مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره بیست و هفتم، شماره پنج، مرداد ۱۳۹۸
تاریخ دریافت:۱۳۹۷/۴/۳
تاریخ پذیرش:۱۳۹۷/۵/۱۳

(مروری بر سیستم نوین ویرایش ژنومی (CRISPR))

مهرداد طالبی[۱]، محمد یحیی وحیدی مهرجردی[۲*]

مقاله مروری

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 دست‌ورزی‌های ژنتیکی در سطوح مختلف مانند DNA و RNA انجام می‌گیرند. روش های 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 نام های 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 سایت‌های Pubmed و Web of science با استفاده از کلید واژه‌هایی مانند CRISPR، Types of CRISPR، gRNA، Cas9 و CRISPR-Cas9 nickase سرچ شده است که در نهایت از بین حدود چهارصد مقاله، تعداد شصت و یک مقاله برای مطالعه دقیق‌تر انتخاب شده است و مطالبی از این مقالات در این مقاله مروری 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 روزافزون این تکنولوژی وامکان 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): ۸۳-۱۵۶۸.

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: ۰۹۱۳۳۵۱۴۶۲۹، پست الکترونیکی: mmvahidi@gmail.com، کد پستی :۸۹۱۷۶۹۳۵۷۱

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-05-04]

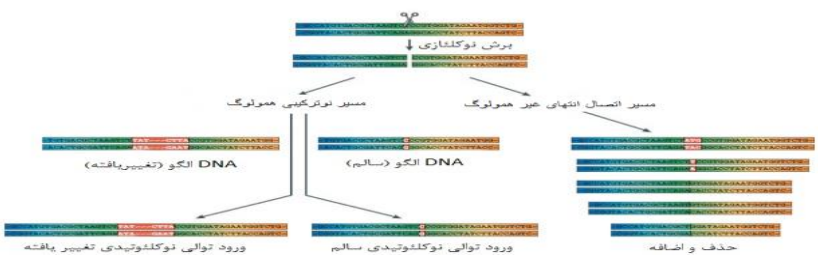
[DOI: 10.18502/ssu.v27i5.1524]

مقدمه

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 جز 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 Pubmed و Web of science با استفاده از کلید واژه‌هایی مانند CRISPR، Types of CRISPR، gRNA، Cas9 و CRISPR-Cas9 nickase سرچ شده است که در نهایت از بین حدود چهارصد مقاله، تعداد شصت و یک مقاله برای مطالعه دقیق‌تر انتخاب شده است و مطالبی از این مقالات در این مقاله مروری آورده شده است. همان‌طور که در بالا گفته شد تعامل بین بخش‌های مختلف ابزارهای ویرایش ژنومی 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 برش‌خورده استفاده می‌کند (۳). دانشمندان از این خاصیت طبیعی سلول برای عرضه DNA الگو مورد نظر خود به سلول، بعداز برش دو رشته‌ای توسط CRISPR/Cas و جای‌گیری این DNA الگو در منطقه آسیب‌دیده استفاده می‌کنند. البته برای این جای‌گیری، DNA الگو وارد شده ما باید در پایین‌دست و بالادست خود، دارای توالی مشابهی با DNA هدف برش‌خورده 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 برش‌خورده 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 وارده ما به قسمت برش‌خورده، سلول باید مکانیسم ترمیمی HR را ایجاد کند. اما مشکل موجود این است که ۷۵٪ مکانیسم ترمیمی سلول NHEJمی‌باشد (۶). البته چندین راهکار وجود دارد تا سلول از مسیر HR استفاده کندکه از جمله ان می‌توان به عرضه کمپلکس CRISPR/Cas به سلول در زمان‌های خاصی از چرخه سلولی اشاره کرد (۷).



