مجله تحقیقات ژنتیک پزشکی
سال: ۱۴۰۱ - شماره: ۱
مجله تحقیقات ژنتیک پزشکی
Medical Genetic Research
www.mgr.ir

رویکردهای CRISPR/dCas9 برای مهندسی بیان ژن

مهدی محمدی قنبرلو[۱]، مژگان رایگانی [۲]، مهرداد آرایی نژاد [۳]، *محمدعلی شکرگزار [۱]

۱. بانک سلولی ملی ایران، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.
۲. مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.
۳. گروه پزشکی مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

*پست الکترونیک مسئول مکاتبات: mashokrgozar@pasteur.ac.ir و
shokrgozar1967@gmail.com

چکیده:

روش کریسپر فناوری قدرتمندی است و مهندسی سیستم های کریسپر کس (CRISPR-Cas) وسیله‌ای برای ویرایش ساده، دقیق، انتخابی و کارآمد توالی DNA در هر موقعیت خاص از ژنوم فراهم کرده است. این توانایی برای درک عملکرد ژن، مهندسی رفتارهای سلولی و گسترش درمان ضروری می باشد. سیستم CRISPR-Cas9 نوع II متداول‌ترین سیستمی است که برای ویرایش ژنوم استفاده می‌شود. این مجموعه ریبونوکلئوپروتئینی از یک DNA اندونوکلئاز (Cas9) و دو RNA، CRISPR RNA (crRNA) و transacting RNA (tracrRNA) تشکیل شده است. متعاقبا، کشف nuclease-dead Cas molecules (dCas9) بستری برای کنترل دقیق عملکرد ژنوم بدون ویرایش ژن را ارائه داد. در این مقاله مروری به معرفی پیشرفت های تکنیک CRISPR/dCas9 و کاربردهای آن در حوزه مهندسی ژنوم و بیان ژن و نیز بهبود روش های آن پرداخته شده است.

کلمات کلیدی: CRISPR/dCas9، ویرایش ژنوم، مهندسی بیان

مجله تحقیقات
ژنتیک پزشکی
سال : ۱۴۰۱ - شماره : ۱

مجله تحقیقات ژنتیک پزشکی
Medical Genetic Research

www.mgr.ir

CRISPR/dCas9 Approaches for Engineering Gene Expression

Mehdi Mohammadi Qanbarlou [1], Mozhgan Raigani [2], Mehrdad Arainejad [3], *Mohammad Ali Shokrgozar [1]

1. National Cell Bank of Iran, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.
2. Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.
3. Department of Molecular Medicine, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

*Correspondence email: mashokrgozar@pasteur.ac.ir and shokrgozar1967@gmail.com

Abstract

CRISPR is a powerful technology and the CRISPR-Cas9 system has provided a new tool for simple, precise, selective and easy to use genetic engineering of any different DNA targets of the genome. This ability is essential for understanding gene function, engineering cell behaviors, and developing therapies. The type II CRISPR-Cas9 system is the most commonly used for genome editing. This ribonucleoprotein complex consists of a DNA endonuclease (Cas9) and two RNAs, CRISPR RNA (crRNA) and transacting RNA (tracrRNA). Subsequently, the discovery of nuclease-dead Cas molecules (dCas9) provided a platform for precise control of genome function without gene editing. In this review article, the advances of CRISPR/dCas9 technique and its applications in the field of genome engineering and gene expression, as well as the improvement of its methods, have been discussed.

Keywords: CRISPR/dCas9, genome editing, expression engineering

مقدمه

روش کریسپر CRISPR[1] (تناوب‌های کوتاه پالیندروم فاصله‌دار منظم خوشه‌ای) فناوری قدرتمندی است که بعنوان ابزاری برای ویرایش انتخابی توالی DNA در هر موقعیت خاص در ژنوم استفاده می شود [۱]. این فناوری بسیار دقیق‌تر از فناوری‌های پیرایش ژنومی مرسوم مورد استفاده قرار می‌گیرد [۲]. کشف این روش، انقلابی در پیشرفت زیست شناسی مولکولی با کاربری‌های سودمند در پزشکی و زیست فناوری بوده است [۳]. توانایی دست‌ورزی و ویرایش اطلاعات ژنتیکی برای مطالعه عملکرد و کشف مکانیسم‌های بیولوژیکی ضروری است. از زمان اولین مدارک مبتنی بر تولید قطعات اختصاصی DNA با استفاده از آنزیم‌های محدودالاثر در سال ۱۹۷۱، دانشمندان از این آنزیم‌ها برای ویرایش ژنی استفاده کرده‌اند [۴]. علاوه بر این آنزیم‌ها، گروه دیگری از ابزارهای تغییردهنده DNA، شامل ریکامبینازها، نوکلئازهای قابل برنامه‌ریزی مانند مگانوکلئازها، ZFN، TALEN و سیستم‌های کریسپر کس[۲] (Cas) می‌باشند [۵]. پروتئین‌های اتصال یابنده به DNA که لوکوس اختصاصی را تغییر می‌دهند، باعث پیشرفت قابل ملاحظه علم، بیوتکنولوژی و پزشکی شده است.

در سال‌های اخیر کریسپر کس، بدلیل پتانسیل کاربری در ژنوم مورد هدف و مهندسی اپی‌ژنتیک برای آشکار سازی دانش پنهان و واقعیت-های پشت پرده فرآیندهای پیچیده زندگی، موضوع جذاب تحقیقات بوده است [۶]. با شناسایی کریسپر کس در باکتری‌ها اکتشافات خیلی زیادی به منظور یافتن روش‌های جدیدتر و کارآمدتر برای وسعت بخشیدن به دامنه کاربری در مهندسی ژنتیک و ژنتیک مولکولی انجام شده است [۷]. به طور طبیعی سیستم کریسپر یک نوع مکانیسم ایمنی اکتسابی در پروکاریوت‌ها است که برای برش اسیدهای نوکلئیک استفاده می‌شود. سیستم‌های کریسپر در گونه‌های مختلفی از باکتری‌ها و آرکی‌باکترها وجود دارند که اجزا و مکانیسم‌های عمل آن‌ها با هم متفاوت است [۸]. برای مثال، سیستم‌های کریسپر کلاس I کمپلکس‌های افکتور چندپروتئینی دارند، در حالی که سیستم‌های کلاس II فقط یک پروتئین افکتور دارند [۹]. به طور کلی سیستم کریسپر کس دو کلاس و شش گروه کریسپری و حداقل ۲۹ زیرگروه دارد که این تعداد به سرعت در حال گسترش است [۱۰]. همه سیستم‌های کریسپر متکی بر RNA کریسپری به نام crRNA (CRISPR-RNA) و gRNA (RNA راهنما) برای هدایت و اختصاصیت هدف‌گیری است. به دنبال هیبریداسیون بخشی از crRNA به نام spacer با توالی هدف که مجاور پروتواسپیسر[۳] (PAM) یا توالی احاطه کننده[۴] (PFS) قرار گرفته است، پروتئین‌های Cas اسید نوکلئیک هدف را برش می‌دهند [۱۱, ۱۲]. بنابراین از طریق طراحی crRNA حاوی توالی spacer مناسب و متعاقب آن هدایت سیستم کریسپر به هر لوکوس ژنی که مجاور توالی PAM یا PFS قرار گرفته باشد، می‌توان به ویرایش اختصاصی جایگاه دست یافت. کشف و توسعه سیستم کریسپر نوع II منجر به انتخاب و گسترش طیف وسیعی از کاربردها، از علوم بنیادین تا علوم کاربردی و پزشکی، شده است [۱۳-۱۵]. در حقیقت، موفقیت‌های اخیر الهام بخش تلاش‌های صورت گرفته برای کشف سیستم‌های کریسپر و توسعه کاربردهای جدید در حوزه مهندسی ژنوم است.

