مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۷، شماره ۴، زمستان ۹۶، صفحات ۲۲۳ تا ۲۳۶

Review Article

CRISPR/Cas9: ابزار قدرتمند مولکولی برای ویرایش ژنوم

محمدرضا نوری دلویی [۱]، سعیده کاوسی [۲]، نازنین رحیمی راد [۲]

[۱] استاد، دکترای ژنتیک مولکولی پزشکی، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
[۲] کارشناس ارشد ژنتیک مولکولی دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

اصلاح هدفمند ژنومی با استفاده از نوکلئازهای هدایت شونده توسط RNA روشی سریع، آسان و پربازده است که نه تنها امکان دستکاری و تغییر ژن‌ها و مطالعات کارکردی را برای پژوهشگران فراهم نموده است، بلکه آگاهی آن‌ها را در رابطه با اساس مولکولی بیماری‌ها و ابداع روش‌های درمانی نوین و هدفمند افزایش داده است. تاکنون فنون متفاوتی با عنوان قیچی‌های مولکولی با قابلیت ویرایش هدفمند ژنوم شامل ZFN، TALEN و CRISPR/Cas9 ایجاد شده است. در واقع CRISPR/Cas9، سیستم ایمنی باکتری‌ها در برابر ویروس‌ها است که در آن نوکلئاز Cas9 توسط یک RNAی راهنمای تک رشته به توالی‌های مکمل هدف متصل شده و تغییراتی را اِعمال می‌کند. پیشرفت‌های حاصل شده در انتقال، ترمیم و پیدایش راهکارهای ویژه موجب ابداع رده‌های متفاوت CRISPR/Cas9 شده است. از آن‌جایی که این ابزار تنومند، قادر به اصلاح مستقیم جهش‌های عامل بیماری است، توانایی آن در درمان اختلالات ژنتیکی مورد توجه فوق العاده‌ی پژوهش‌گران قرار گرفته است. با توجه به موارد گزارش شده از هدف‌گیری‌های غیر اختصاصی پروتئین Cas9، تمرکز بسیاری از پژوهش‌ها بر روی ارتقاء ویژگی‌های Cas9 قرار گرفته است. در این راستا پیشرفت‌های چشم‌گیر در انتخاب RNA راهنما، آنزیم‌های جدید و روش‌های شناسایی هدف‌گیری‌های نابجا را می‌توان نام برد. در این مقاله مروری، تاریخچه و جنبه‌های متفاوت سیستم CRISPR/Cas9 مانند دقت در هدف‌گیری ژنوم، انتقال سیستم و کنترل آن بر روی رخدادهای ترمیمی همراه با کاربردهای آن در پژوهش‌های آتی زیست شناسی و درمان‌های نوین بیماری‌ها مورد بررسی و بحث قرار گرفته است.

واژگان کلیدی: *ویرایش ژنوم، CRISPR/Cas9، هدف‌گیری اختصاصی، درمان‌های نوین.*

مقدمه

توالی یابی ژنوم انسان نقطه عطف در مطالعات پایه ژنتیکی بیماری‌ها به شمار می‌رود. پیشرفت‌های اخیر در روش‌های توالی یابی این امکان را فراهم آورده است که در خلال کمتر از یک هفته بتوان ژنوم کامل یک انسان را با فناوری Hiseq $X_{10,5}$ با هزینه حدود ۱۰۰۰ دلار امریکا توالی یابی کرد. امروزه اطلاعات فراوانی در رابطه با توالی ژن‌ها و انواع واریانت‌های میان افراد با پیش زمینه‌های متفاوت در دسترس است. با این وجود دانشِ ما، در رابطه با کارکرد ژن‌ها و واریانت‌ها تا همین اواخر بسیار محدود بوده است و این امر از جمله ناشی از کمبود یک روش مهندسی با توانایی ایجاد تغییرات هدفمند در توالی ژن‌ها به جهت تسهیل بررسی کارکرد مولکولی آن‌ها دارد. فنون توانمند ژنتیک با ایجاد انواع دست‌ورزی‌ها در سطح تک باز به آسان‌تر شدن ارزیابی کارکرد ژن‌ها و پیشرفت مطالعات مرتبط با الگوهای بیماری منجر شده است. نخستین جرقه‌های مهندسی ژنتیک در سال ۱۹۷۰ با روش‌های ارتقاء یافته برای تغییر ناحیه‌ای از DNA در مخمر توسط سیستم نوترکیبی هومولوگ زده شد. اواخر دهه ۱۹۸۰، Capecchi و

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه ژنتیک پزشکی، محمدرضا نوری دلوئی (**email**: nooridaloii@tums.ac.ir)

تاریخ دریافت مقاله: ۹۶/۵/۳
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۶/۸/۸

همکاران روش‌هایی برای هدف‌گیری اختصاصی ژنوم مبتنی بر استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی و نوترکیبی هومولوگ مطرح کردند. رویکردهای پژوهشی دانشمندان مطالعه‌ی بیماری‌ها در جانوران الگو -اغلب موش‌ها- را تسهیل کرده و به کشف و ارتقاء حوزه دارویی نیز انجامیده است. اگرچه متاسفانه به علت محدودیت‌های نوترکیبی هومولوگ برای هدف گیری اختصاصی ژنوم تنها در برخی از سلول‌های خاص، تعمیم دادن این فناوری به سایر انواع سلول‌ها و سیستم‌های یوکاریوتی تا همین اواخر با شکست مواجه شد (۳-۱).

برای عبور از چالش مورد اشاره در بالا، شماری از پژوهشگران تلاش خود را برای طراحی یک روش کارآمد را که قادر به ایجاد شکست دورشته DSB (Double Strand Breakage) و مهار سیستم ترمیم درون سلول باشد آغاز کردند تا بدین وسیله قادر به ایجاد تغییر ژنوم انواع سلول‌ها باشند. توانایی القاء شکست دورشته در ژنوم به شکل هدفمند و در جایگاه اختصاصی این اجازه را به پژوهش‌گران می‌دهد که انواع تغییرات را در ژنوم موردنظر ایجاد کنند. به طور طبیعی درون سلول‌ها شکست دورشته ای DNA توسط دو سازوکار ترمیمی بازسازی می‌شود. نخستین ساز و کار اتصال انتهاهای غیرهومولوگ (Non-Homologous End Joining: NHEJ) با ضریب خطای بالا است و کارکرد آن بدین نحو است که دو انتهای شکسته شده را به هم اتصال می‌دهد و در اغلب موارد همراه با حذف و یا اضافه شدن (Insertion and deletion: indel) نوکلئوتیدها همراه است. دومین ساز و کار، ترمیم مستقیم هومولوگ (Homology-Directed Repair) با دقت بسیار بالا می باشد که کارکرد آن بدین نحو است که از الگوی DNA با انتهاهای هومولوگ در نقطه شکست بدون هیچ حذف و اضافه ای استفاده می‌شود. سیستم ترمیم NHEJ در غیرفعال کردن (Knock-out) ژن‌ها کاربرد دارد و به همین دلیل می‌توان از آن در مطالعات کارکردی ژنوم بهره گرفت. از سوی دیگر از سیستم ترمیم HDR می‌توان برای ویرایش ژنوم استفاده کرد و به واسطه آن توالی DNA را از نو نوشت و واریانت های جدید ژنی و پروتئینی را به وجود آورد. با استفاده از تغییرات این دو روش می‌توان در راستای آشکارسازی هرچه تمام‌تر ژنومیک کارکردی و ژنومیک پزشکی گام های بلندی را برداشت. به عبارت دیگر بزرگترین چالش پیش رو در این حوزه، القای شکست دورشته ای هدفمند در جایگاه ویژه ای از ژنوم است. از آن‌جا که در طبیعت، آنزیم‌هایی با توانایی ایجاد شکست دورشته ای مختص مکان و هدفمند وجود ندارد؛ لازم است توسط روش‌های متفاوت و مناسب مهندسی ژنتیک ویژگی شناسایی و اتصال به توالی ویژه‌ای از DNA را در آن‌ها ایجاد کرد. با طراحی این آنزیم‌ها و تولید آن‌ها به شکل *in vitro* و انتقال آن‌ها به سلول‌ها می‌توان شکست‌هایی با جایگاه مشخص را القا کرد. برای دستیابی به این هدف، پژوهشگران بر روی شناسایی عوامل متصل شونده به DNA تمرکز کرده‌اند که توسط فنون مهندسی ژنتیک قابلیت اتصال به توالی خاص DNA را دارا می‌باشد و با استفاده از قلمروهای (Domains) کاتالیتیک ایجاد شکاف DNA در ناحیه موردنظر را منجر می‌شود (۳،۴).

برای فهم بهتر تنظیمات اپی ژنتیکی و فعالیت ژن‌ها نیاز به فن‌اوری‌های کارآمد در ویرایش ژنوم و در موجودات الگو است. با بررسی‌های مستقیم ژنتیکی می‌توان توسط روش فنوتیپ به ژنوتیپ، یک تغییر ژنتیکی خاص در ژنوم را که منجر به فنوتیپ مشخصی شده است، تحت ارزیابی قرار داد. به طور کلی، در خلال این تغییرات شماری از ژن‌ها در ژنوم تحت تأثیر قرار می‌گیرند، بدین ترتیب می‌توان سلول‌ها و موجودات با فنوتیپ مشخص را انتخاب کرده و سپس مکان تغییر یافته را تعیین توالی کرد تا به واسطه آن ویژگی‌های ژنتیکی ایجاد کننده فنوتیپ مذکور شناسایی شوند. فنون جدیدتر بر اساس تداخل RNA (RNA interference) ویژه RNA های کوتاه سنجاق سری (shRNA) به جهت ایجاد تغییرات هدفمند در ژنوم، انقلابی شگرف در حوزه بررسی ژنوم در موجودات ایجاد کرده‌اند. ساز و کار این فرایند بدین نحو است که shRNA با به کار گرفتن ماشین RNAی درون سلولی توالی mRNAی مکمل را هدف قرار داده و به واسطه آن ژن مربوطه را ناک دان می‌کند. بر خلاف کاربرد فراوان RNAi در بررسی شماری از فرایندهای زیستی این روش دارای معایبی همانند عدم خاموش سازی کامل رونوشت، طیف وسیعی از رخداد جهش‌های ناخواسته است که به نوبه‌ی خود به سیگنال ضعیف و ایجاد اختلال در تفسیر درست نتایج می‌انجامد (۸-۵).

