



Genom Düzenleme Teknolojileri ve Çözüm Bekleyen Sorunlar

Fulya Yaylacioğlu Tuncay

10.01.2020

NELERİ KONUŞACAĞIZ ?

Genom Düzenleme Teknolojileri

- Nedir ?
- Ne için kullanabiliriz ?
- Çözüm bekleyen sorunlar neler?
- Kullanımında etik veya yasal düzenlemeler var mı?
- Aklınızdaki sorular ?

Genom Düzenleme Teknolojileri

NEDİR?

- Bir organizmanın genomunda değişiklik yapabilme

Geçmişten farkı nedir?

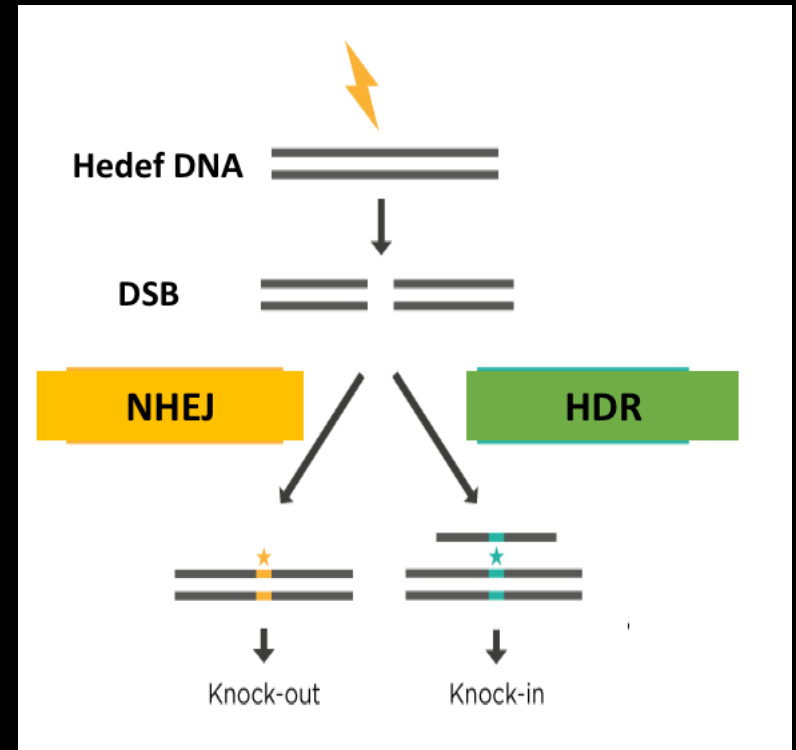
- HEDEFLİ DEĞİŞİKLİK



Genom Düzenleme Teknolojileri

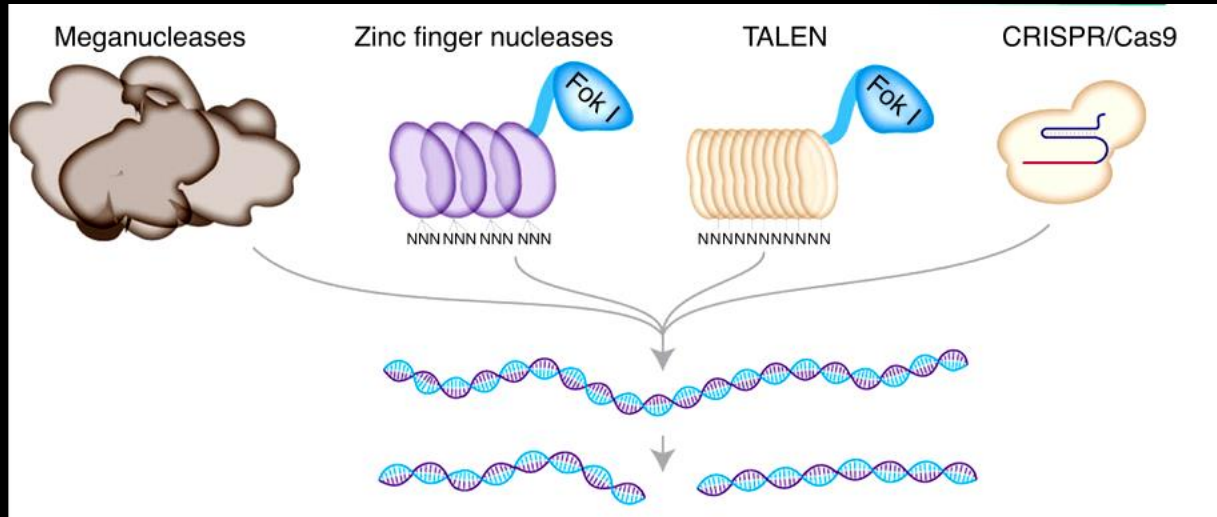
Genomda hedefte değişikliği sağlayan mekanizma:

1. DNA'da hedef bölgede **çift iplik /tek iplikte kesik**
2. Hücrenin kendi tamir mekanizmalarının kullanılması ve bu kesğin tamiri



Genom Düzenleme Teknolojileri

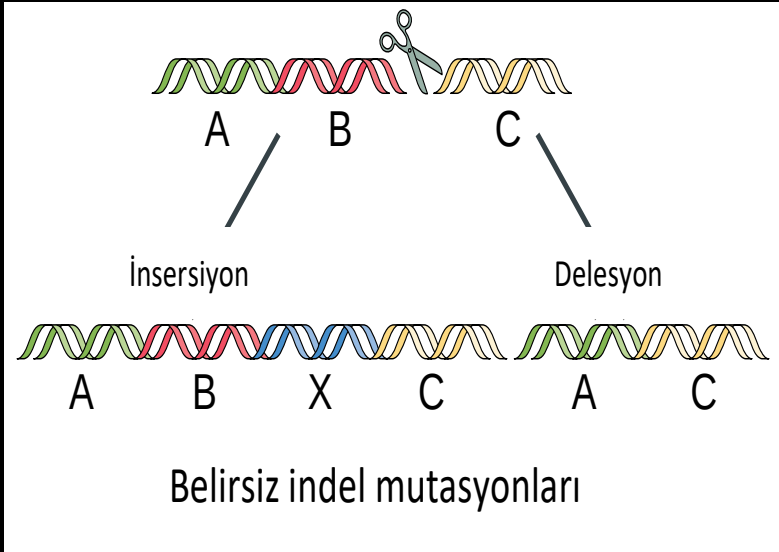
Genom Düzenleme Araçları → Nükleazlar



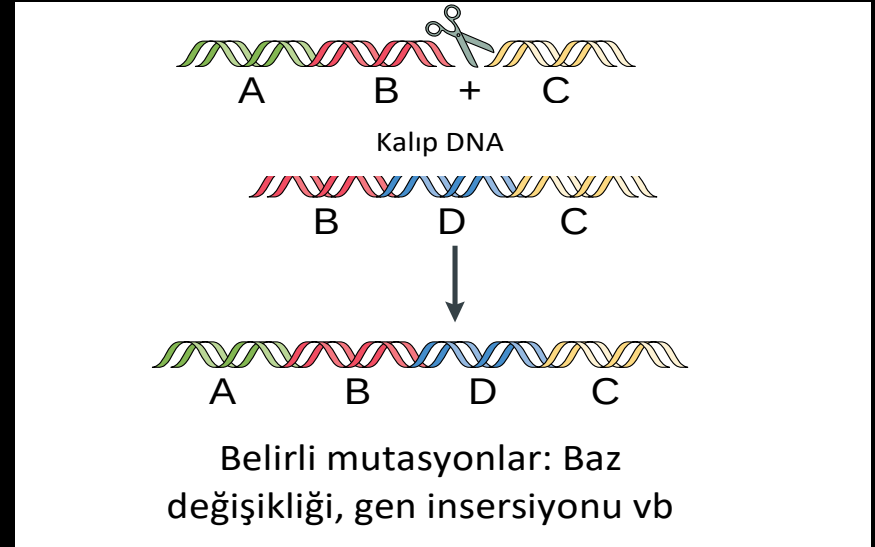
Çift Zincir Kırık

Genom Düzenleme Teknolojileri

DNA Tamir Mekanizmaları



Homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ)

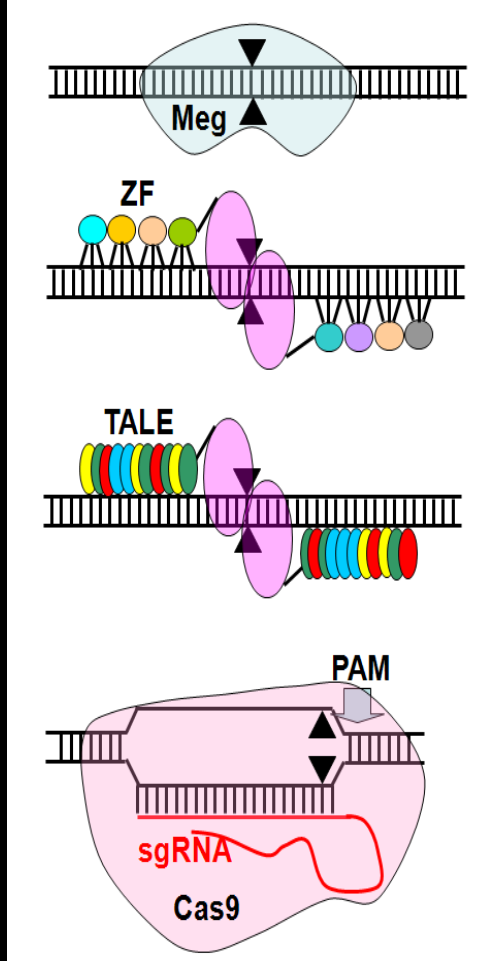


Homoloji bağımlı tamir (HDR)

