

CRISPR/Cas 9 Temelli Teknolojilerin Farmakoloji Alanında Uygulamaları: Geleneksel Derleme

Applications of CRISPR/Cas 9 Based Technologies in the Field of Pharmacology: A Traditional Review

¹ Sena USTAÖMER^a, ² Yeşim KAYA YAŞAR^b

^aKaradeniz Teknik Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Eczacılık Meslek Bilimleri Bölümü, Trabzon, Türkiye

^bKaradeniz Teknik Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji ABD, Trabzon, Türkiye

ÖZET RNA tabanlı nükleaz sistemi olan CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) temelli genom düzenleme teknolojisi, bakterilerin plazmit veya nükleik asit içeren viral kapsidlere karşı geliştirdiği direnç mekanizmalarından biridir. CRISPR/Cas sistemi yabancı DNA'ya ait küçük DNA parçalarının prokaryotik hücrenin genomuna katılmasını sağlar. Böylece konakçı hücrenin aynı istilacı ile yeniden karşılaşması durumunda, adaptif bağışık yanıt devreye girer. CRISPR/Cas sistemi çeşitli viral vektörler ve lipid partiküller gibi taşıyıcı sistemler ile biyolojik ortamlara uygulanarak hücrelerin genomunda değişiklik yapılmasını sağlar. Bu nedenle CRISPR/Cas sistemi beta talasemi, orak hücreli anemi, duchenne kas distrofisi, transtiretin amiloidosis ve Leber konjenital amorozisi gibi hastalıklarda genomda mutasyondan etkilenen bölgeyi düzeltmek amacıyla kanser gibi hastalıklarda ise terapötik strateji olarak prelinik ve klinik çalışmalarda değerlendirilmektedir. Makalede CRISPR/Cas sistemi açıklanarak; literatürde bu sistemin biyolojik ortamlara uygulandığı, genetik hastalıklar ve kanser gibi çeşitli klinik durumların tedavisinde etkinliği ve güvenilirliğinin değerlendirildiği araştırmaların sonuçları sistematik şekilde derlenerek sunulmuştur.

ABSTRACT CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)-based genome technology, which is an RNA-based nuclease system, is one of the resistance mechanisms developed by bacteria against viral capsids containing plasmid or nucleic acid. The CRISPR/Cas system provides that small DNA fragments of foreign DNA to be integrated into the genome of the prokaryotic cell and the adaptive immune response is activated when the host cell encounters the same invader again. The CRISPR/Cas system can be applied to biological systems with various vehicle systems such as viral vectors and lipid particles, allowing modifications to the genome of cell. Thus, in the event that the host cell encounters the same invader again, the adaptive immune response is activated. Furthermore, in order to correct the region affected by mutation in the genome in diseases such as beta thalassemia, sickle cell anemia, duchenne muscular dystrophy, transthyretin amyloidosis and leber congenital amorosis and also in cancer, CRISPR system is evaluated in preclinical and clinical studies as a therapeutic strategy. In this article, by explaining the CRISPR/Cas system, it was reviewed and presented the results of the studies in which this system was applied to biological environments and the effectiveness and safety of the treatment of various clinical conditions such as genetic diseases and cancer in the literature.

Anahtar Kelimeler: CRISPR/Cas sistem; taşıyıcı sistemler; pre-klinik/klinik çalışmalar

Keywords: CRISPR/Cas systems; vehicle systems; preclinical and clinical studies

CRISPR SİSTEMİNİN TARİHÇESİ

CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) sistemi Nakata ve ark. tarafından

1987 yılında keşfedilmiştir. 2000 yılında ise keşfedilen tekrar dizilerinin prokaryotlarda yaygın olduğu tespit edilmiştir. 2002 yılında Jansen ve ark. tarafından yapılan tanımlanmanın ardından Cas protein gen-

Correspondence: Sena USTAÖMER

Karadeniz Teknik Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Eczacılık Meslek Bilimleri Bölümü, Trabzon, Türkiye

E-mail: ustaomer@gmail.com



Peer review under responsibility of Journal of Literature Pharmacy Sciences.

Received: 06 Mar 2023

Received in revised form: 08 May 2023

Accepted: 18 May 2023

Available online: 25 May 2023

2630-5569 / Copyright © 2023 by Türkiye Klinikleri. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

leri keşfedilmiştir. 2005 yılında bu tekrar dizilerini ayıran aralayıcı diziler olarak adlandırılan *spacer* ların yabancı orjinli oldukları görülmüştür. 2007 yılında CRISPR/Cas sisteminin adaptif bağışıklıkta rol oynadığı deneysel olarak kanıtlanmıştır. 2010 yılında *spacer* dizileri tarafından yönlendirilen Cas 9 enziminin hedef DNA'yı kestiği görülmüştür.¹⁻⁴ 2012 yılında Doudna, Charpentier ve ark. tarafından *Streptococcus pyogenes* ve *S. thermophiles*'teki Cas 9'un CRISPR RNA'ları (crRNA'lar) tarafından yönlendirilerek hedef DNA'da çift zincirli bir kırılma oluşturabileceği kanıtlanmıştır. 2013 yılında Doudna ve ark. ökaryot hücrelerde CRISPR/Cas 9 sistemleriyle genom düzenleme çalışmalarını yapmıştır.⁵⁻⁷ CRISPR/Cas 9'un akciğer kanseri tedavisindeki etkinliği 2016 yılında Çin'de klinik olarak incelenmiştir.⁷ CRISPR sistemi beta talasemi (BT), orak hücre gibi farklı hastalıkların tedavisi için klinik araştırmalarda incelenmektedir. CRISPR sisteminin gelişimi zaman çizelgesi olarak Şekil 1'de gösterilmiştir.

