



نشریه آموزشی - پژوهشی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور

# فصلنامه تحقیقات کاربردی در علوم دامی

شماره ۴۰، پاییز ۱۴۰۰

ص:ص: ۶۰-۴۷

## بررسی انواع روش‌های ویرایش ژنوم با استفاده از آنزیم‌های نوکلئاز هدفمند

• حامد اسدالهی<sup>۱\*</sup>، حسین عمرانی<sup>۲</sup>

۱- گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- موسسه تحقیقات علوم دامی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۴۰۰ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۴۰۰

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۲۲۴۴۹۳۳۷

Email: hamed\_asadolahi@yahoo.com

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ aasrj.2021.354589.1235

### چکیده:

در دهه‌های اخیر، مهندسی ژنتیک متکی به تکنیک‌هایی بوده است که نیازمند سال‌ها زمان و همچنین ساخت سازه‌های پیچیده DNA مانند نشانگرهای انتخابی بود که فقط برای چند گونه خاص مورد استفاده قرار می‌گرفت. با ظهور آنزیم‌های نوکلئاز هدفمند، از جمله تکنولوژی‌های ZFN، TALEN و CRISPR-Cas9، ژنوم گونه‌های مختلف اکنون به راحتی قابل ویرایش هستند. از آنزیم‌های هدفمند نوکلئاز در غیرفعال‌سازی ژن‌های خاص در دام جهت بهبود صفات تولیدی حیوان و افزایش محصول، استفاده از مدل‌های حیوانی در راستای مطالعه بیماری‌های مختلف انسانی، کاهش انتقال بیماری‌های مشترک انسان و حیوان، غیرفعال کردن ژن‌های درگیر در عفونت‌های مختلف، مقاومت به پاتوژن و در نهایت اصلاح و درمان اختلالات پیچیده ژنتیکی استفاده می‌شود. این پیشرفت‌ها فرصت‌های بی‌شماری را فراهم آورده است که نه تنها به درک ما از عملکردهای ژنی و مکانیزم‌های بیماری کمک می‌کند، بلکه باعث شناسایی جهش‌های مختلف بیماری‌زا، اصلاح محصولات کشاورزی و دامی و اصلاح محیط زیست ما می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: ویرایش ژنوم، آنزیم‌های نوکلئاز هدفمند، ZFN، TALEN، CRISPR-Cas9

Applied Animal Science Research Journal No 40 pp: 47-60

**Investigation of various genome editing methods using targeted nuclease enzymes**By: Asadollahi, Hamed<sup>\*1</sup>, Emrani, Hossein<sup>2</sup>

1: Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

2: Animal Science Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), 31585 Karaj, Iran

**Received: May 2021****Accepted: August 2021**

In recent decades, genetic engineering has relied on techniques that took years, as well as the construction of complex DNA constructs such as selective markers that were used for only a few specific species. With the advent of targeted nuclease enzymes, including ZFN, TALEN, and CRISPR-Cas9 technologies, the genome of different species are easily editable. Targeted nuclease enzymes are used in inactivation of specific genes in livestock to improve animal production traits and increase productivity, animal models to study various human diseases, reduce the transmission of common human and animal diseases, inactivation of genes involved in various infections, resistance to pathogens, and finally modification and treatment of complex genetic disorders. This development has provided countless opportunities that not only contribute to our understanding of gene functions and disease mechanisms, but also to the identification of various pathogenic mutations, the improvement of agricultural and livestock products, and the improvement of our environment.

**Key words:** Genome editing, Targeted nuclease enzymes, ZFN, TALEN, CRISPR-Cas9**مقدمه**

(1989). ویژگی پایانه‌های DNA دورشته‌ای باعث شد تا محققان بررسی کنند آیا قرار دادن داوطلبانه یک DNA دورشته‌ای در یک جایگاه اختصاصی در یک ژنوم خاص باعث افزایش همسان‌های نو ترکیب در همان جایگاه یا جایگاه‌های نزدیک آن خواهد شد یا خیر. برای این منظور گروه‌های مختلفی از محققین از استراتژی دو مرحله‌ای استفاده کردند. در این استراتژی در مرحله اول، یک جایگاه برشی مگانوکلاز<sup>۴</sup> (گروهی از اندورینونوکلازها هستند که به توالی‌های ۱۲ الی ۱۳ جفت بازی DND دورشته‌ای متصل شده و آن‌ها را برش می‌زنند) توسط همسان‌های نو ترکیب با فراوانی اندک درج شده و در مرحله بعد یک DNA دورشته‌ای بوسیله بیان یک مگانوکلاز همجنس درج می‌گردد. آن‌ها دریافتند که درج داوطلبانه DNA دورشته‌ای در هر جایگاه خاص، سبب افزایش چندین برابر میزان همسان‌های نو ترکیب جایگزینی ژن می‌شود (Cohen-Tannoudji, et al.,

فناوری‌های دستکاری ژنوم طی چند سال گذشته به طرز چشم‌گیری پیشرفت داشته است. طی چندین دهه، محققان به منظور شناسایی یا اصلاح تغییرات DNA در جایگاه‌های ژنومی خاص، بر توالی‌های همسان نو ترکیب (HR)<sup>۱</sup> متکی بودند. اگرچه همولوگ‌های نو ترکیب رویکرد ارزشمندی را در شناسایی عملکرد ژن و مکانیزم‌های بیماری پدید آورده است، ولی فراوانی اندک در شناسایی هدفمند توالی ژنومی بسیاری از ارگانسیم‌ها و در نتیجه نیاز به سازه‌های پیچیده DNA<sup>۲</sup>، استفاده گسترده آن را به عنوان یک استراتژی ویرایش ژن محدود کرده است. مطالعات اولیه در مورد همسان‌های نو ترکیب در سلول‌های یوکاریوتی نشان داد که پایانه‌های DNA دو رشته‌ای، که حاصل از قطعات DNA دو رشته‌ای اند (DSBs)<sup>۳</sup>، قابلیت نو ترکیبی بسیار بالایی دارند (Xue and Greene., 2021; Bollag, et al.,

<sup>1</sup> Homologous Recombination (HR)<sup>2</sup> DNA Constructs<sup>3</sup> DNA Double-Strand Breaks (DSBs)<sup>4</sup> Meganucleases<sup>5</sup> Zince-Finger Nucleases (ZFNs)

همسانی توالی بین تکرارها و قابل پیش‌بینی بودن کدهای TALE، برنامه‌ریزی مجدد این اندونوکلازها را امکان‌پذیر می‌سازد. Jinek و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان دادند سیستم کریسپر کاس ۹ (CRISPR-Cas9)<sup>۸</sup> (خوشه‌های منظم بین پالیندروم‌های تکراری کوتاه)، در باکتری استرپتوکوکوس پایوژنز<sup>۹</sup> که برای مهندسی ژنومی سازگار شده است، می‌تواند جرقه انقلاب عظیمی در ویرایش ژنوم پدید آورد. سیستم CRISPR-Cas9 جهت انجام ویرایش ژنومی دارای یک مولکول RNA کوچک تک‌رشته‌ای به نام "RNA راهنما" (sgRNA)<sup>۱۰</sup> و یک آنزیم اندونوکلاز غیراختصاصی به نام Cas9 می‌باشد (Jinek, et al., 2012). RNA کوچک تک رشته‌ای با Cas9 یک کمپلکس تشکیل داده و اتصال بازهای RNA راهنما به توالی ژنوم هدف طبق مدل واتسون و کریک انجام می‌پذیرد. مکانیسم سیستم کریسپر در مقایسه با ZFN ها و TALEN ها، که نیازمند به برنامه ریزی مجدد کامل آنزیم‌ها هستند، تنها با یک تغییر ساده در RNA راهنما باعث می‌شود تا با برنامه ریزی مجدد Cas9 به هر نوع توالی هدف متصل گردد (Kumar, et al., 2019; Jinek, et al., 2013). کارایی بالا، قابلیت چندگانه و سادگی برنامه ریزی مجدد سیستم CRISPR-Cas9، این تکنولوژی را به خط اول ویرایش ژنومی تبدیل کرده است. همچنین در مطالعه‌ای که به تازگی صورت گرفته است، یک سیستم طبقه‌بندی جدید کلاس ۲ کریسپر شناسایی شد. در سیستم Francisella novicida U112 به دلیل داشتن برخی ویژگی‌ها، تا حدودی از سیستم CRISPR-Cas9 متمایز بوده و می‌تواند به عنوان یک سیستم ویرایش ژنومی مورد استفاده قرار گیرد (Zetsche, et al., 2015).

