امیرحسن فرضعلیزاده؛ پژوهشگر تحقیقاتی زیست فناوری پزشکی و سیستم بیولوژی سرطان
دکتر طاهره ناجی؛ دانشیار گروه سلولی و مولکولی، دانشکده علوم و فناوری های نوین

سیر تکاملی ابزارهای ویرایش ژنوم و جایگاه تکنیک CRISPR در ژن درمانی —بخش سوم

مزیت روش سیستم NgAgo نسبت به سیستم CRISPR

۱. نیاز به وجود توالی PAM نیست.

۲. برخلاف CRISPR که تا ۳۷ درجه دما را تحمل می کند، این روش تا ۵۵ درجه را برمی تابد.

۳. تحمل mismatch کمتر که موجب می شود off-target برای این روش به طرز چشمگیری کاهش یابد.

٤. الیگو راهنمای این تکنیک ٢٤ نوکلئوتید است که خود باعث دقت بالاتر این روش می شود.

۵. اندازه کوچک NgAgo (۸۸۷ اسیدآمینه) مزیتی است برای حمل آن، توسط ویروس هایی نظیر AAV که ظرفیت انتقال ژن کمی دارند.

با همه ی این مزایا بهره وری از سیستم NgAgo برای مهندسی ژنوم در شرایط In vivo/vitro همچنان نیازمند بررسی بیشتری است، زیراکه برپایه ی گزارش های علمی، با کارکرد ناموفق آن از سوی پژوهشگران در مجله «Protein and Cell» گویای این است، که این سیستم در شمار فراوانی از سلول‌ها و موجودات، در چندین آزمایشگاه قابل انجام نبوده است. سپس در ماه نوامبر ۲۰۱٦، به دلیل مشکلات عدم قابلیت بازتولید، مجله‌ی نیچر بیوتکنولوژی بیانیه مربوط به Retraction Watch را منتشر کرد.

راهکارهای درمانی بر پایه ویرایش ژنوم

کاربردهای درمانی سیستم CRISPR

بی گمان فناوریCRISPR یک پیشرفت اساسی در زمینه ویرایش ژنوم به شمار می آید. برای نخستین بار در سال ۲۰۱۲ ابزار ویرایش ژنوم CRISPR/Cas9 به گونه ی موفقیت آمیز برای ویرایش ژنوم در سلول های کشت شده انسانی استفاده شد. پس از آن در باره ی موجودات زیادی مانند مخمر نانوایی، ماهی زبرا، مگس میوه، نماتدها، موش، گیاهان و چندین موجود دیگر نیز به کار گرفته شد. دو تحقیق در سلول های بنیادی در دسامبر ۲۰۱۳ نشان داد، که این ابزار در آزمایشگاه بسیار مفید است- همچنین می تواند راه خود را به سیستم درمان پیدا کند.

کریسپر برای نجات از ناهنجاری های تک ژنی

یک تیم تحقیقاتی تحت رهبری جینسونگ لی در سال ۲۰۱۳ از آکادمی علوم چینی با بیان این که CRISPR-Cas9 برای ایجاد جهش در طیف وسیعی از موجودات استفاده شده، اما پتانسیل آن برای مقابله موثر با بیماری ها هنوز مشخص نشده است، تصمیم به کشف پتانسیل این روش در موش ها با اختلال آب مروارید غالب، گرفتند که علت آن یک نسخه از یک ژن شناخته شده به نام Crygc است. آنها دریافتند که موش‌های دارای جهش غالب در یک ژن که باعث آب مروارید می شود، توسط تزریق mRNA CAS9 و یک gRNA که آلل جهش یافته را در زیگوت ها هدف قرار می‌دهند، نجات می یابند. این تیم تحقیقاتی بیماری ٢٤ موش را درمان کردند.

