دامستیک؛ دوره ۲۲، شماره ۳ (شماره ۲۴ پیاپی): ۴۸-۳۶

نشریهٔ علمی- ترویجی (حرفه‌ای)

دامِستیک

انجمن علمی- دانشجویی گروه مهندسی علوم دامی دانشگاه تهران؛ زمستان ۱۴۰۱

https://domesticsj.ut.ac.ir/article_93927.html

مقاله علمی- ترویجی

مروری بر فناوری ویرایش ژنی (کریسپر) و کاربردهای آن در تحقیقات علوم دامی

محمدرضا هاشمی[۱*]، یونس دوستی[۲*]، فرناز ارجمند کرمانی[۲] و محمد مرادی شهربابک[۳]

[۱] دانشجوی دکتری تخصصی ژنتیک و اصلاح نژاد دام و طیور، گروه مهندسی علوم دامی، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران ، کرج، البرز، ایران

[۲] دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه مهندسی علوم دامی، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران ، کرج، البرز، ایران

[۳] استاد ژنتیک و اصلاح نژاد دام و طیور، گروه مهندسی علوم دامی، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران ، کرج، البرز، ایران

https://doi.org/10.22059/domesticsj.2023.354410.1116

چکیده

در سال ۱۹۵۳، محققان با کشف ساختار مارپیچ DNA به دنبال روش‌هایی برای دست‌ورزی ژنوم بودند. نقطهٔ شروع فرآیند ویرایش ژنوم (Genome Editing) در دههٔ ۷۰ میلادی با تولید DNA نوترکیب (Recombinant DNA) و توسعهٔ مهندسی ژنتیک و سپس، تولید تجاری آنزیم‌های محدودکننده (Restriction Enzymes) آغاز شد. ویرایش ژنوم به فرآیند اصلاح هدفمند ژنوم اشاره دارد و یکی از مهمترین پیشرفت‌های مهندسی ژنتیک در قرن حاضر است. این فناوری، به دانشمندان این امکان را داده است که مواد ژنتیکی را با هدف بهبود عملکرد و ایجاد تغییرات ژنتیکی هدفمند در انسان، جانوران و گیاهان در نواحی خاصی از ژنوم حذف یا اضافه کنند و یا تغییر دهند. یکی از روش‌های ویرایش ژنوم، سیستم کریسپر است که به عنوان ابزاری قدرتمند برای ویرایش ژنوم با کارآیی بالا در انواع مختلف ارگانیسم‌ها به کار گرفته شده است و انقلابی در تحقیقات زیستی ایجاد کرده است. سیستم کریسپر، سیستم ایمنی اکتسابی در پروکاریوت‌ها می‌باشد که از آن‌ها در برابر باکتریوفاژها و پلاسمیدها محافظت می‌کند. از این تکنیک، می‌توان برای درمان و کنترل بیماری‌های ژنتیکی، بهبود کیفیت غذا، ساخت واکسن و دارو و نیز در جهت اصلاح و بهبود عملکرد رشد و تولیدمثل استفاده کرد. در سال ۲۰۲۰ به دو دانشمند به نام های جنیفر دودنا (Jennifer Doudna) و امانوئل شارپنتیر (Emmanuelle Charpentier) به دلیل ابداع تکنیک کریسپر جایزه نوبل اعطا گردید که نشان از اهمیت و کاربردهای فراوان این فناوری در حوزه پزشکی و کشاورزی در سال‌های آینده دارد. هدف از مطالعه حاضر، مروری بر تاریخچه، اهمیت و کاربرد سیستم کریسپر در حوزه دامپروری با هدف پیشرفت در اصلاح دام و طیور و با در نظر گرفتن موازین اخلاقی و آسایش دام است.

کلمات کلیدی: علوم دامی، کریسپر، کشاورزی، ویرایش ژنوم

***نویسندگان مسئول:** m.hashemi1369@ut.ac.ir and y.devisty@ut.ac.ir

بخش: ژنتیک و اصلاح‌نژاد دام و طیور **دبیر تخصصی:** دکتر معصومه ناصرخیل

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۰۷ **تاریخ بازنگری:** ۱۴۰۱/۱۲/۲۰ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۱/۱۲/۲۵ **تاریخ انتشار آنلاین:** ۱۴۰۱/۱۲/۲۶

رفرنس‌دهی: هاشمی، م.ر.، دوستی، ی.، ارجمند کرمانی، ف.، مرادی شهربابک، م. مروری بر فناوری ویرایش ژنی (کریسپر) و کاربردهای آن در تحقیقات علوم دامی. *علمی- ترویجی (حرفه‌ای) دامِستیک*، ۱۴۰۱؛ ۲۲(۳): ۳۶-۴۸.

مقدمه

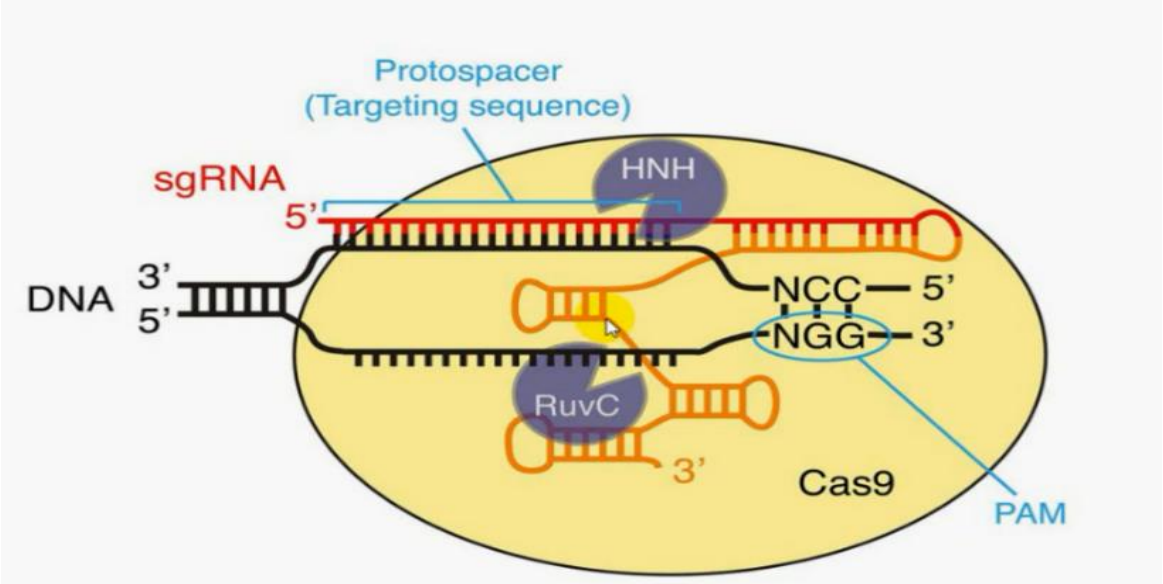
سیستم کریسپر، به گفته جیمز واتسون، کاشف DNA، مهم‌ترین کشف در زیست شناسی بعد از کشف ساختار DNA می‌باشد. کلمهٔ CRISPR مخفف عبارت " Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats" است که به معنای "تناوب‌های کوتاه پالیندرومیک فاصله دار منظم خوشه‌ای" می‌باشد. این سیستم یک سیستم ایمنی اکتسابی پروکاریوتی است که باعث مقاومت باکتری‌ها به عناصر ژنتیکی خارجی (ویروس‌ها یا فاژها) می‌شود (Jinek *et al.*, 2012). در پروکاریوت‌ها، سیستم‌های دفاعی ضد ویروس مختلفی وجود دارد که یکی از رایج ترین آن‌ها کریسپر است که از طریق قیچی کردن ژنوم ویروس مهاجم توسط اندونوکلئاز Cas9 باعث ممانعت از درج شدن ژنوم ویروس به داخل ژنوم باکتری می‌شود (Doudna *et al.*, 2014). این سیستم، شامل بخشی از DNA پروکاریوتی است که به صورت تکرارهایی (Repeats) کوتاه قرار گرفته‌اند. در بین توالی‌های تکراری، توالی‌هایی به نام فاصله انداز (Spacer) قرار گرفته است که نتیجهٔ مواجهٔ قبلی باکتری با باکتریوفاژ ویروسی یا پلاسمید است. این توالی‌های فاصله انداز مسئول شناسایی عناصر اگزوژن بوده و مشابه پدیدهٔ تداخل RNA (RNA interference) در سیستم یوکاریوتی عمل می‌کنند (Jinek *et al.*, 2012). این فاصله اندازها همان پیش فاصله اندازها (Protospacers) در توالی‌های خارجی و عناصر ژنتیکی متحرک (مانند باکتریوفاژها و پلاسمیدها) هستند که توسط آنزیم‌های Cas1 و Cas2 در هنگام نخستین حمله ویروس، در ژنوم باکتری بین تکرارهای مستقیم جای گرفته‌اند و سبب ایجاد حافظهٔ سلولی در باکتری می‌شوند که باعث می‌شود سیستم کریسپر باکتری، ژنوم خودی را از غیر خودی (ژنوم ویروسی) تشخیص دهد (Barrangou *et al.*, 2007; Ran *et al.*, 2013). اولین مشاهده در مورد سیستم کریسپر، توسط یوشیزومی ایشینو (Yoshizumi Ishino) در سال ۱۹۸۷ در دانشگاه اوزاکای ژاپن انجام شد. در آن سال ایشینو که بر روی ژن‌های iap در باکتری E.coli تحقیق می‌کرد، در آخرین پاراگراف مقالهٔ خود گزارش کرد که در باکتری E.coli توالی‌های پالیندرومی عجیبی تکرار می‌شوند. به گونه‌ای که تعداد زیادی توالی تکراری در این باکتری بوسیله‌ی توالی‌های متنوع و غیر تکراری از هم جدا شده‌اند؛ اما ایشینو به اهمیت این توالی‌هایی که گزارش کرده بود پی نبرد (Ishino *et al.*, 1987). تا اینکه در سال ۱۹۹۳، فرانسیسکو موجیکا (Mojica)، میکروبیولوژیست در دانشگاه آلیکانتهٔ اسپانیا، متوجه شد که این Spacerها از ژنوم باکتریوفاژهایی که قبلا به باکتری حمله کرده بودند، منشاء می‌گیرند. او بعداً نشان داد که توالی‌های مشابه در پروکاریوت‌ها گسترده است و با مواد ژنتیکی در فاژها، مطابقت دارد. موجیکا در سال ۲۰۰۵، گزارش کرد که این توالی‌ها بخشی از یک سیستم ایمنی میکروبی هستند. در واقع، باکتری‌ها از توالی‌های Spacer به نوعی به عنوان خاطره سلولی استفاده می‌کنند تا در صورت حمله مجدد ویروس‌ها (فاژها)، بتوانند سریع تر عوامل بیگانه و مهاجم را شناسایی کرده و آن را از بین ببرند (Makarova *et al.*, 2006). این توالی را که شامل Repeatها و Spacerهای متعدد است، آرایهٔ کریسپر (CRISPR Array) گویند. توالی‌های Spacer به عنوان الگوهایی به منظور تولید توالی‌های کوتاه کریسپری (crRNA) مورد استفاده قرار گرفته و کمپلکسی را با مولکول tracrRNA یا (trans-activating CRISPR RNA) تشکیل می‌دهد. همچنین، tracr RNA باعث بلوغ crRNA می‌شود. این دو توالی به همراه یکدیگر به عنوان یک توالی راهنما، پروتئین Cas9 را به سمت DNA مهاجم هدایت می‌کنند (Doudna *et al.*, 2014). برای ساده‌سازی کاربردهای آزمایشگاهی، crRNA و tracrRNA را نیز می‌توان به صورت مصنوعی (Synthetic gRNA = sgRNA) مهندسی و ادغام کرد که اصطلاحا به آن sgRNA گویند (Albitar *et al.*, 2018). کمپلکس Cas9-gRNA قادر است با شناسایی ناحیه‌ای به نام PAM (Protospacer Adjacent Motif) بر روی DNA ویروس، به آن حمله کرده، دو رشته DNA را برش دهد و ویروس را منهدم سازد. به عبارت دیگر، این تکنولوژی مستقیماً DNAرا مورد هدف قرار داده و از پروتئین Cas9 به عنوان مولکول برش دهنده‌ی DNA استفاده می‌کند؛ به طوری که توسط یک RNAراهنما که توانایی شناسایی ناحیه‌ای از ژنوم مورد هدف را دارد، با DNA مورد نظر جفت می‌شود و سپس توسط دومین‌های پروتئینی که به عنوان قیچی مولکولی عمل می‌کنند، برش را انجام می‌دهد. Cas مخفف Crispr-Associated Protein است؛ یک آنزیم برنامه ریزی شده که قادر به برش رشته‌های DNA در مکان‌های خاص است. Cas9 از طریق دومین‌های نوکلئازی قادر است دو رشتهٔ DNA را در جایگاه هدف برش دهد (Shmakov *et al.*, 2015). بلافاصله پس از ایجاد برش در رشته‌های DNA و ایجاد شکست دو رشته‌ای (DSB=Double Strand Break) چندین مکانسیم ترمیمی برای ترمیم ناحیهٔ برش خوردهٔ DNA ایجاد می‌شود که مهمترین آن‌ها مسیرهای ترمیم سلولی HDR (Homology Directed Repair) و NHEJ (Non Homologous End Joining) هستند (Doudna *et al.*, 2014). فرآیند ترمیم

