مروری بر سیستم CRISPR/CAS

محمد عرفان یزدانی[1]،حمید رضا امینی[2]*

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، موسسه آموزش عالی نقش جهان، اصفهان، ایران

۲-گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، موسسه آموزش عالی نقش جهان، اصفهان، ایران

چکیده

با گسترش حوزه تحقیقات میکروبیولوژی، یک ابزار جدید ویرایش ژنوم از خصوصیات زیستی باکتری ها حاصل شد که با سادگی و تطبیق پذیری بیشتر نسبت به روش های قبلی به ویرایش دقیق ژنوم میپردازد. این تکنیک جدید، که به اختصار **CRISPR** نامیده می شود منجر به گسترش سریع تحقیقات در حوزه زیست پزشکی بخصوص در رابطه با بیماری های خاص نظیر سرطان و مدلینگ آن با استفاده از ویرایش هدفمند ژن ها شده است. در این مقاله به نحوه عملکرد روش **CRISPR** در ویرایش هدفمند ژنوم پرداخته میشود. در کل ستفاده از این تکنولوژی در درمان بیماری ها زمانی موثر و کارامد خواهد بود که اجزا این سیستم **CRISPR** روز به روز بهینه شده و از یک طرف امکان ایجاد برشهای نابجا در ژنوم سلولها را کاهش و از طرف دیگر بازدهی تغییرات هدفمند ژنوم را در زمان انتقال آن به سلول با استفاده روش های مختلف انتقال ژن افزایش دهد.

واژگان کلیدی : کریسپر، ژنوم، توالی یابی

مقدمه

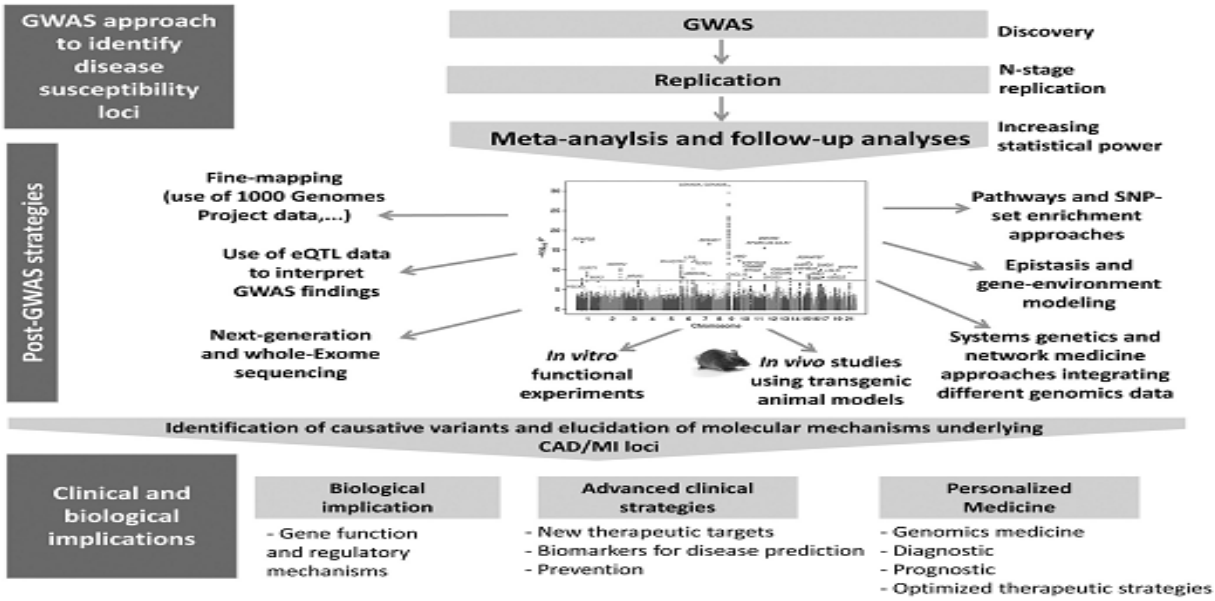
به طور کلی، ما در ژنتیک به دنبال این هستیم که یک ژن یا ژنهای کنترل کننده صفات در کجای ژنوم قرار گرفته و هر یک چه صفت و یا صفاتی را کنترل میکنند و جهشهای موجود در این ژنها و یا در مناطقی که در تنظیم بیان آن نقش دارند، چه تاثیری بر فنوتیپ خواهند داشت. خوشبختانه با پیشرفتهای اخیری که در مطالعات پویش کل ژنوم و با بکارگیری نشانگرهای گسترده شده در کل ژنوم (SNP) و توالی یابی ژنوم ایجاد شده است، بسیاری از مناطق مرتبط با صفات به ویژه در رابطه با بحث بیماریها به واسطه ارتباط بین این نشانگرها و صفات مورد نظر با فرض اینکه این شناساگرها و جایگاه های کنترل کننده این صفات در عدم تعادل لینکاژی (LD) قرار دارند؛ شناسایی شده اند.

در این زمینه، چنانچه توالی های ژنوم بسیاری از موجودات هم شناسایی شود که هم اکنون با سرعت چشمگیری در حال انجام است، با این حال درک عملکرد ژنهای موجود در آن، نیاز به ویرایش این توالیها با استفاده از حذف و یا تغییر واریانتهای سببی این ژنها، و سپس بررسی عملکرد فنوتیپهای حاصل از آن را دارد. حال با این همه پیشرفت در این زمینه در جهت شناسایی واریانتهای سببی، مرحله بعدی این مطالعات چیست و به عبارتی آنسوی مطالعات پویش کل ژنوم چه میگذرد و زندگی بعد از مطالعات پویش کل ژنوم چگونه خواهد بود، و چگونه و با چه استراتژیهایی میتوان مسیر تاریکی از سمت ارتباط (Association) به سمت عملکرد دقیق (Precise Function) هر ژن و نقش آن بر فنوتیپ و نهایتا درمان بیماریها را روشن کرد؟ [۱]

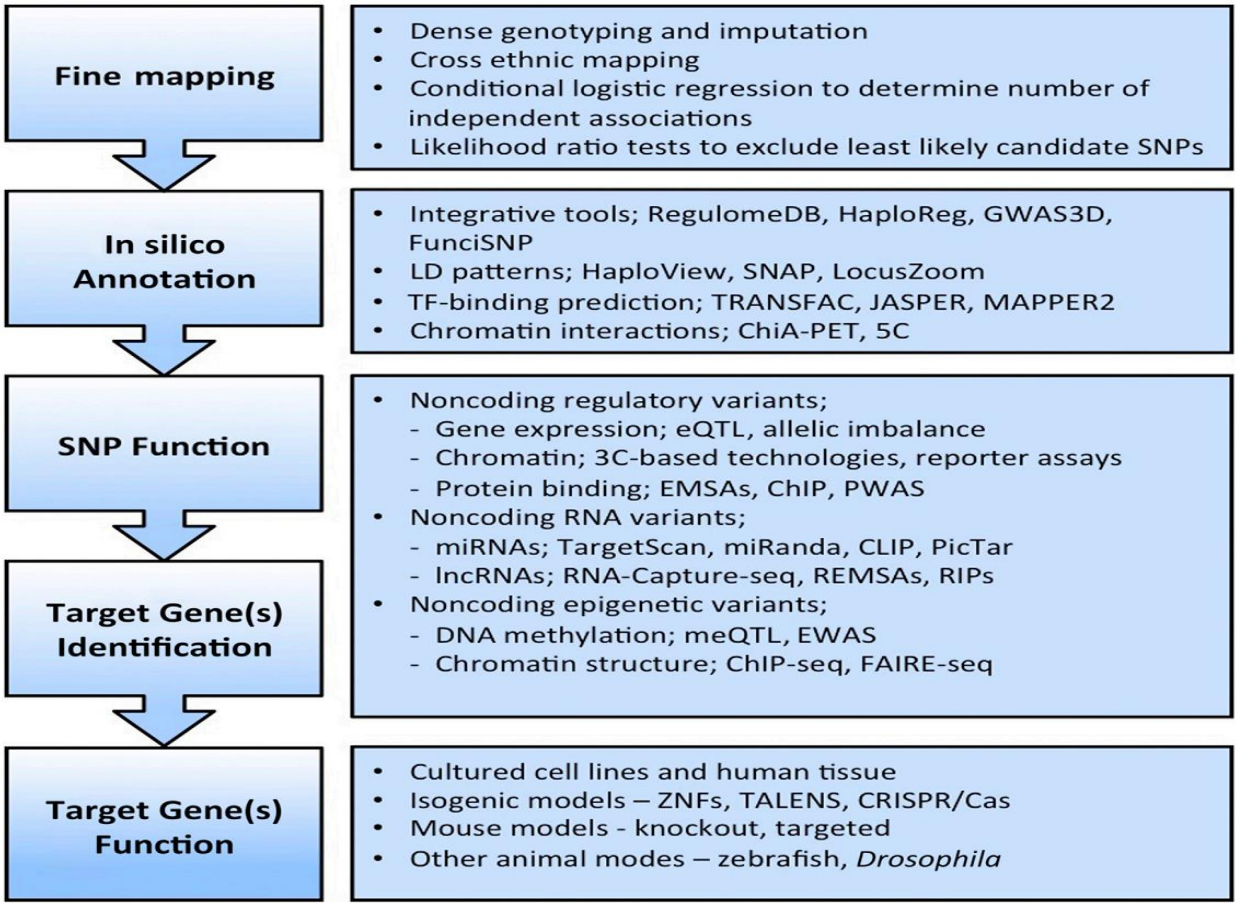
به طور کلی، استراتژیهای بعد از مطالعات پویش ژنوم شامل Fine–mapping (استفاده از دادههای پروژه ۱۰۰۰ ژنوم)، استفاده از دادههای eQTL جهت تفسیر یافتههای حاصل از GWAS، توالییابی ژنهای کد کننده پروتئینها (Whole Exome Sequencing) آزمایشهای مربوط به بررسی عملکرد تحت شرایط In Vitro و استفاده از مطالعات In Vivo و با استفاده از مدل حیوانات تراریخت و با کمک مدلهای ایزوژنیک و با استفاده از تکنیکهای ZFNs، TALENsو

۹CRISPR/CAS است (در شکل ۱ و ۲ مراحل پس از مطالعات GWAS، به طور کامل و با جزئیات تمامی مراحل نشان داده شده است).

