

((CRISPR) ژنومی ویرایش نوین سیستم بر مرواری)

مهرداد طالبی^۱، محمد یحیی وحیدی مهرجردی^{۲*}

مقاله مرواری

طی دهه‌های اخیر پیشرفت علم ژنتیک در زمینه دست ورزی ماده ژنتیک و به سبب آن درمان بیماری‌ها چشمگیر بوده است. البته این نکته قابل ذکر است که این دست ورزی‌های ژنتیکی در سطوح مختلف مانند DNA و RNA انجام می‌گیرند. روش‌های قدیمی تر ویرایش ژنومی، شامل مگانوکلئازها (MN)، نوکلئازهای انگشت روی (ZFN) و نوکلئازهای فعال کننده شبیه فاکتور رونویسی (TALEN) هستند که عملکرد خود را با ایجاد برش‌های دورشته‌ای (DSBs) انجام می‌دهند و پس از برش، سلول از طریق دو سیستم ترمیمی خود به نام‌های نوترکیبی همولوگ (HR) و اتصال انتهای غیرهمولوگ (NHEJ) سعی در ترمیم این برش دارد. تکنولوژی CRISPR/Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat) در سال‌های اخیر کشف شده که با توجه به قابلیت‌های این سیستم و قابلیت‌هایی که از طریق مهندسی ژنتیک به آن اضافه شده، تبدیل به پرکاربردترین ابزار ویرایش ژنومی شده است.

در این مطالعه به مدت سه ماه در پاییز و زمستان ۱۳۹۷، در سایتهاي Web of science و Pubmed با استفاده از کلید واژه‌هایی مانند CRISPR، CRISPR-Cas9، Cas9، gRNA، Types of CRISPR، CRISPR nickase و CRISPR-Cas9 سرچ شده است که در نهایت از بین حدود چهارصد مقاله، تعداد شصت و یک مقاله برای مطالعه دقیق‌تر انتخاب شده است و مطالعه از این مقالات در این مقاله مرواری آورده شده است.

روش‌های مهندسی ژنتیک توانسته با انجام تغییرات موفقیت‌امیزی در این سیستم، آن را به کارآمدترین ابزار ویرایش ژنومی در سال‌های اخیر تبدیل کند. محققین در تلاشند با رفع مشکلاتی مانند اختصاصیت بالا، برش جایگاه‌های غیر هدف، نحوه انتقال به سلول و راهاندازی سیستم ترمیمی مناسب، بتوانند به سیستمی برای درمان بیماری‌های مختلف دست یابند. با توجه به پیشرفت روزافروز این تکنولوژی و امکان شناسایی پروتئین‌های جدید که مزایای بیشتری نسبت به پروتئین‌های موجود مانند cas9 و Cpf1 دارند، درمان بیماری‌های ژنتیکی در اینده‌ای نه چندان دور، دور از ذهن نمی‌باشد.

واژه‌های کلیدی: تکنیک ویرایش ژنومی، CRISPR، نوترکیبی همولوگ، اتصال انتهای غیر همولوگ.

ارجاع: طالبی مهرداد، وحیدی مهرجردی محمد یحیی. سیستم نوین ویرایش ژنومی (CRISPR). مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، ۱۳۹۸، ۲۷(۵)، ۱۵۶۸-۸۳.

۱-دانشجو دانشکده پزشکی، گروه ژنتیک- دانشگاه علوم پزشکی خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی، یزد، ایران

۲-دکتری مرکز تحقیقات دیابت، دانشگاه علوم پزشکی خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی، یزد، ایران

* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۳۵۱۴۶۲۹، پست الکترونیکی: mmvahidi@gmail.com، کد پستی: ۱۹۱۷۶۹۳۵۷۱

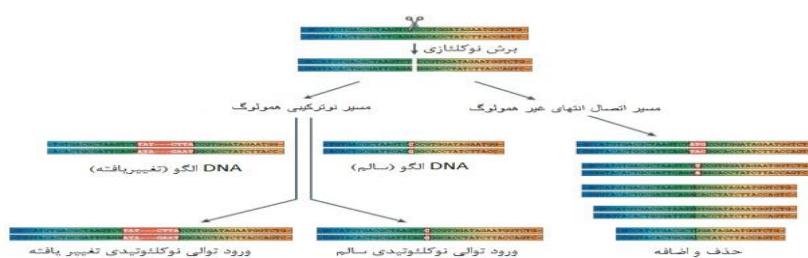
مقدمه

باعث شناسایی DNA هدف ما و برش دورشتهای در آن می‌شود. این برش به سلول این امکان را می‌دهد که از طریق مکانیسم‌های طبیعی خود آسیب‌های زیان‌آور حاصل از برش دورشتهای را تعمیر کند. یکی از مکانیسم‌های ترمیمی HR است که از کروموزوم همولوگی که دچار برش نشده برای ترمیم DNA برش خورده استفاده می‌کند (۳). دانشمندان از این خاصیت طبیعی سلول برای عرضه DNA الگو مورد نظر خود به سلول، بعداز برش دو رشتاهی توسط CRISPR/Cas و جای‌گیری این DNA الگو در منطقه آسیب‌دیده استفاده می‌کنند. البته برای این جای‌گیری، DNA الگو وارد شده ما باید در پایین دست و بالادست خود، دارای توالی مشابهی با DNA هدف برش خورده باشد که به آن‌ها بازوهای همولوگ گفته می‌شود (شکل ۱) (۴).

سیستم دیگری که منجر به ترمیم برش‌های دورشتهای می‌شود NHEJ است و در آن برای تعمیر قسمت‌های برش خورده به جای استفاده از کروموزوم همولوگ، از کروموزوم‌های غیر همولوگ استفاده می‌شود. این سیستم ترمیمی به دلیل استفاده از کروموزوم‌های غیرهمولوگ منجر به ناپایداری ژنومی و ایجاد حذف و اضافه‌هایی در قسمت برش دورشتهای DNA می‌شود (شکل ۱) (۵). برای جای‌گیری DNA الگو وارد مکانیسم ترمیمی NHEJ می‌باشد (۶). البته چندین راهکار وجود دارد تا سلول از مسیر HR استفاده کند که از جمله ان می‌توان به عرضه کمپلکس CRISPR/Cas به سلول در زمان‌های خاصی از چرخه سلولی اشاره کرد (۷).

CRISPR/Cas تکنیکی است که عملکرد و ساختار آن از باکتری مشتق شده است و طی چند سال اخیر به مهم‌ترین ابزار ویرایش ژنومی و ژن‌درمانی تبدیل شده است (۱). از روش‌های قدیمی‌تر ویرایش ژنومی که البته هنوز در مطالعات استفاده می‌شوند، می‌توان به ZFN، MN و TALEN اشاره کرد. هر یک از این گروه‌ها دارای دو جزء ساختاری هستند که با یکی از اجزای خود جایگاه هدف را تشخیص می‌دهند و با جزء دیگر برش دورشتهای را اعمال می‌کنند. در روش‌هایی مانند ZFN و TALEN هر دو جزء تشکیل‌دهنده، اساس پروتئینی دارد که در جز تشخیص‌دهنده هدف، از پروتئین‌هایی استفاده می‌شود که به نکلئوتیدها متصل می‌شوند (۲). اما در تکنولوژی CRISPR/Cas ویژگی اتصال به هدف توسط نوکلئوتیدها انجام می‌شود و عمل نوکلئازی توسط پروتئین‌های cas صورت می‌گیرد. استفاده از نوکلئوتید در CRISPR نسبت به روش‌های قدیمی‌تر، ویژگی‌هایی مانند طراحی راحت‌تر، انتقال بهتر به سلول و قیمت ارزانتر را به این تکنیک داده که توجه دانشمندان را به خود جلب کرده است (۲).

