



نشریه آموزشی - پژوهشی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور

فصلنامه تحقیقات کاربردی در علوم دامی

شماره ۴۲، بهار ۱۴۰۱

صص: ۱۶-۳

بررسی انواع روش‌های ویرایش ژنوم با استفاده از آنزیم‌های نوکلئاز هدفمند

• حامد اسدالهی (نویسنده مسئول)

گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران.

• حسین عمرانی

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

تاریخ دریافت: آبان ۱۴۰۰ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۴۰۰

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۲۲۴۴۹۳۳۷

Email: hamed_asadolahi@yahoo.com

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ AASRJ.2021.354971.1240

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 عوامل بیماری‌زا 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 42 pp: 3-16

Investigation of various genome editing methods using targeted nuclease enzymesBy: H. Asadollahi¹, H. Emrani¹¹Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran²Animal Science Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran**Received: November 2021****Accepted: February 2022**

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 developments 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**

DNA دورشته‌ای سبب شد که محققان به بررسی تاثیر قرار دادن داوطلبانه یک DNA دورشته‌ای در یک جایگاه اختصاصی در یک ژنوم خاص در افزایش یا عدم افزایش همسان‌های نوترکیب در همان جایگاه یا جایگاه‌های نزدیک آن پردازند. برای این منظور گروه‌های مختلفی از محققین از استراتژی دو مرحله‌ای استفاده کردند. در این استراتژی در مرحله اول، یک جایگاه برشی مگانوکلاز^۴ (گروهی از اندوریبونوکلازها هستند که به توالی‌های ۱۲ الی ۱۳ جفت بازی DND دورشته‌ای متصل شده و آن‌ها را برش می‌زنند) توسط همسان‌های نوترکیب با فراوانی اندک درج شده و در مرحله بعد یک DNA دورشته‌ای بوسیله بیان یک مگانوکلاز همجنس ایجاد می‌گردد. آن‌ها دریافتند که درج داوطلبانه DNA دورشته‌ای در هر جایگاه خاص، سبب افزایش چندین برابر میزان همسان‌های نوترکیب جایگزینی ژن می‌شود (Cohen-Tannoudji, et al., 1998). با این وجود، استراتژی دو مرحله‌ای که در این مطالعات استفاده شده بود، امکان برنامه‌ریزی مجدد نوکلئاز را نداشت و به‌طور قابل توجهی

فناوری‌های دستکاری ژنوم طی چند سال گذشته به طرز چشم‌گیری پیشرفت داشته است. طی چندین دهه، محققان به‌منظور شناسایی یا اصلاح تغییرات DNA در جایگاه‌های ژنومی خاص، بر توالی‌های همسان نوترکیب (HR)^۱ متکی بودند. اگرچه توالی‌های همسان نوترکیب راهکار ارزشمندی را در شناسایی عملکرد ژن و مکانیزم‌های بیماری پدید آورده است، ولی مشکلات موجود در شناسایی هدفمند توالی ژنومی بسیاری از ارگانیزم‌ها و در نتیجه نیاز به سازه‌های پیچیده DNA^۲، استفاده گسترده آن را به عنوان یک استراتژی ویرایش ژن محدود کرده است. مطالعات اولیه در مورد همسان‌های نوترکیب در سلول‌های یوکاریوتی نشان داد که پایانه‌های DNA دو رشته‌ای، که حاصل از قطعات DNA دو رشته‌ای اند (DSBs)^۳، قابلیت نوترکیبی بسیار زیادی دارند (Xue and Greene., 2021; Bollag, et al., 1989). ویژگی پایانه‌های

¹ Homologous Recombination (HR)² DNA Constructs³ DNA Double-Strand Breaks (DSBs)⁴ Meganucleases⁵ Zince-Finger Nucleases (ZFNs)