NHEJ مستعد خطا است و درج یا حذف نوکلئوتیدی (indels) ایجاد می‌کند که منجر به جهش‌های تغییر قالب (Frameshift) می‌شود که ژن هدف را غیرفعال می‌کند. در حالیکه، یوکاریوت‌ها از هر دو مکانیسم (NHEJ ،HDR) برای پاسخ به شکستگی DNA استفاده می‌کنند، در اکثر پروکاریوت‌ها فقط مکانیسم HDR وجود دارد (Koonin *et al.*, 2017). کارآیی سیستم CRISPR-Cas بسیار وابسته به CRISPR crRNA است که باید با کیفیت خوبی طراحی شود (Abudayyeh *et al.*, 2016). در تکنیک ویرایش ژنوم استفاده از اندونوکلئازها باید طوری باشد که جایگاه هدف گیری شده را به طور دقیق شناسایی کند؛ زیرا، در صورت برش خارج از هدف (off-target) ممکن است باعث ایجاد تغییر در لوکوس‌های ناخواسته و ایجاد فنوتیپ جدید شود (Doudna *et al.*, 2014). انواع مختلفی از روش‌های ویرایش ژنوم وجود دارند که در همگی آن‌ها از اندونوکلئازهایی با قابلیت برنامه ریزی استفاده می‌کنند و شامل چهار دسته هستند که عبارتند از: Meganucleases، ZFNs (Zing Finger Nucleases)، TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) و سیستم CRISPR (Yang *et al.*, 2019). متداول‌ترین و رایج‌ترین ابزارهای CRISPR از سیستم CRISPR-Cas موجود در باکتری استرپتوکوکوس پیوژنز (Streptococcus Pyogenes) مشتق شده است که آنزیم اندونوکلئاز Cas آن Cas9 نام دارد و به SpCas9 شهرت دارد (شکل ۱). از همین رو، ابزارهای CRISPR اغلب به نام CRISPR-Cas9 نام گذاری می‌شوند (Khalil, 2020). در سیستم کریسپر، اندونوکلئازهای Cas9 توسط یک gRNA راهنما تقریبا با طول ۲۰ نوکلئوتید که با DNA هدف جفت می‌شود، به توالی مورد نظر فراخوانده شده و سپس DNA توسط زیرواحدهای آنزیم Cas9 برش می‌خورد. بنابراین، به راحتی و با تغییر توالی gRNA راهنما می‌توان Cas9 را به یک سیستم ایده آل برای ویرایش ژنوم هر نوع ارگانیسمی تبدیل کرد (Jinek *et al.*, 2012). اگرچه در ابتدا فناوری‌های ZFN و TALEN کارآیی و اختصاصیت ویرایش ژنی را بهبود بخشیده‌اند؛ اما، برخلاف سیستم کریسپر، برای استفاده در آزمایشگاه نسبتا گران و پیچیده هستد زیرا این دو روش متکی به مهندسی پروتئین برای ویرایش هستند که برای برنامه ریزی مجدد مشکل بوده و برای هر هدف جدید به مهندسی پروتئین گسترده نیاز دارند. این امر فرآیندی سخت و مستعد بروز خطا می‌باشند (Zhang *et al.*, 2017). همچنین، ایجاد توالی‌های RNA مصنوعی (مورد استفاده در سیستم کریسپر) به مراتب راحت‌تر از مهندسی پروتئین در روش‌های ZFN و TALEN می‌باشد. علاوه بر این، با استفاده از سیستم CRISPR/Cas9 می‌توان به طور همزمان چندین جایگاه را در ژنوم یک موجود زنده مورد هدف قرار داد (Zhao *et al.*, 2021). همچنین Cas9 از یک RNA مکمل استفاده می‌کند و در نتیجه می‌توان آن را برای هدف قرار دادن تقریباً، هر ژن در ژنوم با سنتز یک مولکول RNA راهنما (gRNA) برنامه‌ریزی کرد (Cong *et al.*, 2013; Jinek *et al.*, 2012). پروتئین Cas9 دارای بار مثبت بوده و وزن مولکولی آن ۱۶۳ کیلو دالتون می‌باشد و دارای حدود ۴ هزار جفت باز و ۱۳۶۸ اسیدآمینه می‌باشد. SpCas9 دارای PAM ساده NGG است (N هر نوکلئوتیدی می‌تواند باشد). همچنین، Cas9 متعلق به باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*) دارای ۱۰۵۳ اسیدآمینه است و وزن مولکولی آن نسبتا کمتر بوده و اندازهٔ آن کوچک‌تر (حدود ۳ کیلو جفت باز) و PAM آن دارای توالی NNGRRT (R می‌تواند A یا G باشد) است. این اندازهٔ کوچک آنزیم SaCas9 یک مزیت برای انتقال به درون سلول به حساب می‌آید (Cong *et al.*, 2013). ساختار کریستالی آنزیم Cas9 از دو بخش برشی (NUC) و بخش شناسایی (REC) تشکیل شده است. بخش برشی آنزیم از سه دومین با عناوین HNH، RuvC و PI تشکیل شده است و تقریباً، نقش قیچی را ایفا می‌کند و بخش شناسایی آن REC وظیفهٔ تشخیص قطعه DNA مورد هدف را برعهده دارد و دارای دومین‌های REC1، REC2 و BH می‌باشد (شکل ۲). پس از اینکه SpCas9 به DNA هدف متصل شد دستخوش یک سری تغییرات ساختاری فضایی شده تا توانایی برش دادن DNA را در خود فعال نماید و در نهایت، سبب ایجاد برش دو رشته‌ای تقریبا در فاصلهٔ ۳ نوکلئوتیدی بالاتر از ناحیهٔ PAM در DNA هدف می‌شود (Jiang *et al.*, 2015).

