



نشریه آموزشی - پژوهشی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور

فصلنامه تحقیقات کاربردی در علوم دامی

شماره ۴۱، زمستان ۱۴۰۰
صص: ۱۳-۲۸

مروری بر روش‌های ویرایش ژنوم

• حامد اسدالهی^{۱*}، حسین عمرانی^۲

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: خرداد ۱۴۰۰ تاریخ پذیرش: مهر ۱۴۰۰

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۲۲۴۴۹۳۳۷

Email: hamed_asadolahi@yahoo.com

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ aasrj.2021.354669.1236

چکیده:

با ظهور روش‌های ویرایش ژن، از جمله تکنولوژی‌های ZFN، TALEN و CRISPR-Cas9، اکنون ژنوم گونه‌های مختلف به راحتی قابل ویرایش هستند. از این روش‌ها در غیرفعال‌سازی ژن‌های خاص در گونه‌های مختلف حیوان جهت بهبود صفات تولیدی و افزایش محصول، بهبود بیماری‌های مختلف انسانی، کاهش انتقال بیماری‌های مشترک انسان و حیوان، غیرفعال کردن ژن‌های درگیر در بیماری‌های مختلف، مقاومت به پاتوژن و در نهایت اصلاح و درمان اختلالات ژنتیکی استفاده می‌شود. جهت دستیابی به قابلیت‌های این مکانیسم‌های ویرایشی به بهبود برخی از محدودیت‌ها مانند تعیین هدف اختصاصی، انتقال آنزیم نوکلئاز هدفمند، توالی DNA دهنده و همچنین مکانیسم‌های ترمیم DNA نیاز است. در واقع کیفیت انتقال، شناسایی اهداف اختصاصی، درک بهتر از مکانیسم‌های ویرایش DNA و شناسایی راه‌هایی برای ارتقاء مکانیسم ترمیم نوترکیبی همسان، تمرکز اصلی در سیستم‌های ویرایش ژنومی است. این پیشرفت‌ها فرصت‌های بی‌شماری را فراهم آورده است که به درک ما از عملکردهای پیچیده ژن و مکانیزم‌های بیماری، شناسایی جهش‌های مختلف بیماری‌زا و اصلاح محصولات کشاورزی و دامی کمک می‌کند.

واژه‌های کلیدی: ویرایش ژنوم، ZFN، TALEN، CRISPR-Cas9

Applied Animal Science Research Journal No 41 pp: 13-28

An overview of genome editing methodsBy: Asadollahi, Hamed^{*1}, Emrani, Hossein²

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: June 2021**Accepted: October 2021**

With the advent of gene editing methods, including ZFN, TALEN and CRISPR-Cas9 technologies, the genomes of different species can be easily edited. Of these methods, are used in inactivation of specific genes in livestock to improve animal production traits and increase productivity, Improving 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. To achieve the capabilities of these editing mechanisms, some limitations need to be improved, such as specific targeting, targeted nuclease enzyme transfer, donor DNA sequencing, and DNA repair mechanisms. In fact, transmission quality, identification of specific targets, better understanding of DNA editing mechanisms, and identification of ways to enhance the mechanism of matched recombination repair are the main focus of genomic editing systems. These advances have provided countless opportunities to help us understand the complex functions of genes and disease mechanisms, identify different pathogenic mutations, and modify agricultural and livestock products.

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

استفاده از آنزیم‌های نوکلئاز هدفمند^۳ از جمله ZFN، TALEN و CRISPR-Cas9 به مرور مورد استفاده قرار گرفت.

ZFN

به دنبال یک روش انعطاف‌پذیر جهت قرار گرفتن قطعات DNA دورشته‌ای به درون ژنوم، از یک گروه از آنزیم‌های اندونوکلئازی مصنوعی به نام آنزیم‌های ZFN^۴ استفاده شده است (Bibikova, et al., 2001). استفاده از ZFN ها می‌تواند جایگزینی جایگاه اختصاصی ژن بوسیله همولوگ‌های نوترکیب را چندین برابر بهبود بخشد (Xue and Greene., 2021; Bibikova, et al., 2001). ZFN ها اندونوکلئازهای مصنوعی هستند که از ترکیب انواع فاکتورهای نسخه‌برداری (TF)^۵ متصل‌شونده به DNA شامل پروتئین‌های انگشت روی (ZFP) و دامین کاتالیزوری FokI حاصل شده‌اند. در FokI، دامین متصل‌شونده به DNA و دامین دارای خاصیت نوکلئازی را

طی چندین دهه گذشته، محققان به منظور شناسایی یا اصلاح تغییرات DNA در جایگاه‌های ژنومی خاص، بر توالی‌های همسان نوترکیب (HR)^۱ متکی بودند. اگرچه همولوگ‌های نوترکیب رویکرد ارزشمندی را در شناسایی عملکرد ژن و مکانیزم‌های بیماری پدید آورده است، ولی فراوانی اندک در شناسایی هدفمند توالی ژنومی بسیاری از ارگانیسم‌ها و در نتیجه نیاز به سازه‌های پیچیده DNA، 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)^۲، قابلیت نوترکیبی بالایی دارند (Xue and Greene., 2021; Bollag, et al., 1989). از این رو جهت درج قطعات DNA دو رشته‌ای به درون ژنوم، تکنولوژی‌های

³ Targeted nuclease enzymes⁴ Zinc finger nucleases⁵ Transcription Factors¹ Homologous Recombination² DNA Double-Strand Breaks

اندونوکلئاز Fok1 به عنوان زیرواحدهای کاتالیزوری استفاده می‌کنند. 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 متصل شونده به DNA انجام می‌شود. این دامین‌ها دو توالی مجاور و معکوس DNA که توسط توالی‌های ۱۲ الی ۲۰ جفت‌بازی جدا شده‌اند را برای دایمریزاسیون اندونوکلئاز Fok1 طراحی می‌کنند (Miller, 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، 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 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 هدف‌گیری شده و تمایز ویژه‌ای را برای TALEN جهت انجام ویرایش ژنومی پدید می‌آورد. همانطور که در ZFN ها دیده می‌شود، فعالیت برش DNA توسط TALEN ها به‌ویژه از طریق متیلاسیون^۹ 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^{۱۰} 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

می‌توان به‌صورت فیزیکی از هم جدا نمود (Kim, et al., 1994)، که این ویژگی اجازه تلقیق دامین کاتالیزوری Fok1 را با سایر دامین‌های متصل شونده به DNA مانند ZFP ها می‌دهد. در ZFN ها، توالی هدف توسط دامین‌های ZFP شناسایی می‌شوند. ZFP ها دامین‌های متصل شونده به DNA هستند که ابتدا در فاکتورهای مربوط به نسخه‌برداری یوکاریوتی شناسایی شدند (Miller, et al., 1985). ZFP ها شامل آرایه‌های پشت سر هم انگشت‌های Cys2-His2^۶ بوده که هر حلقه دارای یک یون روی (II)^۷ جهت تشکیل دامین متصل شونده به DNA می‌باشد. ZFP ها به درون شیار بزرگ DNA دورشته‌ای ماریچج آلفا متصل شده و هر انگشت تقریباً ۳ جفت‌باز 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 قرار می‌گیرند. هر آرایه از سه تا شش انگشت تشکیل شده است که ۹ تا ۱۸ جفت‌باز 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 ۳^۱ به انتهای ۵^۱ به DNA متصل می‌شوند (Pavletich and Pabo., 1991). با این حال، پیچیدگی‌های موجود در طبیعت تا حد زیادی مانع از پذیرش گسترده بکارگیری ZFN ها توسط جامعه علمی شده است (Urnov, et al., 2010).