پیش از شکل‌گیری فناوری CRISPR پژوهشگران از ابزارهای متفاوتی که قادر به ایجاد شکست دورشته در DNA می‌باشند برای ایجاد انواع تغییرات در ژنوم استفاده می‌کردند. برای نمونه ۴ نوع متفاوت از نوکلئازهای متصل شونده به DNA شامل مگانوکلئازها، نوکلئازهای انگشت روی (Zinc Finger Nucleases: ZFN)، نوکلئازهایی با کارکرد مشابه فعال کننده‌های عوامل رونویسی (Transcription Activator-like Effector Nuclease :TALEN) و نوکلئاز Cas9 را که جدیدترین نوع کشف شده است را می‌توان نام برد (۹).

هر یک از نوکلئازهای نام برده شده در بالا با محدودیت‌هایی روبرو بوده‌اند. مگانوکلئازها مشابه آنزیم‌های محدودگر عمل کرده و به گونه‌ای طراحی شده‌اند که قادر به هدف گیری توالی‌هایی به طول ۱۴ تا ۴۰ جفت باز هستند. مگانوکلئازها به دلیل دارا بودن کاستی هایی مانند عدم ویژگی کافی در شناسایی DNAی هدف و نیاز قلمرو های شکافنده آن‌ها به ادغام با توالی هدف، تنها در مدت کوتاهی استفاده شده است. ZFN ها و TALEN ها دارای کارکردهای نسبتاً مشابهی هستند، اگرچه در قلمرو متصل شونده به DNA با هم تفاوت دارند و الگوهای سه و تک نوکلئوتیدی را شامل می‌شود. این آنزیم‌ها دارای قلمرو های متصل شونده به DNAی جداگانه و یک قلمرو شکافنده غیراختصاصی تحت عنوان اندونوکلئاز FokI می باشند. این ویژگی ها البته به برتری کارایی این دو آنزیم نسبت به مگانوکلئازها انجامیده است (۹،۱۰).

در رابطه با ZFNها، بزرگ‌ترین چالش طراحی و ساخت آن‌ها با توجه به ایجاد خصوصیت اتصال اختصاصی به هدف است و در مورد TALEN ها بر خلاف داشتن خصوصیت اتصال یک به یک بین قطعات TALE و هر یک از بازهای توالی هدف نیازمند فن‌های پیچیده کلونینگ مولکولی برای طراحی اجزای TALE مشخص و حفاظت شده است. سرانجام ابداع روش توانمند CRISPR، روش‌های به مراتب به صرفه‌تر و آسان‌تر برای ایجاد انواع تغییرات در ژنوم و مهندسی پروتئین، در مقایسه با روش‌های پیشین شکل گرفت (جدول ۱) (۱۱).

با توجه به دست ورزی راحت‌تر، مراحل ساده‌تر و پایین‌تر بودن هزینه‌ها CRISPR/Cas9 به عنوان سیستم برتر و انقلابی بزرگ در پژوهش های زیست شناسی انتخاب شد. این سیستم به واسطه ارتقای روش‌های درمانی به بهبود شرایط سلامتی انسان‌ها و مقابله با بسیاری از بیماری‌ها منجر شده است (۱۲). در این مقاله مروری با بهره گیری از ده‌ها مقاله معتبر و جدید و تجارب کسب شده علمی نگاه کوچکی به کارآمدترین روش مهندسی ژنوم "سیستم CRISPR/Cas9"، سپس روش‌های مطرح شده برای ارتقاء این روش و توانایی این سیستم در انواع درمان‌های بیماری‌ها در معرض معرفی و بحث اجمالی قرار گرفته است.

جدول۱. مقایسه انواع نوکلئازهای با قابلیت برنامه ریزی

ویژگی‌ها	ZFN	TALEN	CRISPR
جزء متصل شونده به DNA	پروتئین	پروتئین	RNA
اندازه توالی هدف	۱۴-۴۰	۳۰-۴۰	۲۲
جزء نوکلئازی	FokI	FokI	Cas
میزان سمیت	متغیر- بالا	پایین	پایین
طراحی سیستم	پیچیده	پیچیده	ساده
میزان کارکرد سیستم	پایین	پایین	بالا

ZFN, zinc finger nuclease; TALEN, transcription activator-like effector nuclease; CRISPR, clustered regularly interspaced short palindromic repeats.

CRISPR/Cas9 در ایمنی اکتسابی باکتری‌ها

در سال ۱۹۸۷، Ishiuo و همکاران تکرارهای خوشه‌ای CRISPR را در باکتری اشرشیا کولی شناسایی کردند. این پژوهشگران دریافتند که این نواحی دارای یک بارکد اختصاصی تحت عنوان فاصله انداز ناشی از منشأ پلاسمیدی و یا ویروسی خود هستند. در سال ۲۰۰۷، فرضیه دخالت داشتن این تکرارها در دفاع اکتسابی پروکاریوت ها به اثبات رسید. به عبارت دیگر، در خلال مواجهه با فاژها شکل‌گیری توالی فاصله انداز در ژنوم باکتری رخ می‌دهد و میزان حساسیت باکتری‌ها در آلوده شدن توسط فاژها به محتوای توالی فاصله انداز بستگی دارد. مطالعات بعدی نشان دادند که CRISPR به شکل یک مجموعه با اندونوکلئاز Cas9 کار می‌کند، بدین نحو که ژن کدکننده پروتئین Cas9 در مجاورت لوکوس CRISPR قرار گرفته و به ایجاد شکاف در توالی DNA و یا RNA منجر می‌شود.

بر اساس این یافته‌ها شماری از پژوهش‌ها، شناسایی اجزای تشکیل دهنده سیستم CRISPR/Cas9 و استفاده از این دانش در مهندسی ژنتیک و ایجاد تغییرات مختص جایگاه در ژنوم را در کانون توجه خود قرار دادند (۱۳).

باکتری‌ها و آرکئی‌ها توسط CRISPR/Cas9 از ژنوم خود در برابر حمله‌ی نوکلئیک اسید فاژ ها و پلاسمیدهای ادغام شونده محافظت می‌کنند. در واقع سیستم CRISPR/Cas9 به کمک سیستم ایمنی آمده و توسط فعالیت‌های هماهنگ شده شماری از پروتئین‌ها و اسید نوکلئیک‌های مهاجم اعم از DNA و RNA را هدف قرار می‌دهد (شکل ۱).

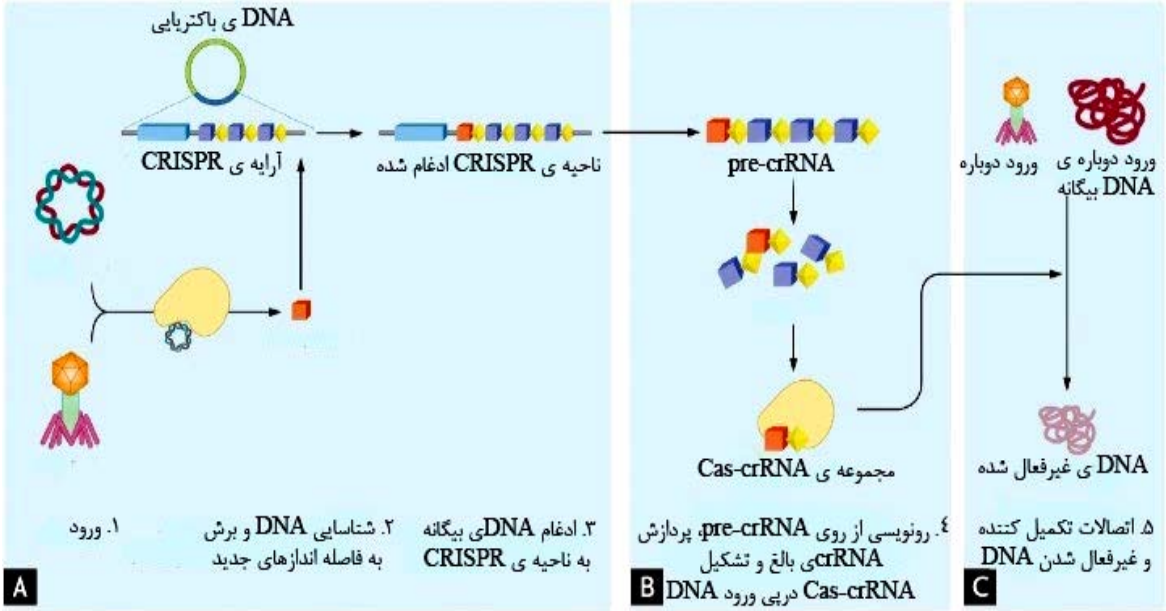
سیستم‌های CRISPR/Cas9 را بر اساس کارکرد اجزای تشکیل دهنده خود به دو رده اصلی تقسیم می‌کنند. رده

نخست، سیستم‌های CRISPR/Cas9 هستند که از چند ریز جزء عمل کننده از جنس RNA تشکیل شده اند و شامل تیپ I و III و تیپ IV هستند و رده‌ی دوم، سیستم‌های CRISPR/Cas9 از یک تک جزء عمل‌کننده از جنس RNA تشکیل شده اند که شامل تیپ II و تیپ V می‌باشند (۱۴).

