

ویرایش هدفدار ژنوم با میانجی‌گری اندونوکلازهای مهندسی شده

An overview of genome editing methods based on endonucleases

منا بردبار^۱، رضا درویش‌زاده^۲، مقصود پژوهنده^۳، دانیال کهریزی^{۴*}

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه

۲- استاد، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه و پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه

۳- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان

۴- استاد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه رازی

Bordbar M¹, Darvishzadeh R², Pazhouhandeh M³, Kahrizi D^{*4}

1- MSc, in Agricultural Biotechnology, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

2- Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Institute of Biotechnology, Urmia University, Urmia, Iran

3- Associate Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Azarbaijan Shahid Madani University, Iran

4- Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Razi University, Kermanshah, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: dkahrizi@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۸/۶/۵ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۷/۱۵)

چکیده

برای مقابله با چالش‌های فعلی در کشاورزی، ویرایش ژنوم با استفاده از نوکلئازهای اختصاصی محل (SSNs) به‌عنوان یک ابزار قدرتمند برای تحقیقات زیست‌شناسی پایه و کاربردی ارائه شده است. در این مقاله، اصول و کاربرد ابزارهای ویرایش ژنوم، از جمله مگانوکلازها (MN)، نوکلئازهای انگشت روی (ZFNs)، نوکلئازهای افکتور شبه فعال‌کننده رونویسی (TALENs) و تناوب‌های کوتاه پالیندروم فاصله‌دار منظم خوشه‌ای CRISPR/Cas9 توصیف می‌شود. در این میان؛ CRISPR/Cas9، به‌عنوان جدیدترین فناوری ویرایش ژنوم، به سرعت در حال توسعه است و با موفقیت در بسیاری از ارگانیسم‌ها مورد استفاده قرار گرفته است. این مقاله به‌طور خاص قدرت CRISPR/Cas9 را به‌عنوان ابزاری برای مهندسی ژنوم گیاهی نشان می‌دهد و نقاط قوت و ضعف فن‌آوری CRISPR/Cas9 را در مقایسه با سه ابزار ویرایش مجدد ژنوم، MNs، ZFNs و TALEN تشریح می‌نماید.

واژه‌های کلیدی

اندونوکلاز
ویرایش ژن
CRISPR/Cas9

مقدمه

در اصلاح نباتات متداول، ایجاد تغییر در ساختار ژنتیکی گیاهان عمدتاً توسط روش‌های معمول شامل دورگ‌گیری و گزینش، تلاقی‌های برگشتی و جهش انجام می‌گیرد. کاهش تنوع زیستی، نیاز به وجود گونه‌های خویشاوند و سازگار جنسی گیاه هدف، لزوم صرف هزینه بالا و زمان‌بر بودن فرآیندهای اصلاحی از ایرادهای اساسی اصلاح نباتات متداول است (Chen and Gao 2014).

نتیجه پیشرفت‌ها در زیست‌شناسی مولکولی ظهور فناوری‌های نوین مانند بیوتکنولوژی و نانوبیوتکنولوژی است. مهندسی ژنتیک یکی از فناوری‌های نوین و ارزشمندی است که می‌تواند در خدمت بشریت قرار گیرد (Dumbliauskas et al. 2011). این فناوری از ابتدای پیدایش، یعنی دهه هفتم قرن بیستم، تاکنون پیشرفت‌های چشم‌گیری داشته و خدمات ارزنده‌ای را ارائه نموده است (Pazhouhandeh et al. 2006). ویرایش هدفمند ژنوم با استفاده از نوکلئازهای اختصاصی، پتانسیل بالایی را برای بهبود کیفیت و عملکرد گیاهان زراعی در جهت تامین نیاز غذایی مردم جهان و فراهم کردن یک سیستم کشاورزی پایدار ایجاد کرده است (Lio et al. 2013; Pakbaz et al. 2015).

امروزه تولید غذا هم از ابعاد کمی و کیفی نمی‌تواند صرفاً به کشاورزی سنتی متکی باشد. تأمین امنیت غذایی جامعه و نیاز به افزایش مداوم تولیدات کشاورزی بستگی به مسلح شدن و در آمیختن مؤثر اصلاح نباتات متداول با زیست‌فناوری‌های نوین و ابزارهای قوی مهندسی ژنتیک دارد. اگرچه، زیست‌فناوری‌های نوین روش‌هایی را برای تولید محصولات که کاربردهای گسترده‌ای در پزشکی، کشاورزی و صنعت دارند، فراهم می‌نمایند ولی جنبه‌های ایمنی موجودات دست‌ورزی شده ژنتیکی^۱ یا تراریخته^۲ و فرآورده‌های حاصل از آنها باید قبل از استفاده دقیقاً مورد بررسی قرار گیرند. از مهم‌ترین ملاحظات تاثیرگذار در بهره‌برداری از محصولات تراریخته، انتقال قطعات DNA غیر گیاهی به ژنوم گیاه والد، فرار ژن و انتقال عمودی ژن هدف و استفاده از ژن‌های گزینشگر مانند ژن‌های مقاومت به

آنتی‌بیوتیک‌ها و علف‌کش‌ها می‌باشند (Jouzani et al. 2010; Jouzani and Tohidfar 2013; Tohidfar 2013). بنابراین، به عنوان یک جایگزین، نیاز به استفاده از روش‌های پیشرفته تولید گیاهان تراریخته مانند تناوب‌های کوتاه پالیندروم فاصله‌دار منظم خوشه‌ای Cas9^۳ (CRISPR/Cas9) که نوعی روش ویرایش ژنوم است، جهت بهبود کیفیت و عملکرد موثر گیاهان زراعی با کارایی بالا بیش از پیش احساس می‌شود. این سیستم با ایجاد جهش‌هایی در مکان‌های ژنی چندگانه و ایجاد حذف‌های بزرگ می‌تواند به اصلاح گیاهان بدون انتقال ژن خارجی شتاب دهد. این روش می‌تواند عملکرد و فعالیت ژن‌های گیاهی را بهبود بخشیده و صفات جدید ایجاد نماید (Zhang and Zhou 2014). انواع متنوعی از نوکلئازهای اختصاصی محل^۴ برای مهندسی ژنتیک استفاده می‌شوند. با اینکه جزئیات هر سیستم متفاوت است اما فرایند کلی سیستم‌های SSNs مشابه است (Samanta et al. 2016). مهم‌ترین بخش استراتژی مهندسی هدفدار ژنوم، ایجاد برش‌های دو رشته‌ای اختصاصی جایگاه در یک لوکوس از پیش تعیین شده به وسیله اندونوکلازهای مهندسی شده است. ترمیم نهایی این برش‌های دو رشته‌ای، به وسیله ی نوترکیبی هومولوگی یا اتصال پایانه‌های غیر هومولوگ، تغییرات ژنتیکی مورد نظر و دلخواه را ایجاد می‌کند (Jensen et al. 2011; Perez-Pinera et al. 2012). سازوکار اتصال پایانه‌های غیرهومولوگ، به دلیل واردشدگی‌ها یا حذف‌های کوچک^۵، می‌تواند سبب تخریب ژن از طریق ایجاد جهش‌های تغییر در چارچوب^۶ شود. بنابراین در تحقیقات، از این سیستم غالباً برای ایجاد موتاسیون و غیرفعال-سازی ژن استفاده می‌شود. در حالی که سازوکار نوترکیبی هومولوگ می‌تواند تبادل نوکلئوتیدی بین یک ناحیه ژنومی درونی و یک قطعه DNA بیگانه را که توسط توالی‌های هومولوگ احاطه شده، واسطه‌گری نماید تا سبب واردشدگی، حذف و یا جایگزینی یک توالی خاص شود (Pauwels et al. 2014)، بنابراین از این مسیر عمدتاً برای حذف یا افزودن دقیق

³ CRISPR/Cas9: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat/CRISPR-associated system 9.

⁴ SSNs: Genome editing mediated by site- specific nucleases

⁵ Indel

⁶ Frame shift mutation

¹ GMO: Genetically modified organism

² Transgenic

کارایی آن‌ها در مهندسی هدف‌دار ژنوم مورد بررسی و توصیف قرار گیرد.

۱- مگانوکلازها (Meganucleases)

مگانوکلازها که در تمام قلمروهای حیات یافت می‌شوند، نوکلئازهای طبیعی هستند که در اواخر دهه ۱۹۸۰ کشف شدند. این‌ها توالی‌های بلندی از DNA به طول ۴۰-۱۴ جفت‌باز را شناسایی می‌کنند و یک ابزار نویدبخش برای ایجاد برش‌های دو رشته‌ای در کروموزوم‌ها برای مهندسی هدف‌دار ژنوم هستند (Marraffini and Jiang 2015). مگانوکلازها بر اساس توالی و موتیف‌های ساختاری به پنج خانواده تقسیم می‌شوند که بیشترین مطالعات بر روی اعضای خانواده‌ی LAGLIDADG به جهت آن که بیشترین ویژگی را در شناسایی توالی‌های DNA نشان داده‌اند (Zhao et al. 2007; Marcaida et al. 2010)، انجام گرفته است.

ژن‌های کدکننده مگانوکلازهای LAGLIDADG که تحت عنوان "نوکلئازهای خانگی"^۲ نیز خوانده می‌شوند، بیشتر در درون ایترون‌ها واقع شده و تا امروز نقش دقیق آن‌ها در میزبان مشخص نشده و جزو عناصر ژنتیک خودخواه^۳ دسته‌بندی می‌شوند (Gogarten and Hilario 2006). نام‌گذاری HEs مشابه نام‌گذاری آنزیم‌های برشی می‌باشد (Smith and Nathans 1973). در حقیقت اندونوکلازهای ایترون با پیشوند I (برای intron) و اندونوکلازهای intien با پیشوند PI (برای Protein insert) مشخص می‌شوند (Miglani 2017). دو مورد از مهم‌ترین اعضای این خانواده I-CreI (Heath 1997) گرفته شده از میتوکندری مخمر نان^۴ و PI-SceI (Duan 1997) گرفته شده از کلروپلاست جلبک سبز^۵ می‌باشند (Miglani 2017) که هر دو به‌صورت ساختار ثانویه‌ی صفحه‌ی آنتی پارالل- بتا در می‌آیند که به‌عنوان واحد شناسایی DNA عمل کرده و با تشکیل یک ساختار زین مانند بر روی شیار بزرگ مارپیچ DNA قرار می‌گیرند. برش DNA با میانجی‌گری کاتیون‌های دو ظرفیتی که در جایگاه فعال آنزیم واقع شده‌اند، کاتالیز می‌شود (Pauwels et al. 2014; Zhao et al. 2017).

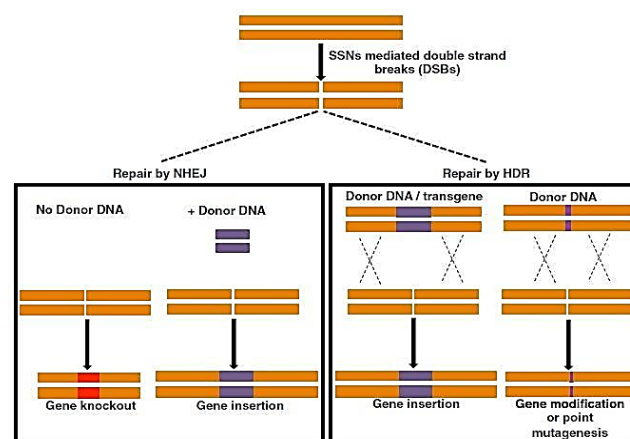
² HE: Homing endonuclease

³ Selfish

⁴ *Saccharomyces cerevisiae*

⁵ *Chlamydomonas reinhardtii*

بخش‌های هدف ژنوم و یا وارد کردن دقیق ژن خارجی به یک محل شناخته شده در ژنوم استفاده می‌شود (Maruyama et al. 2015). در نتیجه ویرایش ژنومی توسط SSNs می‌تواند بسیار متفاوت باشد (Samanta et al. 2016) (شکل ۱).



