

**APLIKASI TEKNOLOGI CRISPR/CAS9 DAN PENYUNTINGAN PERDANA
DALAM KAJIAN BIOLOGI MOLEKUL DAN KEFUNGSIAN GEN**
(Application of CRISPR/Cas9 Technology and Prime Editing in Molecular Biology and Gene
Functionality Studies)

Nurul Nadia Mohamad Zamberi¹, Mohd Raziff Alias¹, M. Aiman Mohtar¹, Saiful Effendi Syafruddin^{1*}

¹Institut Biologi Molekul Perubatan UKM (UMBI), Jalan Yaacob Latiff, 56000 Cheras, Kuala Lumpur

*Correspondence: effendisy@hctm.ukm.edu.my

Abstrak

Kemunculan teknologi penyuntingan genom, terutamanya CRISPR/Cas9, telah mengubah dan merevolusikan landskap bidang genetik dan biologi molekul dengan begitu drastik. Sistem CRISPR/Cas9 diadaptasi daripada sistem adaptasi imuniti bakteria, menggunakan enzim Cas9 yang dipandu oleh sgRNA untuk penyingkiran gen atau penyuntingan genom secara jitu. Walau bagaimanapun, cabaran seperti kesan luar sasaran (off-target effects) telah mendorong pembangunan beberapa varian Cas9 seperti dCas9. dCas9 diubah suai untuk tidak memiliki sebarang aktiviti endonuklease dan kini dCas9 telah digunakan untuk pelbagai aplikasi yang melangkaui fungsi tradisional CRISPR/Cas9 sebagai kaedah pengeditan genom. Selain itu, teknologi terkini penyuntingan perdana (prime editing) telah menggabungkan enzim Cas9 yang diubahsuai bersama enzim transkriptase berbalik (reverse transcriptase) untuk meningkatkan lagi tahap keberkesanan penyuntingan genom secara jitu. Walaupun wujud kerisauan terhadap pertimbangan etika dan kebimbangan terkait keselamatan, namun teknologi ini menjanjikan dampak yang besar di dalam menangani penyakit genetik serta aplikasi dalam bidang perubatan jitu (precision medicine). Memahami dan mengoptimumkan potensi CRISPR/Cas9 dan teknologi penyuntingan perdana menandakan bermula era baharu dalam bidang penyelidikan berkaitan biologi dan perubatan, dan seterusnya menyediakan satu platform untuk penyuntingan genom yang tepat dan pengawalseliaan proses transkripsi gen.

Kata kunci: CRISPR/Cas9, Penyuntingan Perdana, Penyuntingan Genom, Pengawalseliaan Transkripsi, Modifikasi Epigenetik

Abstract

The advent of genome editing technologies, notably CRISPR/Cas9, have profoundly reshaped the landscape of genetic and molecular biology fields. CRISPR/Cas9 system, adapted from bacterial adaptive immune system, employs the Cas9 enzyme guided by sgRNA for gene knockout or precise genome editing. However, challenges such as off-target effects have paved the way for the development of several Cas9 variants such as dCas9. dCas9 is catalytically inactive that have been used for wide variety of applications that go beyond the traditional CRISPR/Cas9-mediated genome editing. Additionally, the latest advancement, prime editing technology, combines a modified Cas9 and reverse transcriptase enzyme that has further improved and offered unparalleled efficiency in performing precise genome editing. Despite ethical considerations and safety concerns, both CRISPR/Cas9 and prime editing technologies hold immense potential for treating various genetic diseases and precision medicine applications. Understanding and harnessing the full potential of these technologies would mark a new era in the field of biological science and medical-related research, providing powerful and valuable tools for precise genome modifications and gene expression regulation.

Keywords: CRISPR/Cas9, Prime Editing, Gene Editing, Transcription Regulation, Epigenetic Modification

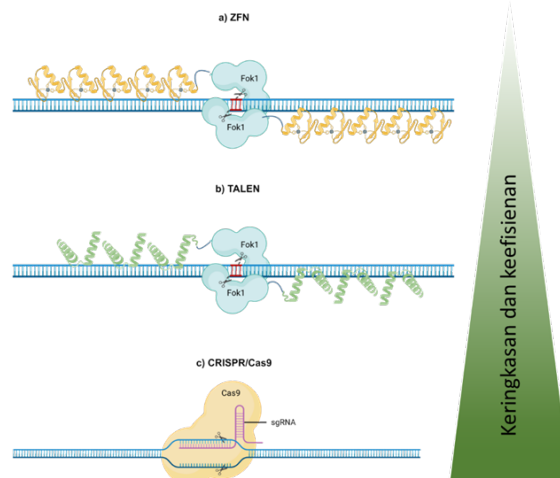
PENGENALAN

Penyuntingan genom merupakan salah satu teknik terkehadapan dalam bidang biologi molekul. Teknik ini membolehkan pengubahsuaian jujukan asid nukleik (DNA) dilakukan dalam hampir semua jenis sel eukariot dan prokariot yang melibatkan sisipan, penghapusan, atau penggantian urutan. Teknik penyuntingan genom semakin berkembang dan berevolusi dengan pantas melalui pembangunan pelbagai teknologi terkini seperti kaedah Nuklease Jejari Zink (*Zinc Finger Nuclease* atau ZFNs) dan kaedah nuklease efektor seperti pengaktif transkripsi (*Transcription Activator-Like Effector Nucleases* atau TALENs) (Carroll 2014; Zhang, Zhang & Yin 2019). Mutakhir ini, kaedah yang paling popular di kalangan saintis adalah teknologi CRISPR/Cas9 yang berfungsi melalui pemotongan jujukan DNA sasaran menggunakan enzim endonuklease Cas9 yang dipandu oleh helaian tunggal RNA (*single strand RNA* atau sgRNA) (Hsu, Lander & Zhang 2014).

Menelusuri sejarah teknologi penyuntingan genom, di tahun-tahun awal perkembangannya, penyelidik dunia lebih menggunakan kaedah ZFNs dan TALENs dalam kajian mereka. Dilaporkan di dalam beberapa dapatan penyelidikan, teknologi

awal ini berjaya menghasilkan sel-sel imun yang dapat digunakan untuk rawatan kanser kanak-kanak (Qasim et al. 2017), mengurangkan mutasi gen *HBB* dalam sel stem haematopoietik (Chang et al. 2017b; Hoban et al. 2013), dan menyahaktifkan gen *CCR5* dalam sel somatik (Miller et al. 2011). Berdasarkan kejayaan dapatan ini, kaedah penyuntingan genom terbukti mempunyai potensi yang besar untuk tujuan terapeutik dan mampu mengubah bukan sahaja landskap bidang perubatan malah bidang-bidang lain seperti farmaseutikal, bioteknologi dan pertanian (Gaj, Gersbach & Barbas 2013; Li et al. 2020a; Osakabe & Osakabe 2015).

Walau bagaimanapun, kemunculan teknologi CRISPR/Cas9 pada sekitar tahun 2012 telah menyebabkan ramai penyelidik beralih arah dari penggunaan teknologi ZFNs dan TALENs kepada teknologi CRISPR/Cas9 ini (Mali et al. 2013). Hal ini disebabkan kerana teknologi CRISPR/Cas9 adalah lebih efisien, fleksibel, dan mudah untuk diatur cara (Jinek et al. 2012). Secara umumnya, kaedah penyuntingan genom ZFNs dan TALENs adalah kompleks, kerana teknologi ini bergantung kepada interaksi antara protein yang membawa enzim endonuklease *FokI* (yang akan memotong kawasan sasaran) dengan urutan DNA di kawasan sasaran (Rajah 1).



Rajah 1. Prinsip asas kaedah penyuntingan genom ZFNs, TALEN dan CRISPR/Cas9

Penyelidik perlu membina struktur protein ini agar ianya bersesuaian dan spesifik dengan kawasan sasaran. Sekiranya penyelidik mahu menyasarkan kawasan lain, struktur protein yang baharu perlu dibina dan dicirikan, proses ini memakan masa yang lama dan melibatkan kos yang tinggi (Eid & Mahfouz 2016).

Sebaliknya, teknologi CRISPR/Cas9 pula bergantung kepada interaksi antara sgRNA dengan urutan DNA di kawasan sasaran berdasarkan padanan bes komplementari *Watson-Crick* (*Watson-Crick complementary base pairing*). sgRNA yang mempunyai kepanjangan antara 18-20 bp akan membentuk sebatian dengan enzim Cas9 dan

memandu enzim ini ke kawasan sasaran (Jinek et al. 2012; Mojica et al. 2005). Untuk menyasarkan kawasan baharu, penyelidik hanya perlu mereka bentuk sgRNA yang melengkapkan urutan DNA di kawasan sasaran tersebut. Disebabkan oleh tahap fleksibiliti yang tinggi ini, kaedah CRISPR/Cas9 ini boleh digunakan untuk menyasarkan lebih daripada satu atau hampir keseluruhan gen yang terdapat dalam organisma eukariot secara serentak (Bock et al. 2022; Cong et al. 2013; Patel et al. 2022). Perbezaan antara teknologi penyuntingan genom ZFNs, TALENs dan CRISPR/Cas9 disenaraikan dalam Jadual 1.