کاس ۹ (CRISPR-Cas9)^۸ (خوشه های منظم بین پالیندروم های تکراری کوتاه)، در باکتری استرپتوکوکوس پایوژنز^۹ که برای مهندسی ژنومی سازگار شده است، می تواند جرقه انقلاب عظیمی در ویرایش ژنوم پدید آورد. سیستم CRISPR-Cas9 جهت انجام ویرایش ژنومی دارای یک مولکول RNA کوچک تک رشته ای به نام "RNA راهنما" (sgRNA)^{۱۰} و یک آنزیم اندونوکلئاز غیراختصاصی به نام Cas9 می باشد (Jinek, et al., 2012). RNA کوچک تک رشته ای با Cas9 یک کمپلکس تشکیل داده و اتصال بازهای RNA راهنما به توالی ژنوم هدف طبق مدل واتسون و کریک انجام می پذیرد. مکانیسم سیستم کریسپر در مقایسه با ZFN ها و TALEN ها، که نیازمند به برنامه ریزی مجدد کامل آنزیم ها هستند، تنها با یک تغییر ساده در RNA راهنما باعث می شود تا با برنامه ریزی مجدد Cas9 به هر نوع توالی هدف متصل گردد (Kumar, et al., 2019; Jinek, et al., 2013). کارایی زیاد، قابلیت چندگانه و سادگی برنامه ریزی مجدد سیستم CRISPR-Cas9، این تکنولوژی را به خط اول ویرایش ژنومی تبدیل کرده است. همچنین در مطالعه ای که به تازگی صورت گرفته است، یک سیستم طبقه بندی جدید کلاس ۲ کریسپر شناسایی شد. در سیستم Francisella novicida U112 به دلیل داشتن برخی ویژگی ها، تا حدودی از سیستم CRISPR-Cas9 متمایز بوده و می تواند به عنوان یک سیستم ویرایش ژنومی مورد استفاده قرار گیرد (Zetsche, et al., 2015).

آنزیم های نوکلئاز انگشت روی (ZFNs)

ZFN ها اندونوکلئازهای مصنوعی هستند که از ترکیب انواع فاکتورهای نسخه برداری (TFs)^{۱۱} متصل شونده به DNA شامل پروتئین های انگشت روی (ZFPs) و دامین کاتالیزوری Fok1 حاصل شده اند (شکل ۱). در مقایسه با سایر اندونوکلئازهای معمول نوع II که DNA را داخل یا نزدیک به مکان های اتصال آن ها برش می دهند، Fok1 یک نوع اندونوکلئاز نوع IIS است که DNA را دقیقاً از محل اتصال به سایت برشی آن جدا می کند (Nwankwo and Wilson., 1987). در Fok1، دامین متصل شونده به DNA و دامین دارای خاصیت نوکلئازی را می توان به صورت فیزیکی از هم

استفاده از این استراتژی را برای ویرایش ژنوم محدود می کرد. به دنبال یک روش انعطاف پذیرتر جهت درج قطعات DNA دورشته ای به درون ژنوم، گروه کارول استفاده از یک کلاس جدید از آنزیم های اندونوکلئازی مصنوعی به نام آنزیم های نوکلئاز انگشت روی (ZFNs)^۵ را مورد بررسی قرار دادند (Bibikova, et al., 2001). این نوکلئازها به صورت دایمر به DNA های یوکاریوتی متصل می شوند. پروتئین های انگشت روی (ZFPs)^۶ سبب هدایت فعالیت کاتالیزوری آنزیم های Fok1 (یک نوع اندونوکلئاز نوع IIS) به درون ژنوم می شوند (Bogdanove, et al., 2018; Nwankwo and Wilson., 1987). برخلاف مکانوکلئازها که توالی های از پیش تعریف شده DNA را تشخیص می دهند آنزیم های نوکلئاز انگشت روی (ZFPs) می توانند با تغییر پروتئین های انگشت روی (ZFPs) برای هدف قرار دادن هر مکان خاص درون ژنوم، مجدداً برنامه ریزی شوند. علاوه بر این، استفاده از ZFN ها می تواند جایگزینی جایگاه اختصاصی ژن بوسیله همولوگ های نوترکب را چندین برابر بهبود بخشد (Bibikova, et al., 2001; Nwankwo and Wilson., 1987). با این حال، پیچیدگی های موجود 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، اندونوکلئازهای شبه فعال مؤثر در رونویسی (TALENs)^۷ که حاصل از امتزاج پروتئین های متصل شونده به DNA و دامین کاتالیزوری Fok1 می باشند، در پروسه ویرایش ژنومی بکار گرفته شدند (Kita, et al., 1989). این آنزیم ها نیز به عنوان دایمر عمل می کنند 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، همسانی توالی بین تکرارها و قابل پیش بینی بودن کدهای TALE، برنامه ریزی مجدد این اندونوکلئازها را امکان پذیر می سازد. علاوه بر این، Jinek و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان دادند سیستم کریسپر