---

[1] **C**lustered **R**egularly **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**epeats

[۲] CRISPR associated protein

[۳] Protospacer Adjacent Motif

[۴] protospacer

در این مقاله مروری به معرفی پیشرفت های تکنیک CRISPR/dCas9 و کاربردهای آن در مهندسی بیان ژن و همچنین بهبود روش های آن، پرداخته شده است.

کریسپر

در سال‌های اخیر، روشی نوظهور جهان علم را با انقلابی عظیم مواجه نمود. کریسپر نسبت به سایر روش‌های ویرایش ژنومی متداول، سرعت، دقت عملکردی بالا و هزینه اقتصادی پایین تری دارد و با استفاده از آن، امکان برش و حذف ژن آسیب‌دیده از ساختار ژنتیکی سلول وجود دارد [۱۶, ۱۷]. این ویژگی‌ها، سیستم کریسپر- کس۹ CRISPR-Cas9 را به عنوان روشی کارآمد و سودمند در مطالعه برهم‌کنش چندین خصوصیت ژنتیکی و نیز عاملی برای بهبود روند درک بهتر بیماری‌های متداولی نظیر دیابت، بیماری‌های قلبی و یا موارد مرتبط با مغز مطرح ساخته است [۱۸-۲۱].

کریسپر نوعی تکنولوژی جدید ویرایش ژنتیکی است که می‌تواند به پیشرفت ژن درمانی کمک‌های زیادی کند. تاکنون ژن درمانی عمدتا از طریق تکنیک " انتقال ژن[5]" انجام شده است؛ به این صورت که یک ویروس بی‌خطر، نسخه سالمی از یک ژن را به سلول منتقل می‌کند تا جایگزین ژن معیوب مسبب بیماری قرار بگیرد. اما در روش کریسپر، دانشمندان می‌توانند مستقیما ژن معیوب را اصلاح کنند. آنها DNA معیوب را جدا کرده و به جای آن یک DNA سالم قرار می دهند. قاعدتا، این روش کارآمدتر از اضافه کردن یک ژن جدید بوده، زیرا خطرات ناشی از اضافه کردن یک ژن غریبه و خارجی از میان می‌رود. از طرف دیگر، امکان دارد این ژن خارجی در مکان اشتباهی قرار گرفته و منجر به سرطان شود. در حالیکه ژن ترمیم شده با تکنیک کریسپر تحت کنترل خواهد بود [۱۸, ۲۲].

فرایند کریسپر- کس۹ (CRISPR- Cas9)

کریسپر- کس۹ ابزاری سریع، ارزان و بسیار دقیق‌تر از تکنیک‌های موجود برای ویرایش و اصلاح ژن بوده و دارای طیف گسترده‌ای از برنامه های کاربردی بالقوه است. کریسپر- کس۹ تکنولوژی منحصر بفردی است که امکان ویرایش بخشی از ژنوم را با حذف، اضافه کردن یا جایگزین نمودن آن فراهم می سازد. این روش در حال حاضر روشی ساده، دقیق و تطبیق پذیر برای دست‌ورزی ژنتیک می‌باشد [۱۷].

در حقیقت برخی از باکتری‌ها دارای سیستم ساده کریسپر- کس۹ برای ویرایش ژن می‌باشند که برای پاسخ به عوامل مهاجم نظیر ویروس‌ها بکار می‌رود و این فرآیند به منزله سیستم ایمنی برای آنها تلقی می شود. کریسپر در باکتری‌ها قسمتی از DNA باکتری را قطع کرده و در تهاجم های بعدی به باکتری برای شناسایی پاتوژن کمک می‌کند [۷]. دانشمندان از این سیستم در سلول‌های دیگر جانوران شامل موش و انسان استفاده کرده‌اند [۲۳-۲۵].

سیستم کریسپر- کس۹ شامل دو مولکول کلیدی برای ایجاد تغییر یا جهش در DNA می‌باشد [۲۶]:

۱- آنزیمی به نام Cas9:

این آنزیم به عنوان یک جفت قیچی مولکولی عمل می‌کند که می‌تواند دو رشته DNA را در محل خاصی از ژنوم برش دهد که آن قسمت کوچک DNA می‌تواند بعدا اضافه یا حذف شود [۲۷].

۲- قطعه ای از RNA که به آن RNA راهنما (gRNA) گفته می‌شود:

---

[5] **G**ene **T**ransfer

این قطعه شامل توالی ریبونوکلئیک اسید از پیش طراحی شده ایست که طول آن حدود ۲۰ باز می‌باشد. این RNA داربست به DNA اتصال یافته و به آنزیم کس ۹ دستور می‌دهد که به کجای DNA متصل شود. کس ۹ با پیروی از RNA راهنما (gRNA) در همان قسمت، دو رشته DNA را می برد. در این مرحله، سلول DNA آسیب دیده را شناسایی کرده و سعی می‌کند تا آن را ترمیم کند. ترمیم رشته دوتایی شکسته شده به دو روش امکانپذیر است: مسیر ترمیمی اتصال انتهاهای غیر همولوگ (Non - Homologous End -Joining (NHEJ)) و مسیر ترمیمی همولوگ (Homology -Directed Repair (HDR)) (۲۸، ۲۹).

عملکرد کریسپر- کس۹

کریسپر- کس ۹ توانایی بالایی برای درمان طیف وسیعی از بیماری‌های پزشکی با زمینه ژنتیکی مانند سرطان، هپاتیت B و یا حتی کلسترول بالا و غیره را دارد [۲۸-۳۰]. بسیاری از ابزارهای دیگر برای اصلاح ژن در ژنوم سلول‌های سوماتیک بکار برده می‌شدند، در حالی که این سیستم در مورد اصلاح ژن در سلولهای زایشی نیز کاربرد دارد [۳۰]. اهمیت اصلاح ژن در سلول‌های زایشی در این است که تغییر در ژن آن‌ها به نسل‌های آینده نیز منتقل می‌شود که این مسئله دارای پیامد-های اخلاقی مهم می‌باشد. انجام اصلاح ژنی در سلول‌های زایشی در حال حاضر در انگلستان و در بیشتر دیگر کشورها غیرقانونی می‌باشد [۳۰]. در مقابل، استفاده از کریسپر- کس ۹ و دیگر تکنولوژی‌ها برای ایجاد ویرایش ژن دارای مناقشه است.

Cas9 و dCas9

پروتئین Cas9 به جایگاه هدف که در gRNA وجود دارد، متصل شده و با دقت بالا یک شکست دو رشته‌ای ایجاد می‌کند. به دنبال این شکست، یک جهش indel به وسیله مکانیسم ترمیم اتصال انتهاهای غیر همولوگ در سلول ایجاد می‌شود. همچنین با استفاده از الگوی ترمیم از پیش طراحی شده می‌توان باز اختصاصی در DNA را تغییر داد. وجوه عملکردی سیستم Cas9 به وسیله گوپا و همکارانش در یک مقاله مروری بررسی شده است [۳۱].