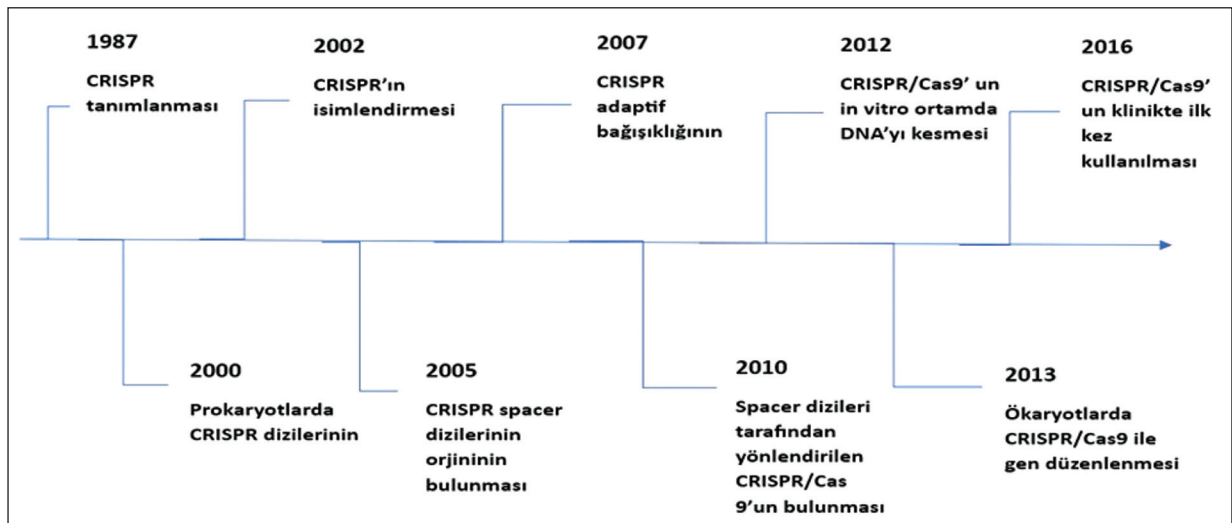
CRISPR/Cas sisteminden tarım, hayvancılık, gıda ve sağlık gibi birçok alanda yararlanılması bu teknolojinin gelişmesini sağlamıştır. 2020 Nobel Kimya Ödülü, CRISPR/Cas 9 genetik makası ile gen düzenlemeyi keşfeden Emmanuelle Charpentier ve Jennifer Doudna'ya layık görülmüştür.⁷⁻¹⁰

CRISPR/CAS SİSTEMİ

CRISPR temelli genom düzenleme teknolojisi, ilk kez bakteri gibi tek hücreli prokaryotlarda keşfedilmiş olan RNA tabanlı bir nükleaz sistemidir.

Prokaryotik canlılar, istilacı elemanlara karşı pek çok savunma mekanizması geliştirmektedir. CRISPR ilişkili Cas sistemi de bu direnç mekanizmalarından biridir. CRISPR/Cas sistemi sayesinde bakteri genomunu istila eden yabancı DNA'ya ait küçük DNA parçaları CRISPR lokusunda yer alan tekrar dizileri arasına katılır. Tekrar dizileri arasında bulunan aralayıcı (*spacer*) dizi ekzojen nükleik asit elementte *protospacer* olarak tanımlanmaktadır.⁷ *Protospacer* adı verilen dizinin sisteme özgü işaretleme sağlayan bir CRISPR motifi ile çevrelenmesi sonucu, *protospacer* bitişik motif yani PAM dizisi oluşmaktadır.¹¹ PAM dizisi sayesinde Cas sistemi bu işaretli bölgeyi keserek prokaryotik hücrenin genomuna katılmasına olanak sağlar. Konakçının aynı istilacı ile yeniden karşılaşması durumunda ise adaptif bağışık yanıtı devreye sokar. Prokaryotik canlılarda adaptif bağışıklığın devreye girmesinde önemli göreve sahip CRISPR dizileri ve Cas genleri farklılık gösterebilir ancak CRISPR lokusu ile bu lokusun bileşenleri ortaktır.¹²

CRISPR lokusu bileşenleri arasında palindromik tekrar dizileri, *spacer* olarak adlandırılan aralayıcı



ŞEKİL 1: CRISPR sisteminin gelişimini gösteren zaman çizelgesi.

DNA bölgeleri, transkripsiyonun başlamasına aracılık eden lider dizisi (promoter) ve Cas genleri yer almaktadır.

CRISPR SİSTEMİNİN SINIFLANDIRILMASI VE MODÜLASYONU

Cas genlerinin kompozisyonuna, tekrar dizilerine ve hedef genin kesilmesinden sorumlu crRNA-Cas protein kompleksine göre yapılan sınıflandırmada CRISPR/Cas sistemi 2 sınıfa ayrılmaktadır.¹³ Sınıf 1: Birden fazla alt birimden oluşan Cas efektör proteinlerinden oluşurken; Sınıf 2: Cas 9, Cas 12, Cas 13 gibi tek alt birime sahip Cas efektör proteinlerinden oluşmaktadır.¹¹

Hedef dışı etkileri önlemek, genom düzenleme etkinliğini artırmak için CRISPR/Cas proteinlerinin, sgRNA'ların ve CRISPR aracılı onarım mekanizmalarının modifiye edilmesi gerekmektedir. Sistemin özgülüğünü artırmak için Cas proteininin RuvC ve HNH domainlerinde mutasyon oluşturarak katalitik olarak inaktif Cas (dCas) varyantlar (dCas 9 ve dCas 12a) geliştirilmiştir.⁵ Böylece DNA üzerinde meydana gelen tek nükleotid polimorfizmleri kontrollü şekilde düzeltilebilmektedir. Cas 9 mRNA ve gRNA'larının her iki terminal ucunda gerçekleştirilen 2'-O-metil-3'-fosforotiyoat modifikasyonlarının Cas 9 aracılı genom düzenlemenin etkinliğini artırdığı tespit edilmiştir.¹⁴ CRISPR/Cas sistemiyle hedef gen bölgesinde kesim sonrası gen onarımı meydana gelmektedir. CRISPR aracılı onarım mekanizmaları homolojiye yönelik onarım [homology directed repair (HDR)] ve homolog olmayan uç birleştirme eş zamanlı olmak üzere 2 şekilde gerçekleşebilmektedir. Fakat kesilen hedef bölgenin onarılması ile yabancı tipteki gen dizilimini sağlamada HDR onarım mekanizmasının katkısı daha fazladır. Yapılan çalışmalarda, onarım mekanizmasını HDR'ye yönlendirmek için CRISPR sistemiyle birlikte kesilen gen bölgesi ile homolog DNA dizisi taşıyıcı sistem ile uygulanmaktadır. Bir dizi biyolojik molekülün, CRISPR aracılı HDR mekanizmasının verimliliğini artırdığı bilinmektedir (beta 3- adrenerjik reseptör agonisti *L755507*, ligaz IV inhibitörleri *Scr7*, *E1B55K* ve *E4orf6*, kinaz inhibitörlerinden *VE-822* ile *AZD-7762* gibi).¹⁵

CRISPR/CAS SİSTEMİYLE OLUŞAN ADAPTİF BAĞIŞIKLIK YANITI

Genel olarak CRISPR/Cas sisteminde oluşan bağışıklık yanıtının adaptasyon, ekspresyon ve interferans olmak üzere 3 aşamada gerçekleştiğini söyleyebiliriz.

Adaptasyon Süreci

İlk aşamada istilacı DNA 'sında yer alan *protospacer* sekansı CRISPR lokusuna eklenerek, yabancı DNA 'nın ayırt edilmesi ve doğal bağışık yanıtın modülasyonu sağlanmaktadır.

