

## CRISPR/Cas9: ابزار قدرتمند مولکولی برای ویرایش ژنوم

محمد رضا نوری دلویی<sup>۱</sup>، سعیده کاوسی<sup>۲</sup>، نازنین رحیمی راد<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> استاد، دکترای ژنتیک مولکولی پزشکی، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

<sup>۲</sup> کارشناس ارشد ژنتیک مولکولی دانشگاه علوم پزشکی تهران

### چکیده

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

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

### مقدمه

میان افراد با پیش زمینه‌های متفاوت در دسترس است. با این وجود دانش ما، در رابطه با کارکرد ژن‌ها و واریانت‌ها تا همین اواخر بسیار محدود بوده است و این امر از جمله ناشی از کمبود یک روش مهندسی با توانایی ایجاد تغییرات هدفمند در توالی ژن‌ها به جهت تسهیل بررسی کارکرد مولکولی آن‌ها دارد. فنون توانمند ژنتیک با ایجاد انواع دست‌ورزی‌ها در سطح تک باز به آسان‌تر شدن ارزیابی کارکرد ژن‌ها و پیشرفت مطالعات مرتبط با الگوهای بیماری منجر شده است. نخستین جرقه‌های مهندسی ژنتیک در سال ۱۹۷۰ با روش‌های ارتقاء یافته برای تغییر ناحیه‌ای از DNA در مخمر توسط سیستم نوترکیبی هومولوگ زده شد. اواخر دهه ۱۹۸۰، Capecchi و

توالی یابی ژنوم انسان نقطه عطف در مطالعات پایه ژنتیکی بیماری‌ها به شمار می‌رود. پیشرفت‌های اخیر در روش‌های توالی یابی این امکان را فراهم آورده است که در خلال کمتر از یک هفته بتوان ژنوم کامل یک انسان را با فناوری Hiseq X10.5 با هزینه حدود ۱۰۰۰ دلار امریکا توالی یابی کرد. امروزه اطلاعات فراوانی در رابطه با توالی ژن‌ها و انواع واریانت‌های

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه ژنتیک پزشکی،

محمد رضا نوری دلویی (email: nooridaloi@tums.ac.ir)

تاریخ دریافت مقاله: ۹۶/۵/۳

تاریخ پذیرش مقاله: ۹۶/۸/۸

ژنتیک و ویژگی شناسایی و اتصال به توالی ویژه‌ای از DNA را در آن‌ها ایجاد کرد. با طراحی این آنزیم‌ها و تولید آن‌ها به شکل *in vitro* و انتقال آن‌ها به سلول‌ها می‌توان شکست‌هایی با جایگاه مشخص را القا کرد. برای دستیابی به این هدف، پژوهشگران بر روی شناسایی عوامل متصل شونده به DNA تمرکز کرده‌اند که توسط فنون مهندسی ژنتیک قابلیت اتصال به توالی خاص DNA را دارا می‌باشد و با استفاده از قلمروهای (Domains) کاتالیتیک ایجاد شکاف DNA در ناحیه موردنظر را منجر می‌شود (۳،۴).

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

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

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

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

مطرح شده برای ارتقاء این روش و توانایی این سیستم در انواع درمان‌های بیماری‌ها در معرض معرفی و بحث اجمالی قرار گرفته است.

### CRISPR/Cas9 در ایمنی اکتسابی باکتری‌ها

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

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

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

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

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

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

با توجه به دست‌ورزی راحت‌تر، مراحل ساده‌تر و پایین‌تر بودن هزینه‌ها CRISPR/Cas9 به عنوان سیستم برتر و انقلابی بزرگ در پژوهش‌های زیست‌شناسی انتخاب شد. این سیستم به واسطه ارتقای روش‌های درمانی به بهبود شرایط سلامتی انسان‌ها و مقابله با بسیاری از بیماری‌ها منجر شده است (۱۲). در این مقاله مروری با بهره‌گیری از ده‌ها مقاله معتبر و جدید و تجارب کسب شده علمی نگاه کوچکی به کارآمدترین روش مهندسی ژنوم "سیستم CRISPR/Cas9"، سپس روش‌های

جدول ۱. مقایسه انواع نوکلئازهای با قابلیت برنامه‌ریزی

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

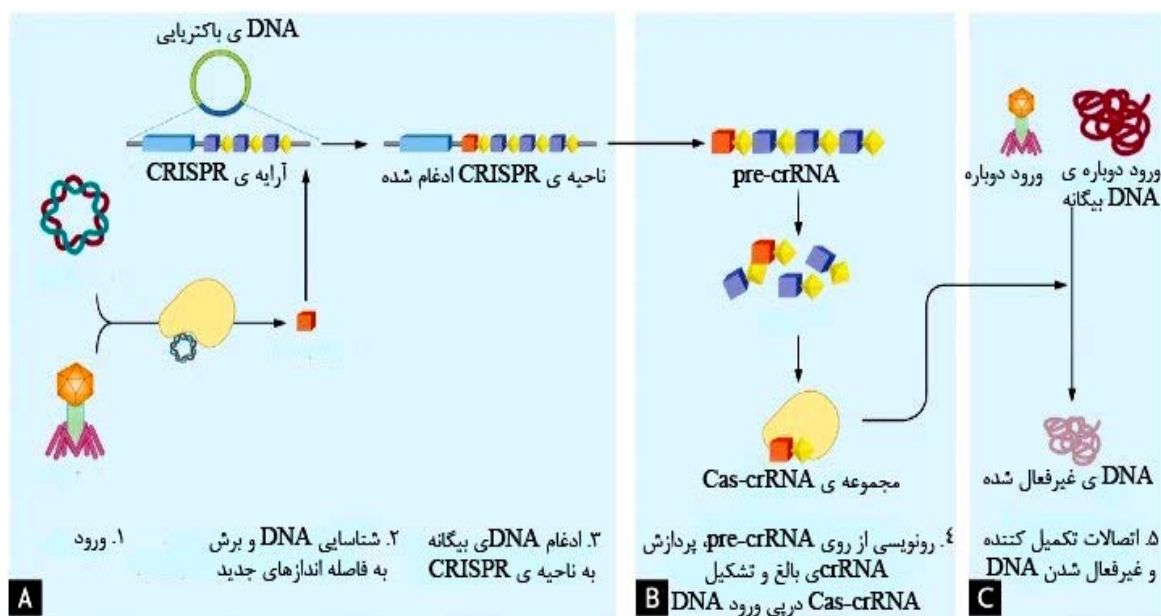
ZFN, zinc finger nuclease; TALEN, transcription activator-like effector nuclease; CRISPR, clustered regularly interspaced short palindromic repeats.

