avantajlarından biridir. Ayrıca, hedef bölge olarak mukozal doku veya hava yolu gibi yolların kullanımı veya intratümoral aşılama gibi nispeten spesifik dokuların hedeflenmesi için de kullanılmaktadır. Bununla birlikte, transfeksiyon yöntemlerinin etkinliğinin biyolojik yöntemlerden daha düşük olduğu bildirilmektedir. Ayrıca taşıyıcı moleküllerin transfeksiyon sistemi ile birleştirildiği ve kullanıma hazır bir gen düzenleme sisteminin oluşturulduğu basamaklarda geliştirilmesi gereken problemlerin olduğu ifade edilmiştir (Rettig ve Rice, 2007).

Fiziksel gen transfer yöntemleri genin, genlerin ve gen düzenleme sistemlerinin biyolojik veya kimyasal bir taşıyıcı olmaksızın hedef hücre ve dokulara iletildiği bir gen transfer stratejisidir (Wolff vd., 1990). Fiziksel gen transfer stratejileri arasında en kolay ve güvenli olanı, lokal dokuya veya sistematik dolaşıma saf DNA veya gen düzenleme

aracı (CRISPR, TALEN, vb.) enjeksiyonu içermektedir. Fakat bunlar serum ve sitoplazmik nükleazlar tarafından DNA'ların parçalanabilmektedir. Aynı zamanda proteazlar, fagositler ve retiküler endotelial sistem (RES) elemanları tarafından gen düzenleme araçları sindirilebilmekte ve bu durum uygulamadan başarılı sonuç alma şansını oldukça düşürmektedir. Bu nedenle, biyolojik veya kimyasal bir taşıyıcı kullanmadan istenilen gen düzenleme paketinin fiziksel transferi amacıyla yeni yöntemler geliştirilmektedir (Houk vd., 1999; Lechardeur vd., 1999).

Geliştirilen fiziksel yaklaşımların çoğunda, daha nicel ve standartlaştırılmış gen transferi ile sonuçlanan bir tür ekipman kullanılmaktadır. Bu amaçla, elektroporasyon (EP), sonoporasyon, mikroenjeksiyon, parçacık bombardımanı (gen tabancası) ve harici fiziksel kuvvet (basınç, ses, şok dalgası, elektrik darbeleri) kullanılarak hidrodinamik enjeksiyon gibi çeşitli yöntemler geliştirilmiş ve başarı ile uygulanmaktadır (Te-hui vd., 2004).

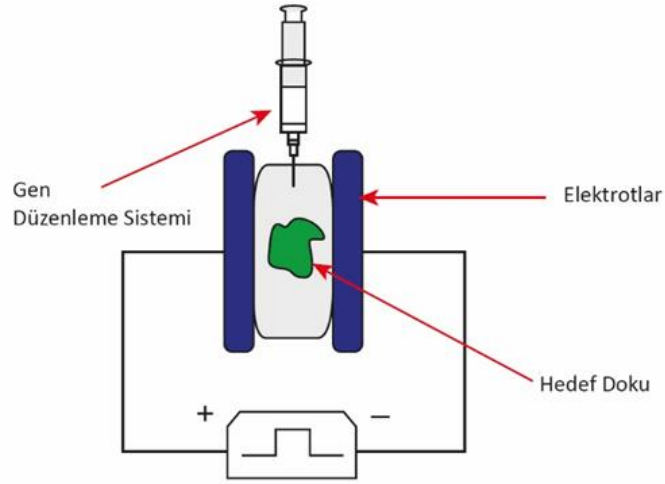
Çizelge 1.1: Gen transfer yöntemlerinin karşılaştırması (Jinturkar vd., 2011).

Gen Transfer Yöntemleri	Avantajları	Dezavantajları
Biyolojik yöntemler (viral ve bakteriyel vektörler)	– Bölünen ve bölünemeyen hücrelerde yüksek transfeksiyon verimliliği, – Stabil ekspresyon düzeyi, – Sistematik transfeksiyon.	– Zor üretim ve soğuk zincir/depolama gerekliliği, – Ekstra kalite kontrol basamakları gerekliliği, – Yüksek maliyet, – Eklenecek gen boyutu sınırlı, – İmmünojenite ve onkogenesite riski.
Kimyasal yöntemler (viral olmayan kimyasal vektörler)	– Yüksek in vitro transfeksiyon verimi, – Küçük miktarlarda verimli üretim ve daha esnek saklama koşulları, – Düşük maliyet, – Yüksek tekrarlanabilirlik, – Gen boyut sınırı yok.	– Düşük in vivo transfeksiyon verimliliği, – Birincil ve bölünemeyen hücrelerde düşük verimlilik, – Sınırlı klinik başarı, – Tutarlı, tekrarlanabilir büyük ölçekli üretim problemleri,
Fiziksel yöntemler	– Daha yüksek lokal doku transfeksiyon verimliliği, – Tüm hücre tiplerinde transfeksiyon imkânı, – Kolay protokol standardizasyonu, – Gen boyun sınırı yok.	– Spesifik cihaz ihtiyacı, – Farklı hücre tipleri için parametre optimizasyonu ihtiyacı, – Diğer yöntemlere kıyasla daha yüksek doku hasarı.

1.4.1.Elektroporasyon

Elektroporasyon, hedef hücre ve dokulara cihaz desteği olmaksızın, saf DNA veya gen düzenleme sistemi aktarımı için geliştirilen yöntemlerdendir (Şekil 1.6). Elektroporasyon tekniğinde elektrik akımı kullanılmakta ve hücrelere kısa tekrarlı elektrik akımı uygulanarak hücre zarlarının bütünlüklerinin kısa süreli bozulmaları sağlanmaktadır. Elektrik, hücrelere ortalama olarak 3 milisaniye (ms) kadar uygulanmaktadır. Ancak, bu süre 120 nm ile 20 ms arasında değişebilmektedir (Chang ve Reese, 1990). Uygulama sonrası oluşan hasar geçici olmakta ve kısa sürede hücrelerin bütünlüklerini tekrar sağlamaktadır. Bu süre zarfında hücreler içine DNA ve protein molekülleri, hedef hücrelerin sitoplazma ve nükleuslarına başarı ile aktarılmaktadır. Elektroporasyon, prokaryotik ve ökaryotik hücreler üzerinde yüksek verimle uygulanabilen, hücre ve doku tipi açısından esnek bir gen aktarım sistemlerindendir (Jinturkar vd., 2011).

Elektroporasyon tekniğinin uygulamasında, hücreler güç kaynağına bağlı bir kuvvet içinde in vitro olarak transfekte edilmektedir. Hücreler ve tamponlanmış moleküller birlikte süspanse edilmekte ve elektrik alanı uygulanmaktadır. Elektrik alanın gücü ve süresi, doku türüne göre en iyi transfeksiyonun gerçekleşeceği düzeylerde uygulanmaktadır. Elektroporasyon uygulamasının başarısının hücrelerin tipi, büyüme durumu, transfekte edilecek DNA miktarı, sistem içindeki kapasitör boyutu, uygulanan voltaj ve elektrik alan süresi ile doğrudan ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca, dimetilsülfoksidin (DMSO) uygulamasının özellikle memeli hücrelerinde daha yüksek elektroporasyon verimini sağladığı bildirilmiştir (Melkonyan vd., 1996).



Şekil 1.6: Elektroporasyon yöntemi uygulaması şematik görüntüsü (Jinturkar vd., 2011).

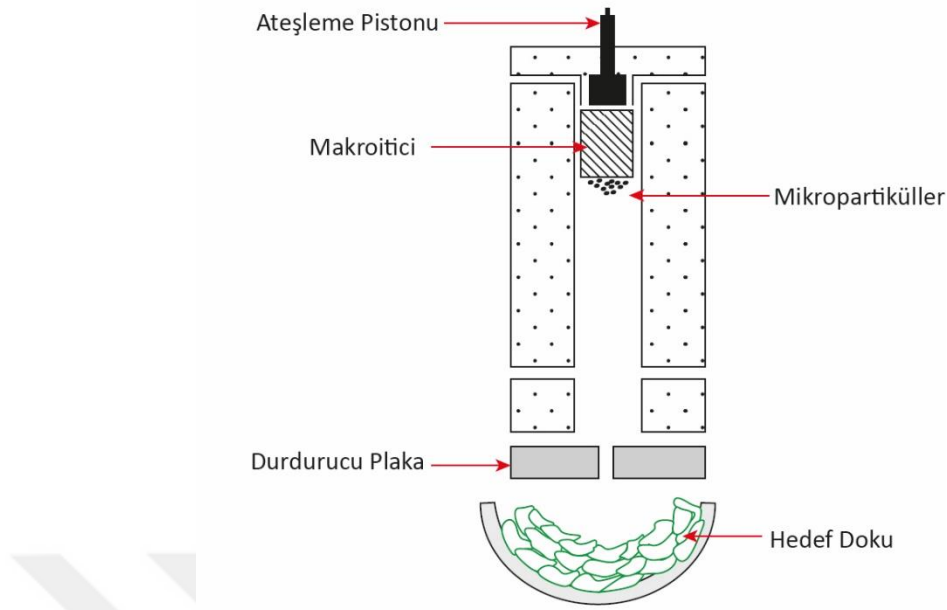
1.4.2.Hidrodinamik Gen Transfeksiyonu

Hidrodinamik gen transfeksiyonu, saf DNA ve gen düzenleme sistemlerinin iletimi için büyük miktarda sıvı ile kan damarlarında oluşturulan hidrodinamik basınç ile transfeksiyonu sağlayan bir tekniktir (Budker vd., 1998). Hidrodinamik gen transfeksiyonu ilk olarak 1990'lı yıllarda, endotelyal ve parankimal hücrelerin geçirgenliğini arttırmak için uygulanmış ve plazmid DNA'sını intravasküler enjeksiyon ile sıçanlarda iskelet kasları ve iç organlar başta olmak üzere sistematik olarak transfeksiyon başarısı gösterilmiştir (Liu vd., 1999; Gao vd., 2007). Hidrodinamik yöntem, görece daha basit olması, verimlilik ve çok yönlülük özellikleri sebebiyle öne çıkmaktadır. Ayrıca, hidrodinamik yöntemle yapılan transfeksiyonunun organizmanın sisteminde daha uzun süre aktif kaldığı gözlemlenmiştir (Budker vd., 1998). Fakat, bazı uygulamalarda artan iç basınç, organizmada yüksek kan basıncı ve düşük kalp atışına sebebiyet vermekte ve organizmayı öldürebilmektedir (Jinturkar vd., 2011). Hidrodinamik gen iletim stratejisinde genellikle parankima hücreleri hedeflenmektedir. Uygulama ile oluşan basınç ile endotel bariyerin bütünlüğü bozulduğunda taşınan moleküller (DNA ve/veya gen düzenleme sistemleri) doğrudan parankim hücrelerin sitoplazmalarına erişebilmektedir (Zhang vd., 2004; Jinturkar vd., 2011).