یک تیم مستقل نیز به رهبری هانس کلور در سال ۲۰۱۳ از موسسه Hubrecht در هلند، از سیستم ویرایش ژنوم

CRISPR–Cas9 برای اصلاح تنظیم کننده هدایت تراغشایی فیبروز سیستیک(CFRT) استفاده کردند. آنها از روش همولوژی نوترکیب در کشت سلول های بنیادی روده ای بیمار مبتلا به فیبروز سیستیک استفاده کردند. جرالد شوانک، نخستین نویسنده گزارش درمان بیماری فیبروزسیستیک، ابراز داشت که «کریسپر در سلول های بنیادی بالغ پتانسیل بالایی دارد، زیرا ژنوم سلول های بنیادی بالغ در کشت های ارگانوئید پایدار هستند». با این وجود، فیبروز سیستیک شاید بهترین گزینه برای ژن درمانی نباشد، زیرا این بیماری روی اندام های مختلفی تاثیر می گذارد. به هر حال، یافته های این دو تیم تحقیقاتی یک اصل کلی در استفاده از کریسپر در اصلاح اختلالات تک ژنی به وجود آورد.

درمان موش DMD به روش CRISPR

با مشاهده موفقیت کریسپر در پژوهش های پایه، محققان مشتاق به کاربرد آن در محیط بالینی شدند. کریسپر بیشتر برای اصلاح سلول های جنسی در حیوانات استفاده می شود، اما تاکنون برای درمان بیماری پس از زایمان استفاده نشده است. به تازگی، سه مقاله هم زمان در مجله Science منتشر شده که نشان داده‌اند کریسپر می تواند یک بیماری ژنتیکی را در مدل موشی پس از تولد درمان کند که خود یک سند مهم برای اندیشیدن به کارهای پیش بالینی و بالینی در آینده است. بیماری ژنتیکی دیستروفی عضلانی دوشن(DMD) یک ناهنجاری مغلوب وابسته با کروموزوم X است که از هر ۵۰۰۰ نفر از مردان، یک نفر به آن دچار هستند. DMD بیشتر با جهش تغییر غالب در پروتئین دیستروفین ایجاد می شود. بدون عملکرد دیستروفین، از بین رفتن عضلات پیش رونده مشاهده می شود، که منجر به مرگ در حدود ۳۰ سالگی می گردد. DMD نسبت به سایر بیماری های ژنتیکی که با کریسپر درمان می شوند، ساده تر است و می توان آن را با ویرایش با واسطه‌ی NHEJ درمان کرد. محققان DMD(Duchenne muscular dystrophy) با مشاهده موفق بودن روش پرش اگزون توسط کریسپر در موش، بسیار هیجان زده شده و این روش ممکن است برای تعدادی از بیماری های ژنتیکی نادر ناشی از نقص پیرایش (Splicing) از جمله گشادشدگی مویرگ ها(Ataxia telangiectasia)، اختلال مادرزادی گلیکوزیله شدن (Congenital disorder of glycosylation) و بیماری نیمن پیک (Niemann–Pick) نوع C نیز قابل استفاده باشد و این مطالعات گام مهمی در جهت مطالعات بالینی است. سایر بیماری های مونوژنیک مانند کمخونی سلول های داسی شکل و بتا تالاسمی، اغلب به عنوان اهداف بالقوه کریسپردرمانی در نظر گرفته می شود. علی رغم تحقیقات انجام شده در مورد DMDموش، هنوز درمان کارآمد برای DMD انسانی با چالش هایی روبرو است

درمان بیماری های عفونی_ویروسی با استفاده از CRISPR

CRISPR Cas9 قابلیت تبدیل شدن به یک عامل درمانی به منظور درمان ناهنجاری های ژنتیکی و عفونت های ویروسی را دارد. با توجه به اینکه قبل از ارائه کریسپر، در ابتدا ویرایش ژنوم HIV-1 با استفاده از ZFNs و TALENs بر روی گیرنده CCR4 انجام می شد محققان علاقمند به برش ژنوم HIV–1 در سلول های آلوده شدند تا با استفاده از سیستم CRISPR Cas9 کارایی ویرایش ژنوم بهبود و اثرات غیر هدفمند(Off–target) را کاهش دهند و از عفونت مجدد سلول ها به HIV-1 جلوگیری کنند.