Jadual 1. Perbezaan antara teknologi penyuntingan genom ZFNs, TALENs dan CRISPR/Cas9

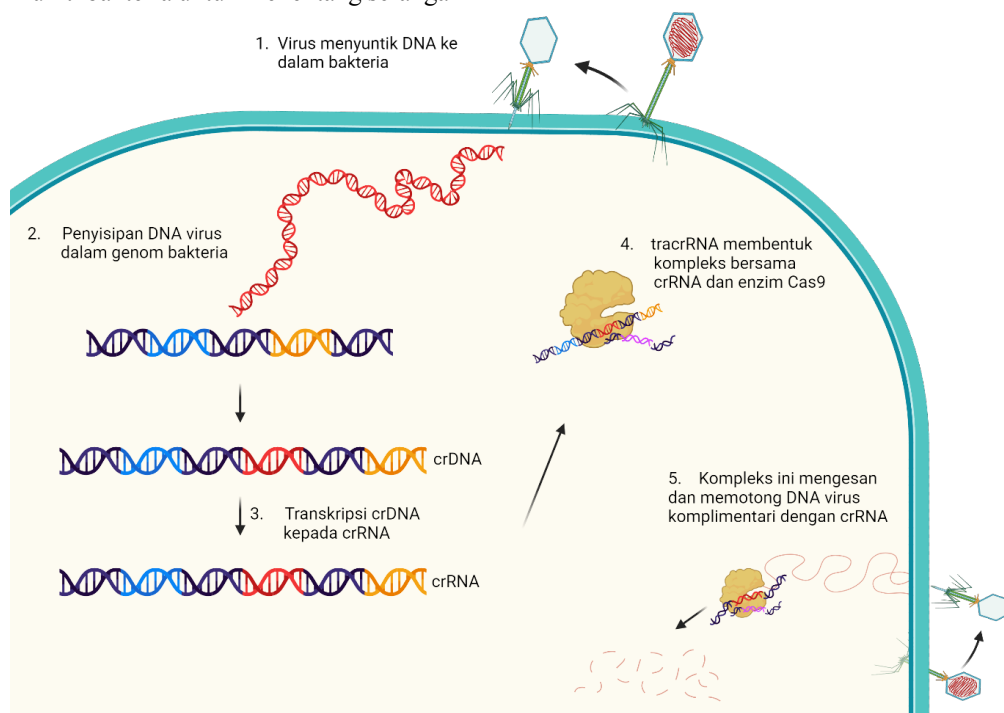
	ZFN dan TALEN	CRISPR/Cas9
Prinsip penyasaran	Interaksi antara protein dan DNA kawasan sasaran	Interaksi antara gRNA dan DNA kawasan sasaran
Komponen penyasaran	Protein mempunyai <i>DNA-binding</i> domain yang akan mengenalpasti dan mengikat jujukan DNA spesifik di kawasan sasaran	gRNA yang komplementari dengan jujukan DNA spesifik di kawasan sasaran akan membentuk kompleks dengan enzim Cas9
Kecekapan rekabentuk	Sukar dan kurang cekap Perlu membina dan mencirikan protein baharu untuk menasaskan kawasan DNA lain Boleh megambil masa yang lama dan kos yang tinggi Hanya boleh menasaskan satu kawasan DNA pada satu masa Kecekapan penghantaran yang rendah ke dalam sel	Mudah dan lebih cekap: Hanya perlu merekabentuk gRNA yang komplementari dengan DNA kawasan sasaran (<i>watson-crick pairing</i>) Cepat dengan kos yang amat berpatutan Boleh menasaskan banyak kawasan DNA serentak. <i>Genome wide-gene editing</i> juga boleh dilakukan Kecekapan penghantaran yang tinggi ke dalam sel

KAEDAH PENYUNTINGAN GENOM CRISPR/CAS9

2.1. Sejarah Penemuan Dan Adaptasi Untuk Sel Eukariot

CRISPR adalah akronim untuk kelompok pengulangan pendek berpalingdom yang berselang secara teratur (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*). Seperti yang diterangkan dalam seksyen 1, Cas9 merupakan enzim yang bertanggungjawab untuk memotong jujukan DNA yang ingin disunting. Pada awal penemuannya, sistem CRISPR/Cas9 ini hanyalah mekanisme adaptasi imuniti bakteria untuk menentang serangan

atau jangkitan bakteriofaj (*bacteriophage*) dan virus (Barrangou et al. 2007; Jansen et al. 2002). Semasa proses jangkitan ini berlaku, sebahagian daripada elemen genetik bakteriofaj dan virus ini akan diintegrasikan ke dalam genom bakteria yang dijangkiti. Secara khususnya, proses integrasi ini berlaku di antara jujukan DNA berulang (*repeated DNA sequence*) bakteria yang dikenali sebagai CRISPR DNA. Sekiranya terdapat jangkitan berulang, bakteria akan menghasilkan CRISPR RNA (crRNA) dan seterusnya akan membentuk kompleks bersama tracrRNA dan enzim Cas9 (Barrangou et al. 2007). Kompleks ini akan mengesan dan memusnahkan elemen genetik bakteriofaj atau virus yang menepati crRNA tersebut (Rajah 2).



Rajah 2. Sistem adaptasi imuniti bakteria yang telah diadaptasi untuk pembangunan teknologi penyuntingan genom CRISPR/Cas9

Bertitik tolak daripada keberkesanan sistem adaptasi imuniti bakteria ini di dalam menyasarkan DNA, maka para saintis telah berjaya mengadaptasi sistem CRISPR/Cas9 ini untuk tujuan penyuntingan genom sel eukariot (Cho et al. 2013; Jinek et al. 2013; Syafruddin et al. 2019). Bagi memudahkan penggunaan aplikasi ini di dalam sel eukariot, para saintis telah membuat modifikasi dengan mencantumkan crRNA bersama tracrRNA yang kini dikenali sebagai sgRNA. sgRNA ini membentuk kompleks dengan Cas9 yang seterusnya akan membawa Cas9 ini ke kawasan jujukan DNA sasaran yang menepati sgRNA (Jinek et al. 2012).

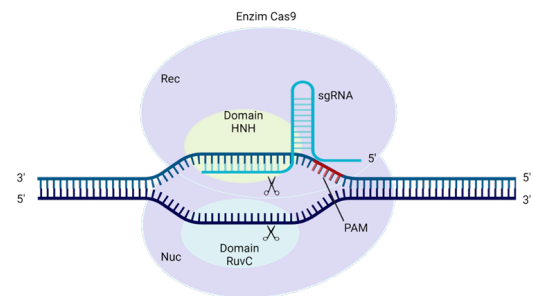
Satu syarat utama dalam reka bentuk sgRNA adalah sgRNA ini perlu berada di huluhan 5' jujukan DNA yang dikenali sebagai motif bersebelahan pengatur jarak proto (*Protospacer Adjacent Motif* atau *PAM*) (Collias & Beisel 2021). Syarat ini amat penting kerana enzim Cas9 akan mengenal pasti jujukan PAM dan jujukan PAM ini bergantung kepada jenis enzim Cas9 yang digunakan Jadual 2. Enzim Cas9 yang paling kerap digunakan adalah daripada *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) manakala jujukan PAM untuk SpCas9 adalah 5' NGG 3' (Gasiunas et al. 2012; Jinek et al. 2012).

Jadual 2. Enzim Cas9 yang diasingkan daripada spesies bakteria berbeza berserta syarat jujukan PAM

Enzim Cas9	Bakteria	Jujukan PAM (5' to 3')
SpCas9	<i>Streptococcus pyogenes</i>	NGG
SaCas9	<i>Staphylococcus aureus</i>	NGRRT or NGRRN
NmeCAS9	<i>Neisseria meningitidis</i>	NNNNGATT
CjCas9	<i>Campylobacter jejuni</i>	NNNNRYAC
StCas9	<i>Streptococcus thermophilus</i>	NNAGAAW
LbCpf1	<i>Lachnospiraceae bacterium</i>	TTTV
AsCpf1	<i>Acidaminococcus sp.</i>	TTTV

SpCas9 mempunyai dua bahagian asas iaitu bahagian (i) pengesanan (*recognition* atau Rec) dan (ii) nuklease (*nuclease* atau Nuc). Enzim Cas9 berinteraksi dan membentuk kompleks dengan sgRNA melalui bahagian Rec. Bahagian Nuc pula berperanan untuk memotong jujukan DNA sasaran menerusi dua domain nuklease yang dikenali sebagai HNH dan RuvC (Ishino, Krupovic & Forterre 2018; Nishimasu et al. 2014). Domain nuklease RuvC akan membelah helaian DNA yang mengandungi jujukan PAM manakala domain nuklease HNH akan membelah helaian DNA yang bertentangan dan seterusnya akan menyebabkan bebenang ganda dua DNA terputus (Shibata et al. 2017) (Rajah 3). Posisi

belahan helaian DNA ini juga adalah spesifik iaitu tiga nukleotida di huluhan 5' jujukan PAM. Pecahan bebenang ganda dua DNA boleh mengakibatkan tekanan genotoksik kepada sel dan jika tidak dibaiki akan menyebabkan kerosakan yang lebih teruk. Oleh yang demikian, sel akan mengaktifkan mekanisme baik pulih DNA yang seterusnya dieksplotasi oleh para saintis untuk menjadi prinsip asas penyuntingan genom sel eukariot.