Ekspresyon Süreci

Ekspresyon sürecinde ilk olarak *spacer-repeat-spacer* dizisinden crRNA'nın transkript formu olan pre-crRNA (öncül crRNA) elde edilir. Pre-crRNA sentezinden sonra Cas genlerinin aktivasyonu ile crRNA oluşumu başlar. Böylece olgunlaşan crRNA'lar crRNA-efektör protein kompleksini oluşturur.¹³ Cas 9 proteini, crRNA-tracrRNA kompleksini tanıma lobu ile algılayarak bu komplekse bağlanmaktadır. Bu sırada bir endonükleaz olan RNaz III (Ribonükleaz III), kompleksi tekrar-antitekrar bölgesinden keserek, bireysel crRNA-tracrRNA birimlerini yani gRNA adı verilen rehber RNA'yı oluşturur. Cas 9 proteini, crRNA-tracrRNA birimine (gRNA) bağlanır.¹⁶

İnterferans Süreci

Ekspresyon aşamasında oluşturulan crRNA'lar tarafından homolog dizilerin spesifik bölünmesi için Cas nükleazlar yönlendirilir. crRNA Cas proteini ile CRISPR ribonükleoproteini (crRNP) oluşturur. crRNP yapısı da hedef nükleik asitte PAM'ı tanıyarak, istilacı nükleik asidin hedef bölgeden kesilmesini sağlar.^{17,18} Hedef DNA üzerinde kesim işlemi endonükleaz aktivitesi gösteren Cas 9 proteini tarafından gerçekleştirilir. Hedeflenen DNA'nın tamamlayıcı ipliğini Cas 9'un HNH domaini keserken, tamamlayıcı olmayan DNA ipliğini RuvC domaini kesmekle görevlidir.¹⁹

CRISPR SİSTEMİNİN BİYOLOJİK ORTAMLARA UYGULANMASINI SAĞLAYAN TAŞIYICI SİSTEMLER
CRISPR sistemlerinin biyolojik ortamlara uygulama yöntemleri viral taşıyıcı sistemler, viral olmayan ta-

şıyıcı sistemler ve fiziksel etkiye dayalı taşıyıcı sistemler olarak 3 gruba ayrılmıştır.

CRISPR'IN VİRAL TAŞIYICI SİSTEMLER İLE UYGULANMASI

CRISPR sistemi memeli hücrelerine penetre olup, virülsü olmayan viral vektörler ile taşınmaktadır. CRISPR sistemi adeno-ilişkili viral vektörler, tam boyutlu adenoviral vektörler ve lentiviral vektörler aracılığıyla biyolojik sistemlere uygulanabilmektedir. Viral vektörler CRISPR temelli sistemlerin in vivo uygulamalarında ve klinik çalışmalarda tercih edilmektedir. Ancak ex vivo ve in vitro çalışmalarda da kullanılmaktadırlar (Tablo 1).

CRISPR'IN VİRAL OLMAYAN TAŞIYICI SİSTEMLER ARACILIĞIYLA UYGULANMASI

CRISPR/Cas 9 sisteminin biyolojik ortamlara uygulanmasında yararlanılan viral olmayan yöntemler arasında lipozomlar ve lipid nanopartikülleri, lipopleksler ve polipleksler, altın parçacıkları ve diğer inorganik nanopartiküller, hücreye nüfuz eden peptidler ve daha yeni ve gelişmekte olan birkaç yöntem bulunmaktadır (Tablo 1).

FİZİKSEL ETKİLİ TAŞIYICI SİSTEMLER

0,5-5 mikrometrelik iğne yardımıyla hücre zarını delerek, uygulamanın yapıldığı *mikroenjeksiyon yöntemi*; yüksek voltajlı elektrik akımı ile hücre zarında nanometre çapında geçici açıklık oluşturarak, CRISPR sisteminin hücrelere uygulandığı *elektroporasyon yöntemi*; CRISPR bileşenlerini içeren çözeltilerin farelerin kuyruk venine uygulanmasıyla

TABLO 1: CRISPR/Cas 9 taşıyıcı sistemlerinin avantaj/dezavantajları ve uygulandığı çalışmalar.

Taşıyıcı sistemler	Avantajlar	Dezavantajlar	Uygulandığı çalışmalar	ClinicalTrials.gov numarası*
• Adeno ilişkili viral vektörler	• Daha hafif immün yanıt • In vivo uygulama imkânı	• Taşıyabileceği yük sınırı (CRISPR/Cas9 sistemi boyutu açısından)	• Leber konjenital amorozi Tip 10 Faz 1/2 aşamasındaki in vivo çalışmada AGN-151587'in subretinal enjeksiyonu (EDIT-101) (ClinicalTrials.gov numarası: NCT03872479) • PD-1 Metastatik küçük hücreli olmayan akciğer kanseri Faz 1 aşamasındaki ex vivo çalışmada CRISPR/Cas 9 ile düzenlenen T hücrelerinin infüzyonu (ClinicalTrials.gov numarası: NCT02793856)	
• Lentivirüs (LV) ve adenoviral vektörler	• Taşıyabileceği yük fazla • Ex vivo, in vivo, in vitro çalışmalarda uygulayabilme	• LV'nin memeli genomuna entegrasyon riski bulunmakta bu nedenle az tercih edilmekte		
• Lipozomlar	• Plazmit DNA, mRNA ve RNP şeklinde uygulama	• Lipozomal enzimlerin CRISPR/Cas9'a etkisi ile sistemin parçalanma olasılığı	• Faz 1 aşamasındaki transkriptin ilişkili (ATTR) ailesel amiloid polinöropati, transkriptin ilişkili (ATTR) ailesel amiloid kardiyomyopati in vivo çalışmasında LNP ile verilen CRISPR/Cas9 gen düzenleme sistemi infüzyonu (NTLA-2001) (ClinicalTrials.gov numarası: NCT04601051)	
• Altın nanopartiküller	• İnert taşıyıcı sistem • In vivo, in vitro, ex vivo çalışmalarda uygulayabilme • Mikroenjeksiyon • In vitro transkripsiyon aşaması gerekli değil • Mikroskop kullanımı gerektirmesi • Elektroporasyon • Uygulanacak hücrenin tipinden daha az etkilenme	• Stokün üretimini uyarmakta • Boyut kısıtlaması yok • Plazminin genom entegrasyonu • In vitro ve ex vivo kullanım • In vivo uygulama yok		• Orak hücreli anemi, • Beta talasemi Faz 1/2 aşamasındaki ex vivo çalışmada CRISPR/Cas9 ile düzenlenen otolog CD34+ HKPH'lerin infüzyonu (CTX001) (ClinicalTrials.gov numarası: NCT03745287, NCT03656578)
• Hidrodinamik Dağıtım	• Eksijen dağıtım bileşeni gerekli değil	• Sadece in vivo çalışmalarda uygulanabilme		

*CRISPR/Cas 9 sistemi ile yürütülen klinik araştırmaların yayımlandığı ClinicalTrials veri tabanına kayıtlı çalışma numarası. ATTR: Transkriptin amiloidöz; LNP: Lipid nanopartikül; HKPH: Hematopoietik kök ve prekürsör hücre.

elde edilen hidrodinamik basınçtan faydalanılarak hücre geçirgenliğinin artırıldığı hidrostatik dağıtım yöntemi fiziksel etkili taşıyıcı sistemler içerisinde yer almaktadır (Tablo 1).