قدرت عمل تکنیکهای TALENs و به ویژه ۹CRISPR/CAS به گونه ای است که میتوانند تغییراتی در حد یک آلل (جایگزینی آلل جهش یافته با نوع وحشی) و یا حذف و وارونگی در حدKbp ۱۴۰ (وارونگی ژن فاکتور ۸ خون، مرتبط با بیماری هموفیلی نوع Aدر سلولهای بنیادی جنینی انسان) و تا بعضا Mbp ۵ (در Zebra fish) در ژنوم ایجاد کنند. که طبیعتا با توجه به اینکه ایجاد و یا حذف جهش تک یا چند نوکلوئتیدی جهت غیر فعال کردن ژنهای کد کننده پروتئین، بررسی عملکرد ژنهای کلاستر (مجموعه ای از ژنهای یک موجود که معمولا در فاصله کمتر از ۱۰۰۰ جفت باز از یکدیگر قرار داشته و برای ساخت پلی پپتیدها و یا پروتئین های مشابه کد شده، و در مجموع یک عملکرد کلی را باعث میشوند) و همچنین توالی های تنظیمی ژنها کافی نیست، و با توجه به اینکه میتوان به طور همزمان در چندین قسمت ژنوم به طور هدفمند تغییرات مورد نظر را اعمال کرد؛ ایجاد وارونگی و یا حذف توالیها با اندازه طولانیتر جهت بررسی عملکرد ژنها بیشتر حائز اهمیت است[۱۴،۱۳،۱۲،۱۱،۱۰،۹،۸،۷،۶،۵،۴،۳،۲]. در این مقاله به بررسی ساز و کار سیستم کریسپر و نقش آن در درمان بیماری ها پرداخته خواهد شد.



شکل ۱: استراتژیهای بعد از مطالعات پویش ژنوم و کاربردهای کلینیکی و بیولوژیکی حاصل از آن



شکل ۲: مراحل بعد از مطالعات پویش ژنوم، از Fine Mapping تا شناسایی عملکرد دقیق ژنها با استفاده از مدلهای ایزوژنیک و به کمک تکنیکهای ZFNs، TALENs و CRISPR/ CAS۹

تاریخچه ی سیستم **CRISPR/Cas۹**

میکروب ها استراتژی های زیادی برای فرار از آلودگیهای ناشی از ویروسها و فاژها کسب کردهاند تا از درج DNA ویروس در ژنوم خود جلوگیری کنند. در طی ده سال گذشته یک سیستم ایمنی جدید در باکتریها کشف شد، یک تکنیک جدید برای جلوگیری از عفونت. این سیستم ایمنی به باکتری اجازه میدهد که هم مانع از درج DNA خارجی به داخل ژنوم شود و هم DNA خارجی را برای تخریب مورد هدف قرار دهد. این سیستم اولین بار در سال ۱۹۸۷ شناسایی شد. محققان بر روی آنزیم *iap*تحقیق میکردند که در ناحیه ی '۳ در پایین دست ژن *iap* مجموعهای از توالیهای تکراری ۲۹ نوکلئوتیدی با فواصل ۳۲ نوکلئوتیدی را مشاهده کردند.

پس از آن عناصر تکرار شوندهی مشابهی در سایر باکتریها و آرکیباکترها یافت شد. بر اساس تحقیقات، این توالیهای تکراری منظم در بیش از ۴۰ درصد باکتریها و ۹۰ درصد آرکیباکتریها وجود داشته است.

در سال ۲۰۰۲ این تکرارهای کوتاه، تناوبهای کوتاه پالیندروم فاصلهدار منظم خوشهای نام گرفتند و اختصار CRISPR[۱] توسعه داده شد [۱۵].اگرچه CRISPR دربسیاری از گونه های باکتریایی شناسایی شد اما اهمیت بیولوژیکی آن تا سال ۲۰۰۵ ناشناخته باقی ماند. در آن زمان سه گروه تحقیقاتی مستقل گزارش دادند که CRISPR شامل مشتقات کروموزمی است که ماهیت فاژی و پلاسمیدی دارند [۱۶, ۱۷].

در سال ۲۰۰۷ پس از تجزیه و تحلیلهای بیشتر، تایید شد که سیستم CRISPR نوعی مکانیسم دفاعی باکتریایی است که باکتری را در مقابل پلاسمید و فاژ محافظت میکند [۱۸]. بارانگو و همکاران [۲] در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که باکتر S. Thermophilus با استفاده از این سیستم قابلیت از بین بردن ژنوم باکتریوفاژها را دارد [۱۹]. سپس typ II از این سیستم توسط گروه چارپنتیر [۳]طراحی شد که نیاز به یک RNA[۴] راهنما به طول ۲۰-۲۳ نوکلئوتید و نیز [۵]پروتئین Cas۹ دارد. این تکنولوژی عمدتا توسط دو گروه تحقیقاتی در دنیا: گروه ژانگ [۶] و گروه باست [۷] ترویج شده است [۱۵]. بعد از آن گزارش، محققان توانستند با تزریق پروتئین Cas۹ و gRNA به داخل سیتوپلاسم زیگوت های موش اقدام به غیرفعال کردن هدفمند چند ژن و یا وارد کردن همزمان چند ژن به داخل ژنوم میزبان نمایند. پس از این مطالعات، گزارشات زیادی مبنی بر تزریق همزمان mRNA مربوط به Cas۹ و sgRNA[۸] به درون زیگوت به عنوان یکی از روش های کارآمد به منظور تولید حیوانات مدل در موش، گوسفند، میمون و خوک منتشر شده است.

خاص بودن این سیستم برای DNA خارجی چند سال بعد با کشف موتیف های محافظت کنندهی داخل ژنوم روشن شد. موتیفهای حفاظت کنندهای که PAM[۹] نامیده میشوند. این موتیفها تارگتهای ترمیمی برای اندونوکلئازهای Cas هستند و به سیستم اجازه میدهند که DNA خودی را از غیرخودی تشخیص دهند. در طی سالهای بعدی و مطالعات گستردهتر ژن *Cas* ، پروتیئن *Cas* ، crRNA[۱۰] ، tracrRANA[۱۱] و جزیئات بیشتر دیگری مورد بررسی قرار گرفت و سیستم CRISPR به سرعت منتشر شد [۲۰, ۲۱, ۲۲]. گرچه مکانیسمهای مولکولی CRISPR هنوز به وضوح مشخص نشدهاند اما عملکرد و فرآیندهای اساسی آنها تا حدودی روشن شدهاند.

در سال ۲۰۱۰ بر اساس نقش پروتیئنهای *Cas*، سیستم CISPR به سه دسته تقسیم شدند: نوعI ، نوعII و نوعIII. در نوعII تنها یک پروتیئن *Cas* برای شناسایی و تفکیک سایتهای هدف مورد نیاز است در حالی که سیستمهای نوع I و III نیازمند مجموعهای از پروتیئن های *Cas* هستند [۲۳, ۲۴]. پروتئین منحصر به فرد سیستم نوع II، *Cas9* میباشد که در واقع جزء اصلی سیستم CRISPR را تشکیل میدهد[۲۵]. با توجه به عملکرد ، مکانیسم و سادگی CRISPR نوعII نسبت به دو نوع دیگر، محققان شروع به بررسی آن در ویرایش ژنوم کردند. در سال ۲۰۱۲ این موضوع توجه محققان را جلب کرد که با توجه به اینکه کمپلکس Cas9-crRNA در *Streptococus Thermophilus* و *Sterptococus Pyogens* می تواند به عنوان یک اندو نوکلئاز توسط RNA راهنما هدایت شود در محیطهای in vitro نیز با طراحی توالی های دقیق RNA راهنما به عنوان یک هدایتگر و به کمک پروتئین Cas۹ میتوان مکانهای ژنی خاص را در DNA مورد هدف قرار داد[۷۸]. به طور خلاصه

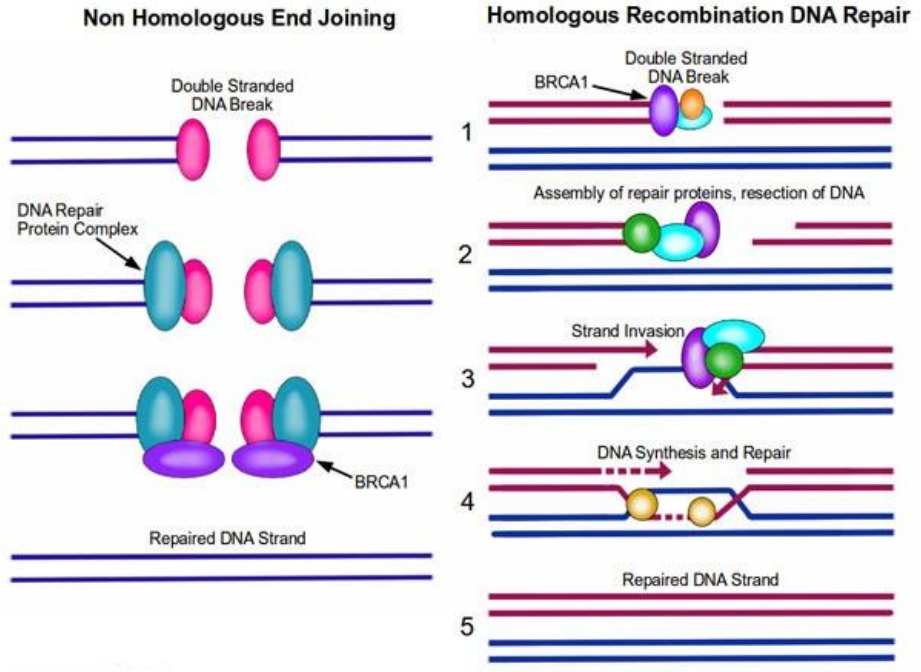
---

[۱] Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats.
[۲] Barrangou et al
[۳] charpentier
[۴] Guide RNA
[۵] CRISPR Associated Protein9
[۶] Zhang
[۷] Bassett
[۸] Single-guide RNA
[۹] Protospacer Adjacent Motifs
[۱۰] CRISPR RNA
[۱۱] trans-activating crRNA

مولکول راهنما شامل یک مولکول تک رشتهای است که ادغام بین crRNA و tracrRNA را تسهیل میبخشد، به همین دلیل به آن sgRNA[۱۲] میگویند. علاوه بر این مواد ژنتیکی جدید را میتوان در محل برش از طریق ایجاد یک الگو درج کرد که میتواند به سادگی یک جهش تک نوکلئوتیدی یا درج چندین هزار نوکلوتید جدید از طریق HDR[۱۳] باشد.

این یافته ها همراه با مطالعات قبلی منجر به پیشنهاد این نظریه شد که مجموعه ی کامل از Cas9-crRNA میتواند یک ابزار ویرایش قوی ژنوم در هر دو رشتهی DNA باشد.

در این زمینه استدلال بر این است که میتوان از فرایند عمومی بسیار محافظت شده نوترکیبی همولوگ (Homologous Recombination) استفاده کرد. به طور کلی ، سلولها از فرایند نوترکیبی همولوگ (HR) جهت ایجاد نوترکیبی در جایگاه خاصی از ژنوم به ویژه همراه با فرایند اتصال انتهای غیر همولوگ (Non Homologous End Joining) جهت ترمیم DNA دارای دو رشته شکسته شده (Double-Strand Break) استفاده میکنند، که در حالت HR توالی مشابه توالی شکسته شده از توالی کرموزوم همتای غیر آسیب دیده کپی، و با استفاده از نوترکیبی همولوگ در محل کرموزوم شکسته شده متصل میشود ولی در فرایند NHEJ، دو رشته DNA دقیقا در محل شکسته شده به یکدیگر متصل میشوند (شکل ۳).



