مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۸، شماره ۱، بهار ۹۷، صفحات ۱ تا ۱۵

Review Article

DOI: 10.29252/iau.28.1.1

مهندسی ژنوم از آزمایشگاه تا بالین توسط CRISPR/Cas9

محمدرضا نوری دلویی[۱]، سعیده کاوسی[۲]، نازنین رحیمی راد[۳]

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

چکیده

اکتشاف قیچی‌های مولکولی به همراه توانایی آن‌ها در ایجاد تغییرات هدفمند در نقاط مشخصی از ژنوم، به بررسی‌های کارکردی ژن‌ها، ژنوم و اپی‌ژنوم منجر شده است. این فنون با افزایش فهم پژوهشگران در رابطه با اساس مولکولی بیماری‌ها و تسهیل درمان‌های نوین ژنتیکی کمک شایانی به علم ژنتیک پزشکی کرده است. سادگی سیستم CRISPR/Cas9، دستورزی راحت و قابلیت هدف‌گیری چندگانه، CRISPR/Cas9 را به عنوان سیستم منتخب در بسیاری از پژوهش‌ها تبدیل کرده است.از سوی دیگر با استفاده از سیستم CRISPR/Cas9 و ایجاد انواع الگوهای بیماری در حیوانات الگو، می‌توان مطالعات گسترده‌ای در رابطه با بیماری‌هایی با اساس ژنتیکی انجام داد. انتظار می‌رود که در آینده‌ای نه چندان دور پژوهشگران به بهسازی این فناوری در ابعاد متفاوتی مانند دقت در هدف‌گیری، انتقال و کنترل بر روی هدف‌گیری به هنگام فرایندهای ترمیمی، مبادرت بورزند. در این مقاله‌ی مروری تاریخچه، نوع سیستم‌های CRISPR، جایگاه این فناوری در حوزه‌ی ویرایش ژنوم و استفاده از آن در درمان‌های نوین بیماری‌ها اعم از ژنتیکی، سرطان و غیره، مورد بحث و بررسی قرار گرفته است.

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

مقدمه

در سال‌های اخیر با توجه به آشکار شدن بروز متفاوت بیماری‌ها در افراد متفاوت، حوزه‌ی اختصاصی‌سازی درمان اهمیت ویژه‌ای در میان پژوهشگران یافته است. این حوزه PMI (Precision Medicine Initiative) مشتمل بر سرمایه گذاری‌های کلان درمانی، درمان‌های هدفمند و پیشگیری از رخداد بیماری‌ها با توجه به ویژگی‌های فردی مانند تفاوت‌ها در پیش زمینه ژنتیکی، عامل‌های محیطی و سبک زندگی است.

تجمع ویژگی‌های فردی در غالب ژنومیکس، پروتئومیکس و پارامترهای فنوتیپی نه تنها فهم پژوهشگران را نسبت به سلامت و بیماری ارتقاء داده است بلکه موجب تغییر و بهینه‌سازی روش‌های در دسترس برای محاسبه احتمال خطر، آزمون‌های تشخیصی و راهکارهای درمانی گردیده است. در سال‌های اخیر پیشرفت‌های قابل توجهی در حوزه توالی یابی و پروفایلینگ ژن‌ها رخ داده است. این پیشرفت‌ها مرهون فناوری‌های نوین توالی یابی موازی و گسترده است و با توجه به این که هنوز چالش بزرگی در رابطه با ویرایش دقیق ژنی پیش روی پژوهشگران است و بزرگترین سد عدم توانایی در بسط دادن این اطلاعات در کاربردهای بالینی می‌باشد، نیاز رو به رشدی برای فنون نوین مهندسی ژنتیک با توانایی هدف‌گیری دقیق و با کارایی بالا و به صرفه همچنان احساس می‌شود (۵-۱).

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

تاریخ دریافت مقاله: ۹۶/۹/۱۴
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۶/۱۰/۱۹

در خلال دهه‌های گذشته، پژوهشگران با ایجاد تغییرات اساسی در فنون مهندسی ژنتیک سعی در ایجاد تغییرات دلخواه در ژنوم در موجودات داشته‌اند. نظر به نیاز جامعه پزشکی از زمانی که دو دانشمند برجسته، واتسن و کریک ساختار مارپیچ دورشته‌ای DNA را بر همگان آشکار کردند، شمار رو به رشدی از پژوهشگران تلاش‌های خود را بر روی ایجاد انواع تغییرات در DNA متمرکز کرده‌اند. دستیابی به این مهم در ابتدا مستلزم حضور یک جزء پایه برای شناسایی توالی هدف، ایجاد شکاف در آن و ایجاد تغییر هدفمند در توالی DNA است. در این راستا مجموعه‌های DNA-پروتئین درون سلولی با توانایی هدف‌گیری اختصاصی و مسیرهای طبیعی‌ترمیم آسیب DNA در گونه‌های متفاوت توسط پژوهشگران برای ابداع انواع تغییرات ژنی در ژنوم در موجودات به کار گرفته شدند که در میان همه‌ی این فنون، فناوری CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated nuclease 9) با پیشرفت چشمگیر خود به عنوان انقلابی در دانش زیست شناسی و به ویژه پزشکی در سال ۲۰۱۵ مطرح شده است (جدول ۱) (۵،۳،۱) .

ساز و کار عمل CRISPR/Cas9 در ایجاد تغییرات

تا به امروزه ۶ نوع سیستم CRISPR، سه مورد I تا III و در پی آن IV تا VI معرفی شده‌اند. ویژگی‌های هر یک از این سیستم‌ها مانند نحوه‌ی انتقال، بیان و ایجاد تغییرات برای شناسایی و ایجاد شکاف در DNAی هدف با توجه به ساز و کارهایشان در خلال فرایند ایمنی زایی متفاوت است. در نوع I از یک مجموعه‌ی بزرگ پروتئین Cas9 که توسط ژن Cas3 کد می‌شود، استفاده می‌شود. این پروتئین به شکل جداگانه دارای فعالیت‌های هلیکازی و DNase است. به طرز مشابه، در نوع III سیستم CRISPR/Cas9 از پروتئین‌های بزرگ خانواده Cas مرتبط با تکرارهای خوشه‌ای استفاده می‌شود. انواع I و III و IV را بر اساس مجموعه‌های چندجزئی پروتئین کارکردی تحت عنوان رده‌ی ۱ دسته بندی می‌کنند. رده‌ی ۲ که مشتمل بر انواع II و V و VI می‌باشد، برخلاف رده‌های ۱ و ۳ دارای یک جزء پروتئین کارکردی می‌باشد و تنها از یک پروتئین منفرد Cas9 با ویژگی نوکلئازی استفاده می‌کند. به همین ترتیب در انواع V و VI نیز از یک پروتئین منفرد و مشابه Cas9 استفاده می‌شود (جدول ۲). در مجموع امروزه پژوهشگران تنها سیستم نوع II باکتریایی CRISPR/Cas9 مشتمل بر نوکلئازهای تحت هدایت RNAی راهنما را به عنوان بهترین گزینه برای ایجاد تغییرات در ژنوم و مهندسی ژنتیک به کار می‌گیرند (۶).

چنان چه در بالا اشاره شد، نوع II سیستم CRISPR/Cas9 از یک نوکلئاز منفرد Cas9 استفاده می‌کند. این آنزیم در

جدول ۱. نظری بر تاریخچه CRISPR

نوع یافته یا کشف	سال
کشف ساختارهای پالیندرومیک غیر عادی در باکتری اشریشیای کلی.	۱۹۸۷
استفاده از واژه‌ی CRISPR برای نخستین بار و شناسایی عوامل تشکیل دهنده‌ی CRISPR و	۲۰۰۲
شناسایی توالی‌های فاصله انداز CRISPR به عنوان عوامل ژنتیکی بیگانه.	۲۰۰۵
ارائه‌ی گزارش نقش CRISPR در ایمنی اکتسابی باکتری‌ها.	۲۰۰۷
ارتقاء سیستم CRISPR/Cas9 به عنوان ابزار ویرایش ژنوم.	۲۰۱۲
هدف‌گیری همزمان چندین ناحیه در ژنوم.	
مهار بیان ژنوم HIV با استفاده از CRISPR.	۲۰۱۳
برش دادن ژنوم HIV از سلول‌های فرد آلوده و خارج کردن آن و ممانعت از آلودگی‌های بعدی با استفاده از CRISPR.	
تولد میمون‌های دوقلو همراه با ایجاد جهش‌های هدفمند شده توسط CRISPR.	۲۰۱۴
تولید گوجه‌های فرنگی مقاوم به آفت‌های ویروسی توسط CRISPR.	۲۰۱۵
دستکاری جنین‌های انسانی با سیستم CRISPR/Cas9 توسط پژوهشگران چینی.	
تولید خوک‌های ترانسژیک با استفاده از CRISPR/Cas9.	
استفاده از ابزارهای ویرایش ژنوم برای درمان یک دختر بچه مبتلا به لوسمی.	
ارتقاء سیستم برای ایجاد انواع تغییرات در ژنوم در سلول‌های انسان توسط ریزتزریق اجزای CRISPR به درون سلول.	
تلاش پژوهشگران برای ایجاد پشه‌های مقاوم به مالاریا توسط فناوری CRISPR/Cas9.	۲۰۱۶
طراحی و به کارگیری پروتئین CRISPR، توسط پژوهشگران دانشگاه هاروارد، که به جای DNA، مولکول‌های RNA را هدف می‌گیرد.	۲۰۱۷
استفاده از نانوذرات طلا برای انتقال سیستم CRISPR/Cas9 درون سلول‌ها با عنوان CRISPR-Gold.	