شکل ۱: مسیرهای ترمیمی نوترکیبی همولوگ و اتصال انتهاهای غیرهمولوگ

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-05-04]
[DOI: 10.18502/ssu.v27i5.1524]

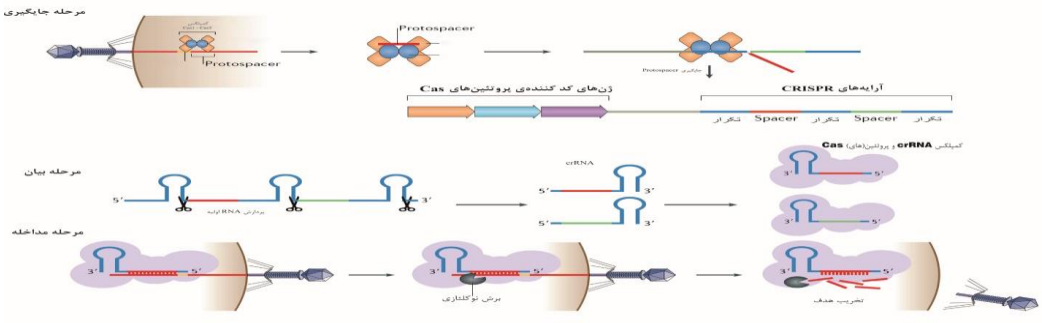
انواع سیستم‌های CRISPR/Cas و مکانیسم عمل آن‌ها

مکانیسم عمل

این سیستم در ۴۰٪ ژنوم باکتری‌ها و تقریبا ۹۰٪ آرکی‌باکتری‌ها یافت می‌شود (۸) و مانند سیستم ایمنی در برابر عناصر ژنتیکی مهاجم مانند ویروس‌ها و پلازمیدها عمل می‌کند (۱۴-۹). 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 متغییری 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 متصل‌شونده به RNA هستند و برای عملکردسیستم CRISPR/Cas ضروری هستند. مکانیسم تشکیل و عملکرد کمپلکس CRISPR/Cas شامل سه مرحله جایگیری (Adaptation) ، بیان (Expression) و مداخل (Iinterference) است (شکل۲) (۱۹-۱۵).

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 Protospacer (قطعاتی از عناصر ژنتیکی مهاجم که در ژنوم میزبان جای می‌گیرد) از DNA مهاجم به شناسایی یک توالی کوتاه به نام موتیف مجاور protospacer (PAM; Protospacer adjacent motif) بستگی دارد که این توالی‌ها معمولا چندین نوکلئوتید طول دارند و بین انواع سیستم‌های CRISPR/Cas متفاوت می‌باشد (۲۲, ۲۱). اگرچه مراحل مربوط به جایگیری در سیستم CRISPR/Cas کمتر شناخته شده است، اما نکته قابل توجه این است که cas1 و cas2 تقریباً در همه انواع CRISPR/Cas در مرحله جایگیری مهم‌ترین نقش را دارند (۲۴, ۲۳). قابل ذکر است پروتئین‌های cas1 و cas2 حفاظت شده‌ترین پروتئین‌ها در این سیتم هستند و در مطالعات زیادی برای کلاس بندی و کشف سیتم‌های جدید CRISPR به عنوان مبنا قرار گرفتند (۲۵). پس از جایگیری توالی‌های خارجی و تشکیل لوکوس CRISPR، نوبت به مرحله بیان می رسد. در این مرحله ابتدا یک RNA (crRNA; Crispr RNA) اولیه بزرگ از لوکوس CRISPR تولید می‌شود که در فرایندهای بعدی این crRNA بزرگ، پردازش شده و به چندین crRNA کوچک تبدیل می‌شود (۲۶).

مرحله سوم از مکانسیم عمل CRISPR/Cas، مداخله نام دارد که DNA یا RNA مهاجم توسط CRISPR/Cas شناسایی شده و در نواحی Protospacer، عمل برش را انجام می‌دهد (۲۰). حال دلیل اینکه چرا در سیستم‌های CRISPR/Cas با وجود اینکه توالی Protospacer در سلول میزبان در ناحیه لوکوس CRISPR وجود دارد، آن را برش نمی‌دهد؟ دلیل آن وجود توالی‌های PAM است که فقط در DNA مهاجم و در پایین دست توالی Protospacer وجود دارد و هم‌چنین وقتی crRNA، Protospacer را شناسایی کرد، پروتئین یا پروتئین‌های Cas برای برش نیاز به توالی PAM دارند (۲۷).