1.4.3.Gen Tabancası Aracılığıyla Parçacık Bombardmanı

Parçacık bombardmanı, ilk olarak 1987 yılında bitkiler üzerinde kullanılmıştır (Klein vd., 1987) ve hedef moleküllerin dokulara iletiminde kullanılan en etkili yöntemlerdendir (McCabe vd., 1988). Gen tabancası, küçük miktarda DNA ve proteinlerin hedef dokulara iletiminde düşük toksiteye sebep olan hızlı, basit ve esnek bir yöntemdir (Şekil 1.7) (Cheng vd., 1993; Hansen vd., 2018). İlk olarak dokuların transfeksiyonu için tasarlanmakla birlikte, daha sonra yapılan çalışmalarda in vitro ve in vivo çalışmalarda kullanılmak üzere farklı protokoller geliştirilmiştir (Yang vd., 1990; Williams vd., 1991).

Gen tabancası yönteminde DNA, RNA, peptid ve proteinlerin hücre içine transferi amacıyla altın ve tungsten gibi mikro düzeyde taşıyıcı partiküller kullanılmaktadır. Taşınacak moleküllerin (DNA, RNA, protein), taşıyıcı partiküllerin (altın veya tungsten mikro partiküller) üzerine kaplanması ve hedef hücrelere yüksek hızlı bir akışla verilmesini (fırlatılmasını) içermektedir (Heiser vd., 1994). Altın ve tungsten moleküllerin dokuya iletimi için anlık elektrik akımı ve basınçlı helyum gazı kullanılmakta ve bu sayede taşıyıcı moleküller hücre zarını delerek sitoplazmaya ulaşmaktadır (Sazonova vd., 2019). Gen tabancasının verimini, taşıyıcı ile taşınan moleküllerin oranı, kullanılan taşıyıcı partiküllerin boyutu ve malzemesi, taşınan molekülün partiküllere kaplanma yöntemi, parçacığın fırlatılma hızı, hedeflenen dokunun türü ve yapısı etkilemektedir (Eisenbraun vd., 1993). Bu parametreler gen tabancasının verimli çalışması için önemlidir ve yanlış hesaplamalarda dokuda hasara sebep olabilmektedir. Gen tabancası yöntemi kullanımında önemli avantajlar olmakla birlikte kullanılan cihaz, partiküller ve reaktiflerin maliyeti yüksektir ve ayrıca in vivo çalışmalarda yöntemin uygulanması sonrası bağışıklık yanıtı tetiklenebilmektedir (Sanford vd., 1993; Jinturkar vd., 2011).



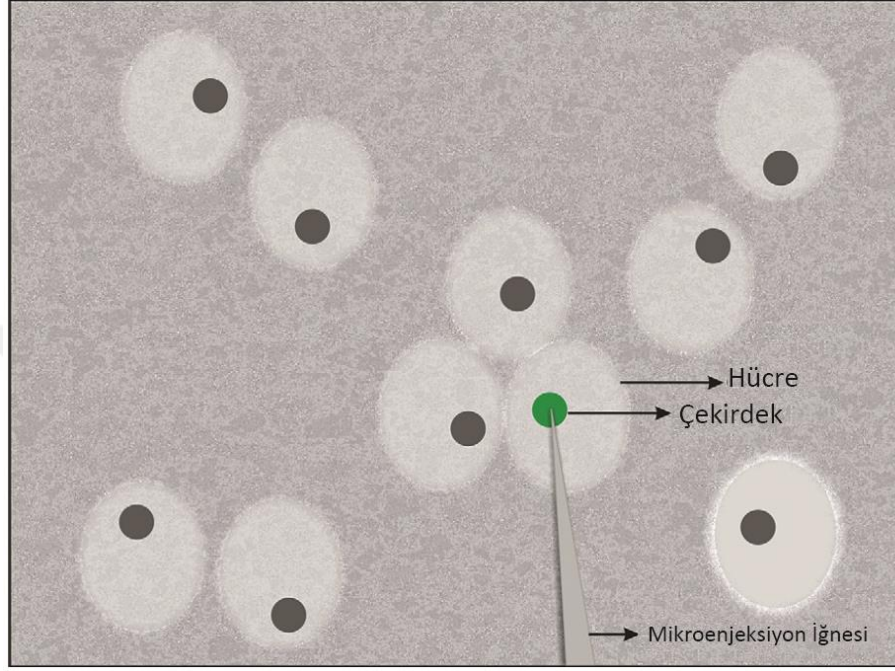
Şekil 1.7: Gen tabancası yöntemi uygulaması şematik görüntüsü (Jinturkar vd., 2011).

1.4.4. Mikroenjeksiyon

Mikroenjeksiyon, gen düzenleme araçlarını doğrudan sitoplazmaya veya çekirdeğe iletilmesi için kullanılan yöntemlerdendir (Şekil 1.8) (Jinturkar vd., 2011). Mikroenjeksiyon yöntemi, genellikle camdan imal edilen çok ince kapiller bir iğne ve bu iğnenin mikro düzeyde hareketlerini kontrol edebilmek için kullanılan hassas konumlandırma cihazı ile gerçekleştirilmektedir. Hücrelere doğrudan enjeksiyon yapılabilmesi için prosedür mikroskop altında yapılmaktadır. Yöntem, spesifik hücreler için doğrudan ve kesin gen düzenleme sistemlerinin aktarımına olanak sağlamaktadır. Mikroenjeksiyon yöntemi diğer yöntemlere kıyasla daha temel bir prosedüre sahip olmakla birlikte, uygulanması için özel eğitilmiş personele ihtiyaç duyulmaktadır (Xu vd., 2018). Gen düzenleme verimi yüksek olmakla birlikte, bir seferde sadece bir hücre transfekte edilebildiği için zahmetli bir yöntemdir (Chi vd., 2020).

Mikroenjeksiyon yöntemi transgenik hayvanların geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Liu vd., 2013; Dadashpour vd., 2019). Mikroenjeksiyon, tek hücre üzerinde yüksek verimli genetik manipülasyonlar yapılmasına izin veren yapısı nedeniyle ön plan çıkmaktadır. Farklı çalışmalarda (Pepperkok vd., 1988; Kagawa vd.,

2001) hem mitokondriyal hem de nükleer genetik bozuklukların tedavisinde başarı ile uygulanmıştır. Ayrıca, mekanizmanın bilgisayar destekli enjeksiyon sistemleri olarak geliştirilmesi, yüksek oranda tekrarlanabilir ve başarılı protokollerin üretilmesine olanak sağlamaktadır (Jinturkar vd., 2011).



Şekil 1.8: Mikroenjeksiyon yöntemi uygulaması şematik görüntüsü (Jinturkar vd., 2011).

1.4.5.Sonoporasyon (Ultrason) Aracılı Gen Transfeksiyonu

Sonoporasyon, hücre zarlarının geçirgenliğinin geçici olarak artırılması için hücrelere veya dokuya ultrason enerjisinin uygulandığı bir transfeksiyon yöntemidir (Li, 2020). Bir dokuya ultrason enerjisi uygulandığında dokuda ve solüsyonda mini kabarcıklar oluşmaktadır. Bu kabarcıklar uygulanan enerji şiddeti ile büyümekte, fakat kabarcık içinde oluşan basınç sebebiyle çökmektedir. Bu çökme durumu, hücre duvarını geçirgen hale getiren ve istenilen mikro ve makro molekülerin hücre içine alınmasına izin veren enerji patlaması ve takriben hücre zarında da porlar oluşturmaktadır. Bu durum teknik olarak “kavitasyon” olarak isimlendirilmektedir (Lawrie vd., 2000). Ultrason yöntemi hem tedavi hem de tanı amaçlı kullanılan birden fazla uygulama için kullanılmaktadır (Kim vd., 1996). Bu uygulamalarda değişimi sağlayan ana etken kullanılan dalgaların

frekanslıdır. Hücre bozulması ve parçalanması amacı ile tanısal görüntülemelerde düşük frekansa sahip (20 kHz) dalgalar kullanılırken; böbrek ve safra taşlarının parçalanması için yüksek frekanslı şok dalgaları kullanılmaktadır (Kim vd., 1996; Mitragotri vd., 1996). Sonoporasyon, aracılı gen transfeksiyonu uygulamalarında düşük frekanslı ultrason dalgalarının transfeksiyon için ideal olduğu bildirilmiştir (Wyber vd., 1997). Sonoporasyon, kolay uygulama ve invazif olmama özellikleri ile ön plana çıkmaktadır. Fakat yapılan çalışmalarda yöntemin transfeksiyon etkinliği elektroporasyon ile karşılaştırıldığında nispeten daha az olduğu bildirilmiştir (Wells, 2004).

1.4.6.İyontoforez

İyontoforez, hücre ve dokulara düşük miktarda elektrik akımı verilerek transgenik ajanların hücre içine girişinin sağlandığı gen aktarım mekanizmasıdır (Oh vd., 1993). Spesifik dokulara minimum yan etki ile uygulanabilirliği ve yüksek verimi sebebiyle özellikle deri altı klinik uygulamalarda tercih edilmektedir (Jinturkar vd., 2011; Wang vd., 2022). İyontoforez tekniğinde, transfeksiyon yapılacak olan doku veya hücrelere temas eden bir zar ile elektrik akımının doğrudan iletimi gerçekleştirilmektedir. Ayrıca, elektrik akımının doku üzerinde oluşturacağı negatif etkileri azaltmak için özel konvektif çözücüler kullanılmaktadır. Uygulama sonrasında hücre zarlarında geçici porlar oluşmakta ve transfeksiyon ajanları bu zarlardan geçirilmektedir. Tekniğin başarısını pH, akım yoğunluğu, elektrot materyali ve şekli, uygulama süresi ve transfeksiyon ajanlarının yoğunluğu etkilemektedir (Hirvonen vd., 1996). İyontoforez tekniğinde elektrik akımının kullanılması özellikle negatif yüklü olan RNA, siRNA ve plazmid DNA'ların hücre içine transfekte edilmesinde en başarılı yöntemlerden biri olduğu bildirilmiştir (Hao vd., 2010).

2. MATERİYAL ve METOT

Araştırmada, mezbahanelerde kesilen koyunların ovaryumları toplanmış ve ovaryumlar 30 – 35 °C'deki PBS içerisinde laboratuvara getirilmiştir. Çalışmada in vitro fertilizasyon yapılmış ve CRISPR-Cas9 uygulanmış toplam 13 oosit kullanılmıştır.

