Journal of Cell and Tissue 14(3) (2023) 241-263

Journal of Cell and Tissue
http://jct.araku.ac.ir

Genome Editing Technologies and Application in Medicine: Discoveries, Challenges, and Prospects

Lohrasbi R [a], Amiri-Yekta A [a*]

[a] Department of Genetics, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran

Original Article

Use your device to scan and read the artic

le online

Citation: Lohrasbi R, Amiri-Yekta A. Genome Editing Technologies and Application in Medicine: Discoveries, Challenges, and Prospects. Journal of Cell and Tissue . 2023; 14(3):241

https://10.61186/JCT.14.3.241

KEYWORDS

Genome editing
Gene therapy
Clinical trial
Clinical application
CRISPR/Cas

ABSTRACT

Aim: A multitude of devastating human diseases arise from genetic mutations that lead to cellular dysfunction, as well as from infectious diseases and cell transformation. These diseases have significantly impacted individuals and communities worldwide and led to challenges in medical and biological sciences to address their causes and improve treatment approaches. Since identifying genes as the main heredity unit, generating targeted alterations in specific gene loci for treatment and perception of disease function has been a crucial concern. The discovery of nuclease enzymes revolutionized this field and transformed the concept of genome editing from a dream to a tangible reality.

Currently, targeted gene editing and modification through techniques such as zinc finger nuclease (ZFN), transcription activator-like effector nuclease (TALEN), and clustered regulatory interspaced short palindromic repeat Cas-associated nuclease (CRISPR/Cas) offers robust methods to assess gene function, also precisely and efficiently manipulate cells behavior.

ZFN and the TALEN were the earliest gene editing approaches that developed, which rely on the *FokI* enzyme and engineered protein that binds to a specific sequence in the genome and induces double-strand breakage, stimulating the cell's repair mechanisms. Although these techniques led to many significant discoveries and developments in gene editing, they had limitations such as complexity and high prices.

The emergence of CRISPR/Cas technology propelled gene editing to a new stage of efficiency and accessibility. This technique utilizes RNA to guide the Cas enzyme to the target gene sequence and, like the ZFN and TALEN,

* Corresponding author. Tel.: 021-23562720; Fax: 021-22306481
E-mail address: amir.amiriyekta@royaninstitute.org
DOI: https://10.61186/JCT.14.3.241
Received: 30 Jul. 2022; Received in revised form: 21 Oct. 2023; Accepted: 8 Nov. 2023
Review Article
©Author

creates a double-strand breakage, which triggers DNA repair mechanisms. CRISPR/Cas is a versatile, simple, and cost-effective revolutionary gene-manipulating tool that enabled researchers to explore the potential of gene editing in a wide application range.

Base and Prime editors are the latest systems in the genome manipulation area, which, based on the CRISPR/Cas technique, represent the impressive development and improvement in gene editing capabilities. Despite the others, these two technologies induce the single-strand breakage and modify at the nucleotide level in target sequences.

The ability to edit genes indicates new possibilities for treating genetic diseases and even preventing them before they appear. Nowadays, a growing number of clinical trials utilizing genome editing for therapeutic purposes are underway, thanks to the substantial advancements in these tools. These remarkable improvements hold promise in treating various diseases and improving patient's outcomes.

However, despite the outstanding progress made in gene editing technology, there are still several challenges and obstacles, such as ethical considerations, off-target effects, and safety concerns, which still need more investigation and studies. Consequently, ongoing researches are focused on developing the accuracy and efficacy of these editing tools.

Conclusion: The advancement of gene editing technology has opened up a new way in medical and biological sciences to modify and manipulate the genome, also exploring the various diseases caused.

سلول و بافت، دوره ۱۴، شماره ۳، سال ۱۴۰۲صفحات ۲۴۱ تا ۲۶۳

سلول و بافت

فناوری‌های ویرایش ژنوم و کاربرد آن در پزشکی: یافته‌ها، چالش‌ها و چشم‌انداز

ریحانه لهراسبی[۱] و امیر امیری‌یکتا[۱*]

[۱] پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست شناسی و علوم پزشکی تولید مثل جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه ژنتیک، تهران، ایران

واژگان کلیدی

ویرایش ژنوم
تصحیح هدفمند ژن
کارآزمایی بالینی
ژن درمانی
CRISPR/Cas

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۰۷

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۰۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۲۰

چکیده

مقدمه: بسیاری از بیماری‌های ویرانگر انسانی در اثر ایجاد جهش در ژنوم و بروز اختلال عملکرد در سلول، تغییرات ژنتیکی حاصل از بیماری‌های عفونی و یا تغییرات سلولی رخ می‌دهند. از زمان شناسایی ژن به‌عنوان واحد اصلی وراثت، توانایی ایجاد تغییر در محل بخصوصی از ژنوم انسان به‌منظور درمان و درک بهتر عملکرد بیماری‌ها، هدفی مهم در علوم پزشکی و زیست شناسی بوده است. **نتیجه‌گیری:** اصلاح ژن به صورت هدفمند از طریق ابزارهایی مانند ZFN، TALEN و CRISPR/Cas یک تکنیک قدرتمند جهت ارزیابی عملکرد ژن و همچنین دستکاری دقیق رفتار و بازده‌ی سلول بوده و امروزه با توسعه و پیشرفت چشمگیر ابزارهای ویرایش ژنوم، تعداد بسیاری کارآزمایی بالینی مبتنی بر این روش با هدف درمان انواع بیماری‌ها در حال انجام است. **هدف:** در این مقاله به‌طور خلاصه پیشینه، مراحل پیشرفت ابزارهای ویرایش ژنوم و همچنین کاربردهای این روش نوظهور را در پزشکی بازگو کرده و چالش‌های پیش روی آن را بیان می‌کنیم.

۱ – مقدمه

جهش ژنتیکی یکی از عوامل موثر در ایجاد تکامل و سبب دستیابی انسان به توانایی‌هایی جهت برتری نسبت به سایر گونه‌ها است. با این وجود تمامی جهش‌های ژنتیکی سودمند نبوده و بسیاری از آن‌ها باعث ایجاد شرایط تهدیدکننده‌ی زندگی انسان می‌شوند. در حال حاضر ۶۰۰۰ تا ۸۰۰۰ بیماری ژنتیکی نادر، شناخته شده است (۱). به‌کارگیری ابزارهای مولکولی و دانش بیوتکنولوژی به‌منظور درک گسترده و درمان دقیق اختلالات ناشی از جهش‌های ژنتیکی، ضروری می‌باشد. به‌طور کلی ویرایش ژنوم (Genome editing) در مهندسی ژنتیک، تکنیکی است که با استفاده از روش‌های ترمیم در محل مشخصی (Site-specific) از توالی DNA، تغییرات خاصی از جمله حذف، تصحیح و یا جایگزینی را ایجاد می‌کند (۲, ۳). به‌کارگیری این شیوه در درمان بیماری‌های حاصل از جهش و همچنین ایجاد مدل‌های حیوانی، همواره هدفی مهم در زیست‌شناسی مولکولی بوده است (۴). از این‌رو کشف آنزیم‌های محدود کننده (Restriction enzymes) در سال ۱۹۷۰ میلادی که به‌طور معمول سبب مقاومت باکتری‌ها در مقابل فاژها می‌گردند، نقطه‌ی عطفی در ظهور فناوری‌های DNA نوترکیب و درنهایت سبب تحولی عظیم در اواخر دهه ۱۹۸۰ میلادی و پیدایش تکنولوژی ویرایش ژنوم شد (۷-۵).

به‌طور کلی ابزارهای ویرایش ژنوم محققین را قادر می‌سازد تا از حیوانات مدل به‌منظور درک علت بیماری‌های مختلف و شفاف‌سازی مکانسیم مولکولی آن‌ها جهت به‌کارگیری استراتژی‌های درمانی بهتر استفاده کنند. علاوه بر آن به‌کارگیری این

* نویسنده مسئول؛ تلفن: ۰۲۱-۲۳۵۶۲۷۲۰؛ فکس: ۰۲۱-۲۲۳۰۶۴۸۱

آدرس پست الکترونیک: amir.amiriyekta@royaninstitute.org

روش به‌منظور درمان دقیق و هدفمند انواع بیماری‌ها، در پزشکی نوین امیدبخش بوده و آینده‌ی روشنی را جهت معالجه‌ی اختلالات غیرقابل درمان نوید می‌دهد.

در این مقاله برآنیم که از ابتدای پیدایش ابزارهای ویرایش ژن تا پیشرفت‌ها و کاربردهای امروزه‌ی آن در بالین را به‌صورت اجمالی مرور کرده و همچنین چشم انداز و چالش‌های پیش‌روی این روش نوین را مورد بررسی قرار دهیم.

- اولین قدم‌های پیدایش تکنیک ویرایش ژنوم

توانایی درمان یک بیماری ارثی و یا سرطان‌ها در سطح ژنتیک، موضوعی است که همواره ذهن دانشمندان علم زیست شناسی را به خود مشغول کرده است. کشف راه‌های انتقال قطعات ژنتیکی از یک باکتری به باکتری دیگر به‌روش تقسیم و یا ترانسفورماسیون و همچنین انتقال DNA از فاژ به باکتری توسط مکانیسم ترانسداکشن، سبب تغییر نگرش دانشمندان به این گونه از موجودات به‌منظور به‌کارگیری آن‌ها به‌عنوان ابزار انتقال شد (۸, ۹). ایده‌ی درمان نقص ژنتیکی با انتقال DNA عملکردی به سلول، از نتایج حاصل از تحقیقات انجام شده در اوایل دهه‌ی ۱۹۶۰ میلادی که توانایی دریافت DNA خارجی به صورت دائمی و پایدار در سلول‌های جانوری و ایجاد عملکردی جدید در آن‌ها را در پی داشت، منشا گرفت (۱۰). در همین زمان مطالعات انجام شده بر روی ویروس‌ها قابلیت آن‌ها در انتقال ژن و ایجاد بیان پایدار در سلول هدف را مشخص نمود. پس از مطرح نمودن نظریه‌ی به‌کارگیری ویروس به‌منظور تغییر در سلول‌های سوماتیک (Somatic cells) و ژن درمانی، در نهایت در سال ۱۹۶۸ میلادی از ویروس موزائیک تنباکو (Tobacco mosaic virus) به‌عنوان ناقل، جهت انتقال قطعه‌ی پلی آدنیلات (Polyadenylate) به یک RNA ویروس استفاده شد (۱۳-۱۱). این نتایج سبب ترغیب دانشمندان به انجام آزمایش‌ها و تحقیقات بیشتر در این حوزه و درنهایت شروع انجام تکنیک‌های ویرایش ژن به صورت مستقیم بر روی انسان شد.

نخستین بیماران تحت درمان با تکنیک ویرایش ژنوم: به‌کارگیری تکنیک ویرایش ژنوم در بالین و ژن درمانی، سبب ایجاد امید در هزاران فرد مبتلا به بیماری‌های ژنتیکی شده است. در ابتدا جهت انتقال ترانس‌ژن (Transgene) به سلول هدف به‌منظور درمان سرطان‌ها و بیماری‌های تک‌ژنی، ناقل‌های ویروسی مورد استفاده قرار می‌گرفت (۱۴, ۱۵). اولین کارآزمایی بالینی و پیشرو در ویرایش ژنوم جهت انتقال ژن خارجی به انسان در سال ۱۹۸۸ میلادی انجام شد. این مطالعه با هدف انتقال مارکر انتخابی مقاومت به نئومایسین ((Neomycin resistance (NeoR) به وسیله‌ی حامل رتروویروس (Retrovirus) به لکوسیت‌های نفوذکننده به تومور ((Tumor infiltration leukocytes (TILs) استخراج شده از بیمار مبتلا به ملانوم (Melanoma) در شرایط *ex vivo* انجام شد. سپس کاست ژنی حاصل با هدف نشانه گذاری و ردیابی TILها و همچنین مشخص شدن اثربخشی آن‌ها در برابر تومور به بیمار منتقل شد (۱۶). بلافاصله پس از آن در سال ۱۹۹۰ میلادی اولین کارآزمایی بالینی با هدف درمان بیماری تک ژنی نقص ایمنی مختلط شدید آدنوزین دآمیناز ((Adenosine deaminase-severe combined (ADA-SCID immunodeficiency) به‌منظور انتقال ژن آدنوزین دآمیناز به لنفوسیت T فرد بیمار با استفاده از رتروویروس انجام شد. در این مطالعه در حالی‌که یکی از بیماران بهبودی نسبی را نشان داد، اما این روند در فرد دیگر نمایان نشد (۱۷, ۱۸). اگرچه مشاهدات و نتایج اولیه در تکنیک ویرایش ژنوم تا حدودی مطلوب بود، با این وجود شکست‌های بزرگی نیز به دنبال داشت.