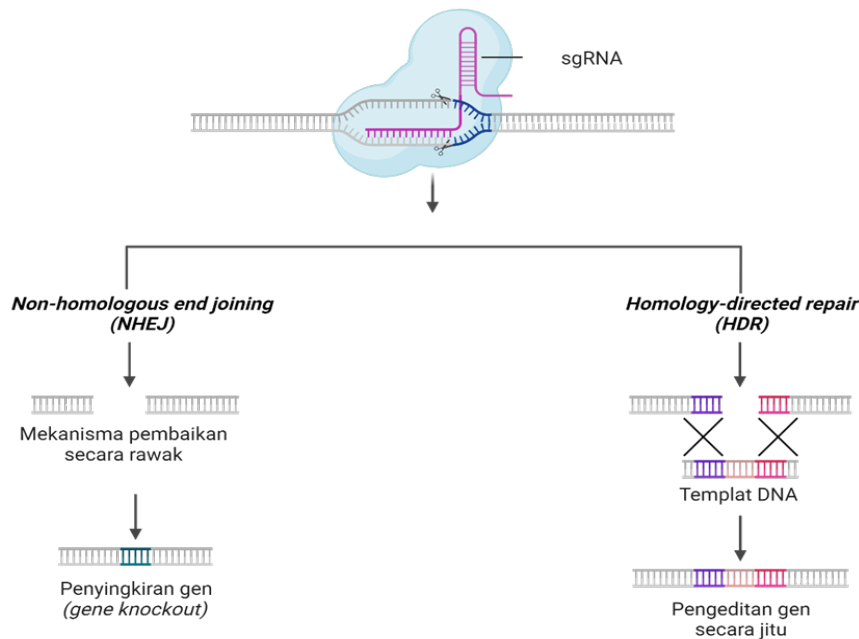


Rajah 3. Domain HNH dan RuvC enzim SpCas9 yang mencetus pecahan bebenang ganda dua DNA

2.2. Mekanisme Penyuntingan Genom CRISPR/Cas9

Sel akan bertindak balas terhadap pecahan bebenang ganda dua DNA yang dicetuskan oleh kompleks Cas9/sgRNA dengan mengaktifkan mekanisme baik pulih DNA sama ada menerusi penyambungan hujung bukan homolog (*non-homologous end joining* atau NHEJ) atau pembaikan berpanduan homologi (*homology-directed repair* atau HDR) (Symington & Gautier 2011) (Rajah 4). Mekanisme NHEJ akan mengambil tempat sekiranya sel tidak mempunyai sebarang templat untuk membaiki pecahan bebenang ganda dua DNA tersebut. Sekiranya terdapat templat untuk proses baik pulih berlaku, sel akan mengaktifkan mekanisme HDR (Symington & Gautier 2011). Namun begitu, kadar keefisienan mekanisme HDR adalah sangat rendah menjadikan NHEJ mekanisme pembaikan DNA yang utama dalam sel (Liu et al. 2019). Oleh kerana tiada templat, mekanisme NHEJ akan membaiki pecahan bebenang ganda dua DNA ini secara rawak. Perkara ini akan menyebabkan mutasi atau perubahan jujukan DNA sama ada melalui penambahan atau kehilangan satu (atau lebih) nukleotida (*Insertion/Deletion* atau INDELS) di kawasan sasaran (Chang et al. 2017a).

Dengan menggunakan teknologi CRISPR/Cas9 yang disusuli oleh pengaktifan mekanisme NHEJ, saintis boleh mengganggu atau menyahaktifkan fungsi sesuatu gen atau protein dengan berkesan (Bétermier, Bertrand & Lopez 2014). Mekanisme ini dapat membantu kajian tentang peranan gen atau protein tertentu dalam pengawal aturan proses fisiologi atau patofisiologi organisma dengan lebih terperinci.



Rajah 4. Mekanisme baikpulih pecahan beban ganda dua DNA yang dicetuskan oleh kompleks sgRNA/Cas9. Pengaktifan mekanisme baikpulih NHEJ akan menyebabkan penyingkiran gen manakala pengeditan gen secara jitu diaruh oleh mekanisme baikpulih HDR

Untuk penyuntingan jujukan DNA yang lebih jitu, mekanisme HDR perlu diaktifkan dengan menghantar templat baik pulih ke dalam sel, sama ada dalam bentuk helaian tunggal DNA (single-stranded DNA atau ssDNA), plasmid atau bulatan mini (*minicircle*) bersama dengan enzim Cas9 dan sgRNA (Ran et al. 2013b). Templat baik pulih ini mengandungi jujukan DNA yang akan menggantikan atau disisip ke dalam kawasan sasaran dan diapit oleh jujukan DNA yang mempunyai homologi dengan kawasan sasaran. Sejurus pecahan beban ganda dua DNA berlaku, sel akan membaiki pecahan ini dengan menggunakan templat melalui proses rekombinasi homolog (*homologous recombination*) (Ran et al. 2013b). Pengeksploitanian proses rekombinasi homolog ini membolehkan pengeditan gen secara jitu dan penyisipan gen (*gene knockin*) dapat dijalankan dengan menggunakan teknologi CRISPR/Cas9. Namun begitu, pengeditan gen secara jitu melalui proses ini tidak boleh dijalankan di dalam sel yang tidak mempunyai keupayaan untuk menjalankan proses rekombinasi homolog (*homologous recombination deficiency*) (Liu et al. 2019).

Kedua-dua kaedah penyuntingan genom CRISPR/Cas9 ini sama ada melalui proses NHEJ atau HDR ini telah digunakan secara meluas dalam bidang penyelidikan biologi molekul, genetik, sains perubatan dan lain-lain (Doudna 2020; Hsu, Lander & Zhang 2014; Uddin, Rudin & Sen 2020). Hal ini disebabkan oleh tahap keefisienan yang tinggi serta aliran kerja yang lebih ringkas untuk tujuan penyenyapan gen atau pengubahsuaian jujukan DNA secara jitu di kawasan sasaran.

VARIASI ENZIM CAS9

Di sebalik tahap keefisienan yang tinggi dalam menyasarkan dan mengedit gen, teknologi CRISPR/Cas9 ini juga mempunyai beberapa kekurangan yang telah menghalang kemajuan aplikasinya untuk tujuan perubatan dan terapeutik. Seperti yang telah dinyatakan, NHEJ adalah mekanisme baikpulih DNA yang utama dalam sel dan lebih cekap berbanding HDR (Liu et al. 2019). Disebabkan itu, kadar kejayaan untuk menghasilkan gen terubahsuaai secara jitu amat rendah. Selain itu, terdapat kebimbangan faktor keselamatan bahawa enzim Cas9 ini mungkin boleh bertindak di luar kawasan sasaran (Doudna 2020). Tambahan pula, pecahan beban ganda dua DNA yang dicetuskan oleh enzim Cas9 ini akan menyebabkan tekanan genotoksik di dalam sel dan boleh menjejaskan integriti genom (Sheridan 2021). Justeru, beberapa strategi telah dibangunkan untuk meningkatkan tahap keefisienan, pengkhususan dan keselamatan penggunaan teknologi CRISPR/Cas9 ini, terutamanya untuk aplikasi klinikal. Antaranya adalah termasuk pembangunan pelantar reka bentuk sgRNA yang lebih baik bagi meningkatkan kecekapan proses sasaran dan meminimumkan tindakan di luar kawasan sasaran (Cui et al. 2018). Para saintis juga telah mereka bentuk pelbagai varian enzim Cas9 untuk mengatasi dan menyelesaikan masalah yang dihadapi ini. Selain itu, pembangunan varian enzim Cas9 ini telah membolehkan teknologi CRISPR/Cas9 ini digunakan dalam pelbagai aplikasi dan tidak lagi terhad kepada proses sasaran dan penyuntingan gen. Ini adalah termasuk modulasi proses transkripsi, pengubahsuaian histon

dan metilasi DNA, visualisasi kromosom, dan pengeditan gen secara jitu yang tidak bergantung kepada HDR (Adli 2018; Sánchez-Rivera & Jacks 2015).