2.1 Oositlerin Elde Edilmesi ve Olgunlaştırılması

Ovaryum yüzeyinde bulunan 1 – 6 mm çapındaki folliküller 15 mM HEPES, 15 mM sodyum Hepes, 0.3 mg/mL sodyum bikarbonat, 0.01 mg/mL heparin sodyum tuzu, 0.075 mg/mL penisilin G potasyum tuzu, 0.05 mg/mL streptomisin sülfat, 0.08 mg/mL kanamisin monosülfat ve % 10 fetal buzağı serumu ilaveli M-199 içeren Hepes tamponlu oosit yıkama medyumunu ile yıkanmıştır. Yıkama sıvısı stereo mikroskop altında incelenerek, homojen vitellüs ve dört sıra kompakt kumulus hücresine sahip kumulus-oosit kompleksleri toplanmıştır. Bu oositler üç kez oosit yıkama medyumunda ve bir defa in vitro olgunlaştırma medyumunda yıkanarak dört gözlü petri kutularına transfer edildikten sonra üstleri mineral yağ ile kaplanan oositler 38,5 °C'de ve % 5 CO₂'li inkübatörde 24 saat inkübe edilmiştir.

2.2 Oositlerin Fertilizasyonu ve Zigotların Kültürü

Fertilizasyon amacıyla taze koç sperması kullanılmıştır. Sperma percoll-gradient yöntemi ile hazırlanıp iki farklı Percoll tabakası (% 90 ve % 45) üzerine bırakılan sperma 1500x g'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra üst kısım atılarak kalan pelet hepesle tamponlanmış, 3 mg/mL BSA-fraction V, 2.1 mg/mL sodyum bikarbonat, 0.72 mg/mL D-glikoz, 0.06 mg/mL pirüvik asit, 0.25 mg/mL L-glutamin, 0.12 mg/mL kanamisin monosülfat, 0.075 mg/mL penisilin G potasyum tuzu, 0.05 mg/mL streptomisin sülfat içeren SOF medyumuyla sulandırılıp tekrar 600x g'de 6 dakika santrifüj edilmiştir. Oluşan pelet sulandırılarak konsantrasyon tayini yapılmış ve bu şekilde hazırlanan spermatozoonlar (0.8×10^6 spermatozoon/mL) fertilizasyon medyumuna alınan in vitro olgunlaştırılmış oositlerin üzerine ilave edilmiştir. Daha

sonra mikro manipulator ile *MSTN* geninde knock-out oluşturulup CRISPR-Cas9 enzimleri ve gRNA içeren karışım altı adet erkek pronükleousa ve yedi adet zigota verilmiştir.

2.3.Cas9 mRNA ve sgRNA üretimi

T7 promotörü, Cas9 ileri ve geri primerleri kullanılarak PCR amplifikasyonu ile Cas9 kodlama bölgesine eklenmiştir. T7 – Cas9 PCR ürünü jel ile saflaştırılıp bir Message Machine T7 ultra kiti (Life Technologies, AM1345) kullanılarak in vitro transkripsiyon (IVT) için bir şablon olarak kullanılmıştır. T7 promotörü, ileri ve geri primerler ile PCR amplifikasyonu ile sgRNA şablonuna eklenip T7 – sgRNA PCR ürünü jel ile saflaştırılmıştır. Bir MEGA short script T7 kiti (Life Technologies, AMB13345) kullanılarak IVT için bir şablon olarak kullanılmıştır.

Çizelge 2.1: Cas9 nükleaz bileşenleri (Genscript Biotech Corp, ABD).

Kit Bileşenleri	Miktar	Bileşenler
GenCrispr Cas9-C-NLS	50 µg	1 mg/mL
10 X Reaction Buffer	1.5 mL	200 mM HEPES, 1 M NaCl, 50 mM MgCl ₂ , 1 mM EDTA, pH 6.5 at 25°C

Hem Cas9 mRNA hem de sgRNA, bir MEGAclean kiti (Life Technologies, AM1908) kullanılarak saflaştırılmıştır. sgRNA sentezi aşamaları aşağıda sırasıyla verilmiştir:

- PCR için forward (ileri) ve reverse (geri) primerler tasarlanmıştır. gRNA DNA şablon dizisi, T7 promotör dizisinden, hedefe özgü gRNA'yı kodlayan diziden ve crRNA/tracrRNA'nın sabit bölgesinden oluşmaktadır.
- Sentetik gRNA şablonu için hedef F1 ve hedef R1 geri oligonükleotitlerinin dizileri tasarlanmıştır.
- PCR amplifikasyonu ile gRNA DNA şablonu birleştirilmiştir.

- gRNA, Cas9 Nükleaz ile stabil bir kompleks oluşturmak için mikroyenjeksiyon kullanılarak pronükleus ve zigotlara aktarılmıştır.

Çizelge 2.2: gRNA PCR reaksiyonu için gerekli kimyasallar (GenCrispr sgRNA Synthesis Kit).

Kimyasallar	Miktar (µL)
10x PCR Reaction buffer	5
10 µM Tracr RNA fragment	1
10 µM T7 Primer Mix	1
10 µM Target F1 oligonucleotide	1
10 µM Target R1 oligonucleotide	1
10 µM dNTP mixture	1
High-Fidelity polymerase	0,5
Nuclease-free water	39,5
Toplam Hacim	50

Çizelge 2.3: gRNA PCR reaksiyon koşulları

Adım	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	94°C	3 dk	1
Denatürasyon	94°C	10 sn	32
Bağlanma	55°C	15 sn	
Son Uzama	72°C	1 dk	1
Saklama Koşulları		+4°C ∞	

Çizelge 2.4: MSTN genini içeren hedef dizi.

Hedef Dizi	GCTGCTTGTTGCTGGCCCAGTGG
-------------------	-------------------------

Çizelge 2.5: MSTN geni için tasarlanan primer dizileri.

Forward (ileri)	5'-GGAAGCAGTAAGAGCAAGGAAA-3'
Reverse (geri)	5'-TCTTTGCTGATGTTAGGAGCTG-3'

MSTN geni için restriksiyon enzimi kesim dizisi:

CCCCTGGGgCAGCcACAtGCAGC

Çizelge 2.6: MSTN geni için referans sekans ve çerçeve kaydırma frekans oranı.

Referans Sekans	CCATGCAAAAACCTGCAAATCTTTGTTTATATTTACCT ATTTATGCTGCTTGTTGCTGGCC<>CAGTGGATCTGA ATGAGAACAGCGAGCAGAAGGAAAATGTGGAAAAA AAGGGGCTGTGTA
Çerçeve Kaydırma	
Frekansı	80.56

2.4 Zigotların Kültürü

Fertilizasyonu takiben hücrelerin tümü 3 mg/mL BSA (fatty acid free), 20 µL/mL esansiyel aminoasit solüsyonu, 10 µL/mL non-esansiyel aminoasit solüsyonu, 0.03 mg/mL pirüvik asit, 0,04 mg/mL L-glutamin, 0,08 mg/mL kanamisin monosülfat, 0,075 mg/mL penisilin G-potasyum tuzu, 0.05 mg/mL streptomisin sülfat ilaveli kültür medyumuna (SOF medyum) transfer edilip % 5 CO₂, % 5 O₂ ve % 90 N₂ anaerobik ortamda ve 39 °C'de 8 gün kültüre edilmiştir. Daha sonra bu embriyolardan DNA izolasyonu yapılmış ve MSTN geninde knock-down oluşumu incelenmiştir.

2.5 DNA İzolasyonu

Ticari kit (Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit) kullanılarak, embriyolardan yüksek saflıkta DNA izole edilmiştir. DNA konsantrasyonları Qubit cihazı ile ölçülmüştür. DNA izolasyonu aşamaları aşağıda sırasıyla verilmiştir:

- Hücreler kültür medyumundan toplanmıştır. Bunun için ilk olarak hücrelere PBS ile yıkama işlemi uygulanmıştır. Daha sonra PBS uzaklaştırılmıştır. Tekrar PBS eklenerek hücre kazıyıcı ile hücreler kazınmış ve mikrosantrifüj

tüplere alınmıştır. 250x g'de 5 dakika santrifüj yapılmıştır. Süpernatant uzaklaştırılmıştır.

- Hücreler 200 µL TE Buffer eklenerek süspanse edilmiştir. Üzerine 200 µL Lizis Solüsyonu ve 20 µL Proteinaz K eklenerek pipetaj yapılmıştır.
- Hücreler 56°C'ye ısıtılmış su banyosunda 10 dakika inkübe edilmiştir.
- Hücrelere 20 µL RNase A Solüsyonu eklenmiştir. Vorteks yapılmış ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir.
- Hücrelere 400 µL % 50'lik etanol eklenmiştir ve vorteks yapılmıştır.
- Hücre lizati 2 mL'lik mikro santrifüj tüpüne yerleştirilmiş olan GeneJet spin kolonuna aktarılmıştır. 6000x g'de 1 dakika santrifüj yapılmıştır.
- Mikro santrifüj tüpü atılmıştır ve GeneJet spin kolunu yeni bir mikro santrifüj tüpüne yerleştirilmiştir.
- Spin kolona 500 µL Wash Buffer I eklenmiştir. 8000x g'de 1 dakika santrifüj yapılmıştır. Mikro santrifüj tüpü atılarak spin kolunu yeni bir mikro santrifüj tüpüne yerleştirilmiştir.
- Spin kolona 500 µL Wash Buffer II eklenmiştir. 12 000x g'de 3 dakika santrifüj yapılmıştır.
- Mikro santrifüj tüpü atılmıştır ve spin kolonu steril bir 1.5 mL'lik eppendorfa yerleştirilmiştir.
- Genomik DNA'yı elde etmek için spin kolon membranının merkezine 200 µL Elüsyon Buffer eklenmiştir. Oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilmiştir ve 8000x g'de 1 dakika santrifüjlenmiştir.

2.6 DNA Miktarının Ölçülmesi

İzole edilen DNA'ların ölçümü için hem Nanodrop spektrofotometre hem de QFX Fluorometre (Denovix, USA) yapılmıştır. Klorometri ölçümde Denovix dsDNA High Sensitivity Kit kullanılmıştır.

DNA miktarı ölçüm aşamaları şu şekildedir:

- Kullanılmadan önce tüm solüsyonların oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir. Ardından tüpler vortekslenerek kısaca santrifüjlenmiştir.
- Floresan boya ile tampon çözelti 1:100 oranında karıştırılarak çalışma solüsyonunu hazırlanmıştır. Her bir standart ve bilinmeyen için 190 µL çalışma solüsyonu kullanılmıştır. Standart ve bilinmeyen sayısına yetecek kadar çalışma solüsyonu taze olarak hazırlanmıştır.
- Her standart veya bilinmeyen numune için, ince çeperli 0,5 mL hacimli tüpe 190 µL çalışma solüsyonu eklenmiştir. Ardından 10 µL standart ve bilinmeyen örnekler çalışma solüsyonunun üzerine eklenmiştir. Kit içerisinde bulunan 0 ng/µL ve 25ng/µL standart olarak kullanılmıştır.
- Test tüpleri oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir. Ardından florometrik ölçüm yapılmıştır. Ölçümler QFX Fluorometre cihazı kullanılarak Lineer Regresyon modelinde hesaplanmıştır. Değerler kaydedilmiştir.