اولین تراژدی ژن درمانی: در سال ۱۹۹۹ میلادی، بدترین سناریوی درمان با روش ژن درمانی و ویرایش ژنوم زمانی به واقعیت پیوست که جسی گلسینگر (Jesse Gelsinger) ۱۸ ساله که از کمبود نسبی آنزیم اورنیتین کاربامیلاز (Ornithine (OTC) transcarbamylase) که در کبد برای حذف نیتروژن بیش از حد اسیدهای آمینه و پروتئین‌ها مورد نیاز است رنج می‌برد، در یک کارآزمایی بالینی شرکت نمود. ناقل آدنوویروس تزریق شده به گلسینگر بلافاصله واکنش ایمنی بسیار بالایی در او ایجاد و متاسفانه چهار روز پس از آن، به دلیل نارسایی در چند عضو بدن، درگذشت (۱۹, ۲۰). مدت کوتاهی پس از این اتفاق، ژن درمانی انجام شده بر روی بیماران دارای نقص ایمنی مختلط شدید (Severe combined immunodeficiency (SCID)) سبب ابتلای پنج نفر به لوسمی (Leukemia) و فوت یکی از آن‌ها شد (۲۱, ۲۲). تحقیقات بیشتر نشان داد که درج ناقل در جایگاه پروتوانکوژن LMO2 (Protooncogene) سبب ایجاد لوسمی در این افراد شده است (۲۳). هر دوی این اتفاقات غم‌انگیز موجب ایجاد نگرانی در خصوص ایمنی انجام ژن درمانی بر روی انسان و توقف مطالعات این حوزه در بالین تا زمان دستیابی به صلاحیت لازم شد (۲۴). در همین راستا تحقیقات بر روی بهینه‌سازی ناقل‌ها و همچنین استفاده از ابزارهایی که به صورت هدفمند، تغییری را در سلول مورد نظر ایجاد می‌کنند، با هدف ارتقای ایمنی در ژن درمانی شدت گرفت.

- توسعه‌ی ابزارهای هدفمند ویرایش ژنوم

دستورزی DNA توسط دانشمندان برای اولین بار در لوله‌های آزمایش صورت گرفت. از اوسط دهه‌ی ۱۹۸۰ میلادی مطالعات دستکاری ژن‌های سلول‌های یوکاریوتی مخمر و سپس پستانداران آغاز شد. نتایج حاصل از این پژوهش‌ها نشان داد که ژنوم سلول‌های پستانداران از طریق فرایند نوترکیبی هومولوگ (Homologues recombination (HR))، توانایی ادغام با یک کپی DNA خارجی را دارا می‌باشند (۲۸-۲۵). با این وجود، بازده‌ی پایین این روش و همچنین خطر بالای درج تصادفی ژن خارجی در نواحی ناخواسته، از چالش‌ها و محدودیت‌های این روش بودند (۲۹).

به‌منظور رفع این مشکلات و جایگزین کردن روش‌هایی جهت غلبه بر محدودیت‌ها، پژوهشگران بر روی توسعه‌ی استراتژی‌های متفاوت به‌منظور دستیابی به تکنیک شکست در دو رشته (Double-strand break (DSB)) به‌صورت هدفمند متمرکز شدند (۳۰). در همین راستا، ابتدا مگانوکلئازها و یا Homing endonuclease که اندونوکلئازهایی (Endonuclease) با توانایی شناسایی ۱۴ تا ۴۰ جفت باز می‌باشند، مورد بررسی قرار گرفتند. با به‌کارگیری این آنزیم‌ها، علی‌رغم افزایش بازده‌ی درج، همچنان یافتن آنزیمی که در محل مورد نظر شکست ایجاد کند به سختی امکان پذیر بود. علاوه بر آن، برش ایجاد شده توسط این آنزیم‌ها در ژنوم سلول با استفاده از روش اتصال انتهای غیرهولوگ (Non-homologues end joining (NHEJ)) صورت می‌گیرد که همین امر نه تنها سبب می‌شود که توالی مورد انتظار در ژنوم ادغام نگردد، بلکه می‌تواند درج قطعات DNA به صورت تصادفی در محل شکست و حتی حذف (Deletion) را به‌دنبال داشته باشد (۳۱, ۳۲).

پس از آن مطالعات در حوزه‌ی توسعه‌ی تکنیک‌های ویرایش ژن با استفاده از اندونوکلئازها بر روی ایجاد شکست در دو رشته‌ی DNA با دقت بالاتر متمرکز شد. در نهایت کشف پروتئین‌های انگشت روی (Zinc finger protein (ZFP)) یوکاریوتی، عصر جدیدی را در صنعت ویرایش ژنوم آغاز نمود. این مولکول‌ها با کمک یون روی (Zinc (Zn)) توالی‌های سه جفت بازی خاصی را بر روی ژنوم شناسایی کرده، به، آن متصل می‌گردند و برخلاف مگانوکلئازها توانایی تجمع در محل شناسایی شده جهت افزایش اختصاصیت برش را دارا می‌باشند. همین امر سبب ترکیب این پروتئین با آنزیم اندونوکلئاز *FokI* و در نهایت خلق نوکلئاز انگشت روی (Zinc finger nuclease (ZFN)) شد (۳۳, ۳۴). این تکنیک به‌طور قابل توجهی موجب افزایش بازده‌ی نوترکیبی هومولوگ به‌صورت هدفمند، در موجودات مدل و همچنین انسان شد (۳۵, ۳۶). با این وجود، ایجاد جهش‌های خارج از هدف (Off-target)

یکی از نگرانی‌های به‌کارگیری این روش جهت ویرایش ژن و درمان بیماری‌ها بود (۳۷, ۳۸). در حالی که ZNF به‌عنوان ابزار مهندسی ژن معرفی و شروع دوره‌ی جدیدی در درمان و زیست فناوری را رغم زد، اما کشف افکتور شبه فعال کننده‌ی رونویسی (Transcription activator-like effector (TALE)) از باکتری زانتوموناس در سال ۲۰۰۹ میلادی که توانایی شناسایی یک نوکلئوتید خاص را دارا بود، توجه زیادی را به خود جلب کرد (۳۹, ۴۰). این کشف در عرض چند ماه، امکان ایجاد نوکلئازهای شبه فعال کننده‌ی رونویسی (Transcription activator-like effector nuclease (TALEN)) که قادر به ایجاد تغییر در هر ژنی بودند را فراهم نمود. برخلاف برتری سیستم TALEN نسبت به ZFN در افزایش نرخ اختصاصیت برش و همچنین کاهش سمیت، اندازه‌ی بزرگ این پروتئین‌ها انتقال آن‌ها به سلول مورد نظر را با چالش روبرو کرد (۴۱, ۴۲).

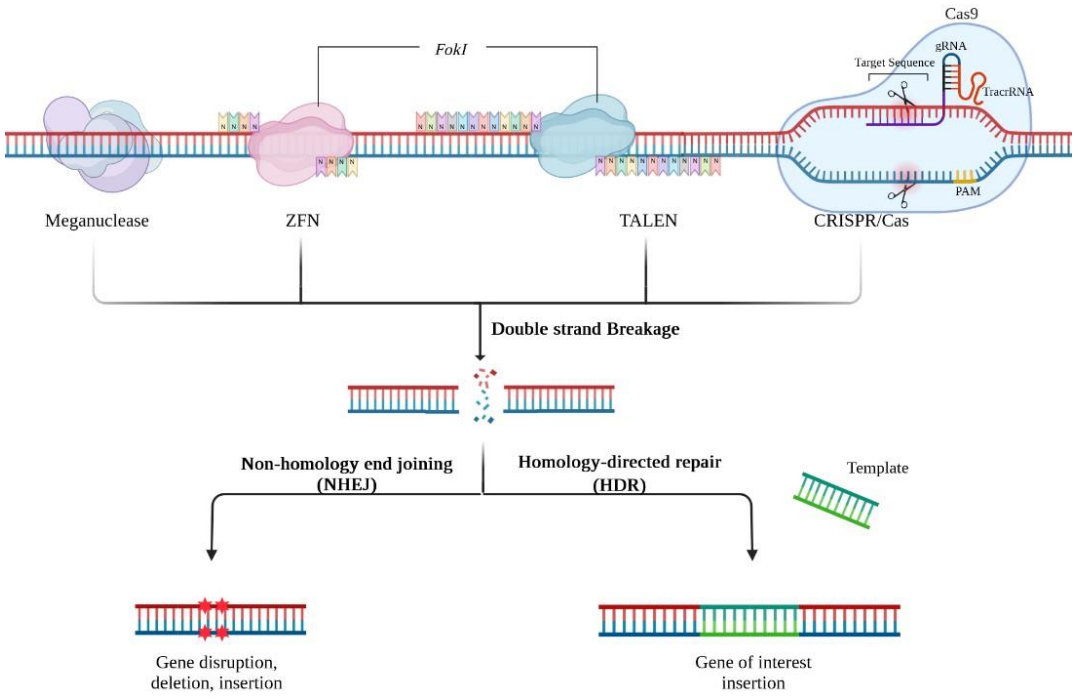
ظهور تکنولوژی CRISPR: اگرچه کشف مگانوکلئازها و به‌دنبال آن سیستم‌های ZFN و TALEN بازده‌ی ویرایش ژنوم را افزایش داد، اما همچنان هدف قراردادن مکان‌های مختلف در ژنوم، نیازمند به‌کارگیری روش‌های کارآمدتری بود. دشواری مراحل کلونینگ و مهندسی پروتئین در تکنیک‌های ZFN و TALEN تا حدودی مانع پذیرش این ابزارها توسط جامعه‌ی علمی شد (۴۳). از این رو سهولت به‌کارگیری و همچنین قدرت بالای تکنولوژی CRISPR (Clustered regularly interspaced short palindromic repeat) در ویرایش ژنوم که یک پروتئین اندونوکئاز بوده و توانایی هدف قراردادن توالی خاصی از DNA توسط یک RNA راهنمای کوتاه و برش آن را دارا می‌باشد، انقلاب عظیمی در زمینه‌ی ابزارهای ویرایش ژنوم ایجاد کرد (۴۴). در سال ۱۹۸۷ میلادی برای اولین بار تکرارهای کوتاه پالیندرومی با فاصله‌ی منظم خوشه‌ای (CRISPR) در باکتری *Escherichia coli* کشف شد، اما باتوجه به دشوار بودن مطالعه‌ی آن‌ها، منشا و اهمیت این توالی نقطه‌ای مبهم در علم زیست شناسی باقی‌ماند (۴۵). در سال ۱۹۹۵ میلادی، فرانچسکو موجیکا (Francisco Mojica) با کشف ساختارهای مشابه توالی‌های CRISPR در ژنوم آرکی *Haloferax mediterranei* سبب پیشرفت قابل توجهی در درک عملکرد بیولوژیکی توالی CRISPR شد (۴۶). در حقیقت حضور این عناصر در دو رده‌ی تکاملی متفاوت این فرضیه را مطرح نمود که این توالی‌ها شامل قطعات DNA خارجی بوده و در واقع بخشی از سیستم ایمنی باکتری‌ها و آرکی‌ها می‌باشند (۴۷). در نهایت در سال ۲۰۱۲ میلادی امانوئل شارپنتیر (Emmanuelle Charpentier) و جنیفر دودنا (Jennifer Doudna) با طراحی RNA راهنما ((Guide RNA (gRNA) برای هدف قراردادن یک منطقه‌ی خاص در توالی ژنوم توسط سیستم CRISPR و همچنین آنزیم وابسته‌ی آن ((CRISPR- (Cas9) associated 9)، درخشان‌ترین ابزار تکنولوژی دستکاری ژن را که به‌عنوان نسل سوم ابزارهای ویرایش ژنوم شناخته می‌شود، معرفی نمودند (۴۸).