هماهنگی با دو راهنما crRNA (CRISPR RNA) و tracRNA (Transacting CRISPR RNA) عمل می‌کند. برای بهینه سازی مصرف این سیستم پژوهشگران از یک حلقه‌ی اتصالی برای ایجاد یک trac RNA دوگانه تحت عنوان sgRNA (Single guide RNA) استفاده می‌کنند که در ایجاد شکاف اختصاصی در توالی هدف با اندونوکلئاز Cas9 همکاری می‌کند. یک توالی ۲ تا ۵ جفت بازی حفاظت شده با عنوان موتیف PAM (Proto spacer adjacent motif) در جهت مخالف دورگه RNA-DNA قرار گرفته است که برای شناسایی توالی DNAی هدف توسط Cas9 ضروری است. به محض شناسایی توالی هدف یک شکست دورشته توسط دو قلمرو Cas9 رخ می‌دهد. این قلمروها مشتمل بر قلمرو HNH که رشته‌ی مکمل توالی crRNAی راهنما را برش داده و قلمرو RuvC-like که رشته‌ی غیرمکمل را برش می‌دهد، می‌باشد. با بهره‌گیری از این ساز و کار، نوکلئاز طراحی شده با انواع sgRNAها قادر به ایجاد شکاف DNAی ژنومی در یک جایگاه ویژه و ایجاد یک تغییر مشخص و دقیق در ژنوم می‌باشد. با تغییر دادن شمار اندکی از بازهای توالی RNAی راهنما که مکمل توالی هدف و همراه پروتئین Cas9 است، به سهولت می‌توان اهداف تازه‌ای را تعریف کرد. ظرفیت ایجاد شمار زیادی شکست‌های دو رشته (مالتیپلکس) در یک ژنوم به واسطه‌ی بیان انواع متفاوتی از RNA در سیستم، از دیگر توانایی‌های پروتئین Cas9، به شمار می‌آید (۷).

انواع سیستم‌های ترمیم و کاربرد آن‌ها در CRISPR/Cas9

در پی رخداد شکست دو رشته در DNA، آسیب وارده توسط یک یا دو مسیر ترمیم اصلی مشتمل بر ترمیم با میانجگری سیستم ترمیمی همولوژی (Homology Directed Repair: HDR) و اتصال پایانه‌های غیرهومولوگ (Non-Hemologous End Joining: NHEJ) اصلاح می‌شود.

NHEJ موجب شکل‌گیری حذف‌ها و درج‌های کوچک (Insertion-deletions: indels) در توالی هدف می‌گردد. سیستم ترمیم NHEJ بدون نیاز به DNAی الگو عمل می‌کند. حذف و درج‌های ایجاد شده ممکن است به جهش‌های تغییرقالب و ایجاد کدون خاتمه‌ی زودرس و شکل‌گیری پروتئین ناقص غیرکارکردی منجر شود یا توسط ساز و کار سلولی (Nonsense Mediated Decay: NMD) این کدون‌ها شناسایی شده و به واسطه تخریب رونوشت از تشکیل پروتئین‌های ناقص پیشگیری می‌شود. در حالی که HDR به تبادل اطلاعات ژنتیکی بین دو مولکول DNA با توالی یکسان منجر می‌شود. سیستم ترمیم HDR تنها با استفاده از DNAی الگو تک رشته و دو رشته برونی دارای توالی مشابه

جدول ۲. انواع سیستم‌های CRISPR

رده	نوع	پروتئین مورد استفاده	پردازش Pre-crRNA	هدف	موتیف توالی هدف	پروتئین‌های نوکلئازی	ویژگی‌های بارز
۱	I	Cas3	Cas6	DNA	PAM	Cascade crRNA Cas3	استفاده از مجموعه‌های بزرگ پروتئین Cas
۱	III	Cas10	Cas6+فاکتور نامشخص	DNA RNA	CRISPR repeat	Cmr/Csm crRNA Cas10	استفاده از مجموعه‌های بزرگ پروتئین Cas
۱	IV	Csf1	———	———	———	———	استفاده از مجموعه‌های بزرگ پروتئینCas
۲	II	Cas9	Rnase III	DNA	PAM	Cas9 crRNA tracrRNA	استفاده از تنها یک جزء پروتئین کارکردی (مناسب ویرایش ژنوم)
۲	V	Cpf1	Cpf1	DNA	PAM	Cpf1 crRNA tracrRNA (برخی موارد)	استفاده از تنها یک جزء پروتئین کارکردی
۲	VI	C2c2	———	———	———	———	استفاده از تنها یک جزء پروتئین کارکردی

با توالی هدف قادر به ترمیم آسیب وارده است. از این رو پژوهشگران با استفاده از HDR قادر به وارد کردن اطلاعات ژنتیکی جدید به جایگاه هدف و جایگزین کردن ژن هدف جهش یافته با توالی بدون جهش می‌باشند.
شایان تأکید است که فناوری CRISPR/Cas9 امکان القای شکست دورشته و تغییر بیان ژن هدف در جایگاه ترمیم فراهم آورده و افق‌های جدیدی را برای پژوهشگران در حوزه‌ی تغییرات حساب شده ژنومی نوید داده است (۸،۵).

هدف‌گیری اختصاصی توسط CRISPR/Cas9

شماری از پژوهشگران تلاش خود را بر روی کاهش هدف‌گیری غیراختصاصی توسط سیستم CRISPR/Cas9 متمرکز کرده‌اند. از رهگذر این پژوهش‌ها، واریانت‌هایی از پروتئین Cas9 با ویژگی بسیار بالا گزارش شده است که به کاهش اتصالات غیراختصاصی انجامیده است. به طور مشابه واریانت ارتقاء یافته SpCas9 با عنوان eSpCas9 به کاهش اتصالات غیراختصاصی و افزایش میزان هدف‌گیری اختصاصی سیستم منجر شده است. در سال‌های اخیر اندونوکلئاز Cpf1 که آن را با عنوان "همه کاره" در ماشین CRISPR نیز یاد می‌کنند شناسایی شده است، که قادر به ایجاد پایانه‌های چسبنده در نتیجه‌ی شکست دورشته DNA می‌باشد. افزون بر کاهش هدف گیری نابجا برای حصول اطمینان از ایجاد تغییر ژنتیکی ناشی از هدف‌گیری‌های اختصاصی شکل‌گیری یک کنترل بر روی سیستم ترمیم نیز حائز اهمیت است. این تغییرات دقیق را می‌توان اغلب توسط سیستم ترمیمی HDR با میزان خطای پایین به دست آورد (۹).
تمایل پژوهشگران برای استفاده بیشتر از HDR، با کمک مهارکننده‌های شیمیایی NHEJ برآورده شده است. در این راستا برای افزایش نرخ رخداد HDR، باید زمانی شکست‌های دورشته DNA رخ دهد که فرایند HDR غالب بوده و فرایند NHEJ سرکوب شده است. از آن‌جا که فرایند HDR به حضور یک DNAی الگو برای نسخه‌سازی اطلاعات در خلال شکست نیازمند است، انتقال و دسترسی هم‌زمان این الگو در هنگام رخداد شکست دورشته DNA برای موفقیت فرایند ترمیم HDR امری حیاتی محسوب می‌شود. فرایند HDR ناموفق می‌تواند پیامدهای بسیار نامطلوبی را در پی داشته باشد، از این رو پژوهشگران تلاش می‌کنند تا افزون بر ارتقاء این سیستم ترمیمی بر روی آن کنترل مناسب نیز داشته باشند؛ چرا که کلید موفقیت در استفاده از این فناوری برای درمان بیماری‌های ژنتیکی توسط تغییرات تک باز و یا جایگزینی یک توالی، تمرکز جدی بر روی کنترل این سیستم است. رخدادهای دور از انتظار و مضر حاصل از HDR ناقص به دلیل ایجاد اختلالات پیچیده و موزاییک و ناتوانی درمان‌های آتی در هدف‌گیری آن‌ها در فرایندهای ژن درمان موجب پیچیده شدن روند درمانی می‌گردد (۱۰).

مطالعات برپایه سلول و in vivo در حیوانات الگو

امروزه کاربرد روش CRISPR/Cas9 در حوزه‌های متنوعی مشتمل بر محصولات کشاورزی، دامپروری، الگوهای بیماری‌ها و درمان‌های هدفمند گسترش یافته است. در این بخش، جنبه‌های درمانی بیماری‌هایی با اساس ژنتیکی و به ویژه بیماری‌های تک ژنی مورد تأکید قرار گرفته است (۱۱).
در ژن درمانی می‌توان ژن موجود در سلول یا بافت با ویژگی آسیب شناختی یا پاتولوژیک را با دو روش ex vivo و in vivo را اصلاح کرد. در روش ex vivo، با خارج کردن جمعیت سلولی هدف از بدن فرد بیمار و در پی آن با استفاده از نوکلئازهای طراحی شده، تغییرات موردنظر را در آن‌ها ایجاد می‌کنند و سپس به واسطه‌ی پیوند به بدن فرد بیمار بازگردانده می‌شود. پرهیز از چالش‌هایی مانند دفع پیوند و پاسخ‌های ایمنی شناختی از مهم‌ترین مزایای این روش است. از سوی دیگر در ژن درمانی in vivo عوامل تغییردهنده‌ی ژنوم مانند نوکلئازهای با قابلیت برنامه‌ریزی و الگوها به شکل مستقیم درون بدن انسان فرستاده می‌شوند (۱۴-۱۲).

ژن درمانی برای بیماری‌های ژنتیکی

ژن درمانی، دست‌کاری کردن توالی‌ها و تحریک جهش‌های حذف و جابجایی برای ایجاد کارکرد محافظتی را در میزبان شامل می‌شود. آسان‌ترین و بهترین اختلالات بیماری‌های تک ژنی می‌باشند، که عدم کفایت هاپلوئیدی (Haploinsufficieny) محصول به بروز فنوتیپ بیماری منجر می شود. بدین ترتیب کسب تنها یک نسخه از ژنی که دچار اختلال شده است این کمبود را جبران کرده و می‌تواند به بهبودی بیماری منجر شود. این امر البته در رابطه با بیماری‌های چندژنی که در بردارنده‌ی تغییرات متفاوت و همزمان در ژنوم است، یک چالش بزرگ در درمان بیماری محسوب می‌شود. شایان ذکر است که تغییر هدفمند ژن‌ها چه در سلول‌های سوماتیک و چه در رده سلول‌های زایشی در جانوران الگو گزارش شده است. درمان یک بیماری خاص

نیازمند شناخت کافی از اساس ژنتیکی آن می‌باشد. به همین دلیل می‌توان از ابزارهای مولکولی برش دهنده یا قیچی‌های مولکولی برای ایجاد انواع تغییرات در ژنوم و القاء رخداد ژنتیکی کمک کننده به روند بهبود بیماری استفاده کرد. دسترسی به اطلاعات ژنتیکی در رابطه با بیماری‌های پیچیده، فناوری ویرایش کننده‌ی ژنوم را قادر ساخته تا امیدی برای درمان بیماری‌های چند عاملی پیچیده مانند بیماری‌های قلبی عروقی، ایدز (Acquired immune deficiency syndrome) و آلزایمر به وجود آورد. سیستم‌های قدرتمند مانند CRISPR/Cas9، فرایند القای جهش‌هایی را که قادر به معکوس کردن روند بیماری هستند در اختیار پژوهشگران قرار داده است. تولید واریانت‌های کارکردی به جهت القاء فنوتیپ طبیعی، به شدت کارکرد سیستم ترمیم HDR و توانایی آن در جایگزینی توالی ژن با قطعه حمل شونده وابسته است. از سوی دیگر، درمان بیماری‌های پیچیده، مانند ایدز وابسته به ایجاد یک آلل فاقد کارکرد توسط روش‌های غیر فعال سازی آلل‌ها در ژن هدف و با استفاده از سیستم ترمیمی NHEJ می‌توان به سهولت آن را تأمین کرد. مطالعات پیوستگی همه‌ی ژنوم نه تنها به نقشه یابی نواحی غیرکدکننده ژنوم کمک شایانی کرده است، بلکه ارتباط این نواحی را با فنوتیپ‌های بیماری‌ها نیز تا حدودی آشکار کرده است. از این رو به نظر می‌رسد که ایجاد تغییرات در این نواحی غیرکدکننده در ژنوم با استفاده از فنون مهندسی ژنوم قادر به معکوس کردن روند شماری از بیماری‌ها است (۱۵).