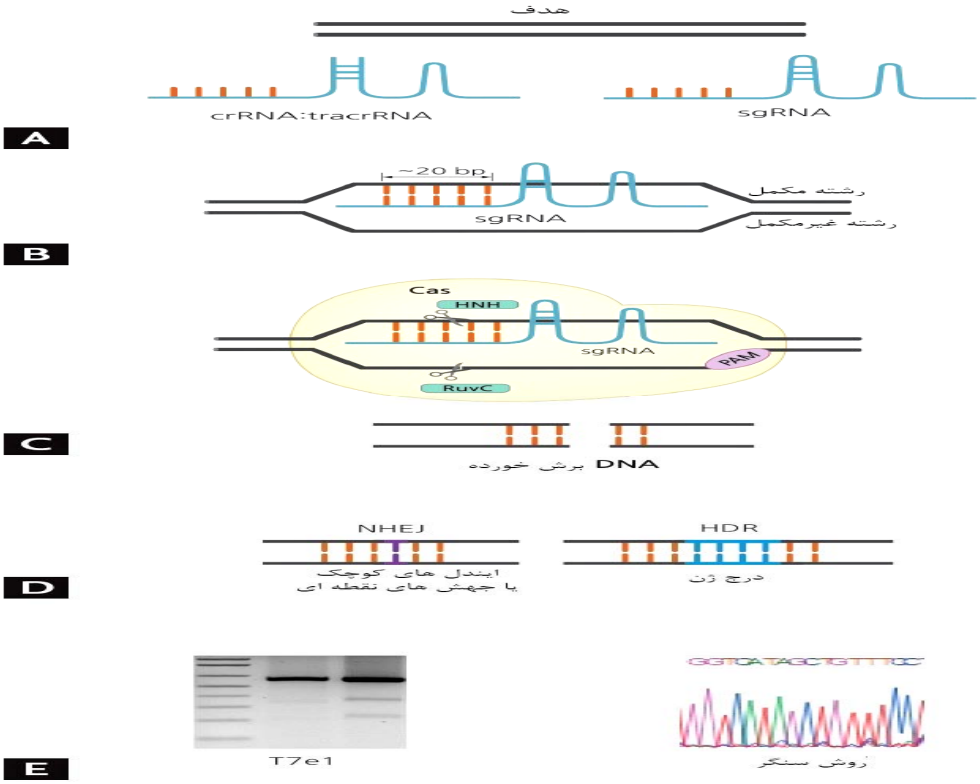
سیستم CRISPR/Cas9 کارکردی مانند ماشین سیستم ایمنی مولکول دارد و با ایجاد یک حافظه مولکولی از تهاجم‌های پیشین به شکل یک توالی فاصله انداز به کمک سیستم ایمنی می‌آید. در واقع از توالی قطعه فاصله‌انداز برای هدف‌گیری اسید نوکلئیک به شکل CRISPR RNA یا به اختصار crRNA استفاده می‌شود. امروزه انواع متفاوتی از سیستم‌های CRISPR/Cas9 یافت شده که قادر به هدف گیری مولکول‌های DNA و RNA به واسطه‌ی مجموعه چندریبونوکلئوپروتئینی هستند. ساده‌ترین نوع آن تیپ II است که تنها اندونوکلئاز Cas9 را دارد و هدایت آن توسط RNA راهنما (guide RNA) متشکل از CRISPR و ترانس اکتیو (Trans activating CRISPR RNA :tracrRNA) CRISPR/RNA انجام می‌پذیرد. این مولکول RNA به گونه‌ای مهندسی شده است که توالی مربوطه را به شکل یک RNA راهنمای تک رشته sgRNA ارائه دهد و در خلال اتصال به اندونوکلئاز Cas9 آن را هدایت کند. مجموعه ریبونوکلئوپروتئینی متشکل از اندونوکلئاز Cas9 و RNA به منظور یافتن توالی مکمل روی DNA، شروع به اسکن کردن DNA می‌کند و در پی آن، پیش از موتیف مرتبط با توالی فاصله انداز PAM (Protospacer Associated Motif) توالی NGG، یک برش ایجاد می‌کند. توالی PAM که برای ایجاد برش توسط اندونوکلئاز Cas9 ضروری است، قادر به تشخیص DNA خودی از بیگانه است و به همین دلیل است که گونه‌های باکتریایی و آرکئی‌ای در DNAی خودی شکاف ایجاد نمی‌کنند. سیستم CRISPR/Cas9 از sgRNA برای شناسایی توالی مکمل در DNA هدف استفاده کرده و به شکست دورشته‌ای در ناحیه موردنظر منجر می‌شود. به همین دلیل سیستم CRISPR/Cas9 به شدت به قانون جفت شدن بازهای واتسن و کریک بین RNA و DNA هدف که به راحتی می‌توان توسط فنون مهندسی ژنتیک در آن دخل و تصرف کرد، وابسته است. لازم به تاکید است که استفاده از این روش برای ویرایش ژنوم یوکاریوت‌ها تنها نیازمند دستکاری توالی کوتاه sgRNA است و هیچ نیازی به دست‌ورزی‌های پیچیده در حوزه‌ی پروتئین‌ها نیست. با عنایت به سادگی نسبی این سیستم، کارایی بالا و قدرت تمایل زیاد برای کارکرد چندگانه و ساخت کتابخانه، می‌توان از آن در گونه‌ها و رده های سلولی متفاوت بهره‌مند شد (شکل ۲). اگرچه که این سیستم نیز مانند هر فناوری دیگر با محدودیت‌هایی مشتمل بر هدف گیری‌های غیراختصاصی پروتئین Cas9 روبرو است. اهمیت بالای این چالش در حوزه‌ی آزمون‌های بالینی به پیدایش راه-های متعدد برای مقابله با آن منجر شده است. در این راستا توجه به تفاوت‌های این هدف‌گیری غیراختصاصی میان انواع گونه‌ها و رده‌های سلولی حائز اهمیت است. به همین دلیل شماری از پژوهشگران بر روی افزایش ویژگی سیستم CRISPR/Cas9 تمرکز کرده‌اند. این یافته‌ها شامل طراحی کایمریک سیستمی است که از پروتئین Cas9 بدون کارکرد کاتالیتیک و قلمرو کاتالیتیک اندونوکلئاز FokI تشکیل شده است. از سوی دیگر در روش ایجاد جفت شکاف می‌توان از واریانت های Cas9 با قلمرو های تکی با کارکرد نوکلئازی استفاده کردکه هر یک قادر به ایجاد یک تک شکاف هستند. با استفاده از یک جفت sgRNA می‌توان دو شکاف مرتبط و نزدیک به هم در مجموع یک شکاف دو رشته در DNA را شکل داد. اگرچه روش ایجاد جفت شکاف موجب افزایش میزان ویژگی سیستم CRISPR/Cas9 می‌شود، به ندرت شکاف‌های تکی ایجاد شده در DNA به درستی ترمیم نمی‌یابد؛ رخدادی که می‌تواند پیامدهای خطرناکی داشته باشد (۱۵).

fdCas9, fCAS9 و RFN ها واریانت‌هایی هستند که از ادغام قلمرو کاتالیتیک FokI با پروتئین Cas9 غیرفعال از لحاظ فعالیت کاتالیتیک (dCas9) حاصل می‌شوند و میزان ویژگی و دقت سیستم CRISPR/Cas9 را در ایجاد تغییرات در سطح ژنوم به مقدار زیادی افزایش می‌دهند. سایر روش‌ها برپایه تیتراسیون میزان مولکول‌های sgRNA و پروتئین Cas9 و یا طراحی و ایجاد سایر شکل‌های پروتئین کوتاه شده sgRNA نیز به نوبه خود در افزایش ویژگی سیستم CRISPR/Cas9 نقش به سزایی ایفا می‌کنند.

به علت اعمال محدودیت‌های فنون استفاده شده در این حوزه همچون توالی یابی، توانایی پژوهشگران برای شناسایی همه هدف‌گیری های غیراختصاصی کاسته می‌شود. به این دلیل نیاز روز افزون به واریانت‌های جدید پروتئین Cas9 همراه با ویژگی افزایش یافته احساس می‌شود تا به واسطه آن بتوان به روش‌های مطمئن‌تری در حوزه درمان‌های بالینی و به ویژه کار بر روی سلول‌های زاینده دسترسی پیدا کرد زیرا یک تغییر کوچک در توالی این سلول‌ها به یک تغییر عظیم در دودمان حاصل از آن‌ها منجر خواهد شد. به همین جهت، دستیابی به



شکل ۱. سازوکار سیستم ایمنی اکتسابی میکروبی و استفاده آن از سیستم CRISPR. به محض ورود DNAی بیگانه به درون باکتری‌ها آنزیم نوکلئاز وابسته به CRISPR تحت عنوان Cas9 یک توالی جداکننده تحت عنوان Spacer را از DNAی برونی کسب کرده و آن را درون انتهای هدایت‌گر لوکوس CRISPR در ژنوم باکتری وارد می‌کند. سپس رونوشت حاصل از CRISPR در باکتری تحت پردازش قرار می‌گیرد و اگر در آینده حمله دیگری شکل گیرد RNAی بالغ لوکوس CRISPR تحت عنوان crRNA به عنوان یک راهنما برای مجموعه‌ی Cas عمل کرده و DNAی مهاجم مکمل را تخریب می‌کند. A) اکتساب B) ساخت crRNA C) تغییرات



شکل ۲. نمایش ساده ای از فناوری ویرایش ژنوم CRISPR/Cas9 از نحوه‌ی انتخاب هدف تا طراحی RNAی راهنما.