شکل ۱- نتایج محتمل حاصل از ویرایش ژنوم با استفاده از SSNs. بعد از شکسته شدن رشته دوتایی توسط SSNs ممکن است در غیاب رشته دهنده نتیجه به سمت خاموش کردن ژن منتهی شود یا در صورت حضور DNA دهنده ادغام ژن صورت پذیرد و با ترمیم انتهای غیر هومولوگ بازسازی انجام گیرد. نتیجه ترمیم شکست رشته دوتایی با مسیر هومولوگ ممکن است ایجاد جهش و یا ادغام ژن مورد نظر باشد (Marraffini and Jiang 2015).

برای اینکه یک اندونوکلاز مهندسی شده، بتواند به طور گسترده‌ای در ویرایش هدف‌دار ژنوم کاربرد داشته باشد، باید دارای دو ویژگی اساسی باشد: الف) توالی بلندی از DNA را با ویژگی بالا شناسایی کند تا از ایجاد سمیت ناشی از برش‌های خارج از جایگاه هدف^۱ جلوگیری شود. زیرا برش‌های خارج از جایگاه هدف، سبب ایجاد تغییرات در لوکوس‌های ناخواسته شده و فنوتیپ‌های غیر قابل پیش‌بینی می‌شود. ب) شناسایی و برش در یک توالی تعریف شده به آسانی عملی شود (Asadollahi et al. 2014). چهار رده اصلی از داکسی اندونوکلازها، شامل مگانوکلازها، اندونوکلازهای انگشت روی، اندونوکلازهای افکتور شبه فعال کننده‌ی رونویسی و سیستم CRISPR/Cas هستند که به‌عنوان ابزار مهندسی ژنوم توسعه یافته محسوب می‌شوند و هر کدام دارای معایب و مزایایی می‌باشند. در این مقاله سعی می‌شود که هر کدام از آن‌ها با توجه به میزان اهمیت و

¹ Off-target

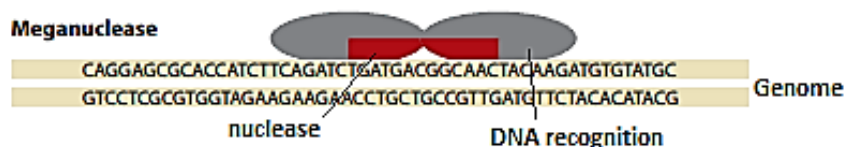
برخی از مگانوکلازها همودایمر تشکیل می‌دهند (مثل I-CreI) و جایگاه‌های هدف پالیندرومی^۱ و پالیندرومی کاذب را شناسایی می‌کنند. در حالی که برخی دیگر از آن‌ها مونومری بوده (مانند I-SceI) و توالی‌های غیرپالیندرومی را شناسایی می‌کنند (Miglani et al. 2017) (شکل ۲). مگانوکلازها با وجود دارا بودن مزایایی قابل توجه مانند ویژگی بسیار بالا در شناسایی توالی مورد نظر، سه محدودیت اصلی نیز دارند که کاربرد وسیع آن‌ها را محدود می‌کند: الف) وجود شبکه گسترده‌ای از برهمکنش‌های بین DNA و مگانوکلاز است که تاکنون کد آن شناسایی نشده است. ب) متیله شدن DNA در توالی‌های دو نوکلئوتیدی G و C سبب کاهش تمایل^۲ آنزیم در اتصال به DNA و همچنین کاهش فعالیت کاتالیتیکی آنزیم می‌شود (Duan et al. 1997; Valton 2012). ج) احتمال وجود یک جایگاه شناسایی در ژنوم برای هر آنزیم بسیار پایین است. برای نمونه اگر طول جایگاه شناسایی یک آنزیم حدود ۱۸ جفت‌باز باشد، ژنوم انسان باید ۲۰ برابر بزرگ‌تر از مقدار فعلی باشد تا یک جایگاه شناسایی برای آنزیم مورد نظر وجود داشته باشد. برای ایجاد مگانوکلازهای مهندسی شده، دو رویکرد ذیل مورد تاکید قرار گرفته است:

الف) تغییر ویژگی مگانوکلازهای طبیعی از طریق تغییر توالی اسید آمینه‌ای آن‌ها و سپس انتخاب آنزیم‌های عملکردی که جایگاه مورد نظر را شناسایی کرده و برش دهند (Seligman et al. ۲۰۰۸).
ب) تغییر ویژگی مگانوکلازهای طبیعی از طریق تغییر توالی اسید آمینه‌ای آن‌ها و سپس انتخاب آنزیم‌های عملکردی که جایگاه مورد نظر را شناسایی کرده و برش دهند (Seligman et al. ۲۰۰۸).

الف) تغییر ویژگی مگانوکلازهای طبیعی از طریق تغییر توالی اسید آمینه‌ای آن‌ها و سپس انتخاب آنزیم‌های عملکردی که جایگاه مورد نظر را شناسایی کرده و برش دهند (Seligman et al. ۲۰۰۸).

^۱ Palindromic

^۲ Affinity



شکل ۲- شمای کلی طرز عمل مگانوکلاز متصل شده به DNA دو رشته‌ای

جدول ۱- مواردی از کاربرد مگانوکلازها در ویرایش ژنوم گیاهان

Homologous recombination	گیاه	منبع
PB1	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Thale cress)	Puchta (2002); Antunes et al. (2012)
I-SceI	<i>Hordeum vulgare</i> (Barley)	Watanabe et al. (2015)
	<i>Nicotiana benthamiana</i> (Tobacco)	Puchta, Dujon, and Hohn (1993); Puchta, Dujon, and Hohn (1996); Puchta (1999b); Siebert and Puchta (2002)
	<i>Zea mays</i> (Maize)	Yang et al. (2009); Gao et al. (2010)

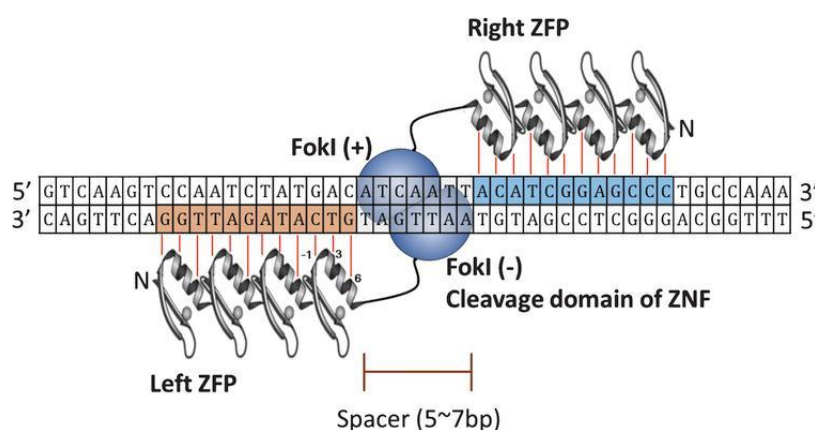
^۳ Chimeric

^۴ Recombination activating gene 1

^۵ SCID: Severe combined immunodeficiency

^۶ Xeroderma pigmentosum

^۷ DMD: Duchenne muscular dystrophy



شکل ۳- تصویر دایمر نوکلئاز انگشت‌روی متصل به قطعه DNA هدف خود. القای شکستگی در رشته دوتایی نیازمند یک جفت ZFNs، که هر یک شامل ۳ الی ۶ پروتئین انگشت‌روی (که در این شکل ۴ تا از آن‌ها نشان داده شده) در انتهای N-terminal و دومین شکافنده اندونوکلاز محدودگر Fok1 در انتهای C-terminal می‌باشد. حدود ۳۶-۱۸ نوکلئوتید توسط دایمر ZFN شناسایی شده، و آنزیم Fok1 موجب شکست در دو رشته DNA در توالی هدف می‌شود. دو توالی شناسایی ZFN توسط توالی ۷-۵ نوکلئوتیدی جداگر از یکدیگر جدا می‌شوند (Marraffini and Jiang 2015).

۲- نوکلئازهای انگشت‌روی (Zinc-finger nucleases)

پروتئین‌های انگشت‌روی، پروتئین‌های مصنوعی هستند که با ادغام چندین قلمرو از رده عامل‌های رونویسی تحت عنوان پروتئین‌های انگشت‌روی به یک قلمرو برش‌دهنده مستقل از توالی مربوط به اندونوکلاز محدودکننده نوع IIS از FokI ساخته شده‌اند. هر قلمرو انگشت‌روی، شامل ۳۰ اسیدآمینه است که دارای یک اتم روی می‌باشند که با دو اسیدآمینه هیستیدین و دو اسیدآمینه سیستئین پیوند غیرکوالان برقرار می‌کنند (Noori- Daloii 2010; Miller 1985; Wolfe 2000). یک مارپیچ آلفا در هر قلمرو انگشت‌روی، یک توالی سه‌تایی اختصاصی از DNA را شناسایی می‌کند. در مطالعات اولیه مشخص شد هر ZFN مورد استفاده تنها سه قلمرو انگشت‌روی داشته که به توالی ۹ جفت‌بازی از DNA متصل می‌شود. به‌طوری که دایمرهای ZFN (گونه‌های فعال) را قادر می‌سازد که یک توالی ۱۸ جفت‌بازی را برای هر برش شناسایی کنند (Urnov 2010). به‌دلیل اینکه قلمرو نوکلئاز FokI به‌صورت دایمر عمل می‌کند، نوکلئازهای عملکردی انگشت‌روی زمانی شکل می‌گیرند که قلمروهای انگشت‌روی در نزدیکی همدیگر قرار گیرند و همچنین دارای جهت‌گیری مناسبی باشند؛ طوری که قلمروهای کاتالیتیک آنزیم FokI در کنار هم قرار گیرند (Urnov 2010; Vanamee et al. 2001). دو واحد مونومری ZFN به نزدیکی ناحیه ژن هدف متصل می‌شوند و

رشته‌ها را از هم جدا کرده تا فاصله‌ی مناسبی برای ایجاد DSB^۱ در ژنوم ایجاد شود چون در غیر این صورت تشکیل دایمر اندونوکلاز FokI غیر ممکن می‌شود (Vanamee et al. 2001) (شکل ۳).

برای به حداقل رساندن برش‌های ناخواسته، تغییرات متنوعی را می‌توان در مورد ZFNها اعمال کرد: الف) نوکلئازهای انگشت‌روی را طوری می‌توان طراحی کرد که تنها به‌صورت هتروداایمر عمل کنند. برای نیل به این هدف، واریانت‌هایی را در قلمرو کاتالیتیک آنزیم Fok1 ایجاد می‌کنند که تنها ساختارهای هتروداایمر تشکیل شوند و همودایمرها ناپایدار باشند (Bitinaite et al. 1998; Geurts and Moreno 2010). ب) طول فاصله‌انداز^۲ بین دو مونومر ZFN معمولاً حدود ۶-۴ جفت‌باز است، اما از طریق ایجاد تغییرات در طول رابط^۳ بین ZFP و Fok1 نیز می‌توان توان تا حدی از دایمریزاسیون غیر اختصاصی و در نتیجه برش‌های خارج از جایگاه هدف جلوگیری کرد (Noori- Daloii 2010; Shimizu et al. 2009; Händel et al. 2009). ج) یکی دیگر از تغییرات ایجاد شده در ZFNها، افزایش فعالیت کاتالیتیک قلمرو Fok1 می‌باشد که نتیجه آن ایجاد واریانت‌هایی با فعالیت افزایش یافته است (Gao et al. 2010). د) طراحی نیکازهای

¹ Double-strand break

² Spacer

³ Linker

(Carbery et al. 2010; Cui et al. 2011; Meyer et al. 2010)، برای درمان بیماری‌ها از قبیل ایجاد اختلال در بیان ژن CCR5^۲ در انسان به منظور ایجاد مقاومت به ویروس HIV^۳ و نهایتاً حفاظت از سلول‌های ایمنی بدن و درمان HIV (Holt et al. 2010) بسیاری از گیاهان، از روش ویرایش ژنوم به وسیله ZFNsهای مهندسی شده استفاده شده است که جزئیات در جدول ۲ آورده شده است.