شکل ۳: مکانسیم دو فرایند HR و NHEJ در ترمیم DNA

لذا در مطالعات مربوط به انتقال ژن از همین فرایندهای طبیعی سلولها جهت اتصال ژنهای خارجی (با در نظر گرفتن توالی های همولوگ با ژنوم میزبان) به ژنوم و همچنین ایجاد تغییرات در ژنوم میزبان استفاده میشود، که لازمه آن بالا بودن میزان این دو فرایند (HR و NHEJ) به همراه ایجاد شکست دو رشتهای DSB) DNA) در سلولهای موجود مورد استفاده است.

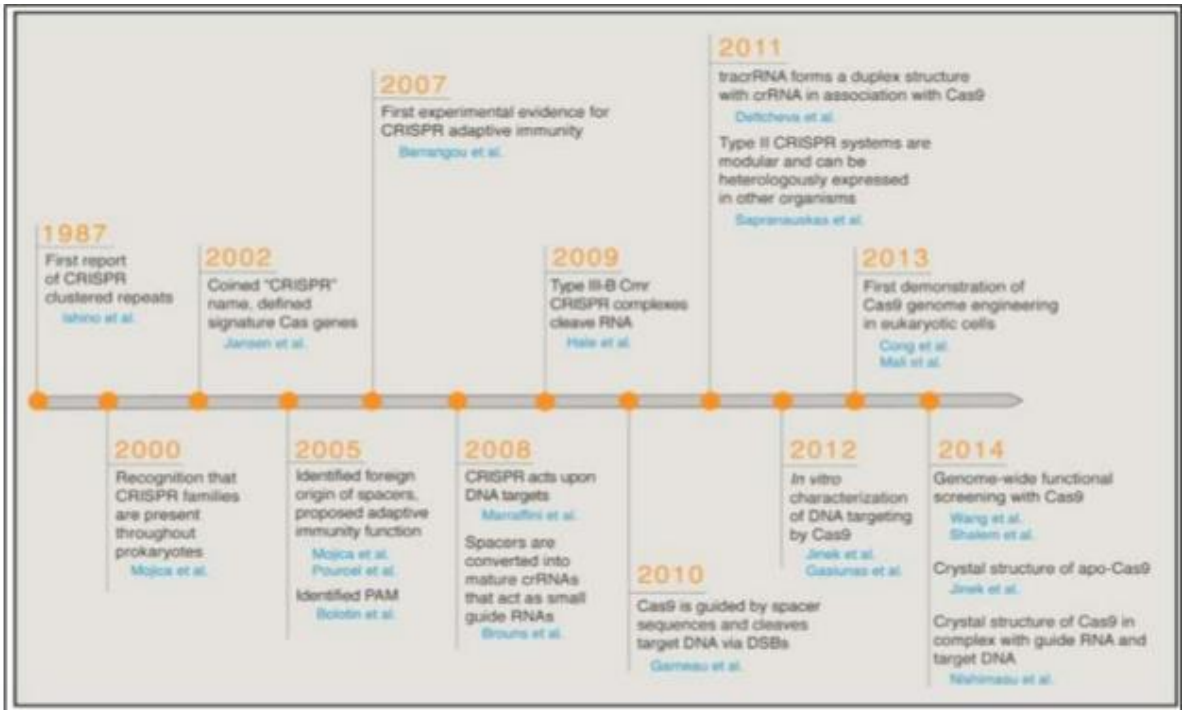
بنابراین، اولین مرحله ی توسعه تکنولوژی نوترکیبی همولوگ جهت ایجاد تغییرات در ژنوم (به طوری که بر عملکرد سایر ژنها نیز تاثیر منفی نداشته باشد و از طرفی عملکرد یک ژن و میزان واریانسی که واریانتهای آن ژن بر میزان عملکرد یک صفت میگذارند را بتوان بررسی نمود) ایجاد شکست دو رشتهای (DSB) در ژنوم در مکانی خاص است. در این زمینه در سالهای اخیر

---

[۱۲] single guide RNA

[۱۳] Homology-Directed Repair

تکنیکهای مختلفی نظیر ZFNs، TALENs و بخصوص ۹CRISPR/CAS معرفی شده اند که میتوانند در هر قسمتی از ژنوم به طور کاملا هدفمند شکست دو رشتهای را ایجاد و تغییرات مورد نظر را بسته به هدف محقق اعمال کرد و به ویژه در مورد تکنیک ۹CRISPR/CAS مطالعات در این زمینه بقدری پیشرفت کردهاند که مقالات منتشر شده از آن، مجلات معتبر Nature، Cell و Science را به خود اختصاص داده است و به ویژه که در سالهای اخیر رشد چشمگیری داشته است و از سال ۲۰۱۳ به بعد سیستم ۹CRISPR/Cas به عنوان یک تکنولوژی جدید در مهندسی ژنوم، هدفمند شد و با موفقیت در بسیاری از گونه ها مورد استفاده قرار گرفت. علاوه بر این در طی چند سال اخیر این روش به طور مداوم به منظور دستیابی به نتایج بهتر و بهینهتر اصلاح شده است و در طول ۳۰ سال گذشته CRISPR از یک سری توالیهای ناشناخته به یک ابزار ویرایش ژنومی امیدوار کننده در سطح جهانی تکامل یافته است[۲۶].



شکل(۴): تاریخچه ی CRISPR

بیولوژی نوع**II** سیستم **CRISPR** در باکتری:

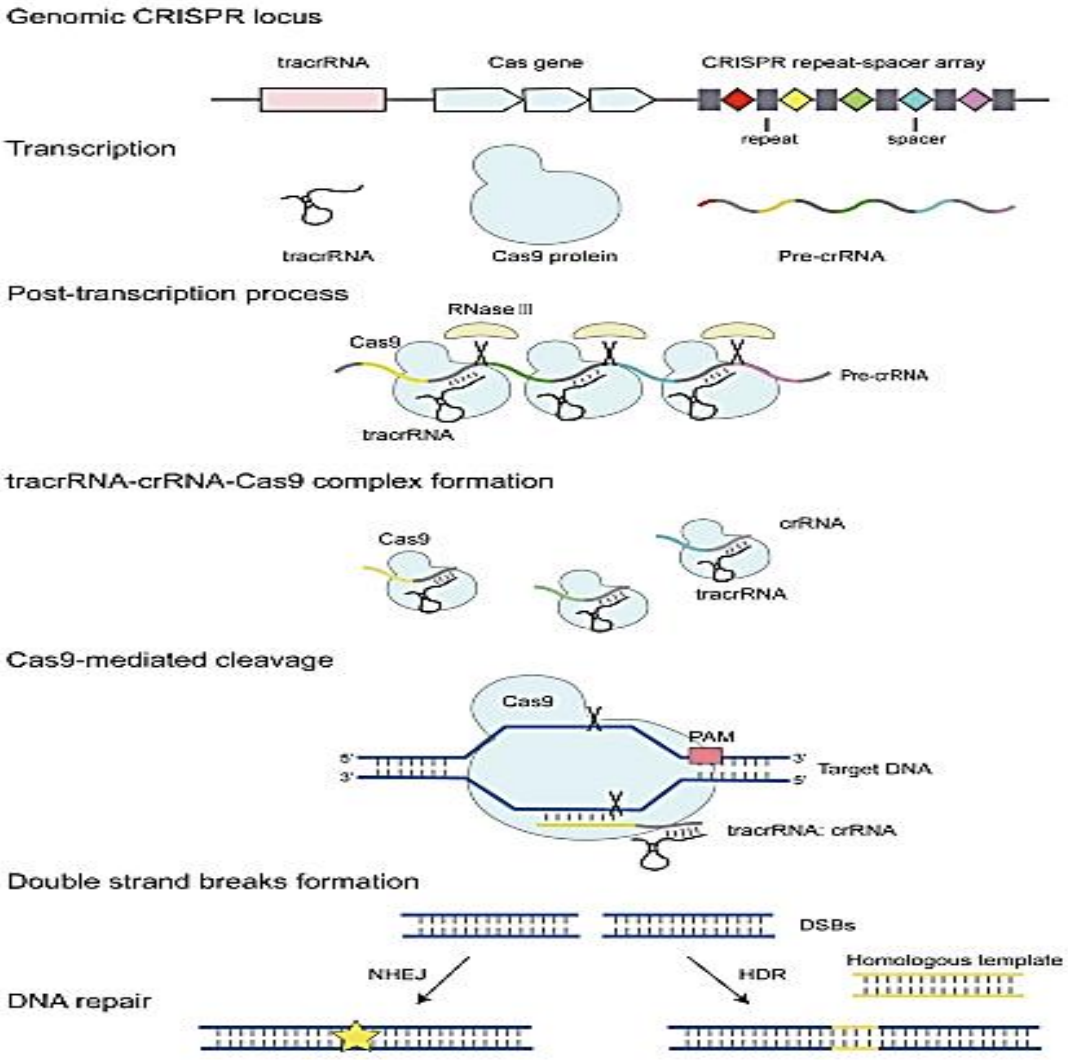
مکان ژنی CRISPR به tracrRNA، ۹Cas و pre-crRNA رونویسی میشود. سپس با همکاری tracrRNA و RNaseIII، pre-crRNA تکامل یافته و دابلکس tracrRNA:crRNA شکل می گیرد که در نهایت ۹Cas را جهت ایجاد شکست دو رشته ای یا DSB در محل مورد نظر هدایت میکنند و DSB ایجاد شده میتواند در مسیر نوترکیبی همولوگ یا اتصال انتهای نواحی غیر همولوگ NHEJ[۱۴] یا HDR شده و ترمیم میگردد.

نوع**II** سیستم **۹CRISPR/Cas** جهت ویرایش ژنوم:

[۱۴] non_homologous end joining

ناحیهی ژنی سیستم CRISPR/*Cas9* شامل ژن *tracrRNA* ، ژن *Cas* و آرایه های تکرار شونده ی ساختار ژنی CRISPR است که هر کدام به ترتیب به tracrRNA ، پروتئین *Cas* و pre-crRNA رونویسی میشوند (شکل ۵) با همکاری tracrRNA و RNaseIII، pre-crRNA میتواند به crRNA و tracrRNA متصل شود و در نهایت سبب هدایت ۹Cas به مکان مورد نظر شود[۲۷]. کمپلکس Cas9:RNA به صورت تصادفی توالی DNA را بررسی میکند و به سرعت از مکانهای غیر PAM میگذرد و تنها به توالی PAM متصل میشود. PAM یک موتیف کوتاه در مجاورت توالی هدف میباشد (معمولا موتیف NGG برای ۹spCas و گاهی موتیف NAG) که کمپلکس Cas9:RNA برای اعمال اثر بر روی DNA را مورد بررسی قرار میدهد[۲۸].

