

## نسل جدید فناوری‌های ویرایش ژنوم و کاربردهای CRISPR-CAS9

مهدی محمدی<sup>۱</sup>، لیلیا کوکبی عابد<sup>۲</sup>، لیلیا قاضی زاده<sup>۳</sup>، امیر عباس رحیمی<sup>۳</sup> و محمد علی شکرگزار<sup>۱\*</sup>

<sup>۱</sup> ایران، تهران، انستیتو پاستور ایران، بخش بانک سلولی، گروه بیوتکنولوژی دارویی

<sup>۲</sup> ایران، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، بخش مولکولی، گروه بیوتکنولوژی پزشکی

<sup>۳</sup> ایران، تهران، انستیتو پاستور ایران، بخش بانک سلولی، گروه بیوتکنولوژی پزشکی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۱۹

### چکیده

تکنولوژی‌های ویرایش ژنوم به ویژه CRISPR/Cas9 کاربردهای بسیار متنوعی در علوم پزشکی، کشاورزی و صنعت دارند. هم‌اکنون در بسیاری از مراکز تحقیقاتی و شرکت‌ها در دنیا از این تکنولوژی به صورت آزمایشگاهی در درمان بیماری‌های ویروسی و سرطان و حتی اصلاح گیاهان استفاده می‌شود. پیدایش و آسانی کار با این تکنیک که توالی‌های ویژه‌ای از ژنوم را تشخیص می‌دهند، انقلابی در ویرایش ژن‌ها بوجود آورد و باعث پیشرفت غیرمنتظره علمی و کشفیات زیادی در ژن درمانی، مدل‌سازی بیماری‌ها، کشف داروها، زیست‌شناسی سنتتیک، علوم اعصاب و علوم کشاورزی گردید. از آنجا که توانایی تغییرات ژنتیکی در سلول‌ها و ارگانیسم‌های زنده ابزار بنیادی در تحقیقات بیولوژیک است، دستیابی به تغییرات هدفمند اختصاصی بسیار مورد نیاز و مهم می‌باشد. ویرایش ژنوم با پیدایش و توسعه نوکلئازها با RNA راهنما بسیار رایج شده است. این سیستم ترکیبی از یک پروتئین قیچی مانند به نام Cas9 با یک مولکول راهنما (gRNA) است که مانند یک کارگاه عمل کرده و یک مکان خاص در ژنوم را پیدا کرده و آن را برش می‌دهد.

**کلیدواژگان:** بیوتکنولوژی، کشاورزی، مهندسی ژنتیک، ژن درمانی، مدل‌سازی بیماری

\* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: mashokrgozar@pasteur.ac.ir

### مقدمه

(۱). برش دو رشته DNA باعث آسیب شدیدی در DNA ژنومیک همه ارگانیسم‌ها، به دلیل چون آسیب به هر دو رشته از DNA، می‌شود و این آسیب باید ترمیم شود تا تمامیت اطلاعات ژنومیک موجود و یا رده سلولی حفظ شود (۲).

مطالعات ترمیم DNA نشان داده که برش‌های دو رشته‌ای DNA از طریق نوترکیبی وابسته به تشابه<sup>۵</sup> یا HDR و یا توسط روش غیر وابسته به تشابه<sup>۶</sup> که اتصال انتهای غیر مشابه<sup>۶</sup> (NHEJ) نامیده می‌شود، انجام می‌شود. القاء برش دو رشته DNA در جایگاه مورد نظر توسط نوکلئازهای مهندسی شده، باعث القاء مسیرهای ترمیم DNA می‌شود (۲). در مسیر اتصال انتهای غیر مشابه، indels<sup>۷</sup>های کوچک می‌تواند باعث از بین رفتن ژن<sup>۷</sup> یا بهم ریختن چارچوب خوانش ژن‌ها شود و در مسیر نوترکیبی وابسته به تشابه (HDR) یا با

در سال‌های اخیر پیدایش تکنولوژی‌های بسیار متنوع ویرایش ژنوم برای محققین توانایی ارائه سریع و مقرون به صرفه تغییر و تبدیلات ویژه توالی را برای دامنه وسیعی از انواع سلول‌ها و ارگانیسم‌ها مهیا کرده است. با استفاده از طراحی نوکلئازهای ویژه‌ای که باعث برش DNA در جایگاه‌های خاصی می‌شوند و سیستم‌های ترمیمی میزبان، می‌توان ژن‌های میزبان را دستکاری نمود (۱). پیدایش و آسانی کار با بعضی از این تکنیک‌ها که توالی‌های ویژه‌ای از ژنوم را تشخیص می‌دهند، انقلابی در ویرایش ژن‌ها بوجود آورد و باعث پیشرفت غیرمنتظره علمی و کشفیات زیادی در ژن درمانی، نمونه‌سازی (مدل‌سازی) بیماری‌ها، کشف داروها، زیست‌شناسی سنتتیک<sup>۲</sup>، علوم اعصاب و علوم کشاورزی گردید. نتایج حاصل از تکنیک‌های ویرایش ژن‌ها، توانایی القاء هدفمند برش DNA دو رشته‌ای<sup>۳</sup> و یا DSBs می‌باشد

<sup>۵</sup> Homology-independent manner

<sup>۶</sup> Non homologous end joining

<sup>۷</sup> Knockout

<sup>۱</sup> Disease modeling

<sup>۲</sup> Synthetic biology

<sup>۳</sup> Double-strand breaks

<sup>۴</sup> Homology-dependent recombination

تراریخته می‌شود که باهم توانایی تسریع در مدل سازی بیماری‌های انسانی و کشف روش‌های درمانی جدید را دارند. همچنین نوکلئازهای هدفمند، ابزاری قوی برای گیاهان مهندسی شده بوجود می‌آورند (۵).

ب: زیست‌شناسی مصنوعی (سنتتیک) و مهندسی در مقیاس ژنوم

نوکلئازهای هدفمند به آسانی باعث ایجاد سویه‌های مختلف باکتری و مخمر برای زیست‌شناسی مصنوعی مثل مسیرهای متابولیک مهندسی شده، می‌شوند. برای مثال سویه‌های باکتری Actinomycetales، با وجود سرکشی و مقاومت در برابر دستکاری‌های ژنتیک، یکی از مهمترین منابع صنعتی مناسب برای متابولیت‌های ثانویه است. از این نوکلئازها می‌توان برای غیر فعال کردن چندین ژن در اکتینومیست‌ها استفاده نمود تا سویه‌ای از باکتری با قابلیت توانایی تولید متابولیت موردنظر ایجاد شوند. همچنین این نوکلئازها مهندسی مسیرهای متابولیک پیچیده را در مخمر با کارایی بالا تسهیل می‌کنند. به علاوه می‌توان از آن‌ها در جهش‌زایی تصادفی DNA کروموزوم مخمر برای غربال‌گری جهش‌های مورد نظر استفاده کرد (۶).