در این مطالعه به مدت سه ماه در پاییز و زمستان ۱۳۹۷، در سایت‌های Web of science و Pubmed با استفاده از کلید Cas9, gRNA, Types of CRISPR, CRISPR و CRISPR-Cas9 nickase و واژه‌هایی مانند Cas9, CRISPR, CRISPR-Cas9 سرچ شده است که در نهایت از بین حدود چهارصد مقاله، تعداد شصت و یک مقاله برای مطالعه دقیق‌تر انتخاب شده است و مطالعی از این مقالات در این مقاله مروری آورده شده است. همان‌طور که در بالا گفته شد تعامل بین بخش‌های مختلف ابزارهای ویرایش ژنومی



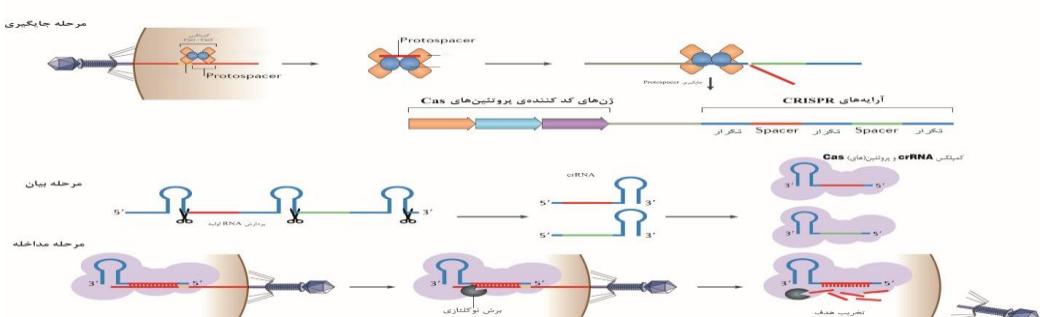
شکل ۱: مسیرهای ترمیمی نوترکیبی همولوگ و اتصال انتهای غیرهمولوگ

انواع سیستم‌های CRISPR/Cas و مکانیسم عمل آن‌ها

مکانیسم عمل

این سیستم در ۴۰٪ ژنوم باکتری‌ها و تقریباً ۹۰٪ آرکی‌باکتری‌ها یافت می‌شود (۸) و مانند سیستم ایمنی در برابر عناصر ژنتیکی مهاجم مانند ویروس‌ها و پلازمیدها عمل می‌کند (۹-۱۴). یک لوکوس CRISPR از آرایه‌ای از CRISPR تشکیل می‌شود که هر کدام از این آرایه‌ها دارای DNA تکراری کوتاه هستند و در بین این تکرارها، توالی‌های DNA کوتاه و متغیری به نام Spacer وجود دارد و از DNA مهاجم گرفته می‌شود. هم‌چنین در مجاورت لوکوس CRISPR، چندین ژن کدکننده پروتئین‌های Cas وجود دارد که این پروتئین‌ها طبق آنالیزهای کامپیوتری دارای دمین‌های نوکلئاز، هلیکاز و چندین دمین متصل شونده به RNA هستند و برای عملکرد سیستم CRISPR/Cas کمپلکس CRISPR/Cas شامل سه مرحله جایگیری (Interference)، بیان (Adaptation) و مداخل (Expression) است (شکل ۲) (۱۵-۱۹).

طی مرحله جایگیری، قسمت‌های کوتاهی از توالی پلازمیدی یا ویروسی (Spacer precursor or protospacer) در جایگاه‌های CRISPR جای می‌گیرند (۲۰، ۱۶). به نظر می‌رسد انتخاب قطعاتی از عناصر ژنتیکی مهاجم که در ژنوم میزبان جای می‌گیرد از DNA مهاجم به شناسایی یک توالی PAM; Protospacer (protospacer) به نام موتیف مجاور (motif) کوتاه به نام موتیف مجاور (protospacer) بستگی دارد که این توالی‌ها معمولاً چندین



شکل ۲: مراحل مختلف مکانیسم عمل سیستم‌های CRISPR/Cas (۲۸)

Cas2 و Cas3 های درگیر در مرحله بیان هستند. اما I-A و I-B دارای تعداد بیشتر از یک اپرون هستند که هر اپرون پروتئین های مشخصی را کد می کند. دیگر پروتئین های درگیر در این سیستم در جدول یک نشان داده شده است (۲۹).

سیستم CRISPR/Cas نوع III

همه زیرگروه های سیستم نوع III، ژن Cas10 را دارا می باشند که این ژن یک پروتئین چند دمینی را کد می کند. یکی از دمین های خاص این پروتئین دمین Palm است و دارای موتیف شناسایی کننده RNA recognition (motif) (RNA recognition motif) می باشد و همچنین به عنوان بزرگترین دمین Cas10 شناخته می شود. دمین palm از لحاظ همولوژی مشابه دمین مرکزی بسیاری از پلیمرازها و سیکلازها است. علاوه بر Cas10 که به نوعی مهم ترین پروتئین سیستم نوع III است، همه انواع این سیستم دارای پروتئین های Cas5 (ss; small subunit) و پروتئین زیر واحد کوچک (Cas7) (cmr) (III-A و III-B) تقسیم بندی می شد که متصل شونده به Cas10 هستند (۳۶، ۳۷). نوع III قبلاً به دو گروه (III-A و III-B) تقسیم بندی می شد که بعد ها با پیشرفت آنالیزهای کامپیوتری و تنوع زیاد ژن های تشکیل دهنده نوع III، دو زیرگروه III-C و III-D به آن اضافه شد (۲۹). نکته جالب راجع به این سیستم هدف قراردادن DNA (۴۰، ۴۱) و RNA (۳۸، ۳۹) است.

سیستم CRISPR/Cas نوع IV

این سیستم را می توان ناشناخته ترین و غیرطبیعی ترین سیستم CRISPR/Cas دانست. تعداد کمی از باکتری ها دارای این سیستم هستند که اغلب روی پلازمید آن ها قرار دارد. Cas1 و Cas2 در این سیستم وجود ندارند و اغلب ژن های Cas در مجاورت لوکوس CRISPR قرار نمی گیرند که در بعضی موارد هیچ لوکوسی از سیستم CRISPR مشاهده نشد. دیگر پروتئین ها در جدول یک نشان داده شده است (۳۰). سیستم نوع IV به دو دسته تقسیم می شود که یک دسته دارای پروتئین هلیکازی DinG است و در دسته دوم این پروتئین وجود ندارد. اما دسته دوم دارای پروتئینی به نام زیر واحد کوچک (ss) است که در دسته اول وجود ندارد (۲۹، ۳۵).

