استفاده از سیستم CRISPR/Cas۹ مبتنی بر فناوری نانو برای درمان سرطان

۱- مهرآور مهری ۲- سعید رضایی زارچی

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوفیزیک دانشگاه پیام نور تفت
۲- استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور تفت

Email: mehravarmehri@gmail.com
Email: srezaei_۲۰۰۶@yahoo.com

چکیده

CRISPR/Cas۹ پروتئینی می باشد که با تکرارهای کوتاه پالیندرومیک با فاصله منظم خوشه ای بعنوان یک فناوری قوی برای ویرایش ژن شناخته می شود. و هدف از این پژوهش استفاده از سیستم CRISPR/Cas۹مبتنی بر فناوری نانو برای درمان سرطان که شامل تغییرات ژنتیکی متعدد است، می‌باشد. در این پژوهش ما به بررسی مکانیسم های CRISPR/Cas۹ پرداخته و کاربرد آن برای درمان سرطان را ارائه می دهیم. ما موانع دشوار برای تحویل CRISPR/Cas۹ در داخل بدن را شرح می‌دهیم و راه‌حل‌های نسبی را برای کپسوله‌سازی، تحویل هدف، رهاسازی کنترل‌شده، درونی‌سازی سلولی و فرار آندوزومی مورد بحث قرار می‌دهیم.

کلمات کلیدی: CRISPR/Cas۹، سرطان، نانوذرات، درمان.

۱. مقدمه

سرطان به عنوان یکی از کشنده ترین بیماری ها زندگی انسان را به شدت تهدید می کند [۱]. تاکنون، بسیاری از روش‌های درمانی، از جمله پرتودرمانی، شیمی‌درمانی یا جراحی، برای درمان سرطان استفاده شده‌اند، اما فراوانی عود بالا و مقاومت شیمی درمانی/رادیویی معمولاً منجر به اثر درمانی ضعیف می‌شود. به خوبی ثابت شده است که ژنتیک با تجمع جهش های ژنتیکی و اپی ژنتیکی متعدد نقش مهمی در پاتوژنز و رشد سرطان ایفا می کند [۲]. پایگاه داده کاتالوگ جهش های جسمی در سرطان تأثیر مستقیم بیش از ۶۰۰ جهش در تومورهای انسانی را برجسته می کند [۳]. بنابراین، برای اصلاح یا غیرفعال کردن جهش ژنی در سلول سرطانی باید روش جایگزینی برای درمان سرطان ارائه شود و ابزاری که بتواند به طور خاص ویرایش ژنتیکی را با دقت بالا القا کند، مورد نیاز است [۴].

در حال حاضر، یک فناوری ویرایش ژن جدید به نام CRISPR/Cas۹ مرتبط با تکرار پالیندرومی کوتاه و منظم در فضای بین‌فضایی خوشه‌ای (CRISPR/Cas۹) کشف و توسعه یافته است [۵]. در این سیستم، اندونوکلئاز Cas۹ به‌طور دقیق توسط یک RNA راهنمای منفرد (sgRNA) به سمت مکان‌های هدف هدایت می‌شود و سپس شکستگی‌های دو رشته‌ای DNA (DSBs) را تولید می‌کند که منجر به اصلاح ژنومی مکان خاص می‌شود. در مقایسه با روش‌های مرسوم ویرایش ژن، از جمله ZFNs (نوکلئازهای انگشت روی) و TALENs (نوکلئازهای موثر مانند فعال‌کننده رونویسی)، ویرایش ژن با واسطه CRISPR/Cas۹ انعطاف‌پذیرتر، مؤثرتر و دقیق‌تر است [۶]. از زمان اولین کاربرد آن در سلول‌های پستانداران در سال ۲۰۱۳ [۷]، فناوری CRISPR/Cas۹ به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است و کاربرد آن از تغییر ژن در سلول‌ها به ارگانیسم‌ها گسترش یافته است [۸]. نقش بالقوه CRISPR/Cas۹ در ژن درمانی، آن را به یکی از داغ‌ترین گلدان‌ها در درمان سرطان تبدیل کرده است. مفاهیم مختلف درمان سرطان با واسطه CRISPR/Cas۹، از جمله دستکاری ژن‌های مرتبط با تومور، ایمونوتراپی تومور، مدل‌سازی تحقیقات تومور و غلبه بر مقاومت دارویی ضد سرطان در انواع مختلف سرطان ایجاد شده است [۹].