ج: ویرایش درمانی ژنوم

ویرایش ژنوم پتانسیل بالای برای درمان برخی بیماری‌های ژنتیکی دارد. یکی از موفق‌ترین مثال‌ها در این رابطه، از هم‌گسیختگی گیرنده‌های همراه CCR5 و ویروس HIV است که از آن هم در سلول‌های T دارای رسپتور CD4<sup>+</sup> و هم سلول‌های پایه‌ای خون‌ساز مهندسی شده برای مقاومت به HIV استفاده می‌شود. همچنین دانشمندان با استفاده از ناقل ویروسی وابسته به آدنو (AAV) کد کننده یک جفت نوکلئازها که برای نقص ژنی فاکتور ۹ خونی همراه با الگوی صحیح آن ژن طراحی کرده بودند، توانستند با تصحیح موثر آن ژن در کبد موش، باعث افزایش تولید آن فاکتور هم در نوزادان تازه متولد شده آن‌ها و هم در موش‌های بالغ مدل واجد بیماری هموفیلی شوند. اخیراً در ویرایش ژنتیکی در حالت *In vivo* موفق به بازگرداندن بیان ژن دیستروفین و رهایی از عملکرد ماهیچه در موش مدل مبتلا به ضعف ماهیچه‌ای دوشن<sup>۷</sup> شدند (۷).

استفاده از یک الگوی دهنده یا الیگوداکسی نوکلئوتیدهای تک رشته‌ای (ssODN) باعث جایگزینی و یا knockin ژن‌ها می‌شود. این روش در مراحل S/G2 از سیکل سلولی در زمانی که کروماتیدهای خواهری در دسترس می‌باشند، انجام می‌شود (۳).

بنابراین، شکست و برش‌های DNA باعث فعال‌سازی مسیرهای ترمیم DNA در سلول شده که نتیجه آن تسهیل در ارائه تغییرات در جایگاه‌های ویژه ژنوم است. این مراحل اغلب برای حذف و غیر فعال کردن ژن‌ها از طریق درنهم<sup>۲</sup> و یا حذف<sup>۳</sup> بازهای آلی که در حین عمل اتصال انتهاهای غیر مشابه و یا NHEJ اتفاق می‌افتد، استفاده می‌شوند. در حالت دوم، در حضور الگوی دهنده با تشابه به جایگاه هدف کروموزوم، انضمام<sup>۴</sup> یا تصحیح باز از طریق ترمیم مستقیم مشابه یا HDR انجام می‌گردد (۲، ۳). توانایی تغییرات ژنتیکی در سلول‌ها و ارگانسیم‌های زنده ابزار بنیادی تحقیقات بیولوژیک است، اما دستیابی به تغییرات هدفمند اختصاصی بسیار مورد نیاز و مهم است. ویرایش ژنوم با پیدایش و توسعه نوکلئازها با RNA<sup>۵</sup> راهنما بسیار رایج شده است (۴).

### کاربردهای ویرایش ژنوم

ویرایش ژنوم کاربردهای مختلفی در حوزه‌های مختلف دارد، که در زیر به تعدادی از آنها می‌پردازیم.

الف: رده‌های سلولی و ارگانسیم‌های مهندسی شده

قبل از ظهور نوکلئازهای مهندسی شده، دستکاری ژنتیکی رده‌های سلولی پستانداران کاری سخت، پرهزینه و زمان‌بر بود. بنابراین، با ظهور تکنولوژی‌های مقرون به صرفه و مناسب برای کاربر، رده‌های سلولی حامل هر تغییر ژنتیکی می‌توانند به آسانی و در عرض چند هفته تولید شوند. می‌توان به مثال‌هایی از بعضی نتایج عادی که به علت این نوع نوکلئازها ظهور پیدا کرده اند، اشاره کرد: (۱) از بین بردن ژن، (۲) حذف ژنی، (۳) وارونگی ژنی، (۴) تصحیح ژنی و حتی (۵) جابجایی کروموزومی. به علاوه رده‌های سلولی مهندسی شده، نوکلئازهای هدفمند باعث تسریع در ایجاد ارگانسیم‌های از نظر ژنتیکی تغییر یافته مثل اسب آبی، موش، خرموش (رت)، میمون، چارپایان اهلی مثل گاو و گوسفند

<sup>5</sup>RNA-guided endonucleases  
<sup>6</sup>Coreceptor  
<sup>7</sup>Duchenne muscular dystrophy

<sup>1</sup>Donor template  
<sup>2</sup>Insertion  
<sup>3</sup>Deletion  
<sup>4</sup>Integration

### ویرایش ژن‌ها با استفاده از نوکلئازهای ویژه جایگاه

از نظر تاریخی، غیر فعال کردن ژن‌ها، جایگزینی و یا اضافه کردن هدفمند ژن‌ها با استفاده از نوترکیبی همساخت و یا HR<sup>۱</sup> انجام می‌شود، ولی راندمان پایین نوترکیبی در سلول‌های پستانداران و ارگانسیم‌های مدل، بطور دراماتیکی استفاده از این روش را محدود می‌کند. در ترمیم برش‌های دو رشته‌ای DNA با استفاده از اتصال انتهای غیر مشابه یا NHEJ، می‌توان حذف‌ها و یا درنهم‌های کوچک در جایگاه‌های ویژه‌ای را انجام داد که نتیجه آن از بین بردن عملکرد یک ژن از طریق به هم ریختن قالب خواندن آن ژن است. با این روش می‌توان وارونگی‌های بزرگ کروموزومی و جابجایی‌ها را انجام داد. برای مثال این روش‌ها در انواعی از سلول‌های اجدادی مثل سلول‌های پایه‌ای جنینی<sup>۲</sup> یا ES و سلول‌های پرتوان القاء شده یا iPS استفاده شده است (۸).

الف- از هم گسیختگی ژن: ساده‌ترین شکل ویرایش ژن‌ها، استفاده از طبیعت اشتباه‌پذیری<sup>۳</sup> از سیستم‌های ترمیم در سلول است. ترمیم اتصال انتهای غیر مشابه فرآیندی مستعد اشتباه است که می‌تواند باعث از بین رفتن ژن‌ها، به دلیل درنهم‌ها و حذف‌های کوچک (indels)، شود (۸).

ب- درنهم ژن: DNA پلاسمیدی یا ناقل‌های ویروسی داخل شونده اغلب برای وارد کردن ژن به ژنوم استفاده می‌شوند. در این روش، جایگاه ورود نمی‌تواند کنترل شود، در نتیجه ژن خارجی و نواحی تنظیمی آن می‌توانند در جایگاه‌های ناخواسته وارد شده و باعث غیر فعال شدن ژن‌های ضروری و یا فعال شدن پروتو - انکوژن‌ها شوند. نوکلئازهای مهندسی شده راندمان نوترکیبی همساخت (HR) را در جایگاه‌های اختصاصی افزایش می‌دهند، در نتیجه اجازه دخول هدفمند ژن‌های درمانی در ژنوم و در مکانی ایمن را به ما می‌دهند (۸).

ج- تصحیح ژن و جهش‌های نقطه‌ای: جهش‌های نقطه‌ای می‌تواند باعث تصحیح و یا ارائه انواع نوکلئوتیدهای منفرد در ژنوم از طریق ارائه هم‌زمان نوکلئازهای قابل برنامه‌ریزی و ناقل‌های هدفمند یا لیگوداکسی نوکلئوتیدهای تک رشته‌ای (ssODNs) شود. بر خلاف ناقل‌های هدفمند که آماده-سازی آن‌ها طاقت فرسا و زمان‌بر است، طراحی و سنتز

ssODNs فقط چند روز زمان احتیاج دارد. این روش دقیق و کارآمد باعث ایجاد مدل‌های بیماری در حیوانات و سلول‌های انسانی می‌شود (۸).