کلاس بندی سیستم های CRISPR/Cas

فشار تکاملی ناشی از مرگ فاژی، منجر به وجود آمدن انواع متنوعی از سیستم های CRISPR/Cas شده است. برای ساده تر شدن دسته بندی سیستم های CRISPR/Cas، ژن های Cas (به صورت اپرون) و لوکوس های CRISPR بر اساس رابطه تکاملی شان با هم دسته بندی می شوند که به این کلاس بندی Polythentic گفته می شود. عموماً این کلاس بندی وابسته به چارچوب خواندن باز (ORF; Open reading frame) تعداد های موجود در اپرون و ساختارهای تکراری لوکوس های CRISPR می باشد (۲۷، ۲۹). سیستم های CRISPR بسته به اینکه چند پروتئین Cas در برش جایگاه هدف همکاری می کنند به دو کلاس تقسیم می شوند. در کلاس یک چند پروتئین Cas به crRNA وصل می شوند و بعد از شناسایی جایگاه هدف در برش شرکت می کنند که شامل سیستم های III و IV می شود. اما در کلاس دو، این نقش تنها بر عهده یک پروتئین می باشد و این کلاس شامل انواع II، V و VI می شود. هر کدام از این انواع سیستم های CRISPR/Cas بر اساس رابطه تکاملی پروتئین های Cas خود به نوع رده های پایین تری تقسیم می شوند که در ادامه به آن ها اشاره می کنیم (۳۰).

کلاس یک

سیستم CRISPR/Cas نوع یک

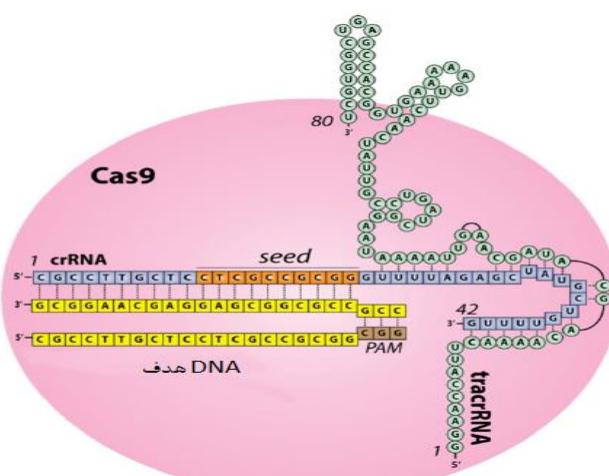
همه لوکوس های نوع I دارای ژن cas3 یا نوع تغییر یافته ای از آن (cas3') هستند که این ژن، کد کننده یک آنزیم هلیکازی است و ثابت شده است که می تواند دو رشته DNA و دو پلکس RNA/DNA را باز کند (۳۱-۳۳). معمولاً دمین هلیکازی به یک دمین اندونوکلئازی وصل می شود که مسئول برش است و در بعضی از زیرگروه های نوع یک توسط ژنی دیگر در مجاورت cas3 کد می شود (۳۴). سیستم نوع I به هفت زیرگروه I-A تا I-F تقسیم می شود و البته به دلیل مکانیسم ناشناخته تولید crRNA و پروتئین های درگیر در زیرگروه U-I، آن را به طور جداگانه نام گذاری کردند (۳۵). زیرگروه های I-C، I-D و I-E تنها دارای یک اپرون حاوی ژن های Cas1 هستند.

کلاس دو

سیستم CRISPR/Cas نوع II

به جرات می‌توان گفت بیشترین استفاده از CRISPR/Cas در سیستم‌های یوکاریوتی و بیشترین تغییرات انجام گرفته با مهندسی ژنتیک برای استفاده سیستم‌های Cas در سلول‌های یوکاریوتی، با نوع II سیستم CRISPR/Cas انجام گرفته که از دلایل این استفاده زیاد می‌توان به مواردی مانند دقیق بالا، ساختار ساده (به دلیل استفاده از تنها یک پروتئین Cas می‌باشد) و قابلیت استفاده برای تعداد کثیری از سلول‌های یوکاریوتی و پروکاریوتی اشاره کرد (۴۲). سیستم CRISPR-Cas9 شناخته می‌شود، اغلب از سه نوع II که به عنوان CRISPR-Cas9 شناخته می‌شود: یک جزء پروتئینی و دو جزء RNA برخلاف انواع دیگر اغلب در فرایند بیان و مداخله این سیستم علاوه بر crRNA دیگری به نام trans activating RNA (tracr RNA) وجود دارد که در مرحله بیان crRNA به ناحیه تکراری crRNA اولیه می‌چسبد و این اتصال باعث می‌شود که تکراری RNaseIII بتواند در قسمت تکراری crRNA برش ایجاد کند (۲۶). هم‌چنین در فرایند مداخله CRISPR-Cas9 TracrRNA برای عمل اندونوکلئازی Cas9 و شناسایی PAM لازم می‌باشد و بدون آن cas9 قادر به برش نیست. Cas9 برای برش دارای

دمین‌های اندونوکلئازی RUVG و HNH است که به ترتیب هر کدام رشتۀ مکمل و رشتۀ غیرمکمل جایگاه هدف را برش می‌دهند (۴۳). مطلبی که در بالا گفته شد، روند طبیعی در باکتری‌ها را بازگو کرد. اما دانشمندان برای استفاده از سیستم CRISPR-RNA9 Cas9 در سلول‌های یوکاریوتی و پروکاریوتی از نوعی tracrRNA با crRNA ترکیب شده استفاده می‌کنند که در آن RNA (gRNA; Guide RNA) را با نام RNA راهنمایی (guide RNA) نیز می‌شناسند. این تکنیک برای اولین بار در سال ۲۰۱۲ توسط گروه دودنای (Doudna) با سیستم CRISPR-Ca9 باکتری استرپتوكوکوس پایوزن (Streptococcus pyogenes) انجام شد (۴۲). gRNA در مجموع شامل ۱۲۲ نوکلئوتید می‌باشد که در ۴۲ نوکلئوتید آن متعلق به crRNA و ۸۰ نوکلئوتید آن متعلق به tracrRNA که مسئول است. بیست نوکلئوتید از crRNA که مسئول شناسایی جایگاه هدف است، در قسمت ۵' آن قرار دارد و نوکلئوتیدهای قسمت ۳' به tracrRNA می‌چسبند که در نتیجه این اتصال یک ساختار حلقه بوجود می‌آید. نوکلئوتیدهای قسمت ۵' ناحیه شناسایی کننده هدف در crRNA اهمیت کمتری در اتصال دارند و ۸-۱۲ نوکلئوتید بخش ۳' (Seed) ناحیه شناسایی کننده هدف، در شناسایی هدف اختصاصی‌تر هستند (شکل ۳) (۴۴).