CRISPR/CAS SİSTEMİNİN PREKLİNİK VE KLİNİK ÇALIŞMALARDAKİ UYGULAMALARI

BT ve Orak Hücreli Anemi

BT ve orak hücreli anemi (OHA) dünyada yaygın görülen ve ölümcül semptomlarla seyreden monogenik (tek gen üzerinde meydana gelen) hastalıklardır. Her yıl yaklaşık olarak 60.000 hastaya BT; 300.000 hastaya OHA tanısı konulduğu bilinmektedir.^{17,20} Bu hastalıklar, hemoglobinin β alt birim (HBB) genindeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır.

İnsanlarda hemoglobin (Hb) üretimi gelişimsel olarak düzenlenmektedir. Prenatal dönemde fetal HbF ekspresyonu baskındır ancak postnatal dönemde zamanla HbF ekspresyonu azalmaya ve erişkin HbA ekspresyonu artmaya başlamaktadır.

HbF iki α ve iki γ globin zincirinden oluşurken, HbA iki α ve iki β globin zincirinden oluşmaktadır. Bu da postnatal dönemde β globin seviyesinin artması ve γ globin seviyesinin azalması anlamına gelmektedir. BCL11A, bu düzenlemeden sorumlu olan, γ globin ekspresyonunu ve HbF'yi baskılayan bir transkripsiyon faktörüdür. Genom düzeyinde yürütülen çalışmalarda, bazı tek nükleotid polimorfizmleri (TNP) erişkinlerde HbF ekspresyonunun artmasıyla ilişkilendirilmiştir. Bu TNP'ler BCL11A ekspresyonunu azaltıp, HbF ekspresyonunu ve dolayısıyla γ globin sentezini artırarak BT ve OHA'da hastalığın belirtilerinin hafiflemesini sağlamaktadır.^{18,21}

Biri transfüzyona bağımlı talasemi (TBT) için yürütülen (NCT03655678) diğeri ise OHA için yürütülen (NCT03745287) Faz I/II klinik çalışmalarında, birer hastaya, BCL11A eritroide özgü *enhancer*'ı hedefleyen CRISPR ile düzenlenmiş CD34+ hücre infüzyonu (CTX001 infüzyonu) uygulanmıştır (Tablo 1). İki hastaya uygulanan CTX001 infüzyonunun da yüksek bir genetik düzenleme sıklığına sahip olduğu görülmüştür ve hedef dışı düzenleme kanıtı yoktur.

Her iki hasta klinik olarak incelendiğinde HbF seviyelerinde anlamlı bir artış gözlenmiştir. Bu rapo-

run yayınlanmasından sonra çalışmaya ek olarak 8 hastaya daha (6'sı TBT'li, 2'si OHA'lı) CTX001 uygulanmıştır ve 3 aydan fazla takip verisi elde edilmiştir. Elde edilen ilk etkinlik verilerinin, daha önceki iki hastanın bulgularıyla büyük ölçüde tutarlı olduğu görülmüştür.²² Bu çalışmalar kırk beşer katılımcıya genişletilmiş Faz 2/3 çalışmaları (NCT03655678 ve NCT03745287) olarak sürmektedir.^{23,24} Yapılmakta olan bir klinik çalışmada (NCT04819841), CRISPR ile orak mutasyonu düzeltilmiş bir insan otolog Hematopoietik kök ve prekürsör hücre (HKPH) ürünü olan GPH101 ilaç ürününün, ağır OHA hastalarında etkinliği ve güvenliği değerlendirilmektedir.¹⁹

β talasemi majör olan deneklerde γ globin geni CRISPR aracılığıyla yeniden aktive edilmiş otolog HKH'ler ile tedavinin güvenliğini ve etkinliğini değerlendirmeyi amaçlayan bir başka klinik çalışma (NCT04211480) ise devam etmektedir.²⁵ Daha kapsamlı çalışmalar yapıldıkça CRISPR teknolojisinin β talasemi ve OHA tedavisindeki etkinliği daha iyi anlaşılacaktır.

Duchenne Musküler Distrofi

Duchenne musküler distrofi (DMD), X kromozomunda distrofin genindeki mutasyonlara bağlı olarak meydana gelen nöromusküler sistemi tutan resesif bir hastalıktır. DMD'li hastaların distrofin geninde bu proteinin üretimini engelleyen binlerce çeşit mutasyon tespit edilmiştir.

Distrofin genindeki mutasyonlar bir ekson delesyonuna neden olarak erken durdurma kodonu meydana getirmektedir. Bu durum da genin okuma çerçevesinin bozulmasına neden olmaktadır. DMD ile ilişkili genetik mutasyonların düzeltilmesinde CRISPR sistemiyle sağlanabilecek genetik modifikasyonlar, hastalığın küratif tedavisi için umut vaatmektedir.⁵ DMD'de distrofin geninin okuma çerçevesindeki eksonlarda delesyon şeklinde meydana gelen mutasyonları düzeltmek üzere 2 yöntem tanımlanmıştır.²⁶

Bu yöntemlerden birincisi oluşan erken durdurma kodonunun, diğer eksonlarla bağlantı kuran akseptör veya donör bölgelerinin delesyonu yoluyla okunmadan atlanması; ikincisi üçlü kodonların okuma çerçevesi içinde doğru sıralanmasını sağla-

mak için uygun sayıda nükleotidin delesyonu veya insersiyonu ile okuma çerçevesinin düzeltilmesidir. Yapılan çalışmalarda da nükleotit insersiyonu gerçekleştirilmeye çalışılmıştır.

DMD tedavisi için CRISPR/Cas 9 sistemi ile yürütüldüğü bilinen bir klinik çalışma bulunmamaktadır. CRISPR/Cas 9 sisteminin DMD üzerindeki etkileri prelinik çalışmalarda incelenmiştir. DMD'li hastalarda en yaygın görülen mutasyonlardan biri ekson 50'nin delesyonudur. Distrofin geninde meydana gelen bu delesyon sonucu ekson 51'in okuma çerçevesi dışına yerleşmektedir.²² Bu mutasyonun düzeltilmesi adına CRISPR/Cas 9 uygulamaları ardından yapılan analizlerde distrofin proteininin ekspresyonunun arttığı ayrıca kas fonksiyonunu korunarak kas liflerindeki dejenerasyonun önlendiği gösterilmiştir.²⁷

DMD'de en yaygın görülen mutasyonlardan biri de ekson 44 delesyonlarıdır. Ekson 44 delesyonu; ekson 43'ün ekson 45'e eklenmesine ve erken durdurma kodonu oluşmasına neden olmaktadır. Ekson 43 ve 45'in ekson-intron bağlantısını sağlayan akseptör veya donör bölgelerinin delesyonunu sağlayan sgRNA'lar oluşturularak çerçeve içi distrofinin yeniden oluşturulması sağlanmaktadır.

