



ویرایش ژنومی

نوشته:

کورساد تورکسن

مترجمان:

امین صادقی

رویا مطلبی چالشری



۱۳۹۷

سرشناسه: ترکسن، کرسد، ۱۹۵۲ - م.

Turksen, Kursad

عنوان و نام پدیدآور: ویرایش ژنومی/نوشته کورساد تورکسن؛ مترجمان امین صادقی، رویا مطلبی چالشتری.

مشخصات نشر: تهران: انتشارات صالحیان، ۱۳۹۷.

مشخصات ظاهری: ۲۷۴ص.

شابک: 978-622-6185-54-7

وضعیت فهرست نویسی: فیپا

یادداشت: عنوان اصلی: [Genome editing, 2016].

موضوع: ژنتیک -- مهندسی

Genetic engineering: موضوع

موضوع: ویرایش ژنوم

Gene editing: موضوع

شناسه افزوده: صادقی، امین، ۱۳۶۸ مهر -، مترجم

شناسه افزوده: مطلبی چالشتری، رویا، ۱۳۶۱ -، مترجم

رده بندی کنگره: ۱۳۹۷ و ۳۵۹/ت HQ۴۴۲

رده بندی دیویی: ۶۵/۶۶۰

شماره کتابشناسی ملی: ۵۲۷۲۵۷۴

ویرایش ژنومی

مترجمان: امین صادقی، رویا مطلبی چالشتری.

ناشر: صالحیان

صفحه آرا: هاجر اسفندیاری

سال و نوبت چاپ: ۱۳۹۷ - اول

شمارگان: ۱۰۰۰ نسخه

شابک: 978-622-6185-54-7

قیمت: ۲۵۰۰۰ تومان

شماره تماس: ۰۹۱۹۰۸۱۰۱۴۲ - ۶۶۹۷۹۳۰۰

آدرس: تهران - میدان انقلاب - خیابان کارگر جنوبی - خیابان شهدای زاندارمیری -

پلاک ۱۲۷ - واحد ۳

آدرس الکترونیکی: pubsalehiyan.com

تقدیم به

پدر و مادر عزیزم

سرم رانه ظلم می تواند خم کند، نه مرگ و نه ترس

سرم فقط برای بوسیدن دستانان خم می شود

فهرست مطالب

پیشگفتار مترجمان.....	۱۲
فصل اول.....	۱۳
ویرایش ژنومی با آنزیم‌های نوکلئاز هدفمند.....	۱۳
خلاصه.....	۱۳
مقدمه.....	۱۴
آنزیم‌های نوکلئاز انگشت روی (ZFNs).....	۱۶
اندونوکلئازهای شبه فعال موثر در رونویسی (TALENs).....	۲۱
نوکلئازهای هدایت‌کننده RNA.....	۲۳
توالی هدف اختصاصی.....	۳۰
ویرایش ژنومی با آنزیم‌های نوکلئاز هدفمند.....	۳۲
برتری مکانسیم ترمیم نوترکیبی همسان (HR) نسبت به مکانسیم ترمیم اتصال انتهای ناهمسان (NHEJ).....	۳۶
روش‌های انتقال.....	۳۷
کاربردها.....	۴۱
نتیجه‌گیری.....	۴۳
منابع.....	۴۴
فصل دوم.....	۷۱
شناسایی نواحی غیرکدکننده ژنوم با استفاده از سیستم ویرایش CRISPR/Cas9.....	۷۱
خلاصه.....	۷۱
مقدمه.....	۷۲
دستکاری ژنتیکی توالی‌های غیرکدکننده در عصر پری‌نوکلئاز.....	۷۳
ویرایش از طریق حذف کروموزوم.....	۷۶

۸۰ویرایش اپی ژنومیک
۸۲هدف گیری RNAهای غیر کدکننده
۸۳نتیجه گیری
۸۴منابع
۹۱ فصل سوم
۹۱ مهندسی ژنومی انسانی و پلوریپوتنسی
۹۱خلاصه
۹۲پلوریپوتنسی القا شده و مدل ژنومی انسانی
۹۴ظهور ابزارهای ویرایش ژنومی
۹۷افزودن عملکرد به iPSCها از طریق انتقال ژن در جایگاه های امن
۹۹دستیابی به مهندسی ژنومی برای مدل های بیماری
۱۰۱جلوگیری از نتایج نامطلوب: برش های غیرهدف و موزائیسیم
۱۰۵انتخاب کلون های ایزوژنیک و کنترل های فنی
۱۰۸نتیجه گیری
۱۱۰منابع
۱۲۳ فصل چهارم
۱۲۳ CRISPR/Cas9 و فناوری های دستورزی ژنوم موش
۱۲۳خلاصه
۱۲۴مقدمه
۱۲۴فناوری های مرسوم دستورزی ژنوم موش در دوران قبل از CRISPR
۱۲۶روش های مرسوم Tg و محدودیت های آن
۱۲۶روش های مرسوم KO و KI و محدودیت های آنها
۱۲۸میکرواینجکشن و محدودیت های آن
۱۲۸CRISPR/Cas9 و ویرایش ژنومی موش

۱۳۰	چالش‌های کنونی مهندسی ژنوم موش به روش CRISPR / Cas9
۱۳۰	کارآیی ضعیف توالی انتقال یافته در جایگاه‌های برش بوسیله نولکناز Cas9
۱۳۰	چالش‌های موجود در توسعه مدل‌های حاصل از سیستم KO
۱۳۱	اثرات غیرهدف
۱۳۲	چالش‌های مرتبط با ژنوتایپینگ
۱۳۳	تاثیر CRISPR/Cas9 بر آینده دستورزی ژنوم موش
۱۳۳	تاثیر بر فناوری‌های TG تصادفی
۱۳۴	تاثیر بر فناوری‌های KO/KI
۱۳۴	تاثیر بر تکنیک میکرواینجکشن
۱۳۵	نتیجه‌گیری
۱۳۶	منابع
۱۴۱	فصل پنجم
۱۴۱	فناوری ویرایش ژنومی در سیستم CRISPR/Cas
۱۴۱	(چگونه کارایی Knock-In در سلول‌های تخم موش افزایش میابد)
۱۴۱	خلاصه
۱۴۲	مقدمه
۱۴۲	سیستم CRISPR/Cas
۱۴۴	سیستم انتقال Cas9 و gRNA
۱۴۶	الیگونوکلیوتیدهای تکرار شده‌ای (ssODN) و دورشته‌ای (dsODN) به عنوان رشته‌های الگو
۱۴۷	مولکول‌هایی که کارایی HDR را افزایش می‌دهند
۱۵۲	چرخه سلولی
۱۵۳	چشم‌انداز آینده
۱۵۴	نتیجه‌گیری
۱۵۵	منابع

۱۶۱.....	فصل ششم
۱۶۱.....	تولید سلول‌های بنیادی گزارشگر
۱۶۱.....	چکیده
۱۶۲.....	مقدمه
۱۶۳.....	لاین‌های پلوریپوتنت ژن گزارشگر به عنوان مدل‌های سلولی
۱۶۵.....	روش‌های تولید سلول‌های بنیادی پلوریپوتنت گزارشگر
۱۶۶.....	بیان حداقل گزارشگر مشتق شده از پروموتور
۱۶۷.....	روش‌های غیرتلفیقی
۱۶۸.....	روش‌های تلفیقی
۱۶۸.....	اضافه شدن گزارشگر به ناحیه پروموتور داخلی
۱۷۰.....	نوترکیبی همسان
۱۷۱.....	مگانوکلنازها
۱۷۱.....	نوکلنازهای انگشت روی (ZFN)
۱۷۲.....	TALEN
۱۷۲.....	CRISPR
۱۷۳.....	روش‌های جایگزین
۱۷۳.....	کاربردهای بالقوه سلول‌های بنیادی گزارشگر
۱۷۶.....	نتیجه‌گیری
۱۷۷.....	منابع
۱۸۵.....	فصل هفتم
۱۸۵.....	ویرایش ژنومی در درمان بیماری‌های قلب و عروق
۱۸۵.....	چکیده
۱۸۶.....	ژنومیکس بیماری‌های قلب و عروق
۱۸۶.....	پزشکی دقیق

۱۸۶	ژنتیک بیماری قلب و عروق
۱۸۹	مدل سازی بیماری با سلول های بنیادی پلوریپوتنت انسان
۱۹۲	مدل سازی بیماری ژنتیکی قلب و عروق
۱۹۲	کاردیومیوپاتی وراثتی
۱۹۴	کانلویپاتی وراثتی
۱۹۵	والولویپاتی وراثتی
۱۹۶	درمان فردی بیماری های ژنتیکی قلب و عروق
۱۹۶	چالش های درمان مهندسی ژنومی
۱۹۸	اهداف کنونی برای درمان بوسیله ویرایش ژنومی <i>In Vivo</i>
۲۰۰	نتیجه گیری و چشم انداز آینده
۲۰۲	منابع
۲۱۵	فصل هشتم
۲۱۵	استفاده از سیستم ویرایش ژنومی CRISPR-Cas9 در درمان بیماری دیابت
۲۱۵	خلاصه
۲۱۶	اهمیت فناوری های ویرایش ژنومی در علوم پزشکی
۲۱۷	شناسایی آرایه CRISPR
۲۱۹	ساختار آرایه های CRISPR
۲۲۰	مکانیزم ایمنی اکتسابی
۲۲۳	سازگاری CRISPR-Cas نوع II برای ویرایش ژنومی
۲۲۵	کاهش خطر جهش زایی غیرهدف با استفاده از سیستم CRISPR-Cas9
۲۲۷	استفاده جایگزین از سیستم CRISPR-Cas9
۲۲۹	استفاده از فناوری CRISPR-Cas9 در موجودات مدل
۲۳۰	تولید سلول های بتا (β) از سلول های بنیادی پلوریپوتنت انسانی برای درمان دیابت
۲۳۴	نتیجه گیری

۲۳۶	منابع
۲۵۳	فصل نهم
	ویرایش ژنومی در شبکه‌ی چشم: مطالعات CRISPR انجام شده برای بیماران وراثتی
۲۵۳	تحلیل تدریجی شبکه‌ی
۲۵۳	خلاصه
۲۵۴	تحلیل تدریجی شبکه‌ی
۲۵۵	مکمل‌سازی ژن
۲۵۶	روش‌های ژن درمانی با ویروس
۲۵۶	آدنوویروس‌ها
۲۵۷	ویروس‌های مرتبط با آدنو
۲۵۹	ویروس‌های RNA دار
۲۶۰	تصحیح و ترمیم ژن
۲۶۱	تداخل ریبوزایم
۲۶۱	ژن درمانی آنتی‌سنس
۲۶۲	ژن درمانی آنتی‌آپوپتوز
۲۶۲	پیشرفت‌های اخیر: CRISPR و TALEN, ZFN
۲۶۳	نوکلئازهای انگشت روی (ZFN)
۲۶۴	نوکلئازهای افکتور شبه فعال‌کننده رونویسی (TALEN)
۲۶۵	خوشه‌های منظم درون پالیندروم‌های تکراری کوتاه (CRISPR)
۲۶۶	مطالعه موردی از آزمایشگاه تا بالین بیمار: روش، جهش غالب اتوزومی RP D190N
۲۶۹	نتیجه‌گیری
۲۷۰	منابع

پیشگفتار مترجمان

بیوتکنولوژی و مهندسی ژنوم از شاخه‌های علوم زیست‌شناسی نوین محسوب می‌شود که در دو دهه اخیر پیشرفت‌های چشمگیری در آن صورت پذیرفته است. مهندسی ژنوم بواسطه کاربردهای مختلفی که در علوم پایه، کشاورزی، پزشکی و داروسازی داشته است از توجه ویژه‌ای برخوردار است. وجود چنین کاربرد گسترده و نیاز به کسب آگاهی بیشتر، ما را بر آن داشت تا به سبکی شیوا ترجمه کتاب پیش رو تحت عنوان *Editing Genome* نوشته کورساد تورکسن که در سال ۲۰۱۶ به چاپ رسیده است را بر عهده بگیریم.

به جرات می‌توان ابراز نمود کتاب حاضر نخستین ترجمه از معرفی و کاربرد روش‌های نوین مهندسی ژنومی در کشور عزیزمان ایران می‌باشد که می‌تواند مورد استفاده دانشجویان و اساتید رشته‌های مختلف علوم زیستی، کشاورزی، پزشکی و داروسازی قرار گیرد. علی‌رغم دقت و تلاش همه جانبه در ترجمه این کتاب، با این وجود هیچ اثری عاری از اشتباه نمی‌باشد، لذا از همه دانشجویان، اساتید و پژوهشگران در حوزه‌های آموزشی و پژوهشی تقاضا می‌شود در صورت مشاهده هرگونه کاستی و ایراد، ما را در ارائه هرچه بهتر نگارش‌های آتی یاری نمایند.

با تشکر

گروه مترجمان

فصل اول

ویرایش ژنومی با آنزیم‌های نوکلئاز هدفمند

خلاصه

در دهه‌های اخیر، مهندسی ژنومیک متکی به تکنیک‌هایی بود که نیازمند سال‌ها زمان و همچنین ساخت سازواره‌های بزرگ و پیچیده DNA مانند نشانگرهای انتخابی بود و فقط برای چند گونه مورد استفاده قرار می‌گرفت. با این حال، سهولت و کارایی فناوری‌های فعلی برای ویرایش ژنوم بی‌سابقه است. با ظهور آنزیم‌های نوکلئاز هدفمند، از جمله تکنولوژی کریسپر کاس ۹ (CRISPR-Cas9)، ژنوم‌های همه گونه‌ها اکنون به راحتی قابل ویرایش هستند. این پیشرفت فرصت‌های بی‌شماری را فراهم کرده است که نه تنها به درک ما از عملکردهای ژنی و مکانیزم‌های بیماری کمک می‌کند، بلکه باعث شناسایی جهش‌های بیماری‌زا، اصلاح محصولات کشاورزی و دام، و شاید سبب اصلاح محیط‌زیست ما گردد. این فصل در مورد پیشرفت‌های فناوری ویرایش ژنومی و کاربردهای آن در زمان حال و آینده بحث می‌کند.

مقدمه

فناوری‌های دستکاری ژنوم طی چند سال گذشته به طرز چشم‌گیری بهبود یافته است. طی چندین دهه، محققان به منظور شناسایی یا اصلاح تغییرات DNA در جایگاه‌های ژنومی خاص، بر توالی‌های همسان نوترکیب (HR)^۱ متکی بودند، که یک رخداد طبیعی و نادر می‌باشد. 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 ارگانسیم‌ها و در نتیجه نیاز به سازواره‌های بزرگ و 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 پایانه‌های DNA دورشته‌ای، که حاصل از قطعات DNA دورشته‌ای اند (DSBs)^۲، قابلیت نوترکیبی بسیار بالایی دارند (۱). ویژگی پایانه‌های DNA دورشته‌ای باعث شد تا محققان بررسی کنند آیا قرار دادن داوطلبانه یک DNA دورشته‌ای (DSBs) در یک جایگاه اختصاصی در یک ژنوم باعث افزایش همسان‌های نوترکیب در همان جایگاه یا جایگاه‌های نزدیک آن می‌شود یا خیر. برای این منظور چندین گروه از محققین از استراتژی دو مرحله‌ای استفاده کردند به این صورت که در مرحله اول، یک جایگاه برشی مگانوکلاز^۳ توسط همسان‌های نوترکیب با فراوانی اندک درج گردید و مرحله بعد یک DNA دورشته‌ای (DSBs) بوسیله بیان یک مگانوکلاز همجنس درج می‌گردد. آن‌ها دریافتند که درج داوطلبانه DNA دورشته‌ای (DSBs) در هر جایگاه خاص، سبب افزایش چندین برابر میزان همسان‌های نوترکیب و جایگزینی ژن می‌شود (۲، ۶). با این وجود، استراتژی دو مرحله‌ای که در این مطالعات استفاده شده بود، امکان برنامه‌ریزی مجدد نوکلئاز را نداشت و به طور قابل توجهی استفاده از این استراتژی را برای ویرایش ژنومی محدود می‌کرد.

1-Homologous Recombination (HR)

2- DNA Double-Strand Breaks (DSBs)

^۳ - مگانوکلازها (Meganucleases): گروهی از اندوریبونوکلاز هستند که به توالی‌های ۱۲ تا ۴۰ جفت بازی DNA دورشته‌ای متصل شده و آن‌ها را برش می‌زنند

به دنبال یک روش انعطاف‌پذیرتر جهت درج قطعات DNA دورشته‌ای (DSBs) به درون ژنوم، گروه کارول، استفاده از یک کلاس جدید از آنزیم‌های اندونوکلازای مصنوعی به نام آنزیم‌های نوکلئاز انگشت روی (ZFNS)^۱ را مورد بررسی قرار دادند (۷، ۹). این نوکلئازها به صورت دایمر به DNA های یوکاریوتی متصل می‌شوند. پروتئین‌های انگشت روی (ZFPs)^۲ سبب هدایت فعالیت کاتالیزوری آنزیم‌های غیراختصاصی Fok1 به درون ژنوم می‌شوند (۱۰، ۱۱، ۱۴). برخلاف مگانوکلازها که توالی‌های از پیش تعریف شده DNA را تشخیص می‌دهند، آنزیم‌های نوکلئاز انگشت روی (ZFNS) می‌توانند با تغییر پروتئین‌های انگشت روی (ZFPs) برای هدف قرار دادن هر مکان مورد نظر درون ژنوم، مجدداً برنامه‌ریزی شوند. مهمتر اینکه استفاده از ZFN ها می‌توانند جایگزینی جایگاه اختصاصی ژن بوسیله همولوگ‌های نو ترکیب را چندین برابر بهبود بخشند (۹، ۱۵). با این حال، به دلیل پیچیدگی‌های موجود در طبیعت مانع از پذیرش گسترده بکارگیری از ZFN ها توسط جامعه علمی شده است (۱۶). یک دهه پس از اینکه ZFN ها به عنوان ابزارهای ویرایش ژنومی بکار گرفته شدند، کلاس دیگری از نوکلئازهای هدفمند توسعه یافتند. همانند ZFN ها، اندونوکلازهای شبه فعال موثر در رونویسی (TALENs)^۳ که حاصل از امتزاج پروتئین‌های متصل شونده به DNA و دامین کاتالیزوری Fok1 می‌باشد، در ویرایش ژنومی بکار گرفته شدند (۱۷، ۱۸). همچنین این آنزیم‌ها به عنوان دایمرها عمل می‌کنند و DNA را به طور موثر می‌شکنند تا بتوانند ویرایش ژنومی را فعال کنند و می‌توانند به صورت هدفمند درون ژنوم قرار گیرند (۱۹). همچنین به دلیل همسانی توالی بین تکرارها، سادگی و قابل پیش‌بینی بودن کدهای TALE، برنامه‌ریزی مجدد این اندونوکلازها را امکان‌پذیر می‌سازد. ژینک و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان دادند سیستم کریسپر کاس ۹ (CRISPR-Cas9)^۴ (خوشه‌های منظم بین پالیندروم‌های تکراری کوتاه - کریسپر یار ۹)، در باکتری

^۱- Zinc-Finger Nucleases (ZFNS)

^۲- Zinc-Finger Proteins (ZFPs)

^۳- Transcription Activator-Like Effector endonucleases (TALENs)

^۴- Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR) - CRISPR-associated 9 (Cas9)

استرپتوکوکوس پایوژنز^۱ که برای مهندسی ژنومی سازگار شده است، می‌تواند جرقه انقلاب عظیمی در ویرایش ژنومی پدید آورد. سیستم CRISPR-Cas9 جهت انجام ویرایش ژنومی دارای یک مولکول RNA کوچک تک‌رشته‌ای به نام "RNA راهنما" (sgRNA)^۲ و یک آنزیم اندونوکلئاز غیراختصاصی به نام Cas9 می‌باشد (۲۰). RNA کوچک تک‌رشته‌ای با Cas9 یک کمپلکس تشکیل می‌دهد و اتصال بازهای RNA راهنما به توالی ژنوم هدف طبق مدل واتسون و کریک انجام می‌پذیرد. مکانیسم سیستم کریسپر در مقایسه با ZFNها و TALENها، که نیازمند به برنامه‌ریزی مجدد کامل آنزیم‌ها هستند، تنها با یک تغییر ساده در RNA راهنما باعث می‌شود تا با برنامه‌ریزی مجدد Cas9 به هر نوع توالی هدف متصل گردد (۲۰، ۲۲). سادگی برنامه‌ریزی مجدد سیستم CRISPR-Cas9، کارآیی بالا و قابلیت چندگانه آن، این تکنولوژی را به خط مقدم ویرایش ژنومی تبدیل کرده است. آیا این فن‌آوری می‌تواند فراتر رود؟

در مطالعه‌ای که اخیراً صورت گرفته است یک سیستم طبقه‌بندی جدید کلاس ۲ کریسپر شناسایی شد. در سیستم *Francisella novicida* U112 به دلیل داشتن برخی ویژگی‌ها، کمی از سیستم CRISPR-Cas9 متمایز است و می‌تواند به عنوان یک سیستم ویرایش ژنومی مورد استفاده قرار گیرد (۲۳). در این فصل به طبقه‌بندی‌های مختلف آنزیم‌های هدفمند نوکلئاز و توصیف کاربردهای آن‌ها به عنوان ابزار ویرایش ژنومی می‌پردازد.

آنزیم‌های نوکلئاز انگشت روی (ZFNs)

ZFNها اندونوکلئازهای مصنوعی شیمیری هستند که از ترکیب انواع فاکتورهای نسخه‌برداری (TFs)^۳ متصل شونده به DNA شامل: پروتئین‌های انگشت روی (ZFPs) و دامین کاتالیزوری FokI حاصل شده‌اند (شکل ۱). در مقایسه با سایر اندونوکلئازهای معمول نوع II که DNA را در داخل یا نزدیک به سایت‌های اتصال آن‌ها برش می‌زنند، FokI یک

^۱- *Streptococcus pyogenes*

^۲- single guide RNA (sgRNA)

^۳- Transcription Factors (TFs)

نوع اندونوکلئاز نوع IIS است که DNA را دقیقاً از محل اتصال به سایت برشی آن جدا می‌کند (۱۱، ۱۴). در Fok1، دامین متصل شونده به DNA و دامین دارای خاصیت نوکلئازی را می‌توان به صورت فیزیکی از هم جدا نمود (۱۴، ۲۴، ۲۶)، که این ویژگی اجازه تلفیق دامین کاتالیزوری Fok1 را با سایر دامین‌های متصل شونده به DNA مانند ZFPها یا TALEها می‌دهد. Fok1 برای اعمال فعالیت کاتالیزوری نیازمند دایمیریزاسیون^۱ (دو بخشی شدن) می‌باشد (۸). تنها دو زیرواحد کاتالیزوری Fok1 برای دایمیریزاسیون و جلوگیری از برش تصادفی DNA کافی نیست. بوسیله دامین‌های متصل شونده به DNA مانند ZFPها، TALEها یا پروتئین‌های Cas، دو زیر واحد Fok1 به هر جایگاه در ژنوم متصل می‌شوند، که سبب شناسایی دو جایگاه اتصال مجاور می‌گردند (۸). جهت دایمیریزاسیون زیر واحدهای کاتالیزوری، فاصله مناسب بین دو جایگاه اتصال لازم است (شکل ۱) (۸، ۱۹، ۲۷). در ZFNها، توالی هدف توسط دامین‌های ZFP شناسایی می‌شوند. ZFPها دامین‌های متصل شونده به DNA هستند که ابتدا در فاکتورهای نسخه‌برداری (TFs) یوکاریوتی شناسایی شدند (۲۸، ۲۹). ZFPها شامل آرایه‌های پشت سرهم انگشت‌های Cys2-His2^۲ است که هر حلقه دارای یک یون روی (II)^۳ جهت تشکیل دامین متصل شونده به DNA می‌باشد. ZFPها به درون شیار بزرگ DNA دورشته‌ای مارپیچ آلفا متصل می‌شوند و هر انگشت تقریباً ۳ جفت باز از توالی ژنوم DNA هدف را شناسایی می‌کند (۳۰، ۳۱). تعداد سه انگشت یا بیشتر جهت اتصال به ژنوم DNA کافی می‌باشد، و ZFNها با سه تا شش انگشت به طور کلی برای شناسایی DNA دورشته‌ای شکسته (DSBs) 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 دربرمی‌گیرند. این نوع ترتیب آرایش قرارگیری، خاصیت منحصر به فردی را پدید می‌آورد، به خصوص با توجه به این که، توالی ۱۸ جفت بازی کمتر از یک بار در ژنوم

^۱- Dimerization

^۲- Cys2-His2 Fingers

^۳- Zinc (II) Ion

انسان پیش‌بینی می‌شود. آرایه‌های پشت سرهم تکراری از انگشت‌ها از انتهای ۳' به انتهای ۵' به DNA متصل می‌شوند (شکل ۱) (۳۰). جهت انجام دایمریزاسیون زیرواحدهای کاتالیزوری FokI، توالی‌های مقابل DNA که توسط جفت ZFN‌ها شناسایی شده‌اند، باید بوسیله یک فاصله دهنده ۵ تا ۶ جفت بازی جدا شوند (۹، ۳۲، ۳۴). یکی از موانع اصلی در استفاده از ZFN‌ها به عنوان ابزار ویرایش ژنومی حساسیت آن‌ها به تاثیرات محیط بر DNA هدف، جهت اتصال می‌باشد (۳۵، ۳۶).