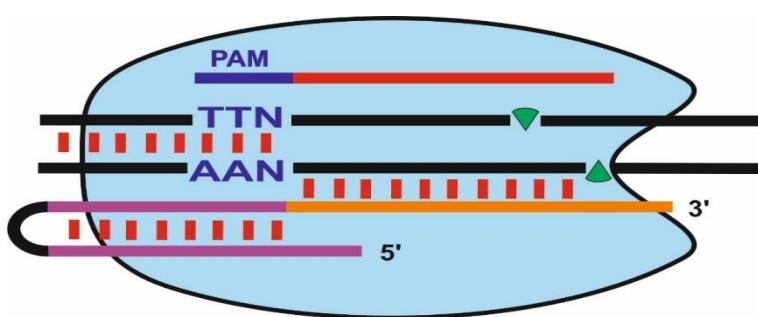
شکل ۳: ساختار gRNA و نواحی مختلف آن (۴۴)

V CRISPR/Cas نوع

گروه اسکاندر (Schunder) در سال ۲۰۱۳، ژنی به نام Cpf1 ژن‌های Cas و لوکوس CRISPR مرتبط با آن را در بacterی فرانسیسلا (Francisella spp) یافتند و همچنان این گروه به دلیل وجود قسمت‌هایی از DNA فاز در لوکوس CRISPR آن پیشنهاد داد که این سیستم خاصیت عملکردی دارد. پس از آن گروه زج (Zetche) این سیستم CRISPR/Cas را به عنوان نوع V سیستم CRISPR معرفی کرد که پروتئین کلیدی آن Cpf1 است (۲۵). Cpf1 یک پروتئین بزرگ (۱۳۰۰ آمینواسید) است که دارای یک دمین نوکلئازی شبیه RUV-C سیستم CRISPR-Cas9 می‌باشد و فاقد دمین نوکلئازی HNH است. علاوه بر RUV-C، این پروتئین دارای دمین Tnp است که تصور می‌شود Tnp مرتبط به خانواده ترانسپوزون‌ها است. به دلیل وجود دمین Tnp در Cpf1 پیشنهاد می‌شود این سیستم از عناصر متحرک ترانسپوزونی منشا گرفته است (۴۶، ۵۱). مطالعات قبلی باعث تشویق محققین به مطالعات بیشتر در این زمینه شد و نتیجه آن شناخت پروتئین‌ها و توالی‌های PAM درگیر در این سیستم می‌باشد. طبق مطالعات، چند تفاوت کلیدی بین Cpf1 و Cas9 وجود دارد که در زیر آن‌ها را لیست کردیم:

- توالی PAM در Cpf1، سمت مخالف جایگاه برش وجود دارد. اگرچه توالی Seed در Cpf1 کنار توالی PAM قرار دارد، ولی با این حال برش در قسمت ۵' که اختصاصیت کمتری دارد در شناسایی هدف، اتفاق می‌افتد (شکل ۴).

این گروه خود به سه زیرگروه A، II-B و II-C تقسیم می‌شود (۳۵، ۴۵). زیرگروه II-A علاوه بر دارا بودن پروتئین‌های معمول این سیستم، دارای پروتئین اضافه دیگری به نام Csn2 است که تصور می‌شود در مرحله Csn2 جایگیری نقش دارد (۴۶). زیرگروه II-B اگرچه فاقد cas4 است، اما دارای پروتئینی با عملکرد مشابه به نام ۴ می‌باشد (۴۶). همچنان زیرگروه II-C فقط دارای پروتئین‌های Cas1، Cas2 و Cas9 است که بیشترین فراوانی را بین انواع CRISPR-Cas9 به خود اختصاص داده است (۴۷، ۴۸). در بین همه انواع CRISPR-Cas9 استفاده شده، بیشترین مورد متعلق به باکتری استرپتوکوکوس پایوزن (spCas9) است که Cas9 در این نوع سیستم یک توالی PAM را سه نوکلوتیدی شامل NGG را شناسایی می‌کند و DNA را باز بالادست توالی PAM برش می‌دهد (۲۶). با این حال ممکن است به دلیل بزرگی ژنوم سلول‌های یوکاریوئی، توالی هدف، تشابه بالایی با دیگر نواحی ژنوم Off-target می‌شود (۴۹). علاوه بر این استفاده از تنها یک نوع توالی PAM باعث می‌شود که نتوانیم برای هر قسمت از ژنوم مورد نظر خود gRNA طراحی کنیم. برای همین دانشمندان سیستم‌های CRISPR/Cas باکتری‌ای مختلف را وارد تحقیقات کردند که توالی‌های PAM مختلفی را شناسایی می‌کنند (۵۰).



شکل ۴: شماتیکی از ساختار سیستم CRISPR/Cpf1

رسیدند که دو سیستم در باکتری‌های اسیدامینوکوکوس، (Lacnospiraceae) و لاکنوس یراسهها (Acidaminococcus) موتاسیون‌هایی به اندازه SpCas9 بوجود می‌آورند (۵۲).

سیستم VI CRISPR/Cas

گروه شماکو (Shmakov) طی مطالعاتی از سال ۲۰۱۱ تا ۲۰۱۵ موفق به شناسایی نوع جدیدی از سیستم VI CRISPR/Cas شده‌اند که همانکنون به عنوان نوع می‌شناسیم (۵۳). این گروه بر اساس آنالیزهای کامپیوتوئی ژنوم باکتری‌ها و مبنا قرار دادن cas1 به عنوان حفاظت‌شده‌ترین پروتئین در سیستم CRISPR/Cas و شناسایی پروتئین‌های بیشتر از ۵۰۰ آمینواسید، موفق به شناسایی این نوع جدید در ژنوم ۲۱ باکتری شدند. البته پروتئین‌های Cas9 و Cpf1 هم بیشتر از ۵۰۰ آمینواسید دارند که در این مطالعات یافت شدند و در نتیجه از تحقیقات خارج شدند (۵۴).

این پروتئین کشف شده با کشف نوع دوم این سیستم به نام CRISPR-Cas13a، با نام Cas13b شناخته می‌شود. نوع b این سیستم در سال ۲۰۱۶ توسط گروه ژانگ (zhang) به طرز مشابهی شناسایی شد. با این تفاوت که این گروه در آنالیزهای کامپیوتوئی ژنوم باکتری‌ها از Cas1 و Cas2 استفاده نکرد و مبنای تعداد آمینواسید آن‌ها چیزی بین ۹۰۰ تا ۱۸۰۰ آمینواسید بوده است (۵۲).

نکته قابل توجه و جالبی که سیستم نوع VI را از همه انواع دیگر جدا می‌کند آن است که این سیستم فقط RNA را هدف قرار می‌دهد (۵۵). در نتیجه این خاصیت، دانشمندان حوزه جدیدی از مطالعات را آغاز کردند که هدف آن تغییر بازها و برش بازها در سطح RNA برای بسیاری از بیماری‌ها است.

۲- اغلب توالی‌های cas9 در PAM غنی از G هستند و این در حالی است که در Cpf1 توالی PAM غنی از A/T هستند و به همین دلیل این سیستم را برای دستورزی ژنتیکی مناطق غنی از A/T در ژنوم مناسب می‌کند.

۳- یکی از تفاوت‌های اصلی بین Cas9 و Cpf1 این است که Cpf1 برخلاف Cas9 که نیاز به gRNA با طول ۱۲۲ نوکلئوتید دارد، تنها به یک crRNA با طول ۴۲-۴۴ نوکلئوتید نیاز دارد که باعث طراحی راحت‌تر و هم‌چنین ارزان‌تر شدن آزمایش و پرایش ژنومی می‌شود.

۴- برخلاف برش Cas9 که باعث ایجاد انتهای صاف در DNA می‌شود، برش Cpf1 مانند آنزیم‌های محدود‌کننده DNA (Restriction enzymes) ایجاد تکرشته‌های آویزان در DNA می‌کند. این انتهای آویزان مانند استفاده از آنزیم‌های محدود‌کننده احتمال انتقال مستقیم ژن را ممکن می‌سازند.