۳- نوکلئازهای افکتور شبه فعال‌کننده رونویسی^۴ (TALEN)

اخیراً نوکلئازهای افکتور شبه فعال‌کننده رونویسی TALENs که در سال ۲۰۱۰ به وسیله Christian و همکاران گزارش شد به عنوان یک ابزار دیگر در ویرایش ژنوم مطرح شده‌اند (Joung and Sander 2013). فاکتورهای شبه فعال‌کننده رونویسی، پروتئین‌هایی هستند که به طور طبیعی از باکتری‌های خانواده زانتوموناس ترشح می‌شوند و به توالی‌هایی در ژنوم گیاهان میزبان اتصال می‌یابند. مشابه با نوکلئازهای انگشت‌رویی، نوکلئازهای افکتور شبه فعال‌کننده رونویسی هم، قلمرو غیر اختصاصی Fok1 را به عنوان واحد برش دهنده DNA مورد استفاده قرار می‌دهند و به صورت دایمر عمل می‌کنند. هر تکرار ۳۳-۳۵ اسید آمینه را شامل می‌شود و یک نوکلئوتید را شناسایی می‌کند. آخرین تکرار معمولاً تنها ۲۰ اسید آمینه دارد. به همین دلیل یک نیم-تکرار^۵ نامیده می‌شود. ویژگی شناسایی DNA با میانجی‌گری اسید آمینه‌های شدیداً متنوع در موقعیت‌های ۱۲ و ۱۳ هر تکرار انجام می‌گیرد (شکل ۴).

انگشت‌روی^۱ از طریق ایجاد واریانت‌هایی در قلمرو کاتالیک Fok1 یکی از مونومرها، به طوری که فعالیت اندونوکلازی آنزیم از دست رفته، اما تأثیری بر فرآیند دایمیریزاسیون نداشته باشد. در نتیجه، پس از دایمیریزاسیون تنها یکی از رشته‌های DNA برش خورده و به اصطلاح یک Nick ایجاد می‌شود که برای ترمیم آن، سلول بیشتر از سازوکار نو ترکیبی هومولوگ استفاده می‌کند (Meng et al. 2008). نوکلئازهای انگشت‌رویی در مقایسه با مگانوکلازها به دلیل دارا بودن ویژگی Modularity طراحی آسان-تری دارند.

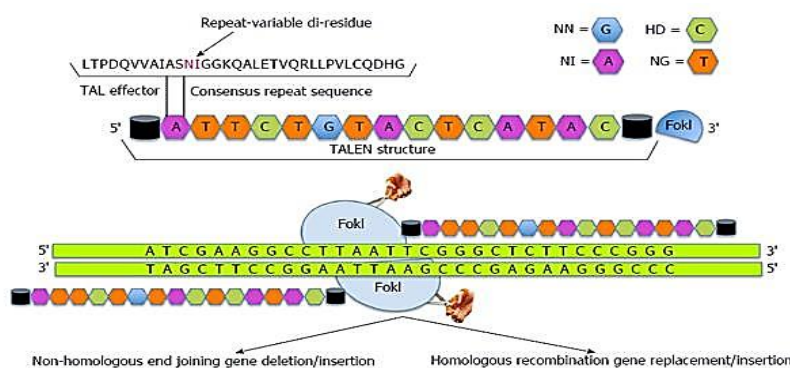
هرچند که نوکلئازهای انگشت‌رویی برای ویرایش هدفدار ژنوم در طیف متنوعی از سلول‌ها و ارگانیسم‌ها استفاده شده‌اند (Urnov et al. 2010)، اما دو محدودیت اصلی، کاربرد گسترده‌ی آن‌ها را محدود کرده است: الف) قلمروهای انگشت‌رویی به دلیل اثرات Context-dependent DNA binding ظرفیت محدودی دارند که هدف قرار دادن هر توالی مورد نظر از DNA را برای نوکلئازهای انگشت‌رویی دشوار می‌کند (Ramirez et al. 2008). ب) فقدان برخی ویژگی‌های قلمروهای انگشت‌رویی، می‌تواند برش‌هایی را در جایگاه‌های غیرهدف ایجاد کند که سبب جهش‌های ناخواسته و در نتیجه ایجاد فنوتیپ‌های غیر قابل پیش بینی و یا به عبارتی، سبب میزان سمیت بالایی شوند (Pattanayak et al. 2011; Marraffini and Jiang 2015).

اولین موفقیت استفاده از ZFN ایجاد جهش در ژن زردی دروزوفیلا (Bibikova et al. 2002) در حدود یک دهه پیش بود و تاکنون در مورد بسیاری از سلول‌ها و جانداران مورد استفاده قرار گرفته است. به طور مثال در زیگوت ماهی زبرا به طور مستقیم در سال ۲۰۰۸، در زیگوت خانواده موش‌ها در سال ۲۰۱۰

^۱ ZF Nickases

جدول ۲- نمونه‌هایی از کاربرد ZFNsهای مهندسی شده در ویرایش ژنوم گونه‌ها و سلول‌های گیاهی

منبع	گیاه
Lloyd et al. (2005); Wright et al. (2005); De Pater et al. (2009); Osakabe, Osakabe, and Toki (2010); Zhang et al. (2010)	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Thale cress)
Curtin et al. (2011); Sander et al. (2011)	<i>Glycine max</i> (Soybean)
Wright et al. (2005); Townsend et al. (2009); Cai et al. (2009); Petolino et al. (2010); Schneider et al. (2016)	<i>Nicotiana sp.</i> (Tobacco)
Marton et al. (2010)	<i>Petunia disambiguation</i> (Petunia)
Ainley et al. (2013); Kumar et al. (2015)	<i>Zea mays</i> (Maize)
De Pater et al. (2009); Marton et al. (2010); Peer et al. (2015)	Other plants
Cai et al. (2009)	Plant cells



شکل ۴- تصویر نوکلئاز TALEN جفت شده با توالی DNA هدف خود. هر توالی TALEN دارای افکتورهای شبه فعال کننده رونویسی در انتهای N-terminal (TALEs) و دومین شکافنده اندونوکلاز FokI در انتهای C-terminal است. هر TALE شامل ۲۰-۱۵ تکرار متغیر دو رزیدیوی (RVDs) و هر یک جفت نوکلئوتید از توالی DNA هدف را شناسایی می کند. جفت های TALEN حدوداً ۴۰-۳۰ جفت باز را روی DNA هدف شناسایی می کنند، و دو جفت از توالی هدف TALEN توسط ۲۱-۱۲ جفت باز از جداگر DNA از هم جدا می شوند (Marraffini and Jiang 2015).

می دهند (Doyon et al. 2011; Miller et al. 2007). ویژگی شناسایی DNA به وسیله RVDها^۲ در موقعیت های ۱۲ و ۱۳ از هر تکرار صورت می گیرد. بیش از ۲۰ نوع RVD مختلف در TALEها شناسایی شده که در این میان NN, HD, NG, NI, T, G/A, C, به مراتب رایج ترند و هر کدام به ترتیب نوکلئوتیدهای T, A را شناسایی می کنند (Boch et al. 2009; Moscou and Bogdanove 2009). هر واحد تکراری دارای دو هلیکس چپ گرد است که لوپ در برگرفته RVD را در معرض شیار بزرگ DNA قرار می دهد (Deng et al. 2012; Mak et al. 2012). TALEN انعطاف پذیری و کارایی بیشتری نسبت به ZFN دارد ولی عیب آن مشکل بودن شناسایی نوکلئوتیدها و ۴-۳ بار بلندتر بودن تکرارهای آن نسبت به ZFN است. شباهت تکرارهای TALEN و پیچیده و دشوار بودن جمع آوری و نگهداری آنها در یک پلاسמיד و کدگذاری آنها در سلول های میزبان از دیگر معایب این تکنیک است. علاوه بر این تکرارهای پشت سرهم آنها چالش بزرگی برای بسته بندی آنها در وکتورهای آدنو وایرال و رترو وایرال است. اولین استفاده از TALEN در ویرایش ژن های NTF3 (Neurotrophin 3) و CCR5 در لاین های سلولی و شناسایی ۵ لوکوس در سلول های پایه جنینی انسان در سال ۲۰۱۱ بود. در این روش میزان جهش های Off-target کاهش یافته و سیتوتوکسیته مرتبط با نوکلئازها کاهش می یابد.

برخلاف ZFNها که Context-dependent DNA binding رخ می داد و طراحی آنها را با مشکل روبه رو می ساخت، این امر در مورد TALENها رخ نمی دهد و به آسانی و سریع برای هر توالی از DNA به دلیل کد ساده پروتئین-DNA ساخته می شوند. افزون بر این، نشان داده شده که TALENها به طور قابل توجهی، برش های غیر اختصاصی و سمیت را در مقایسه با ZFNها کاهش می دهند، از این رو، ابزار سودمندتری برای ویرایش ژنوم به شمار می آیند (Ding et al. 2013). براساس آزمایش گزارشگر مخمر^۱، طول بهینه فاصله انداز بین دو جایگاه اتصال TALEN حدود ۳۱-۱۶ جفت باز است (Sun and Zhao 2013). به دلیل این که قلمرو کاتالیتیک FokI برای فعال شدن باید دایمر شود، زیر واحدهای TALEN باید در جایگاه برش به صورت هترو دایمر تجمع یابند. همودایمرهای TALEN استعداد بالایی در برش های غیر اختصاصی دارند که سبب کاهش ایمنی و کارایی در ویرایش ژنوم می شوند. برای حل این مشکل در قلمرو کاتالیتیک TALENها جهش هایی را ایجاد می کنند که از طریق تداخل در برهم کنش های الکتروستاتیک و هیدروفوب سبب جلوگیری از تشکیل همودایمر می شود. بنابراین، همه ی دایمرهای پایدار تشکیل شده در جایگاه اختصاصی برش از نوع هترو می باشند. ایجاد واریانت های FokI که به طور ترجیحی ایجاد هترو دایمر می کنند، به طرز موفقیت آمیزی برش های غیر اختصاصی را کاهش

¹ Yeast reporter assay

² Repeat-variable diresidues

جدول ۳- نمونه‌هایی از کاربرد روش TALEN در ویرایش ژنوم گونه‌ها و سلول‌های گیاهی

منبع	گیاه/ سلول گیاهی
Morbitzer et al. (2010)	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Thale cress)
Haun et al. (2014)	<i>Glycine max</i> (Soybean)
Zhang et al. (2013); Li et al. (2016)	<i>Nicotiana tabacum</i> (Tobacco)
Nishizawa-Yokoi et al. (2015); Shan et al. (2015)	<i>Oryza sativa</i> (Rice)
Sawai et al. (2014); Clasen et al. (2016)	<i>Solanum tuberosum</i> (Potato)
Liang et al. (2014)	<i>Zea mays</i> (Maize)
Budhagatapalli et al. (2015)	<i>Hordeum vulgare</i> (Barley) leaf cells
Zhang et al. (2013)	<i>Nicotiana tabacum</i> (Tobacco) protoplast-derived calli

تعدادی از گونه‌ها و سلول‌های گیاهی مختلفی که با این روش ویرایش ژنوم، مهندسی شده‌اند در جدول ۲ آورده شده است.