3.1. Cas9 Nickase

Cas9 nickase atau Cas9n dihasilkan dengan memutasikan salah satu domain nuklease (RuvC atau HNH) yang berfungsi untuk memotong jujukan DNA di kawasan sasaran. Bagi domain nuklease RuvC, asid aspartik di posisi amino asid yang ke-10 di gantikan dengan alanina (D10A), manakala histidina di posisi amino asid 840 domain nuklease HNH digantikan dengan alanina (H840A) (Ran et al. 2013a). Penyahaktifan aktiviti nuklease dalam salah satu domain ini hanya akan mengakibatkan cetusan pecahan bebenang tunggal DNA (*single strand break*) oleh kompleks sgRNA/Cas9n di kawasan sasaran. Bagi tujuan proses sasaran atau pengeditan gen, konfigurasi dua kompleks sgRNA/Cas9n secara berpasangan dan berdekatan antara satu sama lain diperlukan. Setiap satu kompleks sgRNA/Cas9n ini akan menyasarkan helaian DNA yang bertentangan dan seterusnya mencetuskan pecahan bebenang ganda dua DNA yang akan dibaik pulih samada menerusi mekanisme NHEJ atau HDR (Ran et al. 2013a). Penggunaan varian Cas9n dan dua sgRNA yang berbeza di kawasan sasaran ini dapat meningkatkan ketepatan dan meminimumkan tindakan di luar kawasan sasaran (Shen et al. 2014; Trevino & Zhang 2014).

Di samping itu, enzim Cas9n juga telah digunakan untuk membangunkan teknologi penyuntingan jitu ke atas gen generasi baharu yang tidak bergantung kepada HDR: penyuntingan bes (*base editing* atau BE) dan penyuntingan perdana (*prime editing* atau PE) (Anzalone et al. 2019; Gaudelli et al. 2020; Komor et al. 2016). Berbeza dengan kaedah tradisional CRISPR/Cas9, BE dan PE tidak mencetuskan pecahan bebenang ganda dua DNA serta tidak memerlukan templat baik pulih yang berasingan untuk menyunting jujukan DNA. Dalam teknologi BE, Cas9n digabungkan sama ada dengan (i) sitosina deaminase (CBE) yang akan menggantikan sitosina kepada timidina, atau (ii) adenosina deaminase (ABE) yang akan memangkin penukaran adenina kepada guanina (Gaudelli et al. 2020; Komor et al. 2016). Teknologi PE pula menggunakan Cas9n yang dikonjugasikan bersama dengan enzim transkriptase berbalik (*reverse transcriptase*) di mana templat baik pulih dibekalkan bersama dengan sgRNA dan jujukan pengikat primer (*primer binding sequence* atau PBS) dalam satu oligonukleotida yang dikenali sebagai pegRNA (Anzalone et al. 2019). Berbanding teknologi PE, aplikasi teknologi BE amat terhad dalam penyuntingan gen kerana ia hanya boleh

memangkin penggantian nukleotida tunggal tertentu sahaja. Sehubungan itu, teknologi PE adalah lebih versatil di mana ia boleh digunakan untuk memangkin sebarang jenis perubahan nukleotida sama ada tunggal mahupun lebih. Dalam pada itu, teknologi PE juga boleh digunakan untuk menyisip atau menyingkirkan jujukan pendek DNA (*small INDELS*) di kawasan sasaran. Teknologi PE ini akan dibincangkan dengan lebih mendalam dalam ulasan ini manakala perincian untuk teknologi BE boleh dirujuk dengan lebih terperinci di dalam makalah berikut (Anzalone, Koblan & Liu 2020; Chen & Liu 2023; Porto et al. 2020).

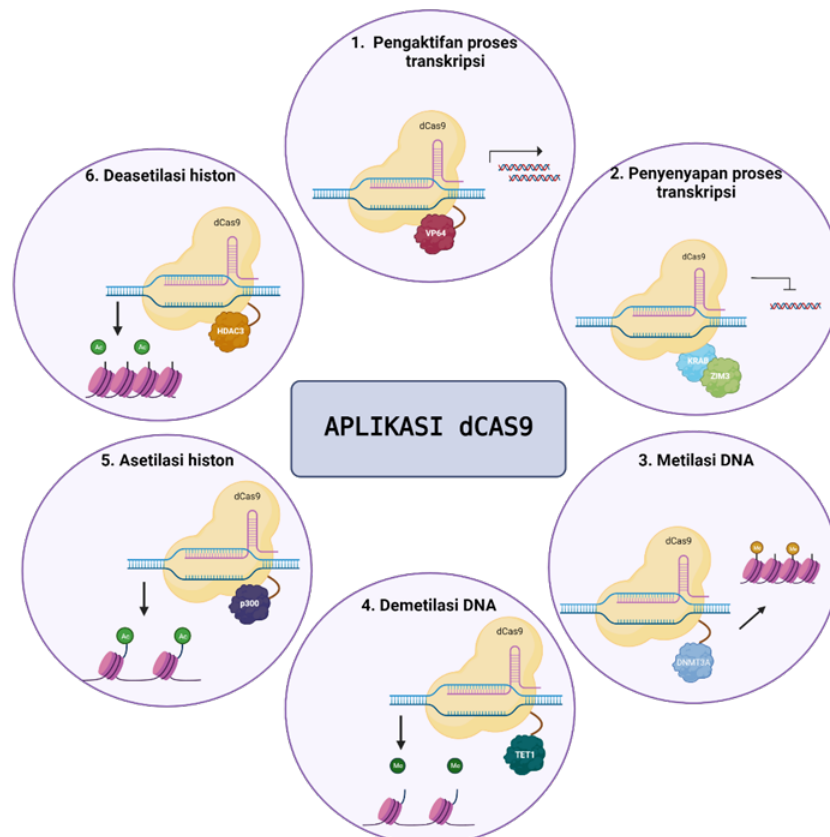
3.2. Cas9 tidak aktif (*Dead Cas9*)

Berpandukan strategi penghasilan Cas9n, para saintis seterusnya berjaya menghasilkan Cas9 tidak aktif atau "*Cas9 mati*" (*dead Cas9/dCas9*) dengan menyahaktifkan kedua-dua domain nuklease RuvC dan HNH (Qi et al. 2013). Disebabkan oleh modifikasi ini, dCas9 kehilangan sepenuhnya aktiviti nukleasenya dan tidak boleh mencetuskan sebarang pecahan DNA. Namun begitu, dCas9 masih boleh direkrut ke kawasan sasaran oleh sgRNA (Jusiak et al. 2016). Oleh yang demikian, para saintis mengambil peluang ini untuk menghasilkan varian dCas9 dengan menggabungkan dCas9 dengan pelbagai enzim atau molekul pemangkin yang lain. Dalam konteks ini, dCas9 hanya berfungsi sebagai "pengangkut" yang membawa enzim atau molekul pemangkin ini yang seterusnya akan bertindak dan menjalankan fungsinya ke atas kawasan sasaran (Adli 2018). Sebagai contoh, dCas9 digabungkan dengan domain pengaktif transkripsi (VP64 atau VPR) atau domain penindas transkripsi (KRAB) di mana kedua-dua variasi dCas9 ini berguna untuk mengawal selia ekspresi dan mengkaji fungsi gen (Alerasool et al. 2020; Chavez et al. 2015; Gilbert et al. 2013; Maeder et al. 2013).

Di samping itu, terdapat varian dCas9 yang digabungkan dengan kumpulan enzim yang berfungsi dalam pengawalseliaan dan modifikasi epigenetik. Penggabungan ini termasuk dengan enzim yang memangkin modifikasi protein histon seperti histon asetiltransferase, histon deasetilase dan histon metiltransferase yang berperanan dalam mengawal pembukaan dan penutupan kawasan kromatin (Hilton et al. 2015; Kearns et al. 2015; Kwon et al. 2017; Li et al. 2020b; O'Geen et al. 2017). Pembukaan dan penutupan kromatin ini merupakan antara proses awal dan penting dalam pengawalaturan replikasi dan transkripsi gen dalam sel. Selain itu, penggabungan dCas9 dengan enzim yang berperanan dalam proses metilasi DNA seperti DNA metiltransferase dan DNA demetilase juga telah digunakan untuk mengkaji pengawalseliaan ekspresi dan fungsi gen di dalam sel (Lu et al. 2019;

Núñez et al. 2021; Taghbalout et al. 2019; Tarjan, Flavahan & Bernstein 2019). Selain itu, dCas9 juga boleh digunakan untuk tujuan penandaan atau visualisasi lokus genomik atau kromatin dengan mengkonjugasikan dCas9 ini bersama protein pendarfluor hijau, merah dan lain-lain (Chen et al. 2018; Ye, Rong & Lin 2017). Rajah 5 menggambarkan aplikasi dCas9 yang pelbagai melalui penggabungan dCas9 bersama enzim atau molekul pemangkin yang berkaitan. Perincian berkaitan aplikasi dCas9

ini boleh dirujuk dalam ulasan-ulasan berikut (Adli 2018; Rahman & Tollefsbol 2021; Xu & Qi 2019). Secara kolektif, penjana varian dCas9 yang ini telah mengembangkan aplikasi teknologi CRISPR melangkaui fungsi tradisionalnya sebagai alat proses sasaran dan pengeditan gen. Justeru, para saintis kini mempunyai pelbagai kaedah biologi molekul untuk mengkaji fungsi gen serta proses fisiologi dan patofisiologi dengan lebih komprehensif dan efisien.