در این سال ها دو تیم تحقیقاتی با استفاده از طراحی gRNAهای چندمنظوره برعلیه ناحیه long–terminal repeat promoter (LTR) مربوط به ژنوم HIV–1، موفق به کاهش معنی دار بیان آنها در سلول های آلوده انسانی شدند. HIV–1 سلول های سیستم ایمی بدن، به ویژه سلول های CD4 را آلوده می کند و در نهایت منجر به سندرم نقص ایمنی اکتسابی (ایدز) در افراد غیر درمان شده می شود. بیش از ۲۵میلیون نفر در سراسر دنیا در حال حاضر مبتلا به ویروس HIV–1 هستند. امروزه HIV–1 را می توان با درمان ضدرتروویروسی(Antiretroviral therapy) کنترل کرد تا ویروس قابل تشخیص در خون باشد. اما ویروس به طور کامل ناپدید نمی شود و در سلول های آلوده پنهان می شود. محققان برای درمان واقعی HIV–1، این مخازن ویروسی پنهان را از بین ببرند و کریسپر ممکن است راهکارهای نوینی برای انجام این کار مشکل، پیش روی دانشمندان قرار دهد. اخیرا آزمایشگاه تخصصی در دانشگاه Temple دو روش بالقوه با رهبری Zhang و Kaminski برای درمان HIV–1 با کریسپر را نشاده داد است که یکی استفاده از CRISPR/gRNA–direct synergistic activation mediator (dCas9–SAM) برای فعال کردن رونویسی HIV–1 و از

بین بردن سلول های آلوده است و دیگری با استفاده از نوع وحشی Cas9 برای حذف ژنوم HIV-1 از سلوهای آلوده است. نتایج آزمایشات تکثیر PCR و توالی یابی نمونههای جمعآوری شده نشان داد که بیشتر ژنوم HIV-1 برش خورده و تنها بخش کوچکی از LTRها باقی ماندهاند که به یکدیگر متصل شدهاند. جمعیت سلول های بیانی کلونال CRISPR/gRNA نیز از ابتلا بهHIV-1 ایمن بودند. هر دوی این روش ها پیشرفت های هیجان انگیزی در تحقیقات قبل از بالینی HIV-1 که باید در مدل های حیوانی دنبال شود نشان می دهند. ولی با این حال موانع و مشکلات خاصی هم پیش روی این روش ها هست و هیچ پتانسیلی برای برش DNA نا به جا وجود ندارد. شاید برش مستقیم HIV-1 اجازه دهد T-cellها زنده بمانند، اما پیشگیری از عفونت نیازمند بیان تقویتی CRISPR/gRNA است، که می تواند منجر به افزایش میزان برش های غیر هدفمند شود. به طور کلی این روش ها جهت انجام کار در یک مدل حیوانی با سه مانع مواجه هستند: ۱- رسانش کریسپر به تمام سلول های هدف. که ممکن است این هدف به دلیل مخازن ویروسی در چندین اندام، دشوار باشد. ۲-توالی یابی اختصاصی ژنوم بیماران HIV-1 به روش کریسپر. که بایستی gRNAهای کریسپر اتصال اختصاصی به DNA هدف را داشته باشند. ۳- مقاومت HIV-1 در برابر درمان با کریسپر. که این کار را ممکن است از طریق جهش های PAM یا جهش های سلولی انجام دهد. به منظور مبارزه با این مشکل می توان gRNAهای متعدد طراحی و استفاده کرد، درست همانطوری که در روش ATR داروهای متعددی برای کاهش بروز مقاومت استفاده می کنند.

علی رغم مشکلات بالقوه در ترجمه این یافته ها به درمان، هنوز بحث های چالش برانگیز و مبهمی پیش روی درمان های احتمالی و قطعی HIV-1 است ولی دریچه های امید بخشی را در مسیر درمان HIV-1 و سایر عفونت های ویروسی، به ویژه هپاتیتB که بیش از ۲۵۰میلیون نفر را در سراسر دنیا آلوده کرده است، پیش روی دانشمندان قرار داده است.