2.7 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Yeterli miktarda DNA konsantrasyonuna ve saflığına sahip DNA'larda hedeflenen MSTN geninin sekansını kapsayacak şekilde primerler tasarlanıp polimeraz zincir reaksiyonu işlemi (Çizelge 2.7) gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2.7: MSTN genine ait PCR reaksiyon koşulları

Adım	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	95	5 dk	1
Denatürasyon	95	45 sn	
Bağlanma	58	1 sn	39
Uzama	72	90 sn	
Son Uzama	72	10 dk	1
Saklama Koşulları		+4°C	

2.8 PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Kontrolü

PCR reaksiyonundan sonra oluşan bantların kontrolü agaroz jel elektroforezi ile gerçekleştirilmiştir. Oluşan ürünlerin uzunlukları 100 bp plus Opti-DNA (Abm, Canada) belirteç ile belirlenmiştir. Elektroforez için % 2'lik agaroz jel hazırlanıp yürütme işlemi elektroforez cihazında gerçekleştirilmiştir.

2.8.1 Agaroz Jelin Hazırlanması

Hassas terazide 2 mg agaroz tartılmıştır ve 200 mL'lik erlenmayer içerisine alınmıştır. Üzerine 100 mL % 1'lik TBE tamponu (Tris-Borat EDTA tamponu) eklenmiştir ve içerisindeki agaroz çözününceye kadar mikrodalga fırında kaynatılmıştır. Agaroz jel karışımı elle tutulabilecek sıcaklığa (50-55°C) düştüğünde 2 µL etidyum bromür eklenmiştir.

Kenarları özel lastiklerle kapatılmış elektroforez kabına kuyucukları oluşturmak için tarak yerleştirilmiştir. Daha sonra hazırlanan jel tek bir köşeden hava kabarcığı oluşmayacak şekilde kaba aktarılmıştır. Jelin polimerleşmesi beklenmiştir. Lastikler çıkarılıp jel elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Elektroforez tankı içerisine % 1'lik TBE tamponu eklenmiş ve tarak çıkarılmıştır. Embriyodan izole edilen genomik DNA'dan 10 µL ve yükleme boyasından (6x Loading Dye) 2 µL karıştırılarak kuyucuklara yüklenmiştir. Yükleme tamponu DNA'nın kuyucuklara çökmesini sağlamıştır. Oluşan bantlar 120 voltluk elektroforetik alanda (Cleaver Scientific) 45 dakika boyunca 1x TBE tamponu içerisinde yürütülmüş ve Syngene Gene Genius marka jel görüntüleme sistemi ile görüntülenmiştir. Tek bant görüntüsü elde edilmiştir.

2.9 DNA Dizileme Analizi

Dizileme çalışmaları için altın standart olan DNA sekans analizi, değişim yapılmamış koyun ve MSTN geni değiştirilen gruba ait PCR ürünleri için yapılmıştır. Elde edilen 260 bp'lik PCR ürünü, MSTN geni için DNA sekans analizine tabi tutulmuştur. DNA dizi analizi ABI 3500 (ThermoFisher Scientific, USA) cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

DNA dizileme analizi için öncelikli olarak temizleme işlemi yapılmıştır. Bu amaçla 5 µL PCR ürünü ile 1 µL ExoSAP-IT (Applied Biosystems, UK) strip tüpte birleştirilerek 37°C’de 30 dk ve 80°C’de 15 dk termal döngü cihazında inkübe edilmiştir.

Sekans PCR’ı için BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher Scientific) kullanılmış ve Tablo 2.8’te listelenen bileşenler her bir örnek için karıştırılıp 8’li strip tüplere dağıtılmıştır. Daha sonra örnekler termal döngü cihazında inkübe edilmiştir.

Çizelge 2.8: Sekans PCR reaksiyonu için gerekli kimyasallar.

Kimyasallar	Miktar (µL)
5x Sequencing Buffer	2
BigDye™ Terminator v3.1	1
Primer (Forward veya revers)	1
DNA Örneği (ExoSAP ile temizlenmiş)	2
Ultra Saf Su	4
Total Hacim	10

Çizelge 2.9: Sekans için hazırlanan örneklerin PCR koşulları

Adım	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	95°C	1 dk	1
Denatürasyon	95°C	10 sn	
Bağlanma	50°C	5 sn	25
Uzama	60°C	4 dk	
Saklama Koşulları	+4°C		

Sekans PCR çalışması tamamlandıktan sonra örnekler Sephadex ile temizlenmiştir. Bu amaçla, 1 gr Sephadex G-50 (Sigma Aldrich, USA) 14 mL ultra

distile suda çözdürölüp, çözeltili pröfikasyon spin kolonu üzerine 800 µL ilave edilmiştir. DNA spin kolon 3500 rpm’de 3 dakika santrifölj edilmiştir. Mikro santrifölj tölöl atılarak spin kolon yeni mikro santrifölj tölölüne yerleştirilmiştir. Ardından pröfikasyon spin kolonu içindeki Sephadex kolonun üzerine Sekans PCR’ı tamamlanan örnekle ilave edilerek 3500 rpm’de 3 dk santrifölj yapılmıştır. Toplama tölölündeki örnekle pleyt kuyucuklarına dağıtılarak DNA dizileme cihazında analiz edilmiştir.

Sekans sonucunda değışim yapılmamış koyun MSTN geni ile değıştirilen MSTN geni sekans verileri alt alta dizilerek (alignment) yapılmış değışikler ortaya konulmuştur.



3.BULGULAR

3.1 Cas9 mRNA ve sgRNA Üretimi

Hem Cas9 mRNA hem de sgRNA, bir MEGAclear kiti (Life Technologies) kullanılarak saflaştırılmıştır. Cas9 Nükleaz ile birlikte ile koyun yumurtalarına verilmek üzere sentezlenen sgRNA'lar öncesinde Nanodrop Spektrometrede ölçülmüştür (Resim 3.1). Yüksek saflıkta elde edilen sgRNA'lar, Cas9 Nükleaz ile stabil bir kompleks oluşturmak için mikroyenjeksiyon kullanılarak pronükleus ve zigotlara aktarılmıştır.



Resim 3.1: sgRNA miktarının Nanodrop Spektrometre ölçüm sonuçları.

3.2 Yumurtalara sgRNA Verilmesi

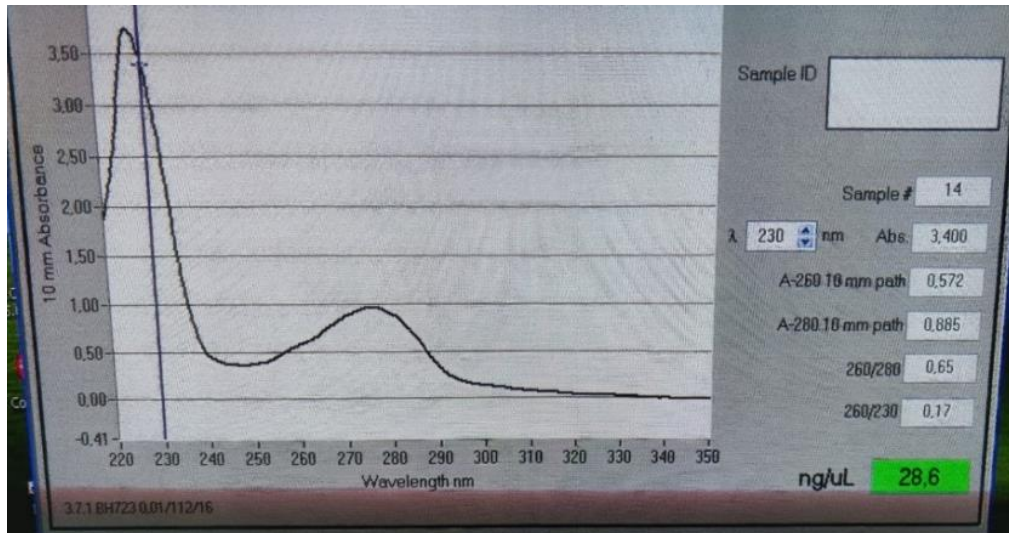
Stereo mikroskop altında, olgunlaştırma medyumunu (50 μ l) içerisindeki yumurtaların Zona pellusidalarına 5-7 μ m çapında mikroyenjeksiyon iğnesi ile boşluklar oluşturuldu (Resim 3.2). Olgunlaştırma medyumunu içerisine 150 ng/ μ l sgRNA ve 100 ng/ μ l Cas9-NLS enzimi eklendi. Cas9-NLS enziminin hedef bölgeyi kesmesi için medyum 24 saat boyunca 37 °C'de % 5 CO₂'li ortamda inkübatörde bekletildi.



Resim 3.2: Mikroenjeksiyon iğnesi ile yumurtalara boşlukların açılması.

3.3 DNA İzolasyonu

Ticari kit (Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit) kullanılarak, yumurta hücrelerinden DNA izole edilmiştir. DNA konsantrasyonları Nanodrop cihazı ile ölçülmüştür (Resim 3.3).