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

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-05-04]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i5.1524]

کلاس‌بندی سیستم‌های CRISPR/Cas

فشار تکاملی ناشی از مرگ فاژی، منجر به وجود آمدن انواع متنوعی از سیستم‌های CRISPR/Cas شده است. برای ساده‌تر شدن دسته‌بندی سیستم‌های CRISPR/Cas، ژن‌های Cas (به صورت اپرون) و لوکوس‌های CRISPR بر اساس رابطه تکاملی‌شان با هم دسته‌بندی می‌شوند که به این کلاس‌بندی Polythetic گفته می‌شود. عموما این کلاس‌بندی وابسته به چارچوب خواندن باز (ORF; Open reading frame) تعداد Casهای موجود در اپرون و ساختارهای تکراری لوکوس‌های CRISPR می‌باشد (۲۹, ۲۷). سیستم‌های CRISPR/Cas بسته به اینکه چند پروتئین Cas در برش جایگاه هدف همکاری می‌کنند به دو کلاس تقسیم می‌شوند. در کلاس یک چند پروتئین Cas به crRNA وصل می‌شوند و بعد از شناسایی جایگاه هدف در برش شرکت می‌کنند که شامل سیستم‌های CRISPR/Cas نوع I، III و IV می‌شود. اما در کلاس دو، این نقش تنها بر عهده یک پروتئین می‌باشد و این کلاس شامل انواع II، V و VI می‌شود. هر کدام از این انواع سیستم‌های CRISPR/Cas براساس رابطه تکاملی پروتئین‌های Cas خود به انواع رده‌های پایین‌تری تقسیم می‌شوند که در ادامه به آن‌ها اشاره می‌کنیم (۳۰).

کلاس یک

سیستم CRISPR/Cas نوع یک

همه لوکوس‌های نوع I دارای ژن cas3 یا نوع تغییر یافته‌ای از آن (cas3´) هستند که این ژن، کدکننده یک آنزیم هلیکازی است و ثابت شده است که می‌تواند دو رشته DNA و دوپلکس RNA/DNA را باز کند (۳۳-۳۱). معمولاً دمین هلیکازی به یک دمین اندونوکلئازی وصل می‌شود که مسئول برش است و در بعضی از زیرگروه‌های نوع یک توسط ژنی دیگر در مجاورت cas3 کد می‌شود (۳۴). سیستم نوع I به هفت زیرگروه I-A تا I-F و I-U تقسیم می‌شود و البته به دلیل مکانیسم ناشناخته تولید crRNA و پروتئین‌های درگیر در زیرگروه I-U، آن را به طور جداگانه نام‌گذاری کردند (۳۵). زیرگروه‌های I-C، I-D، I-E و I-F تنها دارای یک اپرون حاوی ژن‌های Cas1، Cas2، Cas3 و Casهای درگیر در مرحله بیان هستند. اما I-A و I-B دارای تعداد بیشتر از یک اپرون هستند که هر اپرون پروتئین‌های مشخصی را کد می‌کند. دیگر پروتئین‌های درگیر در این سیستم در جدول یک نشان داده شده است (۲۹).