از آن‌جا که میزان موفقیت ژن درمانی به ماهیت بیماری، ماهیت تغییرات موردنیاز، روش ترمیم مورداستفاده، توپولوژی هدف و توالی الگو و مرحله‌ی سلولی وابسته می‌باشد، لازم است که پیش از استفاده از این روش، چالش‌ها و راه حل‌های پیشنهادی در در موجودات الگو پیش از ورود به مرحله‌ی بالینی تحت بررسی قرار گیرند. افزون بر این‌ها اطلاعاتی لازم است تا میزان تغییر مورد نیاز برای درمان و میزان شایستگی سلول تغییر یافته را نسبت به سلول بدون تغییر آشکار کند. با افزایش میزان تغییرات لازم برای درمان، میزان چالش‌های پیش رو نیز فزونی خواهد یافت. برای نمونه، بررسی و مقایسه ایجاد فرایند درمان بر روی سلول‌های هدف به شکل ex vivo از جمله چالش‌های پیش رو است، زیرا در این روش با دشواری سلول‌هااز بدن بیمار گرفته شده و تحت سیستم‌های ویرایشی مانند CRISPR/Cas9 در آن‌ها تغییرات لازم انجام گرفته و به بدن بیمار بازگردانده می‌شوند. در حالت in vivo سیستم CRISPR/Cas9 به شکل مستقیم به سلول‌های هدف منتقل می‌شود تا تغییرات ژنتیکی موردنظر را ایجاد شوند. یکی از چالش‌های پیش رو انتخاب شکل انتقالی این برش دهنده‌های مولکولی، DNA یا RNA یا پروتئین است (۱۵، ۵).

از آن‌جا که DNA درای قابلیت درج نابجا درون ژنوم و ایجاد جهش‌های ناخواسته و بدخیمی است، با توجه به ایمن بودن انتقال پروتئین‌ها به درون ژنوم، از این ماکرومولکول‌ها استفاده می‌شود. با این حال باید توجه داشت که استفاده از پروتئین‌ها نیازمند طی کردن فرایندهای طاقت فرسای مهندسی پروتئین است. وارد ساختن پروتئین‌ها به درون سلول‌ها، موجب القای تنش سلولی و فعال شدن سیستم ایمنی در پاسخ به سمیت ناشی از ورود پروتئین بیرونی می‌شود. از سوی دیگر پایش میزان پروتئین انتقالی و پایداری آن در سلول هدف نیز از چالش‌های پیش روی استفاده از این ماکرومولکول‌ها به شمار می‌رود. استفاده از RNA نیز نسبت به DNA از ایمنی بالاتری برخوردار است، اگرچه بهره‌گیری مستقیم از RNA به دلیل ساختار شکننده‌ی آن از لحاظ فنی چالش برانگیز است.

شماری از اختلالات خونی مشتمل بر نقص ایمنی شدید مرکب (Severe combined immunodeficiency)، سندرم ویسکوت آلدریچ (Wiskott-Aldrich syndrome)، آنمی فانکونی (Fanconi anemia) و آنمی سلول داسی شکل (Sickle cell anemia) به شکل ex vivo با استفاده از قیچی‌های مولکولی و قلمرو انگشت روی قابل درمان هستند. گیرنده‌ی ویروس HIV تحت عنوان CCR5 (C-C chemokine receptor type 5) را می‌توان توسط NHEJ در سلول‌های لنفوسیت T دچار جهش کرد. این فرضیه توسط جانوران الگو به اثبات رسیده است. در سال‌های اخیر نیز مهندسی CCR5 در سلول‌های Tای انسانی وارد مرحله‌ی بالینی شده است. این آزمون‌ها حاکی از ایمن بودن و کارایی بالای ویرایش ژنی در انسان‌ها برای مقابله و درمان بیماری ایدز می‌باشد. استفاده از سیستم مولکولی CRISPR/Cas9 در درمان تیروزینمی (Tyrosinemia) و پیشگیری از بیماری‌های قلبی عروقی با موفقیت‌های چشمگیری همراه بوده است. به همین دلیل در راستای درمان انواع متفاوتی از بیماری‌های انسانی شماری از مراحل آزمون‌های بالینی با تمرکز بر روی استفاده از سیستم CRISPR/Cas9 با موفقیت انجام گرفته است (۱۶).

سیستم CRISPR/Cas9 و الگوهای بیماری

اطلاعات به دست آمده از توالی یابی و اساس ژنتیکی بیماری‌ها به ایجاد الگوهای موشی و مطالعات کارکردی در مبتلایان کمک شایانی کرده است. سیستم CRISPR/Cas9

امکان مطالعه‌ی بیماری‌های پیچیده ژنتیکی مانند سرطان را که مشتمل بر صدها تغییر ژنتیکی (مانند جهش‌های نقطه‌ای، حذف و جابجایی‌ها کروموزومی) می‌باشد فراهم کرده است، زیرا ایجاد یک الگوی موشی برای مطالعه‌ی تومورها و پیشروی این بیماری امری دشوار محسوب می‌شود. از سوی دیگر ژنوم و اپی ژنوم سلول‌های سرطانی از پیچیدگی‌های بالایی برخوردار است و به همراه شمار زیادی از چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی و بازآرایی‌های کروموزومی، هدف مناسبی برای روش CRISPR/Cas9 به جهت ساخت الگوهای موشی با همه‌ی این اختلالات ژنتیکی و بازسازی روند بیماری به شمار می‌رود. به عبارت دیگر، با استفاده از سیستم CRISPR/Cas9 امکان به وجود آوردن الگوهای حیوانی شامل همه‌ی تغییرات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی فراهم شده است و بدین وسیله مطالعه‌ی ساز و کار مولکولی پیشروی بیماری و شناسایی ژن سرکوبگر تومور و انکوژن‌ها برای پژوهشگران امکان پذیر گردیده است (۱۷).

در این راستا می‌توان تغییراتی را به شکل ex vivo در سلول‌های بنیادی خون‌ساز توسط CRISPR/Cas9 ایجاد کرده و سپس، سلول‌های تغییریافته را به بدن الگوی موشی پیوند زد. از این الگوی موشی می‌توان به عنوان ابزاری قدرتمند در مطالعات مرتبط با بدخیمی خونی بهره گرفت. خوک، رت و پریمات‌های غیر انسانی نیز می‌توانند اهداف مناسبی برای CRISPR/Cas9 باشند. الگوهای بیماری در این در موجودات می‌تواند برای مطالعه‌ی زمینه‌ی ژنتیکی بیماری‌های پیچیده چند ژنی مفید واقع شود. در این میان خوک‌ها به دلیل دارا بودن بیشترین شباهت فیزیولوژیکی با انسان از برتری بالاتری برخوردارند، اگرچه به علت پرهزینه بودن، اندازه‌ی بزرگ و دشوار بودن الگوسازی بیماری در این حیوانات، در مطالعات به شکل وسیعی از آن‌ها استفاده نشده است. دو مورد از گزارش‌ها در این رابطه نشان دهنده‌ی نحوه‌ی استفاده از CRISPR/Cas9 برای ایجاد تغییرات در ژنوم میمون رزوس (Rhesus monkey) و سینومولگوس (Cynomolgus monkey) می‌باشد. این سیستم در شماری از موارد مانند مطالعه بر روی یادگیری و ادراک یاری‌گر بوده است. در یکی از پژوهش‌ها، نتایج حاکی از توانایی روش CRISPR/Cas9 در معکوس کردن وارونگی ژن f، وارونگی فیلیپ، می‌باشد. سلول‌های بنیادی القایی که این وارونگی در آن‌ها اصلاح شده با نرخ ۶/۷ درصد استخراج شده و هیچ گونه هدف‌گیری غیر اختصاصی نیز مشاهده نگردیده است. نتایج این آزمون از لحاظ بالینی بسیار حائز اهمیت است، زیرا توانایی این سیستم در ایجاد بازارآیی‌های کروموزومی وسیع در سلول‌های بیماران هموفیلی A می‌تواند بر ارتقاء روند درمان این مبتلایان مؤثر باشد. از سوی دیگر با استفاده از سیستم CRISPR/Cas9 می‌توان اگزون ۲۳ جهش یافته را از ژن دیستروفین حذف کرده و فعالیت نسبی پروتئین دیستروفین را به آن بازگرداند و بدین وسیله به درمان مبتلایان دیستروفی عضلانی دوشن کمک کرد (۱۸).

غیرفعال سازی و اصلاح جهش‌های مضر دیستروفی عضلانی دوشن

دیستروفی عضلانی دوشن شدیدترین و رایج‌ترین نوع دیستروفی عضلانی ژنتیکی (وابسته به X) میان بزرگسالان است. ژن دیستروفین بسیار بزرگ بوده و ۷۹ اگزون دارد. به دلیل همین بزرگی ژن انواع متفاوتی از جهش‌های رخ داده در ژن دیستروفین به ابتلای فرد به این بیماری منجر می‌شود. تا به امروز هیچ درمان قطعی برای این بیماری یافت نشده است، اگرچه به نظر می‌رسد که فنون مهندسی ژنتیک مبتنی بر ایجاد انواع تغییرات در ژنوم قادر به بازیابی بیان ژن دیستروفین تغییر یافته باشد (۱۹،۵، ۳).