Rajah 5. Aplikasi dCas9 dalam pengawalseliaan proses transkripsi dan modifikasi epigenetik

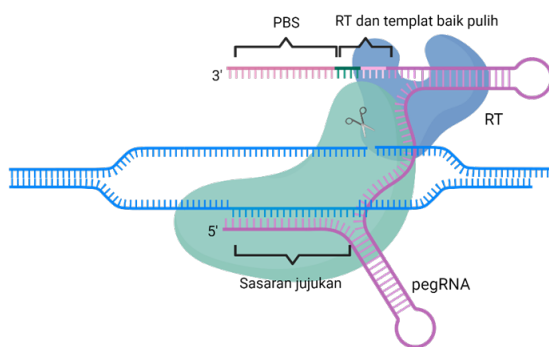
TEKNOLOGI PENYUNTINGAN PERDANA

Seperti yang telah dibincangkan dalam subseksyen 3.1, penghasilan varian Cas9n telah menjadi asas kepada pembangunan teknologi penyuntingan bes (BE) dan penyuntingan perdana (PE) yang dapat menyunting jujukan DNA dengan lebih cekap dan jitu (Kantor, McClements & MacLaren 2020). Kelebihan BE dan PE adalah teknologi ini tidak memerlukan templat baik pulih yang berasingan serta tidak akan menyebabkan pecahan bebenang ganda dua DNA (Anzalone, Koblan & Liu 2020). Namun begitu, aplikasi teknologi BE hanya terbatas untuk membuat perubahan atau mencetuskan mutasi transisi pada nukleotida tunggal: G→A, A→G, T→C, dan C→T (Gaudelli et al. 2020; Komor et al. 2016). Oleh yang demikian, teknologi PE yang lebih versatil telah dibangunkan, teknologi ini boleh

memangkin sebarang perubahan jujukan DNA sama ada pada nukleotida tunggal atau lebih (mutasi transisi dan transversi), selain mampu membuat penyisipan atau penyingkiran jujukan DNA (Chen & Liu 2023). Atas kelebihan ini, teknologi PE mempunyai potensi besar untuk digunakan dalam membangunkan model eksperimen dan mengkaji pelbagai jenis penyakit yang berpunca daripada mutasi jujukan DNA.

Teknologi PE menggunakan Cas9n yang dikonjugasikan dengan enzim transkriptase berbalik (Cas9n-RT), dan oligonukleotida pegRNA yang mengandungi (i) jujukan sgRNA yang komplementari dengan kawasan sasaran, (ii) jujukan primer untuk proses baik pulih oleh enzim RT (PBS) dan (iii) template baik pulih (Anzalone et al. 2019). Cas9n-RT akan dipandu ke kawasan sasaran oleh pegRNA di mana kawasan sasaran ini harus berada di huluan jujukan PAM (5' NGG 3') yang merupakan

syarat utama penggunaan enzim Cas9 dari spesies *Streptococcus pyogenes*. Kompleks Cas9n-RT/pegRNA akan mencetuskan pecahan bebenang tunggal DNA di kawasan sasaran yang seterusnya akan dibaiki oleh enzim RT dengan menggunakan jujukan PBS dan templat baik pulih yang dibekalkan dalam pegRNA (Anzalone et al. 2019) (Rajah 6). Bagi meningkatkan tahap keberkesanan penyuntingan, satu sgRNA berasingan boleh direka bentuk dan dihantar ke dalam sel bersama-sama dengan komponen PE yang dinyatakan di atas. sgRNA tambahan ini akan memandu Cas9n-RT ke bebenang DNA yang bertentangan dan seterusnya mengaruh pecahan bebenang tunggal DNA (Anzalone et al. 2019).



Rajah 6. Prinsip asas dan komponen kaedah penyuntingan
Prime editing

4.1 Aplikasi Penyuntingan Perdana dalam Pembangunan Model Eksperimen Penyakit dan Terapi

Teknologi PE ini telah digunakan secara meluas dalam lapangan kajian perubatan dan pembangunan model eksperimen yang lebih tepat dan mirip kepada patogenesis penyakit yang dikaji (Abuhamad et al. 2022; Anzalone et al. 2019; Happi Mbakam et al. 2022; Schene et al. 2020; Sürün et al. 2020). Dalam kajian terdahulu yang dijalankan oleh Anzalone et al. (2019), teknologi PE digunakan untuk memperkenalkan jujukan DNA asal atau membetulkan mutasi patogenik yang menyebabkan penyakit berkaitan genetik seperti *Sickle Cell Disease* dan penyakit *Tay-Sachs Disease*. Dalam kajian penyakit *Sickle Cell Disease*, mutasi *HBB E6V* dapat diperkenalkan ke dalam sel selanjur buah pinggang embrio manusia (HEK293T) dengan kadar kecekapan penyuntingan sebanyak 44% melalui penggunaan teknologi PE. Seterusnya, teknologi PE ini juga digunakan untuk membalikkan mutasi gen *HBB E6V* kepada jujukan asal (*wild-type*) dan kecekapan pembetulan mutasi yang diperhatikan adalah di antara 26% hingga 52% (Anzalone et al. 2019).

Selain itu, Liu et al., menggunakan teknologi PE untuk mengkaji kesan mutasi *E342K* serta baik

pulih mutasi gen *Serpin Peptidase Inhibitor Family A Member 1* ini dalam model eksperimental in vitro dan in vivo penyakit *Alpha-1 Antitrypsin Deficiency* (Liu et al. 2021). Dalam penemuan lain, teknologi PE digunakan untuk membaik pulih mutasi gen *DNMT1* dalam retina mencit yang menyebabkan penyakit *Inherited Retinal Disease* (She et al. 2023). Terdapat juga kajian yang mengaplikasikan teknologi PE ini untuk memperbaiki mutasi R785* dalam gen *CFTR* yang menyebabkan penyakit *Cystic Fibrosis* (Geurts et al. 2021). Disamping itu, teknologi PE digunakan dalam kajian untuk menyisip semula 2 nukleotida yang tersingkir dalam gen *DMD* yang menyebabkan penyakit *Duchenne Muscular Dystrophy* berjaya mengembalikan semula fungsi gen *DMD* dalam menghasilkan protein *dystrophin* (Chemello et al. 2021).

Kajian kes yang dibincangkan di atas menunjukkan penggunaan dan fleksibiliti teknologi penyuntingan perdana atau PE dalam membangunkan model eksperimen yang tepat dan mirip dengan penyakit yang dikaji. Selain daripada itu, ia juga menunjukkan tahap keefisienan teknologi PE ini yang tinggi dalam penyuntingan gen terutama sekali untuk membalikkan mutasi kepada jujukan asal (*wild-type*) dan berpotensi untuk digunakan secara klinikal sebagai kaedah rawatan. Namun begitu, kajian klinikal yang lebih komprehensif dan mendalam masih diperlukan bagi memastikan keberkesanan dan keselamatan kaedah rawatan berasaskan teknologi PE ini.

PENUTUP DAN PERSPEKTIF MASA HADAPAN

Penemuan dan seterusnya adaptasi penggunaan teknologi CRISPR/Cas9 dalam sel eukariot memang tidak dapat dinafikan telah merevolusikan bidang penyelidikan berkaitan biologi dan perubatan ke tahap yang tidak dapat kita bayangkan sebelum ini. Kemajuan teknologi ini berkembang dengan begitu pesat dan sehingga kini ia telah digunakan secara meluas oleh saintis di seluruh dunia. Hal ini didorong oleh tahap fleksibiliti dan keefisienannya yang tinggi serta aplikasinya yang pelbagai, merangkumi proses penyingkiran dan penyuntingan gen secara jitu sehinggalah kepada pengawalseliaan proses transkripsi dan modifikasi epigenetik. Disebabkan oleh ini, dua saintis yang menjadi antara tulang belakang penting dalam penemuan dan pembangunan teknologi CRISPR/Cas9 ini, Jennifer Doudna dan Emmanuelle Charpentier, telah dianugerahkan Hadiah Nobel dalam bidang Kimia pada tahun 2020 (Ledford & Callaway 2020). Kejayaan ini amat mengagumkan kerana kebolegunaan teknologi CRISPR/Cas9 ini dalam penyuntingan gen sel eukariot telah ditunjukkan

buat kali pertama pada tahun 2012 (Cong et al. 2013; Mali et al. 2013), dan 8 tahun berselang, dua saintis yang merintis teknologi ini telah berjaya merangkul Hadiah Nobel.

Di sebalik kelebihan dan ciri luar biasa teknologi CRISPR/Cas9 ini, kaedah ini secara umumnya masih terbatas untuk kegunaan dalam bidang penyelidikan berkaitan perubatan, farmaseutikal, bioteknologi dan pertanian. Beberapa faktor telah menjadi perdebatan dan batu penghalang kepada pengeksplotasian sepenuhnya teknologi ini, terutama sekali untuk tujuan terapeutik. Antara faktor yang menjadi kebimbangan penggunaan teknologi ini dalam merawat pesakit adalah faktor ketoksikan, tindakan di luar kawasan sasaran dan keberkesanan kaedah rawatan itu sendiri. Bagi meleraikan kegusaran ini, saintis telah berusaha untuk meningkatkan keselamatan dan keberkesanan untuk membolehkan penggunaan teknologi CRISPR/Cas9 secara klinikal. Namun begitu, ini tidak bermakna yang teknologi ini tidak dapat digunakan langsung dalam penyelidikan berkaitan pembangunan kaedah terapeutik untuk kegunaan klinikal. Sebagai contoh, kaedah CRISPR/Cas9 digunakan dalam kajian klinikal kanser imunoterapi di mana imun T-sel diedit secara *ex vivo* yang bertujuan meningkatkan sifat anti-kanser dan imuniti sel ini sebelum dipindahkan semula ke dalam pesakit (Foy et al. 2023; Ottaviano et al. 2022; Stadtmauer et al. 2020).