سیستم CRISPR/Cas نوع III

همه زیرگروه‌های سیستم نوع III، ژن Cas10 را دارا می‌باشند که این ژن یک پروتئین چند دمینی را کد می‌کند. یکی از دمین‌های خاص این پروتئین دمین Palm است و دارای موتیف شناسایی‌کننده RNA (RNA recognition motif) می‌باشد و هم‌چنین به عنوان بزرگترین دمین Cas10 شناخته می‌شود. دمین palm از لحاظ همولوژی مشابه دمین مرکزی بسیاری از پلیمرازها و سیکلازها است. علاوه بر Cas10 که به نوعی مهم‌ترین پروتئین سیستم نوع III است، همه انواع این سیستم دارای پروتئین‌های Cas5، Cas7 و پروتئین زیرواحد کوچک (ss; small subunit) متصل‌شونده به Cas10 هستند (۳۷, ۳۶). نوع III قبلا به دو گروه III-A (csm) و III-B (cmr) تقسیم‌بندی می‌شد که بعدها با پیشرفت آنالیزهای کامپیوتری و تنوع زیاد ژن‌های تشکیل‌دهنده نوع III، دو زیرگروه III-C و III-D به آن اضافه شد (۲۹). نکته جالب راجع به این سیستم هدف قراردادن DNA (۳۸،۳۹) و RNA (۴۱, ۴۰) است.

سیستم CRISPR/Cas نوع IV

این سیستم را می‌توان ناشناخته‌ترین و غیرطبیعی‌ترین سیستم CRISPR/Cas دانست. تعداد کمی از باکتری‌ها دارای این سیستم هستند که اغلب روی پلازمید آن‌ها قرار دارد. Cas1 و Cas2 در این سیستم وجود ندارند و اغلب ژن‌های Cas در مجاورت لوکوس CRISPR قرار نمی‌گیرند که در بعضی موارد هیچ لوکوسی از سیستم CRISPR مشاهده نشد. دیگر پروتئین‌ها در جدول یک نشان داده شده است (۳۰). سیستم نوع IV به دو دسته تقسیم می‌شود که یک دسته دارای پروتئین هلیکازی DinG است و در دسته دوم این پروتئین وجود ندارد. اما دسته دوم دارای پروتئینی به نام زیرواحد کوچک (ss) است که در دسته اول وجود ندارد (۳۵, ۲۹).

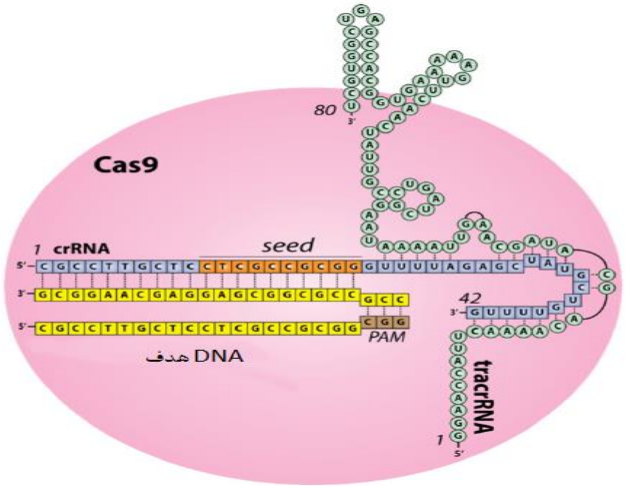
[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-05-04]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i5.1524]