د- نوآرایی کروموزومی: ترمیم برش‌های متقارن دو رشته‌ای ایجاد شده بوسیله نوکلئازهای قابل برنامه‌ریزی منجر به نوآرایی‌های کروموزومی و یا تغییرات ساختاری در DNA می‌شود. حذف‌ها، دوتا شدن‌ها و واژگونی‌های چند مگابازی از قطعات کروموزوم بوسیله این نوع نوکلئازها در سلول‌ها و یا موجودات کامل انجام پذیر است. اگر برش‌های دو رشته‌ای روی دو کروموزوم مختلف انجام شود، باعث جابجایی‌های کروموزومی می‌شود که علت تعدادی از جهش‌های مربوط به سرطان‌ها است (۸).

### مهندسی هدفمند ژنوم

مهندسی هدفمند ژنوم<sup>۴</sup> (تغییر و تبدیلات ژنوم در جایگاه‌های دقیق و از پیش تعیین شده) به طور وسیع در تحقیقات مهندسی پزشکی، پزشکی و زیست فناوری کاربرد دارد. برای مثال برای تعیین عملکرد ژن‌های اختصاصی و یا عناصر غیر کدکننده مثل RNAهای کوچک (miRNA)، محققین آن‌ها را به طور انتخابی غیر فعال کرده و نتایج و پیامدهای فنوتیپیک حاصل از آن را در سلول‌ها یا ارگانسیم‌ها ارزیابی می‌کنند. از RNAهای مداخله گر کوچک (siRNAs) نیز می‌توان برای مطالعه عملکرد ژن‌ها استفاده کرد، ولی کاهش بیان ژن‌ها بوسیله آنها اغلب ناقص و غیر اختصاصی است. روش‌های وابسته به نوترکیبی همساخت (HR) که روشی متداولی است، که می‌توانند ژن‌ها را غیر فعال کنند، راندمان کمی (رنج ۱ در ۱۰۷-۱۰۶) در ارگانسیم‌های پیشرفته دارند که این به عنوان مانعی در استفاده از این‌ها محسوب می‌شود (۹)

تاکنون سه ابزار برجسته و غالب برای ویرایش ژنوم پدیدار شده است. نوکلئازهای قابل برنامه‌ریزی برش‌های دورشته‌ای در جایگاه‌های اختصاصی ایجاد می‌کنند که باعث افزایش نوترکیبی همساخت و در نهایت منجر به جهش‌زایی هدفمند می‌شود. تا چند سال پیش نوکلئازهای انگشت روی یا ZFNs تنها انتخاب در دسترس محققینی که مایل به مهندسی هدفمند ژنوم بودند، بود. در انتهای سال ۲۰۱۱ زمانی که

<sup>۵</sup> Single – strand oligodeoxynucleotides

<sup>۶</sup> Vector

<sup>۷</sup> Targeted genome engineering

<sup>۸</sup> Zinc finger nuclease

<sup>۱</sup> Homologous Recombination

<sup>۲</sup> Embryonic stem cell

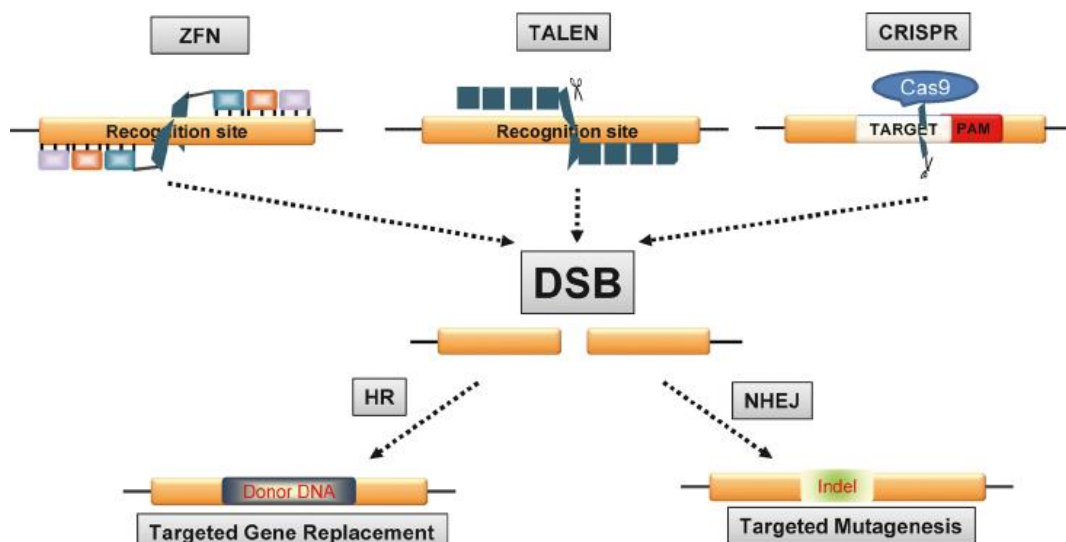
<sup>۳</sup> Induced pluripotent stem cell

<sup>۴</sup> Error-prone nature

### نوکلئازهای مهندسی شده با RNA راهنما

باکتری‌ها و آرکئی‌باکترها، اسیدهای نوکلئیک متخصص از باکتریوفازها و پلاسمیدهای همجوشی یا کانجوگتیو را با یک سیستم ایمنی از خود دفع می‌کنند. سیستم‌های برش DNA با هدایت و راهنمایی RNA باعث محافظت آن‌ها در مقابل DNAهای آلوده کننده متخصص شده و به عنوان یک سیستم ایمنی سازشی عمل می‌کنند. این سیستم ایمنی به نام تکرارهای پالیندرومیک کوتاه پخش شده منظم خوشه‌ای<sup>۲</sup> یا CRISPR در ژنوم بعضی از باکتری‌ها و آرکئاها یافت می‌شود (در ۷۸ درصد از آرکئا و ۴۸ درصد از یوباکتری‌ها). تعداد کاست‌های مختلف CRISPR در ژنوم ۱-۱۸ عدد و در تعداد به طور متوسط ۶۰ عدد است که اندازه واحدهای تکراری آن به طور متوسط بین ۳۷-۲۳ جفت باز و تعداد و اندازه توالی‌های فاصله انداز ۸۴-۱۷ جفت باز می‌باشد (۱۳)

مجله Nature methods این تکنولوژی را به عنوان روش سال انتخاب کرد، ZFNs ها همراه با نوکلئاز موثر شبیه فعال کننده رونویسی یا TALEN به عنوان ابزارهای ویرایش ژنوم بودند (۱۰). در سال ۲۰۱۳ چندین گروه به طور مستقل یک کلاس جدید از نوکلئازهای ویرایش کننده ژنوم به نام نوکلئازهای مهندسی کننده با RNAهای راهنما گزارش کردند. این سه نوکلئاز مکانیسم عملکرد مشابهی دارند که به صورت کلی عبارت است از: ۱- برش DNA کروموزومی در جایگاهی ویژه و ۲- فعال کردن سیستم‌های ترمیم درونی که نتیجه آن تغییر و تبدیل هدفمند ژنوم است (۱۱). این سه نوکلئاز که از آن‌ها به عنوان نوکلئازهای جایگاه-ویژه یا SSD نام برده می‌شود، برش‌های دو رشته‌ای در جایگاه‌های اختصاصی ژنوم ایجاد می‌کنند که در نتیجه مکانیسم‌های ترمیمی ژنوم باعث ترمیم این شکست‌ها خواهد شد. در جدول و شکل زیر عملکرد سه نوکلئاز را با هم مقایسه می‌شود (شکل ۱ و جدول ۱) (۱۲). در جدول ۲ منابع برخط برای طراحی نوکلئازها قابل برنامه‌ریزی لیست شده است.