⁸ Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR) - CRISPR- associated 9 (Cas9)

⁹ Streptococcus pyogenes

¹⁰ Single guide RNA (sgRNA)

¹¹ Transcription Factors (TFs)

⁶ Zinc-Finger Proteins (ZFPs)

⁷ Transcription Dctivator-Like Effector endonucleases (TALENs)

ماژول‌ها^{۱۵} و روش‌های انتخاب ترکیبی^{۱۶} جهت مهندسی نمودن ZFP‌های خاص طراحی شده‌اند. روش‌های مونتاژ ماژول‌ها، براساس کارکرد مستقل هر انگشت با بخش‌های ۳ جفت بازی 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، ZFN‌ها 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 ZFP‌هایی با قابلیت اتصال و تخصصی بودن بالا به توالی DNA می‌باشد (Hurt, et al., 2003). اگرچه این استراتژی‌ها ZFN‌هایی با فعالیت بالا و سمیت کم را مشخص می‌کند، اما به آزمایشگاه‌های بسیار تخصصی نیاز دارد (Cornu, et al., 2008).

اندونوکلازهای شبه فعال مؤثر در رونویسی (TALENs)

همانند ZFN‌ها، TALEN‌ها اندونوکلازهای مصنوعی هستند که از دامین اتصال‌دهنده TALE به عنوان واحدهای متصل‌شونده به DNA و از اندونوکلاز Fok1 به عنوان زیر واحدهای کاتالیزوری استفاده می‌کنند. همانطور که قبلاً ذکر شد، Fok1 به عنوان یک دایمر عمل می‌کند و باید دو زیر واحد TALE-Fok1 در هر جایگاه در کنار یکدیگر قرار گیرند تا فرآیند برش DNA صورت پذیرد. این فرآیند بواسطه دامین‌های TALE متصل‌شونده به DNA انجام می‌شود (Bogdanove, et al., 2018). این دامین‌ها دو توالی مجاور و معکوس DNA که توسط توالی‌های ۱۲ الی ۲۰ جفت‌بازی جدا شده‌اند را برای دایمیرزاسیون اندونوکلاز Fok1 طراحی می‌کنند (Miller, et al., 2011). TALEN‌ها، فاکتورهای نسخه‌برداری هستند که توسط باکتری‌های گیاهی گرم

جدا نمود (Kim, et al., 1994)، که این ویژگی اجازه تلقیق دامین کاتالیزوری Fok1 را با سایر دامین‌های متصل‌شونده به DNA مانند ZFP‌ها یا TALE‌ها می‌دهد. Fok1 برای اعمال فعالیت کاتالیزوری نیازمند دو بخشی شدن یا دایمیرزاسیون^{۱۲} 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 ZFP‌ها، TALE‌ها 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 ZFN‌ها، توالی هدف توسط دامین‌های ZFP شناسایی می‌شوند. ZFP‌ها دامین‌های متصل‌شونده به DNA هستند (Bogdanove, et al., 2018) که ابتدا در فاکتورهای مربوط به نسخه‌برداری یوکاریوتی شناسایی شدند (Miller, et al., 1985). ZFP‌ها شامل آرایه‌های پشت سر هم انگشت‌های Cys2-His2^{۱۳} بوده که هر حلقه دارای یک یون روی (II)^{۱۴} جهت تشکیل دامین متصل‌شونده به DNA می‌باشد. ZFP‌ها به درون شیار بزرگ DNA دورشته‌ای مارپیچ 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، ZFN‌ها با سه تا شش انگشت برای شناسایی DNA دورشته‌ای مورد استفاده 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 ZFN‌ها بین ۱۸ تا ۳۶ نوکلئوتید را در بر می‌گیرد. آرایه‌های پشت سرهم تکراری از انگشت‌ها از انتهای^{۱۳} به انتهای^{۱۴} به DNA متصل می‌شوند (شکل ۱) (Pavletich and Pabo., 1991). جهت انجام دایمیرزاسیون زیر واحدهای کاتالیزوری Fok1، توالی‌های مقابل DNA که توسط جفت ZFN‌ها شناسایی شده‌اند، باید بوسیله یک فاصله‌دهنده ۵ تا ۶ جفت‌بازی جدا شوند (Handel, et al., 2001; Bibikova et al., 2009).