Bu yöntemle yürütülen prelinik çalışmalar, DMD modelinde kas hücrelerine CRISPR sisteminin uygulanması ile hücrelerdeki distrofin ekspresyonunun arttığını ve kas fonksiyonunun etkin bir şekilde geri döndürüldüğünü göstermektedir.²⁸

CRISPR sistemi ile fare kas hücreleri üzerinde gerçekleştirilen gen düzenlemenin, insan kas hücrelerinde gözlenip gözlenmeyeceği merak edilmektedir. Bu konudaki çalışmalar devam etmektedir.

Transtiretin Amiloidozis

Transtiretin amiloidozu [transthyretin amyloidosis (ATTR)], yanlış katlanmış transtiretin [transthyretin (TTR)] proteinleriyle oluşan amiloid fibrillerinin dokularda birikmesiyle meydana gelen progresif bir hastalıktır. ATTR sıklıkla epigenetik değişikliklere bağlı olarak meydana gelen kalıtsal bir hastalıktır. Dünya çapında yaklaşık 50.000 kişide mevcut olduğu düşünülen bu hastalık otozomal dominant geçiş göstermektedir. Hastalığın klinik tablosunda yaygın ola-

rak amiloid polinöropati ve kardiyomyopati görülmektedir.²⁹

Günümüzde uygulanan tedavi yöntemleri diflunisal ve tafamidis ile TTR proteininin stabilizasyonu; inotersen, patisiran gibi ajanlarla ise TTR protein sentezi inhibisyonu şeklinde olmaktadır.²⁹

Bu tedavi stratejileri semptomların hafifletilmesini ve fonksiyonel iyileşmeyi sağlayarak sağkalımı uzatır, ancak uzun süre sürekli uygulama gerektirmekte ve ciddi yan etkilere neden olmaktadır. ATTR'nin, monogenik bir hastalık olması nedeniyle CRISPR/Cas 9 sistemiyle in vivo gen düzenlemesi mevcut tedavi yöntemlerine alternatif, küratif tedaviyi sağlayacak ideal bir terapötik strateji olarak değerlendirilmektedir.⁴ CRISPR/Cas 9 sistemini içeren NTLA-2001 lipid nanopartikülü tasarlanmıştır. Hedef gen bölgesinde kesim sonucu DNA onarım mekanizmaları ile mRNA sentezini azaltabilecek indeller meydana getirilerek, TTR protein seviyelerinin azalması hedeflenmektedir.³⁰

NTLA-2001'in gen düzenleme etkinliği prelinik çalışmalar ile değerlendirilmiştir. TTR mRNA ekspresyonunun (≥ 91) ve TTR protein düzeyinin (≥ 95) anlamlı şekilde azaldığı gösterilmiştir. NTLA-2001 lipid nanopartikülünün gen düzenleme etkinliğini in vivo tespit etmek üzere yürütülen prelinik çalışmalarda çeşitli dozlarda (1,5-6 mg/kg) uygulanan NTLA-2001'in, fare ve maymunlarda TTR mRNA ekspresyon seviyelerini anlamlı bir şekilde azalttığı bilinmektedir. NTLA-2001'in gen düzenleme verimliliği ve in vitro etkin dozları prelinik çalışmalarla karakterize edildikten sonra etkinliği ve güvenilirliği klinik çalışmalarda değerlendirilmiştir.³¹

Polinöropati teşhisi koyulan ve mevcut ATTR tedavilerinden herhangi birinin uygulanmadığı, 18-80 yaş aralığında, 50-90 kg vücut ağırlığına sahip 6 hATTR amiloidozlu (3'ü 0,1 mg/kg dozunda; 3'ü 0,3 mg/kg dozunda) hasta üzerinden değerlendirilen çalışmada (ClinicalTrial.gov numarası: NCT04601051) tedavinin ilk gününden itibaren serum TTR seviyelerinin azalmaya başladığı tespit edilmiştir (Tablo 1). Yüksek doz uygulanan grupta serum TTR düzeylerinde %87 oranında azalma tespit edilmiştir ve etkinin doza bağımlı olduğu bildirilmiştir. Çalışmanın devamında dâhil edilen 15 hastaya NTLA-2001 4

farklı dozda (0,1-1 mg/ kg) uygulanarak hastalardan alınan serum örneklerinde TTR düzeyleri ölçülmüştür. Serum TTR seviyelerinde doza bağımlı olarak önemli oranlarda düşüş gerçekleşmiştir.

NTLA-2001'in etkinliğini değerlendiren daha fazla sayıda katılımcının dâhil edildiği klinik çalışmalar devam etmektedir.³² Elde edilen veriler NTLA-2001 ile uygulanan CRISPR/Cas 9 sisteminin ATTR tedavisinde mevcut tedavilere etkinlik ve güvenilirlik yönünden üstün yeni bir terapötik alternatif olarak değerlendirilebileceğini göstermiştir.

Kanser

Kanserin patogenezi tam anlaşılacakla birlikte karsinogenezin, onkogenlerde ve tümör baskılayıcı genlerde mutasyona sebep olan kümülatif DNA hasarı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.³³

CRISPR/Cas 9 sistemi ile immün kontrol noktası genlerinde düzenlemeler yaparak T hücre tedavisinin etkinliği artırılmaya çalışılmaktadır.³⁴ PD-1 bu immün kontrol noktalarından (T lenfosit yüzeyinde bulunan) biridir. T lenfositler tümör hücreleriyle karşılaştığında tümör hücreleri üzerinde yer alan PD-L1, PD-1 reseptörünü aktive ederek T lenfosit aktivasyonunu inhibe eder; T-lenfosit tümör hücrelerini yok edemez.^{35,36} Bu nedenle T lenfositlerinin PD-1 geni, ex vivo olarak CRISPR/Cas 9 ile düzenlenip etkisiz hâle getirilirse bu reseptör-ligand etkileşiminin gerçekleşmeyeceği ve T lenfositlerinin işlevini yerine getirip tümör hücrelerini yok edebileceği varsayılmıştır.