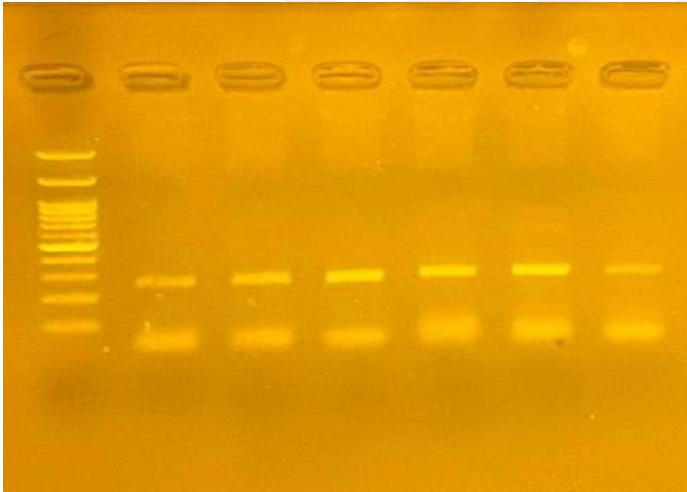


Resim 3.3: DNA miktarlarının nanodrop spektrometre ölçümü

Yeterli miktarda DNA konsantrasyonuna ve saflığına sahip DNA'larda hedeflenen *MSTN* geninin sekansını kapsayacak şekilde primerler tasarlanıp Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.4 PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Kontrolü

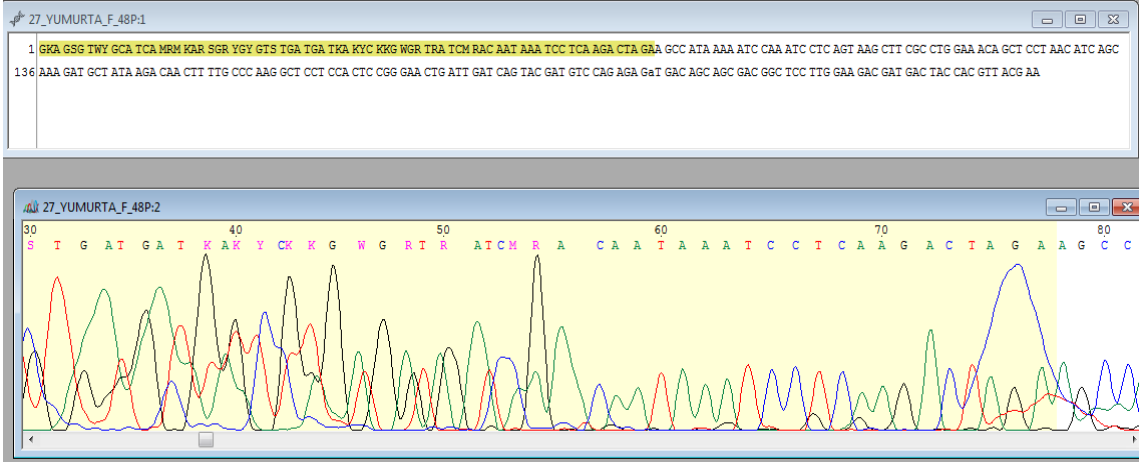
PCR reaksiyonundan sonra oluşan bantların kontrolü agaroz jel elektroforezi ile gerçekleştirilmiştir. Oluşan ürünlerin uzunlukları 100 bp plus Opti-DNA (Abm, Canada) belirteç ile belirlenmiştir. Elektroforez için % 2'lik agaroz jel hazırlanıp yürütme işlemi elektroforez cihazında gerçekleştirilmiştir (Resim 3.4).



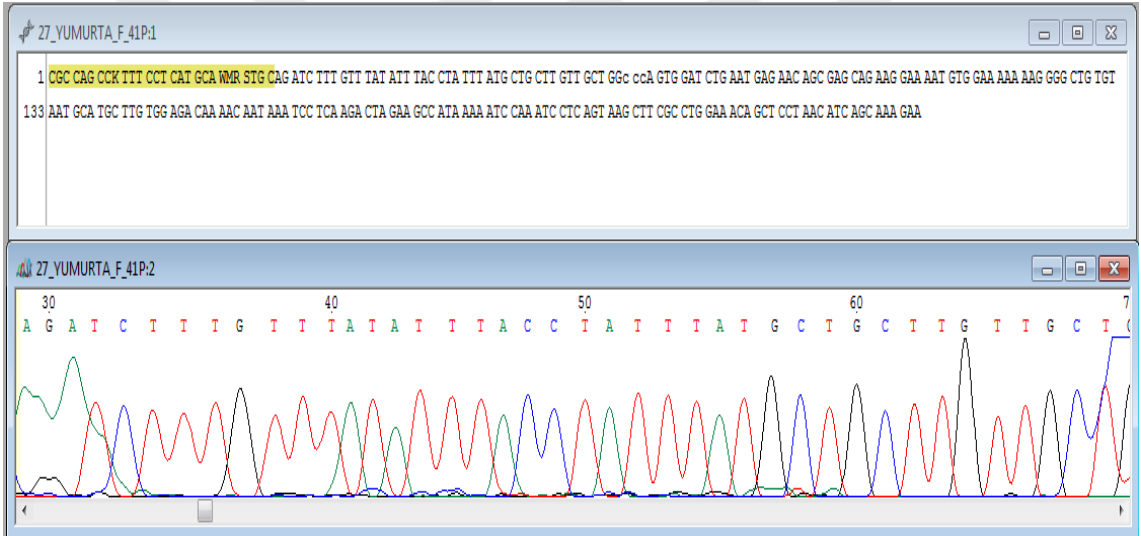
Resim 3.4: PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile doğrulanması.

3.5 Dizileme Analizi

DNA dizileme analizi, değişim yapılmamış koyun ve *MSTN* geni değiştirilen gruba ait PCR ürünleri için yapılmıştır. Elde edilen 269 bp'lik PCR ürünü, *MSTN* geni için DNA sekans analizine tabi tutulmuştur. Sonuçlar Resim 3.5 ve 3.6'da verilmiştir.



Resim 3.5: Delesyon meydana gelmiş olan 48 numaralı örneğin sekans sonuçları.



Resim 3.6: 41 numaralı *MSTN* geni değiştirilmemiş örneğinin sekans sonuçları.

Sekans sonucunda değişim yapılmamış koyun *MSTN* geni ile değiştirilen *MSTN* geni sekans verileri alt alta dizilerek (alignment) yapılmış ve değişiklikler ortaya konulmuştur (Resim 3.7 ve 3.8).

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

EMBOSS_001	ATGCAAAACTGCAAATCTTTGTTTATATTTACCTATTTATGCTGCTTGTGCTGGCCCA	60
EMBOSS_002	-----	0
EMBOSS_001	GTGGATCTGAATGAGAACAGCGAGCAGAGGAAATGTGGAAAAAAGGGGCTGTGTAAT	120
EMBOSS_002	-----GKA-GSGTWYGCATCAMRMKARSGRYGYGTSTGATGA	36
	* * *	
EMBOSS_001	GCATGCTTGTGGAGACAAAACAATAAATCCTCAAGACTAGAAGCCATAAAAAATCCAAATC	180
EMBOSS_002	TKAKYCKKGWRTRATCMRACAATAAATCCTCAAGACTAGAAGCCATAAAAAATCCAAATC	96
	* * * *	
EMBOSS_001	CTCAGTAAGCTTCGCCTGGAAACAGCTCCTAACATCAGCAAAGATGCTATAAGACAACCTT	240
EMBOSS_002	CTCAGTAAGCTTCGCCTGGAAACAGCTCCTAACATCAGCAAAGATGCTATAAGACAACCTT	156

EMBOSS_001	TTGCCCAAGGCTCCTCCACTCCGGGAAGTATTGATCAGTACGATGTCCAGAGAGATGAC	300
EMBOSS_002	TTGCCCAAGGCTCCTCCACTCCGGGAAGTATTGATCAGTACGATGTCCAGAGAGATGAC	216

EMBOSS_001	AGCAGCGACGGCTCCTTGAAGACGATGACTACCACGTTACGACGGAACGGTCATTACC	360
EMBOSS_002	AGCAGCGACGGCTCCTTGAAGACGATGACTACCACGTTACGAA-----	260

EMBOSS_001	ATGCCACGGAGT	373
EMBOSS_002	-----	260

Resim 3.7: 48 numaralı örneğinin değiştirilen *MSTN* gen bölgesinin alignment sonuçları.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

EMBOSS_001	ATGCAAAACTGCAAATCTTTGTTTATATTTACCTATTTATGCTGCTTGTGCTGGCCCA	60
EMBOSS_002	-----CAGATCTTTGTTTATATTTACCTATTTATGCTGCTTGTGCTGGcccA	48
	* * *	
EMBOSS_001	GTGGATCTGAATGAGAACAGCGAGCAGAGGAAATGTGGAAAAAAGGGGCTGTGTAAT	120
EMBOSS_002	GTGGATCTGAATGAGAACAGCGAGCAGAGGAAATGTGGAAAAAAGGGGCTGTGTAAT	108

EMBOSS_001	GCATGCTTGTGGAGACAAAACAATAAATCCTCAAGACTAGAAGCCATAAAAAATCCAAATC	180
EMBOSS_002	GCATGCTTGTGGAGACAAAACAATAAATCCTCAAGACTAGAAGCCATAAAAAATCCAAATC	168

EMBOSS_001	CTCAGTAAGCTTCGCCTGGAAACAGCTCCTAACATCAGCAAAGATGCTATAAGACAACCTT	240
EMBOSS_002	CTCAGTAAGCTTCGCCTGGAAACAGCTCCTAACATCAGCAAAGA-----	212

EMBOSS_001	TTGCCCAAGGCTCCTCCACTCCGGGAAGTATTGATCAGTACGATGTCCAGAGAGATGAC	300
EMBOSS_002	-----	212
EMBOSS_001	AGCAGCGACGGCTCCTTGAAGACGATGACTACCACGTTACGACGGAACGGTCATTACC	360
EMBOSS_002	-----	212
EMBOSS_001	ATGCCACGGAGT	373
EMBOSS_002	-----	212

Resim 3.8: Değişim olmamış *MSTN* geninin alignment sonuçları.

4.TARTIŞMA

Son yıllarda gen düzenleme nükleazları, genetiği değiştirilmiş hayvanlar elde etmek için zaman, maliyet ve çabayı azaltarak, transgenез alanında devrim yaratmıştır. Çiftlik hayvanlarında genetik modifikasyon, hayvanların evcilleştirilmesiyle başlayan uzun bir süreci içermektedir. Bununla birlikte, bugüne kadar pek çok geviş getiren türde embriyo üzerinde CRISPR/Cas9 sisteminin kullanımına dair literatüre rastlanılmamıştır.

Transgenikler, yeni allellerin ve özelliklerin çiftlik hayvanlarına girmesine izin veren ilk büyük dönüm noktasını işaret etmektedir. Bu, somatik hücre nükleer transferi (SCNT) ile kombinasyon halinde genetiği değiştirilmiş çiftlik hayvanlarının üretilmesine olanak sağlamaktadır. ZFN'ler, TALEN'ler ve CRISPR-Cas9 gibi genom düzenleyicilerinin yakın zamanda keşfi ve başarılı bir şekilde doğrulanması, artık SCNT ihtiyacını atlayarak doğrudan zigotta genetik modifikasyona izin vermektedir. Genom düzenleme yöntemleri arasında CRISPR-Cas9, çiftlik hayvanlarının genom düzenlemesi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Sistem, Cas9 proteinini (tek kılavuz RNA, sgRNA) yüklemeye izin veren evrensel bir dizi (tracr) ile birlikte bir kılavuz olarak 17–20 nükleotid RNA dizisi (aralayıcı) kullanmaktadır. Önceden kompleksleştirilmiş bir Cas9 proteini ve sgRNA ribonükleoprotein kompleksi (RNP) hedef hücreye veya embriyoya iletildiğinde, Cas9 hedef DNA bölgelerinde çift sarmallı kopmalar meydana getirmektedir. Daha düşük bir frekansta, çift zincir kopmaları, homolog onarım şablonunun varlığında homolojiye yönelik onarımdan (HDR) veya hataya açık homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) yollarıyla daha yüksek bir frekansta somatik hücrelerde koyun genomunu düzenleme fizibilitesini ve düzenleyicilerin zigotlara doğrudan aktarımını sağlamaktadır.