پروتئین Cas9 یک پروتئین چند دومینی می باشد [۳۲]. دو نوکلئودومین از ۳ دومین پروتئین RuvC، HNH مسئول شکست دو رشته ای DNA هدف می باشند. رزیدوهای (باقی مانده اسید آمینه) D10 و H840 به ترتیب از دومین های RuvC و HNH نقش کلیدی فعالیت کاتالیتیک Cas9 را بر عهده دارند [۳۳, ۳۴]. معرفی یک جهش نقطه‌ای جانشینی آلانین بجای رزیدوی ذکر شده باعث ایجاد پروتئین Cas9 فاقد فعالیت نوکلئازی به نام Cas9 مرده یا dCas9 می شود. علی‌رغم فقدان فعالیت نوکلئازی dCas9، در صورت هدایت gRNA این پروتئین همچنان قادر به اتصال به DNA در موقعیت خاص از ژنوم با همان دقت می باشد. با توسعه سیستم dCas، استفاده از فناوری CRISPR-Cas9 در حوزه های دیگر علاوه بر ویرایش ژنومی گسترش زیادی یافت. برعکس knockout بوسیله مهندسی ژنوم، سیستم CRISPR-dCas9 تغییرات برگشت پذیری را در بیان ژن اعمال کرده و منجر به دستیابی به دو فناوری مجزا می شود. هرکجا فرآیند رونوشت سرکوب شود، کریسپر تداخلی (CRISPRi) و هرکجا رونوشت فعال شود، کریسپر فعال (CRISPRa) نامیده می شود [۳۵]. امروزه این سیستم ها به شکل گسترده به منظور تغییر چندین ژن و شناسایی عملکرد سلولی به کار گرفته شده است. از طرفی، ابزارهای حوزه کریسپر با اتصال Cas9 غیرفعال (dCas9) به افکتورهای مختلف مانند بازدارنده‌ها یا فعال کننده‌های رونویسی، تنظیم کننده‌های اپی ژنتیکی و فلوروفورها گسترش پیدا کرده است.

تنظیم کننده‌های رونویسی

تنظیم پروتئین dCas9 از طریق توانایی الحاق پروتئین‌های افکتور به dCas9 یا gRNA و حفظ هدف‌گیری DNA تعریف می‌شود. بنابراین به منظور طیف وسیعی از کاربردها، هدف‌گیری DNA چندمنظوره می‌تواند با پروتئین‌های افکتور مختلفی ترکیب شود.

مداخله کریسپری

اتصال dCas9 به عناصر DNA ممکن است با ممانعت از حرکت کمپلکس RNA پلی‌مراز، رونویسی را مهار نماید. مداخله با واسطه dCas9 که CRISPR interference(CRISPRi) نام دارد، در پروکاریوت ها به صورت موثری کار می‌کند اما در سلول‌های یوکاریوتی اثربخشی کمتری دارد. برای افزایش ظرفیت مهارکنندگی کریسپر در سلول‌های یوکاریوتی، dCas9 به دومین‌های مهارکننده رونویسی مثل Krüppel-associated box (KRAB)متصل می شود که این دومین در فاکتورهای رونویسی انگشت روی طبیعی یافت می شود. KRAB به عنوان عامل شکل‌گیری هتروکروماتین شناخته شده است و تغییرات در ساختار کروماتین اغلب با مهار هدفمند رونویسی dCas9-KRAB همراه است. dCas9-KRAB یک ابزار قدرتمند در سلول‌های پستانداران است که می‌تواند به طور موثری با نشانه گرفتن نواحی پروموتر، نواحی '5 غیر قابل ترجمه و عناصر افزاینده پروکسیمال و دیستال، ژن‌های منفرد و RNA های غیرکدکننده را مهار کند. برای بهبود توانایی‌های مهاری، dCas9 به یک فاکتور مهاری دو قسمتی شامل دومین‌های مهار رونویسی KRAB و Binding protein 2 methyl-CpG متصل می شود. تطبیق پذیری dCas9-KRAB از طریق توانایی آن در مهار رونویسی ژن‌ها و همچنین نواحی تنظیمی ژنی، برجسته‌تر شده است [۳۶-۳۸].

فعالسازی با سیستم کریسپر

dCas9 می‌تواند به افکتورهای فعال کننده متصل شود و فعالسازی رونویسی قابل برنامه‌ریزی به نامCRISPR activation (CRISPRa) را ایجاد نماید [۳۵]. در یوکاریوت‌ها، ژن‌های گزارشگر و همچنین ژن‌های آندوژن می‌توانند به کمک dCas9 متصل به دومین‌های فعال‌کننده رونویسی زیرواحد فعال کننده فاکتور هسته‌ای kB (p65) یا VP64 (چهار توالی تکرارشونده دومین فعال‌کننده هرپس سیمپلکس VP16) فعال شوند [۳۹-۴۱]. اغلب فعال‌سازی هم افزایی به وسیله این فاکتورهای رونویسی هم افزا و با هدایت gRNAهای متعدد به یک ناحیه پروموتر مشاهده شده است [۴۲]. علاوه بر این، هم افزایی می‌تواند با ترکیب نمودن دومین‌های فعالسازی مختلف به دست آید. فعالسازی چندگانه ژن‌های آندوژن نیز می‌تواند برای برنامه‌ریزی مجدد سلولی استفاده شود. برای مثال هدایت VP64– dCas9–VP64 (dCas9 در هریک از پایانه‌های VP64 به آن متصل شد) به ژن‌های آندوژن Brn2 (Pou3f2 هم نامیده می‌شود) Ascl1 و Myt1l، موجب فعال‌سازی فاکتورهای رونویسی اختصاصی رده و در نتیجه تبدیل مستقیم فیبروبلاست‌های اولیه جنین موشی به سلول‌های نورونی القا شده، گشته است [۴۳]. رویکردهای مشابهی برای برنامه‌ریزی مجدد سلول‌ها به سلول‌های پرتوان یا میتوزی استفاده شده است [۴۴].

ویرایش اپی‌ژنوم

با استفاده از ابزارهای مبتنی بر dCas9، ویرایش‌های اپی‌ژنتیکی هدفمند مثل استیلاسیون و متیلاسیون هیستون‌ها و متیلاسیون DNA قابل انجام است [۴۵]. برای مثال، با اتصال dCas9 به هسته کاتالیتیک استیل ترانسفراز هیستونی p300 و هدایت آن به سمت پروموترها و افزاینده‌ها با هدف تحریک استیلاسیون هیستون H3

Lys27، فعال‌سازی ژنی قوی به دست آمد [۴۶-۴۸]. همچنین ادغام dCas9 به دومین کاتالیتیکی متیل سیتوزین دی اکسیژناز TET1 منجر به متیلاسیون DNA و به دنبال آن هدایت dCas9-TET1 به پروموتر BRCA1، باعث تنظیم رونویسی شد [۴۹]. همچنین در یک مطالعه به عنوان یک درمان بالقوه، dCas9-TET1 برای دمتیلاسیون موتاسیون CGG-expansion (موتاسیون مرتبط با سندرم X شکننده) در ناحیه '5 غیرقابل ترجمه ژن FMR1 و معکوس کردن روند مهاری آن استفاده شد و که در نتیجه آن، بیان ژن FMR1 به طور حائز اهمیتی به دنبال پیوند سلول‌های ویرایش شده به درون مغز موش‌ها حفظ شد [۵۰]. برای سرکوب رونویسی وراثتی، dCas9-KRAB می‌تواند در ترکیب با DNA متیل‌ترانسفراز (DNMT) به کار رود [۵۰, ۵۱]. مهار پایدار توالی افزاینده پروموتر بتا-۲-میکروگلوبولین در 78% سلول‌های K562 از طریق بیان موقت dCas9 متصل به دومین KRAB و دومین‌های کاتالیتیک DNMT3A و DNMT3L به همراه gRNA به دست آمد. فراوان بودن افکتورهای اپی ژنتیکی بالقوه به همراه هدف‌گیری قدرتمند با واسطه dCas9، کاربردهای زیادی را برای مطالعات اپی‌ژنتیکی فراهم می‌کند [۵۲, ۵۳].

کنترل دینامیکی عملکرد Cas9

سیستم‌های القایی برای فعال‌سازی ژنی نیازمند محرک خاصی هستند. بر اساس نوع محرک‌ها، استراتژی‌های مختلفی توسعه یافته‌اند تا سیستم‌های القایی مبتنی بر Cas9 ایجاد کنند که اجازه کنترل زمانی هدف‌گیری ژنی با واسطه Cas9 را می‌دهد.