¹⁵ Modular Assembly Methods

¹⁶ Combinatorial Selection Methods

¹² Dimerization

¹³ Cys2-His2 Fingers

¹⁴ Zinc (II) Ion

اما به نظر می‌رسد همه آن‌ها ویژگی‌های مشابهی داشته باشند. یکی از ویژگی‌های مهم، حضور دو تکرار کوچک است که از لحاظ ساختاری مشابه اما از لحاظ توالی با تکرارهای TALE متمایز می‌باشد. این تکرارها تیمیدین را در موقعیت شروع توالی DNA هدف TALE شناسایی می‌کنند و به عبارت دیگر، هر توالی هدف TALE 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 هدف‌گیری شده و تمایز ویژه‌ای را برای TALE جهت انجام ویرایش ژنومی پدید می‌آورد. همانطور که در ZFN ها دیده می‌شود، فعالیت برش DNA توسط TALE ها به ویژه از طریق متیلاسیون^{۲۱} سیتوزین در شرایط طبیعی، تحت تأثیر شرایط اپی‌ژنتیکی قرار می‌گیرد (Bultmann, et al., 2012). برای غلبه بر این محدودیت‌ها استراتژی‌هایی در نظر گرفته شده است. از جمله این استراتژی‌ها، مهار شیمیایی متیل ترانسفرازهای DNA^{۲۲} یا استفاده از TALE های 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 کلونینگ‌های مختلف از تکرارهای TALE به دلیل شباهت توالی آن‌ها چالش برانگیز است. برای فائق آمدن بر این محدودیت، تلفیق چندین استراتژی مانند کلونینگ فاز جامد^{۲۳}، اتصال مستقل^{۲۴} و اتصال وابسته^{۲۵} 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 هدایت کننده RNA^{۲۶} (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

منفی Xanthomonas در زمان حمله به میزبان ترشح می‌شوند. این فاکتورهای نسخه‌برداری، برای پشتیبانی از بیماری‌زایی، تکثیر و انتشار باکتریایی به میزبان متصل شده و بیان ژن را تنظیم می‌کنند. TALEN ها شامل یک دامین N-terminal حاوی یک سیگنال از یک ناحیه مرکزی حاوی توالی‌های تکراری^{۱۷} مسئول اتصال TALE های متصل‌شونده به توالی DNA و یک دامین C-terminal حاوی سیگنال‌های تعیین محل هسته‌ای^{۱۸} و دامین فعال‌سازی نسخه‌برداری^{۱۹} می‌باشند (Boch and Bonas., 2010). ترکیب اندونوکلئاز FokI با بخش تغییر یافته پایانه C از ناحیه N-terminal 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 می‌کند، هر تکرار TALE که از ۳۳ تا ۳۵ آمینواسید تشکیل شده است، فقط یک جفت باز از ژنوم هدف را شناسایی خواهد کرد (Moscou and Bogdanove., 2009; Boch, et al., 2009). تکرارهای TALE از نظر توالی بسیار شبیه به یکدیگرند و در هر تکرار یک جفت اسید آمینه مجاور، قرار گرفته است (Mak, et al., 2012; Deng, et al., 2012). این اسید آمینه‌ها به تکرارهای تغییر پذیر آزاد دوتایی (RVD)^{۲۰} نامگذاری شده و کد تکراری TALE را مشخص می‌کنند. معمولاً چهار بخش پر تکرار مانند NI، HD، NN و NG مورد استفاده قرار می‌گیرند و به ترتیب آدنین (A)، سیتوزین (C)، گوانین (G) و تیمیدین (T) را شناسایی می‌کنند (Meckler, et al., 2013). همچنین تکرارهای تغییر پذیر دوتایی دیگر با قابلیت تخصصی بودن بیشتر نیز گزارش شده‌اند (Streubel, et al., 2009; Moscou and Bogdanove., 2009; Huang, et al., 2011; al., 2012). فعالیت‌های آرایه‌های حاوی برخی از RVD های جایگزین، کم گزارش شده است (Huang, et al., 2011). برخلاف ZFN ها که نیازی به بخش‌های پروتئینی اضافی برای فعالیت ندارند، TALEN ها علاوه بر تکرار TALE، به برخی از توالی‌های پروتئینی در انتهای هر تکرار نیاز دارند. اگر چه حالت‌های مختلفی برای توسعه TALEN ها به عنوان یک ابزار ویرایش ژنومی استفاده شده است،