در سال ۲۰۱۳ تلاش‌های وسیعی برای انجام تغییر در ژن دیستروفین در میلوبلاست‌های نامیرای بیماران مبتلا، توسط دو روش ZFN (Zinc finger nucleases) و TALEN (Transcription activator-like effector nucleases) شکل گرفت. از آنجا که ۱۳ درصد مبتلایان دیستروفی عضلانی دوشن دارای جهش در اگزون ۵۱ خود می‌باشند به نظر می‌رسد که ایجاد درج و حذف‌های کوچک و یا حذف کامل اگزون ۵۱ به بازیابی بیان ژن دیستروفین منجر گردد. در یکی از مطالعات شکل گرفته، پژوهشگران به شکل پیاپی، اگزون-های ۴۵ تا۵۵ ژن دیستروفین را توسط اندونوکلئازهای چندگانه Cas9 حذف کردند. با استفاده از نتایج به دست آمده از الگوهای موشی تحت درمان می‌توان در آینده این روش را به عنوان یک روش درمانی پیشنهادی در انسان ارائه داد. برای نمونه، الگوی موشی مبتلا به دیستروفی عضلانی دوشن به نام Mdx در اگزون ۲۳ ژن دیستروفین خود دارای جهش است. انتقال درست و سیستماتیک ژن اصلاح شده با استفاده از ناقلین ویروس مجتمع با آدنو یا AAV (Adeno associated viruses) و فنون CRISPR/Cas9 به موش Mdx به اصلاح درصد قابل توجهی از جهش‌های رخ داده منجر شده است و پیش بینی می‌گردد که کارایی درمان بالینی این روش در

انسان‌ها بین ۱۵ تا ۲۵ درصد باشد. همچنین به نظر می‌رسد که در مبتلایان DMD با جهش در اگزون ۴۴ ژن دیستروفین نیز ایجاد تغییرات ژنتیکی هدفدار، سودمند است. اصلاح این ژن در خارج از بدن بیمار در سلول‌های بنیادی القایی (Induced Pluripotent Stem Cells: iPSC) شکل می‌پذیرد. در این ارتباط، سه راهبرد اصلاح کننده جهش به کار گرفته می‌شود: ایجاد پرش اگزونی در اگزون ۴۴، ایجاد درج و حذف-های کوچک در اگزون ۴۴ که به تبدیل جهش تغییر قالب به جهش درون قالب می‌انجامد. راهبرد آخر شامل Knock-in (جهشی است که به نحو هدفدار موجبات تحریک یک ژن و القای فعالیت از دست رفته یک ژن را فراهم می‌کند) کردن اگزون ۴۴ حذف شده برای بازسازی کامل توالی کدکننده پروتئین دیستروفین سالم است که در نتیجه‌ی آن iPSCهای اصلاح شده با موفقیت به سلول‌های عضلانی تمایز پیدا کرده و پروتئین‌های کارکردی را ایجاد می‌کنند (۲۰، ۵) .

ایجاد جهش‌های اصلاحگر و یا محافظت شده هموفیلی

بیماری هموفیلی بر اثر جهش‌های متنوع ژنتیکی در ژن عامل انعقاد خون F8 (در هموفیلی نوع A) و عامل انعقاد خون F9 (در هموفیلی نوع B) ایجاد می‌شود. هموفیلی یک اختلال هدف مناسب برای ژن درمانی به شمار می‌رود، زیرا به نظر می‌رسد که ۱ درصد بیان ژن وحشی عامل‌های ۸ و ۹ انعقادی برای بهبود بیماران تا حد زیادی کفایت می‌کند. نخستین ژن درمانی با هدف‌گیری ژن جهش یافته به شکل in vivo در الگوی موشی مبتلا به هموفیلی B در سال ۲۰۱۵ رخ داده است. از سوی دیگر با استفاده از جفت نوکلئاز انگشت روی برای هدف‌گیری ژن جهش یافته F9 انسانی و استفاده از AAV به عنوان ناقل، قطعه‌ی cDNA فرد دهنده به درون ژنوم موش فرستاده شد. انجام این فرایند در موش بالغ برای ژن F9 انسانی به تولید پایدار پروتئین عامل ۹ انسانی انجامیده است (۲۱،۵).

هموفیلی A از هموفیلی B رایج‌تر است و شامل انواع پیچیده‌تری از جهش‌ها است. به همین دلیل ایجاد تغییر در آن دشوارتر است. رایج‌ترین جهش در هموفیلی A وارونگی فلیپ در ژن F8 می‌باشد، پژوهش‌ها نشان داده است که TALEN قادر به اصلاح این بازآرایی می‌باشد. به همین دلیل می‌توان از روش CRISPR/Cas9 برای هدف‌گیری همه‌ی ابعاد ۶۰۰ کیلوباز این وارونگی و اصلاح این نوع جهش‌ها در ژن‌های عامل‌های انعقادی و یا سلول‌های بنیادی iPSC مستخرج از بیماران مبتلا به هموفیلی A بهره گرفت (۲۲،۵).

کم خونی داسی و تالاسمی β

هر دو بیماری کم خونی داسی شکل و تالاسمی β بر اثر جهش‌های رخ داده در ژن HBB شکل می‌گیرد، که در آن میزان ناکافی محصول (زنجیره‌ی β-گلوبین هموگلوبین) ایجاد می‌شود. ایجاد تغییر در لوکوس گلوبولین β به واسطه نوکلئازها، ارائه دهنده‌ی راهبرد نوین برای درمان دائمی هموگلوبینوپاتی‌ها است. با استفاده از TALENها می‌توان لوکوس β-گلوبولین را مورد هدف قرار داد و به واسطه‌ی knock-in کردن cDNAی ژن با طول کامل در سلول‌های K562 به اصلاح جهش مربوطه یاری رساند. با استفاده از ZFNها می توان کم خونی داسی شکل را توسط ایجاد جهش نقطه‌ای در سلول‌های بنیادی خونی $CD34^+$ درمان کرد. این هموگلوبینوپاتی‌ها نیز دارای مزایای مختص خود به عنوان هدف ژن درمانی هستند که از جمله iPSC بیماران را می‌توان به سلول‌های بنیادی خون‌ساز تمایز داد و سپس توسط پیوند اتولوگ به بدن بیمار بازگرداند. امروزه، این راهبرد با کارایی بالا توسط روش CRISPR/Cas9 در بیماران مبتلا به کم خونی داسی شکل و تالاسمی β به کار گرفته می‌شود (۲۳).

ویروس نقص ایمنی انسان HIV

یکی از جدیدترین راهبردهای ایجاد تغییرات ژنی، تغییر دادن لنفوسیت‌های T به شکل ex vivo برای غیر فعال کردن ژن CCR5 است که به ایجاد مقاومت در برابر عفونت با ویروس نقص ایمنی انسان HIV در افراد می‌انجامد. این فرایند از جمله معدود مواردی است که در درمان‌های برپایه ایجاد تغییرات در مرحله‌ی بالینی مورد استفاده قرار گرفته است. یکی از مواردی که موجب تأیید بالینی این ایده شده است دریافت سلول‌های بنیادی توسط بیمار و دهنده‌ای است که دارای یک حذف هوموزیگوت در ژن CCR5 می‌باشد. این رویکرد موجب کاهش ویروس HIV در حد غیرقابل تشخیص شده و به بازیابی شمار لنفوسیت‌های $CD4^+$ T منجر می‌شود. در یک مطالعه نشان داده شد که ادغام بی‌خطر سلول‌های $CD4^+$ T اتولوگ و تغییر یافته توسط CRISPR/Cas9 که ژن CCR5 در آن ها حذف شده است با بیماران دارای HIV، به بهبود روند بیماری انجامیده است. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، تلاش‌های بی‌شماری به جهت استفاده از راهکار

ایجاد تغییر در ژن برای غیر فعال کردن ژن CCR5 با استفاده از فنون TALEN و CRISPR/Cas9 شکل گرفته است. در تازه‌ترین روش‌ها با استفاده از تغییرات ایجاد شده توسط NHEJ در iPSCهای موشی و حذف ژن CCR5 در آن‌ها، نرخ بازدهی ۱۴ درصد با TALEN و ۳۳ درصد با CRISPR/Cas9 به دست آمده است (۲۴،۳).

برای ارتقاء مقاومت ایجاد شده در برابر عفونت با ویروس HIV می توان سایر ژن‌های دخیل در فرایند عفونت‌زایی را نیز هدف گرفت. این ژن‌ها عبارتند از:

C-X-C گیرنده‌ی کموکاینی تیپ ۴ (CXCR4) که یک گیرنده‌ی کمکی را کد می‌کند. پروتئین برهمکنش دهنده‌ی PC4 و SFRS1 نوع ۱ (PSIP1) است که عامل رشد لنز مشتق از اپیتلیوم (Lens epithelium-derived growth factor) را به عنوان پروتئین ضروری برای درج ویروس HIV کد می‌کند. به جهت کاهش هدف‌گیری‌های غیراختصاصی و عوارض ناشی از این هدف‌گیری شماری از مطالعات تمرکز خود را بر از میان بردن ژنوم ویروس HIV وارد شده به بدن فرد مبتلا معطوف کرده‌اند. در یکی از این پژوهش‌ها نواحی LTR (Long Terminal Repeat) ژنوم ویروس HIV با کارایی بالا توسط روش CRISPR/Cas9 هدف گرفته شد که در نتیجه، آن بیان ژن‌های ویروسی و تقسیم شدن آن‌ها در سلول‌های CHME5, HeLa, T2M-b1 و u1 مهار شد. به استثنای ویروس HIV، نوکلئازهای برنامه‌ریزی شونده برای ایجاد انواع تغییرات در سایر پاتوژن‌های ویروسی نیز به کار برده شده‌اند. برای نمونه در رده‌های سلولی HepAD38, HepG2, Huh7 و HepaRG که توسط ناقل‌های بیانی ویروس هپاتیت B (Hepatitis B Virus: HBV) ترانسفکت شده‌اند، می‌توان توسط سیستم‌های چندگانه CRISPR/Cas9 ژن‌های متعددی را هدف تغییر قرار داد و به کاهش تولید هسته HBT و پروتئین‌های سطح آن منجر شد. علاوه بر این وضعیت، در شرایط in vitro می‌توان از CRISPR/Cas9 برای ایجاد اختلال در بیان ژن‌های HBV در حالت in vivo نیز استفاده کرد. به همین ترتیب ژن‌های E6 و E7 ویروس پاپیلومای انسانی را نیز می‌توان توسط روش CRISPR/Cas9 هدف قرار داد (۲۵).