Preklinik çalışmalarda, CRISPR/Cas 9 RNP'nin elektroporasyonu ile PD-1 geninin ekson 1'i hedeflenerek primer insan T hücrelerinde PD-1 ekspresyonu azaltılmıştır. Bu yöntemin etkinliğini değerlendiren 2 farklı klinik çalışmanın sonuçları 2020 yılında yayımlanmıştır. Çalışmalardan birinde (NCT03399448) hastalardan T hücreleri izole edilerek CRISPR/Cas 9 sistemi uygulanmış TCR α ve β zinciri geni (TRAC ve TRBC) ile PD-1'i kodlayan PDCD1 geni silinebilmiştir. İkinci aşamada ise T hücrelere NY-ESO-1 antijenine özgü TCR proteinini kodlayan bir genetik sekans yüklenmiş lentivirüs ile transdüksiyon uygulanmıştır. Periferik kan mononükleer hücrelerinde hedef genlerde %5-10 arasında değişiklik saptanmıştır. Bu çalışma ile CRISPR/Cas9

ile genetik olarak düzenlenmiş T hücresi tedavisinin güvenli ve uygulanabilir olduğu gösterilmiştir.³⁷ Diğer çalışmada, (NCT02793856) refrakter küçük hücreli olmayan akciğer kanserli hastalardan alınan T lenfositlerinin PD-1 geni, ex vivo olarak CRISPR/Cas9 ile düzenlenip etkisiz hâle getirilerek hastalara yeniden infüze edilmiştir (Tablo 1). On yedi hasta ile başlayıp 12'si ile devam eden çalışmada gen düzenleme etkinliğini ölçmek için yapılan akım sitometrik analizi PD-1 ekspresyonunun azaldığını göstermektedir. Yeni nesil dizileme yöntemiyle yapılan hedef dışı bölge analizinde, tüm hedef dışı bölgelerin medyan mutasyon sıklığının %0,05 (aralık, %0-0,25) olduğu görülmüştür; bu, hedef bölgeninkinden çok daha düşüktür.

Bu çalışmada, genetik olarak düzenlenmiş T hücrelerinin ömrünün kısa olduğu gösterilmiştir ve bu da kalıcı genomik değişiklik ihtimalinin sınırlı olduğunu düşündürmektedir. Çalışma ayrıca klinikte CRISPR/Cas 9 teknolojisi ile genetik olarak düzenlenmiş T hücre tedavisinin güvenliğini ve uygulanabilirliğini desteklemektedir.³⁸ Şimdiye kadar yürütülen preklinik ve klinik çalışmalarda, CRISPR sisteminin kanser tedavisindeki potansiyel etkinliği gösterilmiştir.

Leber Konjenital Amorozi

Leber konjenital amorozi [leber congenital amaurosis (LCA)], sıklıkla, *CEP290*, *GUCY2D*, *CRB1* ve *RPE65* genlerindeki otozomal resesif mutasyonlar sonucu retinada yer alan fotoreseptörlerin fonksiyonunu kaybettiği kalıtsal dejeneratif bir hastalıktır. LCA vakalarının %6'sının *Rpe 65* genindeki mutasyona bağlı geliştiği tespit edilmiştir.³⁹ *Rpe 65* geninin 3. eksonunda sitozin nükleotidinin (C) yerini timin nükleotidi (T) almasıyla erken durdurma kodonunu oluşturan *nonsense* (anlamsız) mutasyonu meydana gelmektedir. Bu mutasyon sonucunda fonksiyonel RPE 65 proteini sentezlenmemektedir. *Rpe 65* mutasyonu ile oluşan LCA'nın tedavisinde CRISPR sistemi ile mutasyonlu bölgenin kesilmesi ve HDR onarım mekanizmasıyla homolog DNA dizisinin yerleştirilmesi hedeflenmektedir.⁴⁰ Yapılan çalışmalarda, HDR onarım mekanizması ile gen düzenleme için homolog DNA donörü de beraberinde uygulanmıştır. Farelere yapılan düşük ve yüksek doz

subretinal uygulamalarda *Rpe 65* gen düzenlemesini indüklemek için etkili bir yöntem olduğunu, ancak Cas 9: sgRNA oranının optimal gen düzenleme için kritik olduğunu göstermiştir.

Rpe 65 geninde mutasyonun düzeltilmesinin ve HDR onarım mekanizmalarının aktivasyonunun retina fonksiyonu üzerine etkilerini gözlemek amacıyla subretinal uygulama ardından elektroretinografi yapılmıştır. *Rpe 65* gen ekspresyonunun artmasıyla birlikte farelerin parlak uyarılara karşı tepki vermeye başladığı gözlemlenmiştir.⁴¹ LCA, genellikle *CEP290* genindeki mutasyonlarla ilişkili olarak meydana gelmektedir. *CEP290* geninin 26. intronunda meydana gelen *c.2991+1655A>G* mutasyonu (IVS26 mutasyonu) erken durdurma kodonu (*p.C998X*) oluşturmaktadır.⁴² IVS26 mutasyonunu taşıyan hastaların tedavisi için CRISPR/Cas 9 sistemi ile Faz 1/2 aşamasında bir klinik çalışma (Clinical trials.gov: NCT03872479) Allergan ve Editas Medicine (İngiltere) şirketleri tarafından yürütülmektedir (Tablo 1).⁴³ *CEP 290* geninin 26. intronunda meydana gelen *c.2991+1655A>G* splice mutasyonunu ortadan kaldırmak üzere EDIT-101 isimli ilaç molekülü tasarlanmıştır. *CEP290* geninde *splice* mutasyonu taşıyan 18 hastaya ilaç molekülü uygulanmıştır. Bu klinik çalışmanın 3 farklı dozda 5 kohort üzerinden yürütülmesi hedeflenmiştir. Orta doz kohortundaki hastalarda iyileşmeye dair belirtilerin görülmesine rağmen diğer kohort gruplarından elde edilecek verilerle tedavi etkinliği daha iyi yorumlanabilecektir.⁴³

TARTIŞMA

İlk kez bakteri gibi prokaryotlarda virüslere karşı savunma mekanizması olarak keşfedilen CRISPR temelli genom düzenleme teknolojileri arasında yerini alarak, etkinliği ve güvenilirliği klinik çalışmalarla değerlendirilmeye başlamıştır.

CRISPR sisteminin birçok avantaja sahiptir. Öncelikle CRISPR/Cas9'un hedefe özgüllüğü çok daha iyidir. CRISPR/Cas 9 sisteminde yeniden yapılandırılmaya gerek duyulmaz, hedef bölgelerle eşleşen sgRNA dizileri yeni bölgeleri tanımak için uygun şekilde tasarlamak yeterlidir. CRISPR/Cas 9'un eş zamanlı çoklu lokus düzenleme potansiyeline sahip olması ve maliyet açısından uygun olması önemli avantajdır.¹³ CRISPR'ın bazı dezavantajları da bu-

lunmaktadır. Örneğin modifiye edilmiş sgRNA'ların hedef dışı etkilere yol açabileceği bilinmektedir.³⁴ CRISPR/Cas 9, bir sgRNA ile aynı anda yalnızca bir geni düzenleyebildiğinden multiplex gen düzenleme için birden fazla sgRNA gerekmekte ve bu da uygulama zorluğunu beraberinde getirmektedir. Cas genine ve Cas proteinine karşı konakçı bağışıklık tepkisi, CRISPR/Cas sisteminin klinik çalışmalarında en önemli zorluklardan biri olarak kabul edilmektedir.³⁵ Araştırmacılar Cas 9 proteinini modifiye ederek veya Cas 9 homologlarını kullanarak bu sorunu çözmeye çalışmaktadır.⁴⁴ CRISPR sisteminin kullanıldığı prelinik ve klinik çalışmalar, bu teknolojinin terapötik potansiyelini değerlendirmesi yönünden önemlidir. CRISPR sistemi, OHA, β -talasemi, DMD, kanser, transtiretin amiloidozis, LCA gibi birçok hastalık için çok sayıda prelinik ve klinik çalışma yürütülmüştür.