### آنزیم‌های نوکلئاز انگشت روی (ZFNs)

ZFN ها اندونوکلازهای مصنوعی هستند که از ترکیب انواع فاکتورهای نسخه‌برداری (TFs)<sup>۱۱</sup> متصل‌شونده به DNA شامل پروتئین‌های انگشت روی (ZFPs) و دامین کاتالیزوری Fok1

(1998). با این وجود، استراتژی دو مرحله‌ای که در این مطالعات استفاده شده بود، امکان برنامه‌ریزی مجدد نوکلئاز را نداشت و به‌طور قابل توجهی استفاده از این استراتژی را برای ویرایش ژنوم محدود می‌کرد. به دنبال یک روش انعطاف پذیرتر جهت درج قطعات DNA دورشته‌ای به درون ژنوم، گروه کارول استفاده از یک کلاس جدید از آنزیم‌های اندونوکلازی مصنوعی به نام آنزیم‌های نوکلئاز انگشت روی (ZFNs)<sup>۵</sup> را مورد بررسی قرار دادند (Bibikova, et al., 2001). این نوکلئازها به صورت دایمر به DNA های یوکاریوتی متصل می‌شوند. پروتئین‌های انگشت روی (ZFPs)<sup>۶</sup> سبب هدایت فعالیت کاتالیزوری آنزیم های Fok1 به درون ژنوم می‌شوند (Bogdanove, et al., 1987; Nwankwo and Wilson., 2018). برخلاف مگانوکلازها که توالی‌های از پیش تعریف شده DNA را تشخیص می‌دهند آنزیم‌های نوکلئاز انگشت روی (ZFPs) می‌توانند با تغییر پروتئین‌های انگشت روی (ZFPs) برای هدف قرار دادن هر مکان خاص درون ژنوم، مجدداً برنامه‌ریزی شوند. علاوه بر این، استفاده از ZFN ها می‌تواند جایگزینی جایگاه اختصاصی ژن بوسیله همولوگ‌های نوترکب را چندین برابر بهبود بخشد (Bibikova, et al., 2001; Nwankwo and Wilson., 1987) های موجود در

طبیعت تا حد زیادی مانع از پذیرش گسترده بکارگیری ZFN ها توسط جامعه علمی شده است (Urnov, et al., 2010). یک دهه پس از اینکه ZFN ها به عنوان ابزارهای ویرایش ژنوم بکار گرفته شدند، کلاس دیگری از نوکلئازهای هدفمند توسعه یافتند. همانند ZFN ها، اندونوکلازهای شبه فعال مؤثر در رونویسی (TALENs)<sup>۷</sup> که حاصل از امتزاج پروتئین‌های متصل‌شونده به DNA و دامین کاتالیزوری Fok1 می‌باشند، در پروسه ویرایش ژنومی بکار گرفته شدند (Kita, et al., 1989). این آنزیم‌ها نیز به عنوان دایمر عمل می‌کنند و DNA را به طور مؤثر شکسته تا بتوانند ویرایش ژنومی را فعال کنند و به صورت هدفمند درون ژنوم قرار گیرند (Miller, et al., 2011). همچنین سادگی،

<sup>8</sup> Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR) - CRISPR- associated 9 (Cas9)

<sup>9</sup> Streptococcus pyogenes

<sup>10</sup> Single guide RNA (sgRNA)

<sup>11</sup> Transcription Factors (TFs)

<sup>6</sup> Zinc-Finger Proteins (ZFPs)

<sup>7</sup> Transcription Dctivator-Like Effector endonucleases (TALENs)

قرار می‌گیرند. هر آرایه از سه تا شش انگشت تشکیل شده است که ۹ تا ۱۸ جفت باز از توالی DNA ژنومی را شناسایی می‌کند و هر جفت از ZFN ها بین ۱۸ تا ۳۶ نوکلئوتید را در بر می‌گیرد. آرایه‌های پشت سرهم تکراری از انگشت‌ها از انتهای ۳' به انتهای ۵' به DNA متصل می‌شوند (شکل ۱) (Pavletich and Pabo., 1991). جهت انجام دایمیرزاسیون زیر واحدهای کاتالیزوری Fok1، توالی‌های مقابل DNA که توسط جفت ZFN ها شناسایی شده‌اند، باید بوسیله یک فاصله‌دهنده ۵ تا ۶ جفت‌بازی جدا شوند (Handel, et al., 2009; Bibikova et al., 2001). یکی از موانع اصلی در استفاده از ZFN ها به عنوان ابزار ویرایش ژنومی، حساسیت آن‌ها به تاثیرات محیطی DNA هدف، جهت اتصال می‌باشد (Maeder, et al., 2008). روش‌های مونتاژ ماژول‌ها<sup>۱۵</sup> و روش‌های انتخاب ترکیبی<sup>۱۶</sup> جهت مهندسی نمودن ZFP های خاص طراحی شده‌اند. روش‌های مونتاژ ماژول‌ها، براساس کارکرد مستقل هر انگشت با بخش‌های ۳ جفت‌بازی DNA است. با اتصال سه یا چند انگشت طبیعی یا مصنوعی به یک پلی‌پپتید، یک دامین متصل‌شونده به DNA بصورت اختصاصی ایجاد می‌شود (Segal, et al., 2003). با توجه به سادگی این روش‌ها و به دلیل کارایی ضعیف، ZFN ها به‌عنوان یک فاکتور مستقل محسوب نمی‌شوند (Pruett-Miller, et al., 2008; Ramirez, et al., 2008). لذا برای اینکه به عنوان یک فاکتور مستقل محسوب شوند، باید جفت انگشت‌های روی که به خوبی با هم کار می‌کنند مشخص شده و برای روش‌های مونتاژ ماژول‌ها مورد استفاده قرار گیرند (Moore, et al., 2001; Gupta, et al., 2012). تغییراتی مانند قراردادن توالی کوتاه یا بلند بین انگشتان روی، می‌تواند سبب تبدیل روش‌های مونتاژ ماژول‌ها به اصلاحی برای فرم DNA B و جفت بازها گردد (Moore, et al., 2001). روش‌های انتخاب ترکیبی شامل جستجوی تصادفی از کتابخانه‌های بزرگ جهت انتخاب ZFP هایی با قابلیت اتصال و تخصصی بودن بالا به توالی DNA می‌باشد (Hurt, et al., 2003). اگرچه این استراتژی‌ها ZFN هایی با فعالیت بالا و