نقطه ای از ژنوم که با tracrRNA:crRNA مطابقت دارد و در کنار توالی PAM نیز قرار گرفته است در دومین HNH نوکلئاز ۹Cas، در رشتهای که به crRNAباند شده است شکافی ایجاد میشود و دومین RUVC-like رشتهی دیگر DNA را برش میدهد و فرم[۱۵]DSBs در محل مورد نظر DNA ایجاد میشود[۲۲].

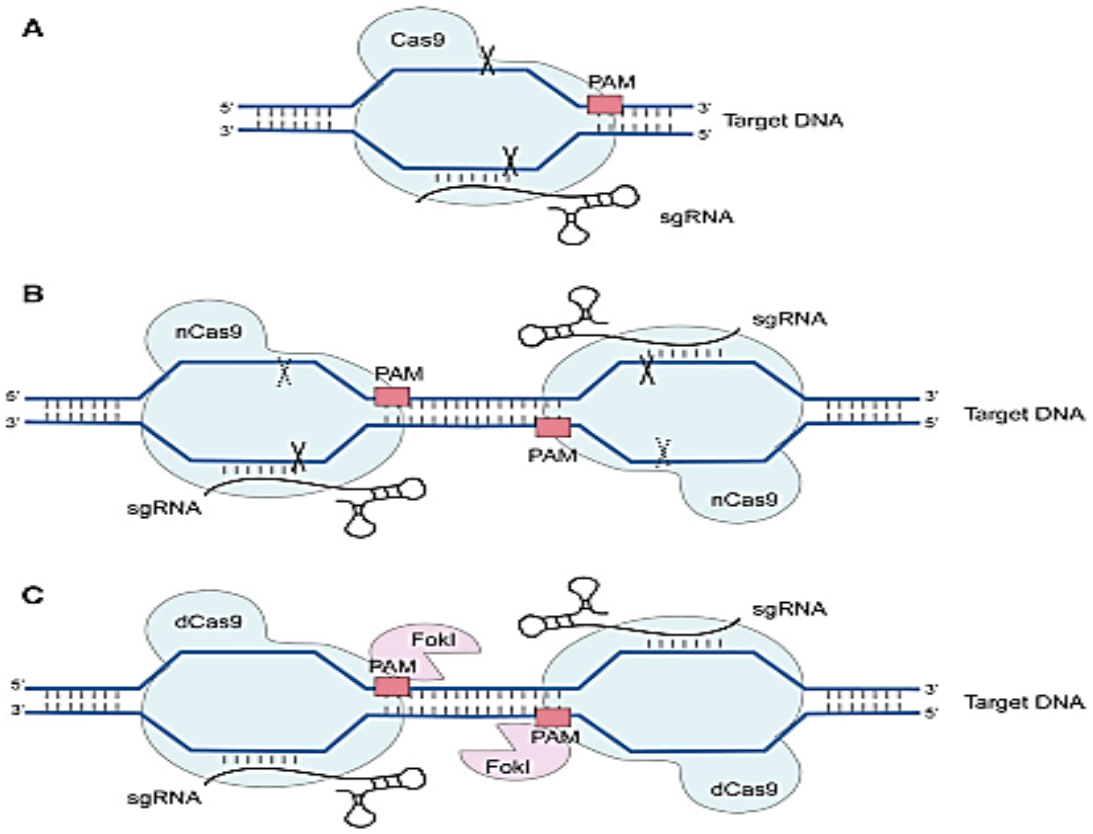


شکل ۵: بیولوژی نوعII سیستم CRISPR در باکتری

[۱۵] Double Strand Breaks

زمانی که در DNA در سایت هدف DSB ایجاد میشود دو مکانیسم ترمیمی میتوانند فعال گردند یکی NHEJ و دیگری HDR. وقتی الگویی در محیط حضور نداشته باشد NHEJ با محل شکاف پیوند برقرار میکند و میتواند سبب الحاق یا حذف (indel[۱۶]) شود. حال اگر Indel سبب تغییر در چارچوب خوانش توالی نوکلئوتیدی شود میتواند سبب ایجاد کدونهای توقف زودرس شود[۲۹] یا سبب تغییر در عملکرد پروتئین حاصل از ترجمه گردد[۳۰] اما در صورتی که در محیط الگوی دهنده (donor) حضور داشته باشد مسیر HDR فعال میشود که میتواند سبب حذف یا اضافه یا جهش در ژنوم گردد[۳۱].

به عنوان یک نتیجه ی کلی نوعII سیستم CRISPR به عنوان یک ابزار قابل برنامه ریزی قوی در حال توسعه است که به عنوان ۹CRISPR/Cas شناخته میشود. در ابتدا محققان از سیستم ۹Cas برای ایجاد DSBs استفاده کردند[۲۶]. گروهی دیگر از محققان شروع به ساخت پروتئینهای ۹Cas مصنوعی کردند و آن را در یک سیستم بیان مربوط به پستانداران کلون کردند علاوه بر این یک sgRNA کایمریک را جایگزین دابلکس tracrRNA:crRNA کردند. با استفاده از یک سیستم سفارشی ۹CRISPR/Cas ، جهشهای مورد نظر را در سلولهای انسانی نیز میتوان سازماندهی کرد.که میزان تاثیر آنها در سایت هدف بین ۲ تا ۳۸ درصد میباشد. در همین حال گانگ و همکارانش[۳۲] دو نوع متفاوت سیستم ۹CRISPR/Cas را طراحی کردند. به طوری که نوکلئازهای Cas میتوانند برشهای دقیق را در مکانهای خاص تحت هدایت RNA راهنمای کوتاه در انسان و موش ایجاد کنند (شکل ۶) [۳۲].



[۱۶] insertion or deletion

شکل(۶): ویرایش ژنوم با A :CRISPR/Cas9) با هدایت sgRNA دومین HNH نوکلئاز ۹Cas رشتهی متصل به sgRNA را برش میدهد و دومین RuvC-like رشته ی دیگر DNA را برش میدهد، و باعث ایجاد DSB در DNA میگردد. sgRNA :[۱۷]nCas9 (B برای جلوگیری از خارج شدن سیستم از مسیر هدف مورد استفاده قرار می گیرند.(جهش در دومینهای HNH و RuvC-like سبب ایجاد نوکلئاز ۹Cas میشود که توانایی برش در یک رشته از DNA را دارد.) C) دایمر ۹sgRNA-guided fCas: که برای بهبود قابلیت ویرایش ژنوم مورد استفاده قرار میگیرند.(۹dCas با دومین نوکلئازی Fokl ادغام میشود)

با تکامل تدریجی سیستم CRISPR/Cas9، ۹Cas استخراج شده از باکتری *S.pyogens* مورد استفاده قرار گرفت. و با موفقیت در باکتری ها، قارچ ها، ویروس ها، انگل ها، گیاهان، حیوانات و رده های سلولهای انسانی آزمایش شد[۳۳, ۳۴]. حتی ویرایش با استفاده از چندین sgRNA نیز به خوبی انجام شد[۳۵]. استفاده از این سیستم در انسان میتواند روشهای قبلی مانند استفاده از حیوانات مدل، کنترلهای اپیژنتیکی و غیره را لغو کند. با این وجود اگرچه CRISPR طیف وسیعی از اقدامات را دارد اما جنبه های تحقیقاتی آن هنوز کامل نگردیده است و مواردی هستند که باید به طور دقیق مورد توجه قرار گیرند.

فاکتورهای کلیدی که بر روی سیستم ۹CRISPR/Cas تاثیر گذارند:

از زمان شناسایی تا کنون، سیستم CRISPR خود را به عنوان یک ابزار قدرتمند و انعطاف پذیر برای ویرایش و تنظیم ژنوم نشان داده است. اما با بررسی های بیشتر مشخص شد این سیستم به آن آسانی که تصور می شد نیست. مطالعات انجام شده و تجربیات به دست آمده نشان می دهند که هر کدام از عوامل وابسته به این سیستم مثل فعالیت ۹Cas، انتخاب مکان هدف، طراحی sgRNA، روشهای انتقال، اثرات مناطق غیر هدف و میزان بروز HDR، تاثیر زیادی بر روی این تکنیک میگذارند. البته با شناسایی این مشکلات بالقوه، می توانیم از این تکنیک بهتر بهرمند شویم. همچنین میتوانیم روی بهبود و کارآیی آن تمرکز کنیم[۳۶].

sgRNAs برای اهداف مختلف به صورت دستی یا با استفاده از نرم افزار مناسب طراحی میشوند. sgRNAs را میتوان با ۹Cas در یک وکتور کلون کرد. سپس وکتور کامل شده به داخل سلولهای هدف منتقل کرد. در نهایت DNA هدف در محل مورد نظر می تواند شکسته شود. در طول این فرآیند اثرات حاصل از فعالیت ۹Cas، انتخاب مکانهای هدف، طراحی sgRNA، روشهای انتقال، اثرات هدف و میزان بروز HDR میتوانند تاثیرات و عملکرد سیستم ۹CRISPR/Cas را تحت تاثیر قرار دهند.

فعالیت :۹**Cas**

به عنوان یک ابزار ویرایش ژنوم، این سیستم مشخصه های نوکلئوتیدی را بر اساس مکمل بودن با دو جزء، یعنی پروتئین *Cas9* و sgRNA تقسیم میکند. با اتصال sgRNA به DNA هدف، پروتئین *Cas9* تحت یک بازآرایی فضایی در ساختار خود قرار میگیرد. لوب کاتالیتیکی نوکلئاز *Cas9* در حدود ۱۰۰ درجه چرخش میکند و باعث فعال شدن خاصیت برش دهندگی نوکلئاز میشود[۳۷]. به طور کلی *Cas9* مکانهای ژنومی را تحت هدایت sgRNA میتواند تشخیص دهد که به ۲۰ نوکلئوتید توالی هدف متصل شده باشند. با این حال محققان دریافتند که sgRNA همراه با ۸۵+ نوکلئوتید بخش انتهایی tracrRNA سبب افزایش فعالیت *Cas9* و سبب تحریک سطح بالاتری از indels تحت شرایط in vivo میشود[۶۸]. آنها همچنین مشاهده کردند که عدم پیوستگی و فاصله ی دو باز غیر منطبق در ناحیهی ابتدایی PAM به طور قابل ملاحظهای فعالیت *Cas9* را کاهش میدهد[۳۷]. تحقیقات بعدی نشان داد که بیشتر از ۵ ناحیه ی عدم انطباق بازی و بیشتر ۳ ناحیهی ایجاد فضاهای درونی سبب لغو فعالیت نوکلئاز *Cas9* در ناحیهی مورد نظر میشود. همچنین کوتاه بودن توالی RNA راهنما نیز باعث کاهش فعالیت

[۱۷] paired Cas9 nikases

Cas9 می شود[۳۸]. بنابراین برای بهینه تر کردن فعالیت *Cas9* طراحی مناسب sgRNA و انتخاب صحیح مکان هدف به شدت مورد نیاز است. در تئوری استفاده از مقادیری بیشتری از کمپلکس sgRNA:*Cas9* می تواند سبب افزایش توانایی قدرت ویرایشی شود. با این حال در عمل میزان زیاد این کمپلکس ممکن است سبب افزایش اثرات اجتناب ناپذیر غیر هدف بر روی توالی ژنوم گردد[۳۹]. افزایش بیش از ۶ برابر مولکول sgRNA نسبت به *Cas9*، حداکثر فرکانس جهش بر روی سایت هدف را نشان داده است. به خصوص زمانی که پروتئین *Cas9* نوترکیب به داخل کشت سلولهای انسانی انتقال یافته است[۴۰]. بنابراین برای بهبود نرخ جهش هدفمند و همچنین فعالیت مفید *Cas9* باید غلظت sgRNA و *Cas9* را در نظر گرفت.

