

## مروری بر ابزار کریسپر برای ویرایش ژنگان

زهرا ایران دوست<sup>۱</sup>، زهرا مرحمتی<sup>۱</sup> و سیدمحسن دهنوی<sup>۲\*</sup>

۱- تهران، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، گروه زیست‌شناسی گیاهی

۲- تهران، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، گروه زیست‌شناسی سلولی-مولکولی

### چکیده

کریسپر چندین دهه پیش از آنکه به عنوان سیستم ایمنی باکتریایی و پس از آن به عنوان ابزاری قدرتمند با قابلیت برنامه‌ریزی مجدد برای هدف‌گیری ژن معرفی شود، به سادگی به عنوان یک واحد تکراری در DNA پروکاریوتی شناخته شده بود. فناوری ویرایش ژن کریسپر دارای پروتئین‌های همراه Cas است که فعالیت اندونوکلازای دارند و می‌توانند DNA مورد نظر را طبق دستوری که gRNA به آن‌ها می‌دهد برش بزنند. در ویرایش ژن از روش‌های HDR و NHEJ و ویرایش باز نیز استفاده می‌شود که در بین آن‌ها، ویرایشگرهای باز امروزه مورد توجه بیشتری قرار گرفته‌اند؛ زیرا می‌توانند وراثت‌نگان (epigenome) را بدون شکستن DNA ویرایش کنند. کریسپر را به طور کلی به کلاس‌های I و II تقسیم می‌کنند. لازم به ذکر است که کریسپر هنوز چالش‌های فنی زیادی دارد و ممکن است مدت زمان زیادی طول بکشد تا یک ابزار کریسپر بی‌نقص تولید شود. در این مقاله به توضیح محدودیت‌های ادغام ژن، عملکرد کلی سیستم کریسپر و همچنین موارد استفاده از آن پرداخته شده است.

کلیدواژگان: کریسپر، Cas9، CISPR، RNA، ویرایش ژنگان (genome)، ژن، DNA

\* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: [mo\\_dehnavi@sbu.ac.ir](mailto:mo_dehnavi@sbu.ac.ir)

### مقدمه

ژن‌های نمونه فراهم می‌کرد (۳). با این حال، این روش محدودیت‌های زیادی داشت؛ از جمله آنکه میزان ادغام خودبه‌خودی کمی آگروژن DNA بسیار کم بوده و میزان این ادغام وابسته به نوع و سطح سلولی بود. نهایتاً این رویکرد می‌توانست باعث یکپارچه‌سازی تصادفی از کمی آگروژن در محل ژنگانی شود (۴). پس از آن محققان به دنبال روش‌های دیگری برای غلبه بر محدودیت‌های ادغام ژن بودند که در ادامه به آن‌ها اشاره خواهد شد. در این مقاله، با بهره‌گیری از مطالعات اخیر، نگاه علمی مختصری به کارآمدترین روش ویرایش ژنگان شده است و ارتقای این روش و موارد استفاده از آن بحث و معرفی شده است.

### توسعه ابزارهای ویرایش ژنگان و محدودیت‌های آن

یکی از پیشرفت‌های اولیه در زمینه ویرایش ژنگان از این واقعیت حاصل شد که معرفی یک برش‌دهنده‌ی دو رشته‌ی DNA (DSB) در یک مکان هدف منجر به افزایش دفعات ادغام ژن هدف می‌شود (۵، ۶). بدین منظور محققان از آنزیم‌های اندونوکلاز برش‌دهنده مثل کاتر I-18 bp cutter Scel برای توضیح ویژگی‌های خاص DSB‌ها در ژنگان موش استفاده کردند (۶). با وجود اینکه مگانوکلازها

ژنگان‌های ارگانسیم‌های یوکاریوتی مرکب از بیلیون‌ها پایگاه DNA هستند. کشف آنزیم‌های گزین‌بر (restriction enzymes) در سال ۱۹۷۰ که معمولاً محافظت‌کننده باکتری‌ها در برابر فاژها است، نقطه عطفی بود که در نهایت باعث چندین تحول کلیدی از اواسط تا اواخر دهه ۱۹۸۰ شد. نخستین بار دانشمندان موفق به دستکاری DNA با انجام آزمایش در لوله‌های آزمایشگاهی شدند. هر چند این تلاش‌ها منجر به بسیاری از اکتشافات زیست‌مولکولی و ژنتیکی شد، توانایی برای ایجاد تغییرات دقیق در DNA سلول‌های زنده یوکاریوتی چندین دهه بعد به دست آمد (۱). مطالعات اولیه اختلال در ژن هدف در سلول‌های مخمر یوکاریوتی (۲) توسط کچی<sup>۱</sup> و اسمیتیس<sup>۲</sup> در سلول‌های پستانداران انجام شد (۱) و نشان دادند که سلول‌های پستانداران می‌توانند یک کمی آگروژن از DNA را به درون ژن خودی از طریق فرایندی به نام «نو ترکیب ژنی» ادغام کنند (۱). اینگونه ادغام ژن در ژنگان هدف قدرت بی‌سابقه‌ای برای توصیف نقش‌های عملکردی

<sup>1</sup> Capecchi  
<sup>2</sup> Smithies

زینک‌فینگر نشان دادند که نوترکیبی‌های هدف نه تنها در ارگانسیم‌های نمونه بلکه در سلول‌های انسانی به‌طور قابل توجهی افزایش یافته است (۱۰، ۱۱). افزایش راندمان در طراحی زینک‌فینگرها، قابلیت ویرایش ژنگان در بخش‌های ویژه‌ی هدف‌گیری شده در سلول‌های زنده را به شدت افزایش می‌دهد و درها را به روی کاربردهای درمانی ابزار ویرایش ژنگان می‌گشاید. درحالی‌که ZFNها به عنوان یک ابزار مهندسی ژنگان هیجان قابل توجهی ایجاد کردند، این کشف که پروتئین‌های فعال‌کننده‌ی رونویسی (TALEN) از باکتری‌های زانتوموناس<sup>۳</sup> می‌توانند به‌طور خاص یک واحد باز را به جای سه واحد باز شناسایی کنند (۱۲، ۱۳)، الهام‌بخش هیجان بیشتر در مورد این پروتئین‌ها بود. همانند زینک‌فینگرها، ترکیب کیمبریک<sup>۴</sup> *Fok I* DNA و TALE ماژول در محل شکستگی به عنوان یک نوکلئاز مؤثر قابل برنامه‌ریزی به نام TALEN عمل می‌کنند (۱). هرچند TALENها برای انتخاب هدف در مقایسه با ZFNها انعطاف‌پذیری و کارآمدی خارج از هدف پایین‌تری دارند، اما ساخت ماژول‌های TALE و دامنه اندونوکلئاز وقت گیر است (۱۴).

#### معرفی کریسپر

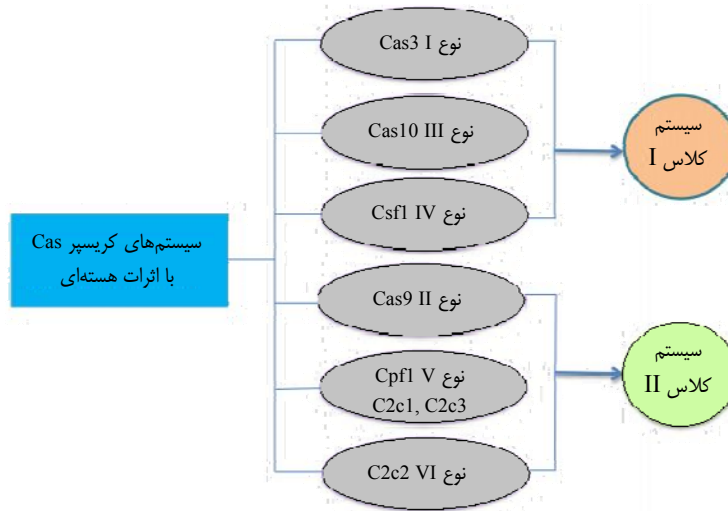
دشواری در همانندسازی و مهندسی پروتئین‌های ZFN و TALEN تا حدودی مانع از پذیرش این ابزار توسط جامعه‌ی علمی شده و منجر به تحول کریسپر<sup>۵</sup> در این زمینه‌ها شده است. فناوری ویرایش ژن کریسپر از پروتئین اندونوکلئاز تشکیل شده است که می‌تواند DNA مورد نظر را طبق برنامه‌ای که RNA راهنما (gRNA) به آن می‌دهد برش بزند. لازم به ذکر است که کریسپر چندین دهه پیش از آنکه به عنوان سیستم ایمنی باکتریایی و پس از آن به عنوان ابزاری قدرتمند با قابلیت برنامه‌ریزی مجدد برای هدف‌گیری ژن معرفی شود، به سادگی به عنوان یک واحد تکراری عجیب و غریب در DNA پروکاریوتی شناخته شده بود.

کریسپر به‌طور منظم و در فواصل کوتاه مساوی‌الطرفین بین توالی‌های تکراری DNA قرار دارد.