Genetik sıkıntıları önlemek için muhtemelen birden fazla verimli hayvanda düzenlemeler yapılması gerekecektir. Ancak, genom düzenleme çalışmalarında risk ve kanıta dayalı, orantılı ve küresel olarak uyumlu hale getirilmiş uygun düzenleyici çerçeveler, araştırmanın gerçekleşmesi için gerekli izinler bir problem olarak görülmektedir. Genomik varyasyonla ilgili sorulara ek olarak, genetik olarak tasarlanmış yavruların gebelik ve doğum sırasında annelerine genetik bilgiyi aktarabileceğine dair endişelerde bulunmaktadır. Bu, genom düzenleme de dahil olmak

üzere rekombinant DNA teknolojileriyle deneysel çalışma gerçekleştirmenin maliyetini daha da artırmakta ve ekonomik fizibilitesini ise azaltmaktadır.

Miyostatinin, iskelet kası büyüme inhibisyonunu düzenlediği bilinmektedir. Belirli genleri düzenlemek için kümelenmiş düzenli aralıklı kısa palindromik tekrarlar CRISPR/Cas9 teknolojisi kullanılarak çok sayıda genomu düzenlenmiş hayvan üretilmiştir. Bununla birlikte, bu tekniğin koyunlarda uygulandığına dair az sayıda araştırma bulunmaktadır. Türkiye ise koyunlarda böyle bir çalışma bulunmamakla birlikte, CRISPR/Cas9 yöntemi kullanılarak yapılan çalışmalar çoğunlukla hücre hatları üzerinedir.

Bu araştırmada, CRISPR-Cas9 teknolojisi kullanarak koyunlarda karkas miktarını ve randımanını artırmak için bir ön çalışma yapılmıştır. Hedef lokus olarak miyostatin geni seçilmiş, sgRNA ve Cas9'un sentetik mRNA'sı döllenmiş koyun embriyolarına in vitro olarak mikroenjeksiyonla aktarılmıştır. Böylelikle, MSTN mutant koyun embriyoları üretebilmek için CRISPR-Cas9 yönteminin başarı ile çalıştığı gösterilmiştir. Koyunlarda istenilen gen, CRISPR-Cas9 tekniği ve mikroinjeksiyon kullanılarak knock-out edilebilecektir.

Bu araştırmada, embriyoların yaşaması ve gelişimi, sgRNA ve Cas9 mRNA'ların sitoplazmaya mikro enjeksiyonundan etkilenmediği gözlemlenmiştir. Scotti vd. (2015), çalışmalarında mikroenjeksiyon sonrası fetal kayıp, doğum oranı ve doğum sonrası hayatta kalma oranlarında hiçbir farklılık tespit edilmediğini bildirmişlerdir. Bu veriler, mutant hayvanların evcil hayvanlar kadar sağlıklı olduğu fikrini akla getirmiştir.

Son yıllarda gen düzenleme nükleazları, genetiği değiştirilmiş hayvanlar elde etmek için zaman, maliyet ve çabayı azaltarak, transgenez alanında devrim yaratmıştır (Petersen vd., 2015). Bununla birlikte, türde CRISPR/Cas9 sisteminin ruminantlarda kullanıldığına dair literatüre rastlanmamıştır (Ni vd., 2014; Niu vd., 2017). Bu teknolojinin zigotların sitoplazmasına enjekte edildiğinde embriyoların hayatta kalması ve in vitro gelişme oranını olumsuz yönde etkilemediği gösterilmiştir. Bununla birlikte, bölünme oranı, daha önce *zona pellucidae* kırılmasına ve mikroenjeksiyona gönderilen zigotlarda gözlemlenen, kendiliğinden mikroenjeksiyon için gerekli olan embriyo manipülasyonundan etkilendiği gözlemlenmiştir (Makarevich vd., 2005). Döllenmeden

48 saat sonra hayatta kalan embriyoların gelişimini sürdürme ve döllenmeden sonraki 6. günde blastosist aşamasına ulaşma yeteneklerinde mikroenjeksiyonun hiçbir yan etkisi bulunmamıştır. Ek olarak, alıcılara transfer edilen mikroenjekte embriyoların % 41,5'i gebe kalabildiği ve term dönemine kadar geliştirildiğinden, genel prosedür yüksek bir doğurganlık oranına izin vermektedir. Tekniğin etkinliği, somatik hücre nükleer transferi ve diğer teknikler için bildirilen iyi bilinen bir sorundan kaçınarak gebelik sırasında hiçbir gebelik kaybının olmaması ile gösterilmiştir (Kalds vd., 2020). Ayrıca, mutant hayvanların üretimindeki verim oldukça yüksek gözlemlenmiştir. Benzer bir çalışmada ileri evre olarak blastosit aşamasından sonra doğum aşaması incelenmiş olup, sonuçların doğumdan sonra doğrulandığı bildirilmiştir. T7EI testi ve dizileme ile analiz edilen 22 doğan kuzudan on tanesi mutant (% 45,5) gözlemlenmiştir. Bu kuzulardan 5'i (yani mutasyona uğramış olanların % 50'si), miyostatin eksikliği olan bir fenotipi indükleyen bialelik knock-out'lu yapıda olduğu bildirilmiştir (Ding vd., 2020). Bu çalışmada, CRISPR/Cas9 sistemi ile alınan verim, çiftlik hayvanlarında bildirilen diğer tekniklere göre daha yüksek bulunmuştur.

Genel olarak, pronükleer mikroenjeksiyonun bazı sonuçları, nükleer transferle ilgili çeşitli zorlukları ve iyi kalitede lentiviral vektörleri üretmeye yönelik teknik zorluklar ile transgenik teknolojilerin dünya çapında yeni laboratuvarlara yayılmasını sınırlandırmıştır. Yapılan bir çalışmada, farelerin veya sıçanların CRISPR/Cas9 kullanılarak oluşturulan *mdx* geninde mutasyona uğradığını gösterilmiştir (Ge vd., 2020). Bazı çalışmalarda (Wu vd., 2018), TALEN ile mutasyonun yavrulara aktarılmasında sonuca bildirilmiştir. Koyunlarda yaptığımız bu araştırmadan elde edilen sonuçlar, CRISPR/Cas9'un, somatik hücre nükleer transferi ile karşılaştırıldığında, mutant hayvan üretmek için daha kolay, daha hızlı ve daha etkili bir teknik olduğunu göstermektedir.

CRISPR/Cas9 sisteminin yanı sıra ZFN'ler veya TALEN'lerin kullanılması sonucu oluşan beklenmeyen etkiler, belirli bir gen için knock-out hayvanları elde etmeye çalışırken sorun olabilmektedir. Bununla birlikte, bu olumsuz etkilerin çoğu, genetiği değiştirilmiş hayvanlarda gözlemlenebilmektedir (Wu vd., 2018). Ayrıca, mutasyona uğramış koyunların evcil koyunlar ile üremesi, yavrulardaki potansiyel hedef dışı mutasyonların seyreltilmesi ile sonuçlanmıştır (Fu vd., 2013). Daha fazla

özgüllük isteniyorsa, bu zorluğun üstesinden gelmek için, sadece bir DNA zincirini veya daha düşük etkiler gösteren daha kısa sgRNA'ları parçalayabilen Cas9 mutantlarının üretilmesi gibi stratejiler tasarlanması önerilmektedir (Ran vd., 2013; Rodríguez vd., 2019). Bizim araştırmamızda, sadece iki yumurta mutasyona uğratılmış ve yalnızca bir kodlamayan bölge tespit edilmiştir. Bu çalışma bir ön çalışma niteliğinde olduğu için olumsuz etkiler araştırılmamıştır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

CRISPR/Cas9 teknolojisine daha fazla laboratuvar tarafından kolay erişim ve eksojen genler eklenmediğinden, makul düzenleyici standartlar, hayvan endüstrisinde gen düzenleme sistemleri için umut verici bir gelecek vadetmektedir.

CRISPR/Cas9 teknolojisi muhtemelen gelecekte, bu dizilerin homolog rekombinasyon yoluyla sık ve yüksek transgen ekspresyonuna izin veren lokusların dahil edilmesi yoluyla çok daha yüksek verimlilikle rekombinant proteinler üretmek için, eksojen dizileri barındıran hayvanlar üretmek için de kullanılabilir.

Bu araştırmada, Türkiye’de ilk kez CRISPR/Cas9 teknolojisi kullanarak koyunlarda karkas miktarını ve randımanını artırmak için bir ön çalışma yapılmıştır. Hedef lokus olarak miyostatin geni seçilmiştir. Bu amaçla, sgRNA ve Cas9'un sentetik mRNA'sı döllenen koyun embriyolarına in vitro olarak mikroenjeksiyonla aktarılmıştır ve *MSTN* mutant koyun embriyoları başarı ile üretilebilmiştir. Bu araştırma, koyunlarda istenilen gende, CRISPR-Cas9 tekniği ve mikroenjeksiyon kullanılarak knock-out edilebileceğini ortaya koymuştur. Sonuçlar yerli koyunlarının ırk yapısını bozmadan verimlerinin de artırılabilirliğini göstermektedir. Ayrıca, elde edilen sonuçlar genetik hastalıklara yönelik tedavi çalışmalarına da fikir oluşturacaktır. Hayvanların verimlerinin artırılması ve uygulanacak etkin ıslah çalışmalarıyla ülke ekonomisini büyük ölçüde katkı sağlanabilecektir. Sonuçta hem insanların hem de hayvanların sağlıklı yaşamasına, ayrıca ülkelerin de refah düzeyinin artmasına katkı sağlayacaktır.

Sonuç olarak çalışmamız, kas büyümesini ve vücut ağırlığını artırmak için etkili bir şekilde CRISPR/Cas9 sistemini kullanarak sağlıklı myostatin knock-out’lu kuzularının üretimi için bir ön adım oluşturacaktır. CRISPR/Cas9 sistemi kullanarak çiftlik hayvanlarında verimlerin artırılması, yerli ırklarının genetik yapılarının iyileştirmek için daha fazla sayıda çalışmaya gereksinim bulunmaktadır.