پیشرفت بی‌سابقه اخیر در به‌اصطلاح فناوری‌های ویرایش ژن، تبدیل این مفهوم آرمان‌شهری را به داروهایی که در کلینیک‌ها استفاده می‌شود، تبدیل کرده است. جدیدترین پیشرفت‌ها در توانایی مهندسی ژنوم‌ها از درک بنیادی زیست‌شناسی زیربنای عملیات رمزگذاری سیستم ایمنی پروکاریوتی که پروتئین CRISPR/Cas نیز نامیده می‌شود، نشات می‌گیرد (CRISPR: تکرار کوتاه پالیندرومی با فواصل منظم خوشه‌ای). سیستم CRISPR/Cas در باکتری ها و باستانی ها برای محافظت از ژنوم آنها در برابر ویروس ها و پلاسمیدها عمل می کند [۱۰]. تجزیه و تحلیل تکاملی توالی DNA ژنومی زیرین، سه نوع اصلی سیستم CRISPR/Cas را متمایز کرد: نوع I، نوع II و نوع III. به طور خاص، نوع II سیستم CRISPR/Cas (یعنی سیستم CRISPR/Cas۹) به دلیل سادگی و کارایی آن در ویرایش ژنوم شناخته شده است، از این رو به طور گسترده برای استفاده در بسیاری از زمینه های تحقیقاتی پایه و کاربردی اقتباس شده است [۱۱].

این همچنین شامل کاربردهای درمانی به دلیل فعالیت قابل توجه پروتئین Cas۹ در سلول های پستانداران برای دستکاری توالی های هدف ژنوم آنها می شود [۱۲].

سیستم CRISPR/Cas۹ از دو جزء تشکیل شده است: یک پروتئین اندونوکلئاز DNA، Cas۹، و یک مولکول RNA راهنمای منفرد (sgRNA) (شکل a۱). به دلیل مکمل بودن جفت باز، sgRNA Cas۹ را به سمت محل ژنومی هدف مشخص هدایت می کند و با فعالیت نوکلئاز Cas۹ درگیر می شود تا دو برش متوالی در DNA ایجاد کند که در یک شکست محلی DNA دو رشته ای (DSB) حل می شود [۱۳]. برای ترمیم DSB ایجاد شده، سلول میزبان عمدتاً دو مکانیسم را نصب می کند: اتصال انتهایی غیر همولوگ (NHEJ) یا تعمیر مستقیم به همسانی (] (HDR۱۵،۱۶]. هر دو مکانیسم امکان دستکاری یکپارچگی ژنوم سلول میزبان را ارائه می دهند و بنابراین برای اهداف مهندسی ژنوم مورد توجه هستند [۱۴].

همچنین، با تغییر توالی در ناحیه قابل طراحی sgRNA، مهندسی مورد نظر را می توان به دنباله ای که در مجاورت موتیف مجاور پروتوسپیسر (PAM) قرار دارد، اعمال کرد، که سیستم CRISPR خاص را تغییر می دهد.

در مقایسه با نوکلئازهای استفاده شده قبلی مانند نوکلئازهای انگشت روی (ZFNs) [۱۵] و نوکلئازهای مؤثر فعال کننده رونویسی (TALENs) [۱۶]، سیستم CRISPR/Cas۹ چندگانه سازی، ویژگی و دقت بالا را ارائه می دهد. مقرون به صرفه بودن به دلیل این ویژگی ها، CRISPR/Cas۹ و سیستم های مرتبط به عنوان یک فناوری کلیدی در زمینه به سرعت در حال گسترش ژن درمانی ظاهر شده اند [۱۷]. با توجه به دانش پیشرفته اصلاح ژنوم، نقطه عطف بعدی برای ویرایش ژن درمانی (TGE) تحویل ابزارهای TGE به محل عمل in vivo، مانند یک بافت خاص یا حتی یک نوع سلول خاص است.