(اندونوکلئازی که امتداد طولانی‌تری -از ۱۴ تا ۴۰ جفت باز DNA- را تشخیص می‌دهد) کارایی ویرایش ژن را افزایش می‌دهند، این روش به دو شکل عمده محدود می‌شود. اولاً هریک از مگانوکلئازهایی که در طبیعت یافت می‌شوند توالی شناخت منحصربه‌فردی دارند؛ بنابراین احتمال پیدا کردن مگانوکلئازهای موردنظر کم است. دوماً اکثر DSBها با مکانیسم ترمیم NHEJ<sup>۱</sup> ترمیم می‌شوند. بدین ترتیب، نه تنها ممکن است الگوی DNA آگزوزن تعریف شده در DSBها موجود نباشد، بلکه ممکن است مکانیسم تعمیر NHEJ نیز به‌طور تصادفی قطعات DNA را در مکان‌های شکسته شده وارد یا حذف کند (۷). محققان برای غلبه بر چنین چالش‌هایی مهندسی مجدد مگانوکلئازهای طبیعی موجود را مجدداً تغییر داده و مشخصات آن را برای هدف قرار دادن اختصاصی DNA تغییر دادند (۱). بدین منظور، کشف و استفاده از پروتئین زینک‌فینگر<sup>۲</sup> یوکاریوتی عصر جدیدی را در هدف‌گیری و ویرایش ژنگان آغاز کرد. زینک‌فینگرها پروتئین‌های کوچک تنظیم‌شده توسط یون روی هستند که با روش مشخصی به توالی DNA متصل می‌شوند. هر مدل روی، یک دنباله با ۳ جفت باز DNA را تشخیص می‌دهد (۸). بنابراین، بر خلاف مگانوکلئازها می‌توان چندین زینک‌فینگر را در یک کمپلکس بزرگ‌تر ادغام کرد تا به پیوند اختصاصی DNA برسند. پس از نشان‌دادن ساختار زینک‌فینگر، محققان شروع به ساخت پروتئین هسته‌ای قابل برنامه‌ریزی با تلفیق پروتئین‌های زینک‌فینگر با دامنه شکاف DNA از اندونوکلئاز *Fok I* کردند (۹). این آنزیم محدودکننده برخلاف بسیاری از آنزیم‌های محدودکننده‌ی دیگر *Fok I* قادر به تشخیص DNA و ایجاد شکاف در آن بود. با دانستن این موضوع محققان دامنه تشخیص توالی *Fok I* DNA را حذف کرده و تنها دامنه شکاف DNA را با مدل‌های پروتئین زینک‌فینگر ادغام کردند. نکته مهم دیگر آن است که *Fok I* برای شکافتن DNA نیاز به همگن‌سازی محل هدف دارد. بنابراین طراحی دو مدل زینک‌فینگر جداگانه که دو مکان مجاور در کنار یکدیگر را هدف قرار می‌دهند، به *Fok I* اجازه همگن‌سازی داده و منجر به شکستن رشته DNA در محل‌های هدف می‌شود. هسته‌های

<sup>3</sup> xanthomonas  
<sup>4</sup> chimeric fusion  
<sup>5</sup> CRISPER

<sup>1</sup> non-homologous end joining :NHEJ  
<sup>2</sup> zinc finger (ZFN)



شکل ۱- انواع سیستم‌های کریسپر (۲۵)

ژنگان خود ادغام می‌کنند (۲۰). به علاوه، توالی حذف‌فصل کریسپر ویژگی هدف‌گیری آنزیم‌های Cas را که در برابر فاژ دفاع می‌کنند مشخص می‌کند. یک سال بعد از این کشف مهم، محققان نشان دادند که فعالیت آنزیم Cas توسط کریسپر RNA (crRNA) های کوچک رونویسی شده از روی توالی‌های حذف‌فصل مشخص می‌شود (۲۱) و می‌تواند انتقال افقی DNA را از پلاسمیدهای باکتریایی مسدود کند (۲۲).

### انواع سیستم‌های کریسپر

سیر تکاملی بین پروکاریوت‌ها و عناصر ژنتیکی متحرک محیطی مثل فاژها چندین سال جریان داشته است. در این مبارزه، انواع پاسخ‌های دفاعی از نوع کریسپر به عنوان مکانیسم دفاعی باکتری‌ها جهت بقا حاصل شده است. این سیستم‌های کریسپر بر اساس ساختار ژن‌های مرتبط با کریسپر طبقه‌بندی می‌شوند (۱۸، ۲۳، ۲۴) که به‌طور معمول در مجاورت توالی‌های کریسپر قرار دارند.

با توجه به شکل بالا، به‌طور کلی کریسپر را به دو کلاس طبقه‌بندی می‌کنند که هر کدام حاوی چندین نوع کریسپر است. کلاس I حاوی کریسپرهای نوع یک و سه است که در آرکی‌ها وجود دارد و کلاس II حاوی کریسپرهای نوع دو، چهار، پنج و شش است. کریسپرهای نوع دو و پنج می‌توانند برای ویرایش DNA استفاده شوند؛ در حالی که کریسپر نوع چهار برای ویرایش RNA استفاده می‌شود (۲۶).

اگرچه نام کریسپر دیرتر ابداع شد (۱۵)، اما این توالی‌های تکراری در ابتدا در *اشریشیا کلی*<sup>۱</sup> توسط ناکاتا<sup>۲</sup> و همکاران معرفی شده بود (۱۶). جالب آنکه برخلاف تکرارهای پشت سرهم معمول در ژنگان، گروه‌های تکراری کریسپر توسط توالی‌های غیر تکراری DNA که حذف‌فصل<sup>۳</sup> نامیده می‌شوند از هم جدا شده بودند. توالی‌یابی ژنگانی فاژها و تجزیه و تحلیل‌های کامپیوتری از توالی‌های ژنگانی، محققان را متوجه ویژگی‌های کلیدی توالی‌های تکراری کریسپر و عناصر حذف‌فصل کرد. توالی کریسپر در بیش از ۴۰٪ باکتری‌های توالی‌یابی شده و ۹۰٪ آرکی‌ها وجود دارد (۱۷) و عناصر کریسپر در مجاورت چندین ژن به خوبی محافظت شده به نام ژن‌های همراه کریسپر قرار دارند (۱۵، ۱۸). شواهد کلیدی آزمایشگاهی در مورد عملکرد بالقوه‌ی سیستم‌های کریسپر حاصل کار هوروات<sup>۴</sup> و همکارانش است. آن‌ها نشان دادند که باکتری‌های *استرپتوکوکوس ترموفیلوس*<sup>۵</sup> بعد از حمله‌ی ویروسی، حذف‌فصل‌های جدید ناشی از توالی ژنگان فاژ را در ژنگان خود ادغام می‌کنند (۱۹). حدود نیمی از باکتری‌ها ژن‌های لازم برای ایمنی CRISPR-Cas را در خود دارند که با رمزگذاری توالی‌های کوتاه، DNA را به صورت CRISPR (تکرارهای خوشه‌ای که به‌طور منظم و کوتاه تکرار می‌شوند) در

<sup>1</sup> *Escherichia coli*

<sup>2</sup> Dr. Nakata's group

<sup>3</sup> spacer sequences

<sup>4</sup> Horvat

<sup>5</sup> *Streptococcus thermo-philus*

## تحول کریسپر به عنوان ابزاری در زمینه ویرایش ژنگان

حضور چندین دستاورد مهم راه را برای تبدیل سیستم‌های کریسپر به فناوری ویرایش ژنگان باز می‌کند. یکی از این دستاوردها آن است که توالی‌های اکتسابی حد فاصل در مناطقی به نام PAMs<sup>۱</sup> بسیار شبیه به یکدیگر بوده و این توالی برای عملکرد سیستم کریسپر بسیار حیاتی است (۲۷). در میان پروتئین‌های Cas کشف شده، Cas9 و Cas12a (که به عنوان Cpf1 نیز شناخته می‌شوند) در ویرایش ژن و تنظیم رونویسی مورد استفاده می‌گیرند. برنامه Cas9 و Cas12a بسیار ساده است و می‌تواند از طریق جفت شدن باز واتسون-کریک بین ژن هدف و gRNA به DNA مورد هدف هدایت شوند (۲۸).

Cas9 تنها پروتئینی است که در *اس ترموفیلوس*<sup>۲</sup> فعالیت DNA کاتالیزوری دارد (۲۹). چارپنتیر<sup>۳</sup> و همکاران مکانیسم پیدایش حیات دو RNA کوتاه مورد نیاز برای فعالیت Cas9 را مشخص کردند (۳۰). سیکسنیس<sup>۴</sup> و همکارانش نشان دادند که کریسپر/اس ترموفیلوس قادر به بازگرداندن تداخل در *E coli* است (۳۱). کریسپر به عنوان یک ابزار زیست‌فناوری می‌تواند آنزیم Cas9 را یا به منظور هدف قراردادن توالی DNA در باکتری‌ها به طور همزمان بازسازی کند و یا چندین gRNA را به یک مکان ژنتیکی منفرد هدایت کند تا اثربخشی ویرایش یا تنظیم رونویسی را تقویت کند (۳۲، ۳۳).

سیستم کریسپر اندوژن دو RNA کوتاه را تعمیر می‌کند: crRNA بالغ و crRNA تعامل. crRNA مرکب از قسمتی‌هایی است که یکی از آن‌ها به عنوان رهبر و دیگری به عنوان جفت پایه همراه با tracrRNA عمل می‌کند. هر دوی crRNA و tracrRNAs نیازمند به کمپلکس پروتئین RNA-Cas9 هستند که می‌تواند از طریق مهندسی ژنتیک تشکیل یک sgRNA (تک gRNA) دهند؛ در حالی که مواردی که برای Cas12a است، صرفاً از یک crRNA تشکیل شده است. پس از تشکیل یک مجموعه ریونوکلوپروتئین با یک Cas9، gRNA، یک شکست دو جداره را در مجاورت PAM انجام می‌دهد. توالی‌ای از DNA که برای شناسایی مورد هدف است، بین

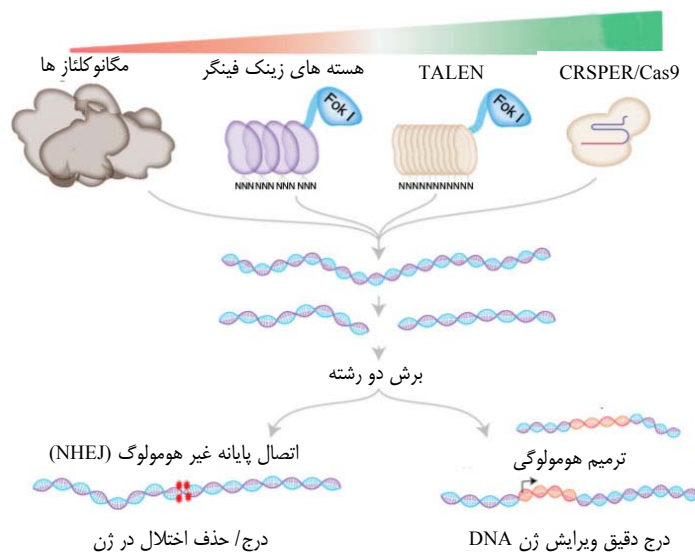
اندونوکلازهای متفاوت قرار می‌گیرد و ایجاد شکستگی بین دو رشته برنامه‌های ویرایش ژنگان را امکان پذیر می‌کند (۲۸، ۳۲).