شکل ۱- چگونگی عملکرد سه نوع نوکلئاز قابل برنامه‌ریزی

<sup>2</sup>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats

<sup>1</sup>Transcription activator – like effector nuclease

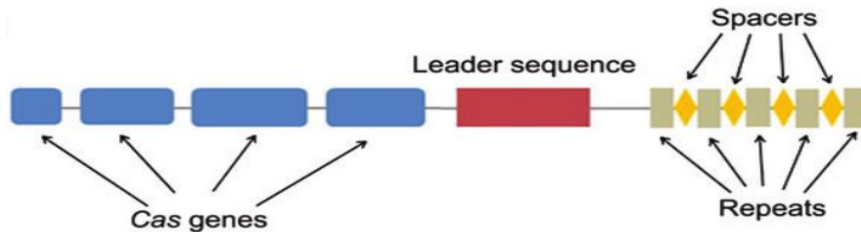
جدول ۱- مقایسه عملکرد نوع ابزار رایج در ویرایش ژن ها (۱۲)

سیستم نوکلناز سنتتیک	خصوصیات اصلی	مزایا	محدودیت‌ها
نوکلنازهای انگشت روی (ZFN)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- اندونوکلنازهای FokI متصل به انگشت‌های روی که با DNA هدف برهم‌کنش می‌دهد.</li> <li>- ۴-۶ موتیف انگشت روی برای اعمال اختصاصیت لازم است.</li> <li>- هر موتیف انگشت روی سه جفت باز DNA را تشخیص می‌دهد.</li> <li>- برش تک رشته‌ای</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- اختصاصیت بالا</li> <li>- ایمنی کم</li> <li>- بهبود رایج در کارآزمایی‌های بالینی استفاده می‌شود</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- غیر یکانی (غیرمدولار)، فرایندهای مهندسی سخت و پرکار</li> <li>- دشوار بودن پیش بینی اثرات سایتوتوکسیک این نوکلناز</li> <li>- برخی از نوکتوتیدهای سه تایی انگشت روی متناسب خود را ندارند.</li> <li>- یک جفت ZFN برای هدف گیری توالی اختصاصی DNA مورد نیاز است.</li> </ul>
نوکلنازهای افکتور شبه فعال کننده رونویسی (TALEN)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- اندونوکلنازهای FokI متصل به دمین‌های TALE که با DNA هدف واکنش می‌دهد</li> <li>- هر دمین TALE یک جفت باز DNA را تشخیص می‌دهد</li> <li>- برش تک رشته ای</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- آرایش یکانی (مدولار)، طراحی آرایش سراسرتر</li> <li>- ادغام دمین‌های TALE متعدد اختصاصیت اتصال را تحت تاثیر قرار نمی‌دهد</li> <li>- اختصاصیت هدف‌گیری مشابه با اثرات سایتوتوکسیک کمتر</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- باز ۵ جایگاه هدف TALEN باید یک تیمین باشد</li> <li>- اثرات خارج از هدف</li> <li>- اتصال TALEN به طور منفی از طریق متیلاسیون DNA تحت تاثیر قرار می‌گیرد</li> <li>- یک جفت ZFN برای هدف‌گیری توالی اختصاصی DNA مورد نیاز است</li> </ul>
تکرارهای کوتاه پالیندرومی منظم خوشه‌ای (CRISPR)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- آندونوکلناز Cas9 برگرفته از استرپتوکوکوس پیوژنز که توسط sgRNA به DNA هدایت می‌شود</li> <li>- اختصاصیت جایگاه که منشا آن توالی ۲۰ جفت بازی sgRNA است که از طریق تشکیل جفت باز واتسون کریک به DNA هدف متصل می‌شود</li> <li>- برش دو رشته‌ای</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- آسان بودن تولید به کمک تکنیک‌های مولوکولی کلونینگ</li> <li>- کارایی هدف‌گیری بالاتر</li> <li>- توانایی هدف‌گیری چندگانه برای هدف قرار دادن ژن‌های متعدد</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- نیازمند یک توالی PAM مجاور جایگاه هدف</li> <li>- اثرات خارج از هدف بیشتر</li> <li>- توانایی اتصال با دسترسی کروماتین تحت تاثیر قرار می‌گیرد</li> </ul>

جدول ۲- منابع برخط برای طراحی نوکلنازها قابل برنامه‌ریزی

اسم	سایت	وابستگی
CRISPR design	<a href="http://crispr.mit.edu/">http://crispr.mit.edu/</a>	Massachusetts Institute of Technology
E-CRISP	<a href="http://www.e-crisp.org/E-CRISP/">http://www.e-crisp.org/E-CRISP/</a>	DKFZ German Cancer Research Center
CRISPE design tool	<a href="http://www.broadinstitute.org/mpg/crispr_design/">http://www.broadinstitute.org/mpg/crispr_design/</a>	The Broad Institute of Harvard and MIT
Cas-OFFinder	<a href="http://www.rgenome.net">http://www.rgenome.net</a>	Harvard Medical School
CROP-IT	<a href="http://www.adlilab.org/CROP-IT/homepage.html">http://www.adlilab.org/CROP-IT/homepage.html</a>	University of Virginia
CHOPCHOP	<a href="http://chopchop.cbu.uib.no">http://chopchop.cbu.uib.no</a>	Harvard University
	<a href="http://">http://</a>	

(شکل ۲). واحدهای تکراری شامل توالی‌های مشابه و توالی‌های فاصله انداز دارای توالی‌های متفاوت مشتق از DNAهای خارجی است. عملکرد لوکوس‌های CRISPR با پروتئین‌های همراه با CRISPR (Cas) به عنوان سیستم ایمنی سازشی بر علیه DNAهای خارجی متخاصم می‌باشد (۱۴).



شکل ۲- ساختار تپیک یک لوکوس CRISPR

عملکرد این سیستم بدین صورت است که به عنوان یک ماشین ایمنی مولکولی، اسید نوکلئیک متخاصم را به شکل قطعات کوچک حفظ می‌کند. این قطعات کوچک در حملات بعدی استفاده می‌شوند و باعث تخریب اسید نوکلئیک‌های متخاصم می‌شود. این لوکوس‌ها شامل تکرارهای پست سر هم و توالی‌های فاصله انداز می‌باشند

DNA خواهد شد (۱۶). در این سیستم crRNA قابل برنامه‌ریزی و tracrRNA ثابت و بدون هیچ تغییری می‌باشد که می‌توانند به هم متصل شده و تشکیل sgRNA را بدهند که پروتئین Cas9 را به جایگاه مورد نظر هدایت و راهنمایی می‌کند. ژن‌های Cas در لوکوس CRISPR پروتئین‌های با فعالیت هلیکازی و نوکلئازی تولید می‌کنند (۱۵-۱۷).