Öngörülemez değişiklikler
Daha sık ama kusurlu
Kalıp DNA ∅

Öngörülebilir değişiklikler
Nadir ama kusursuz
Kalıp DNA +

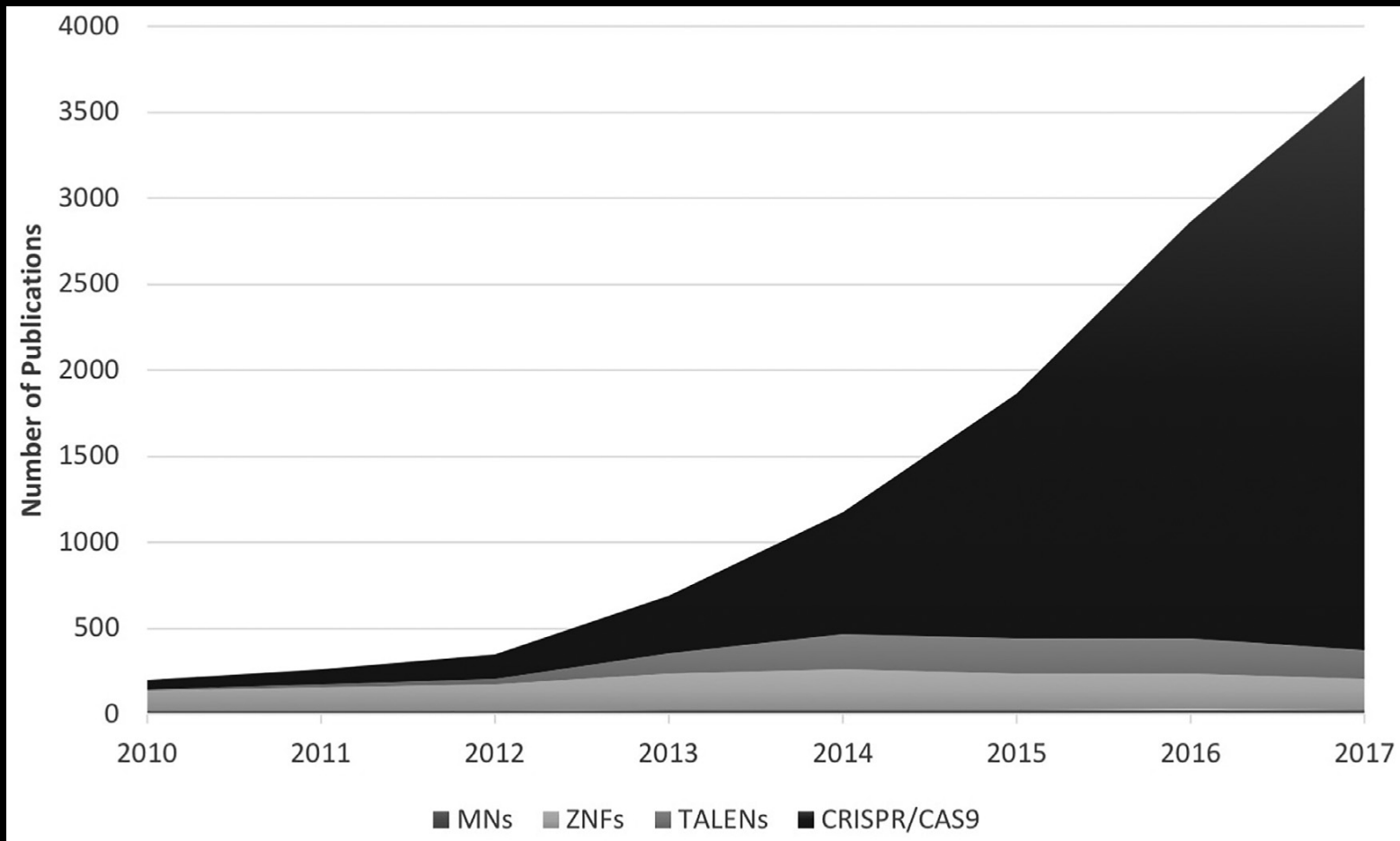
Genom Düzenleme Teknolojileri



Nükleazlar	Avantajları	Dezavantajları
Meganükleazlar 20-40bp/Enzim	Boyutları küçük, hücreye aktarımı kolay	Diziye özgül tasarım yapmak zor
Çinko parmak nükleazlar (ZFN) 3bp/Parmak	Klinik kullanımda en çok kullanılmış platform	Denovo tasarımı zor Büyüklüğü sebebiyle vektörle hücreye aktarılması zor
TALEN 1bp/Modül	Tasarımı ve üretimi ZFN'ye göre daha kolay, CRISPR'a göre daha zor	Büyüklüğü sebebiyle vektörle hücreye aktarılması zor
CRISPR-Cas9 1bp/Baz	Tasarımı ve üretimi kolay Ucuz	Hedef dışı bağlanma

Genom Düzenleme Teknolojileri

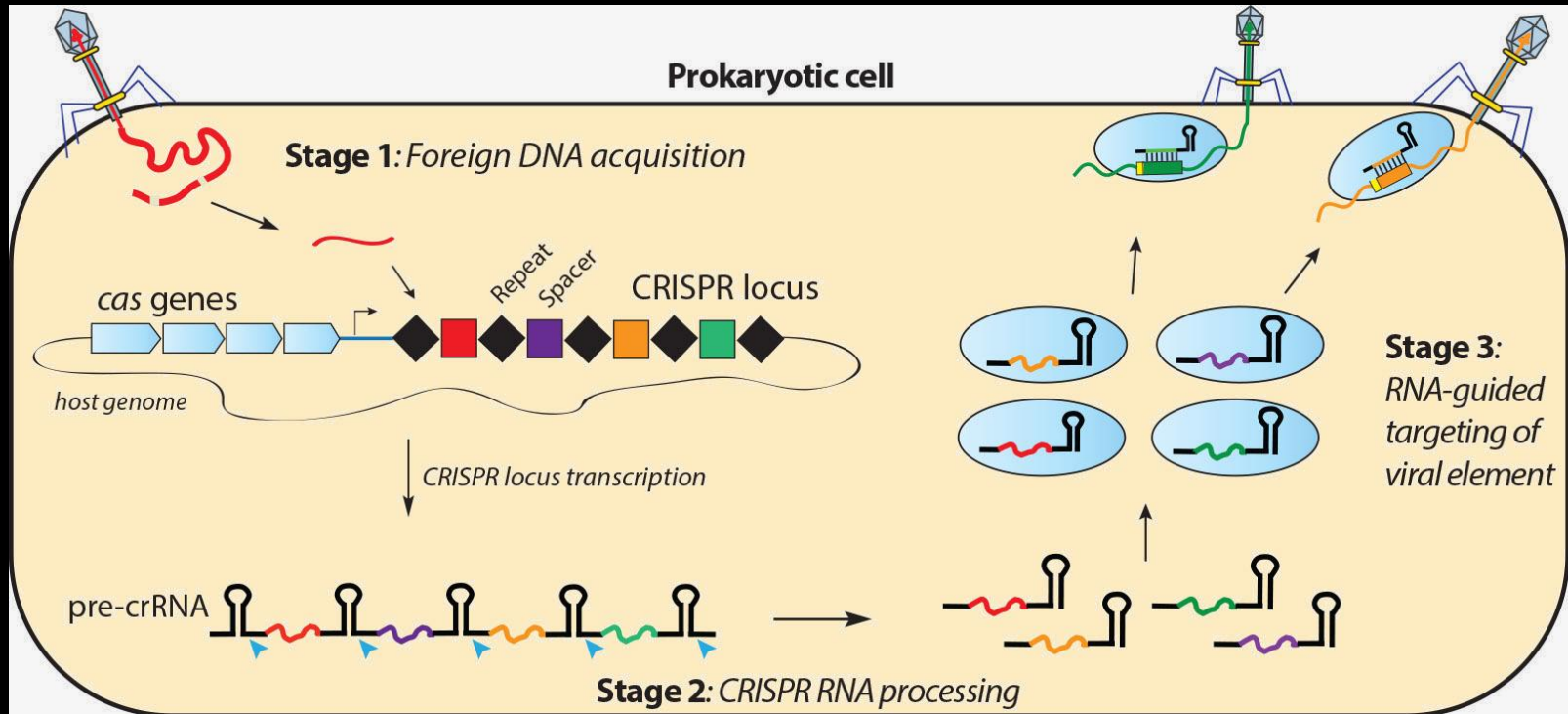
CRISPR/Cas9



Genom Düzenleme Teknolojileri

CRISPR (Düzenli aralıklarla bölünmüş kısa palindromik tekrar kümeleri)/Cas9 (CRISPR- ilişkili nükleaz-9)