۲. ساختار و ویژگی سیستم CRISPR/Cas۹

CRISPR برای اولین بار در سال ۱۹۸۷ کشف شد، زمانی که یک الگوی عجیب DNA در ژن IAP اشرشیاکلی مشاهده شد [۱۸]. این ژن از ۳۰ جفت باز کوتاه از تکرارهای DNA پالیندرومیک (عودکننده/عودکننده) تشکیل شده است. الگوی تکراری تکرارهای مستقیم و توالی های غیر تکراری با اندازه مشابه معمولاً در بسیاری از میکروب ها در هر دو حوزه پروکاریوت ها یافت می شود. بنابراین، نام خانوادگی، CRISPR معرفی شده است [۱۹]. محققان دریافتند که CRISPR نقش خاصی در مکانیسم دفاعی باکتری ها در برابر DNA خارجی (باکتریوفاژها و کونژوگه های پلاسمید) با مداخله با آنها داشت [۲۰]. CRISPR با ژن‌های Cas مرتبط با سیستم ایمنی پروکاریوتی بعداً نشان داده می‌شود، جایی که سویه‌های باکتریایی می‌توانند مقاومت فاژی را با ترکیب توالی‌های فاصله‌دهنده جدید تطبیق دهند. توالی ها همولوگ با نوکلئوتیدهای مهاجمی هستند که از ژن فاژ CRISPR

می آیند و از طریق یک مسیر اختلال ژنی عمل می کنند [۲۱]. این توالی های کوتاه ۲–۵ جفت باز از منطقه به عنوان نقوش مجاور پروتوسپیسر (PAMs) شناسایی می شوند [۲۲].

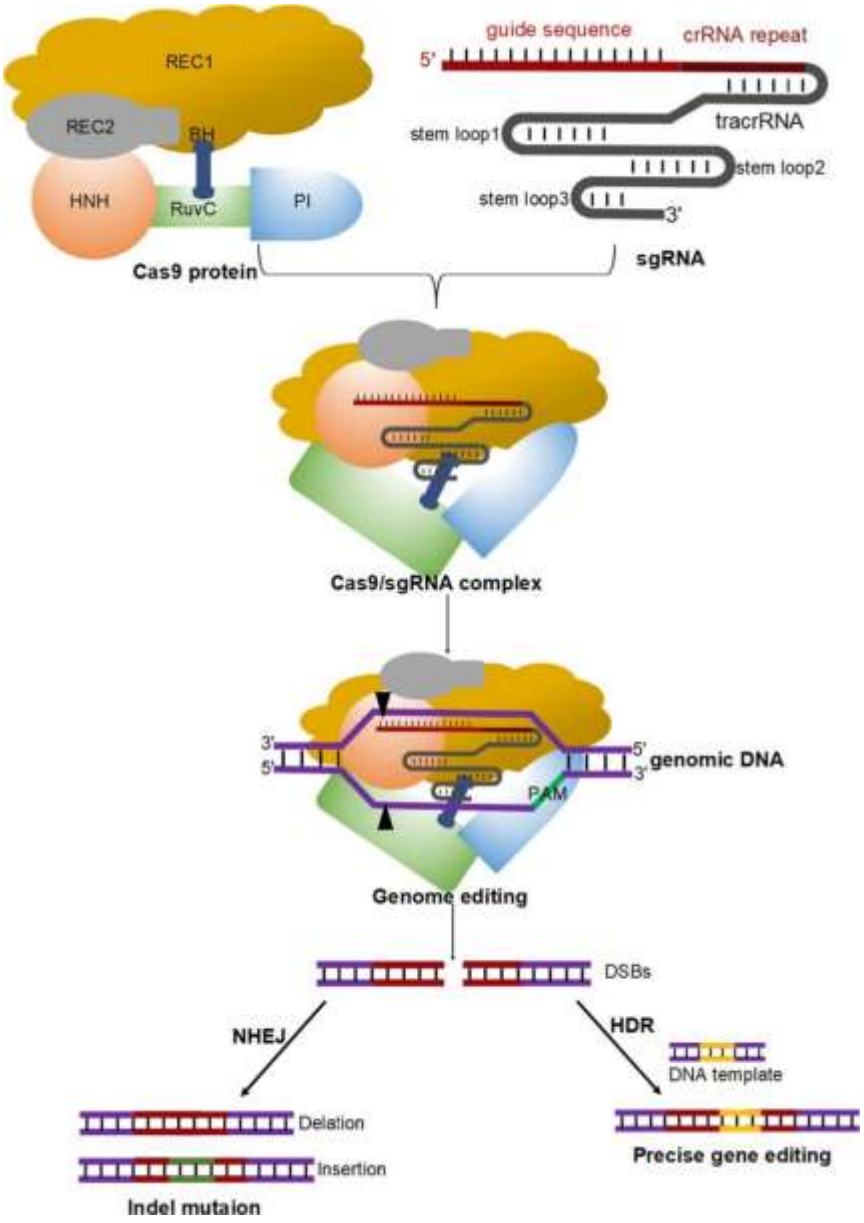
CRISPR/Cas عمدتاً به دو کلاس (۱ و ۲) طبقه بندی می شوند [۳]. در سیستم CRISPR/Cas کلاس۱، چندین پروتئین Cas برای دستیابی به کاربرد آن مورد نیاز است. اما برای سیستم کلاس ۲، فقط به یک پروتئین نیاز دارد [۲۳]. بنابراین، سیستم کلاس ۲ برای ویرایش ژن محبوبیت بیشتری دارد. در میان انواع مختلف سیستم های کلاس ۲، CRISPR/Cas۹ به دلیل سادگی، بیشترین بهره برداری را دارد.