و ساخت کتابخانه، می‌توان از آن در گونه‌ها و رده‌های سلولی متفاوت بهره‌مند شد (شکل ۲). اگرچه که این سیستم نیز مانند هر فناوری دیگر با محدودیت‌هایی مشتمل بر هدف‌گیری‌های غیراختصاصی پروتئین Cas9 روبرو است. اهمیت بالای این چالش در حوزه‌ی آزمون‌های بالینی به پیدایش راه‌های متعدد برای مقابله با آن منجر شده است. در این راستا توجه به تفاوت‌های این هدف‌گیری غیراختصاصی میان انواع گونه‌ها و رده‌های سلولی حائز اهمیت است. به همین دلیل شماری از پژوهشگران بر روی افزایش ویژگی سیستم CRISPR/Cas9 تمرکز کرده‌اند. این یافته‌ها شامل طراحی کایمیک سیستمی است که از پروتئین Cas9 بدون کارکرد کاتالیتیک و قلمرو کاتالیتیک اندونوکلاز FokI تشکیل شده است. از سوی دیگر در روش ایجاد جفت شکاف می‌توان از واریانت‌های Cas9 با قلمرو‌های تکی با کارکرد نوکلئازی استفاده کرد که هر یک قادر به ایجاد یک تک شکاف هستند. با استفاده از یک جفت sgRNA می‌توان دو شکاف مرتبط و نزدیک به هم در مجموع یک شکاف دو رشته در DNA را شکل داد. اگرچه روش ایجاد جفت شکاف موجب افزایش میزان ویژگی سیستم CRISPR/Cas9 می‌شود، به ندرت شکاف‌های تکی ایجاد شده در DNA به درستی ترمیم نمی‌یابد؛ رخدادی که می‌تواند پیامدهای خطرناکی داشته باشد (۱۵).

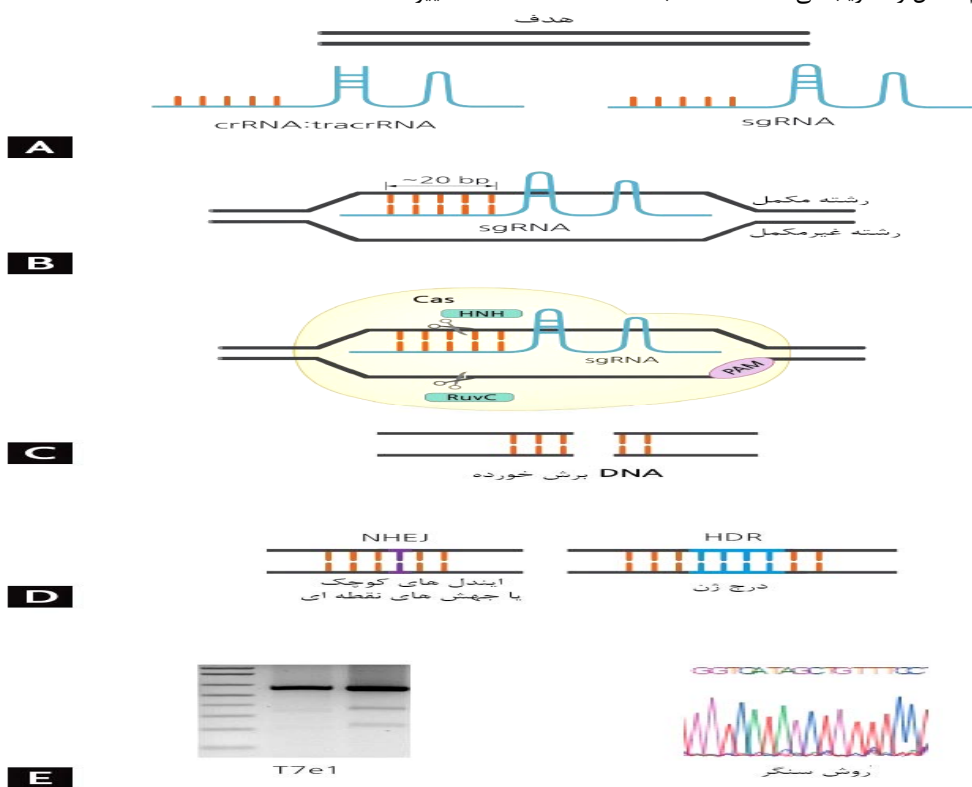
fdCas9، fCas9 و RFN ها واریانت‌هایی هستند که از ادغام قلمرو کاتالیتیک FokI با پروتئین Cas9 غیرفعال از لحاظ فعالیت کاتالیتیک (dCas9) حاصل می‌شوند و میزان ویژگی و دقت سیستم CRISPR/Cas9 را در ایجاد تغییرات در سطح ژنوم به مقدار زیادی افزایش می‌دهند. سایر روش‌ها بر پایه تیتراسیون میزان مولکول‌های sgRNA و پروتئین Cas9 و یا طراحی و ایجاد سایر شکل‌های پروتئین کوتاه شده sgRNA نیز به نوبه خود در افزایش ویژگی سیستم CRISPR/Cas9 نقش به‌سزایی ایفا می‌کنند.