سیستم CRISPR/Cas کاملا متفاوت از نسل قبلی ابزارهای ویرایش ژن یعنی ZFN و TALEN که بر پایه‌ی جفت شدن قلمرو پروتئینی و نوکلئوتیدها هستند، می‌باشد و با استفاده از این تکنیک می‌توان ادغام DNA مورد نظر در موقعیت از پیش تعیین شده در ژنوم سلول هدف را تضمین نمود (۴۹). gRNA و پروتئین Cas دو جز ضروری در سیستم CRISPR هستند. پروتئین Cas که به آن قیچی ژنتیکی نیز گفته می‌شود، یک اندونوکلئاز بوده که شامل دو بخش شناسایی ((Recognition (REC) و نوکلئاز ((Nuclease (NUC) است و DNA هدف را به‌منظور شکست در دو رشته، برش می‌دهد (۵۰). جز REC از دو قلمرو REC1 و REC2 که مسئول اتصال به gRNA هستند، تشکیل شده و بخش NUC دارای ناحیه‌های اندونوکلئازی HNH و RuvC و همچنین قلمرو تعامل با PAM (Protospacer adjust motif) که یک توالی کوتاه حفاظت شده DNA بوده و در شروع اتصال به توالی هدف نقش دارد، می‌باشد (۵۱). gRNA از دو بخش crRNA (CRISPR RNA) که ۱۸ تا ۲۰ جفت باز بوده و به صورت اختصاصی به توالی DNA هدف متصل می‌گردد و tracrRNA (Trans-activating CRISPR RNA) که با ایجاد لوپ سبب تشکیل داربست اتصال Cas9 می‌شود، تشکیل شده است. در حوزه‌ی ویرایش ژنوم می‌توان با ادغام crRNA و tracrRNA به‌منظور

هدف قرار دادن هرگونه توالی ژن، یک RNA راهنمای واحد ((Single guide RNA (sgRNA) طراحی نمود (۵۰).

مکانیسم عملکرد سیستم CRISPR/Cas9 به سه مرحله‌ی شناسایی، برش و ترمیم تقسیم‌بندی می‌شود (۵۲). sgRNA طراحی‌شده، پروتئین Cas را به سمت توالی هدف هدایت کرده، سپس این نوکلئاز سبب ایجاد شکست دو رشته‌ی DNA در ۳ نوکلئوتید بالاتر از توالی PAM می‌گردد و در نهایت DBS توسط مکانیسم‌های ترمیم سلول میزبان، بازسازی می‌شوند (۵۳).

اتصال انتهای غیر همولوگ (NHEJ) و نوترکیبی همولوگ ((Homology-direct repair (HDR) دو مکانیسم ترمیم در برش‌های ایجاد شده توسط سیستم CRISPR/Cas و همچنین ZFN و TALEN هستند (۵۴). فرایند بازسازی NHEJ در تمامی مراحل چرخه‌ی سلولی فعال بوده و طی واکنش آنزیمی با اتصال انتهای قطعات DNA غیرهمولوگ به یکدیگر، شکست ایجاد شده را ترمیم می‌کند. این مکانیسم در بیشتر سلول‌ها فعال و روش غالب در ترمیم سلولی می‌باشد، با این وجود مستعد خطا بوده و ممکن است سبب ایجاد درج و یا حذف‌های کوچک در محل برش که منجر به ایجاد جهش‌های تغییر چهارچوب (Frame shift) و یا کدون توقف زودرس شوند، گردد (۵۵). بازسازی محل برش در دو رشته‌ی DNA توسط مکانیسم HDR بسیار دقیق بوده و نیاز به یک DNA الگوی خارجی (Exogenous DNA) دارای همولوژی با توالی هدف، جهت درج در محل شکست توالی و یا جایگزینی با قطعه‌ی موجود در محل برش دارد (شکل ۱). این نوع از روش ترمیم بیشتر در اواخر مراحل S و G2 چرخه‌ی سلولی فعال است (۵۴, ۵۵).



شکل ۱: ابزارهای ویرایش ژنوم و مراحل ترمیم شکست دو رشته‌ای DNA با به‌کارگیری استراتژی‌های HDR و NHEJ. آنزیم‌های مگانوکلئاز توالی‌های ۱۴ تا ۴۰ جفت باز را به صورت اختصاصی شناسایی نموده و به تنهایی توانایی برش در DNA هدف را دارا می‌باشد. این در حالی است که سیستم‌های ZFN و TALEN به صورت جفت عمل کرده و برش توسط قلمرو *FokI* تنها زمانی اتفاق می‌افتد که دو مولکول ZFN و یا TALEN به توالی هدف متصل شوند. ساختار CRISPR/Cas به تنهایی و با راهنمایی gRNA به توالی موردنظر متصل شده و DNA را برش می‌دهد. تمامی این ابزارها سبب ایجاد شکست در دو رشته‌ی DNA می‌شوند. ترمیم برش ایجاد شده در صورت وجود توالی الگو با استفاده از روش HDR و درج قطعه در این محل انجام می‌گیرد. در غیر این صورت، بازسازی محل شکست در مسیر اتصال انتهای غیرهمولوگ قرار گرفته و می‌تواند حذف و یا درج در جایگاه مورد نظر و همچنین غیرفعال سازی ژن را در پی داشته باشد.

- راه‌های انتقال ابزارهای ویرایش ژنوم به سلول

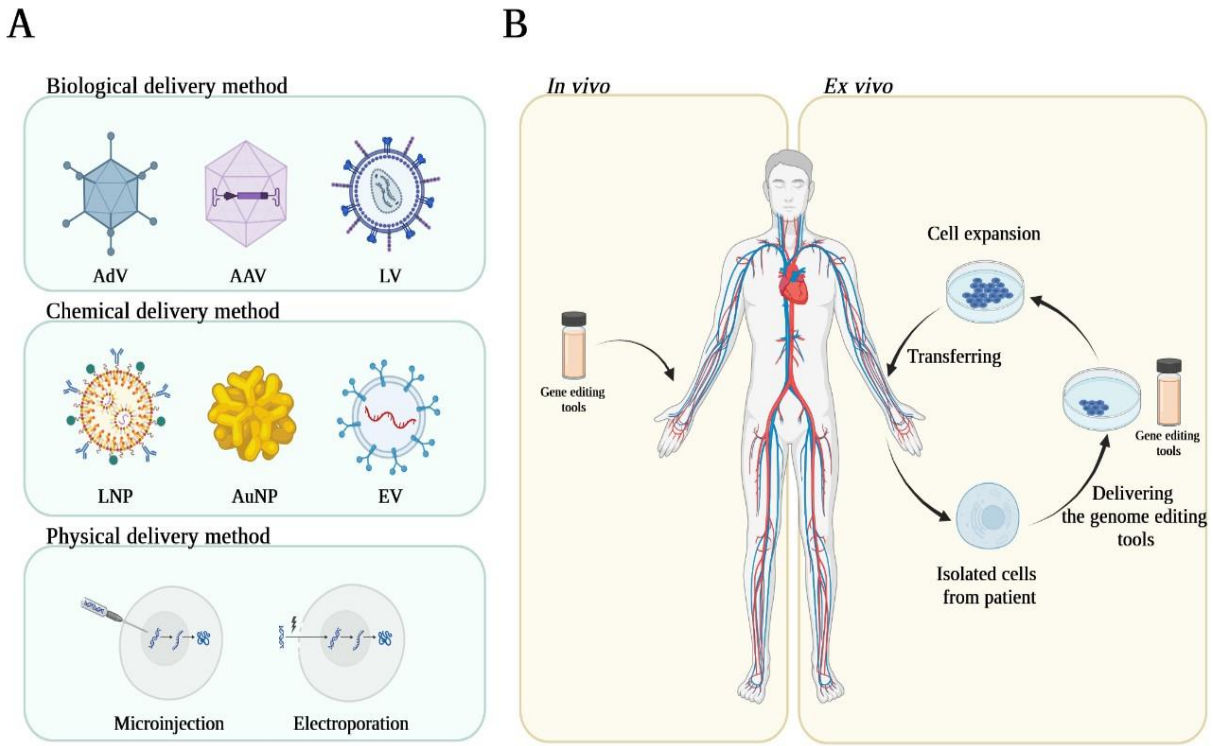
از دیدگاه بیوتکنولوژی یکی از اصلی‌ترین چالش‌ها در فناوری‌های مولکولی، انتقال موثر و آسان اجزای ویرایش ژن به سلول هدف در شرایط *in vivo* و یا *ex vivo* می‌باشد. موانع متعددی از جمله موارد فیزیکی (غشای سلولی، غشای هسته)، هضم توسط پروتئاز و یا نوکلئازهای سلول هدف و همچنین شناسایی حامل از طریق سیستم ایمنی میزبان در شرایط *in vivo*، وجود دارند. اگرچه انتقال پلاسمید حاوی ژن مورد نظر به میزبان به تنهایی، ساده‌تر و دارای بازده‌ی بیشتری می‌باشد اما مطالعات نشان می‌دهد که استفاده از سیستم حامل مناسب، پایداری مولکول DNA خارجی را در سلول هدف افزایش می‌دهد (۵۶). به‌طور کلی روش‌های انتقال ابزارهای ویرایش ژن به سلول، در سه دسته‌ی بیولوژیکی، شیمیایی و فیزیکی قرار می‌گیرند. در مجموع هر روش دارای مزایا و معایب مختص به خود می‌باشد و موفقیت در به‌کارگیری تکنیک ویرایش ژن به صورت بالینی تا حد زیادی به توسعه‌ی بیشتر روش‌های انتقال مناسب نیازمند است. در جدول ۱ تمامی راه‌های انتقال ابزارهای ویرایش ژنوم به سلول هدف با یکدیگر مقایسه شده‌اند.

انتقال بیولوژیکی (ویروسی): در این روش از موارد زیستی طبیعی مانند حامل‌های ویروسی، ذرات شبه ویروس ((VLP) Virus-like particle) و پپتیدهای نفوذ کننده به سلول ((Cell-penetrating peptides (CPPs) جهت انتقال ابزارهای ویرایش ژن به میزبان استفاده می‌شود. بطور کلی حامل‌های ویروسی به دلیل توانایی آن‌ها در آلوده کردن انواع بافت‌ها و سلول‌های انسانی و بهره‌مندی از ساختاری که سبب محافظت در مقابل تخریب توسط آنزیم‌های میزبان می‌گردد، بیشترین بازده در انتقال قطعات ژنتیکی به سلول هدف را دارا می‌باشند (۵۷). به‌منظور حفظ امنیت استفاده از ویروس‌ها در بدن انسان، ژن‌های ویروسی بسته به نوع ناقل حذف می‌شوند (۵۸). در حال حاضر آدنوویروس ((Adenovirus (AdV)، ویروس همراه آدنو ((AAV) Adeno-associated virus) و لنتی ویروس ((Lentivirus (LV) پرکاربردترین حامل‌های ویروسی می‌باشند (۵۹) (شکل ۲-A).

جدول ۱: روش‌های انتقال ابزارهای ویرایش ژنوم به سلول هدف.