Juga, kaedah ini juga digunakan dalam kajian klinikal bagi merawat penyakit β -Thalassemia dan Sickle Cell Disease (Dever et al. 2016; Zakaria et al. 2022). Hasil daripada usaha penyelidikan ini, CASGEVY™ merupakan kaedah terapeutik berasaskan teknologi CRISPR/Cas9 pertama yang mendapat kelulusan FDA bagi merawat penyakit β -Thalassemia dan Sickle Cell Disease (Sheridan 2023). Strategi rawatan CASGEVY™ adalah pengaktifan semula hemoglobin fetal (HbF) melalui penyuntingan gen *BCL11A* yang berfungsi sebagai penindas pembentukan HbF. Pengaktifan semula HbF ini dapat menggantikan fungsi hemoglobin dewasa (HbA) yang abnormal disebabkan oleh mutasi dalam gen β -globin (Frangoul et al. 2021).

Selain daripada itu, terdapat satu kajian klinikal kaedah terapeutik CRISPR/Cas9 yang kini berada dalam fasa 2 untuk merawat penyakit *Hereditary Transthyretin Amyloidosis* (hATTR). Penyakit ini berpunca daripada mutasi dalam gen *TTR* yang akan menyebabkan akumulasi fibril amiloid yang patogenik. Oleh yang demikian, teknologi CRISPR/Cas9 digunakan bagi menyunting dan seterusnya menghalang pembentukan fibril amiloid ini (Gillmore et al. 2021). Sebagai tambahan, maklumat berkaitan aplikasi klinikal teknologi CRISPR/Cas9 yang lebih komprehensif boleh dirujuk di ulasan ini (Khoshandam et al. 2024; Li et al. 2020a).

Kesimpulannya, teknologi CRISPR/Cas9 telah terbukti sebagai satu kaedah biologi molekul yang sangat penting dan bernilai tinggi dalam era ini. Berdasarkan usaha yang telah digembleng dan perkembangan positif mutakhir ini, aplikasi teknologi ini di dalam terapeutik mempunyai masa hadapan yang cerah dan bukan lagi sekadar impian. Kemajuan ini seterusnya mampu membuka lembaran baharu dan mengubah landskap strategi rawatan serta pengurusan pesakit ke arah lebih cekap dan berkesan.

PENGHARGAAN

Penghargaan ditujukan kepada Kementerian Pengajian Tinggi Malaysia *Fundamental Research Grant Scheme* FRGS/1/2020/SKK0/UKM/03/3 atas pembiayaan untuk N.N.M.Z. Penghargaan seterusnya diberikan kepada Akademi Sains Malaysia-Dr Ranjeet Bhagwan Singh (RBS) Medical Research Grant JJ-2020-005 dan Annies Fahmi Initiative Sdn Bhd (AFI) JJ-2021-001.S.E.S. atas pembiayaan untuk S.E.S. Kesemua rajah dalam manuskrip ini dihasilkan dengan menggunakan aplikasi Biorender (<https://www.biorender.com/>)

RUJUKAN

- Abuhamad, A.Y., Mohamad Zambari, N.N., Sheen, L., Naes, S.M., Mohd Yusuf, S.N.H., Ahmad Tajudin, A., Mohtar, M.A., Amir Hamzah, A.S. & Syafruddin, S.E. 2022. Reverting TP53 mutation in breast cancer cells: prime editing workflow and technical considerations. *Cells* 11(10): 1612.
- Adli, M. 2018. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nature Communications* 9(1): 1911.
- Alerasool, N., Segal, D., Lee, H. & Taipale, M. 2020. An efficient KRAB domain for CRISPRi applications in human cells. *Nature Methods* 17(11): 1093–1096.
- Anzalone, A.V., Koblan, L.W. & Liu, D.R. 2020. Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. *Nature Biotechnology* 38(7): 824–844.
- Anzalone, A.V., Randolph, P.B., Davis, J.R., Sousa, A.A., Koblan, L.W., Levy, J.M., Chen, P.J., Wilson, C., Newby, G.A., Raguram, A. & Liu, D.R. 2019. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature* 576(7785): 149–157.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D.A. & Horvath, P. 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315(5819): 1709–1712.
- Bétermier, M., Bertrand, P. & Lopez, B.S. 2014. Is non-homologous end-joining really an inherently error-prone process? *PLOS Genetics* 10(1): 1004086.
- Bock, C., Datlinger, P., Chardon, F., Coelho, M.A., Dong, M.B., Lawson, K.A., Lu, T., Maroc, L.,

- Norman, T.M., Song, B., Stanley, G., Chen, S., Garnett, M., Li, W., Moffat, J., Qi, L.S., Shapiro, R.S., Shendure, J., Weissman, J.S. & Zhuang, X. 2022. High-content CRISPR screening. *Nature Reviews Methods Primers* 2(1): 1–23.
- Carroll, D. 2014. Genome engineering with targetable nucleases. *Annual Review of Biochemistry* 83: 409–439.
- Chang, H.H.Y., Pannunzio, N.R., Adachi, N. & Lieber, M.R. 2017a. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nature reviews. Molecular Cell Biology* 18(8): 495–506.
- Chang, K.-H., Smith, S.E., Sullivan, T., Chen, K., Zhou, Q., West, J.A., Liu, M., Liu, Y., Vieira, B.F., Sun, C., Hong, V.P., Zhang, M., Yang, X., Reik, A., Urnov, F.D., Rebar, E.J., Holmes, M.C., Danos, O., Jiang, H. & Tan, S. 2017b. Long-term engraftment and fetal globin induction upon BCL11A gene editing in bone-marrow-derived CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development* 4: 137–148.
- Chavez, A., Scheiman, J., Vora, S., Pruitt, B.W., Tuttle, M., P R Iyer, E., Lin, S., Kiani, S., Guzman, C.D., Wiegand, D.J., Ter-Ovanesyan, D., Braff, J.L., Davidsohn, N., Housden, B.E., Perrimon, N., Weiss, R., Aach, J., Collins, J.J. & Church, G.M. 2015. Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. *Nature Methods* 12(4): 326–328.
- Chemello, F., Chai, A.C., Li, H., Rodriguez-Caycedo, C., Sanchez-Ortiz, E., Atmanli, A., Mireault, A.A., Liu, N., Bassel-Duby, R. & Olson, E.N. 2021. Precise correction of Duchenne muscular dystrophy exon deletion mutations by base and prime editing. *Science Advances* 7(18): 4910.
- Chen, B., Zou, W., Xu, H., Liang, Y. & Huang, B. 2018. Efficient labeling and imaging of protein-coding genes in living cells using CRISPR-Tag. *Nature Communications* 9(1): 5065.
- Chen, P.J. & Liu, D.R. 2023. Prime editing for precise and highly versatile genome manipulation. *Nature Reviews Genetics* 24(3): 161–177.
- Cho, S.W., Kim, S., Kim, J.M. & Kim, J.-S. 2013. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nature Biotechnology* 31(3): 230–232.
- Collias, D. & Beisel, C.L. 2021. CRISPR technologies and the search for the PAM-free nuclease. *Nature Communications* 12(1): 555.
- Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A. & Zhang, F. 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339(6121): 819–823.
- Cui, Y., Xu, J., Cheng, M., Liao, X. & Peng, S. 2018. Review of CRISPR/Cas9 sgRNA design tools. *Interdisciplinary Sciences, Computational Life Sciences* 10(2): 455–465.
- Dever, D.P., Bak, R.O., Reinisch, A., Camarena, J., Washington, G., Nicolas, C.E., Pavel-Dinu, M., Saxena, N., Wilkens, A.B., Mantri, S., Uchida, N., Hendel, A., Narla, A., Majeti, R., Weinberg, K.I. & Porteus, M.H. 2016. CRISPR/Cas9 beta-globin gene targeting in human hematopoietic stem cells. *Nature* 539(7629): 384.
- Doudna, J.A. 2020. The promise and challenge of therapeutic genome editing. *Nature* 578(7794): 229–236.
- Eid, A. & Mahfouz, M.M. 2016. Genome editing: the road of CRISPR/Cas9 from bench to clinic. *Experimental & Molecular Medicine* 48(10): 265.
- Foy, S.P., Jacoby, K., Bota, D.A., Hunter, T., Pan, Z., Stawiski, E., Ma, Y., Lu, W., Peng, S., Wang, C.L., Yuen, B., Dalmás, O., Heeringa, K., Sennino, B., Conroy, A., Bethune, M.T., Mende, I., White, W., Kukreja, M., Gunturu, S., Humphrey, E., Hussaini, A., An, D., Litterman, A.J., Quach, B.B., Ng, A.H.C., Lu, Y., Smith, C., Campbell, K.M., Anaya, D., Skrdlant, L., Huang, E.Y.-H., Mendoza, V., Mathur, J., Dengler, L., Purandare, B., Moot, R., Yi, M.C., Funke, R., Sibley, A., Stallings-Schmitt, T., Oh, D.Y., Chmielowski, B., Abedi, M., Yuan, Y., Sosman, J.A., Lee, S.M., Schoenfeld, A.J., Baltimore, D., Heath, J.R., Franzusoff, A., Ribas, A., Rao, A.V. & Mandl, S.J. 2023. Non-viral precision T cell receptor replacement for personalized cell therapy. *Nature* 615(7953): 687–696.
- Frangoul, H., Altshuler, D., Cappellini, M.D., Chen, Y.-S., Domm, J., Eustace, B.K., Foell, J., Fuente, J. de la, Grupp, S., Handgretinger, R., Ho, T.W., Kattamis, A., Kernysky, A., Lekstrom-Himes, J., Li, A.M., Locatelli, F., Mapara, M.Y., Montalembert, M. de, Rondelli, D., Sharma, A., Sheth, S., Soni, S., Steinberg, M.H., Wall, D., Yen, A. & Corbacioglu, S. 2021. CRISPR-Cas9 gene editing for sickle cell disease and β -thalassemia. *New England Journal of Medicine* 384(3): 252–260.
- Gaj, T., Gersbach, C.A. & Barbas, C.F. 2013. ZFN, TALEN and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology* 31(7): 397–405.
- Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P. & Siksnys, V. 2012. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *The Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 2579–2586.
- Gaudelli, N.M., Lam, D.K., Rees, H.A., Solá-Esteves, N.M., Barrera, L.A., Born, D.A., Edwards, A., Gehrke, J.M., Lee, S.-J., Liquori, A.J., Murray, R., Packer, M.S., Rinaldi, C., Slaymaker, I.M., Yen, J., Young, L.E. & Ciaramella, G. 2020. Directed evolution of adenine base editors with increased activity and therapeutic application. *Nature Biotechnology* 38(7): 892–900.
- Geurts, M.H., de Poel, E., Pleguezuelos-Manzano, C., Oka, R., Carrillo, L., Andersson-Rolf, A., Boretto, M., Brunsveld, J.E., van Bostel, R., Beekman, J.M. & Clevers, H. 2021. Evaluating CRISPR-based prime editing for cancer modeling and CFTR repair in organoids. *Life Science Alliance* 4(10): 202000940.