این توسط سه جزء کلیدی تشکیل شده است: پروتئین Cas۹، CRISPR RNA (crRNA) و crRNA فعال کننده (tracrRNA) [۲۴]. به طور خاص، اندونوکلئاز Cas۹شامل شش حوزه اصلی، شناسایی (REC)۱، REC۲، Bridge Helix (BH)، PAM Interacting (PI)، HNH و RuvC (شکل ۱) است. crRNA معمولاً دارای یک توالی ۲۰–nt پروتوسپیسر و یک قسمت اضافی است که برای جفت شدن مکمل tracrRNA استفاده می شود. برای tracrRNA، ساختار آن دارای دو بخش کاربردی است که به ترتیب برای اتصال crRNA و پروتئین Cas۹ استفاده می‌شوند. علاوه بر این، کمپلکس crRNA-tracrRNA را می توان به راحتی به عنوان یک RNA راهنمای منفرد (sgRNA) مهندسی کرد (شکل ۱) [۲۵]. به طور خلاصه، اندونوکلئاز Cas۹ را می توان با اتصال به sgRNA با استفاده از دامنه REC۱ فعال کرد. سپس دنباله DNA هدف گیری را که با سایت PAM آن مطابقت دارد جستجو می کند. پس از انجام تطابق، حوزه‌های نوکلئاز (HNH و RuvC) DNA هدف را مانند قیچی می‌شکنند. در طول کل فرآیند، دامنه PI در پروتئین Cas۹ کلید آغاز فعالیت اندونوکلئاز آن برای اتصال DNA هدف است. به طور کلی، هماهنگی چندین ناحیه عملکردی در CRISPR/Cas۹ به آن توانایی قوی برای ویرایش ژن می دهد.