ردیف	دسته‌بندی اصلی	حامل	مزایا	محدودیت‌ها
۱	انتقال بیولوژیکی (ویروسی)	ویروس همراه آدنو	ایجاد پاسخ ایمنی پایین	ظرفیت پایین در حمل
		آدنوویورس	انتقال با بازده‌ی بالا	امکان ایجاد واکنش التهابی
		لنتی‌ویروس	انتقال ژن به صورت پایدار	مستعد بازآرایی ژن
۲	انتقال شیمیایی (غیرویروسی)	نانوذرات لیپیدی	قابل اصلاح و تغییر	طراحی دشوار
		نانوذرات طلا	دستکاری ساده	سمیت
		وزیکول‌های خارج سلولی	سازگاری بالا، ایمنی‌زایی کم	بازده‌ی حمل پایین
۳	انتقال فیزیکی	میکروواینجکشن	انتقال حتمی ژن به سلول	نیاز به مهارت بالا
		الکتروپوریشن	انتقال به جمعیت سلولی	انجام تنها در شرایط آزمایشگاهی
		تغییر شکل غشا	توانایی انتقال به انواع سلول‌ها	هزینه‌بر
		انتقال هیدرودینامیک	مقرون به صرفه	امکان آسیب به بافت

انتقال شیمیایی (غیرویروسی): به‌منظور جلوگیری از خطر پاسخ ایمنی فرد بیمار علیه اجزا پروتئینی حامل ویروسی، به‌کارگیری روش‌های شیمیایی جهت تحویل ابزارهای ویرایش ژنوم به سلول هدف، یک رویکرد امیدوارکننده می‌باشد. در این تکنیک از مواد سنتز شده‌ی مصنوعی مانند پلیمرها، لیپیدها و یا فلزات برای تسهیل ورود قطعات ژنتیکی به سلول میزبان استفاده می‌شود. در این نوع از روش انتقال می‌توان به وزیکول‌های خارج سلولی ((Extracellular vesicles (EV)، نانوذرات طلا ((Gold-nanoparticle (AuNPs) و نانوذرات لیپیدی ((Lipid nanoparticles (LNPs) اشاره نمود (۵۹). در میان تمامی روش‌های غیرویروسی جهت انتقال ابزارهای ویرایش ژن به سلول هدف در شرایط *in vivo*، LNPها از محبوبیت بیشتری نسبت به سایر تکنیک‌ها برخوردارند (۶۰, ۶۱). در شکل A-۲ این نوع از حامل‌ها به صورت شماتیک نمایش داده شده‌اند.



شکل ۲: روش‌ها و مسیرهای انتقال ابزار ویرایش ژنوم به سلول هدف. A) روش‌های انتقال بیولوژیکی (ویروسی)، شیمیایی (غیر ویروسی) و فیزیکی به صورت شماتیک نمایش داده شده‌اند. حامل‌های بیولوژیکی شامل آدنوویروس (AdV)، ویروس همراه آدنو (AAV) و لنتی‌ویروس (LV) می‌باشند. انتقال غیرویروسی با به‌کارگیری نانوذرات لیپیدی (LNP)، نانوذرات طلا (AuNP) و وزیکول‌های خارج سلولی (EV) صورت می‌گیرد. در روش فیزیکی، انتقال به‌صورت میکرواینجکشن و الکتروپوریشن نمایش داده شده است. B) شرایط *in vivo* و *ex vivo* دو مسیر انتقال ابزارهای تصحیح ژن به سلول مورد نظر می‌باشند. در مسیر *ex vivo* سلول مورد نظر از فرد بیمار دریافت شده و پس از انتقال عناصر ویرایش ژن و سپس تکثیر آن‌ها به بدن فرد منتقل می‌گردند. طی شرایط *in vivo*، ابزارهای تصحیح ژنوم به‌طور مستقیم به سلول هدف منتقل می‌گردند.

انتقال فیزیکی: تکنیک‌های فیزیکی به‌منظور انتقال ژن‌ها به سلول مورد نظر بر انرژی الکتریسیته و یا مکانیکی متکی هستند. این دسته از حامل‌ها شامل الکتروپوریشن، میکروواینجکشن، تغییر شکل غشا (Membrane deformation) و انتقال هیدرودینامیک (Hydrodynamic delivery (HD)) که در سال ۱۹۹۹ میلادی جهت انتقال DNA برهنه (Naked DNA) از طریق روش *in vivo* توسعه یافت، می‌باشد (۵۹، ۶۲، ۶۳). الکتروپوریشن تکنیکی فیزیکی، ساده و ارزان بوده که عمدتا در شرایط آزمایشگاهی جهت انتقال عناصر CRISPR/Cas به سلول هدف مورد استفاده قرار گرفته و به‌کارگیری آن در شرایط *in vivo* جهت انتخاب پارامترهای مناسب، به‌منظور جلوگیری از آسیب رساندن به بدن انسان یک چالش بزرگ بوده و به‌صورت محدود گزارش شده است (۶۶-۶۴). در این نوع از انتقال صرف نظر از نوع سلول و ترکیب بافر مورد استفاده در حین الکتروپوریشن، غلظت‌های متفاوت DNA نیز می‌تواند مستقیما بر نتیجه‌ی این تکنیک تاثیر گذاشته و همچنان به تحقیقات بیشتری در این حوزه نیاز است (۶۶). به‌کارگیری روش میکروواینجکشن در انتقال ابزارهای ویرایش ژنوم دشوار بوده و به مهارت بالایی جهت تزریق نیاز دارد (۶۷، ۶۸). در شکل ۲-A به این دو روش اشاره شده است. علاوه بر این تکنیک تغییر شکل غشا نیز در حال حاضر یک روش آزمایشگاهی بوده که در طی آن به‌صورت مکانیکی به‌طور موقت در غشا منافذی ایجاد شده و سبب انتشار غیرفعال ماکرومولکوها به سلول هدف می‌شود. این فناوری راندمان بالایی داشته و می‌توان از آن برای انتقال سیستم CRISPR/Cas به انواع سلول‌های تومور استفاده نمود (۶۹، ۷۰).

- ویرایش ژنوم و درمان بیماری‌های انسانی

امروزه به‌کارگیری بالینی ابزارهای ویرایش ژنوم جهت تصحیح اشتباهات ژنتیکی که سبب بروز فنوتیپ‌های خاصی می‌گردند، به یک خواست طبیعی تبدیل شده است. در چند دهه‌ی گذشته، ویرایش توالی DNA با استفاده از ابزارهای مولکولی منجر به افزایش تعداد مطالعات تجربی در این حوزه شده است. بخش چالش برانگیز و غیرقابل پیش‌بینی این نوع از پژوهش، دستکاری ژنتیکی ژنوم انسان بوده که به‌منظور درک بهتر و تعیین توانایی‌های فناوری ویرایش ژنوم در درمان بیماری‌ها و همچنین تکنولوژی داروهای مبتنی بر ویرایش ژنوم، نیازمند پیشرفت راهکارهای موجود و انجام کارآزمایی‌هایی بر روی انسان می‌باشد.

در مجموع سیستم‌های ویرایش ژن به‌منظور درمان بیماری‌ها به دو گروه *in vivo* و *ex vivo* تقسیم‌بندی می‌شوند (شکل ۲-B). در درمان به صورت *in vivo* سیستم ویرایش ژنوم به‌طور مستقیم به سلول و یا اندام مورد نظر بیمار انتقال پیدا کرده تا جهش و یا علت بیماری در بدن فرد تصحیح گردد. در حال حاضر کاربرد اصلی این روش عمدتا در درمان اختلالات تک ژنی (Monogenic) می‌باشد (۷۱). در شرایط *ex vivo* سلول هدف، از بیمار جدا شده و پس از ویرایش ژن در شرایط آزمایشگاهی، دوباره به فرد منتقل می‌گردد. این روش از فناوری ویرایش ژنوم در درمان بیماری‌های ارثی (Hereditary disease) مانند کم‌خونی داسی شکل (Sickle cell anemia) و بتاتالاسمی (β-thalassemia)، ایمونوتراپی سرطان‌ها (Cancer) و همچنین مهار عفونت‌های ویروسی از اهمیت بالایی در بالین برخوردار است (۷۵-۷۲). در جدول ۲ به‌صورت گزیده کارآزمایی‌های بالینی که در آن از تکنولوژی ویرایش ژنوم استفاده می‌شود، ذکر شده‌اند.

قابل ذکر است که تمام درمان‌های مبتنی بر ویرایش ژنومی که امروزه در حال توسعه هستند با هدف درمان بیماران از طریق اصلاح سلول‌های سوماتیک انجام می‌گیرند و این درمان‌ها به گونه‌ای طراحی شده‌اند که تنها بر روی فرد دریافت‌کننده‌ی دارو تاثیر می‌گذارند. با این وجود، این تکنیک پتانسیل اصلاح جهش‌های ژنتیکی ایجادکننده‌ی بیماری‌ها را در سلول‌های جنسی نیز دارا بوده و می‌تواند سبب تغییرات ژنتیکی و انتقال آن به نسل بعد شود (۷۶).

درمان بیماری‌های عفونی: ویرایش ژنوم به‌طور بالقوه می‌تواند با حذف توالی قطعات DNA ویروسی درج شده در ژنوم میزبان و یا اصلاح گیرنده‌هایی که برای آلوده شدن سلول ضروری می‌باشند در درمان بسیاری از بیماری‌های ویروسی مورد استفاده قرار گیرد. این فناوری به روش‌های *in vivo* و *ex vivo* جهت درمان بیماری ویروس نقص ایمنی انسانی (Human (HIV) immunodeficiency virus) به کار گرفته شده است (۷۷, ۷۸). نتایج حاصل از این مطالعه نشان داده که استراتژی غیرفعال کردن ژن *CCR5* در سلول‌هایی که گیرنده‌ی کموکاین ۵ (Chemokine receptor 5) را کد می‌کنند، از ادغام ویروس HIV در ژنوم میزبان جلوگیری کرده و سبب از بین رفتن آن می‌شود (۷۸, ۷۹).

بیان پایدار انکوژن‌های E6 و E7 ویروس پاپیلومای انسانی (Human papilloma virus (HPV)) نقش مستقیمی در سرطان دهانه‌ی رحم دارد (۸۰). ایجاد جهش هدفمند در این ژن‌های پرخطر HPV توسط ابزارهای ویرایش ژنوم می‌تواند به‌عنوان یک نوع از درمان مطرح شود (۸۱).

ویروس هپاتیت B (Hepatitis B virus (HBV)) مهم‌ترین پاتوژن بیماری‌های کبدی است. به‌منظور بررسی تکنیک ویرایش ژنوم در درمان این بیماری، یک gRNA که جایگاه ژنومی HBV را مورد هدف قرار می‌دهد، طراحی و به وسیله‌ی لنتی‌ویروس به سلول آلوده شده به این ویروس منتقل شد. در نهایت مهار بیان و تکثیر ژن‌های HBV در سلول هدف تایید شد (۸۲, ۸۳).

به‌طور کلی فناوری ویرایش ژنوم علاوه بر اینکه امکان درک عمیق‌تری از مکانیسم بیماری‌های عفونی ویروسی را فراهم نموده، در درمان این گونه از بیماری‌ها پتانسیل بالایی نشان داده است.

درمان تومورهای بدخیم: تکنیک ویرایش ژنوم به‌طور گسترده جهت درمان تومورهای بدخیم نیز در حال توسعه و بررسی می‌باشد. نمونه‌ای از آزمایش موفق در درمان تومورهای بدخیم، به‌کارگیری سلول‌های CAR-T بهینه‌شده که قادر به شناسایی و مبارزه‌ی موثر با سلول‌های سرطانی هستند، می‌باشد. تغییرات در ژن‌های کد کننده‌ی گیرنده‌ی سلول T و همچنین حذف HLA-1 می‌تواند سبب ایجاد سلول‌های CAR-T عمومی برای درمان انواع مختلف تومورها شود (۸۴).