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

نخست، سیستم‌های CRISPR/Cas9 هستند که از چند ریز جزء عمل‌کننده از جنس RNA تشکیل شده‌اند و شامل تیپ I و III و تیپ IV هستند و رده‌ی دوم، سیستم‌های CRISPR/Cas9 از یک تک جزء عمل‌کننده از جنس RNA تشکیل شده‌اند که شامل تیپ II و تیپ V می‌باشند (۱۴). سیستم CRISPR/Cas9 کارکردی مانند ماشین سیستم ایمنی مولکول دارد و با ایجاد یک حافظه مولکولی از تهاجم‌های پیشین به شکل یک توالی فاصله‌انداز به کمک سیستم ایمنی می‌آید. در واقع از توالی قطعه فاصله‌انداز برای هدف‌گیری اسید نوکلئیک به شکل CRISPR RNA یا به اختصار crRNA استفاده می‌شود. امروزه انواع متفاوتی از سیستم‌های CRISPR/Cas9 یافت شده که قادر به هدف‌گیری مولکول‌های DNA و RNA به واسطه‌ی مجموعه چندریبونوکلئوپروتئینی هستند. ساده‌ترین نوع آن تیپ II است که تنها اندونوکلاز Cas9 را دارد و هدایت آن توسط RNA راهنما (guide RNA) متشکل از CRISPR و ترانس اکتیو (tracrRNA: Trans activating CRISPR RNA) انجام می‌پذیرد. این مولکول RNA به گونه‌ای مهندسی شده است که توالی مربوطه را به شکل یک RNA راهنمای تک رشته sgRNA ارائه دهد و در خلال اتصال به اندونوکلاز Cas9 آن را هدایت کند. مجموعه ریبونوکلئوپروتئینی متشکل از اندونوکلاز Cas9 و RNA به منظور یافتن توالی مکمل روی DNA، شروع به اسکن کردن DNA می‌کند و در پی آن، پیش از موتیف مرتبط با توالی فاصله‌انداز PAM (Protospacer Associated Motif) توالی NGG، یک برش ایجاد می‌کند. توالی PAM که برای ایجاد برش توسط اندونوکلاز Cas9 ضروری است، قادر به تشخیص DNA خودی از بیگانه است و به همین دلیل است که گونه‌های باکتریایی و آرکئی‌ای در DNA خودی شکاف ایجاد نمی‌کنند. سیستم CRISPR/Cas9 از sgRNA برای شناسایی توالی مکمل در DNA هدف استفاده کرده و به شکست دورشته‌ای در ناحیه موردنظر منجر می‌شود. به همین دلیل سیستم CRISPR/Cas9 به شدت به قانون جفت شدن بازهای واتسن و کریک بین RNA و DNA هدف که به راحتی می‌توان توسط فنون مهندسی ژنتیک در آن دخل و تصرف کرد، وابسته است. لازم به تاکید است که استفاده از این روش برای ویرایش ژنوم یوکاریوت‌ها تنها نیازمند دستکاری توالی کوتاه sgRNA است و هیچ نیازی به دست‌ورزی‌های پیچیده در حوزه‌ی پروتئین‌ها نیست. با عنایت به سادگی نسبی این سیستم، کارایی بالا و قدرت تمایل زیاد برای کارکرد چندگانه



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



شکل ۲. نمایش ساده ای از فناوری ویرایش ژنوم CRISPR/Cas9 از نحوه ی انتخاب هدف تا طراحی RNA راهنما. (A) انتخاب ژن مورد هدف و طراحی RNA راهنما؛ (B) ایجاد جفت بازهای sgRNA و DNA ژنومی؛ (C) جستجوی موتیف PAM توسط Cas و شکافتن ژن هدف به واسطه القای شکست دو رشته؛ (D) تأیید نهایی تغییر ایجاد شده در ژن مورد نظر

ژنوم به شمار می‌روند. این قلمروها با پروتئین Cas9 که از لحاظ کاتالیکی غیرفعال است ادغام شده و بدین وسیله تنظیم کننده‌های مصنوعی رونویسی را براساس CRISPR/Cas9 تشکیل می‌دهند (۱۷).

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

### CRISPR/Cas9 ادغام شده برای نقشه‌یابی *de novo*

#### برهم‌کنش‌های ژنتیکی

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

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

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

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

#### تنظیم هدفمند در سطح رونویسی

بیشترین توجه پژوهشگران مولکولی در این محث بر روی توانایی القای شکست دورشته در ژنوم و استفاده از آن برای مطالعات کارکردی و اهداف درمانی متمرکز شده است. از این رو پروتئین Cas9 را می‌توان به گونه‌ای طراحی کرد که حتی فارغ از فعالیت نوکلئازی نیز ویژگی اتصال به توالی DNA در ژنوم هدف را در خود حفظ کند. به‌همین دلیل استفاده از پروتئین‌های کایمریک انگشت روی و یا TALEs به عنوان بخش متصل شونده به DNA و دیگر قلمروهای کاتالیکی تنظیم کننده رونویسی از ملزومات کنترل رونویسی در سطح