حاصل شده‌اند (شکل ۱). در مقایسه با سایر اندونوکلازهای معمول نوع II که DNA را داخل یا نزدیک به مکان‌های اتصال آن‌ها برش می‌دهند، Fok1 یک نوع اندونوکلاز نوع IIS است که DNA را دقیقاً از محل اتصال به سایت برشی آن جدا می‌کند (Nwankwo and Wilson., 1987). در Fok1، دامین متصل‌شونده به DNA و دامین دارای خاصیت نوکلئازی را می‌توان به‌صورت فیزیکی از هم جدا نمود (Kim, et al., 1994)، که این ویژگی اجازه تلقیق دامین کاتالیزوری Fok1 را با سایر دامین‌های متصل‌شونده به DNA مانند ZFP ها یا TALE ها می‌دهد. Fok1 برای اعمال فعالیت کاتالیزوری نیازمند دو بخشی شدن یا دایمیرزاسون<sup>۱۲</sup> است (Smith, et al., 2000). تنها دو زیر واحد کاتالیزوری Fok1 برای دایمیرزاسیون و جلوگیری از برش تصادفی DNA کافی نیست. بوسیله دامین‌های متصل‌شونده به DNA مانند ZFP ها، TALE ها و پروتئین‌های Cas، دو زیر واحد Fok1 به هر جایگاهی در ژنوم متصل شده و سبب شناسایی دو جایگاه اتصال مجاور می‌گردند (Smith, et al., 2000). جهت دایمیرزاسیون زیر واحدهای کاتالیزوری، وجود فاصله مناسب بین دو جایگاه اتصال لازم و ضروریست (شکل ۱) (Smith, et al., 2000; Miller, et al., 2011). در ZFN ها، توالی هدف توسط دامین‌های ZFP شناسایی می‌شوند. ZFP ها دامین‌های متصل‌شونده به DNA هستند (Bogdanove, et al., 2018) که ابتدا در فاکتورهای مربوط به نسخه‌برداری یوکاریوتی شناسایی شدند (Miller, et al., 1985). ZFP ها شامل آرایه‌های پشت سرهم انگشت‌های Cys2-His2<sup>۱۳</sup> بوده که هر حلقه دارای یک یون روی (II)<sup>۱۴</sup> جهت تشکیل دامین متصل‌شونده به DNA می‌باشد. ZFP ها به درون شیار بزرگ DNA دورشته‌ای ماریپچ آلفا متصل شده و هر انگشت تقریباً ۳ جفت باز از توالی ژنوم DNA هدف را شناسایی می‌کند (Berg, 1988). با توجه به اینکه تعداد سه انگشت یا بیشتر جهت اتصال به ژنوم DNA کافی می‌باشد، ZFN ها با سه تا شش انگشت برای شناسایی DNA دورشته‌ای مورد استفاده

<sup>12</sup> Dimerization<sup>13</sup> Cys2-His2 Fingers<sup>14</sup> Zinc (II) Ion<sup>15</sup> Modular Assembly Methods<sup>16</sup> Combinatorial Selection Methods

Moscou and Bogdanove., 2009; Boch, خواهد کرد (et al., 2009). تکرارهای TALE از نظر توالی بسیار شبیه به یکدیگرند و در هر تکرار یک جفت اسیدآمینو مجاور، قرار گرفته است (Mak, et al., 2012; Deng, et al., 2012). این اسیدآمینوها به تکرارهای تغییرپذیر آزاد دوتایی (RVD)<sup>21</sup> نامگذاری شده و کد تکراری TALE را مشخص می کنند. معمولاً چهار بخش پر تکرار مانند NI, HD, NN و NG مورد استفاده قرار می گیرند و به ترتیب آدنین (A)، سیتوزین (C)، گوانین (G) و تیمیدین (T) را شناسایی می کنند (Meckler, et al., 2013). همچنین تکرارهای تغییرپذیر دوتایی دیگر با قابلیت تخصصی بودن بیشتر نیز گزارش شده اند (Moscou and Streubel, et al., 2012; Bogdanove., 2009; Huang, et al., 2011; Huang, et al., 2011). فعالیت های آرایه های حاوی برخی از RVD های جایگزین، کم گزارش شده است (Huang, et al., 2011). برخلاف ZFN ها که نیازی به بخش های پروتئینی اضافی برای فعالیت ندارند، TALEN ها علاوه بر تکرار TALE، به برخی از توالی های پروتئینی در انتهای هر تکرار نیاز دارند. اگر چه حالت های مختلفی برای توسعه TALEN ها به عنوان یک ابزار ویرایش ژنومی استفاده شده است، اما به نظر می رسد همه آنها ویژگی های مشابهی داشته باشند. یکی از ویژگی های مهم، حضور دو تکرار کوچک است که از لحاظ ساختاری مشابه اما از لحاظ توالی با تکرارهای TALE متمایز می باشد. این تکرارها تیمیدین را در موقعیت شروع توالی DNA هدف TALE شناسایی می کنند و به عبارت دیگر، هر توالی هدف TALEN باید با T شروع شود (Mak, et al., 2012). اگر چه تنها ۱۰ الی ۱۲ تکرار TALE برای اتصال به ژنوم هدف لازم است، اما تعداد ۱۵ تا ۲۱ تکرار TALE معمولاً هدف گیری شده و تمایز ویژه ای را برای TALEN جهت انجام ویرایش ژنومی پدید می آورد. همانطور که در ZFN ها دیده می شود، فعالیت برش DNA توسط TALEN ها به ویژه از طریق متیلاسیون<sup>22</sup> سیتوزین در شرایط طبیعی، تحت تأثیر شرایط اپی ژنتیکی قرار می گیرد (Bultmann, et al., 2012). برای غلبه بر این

سمیت کم را مشخص می کند، اما به آزمایشگاه های بسیار تخصصی نیاز دارد (Cornu, et al., 2008).

## اندونوکلازهای شبه فعال مؤثر در رونویسی (TALENs)

همانند ZFN ها، TALEN ها اندونوکلازهای مصنوعی هستند که از دامین اتصال دهنده TALE به عنوان واحدهای متصل شونده به DNA و از اندونوکلاز FokI به عنوان زیر واحدهای کاتالیزوری استفاده می کنند. همانطور که قبلاً ذکر شد، FokI به عنوان یک دایمر عمل می کند و باید دو زیر واحد TALE-FokI در هر جایگاه در کنار یکدیگر قرار گیرند تا فرآیند برش DNA صورت پذیرد. این فرآیند بواسطه دامین های TALE متصل شونده به DNA انجام می شود (Bogdanove, et al., 2018). این دامین ها دو توالی مجاور و معکوس DNA که توسط توالی های ۱۲ الی ۲۰ جفت بازی جدا شده اند را برای دایمریزاسیون اندونوکلاز FokI طراحی می کنند (Miller, et al., 2011). TALEN ها، فاکتورهای نسخه برداری هستند که توسط باکتری های گیاهی گرم منفی Xanthomonas در زمان حمله به میزبان ترشح می شوند. این فاکتورهای نسخه برداری، برای پشتیبانی از بیماری زایی، تکثیر و انتشار باکتریایی به میزبان متصل شده و بیان ژن را تنظیم می کنند. TALEN ها شامل یک دامین N-terminal حاوی یک سیگنال ترانسلوکیشن نوع III<sup>17</sup>، یک ناحیه مرکزی حاوی توالی های تکراری<sup>18</sup> مسئول اتصال TALE C-terminal های متصل شونده به توالی DNA و یک دامین C-terminal حاوی سیگنال های تعیین محل هسته ای<sup>19</sup> و دامین فعال سازی نسخه برداری<sup>20</sup> می باشند (Boch and Bonas., 2010). ترکیب اندونوکلاز FokI با بخش تغییر یافته پایانه C از ناحیه N-termina دامین TALE، چارچوب تولید TALEN ها را فراهم کرده است (Miller, et al., 2011). برخلاف ZFP ها که هر انگشت تقریباً توالی ۳ جفت بازی DNA هدف را شناسایی می کند، هر تکرار TALE که از ۳۳ تا ۳۵ آمینو اسید تشکیل شده است، فقط یک جفت باز از ژنوم هدف را شناسایی

<sup>17</sup> Type III Translocation Signal

<sup>18</sup> Tandem Repeats

<sup>19</sup> Nuclear Localization Signals

<sup>20</sup> Transcriptional Activation Domain

<sup>21</sup> Repeat Variable Di-residue (RVD)