درمان بیماری‌های ارثی اتوزوم غالب: ایجاد تغییراتی در ژن‌های بیماری‌زا و کسب و یا از دست دادن عمل‌کرد (Gain or loss of function) می‌تواند در درمان بیماری‌های ارثی مثمر ثمر واقع گردد. در بیماری‌های اتوزوم غالب (Autosomal dominant) مانند آکوندروپلازی (Achondroplasia)، هنگامی‌که واریانت پاتوژن منجر به دستیابی عملکرد بیماری‌زا می‌شود، ایجاد شکست در دو رشته‌ی آلل جهش‌یافته برای تغییر چهارچوب پروتئین مخرب که سبب درج و یا حذف به صورت NHEJ می‌شود، کارساز خواهد بود و بر فنوتیپ فرد تاثیر نخواهد گذاشت. این نوع از بیماری‌ها را می‌توان از طریق نوترکیبی همولوگ جهت درج ژن صحیح نیز درمان نمود (۸۵).

درمان بیماری‌های ارثی که در اثر تکرارهای کوتاه پشت سر هم (Short tandem repeat (STR)) ایجاد می‌شوند، ایجاد برش در دو طرف آلل‌های بیماری‌زا و حذف ژن، موثر واقع می‌شود. علاوه بر آن در بیماری‌هایی مانند هانتینگتون (Huntington) که سنتز پروتئین مخرب توسط ژن جهش‌یافته انجام می‌شود، به‌کارگیری استراتژی NHEJ می‌تواند کارساز باشد (۸۶).

درمان بیماری‌های اتوزوم و وابسته به X مغلوب: با توجه به اینکه در بیماری‌های مغلوب، عملکرد پروتئین از بین رفته و هر دو آلل دارای اثرات بیماری‌زا هستند، با وضعیت پیچیده‌تری برای درمان این نوع از اختلالات مواجه هستیم. به همین منظور به‌کارگیری روش اتصال انتهای غیرهمولوگ موثر نبوده و جهت درمان این نوع از بیماری‌ها، همراه بودن یک قطعه‌ی DNA با سیستم اندونوکلئاز به‌منظور نوترکیبی هومولوگ ضروری می‌باشد (۸۷). علاوه بر این در برخی از بیماری‌ها مانند دیستروفی عضلانی دوشن ((Duchene muscular dystrophy (DMD) تخریب و یا حذف اگزون می‌تواند تا حد قابل قبولی عمل‌کرد پروتئین هدف را بازیابی کند (۸۸).

تحقیقات انجام شده در سال‌های اخیر پتانسیل ویرایش ژنوم در پیشگیری و درمان بیماری‌های پیچیده مانند آلزایمر را نیز نشان می‌دهد (۸۹). علاوه بر آن مطالعات بر روی حیوانات مدل نتایج امیدوار کننده‌ای را برای به‌کارگیری ابزارهای ویرایش ژنوم در درمان بیماری‌های مختلف انسانی مانند نقص ایمنی مختلط شدید (SCID)، بیماری‌های چشمی، سیستیک فیبروزیس (Cystic fibrosis) و بسیاری دیگر از اختلالات ژنتیکی در بر داشته است (۹۲-۹۰).

جدول ۲: گزیده‌ای از کارآزمایی‌های بالینی در دست انجام با استفاده از تکنیک ویرایش ژنوم (۹۳).

ردیف	نام بیماری	ژن هدف	فاز	ابزار ویرایش	نوع ویرایش	روش انتقال	سال شروع	کد کارآزمایی
				بیماری‌های باکتریایی				
۱	عفونت اشریشیا کولای	فاش نشده	I	CRISPR /Cas	خاموش‌سازی ژن (Knock-out)	*In vivo* با استفاده از باکتریوفاژ	2022	NCT05277350
۲	عفونت‌های دستگاه ادراری ((UTI) Urinary tract (infections	ژنوم *E. coli*	I	CRISPR /Cas3	-	*In vivo* با استفاده از باکتریوفاژ	2019	NCT04191148
				بیماری‌های خونی				
۳	بتا تالاسمی ((BT) (β-thalassemia	BCL11A	II/III	CRISPR /Cas9	غیرفعال‌سازی ژن	*Ex vivo* با استفاده از روش الکتروپوریشن	2018	NCT03655678
		HBB	I	CRISPR /Cas9	تصحیح ژن	*Ex vivo*	2020	NCT03728322
		HBB	I/II	CRISPR /Cas9	-	*Ex vivo* با استفاده از روش الکتروپوریشن	2021	NCT04205435
		پروموتر ژن HBG1/2	I/II	CRISPR /Cas12a	تقویت ژن	*Ex vivo* با استفاده از روش الکتروپوریشن	2022	NCT05444894
۴	هموفیلی B	NFIX	I	ZFN	درج ژن	*In vivo* با استفاده از AAV	2018	2017-004805-42
۵	HIV	CCR5	I	ZFN	خاموش‌سازی ژن	*Ex vivo* با استفاده از روش الکتروپوریشن	2015	NCT02388594
		فاش نشده	I	CRISPR	غیرفعال‌سازی	*In vivo* با	2023	NCT0514

				/Cas9			3307
		ژن	خاموش‌سازی	ZFN	I/II	CCR5	NCT0125 2641 2010 با In vivo استفاده از AdV
		ژن	خاموش‌سازی	ZFN	I/II	CCR5	NCT0366 6871 2019 با *Ex vivo* استفاده از AdV
	کم‌خونی داسی‌شکل (Sickle cell (SCD)) (disease	۶	تقویت ژن	Base editing	I/II	پروموتر ژن گاما گلوبین	NCT0545 6880 2022 با *Ex vivo* استفاده از روش الکتروپوریشن
			غیرفعال‌سازی ژن	CRISPR /Cas9	II/I II	BCL11 A	NCT0374 5287 2018 با *Ex vivo* استفاده از روش الکتروپوریشن
			غیرفعال‌سازی ژن	CRISPR /Cas9	III	BCL11 A	NCT0532 9649 2022 با *Ex vivo* استفاده از روش الکتروپوریشن
بیماری‌های چشمی							
	التهاب مقوم در برابر ویروس هرپس سیمپلکس (Herpes simplex virus refractory keratitis)	۷	غیرفعال‌سازی ژن	CRISPR /Cas9	به اتمام رسیده	UL8/UL 29	NCT0456 0790 2020 *In vivo*
	نابینایی مادرزادی لبر (Leber)	۸	تصحیح ژن	CRISPR /Cas9	I/II	CEP290	NCT0387 2479 2019 با *In vivo* استفاده از AAV
اختلالات متابولیکی							
	موکوپلی‌ساکاریدوز نوع II (MPSII) (Mucopolysaccharidosis II)	۹	درج ژن	ZFN	I/II	IDS	2018-000192-33 2018 با *In vivo* استفاده از AAV
	موکوپلی‌ساکاریدوز نوع I (MPSI) (Mucopolysaccharidosis I)	۱۰	درج ژن	ZFN	I/II	IDUA	NCT0270 2115 2017 با *In vivo* استفاده از AAV
	دیابت نوع I	۱۱	شکست و درج ژن	CRISPR /Cas9	I	-	NCT0521 0530 2022 *Ex vivo*
			شکست و درج ژن	CRISPR /Cas9	I/II	-	NCT0556 5248 2023 *Ex vivo*
سرطان‌ها							
	لوسمی میلوئید حاد (Acute (AML)) (Myeloid leukemia	۱۲	خاموش‌سازی ژن	TALEN	I	CD123، IL3RA و TCR	2018-001018-14 2019 با *Ex vivo* استفاده از روش الکتروپوریشنو LV
			خاموش‌سازی ژن	CRISPR /Cas9	I/II	CD33	NCT0484 9910 2021 *Ex vivo* اما حامل فاش نشده

		CD33	I/II	CRISPR /Cas9	خاموش‌سازی ژن	*Ex vivo* اما حامل فاش نشده	2022	NCT0530 9733
۱۳	کارسینوما هپاتوسلولار پیشرفته ((HCC) Advanced hepatocellular (carcinoma	PDCD1	I	CRISPR /Cas9	خاموش‌سازی ژن	*Ex vivo* با استفاده از روش الکتروپوریشن	2019	NCT0441 7764
۱۴	لوسمی سلول B	anti-CD19/CD20 CAR و یا anti-CD19/CD22 CAR	I/II	CRISPR /Cas9	خاموش‌سازی و درج هدفمند (knock-in) ژن	*Ex vivo* با استفاده از روش ویروسی	2018	NCT0339 8967
۱۵	کارسینوم سلول‌های کلیوی ((RCC) Renal (cell carcinoma	TRAC، anti-CD70 CAR و CD52	I	TALEN	خاموش‌سازی و درج هدفمند ژن	*Ex vivo* با استفاده از روش الکتروپوریشن و LV	2021	NCT0469 6731
۱۶	سرطان پروستات	PD-1	I/II	CRISPR /Cas9	خاموش‌سازی ژن	*Ex vivo*	2018	NCT0352 5652
		PD-1	I	CRISPR /Cas9	خاموش‌سازی ژن	*Ex vivo* با استفاده از روش الکتروپوریشن	2021	NCT0476 8608
۱۷	سرطان مثانه‌ی مهاجم مرحله‌ی IV Invasive (IBC)) (bladder cancer	PDCD1	I	CRISPR /Cas9	خاموش‌سازی ژن	*Ex vivo*	2016	NCT0286 3913
۱۸	سرطان مجاری صفراوی ((BTC) (Biliary tract cancer	TGFβR	I	CRISPR /Cas9	خاموش‌سازی ژن	*Ex vivo*	2022	NCT0497 6218

- ویرایش ژنوم سلول‌های جنسی

ویرایش ژنوم سلول‌های جنسی انسان می‌تواند سبب تغییرات ژنتیکی با قابلیت به ارث رسیدن از طریق تخمک و یا اسپرم شود (۹۴). در حال حاضر این نوع از تصحیح ژنتیکی در حیوانات، گیاهان و همچنین جنین انسانی با اهداف تحقیقاتی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۷۶).

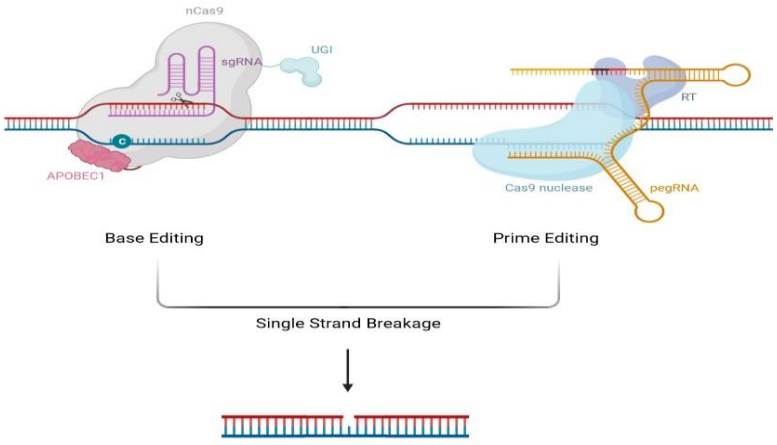
در مجموع ویرایش ژنوم سلول‌های جنسی انسان با موانع زیادی در تئوری و همچنین در مراحل عملی و آزمایشگاهی مواجه بوده و علاوه بر آن موارد اخلاقی نیز تا به امروز مانع انجام آن شده است. علی‌رغم پتانسیل این روش درمانی در جلوگیری از اختلالات وخیم و خطرناک ارثی، نگرانی‌ها در خصوص ایمنی به‌کارگیری آن و همچنین غیرممکن بودن انجام این نوع از درمان به صورت رضایتمندانه و با آگاهی برای فرد دریافت کننده این دارو، انجام آن را با مشکلات مهمی روبرو نموده است. به‌طور جدی‌تر، در صورت بروز جهش‌های ژنتیکی ناخواسته در سلول جنسی و ایجاد بیماری‌های جدید، درمان را با مشکلات پیچیده‌تر همراه خواهد نمود (۹۵, ۹۶). به همین منظور هرگونه ویرایش ژنوم در سلول‌های جنسی در بالین ممنوع و غیرقانونی بوده و هرگونه تحقیقات در این حوزه می‌بایست طبق قوانین ملی هر کشور و تحت مقررات دقیق انجام گیرد (۹۷).