جدول ۲. نمونه‌های ژن‌های تغییر یافته در انواع رده‌های سلولی

منبع	نوکلئاز	تحویل	راهکار	ژن هدف	بیماری	دودمان سلولی
Lee et al. (2012)	ZFN	Plasmid	HDR-mediated cDNA knock-in	<i>CFTR</i>	Cystic fibrosis	HBE, CFTE
Li et al. (2011)	ZFN	AAV	HDR-mediated addition of corrective cDNA	<i>hF9</i>	Hemophilia B	K-562, Hep3B
Voit et al. (2014)	TALEN	Plasmid	HDR-mediated cDNA knock-in	<i>HBB</i>	Sickle-cell anemia	K-562
Lombardo et al. (2007) Urnov et al. (2005) Matsubara et al. (2014) Genovese et al. (2014)	ZFN/TALEN	IDLV, mRNA	HDR-mediated cDNA knock-in	<i>IL2R<math>\gamma</math></i>	SCID	K-562, hCD4+ T cells, HEK-293, lymphoblastoid cells, Jurkat cells, hESCs
Ousterout et al. (2015) Ousterout et al. (2015) Benabdallah et al. (2013) Ousterout et al. (2013)	ZFN/CRI SPR ZFN TALEN	Plasmid Plasmid	Excision of exons 51 or 45–55, restoring the reading frame Addition of the microdystrophin gene NHEJ restoration of reading frame	<i>DMD</i>	DMD	Immortalized patient myoblasts
Osborn et al. (2013)	TALEN	Plasmid	HDR using a ssODN	<i>COL7A1</i>	Epidermolysis bullosa	Patient fibroblasts
Zhen et al. (2014) Kennedy et al. (2014) Hu et al. (2014) Yu et al. (2015) Lin et al. (2014) Seeger et al. (2014) Zhen et al. (2015) Dong et al. (2015) Liu et al. (2015) Kennedy et al. (2015) Ramanan et al. (2015) Hu et al. (2014)	CRISPR	Plasmid	NHEJ-mediated disruption of promoter, <i>E6</i> , and <i>E7</i> gene	<i>E6, E7</i>	HPV	SiHa, C33-A, Caski
Lin et al. (2014) Seeger et al. (2014) Zhen et al. (2015) Dong et al. (2015) Liu et al. (2015) Kennedy et al. (2015) Ramanan et al. (2015) Hu et al. (2014)	CRISPR	Plasmid	NHEJ-mediated disruption of multiple genes	Multiple	HBV	Huh7, HepG2, HepAD38, HepaRG
Hu et al. (2014)	CRISPR	Plasmid	NHEJ-mediated disruption of viral genes	LTR U3 region	HIV	CHME5, HeLa, TZM-b1, U1

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

شده از ژنوم هستند. در واقع توانایی این سیستم در شناسایی یک تک ژن و یک جفت ژن موجب یک کیفیت سنجی سیستماتیک از ارتباطات ژنتیکی در انسان می‌شود. به همین منظور با ترانس‌داکت کردن کتابخانه ویروسی dual-gRNA درون یک جمعیت سلولی که به شکل پایدار Cas9 را بیان می‌کنند و رشد دادن آن‌ها و بررسی تغییرات gRNA در زمان‌های متفاوت می‌توان ارتباطات ژنتیکی را بررسی کرد. با استفاده از این روش ۷۳ جفت ژن شامل ژن‌های سرکوب کننده تومور، انکوژن‌ها و ژن‌های هدف داروهای ضد سرطان را به شکل ترکیبی غیر فعال کرده و ارتباط بین آن‌ها را با جزئیات مورد بررسی قرار دادند. در نتیجه‌ی این پژوهش‌ها،

در این سیستم RNA راهنما gRNA به همراه پروتئین Cas9 توالی‌هایی از ژنوم را که هومولوگ gRNA می‌باشد، هدف قرار می‌دهد و به همین ترتیب با دستکاری کردن gRNA و با استفاده از چندین gRNA در یک مجموعه، هم‌زمان اهداف متفاوتی را در یک سلول مورد ویرایش قرار داد. در این راستا، با ادغام کردن هدف‌گیری چندگانه مجموعه‌ی CRISPR/Cas9 با آرایه‌های الیگونوکلیوتیدی، فنی به دست آمده است که قادر به شناسایی و ویرایش ۱۰<sup>۵</sup> جفت ژن و ساخت کتابخانه‌های دوگانه dual-gRNA می‌باشد. هر یک از gRNA ها قادر به شناسایی یک ژن یا یک توالی نامنظم حذف

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

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

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

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

### CIRCLE-seq

به راحتی می‌توان CRISPER/Cas9 را به نحوی برنامه‌ریزی کرد که به شکل هدفمند در ژنوم یک شکست دورشته‌ای را



توسط هدف‌گیری چندگانه ژن‌ها نیز شده‌اند. مزیت این الگوها در بازسازی و امکان بررسی بیماری‌های پیچیده انسانی مانند بیماری‌های تحلیل برنده اعصاب است. با این وجود الگوهای موشی نسبت به سایرین از مزایای بیشتری از جمله به صرفه بودن هزینه کار کردن با آن‌ها برخوردار هستند و علاوه بر آن الگوهای موشی برای مطالعات گسترده جهش‌زایی به شکل *in vivo* بسیار مناسب هستند (۲۷).

### ج) در زیست‌شناسی مصنوعی

استفاده از روش CRISPR/Cas9 در زیست‌شناسی مصنوعی شامل عموم مفاهیم مرتبط با طراحی و انتقال ژن‌های مصنوعی درون سلول‌های زنده می‌شود. از آنجایی که این ژن‌های مصنوعی متشکل از حسگرها، پردازشگرها و محرک‌ها هستند، زیست‌شناسی مصنوعی نه تنها دارای توانایی ارتقاء مطالعات پایه زیست‌شناسی است، بلکه قادر به ایجاد پیشرفت‌هایی چشمگیر در حوزه‌های کارکردی بالینی و درمان، تولید سوخت‌های زیستی و تولید مواد شیمیایی مفید است (۲۸).

یکی از مهم‌ترین کاربردهای CRISPR/Cas9 در گیاهان در محصولات محصولاتی مانند برنج، گندم، ذرت و تنباکو است. برای نمونه، با استفاده از روش CRISPR/Cas9 می‌توان ژن‌های MLO (Mildew-resistance locus) هدف قرار داده و غیر فعال کرد. این ژن‌ها، کدکننده پروتئین‌هایی هستند که بر علیه بیماری powdery mildew در گندم‌های هگزاپلوئید عمل می‌کنند (۲۹).