## فرآیندهای تعمیر درون سلولی

مگانوکلازها آنزیم‌های محدودکننده مهندسی شده‌ای هستند که بخش‌های طویل توالی‌های DNA را تشخیص می‌دهند. برخلاف تشخیص پروتئین - DNA در ZFNها و TALENها، جفت شدن ساده‌ی بازهای DNA-RNA و توالی‌های PAM کریسپر معین را هدف قرار می‌دهد. تمام این ابزارها باعث ایجاد شکستگی محل اتصال DNA دو رشته‌ای می‌شوند که توسط مکانیسم‌های درون‌سلولی تعمیر می‌شود.

همان‌طور که در شکل ۲ مشخص است، NHE نوعی فرآیند تعمیر است که بدون DNA الگو هدایت می‌شود و در نتیجه اغلب باعث جهش ایندل می‌شود. این فرایند برای فرسایش ژن‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. در مقابل، HDR با طول مشخصی از بازوهای هومولوگ DNAهای اهداکننده برای تصحیح توالی هدف مورد نظر استفاده می‌شود (۳۴). HDR باعث جایگزینی توالی یا درج نوکلئوتید طراحی شده در سایت هدف می‌شود (۳۵). هر مرحله از چرخه سلولی فرآیند ترمیم متفاوتی دارد. HDR محدود به چرخه‌های سلولی S و G2 است (۳۶)؛ در حالی که NHEJ در کل دوره چرخه سلولی کاربرد دارد. اصلاح ژن با استفاده از HDR به علت بازدهی کم آن رضایت‌بخش نیست و اصلاح ژن با استفاده از NHEJ نیز به علت عملکرد تصادفی آن بسیار سخت است. (۳۷). ابزار دیگری با عنوان دامیناز قابل برنامه‌ریزی یا ویرایشگر باز جایگزین مناسبی برای رفع محدودیت‌های ابزارهای پیشین است. ویرایشگر باز با استفاده از Cas9 کاتالستی غیرفعال (dCas9 with D10A and H840A mutation) یا نیکاز Cas9 (nCas9 with D10A mutation) با دامیناز ترکیب شده و گروه‌های آمین C (۳۸) و A (۳۹) را هیدرولیز می‌کند. ویرایشگرهای باز سبتیدین (CBEs) و ویرایشگرهای باز آدنین (ABEs) توسط دو گروه توسعه داده شده‌اند تا بدون شکستن DNA دو رشته‌ای، C را به T و A را به G تغییر دهند. اگرچه ویرایشگر باز راندمان تبدیل نسبتاً بالایی را نشان می‌دهد، در حال حاضر تبدیل C به T و A به G تنها توسط CBE و ABE امکان‌پذیر است.

<sup>1</sup> protospacer-adjacent motifs  
<sup>2</sup> *S. thermophilus*  
<sup>3</sup> charpentier  
<sup>4</sup> sikshys



شکل ۲- اساس و قاعده‌ی کلی فناوری‌های ویرایش ژنگان. آنزیم‌های مگانوکلازها (Meganucleas)، زینک فینگرها، TALEN‌ها و غیره باعث ایجاد شکستگی در محل اتصال DNA دو رشته‌ای می‌شوند که با روش‌های HDR یا NHEJ (HDR: homology-directed repair) تعمیر می‌شود (۱).

توسعه‌ی ابزارهای جایگزین برای تبدیل C به A یا T به A شانس بیشتری را برای اصلاح DNA در مقیاس یک نوکلئوتیدی فراهم می‌کند. طی گزارشات اخیر مشخص شده است که CBE دارای اثرات خارج از هدف غیرقابل پیش‌بینی در روش مستقل از gRNA می‌باشد و همچنین در اصلاح RNA سلولی نیز دخیل است. ویرایش غیر اختصاصی باز توسط CBE و ABE از نظر فعالیت‌های خارج از هدف و مورد هدف، با جایگزین کردن آنزیم دامیناز با APOBEC3A انسانی یا جهش‌های انتخابی در پروتئین‌های APOBEC و tadA-tadA بهبود یافته است.

آنزیم‌های اصلی CRISPR-Cas و مهندسی مجدد آن‌ها در طی سال‌های گذشته، بیش از ۱۰ پروتئین CRISPR/Cas به منظور ویرایش ژن مورد استفاده مجدد قرار گرفته‌اند (جدول ۱) که در بین آن‌ها، پروتئین‌های تازه کشف‌شده‌ای مانند Cpf1 از *AsCpf1*<sup>۱</sup> و *LbCpf1*<sup>۲</sup> بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. برخلاف Cas9 بومی که نیاز به دو RNA کوتاه جداگانه دارد، Cpf1 به‌طور طبیعی به یک

sgRNA نیاز دارد. به‌علاوه، DNA را در محل‌های هدف 3' سطح پایین از توالی PAM به‌صورت متناوب برش می‌دهد و به جای تولید انتهای صاف مانند انتهای Cas9، یک برآمدگی 5' درج می‌کند (به جدول ۱ توجه شود). Cas9‌هایی که به‌طور طبیعی یافت می‌شوند پروتئین‌های بزرگی هستند که محدودیت‌های خاصی را در زمان بسته‌بندی آن‌ها و رسیدن به انواع سلول‌های متفاوت از Lenti یا AAV<sup>۳</sup> ایجاد می‌کند. انواع کوچک Cas9 پتانسیل‌های درمانی خوبی دارند؛ چرا که بر محدودیت‌های بسته‌بندی AAV غلبه کرده‌اند. به این منظور، کشف ۱۰۸۲ آمینو اسید Cas9 از *NmCas9*<sup>۴</sup> (۴۰) و ۱۰۵۳ آمینو اسید Cas9 از *SaCas9*<sup>۵</sup> (۴۱، ۴۲) و ۹۸۴ آمینو اسید از *CjCas9*<sup>۶</sup> (۴۳) قدم‌های روبه‌جلوی نسبت به این هدف است. لازم به ذکر است که برای مبادله پروتئین‌های کوچک Cas9 به توالی PAM پیچیده‌تری نیاز است.

### آنزیم‌های اصلی CRISPR-Cas و مهندسی مجدد آن‌ها

در طی سال‌های گذشته، بیش از ۱۰ پروتئین CRISPR/Cas به منظور ویرایش ژن مورد استفاده مجدد قرار گرفته‌اند (جدول ۱) که در بین آن‌ها، پروتئین‌های تازه کشف‌شده‌ای مانند Cpf1 از *AsCpf1*<sup>۱</sup> و *LbCpf1*<sup>۲</sup> بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. برخلاف Cas9 بومی که نیاز به دو RNA کوتاه جداگانه دارد، Cpf1 به‌طور طبیعی به یک

<sup>۳</sup> AAV: Adeno Associated virus

<sup>۴</sup> Neisseria meningitidis

<sup>۵</sup> Staphylococcus aureus

<sup>۶</sup> Campylobacter jejuni

<sup>۱</sup> Acidaminococcus

<sup>۲</sup> Lachnospiraceae bacterium

جدول ۱- آنزیم‌های اصلی CRISPR-Cas که به طور طبیعی شکل گرفته‌اند (۱).

منابع	محل برش	اندازه‌ی توالی راهنمای sgRNA	توالی PAM	اندازه
(۳۳, ۳۲)	~ 3bp 5' of PAM	20bp	NGG	spCas9 1368
(۴۴)	~ 3pb 5' of PAM	20bp	NGG	FnCas9 1629
(۴۵)	~ 3pb 5' of PAM	21bp	NNGR RT	SaCas9 1053
(۴۰)	~ 3bp 5' of PAM	24bp	NNNNG ATT	NmCas9 1082
(۴۱, ۳۳)	~ 3bp 5' of PAM	20bp	NNAGA AW	St1Cas9 1121
(۴۱, ۳۳)	~ 3bp 5' of PAM	20bp	NGGNG	St3Cas9 1409
(۳۸)	~ 3bp 5' of PAM	22bp	NNNNACAC	CjCas9 984
(۴۶, ۳۸]	19/24bp 3' of PAM	24bp	TTTV	AsCPfl 1307
(۴۶, ۳۸]	19/24bp 3' of PAM	24bp	TTTV	LbCpfl 1228
(۲۶]		28bp	RNA هدف‌گذاری شده	Cas13 ارتولوگ چندجانبه

قطعیت‌هایی را نشان می‌دهد (۱). با این حال، تنها تعداد محدودی از بخش‌های اتصال خارج از هدف که در داخل بدن شکافته شده‌اند نشانگر الزاماتی با دقت کمتر برای اتصال Cas9-DNA در مقابل شکستن DNA است. از آنجاکه اتصال Cas9 مستلزم شکستن DNA نیست، روش‌های جایگزین برای مطالعه شکستن DNA در مقیاس ژنگان با استفاده از انواع Cas9 بکار گرفته شده‌است. اگرچه مقایسه‌ی دقیق روش‌های نقشه‌برداری مختلف فراتر از محدوده‌ی ذکر شده است، توجه به این نکته الزامی است که هر یک از این روش‌ها دارای مزایا و محدودیت‌های منحصر به فرد هستند. بنابراین تعیین یک فرایند بازرسی صحیح که نقشه‌برداری از کلیه‌ی بخش‌های قطع و اتصال DNA را با واسطه‌ی CRISPR-Cas9 انجام دهد، هنوز به صورت یک چالش باقی‌مانده است و به پارامترهای مختلفی مانند توالی‌های رهبر، نوع sgRNA سلول و روش‌های ارسال sgRNA/Cas9 وابسته است. به موازات این رویکردها برای ارزیابی اثرات غیرهدف این سیستم، تلاش‌های زیادی جهت افزایش ویژگی‌های هدف سیستم‌های CRISPR-Cas9 به‌واسطه‌ی مهندسی مجدد انواع spCas9 موجود انجام شده‌است. منظور از اثرات غیرهدف، تغییر بخشی از DNA است که مدنظر نبوده است (۴۷, ۴۸). تلاش‌های مرتبط با کاهش اثرات خارج از هدف به طور کلی در دو مسیر (۱) ایجاد روشی برای تشخیص

به عنوان مثال، SaCas9 به یک توالی ۵'-PAM-3' NNGRRT-5- احتیاج دارد؛ درحالی‌که CjCas9 به یک توالی 5'-PAM-3' NNNNACAC نیاز دارد. از این‌رو، پروتئین‌های کوچک Cas9 در مقایسه با پروتئین‌های SpCas9 از محدوده‌ی هدف‌گذاری و انعطاف‌پذیری نسبتاً محدودتری در تعیین ژنگان برخوردارند.