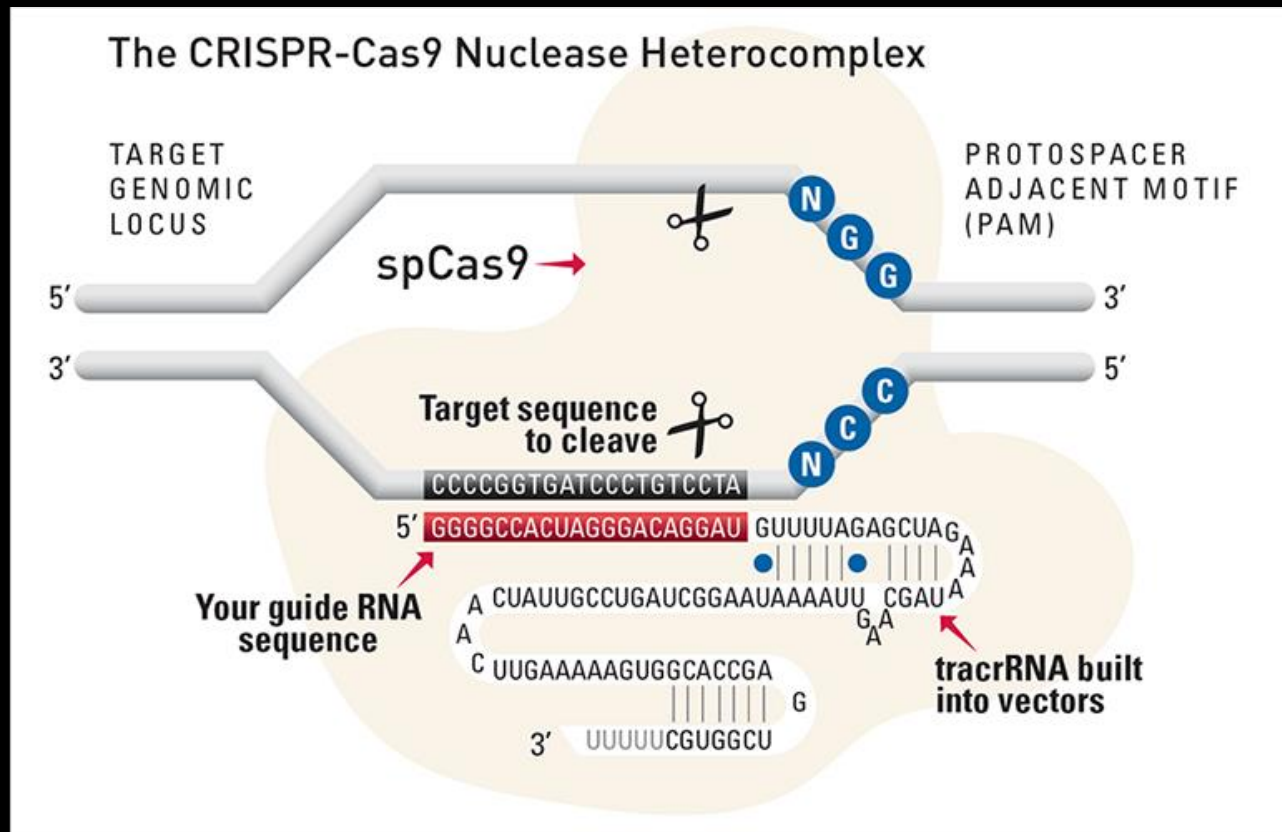
- Prokaryotlarda virüslere karşı savunma sistemi



Genom Düzenleme Teknolojileri

CRISPR/Cas9

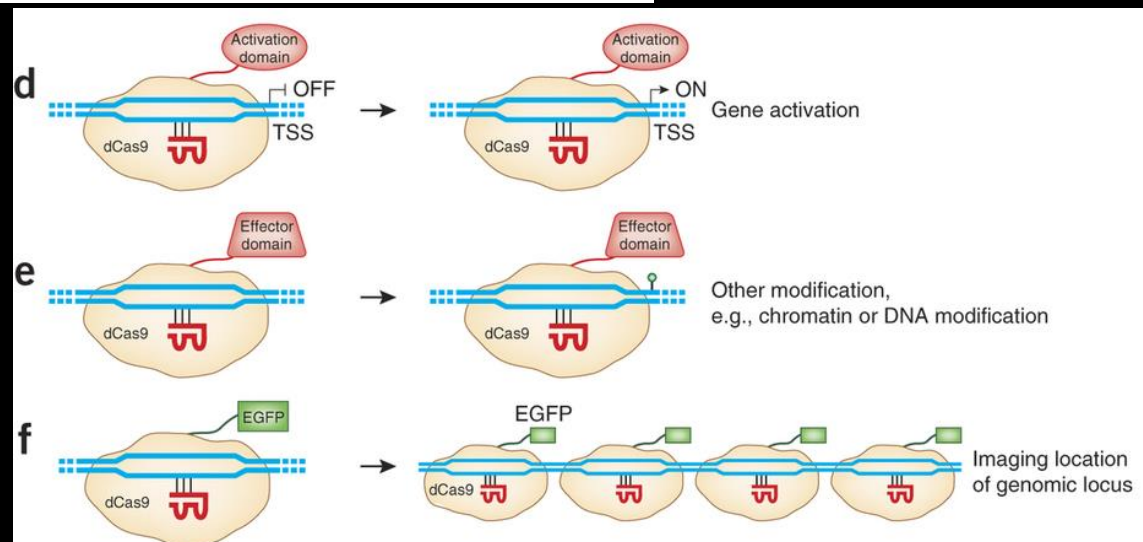
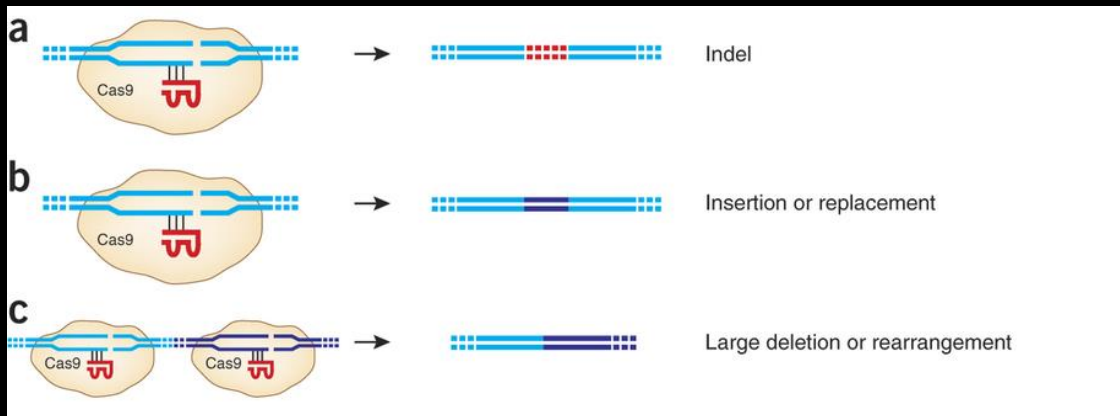
- RNA aracılı genom düzenleme aracı



Genom Düzenleme Teknolojileri

CRISPR/Cas9

- Genomda neler yapılabilir?



Genom Düzenleme Teknolojileri

CRISPR/Cas9

Güncel limitler:

- Hedef kapasitesi: PAM dizisi
- Hedef dışı (off-target) etkiler
- Hedefte öngörülemeyen değişiklikler (NHEJ)

Genom Düzenleme Teknolojileri

CRISPR/Cas9

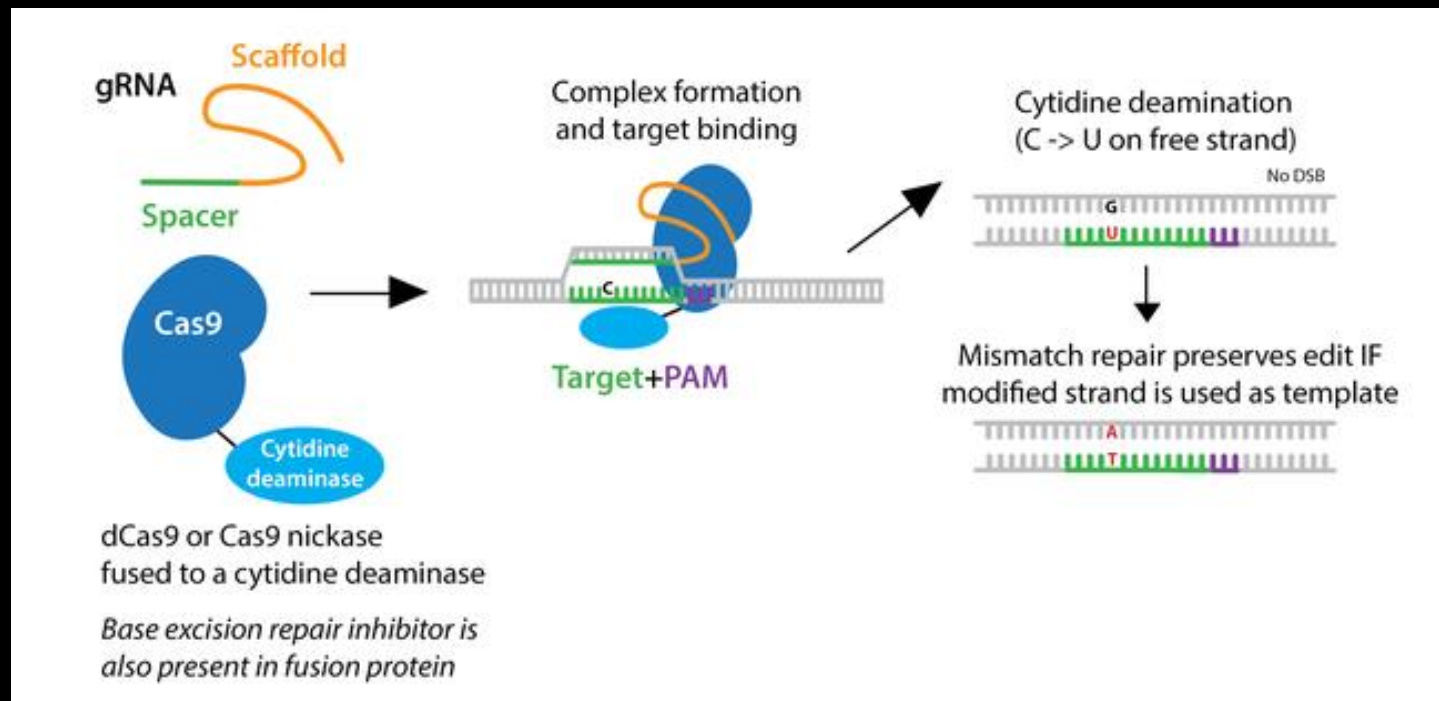
- Varyant Cas9: Hedef sayısı ↑

Species/Variant of Cas9	PAM Sequence
<i>Streptococcus pyogenes</i> (SP); SpCas9	NGG
SpCas9 D1135E variant	NGG (reduced NAG binding)
SpCas9 VRER variant	NGCG
SpCas9 EQR variant	NGAG
SpCas9 VQR variant	NGAN or NGNG
<i>Staphylococcus aureus</i> (SA); SaCas9	NNGRRT or NNGRR(N)
<i>Neisseria meningitidis</i> (NM)	NNNGATT
<i>Streptococcus thermophilus</i> (ST)	NNAGAAW
<i>Treponema denticola</i> (TD)	NAAAAC
Cpf1 (from various species)	TTN
Additional Cas9s from various species	PAM sequence may not be characterized