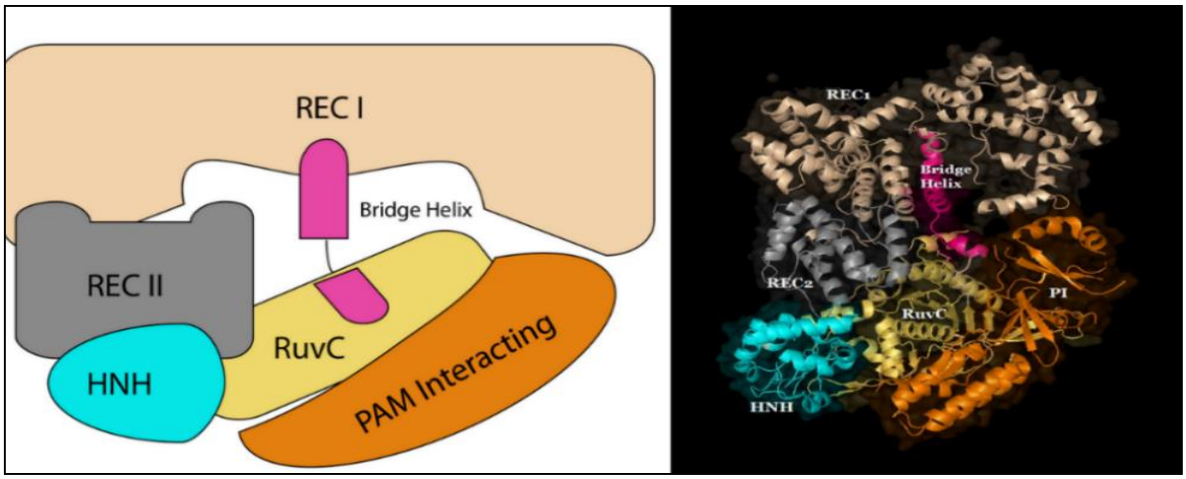
سه مرحلهٔ اصلی در مکانیسم عمل کریسپر در باکتری‌ها

در مرحلهٔ اول که به نام مرحلهٔ اکتساب فاصله انداز (Acquisition) شناخته می‌شود یک قطعهٔ کوچک از ژنوم ویروس به عنوان یک فاصله انداز جدید (spacer) به درون آرایه CRISPR گنجانده می‌شود. این فرآیند، متکی به آنزیم‌های Cas1 و Cas2 می‌باشد. آنزیم‌های Cas فاصله اندازهای جدید (spacers) را از پیش فاصله اندازهای (protospacers) اگزوژن (فاژی) بدست آورده و آن‌ها را به صورت جهت‌دار و در انتهای توالی رهبر (Leading Sequence) در داخل آرایه CRISPR موجود در ژنوم پروکاریوتی قرار می‌دهند (Barrangou *et al.*, 2007). در مرحلهٔ دوم که تحت عنوان مرحلهٔ رونویسی (Expression) نام دارد، آرایهٔ کریسپر به Pre-crRNA رونویسی و سپس توسط

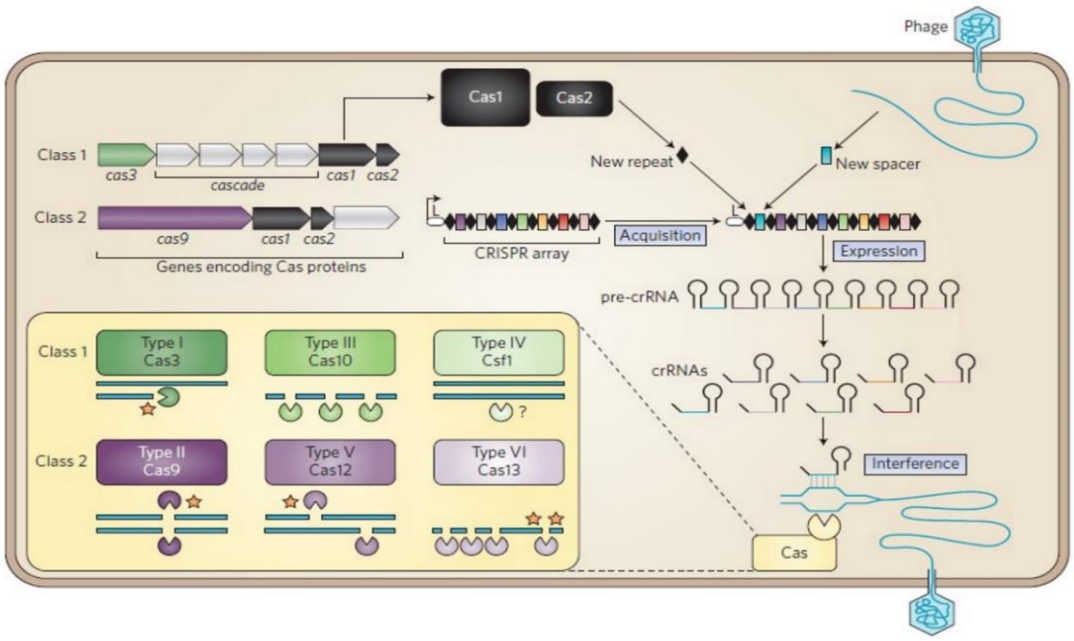
tracrRNA به crRNAهای کوچک برش خورده و پردازش می‌شوند و اصطلاحاً، به بلوغ می‌رسند. هر کدام از این crRNAها حاوی یک بخش هدف گیری کننده‌ی مشتق از یک فاصله انداز منحصر به فرد می‌باشد (Jinek *et al.*, 2012). در مرحلهٔ سوم که مرحلهٔ تداخل (Interference) است، crRNA، آنزیم Cas9 را برای هدف گیری اختصاصی توالی مورد نظر و سپس برش توالی مکمل توسط دومین‌های برش دهنده HNH و RuvC هدایت می‌کند. لازم به ذکر است که در تیپ‌های نوع I ، II ، V و VI سیستم‌های کریسپر، مرحلهٔ سوم (تداخل) برای تشخیص توالی مورد هدف برای برش، نیازمند به توالی سه‌تایی به نام PAM می‌باشند (Barrangou *et al.*, 2007; Zetsche *et al.*, 2015; Al-Attar *et al.*, 2011). به طورکلی، هدف اصلی در مرحلهٔ کسب توالی‌های فاصله انداز جدید، تولید اطلاعات برای خاطرهٔ سلولی و جلوگیری از واکنش خود ایمنی می‌باشد؛ به عبارت دیگر، این فرآیند باعث توانایی در تشخیص DNA خودی (کروموزومی) از غیر خودی (مهاجم یا بیگانه) می‌شود و در نتیجه عدم توانایی در کسب این ویژگی مهم سبب مرگ سلول میزبان می‌شود (Doudna *et al.*, 2014).



شکل ۱- اجزای سیستم CRISPR-Cas9: آنزیم Cas9 باکتری استرپتوکوکوس پیوژنز (SpCas9) با یک RNAی راهنما (sgRNA) که حاوی یک توالی ۲۰ نوکلئوتیدی است، یک کمپلکس تشکیل می‌دهد و به سوی جایگاه DNA موردنظر در ژنوم هدایت می‌شود. این sgRNA شامل یک فاصله انداز و یک RNA داربستی (Scaffold) به نام tracrRNA که برای تشکیل کمپلکس لازم است، می‌باشد. موتیف مجاور پیش فاصله انداز (PAM) برای فعالیت اندونوکلئازی SpCas9 لازم است. توالی gRNA با DNA هدف بلافاصله در بالادست یک موتیف 5'-NGG (PAM) جفت می‌شود و در نهایت آنزیم Cas9 یک شکاف دورشته‌ای را تقریبا در ۳ جفت باز بالادست PAM موجب می شود (Doudna *et al.*, 2014).



شکل ۲- دومین های آنزیم Cas9 و ساختار سه بعدی آن (Doudna *et al.*, 2014)



شکل ۳- مراحل مکانیسم کریسپر: توالی‌های Repeat (لوزی‌های مشکی رنگ) و Spacer (مستطیل‌های رنگی) و نواحی Leader. فاکتورهای رونویسی در ناحیه Leader می‌نشینند و جایگاه کریسپر به Pre-crRNA رونویسی می‌شود و سپس Pre-crRNA توسط tracrRNA به crRNAهای کوچک بلوغ یافته تبدیل شده و نقش مهمی را در هدف گیری و برش DNA خارجی ایفا می‌کند (Makarova *et al.*, 2020).