وقتی که ما از این سیستم در ویرایش ژن‌ها استفاده می‌کنیم، احتیاج به دو جزء (یا ترکیب) داریم که عبارتند از: (۱) RNA راهنما کایمریک<sup>۵</sup> یا gRNA که تقلید کننده عمل مجموعه crRNA - tracrRNA می‌باشد و (۲) پروتئین Cas با فعالیت نوکلئازی. در این سیستم اگرچه ویژگی شناسایی هدف عمدتاً به توالی gRNA وابسته می‌باشد، ولی پروتئین Cas نیز احتیاج به شناسایی چند باز ویژه دارد که از آن به نام موتیف نزدیک فاصله انداز اولیه<sup>۶</sup> یا PAM یاد می‌شود. توالی PAM در میان گونه‌های مختلف باکتریایی متفاوت می‌باشد. برای مثال پروتئین Cas9 در باکتری استرپتوکوکوس پایورنز (spCas9) احتیاج به توالی 5'-NGG-3' دارد. همچنین این پروتئین در باکتری استرپتوکوکوس ترموفیلوس (stCas9) به توالی 5'-NNAGAAW-3' (W باز A یا T می‌باشد)، و در باکتری نایسریا مننژیتیدیس به توالی 5'-NNNGATT-3' نیاز دارد (۸، ۱۷). در جدول زیر (جدول ۳) توالی PAM

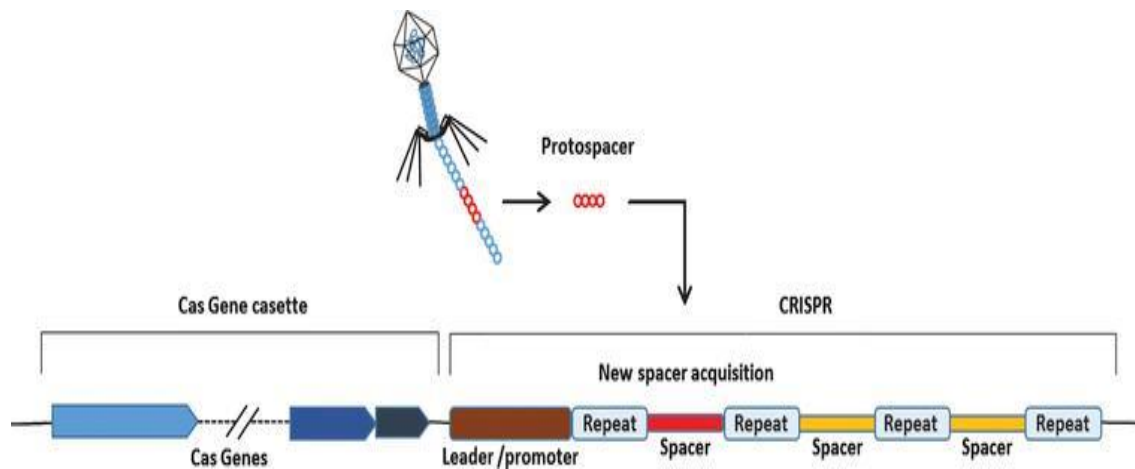
این سیستم به دو کلاس اصلی تقسیم می‌شود (پیشتر به ۶ نوع و چند زیر نوع تقسیم می‌شد) که اساس آن پروتئین‌های Cas می‌باشد. تاکنون بیش از ۴۰ خانواده پروتئین Cas مختلف گزارش شده است که نقش مهمی در پیدایش و تکوین crRNA، دخول توالی‌های فاصله انداز و برش DNA متخاصم بازی می‌کنند. در تیپ II سیستم CRISPR فقط به یک نوع پروتئین Cas به نام Cas9 احتیاج است (۱۵).

در این سیستم، DNA متخاصم (که به نام پروتواسپیسر<sup>۴</sup> نامگذاری می‌شود) وارد نواحی فاصله انداز در لوکوس CRISPR می‌شود (شکل ۳) و سپس به صورت یک نوع RNA بلند به نام pre-crRNA که شامل چندین واحد تکراری و فاصله انداز است، ترجمه می‌گردد. متعاقباً، این RNA پیش‌ساز بلند (pre-crRNA) به یک crRNA که واجد توالی مکمل یک فاصله انداز DNA خارجی می‌باشد به همراه مولکول RNA دیگری به نام trans-crRNA و یا tracrRNA که از ناحیه دیگری از لوکوس CRISPR رونویسی می‌شود، پردازش خواهد شد. نتیجه آن یک هترودوپلکس crRNA-tracrRNA می‌باشد که به عنوان یک مولکول راهنما به DNA خارجی هدف عمل خواهد کرد (crRNA مکمل توالی DNA خارجی می‌باشد) و در ادامه با همراهی پروتئین‌های Cas باعث القاء برش در DNA دورشته‌ای در جایگاه ویژه‌ای از

<sup>4</sup>Protospacers  
<sup>5</sup>Chimeric guide RNA  
<sup>6</sup>Protospacer adjacent motif

<sup>1</sup>Tandem repeat  
<sup>2</sup>Spacers  
<sup>3</sup>CRISPR – associated (Cas) proteins

تعدادی از باکتری ها آمده است که در ویرایش سلول های یوکاریوتی به کار می روند (۱۸).



شکل ۳- محل قرار گیری پروتواسپیسر در لوکوس CRISPR

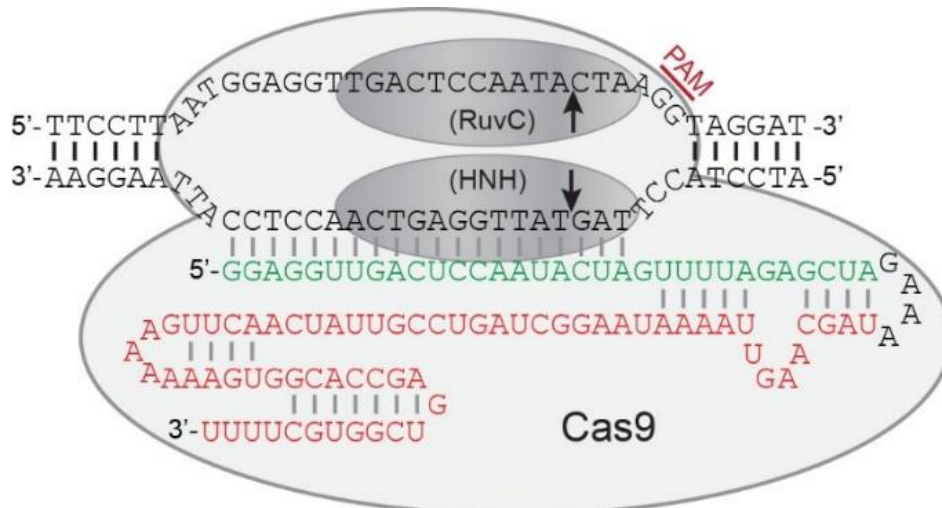
جدول ۳- توالی PAM در تعدادی از باکتری های بررسی شده

منشا	PAM	پروتئین Cas
استرپتوکوکوس پیوژنز	NGG	SpCas9
مهندسی شده از SpCas9	NGA	VRQR-SpCas9
مهندسی شده از SpCas9	NGCG	VRER-spCas9
استرپتوکوکوس ترموفیلوس	W=A or T ( ) N2AGAAW	SthCas9-CRISPR1
استرپتوکوکوس ترموفیلوس	NGGNG	Sth-Cas9-CRISPR3
نایسریا مننژیتیدیس	(M=A or C) N4GMITT	NmCas9
استافیلوکوکوس اورئوس	(R= A or G ) N2GRRT	SaCas9
مهندسی شده از SaCas9	(R= A or G) N2NRRT	KKH-SaCas9
برویباسیلوس لاترسپوروس	(D= A G or T) N4CND	BlatCas9
اسیدامینوکوکوس استرپتوکوک BV3L6	TTTN	AsCpf
لاکتوسپیراسنا باکتریوم ND206	TTTN	LbCpf1