TALEN

یک دهه پس از اینکه ZFN ها به عنوان ابزارهای ویرایش ژنوم بکار گرفته شدند، TALEN ها^۸ نیز در پروسه ویرایش ژنوم 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). همانند ZFN ها، TALEN ها اندونوکلئازهای مصنوعی هستند که از دامین اتصال‌دهنده TALE به عنوان واحدهای متصل شونده به DNA و از

^۶ Cys2-His2 Fingers

^۷ Zinc (II) Ion

^۸ Transcription Dctivator-Like Effector endonucleases

^۹ Methylation

^{۱۰} DNA methyltransferases

از آنزیم‌های نوکلئاز هدفمند در سلول‌های موجودات مختلف از جمله پستانداران، غیر پستانداران و ارگانسیم‌های مدل موجود در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی زیست پزشکی استفاده می‌شود (Meng, et al., 2008; Young, et al., 2011; Nakayama, et al., 2013; Wefers, et al., 2013; Li, et al., 2013; Honda, et al., 2014; Chen, et al., 2015; Niu, et al., 2014). همچنین در مدل‌های آزمایشگاهی، این آنزیم‌ها در جهت تعیین عملکرد ژن و مطالعه رابطه ساختار و عملکرد بیماری‌های انسانی و اصلاح محصولات کشاورزی و دامی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Nødvig, et al., 2015; Arazoe, et al., 2015; Lillico, et al., 2013). به عنوان مثال در گیاهان، از آنزیم‌های هدفمند نوکلئاز جهت انتقال صفات مهم مانند صفت مقاومت به بیماری و صفت مقاومت به علف‌کش استفاده شده است (Shukla, et al., 2012; Li, et al., 2009). از غیرفعال‌سازی ژن در دام جهت بهبود صفات تولیدی حیوان و همچنین استفاده از مدل‌های حیوانی جهت مطالعه بیماری‌های انسانی استفاده می‌شود (Estrada, et al., 2015; Xin, et al., 2013; Prather, et al., 2013). علاوه بر این، غیرفعال‌سازی یا انتقال ژن می‌تواند سبب مقاومت به پاتوژن، افزایش محصول و کاهش انتقال بیماری‌های مشترک انسان و حیوان گردد (Wu, et al., 2015; Proudfoot, et al., 2015; Liu, et al., 2014; Crispo, et al., 2015). آنزیم‌های هدفمند نوکلئاز همچنین برای برنامه‌های کاربردی بالینی در انسان نیز افق جدیدی حاصل نموده است. این آنزیم‌ها قادرند جهت اصلاح و درمان بیماری‌های تک‌ژنی بکار گرفته شوند. همین‌طور از قابلیت چندگانه سیستم ویرایش ژنوم می‌توان برای اصلاح و درمان اختلالات پیچیده ژنتیکی استفاده نمود (Cong, et al., 2013; Mali, et al., 2013). از کاربردهای دیگر نوکلئازهای هدفمند می‌توان به جلوگیری از افزایش کلاسترول^{۱۷} (Long, et al., 2014) و غیر فعال کردن ژن‌های دارای ویژگی خاص و غیرفعال کردن عفونت‌های ویروسی اشاره نمود. علاوه بر این، از نوکلئازهای هدفمند در اصلاح جهش‌های بیماری‌زا مانند وجود سلول‌های داسی شکل^{۱۸}

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^{۱۱}، اتصال مستقل^{۱۲} و اتصال وابسته^{۱۳} برای ساخت تکرارهای TALE تخصصی، اعمال شده است (Briggs, et al., 2012; Schmid-Burgk, et al., 2013).

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 به عنوان 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^{۱۴} با طول مشابه قرار می‌گیرند (Westra, et al., 2012). این توالی‌ها خوشه‌های منظم بین پالیندروم‌های کوتاه تکراری نام دارند. Jinek و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان دادند سیستم CRISPR-Cas9^{۱۵} یا همان خوشه‌های منظم بین پالیندروم‌های تکراری کوتاه، می‌تواند انقلاب عظیمی در ویرایش ژنوم را پدید آورد. سیستم CRISPR-Cas9 جهت انجام ویرایش ژنومی دارای یک مولکول RNA کوچک تک‌رشته‌ای به نام RNA راهنما یا sgRNA^{۱۶} و یک آنزیم اندونوکلئاز غیراختصاصی به نام Cas9 می‌باشد (Jinek, et al., 2012). سیستم CRISPR در مقایسه با ZFN ها و TALEN ها با یک تغییر ساده در RNA راهنما باعث می‌شود تا با برنامه‌ریزی مجدد، Cas9 به هر نوع توالی هدفی متصل گردد (Jinek, et al., 2013). کارایی بالا، قابلیت چندگانه و سادگی برنامه‌ریزی مجدد سیستم CRISPR-Cas9، این تکنولوژی را به خط اول ویرایش ژنومی تبدیل کرده است.

کاربرد آنزیم‌های نوکلئاز هدفمند در ویرایش ژنوم

^{۱۱} Solid-phase Cloning

^{۱۲} Ligation-independent

^{۱۳} Ligation-dependent

^{۱۴} Spacer Elements

^{۱۵} Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat-Cas9

^{۱۶} single guide RNA

^{۱۷} Hypercholesterolemia

^{۱۸} Sickle Cell Disease

تفسیر اطلاعات مربوط به موجودات تغییر یافته ژنتیکی را مختل کند. در برش توالی اگر جایگاه‌ها غیر از موارد مد نظر تغییر داده شود، ممکن است عواقب زیان‌باری را به همراه داشته باشد. بنابراین، باید واکنش‌دهنده‌ها بهینه‌سازی و جایگاه‌های برش غیر هدف شناسایی شوند. اتصال اختصاصی پروتئین‌های ZFP و TALE معمولاً با استفاده از تکامل سیستماتیک لیگاندها با غنی‌سازی نمایشی²⁷، در شرایط آزمایشگاهی تعیین می‌شود (Tuerk and Gold., 1990). اطلاعات بدست آمده از این روش آزمایشگاهی می‌تواند برای شناسایی ژنوم هدف مورد استفاده قرار گرفته و لیستی از جایگاه‌های بالقوه غیر هدف را حاصل نماید. این جایگاه‌های بالقوه غیر هدف می‌توانند از طریق توالی‌یابی مستقیم مورد بررسی قرار گیرند (Pattanayak, et al., 2011). پتانسیل جایگاه‌های غیر هدف به‌طور معمول با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی تعیین می‌شود. اگرچه مطالعات توالی‌یابی کامل ژنوم نشان می‌دهد که جهش‌زایی در جایگاه‌های غیر هدف و سلول‌های بنیادی ویرایش شده با استفاده از سیستم CRISPR-Cas نادر است، اما انتخاب دقیق sgRNA ها در این پروسه توصیه می‌شود (Wang, et al., Martinez, et al., 2015; 2013). دو روش عمده جهت محدود کردن برش جایگاه غیر-هدف توسط ZFN ها و TALEN ها استفاده می‌شود. اولین روش شامل انتخاب ZFN ها یا TALEN هایی با جایگاه شناسایی DNA طولی (۱۲ تا ۱۸ جفت‌باز) است. توالی ۱۸ نوکلئوتیدی حداکثر یک‌بار در ژنومی با ۳ میلیارد جفت‌باز (تقریباً اندازه ژنوم انسان) یافت می‌شود. دومین روش، استفاده از هترودایمرهای اجباری FokI²⁸ است که می‌توانند از دایمرزاسیون تصادفی نوکلئازها و متعاقباً برش تصادفی DNA جلوگیری کنند (Miller, et al., 2007). کاهش برش توالی غیر هدف ZFN ها سبب کاهش نیمه‌عمر آن‌ها می‌شود. احتمالاً اضافه کردن یک آرژنین در ناحیه N-terminal نوکلئازهای ZFN به دلیل جلوگیری از برش بیش از حد توالی غیر هدف، سبب کاهش سمیت در سلول‌ها خواهد شد (Pruett-Miller, et al., 2008). علاوه بر انتخاب دقیق sgRNA ها، چندین