بر اساس جدیدترین طبقه‌بندی سیستم‌های CRISPR-Cas، به دو کلاس و شش نوع تقسیم می‌شوند که از نظر پروتئین‌های مؤثر و ترکیب ژن‌های Cas متفاوت هستند. cas1 و cas2 در تمام سیستم‌های کریسپر وجود دارند. در کلاس I مجموعه‌ای از پروتئین‌های Cas (Cascade) در مرحلهٔ تداخل شرکت دارند ولی در کلاس II فقط یک نوع پروتئین (Cas9) در مرحلهٔ تداخل شرکت دارد (Makarova *et al.*, 2020). سیستم‌هایی که برای شناسایی توالی هدف به PAM نیاز دارند در شکل بالا با علامت ستاره متمایز شده‌اند. اسیدهای آمینهٔ دُمین PI با توالی سه تایی PAM پیوند هیدروژنی برقرار کرده و باعث اتصال آنزیم Cas9 با ژنوم و قرارگیری بر روی قطعهٔ مورد هدف می‌شود. بنابراین، بدیهی هست که نبود توالی PAM بر روی ژنوم باعث عدم ویرایش ژنوم می‌شود و در نتیجه نقش PAM در این فرآیند بسیار مهم است (Al-Attar *et al.*, 2011). نکتهٔ جالب توجه این است که ویروس نیز مکانیسم‌هایی برای اختلال در سیستم کریسپر به کار می‌برد تا از مواجهه با این سیستم دفاعی باکتریایی فرار کند و به نوعی سیستم دفاعی میزبان را دور بزند که اصطلاحاً، به آن AntiCRISPR گویند. در نتیجه جمعیت میزبان باید مکانیسم دفاعی خود را که اکنون ناکارآمد است، به روز نماید. بنابراین می‌توان گفت طولانی‌ترین نبرد تاریخ مربوط به این دو نوع گونهٔ حیات می‌باشد (ویروس در مقابل باکتری) (Asaduzzaman *et al.*, 2021). کشف سیستم anti-CRISPRCas یک مسابقهٔ تسلیحاتی تکاملی بین ویروس و سیستم‌های CRISPR را نشان می‌دهد (Bondy-Denomy *et al.*, 2015). شایان ذکر است که پروتئین Cas9 برای فعالیت برشی خود به یون‌های Mg^{+2} نیاز دارد (Marraffini, 2015). علاوه بر این، در حال حاضر، می‌توان بیان ژن در سلول‌ها را بدون تغییر توالی DNA توسط CRISPRi و CRISPRa برای تشخیص و درمان بیماری‌های مختلف انسانی و تنظیم بیان ژن به کار برد (Gilbert *et al.*, 2013; Qi *et al.*, 2013). اسیدهای آمینهٔ اصلی مسئول فعالیت کاتالیزوری Cas9 به ترتیب D10 (اسید آسپارتیک شماره ۱۰ در پروتئین Cas9) و H840 (اسید آمینهٔ هیستیدین شماره ۸۴۰) از دومین‌های RuvC و HNH هستند. از آنجایی که اسید آمینهٔ آلانین دارای زنجیره جانبی غیر واکنشی متیل می‌باشد و در نتیجه خنثی است و تقریبا به طور مستقیم در عملکرد پروتئین دخیل نیست، جایگزینی اسید آمینهٔ آلانین با این دو اسیدهای آمینه (اسید آسپارتیک و هیستیدین)، یک پروتئین Cas9 به نام Cas9 مرده یا dCas9 (dead Cas9) تولید می‌کند. اگرچه dCas9 خاصیت برشی ندارد، با این وجود، این پروتئین همچنان با هدایت gRNA قادر به اتصال به DNA در یک مکان مشخص در ژنوم می‌باشد (Koonin and Makarova, 2019). spCas9 دارای دو دومین نوکلئازی HNH و RuvC است که به ترتیب رشته‌های DNA مکمل و غیر مکمل را می‌شکند (Yao *et al.*, 2018). Cas9 برای برش DNA به دو مولکول

crRNA و tracrRNA نیاز دارد؛ در حالی که Cas12a یا CPF1 برخلاف Cas9، به هیچ tracrRNA یا RNase III نیاز ندارد و برای برش فقط به crRNA نیاز دارد. همچنین Cas12a از دومین تک نوکلئاز RuvC برای برش هر دو رشته DNA استفاده می‌کند و از دومین WED III به عنوان RNase برای پردازش crRNA خود استفاده می‌کند (Fonfara *et al.*, 2016). اندونوکلئاز Cas12a کوچکتر و ساده‌تر از Cas9 می‌باشد (Zetsche *et al.*, 2015). کوچک بودن این آندونوکلئاز در مرحلهٔ انتقال به داخل سلول مفید خواهد بود. همچنین شایان ذکر است که این مولکول سبب ایجاد انتهای چسبنده (Sticky end) می‌شود که به افزایش کارآیی HDR کمک می‌کند (Paul and Montoya, 2020; Pannunzio *et al.*, 2018; Davis and Chen, 2013; Barman *et al.*, 2020). از Cas13 نیز برای هدف قرار دادن و برش RNA استفاده می‌شود (Abudayyeh *et al.*, 2017).

تنوع فعالیت آنزیم Cas9

با تغییر در دومین‌های مختلف Cas9 انواع مختلف آنزیم Cas9 تولید شد که برای اهداف گوناگون مورد استفاده قرار می‌گیرد (Doench, 2018). برای مثال، الف) WTCas9یا نوع وحشی Cas9 که امکان اتصال و برش هر دو رشته DNA را دارد. ب) Cas9 nickase که در آن یکی از دومین‌های Cas9 خاصیت برش دهندگی را از دست می‌دهد. بنابراین، فقط یک دومین ایجاد برش در یک رشته از هر دو رشته DNA را می‌کند و ایجاد Nick می‌کند. ج) dCas9 یا dead Cas9 که در آن هر دو دُمین خاصیت برشی خود را از دست داده‌اند. در این حالت شناسایی و اتصال به توالی مشخص DNA را دارند، اما قادر به برش نخواهند بود و برای تنظیم بیان ژن، عکس برداری ژنومی، بررسی تغییرات اپی‌ژنتیکی بر روی کروماتین کاربرد دارند (Jiang and Doudna, 2017; Hille and Charpentier, 2016).

مزایای CRISPR

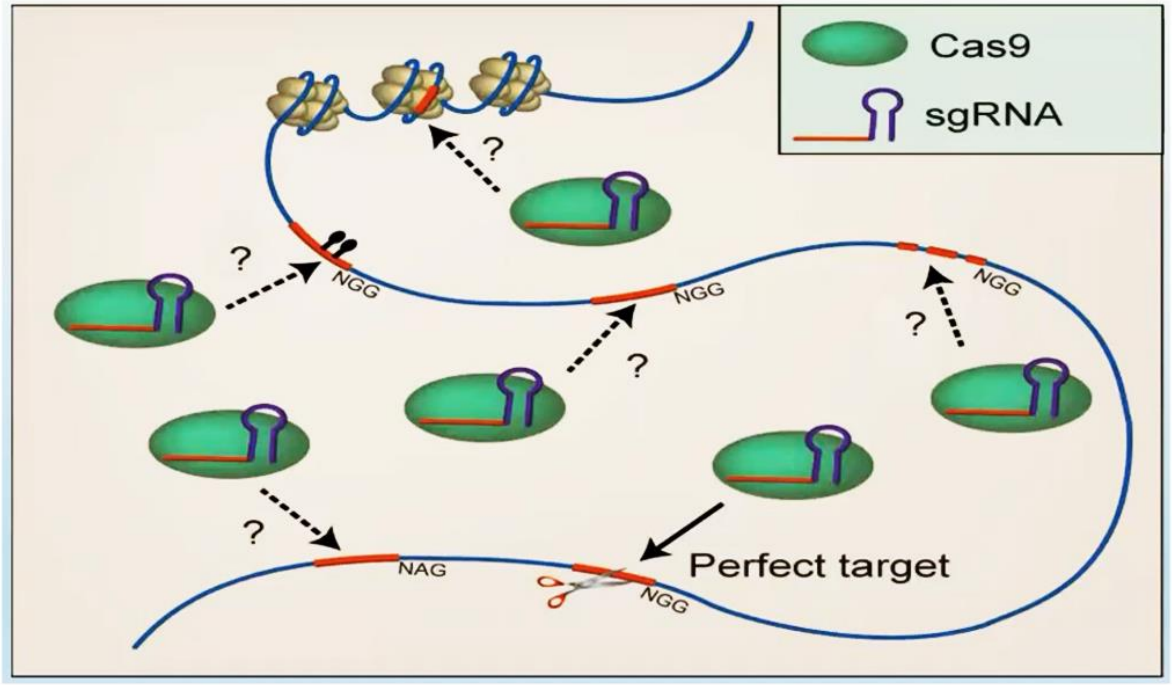
سیستم ویرایش ژنوم CRISPR/Cas9 چندین مزیت را نسبت به TALEN و ZFN دارد. کریسپر ارزان‌تر، ساده‌تر و دقیق تر از سایر روش‌های ویرایش ژنوم است (Zhang *et al.*, 2017). در یک سلول از طریق بیان RNAهای راهنمای جداگانه، CRISPR می‌تواند چندین جایگاه را به طور همزمان در ژنوم با کارآیی بالای مورد نیاز، هدف قرار دهد (Koonin *et al.*, 2017). یکی از کاربردهای مهم سیستم CRISPR/Cas9، امکان ورود چندین نسخهٔ sgRNA به درون سلول و غیر فعال‌سازی چندین ژن است. این توانایی در انحصار سیستم CRISPR است (Alkhnbashi *et al.*, 2016).

محدودیت‌های سیستم کریسپر

امروزه، سیستم کریسپر به عنوان ابزاری قدرتمند برای ویرایش ژنوم شناخته شده و در حوزهٔ زیست فناوری توجه ویژه‌ای را به خود معطوف کرده است. حداقل چهار شرکت کاریبو ساینس (Caribou Biosciences)، ادیتاس مدیسین (Editas Medicine)، کریسپر تراپیوتیکس (CRISPR Therapeutics) و اینتلیا تراپیوتیکس (Intellia Therapeutics) بر پایهٔ فناوری کریسپر بنیان‌گذاری شده است. در حال حاضر، بیشترین نگرانی‌ها در مورد نقاط ضعف و چالش‌های سیستم کریسپر مربوط به ایمنی زیستی سیستم کریسپر و مسائل اخلاقی آن، انتقال امن و دقیق محموله (Cargo) (منظور آنزیم و توالی راهنما است) و نیز جلوگیری از ویرایش‌های ناخواسته و خارج از هدف (Off-target) است. به رغم سرعت بالای توسعهٔ فناوری کریسپر و رشد روز افزون شرکت‌ها در حوزهٔ کریسپر، بسیاری از ویژگی‌های این سیستم هنوز ناشناخته باقی مانده است و نیاز به درک بهتری از مضامین اخلاقی و اجتماعی آن می‌باشد. کریسپر دارای پتانسیل ایجاد انقلابی در کشاورزی و ژن درمانی است؛ اما، پیش از پذیرش این سیستم برای کاربردهای غیر پژوهشی باید درک کاملی از جنبه‌های مختلف این فناوری داشت.