۳. مکانیسم و مزیت سیستم CRISPR/Cas۹

فناوری CRISPR/Cas۹ می تواند به عنوان سیستمی برای انجام برش تمام رشته های DNA آزمایش شده با دقت بسیار مورد استفاده قرار گیرد. در این فرآیند، sgRNA ابتدا پس از سازماندهی مجدد PAM به توالی هدف متصل می شود و سپس آندونوکلئاز Cas۹ را هدایت می کند تا رشته های DNA را در بالادست سایت PAM بشکند و شکستگی های دو رشته ای (DSBs) را تشکیل دهد (شکل ۱) [۲۵]. پس از تشکیل DSB ها، ترمیم ژنوم را می توان در دو مسیر (شکل ۱) آغاز کرد، از جمله اتصال انتهایی غیر همولوگ (NHEJ) و تعمیر مستقیم همولوژی (HDR). به عنوان محتمل ترین مسیر رخ دادن، NHEJ اغلب منجر به درج/حذف (InDel) رشته های DNA ویرایش شده می شود. تولید InDel در نهایت باعث تغییر فریم و/یا

زودرس کدون های توقف می شود. تحت کمک قالب DNA دهنده، HDR قادر است DNA صحیح را با دقت در محل هدف قرار دهد، در حالی که NHEJ می تواند مستقیماً به توالی های شکسته بپیوندد. این می تواند برای وارد کردن ژن مورد نظر با ارائه یک الگوی DNA اگزوژن مجاور برای تولید DNA طراحی شده و اصلاح شده ویژه مورد سوء استفاده قرار گیرد [۲۶].



شکل ۱. ساختارهای شماتیک CRISPR/Cas۹ (REC۱، REC۲، BH، PI، HNH و RuvC) و sgRNA (crRNA و tracrRNA) و مکانیسم مولکولی فرآیند ویرایش ژن آن.

سیستم CRISPR/Cas۹ برای اولین بار در سال ۲۰۱۳ در سلول های پستانداران (اعم از سلول های انسان و موش) مورد استفاده قرار گرفت [۷]. از آن زمان، به طور گسترده در زمینه های تحقیقاتی مختلف، مانند مطالعات بیولوژیکی، بیوتکنولوژی، پزشکی، کشاورزی و غیره استفاده شده است [۲۷]. در مقایسه با ابزارهای متداول مهندسی ژنوم، فناوری CRISPR/Cas۹ مزایای بزرگ خود را نشان داده است (جدول ۱).

جدول ۱- مقایسه فن آوری های مختلف ویرایش ژن

فناوری	ZFNs	TALENs	CRISPR/Cas۹
اندونوکلئاز	FokI	FokI	Cas۹
هدف گیری DNA	پروتئین ZF	پروتئین TALE	SgRNA
Targeting	Protein-DNA-	Protein-DNA-	(crRAN + trancrRNA) RNA-DNA reaction
سازوکار	اجباری	اجباری	
PAM	NA	NA	۵۰-NGG-۳۰
هدف گذاری	پایین	پایین	بالا
خارج از هدف	بالا	بالا	متغیر
هزینه عملیات	بالا	بالا	پایین
عمل امکان پذیری	سخت	در حد متوسط	آسان
سمیت سلولی	بالا	پایین	پایین

به طور خلاصه، سیستم CRISPR/Cas۹ فقط به یک sgRNA ساده برای سازماندهی مجدد RNA-DNA نیاز دارد که از مکانیسم اتصال پروتئین به DNA اختصاصی تر، کارآمدتر و کم هزینه تر است [۲۷]. شخصی سازی کمپلکس CRISPR/Cas۹ تنها با تغییر توالی sgRNA راحت و آسان است. این امکان را برای ویرایش چندین سایت مستقل به طور همزمان فراهم می کند [۲]. بعلاوه، CRISPR/Cas۹ قادر به chro- اصلاح اهداف موزومال با وفاداری بالا و سمیت سلولی کم.

۴. مهندسی ژن در سرطان

علت اصلی تومورها، بی نظمی رشد سلولی، از جمله فعال شدن پروتوآنکوژن ها و غیرفعال شدن ژن های سرکوب کننده تومور است [۲۸]. بنابراین، تکنیک مهندسی ژنوم امید جدیدی را برای درمان سرطان ارائه می‌کند و توانایی ویرایش چندین ژن به CRISPR/Cas۹ پتانسیل زیادی در درمان سرطان می‌دهد.