هموفیلی A و B، نقص آلفا-آنتی‌تریپسین¹⁹، نقص ایمنی وابسته به X در سلول‌های بنیادی خون‌ساز انسانی²⁰، دیستروفی عضلانی دوشن²¹، سندروم ویسکات-آلدریچ²² در سلول‌های بنیادی خون‌ساز و سیستمیک فایبروزیس²³ در سلول‌های اپیتلیال تولید شده از سلول‌های بنیادی پلورپوتنت²⁴ بیماران نیز استفاده می‌شود (Ding, et al., 2014; Firth, et al., 2015; Toscano, et al., 2013; Li, et al., 2015; Ousterout, et al., 2015; Smith, et al., 2015; Park, et al., 2014; Li, et al., 2011; Huang, et al., 2015; Sebastiano, et al., 2014; Genovese, et al., 2014). امروزه غیر فعال کردن گیرنده مشترک ویروس HIV1 به نام CCR5²⁵ در سلول‌های T، سلول‌های بنیادی خون‌ساز و آزمایش‌های بالینی در نوکلئازهای هدفمند که CCR5 را مورد هدف قرار می‌دهند، در حال انجام شدن است (Tebas, et al., 2014; Perez, et al., 2010; Holt, et al., 2008). استفاده از نوکلئازهای هدفمند نه تنها امکان غیر فعال کردن ژن‌های درگیر در عفونت‌های مختلف را داراست، بلکه جهت غیر فعال کردن وکتورهای بیماری‌زای تلفیق شده نیز استفاده می‌شود. مطالعه اخیر در استفاده از سیستم ویرایش ژنوم نیز نشان داد که این سیستم توانایی هدف قرار دادن مناطق LTR U3 از ویروس HIV1 و برش مؤثر قطعه ۹/۷ کیلوبازی حاوی ژنوم HIV را داراست (Hu, et al., 2014). استراتژی‌های مشابهی نیز برای از بین بردن سایر ویروس‌های دارای فاز کمون یا مستعد بیماری‌زایی مانند ویروس Epstein-Barr در ژنوم انسان استفاده شده است (Yuen, et al., 2015).

توالی هدف اختصاصی²⁶

داشتن یک توالی هدف اختصاصی، نیاز اساسی برای استفاده موفق از ابزار ویرایش ژنومی مبتنی بر نوکلئاز است. برش بیش از حد جایگاه‌های غیر هدف می‌تواند سبب بروز سمیت سلولی شده و

¹⁹ $\alpha 1$ -Antitrypsin Deficiency
²⁰ Hematopoietic Stem Cells
²¹ Duchenne Muscular Dystrophy
²² Wiskott-Aldrich Syndrome
²³ Cystic Fibrosis
²⁴ Pluripotent Stem Cells
²⁵ C-C Chemokine Receptor Type 5
²⁶ Target Specificity

²⁷ Exponential Enrichment
²⁸ Obligate Heterodimers

که دو یا چند برش رخ دهد، NHEJ می‌تواند جهش‌های جابجایی درون یا بین کروموزومی^{۳۴} را ایجاد کند. تفکیک DSBها توسط مکانیسم ترمیم HDR به‌طور کلی به‌عنوان مکانیسم ترمیم بدون خطا محسوب شده و از کروماتید خواهری به‌عنوان یک الگو برای ویرایش استفاده می‌کند. استفاده از این مکانیسم ترمیم، اجازه ورود جهش‌های خاص مانند ورود توالی بزرگ DNA دهنده^{۳۵} به محل برش یافته را می‌دهد. همچنین غیرفعال‌سازی ژن را می‌توان با ادغام یک DSB به درون آگرون که در ناحیه پایین دست جایگاه شروع ترجمه واقع شده است، انجام داد (شکل ۱، الف). تفکیک DSB بوسیله مکانیسم ترمیم NHEJ می‌تواند سبب تولید تغییرات ژنتیکی مانند انواع جهش‌های بی‌معنی^{۳۶}، نابجا^{۳۷} و تغییر چهارچوب^{۳۸} شود، که اغلب با غیرفعال کردن ژن همراه است (Chang, et al., 2007). از این استراتژی معمولاً برای غربال نمودن کلی ژنوم به واسطه مکانیسم CRISPR و غیرفعال‌سازی ژن در شرایط طبیعی^{۳۹} استفاده می‌شود (Pelletier, et al., Bassett, et al., 2015; Yang, et al., 2013; Yang, et al., 2014; 2015). اصلاح ژن و جهش‌زایی در جایگاه اختصاصی را می‌توان با ادغام یک DSB در نزدیکی جایگاه اصلاح یا جهش ایجاد نمود (شکل ۱، ب). تفکیک DSBها بوسیله مکانیسم ترمیم HR، تولید توالی DNA مورد نظر با دو انتهای همسان در محل برش را به‌همراه خواهد داشت. از این استراتژی جهت ادغام جهش‌های نقطه‌ای و قطعات بزرگ DNA در شرایط آزمایشگاهی و درون ارگانیسم‌های مدل استفاده شده است (شکل ۱، ج) (Martinez, et al., 2015; Yang, et al., 2014). همچنین غیرفعال‌سازی ژن می‌تواند با قرار گرفتن دو DSB در مجاورت ژن هدف حاصل شود (شکل ۱، د). تفکیک DSBها می‌تواند بدون تولید آلل‌های جهش یافته، باعث حذف یا اضافه قطعات کوچک DNA در جایگاه شود (Carlson, et al., 2014; al., 2012). ادغام دو توالی DSB به درون ناحیه اینترون ژن‌ها

استراتژی دیگر برای کاهش جایگاه‌های غیر هدف با استفاده از سیستم ویرایش ژنومی CRISPR-SpCas9 پیشنهاد شده است. این استراتژی‌ها شامل استفاده از ترکیب SpCas9-D10Aهای جهش یافته که دامین نوکلئاز شبه RuvC را در SpCas9 غیر فعال می‌کنند، با یک جفت متعادل کننده sgRNA^{۲۹} می‌باشد (Ran, et al., 2013; Mali, et al., 2013). استراتژی دابل نیکاز^{۳۰} می‌تواند منجر به کاهش ۱۰۰ الی ۱۵۰۰ برابری فعالیت هدف در لاین‌های سلولی شود. یکی دیگر از استراتژی‌ها، استفاده از مولکول‌های RNA راهنمای کوتاه‌تر است. استفاده از این استراتژی می‌تواند برش‌های غیر هدف را تا ۱۰۰۰ برابر کاهش دهد. این استراتژی در ترکیب با دابل نیکازها می‌تواند انتخاب را بهبود بخشد (Fu, et al., 2014). استراتژی‌ها دیگر، ترکیب استفاده از جفت‌های متعادل کننده sgRNAها با بخش غیر فعال کاتالیزوری Cas9 که به یک زیر واحد کاتالیزوری اندونوکلئاز غیر اختصاصی FokI متصل شده است، می‌باشد. با استفاده از این استراتژی، برش غیر هدف تقریباً هفت برابر نسبت به استراتژی دابل نیکاز کاهش خواهد یافت (Guilinger, et al., 2014). در این روش، برای حداکثر کردن فعالیت، فاصله دهنده‌ای به طول ۱۳ الی ۱۷ جفت‌باز نیاز است.