BT ve OHA'nın monogenik hastalıklar olması CRISPR sisteminin bu hastalıklarda kullanımını konusunda avantaj sağlamaktadır. CRISPR sistemi ile tedavide sıklıkla *BCL11A* geninin silinmesi amaçlanmıştır.⁴⁴ Çalışmaların sonuçları umut vadetmektedir.

Kanser üzerinde yürütülen çalışmalar, klinikte CRISPR/Cas 9 ile genetik olarak düzenlenmiş T hücre tedavisinin güvenliğini ve uygulanabilirliğini desteklemektedir.^{33,37} Belirli kanser türlerinde kemoterapötiklerin etkinliğinin sınırlı olması ve ciddi yan etkilere sahip oldukları düşünüldüğünde CRISPR gibi gen düzenleme teknolojileriyle yeni tedavilerin geliştirilmesi önemlidir.

DMD tedavisinde CRISPR uygulaması ile distrofin ekspresyon seviyesinde ve kas fonksiyonunda önemli oranda iyileşme sağlanmıştır. Buna rağmen bu etkinin ne kadar süre ile kalıcı olduğu henüz bilinmemektedir.⁴⁵

ATTR tedavisinde CRISPR/Cas 9 sistemi uygulamasıyla TTR protein sentezi azaltılarak, yanlış katlanmış TTR proteinlerinin oluşturduğu amiloid fibrillerinin dokularda birikmesi önlenecektir. Uygulamanın yapıldığı hastalarda ciddi advers etkilerle karşılaşılması bu sistemin tedavideki etkinlik ve güvenilirliğini desteklemektedir.^{31,32}

CRISPR sisteminin uygulandığı LCA modeli farelerde HDR onarım mekanizmasının görme fonksi-

yonundaki etkileri incelendiğinde, olumlu gelişmeler elde edilmiştir. Buna rağmen Digenome-seq gibi analizlerde hedef dışı bölgelerin tespiti endişeye neden olmaktadır. Fakat bu hedef dışı bölgelerin intronik kısmında yer aldığı ileri sürülmüştür. Ancak Faz 1/2 aşamasında yürütülen klinik çalışmadan elde edilen veriler, CRISPR sisteminin tedavi etkinliğini yorumlamada yeterli değildir.^{41,46}

SONUÇ VE ÖNERİLER

CRISPR/Cas sistemlerinin diğer genom düzenleme teknolojilerine kıyasla daha verimli ve uygulanabilir olması, prelinik ve klinik çalışmalar için dikkatleri üzerine çekmiştir. Son yıllarda CRISPR/Cas sistemleri üzerine yapılan çalışmalarda önemli ölçüde bir artış gözlenmektedir. Sağladığı avantajlara rağmen hedef dışı etkiler, biyolojik ortamlara uygulamadaki bazı zorluklar, potansiyel kanser riski gibi anlaşılması ve çözülmesi gereken önemli sınırlamalara da sahiptir. Bu sınırlamaların ne derece üstesinden gelinebileceği, artan sayıda çalışmalarla ilerleyen yıllarda görülebilecektir.

CRISPR sistemi klinik açıdan büyük umut vaatmektedir. BT, OHA, DMD, kanser, transtiretin amiloidozis, LCA gibi birçok hastalık üzerine prelinik ve klinik çalışmalar yürütülmektedir.

Gelecekte daha fazla sayıda katılımcı ile yapılacak çalışmalar önem arz etmektedir. Uzun süreli etkinlik ve güvenlik verileri değerlendirildikçe CRISPR temelli gen düzenleme teknolojilerinin klinik önemi daha iyi anlaşılacaktır.

Finansal Kaynak

Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından, tıbbi alet, gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.

Çıkar Çatışması

Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyeliği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.

Yazar Katkıları

Fikir/Kavram: Sena Ustaömer, Yeşim Kaya Yaşar; **Tasarım:** Sena Ustaömer, Yeşim Kaya Yaşar; **Denetleme/Danışmanlık:** Yeşim Kaya Yaşar; **Veri Toplama ve/veya İşleme:** Sena Ustaömer; **Analiz ve/veya Yorum:** Sena Ustaömer, Yeşim Kaya Yaşar; **Kaynak Taraması:** Sena Ustaömer; **Makalenin Yazımı:** Sena Ustaömer; **Eleştirel İnceleme:** Sena Ustaömer, Yeşim Kaya Yaşar; **Kaynaklar ve Fon Sağlama:** Sena Ustaömer, Yeşim Kaya Yaşar.

KAYNAKLAR

- Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product. J Bacteriol. 1987;169(12):5429-33. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Jansen R, van Embden JD, Gaastra W, Schouls LM. Identification of a novel family of sequence repeats among prokaryotes. OMICS. 2002;6(1):23-33. [Crossref] [PubMed]
- Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. Microbiology (Reading). 2005;151(Pt 8):2551-61. [Crossref] [PubMed]
- Garneau JE, Dupuis MÉ, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. Nature. 2010;468(7320):67-71. [Crossref] [PubMed]
- Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science. 2014;346(6213):1258096. [Crossref] [PubMed]
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science. 2012;337(6096):816-21. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Jinek M, East A, Cheng A, Lin S, Ma E, Doudna J. RNA-programmed genome editing in human cells. Elife. 2013;2:e00471. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Cyranoski D. CRISPR gene-editing tested in a person for the first time. Nature. 2016;539(7630):479. [Crossref] [PubMed]
- Uyhazi KE, Bennett J. A CRISPR view of the 2020 Nobel Prize in Chemistry. J Clin Invest. 2021;131(1):e145214. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Deveau H, Barrangou R, Garneau JE, Labonté J, Fremaux C, Boyaval P, et al. Phage response to CRISPR-encoded resistance in Streptococcus thermophilus. J Bacteriol. 2008;190(4):1390-400. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Almendros C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. Microbiology (Reading). 2009;155(Pt 3):733-40. [Crossref] [PubMed]
- Hao M, Cui Y, Qu X. Analysis of CRISPR-Cas System in Streptococcus thermophilus and Its application. Front Microbiol. 2018;9:257. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. Nature. 2012;482(7385):331-8. [Crossref] [PubMed]