یکی از کاربردهای سیستم CRISPR/Cas9 ارائه ایمنی مولکولی بر علیه ویروس‌های عفونت زا در گیاهان است. از این روش برای هدف‌گیری ویروس TYLCV (Tomato Leaf Curl Virus) که به یک بیماری ویران کننده انجامیده است و تا حد از بین رفتن محصول نیز پیش می‌رود، استفاده می‌شود. این سیستم دارای قابلیت مقابله هم‌زمان با چندین DNAی ویروس است. به علاوه یک sgRNA که برای اتصال به یک ناحیه‌ی برون سلولی محافظت شده طراحی شده است، توانایی القاء پاسخ ایمنی بر علیه اعضای متعددی از خانواده جمینی ویروس‌ها را دارد (۲۶).

از CRISPR/Cas9 در سیستم پستانداران بر علیه اهداف ژنومی ویروس HIV و پیش ویروس پنهانی آن در ژنوم، ویروس هپاتیت B و C استفاده می‌شود. برای ارتقاء روش‌های درمانی بر علیه ویروس‌ها می‌توان سیستم CRISPR/Cas9 را به گونه‌ای طراحی کرد که توالی ویروس را برای تخریب آن هدف گیرد. به علاوه می‌توان از این روش در درمان افراد مبتلا به عفونت‌های ویروسی با از بین بردن توالی‌های لازم برای همانندسازی ژنوم ویروس در ژنوم میزبان استفاده کرد. برای نمونه می‌توان توالی‌های LTR را که برای همانندسازی ویروس HIV لازم می‌باشد در ژنوم میزبان هدف گرفت. مطالعات بالینی حاکی از آن است که ایجاد اختلال در ژن CCR5 توسط CRISPR/Cas9 و ارائه سلول‌های اتولوگ با عنوان CD4T حاوی CCR5 غیرکارکردی به کاهش چشمگیر میزان ویروس‌های HIV در بدن فرد مبتلا انجامیده است (۲۷).

از آن‌جا که شماری از عفونت‌های ویروسی مانند ویروس هپاتیت B و C در سرطان کبد، ویروس پاپیلومای انسانی در سرطان دهانه‌ی رحم و ویروس اپشتین بار (Epstein-barr virus) در کارسینومای نازوفارنکس (Nasopharyngeal carcinoma) در انسان همراه با سرطان رخ می‌دهد هدف‌گیری این ویروس‌های انکوژنی، تخریب و ایجاد تغییر در آن‌ها می‌تواند به پیشگیری و معکوس کردن فرایند پیشروی سرطان منجر شود. با عنایت به نکات اشاره شده در بالا، پژوهشگران امیدوارند در راستای استفاده از سیستم CRISPR/Cas9 برای تخریب این ویروس‌های انکوژنی، قادر به ارائه یک راهکار نو برای درمان این گونه سرطان‌ها باشند. اشاره می‌گردد که همه‌ی این روش‌های درمانی پیشنهادی تا حد زیادی به پیشرفت فنون انتقال CRISPR/Cas9 به سلول‌های هدف وابسته است (۲۸).

استفاده از CRISPR/Cas9 برای مطالعات اپی-ژنتیکی مؤثر بر بیماری

از سیستم CRISPR/Cas9 می‌توان برای تنظیم بیان آنزیم‌های تغییردهنده‌ی DNA و هیستون‌ها، تغییر مکان‌های اتصالی عامل‌های رونویسی، تغییر بیان RNAهای غیرکدشونده، تغییر نواحی تنظیم کننده غیر کد شونده و

تغییر ساختار کروماتین استفاده کرد. در نتیجه می‌توان به شکل هدفمندی در درمان و مطالعه‌ی انواع بیماری‌های عصبی، مانند زیر بهره گرفت:

۱- می‌توان از CRISPR/Cas9 برای فهم بهتر تکوین اعصاب و عامل‌های رونویسی دخیل در آن استفاده کرد. با استفاده از حذف این عامل‌ها می‌توان به کارکرد حیاتی آن‌ها پی برد. برای نمونه می‌توان توسط CRISPR/Cas9 عامل رونویسی bHLH با عنوان neuroD را غیر فعال کرد و نقش آن در بلوغ گیرنده‌های نورونی را آشکار ساخت. به علاوه با حذف نواحی خاص افزاینده‌ها (Enhancers) می‌توان فعالیت تنظیمی آن‌ها را مختل کرد و از این طریق به کارکرد ژن مرتبط پی برد. از سوی دیگر با استفاده از پروتئین‌های ترکیبی dCas9 می‌توان به شکل مستقیم موجب افزایش و یا کاهش بیان ژن‌ها شد. سرانجام، با استفاده از این روش می‌توان برچسب‌های پروتئینی به جایگاه‌های حذف شده اضافه کرد و روند مطالعات بیوشیمیایی و اپی ژنتیکی را تسهیل کرد.

۲- استفاده از CRISPR/Cas9 در مطالعه‌ی بیماری‌های سیستم اعصاب مرکزی: گلیوبلاستومای چندشکل (Glioblastoma multiform)، اوتیسم (Autism) و شیزوفرنی (Schizophrenia).

۳- استفاده از CRISPR/Cas9 بر روی سلول‌های بنیادی القایی انسانی: این سلول‌ها برای مطالعه‌ی نمو زیستی و ساز و کارهای بیماری و به عنوان بستری جهت بررسی شناخت بهتر داروها بسیار مناسب است. بیان ۴ عامل Sox2, Oct4, Klf4, C-myc موجب بازگشت سلول‌های سوماتیک بالغین به حالت سلول‌های بنیادی می‌شود. در این مرحله با استفاده از عامل‌های رشد و محرک‌های ویژه می‌توان این سلول‌ها را به سمت سلول‌های نورونی iNeurous تمایز داد و علاوه بر مطالعه‌ی آن‌ها، انواع آزمون‌ها را نیز انجام داد. بدین ترتیب با استفاده از CRISPR/Cas9 می‌توان مسیرهای تنظیمی را در بیماری‌های عصبی، مانند: پارکینسون (Parkinson's disease)، سندرم X شکننده (Fragile X syndrome)، اختلالات اوتیسم و شیزوفرنی، هدف مطالعه قرار داد.

سرانجام، از این روش می‌توان در موارد پیشرفته‌تر دخیل در بیماری‌های اعصاب و روان مشتمل بر مطالعات زیست شناختی بر روی ساختار کروماتین، نواحی غیرکد شونده تنظیمی مهم در بیماری زایی اعصاب و روان و فعالیت‌های RNAی غیرکدشونده طویل در این نوع از بیماری‌ها بهره گرفت (۲۹).

الگوسازی هایپرانسولینمی مادرزادی با سلول‌های بنیادی جنینی فاقد ABCC8 تولید شده توسط روش CRISPR/Cas9

هایپر انسولینمی مادرزادی (Congenital hyperinsulinism:CHI) به گروهی از بیماری‌های نادر ژنتیکی گفته می‌شود که به واسطه‌ی ترشح بیش از اندازه‌ی انسولین از سلول‌های بتای پانکراس شناخته می‌شوند. انسولین هورمون تنظیم کننده قند خون است و ترشح بیش از حد آن موجب هایپوگلیسمی (Hypoglycemia) خواهد شد. هایپوگلیسمی به نوبه‌ی خود موجب تحریک رفتار خشونت آمیز، بی حالی، عدم هشیاری و غش می‌شود و می‌تواند احتمال خطر رخداد جراحات مغزی را افزایش دهد. ساز و کار مولکولی هایپر انسولینمی مادرزادی در گرو ژن‌های اساسی دخیل در ترشح انسولین از سلول‌های بتا است. این ژن‌ها شامل ABCC8, KCNJ11 GCK هستند که پروتئین‌های Sur1, Kir6.2 را کد می‌کنند و برای نمونه تا سال ۲۰۱۵، ۱۵۰ جهش در ABCC8 و ۲۴ جهش در KCNJ11 گزارش شده است (۳۰).

با این که الگوهای موشی زیادی برای CHI طراحی شده است، اما وجود یک الگو بر اساس سلول‌های بنیادی امری لازم به نظر می‌رسد. CRISPR/Cas9 امروزه به عنوان یک ابزار قدرتمند جهت ویرایش ژنوم کاربرد دارد. ادغام سیستم CRISPR/Cas9 و سلول‌های بنیادی پرتوان القائی انسانی راهکاری جدید برای الگوسازی بیماری‌های انسانی در محیط in vitro فراهم آورده است. بدین ترتیب می‌توان بیماری‌های نادر انسانی را مورد مطالعه‌ی قرار داد و اثر بخشی داروهای پیشنهادی را بررسی و غربالگری نمود. مطالعات نشان داده است که سلول‌های بنیادی دارای اختلال در بیان ژن ABCC8 نسبت به سلول‌های طبیعی همتای خود، بیشتر مانع ترشح انسولین می‌شوند. به علاوه مشخص شده است که می‌توان ترشح اضافی انسولین را توسط داروها نیز کنترل کرد و ساختار کانال K-ATP را به عنوان هدف جدیدی برای طراحی این داروها در نظر گرفت. الگوی سلول‌های بنیادی بازسازی کننده شرایط بیماری CHI بستری مناسب برای آزمون این داروها به شمار می‌رود. داروی Diazoxide، نه در همه‌ی بیماران، بلکه در اغلب آن‌ها برای درمان هایپوگلایسمی به کار می‌رود. در بیمارانی که کارکردSur1 در آن‌ها به طور کامل از دست رفته است این دارو پاسخگو نیست. سرانجام می‌توان گفت که این الگوی ساخته شده نه تنها برای بررسی بیماری

CHI در محیط in vitro مناسب است بلکه بستری مناسب برای مطالعه‌ی بیشتر سایر بیماری‌های توارثی مرتبط با پانکراس را فراهم می‌کند (۳۱،۳۲)

سلول‌های بنیادی القایی

iPSCها شباهت زیادی با سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های پرتوان دارند و به دلیل داشتن نرخ بالای خودنوزایی قادر به ایجاد همه‌ی انواع سلول‌ها هستند. به علاوه استفاده از آن‌ها نسبت به همتایان جنین خود بسیار کمتر بحث برانگیز بوده است. پیشرفت‌های اخیر در فناوری سلول‌های بنیادی امیدهای پرشماری را در رابطه با مزایای استفاده از iPSC ها در درمان بالینی ایجاد کرده است. چنان چه که در بالا اشاره شد iPSC ها مزایای پر شماری در شخصی سازی داروها دارند، زیرا می‌توان سلول‌ها را از فرد بیمار گرفت و از عوارض رد پیوند و پاسخ‌های ایمنی به هنگام پیوند آن به بدن بیمار ممانعت کرد. درمان‌های ex vivo شامل اصلاح iPSCهای گرفته شده از بیمار توسط فنون ایجاد کننده تغییر در ژن‌ها مانند CRISPR/Cas9 و تمایز دادن آن‌ها به سلول‌های تمایزیافته مانند نورون‌ها و کاردیومیوسیت‌ها (Cardiomyocytes) است (۳۳،۳۱،۵).