محدودیت استفاده از CRISPR در ژن درمانی

برپایه ی کارهای علمی دانشمندان مهندسی ژنوم، در آینده نزدیک از کریسپر برای درمان بیماری های مختلف ژنتیکی بهره وری خواهد شد. ولی همچنان «محدودیت پتانسیل اثرات نا هدفمند،چشمگیر است» که باید حل شود. بسیاری از پرسش های بنیادی در مورد CRISPR/Cas9 وجود دارد، که هنوز به آن پاسخ داده نشده است. این جزیئات علمی همچنان تمرکز اصلی آزمایشگاه های تخصصی مهندسی ژنوم است. این نگرش برای توانایی دانشمندان جهت تاثیرگذاری بر کارایی ویرایش ژنوم، حیاتی خواهد بود.

مسیرهای آینده و موانع ویرایش بالینی CRISPR

پتانسیل کاربردی CRISPR/Cas9 در ژن درمانی بسیار شگفت انگیز است، اما کاربرداین سیستم در in vivo همچنان دارای نارسایی های است. استراتژی های in vivo و ex vivo در درمان بیماری ها با سیستم ویرایش ژنوم CRISPR/ Cas9، با مشکلات و محدویت های خاصی همراه است. استراتژی ex vivo بدین مفهوم است، که سلول های بیمار از بدن موجود هدف خارج شده و سپس ویرایش های ژنومی مورد نظر بر روی آنها با استفاده از CRISPR Cas9 انجام می شود و درپایان سلول های سالم به بدن موجود تزریق می شود.

اگر چه پژوهش رویDMD نشاندهندهی گام مهمی در پیشروی کریسپر در ژن درمانی است، اما باید توجه داشت که، DMD نسبت به سایر بیماری های ژنتیکی که با کریسپر درمان می شوند، ساده تر است. همچنان که در بالا اشاره شد، DMD را می توان با ویرایش با NHEJ درمان کرد، اما بیشتر بیماری های دیگر نیاز به ویرایش دقیق HDR متناسب با جمعیت کوچکتر بیمار دارند. برای این که درمان DMD با کریسپر به درمان بالینی نزدیکتر شود، باید کارهای زیادی انجام شود. در آغاز انتقال کریسپر باید بهینه سازی شود: ۱- به تعداد زیادی از سلول های عضلانی در سراسر بدن، به خصوص سلول های بنیادی، رسانش شود. ۲- هر گونه ایمنیزایی از وکتور AAV حذف شود.

هنگامی که انتقال بهینه شد، مهم است که تعیین شود چه مدت فنوتیپ نجات یافته ماندگاری دارد، و آیا پایداری ماندن آن طولانی است؟. برای این کار بایستی اثرات نهفته ی ناهدفمند در عضلات و مشابه آن در طول یک دوره طولانی بررسی شود. برای کاهش ویرایش ناهدفمند، باید بیان Cas9 با دقت بررسی شود. بیان کوتاه مدت کریسپر به طور ویژه مطلوب خواهد بود، زیرا این امر می تواند پتانسیل ویرایش ناهدفمند را در طول زمان کاهش دهد، اما این روش نیاز به ویرایش سلول های بنیادی قوی برای حفظ فنوتیپ مورد نظر را دارد.

پیشرفت های روز افزون در زمینه یDMD، چالش های ویرایش در درمان آن را امکان پذیر می کند. اگر ایمنی و کارایی این روش بهینه شود، DMD می تواند یکی از اولین بیماری های بالینی باشد که با کریسپر درمان می شود. بسیاری از موانع برای ویرایش ژن با کریسپر همچنان باقی مانده است، اما با توجه به سرعت پیشرفت تکنولوژی، روش های ویرایش دقیق نیز ممکن است نزدیکتر از انتظار باشند.