²¹ Methylation
²² DNA methyltransferases
²³ Solid-phase Cloning
²⁴ Ligation-independent
²⁵ Ligation-dependent
²⁶ RNA-Guided Nucleases

¹⁷ Tandem Repeats
¹⁸ Nuclear Localization Signals
¹⁹ Transcriptional Activation Domain
²⁰ Repeat Variable Di-residue (RVD)

معمولاً ۲۰ الی ۵۰ نوکلئوتید طول دارند، در ژنوم باکتری‌ها و آرکی باکتری‌ها در میان عناصر فاصله‌دهنده^{۲۷} 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 DNA های مهاجم آلوده شدند، با استفاده از RNA های کوچک تولید شده از این خوشه‌ها توسط یک اندونوکلاز به نام Cas سبب هضم ژنوم فاژ مهاجم می‌شوند. از میان چندین سیستم کریسپر مختلف شناخته شده در باکتری‌ها و آرکی باکتری‌ها، سیستم نوع II^{۲۸} 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^{۲۹} است. این رونوشت RNA حاوی یک فاصله‌دهنده و یک توالی تکراری می‌باشد. بخش دوم، یک رونوشت RNA گذشته به نام TracrRNA^{۳۰} 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^{۳۱} 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^{۳۲} 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)^{۳۳} می‌باشند. PAM که توالی کوتاه DNA است در پایین دست ناحیه protospacer واقع شده است (Jinek, et al., 2012; 2008; 2008).

مثال، آنزیم اندونوکلاز در باکتری استرپتوکوکوس پایورنز SPCas9^{۳۴} 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 PAM برای چندین نوع از سیستم CRISPR-Cas شرح داده شده است که برخی از آن‌ها برای ویرایش‌های ژنومی سازگار شده‌اند (جدول ۱) (Deveau, et al., 2010; Deveau, et al., 2008).

²⁷ Spacer Elements

²⁸ Type II CRISPR-Cas System

²⁹ CRISPR RNA

³⁰ Trans-activating crRNA (TracrRNA)

³¹ RuvC-like Nuclease Domain

³² Protospacer Elements

³³ Protospacer-Adjacent Motif (PAM)

³⁴ S.pyogenes Cas9 (SpCas9)

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)	NNNGATT	<i>Neisseria meningitidis</i>
(Fonfara, et al., 2014)	NNNNACA	<i>Campylobacter jejuni</i>

وسعی از توالی‌ها را برای ویرایش ژنوم مورد استفاده قرار دهد (Kleinstiver, et al., 2015). در مجموع، می‌توان گفت که اندونوکلاز Cas9 گونه‌های مختلف، قادرند تمام نوکلئوتیدهای ژنوم را تحت پوشش قرار دهند. در رایج‌ترین سیستم CRISPR-

علاوه بر این، با استفاده از اطلاعات ساختاری و طراحی ترکیبی، در آنزیم اندونوکلاز SpCas (آنزیم اندونوکلاز در باکتری استریتوکوکوس پایوژنز) تغییراتی ایجاد شد تا توانایی شناسایی توالی‌های جایگزین PAM را دارا باشد و به طور قابل توجهی طیف

می باشد. بنابراین، انتخاب sgRNA نقش مهمی در پاکسازی جهش‌ها^{۳۶} دارد. مطالعات متعدد نشان داده است که اندونوکلئاز SpCas9 می‌تواند سبب تحمل به Mismatche ها^{۳۷} (عدم اتصال دقیق نوکلئوتیدی)، برآمدگی RNA^{۳۸} (یک نوکلئوتید جفت نشده در یک رشته) و برآمدگی DNA بین توالی راهنمای crRNA و توالی هدف شود (Hsu, et al., 2013; Jinek, et al., 2012; Lin, et al., Cong, et al., 2013; Mali, et al., 2013; 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 DNA دورشته‌ای را تحت تأثیر قرار دهد (Chari, et al., 2014; Xu, et al., 2015; et al., 2015; Doench,