روش‌های مونتاژ ماژول‌ها (بخش‌های کوچک)^۱ و روش‌های انتخاب ترکیبی^۲ 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 متصل شونده به DNA بصورت اختصاصی ایجاد می‌شود (۳۷، ۴۱). اما با توجه به سادگی این روش‌ها به دلیل کارایی ضعیف ZFN‌ها و سمیت بالا به عنوان یک فاکتور مستقل محسوب نمی‌شوند (۴۲، ۴۴). برای اینکه به عنوان یک فاکتور مستقل محسوب گردند، باید جفت انگشت‌های روی که به خوبی با هم کار می‌کنند مشخص شده و برای روش‌های مونتاژ ماژول‌ها مورد استفاده قرار گیرند (۴۵، ۴۸). تغییراتی مانند قرار دادن توالی کوتاه یا بلند بین انگشتان روی، می‌تواند سبب تبدیل روش‌های مونتاژ ماژول‌ها به اصلاح برای فرم B DNA یا جفت بازها گردد (۴۹). روش‌های انتخاب ترکیبی شامل جستجوی تصادفی از کتابخانه‌های بزرگ می‌باشد، جهت انتخاب ZFP‌هایی با قابلیت اتصال و تخصصی بودن بالا به توالی DNA (۵۰، ۵۱). اگرچه این استراتژی‌ها ZFN‌هایی را با فعالیت‌های بالا و سمیت کم مشخص می‌کند، اما نیازمند آزمایشگاه‌های بسیار تخصصی می‌باشد (۴۳، ۴۴).

چندین وب سایت جهت کمک به طراحی و انتخاب جفت‌های ZFN مورد استفاده قرار می‌گیرند از قبیل:

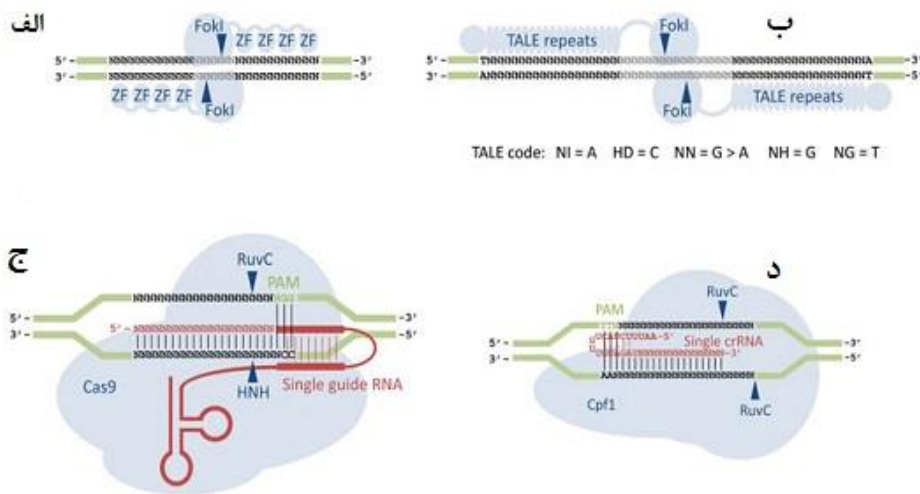
- سایت الگوریتم ZFN‌های هدف:

¹- Modular Assembly Methods

²- Combinatorial Selection Methods

(<http://mccb.umassmed.edu/ZFPmodularsearch.html>)

- ابزار انگشت روی: (<http://www.scripps.edu/barbas/zfdesign/zfdesignhome.php>)
- ZiFit (<http://zifit.partners.org/ZiFiT>)
- سایت انگشت روی: (<http://ccg.vital-it.ch/tagger/targetsearch.html>)



شکل ۱- طرح کلی آنزیم‌های نوکلئاز هدفمند جهت ویرایش ژنومی

الف طرح کلی آنزیم نوکلئاز انگشت روی (ZFN)، هر کدام حاوی چهار پروتئین روی (ZF) که یک توالی هدف با طول ۱۲ نوکلئوتید را شناسایی می‌کند. جایگاه هدف ZFN حاوی دو انگشت روی که بوسیله ۵ تا ۷ نوکلئوتید از هم فاصله گرفته‌اند برای فعال‌سازی دایمیرزاسیون FokI. ZFNها وارونه به توالی DNA متصل می‌شوند. ناحیه N-terminal پروتئین ZF، توالی سه‌تایی ۳' را شناسایی می‌کند. (ب) طرح کلی یک جفت TALEN، هر یک شامل یک آرایه دارای ۲۰ تکرار TALE می‌باشد که یک توالی هدف ۲۰ نوکلئوتیدی را شناسایی می‌کند. جایگاه هدف TALEN دارای دو جایگاه اتصال می‌باشد که توسط یک بخش ۱۲ تا ۲۰ نوکلئوتیدی جهت قرار دادن توالی مضاعف TALEN در ناحیه C-terminal و دایمیرزاسیون FokI جدا شده‌اند. برخلاف ZFNها که از جهت ۳' به ۵' به

DNA متصل می‌شوند، TALEN‌ها در جهت ۵' به ۳' با بیشترین تکرار شناسایی در ناحیه N-terminal و در انتهای ۵' اختصاصیت تکرارهای TALE بوسیله تکرارهای دوتایی متغیر در موقعیت ۱۲ و ۱۳ از تعداد ۳۵ آمینواسید تکرارهای TALE حاصل می‌شود. چهار تکرارهای دوتایی متغیر مانند: NI، HD، NN و NG معمولا مورد استفاده قرار می‌گیرند که به ترتیب آدنین (A)، سیتوزین (C)، گوانین (G) و تیمیدین (T) را شناسایی می‌کنند. علاوه بر تکرارهای TALE، جهت شناسایی توالی هدف DNA نیازمند توالی‌های پروتئین دیگری نیز می‌باشد. در ناحیه N-terminal دو تکرار شناسایی کوچک و یک تیمیدین در موقعیت صفر واقع شده‌اند. ج) طرح کلی سیستم CRISPR-Cas9 جهت ویرایش ژنومی به‌مراه DNA هدف. Cas9 یک اندونوکلاز است که حاوی RuvC و فعالیت نوکلئازی HNH می‌باشد. RNA راهنما (قرمز رنگ) یک مولکول RNA مصنوعی است که با استفاده از ترکیب crRNA با tracrRNA بوسیله یک RNA کوچک لینکر تشکیل شده است. کمپلکس اندونوکلاز RNA-Cas9 با توالی هدف DNA به نام protospacer در تعامل است. در ابتدا توالی کوچکی از DNA هدف به نام PAM که دقیقا در پایین دست توالی protospacer واقع شده است را شناسایی می‌کند. تغییرات در فعالیت RuvC یا نوکلئاز HNH می‌تواند SpCas9 را به یک نوکلئازی تبدیل کند که می‌تواند فعالیت غیرهدف را کاهش دهد. د) طرح کلی سیستم CRISPR-FnCpf1 جهت ویرایش ژنومی به‌مراه DNA هدف. FnCpf1 یک آنزیم نوکلئاز دارای دو دامین نوکلئازی RuvC-like می‌باشد. برخلاف SpCas9 که نیازمند دو مولکول RNA کوچک می‌باشد، FnCpf1 جهت فعالیت نیازمند یک مولکول کوچک crRNA می‌باشد. همانند SpCas9 نوکلئاز FnCpf1 نیز برای فعالیت نیازمند توالی PAM می‌باشد. در هر صورت، توالی PAM بلافاصله در موقعیت ۵' توالی protospacer واقع شده است و Cpf1 توالی DNA هدف را در انتهای ۳' protospacer برش می‌زند. علاوه بر این برخلاف SpCas9 که توالی هدف را بصورت انتهای صاف (Blunt Ends) برش می‌زند، FnCpf1 توالی هدف را در ناحیه ۵' بصورت ۴ تا ۵ نوکلئوتید آویزان تولید می‌نماید.

اندونوکلئازهای شبه فعال موثر در رونویسی (TALENs)

همانند ZFNها، TALENها اندونوکلئازهای مصنوعی هستند که از دامین اتصال دهنده TALE به عنوان واحدهای متصل شونده به DNA و از اندونوکلئاز Fok1 به عنوان زیرواحدهای کاتالیزوری استفاده می‌کنند. همانطور که قبلاً ذکر شد، Fok1 به عنوان یک دایمر عمل می‌کند و باید دو زیرواحد TALE-Fok1 در هر جایگاه در کنار یکدیگر قرار گیرند تا فرایند برش DNA صورت پذیرد. این فرایند بواسطه دامین‌های TALE متصل شونده به DNA صورت می‌پذیرد، این دامین‌ها دو توالی مجاور و معکوس DNA که توسط توالی‌های ۱۲ تا ۲۰ جفت‌بازی جدا شده‌اند را برای دایمریزاسیون اندونوکلئاز Fok1 طراحی می‌کند (۱۹).

TALENها، فاکتورهای نسخه‌برداری (TFs) هستند که توسط باکتری‌های گیاهی گرم 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 میزبان را تنظیم می‌کند. TALENها شامل: یک دامین N-terminal حاوی یک سیگنال ترانسلوکیشن نوع III^۱، یک ناحیه مرکزی حاوی توالی‌های تکرارهای^۲ مسئول اتصال TALEهای متصل شونده به توالی DNA گیاهی و یک دامین C-terminal حاوی سیگنال‌های تعیین محل هسته‌ای^۳ و دامین فعال‌سازی نسخه‌برداری^۴ می‌باشد (۵۲). ترکیب اندونوکلئاز Fok1 با بخش تغییر یافته پایانه C از ناحیه N-terminal دامین TALE، چارچوب تولید TALENها را فراهم کرده است (۱۹).

برخلاف ZFPها که در آن هر انگشت تقریباً توالی ۳ جفت‌بازی DNA هدف را شناسایی می‌کند، هر تکرار TALE که از ۳۳ تا ۳۵ آمینواسید تشکیل شده است، فقط یک جفت‌باز از ژنوم هدف را شناسایی می‌کند (۵۳، ۵۴). تکرارهای TALE از نظر توالی بسیار شبیه به یکدیگرند و بویژه اینکه در هر تکرار یک جفت‌باز آمینو مجاور، چیدمان شده

¹- Type III Translocation Signal

²- Tandem Repeats

³- Nuclear Localization Signals

⁴- Transcriptional Activation Domain

است (۵۵، ۵۶). این اسید آمینه‌ها به عنوان "تکرارهای تغییرپذیر آزاد دوتایی (RVD)"^۱ نامیده می‌شوند و کد تکراری TALE را مشخص می‌کنند. چهار عبارت پر تکرار مانند NI، HD، NN و NG معمولاً مورد استفاده قرار می‌گیرند که به ترتیب آدنین (A)، سیتوزین (C)، گوانین (G) و تیمیدین (T) را شناسایی می‌کنند (۵۷، ۶۰). همچنین تکرارهای تغییرپذیر دوتایی دیگری، با قابلیت تخصصی بودن بیشتر نیز گزارش شده است (۱۹، ۵۳، ۵۹، ۶۱). با این وجود، آرایه‌های حاوی برخی از این RVDهای جایگزین نیز می‌توانند فعالیت‌های کمتر داشته باشند (۵۹، ۶۱).

برخلاف ZFNها، که نیازی به بخش‌های پروتئینی اضافی برای فعالیت ندارند، TALENها علاوه بر تکرار TALE، نیازمند برخی از توالی‌های پروتئینی در انتهای هر تکرار می‌باشند. اگرچه چندین چارچوب برای توسعه TALENها به عنوان یک ابزار ویرایش ژنومی استفاده شده است، به نظر می‌رسد همه آن‌ها ویژگی‌های مشابهی داشته باشند. یکی از ویژگی‌های مهم، حضور دو تکرار کوچک که از لحاظ ساختاری مشابه اما از لحاظ توالی با تکرارهای TALE متمایز است. این تکرارها تیمیدین را، در موقعیت شروع توالی DNA هدف TALE، تشخیص می‌دهند و به عبارت دیگر، هر توالی هدف TALEN باید با T شروع شود (۵۵). اگرچه فقط ۱۰ تا ۱۲ تکرار TALE برای اتصال به ژنوم هدف لازم است، اما تعداد ۱۵ تا ۲۱ تکرار TALE معمولاً هدف‌گیری، اختصاصیت و تمایز ویژه‌ای را برای TALEN جهت انجام ویرایش ژنومی پدید می‌آورد. همانطور که در ZFNها دیده می‌شود، فعالیت برش DNA توسط TALENها نیز تحت تأثیر شرایط اپی‌ژنتیکی قرار می‌گیرد، به ویژه از طریق متیلاسیون^۲ سیتوزین در شرایط طبیعی (۶۲). استراتژی‌هایی برای غلبه بر این محدودیت‌ها توسعه یافته است، از جمله این استراتژی‌ها، مهار شیمیایی متیل ترانسفرازهای DNA^۳ یا استفاده از TALEهای جایگزین که سبب حفظ آسپارژین در جایگاه ۱۲ و حذف آن در جایگاه ۱۳ توالی هدف می‌شوند (۶۲، ۶۳).

¹- Repeat Variable Di-residue (RVD)

²- Methylation

³- DNA methyltransferases

سادگی کدهای TALE نشان دهنده پیشرفته بودن بیشتر در سیستم تشخیص توالی DNA هدف نسبت به ZFNهاست. با این وجود انجام چندین کلونینگ از تکرارهای TALE به دلیل شباهت توالی آنها چالش برانگیز بوده است. برای فائق آمدن بر این محدودیت، تلفیق چندین استراتژی مانند: کلونینگ فاز جامد^۱، اتصال مستقل^۲ و اتصال وابسته^۳ برای ساخت تکرارهای TALE بسیار تخصصی، ایجاد شده است (۶۴، ۶۵، ۶۶، ۶۷). چندین وب سایت جهت کمک به طراحی و انتخاب جفت‌های TALE مورد استفاده قرار می‌گیرند شامل:

- TAL Effector Nucleotide Targeter 2.0 (<https://tale-2.0.cac.cornell.edu>)
- الگوریتم امتیازدهی برای پیش‌بینی فعالیت TALEN (http://baolab.bme.gatech.edu/Research/BioinformaticTools/TAL_targeter.html)
- TALEffectors (<http://www.genome-engineering.org/taleffectors>)
- E-TALEN (<http://www.e-talen.org/E-TALEN>)
- CHOPCHOP (<https://www.chopchop.rc.fas.harvard.edu>)
- TALENdesigner (<http://www.talen-design.de>)
- ZiFit (<http://www.zifit.partners.org/ZiFiT>)
- MojoHand (<http://www.talendesign.org>)

نوکلئازهای هدایت‌کننده RNA^۴

باکتری‌ها و آرکی‌باکتری‌ها یک نوع سیستم ایمنی اکتسابی را اتخاذ نموده‌اند، به این صورت که قطعه‌هایی از DNA فازها یا پلاسمیدهای مهاجم را دریافت نموده و آنها را درون ژنوم خود ادغام می‌کنند و به عنوان یک مکانیسم دفاعی در آینده بکار می‌گیرند. این قطعات کوچک

¹- Solid-phase Cloning

²- Ligation-independent

³- Ligation-dependent

⁴- RNA-Guided Nucleases

DNA که معمولاً ۲۰ تا ۵۰ نوکلئوتید طول دارند، در داخل ژنوم باکتری‌ها و آرکی‌باکتری‌ها در میان عناصر فاصله‌دهنده^۱ با طول مشابه قرار می‌گیرند (۶۸). این توالی‌ها "خوشه‌های منظم بین پالیندروم‌های کوتاه تکراری" نام دارند، زیرا آن‌ها در خوشه‌های کوچکی درون ژنوم میزبان گنجانده شده‌اند. باکتری‌ها و آرکی‌باکتری‌ها پس از اینکه برای دومین بار توسط همین فاز یا فازهای یک خانواده مشابه (یا دیگر DNAهای مهاجم) آلوده شدند، RNAهای کوچک تولید شده از این خوشه‌ها با کمک یک اندونوکلاز به نام Cas سبب هضم ژنوم فاز مهاجم می‌شوند. از میان چندین سیستم کریسپر مختلف شناخته شده در باکتری‌ها و آرکی‌باکتری‌ها، سیستم کریسپر نوع II^۲ به عنوان ابزاری برای ویرایش ژنومی سازگاری یافته است (۲۰، ۶۹، ۷۰).

سیستم کریسپر نوع II دارای سه بخش می‌باشد. بخش اول، یک رونوشت RNA، به نام کریسپر RNA (crRNA)^۳ می‌باشد که از آرایه CRISPR تولید می‌شود و این رونوشت RNA حاوی یک فاصله‌دهنده و یک توالی تکراری می‌باشد. بخش دوم، یک رونوشت RNA کد شده به نام ترانس فعال‌سازی crRNA (TracrRNA)^۴ است که دارای توالی مکمل با توالی تکراری رونوشت crRNA می‌باشد. سومین بخش اندونوکلاز Cas9 می‌باشد، که متشکل از دو دامین نوکلئاز است شامل: یک دامین مشابه RuvC^۵ در نزدیکی N-terminal پروتئین و یک دامین نوکلئازی HNH در وسط پروتئین (۲۰). هر سه بخش تشکیل یک کمپلکس ریبونوکلیک می‌کند که توالی خاصی از DNA ژنومی را شناسایی نموده و به نام عناصر پروتئین فاصله‌دهنده^۶ نامیده می‌شوند که توسط فاصله‌دهنده crRNA تعیین شده‌اند. تشکیل ساختار هیبرید DNA-RNA بین crRNA و protospacer سبب برش توالی DNA هدف می‌شود (۲۰). توالی‌هایی که نقش اندونوکلاز Cas را ایفا می‌کنند،

^۱- Spacer Elements

^۲- Type II CRISPR-Cas System

^۳- CRISPR RNA (crRNA)

^۴- trans- activating crRNA (TracrRNA)

^۵- RuvC-like Domain

^۶- Protospacer Elements

نیازمند به یک توالی به نام موتیف مجاور protospacer (PAM)^۱ می‌باشند. PAM که یک توالی کوتاه DNA است که بلافاصله پایین‌دست ناحیه ۳' عنصر protospacer واقع شده است (۲۰، ۷۱، ۷۳). به عنوان مثال آنزیم اندونوکلئاز در باکتری *استریتوکوکوس پایوژنز* (SpCas9)^۲ نام دارد که برای انجام فعالیت مطلوب نیازمند یک توالی ۳'-NGG-۵' می‌باشد (N هر کدام از ۴ نوع نوکلئوتید می‌تواند باشد) (۷۴). نوعی از توالی‌ها مانند (۳'-NAG-۵') سبب کاهش فعالیت می‌شوند در حالی که هر ترکیب سه‌گانه دیگر غیر از این توالی محدودیتی در فعالیت حاصل نمی‌نماید (۷۴). وجود توالی PAM برای چندین نوع از سیستم CRISPR- Cas شرح داده شده است که برخی از آن‌ها برای ویرایش ژنومی سازگار شده‌اند (جدول ۱) (۷۳، ۷۵، ۸۰).

جدول ۱- انواع توالی PAM مورد نیاز برای سیستم کریسپر که برای ویرایش ژنومی سازگار شده‌اند

شماره منبع	ارگانیسم	توالی PAM
۷۴	<i>Streptococcus pyogenes</i>	NGG
۸۱	<i>Streptococcus pyogenes</i> (VQR variant)	NGAG
۸۱	<i>Streptococcus pyogenes</i> (VRER variant)	NGCG
۷۹	<i>Streptococcus mutans</i>	NGG
۲۴۶-۸۱	<i>Staphylococcus aureus</i>	NNGGGT
		NNGAAT
		NNGAGT
۷۳-۷۶ ۸۰	<i>Streptococcus thermophilus</i> (CRISPR3)	NGGNG

^۱ Protospacer-Adjacent Motif (PAM)

^۲ *S. pyogenes* Cas9 (SpCas9)

۷۶	<i>Streptococcus thermophilus</i> (CRISPR1)	NNAAAAW
۷۶	<i>Campylobacter jejuni</i>	NNNNACA
۷۸-۷۷	<i>Neisseria meningitidis</i>	NNNNGATT
۷۶	<i>Pasteurella multocida</i>	GNNNCNNA
۷۶	<i>Francisella novicida</i>	NG
۷۵	<i>Treponema denticola</i>	NAAAAAN

علاوه بر این، با استفاده از اطلاعات ساختاری و طراحی ترکیبی، آنزیم اندونوکلئاز SpCas9 دچار تغییراتی شد تا توانایی شناسایی توالی‌های جایگزین PAM را دارا باشد و به طور قابل توجهی طیف وسیعی از توالی‌ها را برای ویرایش ژنوم مورد استفاده قرار دهد (۸۱). در مجموع، اندونوکلئاز Cas9 از انواع گونه‌های مختلف، قادرند تقریباً تمام نوکلئوتیدهای ژنوم را تحت پوشش قرار دهند. رایج‌ترین سیستم CRISPR-Cas9 برای ویرایش ژنومی از باکتری/سترپتوکوکوس پایوژنز استفاده می‌شود. سیستم سه جزئی ساده با اتصال crRNA و tracrRNA به sgrRNA تشکیل می‌شود (۲۰). تغییرات ساده توالی راهنما درون مولکول sgrRNA کافیسیت، تا اندونوکلئاز SpCas9 را برای هدف قرار دادن هر بخش از ژنوم مستعد سازد.

سیستم CRISPR-Cas9 مزایای متعددی نسبت به سیستم ZFN و TALEN به عنوان ابزاری برای ویرایش ژنومی دارند. اولاً، سیستم‌های CRISPR-Cas9 بر پایه یک اندونوکلئاز ثابت هستند و بنابراین نیازی به برنامه‌ریزی مجدد ندارند. برنامه‌ریزی مجدد سیستم‌های CRISPR-Cas9 نیازمند به طراحی و تولید یک sgrRNA جدید می‌باشد. ثانیاً، سادگی این سیستم فرصتی را برای کاربرد گسترده و چندگانه در ژنوم فراهم می‌کند. انتقال sgrRNAهای 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 بقا سلول و مقاومت به دارو، در شرایط آزمایشگاهی و همچنین

ژن‌های حیاتی در رشد تومور و متاستاز در شرایط *in vivo* دسترس قرار دارند (۸۲، ۸۹، ۹۰). یکی دیگر از مزیت‌های تکنولوژی CRISPR-Cas9 نسبت به ZFN و TALEN، توانایی آن در برش دادن DNA ژنومی بدون توجه به وضعیت اپی‌ژنتیکی آن می‌باشد (۷۴، ۹۱). در نهایت اینکه، تفاوت مکانیسم CRISPR-Cas9 نسبت به ZFN و TALEN در این است که، اندونوکلئاز SpCas9 توالی DNA را به صورت دقیق در جایگاه اتصال توالی هدف برش می‌زند (۲۰). در نهایت توالی DNA دورشته‌ای برش یافته توسط مکانیسم ترمیم کروموزوم مانند: نوترکیبی همسان (HR)^۱ یا اتصال پایانه ناهمسان (NHEJ)^۲، محل برش توالی هدف را تغییر می‌دهد و مانع اتصال و برش مجدد اندونوکلئاز Cas9 می‌شود. این ویژگی CRISPR-Cas9 یک مزیت قابل توجه برای ویرایش ژنوم توسط هومولوگ‌های نوترکیب می‌باشد.

شناسایی دقیق توالی هدف، جهت استفاده موفق به عنوان ابزار ویرایش ژنومی بسیار حائز اهمیت می‌باشد. بنابراین، انتخاب sgRNA نقش مهمی در پاکسازی جهش‌ها^۳ دارد. مطالعات متعدد نشان داده است که اندونوکلئاز SpCas9 می‌تواند سبب تحمل به mismatchها^۴ (عدم اتصال دقیق نوکلئوتیدی)، برآمدگی RNA^۵ (یک نوکلئوتید جفت نشده در یک رشته)، و برآمدگی DNA بین توالی راهنمای crRNA و توالی هدف شود (۲۰، ۲۱، ۷۴، ۹۲، ۹۵). اگرچه قوانین ساده و معینی برای نحوه فعالیت آنزیم اندونوکلئاز SpCas9 وجود ندارد، ولی مطالعات نشان داده‌اند که تعداد و موقعیت mismatchها در توالی PAM بسیار حائز اهمیت می‌باشند. mismatchهای دوپلکس DNA-RNA مانند: برآمدگی‌های DNA و RNA که در نزدیکی توالی PAM قرار دارند، فعالیت آنزیم اندونوکلئاز Cas9 را مختل می‌کنند، در حالیکه mismatchهای واقع شده در محل‌های خارج از توالی هدف را می‌تواند بهتر تحمل کند. اگرچه mismatchهای تک نوکلئوتیدی

^۱- Homologous Recombination (HR)

^۲- Non Homologous End-Joining (NHEJ)

^۳- Tailoring Mutations

^۴- Tolerate Mismatches

^۵- RNA Bulges

تأثیر اندکی بر فعالیت آنزیم اندونوکلاز SpCas9 دارند، ولی تعداد دو یا چند mismatche بسته به موقعیت قرارگیری آنها، می‌توانند به طور قابل توجهی فعالیت آنزیم اندونوکلاز SpCas9 را مختل کنند. با این حال، مطالعات اخیر نشان داده‌اند که نوکلئوتیدی که بلافاصله در ناحیه بالادست توالی PAM واقع شده است ممکن است بر آنزیم اندونوکلاز Cas9 متصل به توالی DNA دورشته‌ای موثر باشد (۹۱، ۹۶، ۹۸).