تنگناهای اخلاقی کاربرد کریسپر در ویرایش ژنوم انسان

باتوجه به پتانسیل و اختلاف نظر در مورد کریسپر، آکادمی ملی علوم و آکادمی ملی پزشکی آمریکا یک ابتکار جدید برای کمک به سیاستگزاران، محققان/ پزشکان و مردم جهت درک فناوری ویرایش ژنوم انسان و پیامدهای آن، با هدف اطلاع رسانی و تصمیم گیری منطقی در مورد این فناوری، انجام داده است. یکی از بخش های مهم این برنامه، اجلاس جهانی در زمینه اصلاح ژن انسان است که به طور مشترک توسط دانشگاه های آمریکایی، آکادمی علوم چینی و انجمن سلطنتی انگلیس در دسامبر ۲۰۱۵ برگزار شد. این کمیته اظهار داشت که تحقیقات پایه/پیش بالینی در زمینه ویرایش هر دو نوع سلول سوماتیک و جنسی باید با قواعد مناسب ادامه یابد. درمورد ویرایش سلول های جنینی/جنسی، این سلول ها نباید برای ایجاد حاملگی استفاده شوند. در ادامه، کاربردهای بالینی سلول های سوماتیک مطرح شد، پاسخ کمیته در این باره، بسیار امیدوارکننده و بر ارزش بالای نهفته آن اشاره شد. با این حال، این بیانیه تاکید می کند که خطراتی مانند ویرایش ناهدفمند باید همراه با مزایا بیان و در چهارچوب قانونی برای ژن درمانی انجام شود. تحقیقات بیشتر در بهبود ویرایش کریسپر، کمک خواهد کرد که برنامه های کاربردی بالینی سوماتیک به واقعیت نزدیک تر شود. اگر چه در شرایط In vivo، ویرایش ژن هایی که موروثی نیستند، نسبتا خوب انجام شده است ولی ویرایش سلول های جنسی بالینی همچنان بسیار بحث براگیز باقی مانده است. کمیته اجلاس بین المللی می نویسد که «هرگونه ادامه استفاده بالینی از ویرایش سلول های جنسی غیر مسئولانه است، مگر اینکه مسائل مربوط به ایمنی و اثر بخشی آن حل شود و اجماع وسیع اجتماعی در مورد مناسب بودن برنامه پیشنهاد شود. «این نگرانی ها صرفا مربوط به سلامت نیستند بلکه شامل پرسش های عمیق اجتماعی، معنوی و اخلاقی نیز می شوند.

همان گونه که برخی از دانشمندان پیش بینی کرده اند، این بیانیه از ممنوعیت کامل ویرایش سلول های جنسی حمایت نمی کند، اما پیشنهاد می کند که احتمال ویرایش سلول های جنسی را باید به عنوان «پیشرفت دانش علمی و دیدگاه های اجتماعی تکامل یافته» به صورت دوره ای بازبینی شود. جهت اطلاع پژوهشگران در همین چند ماه پیش(Nov ۲۷, ۲۰۱۸) یک دانشمند چینی(Jiankui He) که دو نوزاد دختر را در دوره جنینی به خاطر ابتلا به HIV-1، ژن CCR5 آنها را به روش فناوری کریسپر حذف و دستکاری ژنتیکی کرده بود، از سوی دولت چین دستور بازداشت خانگی گرفت و شاید حکم اعدام برای این دانشمند صادر شود. شاید هدف پژوهشگران از این آزمایش، به دنیا آوردن نوزادان سالم مقاوم در برابر ویروس ایدز و ارائه بینش‌های جدیدی برای از بین بردن بیماری‌های ژنتیکی در رحم انسان باشد، ولی به خاطر منع جهانی دستکاری ژنتیکی انسان، انجام هرگونه آزمایشات بالینی بر روی سلول های جنسی ممنوع و دستورات قضایی سختی بر علیه آنها صادر می شود.

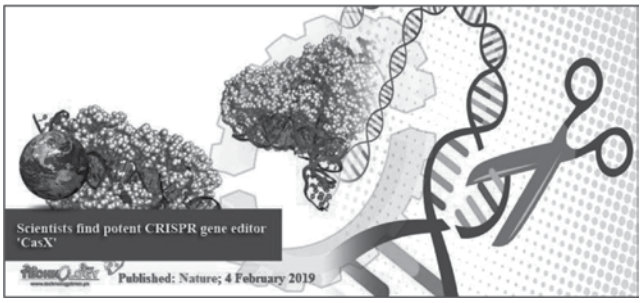
پژوهش های بیشتر و دسترسی به بررسی های دانشمندان دیگر