القای شیمیایی

ترکیبات شیمیایی می‌توانند بیان ژن را از طریق پروموترهای القایی فعال کنند. این روش ممکن است برای کنترل زمانی دقیق به منظور ایجاد حذف ژنی در برخی سلول‌ها به جای حذف دائم رده‌های سلولی مطلوب باشد. بیان القایی Cas9 با داکسی سایکلین در سلول‌های بنیادی بالقوه انسانی و موش بالغ استفاده شده است. با این وجود، موتاسیون‌زایی مستقل از داکسی سایکلین که در سلول‌های ترانسفکت شده مشاهده شد، بیانگر این است که بیان Cas9 در برخی از این سیستم‌ها با کم و کاستی مواجه است [۵۴, ۵۵].

سیستم‌های القایی بر پایه dCas9 در مهندسی اپی‌ژنوم نیز کاربرد دارند [۵۶]. سیستم CRISPRi القا شونده با داکسی سایکلین، امکان مدل سازی برای بیماری‌ها را به صورت موثر، قابل تنظیم و برگشت‌پذیر در کاردیومایست‌های مشتق از سلول بنیادی بالقوه فراهم می‌کند. سیستم‌های کریسپری القاشونده شیمیایی با استفاده از فعال کننده‌های تثبیت شونده شرطی dCas9 و فعال کننده‌های dCas9 دو بخشی، که به دنبال القای شیمیایی دایمر می‌شوند، توسعه یافته است. از فواید فعال کننده‌های دوبخشی القایی dCas9 می توان به حداقل رساندن بیان معیوب dCas9 و امکان هدف‌گیری ژن‌های متعدد برای تنظیم زمانی چندگانه را نام برد [۵۴].

اپتوژنتیک

سیستم‌های dCas9 القایی با نور باعث تنظیم دینامیکی دقیق ژن‌های آندوژن شده و امکان کنترل فضایی ژن‌ها را فراهم می‌کنند [۵۷]. برای مثال، دایمریزاسیون القا شده با نور سیتوکروم CRY2 با منشا گیاهی با یک بخش اتصال یابنده به نام C1B1، برای ایجاد dCas9-p65 فعال شده با نور و dCas9-VP64 استفاده شده است [۵۸]. در مثالی دیگر یک پروتئین آنتی‌کریسپری برای کنترل مکانی و زمانی ژنوم با

واسطه نور و ویرایش اپی‌ژنومی در سلول‌های انسانی، مهندسی شده است که از جفت شدن یک فتوسنسور از Avena sativa با یک SpCas9 مهاری ساخته شده است [۵۹]. همچنین در مصالعه ای دیگر یک سیستم optogenetic split-protein نسل دوم برای تنظیم بیان ژن NEUROD1 توسعه و هدایت یافت تا موجب تمایز نورونی در سلول‌های بنیادی پرتوان القایی شود [۶۰]. برای تنظیم پیچیده‌تر، سیستم‌های القایی شیمیایی و نوری متعددی برای دست‌ورزی دینامیکی فعالسازی یا مهار ژن‌های گوناگون استفاده شده است. سیستم‌های القایی با نور از طریق کنترل زمانی و بیان ژنی برگشت‌پذیر، برای توسعه مدل‌های بیماری امیدبخش بوده است.

دیگر کاربردهای ژنومی dCas9

سیستم‌های تنظیم ژنی CRISPR-dCas9 برای مشخص کردن عملکرد ژن‌های رونویسی شده ی بسیار ارزشمند، به اثبات رسیده‌اند. از دیگر کاربردهای مهم این ابزارها می‌توان به مشخص کردن عملکرد ژنوم غیرکدکننده اشاره کرد. افکتورهای مهندسی شده Cas9 و dCas9 فرصتی برای کشف نواحی از ژنوم فراهم می‌کنند که ابزارهای دیگری برای مداخله مستقیم روی آن ها وجود ندارد [۶۱-۶۳].

رمزگشایی ژنوم غیرکدکننده

با آغاز گسترش افکتورهای dCas9، استفاده از روش‌های CRISPRi و CRISPRa برای غربالگری پرتوان و به منظور رمزگشایی از ژنوم غیرکدکننده افزایش یافته است [۶۳]. ویرایش ژنومی با این ابزارها منجر به تداخل موثر روی عناصر تنظیمی بدون ایجاد هرگونه موتاسیون در توالی DNA می‌شود و همچنین ابزارهای مبتنی بر CRISPRa امکان انجام مطالعات جهت بدست آوردن عملکرد ژن ها را فراهم می نماید. ترکیب غربالگری‌های CRISPRi و CRISPRa و اجرای موازی آن‌ها برای هدف قرار دادن جایگاه‌های حساس DNase I که پیرامون ژن‌های موردنظر قرار گرفته‌اند، استفاده شده است. این رویکرد خاص، عناصر تنظیمی ای را شناسایی می‌کند که ممکن است وابسته به هدایت مداخله رونویسی بر پایه dCas9 باشند. در مجموع، این روش‌های مبتنی بر dCas9 قوانین توالی‌های تنظیم کننده را در بستر محتوای ژنومی طبیعی خود برای شفاف ساخته و اجازه بررسی RNAهای غیرکدکننده طویلی را فراهم می‌کنند که عملکرد آنها از طریق موتاسیون‌های حذف و اضافه ناشی از نوکلئازهای Cas9 تغییر نمی‌کند [۶۴-۶۶].

تعاملات کروماتینی

عملکرد ژنوم توسط ساختارکروماتینی تنظیم می‌شود. با این حال، دستیابی به اساس مولکولی این تنظیمات به علت عدم دسترسی کافی روش‌های مطالعه برهمکنش‌های کروماتین- پروتئین محدود شده است. برای شناسایی پروتئین‌هایی که با لوکوس ژنومی خاص واکنش می‌دهند، کروماتین می‌تواند با بیان یک آنتی‌بادی الحاق شده با پروتئین علیه dCas9، همراه با یک gRNA که توالی DNA موردنظر را هدف قرار می‌دهد، ایمن‌سازی شود. این روش engineered DNA binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP) نامیده شد که با شناسایی پروتئین‌های مرتبط با لوکوس به وسیله روش اسپکترومتری جرمی دنبال می شود. به طور اختصاصی، enChIP برای آنالیزهای بیوشیمیایی رونویسی و تنظیم اپی ژنتیکی در لوکوس ژنومی سلول‌های زنده استفاده می شود [۶۷-۶۹]. به طور مثال، dCas9 به APEX2 متصل شد که APEX2 یک پراکسیداز مهندسی شده است و پروتئین‌های نزدیک را به طور قابل توجهی با بیوتین نشان دار می‌کند. dCas9–APEX2 می‌تواند برای بیوتین دار کردن پروتئین‌ها در

همسایگی لوکوس‌های ژنومی هدف به کار رود و این پروتئین‌ها با روش های خالص سازی میل ترکیبی (affinity purification) و اسپکترومتری جرمی شناسایی می شوند [۷۰].

تنظیم بیان ژن که با شکل‌گیری برهمکنش‌های long-range کروماتینی تحت تاثیر قرار می‌گیرد، اغلب با عنوان chromatin looping شناخته می‌شود. برای فهم بهتر اصول برهمکنش‌های کروماتینی، روش های مبتنی بر dCas9 برای ویرایش دقیق chromatin looping توسعه یافته است. dCas9 بیوتینه شده برای شناسایی پروتئین‌های مرتبط با کروماتین و مطالعه برهمکنش‌های long-range استفاده شده است [۷۱].