از سیستم CRISPR/Cas9 می‌توان برای بررسی سیستماتیک کارکرد ژن‌ها در سلول‌های انسان نیز بهره گرفت. کتابخانه لنتی ویروسی sgRNA را می‌توان بر علیه ژن‌های شناسایی شده به واسطه غربالگری‌های کارکردی آنالیزهای حساس توالی یابی نسل جدید استفاده کرد. انتظار می‌رود که غربالگری این کتابخانه قدرتمند با رویکرد از دست دادن کارکرد موجب تسهیل شناسایی ژن‌هایی شود که نقشی اساسی در فرایندهای زیستی متفاوت مانند سمیت دارویی، هدف‌گیری مولکول‌های درمانی و بیان فنوتیپ‌های مشخص ایفا می‌کنند (۳۰).

با استفاده از کتابخانه‌های وسیع از RNA های منفرد راهنما SgRNA و اندونوکلاز Cas9 می‌توان با کارایی بسیار بالا از دست دادن‌ها و کسب کارکردهایی را که به شماری از فنوتیپ‌های خاص منجر می‌شوند بررسی کرد و بدین وسیله به شماری از پرسش‌های پیچیده در حوزه‌ی زیست‌شناسی پاسخ داد. برای نمونه، به جهت بررسی کاربرد سیستم CRISPR-

که توسط GUIDE-seq و HTGTS شناسایی بوده‌اند، می‌باشد. این روش افزون بر این که می‌تواند همه‌ی جهش‌های ناخواسته را در ژنوم شناسایی کند، قادر به انجام این فرایند بدون نیاز به ژنوم مرجع است. این خصوصیت در رابطه با موجوداتی که تمام ژنوم آن‌ها در دسترس نیست و یا توالی ژنوم آن‌ها دارای هتروژنی بالایی می‌باشد، حائز اهمیت است. سرانجام، CIRCLE-seq قادر به شناسایی جهش‌های ناخواسته‌ای است که توسط چندشکلی‌های ویژه تک نوکلئوتیدی (SNP) افزایش و یا از بین رفته‌اند می‌باشد و به این دلیل این روش برای ایجاد نیم‌رخ شخصی جهش ناخواسته در افراد از کارایی بالایی برخوردار است (۲۲).

### اشاره‌ای بر کاربردهای امروز و فردای CRISPR/Cas9

#### الف) در پژوهش‌های سرطان

چنانچه می‌دانیم همه سرطان‌ها حاصل از جهش‌های پرشمار و متنوعی هستند که به رشد و تکثیر بیش از حد سلول‌ها و بروز فنوتیپ‌های بدخیم منجر می‌شود. بستر رخداد و حیطه مختل شده توسط این جهش‌ها را می‌توان به ۴ دسته مجزا رده بندی کرد: (انکوژن‌ها، سرکوب‌کننده‌های تومور، عوامل اپی‌ژنتیکی و ژن‌های ایجادکننده مقاومت به شیمی درمانی) (۲۳-۲۵).

سیستم CRISPR/Cas9 به عنوان یک ابزار قدرتمند و با ویژگی بالا، توانایی به اصلاح این جهش‌ها و درمان تقریبی سرطان‌های حاصل از آن‌ها را دارد. از آنجا که تغییرات انکوژنی در شماری از سرطان‌ها، افزایش تکثیر سلول‌ها و وضعیت بدخیمی را در پی دارند، می‌توان انکوژن‌هایی مانند گیرنده تیروزین کینازی Erb2 را به طور مستقیم توسط روش CRISPR/Cas9 هدف قرار داد. از یک دیدگاه تکمیلی توسط روش CRISPR/Cas9 می‌توان جهش‌های عامل سرطان را در رده‌های سلولی انسان و الگوهای حیوانی ایجاد کرد. در همین راستا رده‌های سلولی سرطان‌های ریه، لوکمی میلوئیدی حاد، سرطان کبد و سرطان پانکراس ساخته شده‌اند (۲۶).

#### ب) در الگوهای حیوانی

از روش CRISPR/Cas9 می‌توان در الگوهای حیوانی مبتلا به انواع بیماری - از بیماری‌های ارثی تا سرطان‌ها- نیز بهره گرفت (جدول ۳). تغییرات قابل توارث را توسط انتقال سیستم CRISPR/Cas9 و هدف‌گیری مستقیم یک و یا چند الل در تخم ایجاد کرد. در میان الگوهای حیوانی ترانسژنیک، بیشتر آزمون‌ها بر روی الگوهای موشی شکل گرفته است، اگرچه پژوهشگران موفق به ساخت الگوهای پرمات‌های غیرانسانی

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

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

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

در سلول های سرطانی ریه مورد استفاده قرار گرفته است (۳۱).

به علاوه از سیستم CRISPR-Cas9 برای بررسی نواحی غیرکدکننده ژنوم نیز استفاده می شود بدین شکل که با استفاده از RNA راهنمای تک رشته (SgRNA)، جهش هایی در لوکوس های غیرکدشونده ایجاد می شود تا به وسیله آن ال های کارکردی در افزایشدهی ژن *BCL11A*، لوکوس *POU5F1*، لوکوس *CUL3* و مکان های اتصال عوامل رونویسی همانند P53 و ESR1 یافت شوند (۳۲).