چندین وب‌سایت با قابلیت دسترسی آزاد جهت کمک به انتخاب sgRNA ها توسعه داده شده‌اند. Pelletier و همکاران در سال ۲۰۱۵ در طی اجرای پروژه استفاده از فناوری CRISPR-Cas9، روش انتخابی توالی sgRNA را برای مهندسی نمودن ژنوم موش توسعه دادند (Pelletier, et al., 2015). اگرچه این روش ممکن است نسبت به سایر روش‌های انتخاب توالی sgRNA ها مشکل‌تر باشد، اما فهرست جامعی از تمام sgRNA ها به همراه جایگاه‌های غیر هدف درون ژنوم خود فراهم می‌آورد. استراتژی بکار گرفته شده توسط این گروه که با توجه به نتایج مشاهدات چندین گروه تحقیقاتی در مورد تعریف sgRNA انتخابی انجام پذیرفته است، نشان می‌دهد که اندونوکلئاز SpCas9 می‌تواند چندین Mismatche (تا ۸ نوکلئوتید) را در ناحیه پایانه ۵' sgRNA

Cas9 برای ویرایش ژنومی از باکتری استرپتوکوکوس پایورنز استفاده شده است. سیستم سه جزئی با اتصال crRNA و tracrRNA به sgRNA تشکیل می‌شود (Jinek, et al., 2012). تغییرات ساده توالی راهنما درون مولکول sgRNA جهت مستعد ساختن اندونوکلئاز SpCas9 برای هدف قرار دادن هر بخش از ژنوم کافیت.

سیستم CRISPR-Cas9 مزایای متعددی نسبت به سیستم ZFN و TALEN 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 sgRNA جدید می‌باشد. ثانیاً، سادگی این سیستم فرصتی را برای کاربرد گسترده و چندانگانه 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 (Hsu, et al., 2013; Chari, et al., 2015). در نهایت اینکه، تفاوت اصلی مکانیسم CRISPR-Cas9 نسبت به ZFN و TALEN در این است که اندونوکلئاز SpCas9 توالی DNA را به‌صورت 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)^{۳۵}، 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 نوترکیب می‌باشد (Xue and Greene., 2021). شناسایی دقیق توالی هدف، جهت استفاده به عنوان ابزار ویرایش ژنومی بسیار حائز اهمیت

³⁶ Tailoring Mutations

³⁷ Tolerate Mismatches

³⁸ RNA Bubbles

³⁵ Non Homologous End-Joining (NHEJ)

ویرایش ژنومی ZFN، TALEN 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 می‌دهند. این یافته نشان می‌دهد 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.

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^{۳۹} (اطلاعات دیجیتال توالی نوکلئیک اسید که توسط دانشمندان جمع‌آوری شده است) و توالی ژنوم غیر رفرنس مهره داران^{۴۰} مانند دیابت مستقل از چاقی^{۴۱} و ویروس لوسمی فرند (FLV)^{۴۲} سویه B موش را فراهم می‌کند. همچنین این روش توانایی طراحی sgRNA های بسیار انتخابی در موش با فعالیت‌های کوچک و یا غیر هدف را داراست (Martinez, et al., Pelletier, et al., 2015; Zetsche, et al., 2015). به‌تازگی نوع دیگری از سیستم کلاس ۲ کریسپر برای مبحث ویرایش ژنوم سازگار شده است (Francisella (Fn) در باکتری novicida دارای یک پروتئین بزرگ به نام CRISPR از باکتری Prevotella and Francisella 1 (Cpf1) و یک crRNA کوچک می‌باشد. برخلاف سیستم‌های کریسپر نوع II، سیستم CRISPR-Cpf1 برای تشکیل شدن به tracrRNA نیاز ندارد. پایانه ۵' crRNA حاوی یک ناحیه فاصله‌دهنده بسیار محافظت شده است که برای یک فرم ساقه-حلقه کوتاه^{۴۳} در نظر گرفته شده است. تغییر در توالی یا ساقه-حلقه باعث اختلال در عملکرد برشی CRISPR-Fn Cpf1 خواهد شد. کمپلکس CrRNA-Cpf1 سبب برش‌هایی می‌شود 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 می‌شود. سیستم ویرایش CRISPR-Fn Cpf1 همانند سیستم ویرایش-CRISPR Cas9، نیازمند یک فاصله‌دهنده ۱۸ نوکلئوتیدی است و می‌تواند Mismatche های تک‌نوکلئوتیدی را بین توالی راهنما و توالی DNA هدف تحمل کند. علاوه بر Fn Cpf1، چندین سیستم ویرایش CRISPR-Cpf1 دیگر نیز با تفاوت‌هایی در توالی PAM در باکتری‌ها شناسایی شده‌اند (جدول ۲). با این حال، برخلاف سیستم ویرایش ژنومی CRISPR-Cas9، سیستم‌های