CRISPR-dCas9(CLOuD9) می‌تواند به طور انتخابی و برگشت پذیر لوپ‌های کروماتین را سازماندهی نموده و بیان ژن‌های مرتبط را تنظیم کند. سیستم dCas9 القا شده با نور به عنوان جایگزین سیستم القا شونده شیمیایی CLOuD9، برای هدایت بازآرایی لوپ کروماتینی با زمانی سریع‌تر توسعه یافته است [۷۲].

سیستم القا شونده شیمیایی و برگشت‌پذیر به نام CRISPR-GO نیز می‌تواند سازماندهی فضایی ژنوم درون سلول را کنترل کند. CRISPR-GO اجازه مطالعه برهمکنش‌های کروماتینی درون فضای هسته‌ای را داده و عملکرد آن‌ها را روشن می کند. ابزارهای CRISPRi مثل dCas9-KRAB برای تخریب برهمکنش‌های anchored looping که تغییرات بیان ژنی را هماهنگ می‌کنند، استفاده شده است. این مطالعات به تایید نقش برهمکنش‌های بین مکانی جهت حفظ بیان ژنی کمک نموده است. بازسازی کروماتینی که توسط این تکنولوژی‌ها تسهیل می‌شود، برای مطالعه نقش‌های دینامیکی ساختار ژنومی در تنظیم ژنی بسیار سودمند خواهد بود [۷۳].

تصویربرداری مکانی

روش‌های تصویربرداری توالی‌های DNA برای مطالعه سازماندهی فضایی ژنوم مفید هستند. برای مثال تکنیک‌های هیبریداسیون در محل فلورسنت (FISH) برای این منظور ارزشمند بوده است. با این حال، این روش‌ها نیازمند فیکساسیون سلولی هستند. به منظور تصویربرداری از سلول زنده، dCas9 نشاندار با GFP و gRNA های بهینه از نظر ساختاری، به عناصر تکراری و ژن‌های کدکننده هدایت شده و با هدف‌گیری تعداد زیادی لوکوس ژنی، نشان‌دار کردن تمام کروموزوم برای تصویربرداری از سلول زنده امکان پذیر می گردد [۷۴]. بسته به طول کروموزوم، رنگ کردن کل کروموزوم می‌تواند تقریبا به 100-800 gRNA نیاز داشته باشد. برای توسعه این ابزارها به صورت ویرایش ژنوم چندرنگی، تنظیم‌کننده‌های orthogonal dCas9 با پروتئین‌های فلورسنت مختلفی نشان‌دار می شود. روش‌های دیگر تصویربرداری سلول زنده که مبتنی بر dCas9 چندرنگی هستند، بر مهندسی داربست‌های gRNA متمرکز شده است. با برگزیدن داربست‌های gRNA برای اتصال به مجموعه‌ای از پروتئین‌های فلورسنت، تا ۶ لوکوس کروموزومی هدف به طور همزمان مشاهده شدند. علاوه براین، آپتامرهای gRNA به منظور اتصال به دو پروتئین فلورسنت مختلف مهندسی شده‌اند. این رویکرد دو رنگی نسبت به از دست دادن رنگ مقاوم[۶] هستند. بنابراین، این روش برای تصویربرداری طولانی مدت از نواحی ژنومی مناسب می باشد [۷۵, ۷۶].

کاربردهای زیست پزشکی ابزارهای کریسپر

[۶] Tolerant of photobleaching

ویرایش ژنی مبتنی بر کریسپر و ابزارهای مهندسی اپی‌ژنوم توانایی ما را در دست‌ورزی عملکردهای ژنومی متحول ساخته است. این ابزارها در حال حاضر به طور حائز اهمیتی در ژن‌درمانی و بهبود درمان سلولی اعمال شده است.

ژن درمانی پیش بالینی

تکنولوژی‌های ویرایش ژن، حوزه ژن درمانی را از انتقال یک ترانسژن خارجی به ویرایش توالی‌های ژنوم انسان تبدیل نموده است. پتانسیل‌های درمانی ویرایش‌های دقیق و هدفمند ژنومی شامل طیف وسیع و متنوعی از بیماری‌ها و اختلالات است اما به جهت پیشرفت و ورود تکنولوژی‌های بر پایه کریسپر به حوزه بالینی می بایست بر محدودیت‌های بالقوه آن غلبه شود.

اگرچه اکثر کاربردهای درمانی ویرایش ژنومی، تصحیح موتاسیون‌هایی است که باعث بیماری‌های ژنتیکی می‌شوند، استراتژی‌های ویرایش متنوعی نیز وجود دارد که ژن‌های دخیل در بیماری‌های پیچیده رایج را مورد دست‌ورزی قرار می‌دهند. برای مثال با هدف قرار دادن ژن هموستاز کلسترول موش به نام Pck9 با انتقال آدنوویروسی، کاهش سطح کلسترول لیپوپروتئین با چگالی کم به دنبال تخریب و سرکوب ژنی در in vivo بدست آمد. به منظور ارزیابی پیش بالینی کاربردهای ویرایش ژنومی سوماتیک، استفاده از این روش برای هدف قرار دادن ژن PCSK9 انسانی در موشی که هپاتوسیت‌های انسانی به صورت موفقیت آمیزی به آن پیوند یافته است، گسترش یافت. همچنین رویکردهای مشابهی نیز با استفاده از مهار اپی‌ژنتیکی Pck9 با انتقال ویروسی dCas9-KRAB کشف شده‌اند [۷۷].

استراتژی‌های درمانی ویرایش ژنومی اخیرا برای بیماری های چشمی مثل retinitis pigmentosa که می‌تواند منجر به نابینایی شود کشف شده است. تخریب ژن Nrl با واسطه Cas9 از طریق شکل‌گیری موتاسیون‌های حذف و اضافه، باعث حفظ عملکرد فتورسپتورهای مخروطی در سه مدل موش مختلف دژنراسیون شبکه گردید. در یک مطالعه دیگر در مدل retinitis pigmentosa، ادغام HITI با واسطه Cas9 باعث حذف 1.9 کیلوبازی در ژن کیناز MERTK در رت و بنابراین، ترمیم و بازسازی عملکرد MERTK شد [۷۸]. اجزای درمان‌های ژنی توسط وکتورهای AAV به چشم انتقال داده شد. AAV که به دلیل ویژگی‌هایی چون اثربخشی، ایمنی و طیف وسیع هدف‌گیری بافتی آن، رایج‌ترین وکتور برای انتقال ژن می باشد. انتقال AAV به ماهیچه اسکلتی و قلبی می‌تواند برای درمان بیماری‌های نورونی- ماهیچه‌ای مثل دیستروفی عضلانی دوشن (DMD) استفاده شود [۷۹, ۸۰]. در بیشتر افراد دارای DMD یک نقطه کانونی (hotspot) از حذف‌های مختلف وجود دارد که چارچوب خوانش ژن DMD، ژن کدکننده دیستروفین را از بین می‌برد. بازسازی چارچوب ژنی در چندین مطالعه انجام گرفته: به دنبال انتقال CRISPR-Cas9 با AAV به منظور بریدن اگزون‌های اضافی به ارث رسیده از طریق ترمیم اتصال انتهاهای غیر همولوگ (NHEJ)، به مدت حداقل یک سال پس از تجویز CRISPR-Cas9 حفظ شد. این رویکردهای ویرایشی مبتنی بر حذف منجر به بیان یک پروتئین دیستروفین کوتاه شده اما نسبتا عملکردی شد. خصوصا، پیشرفت‌هایی در جهت گسترش این رویکردها در مدل‌های حیوانی بزرگ DMD صورت گرفته است. علاوه بر روش‌های انتقال ویروسی، نانوپارتیکل‌های لیپیدی نیز می‌تواند برای انتقال Cas9 در in vivo استفاده شود [۸۱]. اخیرا نانوپارتیکل‌های لیپیدی شامل SpCas9 mRNA و gRNA ویرایش شده به روش شیمیایی که ژن Ttr موشی را هدف قرار می‌داد، به موش انتقال داده شدند. به دنبال این تجویز، سطح Transthyretin سرمی

کاهش یافت و ویرایش ژنومی in vivo برای کسب اثرات مفید درمانی لازم به دست آمد. اثربخشی بالینی درمان‌های مبتنی بر CRISPR-Cas متکی بر همراه نمودن پیشرفت های ویرایش ژنومی با پیشرفت‌های مداوم در زمینه روش‌های انتقال است [۸۱]. به خصوص، روش‌های انتقال به صورت غیرویروسی ممکن است موجب رفع نگرانی‌های موجود درباره بیان طولانی مدت پروتئین‌های Cas ایمونوژنیک و ادغام وکتورهای DNA درون ژنوم، می شود.