۴- سیستم CRISPR/Cas

کریسپر (CRISPR) اختصار یافته‌ی واژه‌ی Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats است که معنای لفظی آن تناوب‌های کوتاه پالیندروم فاصله‌دار منظم خوشه‌ای است. کریسپر بخشی از DNA پروکاریوت بوده که حاوی تناوب‌های کوتاه توالی‌های بنیادین است. کریسپر نوعی سیستم ایمنی تطابق‌پذیر در باکتری‌ها است که آن‌ها را قادر به کشف DNA ویروس کرده و بعد آن‌ها را نابود می‌کند. بخشی از سیستم کریسپر، پروتئینی به نام Cas9 است که قابلیت جستجو، برش زدن و سرانجام استحاله‌ی DNA ویروس را به روشی خاص دارد. این فناوری که با نام کریسپر (CRISPR) شناخته می‌شود، به دانشمندان امکان می‌دهد که بسیار دقیق‌تر و بهتر از همه روش‌های پیشین، هر ژنی را در هر موجود زنده‌ای ویرایش و تغییرات لازم را در آن اعمال کنند. به پروتئین‌های دخیل در این مکانیزم CRISPR associated proteins گفته می‌شود که نقش ایجاد کننده‌ی فاصله بین ژن‌های خاص را دارند. Cas می‌تواند توالی خاصی از یک ژن را شناسایی کرده و آن را برش دهد. Cas9 در واقع پروتئینی با عملکرد آنزیمی است که می‌توان با توجه به این که نقش برش توالی ویژه‌ای از DNA باکتریایی را برعهده دارد آن را نوکلئاز نامید.

مروزی بر سازوکار سیستم CRISPR/Cas9

سیستم CRISPR/Cas برای اولین بار در سال ۱۹۸۷ در ژنوم باکتری *Escherichia coli* به‌عنوان یک سیستم ایمنی اکتسابی در برابر هجوم باکتریوفاژها و ورود DNA خارجی مانند پلاسمیدها به درون سلول باکتری شناسایی شد و به دنبال آن در سال ۲۰۰۰

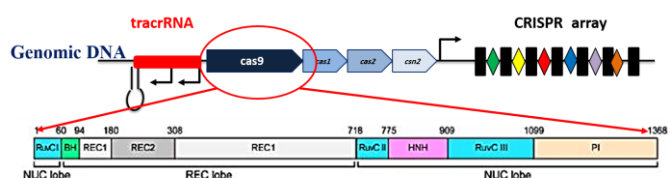
خانواده‌های ژنی CRISPR در تمام پروکاریوت‌ها شناسایی شد (Ishino et al. 1987; Mojica et al. 2000). کریسپر‌ها در ۴۰ درصد از ژنوم باکتری‌های توالی‌یابی شده و در ۹۰ درصد از آرکی‌ها یافت می‌شوند (Grissa et al. 2007). لوکوس CRISPR به‌عنوان بخشی از ژنوم باکتری دارای مجموعه‌ای از توالی‌های تکراری (تکرارهای مستقیم) است که به‌وسیله قطعات کوتاهی از توالی‌های غیرتکراری (Spacer) بین‌شان فاصله ایجاد شده است. طول توالی‌های تکراری در حدود ۵۰-۲۵ جفت‌باز و به تعداد بیش از ۲۴۹ عدد و ناحیه فاصله‌دهنده محتوی توالی‌های غیر تکراری در حدود ۷۲-۲۶ جفت‌باز است (Kim and Kim 2014). همچنین توالی رهبر به طول تقریبی ۵۰۰-۲۰۰ جفت‌باز از توالی‌های غنی از AT تشکیل شده که به‌عنوان یک توالی پیشبر برای نسخه‌برداری آرایه‌های مکان ژنی CRISPR ضروری است. ژن‌های (Cas) CRISPR associated به تعداد ۴ عدد (۱-۴ Cas) در نزدیک ناحیه CRISPR array قرار گرفته‌اند که رمز کننده پروتئین‌های ضروری جهت القای پاسخ ایمنی توسط باکتری در برابر حمله ویروس هستند (Kim and Kim 2013; Staals et al. 2014). سه جزء کلیدی که در این سیستم نقش دارند شناسایی شده‌اند (Deveau et al. 2008):

- 1- CRISPR RNA (CrRNA)
- 2- Trans-activating RNA (tracrRNA)
- 3- Cas آنزیم

ویژگی حیاتی و ضروری دیگر Cas9، PAM^۱ است. سیستم CRISPR/Cas9 می‌تواند برای هدف‌گیری هر ناحیه‌ای از ژنوم از طریق طراحی gRNA^۲ مطلوب به‌کار رود. اما اختصاصیت این سیستم به توالی سه نوکلئوتیدی به‌نام PAM که درست قبل از

^۱ Protospacer adjacent motif

^۲ guide RNA



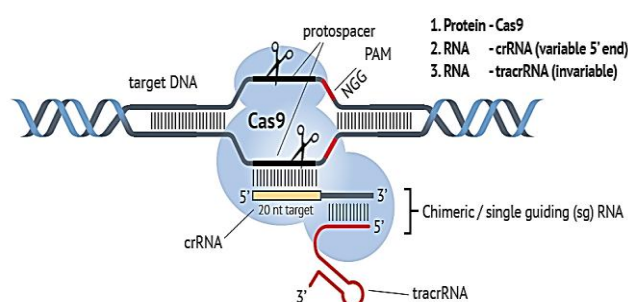
شکل ۶- ساختار پروتئین Cas9: کمپلکس غیرفعال Cas9 دارای ۶ دمین است که عبارتند از: ۱- دمین RECI به عنوان بزرگترین دمین پروتئین Cas9 است و در اتصال gRNA دخالت دارد. ۲- دمین RECII که فعالیت آن نامشخص است. ۳- دمین برهمکنش PAM که فعالیت این دمین در شناسایی توالی PAM و اتصال gRNA است. ۴- دمین Bridge-helix: که غنی از نوکلئوتیدهای گوانوزین است و در نگهداری gRNA و امکان ایجاد برش توسط دمین‌های HNH و RuvC را تسهیل کرده که نتیجه آن ایجاد هیبریداسیون بین gRNA و DNA هدف است. در هنگام ایجاد کمپلکس بین پروتئین Cas9 و gRNA کنفورماسیون دمین‌های RECII، HNH و RuvC تغییر کرده و کمپلکس فعال Cas9 را ایجاد می‌کند. دمین‌های HNH و RuvC ۳-۴ نوکلئوتید را بالادست توالی PAM را برش می‌دهند.

سیستم CRISPR/Cas نوع II

کریسپر نوع II از همه ساده‌تر است و ابزارهای مولکولی آن شامل یک آنزیم تحت عنوان Cas9، به‌همراه دو قطعه RNA کوچک (crRNA) و (tracrRNA) می‌باشد (Kumar and Jain 2014; Deveau et al. 2008). Cas9 تنها ژن مورد نیاز برای بروز ایمنی نوع دوم CRISPR است (Sternberg et al. 2014). RNAهای کوچک دارای دو عملکرد داربستی و نشانه‌گیری هستند. بخشی که نقش نشانه‌گیری دارد دارای توالی مکمل بخشی از توالی ویروس‌های مهاجم پیشین هستند که موجب می‌گردند در دفعات بعدی مواجهه میکروب با آن ویروس، سیستم کریسپر فعال شود؛ در نتیجه، با اتصال gRNA به توالی مکمل خود بر روی ژنوم ویروس مهاجم و قرارگیری آنزیم Cas9 در مجاورت آن، کمپلکس فعال شکل می‌گیرد و دمین‌های نوکلئازی این آنزیم فعالیت نوکلئازی را علیه ژنوم ویروس مهاجم انجام می‌دهند (Jiang et al. 2013; Szczelkun et al. 2014). در نتیجه، میکروب نسبت به ویروس مقاومت نشان می‌دهد این فعالیت آنزیمی موجب شکست در دو رشته (DSB: double-strand break) از ژنوم ویروس مهاجم می‌گردد و ویروس توانایی فعالیت خود را از دست می‌دهد (Gasiunas et al. 2012; Jinek et al. 2012). tracrRNA به‌عنوان یک کوفاکتور در شکافت DNA هدف به Cas9 عمل می‌کند

توالی هدف قرار گرفته است بستگی دارد. در سیستم ایمنی باکتریایی و آرکئی دمین شناسایی کننده ناحیه PAM در Cas9 احتمالاً به عنوان وسیله‌ای برای شناسایی DNA خودی و مهاجم به کار رفته و مانع از این می‌شود که CRISPR ژنوم باکتری یا آرکئی را مورد هدف قرار دهد. توالی مورد شناسایی PAM که توسط آنزیم Cas9 شناسایی می‌شود بر اساس گونه و نوع باکتری که آنزیم نوکلئاز Cas9 از آن مشتق شده است، متفاوت می‌باشد. آنزیم نوکلئازی Cas9 باکتری *Streptococcus pyogenes* که جزء تیپ II کریسپری می‌باشد بیش از همه به منظور ویرایش ژنوم استفاده شده است. این نوکلئاز خاص، توالی 5'-NGG را روی DNA و در قسمت انتهایی 3' توالی gRNA شناسایی می‌کند.

نمای کلی از سیستم CRISPR/Cas9 در شکل ۵ نشان داده شده است. مطالعات اولیه نشان دادند که حداقل ۱۱ نوع سیستم CRISPR/Cas وجود دارند و تمام این سیستم‌ها در سه گروه عمده I, II, III تقسیم می‌شوند. نوع I و III حاوی انواع مختلف پروتئین Cas هستند که برای تسهیل شناسایی نوکلئیک اسیدهای هدف با CrRNA تشکیل یک کمپلکس را می‌دهند. اما در نوع II فقط از یک پروتئین Cas به نام نوکلئاز Cas9 استفاده می‌شود که به دلیل ساده بودن بیشتر مورد مطالعه قرار گرفته و تبدیل به یک ابزار ژنومی مناسب جهت ویرایش شده است (Kumar and Jain 2015; Jiang and Marraffini 2014).



شکل ۵- تصویر نمایشی DNA هدف به همراه هدف‌گیری توسط sgRNA. guide یک sgRNA، دارای ۲۱ نوکلئوتید CrRNA spacer و دم tracrRNA، که آندونوکلاز Cas9 را برای متصل شدن به محل مورد نظر راهنمایی کرده و پیچ و تاب حدود ۲۱ نوکلئوتید از محل مورد نظر بر روی ژنوم را باز می‌کند. محل هدف باید در چارچوب 50-N20-NGG باشد. ابتدا و انتهای رشته DNA ژنومی توسط دمین RUV و دمین HNH از Cas9 برای ایجاد شکستگی رشته دوتایی در نزدیکی PAM حدود سه جفت‌باز شکافته می‌شود (Deveau et al. 2008).