Genom Düzenleme Teknolojileri

CRISPR/Cas9

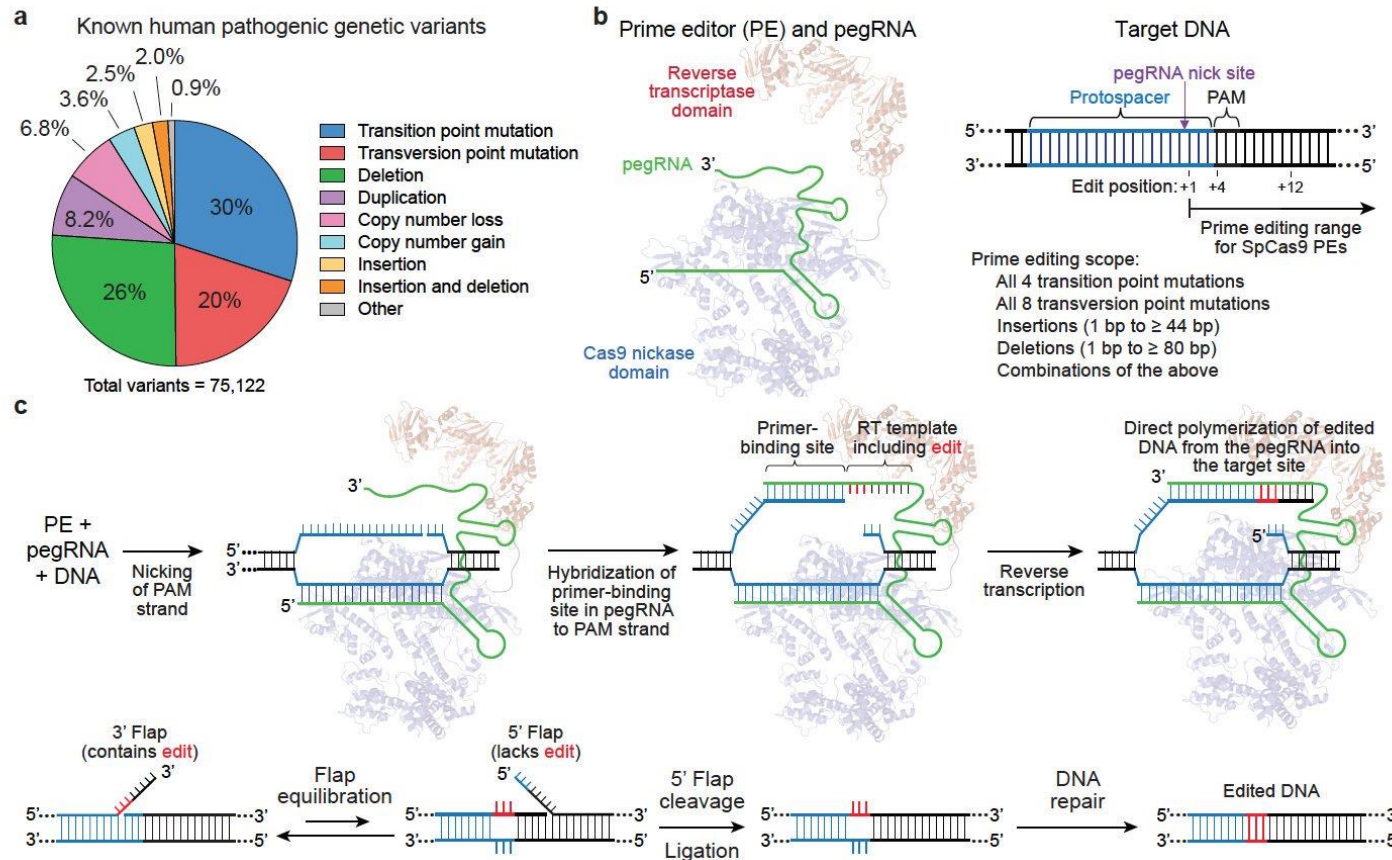
- Varyant sistemler: Base-editing



Genom Düzenleme Teknolojileri

CRISPR/Cas9

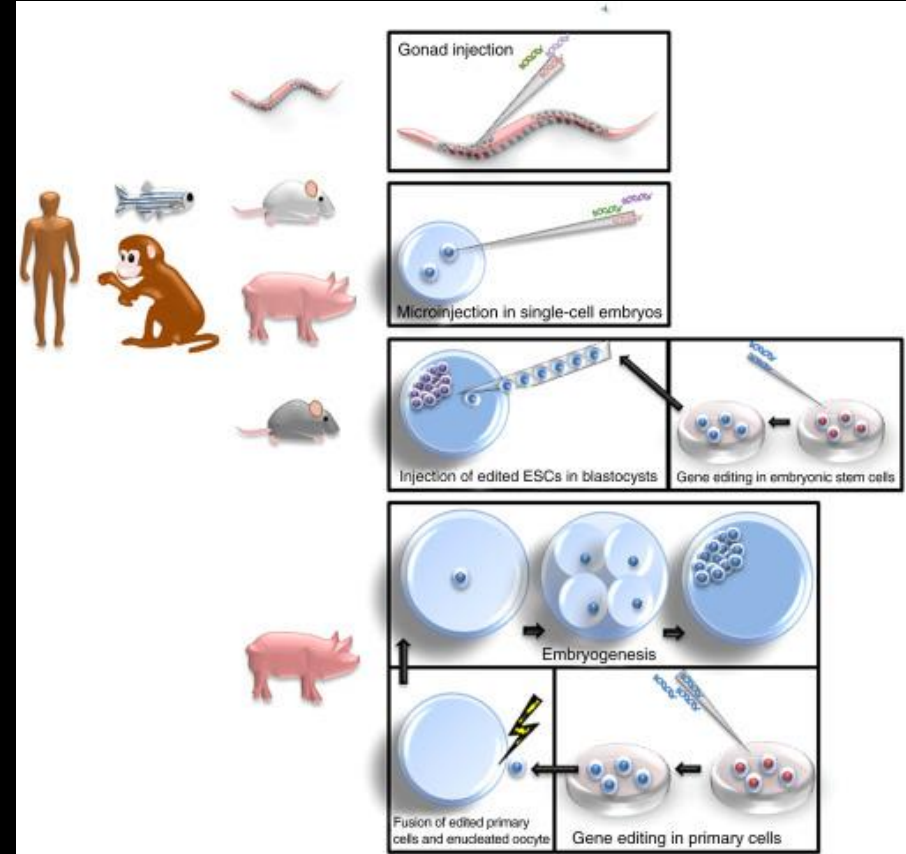
- Varyant sistemler: Prime-editing



Genom Düzenleme Teknolojileri

Uygulama Alanları

- Temel bilim ve preklinik araştırmalar



Genom Düzenleme Teknolojileri

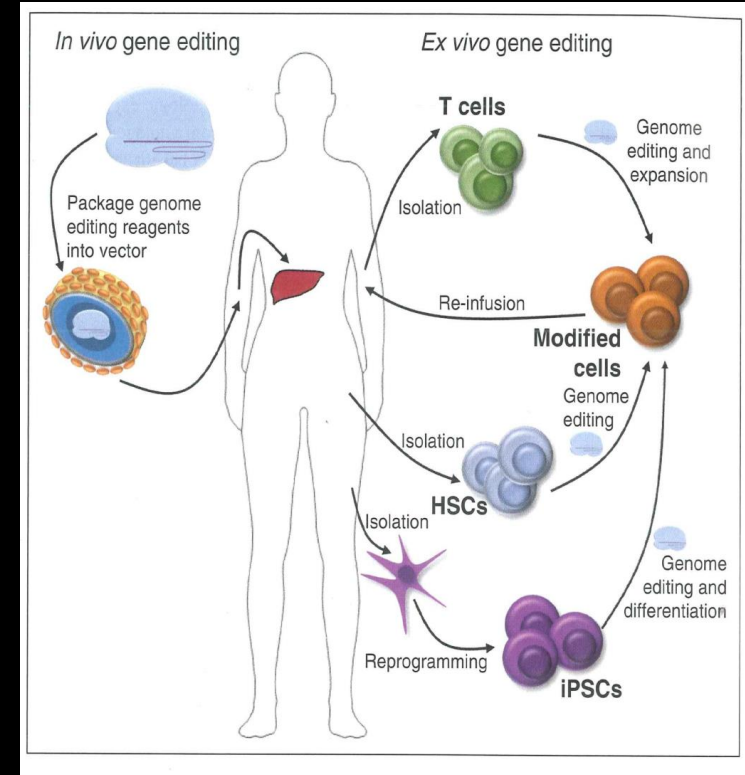
Uygulama Alanları

- Tedavi amaçlı klinik uygulamalar

1. Somatik uygulamalar:

Ex-vivo/ In-vivo

2. Kalıtsımsal, eşey hücrelerini etkileyen uygulamalar

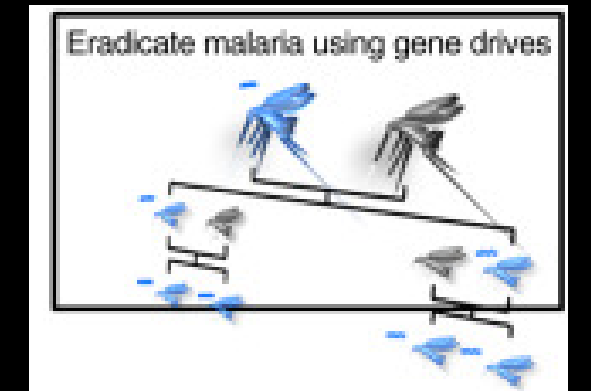
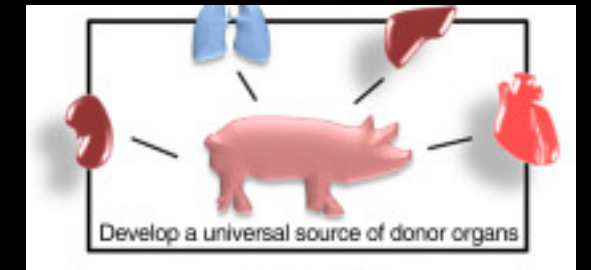
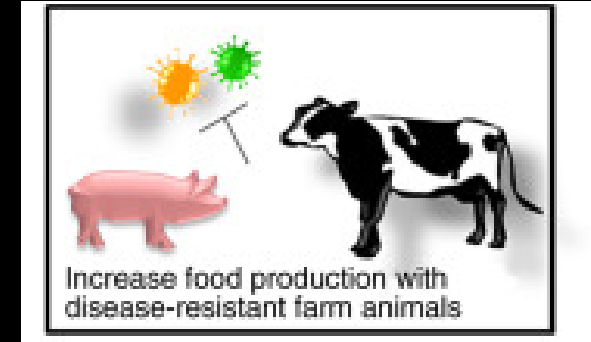
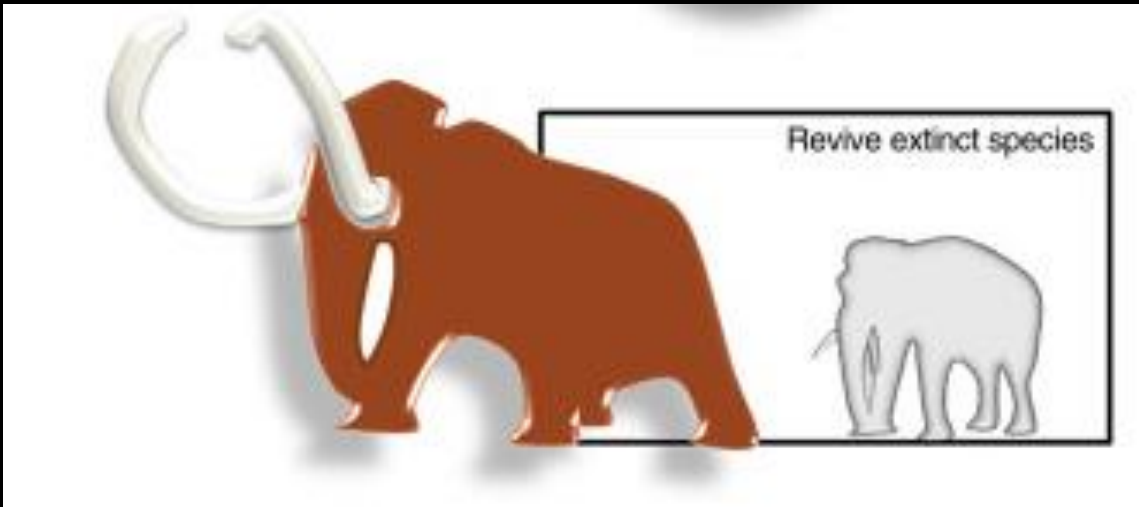


Genom Düzenleme Teknolojileri

Uygulama Alanları

- Diğer:

1. Bitki ve hayvanlarda uygulamalar



Genom Düzenleme Teknolojileri

Uygulama Alanları

- Diğer:

2. İnsan ırkını iyileştirme ???



Genom Düzenleme Teknolojileri

Klinik çalışmalar

- Ex-vivo çalışmalar ön planda
- Hedef somatik hücreler
- FDA ve EMA onaylı klinik faz çalışmalar (Faz 1, Faz2)
- Faz 3 aşamasında ürün Ø
- Çin, ABD ve Avrupa
- Hedef dışı etkiler ve bunların saptanabilirliği

Genom Düzenleme Teknolojileri

Klinik çalışmalar

NCT ID	Diseases targeted	Treatment	Phase	Location
NCT03057912	Human Papillomavirus-Related Malignant Neoplasm	TALEN- or CRISPR/Cas9-mediated disruption of HPV E6/E7 DNA	Phase 1	China
NCT02733856	Metastatic Non-small Cell Lung Cancer	CRISPR/Cas9-engineered PD-1 knockout-T cells	Phase 1	China
NCT02867322	Metastatic Renal Cell Carcinoma	CRISPR/Cas9-engineered PD-1 knockout-T cells	Phase 1	China
NCT02867345	Hormone Refractory Prostate Cancer	CRISPR/Cas9-engineered PD-1 knockout-T cells	Phase 1	China
NCT02863913	Muscle-Invasive Bladder Cancer Stage IV	CRISPR/Cas9-engineered PD-1 knockout-T cells	Phase 1	China
NCT03044743	Stage IV Gastric Carcinoma, Stage IV Vagopharyngeal Carcinoma, T-Cell Lymphoma Stage IV, Stage IV Adult Hodgkin Lymphoma, Stage IV Diffuse Large B-Cell Lymphoma	CRISPR/Cas9-engineered PD-1 knockout-T cells	Phase 1/Phase 2	China
NCT03166878	B Cell Leukemia, B Cell Lymphoma	CRISPR/Cas9-engineered CAR-T cells	Phase 1/Phase 2	China