بهبود درمان های سلولی

اکثر روش‌های ویرایش ژنی بر پایه دست ورزی سلولی ex vivo هستند که اثرات درمانی را پس از برگرداندن سلول‌ها به گیرنده ایجاد می‌کنند. به عنوان مثال، سلول‌های T اتولوگ مهندسی شده در ایمونوتراپی انتخابی سلول T موفقیت آمیز بوده است. رویکردهای ویرایش ژنی برای افزایش ویژگی‌های این سلول‌های مهندسی شده مفید بوده است. برای مثال، الحاق ترانسژن‌های کدکننده گیرنده‌های آنتی ژنی کایمریک قابل برنامه‌ریزی درون ژن کدکننده ناحیه ثابت زنجیره آلفای گیرنده آندوژن سلول T، به جای بیان بیش از حد گیرنده‌های آنتی‌ژنی کایمریک از وکتورهای ویروسی، از فرسودگی سلول‌های T در اثر تحریک‌های بیش از اندازه جلوگیری و در عین حال باعث حذف بیان گیرنده آندوژن سلول T می شود که این گیرنده می تواند عامل ایجاد بیماری پیوند علیه میزبان باشد. کاربرد درمانی مهم دیگر ویرایش ژنومی، حذف اجزای سیستم آنتی‌ژن لکوسیت انسانی به منظور تولید سلول‌های دهنده universal است که چالش‌های عملی و اقتصادی درمان های مبتنی بر سلول‌های اتولوگ اختصاصی بیمار را کاهش می دهد. محققان همچنین پروتئین 1 مرگ برنامه‌ریزی سلولی را به منظور مسدود نمودن سیگنال‌های مهاری که باعث ممانعت از تشخیص سلول های توموری توسط سلول‌های T می شود، مورد هدف قرار داده‌اند. سلول های T اتولوگ که به صورت ex vivo با Cas9 به منظور حذف ژن های کدکننده PD1 و زنجیره‌های آلفا و بتا گیرنده سلول T تیمار شده بودند، در اولین کارآزمایی بالینی انسانی CRISPR-Cas9 به افراد مبتلا به سرطان در ایالات متحده یا اروپا دوباره برگردانده شدند. اخیرا اولین کارازمایی بالینی CRISPR-Cas برای درمان بیماری ژنتیکی بتا تالاسمی و اولین کارازمایی ویرایش ژنومی in vivo با سیستم کریسپر در شبکیه چشم به منظور درمان یک نوع نادری از نابینایی در حال اجراست. مهمتر از همه، این کارازمایی‌های بالینی بر پایه سیستم CRISPR-Cas بر اساس چندین کارازمایی‌های بالینی ویرایش ژنومی که از نوکلئازهای انگشت روی استفاده می‌کنند، تعبیه شده است. در مجموع، این کارازمایی‌های بالینی پتانسیل درمانی ابزارهای مهندسی ژنوم توسعه یافته اخیر را به اثبات خواهد رساند [۸۲-۸۷].

نتیجه‌گیری و دستورالعمل‌های آینده

طراحی های جدید سیستم‌های CRISPR-Cas برای استفاده در سلول‌های یوکاریوت، حوزه مهندسی ژنوم را متحول ساخته است. حتی با وجود استفاده گسترده سیستم‌های CRISPR-Cas نوع دو، کشف و گسترش مداوم سیستم‌های کریسپر از گونه‌های پروکاریوت منجر به تکنولوژی‌های جدید و مفیدی مثل ابزارهای هدف‌گیری RNA بر اساس Cas13a شده است. اتصال dCas9 به مجموعه‌ای از افکتورها ادامه خواهد یافت تا امکانات لازم برای دست‌ورزی اپی ژنتیکی هدفمند گسترش یابد [۸۸, ۸۹].

آسان بودن طراحی کتابخانه gRNA برای هدف گیری Cas9 در ابعاد وسیع همراه با دستاوردهایی در توالی‌یابی نسل جدید، غربالگری‌های ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی را در دسترس آسان قرار داده است. هدف‌گیری

ژنی با ابعاد وسیع و ایجاد اختلال در آن‌ها باعث پیشرفت دانش ما درباره مکانیسم‌های بیولوژیکی خواهد شد و به کشف اهداف درمانی جدید کمک خواهد کرد. علاوه براین، هدف‌گیری چندگانه سیستم‌های کریسپری اجازه دست‌ورزی‌های پیچیده‌تر فرایندهای سلولی را فراهم خواهد کرد.

از زمانی که درمان‌های مبتنی بر کریسپر وارد آزمایشات بالینی شده است، پتانسیل زیادی برای تصحیح بیماری‌های ژنتیکی و بهبود درمان‌های سلولی از خود نشان داده است. نتایج پیش بالینی امیدوارکننده هستند اما ایمنی و کارایی آن باید در طول این مطالعات به شدت ارزیابی شود. خطر بالقوه استفاده از روش‌های ویرایش ژنی، احتمال ایجاد تغییرات خارج از هدف در توالی ژنومی است، بنابراین بهینه سازی روش‌هایی برای ارزیابی موتاسیون‌های نادر و تعیین کمی خطرات بالقوه آن‌ها برای پیشرفت‌های بالینی آینده مهم خواهد بود.

منابع

١. Mali, P., et al., *RNA-guided human genome engineering via Cas9.* Science, 2013. **339**(6121): p. 823-826.

٢. Yang, Y., et al., *CRISPR/Cas: Advances, Limitations, and Applications for Precision Cancer Research.* Frontiers in Medicine, 2021. **8**.

٣. Sherkow, J S., *Who owns gene editing? Patents in the time of CRISPR.* Patents in the Time of CRISPR (April 5, 2016). Biochemist, 2016. **38**: p. 26.

٤. Old, R.W. and S.B. Primrose, *Principles of gene manipulation: an introduction to genetic engineering*. Vol. 2. 1981: Univ of California Press.

٥. Gaj, T., C.A. Gersbach, and C.F. Barbas III, *ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering.* Trends in biotechnology, 2013. **31**(7): p. 397-405.

٦. Petersen, B., *Basics of genome editing technology and its application in livestock species.* Reproduction in Domestic Animals, 2017. **52**: p. 4-13.

٧. Garneau, J.E., et al., *The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA.* Nature, 2010. **468**(7320): p. 67-71.

٨. Horvath, P. and R. Barrangou, *CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea.* Science, 2010. **327**(5962): p. 167-170.

٩. Gleditzsch, D., et al., *PAM identification by CRISPR-Cas effector complexes: diversified mechanisms and structures.* RNA biology, 2019. **16**(4): p. 504-517.

١٠. Makarova, K.S., et al., *Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants.* Nature Reviews Microbiology, 2020. **18**(2): p. 67-83.