<sup>22</sup> Methylation

شناخته شده در باکتری‌ها و آرکی باکتری‌ها، سیستم نوع II<sup>۲۹</sup> به عنوان ابزاری برای ویرایش ژنوم سازگاری یافته است (Kumar, et al., 2019; Makarova and Koonin., 2015). سیستم کریسپر نوع II دارای سه بخش مختلف است. بخش اول، یک رونوشت RNA، به نام crRNA<sup>۳۰</sup> است. این رونوشت RNA حاوی یک فاصله‌دهنده و یک توالی تکراری می‌باشد. بخش دوم، یک رونوشت RNA کدشده به نام TracrRNA<sup>۳۱</sup> است که دارای توالی مکمل با توالی تکراری رونوشت crRNA می‌باشد. سومین بخش اندونوکلاز Cas9 است که متشکل از دو دامین نوکلئازی شامل یک دامین شبه RuvC<sup>۳۲</sup> در نزدیکی N-terminal پروتئین و یک دامین نوکلئازی HNH در وسط پروتئین می‌باشد (Kumar, et al., 2019; Jinek, et al., 2012). هر سه بخش یک کمپلکس ریونوکلئیک را تشکیل داده که توالی خاصی از DNA ژنومی را شناسایی کرده و به نام عناصر پروتئین فاصله‌دهنده<sup>۳۳</sup> معرفی می‌شوند. تشکیل ساختار هیبرید DNA-RNA بین crRNA و توالی هدف DNA (protospacer) سبب برش توالی DNA می‌شود (Jinek, et al., 2012). توالی‌هایی که نقش اندونوکلاز Cas را ایفا می‌کنند، نیازمند یک توالی به نام موتیف مجاور protospacer (PAM)<sup>۳۴</sup> می‌باشند. PAM که توالی کوتاه DNA است در پایین‌دست ناحیه ۳' protospacer واقع شده است (Jinek, et al., 2012; Garneau, et al., 2010; Deveau, et al., 2008). به عنوان مثال، آنزیم اندونوکلاز در باکتری استرپتوکوکوس پایورنز SPCas9<sup>۳۵</sup> نام دارد، که برای انجام فعالیت مطلوب به یک توالی 5'-NGG-3' نیاز دارد. N می‌تواند هر کدام از چهار نوع نوکلئوتید موجود باشد (Hsu, et al., 2013). توالی‌های 5'-NAG-3' سبب کاهش فعالیت می‌شوند در حالی که هر ترکیب سه‌گانه دیگر غیر از این توالی محدودیتی در فعالیت ایجاد نمی‌کند (Hsu, et al., 2013). وجود توالی

محدودیت‌ها استراتژی‌هایی در نظر گرفته شده است. از جمله این استراتژی‌ها، مهار شیمیایی متیل ترانسفرازهای DNA<sup>۲۳</sup> یا استفاده از TALE‌های جایگزین است که سبب حفظ آسپارژین در جایگاه ۱۲ و حذف آن در جایگاه ۱۳ توالی هدف می‌شوند (Valton, et al., 2012). سادگی کدهای TALE به عنوان یک مزیت در سیستم تشخیص توالی DNA هدف نسبت به ZFN هاست. با این وجود انجام چندین کلونینگ از تکرارهای TALE به دلیل شباهت توالی آن‌ها چالش برانگیز است. برای فائق آمدن بر این محدودیت، تلفیق چندین استراتژی مانند کلونینگ فاز جامد<sup>۲۴</sup>، اتصال مستقل<sup>۲۵</sup> و اتصال وابسته<sup>۲۶</sup> برای ساخت تکرارهای TALE تخصصی، اعمال شده است (Reyon, et al., 2012; Briggs, et al., 2012; Cermak, et al., 2011; Schmid-Burgk, et al., 2013).

### نوکلئازهای هدایت‌کننده <sup>۲۷</sup>CRISPR (CRISPR)

باکتری‌ها و آرکی باکتری‌ها دارای یک نوع سیستم ایمنی اکتسابی خاص هستند، به این صورت که قطعه‌هایی از DNA فاژها یا پلازمیدهای مهاجم را دریافت نموده و آن‌ها را درون ژنوم خود ادغام می‌کنند و به‌عنوان یک مکانیسم دفاعی در آینده بکار می‌گیرند (Shivram, et al., 2021). این قطعات کوچک DNA که معمولاً ۲۰ الی ۵۰ نوکلئوتید طول دارند، در ژنوم باکتری‌ها و آرکی باکتری‌ها در میان عناصر فاصله‌دهنده<sup>۲۸</sup> با طول مشابه قرار می‌گیرند (Westra, et al., 2012). این توالی‌ها خوشه‌های منظم بین پالیندروم‌های کوتاه تکراری نام دارند، زیرا آن‌ها در خوشه‌های کوچکی درون ژنوم میزبان گنجانده شده‌اند. باکتری‌ها و آرکی باکتری‌ها پس از اینکه برای دومین بار توسط همین فاژ یا فاژهای یک خانواده مشابه یا دیگر DNA‌های مهاجم آلوده شدند، با استفاده از RNA‌های کوچک تولید شده از این خوشه‌ها توسط یک اندونوکلاز به نام Cas سبب هضم ژنوم فاژ مهاجم می‌شوند. از میان چندین سیستم کریسپر مختلف

<sup>29</sup> Type II CRISPR-Cas System

<sup>30</sup> CRISPR RNA

<sup>31</sup> Trans-activating crRNA (TracrRNA)

<sup>32</sup> RuvC-like Nuclease Domain

<sup>33</sup> Protospacer Elements

<sup>34</sup> Protospacer-Adjacent Motif (PAM)

<sup>35</sup> S.pyogenes Cas9 (SpCas9)

<sup>23</sup> DNA methyltransferases

<sup>24</sup> Solid-phase Cloning

<sup>25</sup> Ligation-independent

<sup>26</sup> Ligation-dependent

<sup>27</sup> RNA-Guided Nucleases

<sup>28</sup> Spacer Elements

Horvath, et Deveau, et al., 2008) شده‌اند (جدول ۱) PAM برای چندین نوع از سیستم CRISPR-Cas شرح داده شده است که برخی از آنها برای ویرایش‌های ژنومی سازگار (al., 2008;).

جدول ۱) انواع توالی PAM در ویرایش ژنوم به روش CRISPR

منبع	توالی PAM	ارگانیسم
(Kleinstiver, et al., 2015)	NGCG	<i>Streptococcus pyogenes</i> (VRER variant)
(Kleinstiver, et al., 2015)	NGAG	<i>Streptococcus pyogenes</i> (VQR variant)
(Hsu, et al., 2013)	NGG	<i>Streptococcus pyogenes</i>
(Van der Ploeg, 2009)	NGG	<i>Streptococcus mutans</i>
(Kleinstiver, et al., 2015)	NNGGGT NNGAAT NNGAGT	<i>Staphylococcus aureus</i>
(Fonfara, et al., 2014)	NGGNG	<i>Streptococcus thermophilus</i> (CRISPR3)
(Fonfara, et al., 2014)	NNAAAAW	<i>Streptococcus thermophilus</i> (CRISPR1)
(Esvelt, et al., 2013)	NAAAAN	<i>Treponema denticola</i>
(Fonfara, et al., 2014)	NG	<i>Francisella novicida</i>
(Fonfara, et al., 2014)	GNNNCNNA	<i>Pasteurella multocida</i>
(Hou, et al., 2013)	NNNNGATT	<i>Neisseria meningitidis</i>
(Fonfara, et al., 2014)	NNNNACA	<i>Campylobacter jejuni</i>