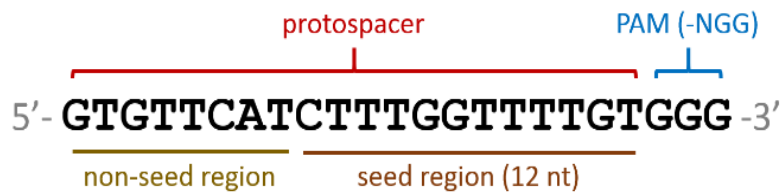
N= A, T, C or G

توالی PAM می شود (۱۹). دومین HNH یک دومین منفرد می باشد ولی دومین RuvC شامل سه زیر دومین است. بررسی های میکروسکوپی نشان داده که مجموعه SpCas9 با gRNA و DNA هدف ساختار دو تکه ای (دولبی) دارد که یک تکه از آن لوب تشخیص هدف بوده و لوب دیگر آن خاصیت نوکلئازی دارد. لوب نوکلئازی آن ترکیبی از دومین نوکلئازی HNH، دومین نوکلئازی RuvC و ناحیه انتهایی C می باشد (۲۰).

عموما در ویرایش ژنوم از نوکلئاز spCas9 استفاده می شود. مجموعه spCas9 - gRNA ابتدا در ژنوم توالی PAM را جستجو می کنند و متعاقب آن دو رشته DNA را از هم باز کرده و سپس تشکیل جفت باز DNA - RNA می دهند (شکل ۴). سپس دو دومین نوکلئازی پروتئین Cas9 یعنی دومین های HNH و RuvC مستقل از هم باعث برش در دو رشته DNA با پیوندهای واتسون و کریک می شوند که نتیجه آن برش خطی دو رشته میان بازهای سوم و چهارم بالادست



شکل ۴- چگونگی جفت شدن gRNA با DNA و نواحی که در DNA برش ایجاد می کند



شکل ۵- توالی تشخیصی در DNA و توالی ناحیه seed در آن

بر اساس CRISPR اثر off-target بیشتری نسبت به ابزارهای دیگر و ویرایش مثل TALEN و ZFN دارد (۲۱).

در یک گزارش معتبر و قوی Jinek و همکارانش نشان دادند که در شرایط آزمایشگاه برای برش DNA عدم اتصال صحیح تا بیش از ۵ نوکلئوتید از gRNA با DNA هدف می توانند تحمل شود. پس این ملاحظه باید در ویرایش ژنوم با سیستم CRISPR-Cas9 در موجودات زنده در نظر گرفته شود. البته روش‌های ساده‌تری برای کاهش این اثر ایجاد شده است (۱۸). تعدادی از مطالعات درباره اثرات بالقوه off-target

نشان داده‌اند که عدم جفت شدن صحیح<sup>۱</sup> در انتهای ۵' جایگاه هدف بهتر تحمل می‌شوند (نه در ناحیه seed و یا ۸ تا ۱۲ جفت بالا دست ناحیه PAM). بنابراین عدم جفت شدن صحیح کوچکتر از سه جفت باز و یا خارج از انتهای ۵' باعث القاء off-target در سلول‌های انسانی و موش صحرایی می‌شوند. در جدول زیر انواع متفاوت آنزیم Cas9 که برای

توالی تشخیصی DNA یک ناحیه حدوداً ۲۰ جفت باز در ناحیه crRNA است (شکل ۵)، اما نشان داده شده است که اضافه و یا حذف کردن چند جفت باز می‌تواند ویژگی آن را بهبود ببخشد. انتهای ۳' از ناحیه crRNA و انتهای ۵' از ناحیه tracrRNA عموماً چهار جفت باز 5'-GAAA-3' دارد که به هم متصل شده و تشکیل یک ساختار stem loop را می‌دهند که به آن tetraloop گفته می‌شود. همچنین یک لوپ فرعی دیگری سمت ۳' از tracrRNA وجود دارد که نقش مهمی در بیان بالای gRNA دارد (۱۸).

#### اثر جایگاه غیر هدف

اثر خاموش سازی جایگاه غیر هدف در تعداد کمی از مثال‌ها بررسی شده است. حداقل طول ناحیه جفت شونده در crRNA، ۱۲ جفت باز است که به آن ناحیه seed گفته می‌شود و در بعضی حالت‌ها می‌تواند باعث اتصال به نواحی دیگر از ژنوم شود. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که ویرایش ژنوم

<sup>1</sup>Mismatches

آلی تایمیدین است (مثل توالی 3'-TTTN-5') و همچنین برش دور از مرکز دو رشته به صورت staggered است که بر خلاف برش دو رشته DNA در Cas9 که به صورت انتهاهای کور می باشد. البته با بررسی های که محققین انجام داده اند، مشخص شده که نرخ موتاسیون در spCas9 (در حدود  $32 \pm 4$  درصد) بیشتر از نرخ موتاسیون در LbCpf1 (Lachnospiraceae bacterium Cpf1) و AsCpf1 (Acidaminococcus sp. Cpf1) که در حدود  $19 \pm 6$  درصد است، است (۲۲).

کاهش اثرات off-target مهندسی شده اند، با معایب و مزایای هر یک، فهرست شده اند (جدول ۴) (۲۲).

علاوه بر اندونوکلاز عمومی و رایج Cas9، آنزیم پروتئینی Cpf1 که یک اندونوکلاز با RNA راهنما و از کلاس II سیستم CRISPR است، برای ویرایش ژن ها در سلول ها مثل سلول های انسانی کاربرد دارد. این اندونوکلاز تفاوت هایی با اندونوکلاز Cas9 دارد که عبارتند از: Cpf1 احتیاج به فقط یک RNA راهنما (sgRNA) دارد یعنی این اندونوکلاز احتیاج به tracrRNA ندارد و توالی تشخیصی PAM آن غنی از باز

جدول ۴- خلاصه ای از پروتئین های Cas9 مهندسی شده و کاربرد آنها در ویرایش ژن ها (۲۲).