روش‌های کاهش Off-target

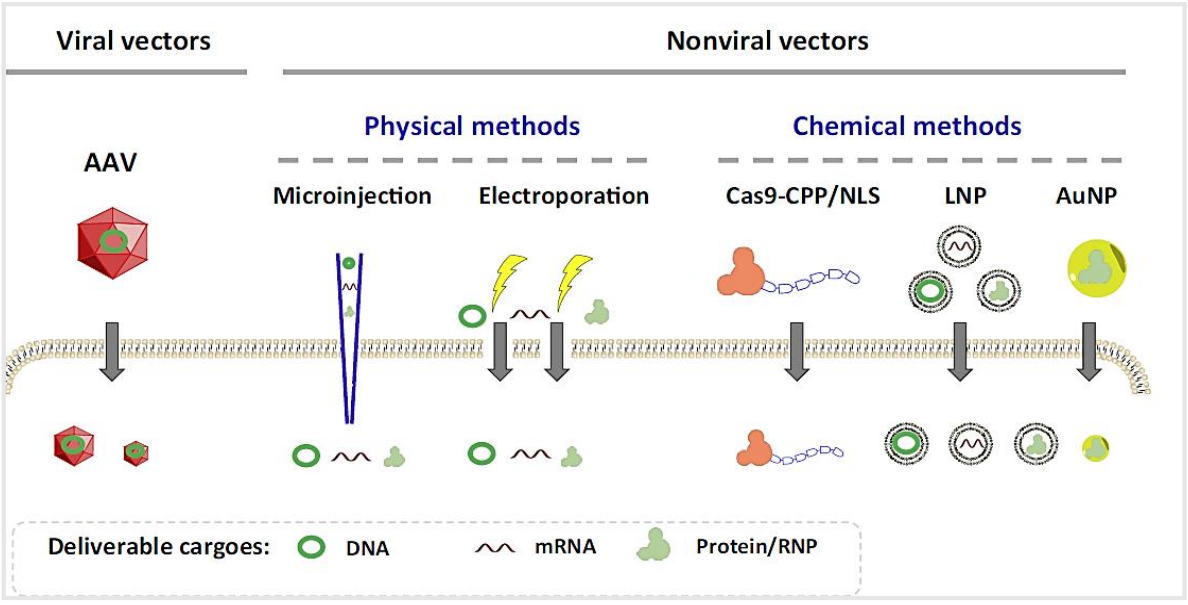
آنزیم cas9 باید قسمت خاصی از توالی DNA را برش دهد، اما ممکن است در قسمت‌های دیگری از ژنوم که مشابهت دارد نیز شکاف ایجاد کند (شکل ۴). این امر می‌تواند به جهش‌های ژنتیکی و افزایش احتمال ابتلا به سرطان منجر شود. اثرات خارج از هدف باعث ایجاد تغییرات غیرمنتظره در ژنوم‌ها می‌شود و در نتیجه نگرانی‌هایی در مورد ایمنی زیستی و کارآیی سیستم کریسپر ایجاد می‌کند. تحقیقات بسیاری برای کاهش اثرات off-target انجام شده است که عبارتند از مهندسی آنزیم Cas9 (Aschenbrenner *et al.*, 2020; Guilinger *et al.*, 2014; Tsai *et al.*, 2014; Kleinstiver *et al.*, 2016; Slaymaker *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2017; Hu *et al.*, 2018)، استفاده از gRNA کوتاه شده یا truncated gRNA (Fu *et al.*, 2014) ، استفاده از Cas nickase (Cong *et al.*, 2013)، استفاده از SPCas9-HF (Kleinstiver *et al.*, 2016)، استفاده از eSPCas9 (Slaymaker *et al.*, 2016) و استفاده از واریانت‌های مهندسی شدهٔ D1135E SpCas9 (Kleinstiver *et al.*, 2015).



شکل ۴- اثرات خارج از هدف در سیستم کریسپر (Slaymaker *et al*., 2016)

روش های انتقال سازۀ ژنی

روش‌های مختلفی برای انتقال Cas9 و gRNA به داخل هستۀ سلول وجود دارد که به طور کلی به دو دستۀ روش‌های انتقال غیرویروسی (Non-viral Delivery) و روش‌های انتقال ویروسی (Viral Delivery) طبقه‌بندی می‌شوند. روش‌های غیرویروسی عبارتند از روش‌های فیزیکی (مانند الکتروپوریشن (Electroporation)، میکرواینجکشن (Microinjection)، ترانسداکشن (Transduction)، ترانسفکس (Transfection)، شوک حرارتی و تزریق پلاسمید) و روش‌های شیمیایی (روش‌های مبتنی بر لیپوزوم، فسفات کلسیم، روش‌های مبتنی بر پروتئین). روش‌های ویروسی نیز شامل روش‌های ناقل‌های لنتی ویروس، رتروویروس و آدنوویروس (AV) و ناقل‌های ویروسی مرتبط با آدنو (AAV = Adeno Associated Virus) می‌باشند (BEHR *et al*., 2021) (شکل ۵).



شکل ۵- روش های انتقال محموله برای ویرایش ژنوم (BEHR *et al*., 2021)

هر کدام از روش‌های بالا معایب و مزایای خود را دارند که در جدول (۱) به طور مختصر نشان داده شده است.

جدول ۱- مزایا و معایب روش‌های انتقال Cas9 و gRNA به داخل هسته سلول (BEHR *et al.*, 2021)

Strategy	Viral Delivery			Non-Viral Delivery				
	LV	AAV	AV	Microingection	Electroporation	Cell Penetreting Peptide	Lipid-Based Nanoparticle	Gold Nanoparticle
Cas9 Delivery Format	DNA	DNA	DNA	DNA, mRNA or protein	DNA, mRNA or protein	Protein	DNA, mRNA or protein	Protein
Delivery Efficiency	+++	++	++	+	+++	+	+	++
Safety Concern	+++	+	++	+	+	+	+	+
Cost	+	++	++	+++	+++	+	+	++
Technical Requirement	+	++	+++	+++	+	++	+	++
Major Advantages	Efficient delivery; Large cloning capacity	Non-integrating	Non-integrating	Direct delivery; Dosage more controllable	Efficient delivery; Easy to operate	No risk of virus	FDA-approved; Low stress to the cells	No risk of virus
Major Limitations	Random integration; insertional mutagenesis	Limited cloning capacity	Immune response	Technical challenging; in vivo work not feasible	Cell viability issue; in vivo work difficult	Variable efficiency depends on cell types; requires extensive optimization		
Major Applications	in vitro and ex vivo	in vivo	in vivo	in vitro and ex vivo	in vitro and ex vivo	in vitro and in vitro	in vitro and in vitro	in vitro and in vitro

AV, adenovirus; AAV, adeno-associated virus; EV, extracellular vesicle; LV, lentivirus; + denotes low; ++ denotes medium; +++ denotes high.

در بحث انتقال، اگر مولکول‌های gRNA و mRNA با هم به داخل سلول ارسال شوند، ممکن است تا زمانی که mRNA ترجمه شود، gRNA شروع به تخریب کند. در واقع، نشان داده شده است که تأخیر در انتقال gRNA تا ۶ ساعت پس از mRNA ممکن است کارآیی ویرایش را افزایش دهد، اغلب هر دو پروتئین Cas9 و gRNA در شرایط آزمایشگاهی تولید می‌شوند و سپس، در یک کمپلکس RNP ترکیب می‌شوند و به صورت واحد به داخل ارسال می‌شوند (Lee *et al.*, 2017). ارسال یک پروتئین غیربومی با منشأ باکتریایی به یک پستاندار ممکن است باعث ایجاد پاسخ‌های ایمونولوژیکی یا ایجاد مسمومیت در صورت عدم نظارت دقیق بر میزان دوز شود (Lee *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2016). پروتئین Cas9 از استرپتوکوک پیوژنز (SpCas9) یک مولکول با بار مثبت با وزن مولکولی 163 کیلو دالتون است. انداۀ بزرگ مولکول یک مشکل برای ورود کارآمد به سلول و هسته است. علاوه بر این، منشأ باکتریایی آن باعث می‌شود که پروتئین Cas9 در انسان ایمونوژن باشد که ممکن است کارآیی ویرایش ژنوم را کاهش دهد و خطر درمان ویرایش ژنوم را افزایش دهد (Crudele *et al.*, 2018). مضاف بر این، فرآیند تخلیص پروتئین هنوز پرهزینه و زمان‌بر است. همچنین، برای اطمینان از خلوص، و حفظ ثبات و فعالیت بیولوژیکی پروتئین Cas9 در طول کل فرآیند تصفیه، فرمولاسیون، حمل و نقل و ذخیره‌سازی به کار قابل توجهی نیاز دارد. استفاده از mRNA یا DNA پلاسمید کد کنندۀ Cas9، می‌تواند از مشکلات مربوط به تولید و خالص‌سازی پروتئین جلوگیری کند و در عین‌حال هزینه را کاهش دهد (Behr *et al.*, 2021). اگر mRNA یا DNA پلاسمید با موفقیت انتقال داده شود، Cas9 می‌تواند در سلول‌های هدف که انتظار می‌رود دستکاری ژن اتفاق بیفتد، تولید شود. با این حال، انتقال درون سلولی هم برای mRNA برهنه و هم برای DNA پلاسمید دشوار است، زیرا آن‌ها ناپایدار هستند و به تنهایی قادر به ورود به سلول‌های هدف نیستند. mRNAها شکننده‌تر و گران‌تر هستند. با این حال، mRNAها خطر جهش‌زایی "درج" بر روی DNA کروموزومی را ایجاد نمی‌کنند (Lee *et al.*, 2017). علاوه بر این، mRNAها نیازی به ورود به هستۀ سلولی ندارند و می‌توانند پروتئین Cas9 را در مکان‌های ریبوزومی سیتوزول تولید کنند. این یک مزیت قابل توجه نسبت به روش DNA پلاسمید است؛ زیرا در روش DNA پلاسمید، ناقل باید به هستۀ سلول انتقال داده شود تا بیان Cas9 را آغاز کند. علاوه بر این، بیان Cas9 با واسطۀ mRNA در مقایسه با روش DNA پلاسمید، خطر اثرات خارج از هدف را نیز کاهش می‌دهد (Behr *et al.*, 2021). روش دیگر برای ارسال Cas9، استفاده از ناقل‌های ویروسی است. در میان بسیاری از ناقل‌های ویروسی، AAVها و لنتی ویروس‌ها پرمصرف‌ترین ناقل‌ها در مطالعات بالینی هستند که به ترتیب در آزمایشات بالینی ژن درمانی in vivo و ex vivo کاربرد دارند (Lattanzi *et al* 2019). ژن‌های Cas9 را می‌توان در ژنوم نوترکیب ناقل‌های ویروسی، مانند ویروس‌های مرتبط با آدنو (AAVs) یا لنتی ویروس‌ها، که در تولید Cas9 در سلول‌های