ویرایش ژنوم با استفاده از آنزیم‌های نوکلئاز هدفمند

اساس ویرایش ژنومی با استفاده از آنزیم‌های نوکلئاز هدفمند، مکانیسم‌های ترمیم DNA^{۳۱} هستند که در تفکیک DSBها دخالت دارند. در سلول‌های یوکاریوتی، شناسایی DSBها بوسیله آنزیم‌های نوکلئاز هدفمند، مکانیسم‌های ترمیم DNA را تحریک می‌کند. از جمله مکانیسم‌های پرکاربرد در ترمیم DNA می‌توان به NHEJ^{۳۲} و ترمیم همولوگ (HDR یا HR) اشاره نمود (Chapman, et al., 2012). تفکیک DSBها توسط NHEJ سبب افزایش خطا در اتصال پایانه‌های DSB شده و اغلب جهش‌های کوچک افزایشی یا کاهشی (indel)^{۳۳} را در محل برش توالی DNA حاصل می‌کند. در برخی موارد، هنگامی

³⁴ Intra or Interchromosomal Translocations

³⁵ Donor Template

³⁶ Nonsense

³⁷ Missense

³⁸ Frameshift

³⁹ In vivo

²⁹ A Pair of Offset sgRNAs

³⁰ Double Nickases Strategy

³¹ DNA-Repair Mechanisms

³² Non-homologous end joining

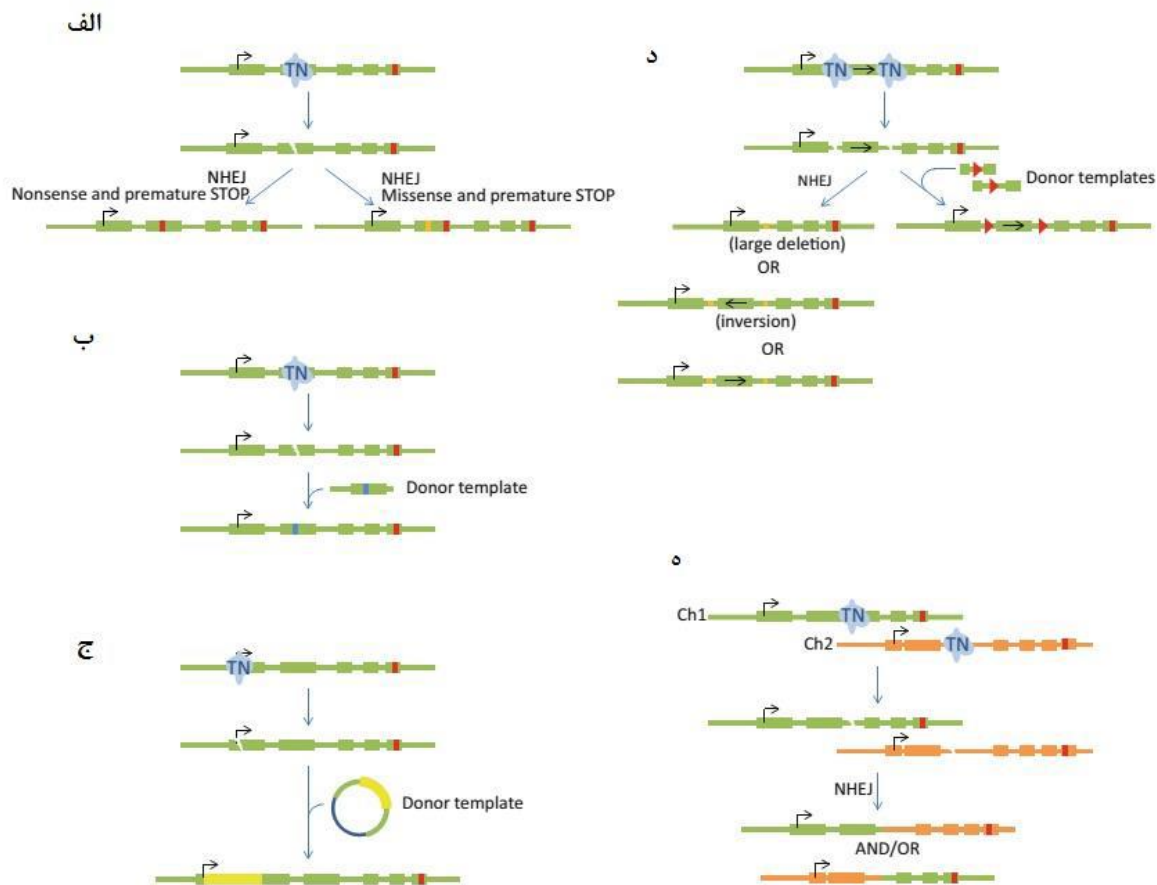
³³ Insertion or Deletion

بدون اثرات منفی در این ناحیه ادغام شوند. همچنین این ناحیه به- نام AAVS1 نیز شناخته می‌شود و درج DSB ها توسط آنزیم- های هدفمند نوکلئاز می‌تواند توالی‌های بزرگ DNA را در مجاورت مناطق همسان با جایگاه AAVS1 قرار دهد (Tiyaboonchai, et al., 2014).

می‌تواند برای ادغام جایگاه‌های شناسایی ریکامیناز (مانند: loxP) جهت تولید آلل‌های اختصاصی مورد استفاده قرار گیرد (شکل ۱، د). قطعات DNA حاوی جایگاه‌های LoxP که در کنار مناطق همسان با جایگاه‌های هدف قرار گرفته‌اند می‌توانند به‌عنوان DNA دهنده برای مکانیسم ترمیم HR استفاده شوند (Yang, Mali, et al., 2013; et al., 2013). همانطور که قبلاً توضیح داده شد، تفکیک DSB ها بوسیله مکانیسم NHEJ می‌تواند منجر به حذف در یک جایگاه و متعاقباً ایجاد یک آلل جهش‌یافته شود. اغلب تلاش‌ها جهت تولید موش‌های مهندسی شده دارای آلل جهش‌یافته از طریق مکانیسم ترمیم NHEJ انجام شده است (Pelletier, et al., 2015). معمولاً، استراتژی‌های هدفمندی که توانایی تولید همزمان هر دو آلل را دارند، طراحی شده‌اند (Pelletier, et al., 2015). قرار دادن DSB ها در درون کروموزوم‌های جداگانه می‌تواند سبب جهش جابجایی کروموزومی^{۴۰} گردد (Do, et al., Blasco, et al., 2014). جابجایی کروموزومی در ارتباط با سرطان اغلب منجر به تغییرات سلولی می‌شود. بکارگیری مشابه از این نوع جابجایی در سلول‌ها می‌تواند دیدگاه‌های انتقادی را نسبت به بیماری‌زایی پاتوژن‌ها ارائه دهد. الگوهای DNA ترمیم همسان که دارای قطعات همسان با هر دو کروموزوم هستند، می‌توانند برای جابجایی کروموزومی استفاده شوند. از سوی دیگر، جایگاه‌های loxP را می‌توان در داخل کروموزوم‌ها قرار داد و نوترکیبی مبتنی بر ریکامیناز Cre را حاصل نمود (Pelletier, et al., 2015). آنزیم‌های هدفمند نوکلئاز همچنین می‌توانند برای غیرفعال کردن خانواده‌های ژن با توالی‌های همسان استفاده شوند. یک جفت ZEN یا TALEN یا یک sgRNA می‌تواند برای هدف قرار دادن چندین عضو طراحی شود (شکل ۱، الف) (Pelletier, et al., 2015). همچنین، آنزیم‌های نوکلئاز هدفمند، امکان درج DNA نوترکیب به درون ژنوم با استفاده از وکتورهای ویروسی غیرقابل ادغام^{۴۱} را فراهم می‌کنند. جایگاه PPP1R12C که بر روی کروموزوم شماره ۱۹ انسان واقع شده است یک ناحیه دارای قابلیت نسخه‌برداری بوده که توالی‌های DNA نوترکیب می‌توانند

⁴⁰ Chromosomal Translocations

⁴¹ Nonintegrating Viral Vectors



شکل ۱) استراتژی‌های هدفمند جهت القای انواع جهش

هایی با توالی مطلوب می‌شود. د) تولید آلل‌های مورد نظر و حذف یک قطعه بزرگ DNA می‌تواند با استفاده از دو آنزیم نوکلئاز که برای اینترون‌های مجاور ژن هدف طراحی شده‌اند، حاصل گردد. برش توالی توسط مکانیسم ترمیم NHEJ می‌تواند باعث تولید جهش‌های Indel در محل شکستگی شود. برش توالی بوسیله مکانیسم HR با توالی DNA دهنده حاوی آنزیم ریکامیناز، آلل‌های مد نظر را تولید می‌کنند. ه) جابجایی کروموزومی می‌تواند از طریق انتقال توالی DSB ها با استفاده از دو آنزیم نوکلئاز هدفمند بر روی کروموزوم‌های مختلف انجام شود. ادغام ریونوکلئاز loxP بر روی هر کروموزوم سبب القای جابجایی خواهد شد.