امروزه کمابیش بر هیچ پژوهشگر در حوزه علوم بیولوژی مولکولی و مهندسی ژنتیک پوشیده نیست که تکنولوژی CRISPR ابزاری توانمندی است برای ویرایش ژنوم موجودات مختلف و راهکار درمانی اطمینان بخشی در ژن درمانی است. چاپ بیش از هزاران مقاله از سال ۲۰۱۰ تا کنون در این حوزه، برهان روشنی بر اهمیت این فناوری استراتژیک در جهان است. زیبایی این فناوری در آن است که شاید بتوان گفت که با هر مدل و جستارهای بیولوژی قابل انطباق است. برای دیدن و پی بردن به حجم گسترده پژوهش های انجام شده با سیستم کریسپر در سرتاسر دنیا، کافی است به شرکت های معتبر توسعه دهنده این فناوری مراجعه شود. شرکت «Addgene»پیشرو در توسعه فناوری کریسپر، محققان را قادر می سازد که به موفقیت های آزمایشات قبلی دانشمندان دستیابی داشته باشند و با طراحی کیت های تخصصی CRISPR/Cas9.CRISPR/Cpf1 و آنزیم ها و وکتورهای متنوع و توسعه ابزارهای بیوانفورماتیکی،

نیازهای دانشمندان را در این حوزه بر آورده سازد. البته منابع مطالعاتی دیگری هم وجود دارد که می تواند مورد استفاده پژوهشگران عزیز قرار گیرد.

آخرین یافته ها در سیستم های ویرایش ژنوم کریسپر

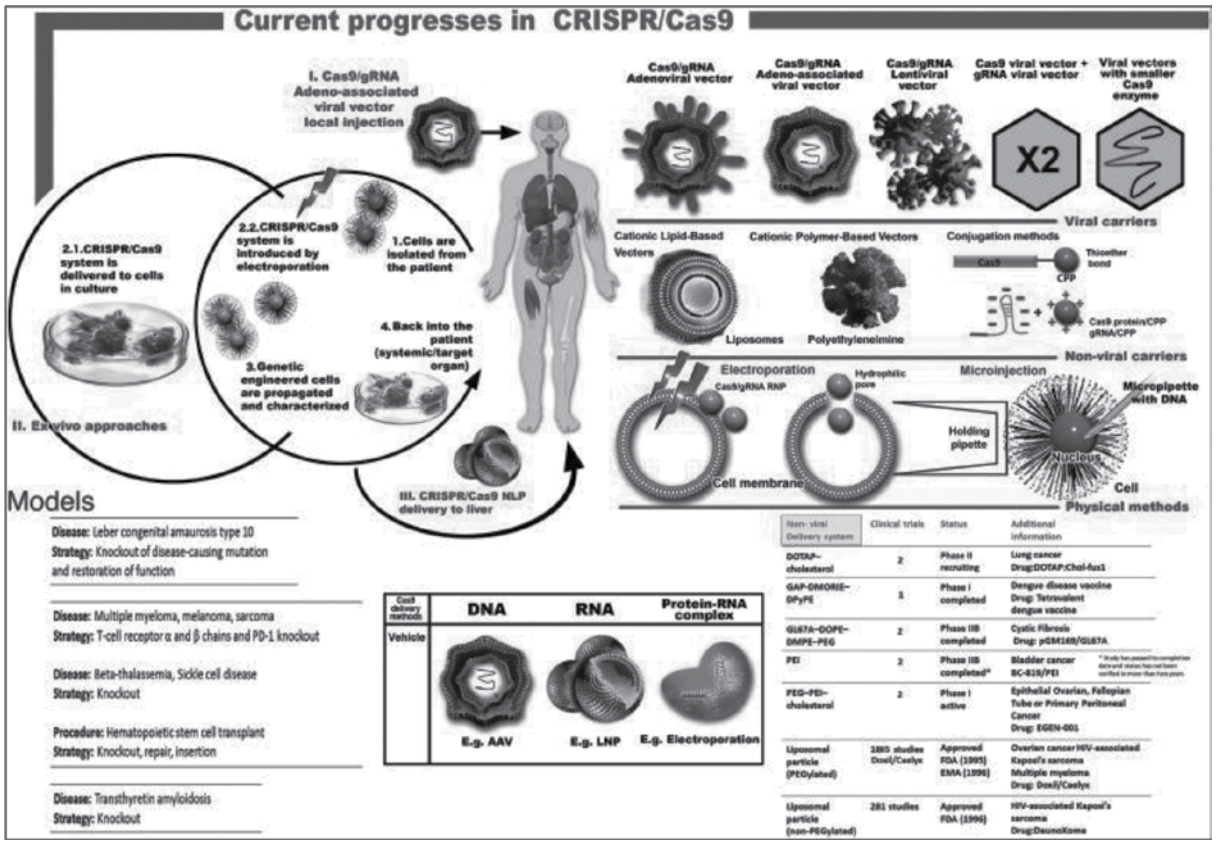
محققان دانشگاه UC–Berkeley در ٤فوریه۲۰۱۹ آنزیم جدیدی موسوم به CasX را برای ویرایش و برش ژن در فناوری کریسپر شناسایی کرده اند. بررسی های تازه نشان داده که زوج های دیگری به جزCRISPR/Cas9 همانند CRISPR/Cas12a،CRISPR/Cas12b نیز پاسخ های خوبی در ویرایش ژنوم پس داده اند. اکنون محققان دانشگاه یوسی برکلی، یک نامزد جدید بهنام CasX را آزمایش کرده اند، که به نظر می رسد دارای چندین مزیت مهم است. آنزیم CasX نسبت به زوج های قبلی خود از لحاظ اندازه بسیار کوچکتر است که به آن کمک می کند تا راحت تر به داخل سلول ها نفوذ کند. از آنجایی که این گونه، جدا از گونه های باکتری است که در انسان یافت نمی شود، کمتر احتمال دارد باعث پاسخ ایمنی در بدن بیماران شود، چیزی که دغدغه طولانی مدت محققان در مورد Cas9 بوده است. بنجامین اُکس، یکی از نویسنده های اصلی این پژوهش، ابراز داشت که اندازه کوچک CasX کمک می کند تا ابزارهای ویرایش ژنوم را بهتر و سریع تر برای اهدافمان توسعه دهیم. این تحقیق در٤ فوریه ۲۰۱۹ در مجله Nature به چاپ رسید. (شکل-۱)