فعالیت پروتئین *Cas9* توسط عوامل دیگری به غیر از sgRNA نیز تحت تاثیر قرار میگیرد. در ویرایش ژنهای یوکاریوت، *Cas9* همیشه با NLS[۱۸] جهت انتقال به داخل هسته، ارتباط برقرار میکند. محققان نشان دادند که اضافه کردن یک لینکر حاوی ۳۲ اسیدآمینه بین *Cas9* و NLS میتواند فرایند تجزیه شدن DNA را افزایش دهد.

در طی مدتی که این سیستم به عنوان یک سیستم ویرایشی مورد استفاده قرار گرفته است چندین پروتئین *Cas9* مختلف نیر مورد بررسی قرار گرفتهاند. از قبیل: [41] NmCas9[۱۹]، St1Cas9[۲۰] [۴۲] و SaCas[۲۱] ۹. در مقایسه با SpCas۹ معمول، بیشتر ارتولوگهای پروتئین *Cas* دارای توالیهای تشخیصی PAM متفاوت و فعالیت های متفاوت می باشند. در رده های سلولی انسانی اگر از پلاسمید استفاده شود *St1Cas9* فعالیت بالاتری را نشان میدهد و *SaCas9* اثربخشی بیشتری دارد[۴۳]. در حالی که در صورت استفاده از لنتیویروسها، *St1Cas9* نرخ جهش پایین تر از حد متوسطی را نسبت به *SpCas9* نشان میدهد[۴۴]. بنابراین انتخاب یک ارتولوگ مناسب پروتئین *Cas9* که متناسب با هدف باشد باید با دقت هرچه تمامتر صورت گیرد.

انتخاب مکان هدف و طراحی **sgRNA**:

در میان تمامی مشکلات و سختی های سیستم CRISPR/*Cas9* طراحی sgRNA اولین نگرانی محسوب میشود. از آنجایی که این سیستم بسیار قابل برنام هریزی است، کمپلکس *Cas9*:sgRNA می تواند برای ویرایش ژنوم یا غیرفعالسازی کاتالیتیکی *Cas9* به کار گرفته شود. این کمپلکس همچنین میتواند برای تنظیم ژن نیز استفاده شود. این برنامه ها تماما نیاز به طراحی sgRNA دارند. اما از آنجایی که این طراحی بررسی بسیاری از معیارهاست، طراحی هوشمندانه ی sgRNA یک چالش عمده است. قبلا تصور بر این بود که کمپلکس *Cas9*:sgRNA میتواند دو رشته ی DNA را در حضور PAM و توالی هدف مجاور آن برش دهد. اما بسیاری از آزمایشها نشان داده اند که بعضی از sgRNAs در محیط آزمایش کمترین میزان عمل را دارند یا حتی غیر فعال میشوند[۴۵-۴۳]. جهت آزمایش های ویرایش ژنوم، مجموعهای از sgRNAs باید ابتدا غربالگری شوند. بنابراین معیارهای طراحی یک sgRNA با حداکثر کارایی یک توانمندی ارزشمند است.

با جمع آوری داده های تجربی در مورد استفاده از سیستم CRISPR/*Cas9* برای مهندسی ژنوم، طیفی از ویژگیها در داخل و اطراف توالی هدف برای افزایش کارایی sgRNA شناسایی شدند.

جهت ویرایش ژنوم توسط این سیستم، در انتهای '۵ sgRNA یک باز گوانین (G) افزوده می شود به عنوان مثال: GX19NGG. که به شدت برای بیان از یک پروموتور U۶ مورد نیاز است[۴۳]. علاوه بر این ترجیح داده می شود که در اولین یا دومین ناحیه ی نزدیک به PAM قرار گیرد تا به فعالیت *Cas9* کمک کند[۴۳]. در حالی که وجود نوکلئوتید سیتوزین (C) در موقعیت های مشابه بسیار نامطلوب است. و سوم اینکه وجود چندین یوراسیل (U) در توالی sgRNA سبب کاهش بیان

---

[۱۸] nuclear location signal

[۱۹] *Neisseria meningitidis Cas9*

[۲۰] *S.thermophilus* Cas9

[۲۱] *Staphylococcus aureus* Cas9

sgRNA میگردد. حضور تیمیدین (T) در چهار موقعیت نوکلئوتیدی مجاور PAM نامطلوب است[۴۶]. باز آدنین (A) بهتر است در وسط sgRNA قرار گیرد و باز گوانین بهتر است دور از ناحیه ی PAM قرار گیرد. در کل ناحیه ی غنی از گوانین و حضور کمتر آدنین در sgRNA سبب پایداری و اثر بخشی بیشتر sgRNA میگردد[۴۷].

علاوه بر این ویژگیهای جدید PAM در *SpCas9* تاثیر مستقیم دارند نیز شناسایی شده اند. برای مثال: اولویت بندی در نوکلئوتید مستقر در NGG وجود دارد. در جایی که نوکلئوتید سیتوزین حضور دارد موفقیت بیشتری نسبت به نوکلئوتید تیمین دیده میشود[۴۴]. گستره ای از توالی CGGH در PAM برای استفاده از *SpCas9* برای تولید DSBs در سلول های پستانداران مناسب است. و برعکس TGGG پایین ترین فعالیت را نشان میدهد[۴۴]. در مقایسه با توالیهای مورد نیاز برای فعالیت سیستم CRISPR/*Cas9*، جهت ویرایش ژنوم با *dCas9* در سیستم CRISPRi/a[۲۲] توالیهای مورد نیاز اساسا متفاوت هستند. در آزمایشهایی که با CRISPRi/a انجام میشوند sgRNAs با ۱۹ نوکلئوتید بالاترین اثربخشی را دارند و بهتر از sgRNAs کوتاه شده با فواصل ۱۷ تا ۱۸ نوکلئوتیدی و sgRNAs با فواصل ۲۰ نوکلئوتیدی عمل میکنند [۴۶]. همچنین پورینها در اکثر موقعیتهای sgRNA ترجیح داده میشوند [۴۶].

در نظر گرفتن معیارهای زیاد و تعداد روز افزون ابزارهای محاسباتی، سبب طراحی sgRNA با قابلیت بالا شده است. بیشتر این ابزارهای طراحی از سیستم *SpCas9* یا تعداد دیگری از سیستمهای *Cas9* در باکتری های دیگر پشتیبانی میکنند. نرم افزارهای طراحی sgRNA و امکان مقایسه ی بین آنها در جدول زیر آورده شده است :

منبع	نوع نرم افزار	حالت گروهی	پشتیبانی گونه ها	امتیازدهی	آنالیز خارج از هدف	مقایسه از بین توالی های چندگانه	Cas9 پشتیبانی برای nickase	توالی ورودی	نوع سیستم CRISPR/ Cas	(نرم افزار (ابزار
[۴۷]	وب	خیر	N.A. ناموجود	خیر	خیر	خیر	بله	فقط توالی	2 فقط نوع	ZiFiT
	وب	بله	15	خارج از هدف امتیاز دهی	بله	خیر	بله	فقط توالی	2 فقط نوع	OptimizedCRISPR Design
[۴۸]	وب	خیر	18	خارج از هدف امتیاز دهی	بله	خیر	خیر	توالی/شناساگر	2 فقط نوع	CRISPR Direct
	وب	خیر	20	خیر	بله	خیر	بله	فقط توالی	2 فقط نوع	Cas9 OnlineDesigner

[۲۲] inhibition/activation

[۴۹]	وب	خیر	19	خارج از هدف امتیاز دهی	بله	خیر	خیر	توالی/شناساگر	نوع ۲ متفاوت	CHOPCHOP
[۵۰]	وب	خیر	21	خارج از هدف امتیاز دهی	بله	خیر	بله	توالی/شناساگر	نوع ۲ متفاوت	E-CRISP
[۵۱]	وب / محلی	بله	N.A. ناموجود	خارج از هدف امتیاز دهی	بله	خیر	بله	فقط توالی	2 فقط نوع	sgRNAcas9
[۵۲]	محلی	بله	N .A. ناموجود	نمره فعال-نوع 2	خیر	خیر	خیر	توالی/شناساگر	2 فقط نوع	sgRNA Designer
[۵۳]	Bioc*	بله	N.A. ناموجود	خارج از هدف امتیاز دهی	بله	بله	بله	فقط توالی	نوع ۲ متفاوت	CRISPRseek
	وب	بله	12	نمره فعال-2نوع	خیر	بله	بله	توالی/شناساگر	انواع مختلف	CRISPR MultiTargeter

شکل(۷):ابزارهای طراحی RNA راهنما

روشهای انتقال:

فناوری CRISPR/Cas۹ در حال تغییر بخش مهندسی ژنوم است و همچنین انتظار می رود که سبب تحول در درمان بیماری های ژنتیکی شود.دستیابی به این هدف مستلزم بهبود توانایی و تخصص است، که یکی از مهمترین آنها بهینه سازی روشهای انتقال میباشد.

معرفی پلاسمیدهایی که به طور همزمان sgRNA و Cas۹ را در خود جای میدهند و آن را به محل هدف، با استفاده از روشهای الکتروپوریشین، نوکلئوفکشن و یا لیپوفکتامین منتقل میکنند، یک روش سریع و رایج است که میتواند به طیف وسیعی از لاین های سلولی اعمال شود. پلازمیدهای به کار برده شده معمولا کایمر sgRNA:*SpCas9* را بیان میکنند.