NCT03080715	Esophageal Cancer	CRISPR/Cas9-engineered PD-1 knockout-T cells	Phase 2	China
NCT03332030	Neurofibromatosis Type 1, Tumors of the Central Nervous System	in/a diagnostic test, develop stem cell lines	N/A, observational	United States
NCT03164435	HIV-1 infection	CRISPR/Cas9-engineered CD34+ cells	N/A	China
NCT03167450	Sickle Cell Disease	Assessing the knowledge, attitudes, and beliefs of SCD patients and associates	N/A, observational	United States
NCT03545815	Solid Tumor	CRISPR/Cas9-engineered PD-1 knockout-T cells anti-mesothelin CAR-T cells	Phase 1	China
NCT03399448	Multiple Myeloma Melanoma Synovial Sarcoma Myxoid Round Cell Liposarcoma	T cells engineered to express NY-ESO-1 TCR and CRISPR/Cas9-engineered knockout TCR and PD-1 in combination with chemotherapy	Phase 1	United States
NCT03538613	Gastrointestinal Epithelial Cancer Gastrointestinal Neoplasm Cancer of Gastrointestinal Tract Cancer, Gastrointestinal	CRISPR/Cas9-engineered CSH knockout T cells	Phase 1/Phase 2	United States
NCT03342547	Gastrointestinal Infection	Participant intestinal stem cell differentiation to miniguts followed by CRISPR/Cas9 genetic screens upon norovirus infections	N/A	China
NCT03606486	High Grade Ovarian Serous Adenocarcinoma Stage II Ovarian Cancer AJCC v8 Stage IIIA Ovarian Cancer AJCC v8 Stage IIIA Ovarian Cancer AJCC v8 Stage IIIB Ovarian Cancer AJCC v8 Stage IIIC Ovarian Cancer AJCC v8 Stage IV Ovarian Cancer AJCC v8 Stage IVA Ovarian Cancer AJCC v8 Stage IVB Ovarian Cancer AJCC v8	Crispr-Duplex sequencing will be used to detect tumor associated mutations in TP53 gene in ovarian cancer samples	N/A	United States
NCT0338967	B Cell Leukemia	CRISPR/Cas9 Gene-editing of CAR-T Cells Targeting CD19 and CD20 or CD22	Phase 1/Phase 2	China
NCT02944481	Malignant Hyperthermia	Genetic comparison of MH phenotype subjects to that of the CHCT negative control subjects	N/A, observational	United States
2017-005531-38	β -thalassaemia	CRISPR technology will be used to test candidate genes/mutations CRISPR/Cas9 Modified CD34+ Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cells (hHSPGs)	Phase 1/Phase 2	Europe