شکل۱- آنزیم CasX، جدیدترین آنزیم کشف شده در فناوری کریسپر توسط محققان دانشگاه یوسی برکلی.

نتیجه گیری، چشم انداز آینده فناوری کریسپر

علی رغم پیشرفت های بزرگ در طراحی نوکلئازهای اختصاصی، ترجمه فناوری های ویرایش ژنوم به بالین هنوز نیازمند بهبود کارایی و اختصاصیت است. درمان بر پایه ویرایش ژنوم می تواند از طریق روش های مختلفی مانند اصلاح یا غیرفعال کردن جهش های مخرب، القای جهش های محافظت‌کننده، افزودن ژن های درمانی و یا تخریب DNA ویروسی انجام شود. فناوری کریسپر هنوز در دوران طفولیت خود است و راه طولانی برای توافق جوامع علمی در مورد چگونگی استفاده از این ابزارها، مخصوصا در مورد ویرایش سلول های جنسی بالینی در پیش دارد. با وجود پیشرفت سریع در تکامل سیستم CRISPR/Cas9 تولید داروهای نوترکیبِ مبتنی بر ژنوم با استفاده از این سیستم در آینده نزدیک چندان دور از انتظار نیست. در حقیقت برخی شرکت ها مانند Editas Medicine و CRISPR Therapeutics با هدف استفاده از سیستم CRISPR/Cas9 در جهت تولید عوامل درمانی هدفمند تاسیس شده اند. تاسیس بیش از ده ها شرکت مهم در امریکا، اروپا و آسیا از سال ۲۰۱٤ تاکنون با محوریت درمان بیماری های ژنتیکی انسانی با استفاده از تکنولوژی CRISPR/Cas9 امید بخش افق های تازه‌ای در درمان بیماری های مهلک ژنتیکی مانند دیستروفی عضلانی دوشن، بتا تالاسمی، بیماری لِبر(LCA) آموروزیس مادرزادی یا عفونت های ویروسی مانند HIV و هپاتیت و انواع بیماری های سرطانی است. در آینده ممکن است کریسپر جایگزین یا تکمیل تکنیک های ویرایش ژنوم قبلی در کشاورزی شود، اما تنظیم مقررات استفاده از کریسپر در گیاهان و حیواناتی که به منظور مصرف انسان مورد استفاده قرار می گیرند، احتمالا ساده نیست، و هنوز زمان می برد که متوجه شد دولت ها چگونه با این فناوری نوین و مخرب، سازگار خواهند شد. ما امیدواریم در کشور عزیزمان هم با تامین ابزارهای ویرایش ژنوم برای پژوهشکده های تحقیقاتی، محققان ایرانی هم سهم کوچکی در پیشرفت این تکنولوژی نوظهور در پروژه های تحقیقاتی و خصوصا در درمان برخی بیماری های ژنتیکی و سرطانی داشته باشند. (شکل-۲) خلاصه پیشرفت های انجام گرفته با فناوری CRISPR/Cas9 تا سال ۲۰۱۸ را نشان می دهد.