کاوش در سیستم‌های مختلف کریسپر نیاز به فهم و توصیف گسترده پروتئین‌های Cas جدید دارد. تلاش‌های زیادی برای مهندسی مجدد پروتئین‌های Cas9 انجام شده است که عمدتاً دارای سه هدف اصلی هستند: ۱- کاهش اندازه‌ی نوکنازهای Cas9 ۲- افزایش صحت و درستی و ۳- گسترش دامنه هدف‌گذاری انواع Cas9. با توجه به اینکه سیستم‌های کریسپر به عنوان یک سیستم دفاعی در برابر ویروس‌های غالباً جهش یافته هستند، برای باکتری‌ها یک سیستم کریسپر با دقت کمتر می‌تواند مفیدتر باشد. محققان در مطالعات اولیه از ابزارهای جایگزین مرتبط با تنوع ژنگان برای درک هدف‌گیری اختصاصی CRISPR-Cas9 استفاده کردند. بدین منظور، از سرکوب سیستم ایمنی کروماتین و تعیین توالی با بازدهی بالا (ChIPSeq) برای ترسیم نقشه بخش‌های اتصال DNA از SpCas9 کاتالیتیکی غیرفعال در موجود زنده استفاده نمودند. لازم به ذکر است که تجزیه و تحلیل دقیق اتصال‌های غیر هدف نشان می‌داد که این سیستم در بخش‌های انتهایی PAM عدم

استفاده از مولکول‌های کوچک شیمیایی، نوری، تنظیم آلوستریک<sup>۱</sup> وابسته به لیگاند برای کنترل فعالیت‌های زمانی و فضایی کمپلکس Cas9/sgRNA باعث افزایش دقت هدف‌گیری می‌شود. (۵۰ و ۵۱).

#### کاربردهای مختلف کریسپر cas9

به علت ویژگی‌هایی همچون انعطاف‌پذیری و غیرشکننده بودن این سیستم، کریسپر به یک ابزار همه‌کاره تبدیل شده است که نه تنها در مطالعات تغییر و ویرایش ژنگان، بلکه در بسیاری از فعالیت‌های مربوط به دستکاری ژنگان و کروماتین نیز قابل استفاده است. حوزه کاربردهای دیگر ممکن است بسیار گسترده باشد، زیرا با وجود آن که deadCas9 نمی‌تواند DNA را برش دهد، می‌تواند به توالی مورد نظر هدایت شود.

همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است، درحالی‌که WT Cas9 ویرایش ژنگان را از طریق فعالیت DNA برش-خورده‌ی قابل هدایت امکان‌پذیر می‌کند، آنزیم‌های Cas9 دارای اختلال کاتالیستی برای دستیابی به تنظیم ژن هدف، ویرایش وراثت‌نگان، تصویربرداری از کروماتین و دستکاری توپولوژی<sup>۲</sup> کروماتین، مجدداً تنظیم شده‌اند. به‌علاوه، از آنزیم نیکاز Cas9 با اختلال کاتالیستی به عنوان بستری برای ویرایش باز و بدون شکستن دو رشته DNA استفاده شده است. علاوه بر هدف قرار دادن DNA توسط پروتئین‌های Cas، سیستم جدید کریسپر Cas که RNA را هدف قرار می‌دهد نیز توصیف شده است.

CRISPR-Cas9 دارای دو حوزه کاتالیستی HNH و RuvC می‌باشد که با هم نقش واسطه DNA DSBs را بازی می‌کنند (۵۲). هرکدام از این حوزه‌های کاتالیستی یک رشته DNA را برش می‌دهند. در نتیجه DSBها به توالی PAM در مکان‌های هدف‌گذاری شده نزدیک می‌شوند. به ویژه، جهش نقطه‌ای در هر کدام از این حوزه‌ها در آنزیم نیکاز اعمال می‌شود، درحالی‌که جهش در هر دو حوزه D10A و H840A for SpCas9 سبب از بین بردن کامل فعالیت برش DNA می‌شود (۳۲).

اثرات خارج از هدف و (۲) مهندسی سیستم CRISPR به منظور افزایش دقت آن صورت می‌گیرد.

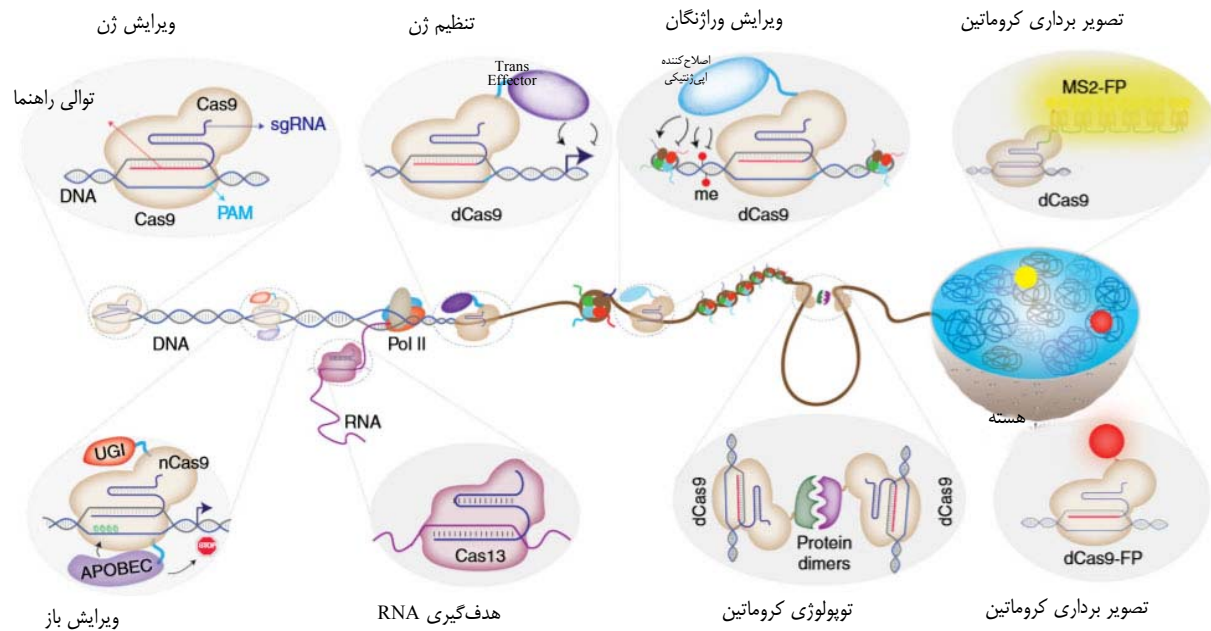
در یک مطالعه، محققان جهش نقطه‌ای خاصی را شناسایی کردند که به‌طور قابل‌توجهی ویژگی SpCas9 را افزایش می‌داد. به همین ترتیب، ساختارهای منطقی منجر به ایجاد انواع Cas9 با ویژگی منحصر به فرد می‌شد. یکی از ساده‌ترین راه‌ها برای افزایش ویژگی هدف‌گذاری تغییر روش تحویل کمپلکس Cas9-sgRNA است. در مقابل ارسال بر پایه‌ی پلاسمید، ارسال مستقیم از Cas9-sgRNA به عنوان یک کمپلکس ریونوکلئوپروتئین (RNP) که منجر به فعالیت زودگذرتر Cas9 می‌گردد، باعث کاهش اثرات غیر هدف می‌شود (۱). به‌علاوه، مورد هدف قرار دادن پی پی یک جایگاه با دو sgRNA جداگانه، با بکار بردن نیکاز nCas9 یا غیرفعال کردن کاتالیستی Cas9 ادغام شده با DNA، اساساً باعث از هم گسیختگی حوزه FokI و کاهش فعالیت خارج از هدف WT Cas9 می‌شود. کمپلکس‌های gRNA می‌توانند مکان ژنتیکی را با فاصله ۵ نانومتری تشخیص داده و به هم متصل کنند و منجر به اتصال خارج از هدف شوند. مقیاس‌بندی تعداد gRNAهای درون سلول باعث افزایش این اثرات خارج از هدف می‌شود.

#### استراتژی‌های موجود برای کاهش اتصالات خارج از هدف

خوشبختانه، استراتژی‌های متعددی برای کاهش اتصال خارج از هدف وجود دارد؛ از جمله، اصلاح مستقیم gRNA با کم کردن فضا که به وسیله کوتاه‌کردن انتهای یکی از عناصر tracrRNA انجام می‌شود، یا اندونوکلئاز Cas9 جهش‌یافته که به عنوان نیکاز عمل می‌کند. این عملکرد باعث کاهش اثرات خارج از هدف به اندازه ۱۵۰۰ برابر در رده‌های سلولی می‌شود (۴۹). dCas9 همچنین می‌تواند با حوزه‌های هسته FokI FuxI (که به‌طور قابل توجهی ویرایش اختصاصی هدف را در مقایسه با نوع تهاجمی Cas9 بهبود می‌بخشد) ادغام شود. تا زمانی که این روش نیاز به دو RNA رهبر جداگانه دارد که کروماتین در فاصله تقریبی مشخصی از مبدأ قرار بگیرد، احتمال اطلاعات خارج از هدف به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد. به موازات این روش‌ها، روش وادار کردن Cas9 با

<sup>1</sup> ligand-dependent allosteric regulatin  
<sup>2</sup> topology

## تکنولوژی کریسپر: فراتر از ویرایش ژنگان



شکل ۳- کاربرد اصلی فناوری کریسپر Cas در ویرایش ژنگان (۱).