بین gRNA و کمپلکس Cas9 بر همکنش ایجاد می‌شود (Jinek et al. 2014; Nishimasu et al. 2012). کمپلکس غیرفعال Cas9 دارای ۶ دمین است (شکل ۶). در واقع ۱۸-۱۲ جفت‌باز بالادست توالی PAM ناحیه Seed region نامیده می‌شود که بین توالی gRNA و DNA هدف هیبریداسیون ایجاد می‌شود. اختصاصیت این ناحیه در میزان کارایی سیستم CRISPR/Cas9 بسیار حائز اهمیت است. کمپلکس Cas9 با ایجاد برش‌های دورشته‌ای (DSBs) در DNA ژنومی باعث ایجاد ویرایش ژنوم در توالی ژن هدف می‌شود (Jinek et al. 2012; Nishimasu et al. 2014). برش DNA دو رشته‌ای در سلول یوکاریوتی از طریق دو سیستم ترمیمی NHEJ^۳ و HDR^۴ بازسازی می‌شود. روش اول که در مکانیسم‌های سلولی غالب‌تر بوده و در فاز G1 و G0 سلول اتفاق می‌افتد، معمولاً منجر به تولید indel کوتاه در توالی هدف می‌شود. به‌همین دلیل این روش برای ایجاد جهش‌های تغییردهنده‌ی توالی کد کننده پروتئین مورد استفاده قرار می‌گیرد. روش دوم HDR، معمولاً در فاز S و G2 فعال بوده و از توالی همولوگ حاضر در ژنوم سلول استفاده می‌کند. بنابراین می‌توان از آن برای مهندسی دقیق ژنوم و بازسازی نقص‌های ژنی استفاده کرد (Anders et al. 2014).

ویرایش هدفمند ژنوم جهت ایجاد تغییرات هدفمند در ژنوم مانند خاموشی ژن، جایگزینی ژن، ویرایش ژن‌ها، شناسایی عملکرد ژن و در تنظیم فرآیند نسخه‌برداری توسط RGEN^۵ استفاده می‌شود. پس از ایجاد DSB، سازوکار بازسازی نوترکیبی همولوگ می‌تواند در بازه وسیعی از موجودات و انواع سلول‌ها تغییرات نوکلئوتیدی دلخواه را ایجاد نماید (Doudna and Charpentier 2014). این فناوری به‌عنوان یک فناوری نوپا و بدیع به‌دلیل طراحی ساده و استفاده آسان، پژوهش‌های ژنتیک و زیست‌شناسی مولکولی را تحت تاثیر قرار داده است. در حال حاضر انواع متنوعی از توالی gRNA در دسترس است که می‌تواند در شاخه بیوتکنولوژی گیاهی کاربردهای وسیعی داشته باشند (Khatodia et al. 2016).

انواع کارآمدتر و دقیق‌تر سیستم CRISPR

(Brouns et al. 2008). آنزیم Cas9 از نظر ساختار و نحوه عملکرد نسبت به سایر نوکلئازهای کریسپری، پیچیدگی مولکولی کمتری دارد و به‌صورت تک زیر واحدی است. همین مسئله، موجب شده است که دانشمندان بتوانند از این آنزیم (که در سیستم نوع II کریسپر وجود دارد) به‌عنوان آنزیم نوکلئاز برای دستکاری ژنی بهره ببرند (Hsu et al. 20014; Wiedenheft et al. 2012; Cong et al. 2013; Mali et al. 2013; Jinek et al. 2012). به‌طور کلی سیستم طبیعی CRISPR/Cas از سه مرحله تشکیل شده است:

۱. مرحله انطباق: در مرحله ی اول توالی Protospacer از DNA مهاجم خارج شده و درون آرایه کریسپر^۱ ذخیره می‌شود. در این راستا، ابتدا DNA خارجی به‌عنوان هدف برای کسب Spacer شناخته می‌شود. این عمل توسط کمپلکس Cas1-Cas2 که از دایمر Cas1 و یک دایمر Cas2 تشکیل شده انجام می‌شود. پس از شناسایی توالی Protospacer و شناسایی آن توسط کمپلکس Cas1-Cas2 این توالی به‌عنوان یک Spacer جدید به درون آرایه‌ی کریسپر جای داده شده و توالی تکراری نیز مضاعف می‌شود (Hsu et al. 2015; Rollie et al. 2014). بر اساس مطالعات انجام گرفته علاوه بر پروتئین‌های نوکلئازی Cas1 و Cas2، نوع دیگری از پروتئین Cas به نام Cas4 شناسایی شده است که با فعالیت اگزونوکلئازی در جهت ۵' به ۳' و با ایجاد 3'-Overhang امکان ادغام Protospacer به مکان ژنی CRISPR را فراهم می‌کند (Zhang et al. 2012).

۲. مرحله سنتز و پردازش: در مرحله بیان و بالغ سازی، آرایه‌ی کریسپر رونویسی شده و سپس به CrRNAهای بالغ پردازش می‌گردد که هر کدام حاوی یک توالی Spacer و قسمتی از توالی تکراری است. سپس CrRNA به‌همراه پروتئین Cas تشکیل یک ریبونوکلوپروتئین را می‌دهد.

۳. مرحله تداخل^۲: در مرحله بعدی توالی tracrRNA که دارای یک ناحیه T شکل (۲۰ نوکلئوتیدی) و سه ناحیه حلقه است به ناحیه توالی تکراری CrRNA متصل شده و تشکیل یک دوپلکس CrRNA/tracrRNA به‌نام RNA راهنما (gRNA) می‌دهد. سپس

³ Non-homologous end joining

⁴ Homology-directed repair

⁵ RNA-guided engineered nucleases

¹ CRISPER array

² Interference

مطالعات اخیر نشان داده است که اگرچه هر ۲۰ نوکلئوتید در توالی gRNA برای عملکرد اختصاصی و اتصال به هدف ضروری هستند اما وجود چند عدم تطبیق در این محل‌ها قابل تحمل است که این خود موجب ایجاد برش نابجا در ژنوم می‌شود (Cong et al. 2013; Jiang et al. 2013). برای جلوگیری از ایجاد برش دو رشته‌ای در جایگاه غیراختصاصی، نوع Cas9 نیکاز (Cas9n) معرفی شده است. همان‌طور که اشاره شد پروتئین Cas9 دو دمین برش دهنده دارد که هر یک در یکی از رشته‌های DNA ایجاد برش می‌کنند؛ بنابراین با غیرفعال نمودن هر یک از این دمین‌ها می‌توان به یک آنزیم با قابلیت ایجاد برش تک رشته‌ای دست یافت. این نوع موتان از Cas9، نیکاز نامیده شده است. در این حالت برای القا برش دو رشته‌ای نیاز به دو gRNA می‌باشد که هر یک به یکی از رشته‌ها متصل می‌شود به‌صورتی که ناحیه ۵' این gRNA به سمت هم بوده و فاصله بین این دو ۵' (Offset) می‌تواند بین ۲۰-۳۰ جفت‌باز باشد. در این حالت برش با انتهای اضافه ۵' در DNA هدف ایجاد می‌شود. این سیستم تحت عنوان Double nicking شناخته شده است. در این سیستم به‌صورت معمول از آنزیم نیکاز دارای جهش D10A در دمین RuvC استفاده می‌شود (Ran et al. 2013). اهمیت استفاده از فرم نیکاز آن است که در صورتی که هر یک از gRNA به‌صورت غیراختصاصی به محلی متصل شده و در آن محل برش تک رشته‌ای ایجاد شود، سیستم تعمیری^۱ BER آن را رفع می‌نماید و تنها برش دو رشته‌ای ایجاد شده در نتیجه اتصال دو gRNA در فاصله نزدیک به هم منجر به فعال شدن مسیرهای NHEJ و یا HDR می‌شود. لازم به ذکر است تاکنون روش مؤثری برای بررسی دقیق اثرات برش تک رشته‌ای معرفی نشده است. این سیستم به میزان قابل توجهی موجب کاهش برش نابجا می‌شود اگرچه کارایی Cas9n در مقایسه با فرم وحشی پروتئین Cas9 به میزان کمی کاهش می‌یابد (Mali et al. 2013).

در راستای بهبود سیستم نیکاز، محققین نوع دقیق‌تری از Cas9 معرفی کردند که در آن هر دو دمین برش دهنده غیرفعال شدند. این نوع اصطلاحاً dCas9 نامیده شده است. در ادامه، اتصال دمین برش دهنده غیراختصاصی Fok1 به انتهای آمینوی dCas9 سیستم

¹ Base excision repair

موسوم به RFN را ایجاد کرد. در این سیستم dCas9 به‌عنوان حامل و هدایت کننده Fok1 به جایگاه برش عمل می‌کند. اساس این سیستم مشابه Double nicking است با این تفاوت که فعالیت نوکلئازی Fok1 مستلزم دایمر شدن آن با همتای خود در رشته مقابل می‌باشد؛ بنابراین برخلاف سیستم نیکاز در RFN اتصال یک gRNA به تنهایی منجر به ایجاد برش تک رشته‌ای نخواهد شد. این سیستم نیز همانند Double nicking نیاز به طراحی دو gRNA که هر یک به یکی از رشته‌های DNA متصل می‌شوند، دارد. در این مورد نیز ۵' این gRNAها باید به‌سمت یکدیگر بوده و فاصله کارآمد بین ۵' gRNAها، ۱۷-۱۴ جفت‌باز می‌باشد (Tsai et al. 2014).

به‌علاوه به‌منظور بهینه‌سازی هرچه بیشتر RFN، از یک سیستم جدید برای بیان هم‌زمان دو یا چند gRNA استفاده شده است. در این سیستم آنزیم آندوریونوکلئاز Cys-4 نیز به‌همراه مجموعه dCas9-Fok1 در سلول بیان می‌شود. همچنین محل برش این آنزیم در بالادست توالی کدکننده gRNA مورد نظر قرار داده می‌شود. به این ترتیب gRNAها تحت یک پروموتور واحد به‌صورت یک رونوشت بیان شده و سپس آنزیم Cys-4 با ایجاد برش در محل اختصاصی خود آن‌ها را از هم جدا می‌کند.

اختصاصیت سیستم CRISPR/Cas9

سیستم CRISPR/Cas9 می‌تواند برای هدف‌گیری هر ناحیه‌ای از ژنوم از طریق طراحی gRNA مطلوب به‌کار رود. اما اختصاصیت این سیستم وابسته به توالی به‌نام PAM که درست قبل از توالی هدف قرار گرفته است بستگی دارد. در سیستم ایمنی باکتریایی و آرکئی دومین شناسایی کننده ناحیه PAM در Cas9 احتمالاً به عنوان وسیله‌ای برای شناسایی DNA خودی و مهاجم به‌کار رفته و مانع از این می‌شود که CRISPR ژنوم باکتری یا آرکئی را مورد هدف قرار دهد (Addgene 2016).

توالی مورد شناسایی PAM که توسط آنزیم Cas9 شناسایی می‌شود بر اساس گونه و نوع باکتری که آنزیم نوکلئاز Cas9 از آن مشتق شده است متفاوت می‌باشد (جدول ۴). آنزیم نوکلئازی Cas9 باکتری *Streptococcus pyogenes* که جزء تیپ II کریسپری می‌باشد بیش از همه به‌منظور ویرایش ژنوم استفاده شده است. این نوکلئاز خاص توالی 5'-NGG را روی DNA و در

به توسعه گیاهان هموزیگوت غیرتراریخته که تنها در یک نسل تولید شده اند، می‌شود (Fauser 2014; Xu et al. 2015). برخی از گونه‌ها، سلول‌ها و جنین‌های گیاهی ویرایش شده با CRISPR/Cas9 در جدول ۳ آورده شده است.