چندین وب سایت با قابل دسترسی آزاد جهت کمک به انتخاب sgRNAها توسعه داده شده‌اند. این وب سایتها طیف گسترده‌ای از اطلاعات ورودی و جایگاه‌های اختصاصی هدف را بر اساس منحصر به فرد بودن آنها درون ژنوم پیشنهاد می‌کنند و همچنین لیستی از پتانسیل برخی از توالی‌های غیرهدف که می‌توانند به عنوان یک توالی هدف شناسایی شوند را ارائه می‌دهند.

- طراحی CRISPR (<http://crispr.mit.edu>)

- E-CRISP (<http://www.e-crisp.org/E-CRISP>)

- ZiFit (<http://zifi.t.partners.org/ZiFit>)

- Cas-OFFinder (<http://www.rgenome.net>)

Pelletier و همکاران در سال ۲۰۱۵ در طی اجرای پروژه استفاده از فناوری CRISPR-Cas9 برای مهندسی نمودن ژنوم موش، با استفاده از وب سایت Cas-OFFinder، روش انتخاب توالی sgRNA را برای موشها توسعه دادند (۹۹). اگر چه این روش ممکن است نسبت سایر روش‌های انتخاب توالی sgRNAها خسته کننده‌تر باشد، اما فهرست جامعی از همه sgRNAها به همراه جایگاه‌های غیر هدف درون ژنوم خود، فراهم می‌آورد. استراتژی بکارگرفته شده توسط این گروه که با توجه به نتایج مشاهدات چندین گروه تحقیقاتی در مورد تعریف sgRNA انتخابی انجام پذیرفته است، نشان می‌دهد که اندونوکلاز SpCas9 می‌تواند چندین mismatche (تا ۸ نوکلئوتید) را در ناحیه پایانه ۵' sgRNA تحمل کند (۲۰، ۷۴، ۹۲، ۹۴، ۹۵، ۱۰۰).

وب سایت Cas-OFFinder نه تنها اجازه شناسایی توالی چندین رفرنس ژنوم^۱، بلکه توالی ژنوم غیر رفرنس مهره‌داران^۲ مانند: دیابت مستقل از چاقی^۳ و ویروس لوسمی فرند (FLV)^۴ سویه B موش، را می‌دهد. مهمتر اینکه، این روش اجازه طراحی SgRNAهای بسیار انتخابی موش، که فعالیت‌های کوچک و یا غیرهدف دارند را می‌دهد (۹۹، ۱۰۱).

اخیراً، نوع دیگری از سیستم کلاس ۲ کریسپر برای ویرایش ژنومی سازگار شده است (۲۳). سیستم کریسپر نوع V در باکتری *Francisella novicida* (Fn) دارای یک پروتئین بزرگ به نام CRISPR از باکتری جنس *Prevotella* (Cpf1) و *Francisella 1* و یک crRNA کوچک می‌باشد. بر خلاف 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^۵ پیش‌بینی شده است. تغییر در توالی یا ساقه-حلقه باعث اختلال در عملکرد برشی CRISPR-FnCpf1 می‌شود، پیشنهاد می‌شود که FnCpf1 ترکیبی از توالی‌های اختصاصی و ویژگی‌های ساختاری ساقه-حلقه را شناسایی می‌کند. کمپلکس CrRNA-Cpf1 سبب برش DNAهایی می‌شود که یک توالی PAM کوتاه غنی از T قبل از شروع آن وجود دارد و سبب تولید DSBهای پراکنده به صورت آویزان^۶ در ناحیه ۵' با طول ۴ تا ۵ نوکلئوتید می‌شود.

سیستم ویرایش CRISPR-FnCpf1 همانند سیستم ویرایش CRISPR-Cas9، نیازمند به یک فاصله‌دهنده ۱۸ نوکلئوتیدی است و می‌تواند mismatchهای تک نوکلئوتیدی را بین توالی راهنما و توالی DNA هدف تحمل کند. علاوه بر FnCpf1، چندین سیستم ویرایش CRISPR-Cpf1 دیگر نیز با تفاوت‌هایی در توالی PAM در باکتری‌ها شناسایی شده‌اند (جدول ۲). با این حال، بر خلاف سیستم ویرایش ژنومی

^۱ - Reference Genome: اطلاعات دیجیتالی توالی نوکلئیک‌اسید است که توسط دانشمندان جمع‌آوری شده است

^۲ - Nonreference Vertebrate Genomes

^۳ - Non-Obese Diabetic

^۴ - Friend Leukemia Virus (FLV)

^۵ - Short Hairpin Loop

^۶ - 5'-Overhang

CRISPR-Cas9، سیستم‌های ویرایش ژنومی ZFN، TALEN و CRISPR-Cpf1 مکانیسم مشابهی دارند، به این صورت که در رشته گیرهدف نوکلئوتید شماره ۱۸ و در رشته هدف نوکلئوتید شماره ۲۳ را در خارج از توالی تشخیص خودشان برش می‌زنند. این یافته نشان می‌دهد ممکن است تا زمانی که تغییرات کافی برای جلوگیری از اتصال Cpf1 به جایگاه توالی هدف بوجود آید، برش زدن در جایگاه هدف ادامه یابد. با این وجود، FnCpf1 و سیستم‌های مرتبط با آن نشان دهنده زرادخانه‌ای در دستان ماست با عنوان ابزار ویرایش ژنومی.

جدول ۲- توالی‌های PAM برای سیستم ویرایش ژنومی CRISPR-Cpf1

شماره منبع	ارگانیسم	توالی PAM
۲۳	<i>Francisella novicida</i>	TTN
۲۳	<i>Acidaminococcus</i> sp. BV3L6	TTTN
۲۳	<i>Lachnospiraceae bacterium</i> MA2020	TTTN
۲۳	<i>Moraxella bovoculi</i> 237	T/C)(T/C)N(

توالی هدف اختصاصی^۱

داشتن یک توالی هدف اختصاصی، نیاز اساسی جهت استفاده موفق از ابزار ویرایش ژنومی مبتنی بر نوکلئاز می‌باشد. برش بیش از حد جایگاه‌های غیر هدف می‌تواند سبب بروز سمیت سلولی شده و تفسیر موجودات تغییر یافته ژنتیکی را مختل کند. در زمینه کاربردهای بالینی، برش توالی اگر جایگاه‌ها را غیر از موارد مد نظر تغییر دهد، ممکن است عواقب زیان‌آور بهمراه داشته باشد. بنابراین، واکنش دهنده‌ها باید بهینه‌سازی و جایگاه‌های برش غیرهدف شناسایی شوند. اتصال اختصاصی پروتئین‌های ZFP و TALE معمولاً با استفاده از تکامل سیستماتیک لیگاندها با غنی‌سازی نمایی^۲، در شرایط آزمایشگاهی تعیین می‌شود (۱۰۲).

^۱- Target Specificity

^۲- Exponential Enrichment

اطلاعات بدست آمده از این روش آزمایشگاهی می‌تواند برای شناسایی ژنوم هدف مورد استفاده قرار گیرند و لیستی از جایگاه‌های بالقوه غیرهدف را حاصل نماید. این جایگاه‌های بالقوه غیرهدف می‌توانند از طریق توالی‌یابی مستقیم مورد بررسی قرار گیرند (۱۰۳، ۱۰۴). اتصال اختصاصی CRISPR-Cas9 بر اساس قوانین جفت‌شدگی بازی واتسون و کریک اداره می‌شود. پتانسیل جایگاه‌های غیرهدف به طور معمول با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی شناخته می‌شوند. اگرچه مطالعات توالی‌یابی کامل ژنوم نشان می‌دهد که جهش‌زایی در جایگاه‌های غیرهدف در موش و سلول‌های بنیادی ویرایش شده با استفاده از سیستم CRISPR-Cas نادر است، ولی انتخاب دقیق sgRNAها توصیه می‌شود (۱۰۱، ۱۰۵، ۱۰۹). دو روش عمده برای محدود کردن برش جایگاه غیر هدف توسط ZFNها و TALENها استفاده شده است. اولین روش شامل انتخاب ZFNها یا TALENهایی با جایگاه شناسایی DNA طویل (۱۲ تا ۱۸ جفت‌باز) می‌باشد. همانطور که قبلاً ذکر شد، توالی ۱۸ نوکلئوتیدی، کمتر از یک بار در ژنومی با ۳ میلیارد جفت‌باز (تقریباً اندازه ژنوم انسان) یافت می‌شود. دومین روش، استفاده از هترودایمرهای اجباری^۱ FokI می‌باشد که می‌تواند از دایمریزاسیون تصادفی نوکلئازها و متعاقباً برش تصادفی DNA جلوگیری کند (۱۱۰). کاهش برش توالی غیرهدف ZFNها سبب کاهش نیمه‌عمر ZFNها می‌شود. اضافه کردن یک آرژنین در ناحیه N-terminal نوکلئازهای ZFN، احتمالاً به دلیل جلوگیری از برش بیش از حد توالی غیرهدف، سبب کاهش سمیت در سلول‌ها می‌گردد (۴۴). علاوه بر انتخاب دقیق sgRNAها، چندین استراتژی دیگر برای کاهش جایگاه‌های غیرهدف با استفاده از سیستم ویرایش ژنومی CRISPR-SpCas9 پیشنهاد شده است. این استراتژی‌ها شامل استفاده از ترکیب SpCas9-D10Aهای جهش‌یافته، که دامین نوکلئاز شبه RuvC^۲ را در SpCas9 غیر فعال می‌کند، با یک جفت متعادل‌کننده sgRNA^۳ می‌باشد (۲۰، ۱۱۱، ۱۱۲). استراتژی دابل نیکاز^۴ می‌تواند منجر به کاهش ۱۰۰ تا ۱۵۰۰ برابری فعالیت

¹- Obligate Heterodimers

²- RuvC-like Nuclease Domain

³- A Pair of Offset sgRNAs

⁴- Double Nickases Strategy

هدف در لاین‌های سلولی شود. یکی دیگر از استراتژی‌ها، استفاده از مولکول‌های RNA راهنمای کوتاه‌تر است. اگر چه برخلاف روال معمول می‌باشد، استفاده از این استراتژی می‌تواند برش‌های غیرهدف را تا هزار برابر کاهش دهد. این استراتژی در ترکیب با دابل نیکازها می‌تواند انتخاب را بهبود بخشد (۱۰۰، ۱۱۳). یکی دیگر از استراتژی‌ها، ترکیب استفاده از جفت‌های متعادل‌کننده sgRNAها با بخش غیرفعال کاتالیزوری Cas9 که به یک زیرواحد کاتالیزوری اندونوکلاز غیراختصاصی FokI متصل شده است. با استفاده از این استراتژی، برش غیرهدف می‌تواند تقریباً هفت برابر نسبت به استراتژی دابل نیکاز کاهش یابد (۱۱۴). در این استراتژی، برای انجام حداکثر فعالیت نیازمند فاصله‌دهنده‌ای با طول ۱۳ تا ۱۷ جفت‌بازی لازم است. هدف اختصاصی سیستم‌های جدید CRISPR-Cpf1 هنوز ناشناخته مانده و مطالعات بیشتری برای شناسایی دقیق‌تر آن‌ها لازم می‌باشد.

ویرایش ژنومی با آنزیم‌های نوکلئاز هدفمند

اساس ویرایش ژنومی با استفاده از آنزیم‌های نوکلئاز هدفمند، مکانیسم‌های ترمیم DNA^۱ هستند که در تفکیک نمودن DSBها دخیل‌اند. در سلول‌های یوکاریوتی، شناسایی DSBها بوسیله آنزیم‌های نوکلئاز هدفمند، مکانیسم‌های ترمیم DNA را تحریک می‌کند که از جمله مکانیسم‌های پرکاربرد در ترمیم DNA می‌توان به NHEJ و ترمیم همولوگ (HDR یا HR) اشاره نمود (۱۱۵). تفکیک DSBها توسط NHEJ سبب افزایش خطا در اتصال پایانه‌های DSB می‌شود و اغلب جهش‌های کوچک افزایشی یا کاهشی (indel)^۲ را در محل برش توالی DNA حاصل می‌کند. در برخی موارد، هنگامی که دو یا چند برش رخ دهد، NHEJ می‌تواند جهش‌های جابجایی درون یا بین کروموزومی^۳ را تولید کند. تفکیک DSBها توسط مکانیسم ترمیم HDR به طور کلی به عنوان مکانیسم ترمیم بدون خطا محسوب شده، و از کروماتید خواهری به عنوان یک الگو برای تعمیر استفاده می‌شود. استفاده از این مکانیسم ترمیم، اجازه ورود جهش‌های خاص، مانند ورود توالی بزرگ DNA

^۱- DNA-Repair Mechanisms

^۲- Insertion or Deletion (indels)

^۳- Intra or Interchromosomal Translocations

دهنده^۱ به محل برش یافته را می‌دهد. همچنین غیرفعال‌سازی ژن را می‌توان با ادغام یک DSB به درون اگزون که در ناحیه پایین‌دست جایگاه شروع ترجمه واقع شده است، انجام داد (شکل ۲، الف). تفکیک DSB بوسیله مکانیسم ترمیم NHEJ می‌تواند سبب تولید تغییرات ژنتیکی مانند انواع جهش: بی‌معنی^۲، نابجا^۳ و تغییر چهارچوب^۴ شود، که اغلب با غیرفعال کردن ژن همراه است (۱۱۶). از این استراتژی معمولاً برای غربال نمودن کلی ژنوم به واسطه مکانیسم CRISPR و غیرفعال‌سازی ژن در شرایط طبیعی^۵ مورد استفاده قرار می‌گیرد (۸۲، ۸۹، ۹۹، ۱۰۷، ۱۰۹، ۱۱۷).

اصلاح ژن و جهش‌زایی در جایگاه اختصاصی را می‌تواند با ادغام یک DSB در نزدیکی جایگاه اصلاح یا جهش ایجاد نمود (شکل ۲، ب). تفکیک DSBها بوسیله مکانیسم ترمیم HR سبب تولید توالی DNA مورد نظر با دو انتهای همسان در محل برش می‌شود. از این استراتژی جهت ادغام جهش‌های نقطه‌ای و قطعات بزرگ DNA در شرایط آزمایشگاهی و درون ارگانیسم‌های مدل استفاده شده است (شکل ۲، ج) (۱۵، ۹۹، ۱۰۱، ۱۰۷، ۱۱۷، ۱۲۳). همچنین غیرفعال‌سازی ژن می‌تواند با قرار گرفتن دو DSB در مجاورت ژن هدف حاصل گردد (شکل ۲، د). تفکیک DSBها بوسیله مکانیسم ترمیم NHEJ می‌تواند سبب خروج از محل برش یافته شوند. با این وجود، تفکیک DSBها می‌تواند باعث اضافه یا حذف قطعات کوچک DNA در جایگاه شود و همچنین ممکن است آلل‌های جهش‌یافته ایجاد نکنند (۱۹، ۱۱۷، ۱۱۸، ۱۲۴، ۱۲۹). ادغام دو توالی DSB به درون ناحیه اینترون از ژن‌ها می‌تواند برای ادغام جایگاه‌های شناسایی ریکامبیناز (مانند: loxP یا Flp) جهت تولید آلل‌های اختصاصی مورد استفاده قرار گیرد (شکل ۲، د). قطعات DNA حاوی جایگاه‌های LoxP که در کنار مناطق همسان با جایگاه‌های هدف قرار گرفته‌اند می‌توانند به عنوان DNA دهنده برای مکانیسم ترمیم HR مورد استفاده قرار گیرند (۹۹، ۱۰۷، ۱۱۱).

^۱- Donor Template

^۲- Nonsense

^۳- Missense

^۴- Frameshift

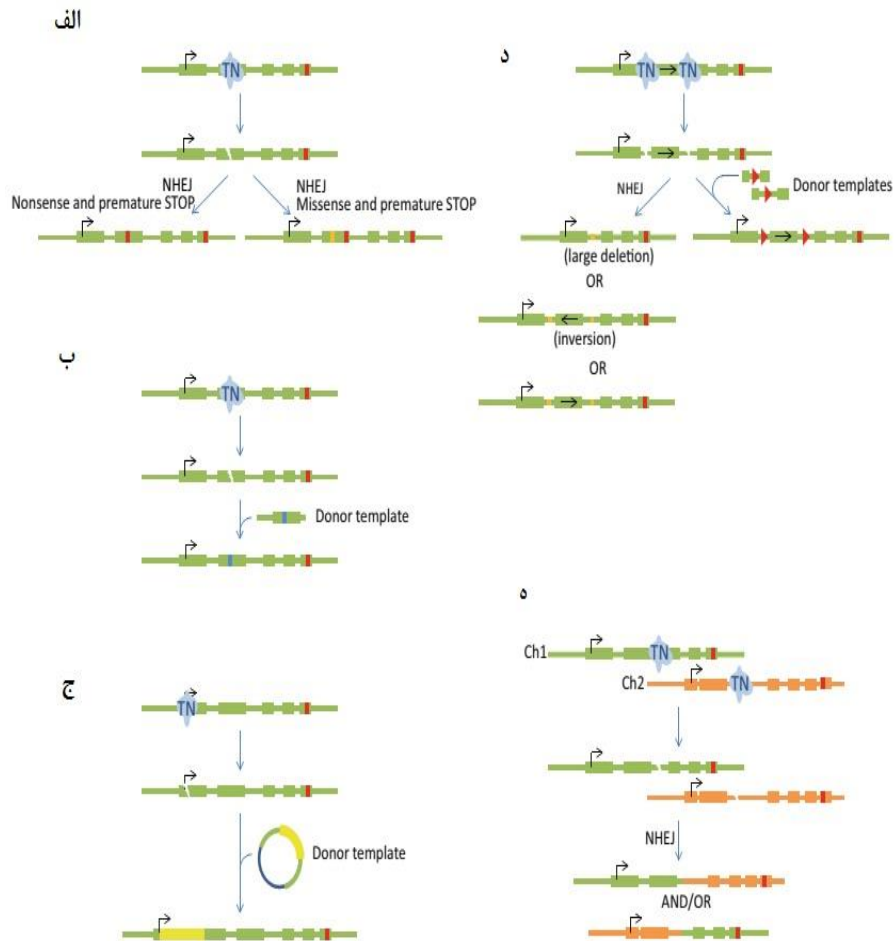
^۵- In vivo

همانطور که قبلاً توضیح داده شد، تفکیک DSBها 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 پذیرفته است (۹۹). معمولاً، استراتژی‌های هدفمند که می‌توانند هر دو آلل را همزمان تولید کنند، طراحی شده‌اند (۹۹). قرار دادن DSBها در درون کروموزوم‌های جداگانه می‌تواند سبب جهش جابجایی کروموزومی^۱ گردد (۱۳۰، ۱۳۶)، این مورد خاص در مورد سرطان، که در آن جابجایی کروموزومی اغلب منجر به تغییرات سلولی می‌شود، بکارگیری مشابه از این نوع جابجایی در سلول‌ها یا موش‌ها 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 (۹۹، ۱۳۷).

آنزیم‌های هدفمند نوکلئاز همچنین می‌توانند برای غیرفعال کردن خانواده‌های ژن با توالی‌های همسان، استفاده شوند. تنها یک جفت ZFN یا TALEN یا یک sgRNA می‌تواند برای هدف قرار دادن چندین عضو خانواده طراحی گردند (شکل ۲، الف) (۹۹). ویژگی دیگر از آنزیم‌های نوکلئاز هدفمند، امکان درج DNA نوترکیب به درون ژنوم با استفاده از وکتورهای ویروسی غیرقابل ادغام^۲ را فراهم می‌کند. جایگاه PPP1R12C که بر روی کروموزوم شماره ۱۹ انسان واقع شده است یک ناحیه دارای قابلیت نسخه‌برداری می‌باشد که توالی‌های DNA نوترکیب می‌توانند بدون اثرات منفی در این ناحیه ادغام گردند. همچنین این ناحیه به نام AAVS1 نیز شناخته می‌شود، و درج DSBها توسط آنزیم‌های هدفمند نوکلئاز می‌تواند توالی‌های بزرگ DNA را در مجاورت مناطق همسان با جایگاه AAVS1 قرار دهد (۱۳۸، ۱۴۰).

¹- Chromosomal Translocations

²- Nonintegrating Viral Vectors



شکل ۲- استراتژی‌های هدفمند جهت القای انواع جهش با استفاده از آنزیم‌های نوکلئاز هدفمند

الف) غیرفعال کردن و القای جهش‌های تصادفی می‌تواند با استفاده از یک آنزیم‌های نوکلئاز هدفمند صورت پذیرد. برش دو رشته (DSBs) توسط NHEJ باعث جهش‌های نقطه‌ای مختلف در جایگاه هدف مانند: بی‌معنی، نابجا و تغییر چهارچوب و همچنین می‌تواند سبب درج یا حذف قطعات بزرگ 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 شده، تولید آللهایی با جهش مورد نظر می‌کند. (ج) انتقال توالی بزرگ DNA با استفاده از یک نوکلئاز هدفمند می‌تواند قابل دستیابی شود. برش DSB توسط مکانیسم ترمیم HR با قرار دادن توالی DNA مورد نظر در جایگاه مخصوص سبب تولید آللهایی با توالی مطلوب می‌شود. (د) تولید آللهای مورد نظر و حذف یک قطعه بزرگ می‌تواند با استفاده از دو آنزیم نوکلئاز که برای اینترون‌های مجاور ژن هدف طراحی شده است حاصل گردد. برش توالی توسط مکانیسم ترمیم NHEJ می‌تواند منجر به خروج یا معکوس شدن منطقه مداخله شود. همچنین می‌تواند تولید جهش‌های Indel در محل‌های 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 DSBs با استفاده از دو آنزیم‌های نوکلئاز هدفمند بر روی کروموزوم‌های مختلف. ادغام ریونوکلئاز loxP بر روی هر کروموزوم سبب القای جابجایی می‌شود.

برتری مکانیسم ترمیم نو ترکیبی همسان (HR) نسبت به مکانیسم ترمیم اتصال انتهای ناهمسان (NHEJ)

انواع روش‌های ترمیم توالی‌های DSB به صورت دائم در حال رقابت با یکدیگرند. به دلیل این امر، درج جهش‌های دقیق توسط مکانیسم ترمیم HR با استفاده از آنزیم‌های نوکلئاز هدفمند، همچنان یک چالش بزرگ محسوب می‌شود. برای جلوگیری از این مشکل، دو استراتژی اصلی پیشنهاد شده است. اولین استراتژی شامل مهار مکانیسم ترمیم NHEJ می‌باشد، که مهم‌ترین مکانیسم تعمیر DSB در سلول‌های یوکاریوتی محسوب می‌گردد. 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 فعال تر است.

مطالعات بر روی روش‌های تفکیک DSB، عوامل متعددی را شناسایی کرده است که به نام روش متعارف NHEJ^۱ مرسوم است (۱۱۵). این عوامل عبارتند از هتروداایمرهای Ku70 / Ku80، که توالی DSBها را به یکدیگر متصل می‌کند و نقش داربست برای ماشین ترمیم NHEJ ایفا می‌کند. یکی دیگر از عوامل مهم در مکانیسم ترمیم NHEJ، وجود آنزیم DNA لیگاز IV می‌باشد که برای اتصال نواحی انتهایی DNA ضروری است. مهار مکانیسم ترمیم NHEJ از طریق مهار بیان هتروداایمرهای Ku70 / Ku80 یا DNA لیگاز IV و همچنین مهار اتصال DNA لیگاز IV به توالی DSB توسط مولکول کوچک SCR7 انجام می‌شود که این عامل می‌تواند مکانیسم ترمیم HR را چندین برابر افزایش داده و سبب کاهش فعالیت مکانیسم ترمیم NHEJ در لاین‌های سلولی و جنین موش گردد (۱۴۱، ۱۴۳).

مکانیسم ترمیم NHEJ در سراسر چرخه سلولی عمل می‌کند در حالیکه مکانیسم ترمیم HR فقط در اواخر مرحله S و اوایل مرحله G2 فعال می‌باشد. بنابراین، انتقال آنزیم‌های هدفمند نوکلئاز در اواخر مرحله S و اوایل مرحله G2 ممکن است سبب باعث افزایش فعالیت مکانیسم ترمیم HR نسبت به مکانیسم ترمیم NHEJ می‌شود. در حقیقت، انتقال سیستم CRIPR-Cas9 به سلول‌های تیمار شده با نوکودازول^۲، (سبب توقف چرخه سلولی در مرحله بین میتوز و G2) منجر به افزایش قابل توجهی در فعالیت مکانیسم ترمیم HR (تا ۳۸٪) نسبت به سلول‌های تیمار نشده می‌گردد (۱۴۴).

روش‌های انتقال

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 پلاسمیدهای حاوی آنزیم‌های هدفمند نوکلئاز و DNA دهنده با استفاده از روش‌هایی مانند الکتروپوریشن^۳ یا

^۱- Canonical NHEJ Pathway

^۲- Nocodazole

^۳- Electroporation

ترانسفکشن^۱ به همراه واکنش‌گرهای شیمیایی به درون سلول‌های ترانسفورم شده و همچنین انتخاب سلول‌های بنیادی جنینی، رایج می‌باشد. با این حال، این روش‌ها معمولاً در کشت‌های اولیه سلولی ناکارآمد هستند و ممکن است باعث سمیت شوند. جهت غلبه بر این محدودیت‌ها چندین روش انتقال ایجاد شده‌اند.