- ***نسل آینده‌ی ابزارهای ویرایش ژنوم***

تقریبا یک دهه از زمانی که Cas9 به‌عنوان ابزار کارآمد برای ویرایش ژنوم معرفی شد، می‌گذرد (۹۸). تا به امروز انواع مختلفی از ابزارهای تصحیح ژن گسترش یافته‌اند که برخی از آن‌ها بدون تکیه بر مسیرهای ترمیم و برش در دو رشته‌ی DNA عمل می‌کنند. از این رو می‌توانند به‌عنوان سیستم‌های قدرتمندی جهت درمان بیماری‌های ژنتیکی پیچیده معرفی گردند. با این حال، برای انتقال این ابزارها به سلول هدف نیاز به حامل‌های بزرگتری می‌باشد. به‌همین منظور به‌کارگیری این تکنیک‌ها در بالین نیازمند بهینه‌سازی و توسعه است (۵۹). ویرایشگرهای Base، Prime (شکل ۳) و اپی‌ژنوم (Epigenome) نسل جدیدی از ابزارهای اصلاح ژن هستند که در حال حاضر در مراحل اولیه آزمایش قراردارند.

ویرایشگر Base: ویرایشگر Base ((Base editor (BE)) یک ابزار جدید در حوزه‌ی اصلاح ژن و مبتنی بر CRISPR/Cas9 بوده که قادر به تغییر دقیق توالی DNA در یک مکان خاص، بدون القای DSB که موجب برتری آن نسبت به سیستم CRISPR/Cas9 شده است، می‌باشد. همین امر سبب شده تا خطرات حذف، وارونگی (Inversion) و یا جایجایی (Translocation) در قطعات DNA به حداقل رسیده و تصحیح ژن هدف بدون ایجاد اختلالی انجام گیرد (۱۰۳-۹۹). نکته‌ی شگفت انگیز در خصوص این تکنیک، توانایی آن در اصلاح حدود ۶۰ درصد از جهش‌های نقطه‌ای (Point mutation) بیماری‌زا می‌باشد (۱۰۴). به‌طور کلی BE یک ابزار درمانی جدید بوده که قادر به تصحیح دقیق و ایمن جهش‌های ژنتیکی، ژن‌های بیماری‌زا و یا مناطق تنظیم کننده است. این استراتژی می‌تواند بدون ایجاد شکست در دو رشته‌ی DNA، به‌طور همزمان چندین ناحیه از ژنوم را بدون حذف و یا جابجایی مورد هدف قرار دهد (۱۰۵).

ویرایشگر Prime: ویرایشگر Prime ((Prime editor (PE)) جدیدترین ابزار اصلاح ژن که به‌عنوان فناوری جستجو و جایگزینی (Search and replace) نیز توصیف می‌شود، دارای سیستمی مشابه CRISPR/Cas اما بدون ایجاد شکست در دو رشته‌ی DNA بوده که دامنه‌ی توانایی این تکنیک را جهت درمان بیماری‌های تک ژنی ارتقا داده است. این مولکول شامل یک gRNA طولانی‌تر از حد معمول به نام pegRNA (Prime editing gRNA) و یک پروتئین تشکیل شده از Cas9 H840A nickase و RT (Reverse transcriptase) نوترکیب می‌باشد (۱۰۶). PE قادر به درج، حذف و جابجایی‌های هدفمند بدون نیاز به قطعه‌ی الگو و ایجاد شکست در دو رشته‌ی DNA است (۱۰۷).



شکل ۳: فناوری‌های BE و PE. ویرایشگر Prime و Base نسل جدیدی از ابزارهای ویرایش ژنوم هستند که برخلاف CRISPR/Cas سبب ایجاد برش در یک رشته‌ی DNA می‌شوند. همین امر موجب افزایش دقت و ایمنی این تکنیک‌ها جهت به‌کارگیری آن‌ها در درمان انواع بیماری‌ها گشته است.

ویرایشگر اپی‌ژنوم: در کنار ویرایش مستقیم توالی ژنتیکی، اصلاح علامت‌های اپی‌ژنتیک در محلی خاص با تغییر متیلاسیون DNA و یا ویرایش هیستون و حلقه‌های کروماتینی که سبب تغییر بیان ژن مورد نظر می‌گردند، از اهمیت بالایی برخوردار است (۱۰۸, ۱۰۹). این نوع ویرایشگر با ترکیب کردن dCas9 (Dead Cas9) و اصلاح‌کننده‌های اپی‌ژنتیک (Epigenetic modifiers) و یا تنظیم کننده‌های رونویسی مانند فعال‌کننده‌ها و سرکوب‌گرها به دست می‌آید (۱۱۲-۱۱۰). اطمینان حاصل کردن از انتقال تغییرات اپی‌ژنتیکی از سلول مادر به دختر یک امر ضروری در به‌کارگیری این روش بوده و نیاز به تحقیقات بیشتر دارد (۱۱۳, ۱۱۴).

چالش‌های پیش روی تکنیک ویرایش ژنوم

هدف نهایی هر دارویی، درمان بیماری با ایمنی، بازده و پایداری بالا می‌باشد. پیشرفت در فناوری‌های ویرایش ژن، پایه و اساس نسل بعدی درمان طیف گسترده‌ای از بیماری‌های ژنتیکی و غیرژنتیکی است. علی‌رغم مزایای فراوان این تکنیک، برخی چالش‌ها مانند دقت، اثربخشی، ایمنی و روش‌های انتقال این ابزار درمانی نیاز به بهبود و توسعه دارند. رفع این مشکلات نیازمند دانش عمیق ماهیت مولکولی بیماری‌ها و همچنین طراحی دقیق ابزارهای ویرایش ژنوم در مطالعات پیش از بالین است.

توسعه‌ی روش‌های انتقال: بسیاری از بیماری‌های ژنتیکی نیازمند درمان در بدن فرد می‌باشند و روش درمانی *ex vivo* برای آن‌ها امکان پذیر نمی‌باشد. انتقال ابزار CRISPR که مولکولی بزرگ و چند جزئی است، در شرایط *in vivo* یک چالش بزرگ بوده و پتانسیل درمانی آن را محدود نموده است. در روش درمانی *in vivo*، عناصر دارو باید پس از عبور محیط‌های مختلف همچنان پایداری خود را حفظ نموده و به سلول هدف وارد شوند. انتقال اجزای ویرایش ژنوم با استفاده از لنتی‌ویروس‌ها به بدن فرد بیمار امکان پذیر است، اما با توجه به پتانسیل ایجاد جهش و همچنین بازده‌ی پایین آن، به صورت محدود مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۱۵). به‌طور عمده وکتورهای AAV که در مناطق ایمن ژنوم درج می‌شوند، جهت انتقال اجزای ویرایش ژن به سلول هدف به کار می‌روند (۱۱۶). با این وجود این ویروس‌ها تنها توانایی انتقال عناصر کوچک را دارا بوده و محدودیت ظرفیت آن‌ها در حمل ابزارهای ویرایش ژنوم یک عامل بازدارنده در به‌کارگیری آن‌ها می‌باشد. یکی از دلایل عمده‌ی ظهور روش‌های انتقال غیر ویروسی، جلوگیری از ایجاد پاسخ‌های ایمنی در بدن فرد دریافت کننده‌ی دارو است. VLPها ابزارهای انتقال مناسبی جهت حمل اجزای CRISPR می‌باشند، اما مطالعه بر روی آن‌ها در مراحل ابتدایی بوده و همچنان نیاز به انجام آزمایش‌های بیشتری جهت استفاده در بالین دارند (۱۱۹-۱۱۷).

در مجموع، رویکردهای مختلف مانند تغییر کپسید AAVها، توسعه‌ی VLPها و همچنین مهندسی مولکول‌های اجزای CRISPR مواردی هستند که باید در بهبود کارایی و ایمنی ناقل‌ها مورد بررسی قرارگیرند تا پتانسیل کامل این روش درمانی نمایان شده و به‌کارگیری آن در پزشکی به حداقل سمیت و بازده‌ی بالا دست پیدا کند (۱۱۵).

افزایش اختصاصیت جایگاه برش: از آنجایی که فناوری CRISPR مبتنی بر اتصال توالی‌های مکمل بوده، خطر اتصال غیراختصاصی sgRNA (Small guide RNA) در مکان‌هایی غیر از ژن هدف وجود دارد. مطالعات مختلف نشان از اثرات مخرب جهش‌های خارج از هدف Cas9 بر بیماران مانند ایجاد جهش در انکوژن‌ها، جابجایی کروموزومی، حذف و درج‌هایی که سبب پیچیده‌تر شدن بیماری‌ها شده‌اند، می‌دهند (۱۲۲-۱۲۰). شناسایی و به حداقل رساندن این اثرات مخرب به‌منظور افزایش ارزش و امنیت به‌کارگیری این فناوری در پزشکی ضروری می‌باشد (۱۲۰). به‌کارگیری آنزیم‌های بهینه شده‌ی SpCas9-HF1 و eSpCas9 به‌طور چشم‌گیری جهش‌های خارج از هدف را کاهش داده است، اما همچنان اثرات این تغییرات در درون بدن حل نشده باقی‌مانده و به توسعه و مطالعات بیشتری نیازمند است (۱۲۳).

مسائل اخلاقی: بزرگترین نگرانی مربوط به پیشرفت‌های قابل توجه در حوزه‌ی فناوری ویرایش ژنوم، پیامدهای آن بر روی جنین انسان می‌باشد. به‌طوری که حتی در سال ۲۰۱۵ میلادی پیشنهاد متوقف ساختن این دسته از آزمایش‌ها پیشنهاد شد. استدلال-های علمی در خصوص مزایای چنین تحقیقاتی با عدم پیش‌بینی پیامدها همراه بوده و فقدان قانون و مقررات دقیقی به‌منظور قرار دادن این تکنولوژی در چهارچوب ضوابط مشخص، سبب ایجاد ترس ظهور سلاح‌های زیستی با ترکیب انسان و جهش‌های ژنتیکی موثر شده است (۱۲۴). میزان مجاز استفاده از تکنیک CRISPR و ویرایش ژنوم در مراحل پژوهش و پیش از بالین، حد قابل قبول به‌کارگیری این تکنیک در پزشکی، گستره‌ی استفاده از این فناوری در موارد غیر از بالین و میزان دسترسی افراد به این تکنولوژی چهار عنوانی است که تمامی نگرانی‌ها و مشکلات اخلاقی به‌کارگیری این روش درمانی را در خود جای می‌دهد (۱۲۵). بنابراین امروزه نیاز مبرم به هماهنگی، نظارت و ایجاد دستورالعمل‌های مرتبط با ویرایش ژنوم در پزشکی مولکولی و همچنین صنایع غیربالینی مانند محصولات کشاورزی و غذایی وجود دارد (۱۲۶).

۲- نتیجه‌گیری

تا به امروز ویرایش ژنوم یکی از پیچیده‌ترین تکنیک‌های درمانی توسعه یافته بوده که می‌تواند شرایط پایدار و مناسبی را برای بیماری‌های ویرانگر و گاهی غیرقابل درمان انسانی فراهم کند (۱۲۷). با این‌حال، همچنان درمان بسیاری از بیماری‌ها برآورده نشده و همین امر دانشمندان را به سمت توسعه‌ی ابزارهای جدید جهت تصحیح ژن و به‌کارگیری استراتژی‌های درمانی نوین سوق می‌دهد. استفاده از تکنیک CRISPR برای هدف قرار دادن دقیق محرک‌های برخی از بیماری‌ها، مستلزم درک بهتر مناطق غیرکد کننده‌ی DNA، حالت‌های اپی‌ژنتیک و همچنین تاثیرات آن‌ها بر بروز بیماری می‌باشد (۱۱۵). اگرچه مسائل مربوط به اثربخشی و ایمنی این روش همچنان یک نگرانی و چالش بزرگ به حساب می‌آید، اما نمی‌توان منکر توانایی آن در درمان بسیاری از بیماری‌ها شد. تحقیقات همچنان در زمینه‌ی ویرایش ژنوم ادامه داشته و انتظار می‌رود در این حوزه پیشرفت‌های چشمگیری حاصل گردد. با توجه به این‌که فناوری ویرایش ژنوم با سرعت در حال تکامل است، دور از ذهن نیست که در آینده‌ای نه چندان دور این تکنیک به یکی از روش‌های رایج ژن درمانی تبدیل گردد.