اگرچه هریک از کتابخانه های SgRNA برای یک هدف خاص طراحی شده اند، اما مراحل پایه ای طراحی بین همه ی آنها مشترک است. در ابتدا نواحی ژنومی دلخواه به جهت هدف-گیری کتابخانه SgRNA توسط قوانین هدف گیری SgRNA شناخته شده مشخص می شوند. برای نمونه، هدف گیری

Cas9 در ارزیابی های ژنومی از روش غیر فعال کردن ژنوم توسط سیستم CRISPR-Cas9 (Gecko) و کتابخانه های SAM برای شناسایی ژن ها توسط غیر فعال کردن یا فعال سازی سلول های سرطانی ملانوما را تحت تیمار با مهارکننده BRAF، Vemurafemib قرار می دهند. افزون بر مقاومت به Vemurafemib، ارزیابی توسط CRISPR-Cas9 دیدگاه های جدیدی بر روی فرآیند مولکولی مقاومت ژن ها به داروها و سموم، پاسخ سلولی به هیپوکسی و نقش عوامل میزبان طی عفونت با فلاو ویروس ها (flaviviruses) گشوده شده است. اگرچه بیشتر ارزیابی ها در شرایط *in vitro* شکل گرفته است، سیستم Cas9 در محیط برون تنی در سلول های دندردیتی برای مطالعه ی پاسخ به لیپوپلی ساکاریدهای باکتریایی و در محیط *in vivo* برای شناسایی عوامل اصلی در ایجاد متاستاز

اضافه‌های کوچک و در نتیجه از دست رفتن کارکرد ژنی منجر می‌شود. از سوی دیگر کارایی NHEJ در مواردی بیشتر است زیرا این فرایند در همه‌ی مراحل چرخه‌ی سلولی فعال است و به هیچ‌گونه الگویی برای ترمیم نیاز ندارد. شایان ذکر است که برخی از اجزای سیستم ترمیمی HDR تنها در مراحل S و G2 چرخه‌ی سلولی بیان می‌شوند، این واقعیت به محدود شدن استفاده از HDR در سلول‌های تقسیم‌شونده و ممانعت استفاده از آن‌ها در سلول‌های پسامیتوزی مانند نورون‌ها و کاردیومیوسیت‌ها منجر شده است. به این دلیل، کنترل کارایی سیستم ترمیم HDR بیشتر تلاش‌ها را برای رسیدن به هدف افزایش تأثیر اصلاح ژن‌ها به خود اختصاص داده است (۳، ۳۴).

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

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

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

۱- به حداقل رساندن فعالیت سیستم در ایجاد جهش‌های ناخواسته  
۲- به حداکثر رساندن حساسیت و ویژگی سیستم در شناسایی اهداف و ایجاد جهش  
۳- دوری جستن از انواع تکرارهای هموپلیمیری همانند GGGG یا AAAA

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

### حوزه‌های مرتبط با پیشرفت‌های فنی سیستم CRISPR/Cas9

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

**ترمیم دورشته.** چنانچه پیش‌تر اشاره شد می‌توان نرخ ویرایش‌ها و تغییرات DNA را توسط دو سیستم ترمیم درون سلولی شکست دورشته ارزیابی کرد. HDR برای اصلاح ژن و درج آن مناسب‌تر از NHEJ است زیرا NHEJ به حذف و

RNA وجود دارند. این روش‌ها شامل الکتورپوریشن (electroporation) انتقال هیدرودینامیک و لیپوزوم‌ها هستند. بیان موقت پروتئین‌ها و mRNA های انتقال داده شده توسط روش‌های غیروبیروسی به درون سلول‌ها، موجب کاهش سمیت و هدف‌گیری ناپجا نسبت به سیستم‌های انتقالی ویروسی می‌شود (۴۱).

فناوری CRISPR/Cas9 از مزایای بی‌شماری برخوردار است. برای نمونه می‌توان از آن به عنوان ابزاری برای برطرف کردن شماری از نقایص که به شکل سیستماتیک و یا از زمان تولد بروز می‌کند مانند فیبروز کیستیک (CF) و هانتینگتون استفاده کرد. با این همه، مشخص کردن مرزهای کاربرد این روش و تعیین مبتلایان مناسب، امروزه معلوم شده است. با این حال هم‌چنان در رابطه با امنیت و میزان کارایی فناوری CRISPR/Cas9 بحث‌هایی وجود دارد. از جمله، یکی از بزرگترین نگرانی‌ها در رابطه با این فناوری، استفاده‌ی افراد سودجو برای ایجاد تغییراتی در رویان‌های انسانی در راستای اهداف بیژنیک است. به همین دلیل نیاز به یک نظارت و کنترل دقیق، مسئولانه و انسانی در این حوزه توسط یک سازمان معتبر بین‌المللی کاملاً احساس می‌شود (۴۲).

### جمع بندی

اکتشاف فناوری CRISPR/Cas9 به عنوان سیستم ایمنی در باکتری‌ها در برابر پاتوژن‌ها و استفاده از آن به عنوان ابزاری کارآمد در راستای ایجاد تغییرات هدفمند در ژنوم به انقلاب عظیمی در پژوهش‌های پایه‌ای زیست‌شناسی منجر شده است. قدرت فزاینده این فناوری در بررسی سیستماتیک کارکرد ژن‌ها در سلول‌های پستانداران، مطالعه‌ی انواع تغییرات ژنومی در خلال پیشرفت سرطان‌ها و سایر بیماری‌ها و توانایی بالقوه‌ی آن در اصلاح جهش‌های ژنتیکی مسبب اختلالات وراثتی غیرقابل انکار است. در این راستا شواهد حاکی از آن است که مطالعات آتی تمرکز خود را بر روی بهینه‌سازی این فناوری گزارده‌اند. شناخت بهتر سازوکار سیستم‌های ترمیمی ایجاد شده درون سلول در پی شکست دورشته حاصل از اندونوکلاز Cas9 موجب افزایش ویژگی تغییرات هدفمند ژنومی می‌شود. شکل‌گیری روش‌های ویژه به جهت انتقال ایمن و کارآمد پروتئین Cas9 و RNA راهنما به سلول‌ها و بافت‌ها برای بهره‌وری مناسب از این فناوری در ژن درمانی انسان مورد نیاز است.