یکی از رویکردهایی که مورد بررسی قرار گرفته است، انتقال آنزیم‌های هدفمند نوکلئاز ترجمه شده به درون سلول از طریق ترانسفکشن بدون استفاده از واکنش‌گرهای شیمیایی، تحت شرایط آزمایشگاهی می‌باشد. این رویکردها بر اساس تغییرات شیمیایی یا ژنتیکی آنزیم‌ها به منظور ایجاد نفوذپذیری در غشای آن‌هاست. به عنوان مثال، ترکیب پپتیدهای غنی از آرژینین به TALEN‌ها جذب آن‌ها به سلول را افزایش داده و تغییرات برگشت‌پذیر ژن‌های حذف شده بواسطه روش TALEN را با سرعت مشابه با روش پلازمیده‌های ترانسفکشن امکان‌پذیر می‌کند (۱۴۵). همچنین تلفیق ژنتیکی TALEN به پپتید TAT قابل نفوذ به سلول، جذب پروتئین ترکیبی^۲ را از طریق سلول با حفظ فعالیت آن امکان‌پذیر می‌سازد (۱۴۶). تلفیق ژنتیکی ZFN‌ها به ترانسفرین^۳، جذب پروتئین ترکیبی ZFN به توالی جایگاه برشی را امکان‌پذیر می‌سازد (۱۴۷). همچنین کارایی اختلال ژن در سلول‌های کشت شده می‌تواند با استفاده از سیستم ویرایش Cas9 و sgRNA تلفیق شده به پپتیدهای نفوذی، بدست آید (۱۴۸). ویژگی مثبت طبیعی ZFP‌ها، تولید ZFN‌هایی با قابلیت نفوذ در غشا و ZFN‌های درونی غیرقابل تلفیق^۴ منجر به کارایی اختلال ژن در سلول‌های پستاندار می‌شود (۱۴۹). یکی دیگر از روش‌های انتقال، بدون استفاده از واکنش‌گرهای شیمیایی، استفاده از الکتروپوریشن ترجمه شده *in vitro*^۵ و آنزیم‌های هدفمند نوکلئاز مونتاژ شده *in vitro*^۶ درون کمپلکس sgRNA-Cas9 می‌باشد. این روش، دارای سمیت کمتر و کارآمدی بیشتر نسبت به روش الکتروپوریشن می‌باشد (۱۵۰).

^۱- Transfection

^۲- Fusion Protein

^۳- Transferrin

^۴- Internalization of Unconjugated ZFNs

^۵- Electroporation of In vitro-translated

^۶- In vitro-assembled Targetable Nucleases

روش‌های ترانسفکشن مبتنی بر استفاده مواد شیمیایی نیز برای سیستم CRISPR-Cas9 طراحی شده‌اند.

این روش می‌تواند اثربخشی ویرایش ژنومی مبتنی بر CRISPR-Cas9 از طریق محافظت کمپلکس نوکلئاز، بوسیله پروتئین‌های سرم سلول‌های خون و ماتریکس خارج سلولی یا از طریق تخریب آن توسط مسیر اندوزومی- لیزوزومی^۱، را افزایش دهد (۱۵۱). روش میکرواینجکشن^۲ یکی دیگر از روش‌های گسترده مورد استفاده جهت ویرایش ژنومی در لاین‌های سلولی و تخم‌ها^۳ برای انتقال نسخه‌های کدکننده آنزیم‌های هدفمند نوکلئاز می‌باشد (۹۹، ۱۰۱، ۱۰۷، ۱۰۹، ۱۱۷، ۱۵۲). محدود شدن فعالیت توالی‌های غیرهدف، احتمالاً ناشی از نیمه‌عمر پروتئین‌های ترجمه شده و یا mRNAهای نسخه‌برداری شده‌ای است، که فعالیتشان را سریعتر از مولکول‌های وکتور معمولی یا وکتور ویروسی انجام می‌دهند. علاوه بر این، ادغام تصادفی وکتورهای معمولی یا ویروسی به درون ژنوم نه تنها می‌تواند طول بیان آنزیم‌های نوکلئاز را تحت تأثیر قرار دهد، بلکه قادر است با ژن‌هایی که در آن DNA وارد شده، تداخل ایجاد نماید. بر این اساس، استفاده از وکتورهای ویروسی اپیزومی^۴ ترجیح داده می‌شوند. در حال حاضر چندین وکتور ویروسی برای فناوری آنزیم‌های هدفمند نوکلئاز در حال گسترش می‌باشند، مانند: آدنوویروس‌ها (AV)^۵، اندو-اسوشیتد ویروس (AAV)^۶، لنتی ویروس (VL)^۷، اینتگرز-دیفیشینت لنتی ویروس (IDLV)^۸ و باکلوویروس‌ها (BV)^۹. این وکتورها به طور گسترده‌ای برای انتقال آنزیم‌های هدفمند نوکلئاز در ارگانیس‌های مدل مورد استفاده قرار گرفته‌اند اما برخی از این سیستم‌های انتقال، محدودیت‌های خود را دارند و ممکن است برای تمام آنزیم‌های هدفمند نوکلئاز

¹- Endosomal-Lysosomal Pathway

²- Microinjection

³- Zygotes

⁴- Episomal Viral Vectors

⁵- Adenovirus (AV)

⁶- Adeno-Associated Virus (AAV)

⁷- Lentivirus (LV)

⁸- Integrase-Deficient Lentivirus (IDLV)

⁹- Baculovirus (BV)

مناسب نباشند. به عنوان مثال، وکتورهای LV و IDLV برای انتقال به ZFNها و TALENها استفاده شده است (۱۵۳، ۱۵۵). با این وجود، حساسیت آنها به تغییرات اپیژنتیکی و خاموش شدن، اثربخشی آنها را محدود می‌سازد. علاوه بر این، بیان TALENها، به دلیل حذف گسترده تکرارهای TALE از طریق تغییر الگوی نسخه‌برداری معکوس^۱ در درون تکرارهای TALE، تحت تاثیر قرار می‌گیرند (۱۵۶، ۱۵۷). البته، این محدودیت می‌تواند با استفاده از، توالی‌های کد شده جایگزین، که سبب محدودیت تغییر الگوی نسخه‌برداری معکوس شده یا ویروس‌های دارای نسخه‌برداری معکوس ناکارآمد، برطرف شود (۱۵۸).

وکتورهای BV با کارایی بالا جهت انتقال توالی هدف در سیستم ویرایش ZFN و TALEN، در کشت سلول‌های بنیادی جنینی استفاده شده‌اند. همچنین وکتورهای BV با ظرفیت بالا قادرند دایمرهای ZFP و TALEN را درون یک قطعه ویروسی وارد نمایند (۱۵۹، ۱۶۲). با این حال، تحت شرایط خاص، تکرارهای TALE قادرند دستخوش پیکربندی مجدد قرار گیرند، که این عامل باعث می‌شود از وکتورهای BV برای ژن درمانی و انتقال ژن هدف کمتر استفاده شود (۱۵۶، ۱۶۳).

وکتورهای AV به عنوان یک ابزار عالی جهت انتقال آنزیم‌های هدفمند نوکلئاز به حساب می‌آیند، زیرا قادرند سلول‌های در حال تقسیم و سلول‌های تقسیم نشده را آلوده سازند، همچنین جایگذاری قطعات بزرگ DNA و کدهای پروتئینی بدون تلفیق با ژنوم میزبان صورت می‌پذیرد. علاوه بر این، از وکتورهای AV به عنوان یکی از برجسته‌ترین وکتورها در آزمایشات بالینی ژن درمانی استفاده می‌شود (۱۶۴). وکتورهای AV جهت انتقال ZFN، TALEN و نوکلئازهای RNA راهنما در شرایط *in vitro* و *in vivo* مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۵۶، ۱۶۵، ۱۷۰). وکتورهای AV قابلیت بارگذاری توالی‌های بزرگ مانند: دایمرهای ZFN و TALEN، و توالی‌های Cas9، sgrRNA و DNA دهنده را دارند.

¹- Reverse Transcriptase

وکتورهای غیر بیماری‌زای AAV جهت انتقال موثر ژن هدف به کار گرفته شده و نتایج امیدوار کننده‌ای را در سطح فازهای I تا III آزمایشات بالینی حاصل نموده است (۱۷۱). وکتورهای AAV ذرات ویروسی ناکارا در همانندسازی^۱ هستند که برای همانندسازی نیازمند به ویروس‌های غیرمرتبط می‌باشند. محتوی ژنتیکی آن‌ها از یک DNA تک‌رشته‌ای با طول ۴/۷ کیلوباز و دو ناحیه قالب خوانش باز (ORF)^۲ تشکیل شده است. از وکتورهای AAV، با توجه به ظرفیت بارگذاری اندک، جهت انتقال در سیستم‌های ویرایش ژنومی ZFN و CRISPR-Cas9 استفاده می‌شود (۱۷۲، ۱۷۴، ۱۷۵، ۱۷۷).

کاربردها

از آنزیم‌های هدفمند نوکلئاز در تعدادی از سلول‌های پستانداران و غیرپستانداران و همچنین در ارگانسیم‌های مدل موجود آزمایشگاه‌های تحقیقاتی زیست‌پزشکی مانند: مخمر، *C. elegans*، مگس میوه دروزوفیلا، زبرافیش، قورباغه زنوپوس، موش، خرگوش و میمون استفاده می‌شوند (۶۱، ۹۹، ۱۰۱، ۱۰۷، ۱۰۹، ۱۱۷، ۱۷۸، ۱۷۹، ۱۸۰، ۱۸۲، ۱۸۳، ۱۸۵، ۱۸۶، ۱۹۰، ۱۹۱، ۱۹۴، ۱۹۵، ۱۹۹، ۲۰۰، ۲۰۳، ۲۰۴، ۲۰۷، ۲۰۸، ۲۱۰).

در مدل‌های آزمایشگاهی، از آنزیم‌های هدفمند نوکلئاز جهت تعیین عملکرد ژن، مطالعه رابطه ساختار- عملکرد و ایجاد بیماری‌های انسانی بر روی مدل‌های حیوانی استفاده می‌شود. همچنین از این آنزیم‌ها در اصلاح محصولات کشاورزی، قارچ و دام استفاده می‌شود (۱۲۴، ۲۱۱، ۲۱۵، ۲۱۶، ۲۱۷، ۲۱۸، ۲۲۱).

به عنوان مثال در گیاهان، از آنزیم‌های هدفمند نوکلئاز جهت انتقال صفات مهم مانند مقاومت به بیماری و مقاومت به علف‌کش استفاده شده است (۲۱۲، ۲۱۳، ۲۱۴). از غیرفعال‌سازی ژن در دام جهت بهبود صفات و تولید حیوان مدل‌های جهت مطالعه بیماری‌های انسانی استفاده می‌شود (۲۲۲، ۲۲۵، ۲۲۶). همچنین غیرفعال‌سازی یا انتقال

¹- Replication-Deficient Viral Particles

²- Open Reading Frame (ORF)

ژن می‌تواند سبب مقاومت به پاتوژن، افزایش محصول و احتمالاً کاهش انتقال بیماری‌های مشترک انسان و حیوانات گردد (۲۱۸، ۲۲۰، ۲۲۷، ۲۲۸).

آنزیم‌های هدفمند نوکلئاز همچنین برای برنامه‌های کاربردی بالینی در انسان نیز افق جدیدی حاصل نموده است. این آنزیم‌ها قادرند جهت اصلاح و درمان بیماری‌های تک ژنی بکار گرفته شوند همچنین از قابلیت چندگانه سیستم ویرایش ژنومی CRISPR-Cas9 می‌توان برای اصلاح و درمان اختلالات پیچیده ژنتیکی استفاده نمود (۲۱، ۹۲). از کاربردهای دیگر نوکلئازهای هدفمند همچنین می‌توان به غیرفعال کردن ژن‌های دارای ویژگی خاص یا غیرفعال کردن عفونت‌های ویروسی اشاره نمود. علاوه بر این از نوکلئازهای هدفمند در اصلاح جهش‌های بیماری‌زا مانند: سلول‌های داسی شکل^۱، هموفیلی A و B، نقص آلفا-آنتی‌تریپسین^۲، نقص ایمنی وابسته به X در سلول‌های بنیادی خون‌ساز انسانی^۳، دیستروفی عضلانی دوشن^۴ انسانی، سندرم ویسکات-آلدریچ^۵ در سلول‌های بنیادی خون‌ساز، سیستمیک فایبروزیس^۶ در سلول‌های اپیتلیال تولید شده از سلول‌های بنیادی پلورپوتنت^۷ بیماران نیز استفاده می‌شود (۱۵۳، ۲۲۹، ۲۳۱، ۲۳۲، ۲۳۵، ۲۳۶، ۲۳۷، ۲۳۸، ۲۳۹، ۲۴۰، ۲۴۱). همچنین برای جلوگیری از افزایش کلسترول^۸ مورد استفاده قرار می‌گیرند (۲۴۲).

امروزه غیرفعال کردن گیرنده مشترک ویروس HIV1 به نام C-C^۹ کموکین نوع ۵ (CCR5) در سلول‌های T، سلول‌های بنیادی خون‌ساز و آزمایش‌های بالینی در نوکلئاز ZFN که CCR5 را مورد هدف قرار می‌دهند، در حال انجام است (۱۶۵، ۱۶۷، ۲۴۳). استفاده از نوکلئازهای هدفمند نه تنها امکان غیرفعال کردن ژن‌های درگیر در عفونت

1- Sickle Cell Disease

2- α 1-Antitrypsin Deficiency

3- Hematopoietic Stem Cells

4- Duchenne Muscular Dystrophy

5- Wiskott-Aldrich Syndrome

6- Cystic Fibrosis

7- Pluripotent Stem Cells

8- Hypercholesterolemia

9- C-C Chemokine Receptor Type 5 (CCR5)

ویروسی را دارد، بلکه جهت غیرفعال کردن وکتورهای بیماری‌زای تلفیق شده نیز استفاده می‌شود. مطالعه اخیر در استفاده از فناوری سیستم ویرایش CRISPR-Cas9 نشان داد این سیستم توانایی برای مورد هدف قرار دادن مناطق LTR U3 از ویروس HIV1 و برش موثر قطعه ۹/۷ کیلوبازی حاوی ژنوم HIV را دارا می‌باشد (۲۴۴). 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 (۲۴۵).

نتیجه‌گیری

توسعه سیستم آنزیم‌های نوکلئاز هدفمند که قابلیت انتقال توالی DNA هدف به مکان‌های خاص در ژنوم را داراست، توانایی ما را برای دستکاری ژنوم‌ها بسیار بهبود داده است و قابلیت‌های زیادی برای ژن درمانی دارند. جهت دستیابی کامل به قابلیت‌های این سیستم ویرایشی نیازمند بهبود برخی محدودیت‌ها مانند: هدف اختصاصی، انتقال آنزیم نوکلئاز هدفمند و توالی DNA دهنده و همچنین مکانیسم‌های ترمیم DNA می‌باشد. گرچه بهبود کیفیت انتقال و شناسایی هدف اختصاصی، تمرکز اصلی در مکانیسم ویرایش ژنومی می‌باشد، اما درک بهتر از مکانیسم‌های تعمیر DNA و از همه مهمتر، شناسایی راه‌هایی برای ارتقاء مکانیسم HR مسئله‌ای چالش برانگیز است. در حال حاضر مهار DNA لیگاز IV نتایج امیدوار کننده‌ای در کشت سلولی و ارگانیسم‌های مدل نشان می‌دهد و ممکن است یک رویکرد قابل ترجمه برای ژن درمانی در انسان تلقی گردد.

منابع

- 1- Bollag RJ, Waldman AS, Liskay RM. 1989. Homologous recombination in mammalian cells. *Annu Rev Genet.* 23: 199–225.
- 2- Cohen-Tannoudji M, Robine S, Choulika A, Pinto D, El Marjou F, Babinet C. 1998. I-SceI induced gene replacement at a natural locus in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol.* 8: 18-1444.
- 3- Donoho G, Jasin M, Berg P. 1998. Analysis of gene targeting and intrachromosomal homologous recombination stimulated by genomic double-strand breaks in mouse embryonic stem cells. *Mol Cell Biol.* 18: 8-4070.
- 4- Gloor GB, Nassif NA, Johnson-Schlitz DM, Preston CR, Engels WR. 1991. Targeted gene replacement in *Drosophila* P element-induced gap repair. *Science.* 253: 7-1110.
- 5- Smih F, Rouet P, Romanienko PJ, Jasin. 1995. M. Double-strand breaks at the target locus stimulate gene targeting in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.* 23: 9-5012.
- 6- Choulika A, Perrin A, Dujon B, Nicolas JF. 1995. Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 15: 73-1968.
- 7- Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. 1996. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93: 60-1156.
- 8- Smith J, Bibikova M, Whitby FG, Reddy AR, Chandrasegaran S, Carroll D. 2000. Requirements for double-strand cleavage by chimeric restriction enzymes with zinc finger DNA-recognition domains. *Nucleic Acids Res.* 28: 9-3361.
- 9- Bibikova M, Carroll D, Segal DJ, Trautman JK, Smith J, Kim YG. 2001. Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases. *Mol Cell Biol.* 21: 97-289.
- 10- Berg JM. 1986. Potential metal-binding domains in nucleic acid binding proteins. *Science.* 232: 7-485.

- 11- Nwankwo D, Wilson G. 1987. Cloning of two type II methylase genes that recognise asymmetric nucleotide sequences: FokI and HgaI. *Mol Gen Genet.* 209: 4-570.
- 12- Looney MC, Moran LS, Jack WE, Feehery GR, Benner JS, Slatko BE. 1989. Nucleotide sequence of the FokI restriction-modification system: separate strand-specificity domains in the methyltransferase. *Gene.* 80: 193-208.
- 13- Kita K, Kotani H, Sugisaki H, Takanami M. 1989. The FokI restriction-modification system. Organization and nucleotide sequences of the restriction and modification genes. *J Biol Chem.* 264: 6-5751.
- 14- Li L, Wu LP, Chandrasegaran S. 1992. Functional domains in Fok I restriction endonuclease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89: 9-4275.
- 15- Bibikova M, Beumer K, Trautman JK, Carroll D. 2003. Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Science.* 300: 1- 5764.
- 16- Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD. 2010. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet.* 11: 46-636.
- 17- Christian M, Cermak T, Doyle EL, Schmidt C, Zhang F, Hummel A. 2010. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics.* 186: 61-757.
- 18- Li T, Huang S, Jiang WZ, Wright D, Spalding MH, Weeks DP. 2011. TAL nucleases (TALNs) hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain. *Nucleic Acids Res.* 39: 72-359.
- 19- Miller JC, Tan S, Qiao G, Barlow KA, Wang J, Xia DF. 2011. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol.* 29: 8-143.
- 20- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. 2012. A programmable dual- RNA- guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 337: 21-816.

- 21- Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE. 2013. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*. 339: 6-823.
- 22- Jinek M, East A, Cheng A, Lin S, Ma E, Doudna J. 2013. RNA-programmed genome editing in human cells. *eLife*. 2: 1-471.
- 23- Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, Makarova KS, Essletzbichler P. 2015. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*. 759: 71-163.
- 24- Li L, Wu LP, Clarke R. 1993. Chandrasegaran S. C-terminal deletion mutants of the FokI restriction endonuclease. *Gene*. 133:79–84.
- 25- Li L, Chandrasegaran S. 1993. Alteration of the cleavage distance of Fok I restriction endonuclease by insertion mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90: 8-2764.
- 26- Kim YG, Li L, Chandrasegaran S. 1994. Insertion and deletion mutants of FokI restriction endonuclease. *J Biol Chem*. 269: 82-31987.
- 27- Tsai SQ, Wyvekens N, Khayter C, Foden JA, Thapar V, Reyon D. 2014. Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol*. 32: 76-569.
- 28- Miller J, McLachlan AD, Klug A. 1985. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J*. 4: 14-1609.
- 29- Brown RS, Sander C, Argos P. 1985. The primary structure of transcription factor TFIIIA has 12 consecutive repeats. *FEBS Lett*. 186: 4-271.
- 30- Pavletich NP, Pabo CO. 1991. Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science*. 252: 17-5809.
- 31- Berg JM. 1998. Proposed structure for the zinc-binding domains from transcription factor IIIA and related proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 85: 99–102.
- 32- Handel EM, Alwin S, Cathomen T. 2009. Expanding or restricting the target site repertoire of zinc-finger nucleases: the inter-domain

- linker as a major determinant of target site selectivity. *Mol Ther.* 17: 11-104.
- 33- Urnov FD, Miller JC, Lee YL, Beausejour CM, Rock JM, Augustus S. 2005. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature.* 435: 51-646.
- 34- Shimizu Y, Bhakta MS, Segal DJ. 2009. Restricted spacer tolerance of a zinc finger nuclease with a six amino acid linker. *Bioorg Med Chem Lett.* 19: 2-3970.
- 35- Liu PQ, Rebar EJ, Zhang L, Liu Q, Jamieson AC, Liang Y. 2001. Regulation of an endogenous locus using a panel of designed zinc finger proteins targeted to accessible chromatin regions. Activation of vascular endothelial growth factor A. *J Biol Chem.* 276: 34-11323.
- 36- Maeder ML, Thibodeau-Beganny S, Osiak A, Wright DA, Anthony RM, Eichinger M. 2008. Rapid “open-source” engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification. *Mol Cell.* 31:294–301.
- 37- Beerli RR, Barbas III CF. 2002. Engineering polydactyl zinc-finger transcription factors. *Nat Biotechnol.* 20: 41-135.
- 38- Bae KH, Kwon YD, Shin HC, Hwang MS, Ryu EH, Park KS. 2003. Human zinc fingers as building blocks in the construction of artificial transcription factors. *Nat Biotechnol.* 21: 80-275.
- 39- Liu Q, Xia Z, Zhong X, Case CC. 2002. Validated zinc finger protein designs for all 16 GNN DNA triplet targets. *J Biol Chem.* 277: 6-3850.
- 40- Mandell JG, Barbas CF. 2006. Zinc finger tools: custom DNA-binding domains for transcription factors and nucleases. *Nucleic Acids Res.* 34: 516–523.
- 41- Segal DJ, Beerli RR, Blancafort P, Dreier B, Effertz K, Huber A, 2003. Evaluation of a modular strategy for the construction of novel polydactyl zinc finger DNA-binding proteins. *Biochemistry.* 42: 48-2137.

- 42- Ramirez CL, Foley JE, Wright DA, Muller-Lerch F, Rahman SH, Cornu TI. 2008. Unexpected failure rates for modular assembly of engineered zinc fingers. *Nat Methods*. 5:5-374.
- 43- Cornu TI, Thibodeau-Beganny S, Guhl E, Alwin S, Eichtinger M, Joung JK. 2008. DNA -binding specificity is a major determinant of the activity and toxicity of zinc-finger nucleases *Mol Ther*. 16: 8-352.
- 44- Pruett-Miller SM, Connelly JP, Maeder ML, Joung JK, Porteus MH. 2008. Comparison of zinc finger nucleases for use in gene targeting in mammalian cells. *Mol Ther*. 16:17-707.
- 45- Gupta A, Christensen RG, Rayla AL, Lakshmanan A, Stormo GD, Wolfe SA. 2012. An optimized two-finger archive for ZFN-mediated gene targeting. *Nat Methods*. 9: 90-588.
- 46- Sander JD, Dahlborg EJ, Goodwin MJ, Cade L, Zhang F, Cifuentes D. 2011. Selection-free zinc-finger-nuclease engineering by context-dependent assembly (CoDA). *Nat Methods*. 8: 9-67.
- 47- Zhu C, Gupta A, Hall VL, Rayla AL, Christensen RG, Dake B. 2013. Using defined finger -finger interfaces as units of assembly for constructing zinc-finger nucleases. *Nucleic Acids Res*. 41: 65-2455.
- 48- Moore M, Klug A, Choo Y. 2001. Improved DNA binding specificity from polyzinc finger peptides by using strings of two-finger units. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98: 41-1437.
- 49- Moore M, Choo Y, Klug A. 2001. Design of poly zinc finger peptides with structured linkers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98: 6-1432.
- 50- Greisman HA, Pabo CO. 1997. A general strategy for selecting high-affinity zinc finger proteins for diverse DNA target sites. *Science*. 275: 61-657.
- 51- Hurt JA, Thibodeau SA, Hirsh AS, Pabo CO, Joung JK. 2003. Highly specific zinc finger proteins obtained by directed domain shuffling and cell-based selection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100: 6-12271.