معایب	مزایا	ویژگی های Cas9
شکست های دورشته ای که با مسیر NHEJ ترمیم می شوند باعث ایجاد موتاسیون های حذف و اضافه می شوند	ویرایش ژنی هدایت شونده با RNA، اختصاصیت بالا، مهندسی آسان	Cas9 نوع وحشی استرپتوکوکوس پیوژنز (spCas9)
برخی از شکاف های ایجاد شده در DNA می توانند با مسیر NHEJ ترمیم شوند	شکست دورشته ای DNA ایجاد نمی شود، باعث تحریک ترمیم همولوگ (HDR) می شود	Cas9nickase (Cas9n)
کمپلکس های Cas9-sgRNA نیکاز دوتایی که رشته های مخالف DNA را هدف قرار می دهند باید طراحی شود	افزایش اختصاصیت، sgRNA دوتایی، باعث ارتقا مسیر HDR نسبت به نیکاز منفرد می شود	Dual sgRNA-Cas9nickases (Cas9dn)
محدوده ویرایش ۵ بازی، تبدیل اختصاصی C به T	شکست دورشته ای ایجاد نمی شود، کارایی بیشتری نسبت به spCas9 دارد، تبدیل مستقیم C به T	سیتیدین دامیناز متصل به Cas9 (D10A)
کاهش فراوانی حذف و اضافه های NHEJ در جایگاه های هدف	تنظیم حضور Cas9 را در هر مرحله چرخه سلولی، به طور موثری باعث ایجاد Knock-in در رده های سلولی و تصحیح ژنی می شود	spCas9-Gem






جهش در موتیف های D10A و H840A باعث غیر فعال شدن فعالیت کاتالیتیکی نوکلئاز Cas9 می شود که به آن dCas9 می گویند (Ma Y. et al., 2014). به عبارتی جهش در موتیف های نوکلئاز Cas9 منجر به یک نوع دیگر نوکلئاز به نام "نوکلئاز مرده یا Dead Cas" می شود که این نوع دیگر قادر به برش DNA نخواهد بود. بنابراین از آن می توان برای تنظیم رونویسی ژن مورد نظر استفاده کرد. به عبارتی با هدف گیری نواحی راه انداز ژن ها یا چارچوب های باز قابل خواندن با این نوع نوکلئازها می توان مانع اتصال آنزیم RNA پلی مرز و در نتیجه مانع رونویسی و تولید شدن mRNA شد (۲۳).

همچنین اتصال dCas9 به یک تعدیل کننده اپی ژنتیک می تواند برای روشن سازی اثر متبله شدن و برخی حالت های کروماتین در شرایط تعریف شده به کار رود. مثل تکنولوژی های ZF و TALE، پروتئین های ترکیبی dCas9 با دومین های کارکردی متنوعی، می توانند فعالیت های متفاوت و متنوعی را نشان دهند (شکل ۶) (۲۴)

<sup>3</sup>Dead

<sup>1</sup>Distal  
<sup>2</sup>Blunt end breaks

شکل ۶- کاربردهای متفاوت تکنولوژی CRISPR/Cas9

<b>ZF/TALE/dCas9</b>	VP16		فعالساز رونویسی
	KRAB		مهار رونویسی
	GFP		تصویر برداری ژنومی
	TET1		دمتلاسیون DNA
	LSD1		دمتلاسیون هیستون

در حالت فعال کردن رونویسی<sup>۱</sup> می توان از دومین فعال کننده مشتق شده از ویروس هرپس سیمپلکس به نام VP16 همراه با dCas9 استفاده کرد. در موارد غیر فعال کردن رونویسی<sup>۲</sup>، اگرچه خود پروتئین dCas9 می تواند مانع رونویسی شود، ولی ترکیب (اتصال) آن با دومین های رپرسور مثل KRAB می تواند به طور موثری مانع بیان ژن ها شود. ترکیب dCas9-GFP قادر به تصویر برداری پویا از جایگاه ژن ها در کشت سلولی است (۱۹). جدول زیر سه روش ویرایش ژنوم را در بعضی حالت ها و معیارها با هم مقایسه می کند (جدول ۵) (۲۵).

جدول ۵- مقایسه سیستماتیک سه روش ویرایش ژنوم

CRISPR/Cas9	TALEN	ZFN	
توالی ۲۰ نوکلئوتیدی sgRNA	مهندسی پروتئین برای هر جایگاه جداگانه	مهندسی پروتئین برای هر جایگاه جداگانه	ساختار
برهمکنش های DNA-RNA، بسیار قابل پیش بینی	برهمکنش پروتئین -DNA، قابلیت پیش بینی کمتر	برهمکنش پروتئین -DNA، قابلیت پیش بینی کمتر	هدف گیری
مکمل بودن sgRNA با توالی هدف با پروتئین Cas9	دو TALEN اطراف جایگاه هدف مورد نیاز است	دو ZFN اطراف جایگاه هدف مورد نیاز است	انتقال
دسترس پذیری زیاد	چالش برانگیز	چالش برانگیز	تسهیم
دسترس پذیری زیاد	از نظر تکنیکی چالش برانگیز است	از نظر تکنیکی چالش برانگیز است	سهولت ساخت کتابخانه و انتقال برای غربالگری های وسیع
بسیار مقرون به صرفه	مقرون به صرفه اما زمان بر	منابع فشرده و وقت گیر	هزینه کرد مالی و زمانی

و غلط را با نوع صحیح آن جابجا کرد، این بیماری به آسانی می تواند درمان شود (۲۶).

اگرچه تکنیک CRISPR کاربردهای وسیعی دارد، ولی در استفاده از آن با دو مشکل روبرو هستیم. اولین آن ها، مشکل عدم شناسایی جایگاه هدف یا off-target است. به تازگی یک تیم چینی سعی کردند که با استفاده از این سیستم اطلاعات ژنتیکی ژنوم ژن کد کننده CCR5 یک جنین انسان را ویرایش

همچنین این سیستم می تواند در ویرایش ژنوم گیاهان و برای نمونه، ایجاد فنوتیپ های مثل مقاومت به باکتری ها در آنها به منظور استفاده کمتر از حشره کش ها، استفاده شود. همچنین می توان از آن برای درمان بیماری های ژنتیکی ناشی از بعضی جهش ها در رشته های DNA، برای نمونه بیماری هانتینگتون که حاصل جهش در ژن HTT است، استفاده نمود. اگر بتوان با استفاده از سیستم CRISPR، نوکلئوتیدهای ناجور

<sup>1</sup>Transcriptional activation<sup>2</sup>Transcriptional repression<sup>3</sup>Dynamic imaging

۱) این تکنیک هنوز توسعه و بسط داده نشده است و روش‌های کامل و دقیق آن، به خصوص در مواردی که با ژنوم انسان سر و کار دارد، به طور دقیق ایجاد نشده است.

۲) دومین مشکل مربوط به مشکلات تکنیکی نیست. چون این تکنیک قوی‌ترین ابزار ویرایش ژنتیکی می‌باشد که تاکنون در تاریخ توسعه داده شده است، بلکه به توانمندساختن دانشمندان در ویرایش هر نوع ژنومی در هر موجودی بازمی‌گردد. ملاحظاتی اخلاقی مرتبط با استفاده ناصحیح آن در ژنوم انسان، برای نمونه طراحی سفارشی فرزندان توسط مشتریان و یا افزایش طول عمر کاربران به صورت نامعمول، به چشم می‌خورند (۲۶).

۳) ویرایش سلول‌های زایا در گونه‌های مدل مختلف برای ایجاد مدل‌های بیماری و یا مطالعه ساختار مولکولی عملکرد ژن‌های ویژه‌ای انجام شده است. یک مثال، کاربرد مشکل‌ساز این تکنولوژی در سلول‌های زایای انسانی مربوط به ژن‌های مرتبط با IQ می‌باشد. بنابراین قدرت این سیستم به مراحل رسیده است که امکان تبدیل خیالات بسیاری به واقعیت فراهم شده است.

لازم به ذکر است که در انگلستان دانشمندان مجوز استفاده از این تکنولوژی را برای ویرایش ژنوم جنین انسان بدست آورده‌اند (۲۵).