با توجه به، حذف انکوژن ها توسط فناوری CRISPR/Cas۹ یک روش بسیار مفید برای مهار رشد تومور است. از سوی دیگر، ترمیم ژن‌های سرکوب‌کننده تومور و بازگرداندن عملکرد آن‌ها نیز می‌تواند از توسعه تومورها جلوگیری کند [۲۹]. در حال حاضر، ژن درمانی مبتنی بر CRISPR/Cas۹ به طور فعال در مورد سرطان ریه، سرطان سینه، سرطان سر، سرطان کولورکتال، کارسینوم کبدی و غیره مورد تحقیق قرار گرفته است. انواع ژن های هدف درگیر هستند، از جمله گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی، پروتئین تومور، چسبندگی کانونی کیناز، ژن سرطان پستان، گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی انسانی، ترانس کریپتاز معکوس تلومراز، لنفوم کیناز آناپلاستیک، هولوگ انکوژن ویروسی سارکوم موش صحرایی کرستن، همولوگ انکوژن ویروسی سارکوم موشی، فوسفاتاز، فن آوری CRISPR/Cas۹ همچنین می تواند ژن عامل بیماری خاص را هدف قرار دهد و مدل های سلولی یا حیوانی جهش های ژنی مربوطه را بسازد. این اجازه می دهد تا درک بهتری از مکانیسم های توسعه بیماری و استراتژی های درمان داشته باشیم. نتایج تجربی نشان داد که استفاده از فناوری CRISPR/Cas۹ برای هدف قرار دادن خاص آلل‌های جهش یافته KRAS انکوژن می‌تواند به طور قابل توجهی رشد تومور را مهار کند. علاوه بر این، فناوری CRISPR/Cas۹ ابزار خوبی برای مطالعه پاتوژنز بیماری‌ها و شناسایی نقش انکوژن‌های جدید یا ژن‌های سرکوب‌کننده تومور در فرآیند بیماری است. به عنوان مثال، سرطان ریه سلول کوچک (SCLC) که مستعد عود است، یک تومور عصبی غدد درون ریز با درجه بالا است که حدود ۱۵٪ از آن را تشکیل می دهد. [۲۹]

تحقیقات فوق پتانسیل عملکرد سایر ژن‌های کاندید را که اغلب در SCLC جهش می‌یابند ثابت می‌کند و همچنین به تأیید اهداف درمانی آتی SCLC کمک خواهد کرد.

۵. تحول CRISPR/Cas۹ برای درمان سرطان

در سال‌های اخیر، علاقه گسترده به بردارهای مبتنی بر فناوری نانو برای تحویل CRISPR/Cas۹ تحقیقات زیادی را برانگیخته است که نشان‌دهنده چشم‌انداز بالقوه آن است. نانوحامل ها را می توان با طراحی منطقی نانوذرات مورد نظر تولید و بهینه کرد. علاوه بر این، بهینه سازی نانوحامل ها را می توان با اصلاحات شیمیایی مناسب به دست آورد [۳۰].

۶. نتیجه‌گیری

به عنوان یک ابزار قدرتمند ویرایش ژن، CRISPR/Cas۹ تأثیر چشمگیری در زمینه زیست شناسی مولکولی و ژن درمانی ایجاد می کند. این به طور گسترده در سراسر جهان پذیرفته شده است و برای هدف قرار دادن مهندسی ژن در سلول ها و موجودات مختلف مورد استفاده قرار می گیرد. در آن مرحله، سیستم‌های CRISPR/Cas۹ امید جدیدی به درمان سرطان می‌آورند. این نه تنها دارای پتانسیل کاربردی زیادی برای دستکاری ژن های سرطانی است، بلکه برای تنظیم بیان ژن، ساخت مدل های تومور، دستیابی به ایمونوتراپی تومور و برای کشف داروهای ضد سرطان استفاده می شود. آنها برای درمان بسیاری از انواع سرطان ها مانند مغز، کبد، ریه، مثانه، کولورکتال و همکاران مورد استفاده قرار گرفته اند و نتایج قابل توجهی را در شرایط آزمایشگاهی و درون تنی به دست آورده اند. تقاضاهای زیادی برای ترجمه بالینی سیستم CRISPR/Cas۹ در درمان سرطان وجود دارد. تاکنون، بیشتر آزمایش‌های بالینی مبتنی بر CRISPR/Cas۹ در شرایط آزمایشگاهی انجام می‌شوند، که نیاز به جداسازی سلول‌ها از بیماران و انتقال مجدد به بیماران پس از اصلاح ژن با سیستم CRISPR/Cas۹ دارد. و تحویل عوامل CRISPR/Cas۹ برای این منظور به شدت به ناقل های ویروسی و رویکردهای فیزیکی بستگی دارد.