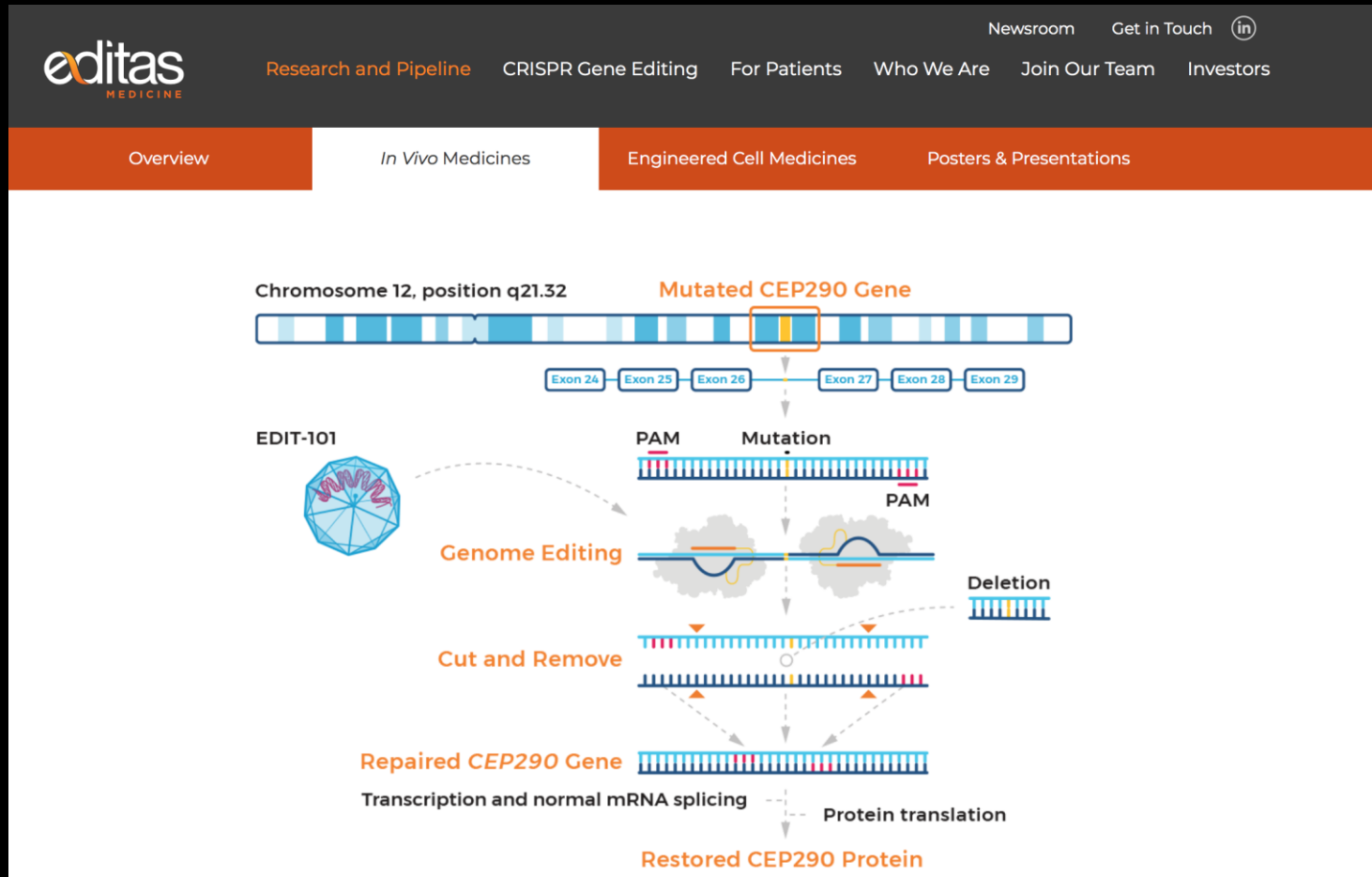
Genom Düzenleme Teknolojileri

Klinik çalışmalar: ZFN



Genom Düzenleme Teknolojileri

Klinik çalışmalar: CRISPR



Genom Düzenleme Teknolojileri

Klinik çalışmalar: CRISPR



GENE EDITING

PROGRAMS

Pipeline

Hemoglobinopathies

Immuno-Oncology

Regenerative
Medicine

In Vivo

ABOUT US

Patients

Investors

Careers

Tackling a range of diseases with different approaches

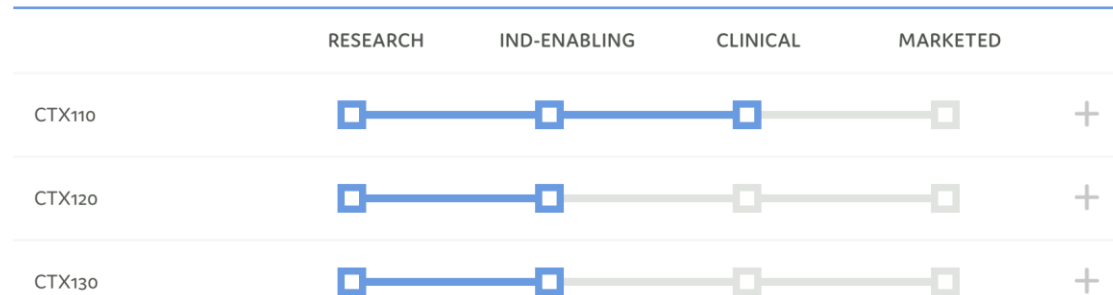
We have established a portfolio of programs by selecting disease targets based on a number of criteria, including unmet medical need, technical feasibility, advantages of CRISPR/Cas9 relative to other approaches and time required to advance the product candidate into and through clinical trials.



Hemoglobinopathies



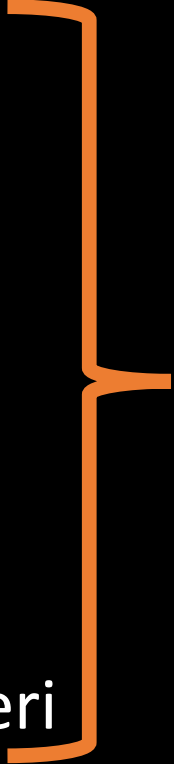
Immuno-Oncology



Genom Düzenleme Teknolojileri

Klinik çalışma sayısının artması için:

1. Hedef dışı etki
2. Hedefte öngörülemeyen etki
3. Etkinlik
4. Bağışıklık yanıtı
5. Hedef hücrelere taşınma
6. Uzun dönem etkileri görememe
7. Etik ve yasal düzenleme eksiklikleri



ÇÖZÜM

Genom Düzenleme Teknolojileri

Etik ve Yasal Durum

Farklı düzlemler:

- Temel bilim araştırmaları, preklinik çalışmalar
- İnsanların denek olduğu çalışmalar
- Ekosistemi etkileyecek hayvan, bitki ve diğer canlılar üzerinde yapılan çalışmalar
- Kötü niyetli kullanımlar: Biyolojik silah

Genom Düzenleme Teknolojileri

Etik ve Yasal Durum

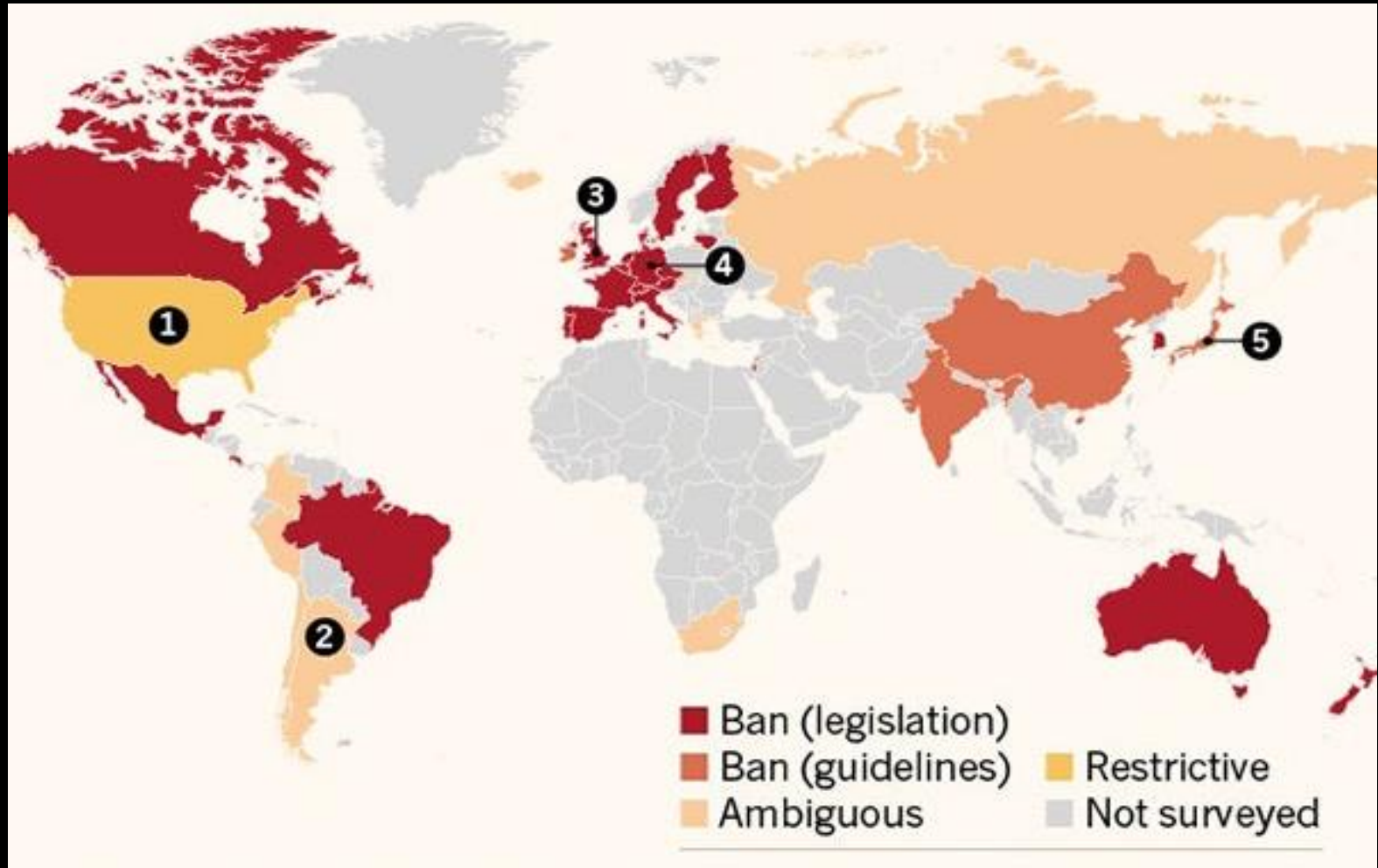
İnsan çalışmaları:

1. Amaç: Tedavi / iyileştirme
2. Ex-vivo/In-vivo
3. Somatik/Germline



Genom Düzenleme Teknolojileri

Etik ve Yasal Durum



Genom Düzenleme Teknolojileri

Etik ve Yasal Durum

- First International Summit on Human Gene Editing (Aralık, 2015)

The National Academic of Sciences, Engineering and Medicine (NASEM), Chinese Academy of Sciences, UK Royal Academy of Science

- WHO 2018'de tavsiye kararları yayınlıyor
- Second International Summit on Human Gene Editing (2019, Londra)

Raporu bu sene içinde bekleniyor

Genom Düzenleme Teknolojileri

Etik ve Yasal Durum

-  Temel bilim araştırmaları için genom düzenleme
-  Ciddi hastalıkların tedavisi için somatik genom düzenleme
-  Alternatif söz konusu olmadığında ciddi bir genetik hastalığın tedavisi için germline genom düzenleme
-  İyileştirme amaçlı somatik ya da germline genom düzenleme

Genom Düzenleme Teknolojileri

Etik ve Yasal Durum

- Yarar/Zarar oranı kabul edilebilir
- Bilgilendirilmiş onam mevcut
- Tanınan otoritelerce konulan düzenlemelere uygun ve gerekli izinler alınmış (FDA, EMA,...)
- Bu koşullar altında somatik hücrelerde genom düzenleme çalışmaları kliniğe taşınabilir.

Genom Düzenleme Teknolojileri

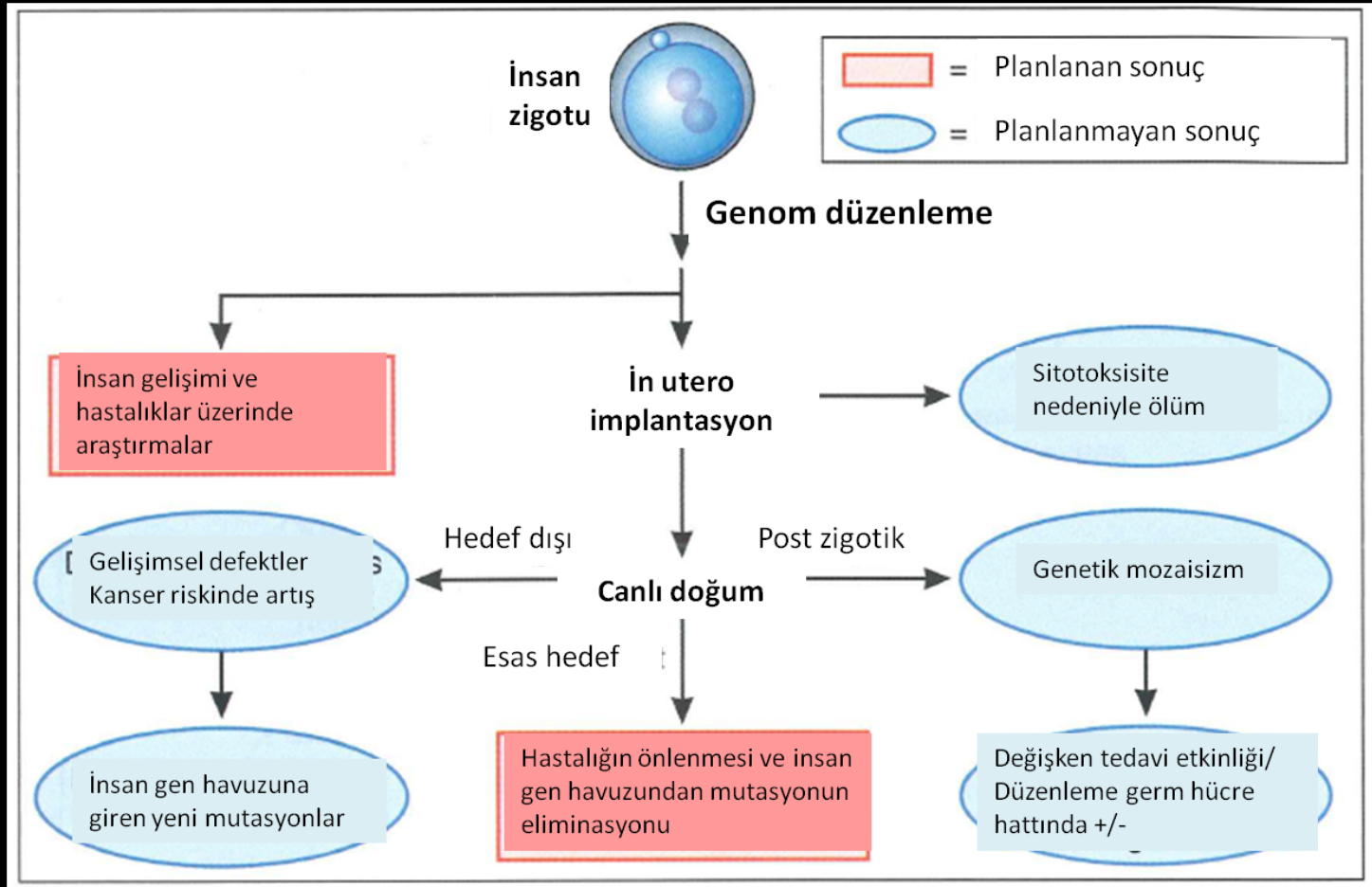
Etik ve Yasal Durum

Somatik hücrelerde genom düzenleme sırasında germ hücre hattında istenmeyen genom düzenleme söz konusu olabilir mi?

- In-vivo genom düzenleme sonucu
- Şu ana kadarki çalışmalarda ya da preklinik çalışmalarda Ø
- Embriyoların ex-vivo her türlü manipülasyonu bile spontan olarak germ hücrelerinde değişikliklere sebep olabilir
- Kemoterapotikler ve bazı ilaçlar da benzer riske sahip

Genom Düzenleme Teknolojileri

Etik ve Yasal Durum



Genom Düzenleme Teknolojileri

Etik ve Yasal Durum

İnsan embriyolarındaki ilk genom düzenleme girişimi

- Çinli araştırmacılar
- β -talasemi, triploid yumurtalar, CRISPR/Cas9
- Düşük etkinlik
- Çok sayıda hedef dışı etki
- Çok tartışmalı
- Bu tarz bir çalışma için erken !!!

Genom Düzenleme Teknolojileri

Etik ve Yasal Durum

İnsan embriyolarındaki genom düzenleme çalışmaları

- Yaşama şansı olan zigotlarda çalışmalarda mevcut

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz eksikliği

Hipertrofik kardiyomiyopati

- Hedefte hatalı sonuç, düşük etkinlik, mozaiklik, hedef dışı etkiler
- Potansiyel var ama yolun başında

Genom Düzenleme Teknolojileri

Etik ve Yasal Durum

- CRISPR Bebekleri: Dr. He, 2018, Çin



Genom Düzenleme Teknolojileri

Etik ve Yasal Durum

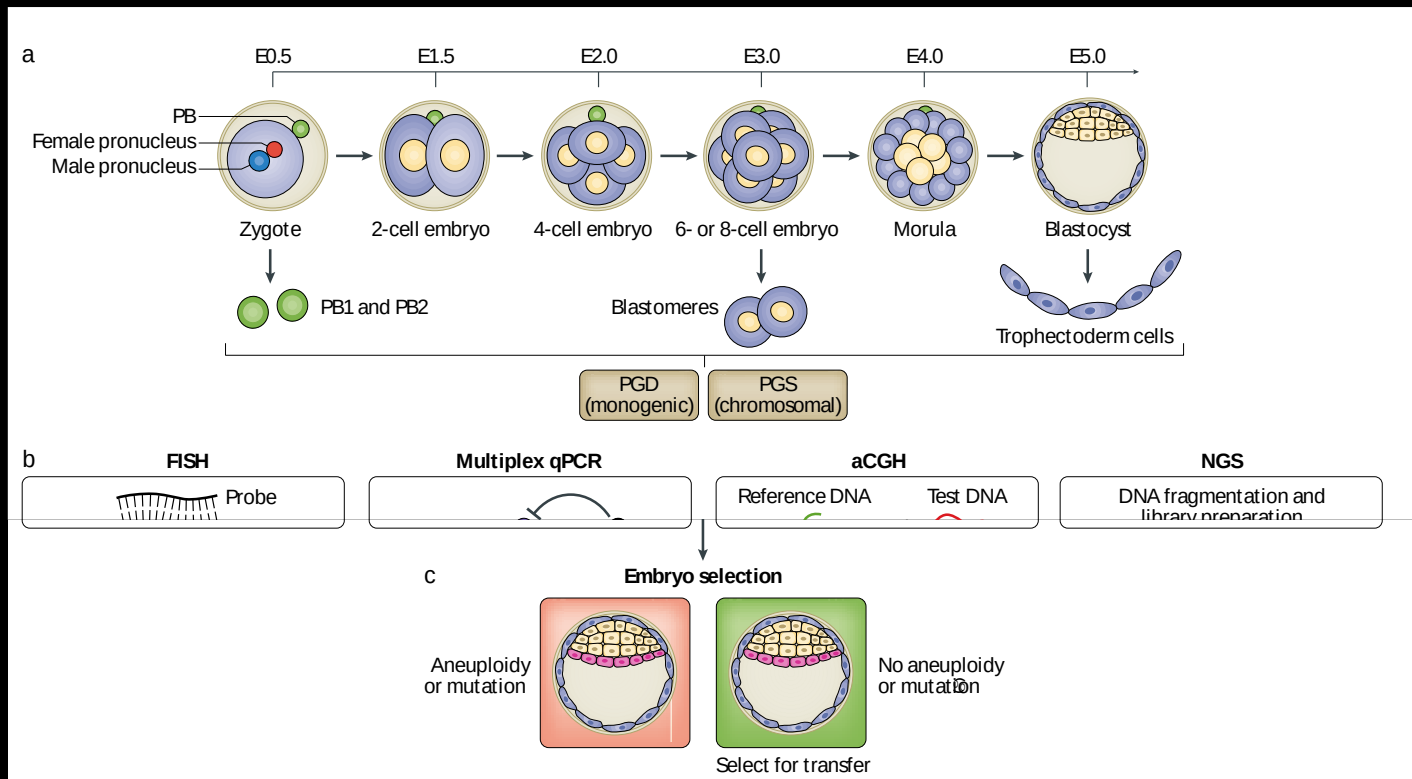
CRISPR Bebekleri

- Mevcut ve planlanan çalışmalarda fonlama ve etik onay alma sorunları
- Kamuoyunda olumsuz tepkilerin oluşması
- Uluslararası etik ve yasal düzenleme ihtiyacına yönelik çalışmalarda hızlanma