A) انتخاب ژن مورد هدف و طراحی RNA راهنما؛Bایجاد جفت بازهای sgRNA و DNAی ژنومی؛ Cجستجوی موتیف PAM توسط Cas و شکافتن ژن هدف به واسطه القای شکست دو رشته؛ Dتأیید نهایی تغییر ایجاد شده در ژن مورد نظر

یک پروتئین Cas9 بسیار دقیق که افزون بر کوچک بودن دارای انعطاف برای قلمرو PAM باشد، می‌تواند به ارتقاء طیف وسیعی از کاربردهای این سیستم بیانجامد. امروزه از روش CRISPR/Cas9 با ویژگی و کارایی برای ایجاد انواع تغییرات و ویرایش در سطح ژنوم شماری از رده‌های سلولی و ارگانیسم‌های پستانداران استفاده می‌شود. طراحی طیفی از واریانت‌های پروتئین Cas9 قادر به کاهش محدودیت‌های مرتبط با این سیستم می‌باشد و این امکان را فراهم می‌آورد که بتوان توسط هریک از این واریانت های پروتئین Cas9 برای هدف ویژه‌ای استفاده کرد. برای نمونه می‌توان به واریانت cpf1Cas9 اشاره کرد که برای ایجاد انواع تغییرات در سطح ژنوم پستانداران در شماری از پژوهش‌ها مورد استفاده قرار گرفته است. از خصوصیات cpf1Cas9 توانایی آن در ایجاد شکست دورشته‌ای و شکل‌گیری انتهاهای چسبنده است که به افزایش کارایی سیستم ترمیمی HDR منجر می‌شود. از دیگر مزایای cpf1Cas9 کوچک‌تر بودن اندازه آن نسبت به پروتئین Cas9 معمولی است.

در آینده‌ای نه چندان دور انتظار می‌رود که کیت‌های CRISPR/Cas9 به عنوان ابزارهای مولکولی متشکل از واریانت های پروتئین Cas9 و ساختارهای متنوع sgRNA و انواع مولکول‌ها برای اهداف ویژه گسترش یابنده افزون بر این، رده-های جدید نوکلئازهای هدف‌گیرنده‌ی اختصاصی مشابه با CRISPR/Cas9 که کارکرد آن‌ها وابسته به جفت بازهای واتسن و کریک می‌باشد می‌توانند مکمل سیستم‌های کنونی شوند. در مجموع، آشکارا می‌توان تاکید کرد که آینده‌ای روشن در انتظار فنون مهندسی ژنوم است. هم اکنون نیز پژوهشگران به ابزارهایی کارآمد برای پاسخ به شماری از پرسش‌های پایه‌ای و ایجاد تغییرات در ژنوم برای بهبود بیماری‌های ژنتیکی و شناخت اساس مولکولی آن‌ها مجهز شده‌اند (۱۶).

تنظیم هدفمند در سطح رونویسی

بیشترین توجه پژوهشگران مولکولی در این مبحث بر روی توانایی القای شکست دورشته در ژنوم و استفاده از آن برای مطالعات کارکردی و اهداف درمانی متمرکز شده است. از این رو پروتئین Cas9 را می‌توان به گونه‌ای طراحی کردکه حتی فارغ از فعالیت نوکلئازی نیز ویژگی اتصال به توالی DNA در ژنوم هدف را در خود حفظ کند. به‌همین دلیل استفاده از پروتئین‌های کایمریک انگشت روی و یا TALEs به عنوان بخش متصل شونده به DNA و دیگر قلمروهای کاتالیکی تنظیم کننده رونویسی از ملزومات کنترل رونویسی در سطح ژنوم به شمار می‌روند. این قلمروها با پروتئین Cas9 که از لحاظ کاتالیکی غیرفعال است ادغام شده و بدین وسیله تنظیم کننده‌های مصنوعی رونویسی را براساس CRISPR/Cas9 تشکیل می‌دهند (۱۷).

پروتئین‌های کایمری، در واقع رونویسی را به شکل مصنوعی در سطح بیان یک ژن و یا حتی چندین ژن کنترل می‌کنند. در نتیجه قادر به فراهم کردن یک بستر مناسب و قدرتمند برای انجام مطالعات کارکردی ژن‌ها و یا حتی ژنوم در محیط طبیعی آن‌ها و یا تحت شرایط فیزیولوژیکی و مراحل تکوینی خاص می‌باشد (جدول ۲). انجام کنترل‌های دوگانه بر روی بیان ژن‌ها به واسطه‌ی فعال کننده‌ها و مهارکننده‌های رونویسی و عوامل تغییردهنده‌ی کروماتین در سلول‌های خاص یا مراحل تکوینی ویژه برای مطالعه ی کارکردی ژن‌ها به شکل منفرد و یا شبکه‌ای از برهم‌کنش میان ژن‌ها و مسیرهای مرتبط با بیان آن‌ها بسیار ارزشمند است. ایجاد کردن این بستر یک ابزار با ارزش برای رسیدن به مطالعات کارکردی قدرتمند درمیان گونه‌های متفاوت یوکاریوت‌ها به شمار می‌رود، بدین ترتیب می‌توان آشکار کردکه چگونه غیر فعال کردن یک ژن منفرد و یا مجموعه‌ای از ژن‌ها برای ارگانیسم هدف مضر و مرگ‌آور است. به علاوه امروزه تغییرات ایجادشده توسط سیستم CRISPR/Cas9 در سطح وسیع ژنوم استفاده می‌شود و بررسی‌های گسترده با کم‌ترین هدف‌گیری غیراختصاصی نشان دهنده قدرت مطالعات کارکردی میان انواع یوکاریوت‌هاست (۱۸).

CRISPR/Cas9 ادغام شده برای نقشه یابی de novo برهم‌کنش‌های ژنتیکی

جهش هم‌زمان دو ژن موجب ایجاد فنوتیپی ویژه می‌شود که بسیار متفاوت از جهش تک تک در هریک از این ژن‌هاست. این موضوع نشان دهنده ارتباط ژنتیک با کارکرد ژن‌های سازنده یک مجموعه پروتئینی و مشارکت آن‌ها در یک مسیر زیستی است. به همین جهت برای شناخت بهتر سیستم‌های زیستی باید یک چارچوب و نقشه واضح از این کارکردها به دست آورد. از سوی دیگر می‌توان از این ارتباطات ژنتیکی در اهداف درمانی به ویژه در درمان سرطان‌ها سود جست. این نوع درمان‌ها در انواع سرطان‌ها در افراد مختلف با هم متفاوت هستند.

برای به دست آوردن یک نقشه مناسب از شبکه اطلاعات ژنتیکی می‌توان از روش CRISPR/Cas9 استفاده کرد که افزون بر تک تک ژن‌ها برای جفت ژن‌ها هم مناسب است.

جدول۲. نمونه‌های ژن های تغییر یافته در انواع رده های سلولی

دودمان سلولی	بیماری	ژن هدف	راهکار	تحویل	نوکلئاز	منبع
HBE, CFTE	Cystic fibrosis	*CFTR*	HDR-mediated cDNA knock-in	Plasmid	ZFN	Lee et al. (2012)
K-562, Hep3B	Hemophilia B	*hF9*	HDR-mediated addition of corrective cDNA	AAV	ZFN	Li et al. (2011)
K-562	Sickle-cell anemia	*HBB*	HDR-mediated cDNA knock-in	Plasmid	TALEN	Voit et al. (2014)
K- 562, hCD4+ T cells, HEK-293, lymphoblastoid cells, Jurkat cells, hESCs	SCID	*IL2Rγ*	HDR-mediated cDNA knock-in	IDLV, mRNA	ZFN/TALEN	Lombardo et al. (2007) Urnov et al. (2005) Matsubara et al. (2014) Genovese et al. (2014)
Immortalized patient myoblasts	DMD	*DMD*	Excision of exons 51 or 45–55, restoring the reading frame	Plasmid	ZFN/CRISPR	Ousterout et al. (2015) Ousterout et al. (2015)
			Addition of the microdystrophin gene	Plasmid	ZFN	Benabdallah et al. (2013)
			NHEJ restoration of reading frame	Plasmid	TALEN	Ousterout et al. (2013)
Patient fibroblasts	Epidermolysis bullosa	*COL7A1*	HDR using a ssODN	Plasmid	TALEN	Osborn et al. (2013)
SiHa, C33-A, Caski	HPV	*E6, E7*	NHEJ-mediated disruption of promoter, *E6*, and *E7* gene	Plasmid	CRISPR	Zhen et al. (2014) Kennedy et al. (2014) Hu et al. (2014) Yu et al. (2015)
Huh7, HepG2, HepAD38, HepaRG	HBV	Multiple	NHEJ-mediated disruption of multiple genes	Plasmid	CRISPR	Lin et al. (2014) Seeger et al. (2014) Zhen et al. (2015) Dong et al. (2015) Liu et al. (2015) Kennedy et al. (2015) Ramanan et al. (2015)
CHME5, HeLa. TZM-b1, U1	HIV	LTR U3 region	NHEJ-mediated disruption of viral genes	Plasmid	CRISPR	Hu et al. (2014)

HDR, homology-directed repair; ZFN, zinc finger nuclease; hF9, human F9; AAV, adeno-associated virus; TALEN, transcription activator-like effector nuclease; SCID, severe combined immunodeficiency; IDLV, integration-deficient lentiviral vector; DMD, Duchenne muscular dystrophy; CRISPR, clustered regularly interspaced short palindromic repeats; NHEJ, nonhomologous end joining; ssODN, single-stranded oligonucleotide; HPV, human papilloma virus; HBV, hepatitis B virus; HIV, human immunodeficiency virus; LTR U3, long terminal repeat U3.