- 52- Boch J, Bonas U. 2010. XanthomonasAvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annu Rev Phytopathol.* 48: 36-419.
- 53- Moscou MJ, Bogdanove AJ. 2009. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science.* 326: 1-1501.
- 54- Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S. 2009. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science.* 326: 12-1509.
- 55- Mak AN, Bradley P, Cernadas RA, Bogdanove AJ, Stoddard BL. 2012. The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target. *Science.* 335: 9-716–9.
- 56- Deng D, Yan C, Pan X, Mahfouz M, Wang J, Zhu JK. 2012. Structural basis for sequence –specific recognition of DNA by TAL effectors. *Science.* 335: 3-720.
- 57- Christian ML, Demorest ZL, Starker CG, Osborn MJ, Nyquist MD, Zhang Y. 2012. Targeting G with TAL effectors: a comparison of activities of TALENs constructed with NN and NK repeat variable di-residues. *PLoS One.* 7: 1-43.
- 58- Cong L, Zhou R, Kuo YC, Cunniff M, Zhang F. 2012. Comprehensive interrogation of natural TALE DNA-binding modules and transcriptional repressor domains. *Nat Commun.* 3: 1-968.
- 59- Streubel J, Blucher C, Landgraf A, Boch J. 2012. TAL effector RVD specificities and efficiencies. *Nat Biotechnol.* 30: 5-593.
- 60- Meckler JF, Bhakta MS, Kim MS, Ovadia R, Habrian CH, Zykovich A. 2013. Quantitative analysis of TALE-DNA interactions suggests polarity effects. *Nucleic Acids Res.* 41: 28-4118.
- 61- Huang P, Xiao A, Zhou M, Zhu Z, Lin S, Zhang B. 2011. Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs. *Nat Biotechnol.* 29: 699–700.
- 62- Bultmann S, Morbitzer R, Schmidt CS, Thanisch K, Spada F, Elsaesser J. 2012. Targeted transcriptional activation of silent oct4

- pluripotency gene by combining designer TALEs and inhibition of epigenetic modifiers. *Nucleic Acids Res.* 40: 77-5368.
- 63- Valton J, Dupuy A, Daboussi F, Thomas S, Marechal A, Macmaster R. 2012. Overcoming transcription activator-like effector (TALE) DNA binding domain sensitivity to cytosine methylation. *J Biol Chem.* 287: 32-38427.
- 64- Reyon D, Tsai SQ, Khayter C, Foden JA, Sander JD, Joung JK. 2012. FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. *Nat Biotechnol.* 30: 5-460.
- 65- Briggs AW, Rios X, Chari R, Yang L, Zhang F, Mali P. 2012. Iterative capped assembly: rapid and scalable synthesis of repeat-module DNA such as TAL effectors from individual monomers. *Nucleic Acids Res.* 40: 1-117.
- 66- Cermak T, Doyle EL, Christian M, Wang L, Zhang Y, Schmidt C. 2011. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting *Nucleic Acids Res.* 39: 1-82.
- 67- Schmid-Burgk JL, Schmidt T, Kaiser V, Honing K, Hornung V. 2013. A ligation-independent cloning technique for high-throughput assembly of transcription activator-like effector genes. *Nat Biotechnol.* 31:76–81.
- 68- Westra ER, Swarts DC, Staals RH, Jore MM, Brouns SJ, van der Oost J. 2012. The CRISPRs, they are a-changin': how prokaryotes generate adaptive immunity. *Annu Rev Genet.* 311: 39-46.
- 69- Makarova KS, Koonin EV. 2015. Annotation and classification of CRISPR-Cas systems. *Methods Mol Biol.* 1311: 47–75.
- 70- Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Horvath P. 2011. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol.* 9: 77-467.
- 71- Garneau JE, Dupuis ME, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P. 2010. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature.* 468: 67-71.

- 72- Mojica FJ, Diez-Villasenor C, Garcia-Martinez J, Almendros C. 2009. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*. 155: 40-733.
- 73- Deveau H, Barrangou R, Garneau JE, Labonte J, Fremaux C, Boyaval P. 2008. Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol*. 190: 400-1390.
- 74- Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V. 2013. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol*. 31: 32-827.
- 75- Esvelt KM, Mali P, Braff JL, Moosburner M, Yaung SJ, Church GM. 2013. Orthogonal Cas9 proteins for RNA-guided gene regulation and editing. *Nat Methods*. 10: 21-1116.
- 76- Fonfara I, Le Rhun A, Chylinski K, Makarova KS, Lecrivain AL, Bzdrenga J. 2014. Phylogeny of Cas9 determines functional exchangeability of dual-RNA and Cas9 among orthologous type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res*. 42: 90-2577.
- 77- Hou Z, Zhang Y, Propson NE, Howden SE, Chu LF, Sontheimer EJ. 2013. Efficient genome engineering in human pluripotent stem cells using Cas9 from *Neisseria meningitidis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110: 9-15644.
- 78- Zhang Y, Heidrich N, Ampattu BJ, Gunderson CW, Seifert HS, Schoen C. 2013. Processing-independent CRISPR RNAs limit natural transformation in *Neisseria meningitidis*. *Mol Cell*. 50: 488-503.
- 79- van der Ploeg JR. 2009. Analysis of CRISPR in *Streptococcus mutans* suggests frequent occurrence of acquired immunity against infection by M102-like bacteriophages. *Microbiology*. 155: 76-1966.
- 80- Horvath P, Romero DA, Coute-Monvoisin AC, Richards M, Deveau H, Moineau S. 2008. Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol*. 190: 12-1401.

- 81- Kleinstiver BP, Prew MS, Tsai SQ, Topkar VV, Nguyen NT, Zheng Z. 2015. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature*. 523: 5-481.
- 82- Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, Shi X, Scott DA, Mikkelsen TS. 2014. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science*. 343: 7-84.
- 83- Sanjana NE, Shalem O, Zhang F. 2014. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat Methods*. 11: 4-783.
- 84- Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, Lander ES. 2014. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science*. 343: 4-80.
- 85- Koike-Yusa H, Li Y, Tan EP, Velasco-Herrera Mdel C, Yusa K. 2014. Genome-wide recessive genetic screening in mammalian cells with a lentiviral CRISPR-guide RNA library. *Nat Biotechnol*. 32: 73-267.
- 86- Zhou Y, Zhu S, Cai C, Yuan P, Li C, Huang Y. 2014. High-throughput screening of a CRISPR/Cas9 library for functional genomics in human cells. *Nature*. 509: 91-487.
- 87- Parnas O, Jovanovic M, Eisenhaure TM, Herbst RH, Dixit A, Ye CJ. 2015. A genome-wide CRISPR screen in primary immune cells to dissect regulatory networks. *Cell*. 16: 86-675.
- 88- Ma H, Dang Y, Wu Y, Jia G, Anaya E, Zhang J. 2015. A CRISPR-based screen identifies genes essential for West-Nile-virus-induced cell death. *Cell Rep*. 28: 83-673.
- 89- Bassett AR, Kong L, Liu JL. 2015. A genome-wide CRISPR library for high-throughput genetic screening in *Drosophila* cells. *J Genet Genomics*. 42: 9-301.
- 90- Chen S, Sanjana NE, Zheng K, Shalem O, Lee K, Shi X. 2015. Genome-wide CRISPR screen in a mouse model of tumor growth and metastasis. *Cell*. 160: 60-1246.
- 91- Chari R, Mali P, Moosburner M, Church GM. 2015. Unraveling CRISPR-Cas9 genome engineering parameters via a library-on-library approach. *Nat Methods*. 12: 6-823.

- 92- Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N. 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 339: 23-819.
- 93- Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK. 2013. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol*. 31: 6-822.
- 94- Jiang W, Bikard D, Cox D, Zhang F, Marraffi ni LA. 2013. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol*. 31: 9-233.
- 95- Lin Y, Cradick TJ, Brown MT, Deshmukh H, Ranjan P, Sarode N. 2014. CRISPR/Cas9 systems have off-target activity with insertions or deletions between target DNA and guide RNA sequences. *Nucleic Acids Res*. 42: 85-7473.
- 96- Doench JG, Hartenian E, Graham DB, Tothova Z, Hegde M, Smith I, 2014. Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation. *Nat Biotechnol*. 32: 7-1262.
- 97- Gagnon JA, Valen E, Thyme SB, Huang P, Akhmetova L, Pauli A. 2014. Efficient mutagenesis by Cas9 protein-mediated oligonucleotide insertion and large-scale assessment of single - guide RNAs. *PLoS One*. 9: 256-981.
- 98- Xu H, Xiao T, Chen CH, Li W, Meyer CA, Wu Q. 2015. Sequence determinants of improved CRISPR sgRNA design. *Genome Res*. 25: 57-1147.
- 99- Pelletier S, Gingras S, Green DR. 2015. Mouse genome engineering via CRISPR-Cas9 for study of immune function. *Immunity*. 42:18-27.
- 100- Fu Y, Sander JD, Reyon D, Cascio VM, Joung JK. 2014. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat Biotechnol*. 32: 84-279.
- 101- Martinez J, Malireddi RK, Lu Q, Cunha LD, Pelletier S, Gingras S. 2015. Molecular characterization of LC3-associated phagocytosis reveals distinct roles for Rubicon, NOX2 and autophagy proteins. *Nat Cell Biol*. 17: 893-906.

- 102- Tuerk C, Gold L. 1990. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*. 249: 10-505.
- 103- Pattanayak V, Ramirez CL, Joung JK, Liu DR. 2011. Revealing off-target cleavage specificities of zinc-finger nucleases by in vitro selection. *Nat Methods*. 8: 70-765.
- 104- Gabriel R, Lombardo A, Arens A, Miller JC, Genovese P, Kaepfel C. 2011. An unbiased genomewide analysis of zinc-finger nuclease specificity. *Nat Biotechnol*. 29: 23-816.
- 105- Smith C, Gore A, Yan W, Abalde-Atristain L, Li Z, He C. 2014. Whole-genome sequencing analysis reveals high specificity of CRISPR/Cas9 and TALEN-based genome editing in human iPSCs. *Cell Stem Cell*. 15: 3-12.
- 106- Iyer V, Shen B, Zhang W, Hodgkins A, Keane T, Huang X. 2015. Off-target mutations are rare in Cas9-modified mice. *Nat Methods*. 12: 1-47.
- 107- Yang H, Wang H, Shivalila CS, Cheng AW, Shi L, Jaenisch R. 2013. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*. 154: 9-1370.
- 108- Veres A, Gosis BS, Ding Q, Collins R, Ragavendran A, Brand H. 2014. Low incidence of off-target mutations in individual CRISPR-Cas9 and TALEN targeted human stem cell clones detected by whole-genome sequencing. *Cell Stem Cell*. 15:27-30.
- 109- Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F. 2013. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*. 153: 8-910.
- 110- Miller JC, Holmes MC, Wang J, Guschin DY, Lee YL, Rupniewski I, 2007. An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol*. 25: 85-778.
- 111- Mali P, Aach J, Stranges PB, Esvelt KM, Moosburner M, Kosuri S. 2013. CAS9 transcriptional activators for target specificity

- screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nat Biotechnol.* 31: 8-833.
- 112- Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE. 2013. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell.* 154: 9-1380.
- 113- Fu Y, Reyon D, Joung JK. 2014. Targeted genome editing in human cells using CRISPR/Cas nucleases and truncated guide RNAs. *Methods Enzymol.* 546: 21-45.
- 114- Guilinger JP, Thompson DB, Liu DR. 2014. Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification. *Nat Biotechnol.* 32: 82-577.
- 115- Chapman JR, Taylor MR, Boulton SJ. 2012. Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Mol Cell.* 47: 497-510.
- 116- Chang YF, Imam JS, Wilkinson MF. 2007. The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annu Rev Biochem.* 76: 51-74.
- 117- Yang H, Wang H, Jaenisch R. 2014. Generating genetically modified mice using CRISPR/Cas -mediated genome engineering. *Nat Protoc.* 9: 68-1956.
- 118- Orlando SJ, Santiago Y, DeKolver RC, Freyvert Y, Boydston EA, Moehle EA. 2010. Zinc- finger nuclease-driven targeted integration into mammalian genomes using donors with limited chromosomal homology. *Nucleic Acids Res.* 38: 1-152.
- 119- Cai CQ, Doyon Y, Ainley WM, Miller JC, DeKolver RC, Moehle EA, 2009. Targeted transgene integration in plant cells using designed zinc finger nucleases. *Plant Mol Biol.* 69: 699-709.
- 120- Moehle EA, Rock JM, Lee YL, Jouvenot Y, DeKolver RC, Gregory PD. 2007. Targeted gene addition into a specified location in the human genome using designed zinc finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104: 60-3055.

- 121- Hockemeyer D, Wang H, Kiani S, Lai CS, Gao Q, Cassady JP. 2011. Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nat Biotechnol.* 29: 4-731.
- 122- Goldberg AD, Banaszynski LA, Noh KM, Lewis PW, Elsaesser SJ, Stadler S. 2010. Distinct factors control histone variant H3.3 localization at specific genomic regions. *Cell.* 140: 91-678.
- 123- Beumer K, Bhattacharyya G, Bibikova M, Trautman JK, Carroll D. 2006. Efficient gene targeting in *Drosophila* with zinc-finger nucleases. *Genetics.* 172: 403-2391.
- 124- Carlson DF, Tan W, Lillico SG, Stverakova D, Proudfoot C, Christian M. 2012. Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. *Proc Natl Acad Sci USA.* 109: 7-17382.
- 125- Ma S, Zhang S, Wang F, Liu Y, Liu Y, Xu H. 2012. Highly efficient and specific genome editing in silkworm using custom TALENs. *PLoS One.* 7: 1-45035.
- 126- Liu PQ, Chan EM, Cost GJ, Zhang L, Wang J, Miller JC. 2010. Generation of a triple-gene knockout mammalian cell line using engineered zinc-finger nucleases. *Biotechnol Bioeng.* 10: 97-105.
- 127- Kim S, Lee HJ, Kim E, Kim JS. 2010. Analysis of targeted chromosomal deletions induced by zinc finger nucleases. *Cold Spring Harbor Protoc.* 10: 1-5477.
- 128- Lee HJ, Kim E, Kim JS. 2010. Targeted chromosomal deletions in human cells using zinc finger nucleases. *Genome Res.* 20: 9-81.
- 129- Petolino JF, Worden A, Curlee K, Connell J, Strange Moynahan TL, Larsen C. 2010. Zinc finger nuclease-mediated transgene deletion. *Plant Mol Biol.* 73: 28-617.
- 130- Blasco RB, Karaca E, Ambrogio C, Cheong TC, Karayol E, Minero VG. 2014. Simple and rapid in vivo generation of chromosomal rearrangements using CRISPR/Cas9 technology. *Cell Rep.* 9: 27-1219.
- 131- Maddalo D, Manchado E, Concepcion CP, Bonetti C, Vidigal JA, Han YC. 2014. In vivo engineering of oncogenic chromosomal rearrangements with the CRISPR/Cas9 system. *Nature.* 516: 7-423.

- 132- Ghezraoui H, Piganeau M, Renouf B, Renaud JB, Sallmyr A, Ruis B, 2014. Chromosomal translocations in human cells are generated by canonical nonhomologous end-joining. *Mol Cell*. 55: 42-829.
- 133- Choi PS. 2014. Meyerson M. Targeted genomic rearrangements using CRISPR/Cas technology. *Nat Commun*. 5: 1-3728.
- 134- Torres R, Martin MC, Garcia A, Cigudosa JC, Ramirez JC, Rodriguez-Perales S. 2014. Engineering human tumour-associated chromosomal translocations with the RNA-guided CRISPR-Cas9 system. *Nat Commun*. 5: 1-3964.
- 135- Piganeau M, Ghezraoui H, De Cian A, Guittat L, Tomishima M, Perrouault L. 2013. Cancer translocations in human cells induced by zinc finger and TALE nucleases. *Genome Res*. 23: 93-1182.
- 136- Do TU, Ho B, Shih SJ, Vaughan A. 2012. Zinc Finger Nuclease induced DNA double stranded breaks and rearrangements in MLL. *Mutat Res*. 740: 34-42.
- 137- Van Deursen J, Fornerod M, Van Rees B, Grosveld G. 1995. Cre-mediated site-specific translocation between nonhomologous mouse chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92: 80-7376.
- 138- DeKolver RC, Choi VM, Moehle EA, Paschon DE, Hockemeyer D, Meijnsing SH. 2010. Functional genomics, proteomics, and regulatory DNA analysis in isogenic settings using zinc finger nuclease-driven transgenesis into a safe harbor locus in the human genome. *Genome Res*. 20: 42-1133-42.
- 139- Luo Y, Rao M, Zou J. 2014. Generation of GFP reporter human induced pluripotent stem cells using AAVS1 safe harbor transcription activator-like effector nuclease. *Curr Protoc Stem Cell Biol*. 29: 71-718.
- 140- Tiyaboonchai A, Mac H, Shamsedeen R, Mills JA, Kishore S, French DL. 2014. Utilization of the AAVS1 safe harbor locus for hematopoietic specific transgene expression and gene knockdown in human ES cells. *Stem Cell Res*, 12(3): 7-630.

- 141- Chu VT, Weber T, Wefers B, Wurst W, Sander S, Rajewsky K, et al. 2015. Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nat Biotechnol.* 33(5): 8-543.
- 142- Maruyama T, Dougan SK, Truttmann MC, Bilate AM, Ingram JR, Ploegh HL. 2015. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nat Biotechnol.* 33(5): 42-538.
- 143- Singh P, Schimenti JC, Bolcun-Filas E. 2015. A mouse geneticist's practical guide to CRISPR applications. *Genetics.* 199(1): 1-15.
- 144- Lin S, Staahl BT, Alla RK, Doudna JA. 2014. Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. *eLife.* 3: e04766.
- 145- Liu J, Gaj T, Patterson JT, Sirk SJ, Barbas III CF. 2014. Cell-penetrating peptide-mediated delivery of TALEN proteins via bioconjugation for genome engineering. *PLoS One.* 9(1): e85755.
- 146- Ru R, Yao Y, Yu S, Yin B, Xu W, Zhao S, et al. 2013. Targeted genome engineering in human induced pluripotent stem cells by penetrating TALENs. *Cell Regen.* 2(1): 5.
- 147- Chen Z, Jaafar L, Agyekum DG, Xiao H, Wade MF, Kumaran RI, et al. 2013. Receptor-mediated delivery of engineered nucleases for genome modification. *Nucleic Acids Res.* 41: 19.
- 148- Ramakrishna S, Kwaku Dad AB, Beloor J, Gopalappa R, Lee SK, Kim H. 2014. Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA. *Genome Res.* 20(6): 1-24.
- 149- Gaj T, Guo J, Kato Y, Sirk SJ, Barbas III CF. 2012. Targeted gene knockout by direct delivery of zinc-finger nuclease proteins. *Nat Methods.* 9(8): 7-805.
- 150- Kim S, Kim D, Cho SW, Kim J, Kim JS. 2014. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Res.* 24(6): 1-1012.

- 151- Zuris JA, Thompson DB, Shu Y, Guilinger JP, Bessen JL, Hu JH, et al. 2015. Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing in vitro and in vivo. *Nat Biotechnol.* 33(1): 73-80.
- 152- Sahin U, Kariko K, Tureci O. 2014. mRNA-based therapeutics developing a new class of drugs *Nat Rev Drug Discov.* 13(10): 80-759.
- 153- Genovese P, Schirotti G, Escobar G, Di Tomaso T, Firrito C, Calabria A, et al. 2014. Targeted genome editing in human repopulating haematopoietic stem cells. *Nature* . 510(7504): 40-235.
- 154- Lombardo A, Genovese P, Beausejour CM, Colleoni S, Lee YL, Kim KA, et al. 2007. Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and integrase-defective lentiviral vector delivery. *Nat Biotechnol.* 25(11): 306-1298.
- 155- Provasi E, Genovese P, Lombardo A, Magnani Z, Liu PQ, Reik A, et al. 2012. Editing T cell specificity towards leukemia by zinc finger nucleases and lentiviral gene transfer. *Nat Med* . 18(5): 15-807.
- 156- Holkers M, Maggio I, Liu J, Janssen JM, Miselli F, Mussolino C, et al. 2013. Differential integrity of TALE nuclease genes following adenoviral and lentiviral vector gene transfer into human cells. *Nucleic Acids Res.* 41(5): e63.
- 157- Yang L, Guell M, Byrne S, Yang JL, De Los Angeles A, Mali P, et al. 2013. Optimization of scarless human stem cell genome editing. *Nucleic Acids Res.* 41(19): 61-9049.
- 158- Mock U, Riecken K, Berdien B, Qasim W, Chan E, Cathomen T, et al. 2014. Novel lentiviral vectors with mutated reverse transcriptase for mRNA delivery of TALE nucleases. *Sci Rep* . 4:6409.
- 159- Lei Y, Lee CL, Joo KI, Zarzar J, Liu Y, Dai B, et al. 2011. Gene editing of human embryonic stem cells via an engineered

- baculoviral vector carrying zinc-finger nucleases. *Mol Ther.* 19(5): 50-942.
- 160- Phang RZ, Tay FC, Goh SL, Lau CH, Zhu H, Tan WK, et al. 2013. Zinc finger nuclease-expressing baculoviral vectors mediate targeted genome integration of reprogramming factor genes to facilitate the generation of human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med.* 2(12): 45-935.
- 161- Tay FC, Tan WK, Goh SL, Ramachandra CJ, Lau CH, Zhu H, et al. 2013. Targeted transgene insertion into the AAVS1 locus driven by baculoviral vector-mediated zinc finger nuclease expression in human-induced pluripotent stem cells. *J Gene Med.* 15(10): 95-384.
- 162- Zhu H, Lau CH, Goh SL, Liang Q, Chen C, Du S, et al. 2013. Baculoviral transduction facilitates TALEN-mediated targeted transgene integration and Cre/LoxP cassette exchange in human-induced pluripotent stem cells. *Nucleic Acids Res.* 41(19): e180.
- 163- Lau CH, Zhu H, Tay JC, Li Z, Tay FC, Chen C, et al. 2014. Genetic rearrangements of variable di-residue (RVD)-containing repeat arrays in a baculoviral TALEN system. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 1: 1-14050.
- 164- Wirth T, Parker N, Yla-Herttuala S. 2013. History of gene therapy. *Gene.* 525(2): 9-162.
- 165- Tebas P, Stein D, Tang WW, Frank I, Wang SQ, Lee G, et al. 2014. Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *N Engl J Med.* 370(10): 10-901.
- 166- Coluccio A, Miselli F, Lombardo A, Marconi A, Malagoli Tagliazucchi G, Goncalves MA, et al. 2013. Targeted gene addition in human epithelial stem cells by zinc-finger nuclease-mediated homologous recombination. *Mol Ther.* 21(9): 704-1695.
- 167- Perez EE, Wang J, Miller JC, Jouvenot Y, Kim KA, Liu O, et al. 2008. Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol.* 8(7): 16-808.

- 168- Holkers M, Maggio I, Henriques SF, Janssen JM, Cathomen T, Goncalves MA. 2014. Adenoviral vector DNA for accurate genome editing with engineered nucleases. *Nat Methods* . 11(10): 7-1051.
- 169- Maggio I, Holkers M, Liu J, Janssen JM, Chen X, Goncalves MA. 2014. Adenoviral vector delivery of RNA-guided CRISPR/Cas9 nuclease complexes induces targeted mutagenesis in a diverse array of human cells. *Sci Rep*. 4: 1-5105.
- 170- Holkers M, Cathomen T, Goncalves MA. 2014. Construction and characterization of adenoviral vectors for the delivery of TALENs into human cells. *Methods*. 69(2): 87-179.
- 171- Kotterman MA, Schaffer DV. 2014. Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy *Nat Rev Genet*. 15(7): 51-445.
- 172- Ellis BL, Hirsch ML, Porter SN, Samulski RJ, Porteus MH. 2013. Zinc-finger nuclease-mediated gene correction using single AAV vector transduction and enhancement by Food and Drug Administration-approved drugs. *Gene Ther*. 20(1): 35-42 .
- 173- Asuri P, Bartel MA, Vazin T, Jang JH, Wong TB, Schaffer DV. 2012. Directed evolution of adeno-associated virus for enhanced gene delivery and gene targeting in human pluripotent stem cells. *Mol Ther*. 20(2): 38-329.
- 174- Handel EM, Gellhaus K, Khan K, Bednarski C, Cornu TI, Muller-Lerch F, et al. 2012. Versatile and efficient genome editing in human cells by combining zinc-finger nucleases with adeno-associated viral vectors. *Hum Gene Ther*. 23(3): 9-321.
- 175- Howes R, Schofield C. 2015. Genome engineering using Adeno-Associated Virus (AAV). *Methods Mol Biol*. 1239: 75-103.
- 176- Platt RJ, Chen S, Zhou Y, Yim MJ, Swiech L, Kempton HR, et al. 2014. CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. *Cell*. 159(2): 55-440.
- 177- Senis E, Fatouros C, Grosse S, Wiedtke E, Niopek D, Mueller AK, et al. 2014. CRISPR/Cas9-mediated genome engineering: an

- adeno-associated viral (AAV) vector toolbox. *Biotechnol J.* 9(11): 12-1402.
- 178- DiCarlo JE, Norville JE, Mali P, Rios X, Aach J, Church GM. 2013. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res.* 41(7): 43-4336.
- 179- Li T, Huang S, Zhao X, Wright DA, Carpenter S, Spalding MH, et al. 2011. Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 39(14): 25-6315.
- 180- Morton J, Davis MW, Jorgensen EM, Carroll D. 2006. Induction and repair of zinc-finger nuclease –targeted double-strand breaks in *Caenorhabditis elegans* somatic cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103(44): 5-16370.
- 181- Friedland AE, Tzur YB, Esvelt KM, Colaiacovo MP, Church GM, Calarco JA. 2013. Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system. *Nat Methods.* 10(8): 3-741.
- 182- Wood AJ, Lo TW, Zeitler B, Pickle CS, Ralston EJ, Lee AH, et al. 2011. Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs. *Science.* 333(6040): 1-307.
- 183- Liu J, Li C, Yu Z, Huang P, Wu H, Wei C, et al. 2012. Efficient and specific modifications of the *Drosophila* genome by means of an easy TALEN strategy. *J Genet Genomics.* 39(5): 15-209.
- 184- Bibikova M, Golic M, Golic KG, Carroll D. 2002. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics.* 161(3): 75-1169.
- 185- Bassett AR, Tibbit C, Ponting CP, Liu JL. 2013. Highly efficient targeted mutagenesis of *Drosophila* with the CRISPR/Cas9 system. *Cell Rep.* 4(1): 8-220.
- 186- Hwang WY, Fu Y, Reyon D, Maeder ML, Kaini P, Sander JD, et al. 2013. Heritable and precise zebrafish genome editing using a CRISPR-Cas system. *PLoS One.* 8(7): e68708.
- 187- Hwang WY, Fu Y, Reyon D, Maeder ML, Tsai SQ, Sander JD, et al. 2013. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol.* 31(3): 9-227.