١١. Strutt, S.C., et al., *RNA-dependent RNA targeting by CRISPR-Cas9.* elife, 2018. **7**: p. e32724.

١٢. O'Connell, M.R., *Molecular mechanisms of RNA targeting by Cas13-containing type VI CRISPR–Cas systems.* Journal of molecular biology, 2019. **431**(1): p. 66-87.

١٣. Pickar-Oliver, A. and C.A. Gersbach, *The next generation of CRISPR–Cas technologies and applications.* Nature reviews Molecular cell biology, 2019. **20**(8): p. 490-507.

١٤. Molla, K.A., S. Karmakar, and M.T. Islam, *Wide horizons of CRISPR-Cas-derived technologies for basic biology, agriculture, and medicine*, in *CRISPR-Cas methods*. 2020, Springer. p. 1-23.

١٥. Liu, Z., et al., *Application of different types of CRISPR/Cas-based systems in bacteria.* Microbial cell factories, 2020. **19**(1): p. 1-14.

١٦. Cox, D.B.T., R.J. Platt, and F. Zhang, *Therapeutic genome editing: prospects and challenges.* Nature medicine, 2015. **21**(2): p. 121-131.

١٧. Li, H., et al., *Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects.* Signal transduction and targeted therapy, 2020. **5**(1): p. 1-23.

١٨. Xiao-Jie, L., et al., *CRISPR-Cas9: a new and promising player in gene therapy.* Journal of medical genetics, 2015. **52**(5): p. 289-296.

١٩. Grotz, A.K., et al., *A genome-wide CRISPR screen identifies regulators of beta cell function involved in type 2 diabetes risk.* bioRxiv, 2021.

٢٠. Liu, N. and E.N. Olson, *CRISPR modeling and correction of cardiovascular disease.* Circulation Research, 2022. **130**(12): p. 1827-1850.

٢١. Tu, Z., et al., *CRISPR/Cas9: a powerful genetic engineering tool for establishing large animal models of neurodegenerative diseases.* Molecular neurodegeneration, 2015. **10**(1): p. 1-8.

٢٢. Uddin, F., C.M. Rudin, and T. Sen, *CRISPR gene therapy: applications, limitations, and implications for the future.* Frontiers in oncology, 2020. **10**: p. 1387.

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

٢٤. Sakuma, T., et al., *Multiplex genome engineering in human cells using all-in-one CRISPR/Cas9 vector system.* Scientific reports, 2014. **4**(١): p. ١-6.

٢٥. Shojaei Baghini, S., et al., *CRISPR/Cas9 application in cancer therapy: a pioneering genome editing tool.* Cellular & Molecular Biology Letters, 2022. **27**(1): p. 1-37.

٢٦. Allen, D., M. Rosenberg, and A. Hendel, *Using Guide RNAs to Enhance Synthetically Engineered CRISPR Genome Editing Systems in Mammalian Cells.* Frontiers in Genome Editing, 2021. **2**.

٢٧. Broeders, M., et al., *Sharpening the molecular scissors: advances in gene-editing technology.* Iscience, 2020. **23**(1): p. 100789.

٢٨. Redman, M., et al., *What is CRISPR/Cas9?* Archives of Disease in Childhood-Education and Practice, 2016. **101**(4): p. 213-215.

٢٩. Zaib, S., M.A. Saleem, and I. Khan, *CRISPR-Cas9 genome engineering: trends in medicine and health.* Mini reviews in medicinal chemistry, ٢٠٢٢. ٢٢(٣): p. 410-421.

٣٠. Dong, C., et al., *Targeting hepatitis B virus cccDNA by CRISPR/Cas9 nuclease efficiently inhibits viral replication.* Antiviral research, 2015. **118**: p. 110-117.

٣١. Gupta, D., et al., *CRISPR-Cas9 system: A new-fangled dawn in gene editing.* Life sciences, 2019. **232**: p. 116636.

٣٢. Gasiunas, G. and V. Siksnys, *RNA-dependent DNA endonuclease Cas9 of the CRISPR system: Holy Grail of genome editing?* Trends in Microbiology, 2013. **21**(11): p. 562-567.

٣٣. Janowski, M., et al., *Chromatin Alterations in Neurological Disorders and Strategies of (Epi) Genome Rescue.* Pharmaceuticals, 2021. **14**(8): p. 765.

٣٤. Brown, A., W.S. Woods, and P. Perez-Pinera, *Targeted gene activation using RNA-Guided nucleases*, in *Enhancer RNAs*. 2017, Springer. p ٢٣٥-٢٥٠.

٣٥. Kampmann, M., *CRISPRi and CRISPRa screens in mammalian cells for precision biology and medicine.* ACS chemical biology, 2018. **13**(2): p. 406-416.

٣٦. Li, Y. and L.q. Zhou, *dCas9 techniques for transcriptional repression in mammalian cells: Progress, applications and challenges.* BioEssays, 2021. **43**(9): p. 2100086.

٣٧. Hu, Y. and W. Li, *Development and Application of CRISPR-Cas Based Tools.* Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2022. **10**.

٣٨. Kanafi, M.M. and M. Tavallaei, *Overview of advances in CRISPR/deadCas9 technology and its applications in human diseases.* Gene, 2022. **830**: p. 146518.

٣٩. Zhang, Y., D. Sastre, and F. Wang, *CRISPR/Cas9 Genome Editing: A Promising Tool for Therapeutic Applications of Induced Pluripotent Stem Cells.* Curr Stem Cell Res Ther, 2018. **13**(4): p. 243-251.

٤٠. Gilbert, L.A., et al., *CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes.* Cell, 2013. **154**(2): p. 442-51.

٤١. Wei, C., et al., *CRISPR/Cas9 targeting of the androgen receptor suppresses the growth of LNCaP human prostate cancer cells.* Mol Med Rep, 2018. **17**(2): p. 2901-2906.

٤٢. Casas-Mollano, J.A., et al., *CRISPR-Cas Activators for Engineering Gene Expression in Higher Eukaryotes.* Crispr j, 2020. **3**(5): p. 350-364.

٤٣. Black, J.B., et al., *Targeted Epigenetic Remodeling of Endogenous Loci by CRISPR/Cas9-Based Transcriptional Activators Directly Converts Fibroblasts to Neuronal Cells.* Cell Stem Cell, 2016. **19**(3): p. 406-14.

٤٤. Yumlu, S., et al., *Efficient Gene Editing of Human Induced Pluripotent Stem Cells Using CRISPR/Cas9.* Methods Mol Biol, 2019. **1961**: p. 137-151.

٤٥. Nakamura, M., et al., *CRISPR technologies for precise epigenome editing.* Nature Cell Biology, 2021. **23**(1): p. 11-22.

٤٦. Gjaltema, R.A.F. and M.G. Rots, *Advances of epigenetic editing.* Current Opinion in Chemical Biology, 2020. **57**: p. 75-81.

٤٧. Chen, L.-F., et al., *Enhancer Histone Acetylation Modulates Transcriptional Bursting Dynamics of Neuronal Activity-Inducible Genes.* Cell Reports, 2019. **26**(5): p. 1174-1188.e5.

٤٨. Zhao, W., et al., *Investigating crosstalk between H3K27 acetylation and H3K4 trimethylation in CRISPR/dCas-based epigenome editing and gene activation.* Scientific Reports, 2021. **11**(1): p. 15912.

٤٩. Urbano, A., et al., *Gene-Specific Targeting of Methylation in the Mammalian Genome. DNA* Cancers, 2019. **11**(١٠).

٥٠. Liu, X.S., et al., *Rescue of Fragile X Syndrome Neurons by DNA Methylation Editing of the FMR1 Gene.* Cell, 2018. **172**(5): p. 979-992.e6.