قسمت انتهای 3' توالی gRNA شناسایی می‌کند. دیگر آنزیم‌های تجاری Cas9 موجود توالی‌های PAM دیگری را شناسایی می‌کنند. سیستم CRISPR/Cas9 جهش‌های پایدار و قابل توارثی را ایجاد می‌کند که به راحتی می‌توان از ساختار Cas9/gRNA جهت تغییرات بیشتر توسط CRISPR/Cas9 تمیز داد. این امر منجر

جدول ۴- مواردی از کاربرد سیستم CRISPR/Cas9 در ویرایش ژنوم گونه‌ها و سلول‌ها و جنین‌های گیاهی

منبع(ها)	گیاه
Eid, Ali, and Mahfouz (2016); Mao et al. (2016)	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Thale cress)
Ali et al. (2015a); Ji et al. (2015)	<i>Beta vulgaris</i> (Beet)
Chandrasekaran et al. (2016)	<i>Cucumis sativus</i> (Cucumber)
Jacobs et al. (2015); Li et al. (2015a)	<i>Glycine max</i> (Soybean)
Li, Zhang, and Ding (2013b); Shan et al. (2013a)	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Thale cress) protoplasts
Jiang et al. (2013b); Shan et al. (2013b)	<i>Oryza sativa</i> (Rice) protoplasts, callus cells

جدول ۵- انواع توالی‌های PAM در سویه‌های مختلف *S. pyogenes* و سایر جنس و گونه‌های باکتریایی (Addgene 2016)

توالی اختصاصی PAM	گونه باکتریایی / انواع پروتئین Cas9
NGG	<i>Streptococcus pyogenes</i> (SP); SpCas9
NAG	SpCas9 D1135E variant
NGCG	SpCas9 VRER variant
NGAG	SpCas9 EQR variant
NGNG یا NGAN	SpCas9 VQR variant
NNGRR(N) یا NNGRRT	<i>Staphylococcus aureus</i> (SA); SaCas9
NNNGATT	<i>Neisseria meningitidis</i> (NM)
NNAGAAW	<i>Streptococcus thermophilus</i> (ST)
NAAAAC	<i>Treponema denticola</i> (TD)
TTN	Cpf1 (از گونه‌های متنوع)
توالی PAM شناسایی نشده است	سایر پروتئین‌های Cas9s برگرفته از گونه‌های مختلف

gRNA و همسانه‌سازی آن در وکتور مناسب (مثلاً با روش Golden gate) تحت پیشبر (پروموتور) مناسب و پایانبر (ترمیناتور)، قطعه نهایی در وکتور بیانی منتقل می‌شود و در نهایت کاست Cas9 حاوی پیشبر و پایانبر به وکتور بیانی اضافه می‌شود. ناقل نهایی به *Agrobacterium tumefaciens* منتقل شده و برای تراریختی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

نتیجه‌گیری کلی

مگانوکلازها، ZFN، TALEN و سیستم CRISPR/Cas9 ابزارهای به‌روز، کارآمد و منعطفی هستند که توانایی ایجاد تغییرات اساسی ژنومی در پژوهش‌های زیستی و نیز پزشکی فردی را دارند. این فن‌آوری‌های در حال ظهور به طرز چشمگیری توانایی دستکاری و مطالعه‌ی ارگانیسم‌های الگو را گسترش داده، نویدبخش درمان بیماری‌های ژنتیکی شده‌اند. با وجود این فناوری‌ها، همچنان پرسش‌ها و چالش‌های مهمی برای رسیدن

ساخت سازه‌های ژنتیکی برای تحقیقات سیستم CRISPR/Cas در ابتدا توالی RNA راهنما (gRNA) که آلل خاصی را هدف‌گیری می‌نماید با استفاده از الگوریتم پیش‌بینی وبسایت Harvard CHOP-CHOP (<http://chopchop.cbu.uib.no>) طراحی می‌شود (Labun et al. 2016). انتخاب gRNA با توجه به موارد زیر انجام می‌شود: ۱- تا حد ممکن نزدیک به انتهای 5' باشد ۲- هر سه آلل CsFAE1 را پوشش دهد ۳- اسکور با کارایی بالا داشته باشد ۴- نواحی غیرهدف (Off target) وجود نداشته باشد ۵- حداقل نواحی خود مکمل باشد ۶- مقدار GC بالا باشد (ترجیحاً بین ۴۰ تا ۷۰٪) (Wang et al. 2014; Tsai et al. 2015). بهترین gRNA با استفاده از نرم‌افزارهای مناسب مانند نرم‌افزار تحت وب Cas-Of-Finder (<http://www.rgenome.net/cas-offfinder>) از نظر وجود Off targetهای احتمالی ارزیابی شود (Bae et al. 2014). پس از سنتز

کامل به اهداف فوق وجود دارد. روش های بهینه سازی در تحویل این نوکلئازها به درون سلول ها و ارگانسیم ها، یکی از مهم ترین این چالش ها است. به ویژه در مورد TALEN ها که پروتئین های نسبتاً بزرگی بوده و دارای توالی های تکراری پشت سر هم می باشند، تحویل کارآمد آن ها بسیار مشکل است. زیرا توالی های تکراری در همه ی سیستم های زیستی از ویروس ها و پروکاریوت ها گرفته تا یوکاریوت ها، طی همانندسازی DNA ناپایدارند. با این وجود، ناقل های آدنوویروسی تا حدودی توانایی حمل کردن و تحویل آن ها به سلول های انسانی را دارند (Holckers et al. 2013). هرچند سیستم CRISPR/Cas نوید بزرگی برای مهندسی ژنتیک به ارمغان آورده، اما مشکلات مربوط به توالی PAM، بسیاری از کاربردهای این سیستم را محدود کرده است (Gaj et al. 2013). مطالعات بیشتری برای افزایش ویژگی و کاهش سمیت سیستم CRISPR/Cas لازم است. این فن آوری ها به پژوهشگران این توانایی را می دهند که هر ژنومی را به دلخواه

تغییر دهند و ما را در فهم بهتر سازوکار بیماری و درمان آن امیدوار کنند. سیستم کریسپر یک ابزار ویرایش ژنی جدید است که در مقایسه با سیستم های قبلی پتانسیل ها و کاربردهای بیشتری دارد. از جمله ی این کاربردها می توان به کاربرد کریسپر در شناخت بیماری های ژنتیکی و اپی ژنتیکی مختلف مثل سرطان اشاره کرد. بررسی سرطان توسط سیستم کریسپر به دو روش شامل خاموش کردن ژن های سرطان زا و روشن کردن ژن های مهارکننده تومور انجام می گیرد. همچنین با توجه به قابلیت دقیق کریسپر، می توان از این سیستم جهت ایجاد جهش های دقیق در رده های مختلف سلولی به منظور مدل سازی سرطان های متنوع استفاده نمود. اینگونه مدل سازی ها به شناسایی بهتر سرطان و توانایی تولید داروهای مؤثر می انجامد (Noori-Daloii et al. 2014). مقایسه بین چهار اندونوکلاز مهندسی شده ی جایگاه اختصاصی محل در جدول ۵ ذکر شده است.

جدول ۶- مقایسه بین چهار اندونوکلاز مهندسی شده ی جایگاه اختصاصی هدف (Noori-Daloii et al. 2014).

ابزار	Meganucleases	ZFN	TALEN	Cas9
طول جایگاه	۴۰-۱۴ جفت باز	۲۸-۱۸ جفت باز و فاصله انداز	۵۰-۳۰ جفت باز و فاصله انداز	۲۰ جفت باز + PAM (۵-۲)
شناسایی	۷-۵ جفت باز	۳۰-۱۰ جفت باز	زیاد	ندارد
Modularity	کم	متوسط	زیاد	ندارد
مزایا	۱- عدم نیاز به قلمروی برش دهنده DNA از Fok1 ۲- کارایی بالای برش DNA	۱- طراحی در ویژگی برای سویترا نسبتاً آسان هست ۲- ویژگی، تمایل اتصال و سمیت شناخته شده دارند	۱- طراحی در ویژگی برای سویترا آسان هست ۲- طول جایگاه شناسایی به دلخواه تنظیم می شود.	۱- به صرفه تر بودن ساخت آن از لحاظ زمان و هزینه ۲- توانایی هدف قرار دادن چند لوکوس به طور همزمان ۳- الگوهای برش متنوع
معایب	۱- طراحی در ویژگی برای سویترا مشکل هست ۲- ویژگی و سمیت به طور سیستماتیک تعیین نشده است	۱- ترجیح توالی های غنی از گوانین ۲- ایجاد برش های خارج از جایگاه هدف و سمیت ناشی از آن ۳- اندازه بزرگ پروتئین ممکن است تحویل آن را با مشکل روبه رو کند.	۱- کد اختصاصی برای شناسایی گوانین ندارد ۲- ویژگی و سمیت به طور سیستماتیک تعیین نشده است ۳- اندازه بزرگ پروتئین ممکن است تحویل آن را با مشکل روبه رو کند.	۱- ایجاد برش های خارج از جایگاه هدف ۲- توانایی هدف قرار دادن چند لوکوس به طور همزمان ۳- الگوهای برش متنوع

منابع

- Addgene (2016) CRISPR 101: A desktop resource, 1st edition, Chapter 2: what is CRISPR? p. 19. New York, USA.
- Ainley W M, Sastry-Dent L, Welter M E, Murray M G, Zeitler B, Amora R, & Simpson M A (2013) Trait stacking via targeted genome editing. *Plant Biotechnology Journal* 11: 1126-1134.
- Ali Z, Abulfaraj A, Idris A, Ali S, Tashkandi M, & Mahfouz M M (2015) CRISPR/Cas9-mediated viral interference in plants. *Genome biology* 16: 238.
- Anders C, Niewoehner O, Duerst A, Jinek M (2014) Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature* 513: 569-573.
- Antunes M S, Smith J J, Jentz D and Medford J I (2012) Targeted DNA excision in Arabidopsis by a re-engineered homing endonuclease. *BMC Biotechnology* 12:86-98.
- Arnould S, Chames P, Perez C, Lacroix E, Duclert A, Epinat JC, Stricher F, Petit AS, Patin A, Guillier S, et al (2006) Engineering of large numbers of highly specific homing endonucleases that induce recombination on novel DNA targets. *Journal of Molecular Biology* 355: 443-458.
- Asadollahi K, Abdollahzadeh R, Nouri Delavi M (2014) Targeted editing of genomes mediated by engineered nucleases; a new approach to gene therapy. *Journal of Sabzevar University of Medical Sciences* 21: 131-144. (In Farsi).
- Bibikova M, Golic M, Golic KG, Carroll D (2002) Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics* 161: 1169-1175.
- Bitinaite J, Wah DA, Aggarwal AK, Schildkraut I (1998) FokI dimerization is required for DNA cleavage. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 10570-5.
- Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, Lahaye T, Nickstadt A, Bonas U (2009) Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* 326: 1509-1512.
- Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuis RJ, et al (2008) Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science* 321: 960-964.
- Budhagatapalli N, Rutten T, Gurushidze M, Kumlehn J, & Hensel G (2015) Targeted modification of gene function exploiting homology-directed repair of TALEN-mediated double-strand breaks in barley. *G3: Genes, Genomes, Genetics* 5: 1857-1863.
- Cai C Q, Doyon Y, Ainley W M, Miller J C, DeKever R C, Moehle E A, Blue R (2009) Targeted transgene integration in plant cells using designed zinc finger nucleases. *Plant molecular biology* 69: 699-709.
- Carbery ID, JiD, Harrington A, Brown V, Weinstein EJ, Lia (2010) Targeted genome modification in mice using zinc-finger nucleases. *Genetics* 186: 451-459.
- Chandrasekaran J, Brumin M, Wolf D, Leibman D, Klap C, Pearlsman M, Gal-On A (2016) Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. *Molecular plant pathology* 17: 1140-1153.
- Chen K, Gao C (2014) Targeted genome modification technologies and their applications in crop improvements. *Plant Cell Reports* 33: 575-83.
- Clasen B M, Stoddard T J, Luo S, Demorest Z L, Li J, Cedrone F, Coffman A (2016) Improving cold storage and processing traits in potato through targeted gene knockout. *Plant biotechnology journal* 14: 169-176.
- Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339: 819-823.
- Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339: 819-823.
- Cui X, JiD, Fisher DA, Wu Y, Briner DM, Weinstein EJ (2011) Targeted integration in rat and mouse embryos with zinc-finger nucleases. *Nature Biotechnology* 29: 64-67.
- Curtin S J, Zhang F, Sander J D, Haun W J, Starker C, Baltes N J, & Dobbs D (2011) Targeted mutagenesis of duplicated genes in soybean with zinc-finger nucleases. *Plant Physiology* 156: 466-473.
- De Pater S, Neuteboom L W, Pinas J E, Hooykaas P J, & Van Der Zaal B J (2009) ZFN-induced mutagenesis and gene-targeting in Arabidopsis through Agrobacterium-mediated floral dip transformation. *Plant biotechnology journal* 7: 821-835.
- Deng D, Yan C, Pan X, Mahfouz M, Wang J, Zhu JK, Shi Y, Yan N (2012) Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors. *Science* 335: 720-723.
- Deveau H, Barrangou R, Garneau JE, Labonte J, Fremaux C, et al (2008) Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Bacteriology* 190: 1390-400.
- Ding Q, Lee YK, Schaefer EA, Peters DT, Veres A, Kim K, Kuperwasser N, Motola DL, Meissner TB, Hendriks WT, et al (2013) A TALEN genome-editing system for generating human stem cell-based disease models. *Cell Stem Cell* 12: 238-251.
- Doudna JA, Charpentier E (2014) The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346: 1258096.
- Doyon Y, Vo TD, Mendel MC, Greenberg SG, Wang J, Xia DF, Miller JC, Urnov FD, Gregory PD, Holmes MC (2011) Enhancing zinc-finger-nuclease activity with improved obligate heterodimeric architectures. *Nature Methods* 8: 74-79.
- Duan X, Gimble FS, Quijcho FA (1997) Crystal structure of PI-SceI, a homing endonuclease with protein splicing activity. *Cell* 89: 555-564.
- Dumbliuskas E, Lechner E, Jaciubek M, Berr A, Pazhouhandeh M, Alioua M, ... Molinier J (2011) The Arabidopsis CUL4-DDB1 complex interacts with MSI1 and is required to maintain MEDEA parental imprinting. *The European Molecular Biology Organization journal* 30: 731-743.
- Eid A, Ali Z, Mahfouz M M (2016) High efficiency of targeted mutagenesis in Arabidopsis via meiotic promoter-