ZFN و TALEN در این است که اندونوکلئاز SpCas9 توالی DNA را به صورت دقیق در جایگاه اتصال توالی هدف برش می‌زند (Jinek, et al., 2012). توالی DNA دورشته‌ای برش‌یافته توسط مکانیسم ترمیم کروموزوم مانند نوترکیبی همسان (HR) یا اتصال پایانه ناهمسان (NHEJ)<sup>۳۶</sup>، محل برش توالی هدف را تغییر داده و مانع اتصال و برش مجدد اندونوکلئاز Cas9 می‌شود. این ویژگی CRISPR-Cas9 یک مزیت قابل توجه برای ویرایش ژنوم توسط هومولوگ‌های نو ترکیب می‌باشد (Xue and Greene., 2021). شناسایی دقیق توالی هدف، جهت استفاده به عنوان ابزار ویرایش ژنومی بسیار حائز اهمیت می‌باشد. بنابراین، انتخاب sgrRNA نقش مهمی در پاکسازی جهش‌ها<sup>۳۷</sup> دارد. مطالعات متعدد نشان داده است که اندونوکلئاز SpCas9 می‌تواند سبب تحمل به Mismatche ها<sup>۳۸</sup> (عدم اتصال دقیق نوکلئوتیدی)، برآمدگی RNA<sup>۳۹</sup> (یک نوکلئوتید جفت نشده در یک رشته) و برآمدگی DNA بین توالی راهنمای crRNA و توالی هدف شود (Hsu, et Jinek, et al., 2012; Cong, et al., 2013; Mali, et al., 2013; al., 2013; Lin, et al., 2014). اگرچه قوانین ساده و معینی برای نحوه فعالیت آنزیم اندونوکلئاز SpCas9 وجود ندارد، ولی مطالعات نشان داده‌اند که تعداد و موقعیت Mismatche ها در توالی PAM بسیار حائز اهمیت است. Mismatche های دوپلکس DNA-RNA مانند برآمدگی‌های DNA و RNA که در نزدیکی توالی PAM قرار دارند، فعالیت آنزیم اندونوکلئاز Cas9 را مختل می‌کنند. اگرچه Mismatche های تک‌نوکلئوتیدی تأثیر اندکی بر فعالیت آنزیم اندونوکلئاز SpCas9 دارند، اما تعداد دو یا چند Mismatche، بسته به موقعیت قرارگیری آنها، می‌تواند به‌طور قابل توجهی فعالیت آنزیم اندونوکلئاز SpCas9 را مختل کند. با این حال، مطالعات اخیر نشان داده‌اند که نوکلئوتیدی که در ناحیه بالا دست توالی PAM واقع شده است ممکن است آنزیم نوکلئاز Cas9 متصل به توالی

علاوه بر این، با استفاده از اطلاعات ساختاری و طراحی ترکیبی، در آنزیم اندونوکلئاز SpCas9 تغییراتی ایجاد شد تا توانایی شناسایی توالی‌های جایگزین PAM را دارا باشد و به طور قابل توجهی طیف وسیعی از توالی‌ها را برای ویرایش ژنوم مورد استفاده قرار دهد (Kleinstiver, et al., 2015). در مجموع، می‌توان گفت که اندونوکلئاز Cas9 گونه‌های مختلف، قادرند تمام نوکلئوتیدهای ژنوم را تحت پوشش قرار دهند. در رایج‌ترین سیستم CRISPR-Cas9 برای ویرایش ژنومی از باکتری استریتوکوکوس پایوژنز استفاده شده است. سیستم سه جزئی با اتصال crRNA و tracrRNA به sgrRNA تشکیل می‌شود (Jinek, et al., 2012). تغییرات ساده توالی راهنما درون مولکول sgrRNA جهت مستعد ساختن اندونوکلئاز SpCas9 برای هدف قرار دادن هر بخش از ژنوم کافیست.

سیستم CRISPR-Cas9 مزایای متعددی نسبت به سیستم TALEN و ZFN به عنوان ابزاری برای ویرایش ژنومی دارد. اولاً، سیستم‌های CRISPR-Cas9 بر پایه یک اندونوکلئاز ثابت هستند و بنابراین نیازی به برنامه‌ریزی مجدد ندارند. برنامه‌ریزی مجدد سیستم‌های CRISPR-Cas9 نیازمند به طراحی و تولید یک sgrRNA جدید می‌باشد. ثانیاً، سادگی این سیستم فرصتی را برای کاربرد گسترده و چندگانه در ژنوم فراهم می‌کند. انتقال sgrNA های متعدد به همراه اندونوکلئاز Cas9 اجازه می‌دهد تا همزمان چندین جایگاه مورد هدف قرار گیرد. امروزه کتابخانه‌های CRISPR متعددی در سرتاسر ژنوم جهت شناسایی ژن‌های حیاتی در بقای سلول و مقاومت به دارو در شرایط آزمایشگاهی و همچنین ژن‌های حیاتی در رشد تومور و متاستاز در درون بدن در دسترس قرار دارند (Shivram, et al., 2021; Bassett, et al., 2015; Chen, et al., 2015; Shalem, et al., 2014). یکی دیگر از مزیت‌های تکنولوژی CRISPR-Cas9 نسبت به ZFN و TALEN، در توانایی این سیستم در برش دادن DNA ژنومی بدون توجه به خصوصیت اپی‌ژنتیکی آن است (Chari, et al., 2015; Hsu, et al., 2013). در نهایت اینکه، تفاوت اصلی مکانیسم CRISPR-Cas9 نسبت به

<sup>36</sup> Non Homologous End-Joining (NHEJ)

<sup>37</sup> Tailoring Mutations

<sup>38</sup> Tolerate Mismatches

<sup>39</sup> RNA Bulges



برخلاف سیستم های کریسپر نوع II، سیستم CRISPR-Cpf1 برای تشکیل شدن به tracrRNA نیاز ندارد. پایانه ۵' crRNA حاوی یک ناحیه فاصله دهنده بسیار محافظت شده است که برای یک فرم ساقه-حلقه کوتاه<sup>۴۴</sup> در نظر گرفته شده است. تغییر در توالی یا ساقه-حلقه باعث اختلال در عملکرد برشی CRISPR-FnCpf1 خواهد شد. کمپلکس CrRNA-Cpf1 برش هایی می شود که یک توالی PAM کوتاه غنی از T قبل از شروع آن وجود دارد و سبب تولید DSB های پراکنده به صورت آویزان در ناحیه ۵' با طول ۴ الی ۵ نوکلئوتید می شود. سیستم ویرایش CRISPR-FnCpf1 همانند سیستم ویرایش CRISPR-Cas9، نیازمند یک فاصله دهنده ۱۸ نوکلئوتیدی است و می تواند Mismatche های تک نوکلئوتیدی را بین توالی راهنما و توالی DNA هدف تحمل کند. علاوه بر FnCpf1، چندین سیستم ویرایش CRISPR-Cpf1 دیگر نیز با تفاوت هایی در توالی PAM در باکتری ها شناسایی شده اند (جدول ۲). با این حال، برخلاف سیستم ویرایش ژنومی CRISPR-Cas9، سیستم های ویرایش ژنومی TALEN، ZFN و CRISPR-Cpf1 مکانیسم مشابهی دارند، به این صورت که در رشته غیر هدف نوکلئوتید شماره ۱۸ و در رشته هدف نوکلئوتید شماره ۲۳ را در خارج از توالی تشخیص خودشان برش می دهند. این یافته نشان می دهد تا زمانی که تغییرات کافی برای جلوگیری از اتصال Cpf1 به جایگاه توالی هدف به وجود آید، این امکان وجود دارد که ایجاد برش در جایگاه هدف ادامه یابد.