## تکامل نسل دوم ابزار ویرایش ژنگان-کریسپر

برخلاف WTCas9 که با ایجاد DSB و ایندل<sup>۱</sup> تصادفی در مکان‌های هدف نتیجه می‌دهد، ابزارهای نسل دوم ویرایش ژن این توانایی را دارند که بدون ایجاد DSB، DNA یک واحد باز را به دیگری تبدیل کنند. همان‌طور که ذکر شد، ویرایشگرهای باز مستقیماً می‌توانند C را به T و A را به G تبدیل کنند. اخیراً از این ویرایشگرها برای تغییر کد ژنتیکی و معرفی کدون‌های پایان استفاده می‌شود که در آن می‌توان با ویرایش C به T در کدون‌های CGA (Arg)، CAG (Gln) و CAA (Gln)، کدون‌های TGA (opal)، TAG (amber) یا TAA STOP (ochre) را به ترتیب ساخت (۵۳، ۵۴، ۵۵). علاوه بر آنزیم آدنوزین دآمیناز APOBEC، محرک آنزیم آدنوزین دآمیناز AID با آنزیم dCas9 ترکیب شده است. قابل ذکر است در صورت عدم وجود UGI در این کمپلکس،

کمپلکس dCas9-AID به یک عامل قدرتمند موضعی موتاژنیک<sup>۲</sup> تبدیل می‌شود که به عنوان یک ابزار غربالگر کاربردی<sup>۳</sup> عمل می‌کند (۱).

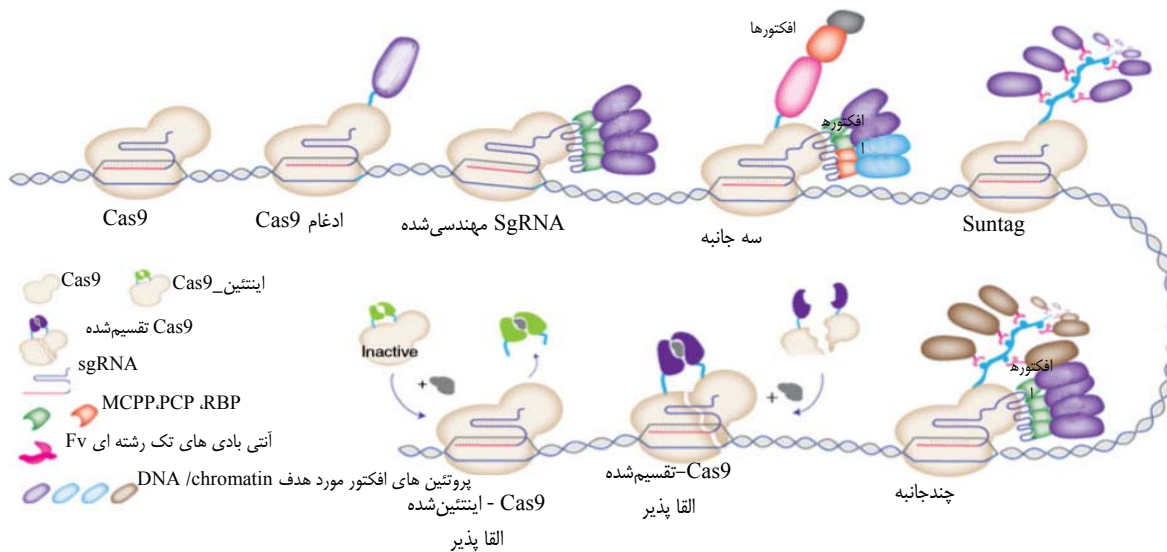
## چگونگی عملکرد کریسپر در بیان ژن

بلافاصله بعد از اثبات اینکه WT Cas9 می‌تواند به عنوان یک اندونوکلاز قابل برنامه‌ریزی برای ویرایش ژن استفاده شود، محققان از dCas9 به‌طور خاص برای تنظیم بیان ژن بهره‌گیری کردند. dCas9 به توالی DNA هدف اتصال محکمی ایجاد می‌کند که با فعالیت سایر پروتئین‌های اتصال DNA مانند فاکتورهای رونویسی درون‌ژنی و RNA پلیمراز II مداخله می‌کند (۵۵).

<sup>2</sup> mutagenic  
<sup>3</sup> gain of function screening tool

<sup>1</sup> Indel





شکل ۴- استراتژی‌های مختلف جذب پروتئین‌های افکتور به بخش مورد نظر با استفاده از ظرفیت اتصال DNA قابل هدایت RNA از کمپلکس Cas9-sgRNA (۱).

فراهم می‌کنند. در تقسیم Cas9، هر نیمی از پروتئین Cas9 می‌تواند القا شده باشد تا یک کمپلکس عملکردی را بسازد. در نظریه اینتین-Cas9، قطعه پروتئین اینتین<sup>۳</sup> می‌تواند به‌طور شیمیایی القا شده باشد تا از Cas9 خارج شده و منجر به فعال شدن آن شود. این تنظیم‌کننده‌های رونویسی، پروتئین‌های سرکوبگر همراه<sup>۴</sup> مثل KAP-1<sup>۵</sup> و پروتئین‌های خواننده اپی‌ژنتیکی مثل HP1<sup>۶</sup> را برای سرکوب ژن جذب می‌کنند (۵۹). سرکوب ژن به‌واسطه KRAB تا حدودی با برنامه‌ریزی مجدد اپی‌ژنتیکی موضعی تغییرات هیستونی و با کاهش در H3 استیلایسون<sup>۷</sup> و افزایش در H3K9me3<sup>۸</sup> سرکوب ژن پیش‌برنده همراه<sup>۹</sup> است (۶۰). در راستای این یافته‌ها، کمپلکس ترکیب dCas9-KRAB منجر به کاهش دسترسی کروماتین و افزایش سطح‌های H3K9me3 در هر دو ژن هدف پیش‌برنده همچون تقویت‌کننده‌های دیستال<sup>۱۰</sup> می‌شود. برخلاف سرکوب ژن واسطه‌ای dCas9-KRAB، استفاده از پلتفرم‌های هدف dCas9 به منظور جذب فعال‌کننده‌های رونویسی قوی منجر به القای بیان ژن می‌شود.

در این رویکرد، فعالیت اتصال‌دهنده‌ی dCas9 می‌تواند رونویسی بیان ژن را از طریق فرایند مسدود کردن سرکوب<sup>۱</sup> می‌کند (۵۵). پروتئین‌های افکتور می‌توانند مستقیماً از طریق یک اتصال‌دهنده‌ی پپتیدی به Cas9 فعال یا Cas9 غیرفعال کاتالیزی متصل شوند. قابل ذکر است، ترکیب شدن یک کمپلکس قوی سرکوبگر مثل KRAB<sup>۲</sup> با dCas9 منجر به تشکیل یک سرکوبگر ژن قوی‌تر و خاص‌تر از dCas9 می‌شود (۵۶). پروتئین‌های زینک فینگر شامل KRAB بزرگ‌ترین خواننده‌ی سرکوبگرهای رونویسی در پستانداران را تشکیل می‌دهند (۵۷). علاوه بر این، داربست sgRNA می‌تواند به گونه‌ای ساخته شود که حاوی چندین آپتامر RNA باشد که به طور خاص به پروتئین‌های متصل‌کننده‌ی RNA (RBP) شناخته شده مانند MCP یا PCP متصل می‌شوند (شکل ۴). پروتئین‌های افکتور می‌توانند از طریق ادغام شدن با RBP به محل مورد هدف هدایت شوند. رویکرد SunTag از یک آرایه پپتیدی تکراری از داربست پروتئینی برای جذب چندین نسخه از یک آنتی‌بادی ادغام شده با پروتئین افکتور استفاده می‌کند (۵۸).

استراتژی‌های شیمیایی القایی امکان کنترل موقت فعالیت Cas9 یا Cas9 ادغام شده با پروتئین‌های افکتور را

<sup>3</sup> intein protein segment

<sup>4</sup> co-repressor

<sup>5</sup> KRAB-box-associated protein-1

<sup>6</sup> Heterochromatin protein1 (HP1)

<sup>7</sup> H3-acetylation

<sup>8</sup> H3 lysin 9 trimethylation (H3K9me3)

<sup>9</sup> gene promoters

<sup>10</sup> distal

<sup>1</sup> KD:knocks down

<sup>2</sup> Kruppel-associated Bo

لقای بیان ژن نسبت به حالت اولیه<sup>۶</sup> در نقطه‌ای خاص از لوکوس دارند. تحریک بیان بخش‌های اندوژنی مزایای بیشتری نسبت به بیان اگزوژنی دارد. کنترل دقیق زمانی و مکانی بر پویایی بیان ژن بخش هدف از پتانسیل درمانی بسیار خوبی برخوردار است. انعطاف‌پذیری رویکرد کریسپر به محققان این امکان را می‌دهد تا روش‌های مختلفی را برای دستیابی به این هدف اتخاذ کنند. هدف‌گذاری القایی کریسپر از طریق اپتوژنتیک<sup>۷</sup> و مولکول‌های کوچک از پیشرفت‌های قابل توجهی در رویکردهای بیان ژن با واسطه‌ی کریسپر برخوردار هستند (۱).