هدف مهارت دارند، مهندسی کرد. با این حال، نشان داده شده است که تولید طولانی مدت Cas9 در سلول‌های هدف منجر به افزایش اثرات خارج از هدف و ایمنی‌زایی می‌شود (Jinek *et al.*, 2014). ناقل‌های ویروسی همچنین خطر ادغام تصادفی ژن در ژنوم میزبان را به همراه دارند. در نهایت، mRNA، DNA پلاسمید و ناقل‌های ویروسی، همگی به زمان بیشتری برای تولید آنزیم Cas9 در سلول‌های هدف نیاز دارند و در نتیجه باعث تأخیر در عمل می‌شوند. تأخیر ممکن است کارآیی ویرایش ژنوم را در هنگام ارسال محموله کاهش دهد؛ زیرا، sgRNAها ممکن است قبل از ساخته شدن پروتئین Cas9 در سلول تجزیه شوند (Behr *et al.*, 2021). در فرآیند ارسال، باید محموله را از مکانیسم‌های تخریب سلولی، از جمله پروتئازها، RNAasها و لیزوزوم‌ها محافظت کرد و باید به گونه‌ای فرموله شود که ایجاد پاسخ ایمنی را به حداقل برساند (Behr *et al.*, 2021; Jinek *et al.*, 2014). AVVها وکتورهای بسیار کارآمدی برای انتقال محموله و ویرایش ژن هستند، زیرا می‌توانند سلول‌های تقسیم‌کننده و غیرقابل تقسیم را در بافت‌های مختلف تحت تأثیر قرار دهند، حداقل ایمنی‌زایی را ایجاد کنند و هیچ بیماری انسانی شناخته‌شدهٔ مرتبط با آن‌ها نیز گزارش نشده است (Wang *et al.*, 2019). با این وجود، AAVها در هنگام استفاده برای ارسال in vivo CRISPR-Cas9 هنوز دارای نقاط ضعف هستند. یکی از اشکالات مهم آن‌ها محدودیت بسته‌بندی (Packaging) است. این امر ارسال همه با هم (All-in-one) را دچار مشکل می‌کند؛ زیرا SpCas9 خود حدود ۴/۲ کیلوبایت اندازه دارد. از آنجایی که AAVها باید حاوی عناصر تنظیمی ضروری برای بیان ژن باشند، مانند ناحیهٔ پروموتور و سیگنال پلی آدنیلاسیون، ظرفیت بسته‌بندی کوچک باعث مشکلات قابل توجهی می‌شود و کاربرد AAVها را زیر سوال می‌برد (Behr *et al.*, 2021). استفاده از SpCas9 کوتاه‌شده، که اندازهٔ کوچک‌تر دارد و یا استفاده از ارتولوگ‌های Cas9 مانند استافیلوکوکوس اورئوس SaCas9، که اندازهٔ آن حدود ۳/۱ کیلوبایت است می‌تواند به عنوان یک راه حل برای محدودیت بسته‌بندی ناقل‌های AAV مد نظر باشد (Friedland *et al.*, 2015). لنتی ویروس یک ویروس RNA پوشش دار با ژنوم تک رشته‌ای است که به خانوادهٔ رتروویروس‌ها تعلق دارد. مزایای استفاده از لنتی ویروس‌ها برای ژن درمانی in vivo شامل ظرفیت حمل ۱۰ کیلوبایت و بیان طولانی‌تر ژن است. این ناقل‌ها، در مقایسه با AAV ها، ضعف محدودیت بسته‌بندی را ندارند (Ran *et al.*, 2015). بسیاری از انواع ناقل‌های غیرویروسی که برای تحویل پروتئین، ژن و RNAi استفاده می‌شوند، برای تحویل in vivo CRISPR-Cas9 نیز کاربرد دارند. این‌ها شامل لیپوزوم‌ها، نانوذرات لیپیدی (LNPs)، نانوذرات پلیمری، نانوذرات پپتیدی و نانوذرات معدنی هستند که دارای چندین مزیت هستند؛ مانند حداقل ایمنی‌زایی، هزینهٔ پایین نظر تولید در مقیاس بزرگ، توانایی تحویل تمام اجزای یک سیستم CRISPRCas9 به صورت یکجا (all-in-one delivery) و انعطاف پذیری برای تحویل محموله‌های مختلف (RNP، DNA پلاسمید، mRNA، sgRNA) (BEHR *et al.*, 2021).

کاربردهای کریسپر

کریسپر کاربردهای گوناگون و امیدبخشی را به ویژه در حوزهٔ درمانی و کشاورزی به همراه داشته است. این فناوری قابلیت دستکاری ژنوم جهت درمان کامل بسیاری از بیماری‌های ارثی و اکتسابی از جمله سرطان، بیماری‌های متابولیک، بیماری‌های سیستم عصبی و بیماری‌های عفونی و... را دارد. این فناوری یک ابزار تشخیصی امیدوارکننده نیز می‌باشد (Chen *et al.*, 2022). در حوزهٔ کشاورزی و تولیدات گیاهی، ایجاد محصولات کشاورزی مقاوم به آفات مانند تولید برنج طلایی با مقادیر بالای بتاکاروتن (پیش‌سازِ ویتامین A) با استفاده از تکنیک کریسپر انجام شده است (Dong *et al.*, 2020). در حوزهٔ دامپروری، بهبود عملکرد و افزایش تولید دام‌ها مانند ایجاد ماهیچهٔ مضاعف در گوسفند و بز با استفاده از کریسپر گزارش شده است (Wang *et al.*, 2018; Kalds *et al.*, 2022). در دام های شیری با استفاده از کریسپر تغییری در اجزای شیر آن‌ها صورت گرفته است که باعث تولید پروتئین‌های ارزشمند و یا مهار برخی از پروتئین‌های شیر شده است؛ مانند تولید شیر غنی از ملاتونین (Ma *et al.*, 2017). همچنین محققان توانستند گوسفندانی تولید کنند که ژن FGF5 در آن‌ها با استفاده از سیستم کریسپر جهت افزایش تولید پشم ناک اوت شده است (Hu *et al.*, 2017). تولید اندام‌های انسانی در حیوانات (Xenotransplantation) با استفاده از سیستم کریسپر از دیگر کاربردهای این تکنیک می باشد. تولید پانکراس انسانی در گوسفند و تولید کلیه در خوک نشان از قدرت این فناری جهت تولید اندام‌های قابل پیوند دارد (Vilarino *et al.*, 2017; Ryczek *et al.*, 2021). مقاومت گاوها در برابر بیماری سل توسط سیستم کریسپر (Gao *et al.*, 2017) و همچنین، استفاده از کریسپر برای تولید واکسن برای آنفولانزای پرندگان گزارش شده است (Zou *et al.*, 2017). لی و همکاران نشان دادند که جهش در ژن میوستاتین (MSTN)، یک تنظیم‌کنندهٔ منفی رشد عضلانی در

ماهیچه‌های اسکلتی، منجر به افزایش تودهٔ عضلانی در بلدرچین شد (Lee *et al.*, 2020). این تکنیک می‌تواند به افزایش چند قلوزایی و مقاومت در برابر بیماری‌ها نیز کمک کند (Tait-Burkard *et al.*, 2018; Menchaca *et al.*, 2020). همچنین در انتها نویسندگان پیشنهاد می‌کنند با استفاده از سیستم کریسپر احتمالا می‌توان ژنوم باکتری‌های شکمبه را در جهت کاهش گازهای گلخانه‌ای تغییر داد تا حجم گاز متان کمتری تولید شود.