DNA دورشته ای را تحت تأثیر قرار دهد (et al., 2014; Xu, et al., 2015; Chari, et al., 2015; Doench, et al., 2015). چندین وبسایت با قابلیت دسترسی آزاد جهت کمک به انتخاب sgrRNA ها توسعه داده شده اند. Pelletier و همکاران در سال ۲۰۱۵ در طی اجرای پروژه استفاده از فناوری CRISPR-Cas9، روش انتخابی توالی sgrRNA را برای مهندسی نمودن ژنوم موش توسعه دادند (Pelletier, et al., 2015). اگرچه این روش ممکن است نسبت به سایر روش های انتخاب توالی sgrRNA ها مشکل تر باشد، اما فهرست جامعی از تمام sgrRNA ها به همراه جایگاه های غیر هدف درون ژنوم خود فراهم می آورد. استراتژی بکار گرفته شده توسط این گروه که با توجه به نتایج مشاهدات چندین گروه تحقیقاتی در مورد تعریف sgrRNA انتخابی انجام پذیرفته است، نشان می دهد که اندونوکلاز SpCas9 می تواند چندین Mismatche (تا ۸ نوکلئوتید) را در ناحیه پایانه ۵' sgrRNA تحمل کند (Lin, et al., 2014; Fu, et al., 2014; Jiang, et al., 2013; Hsu, et al., 2013; Cong, et al., 2013; Jinek, et al., 2012).

وبسایت Cas-OFFinder اجازه شناسایی چندین توالی رفرنس ژنوم<sup>۴۰</sup> (اطلاعات دیجیتالی توالی نوکلئیک اسید که توسط دانشمندان جمع آوری شده است) و توالی ژنوم غیر رفرنس مهره داران<sup>۴۱</sup> مانند دیابت مستقل از چاقی<sup>۴۲</sup> و ویروس لوسمی فرند (FLV)<sup>۴۳</sup> سویه B موش را فراهم می کند. همچنین این روش توانایی طراحی sgrRNA های بسیار انتخابی در موش با فعالیت های کوچک و یا غیر هدف را داراست (Pelletier, et al., 2015; Martinez, et al., 2015). به تازگی نوع دیگری از سیستم کلاس ۲ کریسپر برای مبحث ویرایش ژنوم سازگار شده است (Zetsche, et al., 2015). سیستم کریسپر نوع V در باکتری Francisella novicida (Fn) دارای یک پروتئین بزرگ به نام CRISPR از باکتری Prevotellaand و Francisella 1 (Cpf1) و یک crRNA کوچک می باشد.

<sup>40</sup> Reference Genome

<sup>41</sup> Nonreference Vertebrate Genomes

<sup>42</sup> Non-Obese Diabetic

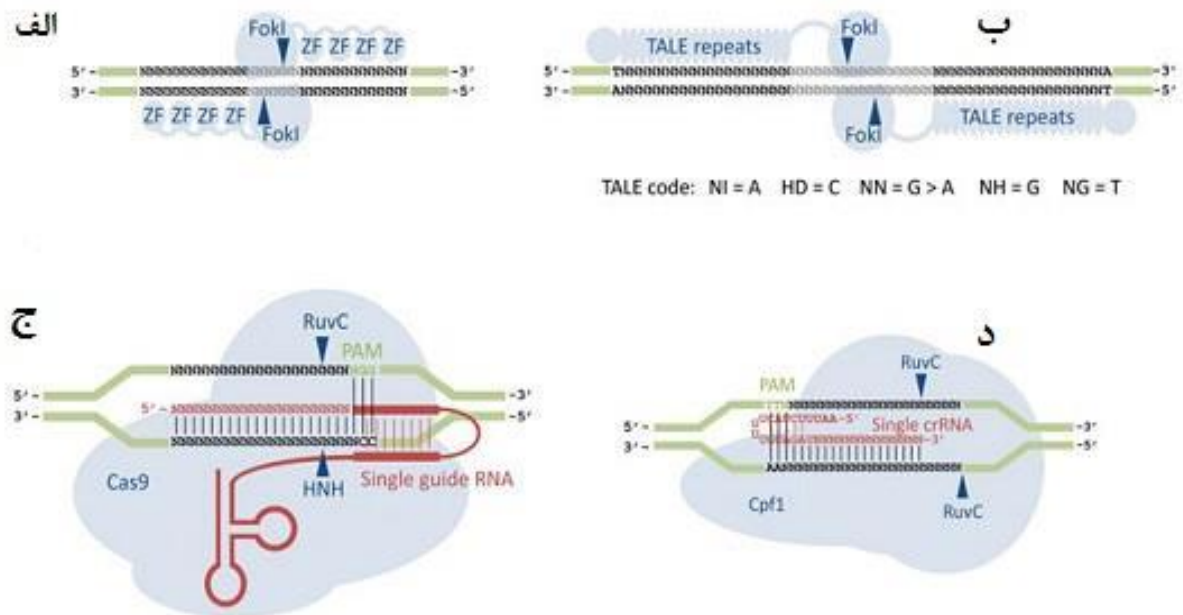
<sup>43</sup> Friend Leukemia Virus (FLV)

<sup>44</sup> Short Hairpin Loop

<sup>45</sup> 5'-Overhang

## جدول ۲) توالی‌های PAM در سیستم ویرایش ژنومی CRISPR-Cpf1

منبع	توالی PAM	ارگانسیم
(Zetsche, et al., 2015)	TTTN	<i>Acidaminococcus sp. BV3L6</i>
(Zetsche, et al., 2015)	TTN	<i>Francisella novicida</i>
(Zetsche, et al., 2015)	(T/C)(T/C)N	<i>Moraxella bovoculi 237</i>
(Zetsche, et al., 2015)	TTTN	<i>Lachnospiraceae bacterium MA2020</i>



## شکل ۱) طراحی آنزیم‌های نوکلئاز هدفمند

می‌باشد که توسط یک بخش ۱۲ الی ۲۰ نوکلئوتیدی جهت قرار دادن توالی مضاعف TALEN در ناحیه C-terminal و دایمریزاسیون FokI جدا شده‌اند. برخلاف ZFN ها که در جهت ۳' به ۵' به DNA متصل می‌شوند، TALEN ها در جهت ۵' به ۳' با بیشترین تکرار در ناحیه N-terminal و در انتهای ۵' متصل می‌شوند. اختصاصی بودن تکرارهای TALE بوسیله تکرارهای دوتایی متغیر در موقعیت ۱۲ و ۱۳ از تعداد ۳۵ آمینواسید تکرارهای TALE حاصل می‌شود. معمولاً در این حالت چهار تکرار دوتایی متغیر مانند NI، HD، NN و NG که

طرح ZFN: هر رشته حاوی چهار پروتئین روی است که یک توالی هدف خاص را شناسایی می‌کند. جایگاه هدف ZFN حاوی دو انگشت روی است که توسط ۵ الی ۷ نوکلئوتید جهت فعال‌سازی دایمریزاسیون FokI از یکدیگر فاصله گرفته‌اند. ZFN ها به صورت وارونه به توالی DNA متصل می‌شوند و ناحیه N-terminal پروتئین ZF، توالی سه‌تایی ۳' را شناسایی می‌کند. (ب) طرح TALEN: هر رشته شامل یک آرایه دارای ۲۰ تکرار TALE می‌باشد که یک توالی هدف ۲۰ نوکلئوتیدی را شناسایی می‌کند. جایگاه هدف TALEN دارای دو بخش اتصال

نوکلئاز هدفمند، توالی DNA دهنده و همچنین مکانیسم های ترمیم DNA نیاز است. در واقع کیفیت انتقال، شناسایی هدف اختصاصی، درک بهتر از مکانیسم های ویرایش DNA و شناسایی راه هایی برای ارتقاء مکانیسم HR تمرکز اصلی در مکانیسم ویرایش ژنومی است. در این راستا پیشنهاد می گردد که این فناوری در مباحث مربوط به ژنتیک و اصلاح نژاد حیوانات برای صفات مختلف مورد استفاده قرار گرفته و نتایج آن بر اساس شرایط موجود در کشور تحلیل و ترویج شود.