۵- معمولاً مسیر ترمیمی NHEJ فعال شده با Cas9، به دلیل نزدیکی برش با جایگاه PAM باعث تخریب جایگاه PAM می‌شود. این پدیده به دلیل دور بودن جایگاه PAM از محل برش در Cpf1 اتفاق نمی‌افتد.

۶- برخلاف CRISPR-Cas9 که باعث شروع مسیر ترمیمی NHEJ می‌شود، سیستم Cpf1 باعث شروع مسیر HR می‌شود. این افزایش کارایی به این دلیل است که اگر برش اول Cpf1 باعث مسیر ترمیمی HR نشود، ممکن است دوباره Cpf1 به جایگاه هدف بچسبد (چون PAM از بین نرفته) و در برش‌های بعدی مسیر HR فعال شود (۳۰، ۳۵).

این ویژگی‌ها باعث شده دانشمندان به فکر استفاده از این سیستم در سلول‌ها بیفتند. به همین دلیل سیستم‌های CRISPR/Cpf1 مختلف را آزمایش کردند و به این نتیجه

جدول ۱: مهمترین پروتئین‌های درگیر در انواع مختلف سیستم‌های CRISPR/Cas

نوع کلاس	انواع	تنظیمی	مداخله	بیان	جایگیری
I	انواع	CAS4	.Cas6 ، SS Cas7 ، Cas5 Cas'	Cas6	Cas1 .Cas2 و CAS4
کلاس یک	انواع III	CARF	Cas5 SS Cas7 و Cas10	Cas6	Cas1 .Cas2
انواع IV	DinG		.Cas5 Cas7 و SS	؟	؟
انواع II	CAS4، Csn2	Cas9	وRNaseIII	Cas9	Cas1 .Cas2 و CAS4
کلاس دو	انواع V	CAS4	Cpf1	Cpf1	Cas1 .Cas2 و CAS4
انواع VI	؟		Cas13	؟	Cas1 .Cas2

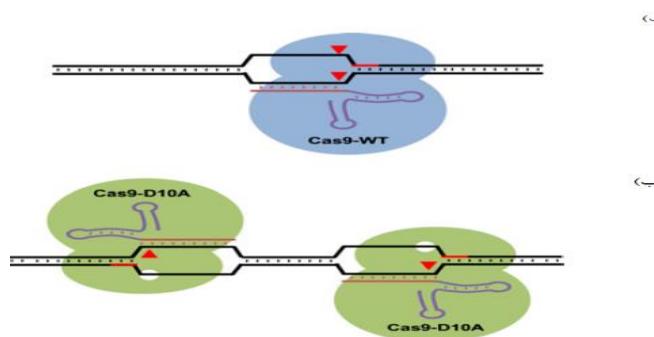
(H840A) HNH (تنها جهش در یکی از دمین‌ها و نه هر دو)، cas9 ای وجود می‌آورند که توانایی ایجاد برش یک رشته از DNA را دارد و هم‌چنین به دلیل کارایی بالای جهش در CRISPR-Cas9 RUVC نسبت به HNH، اصطلاح دمین RUVC به جهش D10A اطلاق می‌شود (۵۷). برش nickase به طراحی می‌شود که هر کدام یک در این تکنیک دو gRNA طراحی می‌شود که هر کدام یک برش تکرشته در رشته‌های متفاوت DNA ایجاد می‌کند و هم‌چنین فاصله این دو gRNA (Offset) چیزی بین ۰-۲۰ است (۵۷، ۵۸). احتمال اینکه دو gRNA طراحی شده در جای دیگری از ژنوم در نزدیکی هم برش ایجاد کنند بسیار پایین است. در نتیجه اختصاصیت این تکنیک نسبت به نوع طبیعی CRISPR-Cas9 بیشتر است. علاوه بر کاهش برش‌های غیراختصاصی، به دلیل ایجاد انتهای چسبنده، افزایش HR را در این روش شاهد هستیم که مطالعات موشی نشان‌دهنده این خاصیت هستند (شکل ۵) (۵۹).

چند نمونه از سیستم‌های CRISPR تغییریافته

هنگام استفاده از سیستم‌های CRISPR در سلول‌های یوکاریوتی به دلیل بزرگی ژنوم این سلول‌ها، شاهد برش‌های غیراختصاصی در نواحی غیر از نواحی هدف خود هستیم (۵۶). تلاش‌ها برای اندازه‌گیری، فهم و بهبود اختصاصیت سیستم‌های CRISPR، تبدیل به حوزه جالبی برای محققین شده است. از انجایی که CRISPR-Cas9 پرکاربردترین سیستم در مطالعات می‌باشد، بالطبع بیشترین مطالعات اختصاصیت هم مختص این سیستم می‌باشد و در نتیجه در سال‌های اخیر بوسیله مهندسی ژنتیک، سیستم‌هایی از CRISPR-Cas9 مشتق شده‌اند که کارایی بالاتری دارند. در این بخش سعی کردیم تعدادی از سیستم‌های تغییریافته موفق در مطالعات را بازگو کنیم (۵۶).

CRISPR-Cas9 nickase

رونده طبیعی برش Cas9 این‌گونه است که یک برش دورشته‌ای با انتهای صاف (Blunt) در DNA ایجاد می‌کند و این کار را به وسیله دو دمین RUVС و HNH خود انجام می‌دهد (۵۷). محققین با ایجاد جهش در D10A RUVС و



شکل ۵: (الف) عملکرد برشی سیستم CRISPR-Cas9 طبیعی. (ب) عملکرد برشی سیستم CRISPR-Cas9 غیرفعال Cas9

فلوئوفورها به نوکلئوتیدهای خاصی، برش غیراختصاصی را کاهش داده، ولی اختصاصیت آن نسبت به گروه اول پایین تر است (۴۴).

Cas9 غیرفعال

با توجه به پیشرفت cas9 در مطالعات ویرایش ژنومی، چندین گروه طی مطالعاتی با ایجاد جهش هایی (D10A و H480A) در دمین نوکلئازی این سیستم باعث بوجود آمدن DNA Cas9 غیرفعال (Dead cas9) شدند که قابلیت برش gRNA هدف را از دست داده ولی با این حال در ترکیب با gRNA قابلیت اتصال به DNA هدف را دارد. محققین از این خاصیت برای کنترل بیان، سرکوب و تغییرات اپیژنتیکی استفاده می کنند (۶۴). در این مورد ساده ترین فعال کننده و سرکوب کننده اتصال یافته به Cas9 غیرفعال به ترتیب VP64 و KRAB بودند. مطالعات بعدی در این زمینه با اتصال همزمان چندین فاکتور فعال کننده یا سرکوب کننده به سیستم CRISPR-Cas9 بوده است که نتایج موققیت آمیزتری را نسبت به مدل های قبلی خود به همراه داشت. نکته قابل توجه در این زمینه، قابل برگشت بودن نتایج این تکنیک در مقایسه با تکنیک های برش دهنده DNA هدف می باشد (۶۵-۷۰).