٥١. Urbano, A., et al., *Gene-Specific Targeting of Methylation in the Mammalian Genome. DNA* Cancers, 2019. **11**(10): p. 1515.

٥٢. Matharu, N. and N. Ahituv, *Modulating gene regulation to treat genetic disorders.* Nature Reviews Drug Discovery, 2020. **19**(11): p. 757-775.

٥٣. Lo, A. and L. Qi, *Genetic and epigenetic control of gene expression by CRISPR-Cas systems.* F1000Research, 2017. **6**: p. F1000 Faculty Rev-747.

٥٤. Doetschman, T. and T. Georgieva, *Gene Editing With CRISPR/Cas9 RNA-Directed Nuclease.* Circulation Research, 2017. **120**(5): p. 876-894.

٥٥. Zhang, Z, et al., *CRISPR/Cas9 Genome-Editing System in Human Stem Cells: Current Status and Future Prospects.* Molecular Therapy - Nucleic Acids, 2017. **9**: p. 230-241.

٥٦. Dai, X., et al., *Inducible CRISPR genome-editing tool: classifications and future trends.* Critical Reviews in Biotechnology, 2018. **38**(4): p. 573-586.

٥٧. Sgro, A. and P. Blancafort, *Epigenome engineering: new technologies for precision medicine.* Nucleic Acids Research, 2020. **48**(22): p. 12453-12482.

٥٨. Syding, L.A., et al., *CRISPR/Cas9 Epigenome Editing Potential for Rare Imprinting Diseases: A Review.* Cells, 2020. **9**(4): p. 993.

٥٩. Manoilov, K.Y., V.V. Verkhusha, and D.M. Shcherbakova, *A guide to the optogenetic regulation of endogenous molecules.* Nature Methods, 2021. **18**(9): p. 1027-1037.

٦٠. Chavez, A., et al., *Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming.* Nature Methods, 2015. **12**(4): p. 326-328.

٦١. Tak, Y.G. and P.J. Farnham, *Making sense of GWAS: using epigenomics and genome engineering to understand the functional SNPs in non-coding regions of the relevance of human genome.* Epigenetics & Chromatin, 2015. **8**(1): p. 57.

٦٢. Canver, M.C., D.E. Bauer, and S.H. Orkin, *Functional interrogation of non-coding DNA through CRISPR genome editing.* Methods, 2017. **121-122**: p. 118-129.

٦٣. Hazan, J. and A.C. Bester, *CRISPR-Based Approaches for the High-Throughput Characterization of Long Non-Coding RNAs.* Non-Coding RNA, 2021. **7**(4): p. 79.

٦٤. Awwad, D.A., *Beyond classic editing: innovative CRISPR approaches for functional studies of long non-coding RNA.* Biol Methods Protoc, 2019. **4**(1): p. bpz017.

٦٥. Uszczynska-Ratajczak, B., et al., *Towards a complete map of the human long non-coding RNA transcriptome.* Nature Reviews Genetics, 2018. **19**(9): p. 535-548.

٦٦. Liu, S.J., et al., *CRISPRi-based genome-scale identification of functional long noncoding RNA loci in human cells.* Science, 2017. **355**(٦٣٢٠).

٦٧. Singh, R., et al., *Cas9-chromatin binding information enables more accurate CRISPR off-target prediction.* Nucleic Acids Res, 2015. **43**(18): p. e118.

٦٨. Fujita, H., T. Fujita, and H. Fujii, *Locus-Specific Genomic DNA Purification Using the CRISPR System: Methods and Applications.* Crispr j, 2021. **4**(2): p. 290-300.

٦٩. Fujita, T. and H. Fujii, *Purification of specific DNA species using the CRISPR system.* Biol Methods Protoc, 2019. **4**(1): p. bpz008.

٧٠. Niinae, T., Y. Ishihama, and K. Imami, *Biotinylation-based proximity labelling*

٧١. Liu, X., et al., *In Situ Capture of Chromatin Interactions by Biotinylated dCas9.* Cell, 2017. **170**(5): p. 1028-1043.e19.

٧٢. Morgan, S.L., et al., *Manipulation of nuclear architecture through CRISPR-mediated chromosomal looping.* Nature Communications, 2017. **8**(1): p. 15993.

٧٣. Wang, H., et al., *CRISPR-Mediated Programmable 3D Genome Positioning and Nuclear Organization.* Cell, 2018. **175**(5): p. 1405-1417.e14.

٧٤. Tanenbaum, M.E., et al., *A protein-tagging system for signal amplification in gene expression and fluorescence imaging.* Cell, 2014. **159**(3): p. 635-646.

٧٥. Hong, Y., et al., *Comparison and optimization of CRISPR/dCas9/gRNA genome-labeling systems for live cell imaging.* Genome Biology, 2018. **19**(1): p. 39.

٧٦. Wang, S., et al., *An RNA-aptamer-based two-color CRISPR labeling system.* Sci Rep, 2016. **6**: p. 26857.

٧٧. Carreras, A., et al., *In vivo genome and base editing of a human PCSK9 knock-in hypercholesterolemic mouse model.* BMC Biol, 2019. **17**(1): p. 4.

٧٨. Suzuki, K., et al., *In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration.* Nature, 2016. **540**(7631): p. 144-149.

٧٩. Maggio, I., X. Chen, and M.A.F.V. Gonçalves, *The emerging role of viral vectors as vehicles for DMD gene editing.* Genome Medicine, 2016. **8**(1): p. 59.

٨٠. Hakim, C.H., et al., *AAV CRISPR editing rescues cardiac and muscle function for 18 months in dystrophic mice.* JCI Insight, 2018. **3**(٢٣).

٨١. Wang, J.Z., et al., *The AAV-mediated and RNA-guided CRISPR/Cas9 system for gene therapy of DMD and BMD.* Brain Dev, 2017. **39**(٧): p. 547-556.

٨٢. Nakazawa, T., et al., *Effect of CRISPR/Cas9-Mediated PD-1-Disrupted Primary Human Third-Generation CAR-T Cells Targeting EGFRvIII on In Vitro Human Glioblastoma Cell Growth.* Cells, 2020. **9**(4): p. 998.

٨٣. Liu, X. and Y. Zhao, *CRISPR/Cas9 genome editing: Fueling the revolution in cancer immunotherapy.* Current Research in Translational Medicine, 2018. **66**(2): p. 39-42.

٨٤. Mollanoori, H. and S. Teimourian, *Therapeutic applications of CRISPR/Cas9 system in gene therapy.* Biotechnology Letters, ٢٠١٨. ٤٠(٦): p. 907-914.

٨٥. Zhang, B., *CRISPR/Cas gene therapy.* Journal of Cellular Physiology, 2021. **236**(4): p. 2459-2481.

٨٦. Ou, Z., et al., *The Combination of CRISPR/Cas9 and iPSC Technologies in the Gene Therapy of Human β-thalassemia in Mice.* Scientific Reports, 2016. **6**(1): p. 32463.

٨٧. Hafler, B.P., *CLINICAL PROGRESS IN INHERITED RETINAL DEGENERATIONS: GENE THERAPY CLINICAL TRIALS AND ADVANCES IN GENETIC SEQUENCING.* Retina (Philadelphia, Pa.), 2017. **37**(3): p. 417-423.

٨٨. Alves, E., et al., *Reprogramming the anti-tumor immune response via CRISPR genetic and epigenetic editing.* Molecular Therapy - Methods & Clinical Development, 2021. **21**: p. 592-606.

٨٩. Bayoumi, M. and M. Munir, *Potential Use of CRISPR/Cas13 Machinery in Understanding Interaction.* Frontiers in Virus-Host microbiology, 2021. **12**: p. 743580-743580.