- Gilbert, L.A., Larson, M.H., Morsut, L., Liu, Z., Brar, G.A., Torres, S.E., Stern-Ginossar, N., Brandman, O., Whitehead, E.H., Doudna, J.A., Lim, W.A., Weissman, J.S. & Qi, L.S. 2013. CRISPR-Mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell* 154(2): 442–451.
- Gillmore, J.D., Gane, E., Taubel, J., Kao, J., Fontana, M., Maitland, M.L., Seitzer, J., O'Connell, D., Walsh, K.R., Wood, K., Phillips, J., Xu, Y., Amaral, A., Boyd, A.P., Cehelsky, J.E., McKee, M.D., Schiermeier, A., Harari, O., Murphy, A., Kyratsous, C.A., Zambrowicz, B., Soltys, R., Gutstein, D.E., Leonard, J., Sepp-Lorenzino, L. & Lebwohl, D. 2021. CRISPR-Cas9 in vivo gene editing for transthyretin amyloidosis. *New England Journal of Medicine* 385(6): 493–502.
- Happi Mbakam, C., Rousseau, J., Tremblay, G., Yameogo, P. & Tremblay, J.P. 2022. Prime editing permits the introduction of specific mutations in the gene responsible for duchenne muscular dystrophy. *International Journal of Molecular Sciences* 23(11): 6160.
- Hilton, I.B., D'Ippolito, A.M., Vockley, C.M., Thakore, P.I., Crawford, G.E., Reddy, T.E. & Gersbach, C.A. 2015. Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nature Biotechnology* 33(5): 510–517.
- Hoban, M.D., Joglekar, A.V., Gray, D., Kaufman, M.L., Urbinati, F., Senadheera, S., Cost, G., Reik, A., Holmes, M.C., Gregory, P.D., Hollis, R.P. & Kohn, D.B. 2013. Zinc finger nucleases targeting the β -globin locus drive efficient correction of the sickle mutation in CD34+ cells. *Blood* 122(21): 2904.
- Hsu, P.D., Lander, E.S. & Zhang, F. 2014. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* 157(6): 1262–1278.
- Ishino, Y., Krupovic, M. & Forterre, P. 2018. History of CRISPR-Cas from encounter with a mysterious repeated sequence to genome editing technology. *Journal of Bacteriology* 200(7): 00580-17.
- Jansen, R., Embden, J.D.A. van, Gaastra, W. & Schouls, L.M. 2002. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology* 43(6): 1565–1575.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A. & Charpentier, E. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337(6096): 816–821.
- Jinek, M., East, A., Cheng, A., Lin, S., Ma, E. & Doudna, J. 2013. RNA-programmed genome editing in human cells. *eLife* 2: 00471.
- Jusiak, B., Cleto, S., Perez-Piñera, P. & Lu, T.K. 2016. Engineering synthetic gene circuits in living cells with CRISPR technology. *Trends in Biotechnology* 34(7): 535–547.
- Kantor, A., McClements, M.E. & MacLaren, R.E. 2020. CRISPR-Cas9 DNA base-editing and prime-editing. *International Journal of Molecular Sciences* 21(17): 6240.
- Kearns, N.A., Pham, H., Tabak, B., Genga, R.M., Silverstein, N.J., Garber, M. & Maehr, R. 2015. Functional annotation of native enhancers with a Cas9–histone demethylase fusion. *Nature Methods* 12(5): 401–403.
- Khoshandam, M., Soltaninejad, H., Mousazadeh, M., Hamidieh, A.A. & Hosseinkhani, S. 2024. Clinical applications of the CRISPR/Cas9 genome-editing system: Delivery options and challenges in precision medicine. *Genes & Diseases* 11(1): 268–282.
- Komor, A.C., Kim, Y.B., Packer, M.S., Zuris, J.A. & Liu, D.R. 2016. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* 533(7603): 420–424.
- Kwon, D.Y., Zhao, Y.-T., Lamonica, J.M. & Zhou, Z. 2017. Locus-specific histone deacetylation using a synthetic CRISPR-Cas9-based HDAC. *Nature Communications* 8: 15315.
- Ledford, H. & Callaway, E. 2020. Pioneers of revolutionary CRISPR gene editing win chemistry Nobel. *Nature* 586(7829): 346–347.
- Li, H., Yang, Y., Hong, W., Huang, M., Wu, M. & Zhao, X. 2020a. Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 5: 1.
- Li, K., Liu, Y., Cao, H., Zhang, Y., Gu, Z., Liu, X., Yu, A., Kaphle, P., Dickerson, K.E., Ni, M. & Xu, J. 2020b. Interrogation of enhancer function by enhancer-targeting CRISPR epigenetic editing. *Nature Communications* 11(1): 485.
- Liu, M., Rehman, S., Tang, X., Gu, K., Fan, Q., Chen, D. & Ma, W. 2019. Methodologies for improving HDR efficiency. *Frontiers in Genetics* 9.
- Liu, P., Liang, S.-Q., Zheng, C., Mintzer, E., Zhao, Y.G., Ponninselvan, K., Mir, A., Sontheimer, E.J., Gao, G., Flotte, T.R., Wolfe, S.A. & Xue, W. 2021. Improved prime editors enable pathogenic allele correction and cancer modelling in adult mice. *Nature Communications* 12(1): 2121.
- Lu, A., Wang, J., Sun, W., Huang, W., Cai, Z., Zhao, G. & Wang, J. 2019. Reprogrammable CRISPR/dCas9-based recruitment of DNMT1 for site-specific DNA demethylation and gene regulation. *Cell Discovery* 5: 22.
- Maeder, M.L., Linder, S.J., Cascio, V.M., Fu, Y., Ho, Q.H. & Joung, J.K. 2013. CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. *Nature Methods* 10(10): 977–979.
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E., Norville, J.E. & Church, G.M. 2013. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339(6121): 823–826.
- Miller, J.C., Tan, S., Qiao, G., Barlow, K.A., Wang, J., Xia, D.F., Meng, X., Paschon, D.E., Leung, E., Hinkley, S.J., Dulay, G.P., Hua, K.L., Ankoudinova, I., Cost, G.J., Urnov, F.D., Zhang, H.S., Holmes, M.C., Zhang, L., Gregory, P.D. & Rebar, E.J. 2011. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nature Biotechnology* 29(2): 143–148.