### منابع

- Bassett, A. R., Kong, L., & Liu, J. L. (2015). A genome-wide CRISPR library for high-throughput genetic screening in *Drosophila* cells. *Journal of Genetics and Genomics*, 42(6), 301-309.
- Berg, J. M. (1988). Proposed structure for the zinc-binding domains from transcription factor IIIA and related proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(1), 99-102.
- Bibikova, M., Carroll, D., Segal, D. J., Trautman, J. K., Smith, J., Kim, Y. G., & Chandrasegaran, S. (2001). Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases. *Molecular and cellular biology*, 21(1), 289-297.
- Boch, J., & Bonas, U. (2010). *Xanthomonas AvrBs3* family-type III effectors: discovery and function. *Annual review of phytopathology*, 48, 419-436.
- Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., ... & Bonas, U. (2009). Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 326(5959), 1509-1512.
- Bogdanove, A. J., Bohm, A., Miller, J. C., Morgan, R. D., & Stoddard, B. L. (2018). Engineering altered protein-DNA recognition specificity. *Nucleic acids research*, 46(10), 4845-4871.
- Bollag, R. J., Watdman, A. S., & Liskay, R. M. (1989). Homologous recombination in mammalian cells. *Annual review of genetics*, 23(1), 199-225.

به ترتیب آدنین (A)، سیتوزین (C)، گوانین (G) و تیمیدین (T) را شناسایی می کنند، مورد استفاده قرار می گیرند. علاوه بر تکرارهای TALE، جهت شناسایی توالی هدف DNA توالی های پروتئین دیگری نیز نیاز است. (ج) طرح CRISPR-Cas9: Cas9 یک اندونوکلئاز است که حاوی RuvC و فعالیت نوکلئازی HNH می باشد. RNA راهنما یک مولکول مصنوعی است که با استفاده از ترکیب crRNA با tracrRNA بوسیله یک RNA کوچک لینکر تشکیل شده است. کمپلکس اندونوکلئاز Cas9-RNA با توالی هدف DNA به نام protospacer در تعامل است. در ابتدا توالی کوچکی از DNA هدف به نام PAM که در پایین دست توالی protospacer واقع شده است را شناسایی می کند. تغییرات در فعالیت RuvC یا نوکلئاز HNH می تواند باعث کاهش فعالیت غیر هدف در SpCas9 شود. (د) طرح CRISPR-FnCpf1: FnCpf1 یک آنزیم نوکلئاز دارای دو دامین نوکلئازی RuvC می باشد. برخلاف SpCas9 که نیازمند دو مولکول RNA کوچک است، FnCpf1 جهت فعالیت به یک مولکول crRNA نیاز دارد. نوکلئاز FnCpf1 نیز همانند SpCas9 برای فعالیت به توالی PAM نیاز دارد. توالی PAM در موقعیت ۵' توالی protospacer واقع شده است و Cpf1 توالی DNA هدف را در انتهای ۳' protospacer برش می زند. علاوه بر این، برخلاف SpCas9 که توالی هدف را بصورت انتهای صاف<sup>۴۶</sup> برش می زند، FnCpf1 توالی هدف را در ناحیه ۵' بصورت ۴ الی ۵ نوکلئوتید آویزان ایجاد می کند.

### توصیه ترویجی

توسعه سیستم آنزیم های نوکلئاز هدفمند که قابلیت ژن درمانی و انتقال توالی DNA هدف به مکان های خاص در ژنوم را داراست، توانایی ما را برای دستکاری های ژنوم بهبود بخشیده است. جهت دستیابی کامل به قابلیت های این مکانیسم های ویرایشی به بهبود برخی از محدودیت ها مانند تعیین اهداف اختصاصی، انتقال آنزیم

<sup>46</sup> Blunt Ends

- Briggs, A. W., Rios, X., Chari, R., Yang, L., Zhang, F., Mali, P., & Church, G. M. (2012). Iterative capped assembly: rapid and scalable synthesis of repeat-module DNA such as TAL effectors from individual monomers. *Nucleic acids research*, 40(15), e117-e117.
- Bultmann, S., Morbitzer, R., Schmidt, C. S., Thanisch, K., Spada, F., Elsaesser, J., ... & Leonhardt, H. (2012). Targeted transcriptional activation of silent oct4 pluripotency gene by combining designer TALEs and inhibition of epigenetic modifiers. *Nucleic acids research*, 40(12), 5368-5377.
- Cermak, T., Doyle, E. L., Christian, M., Wang, L., Zhang, Y., Schmidt, C., ... & Voytas, D. F. (2011). Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic acids research*, 39(12), e82-e82.
- Chari, R., Mali, P., Moosburner, M., & Church, G. M. (2015). Unraveling CRISPR-Cas9 genome engineering parameters via a library-on-library approach. *Nature methods*, 12(9), 823-826.
- Chen, S., Sanjana, N. E., Zheng, K., Shalem, O., Lee, K., Shi, X., ... & Sharp, P. A. (2015). Genome-wide CRISPR screen in a mouse model of tumor growth and metastasis. *Cell*, 160(6), 1246-1260.
- Cohen-Tannoudji, M., Robine, S., Choulika, A., Pinto, D., El Marjou, F., Babinet, C., ... & Jaissier, F. (1998). I-SceI-induced gene replacement at a natural locus in embryonic stem cells. *Molecular and cellular biology*, 18(3), 1444-1448.
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., ... & Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339(6121), 819-823.
- Cornu, T. I., Thibodeau-Beganny, S., Guhl, E., Alwin, S., Eichinger, M., Joung, J. K., & Cathomen, T. (2008). DNA-binding specificity is a major determinant of the activity and toxicity of zinc-finger nucleases. *Molecular Therapy*, 16(2), 352-358.
- Deng, D., Yan, C., Pan, X., Mahfouz, M., Wang, J., Zhu, J. K., ... & Yan, N. (2012). Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors. *Science*, 335(6069), 720-723.
- Deveau, H., Barrangou, R., Garneau, J. E., Labonté, J., Fremaux, C., Boyaval, P., ... & Moineau, S. (2008). Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of bacteriology*, 190(4), 1390-1400.
- Doench, J. G., Hartenian, E., Graham, D. B., Tothova, Z., Hegde, M., Smith, I., ... & Root, D. E. (2014). Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation. *Nature biotechnology*, 32(12), 1262-1267.
- Fu, Y., Sander, J. D., Reyon, D., Cascio, V. M., & Joung, J. K. (2014). Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nature biotechnology*, 32(3), 279-284.
- Garneau, J. E., Dupuis, M. È., Villion, M., Romero, D. A., Barrangou, R., Boyaval, P., ... & Moineau, S. (2010). The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 468(7320), 67-71.
- Gupta, A., Christensen, R. G., Rayla, A. L., Lakshmanan, A., Stormo, G. D., & Wolfe, S. A. (2012). An optimized two-finger archive for ZFN-mediated gene targeting. *Nature methods*, 9(6), 588-590.
- Handel, E. M., 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(1), 104-111.
- Horvath, P., Romero, D. A., Coûté-Monvoisin, A. C., Richards, M., Deveau, H., Moineau, S., ... & Barrangou, R. (2008). Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of bacteriology*, 190(4), 1401-1412.
- Hsu, P. D., Scott, D. A., Weinstein, J. A., Ran, F. A., Konermann, S., Agarwala, V., ... & Zhang, F. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature biotechnology*, 31(9), 827-832.
- Huang, P., Xiao, A., Zhou, M., Zhu, Z., Lin, S., & Zhang, B. (2011). Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs. *Nature biotechnology*, 29(8), 699-700.