- 188- Sander JD, Cade L, Khayter C, Reyon D, Peterson RT, Joung JK, et al. 2011. Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs. *Nat Biotechnol.* 29(8): 8-697.
- 189- Doyon Y, McCammon JM, Miller JC, Faraji F, Ngo C, Katibah GE, et al. 2008. Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol.* 26(6): 8-702
- 190- Meng X, Noyes MB, Zhu LJ, Lawson ND, Wolfe SA. 2008. Targeted gene inactivation in zebrafish using engineered zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol.* 26(6): 695-701.
- 191- Young JJ, Cherone JM, Doyon Y, Ankoudinova I, Faraji FM, Lee AH, et al. 2011. Efficient targeted gene disruption in the soma and germ line of the frog *Xenopus tropicalis* using engineered zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 108(17): 7-7052.
- 192- Lei Y, Guo X, Liu Y, Cao Y, Deng Y, Chen X, et al. 2012. Efficient targeted gene disruption in *Xenopus* embryos using engineered transcription activator-like effector nucleases (TALENs). *Proc Natl Acad Sci USA.* 109(43): 9-17484.
- 193- Blitz IL, Biesinger J, Xie X, Cho KW. 2013. Biallelic genome modification in F(0) *Xenopus tropicalis* embryos using the CRISPR/Cas system. *Genesis.* 51(12): 34-827.
- 194- Nakayama T, Fish MB, Fisher M, Oomen-Hajagos J, Thomsen GH, Grainger RM. 2013. Simple and efficient CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Xenopus tropicalis*. *Genesis.* 51(12): 43-835.
- 195- Carbery ID, Ji D, Harrington A, Brown V, Weinstein EJ, Liaw L, et al. 2010. Targeted genome modification in mice using zinc-finger nucleases. *Genetics.* 186(2): 9-451.
- 196- Meyer M, de Angelis MH, Wurst W, Kuhn R. 2010. Gene targeting by homologous recombination in mouse zygotes mediated by zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107(34): 6-15022.
- 197- Qiu Z, Liu M, Chen Z, Shao Y, Pan H, Wei G, et al. 2013. High-efficiency and heritable gene targeting in mouse by transcription activator-like effector nucleases. *Nucleic Acids Res.* 41(11): e120.

- 198- Wefers B, Panda SK, Ortiz O, Brandl C, Hensler S, Hansen J, et al. 2013. Generation of targeted mouse mutants by embryo microinjection of TALEN mRNA. *Nat Protoc.* 8(12): 79-2355.
- 199- Wefers B, Meyer M, Ortiz O, Hrabe de Angelis M, Hansen J, Wurst W, et al. 2013. Direct production of mouse disease models by embryo microinjection of TALENs and oligodeoxynucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA.* 110(10): 7-3782.
- 200- Geurts AM, Cost GJ, Freyvert Y, Zeitler B, Miller JC, Choi VM, et al. 2009. Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science.* 325(5939): 1-433.
- 201- Tesson L, Usal C, Menoret S, Leung E, Niles BJ, Remy S, et al. 2011. Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs. *Nat Biotechnol.* 29(8): 6-695.
- 202- Li W, Teng F, Li T, Zhou Q. 2013. Simultaneous generation and germline transmission of multiple gene mutations in rat using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol.* 31(8): 6-684.
- 203- Li D, Qiu Z, Shao Y, Chen Y, Guan Y, Liu M, et al. 2013. Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol.* 31(8): 3-681.
- 204- Flisikowska T, Thorey IS, Offner S, Ros F, Lifke V, Zeitler B, et al. 2011. Efficient immunoglobulin gene disruption and targeted replacement in rabbit using zinc finger nucleases. *PLoS One.* 6(6): e21045.
- 205- Song J, Zhong J, Guo X, Chen Y, Zou Q, Huang J, et al. 2013. Generation of RAG 1- and 2-deficient rabbits by embryo microinjection of TALENs. *Cell Res.* 23(8): 62-1059.
- 206- Yan Q, Zhang Q, Yang H, Zou Q, Tang C, Fan N, et al. 2014. Generation of multi-gene knockout rabbits using the Cas9/gRNA system. *Cell Regen.* 3(1): 1-12.
- 207- Honda A, Hirose M, Sankai T, Yasmin L, Yuzawa K, Honsho K, et al. 2015. Single-step generation of rabbits carrying a targeted allele of the tyrosinase gene using CRISPR/Cas9. *Exp Anim.* 64(1): 7-31.

- 208- Chen Y, Zheng Y, Kang Y, Yang W, Niu Y, Guo X, et al. 2015. Functional disruption of the dystrophin gene in rhesus monkey using CRISPR/Cas9. *Hum Mol Genet.* 24(13): 74-3764.
- 209- Wan H, Feng C, Teng F, Yang S, Hu B, Niu Y, et al. 2015. One-step generation of p53 gene biallelic mutant Cynomolgus monkey via the CRISPR/Cas system. *Cell Res.* 25(2): 61-258.
- 210- Niu Y, Shen B, Cui Y, Chen Y, Wang J, Wang L, et al. 2014. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell.* 156(4): 43-836.
- 211- Zhang F, Maeder ML, Unger-Wallace E, Hoshaw JP, Reyon D, Christian M, et al. 2010. High frequency targeted mutagenesis in Arabidopsis thaliana using zinc finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107(26): 33-12028.
- 212- Shukla VK, Doyon Y, Miller JC, DeKolver RC, Moehle EA, Worden SE, et al. 2009. Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature.* 459(7245): 41-437.
- 213- Townsend JA, Wright DA, Winfrey RJ, Fu F, Maeder ML, Joung JK, et al. 2009. High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases. *Nature.* 459(7245): 5-442.
- 214- Li T, Liu B, Spalding MH, Weeks DP, Yang B. 2012. High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nat Biotechnol.* 30(5): 2-390.
- 215- Jia H, Wang N. 2014. Targeted genome editing of sweet orange using Cas9/sgRNA. *PLoS One.* 9(4): e93806.
- 216- Nodvig CS, Nielsen JB, Kogle ME, Mortensen UH. 2015. A CRISPR-Cas9 system for genetic engineering of filamentous fungi. *PLoS One.* 10(7): e0133085.
- 217- Arazoe T, Miyoshi K, Yamato T, Ogawa T, Ohsato S, Arie T, et al. 2015. Tailor-made CRISPR/Cas system for highly efficient targeted gene replacement in the rice blast fungus. *Biotechnol Bioeng.* 112: 9-2543.
- 218- Wu H, Wang Y, Zhang Y, Yang M, Lv J, Liu J, et al. 2015. TALE nickase-mediated SP110 knockin endows cattle with

- increased resistance to tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci USA* . 112(13): 9-1530.
- 219- Tan W, Carlson DF, Lancto CA, Garbe JR, Webster DA, Hackett PB, et al. 2013. Efficient nonmeiotic allele introgression in livestock using custom endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 110(41): 31-16526.
- 220- Proudfoot C, Carlson DF, Huddart R, Long CR, Pryor JH, King TJ, et al. 2015. Genome edited sheep and cattle. *Transgenic Res*. 24(1): 53-147.
- 221- Lillico SG, Proudfoot C, Carlson DF, Stverakova D, Neil C, Blain C, et al. 2013. Live pigs produced from genome edited zygotes. *Sci Rep*. 3: 1-2847.
- 222- Estrada JL, Martens G, Li P, Adams A, Newell KA, Ford ML, et al. 2015. Evaluation of human and non-human primate antibody binding to pig cells lacking GGTA1/CMAH/beta4GalNT2 genes. *Xenotransplantation*. 22(3): 202-194.
- 223- Li P, Estrada JL, Burlak C, Montgomery J, Butler JR, Santos RM, et al. 2015. Efficient generation of genetically distinct pigs in a single pregnancy using multiplexed single-guide RNA and carbohydrate selection. *Xenotransplantation*. 22(1): 20-31 .
- 224- Kang JT, Kwon DK, Park AR, Lee EJ, Yun YJ, Ji DY, et al. 2016. Production of GGTA1 targeted pigs using TALEN-mediated genome editing technology. *J Vet Sci*. 17(1): 89-96 .
- 225- Xin J, Yang H, Fan N, Zhao B, Ouyang Z, Liu Z, et al. 2013. Highly efficient generation of GGTA1 biallelic knockout inbred mini-pigs with TALENs. *PLoS One*. 8(12): e84250.
- 226- Prather RS, Lorson M, Ross JW, Whyte JJ, Walters E. 2013. Genetically engineered pig models for human diseases. *Annu Rev Anim Biosci*. 1: 19-203.
- 227- Liu X, Wang Y, Tian Y, Yu Y, Gao M, Hu G, et al. 2014. Generation of mastitis resistance in cows by targeting human lysozyme gene to beta-casein locus using zinc-finger nucleases. *Proc Biol Sci*. 281(1780): 1-20133368.

- 228- Crispo M, Mulet AP, Tesson L, Barrera N, Cuadro F, Dos Santos-Neto PC, et al. 2014. Efficient generation of myostatin knock-out sheep using CRISPR/Cas9 technology and microinjection into zygotes. *PLoS One*. 10(8): e0136690.
- 229- Sebastiano V, Maeder ML, Angstman JF, Haddad B, Khayter C, Yeo DT, et al. 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): 26-1717.
- 230- Finotti A, Breda L, Lederer CW, Bianchi N, Zuccato C, Kleanthous M, et al. 2015. Recent trends in the gene therapy of beta-thalassemia. *J Blood Med*. 6: 69-85.
- 231- Huang X, Wang Y, Yan W, Smith C, Ye Z, Wang J, et al. 2015. Production of gene-corrected adult beta globin protein in human erythrocytes differentiated from patient iPSCs after genome editing of the sickle point mutation. *Stem Cells*. 33(5): 9-1470.
- 232- Li H, Haurigot V, Doyon Y, Li T, Wong SY, Bhagwat AS, et al. 2011. In vivo genome editing restores haemostasis in a mouse model of haemophilia. *Nature*. 475(7355): 21-217.
- 233- Anguela XM, Sharma R, Doyon Y, Miller JC, Li H, Haurigot V, et al. 2013. Robust ZFN-mediated genome editing in adult hemophilic mice. *Blood*. 122(19): 7-3283.
- 234- Park CY, Kim DH, Son JS, Sung JJ, Lee J, Bae S, et al. 2015. Functional correction of large factor VIII gene chromosomal inversions in hemophilia A patient-derived iPSCs using CRISPR – Cas9. *Cell Stem Cell*. 17(2): 20-213.
- 235- Park CY, Kim J, Kweon J, Son JS, Lee JS, Yoo JE, et al. 2014. Targeted inversion and reversion of the blood coagulation factor 8 gene in human iPS cells using TALENs. *Proc Natl Acad Sci USA*. 111(25): 8-9253.
- 236- Smith C, Abalde-Atristain L, He C, Brodsky BR, Braunstein EM, Chaudhari P, et al. 2015. Efficient and allele-specific genome editing of disease loci in human iPSCs. *Mol Ther*. 23(3): 7-570.
- 237- Ousterout DG, Kabadi AM, Thakore PI, Majoros WH, Reddy TE, Gersbach CA. 2015. Multiplex CRISPR/Cas9-based genome

- editing for correction of dystrophin mutations that cause Duchenne muscular dystrophy. *Nat Commun.* 6: 1-6244.
- 238- Li HL, Fujimoto N, Sasakawa N, Shirai S, Ohkame T, Sakuma T, et al. 2015. Precise correction of the dystrophin gene in duchenne muscular dystrophy patient induced pluripotent stem cells by TALEN and CRISPR-Cas9. *Stem Cell Rep.* 4(1): 54-143.
- 239- Toscano MG, Anderson P, Munoz P, Lucena G, Cobo M, Benabdellah K, et al. 2013. Use of zinc -finger nucleases to knock out the WAS gene in K562 cells: a human cellular model for Wiskott-Aldrich syndrome. *Dis Model Mech.* 6(2): 54-544.
- 240- Firth AL, Menon T, Parker GS, Qualls SJ, Lewis BM, Ke E, et al. 2015. Functional gene correction for cystic fibrosis in lung epithelial cells generated from patient iPSCs. *Cell Rep.* 12(9): 90-1385.
- 241- Ding Q, Strong A, Patel KM, Ng SL, Gosis BS, Regan SN, et al. 2014. Permanent alteration of PCSK9 with in vivo CRISPR-Cas9 genome editing. *Circ Res.* 115(5): 92-488.
- 242- Long C, McAnally JR, Shelton JM, Mireault AA, Bassel-Duby R, Olson EN. 2014. Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA. *Science.* 345(6201): 8-1184.
- 243- Holt N, Wang J, Kim K, Friedman G, Wang X, Taupin V, et al. 2010. Human hematopoietic stem/progenitor cells modified by zinc-finger nucleases targeted to CCR5 control HIV-1 in vivo *Nat Biotechnol.* 28(8): 47-839.
- 244- Hu W, Kaminski R, Yang F, Zhang Y, Cosentino L, Li F, et al. 2014. RNA-directed gene editing specifically eradicates latent and prevents new HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 111(31): 6-11461.
- 245- Yuen KS, Chan CP, Wong NH, Ho CH, Ho TH, Lei T, et al. 2015. CRISPR/Cas9-mediated genome editing of Epstein-Barr virus in human cells. *J Gen Virol.* 96(3): 36-626.

- 246- Ran FA, Cong L, Yan WX, Scott DA, Gootenberg JS, Kriz AJ, et al. 2015. In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature*. 520(7546): 91-186.

فصل دوم

شناسایی نواحی غیر کدکننده ژنوم با استفاده از CRISPR/Cas9 سیستم ویرایش

خلاصه

مطالعات عملکرد ژن در موش‌ها طی دهه گذشته بسیار مورد توجه قرار گرفته است که توسط القای مجموعه‌ای از جهش‌ها از طریق سیستم نوترکیبی همسان در سلول‌های ES موش پدید آمده‌اند. متأسفانه، مطالعه محدودی در زمینه عملکرد عناصر غیر کدکننده ژنوم در دسترس وجود دارد. با این وجود مطالعات مرتبط در این زمینه در ژنوم مهره‌داران طی سال‌های گذشته در حال افزایش است. نقشه جامع تغییرات هیستون، الگوهای متیلاسیون و پروتئین‌های متصل شونده به DNA، جهت پیش‌بینی عناصر کلیدی تنظیم‌کننده در سلول، از طریق کارگروه کنسرسیوم‌های مشترک بین‌المللی مانند ENCODE تهیه شده‌اند. مقایسه این نقشه‌ها با داده‌های حاصل از مطالعات مرتبط با کل ژنوم (GWAS)¹ پیشنهاد

¹ - Genome-Wide Association Studies

می‌کنند که ممکن است، انواع عناصر غیرکدکننده^۱ در ایجاد صفات مختلف و شرایط بیماری دخیل باشند. بنابراین، نیاز به دقت در آزمایشات عملکردی ژنوم و ایجاد مدل‌سازی ژنتیکی عناصر غیرکدکننده، ضروری می‌باشد. در این فصل، ما تعدادی استراتژی جهت آزمایش فرضیه‌های مربوط به عناصر غیرکدکننده DNA، با استفاده از آخرین تکنیک‌های ویرایش ژنومی مانند: CRISPR/Cas9 پیشنهاد می‌کنیم.

مقدمه

ژن‌های کدکننده پروتئین، تنها حدود ۲ درصد از ژنوم مهره‌داران را تشکیل می‌دهند. الباقی، که حدود ۹۸ درصد از ژنوم را شامل می‌شود، ترکیبی از عناصر تکراری DNA و انواع مختلفی از توالی‌های غیرکدکننده‌اند که میزان قابل توجهی از حفاظت گونه‌ای را ایجاد می‌کنند (۱). عناصر غیرکدکننده در تنظیم دقیق بیان ژن و تعیین هویت و عملکرد نوع سلول دخالت دارند. توالی‌های تنظیم‌کننده فعال و غیرفعال با علائم خاص بیوشیمیایی مرتبط هستند. متیلاسیون DNA^۲، تغییرات هیستون و پروتئین‌های متصل شونده به DNA^۳، برای عملکرد و وضعیت یک عنصر مشخص پیش‌بینی می‌شوند (۲). توالی‌های فعال افزایش‌دهنده‌ای^۴ که بوسیله، متیلاسیون تکی لیزین شماره ۴^۵ و استیلاسیون لیزین شماره ۲۷^۶ در هیستون H3 نشان‌دار می‌شوند و در مناطق باز کروماتین واقع شده‌اند، نسبت به آنزیم DNase I حساس‌اند (شکل ۱). علاوه بر این، وجود پروتئین‌های متصل شونده به افزایش‌دهنده‌ها مانند: CHD7 و P300 جهت شناسایی مطمئن افزایش‌دهنده‌ها استفاده می‌شوند (۳). وجود عوامل نسخه‌برداری در محدوده اطراف ژن سبب تنظیم شبکه‌های ژنی می‌شوند (۴). جالب توجه است، که نشاندارکننده‌های کروماتین و فاکتورهای نسخه‌برداری که بخش کوچکی از ژنوم غیرکدکننده را تغییر می‌دهند، بین انواع سلول‌های مختلف و در

¹- Noncoding Elements

²- DNA Methylation

³- DNA-Binding Protein

⁴- Enhancer-Binding Proteins

⁵- Mono-Methylation of Lysine 4 of Histone H3 (H3K4me1)

⁶- Acetylation of Lysine 27 (H3K27ac)

طول توسعه و تمایز سلولی، متفاوت‌اند (۵). همبستگی مستقیمی بین فاکتورهای نسخه‌برداری و کروماتین در بسیاری از انواع سلول‌ها یا بافت‌ها، از جمله سلول‌های بنیادی جنینی (ES)، شرح داده شده است، همچنین تمایل به مطالعه عناصر غیرکدکننده و تنظیم‌کننده سبب توسعه در علوم زیست‌شناسی سلول‌های بنیادی می‌شود (۶). چندین توالی مختلف در عناصر غیرکدکننده در ارتباط با صفات انسانی و شرایط بیماری یافت شده است (۷، ۱۱). به عنوان مثال، مطالعات مرتبط با کل ژنوم (GWAS) نشان داده است یک ویژگی مشترک مانند رنگ چشم به شدت با یک پلی‌مورفیسم DNA، که ۲۱ کیلوباز در بالادست ژن OCA2 مرتبط با رنگدانه است، ارتباط دارد. تجزیه و تحلیل مولکولی نشان داده است که یک پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNP) به نام rs12913832 C-allele، که در درون افزایش‌دهنده OCA2 واقع شده، سبب کاهش بیان ژن OCA2، کاهش کارایی فاکتور نسخه‌برداری، و ایجاد حلقه کروماتینی می‌شود (۱۱). همچنین در مورد رنگ مو نیز، در برخی قسمت‌ها، در توالی‌های غیرکدکننده ژنوم واقع شده است (۱۲). بدین ترتیب، نتایج مطالعات در زمینه نقش عملکردی مناطق غیرکدکننده در ایجاد صفات انسانی و بیماری روز به روز در حال افزایش است. بنابراین، نیاز فوری به مدل‌سازی مناسب برای انواع مناطق غیرکدکننده و جهش احساس می‌شود. در این فصل به مرور کلی از روش‌های تجربی در زمینه نقش عناصر غیرکدکننده و روش‌های غیرفعال کردن آن‌ها، در ارگانیسم‌های مدل با استفاده از سیستم ویرایش ژنومی CRISPR/Cas9 پرداخته شده است.

دستکاری ژنتیکی توالی‌های غیرکدکننده در عصر پری‌نوکلئاز^۱

از طریق مکانیسم نوترکیبی همسان، آلل‌های فاقد عملکرد تمامی ژن‌های کدکننده پروتئین در سلول‌های ES موش (سلول‌های بنیادی جنینی) بدست آمده است (۱۳). از لحاظ تئوری، از همان روش‌های تجربی می‌توان برای غیرفعال کردن عناصر غیرکدکننده استفاده نمود. با این حال، تنها تعداد انگشت شماری از عناصر غیرکدکننده با استفاده از این

¹ - Preenuclease Era

استراتژی در سلول‌های ES غیر فعال شده‌اند (۱۴، ۱۶). در حقیقت، عناصر غیرکدکننده ژنوم در نواحی تکراری بسیار غنی می‌باشند که این عامل سبب پدید آمدن مشکلاتی در طراحی و کتور هدف می‌شود، از اینرو حضور توالی‌های غیر منحصربفرد DNA^۱ در داخل بازوهای همسان برای شناسایی توالی هدف مخاطره‌آمیز است. از این رو، انتظار می‌رود بیشتر رویدادهای شناسایی توالی هدف در خارج از نواحی DNA مورد نظر غیرکدکننده اما در مکان‌های ژنومی غنی از توالی تکراری مشابه رخ دهد.

همچنین، طی یک مطالعه، مطالبی را در ارتباط با شناسایی ژن هدف در سلول‌های ES برجسته نموده است. با مقایسه ژنوم 129/Sv و C57BL/6J (سویه‌هایی از موش که بیشتر به عنوان منبع سلول‌های ES و به عنوان جنین دریافت‌کننده استفاده می‌شوند) به ترتیب، بیش از ۱۰۰۰ جهش رونده^۲ در مجاورت ژن‌های کدگذاری شناسایی شده‌اند، که می‌تواند تفسیر فنوتایپ‌های مرتبط با جهش را مختل سازد (۱۷).

استراتژی جایگزینی که عمدتاً در سال‌های گذشته مورد بررسی قرار گرفته است، استفاده از ترانس‌ژن‌ها با ژنوم بزرگ می‌باشد (۱۸). به جای هدف قرار دادن عناصر تنظیم‌کننده در جایگاه خودش، چندین آزمایشگاه جهش‌های غیرفعالی را در ساختارهای ژنومی بزرگ مانند: کروموزوم‌های مصنوعی باکتریایی (BAC) یا کروموزوم‌های مصنوعی مخمر (YAC) تولید نمودند. با این عمل جهش مورد نظر در ساختار ژنومیک ترانس‌ژن تولید شد. استفاده از باکتری‌ها یا مخمرها، سبب افزایش بازدهی مکانیسم نوترکیب‌های همسان، سهولت در دستورزی تعداد زیادی کلون و همچنین کاهش هزینه‌ها شده است (۱۹). علاوه بر این، سازواره‌های نوترکیب^۳ به سلول‌ها یا ارگانیسم‌های مدل منتقل می‌شوند، و می‌توان اثر جهش در عناصر DNA غیرکدکننده را از طریق ژن گزارشگر موجود در ترانس‌ژن‌ها بررسی نمود (۲۰). از سوی دیگر، BAC‌ها یا YAC‌های تغییر یافته ژنتیکی

^۱- Non-Unique DNA Sequences

^۲ - Passenger Mutation: یک جهش که بر روی کلون تأثیری ندارد اما ممکن است با گسترش کلونال همراه باشد.

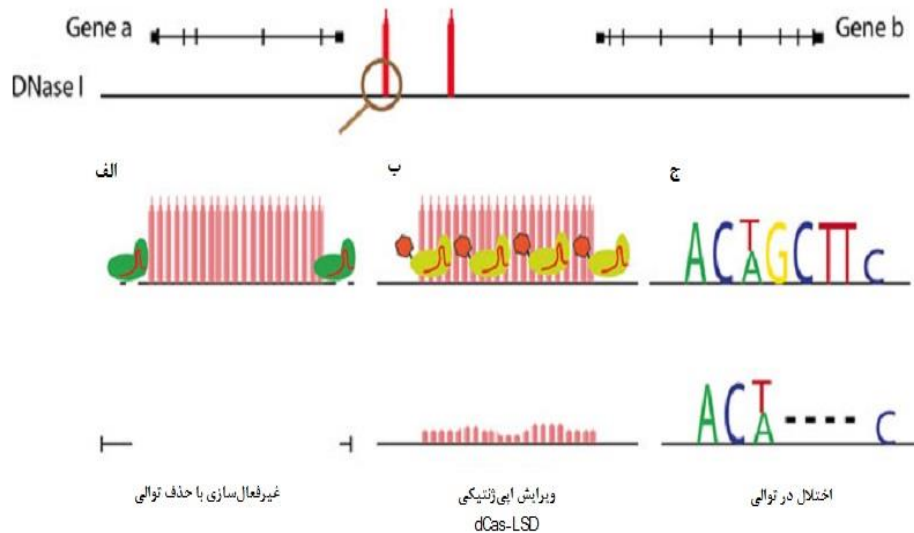
^۳- Recombined Constructs

می‌توانند در محل‌هایی که ژن‌های غیرفعال شده در موش‌ها حضور دارند منتقل شوند (۲۱). با این اوصاف، این رویکرد دارای چندین محدودیت می‌باشد. اول اینکه، دستورزی سازواره‌های بزرگ آسان نیست و فقط تعداد محدودی از آزمایشگاه‌ها موفق به تولید پروتکل‌های مناسب شدند. ثانياً، مدل‌سازی یک جهش در یک ترانس ژن بزرگ، سبب انتقال چندین رقم غیرایزوژن به مدل می‌شود. در نهایت اینکه ممکن است، تعداد کپی، محل ادغام توالی هدف و یکپارچگی ترانس ژن به شدت بر فنوتیپ تأثیر بگذارد و منجر به تولید فنوتیپ‌های پیچیده گردد (۲۲، ۲۳). سیستم ویرایش ژنومی CRISPR/Cas9 با کارایی و انعطاف‌پذیری بالا به نظر می‌رسد کاندیدای ایده‌آل برای پر کردن شکاف موجود در مدل‌سازی ژنتیک و ارزیابی عملکرد توالی‌های غیرکدکننده در تمام ارگانیسم‌های مدل مورد استفاده قرار گیرد (۲۴، ۲۵). با استفاده از این سیستم، می‌توان به راحتی محدودیت‌هایی که در رابطه با ژن هدف در سلول‌های ES و ترانس ژن بزرگ وجود دارد را برطرف نمود. به خصوص، با استفاده از CRISPR/Cas9 همسانی توالی‌ها را برای شناسایی هدف می‌تواند به ۲۰ جفت باز کاهش دهد و مهمتر از همه اینکه، به طور دقیق در جایگاه هدف اتصال میابد (۲۳).