نتیجه‌گیری کلی

در حوزهٔ علوم زیستی، پس از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، ابداع فناوری کریسپر را می‌توان مهم‌ترین تحول در این حوزه دانست. کریسپر یک روش نو پا اما با آینده‌ای روشن در زمینهٔ ویرایش ژنومی است؛ لذا تحقیقات بیشتری باید به منظور اصلاح مشکلات آن صورت پذیرد. تحقیقات در زمینهٔ CRISPR/Cas با سرعت هرچه بیشتر در حال انجام است و این سیستم در آینده به خوبی می‌تواند راه حلی مناسب برای بسیاری از مسائل پزشکی و کشاورزی که ما امروز با آن‌ها مواجه هستیم باشد. این فناوری فرصت‌های بکری ایجاد کرده و می‌تواند فاصلهٔ تکنولوژی بین کشورهای پیشرفته و کشورهای در حال توسعه در زمینهٔ درمان بیماری‌های مختلف و همچنین، کشاورزی را به سرعت پر کند. تمام جنبه‌های این تکنیک کاملا شناخته نشده است، اما به طور کلی، سیستم CRISPR-Cas یکی از انقلابی‌ترین فناوری‌ها در دهه‌های اخیر می‌باشد و کاربردهای بالقوه و مزیت‌های آن و نگرانی‌هایی که در زمینهٔ ایمنی زیستی و زمینه‌های اخلاقی ایجاد کرده است، باید به شدت مورد بررسی قرار گیرد. در حال حاضر، جهان هنوز در سپیده دم این عصر ویرایش ژنتیکی قرار دارد و در آینده فناوری کریسپر بسیاری از علوم را تحت تأثیر قرار خواهد داد. باید از این دوران به عنوان یک فرصت ارزشمند استفاده کرد؛ چرا که بدون شک در آیندهٔ نه چندان دور، در نسل بعدی اصلاح نژاد در دام و طیور، سیستم کریسپر نقش مؤثری خواهد داشت. کشف این سیستم تحولی در توسعهٔ زیست شناسی مولکولی با کاربردهای سودآور در پزشکی و بیوتکنولوژی و کشاورزی و مهندسی ژنتیک و اپی‌ژنتیک ایجاد کرده است. شایان ذکر است که نسل‌های بعد از کریسپر مانند رترون (RETRON) و کریسپر نرم (SOFT CRISPR) ابداع شده است که کارآیی ویرایش ژنوم را بهبود بخشیده است و نشان از پویایی این فناوری دارد. علاوه بر این نویسندگان پیش‌بینی می‌کنند که با ادغام هوش مصنوعی با فناوری کریسپر در آینده، ابزاری بسیار قدرتمندتر ایجاد می‌شود و اکتشافات و فناوری‌های جدید CRISPR درک ما از زندگی و ظرفیت اصلاح ژنتیکی موجودات را بیشتر کند. همچنین این نکته از دید نویسندگان دور نمانده است که احتمالا بین سیستم ایمنی اکتسابی باکتریایی (کریسپر) و سیستم کوئوروم سنسینگ (Quorum sensing) در باکتری‌ها ارتباطی وجود دارد. به عبارت دیگر، نویسندگان پیشنهاد می‌کنند که باکتری‌ها در مواجه با ویروس به صورت منفرد عمل نمی‌کنند و از طریق سیستم کوئوروم سنسینگ برای حمله به فاژ کمک می‌گیرد. به بیانی دیگر، احتمالا، باکتری‌ها، در شناسایی فاژ به صورت هوش تجمعی (collective intelligence) فعالیت می‌کنند و احتمالا بیان ژن‌های Cas1 و Cas2 سیستم دفاعی کریسپر را در باکتری‌هایی که فاقد بیان Cas1 و Cas2 هستند و هنوز با ویروس مواجه نشده‌اند، را تحریک کند.

منابع

Abudayyeh, O.O., Gootenberg, J.S., Essletzbichler, P., Han, S., Joung, J and et al. (2017). "RNA targeting with CRISPR-Cas13." *Nature*, 12, 550(7675), 280-284.

Abudayyeh, O.O., Gootenberg, J.S., Konermann, S., Joung, J., Slaymaker, I.M., and et al. (2016). "C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector." *Science*, 353(6299), 5573.

Al-Attar, S., Westra, E.R., Van Der Oost, J., and Brouns, S.J. (2011). "Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs): the hallmark of an ingenious antiviral defense mechanism in prokaryotes."

Albitar, A., Rohani, B., Will, B., Yan, A., and Gallicano, G. I. (2018). "The application of CRISPR/Cas technology to efficiently model complex cancer genomes in stem cells." *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(1), 134-140.

Alkhnbashi, O. S., Shah, S. A., Garrett, R. A., Saunders, S. J., Costa, F., and et al. (2016). "Characterizing leader sequences of CRISPR loci." *Bioinformatics*, 32(17), i576-i585.

Asaduzzaman, M., Juliana, F. M., Ali, M. H., Parvin, M. J., Hossain, S. I., and et al. (2021). "dnaK GENE EDITING IN THE Escherichia coli GENOME VIA THE CAS9/CRISPR SYSTEM."

Aschenbrenner, S., Kallenberger, S. M., Hoffmann, M. D., Huck, A., Eils, R., and et al. (2020). "Coupling Cas9 to artificial inhibitory domains enhances CRISPR-Cas9 target specificity." *Science Advances*, 6(6), eaay0187.

Barman, A., Deb, B., and Chakraborty, S. (2020). "A glance at genome editing with CRISPR–Cas9 technology." *Current Genetics*, 66(3), 447-462.

Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., and et al. (2007). "CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes." *Science*, 315(5819), 1709-1712.

Behr, M., Zhou, J., Xu, B., and Zhang, H. (2021). "In vivo delivery of CRISPR-Cas9 therapeutics: Progress and challenges." *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 11(8), 2150-2171.

Hu, R., Fan, Z.Y., Wang, B.Y., Deng, S.L., Zhang, X.S., and et al. (2017) "Generation of FGF5 knockout sheep via the CRISPR/Cas9 system." *Journal of Animal Science*, 95(5), 2019-2024.

Hu, J. H., Miller, S. M., Geurts, M. H., Tang, W., Chen, L., and et al. (2018). "Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity." *Nature*, 556(7699), 57-63.

Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., and Nakata, A. (1987). "Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product." *Journal of Bacteriology*, 169(12), 5429-5433.

Jiang, F., and Doudna, J. A. (2017). "CRISPR-Cas9 structures and mechanisms." *Annu Rev Biophys*, *46*(1), 505-529.

Jiang, F., Zhou, K., Ma, L., Gressel, S., and Doudna, J. A. (2015). "A Cas9–guide RNA complex preorganized for target DNA recognition." *Science*, 348(6242), 1477-1481.

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., and et al. (2012). "A programmable dual-RNA–guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity." *Science*, 337(6096), 816-821.

Jinek, M., Jiang, F., Taylor, D. W., Sternberg, S. H., Kaya, E., and et al. (2014). "Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation." *Science*, 343(6176), 1247997.

Kalds, P., Crispo, M., Li, C., Tesson, L., Anegón, I., and et al. (2022). "Generation of Double-Muscled Sheep and Goats by CRISPR /Cas9-Mediated Knockout of the Myostatin Gene." *Methods in Molecular Biology*, 2495, 295-323.

Khalil, A. M. (2020). "The genome editing revolution." *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 18(1), 1-16.

Kleinstiver, B. P., Pattanayak, V., Prew, M. S., Tsai, S. Q., Nguyen, N. T., and et al. (2016). "High-fidelity CRISPR–Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects." *Nature*, 529(7587), 490-495.

Kleinstiver, B. P., Prew, M. S., Tsai, S. Q., Topkar, V. V., Nguyen, N. T., and et al. (2015). "Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities." *Nature*, 523(7561), 481-485

Koonin, E. V., and Makarova, K. S. (2019). "Origins and evolution of CRISPR-Cas systems." *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 374(1772), 20180087.

Koonin, E. V., Makarova, K. S., and Zhang, F. (2017). "Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems." *Current Opinion in Microbiology*, 37, 67-78.

Lattanzi, A., Meneghini, V., Pavani, G., Amor, F., Ramadier, S., and et al. (2019). "Optimization of CRISPR/Cas9 delivery to human hematopoietic stem and progenitor cells for therapeutic genomic rearrangements." *Molecular Therapy*, 27(1), 137-150.

Lee, J., Kim, D. H., and Lee, K. (2020). "Muscle hyperplasia in Japanese quail by single amino acid deletion in MSTN propeptide." *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), 1504.

Bondy-Denomy, J., Garcia, B., Strum, S., Du, M., Rollins, M. F., and et al. (2015). "Multiple mechanisms for CRISPR–Cas inhibition by anti-CRISPR proteins." *Nature*, 526(7571), 136-139.

Chen, G., Wei, T., Yang, H., Li, G., and Li, H. (2022). "CRISPR-Based Therapeutic Gene Editing for Duchenne Muscular Dystrophy: Advances, Challenges and Perspectives." *Cells*, 11(19), 2964.

Chen, J. S., Dagdas, Y. S., Kleinstiver, B. P., Welch, M. M., Sousa, A. A., and et al. (2017). "Enhanced proofreading governs CRISPR–Cas9 targeting accuracy." *Nature*, 550(7676), 407-410.

Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., and et al. (2013). "Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems." *Science*, 339(6121), 819-823.

Crudele, J. M., and Chamberlain, J. S. (2018). "Cas9 immunity creates challenges for CRISPR gene editing therapies." *Nature Communications*, 9(1), 1-3.

Davis, A. J., and Chen, D. J. (2013). "DNA double strand break repair via non-homologous end-joining." *Translational Cancer Research*, 2(3), 130.

Doench, J. G. (2018). "Am I ready for CRISPR? A user's guide to genetic screens." *Nature Reviews Genetics*, 19(2), 67-80.

Dong, O. X., Yu, S., Jain, R., Zhang, N., Duong, P. Q., and et al. (2020). "Marker-free carotenoid-enriched rice generated through targeted gene insertion using CRISPR-Cas9." *Nature Communications*, 11(1), 1-10.

Doudna Jennifer, A., and Charpentier, E. (2014). "The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9." *Science*, 346(6213), 1258096.

Fonfara, I., Richter, H., Bratovič, M., Le Rhun, A., and Charpentier, E. (2016). "The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA." *Nature*, 532(7600), 517-521.