رده‌های iPSC انسانی با ویژگی‌های ژنوتیپی یک بیماری خاص را می‌توان برای فهم بهتر ساز و کارهای بیماری‌زایی به کار برد. ایجاد انواع تغییرات در رده‌های iPSC انسانی توسط CRISPR/Cas9 و استفاده از آن‌ها برای الگو سازی و آزمون کارایی و سمیت داده‌ها نه تنها ارائه یک بازسازی بی‌مانند از بیماری می‌باشد بلکه نسبت به الگوهای حیوانی از هزینه‌های به مراتب کمتری نیز برخوردار می‌باشد. در این میان پژوهشگران باید نسبت به متغیرهای تاثیرگذار بر فنوتیپ ایجاد شده مانند اپی ژنتیک، سن، جنسیت و منشأ قومی آگاه باشند. به این دلیل ویرایش ژنی توسط سیستم CRISPR/Cas9 تنها راه مطمئن متمایز کردن و مشخص کردن تغییراتی که به طور ویژه با ایجاد بیماری ارتباط دارند، محسوب می‌شود (۳۴).

روش CRISPR/Cas9 نه تنها دارای قابلیت غیر فعال کردن چندین ژن به شکل هم‌زمان است بلکه واجد توانایی غیر فعال کردن آلل‌های خاص درون سلول‌های iPSC نیز می‌باشد. این مزیّت موجب برتری این روش نسبت به سیستم‌های پیشین ZFN و TALEN شده است. برخلاف همه‌ی چالش‌های پیش رو برای ویرایش ژن‌ها در سلول‌های بنیادی انسانی، سیستم CRISPR/Cas9 قادر به اصلاح دقیق رده سلولی iPSC انسانی است. به نظر می‌رسد در آینده‌ای نه چندان دور ادغام روش CRISPR/Cas9 با iPSC ها موجب ترکیبی جدید از روش‌های ژن درمانی و سلول درمانی خواهد شد (۳۵).

چالش‌های استفاده از قیچی مولکولی در کاربردهای درمانی

استفاده‌ی گسترده از این قیچی‌های مولکولی در فرایندهای درمانی مستلزم پیشرفت‌های اساسی است. چنان چه پیش‌تر نیز اشاره شد عامل‌های متعددی مانند ماهیت ژنتیکی بیماری، اصلاح موردنیاز، بستر سیستم برشی مولکولی مورد استفاده، روش انتقال، سلول‌ها و اندام هدف در کارایی روش درمانی و تخمین میزان موفقیت بالینی حاصل از آن حائز اهمیت است. پیشرفت در کارایی ساز و کارهای ترمیمی می‌تواند کلیدی برای ارتقاء توانایی این روش‌ها برای درمان طیف وسیعی از بیماری‌های ژنتیکی به شمار آید. درمان برپایه‌ی کارکرد سیستم ترمیمی NHEJ بر روی توالی هدف، موارد مناسبی به شمار می‌روند. از آن‌جا که شماری از درمان‌ها برپایه‌ی سیستم ترمیمی HDR تنظیم شده‌اند و در خلال آن‌ها مولکول الگو جایگزین توالی ناخواسته می‌شود، اصلاحات عمده‌ای برای افزایش کارایی آن‌ها مورد نیاز است. ابتدایی‌ترین چالش، فعال بودن ابتدایی سیستم ترمیمی HDR در سلول‌های میوزی است، حال آن‌که NHEJ در اغلب سلول‌ها فعال می‌باشد. به این دلیل نمی‌توان سلول‌های غیرتقسیم شونده و پسامیتوزی را توسط سیستم ترمیم HDR هدف گرفت (۳۶).

با این وجود می‌توان از راهکارهای متفاوتی برای تحریک رخداد HDR در سلول‌های غیرتقسیم شونده استفاده کرد. همچنین می‌توان به اصلاح ژن هدف توسط سیستم NHEJ بهینه شده نیز امید داشت. پیشرفت در توانایی پژوهشگران در کنترل کارایی این دو سیستم ترمیمی در انواع متفاوت سلول‌ها رابطه مستقیمی با افزایش استفاده‌ی آن‌ها در درمان‌های بالینی نشان می‌دهد. در این میان کاهش هدف‌گیری غیراختصاصی توسط اندونوکلئاز Cas9 بیشترین اهمیت را برای افزایش دقت سیستم CRISPR/Cas9 در اصلاح ژن‌ها به خود اختصاص داده است (۳۷).

بر اساس شماری از مطالعات، افزایش هدف‌گیری های غیراختصاصی Cas9 به بدخیمی و افزایش احتمال خطر مرگ بیماران تحت درمان انجامیده است. برای نمونه فعالیت غیراختصاصی سیستم CRISPR/Cas9 در درمان بیماران می‌تواند به جهش‌های فعال کننده‌ی انکوژن ها در ژنوم فرد مبتلا منجر شود. این سلول‌های انکوژنی پیرایش شده قادر به

غلبه بر سایر سلول‌ها بوده و بدخیمی‌های پیچیده‌ای را به دنبال خواهد داشت، مسئله‌ای که یک چالش پیچیده به شمار می‌آید و مطالعه‌ی آن در انواع متفاوت سلول‌ها، تحت شرایط درمانی، امری ضروری محسوب می‌شود. با استفاده از راهکارهایی مانند ایجاد جفت شکاف و یا ادغام کایمری قلمرو کاتالیتیک FokI با Cas9 غیرفعال از لحاظ کاتالیتیکی (dCas9) می‌توان میزان دقت سیستم را ارتقاء بخشید. از سوی دیگر باید توجه داشت که فعالیت غیراختصاصی سیستم نیز به عوامل متفاوتی مانند میزان پروتئین Cas9 در دسترس، ساختار و ماهیت توالی sgRNA، نوع سلول هدف و مرحله‌ای که سلول هدف در آن قرار دارد نیز وابسته است. با توجه به تفاوت فعالیت غیراختصاصی میان سلول‌ها و ارگانیسم‌های متفاوت باید مطالعات عمیق‌تری در اربطه با آن انجام گیرد (۳۸).

مطالعات اندکی که در آن‌ها توالی یابی همه‌ی ژنوم شکل گرفته است، نشان دهنده‌ی فعالیت غیراختصاصی مشاهده شده کمتری در مقایسه با نرخ مورد انتظار است. غلبه بر این مشکل توسط راه حل‌های متفاوت و دستیابی به روش‌های بسیار دقیق شناسایی کننده از مهم‌ترین عوامل برای استفاده از سیستم CRISPR/Cas9 در مرحله‌ی بالینی و درمان می‌باشد. در این راستا می‌توان از واریانت های دیگر Cas9 با دقت ارتقاء یافته و یا حتی سایر رده‌های تازه کشف شده از اندونوکلئازها استفاده کرد (۳۹).

نظری بر چشم انداز کاربردهای درمانی روش CRISPR/Cas9

چنان‌چه که به نظر می‌رسد روش CRISPR/Cas9 قادر به متصل کردن علومی مانند مطالعات کارکردی زیست شناسی، بیوفناوری و ژنتیک پزشکی می‌باشد. استفاده از این روش در سلول‌های طیف وسیعی از یوکاریوت ها، دانش ما را در رابطه با اساس مولکولی فرایندهای حیاتی سلول به نحو چشمگیری افزایش داده است. علاوه بر آن با استفاده از روش CRISPR/Cas9 پژوهشگران قادر به ساخت الگوهای حیوانی مبتلا به طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها خواهند بود و بدین وسیله مسیر کشف و اختصاصی کردن داروها را هموار خواهند کرد. از سوی دیگر توسط این روش می‌توان به انجام جراحی‌های مولکولی امید داشت و با تغییر دادن نوکلئوتیدهای ژن‌های مسبب بیماری‌ها به اصلاح ژن مربوطه و درمان بیماری دست یافت. سرانجام، در آینده‌ای نه چندان دور ویرایش ژنوم توسط روش CRISPR/Cas9 جایگاه خود را در مرحله‌ی درمانی پیدا خواهد کرد و با افزایش کارایی، ایمنی و ویژگی اجزاء سیستم‌های ویرایش ژن، افق‌های جدید و بی‌شماری را در درمان‌های ژنتیکی روشن خواهد ساخت. بدون شک با استفاده از این روش، سطح کیفیت زندگی انسان‌ها ارتقاء پیدا خواهد کرد و پژوهشگران را قادر به درمان بیماری‌هایی خواهد کرد که هم اکنون دور از دسترس ما است. همچنین، با اختصاصی و فردی سازی این درمان‌ها، میزان اثربخشی آن‌ها بر روی افراد مبتلا افزایش خواهد یافت (شکل ۱). چنان‌چه در ملاحظات اخلاقی نیز بر آن تأکید می‌شود، بحث برانگیزترین چالش پیش رو ایجاد تغییرات در رده‌ی سلول‌های زایشی است. اگرچه باید در نظر گرفت که هر گام برای بهبود حیات انسان‌ها نیاز به پذیرش احتمال خطر، البته در رویکردی مسئوولانه و عاقلانه، دارد و در این میان وظیفه سازمان‌های نظاره‌گر هدایت مسیر پژوهش‌ها به سوی شناخت اساس مولکولی بیماری‌ها و کمک به درمان مبتلایان است و از سوی دیگر قانون‌هایی به جهت ممنوعیت استفاده از این روش برای ارتقاء گونه‌ای و ساخت ابرانسان نیز باید توسط سازمان‌های مسئول و به دقت تدوین و اجرا شود. سرانجام، به شرط استفاده درست و انسانی از این فناوری‌ها، ایجاد تغییرات در ژنوم توسط CRISPR/Cas9، به نوبه خود به پیشرفت سطح زندگی انسان‌ها منجر خواهد شد (۴۰).