زمانی که هدف مورد نظر بزرگ باشد از چندین پلازمید برای هدف گذاری در سایتهای مختلف استفاده میشود[۴۱]. با تمام این احوال بخشی از پلاسمید یا تمام آن به صورت تصادفی به ژنوم میزبان متصل میشود[۴۴]. DNA پلاسمید نیز میتواند هم در بخش هدف و هم در بخش غیر هدف الحاق گردد و در تشخیص مشکل ایجاد کند. علاوه بر این پاسخ های ایمنی میزبان که به

شناخت CpGs غیر متیله در DNA باکتری بستگی دارد میتواند توسط این توالی باکتریایی درج شده ایجاد شود و پروسهی ویرایش ژنوم را قطع کند[۴۴]. بنابراین این روشهای ترنسفکشن در سلولهای اولیه ناکافی هستند و ممکن است منجر به سمیت شوند. پس از انتقال، DNA پلاسمید میتواند تا چندین روز در سلول حفظ شود که ممکن است اثرات خارج از هدف را تشدید دهد[۵۴]. بنابراین استفاده از روشهای دیگر مثل: استفاده از پروتئینهای نوترکیب، رونویسی mRNA در محیط in vitro و وکتورهای ویروسی نیز مورد برسی قرار گرفته اند. برای کنار آمدن با این چالش ها در استفاده از پلاسمید میتوان از پروتئینهای نوترکیب ۹Cas که با sgRNA کمپلکس میشوند در درون لاین های سلولهای انسانی با استفاده از روشهای الکتروپوریشن با میکرواینجکشن بهره برد[۴۴]. همچنین رونویسی mRNA پروتئین *Cas9* به منظور ایجاد حیوانات اصلاح شده به موش، خوک، میمون و ماهیهای خطدار منتقل شده. با این حال این روشها ممکن است برای سلولها تنش زا باشند.روشهای جایگزین عبارتاند از ترکیب شیمیایی پروتئین *Cas9* و sgRNA مانند استفاده از سلولهایی که با پپتید پروتئینهای نوترکیب *Cas9* ترکیب میشوند[۵۵]. یا انتقال *Cas9* با لیپیدهای کاتیوتیک (دارای کاتیونهای فعال)[۵۶]. و یا انتقال جداگانه ی اجزاء و سرهم شدن آنها در محیط سلول.

زمانی که از mRNA استفاده میکنیم، این mRNA پس از انتقال به سلول ابتدا باید به پروتئین *Cas9* ترجمه شود. شروع ترجمه معمولا بلافاصله پس از ترنسفکشن صورت میگیرد. اما از آنجایی که فرایند ترجمه در دو مکان متفاوت سلولی صورت میگیرد انتقال mRNA که پروتئین *Cas9* را کد میکند به جنین های تک سلولی اغلب باعث کایمریسم میگردد. استفاده از خود پروتئین ۹Cas میتواند این محدودیت ها را از بین ببرد. علاوه بر این شناسایی خود پروتئین ۹Cas بسیار ساده تر از mRNA آن در سلول میباشد. اگرچه این روشهای انتقال می تواند مناطق غیر هدف ناشی از استفاده از پلاسمید را کاهش دهد اما اثربخشی کامل آنها هنوز به طور کامل ثابت نشدهاند[۵۷].

در مقابل روش های میکرواینجکشن، انتقال شیمیایی و الکتروپوریشن، انتقال ژن از طریق وکتورهای ویروسی یک فرآیند وابسته به گیرنده های فعال است که اجازه می دهد مقدار زیادی از DNA منتقل شده برای اثربخشی بیش تر و سمیت کمتر سلولی کنترل شود. علاوه بر این وکتورهای ویروسی می توانند به راحتی به تعداد زیادی از انواع سلول ها هم در حالت in vitro و هم درحالت in vivo وارد شوند. بنابراین وکتورهای ویروسی به طور گسترده تری برای سیستم CRISPR استفاده میشوند.

تا به امروز وکتورهای:[۲۳][57] IDLVs، ADVs[۲۴] [۵۸] و[۲۵] rAAVs [۲۷] برای انتقال پروتئین ۹Cas و sgRNA مورد استفاده قرار گرفتهاند.با توجه به ظرفیت بالای IDLVs (در حدود (۱۰ kb این وکتور به عنوان یک ابزار قدرتمند برای انتقال با سیستم CRISPR استفاده شده است.

این وکتورها برای ساخت آرایه های بلند sgRNA در مقیاس بزرگ در تعداد زیادی از ژن های انسان و موش مورد استفاده قرار گرفته اند[۵۹]. و اثرات غیر هدف با فرکانس بسیار پایینی را نشان دادند[۵۷]. اگرچه بیان گذرای *Cas9* که با IDLVs انتقال داده شده است یک برتری در سلول هایی است که به سرعت تقسیم میشوند. اما بیان *Cas9* ممکن است بعد از انتقال از طریق IDLVs، در سلول هایی که تقسیم نمی شوند یا سرعت تقسیم پایین دارند ادامه یابد که اثرات غیر هدف را بالا میبرد.

AdVs هم برای انتقال اجزاء CRISPR/*Cas9* مورد استفاده قرار میگیرد. اما خصوصیت ویژه ی این وکتور در این است که فرم دو خطی DNA این وکتور، یک پروتئین انتهایی با پیوند کوالانت در سمت '۵ خود دارد[۵۸]. این پوشش پروتئینی ساختار DNA را مستعد میکند که تعامل بین DNA اگزوژن و ناحیه ی غیر هدف کاهش یابد و یکپارچگی کروموزمی افزایش، بی نظمی کاهش و ناحیه ی هدف دقیق تر شناسایی شود[۵۸].

---

[۲۳] integrase-defective lentiviral vectors

[۲۴] adenoviral vectors

[۲۵] recombinant adenoassociated viral vectors

و در نهایت rAAVs به دلیل پاتوژن نبودن، ایمن زایی کم، خصوصیات غیر انتشاری و ویژگیهای سروتیپی جهت استفاده در سیستم CRISPR برای اصلاح ژنی در حیوانات گسترش یافته است[۲۷]. از آنجایی که rAAVs ظرفیت حدودیkb ۴/۵ برای اجزاء سیستم CRISPR دارد. استفادهی تنها از یک وکتور rAAV برای انتقال ۹SpCas با سایز تقریبی kb ۴/۲ و sgRNA کایمریک و عوامل کنترل، هنوز هم یک چالش قابل توجه است[۵۹]. که معمولا برای مواجحه با این چالش از دو rAAV به طور همزمان استفاده میشود. [۵۶] با این حال در هر دو روش کاهش فعالیت مشاهده میشود[۶۰]. اخیرا یک Cas کوچکتر، از باکتری *S.aureus* شناسایی شده است که میتواند این مشکل را حل کند.

اثرات غیر هدف:

بسیاری از مطالعات نشان دادند که سیستم ۹CRISPR/Cas یک رویکرد ساده اما بسیار کارآمد برای ویرایش ژنوم در انواع سلولها و ارگانیسم هاست، هم در محیط in vitro و هم در محیط in vivo. نوکلئاز *Cas9* از طریق ۲۰ نوکلئوتید اول sgRNA به سمت توالی هدف بر روی DNA که در مجاورت توالی PAM قرار گرفته اند هدایت میشود. با اعمال اثر *Cas9* در توالی هدف DSBs ایجاد می شوند و سبب سیگنال دهی مراحل بعدی میگردد. با این وجود تعدادی از مطالعات نشان داده اند که این سیستم می تواند مقادیر قابل توجهی از جهش های غیر هدف را ایجاد کند[۶۱]. این اثرات غیر هدف ممکن است نقش مهمی در از بین بردن اسیدهای نوکلئیک ویروسی و یا DNA پلاسمید که برای باکتری و قارچ ها مفید می باشند ایفا کند[۶۲]. با این حال در مطالعات بیولوژیکی و درمانهای ژنتیکی واکنشهای غیر هدف جهش های نامطلوبی در مکان های تصادفی ایجاد می کند و اثرات غیر پیش بینی به دنبال خود خواهد آورد. مطالعات نشان داده اند فعالیت ۹Cas میتواند تنها از طریق یک عدم انطباق بازی در منطقه ی مکمل sgRNA بر روی توالی هدف مهار شود به ویژه اگر این عدم انطباق در نوکلئوتیدهای مرکزی PAM باشد. [۴۴]

بر اساس توالی های کامل ژنومی، مطالعات متعدد نشان داده اند که عدم انطباق در انتهای '۵ ناحیه ی هدف بهتر تحمل میشود[۶۴]. علاوه بر این مطالعات در سلولهای انسانی نشان داده اند که تا حدود ۵ عدم انطباق نوکلئوتیدی عمل برش در ناحیهی هدف را غیر فعال نخواهد کرد. پس نتیجه اینکه مکانهای غیر هدف در فرکانس های بالاتری از عدم انطباق نوکلئوتیدی نسبت به سایت هدف مورد نظر جهش یافته اند. بنابراین برای استفاده ی بهتر از این سیستم مهم است که ارزیابی اثرات خارج از هدف با فرکانس بالا در نظر گرفته شود. تعدادی از روشهای تجربی و محاسباتی که نواحی غیر هدف را پیش بینی می کنند بر اساس اصلاحات انجام شده بر روی *Cas9* در محیطهای in vivo شناسایی شده اند[۶۵]. در ابتدا تمرکز اصلی تنها بر روی نقاط قوت نوکلئاز *Cas9* بود. و کمتر به نقاط ضعف توجه شد. تا اینکه نواحی غیر هدف از طریق الگوریتم های مورد استفاده در توالی های اساسی در مجاورت NGG ناحیهی PAM شناسایی شدند.هنگامی توالی NAG ناحیهی PAM توسط ۹SpCas شناسایی شد که بسیاری از جهش های غیر هدف هنوز مورد شناسایی قرار نگرفته بودند.

با پیشرفت تحقیقات، چندین رویکرد جدید که می توانند اتصالات غیر هدف به شیوه ای بی نظیر نشان دهند توسعه یافته است. از قبیل: [۶۸]IDLV capture،Digenome-seq (70)، غنیسازی استرپتاویدین[۶۴]

هر کدام از این روش ها دارای معایب و مزایایی هستند. IDLV captureبرای ژنوم ویروسی مورد استفاده قرار میگیرد، جهت تشخیص DSB در DNA. همچنین این متود تنها مناطق غیر هدف با فرکانس بیشتر از یک درصد را شناسایی میکند[۶۸]. اگرچه Digenome-seq می تواند نواحی غیر هدفی که فرکانسهای کم تر از ۰/۱ درصد دارد را تشخیص دهد اما نمی تواند فاکتورهای سلولی که ممکن است بر نواحی غیر هدف تاثیر بگذارند را تشخیص دهد.

در حال حاضر دنیا در حال درک مشخصه های سیستم CRISPR/*Cas9* است.در طی دوسال گذشته تلاش های زیادی برای کاهش اثرات غیر هدف صورت گرفته است. اثرات غیر هدف و مشخصه های این سیستم با استفاده از استراتژی های ذکر شده در زیر بهبود یافته است:

الف) انتخاب مکان های هدف مناسب و طراحی دقیق sgRNA، به طوری که موثرترین رویکرد دیده شود. تجربه نشان داده است که توالی مکان هدف با محتوای نسبتا کم GC تقریبا ۳۵ درصد اثرات خارج از هدف کمتری دارد. در صورتی که محتوای بالای GC باعث میشود که هیبرید RNA و DNA پایدار شود و قدرت تحمل غیر انطباق نوکلئوتیدی افزایش یابد[۶۷]. علاوه بر این توالی هدف و توالی PAM دارای حداقل سه ناحیه ی عدم انطباق نوکلئوتیدی هستند که از شکل برآمدگی DNA در انتهاهای '۳ و '۵ و ۵ تا ۷ نوکلئوتید مجاور PAM جلوگیری میکند.