شکل۲- خلاصه پیشرفت های در حال حاضر با فناوری سیستم CRISPR/Cas9 تا سال ۲۰۱۸

منابع:

1- Feng Guo, Deshmukh N. Gopaul, Gregory D. Van Duyne. «Structure of Cre recombinase complexed with DNA in a site-specific recombination synapse.» Published 1997 in Nature. DOI:10.1038/37925.

2. Grissa, Ibtissem, Vergnaud, Gilles and Pourcel, Christine. s.l. «The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats».: BMC Bioinformatics, May 23, 2007, Vol. 8, p. 172.

3. Makarova, Kira S, et al. s.l. «Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems». Nature Reviews Microbiology, Jun 2011, Vol. 9, pp. 467-477.

4.Gasiunas, Giedrius, et al. s.l. : «Cas9–crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria». PNAS, September 4, 2012, Vol. 109, pp. E2579-E2586.

5. Zhang, Feng, Wen, Yan and Guo, Xiong. 1, s.l. «CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges». Human Molecular Genetics, March 17, 2014, Vol. 23.

6- Jennifer A. Doudna, Emmanuelle Charpentier, «The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9». Science 28 Nov 2014:Vol. 346, Issue 6213, 1258096. DOI: 10.1126/science.1258096

7- Cathomen T, Hirsh M, Porteus M,» Genome Editing The Next Step in Gene Therapy Therapy.» American Society of Gene & Cell Therapy. Springer-Verlag New York, 2016. E-Book ISBN: 978-1-4939-3509-3. DOI: 10.1007/978-1-4939-3509-3

8- Ablain J, Durand EM, Yang S, Zhou Y, Zon LI, 2015. A CRISPR/Cas9 vector system for tissue-specific gene disruption in zebrafish. Developmental cell 32, 756-64.

9- Al-Attar S, Westra ER, Van Der Oost J, Brouns SJ, 2011. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs): the hallmark of an ingenious antiviral defense mechanism in prokaryotes. Biological chemistry 392, 277-89.

10- Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, et al., 2008. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. Science 321, 960-4.

11- Daneshvar K, 2015. CRISPR-Cas9 in gene therapy: much control on breaking, little control on repairing. In.: PeerJ PrePrints.

12- Gao, Feng; Shen, Xiao Z; Jiang, Feng; Wu, Yongqiang; Han, Chunyu (2016). «DNA-guided genome editing using the Natronobacterium gregoryi Argonaute». Nature Biotechnology. 34 (7): 768–773. Doi:10.1038/nbt.3547. PMID 27136078.

13- Wu Y, Liang D, Wang Y, Bai M, Tang W, Bao S, Yan Z, Li D, Li J. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. Cell stem cell. Dec 5, 2013;13(6):659-62

14- Schwank G, Koo BK, Sasselli V. et al, "Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients," Cell Stem cell.2013;13(6):653-8

15- Ousterout DG, Kabadi AM, Thakore PI, Majoros WH, Reddy TE, Gersbach CA.Multiplex CRISPR/Cas9-based genome editing for correction of dystrophin mutations that cause Duchenne muscular dystrophy. Nature Communications. 2015 Feb 18;6:6244. doi: 10.1038/ncomms7244.