هم چنین اتصال Cas9 غیرفعال به تغییر دهنده های اپیژنتیکی مانند TET1 و P300 مانند فعال کننده ها و سرکوب کننده ها نتایج قابل قبولی را ارائه داد. یکی از مزایای چشمگیر تغییرات اپیژنتیکی با این روش، قابلیت به ارث رسیدن و پایداری این تغییرات است که برخلاف گروه اول (فعال کننده و

gRNA های تغییر یافته

علاوه بر روش هایی که تاکنون گفته شد، بهبود اختصاصیت هم چنین می تواند از طریق gRNA های تغییر یافته از لحاظ طول هم بوجود آید. مطالعات استفاده از gRNA در با spcas9 طول بلندتر از ۲۰ نوکلئوتید نتایجی به همراه نداشت. اما کاهش طول gRNA تاثیرات خوبی را نشان داده و همان طور که در صحبت های قبلی گفته شد، طول gRNA خود به تنها یکی می تواند در اختصاصیت نقش داشته باشد. با تعداد ۱۷ و ۱۸ نوکلئوتید در قسمت شناسایی کننده هدف خود حساسیت بالاتری را نسبت به نوکلئوتیدهای غیر هدف نشان دادند که از این طریق کارایی سیستم ها را بالا برده اند (۶۱، ۶۰).

به طور جالبی gRNA های با تعداد ۱۴ و ۱۵ نوکلئوتید، سیستم های CRISPR/Cas ای بوجود می آورند که قابلیت برش جایگاه هدف خود را از دست داده و این باعث شده که دانشمندان از آن برای مسیرهای اپیژنتیک، سرکوب و بیان ژن استفاده کنند (۶۲). درین gRNA های تغییر یافته، دسته ای از gRNA ها در مطالعات بررسی شدند که تغییرات شیمیابی روی آن ها انجام شده و این تغییر باعث افزایش اختصاصیت آن ها شده است. سنتز gRNA هایی با ۳'-2'-omethyl (M) و ۳'-2'-o methyl phosphorothioate (MS) در انتهای های ۵' و ۳' به طور قابل توجهی اختصاصیت را در cell T های اولیه و CD⁺₃₄ سلول های بنیادی خونی افزایش داده است (۶۳). نقص این روش در افزایش برش غیراختصاصی است که gRNA های جدیدتر با افودن

می‌توان به اختصاصیت بالا، برش جایگاه‌های غیر هدف، نحوه انتقال به سلول و راهاندازی سیستم ترمیمی مناسب نام برد، بتوانیم به سیستمی دست یابیم که با اطمینان بالای آن را برای درمان بیماری‌های مختلف استفاده کنیم. نکته‌ای که باعث امیدواری محققین برای درمان بیماری‌ها با این روش شده را می‌توان به پیشرفت سریع این تکنیک نسبت داد که با توجه به اینکه یک دهه از کشف این می‌گذرد، در همه زمینه‌ها و حتی در نمونه‌های انسانی برای هدف‌های درمانی استفاده شده است. اگرچه این سیستم به طور گسترده‌ای در نمونه‌های انسانی استفاده نشده است، اما توانسته بحث‌های زیادی از لحاظ اخلاقی در جوامع علمی ایجاد کند که ژن‌درمانی در امбриو و زیگوت را می‌توان از مهم‌ترین دلایل ان دانست. با توجه به پیشرفت روزافزون این تکنولوژی و امکان شناسایی پروتئین‌های جدید که مزایای بیشتری نسبت به پروتئین‌های موجود مانند Cas9 و Cpf1 دارند، درمان بیماری‌های ژنتیکی در ایندهای نه چندان دور، دور از ذهن نمی‌باشد.

تعارض در منافع: وجود ندارد.

سرکوب‌کننده) ممکن است توسط سلول دختر به ارث برسند (۶۹، ۷۱، ۷۲).

در این مطالعه به مدت سه ماه در پاییز و زمستان ۱۳۹۷، در سایت‌های Pubmed و Web of science با استفاده از کلید Cas9، gRNA، Types of CRISPR، CRISPR trans، CRISPR-Cas13b، CRISPR/Cpf1، Cas9 CRISPR-Cas9 nickase، HR activating RNA سرج شده است که در نهایت از بین حدود چهارصد مقاله، تعداد شصت و یک مقاله برای مطالعه دقیق تر انتخاب شده است و مطالبی از این مقالات در این مقاله مروری آورده شده است. CRISPR/Cas سیستمی است که به طور طبیعی به عنوان سیستم ایمنی باکتری‌ها عمل می‌کند و روش‌های مهندسی ژنتیک توانسته با انجام تغییرات موفقیت‌امیزی در این سیستم، آن را به کارآمدترین ابزار ویرایش ژنومی در سال‌های اخیر تبدیل کند. البته این روش مانند هر روش دیگری نیازمند پیشرفت بیشتر است و مشکلات آن کاملاً حل نشده است. محققین انتظار دارند با رفع این مشکلات که از مهم‌ترین آن‌ها

References:

- 1- Ceasar SA, Rajan V, Prykhozhij SV, Berman JN, Ignacimuthu S. *Insert, Remove or Replace: A Highly Advanced Genome Editing System Using Crispr/Cas9*. Biochim Biophys Acta 2016; 1863(9): 2333-44.
- 2- Guha TK, Wai A, Hausner G. *Programmable Genome Editing Tools and Their Regulation for Efficient Genome Engineering*. Comput Struct Biotechnol J 2017; 15: 146-160.
- 3- Englert C, Horne M, Pfeifer F. *Expression of the Major Gas Vesicle Protein Gene in the Halophilic Archaeobacterium Haloferax Mediterranei Is Modulated by Salt*. Molecular and General Genetics MGG 1990; 222(2-3): 225-32.
- 4- Mojica FJ, Rodriguez-Valera F. *The Discovery of CRISPR in Archaea and Bacteria*. FEBS J 2016; 283(17): 3162-9.
- 5- Juez G, Rodriguez-Valera F, Herrero N, Mojica F. *Evidence for Salt-Associated Restriction Pattern Modifications in the Archaeobacterium Haloferax Mediterranei*. J Bacteriology 1990; 172(12): 7278-81.
- 6- Nakata A, Amemura M, Makino K. *Unusual Nucleotide Arrangement with Repeated Sequences*