ب) استفاده از paired Cas9 nickase: اگر در هر کدام از دومین های HNH یا RuvC-like جهش ایجاد شود، Cas۹ حاصل می شود که قابلیت ایجاد برش در یک رشته ی DNA را دارد. با استفاده از Cas9 nickase و sgRNA تشکیل برشهای تک رشته ای را می توان هدایت کرد که در نهایت قابلیت تشکیل DSB را دارا میباشند[۶۹]. (شکل ۲)

د) از sgRNAs کوتاه شده استفاده شود: آزمایش های فراوان نشان داده اند که استفاده از sgRNAs کوتاه به طول ۱۷ تا ۱۸ نوکلئوتید می تواند بروز نواحی غیر هدف را تا بیشتر از ۵۰۰۰ برابر کاهش دهد و به اثر بخشی بیشتر sgRNA کمک کند. همچنین ترکیب sgRNA کوتاه شده با Cas9 nichase میتواند سبب کاهش جهش در نواحی غیر هدف شود[۷۰].

ج) استفاده از دایمرdCas) :۹sgRNA-guided fCas9 به دومین نوکلئازی Fokl الحاق میشود) (۱-۸) همانند *Case9* nickase، دایمر *dCase9* و Fokl میتوانند endogenous را به وسیله ی تشکیل دادن یک اندونوکلئاز *Fokl* عملکردی ویرایش کنند. *fCas9* نشان داده است که عملکرد بهتری برای نواحی هدف نسبت به Cas۹ در ردههای سلول انسانی دارد و اثرات غیر هدف کمتری را نیز دارا می باشد[۷۱].

اگرچه این استراتژی ها به طور خاص اثرات تشخیص ناحیه ی هدف را بهبود میبخشند. اما همچنان نقص هایی نیز دارند. از قبیل: اندازه ی بزرگ پروتئین Cas، نیاز به چندین sgRNA، اجتناب کامل از نواحی غیر هدف و کاهش کارایی در نواحی هدف. پیشرفتهای بیشتر در زمینه ی طراحی sgRNA، بهینه سازی روشهای انتقال و یا کشف ویژگیهای جدید در پروتئین های Cas می تواند در آینده کمک های چشمگیری به سیستم CRISPR کند.

بروز **HDR**:

یکی از مزیتهای استفاده از سیستم ۹CRISPR/Cas برای مهندسی ژنوم این واقعیت است که Cas۹ می تواند به راحتی برنامه ریزی شود برای ایجاد یک شکست دو رشته ای DSB در ژنوم در هرجایی که مورد هدف باشد. پس از برش اولیه، مراحل بعدی در این فرآیند شامل تعمیر DSBs کروموزومی می شود. مهم است بدانیم که سلول ها دارای دو مسیر تعمیر اصلی: NHEJ و HDR هستند و اینکه چگونه کار می کنند، زیرا میتواند هنگام برنامه ریزی آزمایش مناسب باشد.

برخلاف NHEJ،HDR در طول چرخه سلول فعال است و دارای ظرفیت بالاتری برای تعمیر است، زیرا نیازی به الگوی تعمیر (کروماتید خواهری یا همولوگ) یا سنتز گسترده DNA نیست. NHEJ همچنین تعمیرات بسیاری از انواع آسیب های DNA را در سریع ترین زمان ممکن انجام می دهد و سرعت عمل بالاتری نسبت به HDR دارد.

اما در بیشتر سلول های یوکاریوتی، مسیر NHEJ، باعث می شود درج و حذف در طول شکست دو رشته (DSB) تعمیر شود. که این فرآیند جهت بررسی اثرات حاصل از سیستم CRISPR مطلوب نیست. بنابراین ترجیح داده میشود که سلول مسیر HDR را طی کند. تا اثرات حاصل از ۹CRISPR/Cas قابل پیگیری باشد. بهبود بروز جهش ثابت با استفاده از سیستم ۹CRISPR/Cas یک چالش است. لاین های سلولی که در اجزاء NHEJ کمبود دارند سطوح HDR را افزایش می دهند.این نشان میدهد که این دو فرآیند تعمیری بسیار رقابتی هستند. از این رو سرکوب کردن مولکولهای کلیدی NHEJ از قبیل KU70، ۸۰KU و DNA لیگاز ۱۷ به وسیله ی خاموش کردن ژن[۲۸]، میکروواینجکشن کردن ssRNAs ویا استفاده از مولکولهای کوچک مهار کننده[۲۸, ۷۲] نشان داده است که فرکانس ترمیم توسط مسیر HDR در فرآیند سیستم

۹CRISPR/Cas افزایش می یابد. یکی از مهمترین دستاوردهای تحقیقاتی در زمینه ی استفاده از مهارکننده ی ۷Scr است که DNA لیگاز ۱۷ را هدف قرار میدهد تا اثر بخشی ویرایش مجدد ژنوم را با HDR تا ۱۹ برابر افزایش دهد[۷۳]. علاوه بر این گروهی از محققان بر اساس تحقیقات بر روی مجموعهای از ۴۰۰۰ مولکول کوچک[۷۴]، دو مولکول کوچک ۷L۷۵۵۵۰ و Brefeldin A را شناسایی کردند که میتوانند HDR را تا دو و یا سه برابر افزایش دهد. محققان[۷۵] همچنین ثابت کردند که دو مولکول مهارکننده ی کوچک از NU) ۷۴۴DNA-PKcs و KU-۰۰۶۰۶۴۸) می توانند NHEJ را کاهش و فرکانس HDR را افزایش دهند. علاوه بر این توالی های کوتاه hairspin RNA جهت تاثیر بر روی ۸۰/۷۰KU و DNA لیگاز ۱۷ برای ترویج اثر بخشی HDR در هر دو سلول انسان و موش مورد استفاده قرار گرفته است[۲۸]. اما اگرچه سرکوب مولکولهای اصلی NHEJ مثل ۸۰/۷۰KU و DNA لیگاز ۱۷ میتواند HDR را تحریک کند اما گاهی به دنبال این تحریک ۹Cas تجزیه میشود، این مهار کننده ها هم چنین میتوانند اثرات سمی نیز داشته باشند. بنابراین استراتژی دوم با استفاده از تکنیکهای هماهنگسازی چرخهی سلولی توسعه یافته است. به طور کلی اثربخشی ویرایش ۹Cas در موش به وسیله ی NHEJ می تواند به ۲۰ تا ۶۰ ذرصد برسد در حالی که اثربخشی ویرایش ۹Cas به وسیله ی HDR تنها ۰/۵ تا ۲۰ درصد است[۷۵]. اگرچه سلولها دارای توانایی های متفاوتی در رابطه با ترمیم های DSBs هستند اما فاز چرخهی سلولی نیز در تنظیم نوع چرخه ی ترمیم موثر است. NHEJ همیشه در کل چرخه ی سلول رخ می دهد در حالی که HDR محدود به S و ۲G می باشد[۴۶].

پیشرفت هایی در بهبود اثربخشی HDR صورت گرفته است. اگرچه در حال حاضر مطالعات بسیار کمی در این زمینه منتشر شده است. اما از آنجایی که برای مدل های تولید انبوه و یا برای ژنهای بالقوه ی آینده، ویرایش دقیق ژنوم مهم است، از این رو تلاشهای قابل ملاحظهای برای افزایش شیوع HDR انجام میشود.

نتیجه گیری

رشد فزاینده هر تکنولوژی جدید در یک زمینه تخصصی همچون سیستم **CRISPR**، نیازمند توجهات بیشتری است که در تحقیقات به عمل آمده در سال های اخیر گام های موثری در ویرایش ژنوم و به کارگیری آن در درمان بیماری ها برداشته است. بدیهی است استفاده از این تکنولوژی در درمان بیماری ها زمانی موثر و کارامد خواهد بود که اجزا این سیستم **CRISPR** روز به روز بهینه شده و از یک طرف امکان ایجاد برشهای نابجا در ژنوم سلولها را کاهش و از طرف دیگر بازدهی تغییرات هدفمند ژنوم را در زمان انتقال آن به سلول با استفاده روشهای مختلف انتقال ژن افزایش دهد. بنابراین توسعه روشهای انتقال ژن در این زمینه مستلزم تحقیقات بیشتر به منظور دستیابی بهتر و سریعتر از این تکنولوژی است.

منابع

1. *The Post-GWAS Era : From Association to Function (Michel D. and Alice S. Chen-Plotkin)*

2. *Carlson DF, Tan W, Lillico SG, Stverakova D, Proudfoot C, Christian M, et al. Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2012;109(43):17382-7.*

3. *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.*

4. *Gupta A, Hall VL, Kok FO, Shin M, McNulty JC, Lawson ND, et al. Targeted chromosomal deletions and inversions in zebrafish. Genome research. 2013;23(6):1008-17….*

5. *Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. Cell. 2014;157(6):1262-78.*

6. *Lim S, Wang Y, Yu X, Huang Y, Featherstone MS, Sampath K. A simple strategy for heritable chromosomal deletions in zebrafish via the combinatorial action of targeting nucleases. Genome biology. 2013;14(7):R69.*

7. *Ran F, Hsu PD, Lin C-Y, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. Cell. 2013;154(6):1380-9.*

8. *Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. Nature biotechnology. 2014;32(4):347-55.10. Makarova, K.S., et al., An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. Nature Reviews Microbiology, 2015. 13(11): p. 722-736.*

9. *Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, Shi X, Scott DA, Mikkelsen TS, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. Science. 2014;343(6166):84-7.*

10. *Tan W, Carlson DF, Lancto CA, Garbe JR, Webster DA, Hackett PB, et al. Efficient nonmeiotic allele introgression in livestock using custom endonucleases. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2013;110(41):16526-31.*

11. *Xiao A, Wang Z, Hu Y, Wu Y, Luo Z, Yang Z, et al. Chromosomal deletions and inversions mediated by TALENs and CRISPR/Cas in zebrafish. Nucleic acids research. 2013:gkt464.*

12. *Y, Liang D, Wang Y, Bai M, Tang W, Bao S, et al. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. Cell stem cell. 2013;13(6):659-62.*

13. *Yoshimi K, Kaneko T, Voigt B, Mashimo T. Allele-specific genome editing and correction of disease-associated phenotypes in rats using the CRISPR–Cas platform. Nature communications. 2014;5..*

14. *Zhang Y. Genome Editing with ZFN, TALEN and CRISPR/Cas Systems: The Applications and Future Prospects. Advancements in Genetic Engineering. 2014..*

15. Jansen, R., et al., *Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes.* Molecular microbiology, 2002. 43(6): p. 1565-1575.