در این سیستم RNA راهنما gRNA به همراه پروتئین Cas9 توالی‌هایی از ژنوم را که هومولوگ gRNA می‌باشد، هدف قرار می‌دهد و به همین ترتیب با دستکاری کردن gRNA و با استفاده از چندین gRNA در یک مجموعه، هم‌زمان اهداف متفاوتی را در یک سلول مورد ویرایش قرار داد. در این راستا، با ادغام کردن هدف‌گیری چندگانه مجموعه‌ی CRISPR/Cas9 با آرایه‌های الیگونوکلئوتیدی، فنی به دست آمده است که قادر به شناسایی و ویرایش $۱۰^{۵}$ جفت ژن و ساخت کتابخانه‌های دوگانه dual-gRNA می‌باشد. هر یک از gRNA ها قادر به شناسایی یک ژن یا یک توالی نامنظم حذف شده از ژنوم هستند. در واقع توانایی این سیستم در شناسایی یک تک ژن و یک جفت ژن موجب یک کیفیت سنجی سیستماتیک از ارتباطات ژنتیکی در انسان می‌شود. به همین منظور با ترانس‌داکت کردن کتابخانه ویروسی dual-gRNA درون یک جمعیت سلولی که به شکل پایدار Cas9 را بیان می‌کنند و رشد دادن آن‌ها و بررسی تغییرات gRNA در زمان‌های متفاوت می‌توان ارتباطات ژنتیک را بررسی کرد. با استفاده از این روش ۷۳ جفت ژن شامل ژن‌های سرکوب کننده تومور، انکوژن‌ها و ژن‌های هدف داروهای ضد سرطان را به شکل ترکیبی غیر فعال کرده و ارتباط بین آن‌ها را با جزئیات مورد بررسی قرار دادند. در نتیجه‌ی این پژوهش‌ها،

وابستگی چشمگیری بین ارتباط‌های عمومی و کلی بین ژن‌ها و برازندگی تکامل زیستی هر یک از ژن‌ها به تنهایی مشاهده گردیده است. این امر پیشنهاد کننده این موضوع است که ژن‌های فعال در مرکز شبکه ارتباطات از لحاظ کارکردی نسبت به ژن‌های با ارتباط کمتر، بسیار مهم‌تر می‌باشند. به علاوه مشخص شده است که این ارتباطات ژنتیکی در میان رده‌های سلولی مختلف نیز با هم متفاوت می‌باشند و حتی یک ارتباط مشترک هم بین هیچ یک از آن‌ها یافت نشده است. شماری از این ارتباطات همانند BRCA1-PARP1, PTEN/mTOR از پیش شناخته شده‌اند و می‌توان از آن‌ها در درمان‌های هدفمند سود جست (۱۹).

اغلب از روش CRISPR/Cas9 اغلب برای غیر فعال کردن دوگانه جفت ژن‌ها و بررسی ارتباطات بین ژنی استفاده می‌شود اگرچه می‌توان از این روش برای بررسی پاسخ سلول‌ها در مواجهه با داروها نیز بهره گرفت. محصول پروتئینی این ارتباط به طور مستقل توسط فنون سنجش پروتئین قابل بررسی است. سرانجام، با ترمیم چارچوب این ارتباطات در سلول‌های یوکاریوتی می‌توان به مجموعه‌ای از مسیرهای پیام رسانی ایجاد کننده و دخیل در سرطان پی برد و بدین ترتیب متوجه شد که چگونه شبکه‌ی ارتباطی بین ژن‌ها بر روی تومورزایی تأثیر می‌گذارد و از سوی دیگر با استفاده از ارتباطات کشنده ایجاد شده توسط داروهای جدید میزان حساسیت درمان‌های نوین را بهبود بخشید. در این میان باید به نقش حائز اهمیت gRNA در این مجموعه توجه ویژه‌ای داشت و با ارتقاء طراحی آن در بهبود این سیستم تلاش کرد. بدین نحو می‌توان نرخ ویرایش‌های اختصاصی را افزایش داد، میزان اهداف مثبت کاذب را کاهش داد و gRNAای را طراحی کردکه که قلمروهای پروتئینی کارکردی را هدف قرار می‌دهد. از آنجا که اختلاف بیان Cas9 بین سلول‌های یک رده و بین رده‌های متفاوت بر روی کارایی ارتباطات و اختلال ایجاد شده تأثیر می‌گذارد، مطالعات متعدد، به ویژه پروتئومیکس برای ترسیم جامع‌تر این چارچوب ارتباطی لازم می‌باشد. لازم به تاکید است که این چارچوب کاری آزمایشی تنها برای سلول‌های سرطانی کاربرد ندارد بلکه می‌توان از آن برای سیستم‌های زیستی پیچیده و بررسی بیماری‌ها در انواع سلول یوکاریوتی با قابلیت ترانسداکت شدن توسط لنتی ویروس‌ها و رشد در محیط کشت استفاده کرد (۲۰).

CIRCLE-seq

به راحتی می‌توان CRISPER/Cas9 را به نحوی برنامه‌ریزی کرد که به شکل هدفمند در ژنوم یک شکست دورشته‌ای را ایجاد کند. راحتی این فرآیند به استفاده از آن در ویرایش گسترده ژنومی منجر شده است. این شکست دو رشته‌ای توسط سیستم‌های ترمیمی سلول‌ترمیم شده و به اختلال در توالی هدف ژنوم سلول زنده و ارگانیسم منجر می‌شود. به طور معمول از SpCas9 گرفته شده از Streptococcus Pyogenes استفاده می‌شود که نیاز به ۱۷ تا ۲۰ نوکلئوتید تکمیلی بین RNAی راهنما sgRNA و جایگاه هدف proto spacer نیاز دارد. برای استفاده از روش CRISPER/Cas9 در مقاطع بالینی نیاز به تشریح شمار دفعات رخداد و مکان وقوع جهش‌های غیرعمدی و ناخواسته، بسیار حائز اهمیت است. اگرچه در گذشته روش‌های برپایه سلول برای شناسایی این نوع جهش‌ها انجام گرفته است اما این روش‌ها قادر به شناسایی جهش‌های ناخواسته با نرخ رخداد کمتر از یک دهم درصد نمی‌باشد. از سوی دیگر محدودیت‌های ترانسفکشن سلول‌ها و کارایی آن‌ها بر روی امکان پذیری، مقیاس پذیری و تکرار پذیری این نوع روش‌ها تأثیر منفی می‌گذارد. به همین دلیل روش‌های *in vitro* مزایای بی شماری نسبت به روش‌های برپایه سلول دارد. از آن‌جا که در این روش‌ها از اجزای تخلیص شده استفاده می‌شود، نیاز به ترانسفکشن و ترانسداکشن سلولی مرتفع می‌شود. در روش‌های *in vivo* می‌توان بالقوه توالی‌هایی را شناسایی کرد که به ندرت تشخیص آن‌ها توسط روش‌های سلولی امکان پذیر است. در این روش از کتابخانه تصادفی DNA برای شناسایی شکاف‌های ایجاد شده توسط Cas9 استفاده می‌شود (۲۱).

یکی از فنون *in vitro* شناسایی جهش‌های ناخواسته در سطح ژنوم، روش Digenome-seq می‌باشد. این روش بر پایه‌ی شکاف‌های DNAی ژنومی و اتصال آداپتورهایی به همه انتهای آزاد حاصل است که در پی آن می‌توان با استفاده از توالی یابی دقیق و بیوانفورماتیک مکان‌های شکافته شده را به شکل گسترده بررسی کرد. این روش البته به خوانش‌های بلند (۴۰۰ میلیون) نیاز دارد و به همین دلیل شناسایی شکاف‌هایی با نرخ رخداد پایین یک چالش محسوب می‌شود. به این دلیل روش مناسب‌تری با عنوان CIRCLE-seq ارائه شده است که قادر به شناسایی نواحی شکافته شده به واسطه تحریک سیستم CRISPER/Cas9 است که خوانش های زمینه‌ای اختلال برانگیز در دسترس در روش Digenome-seq را حذف می‌کند. این ویژگی نه تنها موجب حساسیت بیشتر در شناسایی جهش‌های ناخواسته می‌شود، بلکه به عنوان یک ماده خام عالی برای توالی یابی نسل بعد به شمار می‌رود. CIRCLE-seq به تنهایی قادر به شناسایی همه جهش‌های رخ داده ناخواسته

کـه توسـط GUIDE-seq و HTGTS شناسـایی بـوده‌انـد، می‌باشد. این روش افزون بر این‌که می‌تواند همه‌ی جهش‌هـای ناخواسته را در ژنوم شناسایی کند، قادر به انجـام ایـن فراینـد بدون نیاز به ژنوم مرجع اسـت. ایـن خصوصـیت در رابطـه بـا موجوداتی که تمام ژنوم آن‌ها در دسترس نیسـت و یـا تـوالی ژنوم آن‌ها دارای هتروژنی بالایی می‌باشد، حائز اهمیـت اسـت. سـرانجام، CIRCLE-seq قـادر بـه شناسـایی جهـش‌هـای ناخواسـته‌ای اسـت کـه توسـط چندشـکلی‌هـای ویـژه تـک نوکلئوتیدی (SNP) افزایش و یا از بین رفته‌اند می‌باشـد و بـه این دلیل این روش برای ایجاد نیم‌رخ شخصی جهش ناخواسته در افراد از کارایی بالایی برخوردار است (۲۲).

اشاره ای بر کاربردهای امروز و فردای CRISPR/Cas9

الف) در پژوهش های سرطان

چنان‌چه می‌دانیم همه سرطان‌ها حاصل از جهش‌های پرشمار و متنوعی هستند که به رشد و تکثیر بیش از حد سـلول‌هـا و بروز فنوتیپ های بدخیم منجر می‌شود. بستر رخداد و حیطـه مختل شده توسط این جهش‌ها را می‌توان بـه ۴ دسـته مجـزا رده بندی کرد: (انکوژن ها، سرکوب کننده های تومور، عوامـل اپی‌ژنتیکی و ژن‌های ایجادکننده مقاومت به شـیمی درمـانی) (۲۳-۲۵).

سیستم CRISPR/Cas9 بـه عنـوان یـک ابـزار قدرتمنـد و بـا ویژگی بالا، توانایی به اصلاح این جهـش‌هـا و درمـان تقریبـی سـرطان‌هـای حاصـل از آن‌هـا را دارد. از آن‌جـا کـه تغییـرات انکوژنی در شماری از سرطان‌هـا، افـزایش تکثیـر سـلول‌هـا و وضعیت بدخیمی را در پی دارند، می‌توان انکوژن هـایی ماننـد گیرنده تیروزین کینازی Erb2 را به طور مستقیم توسـط روش CRISPR/Cas9 هدف قرار داد. از یک دیدگاه تکمیلی توسـط روش CRISPR/Cas9 می‌توان جهش‌های عامل سـرطان را در رده‌های سلولی انسان و الگوهای حیوانی ایجاد کرد. در همـین راستا رده‌های سلولی سرطان‌های ریه، لوکمی میلوئیدی حـاد، سرطان کبد و سرطان پانکراس ساخته شده‌اند (۲۶).