در این فصل، سه استراتژی متمایز جهت اختلال ژنتیکی عناصر غیرکدکننده، با استفاده از روش CRISPR/Cas9 را نشان می‌دهد. ابتدا، به معرفی غیرفعال‌سازی با حذف کروموزوم پرداخته شده است (شکل ۲، الف). سپس، در مورد روش جدیدی با عنوان "ویرایش اپی‌ژنوم"^۱ صحبت می‌کند (شکل ۲، ب) و در نهایت، در مورد استراتژی‌های هدف قرار دارند ژن‌های غیرکدکننده پروتئینی^۲ مانند miRNA و lincRNA بحث می‌کند.

^۱- Epigenome Editing

^۲- Non-Protein-Coding Genes



شکل ۲) مکانیسم‌های مختلف سیستم ویرایش CRISPR/Cas9

الف) غیر فعال کردن با حذف توالی: دو sgRNA برای یک منطقه مورد نظر کروماتین طراحی شده‌اند. هنگامی که همزمان شکاف‌های دو رشته تولید می‌شود، توالی DNA میانی حذف می‌شود. **ب) ویرایش اپی ژنتیکی:** sgRNAها در سراسر طول توالی هدف طراحی شده است و همراه با پروتئین dCas9 متصل به دامین کاتالیزوری Lsd1 به درون نواحی هدف انتقال می‌آید. **ج) اختلال در توالی:** هنگامی فاکتورهای نسخه‌برداری اختصاصی متصل شونده به DNA به خوبی تعیین شدند، یک sgRNA می‌تواند به طور اختصاصی برای اتصال هدف طراحی گردد. پس از ترمیم NHEJ، جهش‌های indel در توالی DNA قرار می‌گیرند.

ویرایش از طریق حذف کروموزوم

عناصر تنظیمی غیرکدکننده، درون توالی‌های مرتبط با فاکتورهای نسخه‌برداری متصل شونده به DNA وجود دارند. مکانیسم عمل آن‌ها با همکاری چندگانه پروتئین‌های متصل شونده به DNA صورت می‌پذیرد. اتصال یک فاکتور نسخه‌برداری اختصاصی به یک توالی

DNA را می‌توان با حضور یک جایگاه خاص یا توالی‌های توافقی پیش‌بینی نمود. با این وجود، الگوی اتصال به DNA همیشه به طور کامل قابل پیش‌بینی نیست، چرا که بسیاری از توالی‌های توافقی هنوز شناسایی نشده‌اند.

بر اساس ماتریس موقعیت وزنی (PWM)^۱، امکان پیش‌بینی توالی‌های توافقی افزایش یافته است و سبب افزایش کارایی فاکتورهای نسخه‌برداری در شناسایی جهش‌های نقطه‌ای در توالی هدف می‌شود (۲۶). از این رو، برخلاف ژن‌های کدکننده پروتئین که می‌توانند شناسایی جهش‌های تغییر چهارچوب را مختل کنند، جهش‌های نقطه برای غیرفعال کردن عناصر تنظیمی پیچیده کارایی ندارند (۲۶).

یک رویکرد متفکرانه حذف عناصر غیرکدکننده از درون توالی‌های بزرگ DNA است که بصورت فرضی عملکردی را کنترل می‌کند. دوم اینکه، همپوشانی جهش‌های حذفی کوچک می‌تواند نقشه صحیح عناصر هسته‌ای یا تشریح روابط مختلف هر یک از توالی‌های انفرادی DNA را نشان دهد. ترمیم اتصال پایانه ناهمسان (NHEJ) از طریق مکانیسم ویرایش ژنومی CRISPR/Cas9، می‌تواند برای به دست آوردن چنین آل‌هایی مورد استفاده قرار گیرد. تولید دو پایانه DNA می‌تواند منجر به حذف توالی مداخله‌گر موجود بین دو توالی DSB شود (شکل ۲، الف). این روش نشان دهنده یک رویکرد ساده و موثر برای غیرفعال کردن عناصر غیرکدکننده درون ژنوم می‌باشد که بوسیله آنزیم‌های هدفمند نوکلئاز مانند CRISPR/Cas9 تولید شده است. از طریق حذف عناصر تنظیمی می‌توان تغییر در سطح بیان ژن را اندازه‌گیری نمود (۲۷).

با استفاده از مکانیسم حذف CRISPR/Cas9 آزمایشی بر روی عناصر تنظیمی نواحی بالادست (آنزیم اساسی در مسیر بیوسنتز ملانین) صورت پذیرفت (۲۱، ۲۸، ۲۹). ناحیه بالادست توالی^۱ ۵ آنزیم تایروزیناز^۲ دارای چندین جایگاه اتصال DNA می‌باشد که بوسیله EP300 و H3K4me1 نشاندار شده‌اند. طی این پژوهش از طریق انتقال sgRNA و Cas9 به تخم‌های بارور شده ماوس، چندین آل حذفی با فرکانس بالا تولید شد (۲۳). هنگامی که

^۱ - Position Weight Matrices (PWM)

^۲ - Tyrosinase

حذف‌های هموزیگوت تولید شدند، نتایج، حذف چندین رنگدانه‌ها را در چندین لاین مستقل نشان داد که بیانگر لزوم این توالی‌ها در بیان ژن رنگ پوست موش می‌باشد. همانطور که قبلاً ذکر شد، حذف دوگانه مکانیسم CRISPR/Cas9 از مسیر ترمیم خطاپذیر^۱ NHEJ صورت می‌پذیرد. بدین ترتیب، هر آلی که به دست می‌آید دارای یک علامت منحصر به فرد در DNA است. یکی دیگر از نتایج ترمیم خطاپذیر NHEJ، تولید حذف‌های بزرگ و ناقص می‌باشد. این آل‌های اضافی می‌توانند در تهیه نقشه ژنتیکی بکار گرفته شوند. همچنین با مقایسه فنوتیپ آل‌های مختلف، یک نقشه ژنتیکی از عناصر افزایش‌دهنده ناحیه^{۵'} آنزیم تایروزیناز موش ساخته شد. مطالعات گذشته در سلول‌های کشت شده نشان داد، کارایی مکانیسم حذف کروموزومی با اندازه حذف توالی مورد نظر کاهش می‌یابد (۳۰). با این وجود، حذف در چندین مگا باز نوکلئوتید، امکان مدل‌سازی دقیق از کروموزوم، تغییر ساختار یا تعداد نسخه‌ها، که اغلب مرتبط با ناهنجاری‌های ژنتیکی هستند را ممکن می‌سازد (۳۱). یک نمونه قابل توجه که توسط لوپیانس و همکارانش در مدل‌سازی جهش در مرزهای ژنوم گزارش شده است، مرزهای ژنومی^۲ یا جداکننده‌ها هستند، که نقش تنظیمی در دامین‌های ژن‌های چندگانه ایفا می‌کنند. معمولاً این مرزها در میان دو دامین بیانی متفاوت که در مجاورت هم قرار دارند واقع شده‌اند (۲۳، ۳۴). مرزهای ژنومی به طور فیزیکی مکان‌های کروماتینی حاوی ژن‌هایی با الگوهای بیانی متفاوت را از هم جدا می‌کنند (۳۴). مطالعه این توالی‌ها با استفاده از سازه‌های DNA مرتبط با ژن‌های گزارشگر، ممکن است فعالیت این عناصر مرزی را نشان دهد ولی عملکرد واقعی این عناصر را نشان نمی‌دهند (۳۵). در صورتی که، با غیرفعال کردن ژن‌ها در جایگاه‌های دقیق هدف توسط مکانیسم حذف CRISPR/Cas9 می‌توان عملکرد دقیق توالی را نشان داد. جالب توجه است که القای چنین تغییرات ژنتیکی در موش می‌تواند تولید فنوتیپ‌های اختلالات کروموزومی مشابه در انسان گردد (۳۶).

¹ - Error-Prone DNA repair

² - Genomic Boundaries

همچنین از مکانیسم حذف CRISPR/Cas9 می‌تواند جهت برش ژنتیکی افزایش‌دهنده‌ها^۱ استفاده نمود (۳۷). در واقع، sgRNAها می‌توانند به آسانی برای افزایش‌دهنده‌ها طراحی شده و همچنین مناطق مجزای انفرادی مرتبط با ایمنی‌سازی کروماتین^۲ از طریق آنالیز گراف‌های توالی‌یابی به روش CHIP-seq برطرف گردد. با این رویکرد، سهم هر کدام از قطعات افزایش‌دهنده می‌تواند روشن شود (۳۸). در برخی موارد خاص، غیرفعال کردن عناصر غیرکدکننده با استفاده از یک sgRNA از طریق اختلال در ویژگی‌های توالی اتصال به DNA می‌تواند صورت پذیرد (شکل ۲، ج). در این مورد ویژگی‌های جایگاه‌های اتصال فاکتور نسخه‌برداری GATA-2 به خوبی مشخص شده است. اخیراً، برسینیک و همکارانش تعدادی از جایگاه‌های GATA-2 مربوط به فرایند خون‌سازی در موجودات را توصیف نموده‌اند (۳۹). با هدف‌گیری توالی توافقی DNA از طریق مکانیسم CRISPR/Cas9، جهش‌های indel مرتبط با ترمیم DNA بعضی از نوکلئوتیدها دچار تغییر می‌شوند. به عنوان یک پیش شرط، همیشه بایستی توجه داشته باشید که چندین جایگاه اتصال فاکتورهای نسخه‌برداری شناسایی شده باشند، حتی اگر توالی‌های آن‌ها به طور قابل توجهی از همدیگر متفاوت باشند. به دلیل فراوانی جایگاه‌های هدف CRISPR/Cas9 در ژنوم پستانداران، sgRNAها می‌توانند برای شناسایی هر از یک عناصر تنظیم‌کننده تولید شوند. با استفاده از این روش، کانور و همکاران آسیب‌پذیری درونی افزایش‌دهنده BCL11A اختصاصی اریتروئید^۳ را شناسایی کردند، که می‌تواند در درمان القا مجدد گلوبین‌های جنینی^۴، بیماری سلول‌های داسی شکل^۵ و بتا تالاسمی^۶ مورد استفاده قرار گیرند (۴۰). به تازگی، اثر چندین جهش بدخیم مورد بررسی قرار گرفته است. جالب توجه است که جهش در توالی‌های غیرکدکننده ژنوم، در تعداد قابل توجهی از بیماران سرطانی شناسایی شده است (۴۱، ۴۳). در مقابل می‌توان تاثیرات جهش در ژن‌های

¹- Enhancers

²- Chromatin Immunoprecipitation

³- Erythroid-Specific BCL11A Enhancer

⁴- Fetal Globin Re-Induction

⁵- Sickle Cell Disease

⁶- β -Thalassemia

کدکننده پروتئین را با استفاده از مدل‌های حیوانی و سلول‌های موجود موجود پیش بینی نمود در حالیکه شناسایی اثر جهش در خارج از توالی‌های کدکننده ژنوم دشوار است. از این رو، جهش‌زایی از طریق مکانیسم CRISPR/Cas9 نشان‌دهنده یک روش آزمایشگاهی معتبر، جهت شناسایی سریع اثر جهش‌های نواحی غیرکدکننده ژنومی می‌باشد. به عنوان مثال، جهش در توالی‌های غیرکدکننده ژنوم، در تعدادی از بیماران لوسمی لنفوسیتی مزمن (CLL)^۱ یافت شده است. در حقیقت، نشان داده شده است در یک منطقه فوق‌العاده جهش‌پذیر، عناصر مشابه افزایش‌دهنده مانند: H3K4 و H3K27ac به وفور یافت می‌شوند. پونته و همکاران ثابت کردند با حذف یک افزایش‌دهنده شناخته شده از طریق مکانیسم CRISPR/Cas9 منجر به کاهش ۴۰ درصدی در ژن Pax5 شده است (۴۴).

ویرایش اپی‌ژنومیک

ایجاد تغییرات شیمیایی در توالی DNA یا پروتئین‌های هیستون را تغییرات اپی‌ژنتیک گویند، که بر ساختار کروماتین و دسترسی به پروتئین‌های متصل‌شونده به DNA اثر می‌گذارد. این تغییرات به صورت پویا در طول توسعه، تمایز و پیری تغییر شکل می‌یابد. در حقیقت، کلاس‌های خاصی از آنزیم‌ها وجود دارند که چنین علائم بیوشیمیایی را به عقب و جلو ویرایش می‌کند، مانند: متیلازهای DNA و هیستون، دمتیلازها^۲، هیستون استیل ترانسفراز (HAT)^۳ و داستیلازها (HDAC)^۴ (۴۵). هر یک از این آنزیم‌ها می‌توانند توسط داروهای خاص، جهت مهار فعالیت‌شان مورد هدف قرار گیرند. طی سال‌های گذشته، از این مهارکننده‌ها برای تداخل با آنزیم‌های بازسازی کروماتین استفاده شده است. علاوه بر این، از این آنزیم‌ها به عنوان عوامل مورد استفاده در شیمی‌درمانی مورد مطالعه قرار گرفته است (۴۶، ۴۸). متأسفانه این مهارکننده‌ها به صورت عمومی و غیراختصاصی عمل می‌کنند. پیشرفت در ویرایش ژنوم و زیست‌شناسی منجر به طراحی پروتئین‌های متصل‌شونده به

¹- Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL)

²- Demethylases

³- Histone Acetyl Transferases (HAT)

⁴- Deacetylases (HDAC)

DNA بر روی انواع نوکلئازهای هدفمند مجزا شده است. ساختارهای مصنوعی متصل شونده به توالی DNA می‌توانند با انواع دامین‌های کاتالیزوری جفت شوند، مانند پروتئین‌های بازسازی‌کننده کروماتین که در این بخش فهرست شده‌اند. این روش اجازه می‌دهد تا به طور دقیق و هدفمند علائم خاص تغییرات کروماتینی بدون دستکاری ژنتیکی انتقال داده شوند (شکل ۲، ب). به عنوان مثال یک TALE با یک آنزیم Tet1 (آنزیم افزایش‌دهنده دمتیلاسیون DNA) جفت شد است. هدف قرار دادن ترکیب TALE-Tet1 منجر به حذف متیلاسیون DNA می‌شود. مثلاً، با هدف قرار دادن پروموتور RHOXF2 در سلول‌های HeLa و HEK293 موجب فعال‌سازی ۵۰ تا ۱۰۰۰ برابر ژن می‌شود (۴۹).

به تازگی، سیستم ویرایش ژنومی CRISPR/Cas9 جهت برنامه‌های کاربردی در ویرایش اپی‌ژنومی بوسیله نوعی از آنزیم نوکلئاز Cas9 موسوم به نوکلئاز مرده (dCas9)^۱، مورد استفاده قرار گرفته است. کران و همکاران توانستند با طراحی، ترکیب dCas9^۲ و LSD1 و gRNAهای اختصاصی افزایش‌دهنده، سبب کاهش بیان ژن هدف شوند (۵۰). این گروه تحقیقاتی توانستند با هدف قرار دادن افزایش‌دهنده‌های مربوط به فاکتورهای بیانی، تغییرات مورفولوژیکی را در سلول‌های ES موش ایجاد کنند. جالب توجه است که این تغییرات به حذف H3K27ac از افزایش‌دهنده‌های کلیدی بستگی دارد.

همچنین ممکن است با اتصال dCas9 به EP300 (هیستون استیل ترانسفراز)، سبب افزایش فعال‌سازی ژن‌های هدف با استفاده از gRNAهای افزایش‌دهنده و پروموتور گردد (۵۱). این رویکرد با تغییرات برگشت‌ناپذیر توالی DNA مرتبط نیست. در حقیقت، فقط ویژگی‌های اپی‌ژنتیکی تغییر می‌کنند، نه خود توالی DNA. از این رو، صفات برگشت‌پذیر و غیروراثتی ویژگی‌های بسیار مطلوبی برای برنامه‌های درمانی می‌باشند. بنابراین، ویرایش اپی‌ژنومیک یکی از ابزارهای امیدوارکننده مشتق شده از سیستم ویرایش CRISPR/Cas9 می‌باشد (۵۲).

^۱ - Nuclease-dead Cas9 Variant (dCas9)

^۲ - Lysine-Specific Demethylase (LSD1)

هدف‌گیری RNAهای غیرکدکننده^۱

مطالعات اخیر، نقش RNAهای غیرکدکننده، مانند میرناها (miRNA)^۲ و لینکرناها (lincRNA)^۳ را در تنظیم بیان ژن در سطوح مختلف نشان داده است (۵۳). از نوع این نسخه‌ها بیش از ۵۶۰۰۰ لنکرینا و تعداد مشابهی میرناهای کوچک انسانی گزارش شده است (۵۴). بدین ترتیب، نیازمند به یک مدل ژنتیکی مناسب جهت تعریف نقش این مولکول‌های RNA تنظیم‌کننده نوظهور می‌باشد. برخلاف ژن‌های کدکننده پروتئین، این نسخه‌ها را نمی‌توان با تحریک جهش‌های تغییر چهارچوب در اگزون‌های غیرفعال نمود. ترجیحا، آن‌ها باید همانند عناصر DNA غیرکدکننده مانند: افزایش‌دهنده‌ها و جداکننده‌ها از ژنوم حذف شوند. به عنوان مثال، هان و همکاران حذف بزرگی شامل ۲۳ کیلوباز در لینکرناى Rian در موش پدید آوردند (۵۵). جالب توجه است، که این محققان توانستند افزایش بیان ژن‌های مجاور لنکرینای Rian را شناسایی کنند. ارائه این شواهد نشان می‌دهد که لینکرناها می‌توانند نسخه‌برداری ژن‌های مجاور را تنظیم کند. در یک مطالعه توسط بین و همکاران، با هدف مشخص کردن عملکرد لینکرناى Haunt، تعدادی از استراتژی‌های متمایز مبتنی بر مکانیسم CRISPR/Cas9 را بکار گرفتند. جهت تجزیه و تحلیل اثر نسخه‌های Haunt، پژوهشگران یک سری حذف با اندازه‌های مختلف تولید و به عناصر کاربردی درونی آن هدایت نمودند. با حذف کوچکی از توالی‌های پروموتور Haunt سبب حذف بیان لینکرناى Haunt و افزایش بیان ژن هدف Haunt شد. در مقابل، با ایجاد حذف بزرگتر، محققین کاهش در بیان همان مجموعه از ژن‌های هدف را مشاهده نمودند، که نشان می‌دهد جایگاه Haunt به عنوان افزایش‌دهنده ژن HOXA نیز عمل می‌کند. برای تأیید این اطلاعات، این محققین از طریق حذف توالی پروموتور با استفاده از مکانیسم CRISPR/Cas9 سبب افزایش بیان ژن Haunt شدند (۵۶). با این مکانیسم می‌توان افزایش بیان لینکرنا را در جایگاه‌های درون ژنومی^۴ ایجاد نمود. میرناها اغلب به صورت خوشه‌های بزرگ ژنی

¹- Targeting Noncoding RNAs

²- micro-RNAs (miRNAs)

³- long intergenic noncoding RNAs (lincRNAs)

⁴- Endogenous Locus

سازماندهی می‌شوند. در این رابطه، ژباتو و همکاران یک حذف بزرگ حاوی میرنا را با انتقال دو sgRNA به جنین در کروموزوم شماره ۹ زبرافیش انجام دادند (۵۷).

نتیجه‌گیری

کارآیی، انعطاف‌پذیری و قابلیت تولید مجدد روش‌های مبتنی بر مکانیسم ویرایش CRISPR/Cas9 بسیاری از محققان را مجبور به انجام آزمایش‌های چالش برانگیزی نمود که چند سال قبل از ابداع این روش بسیار دشوار یا تقریباً غیرممکن بود. القای جهش ژنوم از طریق سیستم CRISPR/Cas9 به طور چشمگیری افزایش یافته است و امکان دسترسی عملی به توالی‌های کدکننده و غیرکدکننده را فراهم نموده. در حال حاضر، با استفاده از روش‌های آنزیم نوکلئاز هدفمند می‌توان کل ژنوم پستانداران را مورد بررسی قرار داد و نقش عناصر کدکننده و غیرکدکننده را در فیزیولوژی و بیماری‌شناسی کشف نمود.

منابع

- 1- Cheng Y, Ma Z, Kim BH, Wu W, Cayting P, Boyle AP, Sundaram V, Xing X, Dogan N, Li J, Euskirchen G, Lin S, Lin Y, Visel A, Kawli T, Yang X, Patacsil D, Keller CA, Giardine B; Mouse ENCODE Consortium, Kundaje A, Wang T, Pennacchio LA, Weng Z, Hardison RC, Snyder MP. 2014. Principles of regulatory information conservation between mouse and human. *Nature*. 515(7527): 5-371.
- 2- Visel A, Blow MJ, Li Z, Zhang T, Akiyama JA, Holt A, Plajzer-Frick I, Shoukry M, Wright C, Chen F, Afzal V, Ren B, Rubin EM, Pennacchio LA. 2009. ChIP-seq accurately predicts tissue-specific activity of enhancers. *Nature*. 457(7231): 8-854.
- 3- Schnetz MP, Handoko L, Akhtar-Zaidi B, Bartels CF, Pereira CF, Fisher AG, Adams DJ, Flicek P, Crawford GE, Laframboise T, Tesar P, Wei CL, Scacheri PC. 2010. CHD7 targets active gene enhancer elements to modulate ES cell-specific gene expression. *PLoS Genet*. 6(7): e1001023.
- 4- Roadmap Epigenomics Consortium, Kundaje A, Meuleman W, Ernst J, Bilenky M, Yen A, Heravi-Moussavi A, Kheradpour P, Zhang Z, Wang J, Ziller MJ, Amin V, Whitaker JW, et al. 2015. Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. *Nature*. 518(7539): 30-317.
- 5- Dixon JR, Jung I, Selvaraj S, Shen Y, Antosiewicz-Bourget JE, Lee AY, Ye Z, Kim A, Rajagopal N, Xie W, Diao Y, Liang J, Zhao H, Lobanenko VV, Ecker JR, Thomson JA, Ren B. 2015. Chromatin architecture reorganization during stem cell differentiation. *Nature*. 518(7539): 6-331.
- 6- Ouyang Z, Zhou Q, Wong WH. 2009. ChIP-Seq of transcription factors predicts absolute and differential gene expression in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 106(51): 6-21521.
- 7- Bauer DE, Kamran SC, Lessard S, Xu J, Fujiwara Y, Lin C, Shao Z, Canver MC, Smith EC, Pinello L, Sabo PJ, Vierstra J, Voit RA, Yuan GC, Porteus MH, Stamatoyannopoulos JA, Lettre G, Orkin SH. 2013. An erythroid enhancer of BCL11A subject to genetic

- variation determines fetal hemoglobin level. *Science*. 342(6155): 7-253.
- 8- Farh KK, Marson A, Zhu J, Kleinewietfeld M, Housley WJ, Beik S, Shores N, Whitton H, Ryan RJ, Shishkin AA, Hatan M, Carrasco-Alfonso MJ, Mayer D, Luckey CJ, Patsopoulos NA, De Jager PL, Kuchroo VK, Epstein CB, Daly MJ, Hafler DA, Bernstein BE. 2015. Genetic and epigenetic fine mapping of causal autoimmune disease variants. *Nature*. 518(7539): 43-337.
- 9- Lidral AC, Liu H, Bullard SA, Bonde G, Machida J, Visel A, Uribe LM, Li X, Amendt B, Cornell RA. 2015. A single nucleotide polymorphism associated with isolated cleft lip and palate, thyroid cancer and hypothyroidism alters the activity of an oral epithelium and thyroid enhancer near FOXE1. *Hum Mol Genet*. 24(14): 907-3895.
- 10- Smemo S, Tena JJ, Kim KH, Gamazon ER, Sakabe NJ, Gómez-Marín C, Aneas I, Credidio FL, Sobreira DR, Wasserman NF, Lee JH, Puvindran V, Tam D, Shen M, Son JE, Vakili NA, Sung HK, Naranjo S, Acemel RD, Manzanares M, Nagy A, Cox NJ, Hui CC, Gomez-Skarmeta JL, Nóbrega MA. 2014. Obesity-associated variants within FTO form long-range functional connections with IRX3. *Nature*. 507(7492): 5-371.
- 11- Visser M, Kayser M, Palstra RJ. 2012. HERC2 rs12913832 modulates human pigmentation by attenuating chromatin-loop formation between a long-range enhancer and the OCA2 promoter. *Genome Res*. 22(3): 55-446.
- 12- Guenther CA, Tasic B, Luo L, Bedell MA, Kingsley DM. 2014. A molecular basis for classic blond hair color in Europeans. *Nat Genet*. 46(7): 52-748.
- 13- Capecchi MR. 2005. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nat Rev Genet*. 6(6): 12-507.
- 14- Bender MA, Bulger M, Close J, Groudine M. 2000. Beta-globin gene switching and DNase I sensitivity of the endogenous beta-