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 CRISPR/Cas در سلول‌های یوکاریوتی، با نوع II سیستم CRISPR/Cas انجام گرفته که از دلایل این استفاده زیاد می‌توان به مواردی مانند دقت 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/Cas نوع II که به عنوان CRISPR-Cas9 شناخته می‌شود، اغلب از سه جزء اساسی تشکیل می‌شود: یک جزء پروتئینی و دو جزء RNA. بر خلاف انواع دیگر اغلب در فرایند بیان و مداخله این سیستم علاوه بر crRNA، RNA 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 RNaseIII بتواند در قسمت تکراری crRNA برش ایجاد کند (۲۶). TracrRNA هم‌چنین در فرایند مداخله CRISPR-Cas9 برای عمل اندونوکلئازی Cas9 و شناسایی PAM لازم می‌باشد و بدون آن cas9 قادر به برش نیست. Cas9 برای برش دارای دمین‌های اندونوکلئازی RUVC و HNH است که به ترتیب هر کدام رشته مکمل و رشته 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-Cas9 در سلول‌های یوکاریوتی و پروکاریوتی از نوعی RNA استفاده می‌کنند که در ان crRNA با tracrRNA ترکیب شده و آن را با نام RNA راهنما (gRNA; Guide RNA) می‌شناسند. این تکنیک برای اولین بار در سال ۲۰۱۲ توسط گروه دودنا (Doudna) با سیستم CRISPR-Ca9 باکتری استرپتوکوکوس پایوژنز (Streptococcus pyogenes) انجام شد (۴۳). gRNA در مجموع شامل ۱۲۲ نوکلئوتید می‌باشد که ۴۲ نوکلئوتید آن متعلق به crRNA و ۸۰ نوکلئوتید آن متعلق به tracrRNA است. بیست نوکلئوتید از crRNA که مسئول شناسایی جایگاه هدف است، در قسمت ´5 آن قرار دارد و نوکلئوتیدهای قسمت ´3 به tracrRNA می‌چسبند که در نتیجه این اتصال یک ساختار حلقه بوجود می‌آید. نوکلئوتیدهای قسمت ´5 ناحیه شناسایی‌کننده هدف در crRNA اهمیت کمتری در اتصال دارند و ۱۲-۸ نوکلئوتید بخش ´3 (Seed) ناحیه شناسایی‌کننده هدف، در شناسایی هدف اختصاصی‌تر هستند (شکل۳) (۴۴)



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

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-05-04]

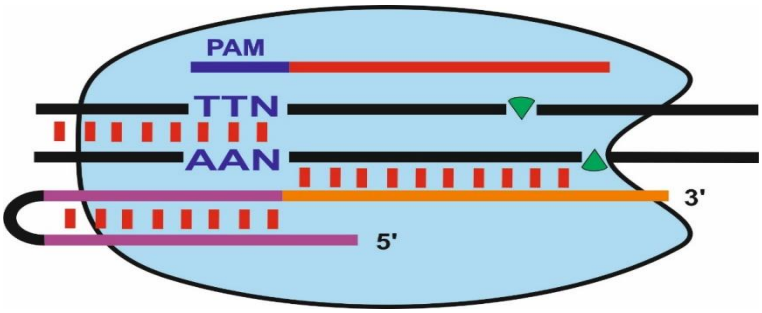
[DOI: 10.18502/ssu.v27i5.1524]

این گروه خود به سه زیرگروه II-A، II-B و II-C تقسیم می‌شود (۴۵, ۳۵). زیرگروه II-A علاوه بر دارا بودن پروتئین‌های معمول این سیستم، دارای پروتئین اضافه دیگری به نام Csn2 است که تصور می‌شود در مرحله جایگیری نقش دارد (۴۶). زیرگروه II-B اگرچه فاقد Csn2 است، اما دارای پروتئینی با عملکرد مشابه به نام cas4 می‌باشد (۴۶). هم‌چنین زیرگروه II-C فقط دارای پروتئین‌های Cas1، Cas2 و Cas9 است که بیشترین فراوانی را بین انواع CRISPR-Cas9 به خود اختصاص داده است (۴۸, ۴۷). در بین همه انواع CRISPR-Cas9 استفاده شده، بیشترین مورد متعلق به باکتری استرپتوکوکوس پایوژنز (spCas9) است که Cas9 در این نوع سیستم یک توالی PAM سه نوکلئوتیدی شامل NGG را شناسایی می‌کند و DNA را سه باز بالادست توالی PAM برش می‌دهد (۲۶). با این حال ممکن است به دلیل بزرگی ژنوم سلول‌های یوکاریوتی، توالی هدف، تشابه بالایی با دیگر نواحی ژنوم داشته باشد که باعث برش در نواحی غیرهدف (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).