به ویژه، فقدان سیستم های تحویل ایمن و کارآمد بزرگترین مانع برای کاربرد بالینی CRISPR/Cas۹ است. جدا از قابلیت کپسوله‌سازی بالا و زیست سازگاری، سیستم تحویل باید بر بسیاری از موانع فیزیکی غلبه کند و اجزای CRISPR/Cas۹ را مستقیماً به مکان‌های هدف حمل کند و درمان دقیق و مؤثر تومور را درک کند. با توسعه سریع فناوری نانو، بردارهای طراحی شده از نانوذرات مختلف به طور گسترده مورد مطالعه قرار می گیرند و پتانسیل بسیار زیادی را نشان می دهند. تا به امروز، ناقل‌های مبتنی بر فناوری نانو مانند پلیمرها، لیپیدها، PSi، MSNs و MOFs برای تحویل محموله‌های ضد سرطان گزارش شده‌اند. علاوه بر این، فناوری نانو و سیستم‌های تحویل مبتنی بر فناوری نانو، اثر درمانی بهبود یافته و عوارض جانبی نامطلوب را کاهش می‌دهند.

۷. مراجع

[1] N. Agrawal, P.V.N. Dasaradhi, A. Mohmmed, P. Malhotra, R.K. Bhatnagar, S.K.Mukherjee, RNA interference: Biology, mechanism, and applications, Microbiol. Mol. Biol. R 67 (2003) 657-+.

[2] L. Yi, J.M. Li, CRISPR-Cas9 therapeutics in cancer: promising strategies and present challenges, Bba-Rev. Cancer 2016 (1866) 197–207.

[3] Z. Mirza, S. Karim, Advancements in CRISPR/Cas9 technology-Focusing on cancer therapeutics and beyond, Semin. Cell Dev. Biol. 96 (2019) 13–21.

[4] T. Friedmann, Gene-therapy of cancer through restoration of tumor- suppressor functions, Cancer 70 (1992) 1810–1817.

[5] E. Pennisi, The CRISPR Craze, Science 341 (2013) 833–836.

[6] M.J. Chen, A.W. Mao, M. Xu, Q.Y. Weng, J.T. Mao, J.S. Ji, CRISPR-Cas9 for cancer therapy: Opportunities and challenges, Cancer Lett. 447 (2019) 48–55.

[7] L. Cong, F.A. Ran, D. Cox, S.L. Lin, R. Barretto, N. Habib, P.D. Hsu, X.B. Wu, W.Y.Jiang, L.A. Marraffini, F. Zhang, Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/ Cas Systems, Science 339 (2013) 819–823.

[8] T.Z. Zhan, N. Rindtorff, J. Betge, M.P. Ebert, M. Boutros, CRISPR/Cas9 for cancer research and therapy, Semin. Cancer Biol. 55 (2019) 106–119.

[9] N.N. Zheng, L.Y. Li, X.D. Wang, Molecular mechanisms, off-target activities, and clinical potentials of genome editing systems, Clin. Transl. Med. 10 (2020) 412–426.

[10] R. Louwen, R.H. Staals, H.P. Endtz, P. van Baarlen, J. van der Oost, Microbiol.Mol. Biol. Rev. 78 (2014) 74–88.

[11] V. Nekrasov, C. Wang, J. Win, C. Lanz, D. Weigel, S. Kamoun, Sci. Rep. 7 (2017) 482.