### حوزه‌های عملکردی کریسپر

برخلاف اپی‌ژنتیک که بر مکانیسم دلالت دارد، وراثت‌نگان می‌تواند همه‌ی تغییرات بعد از ترجمه و سایر ویژگی‌های کروماتین را همراه با عناصر نظارتی در ژنگان توضیح دهد. تلاش اخیر در زمینه‌ی وراثت‌نگان در مقیاس بزرگ‌تر مثل دانشنامه عناصر DNA (ENCODE) و کنسرتیوم<sup>۸</sup> نقشه‌برداری نقشه‌برداری از وراثت‌نگان (REMC) باعث شد نقشه‌برداری از تغییرات کروماتین از روی DNA و پروتئین هیستون موجود در میان ژنگان در انواع خطوط مختلف سلولی مثل انواع ابتدایی سلول و بافت ترسیم شود (۷۰، ۷۱). متیلاسیون DNA یکی از مکانیسم‌های اپی‌ژنتیکی است که به‌طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته‌است. قابل توجه است که در گیاهان و ارگانیزم‌های دیگر، متیلاسیون DNA در سه زمینه مختلف (CHG, CG (or CPG, CHH (H is A, T, or C) وجود دارد؛ درحالی‌که در سیستم‌های پستانداران، متیلاسیون DNA غالباً در کربن پنجم باقیمانده سیتوزین (۵-متیل سیتوزین) CpG اتفاق می‌افتد (۷۲). دی نوکلئوتید DNMT3A و DNMT3B دو آنزیم متیل ترانسفراز DNA هستند که متیلاسیون DNA de novo را کاتالیز می‌کنند (۷۳). متیلاسیون ۵ سیتوزین DNA در عناصر تنظیم‌کننده پروموتور یا دیستال معمولاً با سرکوب رونویسی همراه است. متیلاسیون DNA Aberrant در تعدادی از بیماری‌های آسیب‌شناختی از جمله سرطان نقش دارد. در این مورد، برخی از مولکول‌های کوچک مهارکننده اپی‌ژنتیک در سطح کلی متیلاسیون DNA مانند ۵-آزاسیتیدین را هدف

در مطالعه‌ای توسط Adli در سال ۲۰۱۸، dCas9 را با VP64 که از چهار نسخه‌ی پشت سر هم از یک حوزه‌ی انتقال ۱۶ امینواسید طولانی VP16 از ویروس ساده هرپس تشکیل شده است، ترکیب شد (۶۱) و استراتژی فعال‌سازی ژن واسطه‌ی dCas9-VP64 توسط تعدادی از پلتفرم‌های فعال‌سازی نسل دوم بر پایه‌ی کریسپر بهبود یافت (۶۲). علاوه بر این، محققان dCas9 را با یک کمپلکس سه جانبه ای فعال‌ساز که از پروتئین‌های VP64، P65 و Rta (VPR) تشکیل شده است، ترکیب کردند تا به بیان ژن برسند (شکل ۴) (۶۳). P65 یک دامنه‌ی فعال‌سازی رونویسی از فاکتور رونویسی NF-κB پستانداران است، در حالی‌که Rta<sup>۱</sup> در ویروس/پستین بار<sup>۲</sup> است (۶۴). نکته‌ی قابل توجه آن است که علاوه بر اتصال مستقیم به dCas9، دامنه‌های فاکتور می‌توانند به داربست sgRNA نیز جذب شوند. برای این رویکردها داربست sgRNA به‌گونه‌ای طراحی شده است که شامل واحدهای RNA مثل آپتامرهای هیرپین<sup>۳</sup> MS2 است که می‌تواند به پروتئین‌های مخصوص اتصال RNA مانند پروتئین پوششی باکتروفاج (MCP) متصل شود (۶۵). محققان از داربست مهندسی شده sgRNA-MS2 برای جذب ترکیب VP64-MCP (۶۷) یا کمپلکس فعال‌سازی انتقال (P65-HSF1 HSF1<sup>۴</sup>) شوک حرارتی فعال‌کننده رونویسی (۵۸) برای فعال کردن بیان ژن از یک مکان اندوژنی استفاده کردند. در رویکردی دیگر به نام SAM<sup>۵</sup>، علاوه بر کمپلکس ترکیبی dCas9-VP64، ترکیب MCP با P65-HSF1 از طریق داربست مهندسی‌شده‌ی sgRNA جذب قسمت موردنظر می‌شود (۶۸). اکنون که رویکردهای مختلفی برای القای ژن در مکان‌های ویژه موجود است، یک چالش برای کشف یک رویکرد ایده آل وجود دارد که راه‌حل آن احتمالاً به نوع و موقعیت سلول بستگی دارد. با این حال، تجزیه و تحلیل استراتژی‌های متنوع فعال‌سازی ژن مبتنی بر dCas9 در بین گونه‌های مختلف (چندین دسته‌ی انسانی، موش و سلول‌های پرواز) نشان می‌دهد که استاندارد سیستم‌های VPR, SAM و Suntag از استاندارد VP64 بالاتر بوده و اگرچه رویکردهای SAM توانمندی بیشتری نشان می‌دهند (۶۹)، اختلاف زیادی در

<sup>1</sup> Rta :R transactivative

<sup>2</sup> Epstein-Bar

<sup>3</sup> MS2 hairpin aptamers

<sup>4</sup> HSF1: heat shock transcription activator

<sup>5</sup> SAM: synergistic activation mediator

<sup>6</sup> Fold change  
<sup>7</sup> optogenetics  
<sup>8</sup> Consortium

آنزیم‌های Cas نیز می‌توانند با ایجاد پیوند میان اندونوکلاز با پروموتورهای القاکننده نور یا شیمیایی به صورت انتخابی، باعث کاهش سمیت یا افزایش قابلیت برنامه‌ریزی شوند (۷۶، ۷۷). به نظر می‌رسد در آینده نزدیک استراتژی‌هایی به منظور فعال‌سازی پروتئین‌های ضد CRISPR تدوین شود تا بتواند عملکردهای اندونوکلاز «خاموش» را غیرفعال کند. سایر استراتژی‌ها برای کنترل فعالیت CRISPR-Cas بر تغییراتی در ساختار sgRNAها تکیه می‌کنند (۷۸). gRNAها یا به صورت شرطی و کاملاً فعال هستند که توسط سوئیچ‌های ترمینال RNA غیرفعال می‌شوند و یا کاملاً غیرفعال هستند که توسط یک ماشه RNA «روشن» می‌شوند (۷۹). این استراتژی فعالیت CRISPR-Cas قابل برنامه‌ریزی در داخل بدن را در باکتری‌ها و سلول‌های انسانی نشان خواهد داد. محققان نشان دادند که چنین ابزارهایی به‌طور مشخص بیان ژن‌های مورد نظر را دستکاری می‌کنند. با این حال، هرچند بیان بیش از حد کمپلکس‌های ترکیب اپی‌ژنتیک ممکن است در سطح پایین باشد، اما اثر اپی‌ژنتیکی سراسری ژنگان، همان‌طور که برای کمپلکس ترکیب dCas9-DNMT3A ذکر شده است، هنوز مشخص نشده است. به همین منظور، رویکردهای جدید مانند جذب القایی مبتنی بر Fkbp/Frb برای ویرایش وراژنگان توسط Cas9 (FIRE-Cas9) ممکن است با جذب تنظیم‌کننده‌های کروماتین درون ژنی، دقت بالاتری را در ویرایش اپی‌ژنتیکی ایجاد کند (۸۰). شناسایی ارتباط بین علائم اپی‌ژنتیکی و بیان ژن هدف اصلی در زیست‌شناسی کروماتین است. تاکنون، ابزارهایی که ما را قادر به تغییر وراژنگان می‌کنند موجود هستند و مرحله‌ی بعدی استفاده از این ابزارها برای توصیف بهتر عناصر تنظیمی و حالات سلول‌هاست. به همین منظور، محققان تاکنون از ابزارهای ویرایش ژنگان مبتنی بر Cas9 برای تعدادی از اهداف جالب مانند غربال‌گری سراسری با بازدهی بالا برای توصیف عملکرد تقویت‌کننده‌های دیستال (۸۱)، برنامه‌نویسی مجدد هدفمند از مشخصات سویه (۸۲)، تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القایی و معکوس دوره‌ی کمون HIV استفاده کرده‌اند (۸۴).

#### روش‌های انتقال ژن به درون سلول

همان‌طور که پیش‌تر بیان شد، اولین قدم برای ویرایش ژنگان تهیه‌ی اجزای CRISPR شامل Cas یا مشتقات

قرار می‌دهند (۷۴). این مولکول‌های کوچک که از قبل در حال استفاده بالینی بوده‌اند، کل ژنگان را هدف قرار می‌دهند؛ بنابراین حالت کروماتینی محل‌هایی را که به صورت اپی‌ژنتیکی طبیعی باشند، تغییر می‌دهند. ابزارهای ویرایش اپی‌ژنتیکی که به‌طور خاص مکان‌هایی را تنظیم می‌کنند که به‌طور غیرقانونی تنظیم شده‌اند، از پتانسیل درمانی بسیار خوبی برخوردار هستند و به سرعت در حال توسعه هستند. برای دستیابی به اثبات این اصل، محققان از سیستم dCas9 برای هر دو نشانگر متیلاسیون DNA و متیلاسیون DNA اندوژن در محل مورد نظر استفاده کردند که هدف آن‌ها انتقال متیلاسیون DNA به یک مکان مشخص بود. آن‌ها dCas9 را با حوزه کاتالیزوری DNA متیل ترانسفراز یوکاریوتی DNMT3 (۱) یا DNA متیل ترانسفراز پروکاریوتی MQ3 ادغام کردند (۵۳) که در هر دو استراتژی، رسوب قابل توجهی از متیلاسیون DNA و بیان ژن تغییر یافته در محل مورد نظر مشاهده شد. به علاوه، جذب هدفمند اجزای اضافی ابزار اپی‌ژنتیکی سرکوبگر مانند DNMT3L، KRAB-ZNF و کمپلکس‌های پلی‌کربن باعث تقویت بیشتر استحکام متیلاسیون DNA و سرکوب ژن پایدار در طولانی مدت می‌شود (۱). همچنین با استفاده از مدل سلول‌های بنیادی جنینی بدون DNA متیل ترانسفراز، مطالعه‌ای نشان داد که DNA متیل ترانسفراز ترکیب‌شده با dCas9 تأثیراتی سراسری در بخش‌هایی خارج از محدوده‌ی هدف می‌گذارد که از روی تأثیرات باقی‌مانده از متیلاسیون غیر وابسته به sgRNA و نحوه انتقال آن مشخص می‌شود. لازم به ذکر است با وجود افزایش کلی در متیلاسیون DNA که به فراوانی مایع ترانسفراز dCas9 آزاد هسته‌ای نسبت داده می‌شد با تأثیر محدود بر بیان ژن همراه بود (۷۵).