14. Hendel A, Bak RO, Clark JT, Kennedy AB, Ryan DE, Roy S, et al. Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells. *Nat Biotechnol.* 2015;33(9):985-9. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
15. Li Y, Glass Z, Huang M, Chen Zy, Xu Q. Ex vivo cell-based CRISPR/Cas9 genome editing for therapeutic applications. *Biomaterials.* 2020;234:119711. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
16. Stout E, Klaenhammer T, Barrangou R. CRISPR-cas technologies and applications in food bacteria. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2017;8:413-37. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
17. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR/Cas9 for genome engineering. *Cell.* 2014;157(6):1262-78. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
18. Li B, Niu Y, Ji W, Dong Y. Strategies for the CRISPR-Based therapeutics. *trends Pharmacol Sci.* 2020;41(1):55-65. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
19. Sanozky-Dawes R, Selle K, O'flaherty S, Klaenhammer T, Barrangou R. Occurrence and activity of a type II CRISPR-Cas system in *Lactobacillus gasserii*. *Microbiology (Reading).* 2015;161(9):1752-61. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
20. Barrangou R, Horvath P. CRISPR: new horizons in phage resistance and strain identification. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2012;3:143-62. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
21. Bauer DE, Canver MC, Orkin SH. Generation of genomic deletions in mammalian cell lines via CRISPR/Cas9. *J Vis Exp.* 2015;(95):e52118. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
22. *ClinicalTrials* [Internet]. [Cited: March 30, 2022]. Gene correction in autologous CD34+ hematopoietic stem cells (HbS to HbA) to treat severe sickle cell disease (CEDAR). Available from: [[Link](#)]
23. Saraf SL, Molokie RE, Nouria M, Sable CA, Luchtman-Jones L, Ensing GJ, et al. Differences in the clinical and genotypic presentation of sickle cell disease around the world. *Paediatr Respir Rev.* 2014;15(1):4-12. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
24. Bauer DE, Kamran SC, Lessard S, Xu J, Fujiwara Y, Lin C, et al. An erythroid enhancer of BCL11A subject to genetic variation determines fetal hemoglobin level. *Science.* 2013;342(6155):253-7. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
25. *ClinicalTrials* [Internet]. [Cited: March 30, 2022]. A safety and efficacy study evaluating CTX001 in subjects with transfusion-dependent β -thalassemia. Available from: [[Link](#)]
26. *ClinicalTrials* [Internet]. [Cited: March 30, 2022]. A safety and efficacy study evaluating CTX001 in subjects with severe sickle cell disease. Available from: [[Link](#)]
27. *ClinicalTrials* [Internet]. [Cited: March 30, 2022]. Safety and efficacy evaluation of γ -globin reactivated autologous hematopoietic stem cells. Available from: [[Link](#)]
28. Min YL, Bassel-Duby R, Olson EN. CRISPR correction of duchenne muscular dystrophy. *Annu Rev Med.* 2019;70:239-55. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
29. Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science.* 2013;339(6121):823-6. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
30. Hawkins PN, Ando Y, Dispenzeri A, Gonzalez-Duarte A, Adams D, Suhr OB. Evolving landscape in the management of transthyretin amyloidosis. *Ann Med.* 2015;47(8):625-38. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
31. Gillmore JD, Gane E, Taubel J, Kao J, Fontana M, Maitland ML, et al. CRISPR-Cas9 In Vivo gene Editing for transthyretin amyloidosis. *N Engl J Med.* 2021;385(6):493-502. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
32. *ClinicalTrials* [Internet]. [Cited: May 11, 2022]. Study to Evaluate Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of nTLa-2001 in Patients With Hereditary Transthyretin Amyloidosis With Polyneuropathy (ATTRv-PN) and Patients With Transthyretin Amyloidosis-Related Cardiomyopathy (ATTR-CM). Available from: [[Link](#)]
33. Dohrn MF, Ihne S, Hegebart U, Medina J, Züchner SL, Coelho T, et al. Targeting transthyretin - Mechanism-based treatment approaches and future perspectives in hereditary amyloidosis. *J Neurochem.* 2021;156(6):802-18. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
34. Stadtmayer EA, Fraietta JA, Davis MM, Cohen AD, Weber KL, Lancaster E, et al. CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. *Science.* 2020;367(6481):eaba7365. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
35. Adams D, Gonzalez-Duarte A, O'riordan WD, Yang CC, Ueda M, Kristen AV, et al. Patisiran, an RNAi therapeutic, for hereditary transthyretin amyloidosis. *N Engl J Med.* 2018;379(1):11-21. [[PubMed](#)]
36. Gillmore JD, Maitland ML, Leibold D. CRISPR-Cas9 in vivo gene editing for transthyretin amyloidosis. Reply. *N Engl J Med.* 2021;385(18):1722-3. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
37. Tomasetti C, Marchionni L, Nowak MA, Parmigiani G, Vogelstein B. Only three driver gene mutations are required for the development of lung and colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(1):118-23. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
38. Lu Y, Xue J, Deng T, Zhou X, Yu K, Deng L, et al. Safety and feasibility of CRISPR-edited T cells in patients with refractory non-small-cell lung cancer. *Nat Med.* 2020;26(5):732-740. Erratum in: *Nat Med.* 2020;26(7):1149. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
39. Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med.* 2002;8(8):793-800. Erratum in: *Nat Med* 2002;8(9):1039. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
40. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(4):252-64. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
41. Jo DH, Song DW, Cho CS, Kim UG, Lee KJ, Lee K, et al. CRISPR-Cas9-mediated therapeutic editing of Rpe65 ameliorates the disease phenotypes in a mouse model of Leber congenital amaurosis. *Sci Adv.* 2019;5(10):eaax1210. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
42. Cideciyan AV. Leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations and its treatment with gene therapy. *Prog Retin Eye Res.* 2010;29(5):398-427. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
43. *Editasmedicine* [Internet]. ©Copyright 2022 Editas Medicine [Cited: May 11, 2022]. PRESS RELEASE Editas Medicine announces Dosing of first Pediatric Patient in the BRILLIANCE Clinical Trial Of EDIT-101 For LCA10. Available from: [[Link](#)]
44. Sahel DK, Mittal A, Chitkara D. CRISPR/cas system for genome editing: progress and prospects as a therapeutic tool. *J Pharmacol Exp Ther.* 2019;370(3):725-35. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
45. Chew WL, Tabebordbar M, Cheng JK, Mali P, Wu EY, Ng AH, et al. A multi-functional AAV-CRISPR-Cas9 and its host response. *Nat Methods.* 2016;13(10):868-74. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
46. Ruan GX, Barry E, Yu D, Lukason M, Cheng SH, Scaria A. CRISPR/Cas9-mediated genome editing as a therapeutic approach for leber congenital amaurosis 10. *Mol Ther.* 2017;25(2):331-41. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]