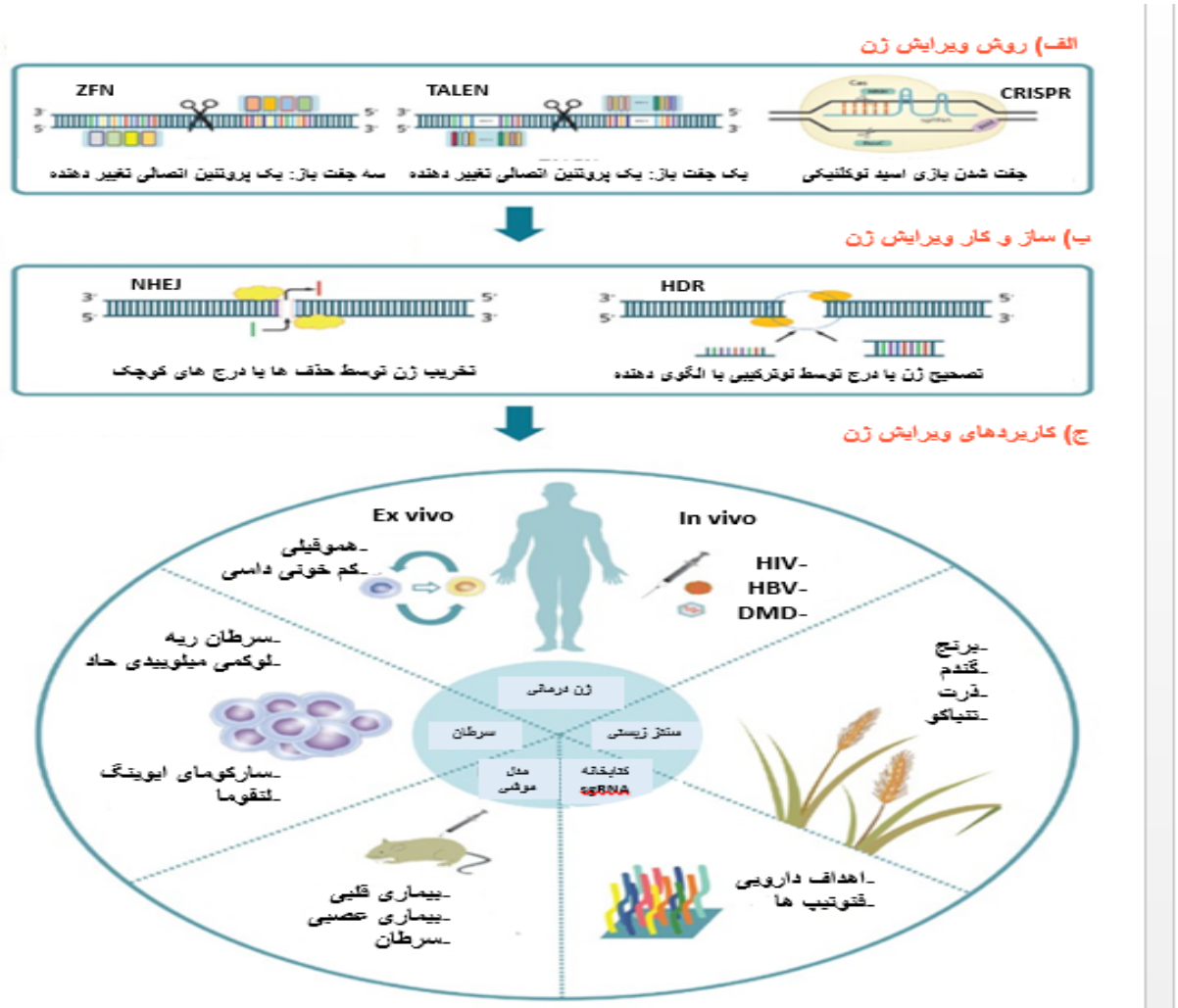
ملاحظات اخلاقی و اجتماعی

با وجود همه‌ی پیشرفت‌ها، فناوری CRISPR/Cas9 مراحل ابتدایی خود را می‌گذراند و هنوز پرسش‌های بی‌شماری در رابطه با آن بی پاسخ مانده است. به همین دلیل ملاحظات اخلاقی در رابطه با سهولت به کارگیری این روش در حوزه‌ی مهندسی ژنتیک میزان هزینه‌ها و کارایی آن وجود دارد. از سوی دیگر، بزرگترین دغدغه‌ی پژوهشگران در رابطه با استفاده از CRISPR/Cas9 برای دستیابی به اهداف نابجا و ایجاد انواع تغییرات بر روی رده‌ی سلول‌های زایشی همچنان بی پاسخ مانده است. در شماری از پژوهش‌ها ساخت الگوهای حیوانی مبتلا به بیماری مورد نظر و مطالعه‌ی مسیرهای مولکولی ژن مربوطه هدف استفاده از این فناوری بوده است.ایجاد تغییر در سلول‌های رده‌ی زایشی پریمات‌های غیرانسان نیز توسط CRISPR/Cas9 گزارش شده است. برای نمونه یکی از بحث برانگیزترین کاربردهای این فن، استفاده آن در ایجاد انواع تغییرات بر روی ژن‌های مرتبط با IQ در انسان می‌باشد. با وجود این چالش‌های علمی و اخلاقی، پژوهشگران در کشور انگلستان اجازه‌ی استفاده از روش CRISPR/Cas9 برای ایجاد تغییر در رویان‌های انسان را دریافت کرده‌اند. در این راستا، پژوهشگران

لزوم ایجاد این تغییر را بررسی و تأیید کرده و بودجه لازم توسط سازمان‌های مربوطه را نیز دریافت کرده‌اند. در این میان قانون گذاران باید از توانایی‌ها و فرصت‌هایی که این فناوری به زندگی انسان وارد می‌کند آگاه بوده و بر اساس آن، مسئوولانه محدودیت‌های کاربردی را تعیین کنند (۴۱،۵).

یکی دیگر از مسائل بحث برانگیز، استفاده از روش CRISPR/Cas9 در ناقل ارگانیسم‌هایی مانند پشه‌ها است. بدین گونه که تغییرات ژنی قادر به وجود آوردن سوش های جهش یافته مقاوم می‌باشد که توانایی غلبه بر جمعیت طبیعی این در موجودات را دارد. به طبع انجام همه‌ی این نظارت‌ها به کاهش نگرانی عموم منجر خواهد شد و سازمان‌ها را برای سرمایه گذاری در این حوزه و پژوهشگران را به تلاش بیشتر برای ایجاد تعادل میان مزایا و معایب این روش و کاربردی کردن آن بیشتر تشویق خواهد کرد.

در اوایل سال ۲۰۱۵، یک گروه از پژوهشگران چینی با استفاده از روش CRISPR/Cas9 تغییراتی را در زیگوت سه هسته‌ای انسان ایجاد کردند که البته قابلیت زیستن نداشته است. هدف این پژوهشگران پایش هدف‌گیری فناوری CRISPR/Cas9 در رویان-های انسان پیش از لانه‌گزینی در رحم بوده است. اگرچه نتایج این مطالعه حاکی از توانایی این فناوری در ایجاد شکاف موثر در ژن هدف (در این مطالعه ژن β-گلوبین) است، اما در راستای عدم کارایی مناسب سیستم ترمیم HDR در این آزمون، رویان‌ها دارای موزائیکی از ژن‌های وحشی و ژن‌های اصلاح شده بودند. از سوی دیگر توسط توالی یابی اگزوم (Exome-sequencing)، هدف‌گیری نابجای فناوری CRISPR/Cas9 نیز در این رویان‌ها مشاهده گردید. این آزمون البته جنجال‌های گسترده‌ای را در پی داشت.



شکل ۱. نظری بر تغییرات ایجاد شده در ژن‌ها و کاربردهای آن از جمله اصلاح نقایص ژنتیکی توسط ایجاد تغییرات مشخصی در ژنوم توسط فناوری‌های ZFN, TALEN و CRISPR/Cas9. در شکل رخداد شکست در رشته، می‌توان آسیب وارده را توسط سیستم‌های ترمیمی اتصال انتهاهای غیرهومولوگ NHEJ و نوترکیبی هومولوگ HDR اصلاح کرد. بر اساس توانایی‌های این فنون، می‌توان از تغییرات ایجاد شده در ژن‌ها در قلمروهای متفاوت پژوهشی و زیست فناوری بهره گرفت (شرح جزئیات در متن)

در اواخر سال ۲۰۱۵، کنسرسیوم جهانی نظاره‌گر بر ایجاد تغییرات در ژنوم انسان در واشینگتن شکل گرفت و فضای مناسبی را برای پژوهشگران این حوزه فراهم کرد تا یک هم فکری گسترده و هم افزا در راستای مهندسی سلول‌های رده زایشی انسان ایجاد کنند (۴۲).

فناوری CRISPR/Cas9 از مزایای فراوانی برخوردار است. برای نمونه می‌توان از آن به عنوان ابزاری برای برطرف کردن شماری از نقایص که به شکل سیستماتیک و از زمان تولد مانند سیستیک فیبروز و هانتینگتون بروز می‌کنند، استفاده کرد. در مجموع، نحوه‌ی ایجاد کردن مرزهای کاربرد این روش و مشخص کردن این موضوع که کدام افراد برای این فرایند مناسب هستند مشخص شده است، اگرچه هنوز هم بر سر میزان ایمنی و کارایی فناوری CRISPR/Cas9 بحث‌هایی وجود دارد. یکی از بزرگترین نگرانی‌ها در رابطه با استفاده نابجا از این فناوری توسط افراد سودجو برای ایجاد تغییراتی در رویان‌های انسانی در راستای اهداف یوژنیک است. به همین دلیل نیاز به یک نظارت و کنترل دقیق شرافتمندانه و مسئولانه در این حوزه توسط یک سازمان معتبر بین‌المللی و مجموعه‌ی دست‌اندرکاران، کاملاً احساس می‌شود (۴۳،۵).