Friedland, A. E., Baral, R., Singhal, P., Loveluck, K., Shen, S., and et al. (2015). "Characterization of Staphylococcus aureus Cas9: a smaller Cas9 for all-in-one adeno-associated virus delivery and paired nickase applications." *Genome Biology*, 16(1), 1-10.

Fu, Y., Sander, J. D., Reyon, D., Cascio, V. M., and Joung, J. K. (2014). "Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs." *Nature Biotechnology*, 32(3), 279-284.

Gao, Y., Wu, H., Wang, Y., Liu, X., Chen, L., and et al. (2017). "Single Cas9 nickase induced generation of NRAMP1 knockin cattle with reduced off-target effects." *Genome Biology*, 18(1), 1-15.

Gilbert, L. A., Larson, M. H., Morsut, L., Liu, Z., Brar, G. A., and et al. (2013). "CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes." *Cell*, 154(2), 442-451.

Guilinger, J. P., Thompson, D. B., and Liu, D. R. (2014). "Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification." *Nature Biotechnology*, 32(6), 577-582.

Hille, F., and Charpentier, E. (2016). "CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance." *Philosophical transactions of the royal society B: biological Sciences*, 371(1707), 20150496.

nucleases with improved specificity." *Science*, 351(6268), 84-88.

Tait-Burkard, C., Doeschl-Wilson, A., McGrew, M.J., Archibald, A.L., Sang, H.M., and et al. (2018). "Livestock 2.0 – genome editing for fitter, healthier, and more productive farmed animals." *Genome Biology*, 19, 204.

Tsai, S. Q., Wyvekens, N., Khayter, C., Foden, J. A., Thapar, V., and et al. (2014). "Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing." *Nature Biotechnology*, 32(6), 569-576.

Vilarino, M., Rashid, S. T., Suchy, F. P., McNabb, B. R., Van Der Meulen, T., and et al. (2017). "CRISPR/Cas9 microinjection in oocytes disables pancreas development in sheep." *Scientific Reports*, 7(1), 1-10.

Wang, D., Tai, P. W., and Gao, G. (2019). "Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery." *Nature Reviews Drug Discovery*, 18(5), 358-378.

Wang, M., Zuris, J. A., Meng, F., Rees, H., Sun, S., and et al. (2016). "Efficient delivery of genome-editing proteins using bioreducible lipid nanoparticles." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(11), 2868-2873.

Yang, G., and Huang, X. (2019). "Methods and applications of CRISPR/Cas system for genome editing in stem cells." *Cell Regeneration*, 8(2), 33-41.

Yao, R., Liu, D., Jia, X., Zheng, Y., Liu, W., and et al. (2018). "CRISPR-Cas9/Cas12a biotechnology and application in bacteria." *Synthetic and Systems Biotechnology*, 3(3), 135-149.

Zetsche, B., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Slaymaker, I. M., Makarova, K. S., and et al. (2015). "Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system." *Cell*, 163(3), 759-771.

Zhang, Z., Zhang, Y., Gao, F., Han, S., Cheah, K. S., and et al. (2017). "CRISPR/Cas9 genome-editing system in human stem cells: current status and future prospects." *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 9, 230-241.

Zhao, Z., Li, C., Tong, F., Deng, J., Huang, G., and et al. (2021). "Review of applications of CRISPR-Cas9 gene-editing technology in cancer research." *Biological Procedures Online*, 23(1), 1-13.

Zou, Z., Huang, K., Wei, Y., Chen, H., Liu, Z., and et al. (2017). "Construction of a highly efficient CRISPR/Cas9-mediated duck enteritis virus-based vaccine against H5N1 avian influenza virus and duck Tembusu virus infection." *Scientific Reports*, *7*(1), 1-12.

Publisher Note

Animal Science Students Scientific Association, Campus of Agriculture and Natural Resources at the University of Tehran

Submit Your Manuscript:

https://domesticsj.ut.ac.ir/contacts?_action=loginForm

Lee, K., Conboy, M., Park, H. M., Jiang, F., Kim, H. J., and et al. (2017). "Nanoparticle delivery of Cas9 ribonucleoprotein and donor DNA in vivo induces homology-directed DNA repair." *Nature Biomedical Engineering*, 1(11), 889-901.

Ma, T., Tao, J., Yang, M., He, C., Tian, X., and et al. (2017). "An AANAT/ASMT transgenic animal model constructed with CRISPR/Cas9 system serving as the mammary gland bioreactor to produce melatonin-enriched milk in sheep." *Journal of Pineal Research*, 63(1), e12406.

Makarova, K. S., Grishin, N. V., Shabalina, S. A., Wolf, Y. I., and Koonin, E. V. (2006). "A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action." *Biology Direct*, 1(1), 1-26.

Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Iranzo, J., Shmakov, S. A., Alkhnbashi, O. S., and et al. (2020). "Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants." *Nature Reviews Microbiology*, 18(2), 67-83.

Marraffini, L. A. (2015). "CRISPR-Cas immunity in prokaryotes." *Nature*, 526(7571), 55-61.

Menchaca, A., Dos Santos-Neto, P.C., Mulet, A.P., and Crispo, M. (2020). "CRISPR in livestock: From editing to printing." *Theriogenology*, 150, 247-254.

Naldini, L., Trono, D., and Verma, I. M. (2016). "Lentiviral vectors, two decades later." *Science*, 353(6304), 1101-1102.

Pannunzio, N. R., Watanabe, G., and Lieber, M. R. (2018). "Nonhomologous DNA end-joining for repair of DNA double-strand breaks." *Journal of Biological Chemistry*, 293(27), 10512-10523.

Paul, B., and Montoya, G. (2020). "CRISPR-Cas12a: Functional overview and applications." *Biomedical Journal*, 43(1), 8-17.

Qi, L. S., Larson, M. H., Gilbert, L. A., Doudna, J. A., Weissman, J. S., and et al. (2013). "Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression." *Cell*, 152(5), 1173-1183.

Ran, F. A. C. L., Cong, L., Yan, W. X., Scott, D. A., Gootenberg, J. S., and et al. (2015). "In vivo genome editing using Staphylococcus aureus Cas9." *Nature*, 520(7546), 186-191.

Ran, F. A. F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., and et al. (2013). "Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system." *Nature Protocols*, 8(11), 2281-2308.

Ryczek, N., Hryhorowicz, M., Zeyland, J., Lipiński, D., and Słomski, R. (2021). "CRISPR/Cas technology in pig-to-human xenotransplantation research." *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 3196.

Shmakov, S., Abudayyeh, O. O., Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Gootenberg, J. S., and et al. (2015). "Discovery and functional characterization of diverse class 2 CRISPR-Cas systems." *Molecular Cell*, 60(3), 385-397.

Slaymaker, I. M., Gao, L., Zetsche, B., Scott, D. A., Yan, W. X., and et al. (2016). "Rationally engineered Cas9

Domestic; 22 (3): 36-48

Scientific-Extensional (Professional) Journal

Domestic

Animal Science Students Scientific Association at the University of Tehran, Winter 2023

https://domesticsj.ut.ac.ir/article_93927.html

Scientific-Extensional Article

An overview of gene editing technology (CRISPR) and its applications in animal science research

Mohamad Reza Hashemi[1*], Younes Doosti[2*], Farnaz Arjmand Kermani[2] and Mohammad Moradi Shahrbabak[3]

[1] Ph.D. Student of Animal and Poultry Breeding & Genetics, Department of Animal Science, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Alborz, Iran

[2] M.Sc. Student of Animal Breeding & Genetics, Department of Animal Science, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Alborz, Iran

[3] Professor of Animal and Poultry Breeding & Genetics, Department of Animal Science, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Alborz, Iran

https://doi.org/10.22059/domesticsj.2023.354410.1116

Abstract

Since the discovery of the helical structure of DNA in 1953, researchers were looking for ways to manipulate the genome. The starting point of the genome editing process began in the 70s with the production of recombinant DNA and the development of genetic engineering and then the commercial production of restriction enzymes. Genome editing refers to the process of targeted modification of the genome and also it is one of the most important advances in genetic engineering in the current century. This technology helped scientists to delete and add or change genetic material to improve performance and create targeted genetic changes in humans, animals, and plants in certain regions of the genome. One of the genome editing tools is the CRISPR system, which has been used as a powerful approach for high-efficiency genome editing in various types of organisms and has created a revolution in biological research. The CRISPR system is an acquired immune system in prokaryotes that protects them against bacteriophages and plasmids. This technique can be used to treat and control genetic diseases, improve the quality of food, make vaccines and drugs, and also to correct and improve the performance of growth and reproduction. In 2020, two scientists named Jennifer Doudna and Emmanuelle Charpentier were awarded the Nobel Prize for inventing the CRISPR technique, which shows the importance and many applications of this technology in the field of medicine and agriculture in the future. This study shows the history, importance, and application of the CRISPR system in animal science to make progress in animal and poultry breeding and take into account ethical standards and animal welfare. This study shows the history, importance, and application of the CRISPR system in animal science to make progress in animal and poultry breeding and take into account ethical standards and animal welfare.

Keyword(s): Agriculture, Animal science, CRISPR, Genome editing

***Corresponding Author E-mail:** m.hashemi1369@ut.ac.ir and y.devisty@ut.ac.ir

Section: Animal and Poultry Breeding & Genetics **Associate Editor:** Dr. Masoumeh Naserkheil

Received: 27 Jan 2023 **Revised:** 11 Mar 2023 **Accepted:** 16 Mar 2023 **Published online:** 17 Mar 2023

Citation: Hashemi, M. R., Doosti, Y., Arjmand Kermani, F., Moradi Shahrbabak, M. An overview of gene editing technology (CRISPR) and its applications in animal science research. *Professional Journal of Domestic*, 2023; 22(3): 36-48.