ب) در الگوهای حیوانی

از روش CRISPR/Cas9 می‌توان در الگوهای حیوانی مبتلا بـه انواع بیماری - از بیماری‌های ارثی تـا سـرطان‌هـا- نیـز بهـره گرفت (جدول ۳). تغییرات قابل توارث را توسط انتقال سیستم CRISPR/Cas9 و هدف‌گیری مستقیم یک و یا چنـد الـل در تخم ایجاد کرد. در میان الگوهای حیوانی ترانسـژنیک، بیشـتر آزمون‌ها بر روی الگوهای موشی شـکل گرفتـه اسـت، اگرچـه پژوهشگران موفق به ساخت الگوهای پریمات های غیرانسـانی توسط هدف‌گیری چندگانه ژن‌ها نیز شده‌اند. مزیت این الگوها در بازسازی و امکان بررسی بیماری‌های پیچیده انسانی ماننـد بیماری‌های تحلیل برنده اعصاب است. با این وجود الگـوهـای موشی نسبت به سایرین از مزایای بیشتری از جمله بـه صـرفه بودن هزینه کار کردن با آن‌ها برخوردار هستند و علاوه بـر آن الگوهای موشی برای مطالعات گسترده جهش‌زایی به شکل *in vivo* بسیار مناسب هستند (۲۷).

ج) در زیست شناسی مصنوعی

استفاده از روش CRISPR/Cas9 در زیست شناسی مصـنوعی شـامل عمـوم مفـاهیم مـرتبط بـا طراحـی و انتقـال ژن‌هـای مصنوعی درون سلول‌های زنده می‌شـود. از آن‌جـایی کـه ایـن ژن‌های مصنوعی متشکل از حسگرها، پردازشگرها و محرک‌هـا هستند، زیست شناسی مصنوعی نه تنها دارای توانـایی ارتقـاء مطالعـات پایـه زیسـت شناسـی اسـت، بلکـه قـادر بـه ایجـاد پیشـرفت‌هـایی چشـمگیر در حـوزه‌هـای کـارکردی بـالینی و درمان، تولید سوخت‌های زیستی و تولید مواد شیمیایی مفیـد است (۲۸).

یکی از مهم‌تـرین کاربردهـای CRISPR/Cas9 در گیاهـان در محصولاتی مانند برنج، گندم، ذرت و تنباکو است. برای نمونـه، با اسـتفاده از روش CRISPR/Cas9 مـی‌تـوان ژن‌هـای MLO (Mildew-resistance locus) هدف قرار داده و غیر فعال کرد. این ژن‌ها، کدکننده پروتئین‌هایی هستند که بر علیـه بیمـاری powdery mildew در گندم‌های هگزاپلوئیـد عمـل مـی‌کننـد (۲۹).

از سیستم CRISPR/Cas9 می‌توان برای بررسی سیسـتماتیک کارکرد ژن‌ها در سلول‌های انسان نیـز بهـره گرفـت. کتابخانـه لنتی ویروسی sgRNA را می‌توان بر علیـه ژن‌هـای شناسـایی شده به واسطه غربـالگری‌هـای کـارکردی آنالیزهـای حسـاس تـوالی یـابی نسـل جدیـد اسـتفاده کـرد. انتظـار مـی‌رود کـه غربالگری ایـن کتابخانـه قدرتمنـد بـا رویکـرد از دسـت دادن کارکرد موجب تسـهیل شناسـایی ژن‌هـایی شـود کـه نقشـی اساسی در فرایندهای زیستی متفاوت ماننـد سـمیت دارویـی، هدف‌گیری مولکول‌های درمانی و بیان فنوتیپ هـای مشـخص ایفا می‌کنند (۳۰).

با استفاده از کتابخانه‌های وسیع از RNA های منفـرد راهنمـا SgRNA و اندونوکلئاز Cas9 می‌توان با کـارایی بسـیار بـالا از دست دادن‌ها و کسب کارکردهایی را که به شماری از فنوتیپ های خاص منجر مـی‌شـوند بررسـی کـرد و بـدین وسـیله بـه شماری از پرسش‌های پیچیده در حوزه‌ی زیست شناسی پاسخ داد. برای نمونه، به جهت بررسـی کـاربرد سیسـتم CRISPR-

جدول ۳. نمونه های کاربرد درمانی ویرایش های ژنومی در الگوهای موشی

بیماری	ژن هدف	راهکار	تحویل	الگو (مدل)	نوکلئاز	منبع
Hemophilia B	*hF9*	HDR-mediated addition of corrective cDNA	AAV	Humanized neonatal, adult mice	ZFN	Li et al. (2011) Anguela et al. (2013)
Hemophilia A, B	*mAlb*	HDR-mediated insertion of F8 and *F9* cDNA, respectively	AAV	Humanized adult mice		Sharma et al. (2015)
Hereditary tyrosinemia I	*Fah*	HDR of point mutation	Hydrodynamic injection	Adult mouse model	CRISPR	Yin et al. (2014)
Cataract	*Crygc*	HDR-mediated correction	Plasmid	Zygote, mouse SSC	CRISPR	Wu et al. (2015)
DMD	Exon 23 of *dmd* gene	HDR using a ssODN	Cas9, sgRNA	Zygote	CRISPR	Long et al. (2014)
		NHEJ-mediated disruption of exon 23	AAV	Adult or neonatal	CRISPR	Xu et al. (2016) Nelson et al. (2016) Tabebordbar et al. (2016) Long et al. (2016)
		NHEJ-mediated disruption of exon 23	Plasmid	Adult	CRISPR	Xu et al. (2016)
HBV	Multiple	NHEJ-mediated disruption of multiple genes	Hydrodynamic injection, Plasmid	Adult	CRISPR	Lin et al. (2014) Zhen et al. (2015) Dong et al. (2015) Liu et al. (2015) Ramanan et al. (2015)
Cardiovascular disease	*Pcsk9*	NHEJ-mediated disruption of PCSK9	Cas9, sgRNA	Adult	CRISPR	Ding et al. (2014)

hF9, human F9; HDR, homology-directed repair; AAV, adeno-associated virus; ZFN, zinc finger nuclease; CRISPR, clustered regularly interspaced short palindromic repeats; SSC, spermatogonial stem cell; DMD, Duchenne muscular dystrophy; ssODN, single-stranded oligonucleotide; Cas9, CRISPR associated protein 9; sgRNA, single guide RNA; NHEJ, nonhomologous end joining; HBV, hepatitis B virus.

Cas9 در ارزیابی‌های ژنومی از روش غیر فعال کردن ژنوم توسط سیستم (Gecko) CRISPR-Cas9 و کتابخانه‌های SAM برای شناسایی ژن‌ها توسط غیر فعال کردن یا فعالسازی سلول‌های سرطانی ملانوما را تحت تیمار با مهارکننده BRAF، Vemurafemib قرار می‌دهند. افزون بر مقاومت به Vemurafemib، ارزیابی توسط CRISPR-Cas9 دیدگاه‌های جدیدی بر روی فرآیند مولکولی مقاومت ژن‌ها به داروها و سموم، پاسخ سلولی به هیپوکسی و نقش عوامل میزبان طی عفونت با فلاو ویروس‌ها (flaviviruses) گشوده شده است. اگرچه بیشتر ارزیابی‌ها در شرایط in vitro شکل گرفته است، سیستم Cas9 در محیط برون تنی در سلول‌های دندریتی برای مطالعه‌ی پاسخ به لیپوپلی ساکاریدهای باکتریایی و در محیط in vivo برای شناسایی عوامل اصلی در ایجاد متاستاز در سلول‌های سرطانی ریه مورد استفاده قرار گرفته است (۳۱).

به علاوه از سیستم CRISPR-Cas9 برای بررسی نواحی غیرکدکننده ژنوم نیز استفاده می‌شود بدین شکل که با استفاده از RNAی راهنمای تک رشته (SgRNA)، جهش‌هایی در لوکوس های غیرکدشونده ایجاد می‌شود تا به وسیله آن الل های کارکردی در افزاینده‌ی ژن *BCL11A*، لوکوس *POU5F1*، لوکوس *CUL3* و مکان‌های اتصالی عوامل رونویسی همانند P53 و ESR1 یافت شوند (۳۲).

اگرچه هریک از کتابخانه‌های SgRNA برای یک هدف خاص طراحی شده‌اند، اما مراحل پایه‌ای طراحی بین همه‌ی آن‌ها مشترک است. در ابتدا نواحی ژنومی دلخواه به جهت هدف-گیری کتابخانه SgRNA توسط قوانین هدف‌گیری SgRNA شناخته شده مشخص می‌شوند. برای نمونه، هدف‌گیری

سمت '۵ حفاظت شده اگزون ها به جهت غیر فعال کردن ژن یا هدف قرار دادن بالادست و پایین دست نقطه‌ی آغاز رونویسی برای فعال کردن و یا سرکوب کردن رونویسی را می‌توان نام برد. سپس همه‌ی اهداف احتمالی SgRNA توسط موتیف ارتولوگ جفت شونده با هدف در اندونوکلئاز Cas9 شناسایی می‌شوند. انتخاب این اهداف بر اساس ۴ معیار شکل می‌پذیرد:

۱- به حداقل رساندن فعالیت سیستم در ایجاد جهش‌های ناخواسته

۲-به حداکثر رساندن حساسیت و ویژگی سیستم در شناسایی اهداف و ایجاد جهش

۳-دوری جستن از انواع تکرارهای همو‌پلیمری همانند GGGG یا AAAA

۴-به حداقل رساندن میزان GC

اگرچه حساسیت و ویژگی در بین انواع طراحی‌ها با هم متفاوت هستند، اما می‌توان توسط مقادیر اضافی از SgRNA درون کتابخانه و استفاده از SgRNA های متفاوت که ژن یکسان را هدف قرار می‌دهند، میزان این تفاوت را کاهش داد. باید توجه داشت که افزون بر انتخاب درست SgRNA هدف گیرنده، RNAهای راهنمای غیرهدف گیرنده نیز به عنوان کنترل منفی باید حضور داشته باشند. در واقع این SgRNAها برای ارزیابی اختلالات پس زمینه‌ای و میزان موفقیت آنالیز، ضروری هستند. به همین ترتیب در انتهای فرایند، SgRNA هایی با حداکثر صحت هدف‌گیری در شرایط آزمون دچار افزایش و کاهش چشمگیر نرخ در مقایسه با شرایط کنترل می‌شوند، اگرچه از سوی دیگر SgRNA های کنترل از نرخ ثابتی در هر دو حالت برخوردارند (۳۳).