³⁹ Reference Genome

⁴⁰ Nonreference Vertebrate Genomes

⁴¹ Non-Obese Diabetic

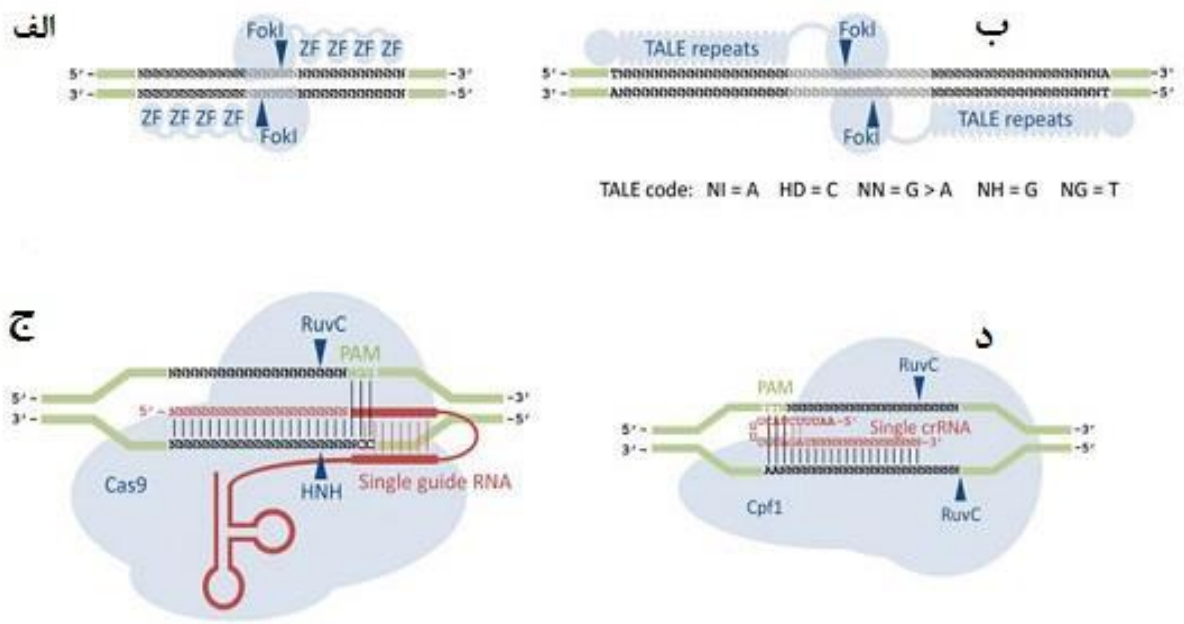
⁴² Friend Leukemia Virus (FLV)

⁴³ Short Hairpin Loop

⁴⁴ 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

FokI مضاعف TALEN در ناحیه C-terminal و دایمریزاسیون 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 به ترتیب آدنین (A)، سیتوزین (C)، گوانین (G) و تیمیدین (T) را شناسایی می‌کنند، مورد استفاده قرار می‌گیرند. علاوه بر تکرارهای TALE، جهت شناسایی توالی هدف DNA توالی

الف) 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 سه تایی 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 می‌باشد که توسط یک بخش ۱۲ الی ۲۰ نوکلئوتیدی جهت قرار دادن توالی

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.
- 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.
- های پروتئین دیگری نیز نیاز است. ج) طرح CRISPR-Cas9: Cas9 یک اندونوکلاز 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 کوچک لینکر تشکیل شده است. کمپلکس اندونوکلاز 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 crRNA 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، بر خلاف SpCas9 که توالی هدف را بصورت انتهای صاف ۴' 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 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.

- 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., ... & Jaisser, 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., Eichtinger, 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.
- 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.