- in the Escherichia Coli K-12 Chromosome.* J Bacteriology 1989; 171(6): 3553-6.
- 7- Ma H, Marti-Gutierrez N, Park SW, Wu J, Lee Y, Suzuki K, et al. *Correction of a Pathogenic Gene Mutation in Human Embryos.* Nature 2017; 548(7668): 413-9.
- 8- Gesner EM, Schellenberg MJ, Garside EL, George MM, Macmillan AM. *Recognition and Maturation of Effector Rnas in a CRISPR Interference Pathway.* Nat Struct Mol Biol 2011; 18(6): 688-92.
- 9- Deveau H, Garneau JE, Moineau S. *CRISPR/Cas System and Its Role in Phage-Bacteria Interactions.* Annu Rev Microbiol 2010; 64: 475-93.
- 10- Horvath P, Barrangou R. *CRISPR/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea.* Science 2010; 327(5962): 167-70.
- 11- Karginov FV, Hannon GJ. *The CRISPR System: Small RNA-Guided Defense in Bacteria and Archaea.* Mol cell 2010; 37(1): 7-19.
- 12- Koonin EV, Makarova KS. *CRISPR-Cas: An Adaptive Immunity System in Prokaryotes.* F1000 Biol Rep 2009; 1: 95.
- 13- Sorek R, Kunin V, Hugenholtz P. *CRISPR—A Widespread System that Provides Acquired Resistance against Phages in Bacteria and Archaea.* Nat Rev Microbiol 2008; 6(3): 181-6.
- 14- Van der Oost J, Jore MM, Westra ER, Lundgren M, Brouns SJ. *CRISPR-Based Adaptive and Heritable Immunity in Prokaryotes.* Trends Biochem Sci 2009; 34(8): 401-7.
- 15- Barrangou R. *CRISPR-Cas Systems and RNA-Guided Interference.* Wiley Interdiscip Rev RNA 2013; 4(3): 267-78.
- 16- Garneau JE, Dupuis MÈ, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, et al. *The CRISPR/Cas Bacterial Immune System Cleaves Bacteriophage and Plasmid DNA.* Nature 2010; 468(7320): 67-71.
- 17- Magadán AH, Dupuis MÈ, Villion M, Moineau S. *Cleavage of Phage DNA by the Streptococcus Thermophilus CRISPR3-Cas System.* PloS one 2012; 7(7): e40913.
- 18- Westra ER, Swarts DC, Staals RH, Jore MM, Brouns SJ, van der Oost J. *The Crisprs, They Are A-Changin': How Prokaryotes Generate Adaptive Immunity.* Annu Rev Genet 2012; 46: 311-39.
- 19- Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA. *RNA-Guided Genetic Silencing Systems in Bacteria and Archaea.* Nature 2012; 482(7385): 331-8.
- 20- Marraffini LA. *The CRISPR-Cas system of Streptococcus pyogenes: function and applications.* In Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations [Internet] 2016 Apr 7. University of Oklahoma Health Sciences Center.
- 21- Deveau H, Barrangou R, Garneau JE, Labonté J, Fremaux C, Boyaval P, et al. *Phage Response to CRISPR-Encoded Resistance in Streptococcus Thermophilus.* J Bacteriol 2008; 190(4): 1390-400.
- 22- Mojica F, Diez-Villasenor C, Garcia-Martinez J, Almendros C. *Short Motif Sequences Determine the Targets of the Prokaryotic CRISPR Defence System.* Microbiology 2009; 155(3): 733-40.
- 23- 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(5819): 1709-12.

- 24-** Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuis RJ, Snijders AP, et al. *Small CRISPR RNAs Guide Antiviral Defense in Prokaryotes*. Science 2008; 321(5891): 960-4.
- 25-** 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(3): 759-71.
- 26-** Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirzada ZA, et al. *CRISPR RNA Maturation by Trans-Encoded Small RNA And Host Factor Rnase III*. Nature 2011; 471(7340): 602-7.
- 27-** Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Horvath P, et al. *Evolution and Classification of the CRISPR-Cas Systems*. Nat Rev Microbiol 2011; 9(6): 467-77.
- 28-** Amitai G, Sorek R. *CRISPR-Cas Adaptation: Insights Into the Mechanism of Action*. Nat Rev Microbiol 2016; 14(2): 67-76.
- 29-** Vestergaard G, Garrett RA, Shah SA. *CRISPR adaptive immune systems of Archaea*. RNA biol 2014; 11(2): 156-67.
- 30-** Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ, et al. *An Updated Evolutionary Classification of CRISPR-Cas Systems*. Nat Rev Microbiol 2015; 13(11): 722-36.
- 31-** Gong B, Shin M, Sun J, Jung CH, Bolt EL, van der Oost J, et al. *Molecular Insights Into DNA Interference by CRISPR-Associated Nuclease-Helicase Cas3*. Proc Natl Acad Sci 2014; 111(46): 16359-64.
- 32-** Huo Y, Nam KH, Ding F, Lee H, Wu L, Xiao Y, et al. *Structures of CRISPR Cas3 Offer Mechanistic Insights into Cascade-Activated DNA Unwinding and Degradation*. Nat Struct Mol Biol 2014; 21(9): 771-7.
- 33-** Sinkunas T, Gasiunas G, Fremaux C, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. *Cas3 Is a Single-Stranded DNA Nuclease and ATP-Dependent Helicase in the CRISPR/Cas Immune System*. EMBO J 2011; 30(7): 1335-42.
- 34-** Mulepati S, Bailey S. *Structural and Biochemical Analysis of Nuclease Domain of Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR)-Associated Protein 3 (Cas3)*. J Biol Chem 2011; 286(36): 31896-903.
- 35-** Makarova KS, Aravind L, Wolf YI, Koonin EV. *Unification of Cas Protein Families and a Simple Scenario for the Origin and Evolution of CRISPR-Cas Systems*. Biol direct 2011; 6: 38.
- 36-** Makarova KS, Aravind L, Grishin NV, Rogozin IB, Koonin EV. *A DNA Repair System Specific for Thermophilic Archaea and Bacteria Predicted by Genomic Context Analysis*. Nucleic Acids Res 2002; 30(2): 482-96.
- 37-** Savitskaya E, Musharova O, Severinov K. *Diversity Of CRISPR-Cas-Mediated Mechanisms of Adaptive Immunity in Prokaryotes and Their Application in Biotechnology*. Biochemistry (Mosc) 2016; 81(7): 653-61.
- 38-** Marraffini LA, Sontheimer EJ. *CRISPR Interference Limits Horizontal Gene Transfer in Staphylococci by Targeting DNA*. Science 2008; 322(5909): 1843-5.

- 39-** Peng W, Feng M, Feng X, Liang YX, She Q. *An Archaeal CRISPR Type III-B System Exhibiting Distinctive RNA Targeting Features and Mediating Dual RNA and DNA Interference*. Nucleic Acids Res 2014; 43(1): 406-17.
- 40-** 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(5): 945-56.
- 41-** Tamulaitis G, Kazlauskienė M, Manakova E, Venclovas Č, Nwokeoji AO, Dickman MJ, et al. *Programmable RNA Shredding by the Type III-A CRISPR-Cas System of Streptococcus Thermophilus*. Mol Cell 2014; 56(4): 506-17.
- 42-** Rodriguez E. *Ethical Issues in Genome Editing Using Crispr/Cas9 System*. J Clin Res Bioeth 2016; 7(2): 266.
- 43-** Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. *A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity*. Science 2012; 337(6096): 816-21.
- 44-** Rahdar M, McMahon MA, Prakash TP, Swayze EE, Bennett CF, Cleveland DW. *Synthetic CRISPR RNA-Cas9-Guided Genome Editing in Human Cells*. Proc Natl Acad Sci 2015; 112(51): E7110-E7.
- 45-** Fonfara I, Le Rhun A, Chylinski K, Makarova KS, Lecrivain AL, Bzdrenga J, et al. *Phylogeny of Cas9 Determines Functional Exchangeability of Dual-Rna and Cas9 among Orthologous Type Ii Crispr-Cas Systems*. Nucleic Acids Res 2013; 42(4): 2577-90.
- 46-** Chylinski K, Makarova KS, Charpentier E, Koonin EV. *Classification and Evolution of Type II CRISPR-Cas Systems*. Nucleic Acids Res 2014; 42(10): b6091-105.
- 47-** Chylinski K, Le Rhun A, Charpentier E. *The TracrRNA and Cas9 Families of Type II CRISPR-Cas Immunity Systems*. RNA Biol 2013; 10(5): 726-37.
- 48-** Koonin EV, Makarova KS. *CRISPR-Cas: Evolution of an RNA-Based Adaptive Immunity System in Prokaryotes*. RNA Biol 2013; 10(5): 679-86.
- 49-** Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. *Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems*. Science 2013; 339(6121): 819-23.
- 50-** Malina A, Cameron CJF, Robert F, Blanchette M, Dostie J, Pelletier J. *PAM Multiplicity Marks Genomic Target Sites as Inhibitory to CRISPR-Cas9 Editing*. Nat Commun 2015; 6: 10124.
- 51-** Makarova KS, Koonin EV. *Annotation and Classification of CRISPR-Cas Systems*. Methods Mol Biol 2015; 1311: 47-75.
- 52-** Smargon AA, Cox DBT, Pyzocha NK, Zheng K, Slaymaker IM, Gootenberg JS, et al. *Cas13b Is a Type Vi-B Crispr-Associated Rna-Guided Rnase Differentially Regulated by Accessory Proteins Csx27 and Csx28*. Mol Cell 2017; 65(4): 618-30. e7.
- 53-** Shmakov S, Abudayyeh OO, Makarova KS, Wolf YI, Gootenberg JS, Semenova E, et al. *Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems*. Mol Cell 2015; 60(3): 385-97.
- 54-** Majumdar S, Zhao P, Pfister NT, Compton M, Olson S, Glover CV, et al. *Three CRISPR-Cas Immune Effector Complexes Coexist in Pyrococcus Furiosus*. RNA 2015; 21(6): 1147-58.