سیستم CRISPR/Cas نوع V

گروه اسکاندر (Schunder) در سال ۲۰۱۳، ژنی به نام Cpf1، ژن‌های Cas و لوکوس CRISPR مرتبط با آن را در باکتری فرانسیسلا (Francisella spp) یافتند و هم‌چنین این گروه به دلیل وجود قسمت‌هایی از DNA فاژ در لوکوس CRISPR آن پیشنهاد داد که این سیستم خاصیت عملکردی دارد. پس از آن گروه زچ (Zetche) این سیستم CRISPR/Cas را به‌عنوان 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 RUVC سیستم CRISPR-Cas9 می‌باشد و فاقد دمین نوکلئازی HNH است. علاوه بر RUVC، این پروتئین دارای دمین Tnp است که تصور می‌شود مرتبط به خانواده ترانسپوزون‌ها است. به دلیل وجود دمین Tnp در Cpf1 پیشنهاد می‌شود این سیستم از عناصر متحرک ترانسپوزونی منشا گرفته است (۵۱, ۴۶). 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:

۱- 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 ´5 که اختصاصیت کمتری دارد در شناسایی هدف، اتفاق می‌افتد (شکل۴).



شکل 4: شماتیکی از ساختار سیستم CRISR/Cpf1

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-05-04]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i5.1524]

۲- اغلب توالی‌های PAM در cas9 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 Cpf1 و Cas9 این است که Cpf1 برخلاف Cas9 که نیاز به gRNA با طول ۱۲۲ نوکلئوتید دارد، تنها به یک crRNA با طول ۴۴-۴۲ نوکلئوتید نیاز دارد که باعث طراحی راحت‌تر و هم‌چنین ارزانتر شدن آزمایش ویرایش ژنومی می‌شود.

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

۵- معمولا 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, ۲۵).

این ویژگی‌ها باعث شده دانشمندان به فکر استفاده از این سیستم در سلول‌ها بیفتند. به همین دلیل سیستم‌های CRISPR/Cpf1 مختلف را آزمایش کردند وبه این نتیجه رسیدند که دو سیستم در باکتری‌های اسیدامینوکوکوس (Acidaminococuss) و لاکنوس یراسها(Lacnospiraceae)، موتاسیون‌هایی به اندازه Spcas9 بوجود می‌آورند (۵۲).

سیستم CRISPR/Cas نوع VI

گروه شماکو(Shmakov) طی مطالعاتی از سال ۲۰۱۱ تا ۲۰۱۵ موفق به شناسایی نوع جدیدی از سیستم CRISPR/Cas شده‌اند که هم‌اکنون به عنوان نوع VI می‌شناسیم (۵۳). این گروه بر اساس آنالیزهای کامپیوتری ژنوم باکتری‌ها و مبنا قرار دادن cas1 به عنوان حفاظت‌شده‌ترین پروتئین در سیستم CRISPR/Cas و شناسایی پروتئین‌های بیشتر از ۵۰۰ امینواسید، 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-Cas13b، با نام Cas13a 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 کامپیوتری 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.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-05-04]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i5.1524]

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

نوع کلاس	انواع	تنظیمی	مداخله	بیان	جایگیری
کلاس یک	نوعI	CAS4	Cas6، SS Cas7، Cas5 و *Cas*´	Cas6	Cas1، Cas2و CAS4
	نوعIII	CARF	Cas5، SS Cas7و Cas10	Cas6	Cas1، Cas2
	نوعIV	DinG	SS و Cas7 Cas5،	؟	؟
کلاس دو	نوعII	CAS4، Csn2	Cas9	RNaseIIIو Cas9	Cas1، Cas2و CAS4
	نوعV	CAS4	Cpf1	Cpf1	Cas1، Cas2و CAS4
	نوعVI	؟	Cas13	؟	Cas1، Cas2