جمع بندی

در میان روش‌های متعدد برای ویرایش ژنوم، فناوری CRISPR/Cas9 از مزایای متعددی مانند طراحی ساده، کاربرد آسان و قابلیت ویرایش چندین ژن به شکل همزمان، نسبت به سایرین برخوردار است. این فناوری به سرعت جایگاه خود را در راستای تحقق اهداف متفاوت در ویرایش ژنوم، با عنوان یک ابزار مقرون به صرفه و با کارکرد آسان یافته است. در انواع رده‌های سلولی یا الگوهای حیوانی، می‌توان به روش‌های متفاوت از فناوری CRISPR/Cas9 به منظور نیل به مقاصد درمانی بهره برد. از آن جایی که این فناوری قادر به شناسایی و اصلاح جهش‌های مسبب اختلالات تک ژنی است، مانع از بروز فنوتیپ‌های ناهنجار حاصل از این جهش‌ها می‌شود. افزون بر این CRISPR/Cas9 امکان ایجاد تغییرات اکتسابی در ژنوم پاتوژن‌هایی مانند HIV را برای پژوهشگران فراهم آورده است، بدین ترتیب که با ایجاد جهش‌های القاء کننده‌ی سیستم ایمنی یا جهش‌های درمانی در بافت میزبان به بهبود افراد مبتلا کمک شایانی می‌شود. توانایی-های بالقوه این فناوری در ژن درمانی انواع سرطان‌ها را نیز نمی-توان نادیده گرفت. سرانجام تأکید می‌نماید که ارزیابی کارکردهای چشمگیر کنونی و آتی فناوری CRISPR/Cas9 در قلمرو ژنتیک پزشکی و اِعمال نظارت بر مسائل اخلاقی که هم‌زمان با ظهور این فناوری به وجود آمده ، وظیفه‌ی خطیری است که بر عهده‌ی پژوهشگران گذارده شده است.

REFERENCES

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

2. Noori-Daloii MR, Vand Rajabpour F. Roles of miRNAs in gene expression regulation, apoptosis, diagnosis and treatment of cancer. Med Sci J Islamic Azad Univ Tehran Med Branch 2011;21:151-61.

3. Noori-Daloii MR. Medical molecular genetics in the third millennium. Tehran: Samer; 2012.

4. Jameson JL, Longo DL. Precision medicine—personalized, problematic, and promising. Obstet Gynecol Surv 2015;70:612-4.

5. Noori-Daloii MR, ed. Emery's elements of medical genetics. 8th ed. Tehran,Iran: Jame-e-negar and Salemi Publication; 2017.

6. Charpentier E, Richter H, van der Oost J, White MF. Biogenesis pathways of RNA guides in archaeal and bacterial CRISPR-Cas adaptive immunity. FEMS Microbial Rev 2015;39:428-41.

7. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science 2013;339:819-23.

8. Scherz P. The mechanism and applications of CRISPR-Cas9. Natl Cathol Bioeth Q 2017;17:29-36.

9. Robert F, Barbeau M, Éthier S, Dostie J, Pelletier J. Pharmacological inhibition of DNA-PK stimulates Cas9-mediated genome editing. Genome Med 2015;7:93.

10. Trobridge GD, Miller DG, Jacobs MA, Allen JM, Kiem HP, Kaul R, et al. Foamy virus vector integration sites in normal human cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2006;103:1498-503.

11. Nordberg A, Minssen T, Holm SH, Horst M, Mortensen K, Møller BL. Taking the gene-editing revolution to the next level: An interdisciplinary view on challenges, threats and opportunities of CRISPR-Cas9 and related technologies (in preparation).

12. Noori-Daloii MR, Tabarestani S. Molecular genetics, diagnosis and treatment of breast cancer. J Sabzevar Univ Med Sci 2010;17:74-87.

13. Noori-Daloii MR, Abdollahzadeh R, Asadollahi K. Targeted genome editing with engineered nucleases-A new approach in gene therapy. J Sabzevar Univ Med Sci 2014:131-44.

14. Prakash V, Moore M, Yáñez-Muñoz RJ. Current progress in therapeutic gene editing for monogenic diseases. Mol Ther 2016;24:465-74.

15. Paul DS, Soranzo N, Beck S. Functional interpretation of non-coding sequence variation: concepts and challenges. Bioessays 2014;36:191-9.

16. Yin H, Xue W, Chen S, Bogorad RL, Benedetti E, Grompe M, et al. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. Nat Biotechnol 2014;32:551-3.

17. Sachdeva M, Sachdeva N, Pal M, Gupta N, Khan IA, Majumdar M, et al. CRISPR/Cas9: molecular tool for gene therapy to target genome and epigenome in the treatment of lung cancer. Cancer Gene Ther 2015;22:509-17.

18. Peng Y, Clark KJ, Campbell JM, Panetta MR, Guo Y, Ekker SC. Making designer mutants in model organisms. Development 2014;141:4042-54.

19. Ousterout DG, Kabadi AM, Thakore PI, Majoros WH, Reddy TE, Gersbach CA. Multiplex CRISPR/Cas9-based genome editing for correction of dystrophin mutations that cause Duchenne muscular dystrophy. Nat Commun 2015;6:6244.

20. Li HL, Fujimoto N, Sasakawa N, Shirai S, Ohkame T, Sakuma T, et al. Precise correction of the dystrophin gene in duchenne muscular dystrophy patient induced pluripotent stem cells by TALEN and CRISPR-Cas9. Stem Cell Reports 2015;4:143-54.

21. Mizukami H, Mimuro J, Ohmori T, Sakata Y, Ozawa K. AAV vector-mediated liver gene therapy and its implementation for hemophilia. In: Gene therapy and cell therapy through the liver 2016:59-73.

22. Park CY, Kim DH, Son JS, Sung JJ, Lee J, Bae S, et al. Functional correction of large factor VIII gene chromosomal inversions in hemophilia A patient-derived iPSCs using CRISPR-Cas9. Cell Stem Cell 2015;17:213-20.

23. Voit RA, Hendel A, Pruett-Miller SM, Porteus MH. Nuclease-mediated gene editing by homologous recombination of the human globin locus. Nucleic Acids Re 2013;42:1365-78.

24. Ye L, Wang J, Beyer AI, Teque F, Cradick TJ, Qi Z, et al. Seamless modification of wild-type induced pluripotent stem cells to the natural CCR5Δ32 mutation confers resistance to HIV infection. Proc Natl Acad Sci U S A 2014;111:9591-6.

25. Hu Z, Yu L, Zhu D, Ding W, Wang X, Zhang C, et al. Disruption of HPV16-E7 by CRISPR/Cas system induces apoptosis and growth inhibition in HPV16 positive human cervical cancer cells. Biomed Res Int 2014;2014:612823.

26. Ali Z, Abulfaraj A, Idris A, Ali S, Tashkandi M, Mahfouz MM. CRISPR/Cas9-mediated viral interference in plants. Genome Biol 2015;16:238.

27. Soriano V. Hot News: Gene Therapy with CRISPR/Cas9 Coming to Age for HIV Cure. AIDS Rev 2017;19:167-72.

28. Lin SR, Yang HC, Kuo YT, Liu CJ, Yang TY, Sung KC, et al. The CRISPR/Cas9 system facilitates clearance of the intrahepatic HBV templates in vivo. Mol Ther Nucleic Acids 2014;3:e186.

29. Powell SK, Gregory J, Akbarian S, Brennand KJ. Application of CRISPR/Cas9 to the study of brain development and neuropsychiatric disease. Mol Cell Neurosci 2017;82:157-66.

30. Teo AK, Gupta MK, Doria A, Kulkarni RN. Dissecting diabetes/metabolic disease mechanisms using pluripotent stem cells and genome editing tools. Mol Metab 2015;4:593-604.

31. Noori-Daloii MR, Ebadi N. Pharmacogenomics and cancer stem cells. Med Sci J Islamic Azad Univ Tehran Med Branch 2015;25:1-15.

32. Guo D, Liu H, Ruzi A, Gao G, Nasir A, Liu Y, et al. Modeling Congenital Hyperinsulinism with ABCC8-Deficient Human Embryonic Stem Cells Generated by CRISPR/Cas9. Sci Rep 2017;7:3156.

33. Wang G, Yang L, Grishin D, Rios X, Lillian YY, Hu Y, et al. Efficient, footprint-free human iPSC genome editing by consolidation of Cas9/CRISPR and piggyBac technologies. Nat Protoc 2017;12:88-103.

34. Ou Z, Niu X, He W, Chen Y, Song B, Xian Y, et al. The Combination of CRISPR/Cas9 and iPSC Technologies in the Gene Therapy of Human β-thalassemia in Mice. Sci Rep 2016;6:32463.

35. Diecke S, Jung SM, Lee J, Ju JH. Recent technological updates and clinical applications of induced pluripotent stem cells. Korean J Intern Med 2014;29:547-57.

36. Noori-Daloii MR, Kavoosi S, Rahimi Rad N. CRISPR/Cas9: high throughput genome editing molecular tool. Med Sci J Islamic Azad Univ Tehran Med Branch 2017;27:223-36.

37. Rothkamm K, Krüger I, Thompson LH, Löbrich M. Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. Mol Cell Biol 2003;23:5706-15.

38. Kim ST, Park J, Kim D, Kim K, Bae S, Schlesner M, et al. Questioning unexpected CRISPR off-target mutations in vivo. bioRxiv 2017:157925.

39. Davis KM, Pattanayak V, Thompson DB, Zuris JA, Liu DR. Small molecule–triggered Cas9 protein with improved genome-editing specificity. Nat Chem Biol 2015;11:316-8.

40. Eid A, Mahfouz MM. Genome editing: the road of CRISPR/Cas9 from bench to clinic. Exp Mol Med 2016;48:e265.

41. Reyes AP, Lanner F. Towards a CRISPR view of early human development: applications, limitations and ethical concerns of genome editing in human embryos. Development 2017;144:3-7.