- 55- Knott GJ, East-Seletsky A, Cofsky JC, Holton JM, Charles E, O'Connell MR, et al. ***Guide-Bound Structures of an RNA-Targeting A-Cleaving CRISPR-Cas13a Enzyme.*** Nat Struct Mol Biol 2017; 24(10): 825-33.
- 56- Tycko J, Myer VE, Hsu PD. ***Methods for Optimizing CRISPR-Cas9 Genome Editing Specificity.*** Mol Cell 2016; 63(3): 355-70.
- 57- Chiang T-WW, Le Sage C, Larrieu D, Demir M, Jackson SP. ***CRISPR-Cas9 D10A Nickase-Based Genotypic and Phenotypic Screening to Enhance Genome Editing.*** Sci Rep 2016; 6: 24356.
- 58- Mali P, Aach J, Stranges PB, Esvelt KM, Moosburner M, Kosuri S, et al. ***CAS9 Transcriptional Activators for Target Specificity Screening and Paired Nickases for Cooperative Genome Engineering.*** Nat Biotechnol 2013; 31(9): 833-8.
- 59- Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, et al. ***DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases.*** Nat Biotechnol 2013; 31(9): 827.
- 60- Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, et al. ***High-Frequency Off-Target Mutagenesis Induced by CRISPR-Cas Nucleases in Human Cells.*** Nat Biotechnol 2013; 31(9): 822-826.
- 61- Reyon D, Tsai SQ, Khayter C, Foden JA, Sander JD, Joung JK. ***FLASH Assembly of Talens for High-Throughput Genome Editing.*** Nat Biotechnol 2012; 30(5): 460-5.
- 62- Fu Y, Sander JD, Reyon D, Cascio VM, Joung JK. ***Improving CRISPR-Cas Nuclease Specificity Using Truncated Guide RNAs.*** Nat Biotechnol 2014; 32(3): 279-84.
- 63- Hendel A, Bak RO, Clark JT, Kennedy AB, Ryan DE, Roy S, et al. ***Chemically Modified Guide RNAs Enhance CRISPR-Cas Genome Editing in Human Primary Cells.*** Nat Biotechnol 2015; 33(9): 985-989.
- 64- Vora S, Tuttle M, Cheng J, Church G. ***Next stop for the CRISPR revolution: RNA-guided epigenetic regulators.*** FEBS J 2016; 283(17): 3181-93.
- 65- Chakraborty S, Ji H, Kabadi AM, Gersbach CA, Christoforou N, Leong KW. ***A CRISPR/Cas9-Based System for Reprogramming Cell Lineage Specification.*** Stem Cell Reports 2014; 3(6): 940-7.
- 66- Cheng AW, Wang H, Yang H, Shi L, Katz Y, Theunissen TW, et al. ***Multiplexed Activation of Endogenous Genes by CRISPR-On, an RNA-Guided Transcriptional Activator System.*** Cell Res 2013; 23(10): 1163-71.
- 67- Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, Liu Z, Brar GA, Torres SE, et al. ***CRISPR-Mediated Modular RNA-Guided Regulation of Transcription in Eukaryotes.*** Cell 2013; 154(2): 442-51.
- 68- 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(7536): 583-8.
- 69- Maeder ML, Angstman JF, Richardson ME, Linder SJ, Cascio VM, Tsai SQ, et al. ***Targeted DNA Demethylation and Activation of Endogenous Genes Using Programmable TALE-TET1 Fusion Proteins.*** Nat Biotechnol 2013; 31(12): 1137-42.

- 70- Perez-Pinera P, Kocak DD, Vockley CM, Adler AF, Kabadi AM, Polstein LR, et al. *RNA-Guided Gene Activation by CRISPR-Cas9-Based Transcription Factors*. Nat Methods 2013; 10(10): 973-6.
- 71- Cano-Rodriguez D, Rots MG. *Epigenetic Editing: on the Verge Of Reprogramming Gene Expression at Will*. Curr Genet Med Rep 2016; 4(4): 170-9.
- 72- Wang F, Marshall CB, Ikura M. *Transcriptional/Epigenetic Regulator CBP/P300 in Tumorigenesis: Structural and Functional Versatility in Target Recognition*. Cell Mol Life Sci 2013; 70(21): 3989-4008.

The new genomic editing system (CRISPR)

Mehrdad Talebi¹, Mohammad Yahya Vahidi Mehrjardi*²

Review Article

Over the past decades, progression in genetic element manipulation, and consequently, the treatment of diseases has been remarkable. It is worth noting that these genetic manipulations perform at different levels, including DNA and RNA. The earlier genomic editing techniques, including MN, ZFN , TALEN , performing their functions by creating double-stranded breaks (DSBs), and after breakage, the cell tries to repair the breakage through two systems, homologous recombination and non-homologous end joining. CRISPR/Cas technology has been discovered recently, and has become the most widely used genome-editing tool, mainly due to its capabilities and those added to this through the genetic engineering. In this study, we aimed to introduce a variety of CRISPR classes in the elementary parts, and then the modified CRISPR systems developed to increase the efficiency and specificity of the system and provide acceptable results will be introduced.

In this study, for three months in the fall and winter, Pubmed and Web of science sites searched for keywords such as CRISPR, Types of CRISPR, gRNA, Cas9, and CRISPR-Cas9 nickase that eventually resulted in about four hundred Sixty-one articles, and some of these articles after closer study, reviewed in this article.

Genetic engineering techniques have successfully transformed this system into the most efficient genome editing tool in recent years. Researchers are working on a system to treat various diseases by resolving problems such as high specificity, cutting off non-target sites, how to move to a cell, and setting up a proper repair system.

Keywords: Genome editing techniques, CRISPR, Homologous recombination, Non-homologous end joining.

Citation: Talebi M, Vahidi Mehrjardi VM. **The new genomic editing system (CRISPR).** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2019; 27(5): 1568-83.

¹Department. of Medical Genetics- Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

²Diabetes Research Center- Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

*Corresponding author: Tel: 09133514629, email: mmvahidi@gmail.com