حوزه‌های مرتبط با پیشرفت‌های فنی سیستم CRISPR/Cas9

پیش از استفاده از سیستم CRISPR/Cas9 در بیماران، ایمن بودن و میزان کارایی این فناوری باید مشخص و تأیید گردد. میزان ویژگی و کارایی این ابزار توانمند ویرایش ژنومی را می‌توان به واسطه هدف‌گیری مسیرهای ترمیم دورشته، نوکلئازهای تغییردهنده و ایجاد تغییر در نحوه‌ی انتقال آن‌ها ارتقاء بخشید.

ترمیم دورشته. چنان‌چه پیش‌تر اشاره شد می‌توان نرخ ویرایش‌ها و تغییرات DNA را توسط دو سیستم ترمیم درون سلولی شکست دورشته ارزیابی کرد. HDR برای اصلاح ژن و درج آن مناسب‌تر از NHEJ است زیرا NHEJ به حذف و اضافه‌های کوچک و در نتیجه از دست رفتن کارکرد ژنی منجر می‌شود. از سوی دیگر کارایی NHEJ در مواردی بیشتر است زیرا این فرایند در همه‌ی مراحل چرخه‌ی سلولی فعال است و به هیچ الگویی برای ترمیم نیاز ندارد. شایان ذکر است که برخی از اجزای سیستم ترمیمی HDR تنها در مراحل S و G2 چرخه‌ی سلولی بیان می‌شوند، این واقعیت به محدود شدن استفاده از HDR در سلول‌های تقسیم شونده و ممانعت استفاده از آن‌ها در سلول‌های پسامیتوزی مانند نورون‌ها و کاردیومیوسیت ها منجر شده است. به این دلیل، کنترل کارایی سیستم ترمیم HDR بیشتر تلاش‌ها را برای رسیدن به هدف افزایش تأثیر اصلاح ژن‌ها به خود اختصاص داده است (۳، ۳۴).

یکی از راهکارها برای افزایش کارایی HDR، سرکوب فرایند NHEJ در خلال ترمیم دورشته است. به عبارت دیگر سرکوب کردن آنزیم‌های مهم فرایند NHEJ به افزایش ۱۹ برابری کارایی سیستم ترمیم HDR انجامیده است. راهکار دیگر تحریک اصلاحات مشابه HDR در سلول‌های پسامیتوزی به واسطه مسیرهای برپایه‌ی HDR می‌باشد که با عنوان "اتصال انتهاهای میکروهمولوژی" (Micro homology mediated end joining) نامیده می‌شوند. استفاده از توالی‌های میکروهومولوگ به طول ۵+۰۲۵ جفت باز تحت عنوان (Precise integration into PITCH target chromosome) به غیرفعال کردن (Knock in)های بسیار دقیق منجر می‌شود. به علاوه، به جهت افزایش نرخ موفقیت CRISPR/Cas9 می‌توان از انتهاهای چسبنده به جای انتهاهای صاف در این فرایند استفاده کرد (۳۵).

نوکلئازها. از دیدگاه بالینی برای رفع نگرانی‌های مرتبط با فرایندهای انجام شونده نیاز به یک فناوری بسیار دقیق مهندسی ژنتیک و ویرایش ژن‌ها احساس می‌شود. جهش‌های ناخواسته ایجاد شده به وسیله هدف‌گیری های نادرست ممکن است به سرطان زایی و یا از کار افتادن ژن مذکور منجر شود. از آن‌جا که تغییرات ایجاد شده در ژنوم پایدار خواهند بود، شماری از پژوهش‌ها برای کاهش نرخ هدف‌گیری‌های نابجا انجام پذیرفته است. یکی از راهکارهای در دسترس برای نیل به این هدف، ارتقاء بخشیدن ویژگی اندونوکلئاز Cas9 در هدف‌گیری است. طراحی دقیق sgRNA شامل دوری جستن از اهداف با درصد بالای بازهای گوانین و سیتوزین است و از سوی دیگر میزان پایداری بیان Cas9 و sgRNA نیز باید کنترل شود تا بتوان به حداکثر میزان ویژگی سیستم CRISPR/Cas9 دست یافت (۳۶).

استفاده از اندونوکلئاز Cas9 تغییریافته بـه همـراه دو sgRNA جداگانه که هرکدام یک شکاف تک رشته بـر روی رشـته‌هـای مخالف هم ایجاد می‌کننـد موجـب کـاهش قابـل توجـه نـرخ هدف‌گیری نابجا در انواع سلول‌ها می‌گردد. افزون بر این، کوتاه کردن توالی sgRNA به اندازه‌ای کـه تـوالی هـدف مکمـل آن کوتاه‌تر از ۲۰ نوکلئوتید شود نیز موجب کـاهش نـرخ هـدف-گیری اشتباه می‌شود. از سوی دیگر پژوهشگران بـه واسـطه‌ی ادغام پروتئین Cas9 که از لحاظ کاتالیکی غیرفعال شده اسـت با نوکلئاز FokI و تشکیل سـاختار fCas9 قـادر بـه شناسـایی توالی هدف با نرخ بسیار بالاتری نسـبت بـه پـروتئین وحشـی درون سلول‌های انسان هستند (۳۷).

انتقال. انتقال کارآمد ابزارهای تغییردهنده ژنوم در سلول‌ها یکـی دیگر از چالش‌های پیش رو به جهت ارتقای کارایی و ویژگی ایـن سیستم‌ها است. انـواع روش‌هـای ویروسـی و غیرویروسـی بـرای انتقال و ارائه اندونوکلئاز Cas9 به سلول‌ها در محیط‌های *in vivo* و *in vitro* مورد ارزیابی قرار گرفته است. بر اساس نـوع انتقـال و میزان پایداری بیان نوکلئازها هر دو احتمال هدف‌گیـری نابجـا و رخداد واکنش ایمنی امکان پذیر است (۳۸).

ناقلین ویروسی مانند ویـروس هـای مجتمـع بـا آدنـو (Adeno-associated viruses: AAV) و لنتـی ویـروس‌هـا رایـج‌تـرین سیستم‌های انتقالی هستند و امروزه به جهت استفاده در مرحله‌ی بالینی نیز مورد تأیید قرار گرفته‌اند. ویروس AAV به ویـژه یـک نامزد مناسب برای شرایط *in vivo* محسوب می‌شود کـه مزایـایی مانند تحریک سیستم ایمنی در درجات بسـیار پـایین، سـروتیپ های کاملاً شناخته شده و قابلیت هدف‌گیری بافت‌هـای متفـاوت مشتمل بر چشم، مغز، کبـد و عضـله را دارا مـی‌باشـد. از جملـه چالش‌های پـیش رو در اسـتفاده از AAV هـا بـه عنـوان ناقـل، ظرفیت پایین پذیرش آنهـا (۴/۸ کیلوبـاز) اسـت. بـه ایـن دلیـل پژوهشگران در صـدد اسـتفاده از دو ناقـل جداگانـه AAV بـرای انتقال توالی کد کننده Cas9 و sgRNA هستند. در روشی دیگـر به جهت غلبه بر این محدودیت اندازه می‌تـوان از پـروتئین‌هـای ارتولوگ Cas9 طراحی شده با طول کوتاه‌تر استفاده کرد. علاوه بر مشکل اندازه‌ی قطعه‌ی حمل شونده، ناقلین ویروسی بـه واسـطه ایجاد بیان پایدار نوکلئازها قادر به ایجـاد سـمیت و ناپایـداری در ژنوم می‌باشند (۳، ۳۹، ۴۰).

شایان تاکید است که انواع متفاوتی از روش‌هـای غیرویروسـی به جهت انتقال سیستم CRISPR/Cas9 به شـکل پـروتئین و RNA وجـــود دارنـــد. ایـــن روش‌هـــا شـــامل الکتروپوریشـن (electroporation) انتقـال هیـدرودینامیک و لیپوزوم ها هستند. بیـان موقـت پـروتئین‌هـا و mRNA هـای انتقـال داده شـده توسـط روش‌هـای غیرویروسـی بـه درون سلول‌ها، موجب کاهش سمیت و هدف‌گیری نابجـا نسـبت بـه سیستم‌های انتقالی ویروسی می‌شود (۴۱).

فن‌اوری CRISPR/Cas9 از مزایای بی‌شماری برخوردار اسـت. برای نمونه می‌توان از آن به عنوان ابزاری برای برطرف کـردن شماری از نقایص که به شکل سیستماتیک و یا از زمـان تولـد بروز مـی‌کنـد ماننـد فیبـروز کیسـتیک (CF) و هـانتینگتون استفاده کرد. با این همه، مشخص کردن مرزهای کـاربرد ایـن روش و تعیین مبتلایان مناسب، امروزه معلوم شـده اسـت. بـا این حال هم‌چنان در رابطه با امنیت و میزان کـارایی فنـاوری CRISPR/Cas9 بحـث‌هـایی وجـود دارد. از جملـه، یکـی از بزرگترین نگرانی‌ها در رابطه با این فنـاوری، اسـتفاده‌ی افـراد سودجو برای ایجاد تغییراتی در رویان‌های انسـانی در راسـتای اهداف یوژنیک است. به همین دلیـل نیـاز بـه یـک نظـارت و کنترل دقیق، مسئولانه و انسـانی در ایـن حـوزه توسـط یـک سازمان معتبر بین المللی کاملاً احساس می‌شود (۴۲).