[12] F.A. Ran, P.D. Hsu, J. Wright, V. Agarwala, D.A. Scott, F. Zhang, Nat. Protoc. 8 (2013) 2281.

[13] D. Rath, L. Amlinger, A. Rath, M. Lundgren, Biochimie 117 (2015) 119–128.

[14] S. Kaboli, H. Babazada, Curr. Issues Mol. Biol. 26 (2018) 81–92.

[15] F.D. Urnov, J.C. Miller, Y.-L. Lee, C.M. Beausejour, J.M. Rock, S. Augustus, A.C. Jamieson, M.H. Porteus, P.D. Gregory, M.C. Holmes, Nature 435 (2005)

[16] T. Gaj, C.A. Gersbach, C.F. Barbas III, Trends Biotechnol. 31 (2013) 397–405.

[17] C.J. Stephens, E.J. Lauron, E. Kashentseva, Z.H. Lu, W.M. Yokoyama, D.T. Curiel, J. Control. Release 298 (2019) 128

[18] Y. Ishino, H. Shinagawa, K. Makino, M. Amemura, A. Nakata, Nucleotide- Sequence of the Iap Gene, Responsible for Alkaline-Phosphatase Isozyme Conversion in Escherichia-Coli, and Identification of the Gene-Product, J. Bacteriol. 169 (1987) 5429–5433.

[19] R. Jansen, J.D.A. van Embden, W. Gaastra, L.M. Schouls, Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes, Mol. Microbiol. 43 (2002) 1565–1575.

[20] A. Bolotin, B. Ouinquis, A. Sorokin, S.D. Ehrlich, Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin, Microbiol-Sgm 151 (2005) 2551–2561.

[21] R. Barrangou, C. Fremaux, H. Deveau, M. Richards, P. Boyaval, S. Moineau, D.A. Romero, P. Horvath, CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes, Science 315 (2007) 1709–1712.

[۲۲] L.A. Marraffini, E.J. Sontheimer, Self versus non-self discrimination during CRISPR RNA-directed immunity, Nature 463 (2010) 568–U194.

[۲۳] H.Y. Liu, L. Wang, Y.Z. Luo, Blossom of CRISPR technologies and applications in disease treatment, Syn. Syst. Biotechno. 3 (2018) 217–228.

[24] A. Hazafa, M. Mumtaz, M.F. Farooq, S. Bilal, S.N. Chaudhry, M. Firdous, H. Naeem, M.O. Ullah, M. Yameen, M.S. Mukhtiar, F. Zafar, CRISPR/Cas9: A powerful genome editing technique for the treatment of cancer cells with present challenges and future directions, Life Sci. 263 (2020).

[25] M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J.A. Doudna, E. Charpentier, A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity, Science 337 (2012) 816–821.

[26] S. Lin, B. Staahl, R.K. Alla, J.A. Doudna, Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery, Elife 3 (2014).

[27] D. Gupta, O. Bhattacharjee, D. Mandal, M.K. Sen, D. Dey, A. Dasgupta, T.A. Kazi, R. Gupta, S. Sinharoy, K. Acharya, D. Chattopadhyay, V. Ravichandiran, S. Roy, D. Ghosh, CRISPR-Cas9 system: a new-fangled dawn in gene editing, Life Sci.

۲۳۲ (۲۰۱۹).

[28] F. Skoulidis, J.V. Heymach, Co-occurring genomic alterations in non-small-cell lung cancer biology and therapy, Nat. Rev. Cancer 19 (2019) 495–509.

[29] M. Azangou-Khyavy, M. Ghasemi, J. Khanali, M. Boroomand-Saboor, M.

Jamalkhah, M. Soleimani, J. Kiani, CRISPR/Cas: From Tumor Gene Editing to T Cell-Based Immunotherapy of Cancer, Front. Immunol. 11 (2020).

[30] Y. Xu, R. Liu, Z. Dai, Key considerations in designing CRISPR/Cas9-carrying nanoparticles for therapeutic genome editing, Nanoscale 12 (2020) 21001–21014.