Genom Düzenleme Teknolojileri

Etik ve Yasal Durum

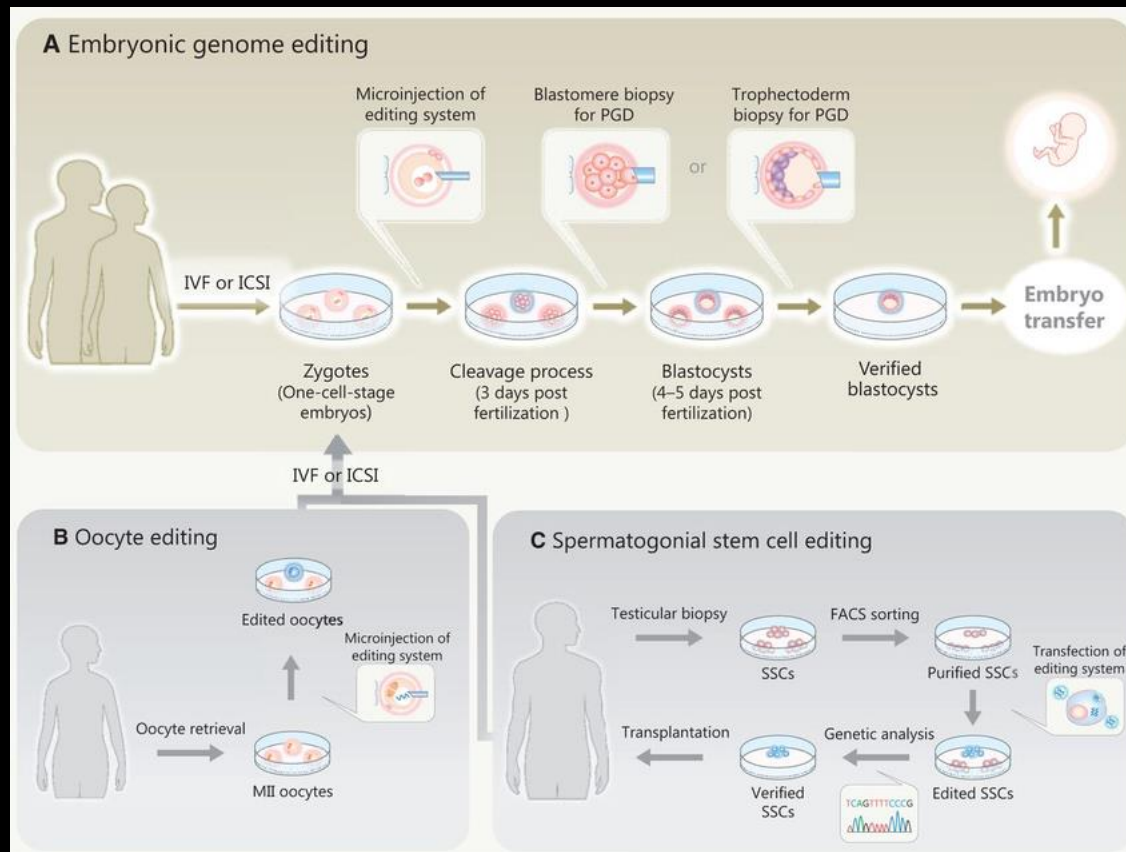
Preimplantasyon genetik tanı vs Genom Düzenleme



Genom Düzenleme Teknolojileri

Etik ve Yasal Durum

Preimplantasyon genetik tanı vs Genom Düzenleme



Genom Düzenleme Teknolojileri

Etik ve Yasal Durum

Preimplantasyon genetik tanı vs Genom Düzenleme

PGD'nin yetersiz kaldığı koşullar neler?

- Her iki ebeveyn AR hastalık açısından homozigot ve hasta
- Tek ebeveyn AD hastalık açısından homozigot
- Bu ebeveynler genetik açıdan ilişkili çocuk konusunda ısrarcı
- PGD için yeterli embriyo elde edilemiyor

Genom Düzenleme Teknolojileri

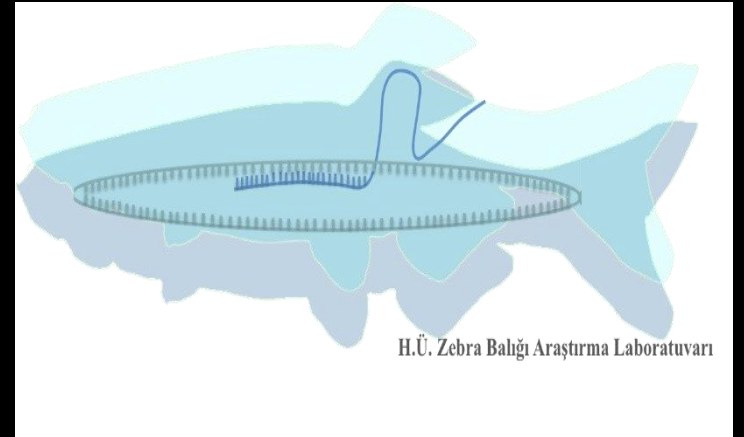
Çözülmesi Beklenen Sorunlar

- Ne kadar hedef dışı etki tolere edilebilir?
- Hedefte değişiklik ama ne kadar hatasız?
- Hangi tip genom düzenleme güvenilir?
- Mozaiklik kabul edilebilir mi?
- Uygulama sonuçları ne kadar takip gerektirecek?
- Dünya etik ve sosyal açıdan buna hazır mı?

Genom Düzenleme Teknolojileri

Biz neler yapıyoruz?

- Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda Prof. Dr. Pervin Dinçer ve ekibi
- Tübitak 1001 projesi ile 2015'te kurduğumuz ve Hacettepe BAP altyapı projesi sayesinde de kapasite artışı ve iyileştirme sağladığımız Zebra Balığı Araştırma Laboratuvarı'nda bu teknolojiyi uyguluyoruz.

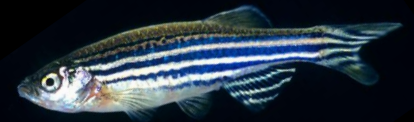


Genom Düzenleme Teknolojileri

Biz neler yapıyoruz?

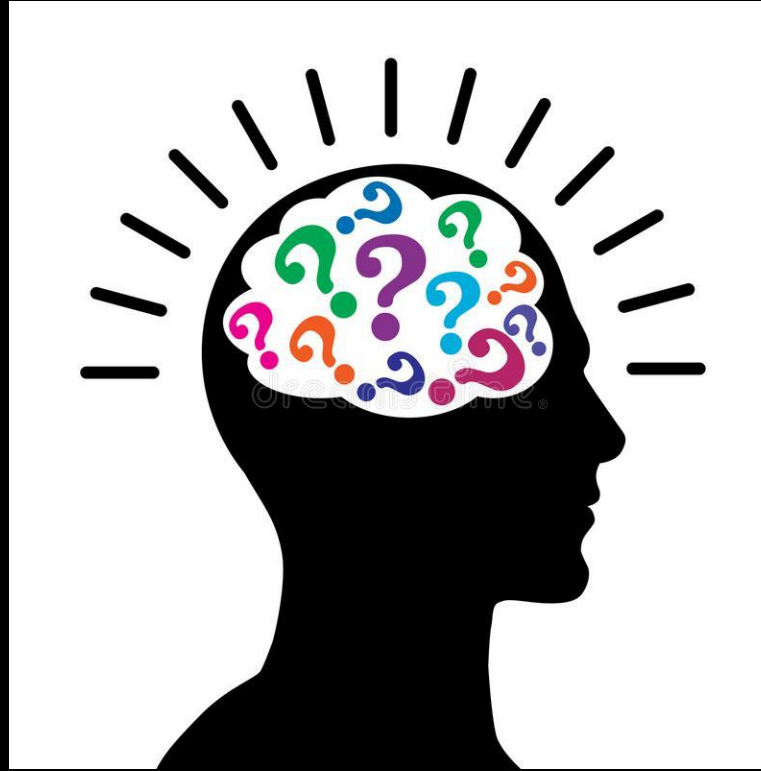
Nadir hastalık modelleri oluşturulması amacıyla hücre hatlarında ve zebra balıklarında TALEN ve daha sıklıkla CRISPR/Cas9 sistemleri ile çalışıyoruz.

- Kas distrofileri
- Kornea Distrofileri



Genom Düzenleme Teknolojileri

SİZİN SORULARARINIZ



TEŞEKKÜR EDERİM

fulya.yt@hacettepe.edu.tr