جمع بندی

اکتشاف فناوری CRISPR/Cas9 به عنـوان سیسـتم ایمنـی در باکتری‌ها در برابر پاتوژن‌هـا و اسـتفاده از آن بـه‌عنـوان ابـزاری کارآمد در راستای ایجاد تغییرات هدفمنـد در ژنـوم بـه انقـلاب عظیمی در پژوهش‌های پایه‌ای زیست‌شناسی منجر شده اسـت. قدرت فزاینده این فناوری در بررسی سیستماتیک کارکرد ژن‌ها در سلول‌های پسـتانداران، مطالعـه‌ی انـواع تغییـرات ژنـومی در خلال پیشرفت سرطان‌ها و سایر بیماری‌ها و توانایی بـالقوه‌ی آن در اصلاح جهش‌های ژنتیکی مسبب اختلالات وراثتـی غیرقابـل انکار است. در این راستا شواهد حاکی از آن است کـه مطالعـات آتی تمرکز خود را بر روی بهینه سازی این فناوری گـزارده انـد. شناخت بهتر سازوکار سیستم های ترمیمـی ایجـاد شـده درون سلول در پی شکست دورشته حاصل از اندونوکلئاز Cas9 موجب افزایش ویژگی تغییرات هدفمند ژنومی مـی‌شـود. شـکل‌گیـری روش‌های ویژه به جهت انتقال ایمن و کارآمـد پـروتئین Cas9 و RNA راهنما به سلول‌ها و بافت ها برای بهره‌وری مناسب از این فناوری در ژن درمانی انسان مورد نیاز است.

REFERENCES

1. Noori-Daloii MR, Ed. Medical molecular genetics in the third millennium. Tehran, Iran: Samer Publication; 2012. [In Persian]

2. Kleinstiver BP, Pattanayak V, Prew MS, Tsai SQ, Nguyen NT, Zheng Z, et al. High-fidelity CRISPR–Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. Nature 2016;529:490-5.

3. Noori-Daloii MR, Ed. Emery's elements of medical genetics. 8th ed. Tehran, Iran: Jame-e-negar and Salemi Publication; 2017. [In Persian]

4. Krejci L, Altmannova V, Spirek M, Zhao X. Homologous recombination and its regulation. Nucleic Acids Res 2012;40:5795-818.

5. Noori-Daloii MR, Alvandi E. Micro RNA: Small but full of mystery and use. Journal of Tehran University of Medical Sciences 2006;64:5-18. [In Persian]

6. Jackson AL, Linsley PS. Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application. Nat Rev Drug Disco 2010;9:57-67.

7. Noori-Daloii MR, Vand Rajabpour F. Roles of miRNAs in gene expression regulation, apoptosis, diagnosis and treatment of cancer. Medical Science Journal of Islamic Azad Univesity-Tehran Medical Branch 2011;21:151-61. [In Persian]

8. Noori-Daloii MR, Nejatizadeh A , Eds. MicroRNA in disease and health: Diagnostic and therapeutic potentials. Gene Therapy Development and Future Perspectives. Rijeka, Croatia: InTech; 2011. P.93-120.

9. Noori-Daloii MR, Abdollahzadeh R, Asadollahi K. Targeted genome editing with engineered nucleases-A new approach in gene therapy. Journal of Sabzevar University of Medical Sciences 2014; 21: 131-144. [In Persian]

10. Silva G, Poirot L, Galetto R, Smith J, Montoya G, Duchateau P, et al. Meganucleases and other tools for targeted genome engineering: perspectives and challenges for gene therapy. Curr Gene Ther 2011;11:11-27.

11. Joung JK, Sander JD. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. Nat Rev Mol Cell Biol 2013;14:49-55.

12. Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. Nat Rev Genet 2010;11:636-46.

13. Hale CR, Zhao P, Olson S, Duff MO, Graveley BR, Wells L, et al. RNA-guided RNA cleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex. Cell 2009;139:945-56.

14. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. Science 2007;315:1709-12.

15. Guilinger JP, Thompson DB, Liu DR. Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification. Nat Biotechnol 2014;32:577-82.

16. Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, Makarova KS, Essletzbichler P, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. Cell 2015;163:759-71.

17. Piatek A, Ali Z, Baazim H, Li L, Abulfaraj A, Al-Shareef S, et al. RNA-guided transcriptional regulation in planta via synthetic dCas9-based transcription factors. Plant Biotechnol J 2015;13:578-89.

18. Konermann S, Brigham MD, Trevino AE, Joung J, Abudayyeh OO, Barcena C, et al. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. Nature 2015;517:583-8.

19. Shen JP, Zhao D, Sasik R, Luebeck J, Birmingham A, Bojorquez-Gomez A, et al. Combinatorial CRISPR-Cas9 screens for de novo mapping of genetic interactions. Nat Methods 2017;14:573-6.

20. Canver MC, Bauer DE, Dass A, Yien YY, Chung J, Masuda T, et al. Characterization of genomic deletion efficiency mediated by clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/Cas9 nuclease system in mammalian cells. J Biol Chem 2017;292:2556.

21. Lareau C, Clement K, Hsu JY, Pattanayak V, Joung JK, Aryee MJ, et al. “Unexpected mutations after CRISPR-Cas9 editing in vivo” are most likely pre-existing sequence variants and not nuclease-induced mutations. bioRxiv 2017:159707.

22. Tsai SQ, Nguyen NT, Malagon-Lopez J, Topkar VV, Aryee MJ, Joung JK. CIRCLE-seq: a highly sensitive in vitro screen for genome-wide CRISPR-Cas9 nuclease off-targets. Nat Methods 2017;14:607-14.

23. Noori-Daloii MR, Ebadi N. Pharmacogenomics and cancer stem cells. Medical Science Journal of Islamic Azad Univesity-Tehran Medical Branch 2015;25:1-15. [In Persian]

24. Noori-Daloii MR, Eshaghkhani Y. lncRNAs: significance and function mechanisms. Medical Science Journal of Islamic Azad Univesity-Tehran Medical Branch 2015;25:79-94. [In Persian]

25. Young RM, Phelan JD, Webster DE, Roulland S, Wright G, Huang D, et al. CRISPR-CAS9 genetic screens uncover ab cell receptor-myd88 superpathway in diffuse large B cell lymphoma. Hematol Oncol 2017;35:S25.

26. Xue W, Chen S, Yin H, Tammela T, Papagiannakopoulos T, Joshi NS, et al. CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver. Nature 2014;514:380-4.

27. Tu Z, Yang W, Yan S, Guo X, Li XJ. CRISPR/Cas9: a powerful genetic engineering tool for establishing large animal models of neurodegenerative diseases. Mol Neurodegener 2015;10:35.

28. Chari R, Yeo NC, Chavez A, Church GM. sgRNA Scorer 2.0: A Species-Independent Model To Predict CRISPR/Cas9 Activity. ACS Synth Biol 2017;6:902-4.

29. Jusiak B, Cleto S, Perez-Piñera P, Lu TK. Engineering synthetic gene circuits in living cells with CRISPR technology. Trends Biotechnol 2016;34:535-47.

30. Zhou Y, Zhu S, Cai C, Yuan P, Li C, Huang Y, et al. High-throughput screening of a CRISPR/Cas9 library for functional genomics in human cells. Nature 2014;509:487-91.

31. Konermann S, Brigham MD, Trevino AE, Joung J, Abudayyeh OO, Barcena C, et al. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. Nature 2015;517:583-8.

32. Diao Y, Li B, Meng Z, Jung I, Lee AY, Dixon J, et al. A new class of temporarily phenotypic enhancers identified by CRISPR/Cas9-mediated genetic screening. Genome Res 2016;26:397-405.

33. Joung J, Konermann S, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Platt RJ, Brigham MD, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 Knockout and Transcriptional Activation Screening. Nat Protoc 2017;12:828-63.

34. Brinkman EK, Chen T, de Haas M, Holland HA, Akhtar W, van Steensel B. Quantitative analysis shows that repair of Cas9-induced double-strand DNA breaks is slow and error-prone. bioRxiv. 2017:142802.

35. Sakuma T, Nakade S, Sakane Y, Suzuki KI, Yamamoto T. MMEJ-assisted gene knock-in using TALENs and CRISPR-Cas9 with the PITCh systems. Nat Protoc 2016;11:118-33.

36. Kleinstiver BP, Prew MS, Tsai SQ, Topkar VV, Nguyen NT, Zheng Z, et al. Engineered CRISPR-CAS9 Nucleases with Altered PAM Specificities. Nature 2015;523:481-5.

37. Tsai SQ, Wyvekens N, Khayter C, Foden JA, Thapar V, Reyon D, et al. Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. Nat Biotechnol 2014;32:569-76.

38. Mout R, Ray M, Lee YW, Scaletti F, Rotello VM. In Vivo Delivery of CRISPR/Cas9 for Therapeutic Gene Editing: Progress and Challenges. Bioconjug Chem 2017;28:880-4.

39. Noori-Daloii MR, Tabarestani S. Molecular genetics, diagnosis and treatment of breast cancer. Journal of Sabzevar University of Medical Sciences 2010;17:74-87.

40. Mout R, Ray M, Yesilbag Tonga G, Lee YW, Tay T, Sasaki K, et al. Direct Cytosolic Delivery of CRISPR/Cas9-Ribonucleoprotein for Efficient Gene Editing. ACS Nano 2017;11:2452-8.

41. Moore R, Spinhirne A, Lai MJ, Preisser S, Li Y, Kang T, et al. CRISPR-based self-cleaving mechanism for controllable gene delivery in human cells. Nucleic Acids Res 2014;43:1297-303.

42. Krishan K, Kanchan T, Singh B. Human genome editing and ethical considerations. Sci Eng Ethics 2016;22:597-9.