الف) غیر فعال کردن و القای جهش‌های تصادفی می‌تواند با استفاده از آنزیم‌های نوکلئاز هدفمند صورت پذیرد. برش دو رشته توسط NHEJ سبب ایجاد جهش‌های نقطه‌ای مختلف در جایگاه هدف از جمله بی‌معنی، نابجا و تغییر چهار چوب شده و همچنین می‌تواند سبب درج یا حذف قطعات DNA گردد. ب) آنزیم‌های نوکلئاز هدفمند قادرند جهش‌های نقطه‌ای اختصاصی را درون ژنوم انتقال دهند. برش توالی DSB توسط مکانیسم ترمیم نو ترکیبی همسان (HR) با استفاده از یک توالی دهنده حاوی جهش‌های مشخص، آلل‌هایی را با جهش مورد نظر تولید می‌کند. ج) انتقال توالی بزرگ DNA با استفاده از یک نوکلئاز هدفمند قابل دستیابی است. برش DSB توسط مکانیسم ترمیم HR با قرار دادن توالی DNA مورد نظر در جایگاه خاص سبب تولید آلل-

روش‌های انتقال آنزیم‌های هدفمند نوکلئاز

انتقال آنزیم‌های هدفمند نوکلئاز و DNA دهنده به سلول‌ها از طریق مکانیسم ترمیم HR جهت موفقیت در فرآیند ویرایش ژنومی بسیار حائز اهمیت است. انتقال پلازمیدهای حاوی آنزیم-های هدفمند نوکلئاز و DNA دهنده با استفاده از روش‌هایی مانند الکتروپوریشن^{۴۴} یا ترانسفکشن^{۴۵} به همراه واکنش‌گرهای شیمیایی به درون سلول‌های ترانسفورم شده و همچنین انتخاب سلول‌های بنیادی جنینی، از جمله موارد رایج است. با این حال، این روش‌ها معمولاً در کشت‌های اولیه سلولی ناکارآمد هستند و ممکن است باعث سمیت سلولی شوند. جهت غلبه بر این محدودیت‌ها چندین روش انتقال ایجاد شده است. یکی از رویکردهایی که مورد بررسی قرار گرفته است، انتقال آنزیم‌های هدفمند نوکلئاز ترجمه‌شده به درون سلول از طریق ترانسفکشن بدون استفاده از واکنش‌گرهای شیمیایی، تحت شرایط آزمایشگاهی است. این رویکردها براساس تغییرات شیمیایی یا ژنتیکی آنزیم‌ها به منظور ایجاد نفوذپذیری در غشای آنهاست. به عنوان مثال، ترکیب پپتیدهای غنی از آرژینین با TALEN ها جذب آنها به سلول را افزایش داده و تغییرات برگشت‌پذیر ژن‌های حذف شده بواسطه روش TALEN را با سرعت مشابه با روش پلازمیدهای ترانسفکشن امکان‌پذیر می‌کند (Liu, et al., 2014). همچنین تلفیق ژنتیکی TALEN به پپتید TAT قابل نفوذ به سلول، جذب پروتئین ترکیبی^{۴۶} را از طریق سلول با حفظ فعالیت آن امکان‌پذیر می‌کند (Ru, et al., 2013). تلفیق ژنتیکی ZFN ها به ترانسفرین^{۴۷}، جذب پروتئین ترکیبی ZFN به توالی جایگاه برشی را امکان‌پذیر می‌سازد (Chen, et al., 2013). همچنین کارایی اختلال ژن در سلول‌های کشت‌شده می‌تواند با استفاده از سیستم ویرایش Cas9 و sgRNA تلفیق شده به پپتیدهای نفوذی، حاصل شود (Ramakrishna, et al., 2014). ویژگی مثبت طبیعی ZFP ها، تولید ZFN هایی با قابلیت نفوذ در غشاء است. ZFN های درونی غیر قابل تلفیق^{۴۸} در بررسی اختلالات ژن در

انواع روش‌های ترمیم توالی‌های DSB به صورت دائم در حال رقابتند. به همین خاطر، درج جهش‌های دقیق توسط مکانیسم ترمیم HR با استفاده از آنزیم‌های نوکلئاز هدفمند، همچنان به عنوان یک چالش بزرگ مطرح است. برای جلوگیری از این مشکل، دو استراتژی اصلی پیشنهاد شده است. اولین استراتژی شامل مهار مکانیسم ترمیم NHEJ می‌باشد که در واقع مهم‌ترین مکانیسم تعمیر DSB در سلول‌های یوکاریوتی محسوب می‌شود. دومین استراتژی، انتقال آنزیم‌های هدفمند نوکلئاز در اواخر مرحله S و اوایل مرحله G2 از چرخه سلولی می‌باشد که در این مرحله، مسیر مکانیسم ترمیم HR فعال‌تر خواهد بود. مطالعات بر روی روش‌های تفکیک DSB، عوامل متعددی را شناسایی کرده است که به نام روش NHEJ استاندارد^{۴۲} مرسوم است (Chapman, et al., 2012). این عوامل عبارتند از هتروداIMERهای 70Ku/80Ku، که توالی DSB ها را به یکدیگر متصل کرده و نقش داربست را برای ماشین ترمیم NHEJ ایفا می‌کنند. یکی دیگر از عوامل مهم در مکانیسم ترمیم NHEJ، وجود آنزیم DNA لیگاز IV می‌باشد که برای اتصال نواحی انتهای DNA ضروری است. مهار مکانیسم ترمیم NHEJ از طریق مهار بیان هتروداIMERهای 70Ku/80Ku یا DNA لیگاز IV و همچنین مهار اتصال DNA لیگاز IV به توالی DSB توسط مولکول کوچک SCR7 انجام شده که این عامل می‌تواند باعث ترمیم NHEJ در لاین‌های سلولی و جنین گردد (Weber, et al., 2015; Singh et al., 2015). مکانیسم ترمیم NHEJ در سراسر چرخه سلولی تقریباً یکسان عمل کرده در حالی که مکانیسم ترمیم HR فقط در اواخر مرحله S و اوایل مرحله G2 ممکن است باعث افزایش فعالیت مکانیسم ترمیم HR نسبت به مکانیسم ترمیم NHEJ شود. در حقیقت، انتقال سیستم CRISPR-Cas9 به سلول‌های تیمار شده با نوکودازول^{۴۳}، که سبب توقف چرخه سلولی در مرحله بین میتوز و G2 می‌شود، منجر به افزایش قابل توجهی در فعالیت مکانیسم ترمیم HR (تا ۳۸٪) نسبت به سلول‌های تیمار نشده خواهد شد (Lin, et al., 2014).