کنند (باعث ایجاد موتاسیون در آن ژن شوند) تا باعث مقاومت به ویروس HIV شوند. چون این ویروس‌ها برای ورود به سلول‌های سفید خونی احتیاج به رسپتور CCR5 دارند و موتاسیون در آن می‌تواند سبب تغییر در نقطه ورود ویروس HIV شود و یا به عبارتی توانایی تهاجم ویروس از دست برود. ولی وقتی محققین سعی در انجام این کار داشتند، متوجه میزان off-target بالایی در آزمایش شدند. این عدم مطابقت نوکلئوتیدها یا موتاسیون‌های ناخواسته می‌تواند منجر به مشکلات زیادی شود (۲۶).

مشکل دیگری که در استفاده از این سیستم مواجه هستیم، اصول اخلاقی (Ethics) آن است. این مشکل مربوط به ویرایش توالی‌های DNA نیست، بلکه مربوط به اثرات جانبی ویرایش‌های ژنتیکی می‌باشد. امروزه در بیشتر کشورها مجوز ویرایش ژنتیکی موجوداتی که باعث بهبود کشاورزی و یا استفاده‌های بیولوژیکی آنها می‌شوند، داده می‌شود. بنابراین حتی اگر اجازه ویرایش ژنتیکی موجودات برای اهداف کشاورزی و یا بیولوژیکی داده شود، اما ویرایش ژنوم انسان هنوز یک موضوعی مورد بحث، به دلایل زیر است:

## منابع

1. Knott GJ, Doudna JA. CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering. *Science*. 2018;361(6405):866-9.
2. Zhang J-P, Li X-L, Li G-H, Chen W, Arakaki C, Botimer GD, et al. Efficient precise knockin with a double cut HDR donor after CRISPR/Cas9-mediated double-stranded DNA cleavage. *Genome biology*. 2017;18(1):1-18.
3. Chakrabarti AM, Henser-Brownhill T, Monserrat J, Poetsch AR, Luscombe NM, Scaffidi P. Target-specific precision of CRISPR-mediated genome editing. *Molecular cell*. 2019;73(4):699-713. e6.
4. Tsai SQ, Joung JK. Defining and improving the genome-wide specificities of CRISPR-Cas9 nucleases. *Nature Reviews Genetics*. 2016;17(5):300-12.
5. Zarei A, Razban V, Hosseini SE, Tabei SMB. Creating cell and animal models of human disease by genome editing using CRISPR/Cas9. *The journal of gene medicine*. 2019;21(4):e3082.
6. Xu X, Qi LS. A CRISPR-dCas toolbox for genetic engineering and synthetic biology. *Journal of molecular biology*. 2019;431(1):34-47.
7. Rodríguez-Rodríguez DR, Ramírez-Solís R, Garza-Elizondo MA, Garza-Rodríguez MDL, Barrera-Saldaña HA. Genome editing: a perspective on the application of CRISPR/Cas9 to study human diseases. *International Journal of Molecular Medicine*. 2019;43(4):1559-74.
8. Yang G, Huang X. Methods and applications of CRISPR/Cas system for genome editing in stem cells. *Cell Regeneration*. 2019;8(2):33-41.
9. Govindan G, Ramalingam S. Programmable site-specific nucleases for targeted genome engineering in higher eukaryotes. *Journal of cellular physiology*. 2016;231(11):23.9۲-۸۰
10. Guha TK, Wai A, Hausner G. Programmable genome editing tools and their regulation for efficient genome engineering. *Computational and structural biotechnology journal*. 2017;15:146-60.
11. Nemudryi A, Valetdinova K, Medvedev S, Zakian S. TALEN and CRISPR/Cas genome editing

- systems: tools of discovery. *Acta Naturae* (англоязычная версия). 2014;6(3 (22)).
12. Gaj T, Gersbach CA, Barbas III CF. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in biotechnology*. 2013;31(7):397-405.
  13. Koonin EV, Makarova KS, Zhang F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Current opinion in microbiology*. 2017;37:67-78.
  14. Nishitani C, Hirai N, Komori S, Wada M, Okada K, Osakabe K, et al. Efficient genome editing in apple using a CRISPR/Cas9 system. *Scientific reports*. 2016;6(1):1-8.
  15. Shmakov S, Smargon A, Scott D, Cox D, Pyzocha N, Yan W, et al. Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. *Nature reviews microbiology*. 2017;15(3):169-82.
  16. Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*. 2015;13(11):722-36.
  17. Charpentier E, Richter H, van der Oost J, White MF. Biogenesis pathways of RNA guides in archaeal and bacterial CRISPR-Cas adaptive immunity. *FEMS microbiology reviews*. 2015;39(3):428-41.
  18. Haeussler M, Concordet J-P. Genome editing with CRISPR-Cas9: can it get any better? *Journal of Genetics and Genomics*. 2016;43(5):239-50.
  19. Barrangou R, Doudna JA. Applications of CRISPR technologies in research and beyond. *Nature biotechnology*. 2016;34(9):933-41.
  20. Ma Y, Zhang X, Shen B, Lu Y, Chen W, Ma J, et al. Generating rats with conditional alleles using CRISPR/Cas9. *Cell research*. 2014.5-122:(1)24;
  21. Heintze J, Luft C, Ketteler R. A CRISPR CASE for high-throughput silencing. *Frontiers in genetics*. 2013;4:193.
  22. Brookhouser N, Raman S, Potts C, Brafman D. May I cut in? Gene editing approaches in human induced pluripotent stem cells. *Cells*. 2017;6(1):5.
  23. Hille F, Charpentier E. CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance. *Philosophical transactions of the royal society B: biological sciences*. 2016;371(1707):20150496.
  24. Pickar-Oliver A, Gersbach CA. The next generation of CRISPR-Cas technologies and applications. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2019;20(8):490-507.
  25. Eid A, Mahfouz MM. Genome editing: the road of CRISPR/Cas9 from bench to clinic. *Experimental & molecular medicine*. 2016;48(10):e265-e.
  26. Shen S, Loh TJ, Shen H, Zheng X, Shen H. CRISPR as a strong gene editing tool. *BMB reports*. 2017;50(1):20.

## The new generation of genome editing technologies and applications of CRISPR-CAS9

Mohammadi M.<sup>1</sup>, Koukbaï Abad L.<sup>2</sup>, Ghazizadeh L.<sup>3</sup>, Rahimi A.A.<sup>3</sup> and Shakargozar M.A.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Pharmaceutical Biotechnology Dept., Cell Bank Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, I.R. of Iran

<sup>2</sup> Medical Biotechnology Dept., Molecular Center, School of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran

<sup>3</sup> Medical Biotechnology Dept., Cell Bank Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, I.R. of Iran

### Abstract

Genome editing technologies, especially CRISPR / Cas9, have a wide variety of applications in medicine, agriculture and industry. Nowadays, in many research centers and companies around the world, this technology is in use in the laboratories for the treatment of viral diseases, cancer and even plant breeding. The emergence and ease of working with this technique, which detects specific sequences of the genome, revolutionized gene editing and led to unexpected scientific advances and discoveries in gene therapy, disease modeling, and drugs were discovered, synthetic biology, neuroscience and agricultural sciences. Because the ability to make genetic changes in living cells and organisms is a fundamental tool in biological research, achieving specific targeted changes is very necessary and important. Genome editing has become very common with the emergence and development of nucleases with guide RNA. The system combines a scissor-like protein called Cas9 with a guide molecule (gRNA) that acts like a detective, locating a specific location in the genome and cutting it.

**Keywords:** Biotechnology, Agriculture, gene engineering, gene therapy, disease modeling