استفاده از اندونوکلاز Cas9 تغییر یافته به همراه دو sgRNA جداگانه که هر کدام یک شکاف تک رشته بر روی رشته‌های مخالف هم ایجاد می‌کنند موجب کاهش قابل توجه نرخ هدف‌گیری ناپجا در انواع سلول‌ها می‌گردد. افزون بر این، کوتاه کردن توالی sgRNA به اندازه‌ای که توالی هدف مکمل آن کوتاه‌تر از ۲۰ نوکلئوتید شود نیز موجب کاهش نرخ هدف‌گیری اشتباه می‌شود. از سوی دیگر پژوهشگران به واسطه‌ی ادغام پروتئین Cas9 که از لحاظ کاتالیکی غیرفعال شده است با نوکلئاز FokI و تشکیل ساختار fCas9 قادر به شناسایی توالی هدف با نرخ بسیار بالاتری نسبت به پروتئین وحشی درون سلول‌های انسان هستند (۳۷).

**انتقال.** انتقال کارآمد ابزارهای تغییردهنده ژنوم در سلول‌ها یکی دیگر از چالش‌های پیش رو به جهت ارتقای کارایی و ویژگی این سیستم‌ها است. انواع روش‌های ویروسی و غیروبیروسی برای انتقال و ارائه اندونوکلاز Cas9 به سلول‌ها در محیط‌های *in vivo* و *in vitro* مورد ارزیابی قرار گرفته است. بر اساس نوع انتقال و میزان پایداری بیان نوکلئازها هر دو احتمال هدف‌گیری ناپجا و رخداد واکنش ایمنی امکان پذیر است (۳۸).

ناقلین ویروسی مانند ویروس‌های مجتمع با آدنو (Adeno-associated viruses: AAV) و لنتی ویروس‌ها رایج‌ترین سیستم‌های انتقالی هستند و امروزه به جهت استفاده در مرحله‌ی بالینی نیز مورد تأیید قرار گرفته‌اند. ویروس AAV به ویژه یک نامزد مناسب برای شرایط *in vivo* محسوب می‌شود که مزایایی مانند تحریک سیستم ایمنی در درجات بسیار پایین، سروتیپ‌های کاملاً شناخته شده و قابلیت هدف‌گیری بافت‌های متفاوت مشتمل بر چشم، مغز، کبد و عضله را دارا می‌باشد. از جمله چالش‌های پیش رو در استفاده از AAV ها به عنوان ناقل، ظرفیت پایین پذیرش آنها (۴/۸ کیلوباز) است. به این دلیل پژوهشگران در صدد استفاده از دو ناقل جداگانه AAV برای انتقال توالی کد کننده Cas9 و sgRNA هستند. در روشی دیگر به جهت غلبه بر این محدودیت اندازه می‌توان از پروتئین‌های ارتولوگ Cas9 طراحی شده با طول کوتاه‌تر استفاده کرد. علاوه بر مشکل اندازه‌ی قطعه‌ی حمل شونده، ناقلین ویروسی به واسطه ایجاد بیان پایدار نوکلئازها قادر به ایجاد سمیت و ناپایداری در ژنوم می‌باشند (۳، ۳۹، ۴۰).

شایان تأکید است که انواع متفاوتی از روش‌های غیروبیروسی به جهت انتقال سیستم CRISPR/Cas9 به شکل پروتئین و

## REFERENCES

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

2. Kleinstiver BP, Pattanayak V, Prew MS, Tsai SQ, Nguyen NT, Zheng Z, et al. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature* 2016;529:490-5.
3. Noori-Dalooi MR, Ed. Emery's elements of medical genetics. 8th ed. Tehran, Iran: Jame-e-negar and Salemi Publication; 2017. [In Persian]
4. Krejci L, Altmannova V, Spirek M, Zhao X. Homologous recombination and its regulation. *Nucleic Acids Res* 2012;40:5795-818.
5. Noori-Dalooi MR, Alvandi E. Micro RNA: Small but full of mystery and use. *Journal of Tehran University of Medical Sciences* 2006;64:5-18. [In Persian]
6. Jackson AL, Linsley PS. Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application. *Nat Rev Drug Disco* 2010;9:57-67.
7. Noori-Dalooi MR, Vand Rajabpour F. Roles of miRNAs in gene expression regulation, apoptosis, diagnosis and treatment of cancer. *Medical Science Journal of Islamic Azad Univesity-Tehran Medical Branch* 2011;21:151-61. [In Persian]
8. Noori-Dalooi MR, Nejatizadeh A, Eds. MicroRNA in disease and health: Diagnostic and therapeutic potentials. *Gene Therapy Development and Future Perspectives*. Rijeka, Croatia: InTech; 2011. P.93-120.
9. Noori-Dalooi MR, Abdollahzadeh R, Asadollahi K. Targeted genome editing with engineered nucleases-A new approach in gene therapy. *Journal of Sabzevar University of Medical Sciences* 2014; 21: 131-144. [In Persian]
10. Silva G, Poirot L, Galetto R, Smith J, Montoya G, Duchateau P, et al. Meganucleases and other tools for targeted genome engineering: perspectives and challenges for gene therapy. *Curr Gene Ther* 2011;11:11-27.
11. Joung JK, Sander JD. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013;14:49-55.
12. Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet* 2010;11:636-46.
13. Hale CR, Zhao P, Olson S, Duff MO, Graveley BR, Wells L, et al. RNA-guided RNA cleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex. *Cell* 2009;139:945-56.
14. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 2007;315:1709-12.
15. Guilinger JP, Thompson DB, Liu DR. Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification. *Nat Biotechnol* 2014;32:577-82.
16. Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, Makarova KS, Essletzbichler P, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell* 2015;163:759-71.
17. Piatek A, Ali Z, Baazim H, Li L, Abulfaraj A, Al-Shareef S, et al. RNA-guided transcriptional regulation in planta via synthetic dCas9-based transcription factors. *Plant Biotechnol J* 2015;13:578-89.
18. Konermann S, Brigham MD, Trevino AE, Joung J, Abudayyeh OO, Barcena C, et al. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature* 2015;517:583-8.
19. Shen JP, Zhao D, Sasik R, Luebeck J, Birmingham A, Bojorquez-Gomez A, et al. Combinatorial CRISPR-Cas9 screens for de novo mapping of genetic interactions. *Nat Methods* 2017;14:573-6.
20. Canver MC, Bauer DE, Dass A, Yien YY, Chung J, Masuda T, et al. Characterization of genomic deletion efficiency mediated by clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/Cas9 nuclease system in mammalian cells. *J Biol Chem* 2017;292:2556.
21. Lareau C, Clement K, Hsu JY, Pattanayak V, Joung JK, Aryee MJ, et al. "Unexpected mutations after CRISPR-Cas9 editing in vivo" are most likely pre-existing sequence variants and not nuclease-induced mutations. *bioRxiv* 2017:159707.
22. Tsai SQ, Nguyen NT, Malagon-Lopez J, Topkar VV, Aryee MJ, Joung JK. CIRCLE-seq: a highly sensitive in vitro screen for genome-wide CRISPR-Cas9 nuclease off-targets. *Nat Methods* 2017;14:607-14.
23. Noori-Dalooi MR, Ebadi N. Pharmacogenomics and cancer stem cells. *Medical Science Journal of Islamic Azad Univesity-Tehran Medical Branch* 2015;25:1-15. [In Persian]
24. Noori-Dalooi MR, Eshaghkhani Y. lncRNAs: significance and function mechanisms. *Medical Science Journal of Islamic Azad Univesity-Tehran Medical Branch* 2015;25:79-94. [In Persian]