6. KAYNAKLAR

- Aiello D., Patel K., Lasagna E. (2018). The myostatin gene an overview of mechanisms of action and its relevance to livestock animals. *Animal Genetics*, 49 (6): 505–519.
- Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romero A., Horvath P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 315 (5819): 1709–1712.
- Basu S., Azadeh A., Justin O., Gladys S., Michelle A., Timothy D. (2015). Silencing of end-joining repair for efficient site-specific gene insertion after TALEN/CRISPR Mutagenesis in *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 112 (13): 4038–4043.
- Bolotin A., Benoit Q., Alexei S.S., Dusko E. (2005). Clustered Regularly Interspaced Short Palindrome Repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, 151 (8): 2551–2561.
- Budker V., Zhang G., Danko I., Williams P., Wolff J. (1998). The efficient expression of intravascularly delivered DNA in rat muscle. *Gene Ther*, 5 (2): 272–276.
- Buehring N., Binkley B. (2013). Myostatin- the holy grail for muscle, bone, and fat. *Current Osteoporosis Reports*, 11 (4): 407–414.
- Carlson F., Wenfang T., Simon L., Dana S., Chris P. (2012). Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 109 (43): 17382–17387
- Chang C., Reese S. (1990). Changes in membrane structure induced by electroporation as revealed by rapid-freezing electron microscopy. *Biophys J*, 58 (1): 1–12.
- Chen H., Choi J., Bailey S. (2014). Cut site selection by the two nuclease domains of the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Journal of Biological Chemistry*, 289 (19): 13284–13294.

- Cheng L., Ziegelhoffer R., Yang S. (1993). In vivo promoter activity and transgene expression in mammalian somatic tissues evaluated by using particle bombardment. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90 (10): 4455–4459.
- Chi Z, Xu Q., Zhu L. (2020). A Review of Recent Advances in Robotic Cell Microinjection. *IEEE Access*, 8: 8520–8532, DOI: 10.1109/ACCESS.2020.2964305
- Cho H., Seung W., Sojung K., Jong Min K., Jin Soo K. (2013). Targeted Genome Engineering in Human Cells with the Cas9 RNA-Guided Endonuclease. *Nature Biotechnology*, 31 (3): 230–232.
- Chylinski K., Le R., Charpentier E. (2013). The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems. *RNA biology*, 10 (5): 726–737.
- Cong L., Ran F., Barretto S., Zhang F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339 (6121): 819–823.
- Dadashpour D.N. (2019). Production of transgenic animal: Microinjection, electroporation, and nuclear transfer. *Veterinary Researches Biological Products*, 13-19. DOI: 10.22092/VJ.2019.125297.1558
- Dalbo J., Roberts D., Hassell S., Kerkick M. (2012). Effects of pre-exercise feeding on serum hormone concentrations and biomarkers of myostatin and ubiquitin proteasome pathway activity. *European Journal of Nutrition*, 52 (2): 477–487.
- Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C., Gonzales K., Chao Y., Pirzada M. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 471 (7340): 602–607.
- Ding Y., Shi Z., Qiang D., Bei C., Xiao Z., Shu Z., Miao J., Xiao W., Bao hua M., Yu lin C. (2020). The CRISPR/Cas9 Induces Large Genomic Fragment Deletions of *MSTN* and Phenotypic Changes in Sheep. *Journal of Integrative Agriculture* 19 (4): 1065–1073.
- Dutra B., Bueno G., Silva N., Nakahara H., Selistre S., Nonaka O. (2012). Expression of myostatin, myostatin receptors and follistatin in diabetic rats submitted to exercise. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 39 (5): 417–422.

- Eisenbraun D., Fuller H., Haynes R. (1993). Examination of parameters affecting the elicitation of humoral immune responses by particle bombardment mediated genetic immunization. *DNA Cell Biol.*, 12 (9): 791–797.
- Esposito P., Picciotto D., Battaglia Y., Costigliolo F., Viazzi F., Verzola D. (2022). Myostatin Basic biology to clinical application. *Advances in Clinical Chemistry*, 106: 181–234.
- Fu Y., Jennifer F., Morgan M., Deepak R., Keith J., Jeffry S. (2013). High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nature Biotechnology*, 31 (9): 822–826.
- Gao X., Kim K.S., Liu D. (2007). Non-viral gene delivery: what we know and what is next. *AAPS J*, 9(1): E92-104. DOI: 10.1208/aapsj0901009.
- Garneau J.E., Dupuis M.È., Villion M., Romero D.A., Barrangou R., Boyaval P., Moineau S. (2010). The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 468 (7320): 67-71.
- Gasiunas G., Barrangou R., Horvath P., Siksnys V. (2012). Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109 (39): E2579–E2586.
- Gök Z., Tunalı B.Ç. (2016). CRISPR-Cas İmmün Sisteminin Biyolojisi, Mekanizması ve Kullanım Alanları. *International Journal of Research and Development*, 8, (2): 11–23.
- Hadj S., Monteil A., Sauvart J., Atgie C. (2012). Overexpression of caveolin-3-enhanced protein synthesis rather than proteolysis inhibition in C2C12 myoblasts: relationship with myostatin activity. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 68 (4): 683–690.
- Hamann A., Albert N., Angela K. (2019). Nucleic acid delivery to mesenchymal stem cells a review of nonviral methods and applications. *BMC Journal of Biological Engineering*, 13:7. DOI: 10.1186/s13036-019-0140-0. eCollection 2019.
- Hansen K., Debra T. (2018). Generation of high specificity antibodies against membrane proteins using DNA gold micronanoplexes for gene gun immunization. *Current protocols in protein science*, DOI: 10.1002/cpp.50.

- Hao J., Li K., Kao W., Liu Y. (2010). Gene delivery to cornea. *Brain Res Bull*, 81 (2-3): 256–261.
- Haynes F.E.M , Greenwood P.L., McDonagh M.B., McMahon C.D., Nicholas G.D., Berry C.J., Oddy V.H. (2013). Lack of association between allelic status and myostatin content in lambs with the myostatin g+6723G>A allele. *J Anim Sci.*, 91 (1): 78-89.
- Heiser C. (1994). Gene transfer into mammalian cells by particle bombardment. *Anal Biochem*, 217 (2): 185–196.
- Hickford J. G. H., Forrest R. H., Zhou H. (2009). Association between a g.+6723G-A SNP in the myostatin gene (*MSTN*) and carcass traits in New Zealand Texel sheep. *J Anim Sci.*, 87(6):1853.
- Hill E., Fonseca W., McGivney G. (2012). *MSTN* genotype (g.66493737C/T) association with speed indices in Thoroughbred racehorses. *Journal of Applied Physiology*, 112(1): 86–90.
- Hirvonen J., Kalia N., Guy H. (1996). Transdermal delivery of peptides by iontophoresis. *Nat Biotechnol*, 14 (13): 1710–1713.
- Horvath P., Romero A., Coûté M., Richards C., Deveau M., Moineau H., Boyaval S., Fremaux P., Barrangou R. (2008). Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Bacteriology*, 190 (4): 1401–1412. DOI: 10.1128/JB.01415-07.
- Houk E., Hochhaus G., Hughes A. (1999). Kinetic modeling of plasmid DNA degradation in rat plasma. *AAPS Pharm Sci*, 1(3): E9. DOI: 10.1208/ps010309.
- Hryhorowicz M., Lipiński D., Zeyland J., Słomski R. (2017). CRISPR/Cas9 immune system as a tool for genome engineering. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 65 (3): 233–240.
- Hsu P., Lander D., Zhang F.(2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 157 (6): 1262–1278.

- Jacinto P., Filipe V., Wolfgang L., Bibiana F. (2020). CRISPR/Cas9-mediated genome editing: from basic research to translational medicine. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 24 (7): 3766–3778.
- Janik E., Marcin N., Michal C., Lukasz K., Joanna S., Michal B. (2020). Various aspects of a gene editing system CRISPR–Cas9. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24): 9604. DOI: 10.3390/ijms21249604.
- Jansen R., Embden D., Gaastra W., Schouls M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular microbiology*, 43 (6): 1565–1575.
- Jiang F., Doudna J.A. (2017). CRISPR–Cas9 structures and mechanisms. *Annual review of biophysics*, 46: 505-529.
- Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna A., Charpentier E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337 (6096): 816–821.
- Jinturkar A., Rath N., Misra A. (2011). Gene Delivery Using Physical Methods. Challenges in Delivery of Therapeutic Genomics and Proteomics, Elsevier, p: 83–126.
- Jo Y., Hyongbum K., Suresh R. (2015). Recent Developments and Clinical Studies Utilizing Engineered Zinc Finger Nuclease Technology. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72 (30): 3819–3830.
- Kagawa Y., Inoki Y., Endo H. (2001). Gene therapy by mitochondrial transfer. *Adv Drug Del Rev*, 49(1-2): : 107–119.
- Kalds P., Yawei G., Shiwei Z., Bei C., Xingxu H., Xiaolong W., Yulin C. (2020). Redesigning small ruminant genomes with CRISPR toolkit overview and perspectives. *Theriogenology*, 147: 25–33.
- Khalil M. (2020). The Genome Editing Revolution: Review. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 18 (1): 68. DOI: 10.1186/s43141-020-00078-y.
- Kim J., Greenleaf F., Kinnick R., Bronk T., Bolander E. (1996). Ultrasound-mediated transfection of mammalian cells. *Hum Gene Ther*, 7 (11): 1339–1346.

- Klein T., Wolf E., Wu R., Sanford J. (1987). High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature*, 327 (6117): 70–73.
- Lawrie A., Briskin A., Francis S., Cumberland D., Crossman D., Newman C. (2000). Microbubble-enhanced ultrasound for vascular gene delivery. *Gene Ther*, 7 (23): 2023–2027.
- Lechardeur D., Sohn J., Haardt M., Joshi B., Monck M., Graham W. (1999). Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer. *Gene Ther*, 6 (4): 482–497.
- Li Y. (2020). Expression of neprilysin in skeletal muscle by ultrasound-mediated gene transfer (sonoporation) reduces amyloid burden for AD. *Molecular Therapy-Methods Clinical Development*, 17: 300-308.
- Liu C., Xie W., Gui C., Du Y. (2013). Pronuclear microinjection and oviduct transfer procedures for transgenic mouse production. *Methods Mol Biol.*, 1027: 217-232.
- Liu F., Song Y., Liu D. (1999). Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther.*, 6 (7): 1258–1266.
- Long K., Chengzu Y., Leonela A., Rhonda B., Eric O. (2016). Genome editing of monogenic neuromuscular diseases: A systematic review. *JAMA Neurology*, 73 (11): 1349-1355
- Lu J., Ren H., Sheng X., Zhang X., Li S., Zhao F., Zhou X., Zhang L. (2012). Transcript characteristic of myostatin in sheep fibroblasts. *Journal of Cellular Biochemistry* 113 (8): 2652–2660.
- Makarevich V., Chrenek P., Zilka N., Pivko J., Bulla J. (2005). Preimplantation development and viability of in vitro cultured rabbit embryos derived from in vivo fertilized gene-microinjected eggs: Apoptosis and ultrastructure analyses. *Zygote*, 13 (2): 125–137.
- Makarova S., Grishin V., Shabalina A., Wolf I., Koonin V. (2006). A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biology direct*, 1: 7. DOI: 10.1186/1745-6150-1-7.