⁴⁴ Electroporation

⁴⁵ Transfection

⁴⁶ Fusion Protein

⁴⁷ Transferrin

⁴⁸ Internalization of Unconjugated ZFNs

⁴² Canonical NHEJ Pathway

⁴³ Nocodazole

لنتی ویروس (IDLV)^{۵۸} و باکلو ویروس ها (BV)^{۵۹} را می توان نام برد. این وکتورها به طور گسترده ای برای انتقال آنزیم های هدفمند نوکلئاز در ارگانسیم های مدل مورد استفاده قرار گرفته اند، اما برخی از این سیستم های انتقال، محدودیت هایی دارند که ممکن است برای تمام آنزیم های هدفمند نوکلئاز مناسب نباشند. به عنوان مثال، وکتورهای LV و IDLV برای انتقال به ZFN ها و TALEN ها استفاده شده اند (Genovese, et al., 2014). با این وجود، حساسیت آن ها به تغییرات اپی ژنتیکی و خاموش شدن، اثربخشی آن ها را محدود ساخته است. علاوه بر این، بیان TALEN ها نیز به دلیل حذف گسترده تکرارهای TALE از طریق تغییر الگوی نسخه برداری معکوس^{۶۰} در درون تکرارهای TALE، تحت تأثیر قرار می گیرد (Holkers, et al., 2013; Yang, et al., 2013). این محدودیت با استفاده از توالی های کد شده جایگزین که سبب محدودیت تغییر الگوی نسخه برداری معکوس شده یا ویروس های دارای نسخه برداری معکوس ناکارآمد، برطرف خواهد شد (Mock, et al., 2014). وکتور-های BV جهت انتقال توالی هدف در سیستم ویرایش ZFN و TALEN، در کشت سلول های بنیادی جنینی استفاده شده اند. همچنین این وکتورها قادرند دایمرهای ZFP و TALEN را درون یک قطعه ویروسی وارد نمایند (Lei, et al., 2011). تحت شرایط خاص، تکرارهای TALE ممکن است دستخوش تغییر قرار گیرند که این عامل باعث می شود از وکتورهای BV برای ژن درمانی و انتقال ژن هدف کمتر استفاده شود (Holkers, et al., 2013; Lau, et al., 2014). وکتورهای AV به عنوان یک ابزار مناسب جهت انتقال آنزیم های هدفمند نوکلئاز به حساب می آیند، زیرا قادرند سلول های در حال تقسیم و سلول های تقسیم نشده را آلوده سازند. در این حالت، جایگذاری قطعات بزرگ DNA و کدهای پروتئینی بدون تلفیق شدن با ژنوم میزبان صورت می پذیرد. علاوه بر این، از وکتورهای AV به عنوان یکی از برجسته ترین وکتورها در آزمایشات بالینی ژن درمانی استفاده می شود (Wirth, et al., 2013). وکتورهای AV جهت انتقال

سلول های پستانداران نقش دارند (Gaj, et al., 2012). یکی دیگر از روش های انتقال بدون استفاده از واکنش گره های شیمیایی، استفاده از الکتروپوریشن ترجمه شده *in vitro*^{۴۹} و آنزیم های هدفمند نوکلئاز مونتاژ شده *in vitro*^{۵۰} درون کمپلکس sgRNA-Cas9 است. این روش، دارای سمیت کمتر و کارایی بیشتر نسبت به روش الکتروپوریشن می باشد (Kim, et al., 2014). روش ترانسفکشن مبتنی بر استفاده از مواد شیمیایی نیز برای سیستم CRISPR-Cas9 طراحی شده است. این روش می تواند اثربخشی و ویرایش ژنومی مبتنی بر CRISPR-Cas9 از طریق محافظت کمپلکس نوکلئاز بوسیله پروتئین های سرم سلول-های خون و ماتریکس خارج سلولی و یا از طریق تخریب آن توسط مسیر اندوزومی-لیزوزومی^{۵۱} را افزایش دهد (Zuris, et al., 2015). روش میکرواینجکشن^{۵۲} یکی دیگر از روش های گسترده مورد استفاده جهت ویرایش ژنوم در لاین های سلولی و تخم ها^{۵۳} برای انتقال نسخه های کدکننده آنزیم های هدفمند نوکلئاز می باشد (Sahin, et al., Pelletier, et al., 2015; 2014). احتمالاً محدود شدن فعالیت توالی های غیر هدف، ناشی از نیمه عمر پروتئین های ترجمه شده و یا mRNA های نسخه برداری شده ای است که فعالیتشان را سریعتر از مولکول های وکتور معمولی یا ویروسی انجام می دهند. علاوه بر این، ادغام تصادفی وکتورهای معمولی یا ویروسی به درون ژنوم نه تنها می تواند طول بیان آنزیم های نوکلئاز را تحت تأثیر قرار دهد، بلکه قادر است با ژن هایی که در آن DNA وارد شده تداخل ایجاد نماید. بر این اساس، استفاده از وکتورهای ویروسی اپیزومی^{۵۴} توصیه می شود. در حال حاضر چندین وکتور ویروسی برای فناوری آنزیم های هدفمند نوکلئاز در حال گسترش هستند، از جمله این وکتورها آدنو ویروس ها (AV)^{۵۵}، آندو-اسوشیتد ویروس (AAV)^{۵۶}، لنتی ویروس (VL)^{۵۷}، اینتگرز-دیفیشینت

⁴⁹ Electroporation of In vitro-translated

⁵⁰ In vitro-assembled Targetable Nucleases

⁵¹ Endosomal-Lysosomal Pathway

⁵² Microinjection

⁵³ Zygotes

⁵⁴ Episomal Viral Vectors

⁵⁵ Adenovirus

⁵⁶ Adeno-Associated Virus

⁵⁷ Lentivirus

⁵⁸ Integrase-Deficient Lentivirus

⁵⁹ Baculovirus

⁶⁰ Reverse Transcriptase

منابع

- Arazoe, T., Miyoshi, K., Yamato, T., Ogawa, T., Ohsato, S., Arie, T., & Kuwata, S. (2015). Tailor-made CRISPR/Cas system for highly efficient targeted gene replacement in the rice blast fungus. *Biotechnology and bioengineering*, 112(12), 2543-2549.
- Asuri, P., Bartel, M. A., Vazin, T., Jang, J. H., Wong, T. B., & Schaffer, D. V. (2012). Directed evolution of adeno-associated virus for enhanced gene delivery and gene targeting in human pluripotent stem cells. *Molecular Therapy*, 20(2), 329-338.
- 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.
- Blasco, R. B., Karaca, E., Ambrogio, C., Cheong, T. C., Karayol, E., Minero, V. G., ... & Chiarle, R. (2014). Simple and rapid in vivo generation of chromosomal rearrangements using CRISPR/Cas9 technology. *Cell reports*, 9(4), 1219-1227.
- 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.

ZFN, TALEN و نوکلئازهای RNA راهنما مورد استفاده قرار می‌گیرند (Holkers, et al., Tebas, et al., 2014). وکتورهای AV قابلیت بارگذاری توالی‌های بزرگ مانند دایمرهای ZFN و TALEN و همچنین توالی‌های Cas9، sgRNA و DNA دهنده را دارند. وکتورهای غیر بیماری‌زای AAV جهت انتقال مؤثر ژن هدف، نتایج امیدوارکننده‌ای را در سطح فازهای I تا III آزمایشات بالینی نشان داده‌اند (Kotterman, et al., 2014). وکتورهای AVV ذرات ویروسی ناکارآمد در همانندسازی⁶¹ هستند که برای همانندسازی به ویروس‌های دیگر نیاز دارند. محتوای ژنتیکی آن‌ها از یک DNA تک‌رشته‌ای با طول تقریبی ۴/۷ کیلوباز و دو ناحیه قالب خوانش باز (ORF)⁶² تشکیل شده است. از وکتورهای AVV جهت انتقال در سیستم‌های ویرایش ژنومی ZFN و CRISPR-Cas9 استفاده می‌شود (Howes and Schofield., 2015). (Asuri, et al., 2012; Senís, et al., 2014;

توصیه ترویجی

گسترش و توسعه سیستم‌های ویرایش ژن که قابلیت ژن‌درمانی و انتقال توالی DNA هدف به مکان‌های خاص در ژنوم را داراست، توانایی ما برای دستکاری‌های ژنوم را بهبود بخشیده است. کیفیت انتقال آنزیم‌های نوکلئاز هدفمند، شناسایی هدف اختصاصی، درک بهتر از مکانیسم‌های ویرایش DNA و شناسایی راه‌هایی برای ارتقاء مکانیسم HR تمرکز اصلی در مکانیسم ویرایش ژنومی است. در این راستا پیشنهاد می‌گردد 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.