- Hurt, J. A., Thibodeau, S. A., Hirsh, A. S., Pabo, C. O., & Joung, J. K. (2003). Highly specific zinc finger proteins obtained by directed domain shuffling and cell-based selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(21), 12271-12276.
- Jiang, W., Bikard, D., Cox, D., Zhang, F., & Marraffini, L. A. (2013). RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nature biotechnology*, 31(3), 233-239.
- 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, e00471.
- Kim, Y. G., Li, L., & Chandrasegaran, S. (1994). Insertion and deletion mutants of FokI restriction endonuclease. *Journal of Biological Chemistry*, 269(50), 31978-31982.
- Kita, K., Kotani, H., Sugisaki, H., & Takanami, M. (1989). The FokI Restriction-Modification System: I. Organization and nucleotide sequences of the restriction and modification genes. *Journal of Biological Chemistry*, 264(10), 5751-5756.
- Kleinstiver, B. P., Prew, M. S., Tsai, S. Q., Topkar, V. V., Nguyen, N. T., Zheng, Z., ... & Joung, J. K. (2015). Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature*, 523(7561), 481-485.
- Kumar, P., Kirti, S., Kumar, P., Sharma, V. K., & Mishra, S. (2019). RNA targeting by CRISPR/Cas-9 tool of genome. *RNA*, 8(13), 4-12
- Lin, S., Staahl, B. T., Alla, R. K., & Doudna, J. A. (2014). Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. *elife*, 3, e04766.
- Lin, Y., Cradick, T. J., Brown, M. T., Deshmukh, H., Ranjan, P., Sarode, N., ... & Bao, G. (2014). CRISPR/Cas9 systems have off-target activity with insertions or deletions between target DNA and guide RNA sequences. *Nucleic acids research*, 42(11), 7473-7485.
- Maeder, M. L., Thibodeau-Beganny, S., Osiaik, A., Wright, D. A., Anthony, R. M., Eichinger, M., ... & Joung, J. K. (2008). Rapid "open-source" engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification. *Molecular cell*, 31(2), 294-301.
- Mak, A. N. S., Bradley, P., Cernadas, R. A., Bogdanove, A. J., & Stoddard, B. L. (2012). The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target. *Science*, 335(6069), 716-719.
- Makarova, K. S., & Koonin, E. V. (2015). Annotation and classification of CRISPR-Cas systems. *CRISPR*, 47-75.
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., ... & Church, G. M. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 339(6121), 823-826.
- Martinez, J., Malireddi, R. S., Lu, Q., Cunha, L. D., Pelletier, S., Gingras, S., ... & Green, D. R. (2015). Molecular characterization of LC3-associated phagocytosis reveals distinct roles for Rubicon, NOX2 and autophagy proteins. *Nature cell biology*, 17(7), 893-906.
- Meckler, J. F., Bhakta, M. S., Kim, M. S., Ovadia, R., Habrian, C. H., Zykovich, A., ... & Baldwin, E. P. (2013). Quantitative analysis of TALE-DNA interactions suggests polarity effects. *Nucleic acids research*, 41(7), 4118-4128.
- Miller, J. C., Tan, S., Qiao, G., Barlow, K. A., Wang, J., Xia, D. F., ... & Rebar, E. J. (2011). A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nature biotechnology*, 29(2), 143-148.
- Miller, J., McLachlan, A. D., & Klug, A. (1985). Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus oocytes*. *The EMBO journal*, 4(6), 1609-1614.
- Moore, M., Choo, Y., & Klug, A. (2001). Design of polyzinc finger peptides with structured linkers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(4), 1432-1436.
- Moscou, M. J., & Bogdanove, A. J. (2009). A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, 326(5959), 1501-1501.
- Nwankwo, D., & Wilson, G. (1987). Cloning of two type II methylase genes that recognise asymmetric nucleotide sequences: Fok I and Hga I. *Molecular and General Genetics MGG*, 209(3), 570-574.

- Pavletich, N. P., & Pabo, C. O. (1991). Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science*, 252(5007), 809-817.
- Pelletier, S., Gingras, S., & Green, D. R. (2015). Mouse genome engineering via CRISPR-Cas9 for study of immune function. *Immunity*, 42(1), 18-27.
- Pruett-Miller, S. M., Connelly, J. P., Maeder, M. L., Joung, J. K., & Porteus, M. H. (2008). Comparison of zinc finger nucleases for use in gene targeting in mammalian cells. *Molecular Therapy*, 16(4), 707-717.
- Ramirez, C. L., Foley, J. E., Wright, D. A., Müller-Lerch, F., Rahman, S. H., Cornu, T. I., ... & Joung, J. K. (2008). Unexpected failure rates for modular assembly of engineered zinc fingers. *Nature methods*, 5(5), 374-375.
- Reyon, D., Tsai, S. Q., Khayter, C., Foden, J. A., Sander, J. D., & Joung, J. K. (2012). FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. *Nature biotechnology*, 30(5), 460.
- Schmid-Burgk, J. L., Schmidt, T., Kaiser, V., Höning, K., & Hornung, V. (2013). A ligation-independent cloning technique for high-throughput assembly of transcription activator-like effector genes. *Nature biotechnology*, 31(1), 76-81.
- Segal, D. J., Beerli, R. R., Blancafort, P., Dreier, B., Effertz, K., Huber, A., ... & Barbas, C. F. (2003). Evaluation of a modular strategy for the construction of novel polydactyl zinc finger DNA-binding proteins. *Biochemistry*, 42(7), 2137-2148.
- Shalem, O., Sanjana, N. E., Hartenian, E., Shi, X., Scott, D. A., Mikkelsen, T. S., ... & Zhang, F. (2014). Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science*, 343(6166), 84-87.
- Shivram, H., Cress, B. F., Knott, G. J., & Doudna, J. A. (2021). Controlling and enhancing CRISPR systems. *Nature Chemical Biology*, 17(1), 10-19.
- Smith, J., Bibikova, M., Whitby, F. G., Reddy, A. R., Chandrasegaran, S., & Carroll, D. (2000). Requirements for double-strand cleavage by chimeric restriction enzymes with zinc finger DNA-recognition domains. *Nucleic acids research*, 28(17), 3361-3369.
- Streubel, J., Blücher, C., Landgraf, A., & Boch, J. (2012). TAL effector RVD specificities and efficiencies. *Nature biotechnology*, 30(7), 593-595.
- Urnov, F. D., Rebar, E. J., Holmes, M. C., Zhang, H. S., & Gregory, P. D. (2010). Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nature Reviews Genetics*, 11(9), 636-646.
- Valton, J., Dupuy, A., Daboussi, F., Thomas, S., Maréchal, A., Macmaster, R., ... & Duchateau, P. (2012). Overcoming transcription activator-like effector (TALE) DNA binding domain sensitivity to cytosine methylation. *Journal of Biological Chemistry*, 287(46), 38427-38432.
- Westra, E. R., Swarts, D. C., Staals, R. H., Jore, M. M., Brouns, S. J., & van der Oost, J. (2012). The CRISPRs, they are a-changin': how prokaryotes generate adaptive immunity. *Annual review of genetics*, 46, 311-339.
- Xu, H., Xiao, T., Chen, C. H., Li, W., Meyer, C. A., Wu, Q., ... & Liu, X. S. (2015). Sequence determinants of improved CRISPR sgRNA design. *Genome research*, 25(8), 1147-1157.
- Xue, C., & Greene, E. C. (2021). DNA Repair Pathway Choices in CRISPR-Cas9-Mediated Genome Editing. *Trends in Genetics*.
- Zetsche, B., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Slaymaker, I. M., Makarova, K. S., Essletzbichler, P., & Zhang, F. (2015). Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*, 163(3), 759-771.