۳- منابع

1. Dawkins HJ, Draghia-Akli R, Lasko P, Lau LP, Jonker AH, Cutillo CM, et al. Progress in rare diseases research 2010–2016: an IRDiRC perspective. Clinical and translational science. 2018;11(1):11.
2. Khalil AM. The genome editing revolution. Journal of genetic engineering and biotechnology. 2020;18(1):1-16.

3. Humbert O, Davis L, Maizels N. Targeted gene therapies: tools, applications, optimization. Critical reviews in biochemistry and molecular biology. 2012;47(3):264-81.
4. Petraitytė G, Preikšaitienė E, Mikštienė V. Genome editing in medicine: tools and challenges. Acta medica Lituanica. 2021;28(2):266-80.
5. Smith HO, Welcox K. A restriction enzyme from Hemophilus influenzae: I. Purification and general properties. Journal of molecular biology. 1970;51(2):379-91.
6. Kelly Jr TJ, Smith HO. A restriction enzyme from Hemophilus influenzae: II. Base sequence of the recognition site. Journal of molecular biology. 1970;51(2):393-409.
7. Danna K, Nathans D. Specific cleavage of simian virus 40 DNA by restriction endonuclease of Hemophilus influenzae. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1971;68(12):2913-7.
8. Tatum E, Lederberg J. Gene recombination in the bacterium Escherichia coli. Journal of bacteriology. 1947;53(6):673-84.
9. Zinder ND, Lederberg J. Genetic exchange in Salmonella. Journal of bacteriology. 1952;64(5):679-99.
10. Szybalska EH, Szybalski W. Genetics of human cell lines, IV. DNA-mediated heritable transformation of a biochemical trait. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1962;48(12):2026-34.
11. Sambrook J, Westphal H, Srinivasan P, Dulbecco R. The integrated state of viral DNA in SV40-transformed cells. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1968;60(4):1288-95.
12. Tatum EL. Molecular biology, nucleic acids, and the future of medicine. Perspectives in biology and medicine. 1966;10(1):19-32.
13. Rogers S, Pfuderer P. Use of viruses as carriers of added genetic information. Nature. 1968;219(5155):749-51.
14. Amer MH. Gene therapy for cancer: present status and future perspective. Molecular and cellular therapies. 2014;2(1):1-19.
15. Prakash V, Moore M, Yáñez-Muñoz RJ. Current progress in therapeutic gene editing for monogenic diseases. Molecular Therapy. 2016;24(3):465-74.
16. Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K, Kasid A, Morgan RA, Moen R, et al. Gene transfer into humans—immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. New England journal of medicine. 1990;323(9):570-8.
17. Blaese R, Culver K, Miller A, Carter C, Fleisher T, Clerici M, et al. B Rosenberg SA, Klein H, Berger M, Mullen CA, Ramsey WJ, Muul L, Morgan RA, Anderson WF. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years. Science. 1995;270:475-80.
18. Bordignon C, Notarangelo LD, Nobili N, Ferrari G, Casorati G, Panina P, et al. Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA− immunodeficient patients. Science. 1995;270(5235):470-5.
19. Stolberg SG. The biotech death of Jesse Gelsinger. NY Times Mag. 1999;28:136-40.
20. FS RSCNL, GP WNBAG, ML WJB. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. Mol Genet Metab. 2003;80:148-58.
21. Herzog RW. Gene therapy for SCID-X1: round 2. Molecular Therapy. 2010;18(11):1891.
22. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, Basile GvdS, Gross F, Yvon E, Nusbaum P, et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. Science. 2000;288(5466):669-72.
23. Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack M, Wulffraat N, Leboulch Pa, et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. science. 2003;302(5644):415-9.
24. Hammer MJ, Eckardt P, Barton-Burke M, editors. Informed consent: a clinical trials perspective. Oncology nursing forum; 2016: NIH Public Access.
25. Rothstein RJ. [12] One-step gene disruption in yeast. Methods in enzymology. 101: Elsevier; 1983. p. 202-11.
26. Smithies O, Gregg RG, Boggs SS, Koralewski MA, Kucherlapati RS. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal β-globin locus by homologous recombination. Nature. 1985;317(6034):230-4.
27. Thomas KR, Folger KR, Capecchi MR. High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. Cell. 1986;44(3):419-28.
28. Capecchi MR. Altering the genome by homologous recombination. Science. 1989;244(4910):1288-92.

29. Lin F, Sperle K, Sternberg N. Recombination in mouse L cells between DNA introduced into cells and homologous chromosomal sequences. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1985;82(5):1391-5.
30. Rouet P, Smih F, Jasin M. Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. Molecular and cellular biology. 1994;14(12):8096-106.
31. Jeggo P. 5 DNA Breakage and Repair. Advances in genetics. 1998;38:185-218.
32. Cohen-Tannoudji M, Robine S, Choulika A, Pinto D, El Marjou F, Babinet C, et al. I-Sce I-induced gene replacement at a natural locus in embryonic stem cells. Molecular and cellular biology. 1998;18(3):1444-8.
33. Klug A, Rhodes D, editors. Zinc fingers: a novel protein fold for nucleic acid recognition. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology; 1987: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
34. Kim Y-G, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1996;93(3):1156-60.
35. Bibikova M, Carroll D, Segal DJ, Trautman JK, Smith J, Kim Y-G, et al. Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases. Molecular and cellular biology. 2001;21(1):289-97.
36. Porteus MH, Baltimore D. Chimeric nucleases stimulate gene targeting in human cells. Science. 2003;300(5620):763-.
37. Gabriel R, Lombardo A, Arens A, Miller JC, Genovese P, Kaeppel C, et al. An unbiased genome-wide analysis of zinc-finger nuclease specificity. Nature biotechnology. 2011;29(9):816-23.
38. Pattanayak V, Ramirez CL, Joung JK, Liu DR. Revealing off-target cleavage specificities of zinc-finger nucleases by in vitro selection. Nature methods. 2011;8(9):765-70.
39. Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. Science. 2009;326(5959):1509-12.
40. Moscou MJ, Bogdanove AJ. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. Science. 2009;326(5959):1501-.
41. Holkers M, Maggio I, Liu J, Janssen JM, Miselli F, Mussolino C, et al. Differential integrity of TALE nuclease genes following adenoviral and lentiviral vector gene transfer into human cells. Nucleic acids research. 2013;41(5):e63-e.
42. Mussolino C, Alzubi J, Fine EJ, Morbitzer R, Cradick TJ, Lahaye T, et al. TALENs facilitate targeted genome editing in human cells with high specificity and low cytotoxicity. Nucleic acids research. 2014;42(10):6762-73.
43. Kherraf Z-E, Conne B, Amiri-Yekta A, Kent MC, Coutton C, Escoffier J, et al. Creation of knock out and knock in mice by CRISPR/Cas9 to validate candidate genes for human male infertility, interest, difficulties and feasibility. Molecular and cellular endocrinology. 2018;468:70-80.
44. Adli M. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. Nat Commun. 2018; 9: 1911. PUBMED.
45. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product. Journal of bacteriology. 1987;169(12):5429-33.
46. Mojica FJ, Juez G, Rodriguez-Valera F. Transcription at different salinities of Haloferax mediterranei sequences adjacent to partially modified PstI sites. Molecular microbiology. 1993;9(3):613-21.
47. Mojica FJ, Díez-Villaseñor Cs, García-Martínez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. Journal of molecular evolution. 2005;60:174-82.
48. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA–guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. science. 2012;337(6096):816-21.
49. Bahrami S, Amiri-Yekta A, Daneshipour A, Jazayeri SH, Mozdziak PE, Sanati MH, et al. Designing a transgenic chicken: applying new approaches toward a promising bioreactor. Cell Journal (Yakhteh). 2020;22(2):133.
50. Mei Y, Wang Y, Chen H, Sun ZS, Ju X-D. Recent progress in CRISPR/Cas9 technology. Journal of Genetics and Genomics. 2016;43(2):63-75.
51. Yamano T, Nishimasu H, Zetsche B, Hirano H, Slaymaker IM, Li Y, et al. Crystal structure of Cpf1 in complex with guide RNA and target DNA. Cell. 2016;165(4):949-62.

52. Ming S, Tian-Rui X, Ce-Shi C. The big bang of genome editing technology: development and application of the CRISPR/Cas9 system in disease animal models. Zoological Research. 2016;37(4):191.
53. Ceasar SA, Rajan V, Prykhozhij SV, Berman JN, Ignacimuthu S. Insert, remove or replace: A highly advanced genome editing system using CRISPR/Cas9. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research. 2016;1863(9):2333-44.
54. Liu M, Rehman S, Tang X, Gu K, Fan Q, Chen D, et al. Methodologies for improving HDR efficiency. Frontiers in genetics. 2019;9:691.
55. Yang H, Ren S, Yu S, Pan H, Li T, Ge S, et al. Methods favoring homology-directed repair choice in response to CRISPR/Cas9 induced-double strand breaks. International journal of molecular sciences. 2020;21(18):6461.
56. Mali S. Delivery systems for gene therapy. Indian journal of human genetics. 2013;19(1):3.
57. Ludwig IS, Lekkerkerker AN, Depla E, Bosman F, Musters RJ, Depraetere S, et al. Hepatitis C virus targets DC-SIGN and L-SIGN to escape lysosomal degradation. Journal of virology. 2004;78(15):8322-32.
58. Gao J, Mese K, Bunz O, Ehrhardt A. State-of-the-art human adenovirus vectorology for therapeutic approaches. FEBS letters. 2019;593(24):3609-22.
59. Taha EA, Lee J, Hotta A. Delivery of CRISPR-Cas tools for in vivo genome editing therapy: trends and challenges. Journal of Controlled Release. 2022 Feb 1;342:345-61.
60. Yanez Arteta M, Kjellman T, Bartesaghi S, Wallin S, Wu X, Kvist AJ, et al. Successful reprogramming of cellular protein production through mRNA delivered by functionalized lipid nanoparticles. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2018;115(15):E3351-E60.
61. Miller JB, Zhang S, Kos P, Xiong H, Zhou K, Perelman SS, et al. Non-viral CRISPR/Cas gene editing in vitro and in vivo enabled by synthetic nanoparticle co-delivery of Cas9 mRNA and sgRNA. Angewandte Chemie. 2017;129(4):1079-83.
62. Liu F, Song Y, Liu D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. Gene therapy. 1999;6(7):1258-66.
63. Zhang G, Budker V, Wolff JA. High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA. Human gene therapy. 1999;10(10):1735-7.
64. Potter H, Heller R. Transfection by Electroporation. Current Protocols in Molecular Biology. 2018;121(1):9.3.1-9.3.13.
65. Suzuki K, Tsunekawa Y, Hernandez-Benitez R, Wu J, Zhu J, Kim EJ, et al. In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration. Nature. 2016;540(7631):144-9.
66. Amiri-Yekta A, Dalman A, Sanati MH, Fatemi N, Vazirinasab H, Zomorodipour A, et al. Optimization of the electroporation conditions for transfection of human factor IX into the goat fetal fibroblasts. Cell Journal (Yakhteh). 2013;14(4):270.
67. Abe T, Inoue K-i, Furuta Y, Kiyonari H. Pronuclear microinjection during S-phase increases the efficiency of CRISPR-Cas9-assisted knockin of large DNA donors in mouse zygotes. Cell Reports. 2020;31(7):107653.
68. Alghadban S, Bouchareb A, Hinch R, Hernandez-Pliego P, Biggs D, Preece C, et al. Electroporation and genetic supply of Cas9 increase the generation efficiency of CRISPR/Cas9 knock-in alleles in C57BL/6J mouse zygotes. Scientific Reports. 2020;10(1):1-12.
69. Han X, Liu Z, Jo MC, Zhang K, Li Y, Zeng Z, et al. CRISPR-Cas9 delivery to hard-to-transfect cells via membrane deformation. Science advances. 2015;1(7):e1500454.
70. Sharei A, Zoldan J, Adamo A, Sim WY, Cho N, Jackson E, et al. A vector-free microfluidic platform for intracellular delivery. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2013;110(6):2082-7.
71. Dasgupta I, Flotte TR, Keeler AM. CRISPR/Cas-dependent and nuclease-free in vivo therapeutic gene editing. Human Gene Therapy. 2021;32(5-6):275-93.
72. Depil S, Duchateau P, Grupp S, Mufti G, Poirot L. 'Off-the-shelf'allogeneic CAR T cells: development and challenges. Nature reviews Drug discovery. 2020;19(3):185-99.
73. Dever DP, Bak RO, Reinisch A, Camarena J, Washington G, Nicolas CE, et al. CRISPR/Cas9 β-globin gene targeting in human haematopoietic stem cells. Nature. 2016;539(7629):384-9.
74. Papizan JB, Porter SN, Sharma A, Pruett-Miller SM. Therapeutic gene editing strategies using CRISPR-Cas9 for the β-hemoglobinopathies. Journal of Biomedical Research. 2021;35(2):115.