چند نمونه از سیستم‌های CR ISPR تغییریافته

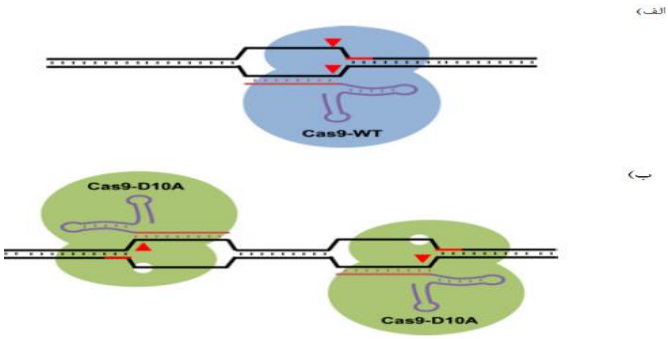
هنگام استفاده از سیستم‌های CRICPR در سلول‌های یوکاریوتی به دلیل بزرگی ژنوم این سلول‌ها، شاهد برش‌های غیراختصاصی در نواحی غیر از نواحی هدف خود هستیم (۵۶). تلاش‌ها برای اندازه‌گیری، فهم و بهبود اختصاصیت سیستم‌های CRISPR، تبدیل به حوزه جالبی برای محققین شده است. از انجایی که CRISPR-Cas9 پرکاربردترین سیستم CRISPR 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

روند 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 RUVC و HNH خود انجام می‌دهد (۵۷). محققین با ایجاد جهش در RUVC (D10A) و HNH (H840A) (تنها جهش در یکی از دمین‌ها و نه هر دو)، cas9ای بوجود می‌آورند که توانایی ایجاد برش یک رشته از DNA را دارد و هم‌چنین به دلیل کارایی بالای جهش در دمین RUVC نسبت به HNH، اصطلاح CRISPR-Cas9 nickase به جهش D10A اطلاق می‌شود (۵۷). برش تک‌رشته‌ای در DNA از طریق مسیر ترمیمی برش بازی (BER; Base excision repair) ترمیم می‌شود. برای همین در این تکنیک دو gRNA طراحی می‌شود که هرکدام یک برش تک‌رشته در رشته‌های متفاوت DNA ایجاد می‌کنند و هم‌چنین فاصله این دو gRNA (Offset) چیزی بین ۲۰-۰ است (۵۸، ۵۷). احتمال اینکه دو gRNA طراحی‌شده 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 (شکل۵) (۵۹).

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-05-04]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i5.1524]



شکل ۵: الف) عملکرد برشی سیستم CRISPR-Cas9 طبیعی. ب)عملکرد برشی سیستم CRISPR-Cas nickase

gRNA های تغییر یافته

علاوه بر روش‌هایی که تاکنون گفته شد، بهبود اختصاصیت هم‌چنین می‌تواند از طریق gRNA های تغییر یافته از لحاظ طول هم بوجود آید. مطالعات استفاده از gRNA در spcas9 با طول بلندتر از ۲۰ نوکلئوتید نتایجی به همراه نداشت. اما کاهش طول gRNA تاثیرات خوبی را نشان داده و همان‌طور که در صحبت‌های قبلی گفته شد، طول gRNA خود به تنهایی می‌تواند در اختصاصیت نقش داشته باشد. gRNA با تعداد ۱۷ و ۱۸ نوکلئوتید در قسمت شناسایی‌کننده هدف خود حساسیت بالاتری را نسبت به نوکلئوتیدهای غیرهدف نشان دادند که از این طریق کارایی سیستم‌ها را بالا برده‌اند (۶۱, ۶۰).