driven expression of Cas9 endonuclease. Plant cell reports 35: 1555-1558.

Fausser F, Schiml S, Puchta H (2014) Both CRISPR/Cas-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal 79: 348-359.

Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF 3rd (2013) ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. Trends in Biotechnology 31: 397-405.

Gao H, Smith J, Yang M, Jones S, Djukanovic V, Nicholson M G, & Lyznik L A (2010) Heritable targeted mutagenesis in maize using a designed endonuclease. The Plant Journal 61: 176-187.

Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V (2012) Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 109: 2579-2586.

Geurts AM, Moreno C (2010) Zinc-finger nucleases: new strategies to target the rat genome. Clinical Science 119: 303-311.

Gogarten JP, Hilario E (2006) Inteins, introns, and homing endonucleases: recent revelations about the life cycle of parasitic genetic elements. BMC Evolutionary Biology 6: 94.

Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C (2007) CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. Nucleic Acids Research 35(suppl 2): W52-W57.

Guo J, Gaj T, Barbas CF III (2010) Directed evolution of an enhanced and highly efficient FokI cleavage domain for zinc finger nucleases. Journal of Molecular Biology 400: 96-107.

Händel EM, Alwin S, Cathomen T (2009) Expanding or restricting the target site repertoire of zinc-finger nucleases: the inter-domain linker as a major determinant of target site selectivity. Molecular Therapy 17: 104-111.

Haun W, Coffman A, Clasen B M, Demorest Z L, Lowy A, Ray E, & Mathis L (2014) Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene family. Plant biotechnology journal 12: 934-940.

Heath PJ, Stephens KM, Monnat RJ Jr, Stoddard BL (1997) The structure of I-Crel, a group I intron-encoded homing endonuclease. Nature Structural and Molecular Biology 4: 468-476.

Holkers M, Maggio I, Liu J, Janssen JM, Miselli F, Mussolino C, Recchia A, Cathomen T, Gonçalves MA (2013) Differential integrity of TALE nuclease genes following adenoviral and lentiviral vector gene transfer into human cells. Nucleic Acids Research 41: e63.

Holt N, Wang J, Kim K, Friedman G, Wang X, Taupin V et al (2010) Human hematopoietic stem/progenitor cells modified by zinc-finger nucleases targeted to CCR5 control HIV-1 in vivo. Nature Biotechnology 28: 839-847.

Hsu PD, Lander ES, Zhang F (2014) Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. Cell 157: 1262-1278.

Huo Y, Nam KH, Ding F, Lee H, Wu L, Xiao Y, Farchione MD Jr, Zhou S, Rajashankar K, Kurinov I, Zhang R, Ke A (2014) Structures of CRISPR Cas3 offer

mechanistic insights into Cascade-activated DNA unwinding and degradation. Nature Structural and Molecular Biology 21: 771-777.

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

Jacobs T B, LaFayette P R, Schmitz R J, & Parrott W A (2015) Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9. BMC biotechnology 15: 16.

Jensen NM, Dalsgaard T, Jakobsen M, Nielsen RR, Sorensen CB, Bolund L, Jensen TG (2011) An update on targeted gene repair in mammalian cells: methods and mechanisms. Journal of Biomedical Science 18: 10.

Jiang L, Qian D, Zheng H, Meng L Y, Chen J, Le W J, and Li Y (2012) RNA-dependent RNA polymerase 6 of rice (*Oryza sativa*) plays role in host defense against negative-strand RNA virus, Rice stripe virus. Virus research 163: 512-519.

Jiang W H, Zhou H Bi, M Fromm B Yang and D P Weeks (2013) Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice. Nucleic Acids Research 41: e188.

Jiang W, Bicaard D, Cox D, Zhang F, Marraffini LA (2013) RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. Nature Biotechnology 31: 233-239.

Jiang W, Bikard D, Cox D, Zhang F, Marraffini LA (2013) RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. Nature Biotechnology 31: 233-239.

Jiang W, Marraffini LA (2015) CRISPR-Cas: New Tools for Genetic Manipulations from Bacterial Immunity Systems. The Annual Review of Microbiology 69: 209-228.

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

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

Joung JK, Sander JD (2013) TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. Nature Reviews Molecular Cell Biology 14: 49-55.

Jouzani SG, Tohidfar M (2013) Plant Molecular Farming: Future Prospects and Biosafety Challenges. Biosafety 2: 2.

Jouzani SG, Tohidfar M, Sadeghi A (2010) Biosafety aspects of genetically modified plants. Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Tehran, Iran (In Farsi).

Khatodia S, Bhatotia K, Passricha N, Khurana SM, Tuteja N (2016) The CRISPR/Cas genome-editing tool: application in improvement of crops. Frontiers in Plant Science 7: 506.

Kim H, Kim JS (2014) A guide to genome engineering with programmable nucleases. Nature Reviews Genetics 15: 321-334.

Kumar P, and D R Jain (2015) C γ -Aminopropylene peptide nucleic acid (amp-PNA): Chiral cationic PNAs

with superior PNA: DNA/RNA duplex stability and cellular uptake. *Tetrahedron* 71:3378-84.

Kumar V, Jain M (2014) The CRISPR-Cas system for plant genome editing: advances and opportunities. *Journal of Experimental Botany* 66: 47-57.

Li Z, Liu Z B, Xing A, Moon B P, Koellhoffer J P, Huang L, Cigan A M (2015) Cas9-guide RNA directed genome editing in soybean. *Plant physiology* 169(2): 960-970.

Li, J, Stoddard, T J, Demorest, Z L, Lavoie, P O, Luo, S, Clasen, B M, and Yabandith, A (2016) Multiplexed, targeted gene editing in *Nicotiana benthamiana* for glyco-engineering and monoclonal antibody production *Plant biotechnology journal* 14: 533-542

Li, J-F, B Zhang, and W Ding (2013) Efficient genome editing in plants using a CRISPR/ Cas system *Cell Research* 23:1229-32

Liang Z, Zhang K, Chen K, & Gao C (2014) Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system. *Journal of Genetics and Genomics* 41: 63-68.

Liu W, Yuan JS, Stewart CN Jr (2013) Advanced genetic tools for plant biotechnology. *Nature Reviews Genetics* 14: 781-93.

Lloyd A, Plaisier C L, Carroll D, & Drews G N (2005) Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102: 2232-2237.

Mak ANS, Bradley P, Cernadas RA, Bogdanove AJ, Stoddard BL (2012) The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target. *Science* 335: 716-719.

Mali P, Aach J, Stranges PB, Esvelt KM, Moosburner M, Kosuri S, et al (2013) CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nature Biotechnology* 31: 833-838.

Mali P, Aach J, Stranges PB, Esvelt KM, Moosburner M, Kosuri S, Yang L, Church GM (2013) CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nature Biotechnology* 31: 833-838.

Manica A, Zebec Z, Steinkellner J, Schleper C (2013) Unexpectedly broad target recognition of the CRISPR-mediated virus defence system in the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Nucleic Acids Research* 41: 10509-10517.

Mao Y, Zhang Z, Feng Z, Wei P, Zhang H, Botella J R, & Zhu J K (2016) Development of germ-line-specific CRISPR-Cas9 systems to improve the production of heritable gene modifications in *Arabidopsis*. *Plant biotechnology journal* 14: 519-532.

Marcaida MJ, Muñoz IG, Blanco FJ, Prieto J, Montoya G (2010) Homing endonucleases: from basics to therapeutic applications. *Cellular and Molecular Life Sciences* 67: 727-748.

Marraffini LA, Jiang W (2015) CRISPR-Cas: New Tools for Genetic Manipulations from Bacterial Immunity Systems. *Annual Review of Microbiology* 69: 209-228.

Marraffini LA, Jiang W (2015) CRISPR-Cas: New Tools for Genetic Manipulations from Bacterial Immunity Systems. *Annual Review Microbiology* 69: 209-228.

Marton I, Zuker A, Shklarman E, Zeevi V, Tovkach A, Roffe S, Vainstein A (2010) Nontransgenic genome modification in plant cells. *Plant physiology* 154: 1079-1087.

Maruyama T, Dougan SK, Truttmann MC, Bilate AM, Ingram JR, Ploegh HL (2015) Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nature Biotechnology* 33: 538-542

Meng X, Noyes MB, Zhu LJ, Lawson ND, Wolfe SA (2008) Targeted gene inactivation in zebrafish using engineered zinc-finger nucleases. *Nature Biotechnology* 26: 695-701.

Meyer M, Angelis MD, Wurst W, Kuhn R, Miller JC, Tan S, Qiao (2010) Genetargeting by homologous recombination in mouse zygotes mediated by zinc-finger nucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 15022-6.

Miglani GS (2017) Genome editing in crop improvement: Present scenario and future prospects. *Journal of Crop Improvement* 31: 453-559.

Miller J, McLachlan AD, Klug A (1985) Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus oocytes*. *The EMBO Journal* 4: 1609-1614.

Miller JC, Holmes MC, Wang J, Guschin DY, Lee YL, Rupniewski I, Beausejour CM, Waite AJ, Wang NS, Kim KA, et al (2007) An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nature Biotechnology* 25: 778-785.

Mojica FJ, DíezVillaseñor C, Soria E, Juez G (2000) Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Molecular Microbiology* 36: 244-246.

Morbiter R, Römer P, Boch J, and Lahaye T (2010) Regulation of selected genome loci using de novo-engineered transcription activator-like effector (TALE)-type transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 21617-21622.