75. Chen Y-C. CRISPR based genome editing and removal of human viruses. Progress in Molecular Biology and Translational Science. 2021;179:93-116.
76. Doudna JA. The promise and challenge of therapeutic genome editing. Nature. 2020;578(7794):229-36.
77. Hu W, Kaminski R, Yang F, Zhang Y, Cosentino L, Li F, et al. RNA-directed gene editing specifically eradicates latent and prevents new HIV-1 infection. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2014;111(31):11461-6.
78. Deng Q, Chen Z, Shi L, Lin H. Developmental progress of CRISPR/Cas9 and its therapeutic applications for HIV-1 infection. Reviews in Medical Virology. 2018;28(5):e1998.
79. Schmidt SC, Anedda B, Burchartz A, Eichsteller A, Kolb S, Nigg C, et al. Physical activity and screen time of children and adolescents before and during the COVID-19 lockdown in Germany: a natural experiment. Scientific reports. 2020;10(1):1-12.
80. Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. Nature Reviews Cancer. 2010;10(8):550-60.
81. Ding W, Hu Z, Zhu D, Jiang X, Yu L, Wang X, et al. Zinc Finger Nucleases Targeting the Human Papillomavirus E7 Oncogene Induce E7 Disruption and a Transformed Phenotype in HPV16/18-Positive Cervical Cancer CellsZFN Induces E7 Disruption in HPV-Positive Cells. Clinical cancer research. 2014;20(24):6495-503.
82. Cradick TJ, Keck K, Bradshaw S, Jamieson AC, McCaffrey AP. Zinc-finger nucleases as a novel therapeutic strategy for targeting hepatitis B virus DNAs. Molecular Therapy. 2010;18(5):947-54.
83. Ramanan V, Shlomai A, Cox DB, Schwartz RE, Michailidis E, Bhatta A, et al. CRISPR/Cas9 cleavage of viral DNA efficiently suppresses hepatitis B virus. Scientific reports. 2015;5(1):10833.
84. Liu X, Zhang Y, Cheng C, Cheng AW, Zhang X, Li N, et al. CRISPR-Cas9-mediated multiplex gene editing in CAR-T cells. Cell research. 2017;27(1):154-7.
85. Miao K, Zhang X, Su SM, Zeng J, Huang Z, Chan UI, et al. Optimizing CRISPR/Cas9 technology for precise correction of the Fgfr3-G374R mutation in achondroplasia in mice. Journal of Biological Chemistry. 2019;294(4):1142-51.
86. Ekman FK, Ojala DS, Adil MM, Lopez PA, Schaffer DV, Gaj T. CRISPR-Cas9-mediated genome editing increases lifespan and improves motor deficits in a Huntington's disease mouse model. Molecular Therapy-Nucleic Acids. 2019;17:829-39.
87. Tang X-D, Gao F, Liu M-J, Fan Q-L, Chen D-K, Ma W-T. Methods for enhancing clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9-mediated homology-directed repair efficiency. Frontiers in genetics. 2019;10:551.
88. Li HL, Fujimoto N, Sasakawa N, Shirai S, Ohkame T, Sakuma T, et al. Precise correction of the dystrophin gene in duchenne muscular dystrophy patient induced pluripotent stem cells by TALEN and CRISPR-Cas9. Stem cell reports. 2015;4(1):143-54.
89. Rohn TT, Kim N, Isho NF, Mack JM. The potential of CRISPR/Cas9 gene editing as a treatment strategy for Alzheimer's disease. Journal of Alzheimer's disease & Parkinsonism. 2018;8(3).
90. Pavel-Dinu M, Wiebking V, Dejene BT, Srifa W, Mantri S, Nicolas CE, et al. Gene correction for SCID-X1 in long-term hematopoietic stem cells. Nature communications. 2019;10(1):1634.
91. Cabral T, DiCarlo JE, Justus S, Sengillo JD, Xu Y, Tsang SH. CRISPR applications in ophthalmologic genome surgery. Current opinion in ophthalmology. 2017;28(3):252.
92. Maule G, Arosio D, Cereseto A. Gene therapy for cystic fibrosis: progress and challenges of genome editing. International journal of molecular sciences. 2020;21(11):3903.
93. CRISPR CLINICAL TRIALS (https://crisprmedicinenews.com/clinical-trials/).
94. Ormond KE, Mortlock DP, Scholes DT, Bombard Y, Brody LC, Faucett WA, et al. Human germline genome editing. The American Journal of Human Genetics. 2017;101(2):167-76.
95. Lander ES, Baylis F, Zhang F, Charpentier E, Berg P, Bourgain C, et al. Adopt a moratorium on heritable genome editing. Nature. 2019;567(7747):165-8.
96. Zhang D, Lie RK. Ethical issues in human germline gene editing: a perspective from China. Monash Bioethics Review. 2018;36:23-35.
97. Huang C, Li Q, Li J. Site-specific genome editing in treatment of inherited diseases: possibility, progress, and perspectives. Medical Review. 2022 Oct 26;2(5):471-500.

98. Jinek M. A Programmable Dual-Siswanto, FM, BH Kartiko/Media Sains 1 (2)(2017) 56 J. Media Sains–September 2017 RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. Science. 2012;337(6096):816-21.
99. Cromer MK, Vaidyanathan S, Ryan DE, Curry B, Lucas AB, Camarena J, et al. Global transcriptional response to CRISPR/Cas9-AAV6-based genome editing in CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. Molecular Therapy. 2018;26(10):2431-42.
100. Kosicki M, Tomberg K, Bradley A. Repair of double-strand breaks induced by CRISPR–Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. Nature biotechnology. 2018;36(8):765-71.
101. Cullot G, Boutin J, Toutain J, Prat F, Pennamen P, Rooryck C, et al. CRISPR-Cas9 genome editing induces megabase-scale chromosomal truncations. Nature communications. 2019;10(1):1136.
102. Blattner G, Cavazza A, Thrasher AJ, Turchiano G. Gene editing and genotoxicity: targeting the off-targets. Frontiers in Genome Editing. 2020;2:613252.
103. Leibowitz ML, Papathanasiou S, Doerfler PA, Blaine LJ, Sun L, Yao Y, et al. Chromothripsis as an on-target consequence of CRISPR–Cas9 genome editing. Nature genetics. 2021;53(6):895-905.
104. Rees HA, Liu DR. Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells. Nature reviews genetics. 2018;19(12):770-88.
105. Stadtmauer EA, Fraietta JA, Davis MM, Cohen AD, Weber KL, Lancaster E, et al. CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. Science. 2020;367(6481):eaba7365.
106. Matsoukas IG. Prime editing: genome editing for rare genetic diseases without double-strand breaks or donor DNA. Frontiers in Genetics. 2020:528.
107. Anzalone AV, Randolph PB, Davis JR, Sousa AA, Koblan LW, Levy JM, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. Nature. 2019;576(7785):149-57.
108. Weinberg DN, Papillon-Cavanagh S, Chen H, Yue Y, Chen X, Rajagopalan KN, et al. The histone mark H3K36me2 recruits DNMT3A and shapes the intergenic DNA methylation landscape. Nature. 2019;573(7773):281-6.
109. Kearns NA, Pham H, Tabak B, Genga RM, Silverstein NJ, Garber M, et al. Functional annotation of native enhancers with a Cas9–histone demethylase fusion. Nature methods. 2015;12(5):401-3.
110. Gilbert LA, Horlbeck MA, Adamson B, Villalta JE, Chen Y, Whitehead EH, et al. Genome-scale CRISPR-mediated control of gene repression and activation. Cell. 2014;159(3):647-61.
111. Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, Liu Z, Brar GA, Torres SE, et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. Cell. 2013;154(2):442-51.
112. Chavez A, Scheiman J, Vora S, Pruitt BW, Tuttle M, PR Iyer E, et al. Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. Nature methods. 2015;12(4):326-8.
113. D'Urso A, Brickner JH. Mechanisms of epigenetic memory. Trends in genetics. 2014;30(6):230-6.
114. Sarkies P, editor Molecular mechanisms of epigenetic inheritance: possible evolutionary implications. Seminars in Cell & Developmental Biology; 2020: Elsevier.
115. Chavez M, Chen X, Finn PB, Qi LS. Advances in CRISPR therapeutics. Nature Reviews Nephrology. 2023;19(1):9-22.
116. Samulski RJ, Muzyczka N. AAV-mediated gene therapy for research and therapeutic purposes. Annual review of virology. 2014;1:427-51.
117. Hamilton JR, Tsuchida CA, Nguyen DN, Shy BR, McGarrigle ER, Espinoza CRS, et al. Targeted delivery of CRISPR-Cas9 and transgenes enables complex immune cell engineering. Cell reports. 2021;35(9):109207.
118. Ling S, Yang S, Hu X, Yin D, Dai Y, Qian X, et al. Lentiviral delivery of co-packaged Cas9 mRNA and a Vegfa-targeting guide RNA prevents wet age-related macular degeneration in mice. Nature Biomedical Engineering. 2021;5(2):144-56.
119. Banskota S, Raguram A, Suh S, Du SW, Davis JR, Choi EH, et al. Engineered virus-like particles for efficient in vivo delivery of therapeutic proteins. Cell. 2022;185(2):250-65. e16.
120. Frock RL, Hu J, Meyers RM, Ho Y-J, Kii E, Alt FW. Genome-wide detection of DNA double-stranded breaks induced by engineered nucleases. Nature biotechnology. 2015;33(2):179-86.
121. Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. Nature biotechnology. 2013;31(9):827-32.
122. Lin Y, Cradick TJ, Brown MT, Deshmukh H, Ranjan P, Sarode N, et al. CRISPR/Cas9 systems have off-target activity with insertions or deletions between target DNA and guide RNA sequences. Nucleic acids research. 2014;42(11):7473-85.

123. Slaymaker IM, Gao L, Zetsche B, Scott DA, Yan WX, Zhang F. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. Science. 2016;351(6268):84-8.
124. Rothschild J. Ethical considerations of gene editing and genetic selection. Journal of General and Family Medicine. 2020;21(3):37-47.
125. Brokowski C, Adli M. CRISPR ethics: moral considerations for applications of a powerful tool. Journal of molecular biology. 2019;431(1):88-101.
126. Khan SH. Genome-editing technologies: concept, pros, and cons of various genome-editing techniques and bioethical concerns for clinical application. Molecular Therapy-Nucleic Acids. 2019;16:326-34.
127. Dunbar CE, High KA, Joung JK, Kohn DB, Ozawa K, Sadelain M. Gene therapy comes of age. Science. 2018;359(6372):eaan4672.