به طور جالبی gRNA های با تعداد ۱۴ و ۱۵ نوکلئوتید، سیستم‌های CRISPR/Cas ای بوجود می‌آورند 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). دربین gRNA های تغییریافته، دسته‌ای از gRNAها در مطالعات بررسی شدند که تغییرات شیمیایی روی آن‌ها انجام شده واین تغییر باعث افزایش اختصاصیت آن‌ها شده است. سنتز gRNA هایی با 2′-omethyl (M) 3′ 2′-o methyl phosphorothioate(MS) و 2′-o methyl 3′ ThioPACe(MSP) در انتهاهای 5′ و 3′، به‌طور قابل توجهی اختصاصیت را در T cellهای اولیه و CD_{34}^{+} سلول‌های بنیادی خونی افزایش داده است (۶۳). نقص این روش در افزایش برش غیراختصاصی است که gRNAهای جدیدتر با افزودن فلوئوفورها به نوکلئوتیدهای خاصی، برش غیراختصاصی را کاهش داده، ولی اختصاصیت آن نسبت به گروه اول پایین‌تر است (۴۴).

Cas9 غیرفعال

با توجه به پیشرفت cas9 در مطالعات ویرایش ژنومی، چندین گروه طی مطالعاتی با ایجاد جهش‌هایی (D10A و H480A) در دمین نوکلئازی این سیستم باعث بوجود آمدن cas9 غیرفعال (Dead cas9) شدند که قابلیت برش DNA هدف را از دست داده ولی با این‌حال در ترکیب با gRNA قابلیت اتصال به DNA هدف را دارد. محققین از این خاصیت برای کنترل بیان، سرکوب و تغییرات اپی‌ژنتیکی استفاده می‌کنند (۶۴). در این مورد ساده‌ترین فعال‌کننده و سرکوب‌کننده اتصال یافته به Cas9 غیرفعال به ترتیب VP64 و KRAB بودند. مطالعات بعدی در این زمینه با اتصال همزمان چندین فاکتور فعال‌کننده یا سرکوب‌کننده به سیستم CRISPR-Cas9 بوده است که نتایج موفقیت‌آمیزتری را نسبت به مدل‌های قبلی خود به همراه داشت. نکته قابل‌توجه در این زمینه، قابل برگشت بودن نتایج این تکنیک در مقایسه با تکنیک‌های برش‌دهنده DNA هدف می‌باشد (۵۸, ۷۰-۶۵). هم‌چنین اتصال Cas9 غیرفعال به تغییردهنده‌های اپی‌ژنتیکی مانند P300 و TET1 مانند فعال‌کننده‌ها و سرکوب‌کننده‌ها 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 (فعال‌کننده و

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-05-04]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i5.1524]

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 واژه‌هایی مانند CRISPR، Types of CRISPR، gRNA، Cas9، Cas9 غیرفعال، CRISPR/Cpf1، CRISPR-Cas13b، trans activating RNA، HR، NHEJ و CRISPR-Cas9 nickase سرچ 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 کاملا حل نشده است. محققین انتظار دارند با رفع این مشکلات که از مهم‌ترین آن‌ها 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 بالایی 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 ان می‌گذرد، در همه زمینه‌ها و حتی در نمونه‌های انسانی برای هدف‌های درمانی استفاده شده است. اگرچه این سیستم به‌طور گسترده‌ای در نمونه‌های انسانی استفاده نشده است، اما توانسته بحث‌های زیادی از لحاظ اخلاقی در جوامع علمی ایجاد کند که ژن‌درمانی در امبریو و زیگوت را می‌توان از مهم‌ترین دلایل ان دانست. با توجه به پیشرفت روزافزون این تکنولوژی وامکان 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.

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 Archaebacterium 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***

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-05-04]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i5.1524]

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.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-05-04]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i5.1524]

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***. NatRev Microbio 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.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-05-04]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i5.1524]

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, Kazlauskiene 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.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-05-04]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i5.1524]

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 StructMol 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.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-05-04]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i5.1524]

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.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-05-04]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i5.1524]

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol 27| NO 5 | Aug 2019
Received: 24 Jun 2018
Accepted: 4 Aug 2018

The new genomic editing system (CRISPR)

Mehrdad Talebi[1], 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.

[1]Department. of Medical Genetics- Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
[2]Diabetes Research Center- Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
***Corresponding author: Tel:** 09133514629, **email:** mmvahidi@gmail.com

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-05-04]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i5.1524]