پروتئین‌ها در تنظیم اپی‌ژنتیک پویا نقش مهمی را ایفا می‌کنند. تعدادی از گروه‌های تحقیقاتی با استفاده از dCas9 هدایت‌پذیر به عنوان پلتفرمی برای جذب دامنه‌های کاتالیزوری پروتئین‌های TET، دستیابی دمتیلاسیون در محل‌های خاص DNA را مورد هدف قرار دادند. کمپلکس همجوشی dCas9-TET1 منجر به ناهمسانگردی DNA در حداکثر ۹۰٪ دی نوکلئوتیدهای موضعی CpG و افزایش قابل توجه در بیان mRNA در بخش‌های هدف شد.

<sup>1</sup> DNA methyltransferase-deficient

استفاده از سیستم‌های وکتور ویروسی و بدون نگرانی از اندازه منتقل می‌شود.

### پاسخ‌های ایمنی

به طور کلی، ابزارهای کریسپر با ترکیب زیست مولکول‌های مشتق‌شده از پروکاریوت‌ها در سلول‌های بدن یوکاریوت‌ها عمل می‌کنند. این مسئله این نگرانی را ایجاد می‌کند که مواد خارجی باعث سمیت سلول‌ها و واکنش‌های ایمنی بدن شوند. اما در حقیقت، محققان از تجزیه و تحلیل‌های نمونه‌های خونی دریافتند که ۷۹٪ افراد مورد آزمایش دارای آنتی‌بادی علیه SaCas9 و ۶۵٪ دارای آنتی‌بادی علیه SpCas9 بودند (۸۹). دو اورتولوگ SaCas9 و SpCas9 از اس اورئوس<sup>۲</sup> و اس پیوژن<sup>۳</sup> که در محیط‌های انسانی شیوع دارند و مستعد تماس با سیستم ایمنی بدن انسان هستند، اورتولوگ‌هایی از Cas هستند که به منظور ژن درمانی مورد مطالعه‌ی گسترده قرار گرفته‌اند. گروه ۵-فسفات انتهایی gRNA در انسان سبب بروز پاسخ ایمنی می‌شود (۹۰). اصلاح آن به گروه ۵-هیدروکسیل به عنوان راهی برای جلوگیری از پاسخ‌های نامطلوب بیولوژیکی پیشنهاد شده است.

### نتیجه‌گیری

کریسپر در زمینه ویرایش ژنگان متحول شده است؛ زیرا اگر بیش از ابزار ویرایش ژنگان کارایی نداشته باشد، به همان اندازه قدرتمند است. به علاوه، استفاده از آن بسیار ساده‌تر و انعطاف‌پذیرتر است. حضور چندین دستاورد مهم راه را برای تبدیل سیستم‌های CISPR به فناوری ویرایش ژنگان باز می‌کند که از جمله آن‌ها این است که توالی‌های اکتسابی حدفصل در مناطقی به PAM بسیار شبیه به یکدیگر هستند و این توالی برای عملکرد کریسپر بسیار حیاتی است. NHEJ درکل چرخه سلولی کاربرد دارد، ولی به علت عملکرد تصادفی آن دقت کافی برای کارهای دقیق را ندارد؛ درحالی‌که HDR مربوط به چرخه‌های سلولی S و G2 است. به علت این محدودیت‌ها، ویرایشگرهای باز که شامل CBE و ABE هستند و می‌توانند بدون شکستن DNA، C را به T و A را به G تغییر دهند، بیشتر مورد توجه قرار گرفتند. کریسپر دارای اثرات خارج از هدف است که

Cas، gRNA و در صورت لزوم DNAهای اضافه است. این اجزا سپس به درون سلول منتقل خواهند شد و انتقال‌دهنده‌های آن‌ها به درون سلول غالباً به دو دسته‌ی وکتورهای ویروسی و وکتورهای غیر ویروسی تقسیم می‌شوند. انتقال غیر ویروسی شامل ریز تزریق، الکتروپوریشن<sup>۱</sup> و یا استفاده از اجزای ویرایش ژنگان می‌تواند اشکال متنوعی از RNA، DBA، یا RNP باشد. کیت و ابزار گوناگون برای هر یک از روش‌های انتقال ایجاد شده است. با این حال، جهت ژن‌درمانی درون سلولی در اکثر اوقات به سیستم انتقال ویروسی متکی هستیم و AAVها به عنوان وکتور ویروسی پیشنهاد شده‌اند. با این حال برای یک انتقال مؤثر، در اندازه‌ی ژن بارگذاری شده (4.5 kb) محدودیت وجود دارد؛ به این دلیل که بیشتر پروتئین‌های Cas شناخته‌شده سنگین هستند. برای مثال، SpCas9 (۱۳۶۸ تا آمینو اسید دارد و بسته‌بندی آن با gRNA کد کننده‌ی DNA در یک ذره AAV بسیار مشکل است. این چالش از دو طریق مورد بررسی قرار گرفته شده است. در روش اول، جستجو برای اورتولوگ‌های سبک‌تر Cas در آرکی‌ها و باکتری‌ها که شامل CjCas9 (984 aa)، NmCas9 (1082 aa)، SaCas9 (۱۰۵۳ aa) و ScCas9 (984 aa) هستند، در چندین سروتیپ بارگذاری شده و به درون سلول حمل می‌شوند (۴۳، ۸۶، ۸۷). Cas14 می‌تواند به عنوان یک Cas سبک مورد استفاده قرار گیرد؛ چراکه می‌تواند فعالیت شکافنده‌ی dsDNA را حفظ کند (۸۸). در روش دیگر، SpCas9 سنگین به N-Cas9 (2-573 aa) و C-Cas9 (574-1368 aa) تقسیم شده و هریک به طور جداگانه در یک AAV بارگذاری می‌شود و Cas9 بازسازی-شده با موفقیت به داخل سلول‌های بدن منتقل می‌شود. ابزار ویرایش ژنگان نه تنها شامل برش‌دهنده‌ی dsDNA است، بلکه ویرایشگرهای باز و تنظیم‌کننده‌های ژن مبتنی بر dCas نیز برای CRISPRi و CRISPRa استفاده می‌شوند. حالت دوم به آن معناست که افزایش بیشتر در اندازه‌ی کامل ژن اجتناب‌ناپذیر است. گرچه مدل‌های ادغام‌شده با تنظیم‌کننده‌های Cas در سیستم وکتور ویروسی AAV مورد آزمایش قرار نگرفته‌اند؛ اما پیشرفت‌های فنی فاز جدیدی از ارائه می‌دهند که در آن ابزارهای ویرایش ژنگان با

<sup>2</sup> S. aureus  
<sup>3</sup> S. pyogenes

<sup>1</sup> Electroporation

حوزه FokI و کاهش فعالیت خارج از هدف WTcas9 می‌شود. علاوه بر این‌ها روش‌های مهندسی پروتئین Cas9 با تلاش‌هایی به منظور افزایش ویژگی هدف‌گذاری روی داربست sgRNA انجام شد. هم‌چنین راهکارهایی به منظور غلبه بر محدودیت‌های موجود در انتقال ژن‌های بزرگ و سنگین نیز بیان شد و در آخر عوامل ایجادکننده پاسخ ایمنی در طی استفاده از این ابزار و راه‌های غلبه بر آن نیز به طور مختصر بررسی شد.

برای غلبه بر این مشکل، محققان با شناسایی یک جهش نقطه‌ای خاص که ویژگی spCas را به طور قابل توجهی افزایش می‌داد، سبب ایجاد انواع Cas9 با ویژگی‌های منحصر به فرد شدند. یکی دیگر از راه‌های کاهش اثرات خارج از هدف تغییر به روش CAS9-sgRNA است. مورد هدف قرار دادن پی در پی یک جایگاه فعال با ۲ تا sgRNA جداگانه با استفاده از nCas9 یا غیرفعال سازی کاتالیستی Cas9 ادغام شده با DNA نیز اساساً باعث از هم گسیختگی

## منابع

- Adli, M., The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nature communications*, 2018. 9(1): p. 1-13.
- Rothstein, R.J., [12] One-step gene disruption in yeast. *Methods in enzymology*, 1983. 101: p. 202-211.
- Capecchi, M.R., Altering the genome by homologous recombination. *Science*, 1989. 244(4910): p. 1288-1292.
- Lin, F., K. Sperle, and N. Sternberg, Recombination in mouse L cells between DNA introduced into cells and homologous chromosomal sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1985. 82(5): p. 1391-1395.
- Rudin, N., E. Sugarman, and J.E. Haber, Genetic and physical analysis of double-strand break repair and recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 1989. 122(3): p. 519-534.
- Rouet, P., F. Smih, and M. Jasin, Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. *Molecular and cellular biology*, 1994. 14(12): p. 8096-8106.
- Jeggo, P., 5 DNA Breakage and Repair, in *Advances in genetics*. 1998, Elsevier. p. 185-218.
- Klug, A. and D. Rhodes. Zinc fingers: a novel protein fold for nucleic acid recognition. in *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. 1987. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Kim, Y.-G., J. Cha, and S. Chandrasegaran, Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996. 93(3): p. 1156-1160.
- Bibikova, M., et al., Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases. *Molecular and cellular biology*, 2001. 21(1): p. 289-297.
- Porteus, M.H. and D. Baltimore, Chimeric nucleases stimulate gene targeting in human cells. *Science*, 2003. 300(5620): p. 763-763.
- Boch, J., et al., Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 2009. 326(5959): p. 1509-1512.
- Moscou, M.J. and A.J. Bogdanove, A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, 2009. 326(5959): p. 1501-1501.
- Gaj, T., C.A. Gersbach, and C.F. Barbas III, ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in biotechnology*, 2013. 31(7): p. 397-405.
- Jansen, R., et al., Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular microbiology*, 2002. 43(6): p. 1565-1575.
- Ishino, Y., et al., Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of bacteriology*, 1987. 169(12): p. 5429-5433.
- Mojica, F.J., et al., Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Molecular microbiology*, 2000. 36(1): p. 244-246.
- Maeder, M.L., et al., CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. *Nature methods*, 2013. 10(10): p. 977-979.
- Barrangou, R., et al., CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 2007. 315(5819): p. 1709-1712.
- Marraffini, L.A. and E.J. Sontheimer, Self versus non-self discrimination during CRISPR RNA-directed immunity. *Nature*, 2010. 463(7280): p. 568-571.
- Brouns, S.J., et al., Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*, 2008. 321(5891): p. 960-964.
- Marraffini, L.A. and E.J. Sontheimer, CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *science*, 2008. 322(5909): p. 1843-1845.
- Haft, D.H., et al., A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS computational biology*, 2005. 1(6).
- Makarova, K.S., et al., Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 2011. 9(6): p. 467-477.
- Khan, S., et al., CRISPR/Cas9: the Jedi against the dark empire of diseases. *Journal of biomedical science*, 2018. 25(1): p. 29.
- Abudayyeh, O.O., et al., C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science*, 2016. 353(6299): p. aaf5573.
- Deveau, H., et al., Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of bacteriology*, 2008. 190(4): p. 1390-1400.
- Zetsche, B., et al., Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*, 2015. 163(3): p. 759-771.
- Garneau, J.E., et al., The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 2010. 468(7320): p. 67-71.
- Deltcheva, E., et al., CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 2011. 471(7340): p. 602-607.
- Sapranaukas, R., et al., The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity

- in *Escherichia coli*. *Nucleic acids research*, 2011. 39(21): p. 9275-9282.
32. Jinek, M., et al., A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *science*, 2012. 337(6096): p. 816-821.
  33. Gasiunas, G., et al., Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012. 109(39): p. E2579-E2586.
  34. Wright, W.D., S.S. Shah, and W.-D. Heyer, Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks. *Journal of Biological Chemistry*, 2018. 293(27): p. 10524-10535.
  35. McVey, M. and S.E. Lee, MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. *Trends in Genetics*, 2008. 24(11): p. 529-538.
  36. Zhao, X., et al., Cell cycle-dependent control of homologous recombination. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 2017. 49(8): p. 655-668.
  37. Eid, A., S. Alshareef, and M.M. Mahfouz, CRISPR base editors: genome editing without double-stranded breaks. *Biochemical Journal*, 2018. 475(11): p. 1955-1964.
  38. Komor, A.C., et al., Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 2016. 533(7603): p. 420-424.
  39. Gaudelli, N.M., et al., Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 2017. 551(7681): p. 464-471.
  40. Hou, Z., et al., Efficient genome engineering in human pluripotent stem cells using Cas9 from *Neisseria meningitidis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013. 110(39): p. 15644-15649.
  41. Ran, F.A., et al., In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature*, 2015. 520(7546): p. 186-191.
  42. Friedland, A.E., et al., Characterization of *Staphylococcus aureus* Cas9: a smaller Cas9 for all-in-one adeno-associated virus delivery and paired nickase applications. *Genome biology*, 2015. 16(1): p. 257.
  43. Kim, E., et al., In vivo genome editing with a small Cas9 orthologue derived from *Campylobacter jejuni*. *Nature communications*, 2017. 8: p. 14500.
  44. Hirano, H., et al., Structure and engineering of *Francisella novicida* Cas9. *Cell*, 2016. 164(5): p. 950-961.
  45. Mojica, F.J., J. García-Martínez, and E. Soria, Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of molecular evolution*, 2005. 60(2): p. 174-182.
  46. Yamano, T., et al., Crystal structure of Cpf1 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 2016. 165(4): p. 949-962.
  47. Zuo, E., et al., Cytosine base editor generates substantial off-target single-nucleotide variants in mouse embryos. *Science*, 2019. 364(6437): p. 289-292.
  48. Jin, S., et al., Cytosine, but not adenine, base editors induce genome-wide off-target mutations in rice. *Science*, 2019. 364(6437): p. 292-295.
  49. Ran, F.A., et al., Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 2013. 154(6): p. 1380-1389.
  50. Guilinger, J.P., D.B. Thompson, and D.R. Liu, Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification. *Nature biotechnology*, 2014. 32(6): p. 577.
  51. Tsai, S.Q., et al., Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. *Nature biotechnology*, 2014. 32(6): p. 569-576.
  52. Nishimasu, H., et al., Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 2014. 156(5): p. 935-949.
  53. Lei, Y., et al., Targeted DNA methylation in vivo using an engineered dCas9-MQ1 fusion protein. *Nature communications*, 2017. 8(1): p. 1-10.
  54. Moon, S.B., J.-H. Ko, and Y.-S. Kim, Recent advances in the CRISPR genome editing tool set. *Experimental & molecular medicine*, 2019. 51(11): p. 1-11.
  55. Qi, L.S., et al., Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 2013. 152(5): p. 1173-1183.
  56. Gilbert, L.A., et al., CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*, 2013. 154(2): p. 442-451.
  57. Urrutia, R., KRAB-containing zinc-finger repressor proteins. *Genome biology*, 2003. 4(10): p. 231.
  58. Konermann, S., et al., Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature*, 2015. 517(7536): p. 583-588.
  59. Friedman, J.R., et al., KAP-1, a novel corepressor for the highly conserved KRAB repression domain. *Genes & development*, 1996. 10(16): p. 2067-2078.
  60. Groner, A.C., et al., KRAB-zinc finger proteins and KAP1 can mediate long-range transcriptional repression through heterochromatin spreading. *PLoS genetics*, 2010. 6(3): p. 294-304.
  61. Wysocka, J. and W. Herr, The herpes simplex virus VP16-induced complex: the makings of a regulatory switch. *Trends in biochemical sciences*, 2003. 28(6): p. 294-304.
  62. Cheng, A.W., et al., Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system. *Cell research*, 2013. 23(10): p. 1163-1171.
  63. Chavez, A., et al., Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. *Nature methods*, 2015. 12(4): p. 326-328.
  64. Hardwick, J.M., et al., The Epstein-Barr virus R transactivator (Rta) contains a complex, potent activation domain with properties different from those of VP16. *Journal of virology*, 1992. 66(9): p. 5500-5508.
  65. Sugiyama, T. and D. Nakada, Translational control of bacteriophage MS2 RNA cistrons by MS2 coat protein: polyacrylamide gel electrophoretic analysis of proteins synthesized in vitro. *Journal of molecular biology*, 1968. 31(3): p. 431-440.
  66. Peabody, D.S., The RNA binding site of bacteriophage MS2 coat protein. *The EMBO journal*, 1993. 12(2): p. 595-600.
  67. Zalatan, J.G., et al., Engineering complex synthetic transcriptional programs with CRISPR RNA scaffolds. *Cell*, 2015. 160(1-2): p. 339-350.
  68. Tanenbaum, M.E., et al., A protein-tagging system for signal amplification in gene expression and fluorescence imaging. *Cell*, 2014. 159(3): p. 635-646.
  69. Chavez, A., et al., Comparison of Cas9 activators in multiple species. *Nature methods*, 2016. 13(7): p. 563-567.
  70. Qu, H. and X. Fang, A brief review on the Human Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE) project. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 2013. 11(3): p. 135-141.

71. Bernstein, B.E., et al., The NIH roadmap epigenomics mapping consortium. *Nature biotechnology*, 2010. 28(10): p. 1045-1048.
72. Razin, A. and A.D. Riggs, DNA methylation and gene function. *Science*, 1980. 210(4470): p. 604-610.
73. Okano, M., et al., DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 1999. 99(3): p. 247-257.
74. Kaminskas, E., et al., FDA Commentary. *The oncologist*, 2005. 10: p. 176-182.
75. Galonska, C., et al., Genome-wide tracking of dCas9-methyltransferase footprints. *Nature communications*, 2018. 9(1): p. 1-9.
76. Polstein, L.R. and C.A. Gersbach, A light-inducible CRISPR-Cas9 system for control of endogenous gene activation. *Nature chemical biology*, 2015. 11(3): p. 198-200.
77. Jensen, E.D., et al., Transcriptional reprogramming in yeast using dCas9 and combinatorial gRNA strategies. *Microbial cell factories*, 2017. 16(1): p. 46.
78. Nakamura, M., et al., Anti-CRISPR-mediated control of gene editing and synthetic circuits in eukaryotic cells. *Nature communications*, 2019. 10(1): p. 1-11.
79. Hanewich-Hollatz, M.H., et al., Conditional guide RNAs: Programmable conditional regulation of CRISPR/cas function in bacterial and mammalian cells via dynamic RNA nanotechnology. *ACS central science*, 2019. 5(7): p. 1241-1249.
80. Braun, S.M., et al., Rapid and reversible epigenome editing by endogenous chromatin regulators. *Nature communications*, 2017. 8(1): p. 1-8.
81. Klann, T.S., et al., CRISPR-Cas9 epigenome editing enables high-throughput screening for functional regulatory elements in the human genome. *Nature biotechnology*, 2017. 35(6): p. 561.
82. Chakraborty, S., et al., A CRISPR/Cas9-based system for reprogramming cell lineage specification. *Stem cell reports*, 2014. 3(6): p. 940-947.
83. Balboa, D., et al., Conditionally stabilized dCas9 activator for controlling gene expression in human cell reprogramming and differentiation. *Stem cell reports*, 2015. 5(3): p. 448-459.
84. Bialek, J.K., et al., Targeted HIV-1 latency reversal using CRISPR/Cas9-derived transcriptional activator systems. *PLoS one*, 2016. 11(6).
85. Lino, C.A., et al., Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. *Drug delivery*, 2018. 25(1): p. 1234-1257.
86. Ibraheim, R., et al., All-in-one adeno-associated virus delivery and genome editing by Neisseria meningitidis Cas9 in vivo. *Genome biology*, 2018. 19(1): p. 137.
87. Li, A., et al., A self-deleting AAV-CRISPR system for in vivo genome editing. *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development*, 2019. 12: p. 111-122.
88. Karvelis, T., et al., PAM recognition by miniature CRISPR-Cas14 triggers programmable double-stranded DNA cleavage. *bioRxiv*, 2019: p. 654897.
89. Charlesworth, C.T., et al., Identification of preexisting adaptive immunity to Cas9 proteins in humans. *Nature medicine*, 2019. 25(2): p. 249-254.
90. Kim, S., et al., CRISPR RNAs trigger innate immune responses in human cells. *Genome research*, 2018. 28(3): p. 367-373.