⁶¹ Replication-Deficient Viral Particles

⁶² Open Reading Frame

- 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.
- Carlson, D. F., Tan, W., Lillico, S. G., Stverakova, D., Proudfoot, C., Christian, M., ... & Fahrenkrug, S. C. (2012). Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(43), 17382-17387.
- Chang, Y. F., Imam, J. S., & Wilkinson, M. F. (2007). The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annu. Rev. Biochem.*, 76, 51-74.
- Chapman, J. R., Taylor, M. R., & Boulton, S. J. (2012). Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Molecular cell*, 47(4), 497-510.
- 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.
- Chen, Z., Jaafar, L., Agyekum, D. G., Xiao, H., Wade, M. F., Kumaran, R. I., ... & Meiler, S. E. (2013). Receptor-mediated delivery of engineered nucleases for genome modification. *Nucleic acids research*, 41(19), e182-e182.
- 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.
- Crispo, M., Mulet, A. P., Tesson, L., Barrera, N., Cuadro, F., dos Santos-Neto, P. C., ... & Menchaca, A. (2015). Efficient generation of myostatin knock-out sheep using CRISPR/Cas9 technology and microinjection into zygotes. *PLoS one*, 10(8), e0136690.
- Ding, Q., Strong, A., Patel, K. M., Ng, S. L., Gosis, B. S., Regan, S. N., ... & Musunuru, K. (2014). Permanent alteration of PCSK9 with in vivo CRISPR-Cas9 genome editing. *Circulation research*, 115(5), 488-492.
- Do, T. U., Ho, B., Shih, S. J., & Vaughan, A. (2012). Zinc finger nuclease induced DNA double stranded breaks and rearrangements in MLL. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 740(1-2), 34-42.
- Estrada, J. L., Martens, G., Li, P., Adams, A., Newell, K. A., Ford, M. L., ... & Tector, J. (2015). Evaluation of human and non-human primate antibody binding to pig cells lacking GGTA 1/CMAH/ β 4Gal NT 2 genes. *Xenotransplantation*, 22(3), 194-202.
- Firth, A. L., Menon, T., Parker, G. S., Qualls, S. J., Lewis, B. M., Ke, E., ... & Verma, I. M. (2015). Functional gene correction for cystic fibrosis in lung epithelial cells generated from patient iPSCs. *Cell reports*, 12(9), 1385-1390.
- 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.
- Gaj, T., Guo, J., Kato, Y., Sirk, S. J., & Barbas, C. F. (2012). Targeted gene knockout by direct delivery of zinc-finger nuclease proteins. *Nature methods*, 9(8), 805-807.
- Genovese, P., Schirotti, G., Escobar, G., Di Tomaso, T., Firrito, C., Calabria, A., ... & Naldini, L. (2014). Targeted genome editing in human repopulating haematopoietic stem cells. *Nature*, 510(7504), 235-240.
- Guilinger, J. P., Thompson, D. B., & Liu, D. R. (2014). Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification. *Nature biotechnology*, 32(6), 577.
- Holkers, M., Cathomen, T., & Gonçalves, M. A. (2014). Construction and characterization of adenoviral vectors for the delivery of TALENs into human cells. *Methods*, 69(2), 179-187.
- Holkers, M., Maggio, I., Liu, J., Janssen, J. M., Miselli, F., Mussolino, C., ... & Goncalves, M. A. (2013). Differential integrity of TALE nuclease genes following adenoviral and lentiviral vector gene transfer into human cells. *Nucleic acids research*, 41(5), e63-e63.
- Holt, N., Wang, J., Kim, K., Friedman, G., Wang, X., Taupin, V., ... & Cannon, P. M. (2010). Human hematopoietic stem/progenitor cells modified by zinc-finger nucleases targeted to CCR5 control HIV-1 in vivo. *Nature biotechnology*, 28(8), 839-847.

- Honda, A., Hirose, M., Sankai, T., Yasmin, L., Yuzawa, K., Honsho, K., ... & Ogura, A. (2014). Single-step generation of rabbits carrying a targeted allele of the tyrosinase gene using CRISPR/Cas9. *Experimental animals*, 14-0034.
- Howes, R., & Schofield, C. (2015). Genome engineering using adeno-associated virus (AAV). In *Chromosomal Mutagenesis* (pp. 75-103). Humana Press, New York, NY.
- Hu, W., Kaminski, R., Yang, F., Zhang, Y., Cosentino, L., Li, F., ... & Khalili, K. (2014). RNA-directed gene editing specifically eradicates latent and prevents new HIV-1 infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(31), 11461-11466.
- Huang, X., Wang, Y., Yan, W., Smith, C., Ye, Z., Wang, J., ... & Cheng, L. (2015). Production of Gene-Corrected Adult Beta Globin Protein in Human Erythrocytes Differentiated from Patient i PSC s After Genome Editing of the Sicklet Point Mutation. *Stem cells*, 33(5), 1470-1479.
- 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, S., Kim, D., Cho, S. W., Kim, J., & Kim, J. S. (2014). Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome research*, 24(6), 1012-1019.
- 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.
- Kotterman, M. A., & Schaffer, D. V. (2014). Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy. *Nature Reviews Genetics*, 15(7), 445-451.
- Lau, C. H., Zhu, H., Tay, J. C. K., Li, Z., Tay, F. C., Chen, C., ... & Wang, S. (2014). Genetic rearrangements of variable di-residue (RVD)-containing repeat arrays in a baculoviral TALEN system. *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development*, 1, 14050.
- Lei, Y., Lee, C. L., Joo, K. I., Zarzar, J., Liu, Y., Dai, B., ... & Wang, P. (2011). Gene editing of human embryonic stem cells via an engineered baculoviral vector carrying zinc-finger nucleases. *Molecular therapy*, 19(5), 942-950.
- Li, D., Qiu, Z., Shao, Y., Chen, Y., Guan, Y., Liu, M., ... & Liu, M. (2013). Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system. *Nature biotechnology*, 31(8), 681-683.
- Li, H. L., Fujimoto, N., Sasakawa, N., Shirai, S., Ohkame, T., Sakuma, T., ... & Hotta, A. (2015). Precise correction of the dystrophin gene in duchenne muscular dystrophy patient induced pluripotent stem cells by TALEN and CRISPR-Cas9. *Stem cell reports*, 4(1), 143-154.
- Li, H., Haurigot, V., Doyon, Y., Li, T., Wong, S. Y., Bhagwat, A. S., ... & High, K. A. (2011). In vivo genome editing restores haemostasis in a mouse model of haemophilia. *Nature*, 475(7355), 217-221.
- Li, T., Liu, B., Spalding, M. H., Weeks, D. P., & Yang, B. (2012). High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nature biotechnology*, 30(5), 390.
- Lillico, S. G., Proudfoot, C., Carlson, D. F., Stverakova, D., Neil, C., Blain, C., ... & Whitelaw, C. B. A. (2013). Live pigs produced from genome edited zygotes. *Scientific reports*, 3(1), 1-4.
- 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.
- Liu, J., Gaj, T., Patterson, J. T., Sirk, S. J., & Barbas III, C. F. (2014). Cell-penetrating peptide-mediated delivery of TALEN proteins via bioconjugation for genome engineering. *PloS one*, 9(1), e85755.
- Liu, X., Wang, Y., Tian, Y., Yu, Y., Gao, M., Hu, G., ... & Zhang, Y. (2014). Generation of mastitis resistance in cows by targeting human lysozyme gene to β -casein locus using zinc-