- Mojica, F.J.M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J. & Soria, E. 2005. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution* 60(2): 174–182.
- Nishimasu, H., Ran, F.A., Hsu, P.D., Konermann, S., Shehata, S.I., Dohmae, N., Ishitani, R., Zhang, F. & Nureki, O. 2014. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell* 156(5): 935–949.
- Núñez, J.K., Chen, J., Pommier, G.C., Cogan, J.Z., Replogle, J.M., Adriaens, C., Ramadoss, G.N., Shi, Q., Hung, K.L., Samelson, A.J., Pogson, A.N., Kim, J.Y.S., Chung, A., Leonetti, M.D., Chang, H.Y., Kampmann, M., Bernstein, B.E., Hovestadt, V., Gilbert, L.A. & Weissman, J.S. 2021. Genome-wide programmable transcriptional memory by CRISPR-based epigenome editing. *Cell* 184(9): 2503–2519.e17.
- O’Geen, H., Ren, C., Nicolet, C.M., Perez, A.A., Halmai, J., Le, V.M., Mackay, J.P., Farnham, P.J. & Segal, D.J. 2017. dCas9-based epigenome editing suggests acquisition of histone methylation is not sufficient for target gene repression. *Nucleic Acids Research* 45(17): 9901–9916.
- Osakabe, Y. & Osakabe, K. 2015. Genome editing with engineered nucleases in plants. *Plant and Cell Physiology* 56(3): 389–400.
- Ottaviano, G., Georgiadis, C., Gkazi, S.A., Syed, F., Zhan, H., Etuk, A., Preece, R., Chu, J., Kubat, A., Adams, S., Veys, P., Vora, A., Rao, K., Qasim, W., & FOR THE TT52 CRISPR-CAR GROUP. 2022. Phase 1 clinical trial of CRISPR-engineered CAR19 universal T cells for treatment of children with refractory B cell leukemia. *Science Translational Medicine* 14(668): 3010.
- Patel, S.A., Hirosue, S., Rodrigues, P., Vojtasova, E., Richardson, E.K., Ge, J., Syafruddin, S.E., Speed, A., Papachristou, E.K., Baker, D., Clarke, D., Purvis, S., Wesolowski, L., Dyas, A., Castillon, L., Caraffini, V., Bihary, D., Yong, C., Harrison, D.J., Stewart, G.D., Machiela, M.J., Purdue, M.P., Chanock, S.J., Warren, A.Y., Samarajiwa, S.A., Carroll, J.S. & Vanharanta, S. 2022. The renal lineage factor PAX8 controls oncogenic signalling in kidney cancer. *Nature*: 1–8.
- Porto, E.M., Komor, A.C., Slaymaker, I.M. & Yeo, G.W. 2020. Base editing: advances and therapeutic opportunities. *Nature reviews. Drug discovery* 19(12): 839–859.
- Qasim, W., Zhan, H., Samarasinghe, S., Adams, S., Amroliya, P., Stafford, S., Butler, K., Rivat, C., Wright, G., Somana, K., Ghorashian, S., Pinner, D., Ahsan, G., Gilmour, K., Lucchini, G., Inglott, S., Mifsud, W., Chiesa, R., Peggs, K.S., Chan, L., Farzeneh, F., Thrasher, A.J., Vora, A., Pule, M. & Veys, P. 2017. Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells. *Science Translational Medicine* 9(374): 2013.
- Qi, L.S., Larson, M.H., Gilbert, L.A., Doudna, J.A., Weissman, J.S., Arkin, A.P. & Lim, W.A. 2013. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell* 152(5): 1173–1183.
- Rahman, M.M. & Tollefsbol, T.O. 2021. Targeting cancer epigenetics with CRISPR-dCAS9: Principles and prospects. *Methods* 187: 77–91.
- Ran, F.A., Hsu, P.D., Lin, C.-Y., Gootenberg, J.S., Konermann, S., Trevino, A., Scott, D.A., Inoue, A., Matoba, S., Zhang, Y. & Zhang, F. 2013a. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell* 154(6): 1380–1389.
- Ran, F.A., Hsu, P.D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D.A. & Zhang, F. 2013b. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols* 8(11): 2281–2308.
- Sánchez-Rivera, F.J. & Jacks, T. 2015. Applications of the CRISPR-Cas9 system in cancer biology. *Nature Reviews. Cancer* 15(7): 387–395.
- Schene, I.F., Joore, I.P., Oka, R., Mokry, M., van Vugt, A.H.M., van Boxtel, R., van der Doef, H.P.J., van der Laan, L.J.W., Verstegen, M.M.A., van Hasselt, P.M., Nieuwenhuis, E.E.S. & Fuchs, S.A. 2020. Prime editing for functional repair in patient-derived disease models. *Nature Communications* 11(1): 5352.
- She, K., Liu, Y., Zhao, Q., Jin, X., Yang, Y., Su, J., Li, R., Song, L., Xiao, J., Yao, S., Lu, F., Wei, Y. & Yang, Y. 2023. Dual-AAV split prime editor corrects the mutation and phenotype in mice with inherited retinal degeneration. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 8(1): 1–12.
- Shen, B., Zhang, W., Zhang, J., Zhou, J., Wang, J., Chen, L., Wang, L., Hodgkins, A., Iyer, V., Huang, X. & Skarnes, W.C. 2014. Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. *Nature Methods* 11(4): 399–402.
- Sheridan, C. 2021. CRISPR therapies march into clinic, but genotoxicity concerns linger. *Nature Biotechnology* 39(8): 897–899.
- Sheridan, C. 2023. The world’s first CRISPR therapy is approved: who will receive it? *Nature Biotechnology*: 3–4.
- Shibata, M., Nishimasu, H., Kodera, N., Hirano, S., Ando, T., Uchihashi, T. & Nureki, O. 2017. Real-space and real-time dynamics of CRISPR-Cas9 visualized by high-speed atomic force microscopy. *Nature Communications* 8(1): 1430.
- Stadtmauer, E.A., Fraietta, J.A., Davis, M.M., Cohen, A.D., Weber, K.L., Lancaster, E., Mangan, P.A., Kulikovskaya, I., Gupta, M., Chen, F., Tian, L., Gonzalez, V.E., Xu, J., Jung, I.-Y., Melenhorst, J.J., Plesa, G., Shea, J., Matlawski, T., Cervini, A., Gaymon, A.L., Desjardins, S., Lamontagne, A., Salas-Mckee, J., Fesnak, A., Siegel, D.L., Levine, B.L., Jadowsky, J.K., Young, R.M., Chew, A., Hwang, W.-T., Hexner, E.O., Carreno, B.M., Nobles, C.L., Bushman, F.D., Parker, K.R., Qi, Y., Satpathy, A.T., Chang, H.Y., Zhao, Y., Lacey, S.F. & June, C.H. 2020. CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. *Science* 367(6481): 7365.
- Sürün, D., Schneider, A., Mircetic, J., Neumann, K., Lansing, F., Paszkowski-Rogacz, M., Hänchen, V., Lee-Kirsch, M.A. & Buchholz,

- F. 2020. Efficient generation and correction of mutations in human iPS cells utilizing mRNAs of CRISPR base editors and prime editors. *Genes* 11(5): 511.
- Syafruddin, S.E., Rodrigues, P., Vojtasova, E., Patel, S.A., Zaini, M.N., Burge, J., Warren, A.Y., Stewart, G.D., Eisen, T., Bihary, D., Samarajiwa, S.A. & Vanharanta, S. 2019. A KLF6-driven transcriptional network links lipid homeostasis and tumour growth in renal carcinoma. *Nature Communications* 10(1): 1152.
- Symington, L.S. & Gautier, J. 2011. Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annual Review of Genetics* 45: 247–271.
- Taghbalout, A., Du, M., Jillette, N., Rosikiewicz, W., Rath, A., Heinen, C.D., Li, S. & Cheng, A.W. 2019. Enhanced CRISPR-based DNA demethylation by Casilio-ME-mediated RNA-guided coupling of methylcytosine oxidation and DNA repair pathways. *Nature Communications* 10(1): 4296.
- Tarjan, D.R., Flavahan, W.A. & Bernstein, B.E. 2019. Epigenome editing strategies for the functional annotation of CTCF insulators. *Nature Communications* 10(1): 4258.
- Trevino, A.E. & Zhang, F. 2014. Genome editing using Cas9 nickases. *Methods in Enzymology* 546: 161–174.
- Uddin, F., Rudin, C.M. & Sen, T. 2020. CRISPR gene therapy: applications, limitations, and implications for the future. *Frontiers in Oncology* 10: 1387.
- Xu, X. & Qi, L.S. 2019. A CRISPR–dCas toolbox for genetic engineering and synthetic biology. *Journal of Molecular Biology* 431(1): 34–47.
- Ye, H., Rong, Z. & Lin, Y. 2017. Live cell imaging of genomic loci using dCas9-SunTag system and a bright fluorescent protein. *Protein & Cell* 8(11): 853–855.
- Zakaria, N.A., Bahar, R., Abdullah, W.Z., Yusoff, A.A.M., Shamsuddin, S., Wahab, R.A. & Johan, M.F. 2022. Genetic manipulation strategies for β -Thalassemia: a review. *Frontiers in Pediatrics* 10: 901605.
- Zhang, H.-X., Zhang, Y. & Yin, H. 2019. Genome editing with mRNA encoding ZFN, TALEN, and Cas9. *Molecular Therapy* 27(4): 735–746.