- Marraffini A., Sontheimer J. (2010). CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nature Reviews Genetics*, 11 (3): 181-190.
- McCabe M., Swain E., Martinell B., Christou P (1988). Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *Nature Biotechnology*, 6: 923–926.
- Melkonyan H., Sorg C., Klempt M. (1996). Electroporation efficiency in mammalian cells is increased by dimethyl sulfoxide (DMSO). *Nucleic Acids Res*, 24 (21): 4356–4357.
- Mitragotri S., Blankschtein D., Langer R. (1996). Transdermal drug delivery using low-frequency sonophoresis. *Pharm Res.*, 13 (3): 411–420.
- Mojica F., Díez V., García M., Almendros C. (2009). Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*, 155 (3): 733–740.
- Monestier O., Brun C., Heu K., Passet B., Malhouroux M., Magnol L., Vilotte L., Blanquet, V. (2012). Ubiquitous Gasp1 overexpression in mice leads mainly to a hypermuscular phenotype. *BMC Genomics*, 13: 541. DOI: 10.1186/1471-2164-13-541.
- Mosler S., Pankratz C., Seyfried A., Piechotta M., Diel P. (2011). The anabolic steroid methandienone targets the hypothalamic pituitary testicular axis and myostatin signaling in a rat training model. *Archives of Toxicology*, 86 (1): 109–119.
- Ni W., Jun Q., Shengwei H., Xinxia Z., Misha R., Min Y., Irina P., Chuangfu C. (2014). Efficient Gene Knockout in Goats Using CRISPR/Cas9 System. *PLoS One*, 9 (9): e106718. DOI: 10.1371/journal.pone.0106718. eCollection 2014.
- Niu Y., Yi D., Xiaolong W., Yulin C. (2017). Multiplex Gene Editing via CRISPR/Cas9 System in Sheep. *Bio Protocol*, 7 (13): e2385. DOI: 10.21769/BioProtoc.2385.
- Oh Y., Leung L., Bommaman D., Guy H., Potts O. (1993). Effect of current, ionic strength and temperature on the electrical properties of skin. *J Control Release*, 27(2): 115–125

- Pepperkok R., Zanetti M., King R., Delia D., Ansorge W., Philipson L, (1988). Automatic microinjection system facilitates detection of growth inhibitory mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85 (18): 6748–6752.
- Peters M., Silvis M.R., Zhao D., Hawkins J.S., Gross A. (2015). Bacterial CRISPR accomplishments and prospects. *Curr Opin Microbiol*, 27: 121-126.
- Petersen H., Bjoern B., Heiner N. (2015). Molecular scissors and their application in genetically modified farm animals. *Transgenic Research*, 24 (3): 381–396.
- Proudfoot M., Chris D., Daniel C., Rachel H., Charles L., Jane P., Tim K., Simon L. (2015). Genome edited sheep and cattle. *Transgenic Research*, 24 (1): 147–153.
- Ran U., Ann F., Patrick H., Chie Yu L., Jonathan G., Silvana K., Alexandro T., David S. (2013). XDouble nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 154 (6): 1380–1389.
- Rettig R., Rice G. (2007). Non-viral gene delivery: from the needle to the nucleus. *Expert Opin Biol Ther.*, 7 (6): 799-808
- Rodríguez R., Diana R., Ramiro S., Mario A., Garza E. (2019). Genome Editing: A perspective on the application of CRISPR/Cas9 to study human diseases (Review). *Int J Mol Med.*, 43 (4): 1559–1574.
- Rothschild J. (2020). Ethical considerations of gene editing and genetic selection. *J Gen Fam Med.*, 21 (3): 37-47.
- Saitoh D., Takayama K., Hitachi T., Hayashi Y. (2020). Discovery of a follistatin-derived myostatin inhibitory peptide. *Bioorg Med Chem Lett.*, 30 (3): 126892.
- Salsman J., Dellaire G. (2017). Precision Genome Editing in the CRISPR Era. *Biochem Cell Biol.*, 95 (2): 187-201.
- Sanford C., Smith F.D., Russell A. (1993). Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Methods Enzymol*, 217: 483–509.
- Sapranaukas R., Gasiunas G., Fremaux C., Barrangou R., Horvath P., Siksnys V. (2011). The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.*, 29 (21): 9275–9282.

- Sazonova C., Margarita A. (2019). Creation of cultures containing mutations linked with cardiovascular diseases using transfection and genome editing. *Current Pharmaceutical Design*, 25 (6): 693-699.
- Scotti N., Sannino L., Idoine A., Hamman P., De Stradis A., Giorio P., Maréchal-Drouard L., Bock R., Cardi T. (2015). The HIV-1 Pr55gagpolyprotein binds to plastidial membranes and leads to severe impairment of chloroplast biogenesis and seedling lethality in transplastomic tobacco plants. *Transgenic Research*, 24 (2): 319–331.
- Sharma M., McFarlane C., Kambadur R., Kukreti H., Bonala S., Srinivasan S. (2015). Myostatin expanding horizons. *IUBMB Life*, 67 (8): 589–600.
- Takeshita S., Isner M. (1999). Peripheral angiogenesis: therapeutic angiogenesis for peripheral vascular occlusive disease. *Curr Interv Cardiol.*, 1(2): 147–56.
- Tang D., Zhu H., Wu J., Chen H., Zhang Y., Zhao X., Chen X., Du W., Wang D., Lin X. (2012). Silencing myostatin gene by RNAi in sheep embryos. *Journal of Biotechnology*, 158 (3): 69–74.
- Te-hui C., Subhabrata B., Shan L. (2004). Gene delivery using physical methods: an overview. In: *Methods in molecular biology*, Humana Press, New Jersey, USA, p:147–165.
- Topçu İ., Duran T. (2021). Gen düzenleme teknolojileri tarihi. *Genetik Müdahale ve Etik Tartışmalar*. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri, p: 5-13.
- Uddin H., Rudin C.M., Triparna S. (2020). CRISPR gene therapy: Applications, limitations, and implications for the future. *Frontiers in Oncology*. 10: 1387. DOI: 10.3389/fonc.2020.01387. eCollection 2020.
- Verma M., Somia N. (1997). Gene therapy promises, problems and prospects. *Nature*, 389 (6648): 239–242.
- Wang X., Yiyuan N., Jiankui Z., Honghao Y., Qifang K., Anmin L., Xiaoe Z., Yan H., Cai B., Shen Q., Zhou S., Zhu H., Zhou G., Niu V., Hua J., Jiang Y., Huang X., Ma B., Chen Y. (2016). Multiplex gene editing via CRISPR/Cas9 exhibits desirable muscle hypertrophy without detectable off-TargetEffects in sheep. *Scientific Reports*, 6: 32271. DOI: 10.1038/srep32271.

- Wang Y., Zeng L., Song W., Liu J. (2022). Influencing factors and drug application of iontophoresis in transdermal drug delivery: An overview of recent progress. *Drug Delivery and Translational Research*, 12 (1): 15–26.
- Wells D.J. (2004). Gene therapy progress and prospects: electroporation and other physical methods. *Gene Ther.*, 11(18): 1363–1369.
- Wilkinson R., Wiedenheft B. (2014). A CRISPR method for genome engineering. *F1000prime reports*, 6: 3. DOI: 10.12703/P6-3. eCollection 2014.
- Williams R., Johnston S., Riedy M., DeVit M., McElligott S., Sanford J. (1991). Introduction of foreign genes into tissues of living mice by DNA-coated microprojectiles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88 (7): 2726–2730.
- Wolff J.A., Malone R.W., Williams P., Chong W., Acsadi G., Jani A, Felgner P.L. (1990). Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*, 247 (4949 Pt 1): 1465–1468.
- Wu M, Lixin D, Ruizao L, Caihong W, Yayu W, Li Y, Jiafan L, Yuqin W, Chuduan W, Xiaogang W. (2018). Double-Musclcd Phenotype in Mutant Sheep Directed by the CRISPRCas9 System Cloning Transgenesis 3–7.
- Wu X., Ma W., Mei C., Chen X., Yao Y., Liu Y., Qin X., Yuan Y. (2020). Description of CRISPR/Cas9 development and its prospect in hepatocellular carcinoma treatment. *J Exp Clin Cancer Res*, 39 (1): 97.DOI:10.1186/s13046-020-01603-0.
- Wyber A., Andrews J., D'Emanuele A. (1997). The use of sonication for the efficient delivery of plasmid DNA into cells. *Pharm Res* 14 (6): 750–756.
- Xu Q. (2018). Review of microinjection systems. *Micromachines for Biological Micromanipulation*. Springer Cham, p: 15-47.
- Xue L., Dong X., Zhang X., Diallo A. (2012). Organization and functional analysis of the 5' flanking regions of myostatin-1 and 2 genes from *Larimichthys crocea*. *DNA and Cell Biology*, 31 (5): 845–855.
- Yang N., Burkholder J., Roberts B., Martinell B., McCabe D. (1990). In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc Nat Acad Sci USA*, 87 (24): 9568–9572.

- Yeo N.C., Chavez A., Lance-Byrne A., Chan Y., Menn D., Milanova D, Kuo C.C., Guo X., Sharma S., Tung A., Cecchi R.J., Tuttle M., Pradhan S., Lim E.T., Davidsohn N., Ebrahimkhani M.R., Collins J.J., Lewis N.E., Kiani S., Church G.M. (2018). An Enhanced CRISPR Repressor for Targeted Mammalian Gene Regulation. *Nature Methods*, 15 (8): 611–616.
- Yi L., Jinming L. (2016). CRISPR-Cas9 Therapeutics in Cancer Promising Strategies and Present Challenges. *Biochimica Biophysica Acta Reviews on Cancer*, 1866 (2): 197–207.
- Young S., Searle F., Onion D., Mautner V. (2006). Viral gene therapy strategies from basic science to clinical application. *J Pathol*, 208 (2): 299–318.
- Zhang G., Gao X., Song Y.K., Vollmer R., Stolz D.B., Gasiorowski J.Z., Dean D.A., Liu D. (2004). Hydroporation as the mechanism of hydrodynamic delivery. *Gene Ther.*, 11 (8): 675–682.
- Zhang S., Guo F., Yan W., Dai Z., Dong W., Zhou J., Zhang W., Xin F., Jiang M. (2020). Recent advances of CRISPR/Cas9-based genetic engineering and transcriptional regulation in industrial biology. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7: 459. DOI: 10.3389/fbioe.2019.00459.