16. Mojica, F.J., J. García-Martínez, and E. Soria, *Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements.* Journal of molecular evolution, 2005. 60(2): p. 174-182.

17. Bolotin, A., et al., *Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin.* Microbiology, 2005. 151(8): p. 2551-2561.

18. Barrangou, R., et al., *CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes.* Science, 2007. 315(5819): p. 1709-1712.

19. Horvath, P., et al., *Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in Streptococcus thermophilus.* Journal of bacteriology, 2008. 190(4): p. 1401-1412.

20. Brouns, S.J., et al., *Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes.* Science, 2008. 321(5891): p. 960-964.

21.22. Haurwitz, R.E., et al., *Sequence-and structure-specific RNA processing by a CRISPR endonuclease.* Science, 2010. 329(5997): p. 1355-1358.

23. Wiedenheft, B., et al., *Structures of the RNA-guided surveillance complex from a bacterial immune system.* nature, 2011. 477(7365): p. 486-489.

24. Makarova, K.S., et al., *An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems.* Nature Reviews Microbiology, 2015. 13(11): p. 722-736.

25. Jinek, M., et al., *A programmable dual-RNA–guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity.* Science, 2012. 337(6096): p. 816-821.

26. Chylinski, K., A. Le Rhun, and E. Charpentier, *The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems.* RNA biology, 2013. 10(5): p. 726-737.

27. Sternberg, S.H., et al., *DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9.* nature, 2014. 507(7490): p. 62-67.

28. Swiech, L., et al., *In vivo interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR-Cas9.* Nature biotechnology, 2015. 33(1): p. 102-106.

29. Platt, R.J., et al., *CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling.* Cell, 2014. 159(2): p. 440-455.

30. Chu, V.T., et al., *Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells.* Nature biotechnology, 2015. 33(5): p. 543-548.

31. Cong, L., et al., *Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems.* Science, 2013. 339(6121): p. 819-823.

32. Ratz, M., et al., *CRISPR/Cas9-mediated endogenous protein tagging for RESOLFT super-resolution microscopy of living human cells.* Scientific reports, 2015. 5.

33. Zhu, W., et al., *The CRISPR/Cas9 system inactivates latent HIV-1 proviral DNA.* Retrovirology, 2015. 12(1): p. 22.

33 , 34 Mans, R., et al., *CRISPR/Cas9: a molecular Swiss army knife for simultaneous introduction of multiple genetic modifications in Saccharomyces cerevisiae.* FEMS yeast research, 2015. 15(2).

34. Peng, R., G. Lin, and J. Li, *Potential pitfalls of CRISPR/Cas9-mediated genome editing.* The FEBS journal, 2016. 283(7): p. 1218-1231.

35. Jinek, M., et al., *Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation.* Science, 2014. 343(6176): p. 1247997.

36. Kiani, S., et al., *Cas9 gRNA engineering for genome editing, activation and repression.* Nature methods, 2015. 12(11): p. 1051-1054.

37. Kim, S., et al., *Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins.* Genome research, 2014. 24(6): p. 1012-1019.

38. Fu, Y., et al., *High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells.* Nature biotechnology, 2013. 31(9): p. 822-826.

39. Hou, Z., et al., *Efficient genome engineering in human pluripotent stem cells using Cas9 from Neisseria meningitidis.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013. 110(39): p. 15644-15649.

40. Kleinstiver, B.P., et al., *Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities.* nature, 2015. 523(7561): p. 481-485.

41. Chari, R., et al., *Unraveling CRISPR-Cas9 genome engineering parameters via a library-on-library approach.* Nature methods, 2015. 12(9): p. 823-826.

42. Wang, T., et al., *Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system.* Science, 2014. 343(6166): p. 80-84.

43. Doench, J.G., et al., *Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation.* Nature biotechnology, 2014. 32(12): p. 1262-1267.

44. Lin, S., et al., *Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery.* Elife, 2014. 3: p. e04766.

45. Xu, H., et al., *Sequence determinants of improved CRISPR sgRNA design.* Genome research, 2015. 25(8): p. 1147-1157.

46. *Moreno-Mateos, M.A., et* al., *CRISPRscan: designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting in vivo.* Nature methods, 2015. 12(10): p. 982-988.

47. *Hwang WY, Fu Y, Reyon D, Maeder ML, Tsai SQ, Sander JD, et al. (2013) Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. Nat Biotechnol 31: 227–229. doi: 10.1038/nbt.2501 PMID: 23360964*

48. *Naito Y, Hino K, Bono H, Ui-Tei K (2014) CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites. Bioinformatics: 1–4. doi: 10.1093/bioinformatics/btu743 PMID: 25189783*

49. *Montague TG, Cruz JM, Gagnon JA, Church GM, Valen E (2014) CHOPCHOP: a CRISPR/Cas9 and*

50. *Heigwer F, Kerr G, Boutros M (2014) E-CRISP: fast CRISPR target site identification. Nat Methods 11:*
122–123. doi: 10.1038/nmeth.2812 PMID: 24481216

51. *Xie S, Shen B, Zhang C, Huang X, Zhang Y (2014) sgRNAcas9: A Software Package for Designing*
CRISPR sgRNA and Evaluating Potential Off-Target Cleavage Sites. PLoS One 9: e100448. doi: 10.
1371/journal.pone.0100448 PMID: 24956386

52. *] Zhu LJ, Holmes BR, Aronin N, Brodsky MH (2014) CRISPRseek: A Bioconductor Package to Identify*

Target-Specific Guide RNAs for CRISPR-Cas9 Genome-Editing Systems. PLoS One 9: e108424. doi:

10.1371/journal.pone.0108424 PMID: 25247697

53. *TALEN web tool for genome editing. Nucleic Acids Res 42: W401–W407. doi: 10.1093/nar/gku410[7]*
PMID: 24861617.

54. Gaj, T., et al., *Targeted gene knockout by direct delivery of zinc-finger nuclease proteins.* Nature methods, 2012. 9(8): p. 805-807.

55. Ramakrishna, S., et al., *Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA.* Genome research, 2014. 24(6): p. 1020-1027.

56. Zuris, J.A., et al., *Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing in vitro and in vivo.* Nature biotechnology, 2015. 33(1): p. 73-80.

57. Sung, Y.H., et al., *Highly efficient gene knockout in mice and zebrafish with RNA-guided endonucleases.* Genome research, 2014. 24(1): p. 125-131.

58. Holkers, M., et al., *Adenoviral vector DNA for accurate genome editing with engineered nucleases.* Nature methods, 2014. 11(10): p. 1051-1057.

59. Koike-Yusa, H., et al., *Genome-wide recessive genetic screening in mammalian cells with a lentiviral CRISPR-guide RNA library.* Nature biotechnology, 2014. 32(3): p. 267-273.

60. Mefferd, A.L., et al., *Expression of CRISPR/Cas single guide RNAs using small tRNA promoters.* RNA, 2015. 21(9): p. 1683-1689.

61. Ran, F.A., et al., *In vivo genome editing using Staphylococcus aureus Cas9.* nature, 2015. 520(7546): p. 186-191.

62. Pattanayak, V., et al., *High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity.* Nature biotechnology, 2013. 31(9): p. 839-843.

63. Shen, B., et al., *Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects.* Nature methods, 2014. 11(4): p. 399-402.

64. Jiang, W., et al., *RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems.* Nature biotechnology, 2013. 31(3): p. 233-239.

65. Wang, X., et al., *Unbiased detection of off-target cleavage by CRISPR-Cas9 and TALENs using integrase-defective lentiviral vectors.* Nature biotechnology, 2015. 33(2): p. 175-178.

66. Kim, D., et al., *Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells.* Nature methods, 2015. 12(3): p. 237-243.

67. Fu, Y., et al., *Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs.* Nature biotechnology, 2014. 32(3): p. 279-284.

68. Wyvekens, N., et al., *Dimeric CRISPR RNA-guided FokI-dCas9 nucleases directed by truncated gRNAs for highly specific genome editing.* Human gene therapy, 2015. 26(7): p. 425-431.

69. Srivastava, M., et al., *An inhibitor of nonhomologous end-joining abrogates double-strand break repair and impedes cancer progression.* Cell, 2012. 151(7): p. 1474-1487.

70. Yu, C., et al., *Small molecules enhance CRISPR genome editing in pluripotent stem cells.* Cell stem cell, 2015. 16(2): p. 142-147.

71. Robert, F., et al., *Pharmacological inhibition of DNA-PK stimulates Cas9-mediated genome editing.* Genome medicine, 2015. 7(1): p. 93.

72. Maruyama, T., et al., *Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining.* Nature biotechnology, 2015. 33(5): p. 538-542.

73. Seo, J., S. Han, and S.-C. Lim, *Role of CDK8 and ß-catenin in colorectal adenocarcinoma.* Oncology reports, 2010. 24(1): p. 285.

74. Adler, A.S., et al., *CDK8 maintains tumor dedifferentiation and embryonic stem cell pluripotency.* Cancer research, 2012. 72(8): p. 2129-2139.

75. Xu, W., et al., *Mutated K-ras activates CDK8 to stimulate the epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic cancer in part via the Wnt/β-catenin signaling pathway.* Cancer letters, 2015. 356(2): p. 613-627.

76. Osborn, M.J., et al., *Fanconi anemia gene editing by the CRISPR/Cas9 system.* Human gene therapy, 2014. 26(2): p. 114-126.

77. Luo, Y., et al., *Integrative analysis of CRISPR/Cas9 target sites in the human HBB gene.* BioMed research international, 2015. 2015.

78. Feng, Y., et al., *Targeting Cdk11 in osteosarcoma cells using the CRISPR-cas9 system.* Journal of orthopaedic research, 2015. 33(2): p. 199-207.

Overview of the CRISPR / CAS system

Mohammad Erfan Yazdani [1], Hamid Reza Amini [2*]

1-Department of Biology, Naghsh Jahan Institute of Higher Education, Isfahan

2-Department of Biology, Naghsh Jahan Institute of Higher Education, Isfahan

*** Corresponding author:**

Hamid Reza Amini

Email: hreza.amini366@gmail.com

Abstract

With the expansion of the field of microbiological research, a new genome editing tool was developed from the biological properties of bacteria, which deals with precise genome editing with greater simplicity and adaptability than previous methods. This new technique, called CRISPR for short, has led to the rapid expansion of biomedical research, especially in relation to specific diseases such as cancer, and its modeling using targeted gene editing. This article discusses how the CRISPR method works in targeted genome editing. In general, the use of this technology in the treatment of diseases will be effective and efficient when the components of this CRISPR system are optimized day by day and on the one hand reduce the possibility of making abnormal cuts in the cell genome and on the other hand the efficiency of targeted genome changes over time. Increase its transfer to the cell using various methods of gene transfer.

Keywords: Crisper, Genome, Sequencing