- finger nucleases. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1780), 20133368.
- Long, C., McAnally, J. R., Shelton, J. M., Mireault, A. A., Bassel-Duby, R., & Olson, E. N. (2014). Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA. *Science*, 345(6201), 1184-1188.
- 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.
- 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.
- Meng, X., Noyes, M. B., Zhu, L. J., Lawson, N. D., & Wolfe, S. A. (2008). Targeted gene inactivation in zebrafish using engineered zinc-finger nucleases. *Nature biotechnology*, 26(6), 695-701.
- Miller, J. C., Holmes, M. C., Wang, J., Guschin, D. Y., Lee, Y. L., Rupniewski, I., ... & Rebar, E. J. (2007). An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nature biotechnology*, 25(7), 778-785.
- 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.
- Mock, U., Riecken, K., Berdien, B., Qasim, W., Chan, E., Cathomen, T., & Fehse, B. (2014). Novel lentiviral vectors with mutated reverse transcriptase for mRNA delivery of TALE nucleases. *Scientific reports*, 4(1), 1-8.
- Nakayama, T., Fish, M. B., Fisher, M., Oomen-Hajagos, J., Thomsen, G. H., & Grainger, R. M. (2013). Simple and efficient CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Xenopus tropicalis*. *genesis*, 51(12), 835-843.
- Niu, Y., Shen, B., Cui, Y., Chen, Y., Wang, J., Wang, L., ... & Sha, J. (2014). Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell*, 156(4), 836-843.
- Nødvig, C. S., Nielsen, J. B., Kogle, M. E., & Mortensen, U. H. (2015). A CRISPR-Cas9 system for genetic engineering of filamentous fungi. *PloS one*, 10(7), e0133085.
- Ousterout, D. G., Kabadi, A. M., Thakore, P. I., Majoros, W. H., Reddy, T. E., & Gersbach, C. A. (2015). Multiplex CRISPR/Cas9-based genome editing for correction of dystrophin mutations that cause Duchenne muscular dystrophy. *Nature communications*, 6(1), 1-13.
- Park, C. Y., Kim, J., Kweon, J., Son, J. S., Lee, J. S., Yoo, J. E., ... & Kim, D. W. (2014). Targeted inversion and reversion of the blood coagulation factor 8 gene in human iPS cells using TALENs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(25), 9253-9258.
- Pattanayak, V., Ramirez, C. L., Joung, J. K., & Liu, D. R. (2011). Revealing off-target cleavage specificities of zinc-finger nucleases by in vitro selection. *Nature methods*, 8(9), 765-770.
- 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.
- Perez, E. E., Wang, J., Miller, J. C., Jouvenot, Y., Kim, K. A., Liu, O., ... & June, C. H. (2008). Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nature biotechnology*, 26(7), 808-816.
- Prather, R. S., Lorson, M., Ross, J. W., Whyte, J. J., & Walters, E. (2013). Genetically engineered pig models for human diseases. *Annu. Rev. Anim. Biosci.*, 1(1), 203-219.
- Proudfoot, C., Carlson, D. F., Huddart, R., Long, C. R., Pryor, J. H., King, T. J., ... & Fahrenkrug, S. C. (2015). Genome edited sheep and cattle.

- Transgenic research, 24(1), 147-153.
- 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.
- Ramakrishna, S., Dad, A. B. K., Beloor, J., Gopalappa, R., Lee, S. K., & Kim, H. (2014). Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA. *Genome research*, 24(6), 1020-1027.
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Lin, C. Y., Gootenberg, J. S., Konermann, S., Trevino, A. E., ... & Zhang, F. (2013). Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 154(6), 1380-1389.
- Ru, R., Yao, Y., Yu, S., Yin, B., Xu, W., Zhao, S., ... & Chen, X. (2013). Targeted genome engineering in human induced pluripotent stem cells by penetrating TALENs. *Cell regeneration*, 2(1), 1-8.
- Sahin, U., Karikó, K., & Türeci, Ö. (2014). mRNA-based therapeutics—developing a new class of drugs. *Nature reviews Drug discovery*, 13(10), 759-780.
- 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.
- Sebastiano, V., Maeder, M. L., Angstman, J. F., Haddad, B., Khayter, C., Yeo, D. T., ... & Joung, J. K. (2011). In situ genetic correction of the sickle cell anemia mutation in human induced pluripotent stem cells using engineered zinc finger nucleases. *Stem cells*, 29(11), 1717-1726.
- Senís, E., Fatouros, C., Große, S., Wiedtke, E., Niopek, D., Mueller, A. K., ... & Grimm, D. (2014). CRISPR/Cas9-mediated genome engineering: an adeno-associated viral (AAV) vector toolbox. *Biotechnology journal*, 9(11), 1402-1412.
- Shivram, H., Cress, B. F., Knott, G. J., & Doudna, J. A. (2021). Controlling and enhancing CRISPR systems. *Nature Chemical Biology*, 17(1), 10-19.
- Shukla, V. K., Doyon, Y., Miller, J. C., DeKolver, R. C., Moehle, E. A., Worden, S. E., ... & Urnov, F. D. (2009). Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature*, 459(7245), 437-441.
- Singh, P., Schimenti, J. C., & Bolcun-Filas, E. (2015). A mouse geneticist's practical guide to CRISPR applications. *Genetics*, 199(1), 1-15.
- Smith, C., Abalde-Atristain, L., He, C., Brodsky, B. R., Braunstein, E. M., Chaudhari, P., ... & Ye, Z. (2015). Efficient and allele-specific genome editing of disease loci in human iPSCs. *Molecular Therapy*, 23(3), 570-577.
- Tebas, P., Stein, D., Tang, W. W., Frank, I., Wang, S. Q., Lee, G., ... & June, C. H. (2014). Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *New England Journal of Medicine*, 370(10), 901-910.
- Tiyaboonchai, A., Mac, H., Shamsedeen, R., Mills, J. A., Kishore, S., French, D. L., & Gadue, P. (2014). Utilization of the AAVS1 safe harbor locus for hematopoietic specific transgene expression and gene knockdown in human ES cells. *Stem cell research*, 12(3), 630-637.
- Toscano, M. G., Anderson, P., Muñoz, P., Lucena, G., Cobo, M., Benabdellah, K., ... & Martin, F. (2013). Use of zinc-finger nucleases to knock out the WAS gene in K562 cells: a human cellular model for Wiskott-Aldrich syndrome. *Disease models & mechanisms*, 6(2), 544-554.
- Tuerk, C., & Gold, L. (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *science*, 249(4968), 505-510.
- 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.
- Wang, H., Yang, H., Shivalila, C. S., Dawlaty, M. M., Cheng, A. W., Zhang, F., & Jaenisch, R. (2013). One-step generation of mice carrying

- mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *cell*, 153(4), 910-918.
- Weber, T., Wefers, B., Wurst, W., Sander, S., Rajewsky, K., & Kühn, R. (2015). Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nature biotechnology*, 33(5), 543-548.
- Wefers, B., Meyer, M., Ortiz, O., de Angelis, M. H., Hansen, J., Wurst, W., & Kühn, R. (2013). Direct production of mouse disease models by embryo microinjection of TALENs and oligodeoxynucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(10), 3782-3787.
- 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.
- Wirth, T., Parker, N., & Yla-Herttuala S. (2013). History of gene therapy. *Gene*, 525(2), 162-169.
- Wu, H., Wang, Y., Zhang, Y., Yang, M., Lv, J., Liu, J., & Zhang, Y. (2015). TALE nickase-mediated SP110 knockin endows cattle with increased resistance to tuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(13), E1530-E1539.
- Xin, J., Yang, H., Fan, N., Zhao, B., Ouyang, Z., Liu, Z., ... & Lai, L. (2013). Highly efficient generation of GGTA1 biallelic knockout inbred mini-pigs with TALENs. *PloS one*, 8(12), e84250.
- Xue, C., & Greene, E. C. (2021). DNA Repair Pathway Choices in CRISPR-Cas9-Mediated Genome Editing. *Trends in Genetics*.
- Yang, H., Wang, H., & Jaenisch, R. (2014). Generating genetically modified mice using CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Nature protocols*, 9(8), 1956.
- Yang, H., Wang, H., Shivalila, C. S., Cheng, A. W., Shi, L., & Jaenisch, R. (2013). One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 154(6), 1370-1379.
- Yang, L., Guell, M., Byrne, S., Yang, J. L., De Los Angeles, A., Mali, P., ... & Church, G. (2013). Optimization of scarless human stem cell genome editing. *Nucleic acids research*, 41(19), 9049-9061.
- Young, J. J., Cherone, J. M., Doyon, Y., Ankoudinova, I., Faraji, F. M., Lee, A. H., ... & Zeitler, B. (2011). Efficient targeted gene disruption in the soma and germ line of the frog *Xenopus tropicalis* using engineered zinc-finger nucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(17), 7052-7057.
- Yuen, K. S., Chan, C. P., Wong, N. H. M., Ho, C. H., Ho, T. H., Lei, T., ... & Jin, D. Y. (2015). CRISPR/Cas9-mediated genome editing of Epstein-Barr virus in human cells. *Journal of General Virology*, 96(3), 626-636.
- Zuris, J. A., Thompson, D. B., Shu, Y., Guilinger, J. P., Bessen, J. L., Hu, J. H., ... & Liu, D. R. (2015). Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing in vitro and in vivo. *Nature biotechnology*, 33(1), 73-80.