Moscou MJ, Bogdanove AJ (2009) A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science* 326: 1501.

Muñoz IG, Prieto J, Subramanian S, Coloma J, Redondo P, Villate M, Merino N, Mrenchino M, D'Abramo M, Gervasio S, et al (2011) Molecular basis of engineered meganuclease targeting of the endogenous human RAG1 locus. *Nucleic Acids Research* 39: 729-743

Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, Dohmae N, Ishitani R, Zhang F, Nureki O (2014) Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell* 156: 935-949.

Nishizawa-Yokoi A, Cermak T, Hoshino T, Sugimoto K, Saika H, Mori A, & Voytas D F (2016) A defect in DNA Ligase4 enhances the frequency of TALEN-mediated targeted mutagenesis in rice. *Plant physiology* 170: 653-666.

Noori- Dalooi MR (2010) Medical Molecular Genetics in the third millennium. Tehran: Samer; Nashre Akhar.

Noori-Dalooi M, Abdollahzadeh R, Asadollahi K (2014) Targeted genome editing with engineered nucleases- A

- new approach in gene therapy. *Quarterly Journal of Sabzevar University of Medical Sciences* 21: 131-144.
- Osakabe K, Osakabe Y, & Toki S (2010) Site-directed mutagenesis in *Arabidopsis* using custom-designed zinc finger nucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 12034-12039.
- Pakbaz S, Pazhouhandeh M, & Eini Gandomani, O (2015) A method for Evaluation of RNA Silencing Suppression Activity in Plants Using Two Proteins of Grapevine Fanleaf Virus (GFLV). *Genetic Engineering and Biosafety Journal* 4: 135-144.
- Pattanayak V, Ramirez CL, Joung JK, Liu DR (2011) Revealing off-target cleavage specificities of zinc-finger nucleases by in vitro selection. *Nature Methods* 8: 765-70.
- Pauwels K, Podevin N, Breyer D, Carroll D, Herman P (2014) Engineering nucleases for gene targeting: safety and regulatory considerations. *New Biotechnology* 31: 18-27.
- Pazhouhandeh M, Dieterle M, Marrocco K, Lechner E, Berry B, Brault V, ... & Ziegler-Graff V (2006) F-box-like domain in the poliovirus protein P0 is required for silencing suppressor function. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 1994-1999.
- Peer R, Rivlin G, Golobovitch S, Lapidot M, Gal-On A, Vainstein A, & Flaishman M A (2015) Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in perennial fruit trees. *Planta* 241: 941-951.
- Perez-Pinera P, Ousterout DG, Gersbach CA (2012) Advances in targeted genome editing. *Current Opinion in Chemical Biology* 16: 268-277.
- Petolino J F, Worden A, Curlee K, Connell J, Moynahan T L S, Larsen C, & Russell, S (2010) Zinc finger nuclease-mediated transgene deletion. *Plant molecular biology* 73: 617-628.
- Popplewell L, Koo T, Leclerc X, Mamchaoui K, Gouble A, Mouly V, Voit T, Pagues F, Cedrone F, et al (2013) Gene correction of a Duchenne muscular dystrophy mutation by meganuclease-enhanced exon knock-in. *Human Gene Therapy* 24: 692-701.
- Puchta H (1999) Use of I-Sce I to induce DNA double-strand breaks in *Nicotiana* in DNA Repair Protocols. Humana Press (pp 447-451).
- Puchta H (2002) Gene replacement by homologous recombination in plants. *Plant Molecular Biology* 48:173-82.
- Puchta H, Dujon B, & Hohn B (1993) Homologous recombination in plant cells is enhanced by in vivo induction of double strand breaks into DNA by a site-specific endonuclease. *Nucleic acids research* 21: 5034-5040.
- Puchta H, Dujon B, & Hohn B (1996) Two different but related mechanisms are used in plants for the repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93: 5055-5060.
- Ramirez CL, Foley JE, Wright DA, Müller-Lerch F, Rahman SH, Cornu TI, Winfrey RJ, Sander JD, Fu F, Townsend JA, et al (2008) Unexpected failure rates for modular assembly of engineered zinc fingers. *Nature Methods* 5: 374-5.
- Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, et al (2013) Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell* 154: 1380-1389.
- Redondo P, Prieto J, Muñoz IG, Alibés A, Stricher F, Serrano L, Cabaniols JP, Daboussi F, Arnould S, Perez C, et al (2008) Molecular basis of xeroderma pigmentosum group C DNA recognition by engineered meganucleases. *Nature* 456: 107-111.
- Rollie C, Schneider S, Brinkmann AS, Bolt EL, White MF (2015) Intrinsic sequence specificity of the Cas1 integrase directs new spacer acquisition. *Elife* 4: e08716.
- Rosen LE, Morrison HA, Masri S, Brown MJ, Springstubb, Sussman D, Stoddard BL, Seligman LM (2006) Homing endonuclease I-CreI derivatives with novel DNA target specificities. *Nucleic Acids Research* 34: 4791-4800.
- Samanta M, Dey A, Gayen S (2016) CRISPR/Cas9: an advanced tool for editing plant genomes. *Transgenic Research*. 25: 561-573
- Sander J D, Dahlborg E J, Goodwin M J, Cade L, Zhang F, Cifuentes D, & Pierick C J (2011) Selection-free zinc-finger-nuclease engineering by context-dependent assembly (CoDA). *Nature methods* 8: 67-69.
- Sawai S, Ohyama K, Yasumoto S, Seki H, Sakuma T, Yamamoto T, Muranaka T (2014) Sterol side chain reductase 2 is a key enzyme in the biosynthesis of cholesterol, the common precursor of toxic steroidal glycoalkaloids in potato. *The Plant Cell* 26: 3763-3774.
- Schneider K, Schiermeyer A, Dolls A, Koch N, Herwartz D, Kirchhoff J, Sastry-Dent L (2016) Targeted gene exchange in plant cells mediated by a zinc finger nuclease double cut. *Plant biotechnology journal* 14: 1151-1160.
- Seligman LM, Chisholm KM, Chevalier BS, Chadsey MS, Edwards ST, Savage JH, Veillet AL (2002) Mutations altering the cleavage specificity of a homing endonuclease. *Nucleic Acids Research* 30: 3870-3879.
- Shan Q, Wang Y, Chen K, Liang Z, Li J, Zhang Y, & Zhang Y (2013) Rapid and efficient gene modification in rice and *Brachypodium* using TALENs. *Molecular plant* 6: 1365-1368.
- Shan Q, Wang Y, Li J, Zhang Y, Chen K, Liang Z, & Gao C (2013) Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nature biotechnology* 31: 686-688.
- Shan Q, Zhang Y, Chen K, Zhang K, Gao C (2015) Creation of fragrant rice by targeted knockout of the Os BADH 2 gene using TALEN technology. *Plant biotechnology journal* 13: 791-800.
- Shimizu Y, Bhakta MS, Segal DJ (2009) Restricted spacer tolerance of a zinc finger nuclease with a six amino acid linker. *Bioorg Med Chem Lett* 19: 3970-3972.
- Smith HQ and Nathans D (1973) A suggested nomenclature for bacterial host modification and restriction systems and their enzymes. *Journal of Molecular Biology* 81: 419-423.
- Smith J, Grizot S, Arnould S, Duclert A, Epinat JC, Chames P, Prieto J, Redondo P, Blanco FJ, Bravo J, et al (2006) A combinatorial approach to create artificial

- homing endonucleases cleaving chosen sequences. *Nucleic Acids Research* 34: e149.
- Staals RH, Agari Y, Maki-Yonekura S, Zhu Y, Taylor DW, van Duijn E, Barendregt A, Vlot M, Koehorst JJ, Sakamoto K, Masuda A, et al (2013) Structure and activity of the RNA-targeting Type III-B CRISPR-Cas complex of *Thermus thermophilus*. *Molecular Cell* 52: 135-145.
- Sternberg SH, Redding S, Jinek M, Greene EC, Doudna JA (2014) DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature* 507: 62-67.
- Sun N, Zhao H. 2013. Transcription activator-like effector nucleases (TALENs): A highly efficient and versatile tool for genome editing. *Biotechnology Bioengineering*. 110: 1811-1821.
- Szczelkun MD, Tikhomirova M, Sinkunas T, Gasiunas G, Karvelis T, et al. 2014. Direct observation of R-loop formation by single RNA-guided Cas9 and Cascade effector complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 111: 9798-9803.
- Tohidfar M, Maleki N, Abedini R (2009) Environmental risks of GM plants and the resistance management. *Biosafety Journal* 2: 24-36. (In Farsi).
- Townsend J A, Wright D A, Winfrey R J, Fu F, Maeder M L, Joung J K, & Voytas D F (2009) High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases. *Nature* 459: 442-445.
- Tsai SQ, Wyvekens N, Khayter C, Foden JA, Thapar V, Reyon D, et al (2014) Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. *Nature Biotechnology* 32: 569-576.
- Urnov, FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD (2010) Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nature Reviews Genetics* 11: 636-646.
- Valton J, Daboussi F, Leduc S, Molina R, Redondo P, Macmaster R, Montoya G, Duchateau P (2012) 5'-Cytosine-phosphoguanine (CpG) methylation impacts the activity of natural and engineered meganucleases. *The Journal of Biological Chemistry* 287: 30139-30150.
- Vanamee ES, Santagata S, Aggarwal AK (2001) FokI requires two specific DNA sites for cleavage. *Journal of Molecular Biology* 309: 69-78.
- Watanabe K, Breier U, Hensel G, Kumlehn J, Schubert I, and Reiss B (2016) Stable gene replacement in barley by targeted double-strand break induction. *Journal of experimental botany* 67: 1433-1445.
- Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA (2012) RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature* 482: 331-338.
- Wolfe SA, Neklodova L, Pabo CO (2000) DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. *Annual Review Biophysics* 3: 183-212.
- Wright D A, Townsend J A, Winfrey Jr R J, Irwin P A, Rajagopal J, Lonosky P M, Voytas D F (2005) High-frequency homologous recombination in plants mediated by zinc-finger nucleases. *The Plant Journal* 44: 693-705.
- Xu RF, Li H, Qin RY, Li J, Qiu CH, Yang YC, Ma H, Li L, Wei PC, Yang JB (2015) Generation of inheritable and "transgene clean" targeted genome-modified rice in later generations using the CRISPR/Cas9 system. *Scientific Reports* 5: 11491.
- Yang M, Djukanovic V, Stagg J, Lenderts B, Bidney D, Falco S C, Lyznik L A (2009) Targeted mutagenesis in the progeny of maize transgenic plants. *Plant molecular biology* 70: 669-679.
- Zhang F, Maeder M L, Unger-Wallace E, Hoshaw J P, Reyon D, Christian M, Joung JK (2010) High frequency targeted mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* using zinc finger nucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 12028-12033.
- Zhang J, Kasciukovic T, White MF (2012) The CRISPR associated protein Cas4 Is a 5' to 3' DNA exonuclease with an iron-sulfur cluster. *PLoS One* 7: e47232.
- Zhang L, Zhou Q (2014) CRISPR/Cas technology: a revolutionary approach for genome engineering. *Science China Life Sciences* 57: 639-640.
- Zhang Y, Zhang F, Li X, Baller J A, Qi Y, Starker C G, & Voytas D F (2013) Transcription activator-like effector nucleases enable efficient plant genome engineering. *Plant physiology* 161: 20-27.
- Zhao L, Bonocora RP, Shub DA, Stoddard BL (2007) The restriction fold turns to the dark side: a bacterial homing endonuclease with a PD-(D/E) -XK motif. *The European Molecular Biology Organization Journal* 26: 2432-2442.