25. Young RM, Phelan JD, Webster DE, Roulland S, Wright G, Huang D, et al. CRISPR-CAS9 genetic screens uncover ab cell receptor-myd88 superpathway in diffuse large B cell lymphoma. *Hematol Oncol* 2017;35:S25.
26. Xue W, Chen S, Yin H, Tammela T, Papagiannakopoulos T, Joshi NS, et al. CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver. *Nature* 2014;514:380-4.
27. Tu Z, Yang W, Yan S, Guo X, Li XJ. CRISPR/Cas9: a powerful genetic engineering tool for establishing large animal models of neurodegenerative diseases. *Mol Neurodegener* 2015;10:35.
28. Chari R, Yeo NC, Chavez A, Church GM. sgRNA Scorer 2.0: A Species-Independent Model To Predict CRISPR/Cas9 Activity. *ACS Synth Biol* 2017;6:902-4.
29. Jusiak B, Cleto S, Perez-Piñera P, Lu TK. Engineering synthetic gene circuits in living cells with CRISPR technology. *Trends Biotechnol* 2016;34:535-47.
30. Zhou Y, Zhu S, Cai C, Yuan P, Li C, Huang Y, et al. High-throughput screening of a CRISPR/Cas9 library for functional genomics in human cells. *Nature* 2014;509:487-91.
31. Konermann S, Brigham MD, Trevino AE, Joung J, Abudayyeh OO, Barcena C, et al. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature* 2015;517:583-8.
32. Diao Y, Li B, Meng Z, Jung I, Lee AY, Dixon J, et al. A new class of temporarily phenotypic enhancers identified by CRISPR/Cas9-mediated genetic screening. *Genome Res* 2016;26:397-405.
33. Joung J, Konermann S, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Platt RJ, Brigham MD, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 Knockout and Transcriptional Activation Screening. *Nat Protoc* 2017;12:828-63.
34. Brinkman EK, Chen T, de Haas M, Holland HA, Akhtar W, van Steensel B. Quantitative analysis shows that repair of Cas9-induced double-strand DNA breaks is slow and error-prone. *bioRxiv*. 2017:142802.
35. Sakuma T, Nakade S, Sakane Y, Suzuki KI, Yamamoto T. MMEJ-assisted gene knock-in using TALENs and CRISPR-Cas9 with the PITCh systems. *Nat Protoc* 2016;11:118-33.
36. Kleinstiver BP, Prew MS, Tsai SQ, Topkar VV, Nguyen NT, Zheng Z, et al. Engineered CRISPR-CAS9 Nucleases with Altered PAM Specificities. *Nature* 2015;523:481-5.
37. Tsai SQ, Wyvekens N, Khayter C, Foden JA, Thapar V, Reyon D, et al. Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol* 2014;32:569-76.
38. Mout R, Ray M, Lee YW, Scaletti F, Rotello VM. In Vivo Delivery of CRISPR/Cas9 for Therapeutic Gene Editing: Progress and Challenges. *Bioconjug Chem* 2017;28:880-4.
39. Noori-Daloi MR, Tabarestani S. Molecular genetics, diagnosis and treatment of breast cancer. *Journal of Sabzevar University of Medical Sciences* 2010;17:74-87.
40. Mout R, Ray M, Yesilbag Tonga G, Lee YW, Tay T, Sasaki K, et al. Direct Cytosolic Delivery of CRISPR/Cas9-Ribonucleoprotein for Efficient Gene Editing. *ACS Nano* 2017;11:2452-8.
41. Moore R, Spinhirne A, Lai MJ, Preisser S, Li Y, Kang T, et al. CRISPR-based self-cleaving mechanism for controllable gene delivery in human cells. *Nucleic Acids Res* 2014;43:1297-303.
42. Krishan K, Kanchan T, Singh B. Human genome editing and ethical considerations. *Sci Eng Ethics* 2016;22:597-9.