- globin locus in mice do not require the locus control region. *Mol Cell*. 5(2): 93-387.
- 15- Visel A, Zhu Y, May D, Afzal V, Gong E, Attanasio C, Blow MJ, Cohen JC, Rubin EM, Pennacchio LA. 2010. Targeted deletion of the 9p21 non-coding coronary artery disease risk interval in mice. *Nature*. 464(7287): 12-409.
 - 16- Volpi SA, Verma-Gaur J, Hassan R, Ju Z, Roa S, Chatterjee S, Werling U, Hou Jr H, Will B, Steidl U, Scharff M, Edelman W, Feeney AJ, Birshtein BK. 2012. Germline deletion of Igh 3'regulatory region elements hs 5, 6, 7 (hs5-7) affects B cell-specific regulation, rearrangement, and insulation of the Igh locus. *J Immunol*. 188(6): 66-2556.
 - 17- Vanden Berghe T, Hulpiau P, Martens L, Vandenbroucke RE, Van Wonterghem E, Perry SW, Bruggeman I, Divert T, Choi SM, Vuylsteke M, Shestopalov VI, Libert C, Vandenabeele P. 2015. Passenger mutations confound interpretation of all genetically modified congenic mice. *Immunity*. 43(1): 9-200.
 - 18- Giraldo P, Montoliu L. 2001. Size matters: use of YACs, BACs and PACs in transgenic animals. *Transgenic Res*. 10(2): 83-103.
 - 19- Giraldo P, Giménez E, Montoliu L. 1999. The use of yeast artificial chromosomes in transgenic animals: expression studies of the tyrosinase gene in transgenic mice. *Genet Anal*. 15(3): 8-175.
 - 20- Murisier F, Guichard S, Beermann F. 2007. Distinct distal regulatory elements control tyrosinase expression in melanocytes and the retinal pigment epithelium. *Dev Biol*. 303(2): 47-838.
 - 21- Montoliu L, Umland T, Schütz G. 1996. A locus control region at -12 kb of the tyrosinase gene. *EMBO J*. 15(22): 34-6026.
 - 22- Giménez E, Giraldo P, Jeffery G, Montoliu L. 2001. Variegated expression and delayed retinal pigmentation during development in transgenic mice with a deletion in the locus control region of the tyrosinase gene. *Genesis*. 30(1): 5-21.
 - 23- Seruggia D, Fernández A, Cantero M, Pelczar P, Montoliu L. 2015. Functional validation of mouse tyrosinase non-coding

- regulatory DNA elements by CRISPR-Cas9-mediated mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* 43(10): 67-4855.
- 24- Harms DW, Quadros RM, Seruggia D, Ohtsuka M, Takahashi G, Montoliu L, Gurumurthy CB. 2014. Mouse genome editing using the CRISPR/Cas system. *Curr Protoc Hum Genet.* 83: 27-15.7.1.
- 25- Seruggia D, Montoliu L. 2014. The new CRISPR-Cas system: RNA-guided genome engineering to efficiently produce any desired genetic alteration in animals. *Transgenic Res.* 23(5): 16-707.
- 26- Matys V, Fricke E, Geffers R, Gössling E, Haubrock M, Hehl R, Hornischer K, Karas D, Kel AE, Kel-Margoulis OV, Kloos DU, Land S, Lewicki-Potapov B, Michael H, Münch R, Reuter I, Rotert S, Saxel H, Scheer M, Thiele S, Wingender E. 2003. TRANSFAC: transcriptional regulation, from patterns to profiles. *Nucleic Acids Res.* 31: 8-374.
- 27- Li Y, Rivera CM, Ishii H, Jin F, Selvaraj S, Lee AY, Dixon JR, Ren B. 2014. CRISPR reveals a distal super-enhancer required for Sox2 expression in mouse embryonic stem cells. *PLoS One.* 9(12): e114485.
- 28- Giraldo P, Martínez A, Regales L, Lavado A, García-Díaz A, Alonso A, Busturia A, Montoliu L. 2003. Functional dissection of the mouse tyrosinase locus control region identifies a new putative boundary activity. *Nucleic Acids Res.* 31(21): 305-6290.
- 29- Giraldo P, Montoliu L. 2002. Artificial chromosome transgenesis in pigmentary research. *Pigment Cell Res.* 15(4): 64-258.
- 30- Canver MC, Bauer DE, Dass A, Yien YY, Chung J, Masuda T, Maeda T, Paw BH, Orkin SH. 2014. Characterization of genomic deletion efficiency mediated by clustered regularly interspaced palindromic repeats (CRISPR)/Cas9 nuclease system in mammalian cells. *J Biol Chem.* 289(31): 24-21312.
- 31- Essletzbichler P, Konopka T, Santoro F, Chen D, Gapp BV, Kralovics R, Brummelkamp TR, Nijman SM, Bürckstümmer T. 2014. Megabase-scale deletion using CRISPR/Cas9 to generate a fully haploid human cell line. *Genome Res.* 24(12): 65-2059.

- 32- Dixon JR, Selvaraj S, Yue F, Kim A, Li Y, Shen Y, Hu M, Liu JS, Ren B. 2012. Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature*. 485(7398): 80-376.
- 33- Lieberman-Aiden E, van Berkum NL, Williams L, Imakaev M, Ragoczy T, Telling A, Amit I, Lajoie BR, Sabo PJ, Dorschner MO, Sandstrom R, Bernstein B, Bender MA, Groudine M, Gnirke A, Stamatoyannopoulos J, Mirny LA, Lander ES, Dekker J. 2009. Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science*. 326(5950): 93-289.
- 34- Moltó E, Fernández A, Montoliu L. 2009. Boundaries in vertebrate genomes: different solutions to adequately insulate gene expression domains. *Brief Funct Genomic Proteomic*. 8(4): 96-283.
- 35- Wang J, Vicente-García C, Seruggia D, Moltó E, Fernandez-Miñán A, Neto A, Lee E, Gómez-Skarmeta JL, Montoliu L, Lunyak VV, Jordan IK. 2015. MIR retrotransposon sequences provide insulators to the human genome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 112(32): 37-E4428.
- 36- Lupiáñez DG, Kraft K, Heinrich V, Krawitz P, Brancati F, Klopocki E, Horn D, Kayserili H, Opitz JM, Laxova R, Santos-Simarro F, Gilbert-Dussardier B, Wittler L, Borschiwer M, Haas SA, Osterwalder M, Franke M, Timmermann B, Hecht J, Spielmann M, Visel A, Mundlos S. 2015. Disruptions of topological chromatin domains cause pathogenic rewiring of gene-enhancer interactions. *Cell*. 161(5): 25-1012.
- 37- Parker SC, Stitzel ML, Taylor DL, Orozco JM, Erdos MR, Akiyama JA, van Bueren KL, Chines PS, Narisu N; NISC Comparative Sequencing Program, Black BL, Visel A, Pennacchio LA, Collins FS. 2013. National Institutes of Health Intramural Sequencing Center Comparative Sequencing Program NISC Comparative Sequencing Program Authors. Chromatin stretch enhancer states drive cell-specific gene regulation and harbor human disease risk variants. *Proc Natl Acad Sci USA*. 110(44): 17921-17926.

- 38- Hnisz D, Schuijers J, Lin CY, Weintraub AS, Abraham BJ, Lee TI, Bradner JE, Young RA. 2015. Convergence of developmental and oncogenic signaling pathways at transcriptional super-enhancers. *Mol Cell*. 58(2): 70-362.
- 39- Hewitt KJ, Kim DH, Devadas P, Prathibha R, Zuo C, Sanalkumar R, Johnson KD, Kang YA, Kim JS, Dewey CN, Keles S, Bresnick EH. 2015. Hematopoietic signaling mechanism revealed from a stem/progenitor cell cistrome. *Mol Cell*. 59(1): 62-74.
- 40- Canver MC, Smith EC, Sher F, Pinello L, Sanjana NE, Shalem O, Chen DD, Schupp PG, Vinjamur DS, Garcia SP, Luc S, Kurita R, Nakamura Y, Fujiwara Y, Maeda T, Yuan GC, Zhang F, Orkin SH, Bauer DE. 2015. BCL11A enhancer dissection by Cas9-mediated in situ saturating mutagenesis. *Nature*. 527(7577): 7-192.
- 41- Chiba K, Johnson JZ, Vogan JM, Wagner T, Boyle JM, Hockemeyer D. 2015. Cancer-associated TERT promoter mutations abrogate telomerase silencing. *Elife*. doi: 10.7554/eLife.07918 .
- 42- Katainen R, Dave K, Pitkänen E, Palin K, Kivioja T, Välimäki N, Gylfe AE, Ristolainen H, Hänninen UA, Cajuso T, Kondelin J, Tanskanen T, Mecklin JP, Järvinen H, Renkonen-Sinisalo L, Lepistö A, Kaasinen E, Kilpivaara O, Tuupanen S, Enge M, Taipale J, Aaltonen LA. 2015. CTCF/cohesin-binding sites are frequently mutated in cancer. *Nat Genet*. 47(7): 21-818.
- 43- Mansour MR, Abraham BJ, Anders L, Berezovskaya A, Gutierrez A, Durbin AD, Etchin J, Lawton L, Sallan SE, Silverman LB, Loh ML, Hunger SP, Sanda T, Young RA, Look AT. 2014. Oncogene regulation. An oncogenic super-enhancer formed through somatic mutation of a noncoding intergenic element. *Science*. 346(6215): 7-1373.

مهندسی ژنومی انسانی و پلوریپوتنسی

خلاصه

پلوریپوتنسی القا شده (iPSCs)¹، منشاء سلول‌های بنیادی افراد می‌باشد و تحقیقات بر روی انسان را به عنوان یک مدل ژنتیکی امکان‌پذیر می‌سازد. اگرچه iPSCها در حدود یک دهه در دسترس بودند، اما اصلاح ژنومی ساده و کارآمد به تازگی حاصل شده است. آنزیم‌های نوکلئاز نو ترکیب و قابل برنامه‌ریزی سبب القای آسیب به توالی DNA هدف جهت تولید جهش‌های تصادفی و یا بکارگیری مکانیسم طبیعی ترمیم DNA جهت تغییرات اصلاحی، بوسیله یک توالی الگوی میانجی می‌شود. در این قسمت به مرور کلی فن‌آوری‌های پیشرفته نوکلئاز مانند: ZFN، TALEN و CRISPR/Cas9 و ابزارهای آنها جهت مهندسی ژنومی iPSCهای انسانی پرداخته شده است. همچنین به چگونگی استفاده از نوکلئازها جهت ویرایش ژنومی و روش‌های تشخیص و اجتناب از توالی غیرهدف می‌پردازد. سرانجام به بررسی انواع منابع ژنتیکی و فنی در iPSCها و مسائل مربوط به کنترل‌های مناسب ایزوژنیک پرداخته است.

¹ - Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs)

پلوریپوتنسی القا شده و مدل ژنومی انسانی

جیمز تامسون اولین کسی بود که توانست از توده سلولی داخلی (ICM)^۱ جنین‌های بارور شده، سلول‌های بنیادی جنینی انسان (ESCs)^۲ را تولید کند (۱). این سلول‌های جدید دارای دو ویژگی بودند، نخست اینکه آن‌ها قادر به تقسیم سلولی نامحدود در محیط کشت هستند (خود تجدید)، همچنین آن‌ها قادرند به تمام سلول‌ها و بافت‌های بالغ تمایز پیدا کنند (پلوریپوتنت یا انعطاف‌پذیر). مزیت بی‌نظیر ESC‌های انسانی نسبت به سایر سلول‌های آزمایشگاهی، ظرفیت تمایز هم در سلول‌های تراتوما (Teratoma)^۳ و هم در سلول‌های توده‌ای کشت‌بافتی است (۲، ۳، ۴). کاربرد چشمگیری در تحقیقات مرتبط با بیماری‌ها و تولید داروهای احیاکننده بلافاصله برای ESC‌ها آشکار شد، با این حال، منابع جنینی هنوز به عنوان مباحث اخلاق زیستی مورد اتفاق نظر واقع نشده‌اند (۵). حدود یک دهه قبل تاکاهاشی و یاماناکا نشان دادند که سلول‌های سوماتیک موش می‌توانند از طریق بیان چهار فاکتور نسخه‌برداری: Oct3/4، Sox2، Klf4 و c-Myc به حالت اولیه سلول‌های بنیادی جنین‌مانند بازگردانده شوند (۶). اندکی پس از القای سلول‌های بنیادی پلوریپوتنت (iPSC) از سلول‌های سوماتیک انسانی، مسائل فنی و قوانین اخلاق زیستی وضع گردید (شکل ۱) (۷)، (۸). در مقایسه با سلول‌های بنیادی جنینی (ESC)، سلول‌های بنیادی پلوریپوتنت القا شده (iPSC) قادرند سلول‌های بنیادی شخصی را با رضایت افراد برای مدل‌سازی بیماری و درمان‌های احتمالی تولید نمایند. علاوه بر این، برخلاف ESC‌ها، iPSC‌ها ممکن است باعث احیای سلامت و رفاه یک فرد شوند. بدین ترتیب، ارائه یک پروفایل ژنتیکی بوسیله iPSC افراد، ممکن است به درک بهتر با سلامت افراد کمک کند (۹). اگرچه ESC‌ها از سلول‌های جنینی انسان یا iPSC‌ها از طریق برنامه‌ریزی مجدد^۴ حاصل می‌شوند اما سلول‌های iPSC‌دارای ویژگی‌های کلیدی یک سیستم ژنتیکی قابل ردیابی می‌باشد مانند: تکثیر سریع (حدود ۱۵ ساعت)، تولید تعداد زیادی سلول در مرحله S اینترفاز، تکثیر نامحدود، سهولت

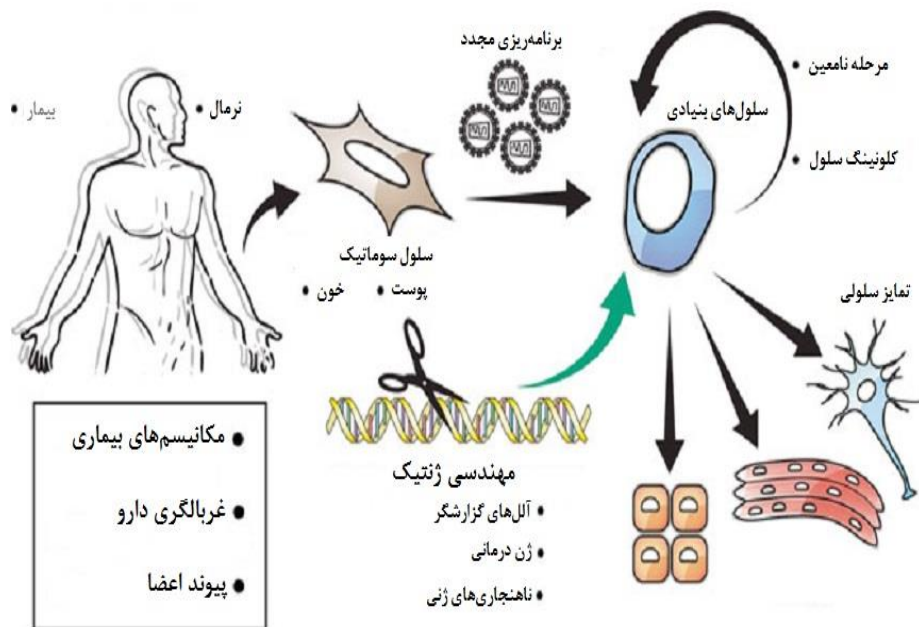
^۱- Inner Cell Mass (ICM)

^۲- Embryonic Stem Cells (ESCs)

^۳- تراتوما (Teratoma): تومور متشکله از چندین نوع بافت مختلف

^۴- Reprogramming

کشت سلول، تمایل به انتقال DNA و انتخاب سلول‌های ترانسفورم شده بوسیله ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک یا توالی‌های مکمل ژنتیکی از طریق جداسازی کلون‌ها (۱۰). همانطور که در این فصل مورد بررسی قرار می‌گیرد، تلفیق فناوری iPSC با نسل جدیدی از ابزارهای مهندسی ژنتیک، انتقال دقیق ژن‌های گزارشگر، ژن درمانی یا حتی اصلاح ناهنجاری‌های ژن را امکان‌پذیر نموده است (شکل ۱). با توجه به سرعت و سهولت نسبی فناوری‌های iPSC و مهندسی ژنومی و تلفیق آن‌ها، امکان مدل‌سازی بیماری‌ها و غربال‌گری داروها در شرایط *in vitro* فراهم شده است (۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۴).



شکل ۱) منبع، ویژگی‌ها و کاربردهای سلول‌های بنیادی پلوریپوتنت انسانی. از مهندسی ژنتیک جهت تولید یا تایید بیماری‌های انسانی استفاده می‌شود

ظهور ابزارهای ویرایش ژنومی

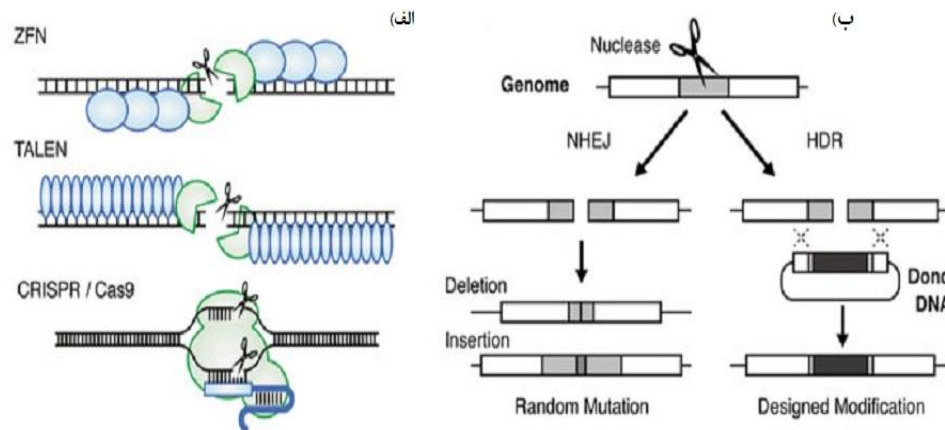
دستورزی ژنتیکی بوسیله فناوری ژن‌های هدفمند^۱، عامل اصلی ژنومیک عملکردی^۲ می‌باشد. اصول هدف قرار دادن ژن، ابتدا بوسیله ماریو کاپچی^۳ با استفاده از سیستم انتخاب مثبت-منفی ESC‌های موش در سلول‌های PSC انسانی انجام پذیرفت (۱۵، ۱۶). با این وجود، اولین آزمایش‌های ژن هدفمند در ESC‌های انسانی نشان می‌دهد که میزان هدف‌گیری ژن به طور معمول کمتر از مقدار مشاهده شده مورد نیاز برای درمان در موش بوده است (۱۷). تشکیل توالی‌های دورشته‌ای (DSBs) در DNA ژنومی به طور طبیعی در طی همانندسازی DNA یا در پاسخ به استرس‌هایی مانند تابش یونیزه و همچنین برای نوترکیبی‌های حیاتی در طی میوز و تولید سیستم ایمنی رخ می‌دهد (۱۸).

ترمیم توالی DSB توسط اتصال پایانه ناهمسان (NHEJ) می‌تواند به طور ذاتی جهش‌زا باشد، در حالی که ترمیم همسان (HDR) می‌تواند به درستی توالی DNA هدف را در حضور یک توالی دهنده DNA (مانند کروماتید خواهر) انتقال دهد. بنابراین فرض بر این بود که تشکیل عمده DSB‌ها در جایگاه‌های هدف می‌تواند فراوانی هدف‌گیری ژن را از طریق یک توالی دهنده DNA افزایش دهد (۱۹، ۲۰). دامین‌های نوکلئازی آنزیم FokI نشان دادند که می‌توان بوسیله نوکلئازها خاصیت جدیدی را طراحی کرد (۲۱). ZFN‌ها وسیله‌ای برای نوترکیب نمودن از طریق افزایش هدف‌گیری DSBR هدفمند، محسوب می‌شوند و تا امروز به عنوان یک ابزار قدرتمند در مهندسی ژنومی باقی مانده است (۲۲) (شکل ۲، الف). ZFN‌ها جفت پروتئین‌هایی هستند مونومرهای FokI را جهت برش توالی به درون یک جایگاه هدف قرار می‌دهد (۲۲، ۲۳). اتصال انگشتان روی به نوکلئوتیدهای سه‌گانه DNA، نسبی می‌باشد به طوری که خواص تعامل انگشت سه‌گانه به نوکلئوتیدهای همسایه وابسته است و مهندسی ZFN‌ها عمیقاً دشوار است (۲۴، ۲۵).

¹- Gene Targeting

²- Functional Genomics

³- Mario Cappechi



شکل ۲) سیستم‌های متداول نوکلئازی جهت برش توالی ژنوم هدف و ترمیم توالی برش یافته

الف) در سیستم ویرایش ژنومی ZFN و TALEN مکانیسم برش از طریق دامین‌های دایمریک نوکلئازی صورت می‌پذیرد توسط دامین‌های متصل‌شونده به DNA. آنزیم نوکلئازی Cas9 از طریق مولکول sgRNA به توالی هدف متصل می‌گردد. رنگ سبز کمپلکس اندونوکلئازی و رنگ آبی اجزای هدف‌گیری توالی. ب) مکانیسم ترمیم توالی برش یافته از دو روش ترمیم اتصال پایانه ناهمسان (NHEJ) و ترمیم همسان (HDR)

TALENها نیز موانع را بین نوآوری‌های فنی و کاربردهای عملی از بین بردند و آزمایشگاه‌های تحقیقاتی را به طراحی و تولید نوکلئازها رساندند (۲۶، ۲۷) (شکل ۲، ب). پروتئین‌های TALE از طریق باکتری بیماری‌زای گیاهی به نام *Xanthomonas spp* ترشح شده که بیان ژن میزبان را فعال می‌کند و منجر به مزیت متابولیکی برای مهاجم می‌شود (۲۸). TALENها نماینده کلاس‌های منحصر به فردی از پروتئین‌ها هستند که به صورت یک به یک به توالی DNA هدف متصل می‌شوند و طراحی آنها نسبت به ZFNها آسان‌تر می‌باشد (۲۹، ۳۰). ماهیت تعامل بین پروتئین و DNA از طریق تکرارهای پروتئینی پلی‌مورفیک می‌باشد که هیچ اثرات وابستگی به توالی همسایه را نشان نمی‌دهد. در مقیاس وسیع آزمایشگاهی که بر روی زیرافیش‌ها مورد مطالعه قرار گرفت، TALENها جهش‌زایی بیشتری نسبت به ZFNها نشان دادند (۳۱). CRISPR/Cas9 نیز به سرعت

مورد توجه دانشگاهیان و عموم قرار گرفت و آن را از یک سیستم ایمنی اکتسابی باکتریایی در برابر فاژها به یک مکانیسم ویرایش ژنومی تبدیل نمود (۳۲، ۳۳، ۳۴) (شکل ۲، ج). پروتئین Cas9 یک اندونوکلئاز عمومی است که DSBها را از طریق دامین‌های نوکلئازی HNH و RuvC تولید می‌کند، یک مجموعه ریبونوکلئوپروتئین (RNP) با RNA کوتاه (crRNA) و tracrRNA جهت فعال‌سازی خاصیت نوکلئازی به توالی DNA ژنومی هدف متصل می‌شوند (۳۵). کشف خاصیت بیوشیمیایی کمپلکس CRISPR توسط خانم‌ها جنیفر دودنا و امانوئل کارپنتیر^۱ انجام شد، خاصیت بیوشیمیایی کمپلکس CRISPR نشان داد که تقسیم برنامه‌ریزی شده می‌تواند از طریق طراحی هیبرید crRNA-tracrRNA یا به عبارت دیگر sgRNA حاصل شود و می‌تواند همراه با پروتئین استرپتوکوکوس پایوژنز (SpCas9) انتقال یابد. بدین ترتیب، سیستم CRISPR/Cas9 می‌تواند به لحاظ تئوری برنامه‌ریزی شود تا هر توالی ۲۰ نوکلئوتیدی در بالادست توالی ۳'-NGG-۵' ناحیه PAM را در هم بشکند. از این مکانیسم بلافاصله پس از طی مراحل آزمایشگاهی بر روی سلول انسانی هم مورد استفاده قرار گرفت (۳۶، ۳۷). در طی سال‌های اخیر، فناوری CRISPR/Cas9 امکان حذف ژن^۲، غربالگری ژنومی، سادگی طراحی و سهولت کاربرد که قبلاً در ژنتیک ارگانیسم‌های مدل غیر قابل دسترس بود را فراهم آورده است (۳۸، ۳۹، ۴۰). آنزیم اندونوکلئاز SpCas9 به مراتب بیشتر در سیستم CRISPR استفاده می‌شود. با این حال، انواع دیگری از آنزیم‌های اندونوکلئاز گونه‌های باکتریایی مانند: *Staphylococcus aureus* (SaCas9)، PAM ۳'-NNGRRN-۵' و *Neisseria meningitidis* (NmCas9)، PAM ۳'-NNNNGATT-۵' برای ویرایش ژنوم مورد استفاده قرار گرفته است (۴۲). طراحی Cas9 در پروکاریوت‌ها به عنوان پروتئین‌هایی با منشاء باکتریایی، منجر به تولید انواع جدیدی از SaCas9 با توالی PAM تغییر یافته، و همچنین دامنه‌های هدف بیشتر می‌شود (۴۳). استخراج اطلاعات ژنوم پروکاریوت‌ها از طریق بررسی میزان همولوژی، کلونینگ و صحت عملکرد، خانواده‌هایی با خواص جدید را پدید آورده است. برخلاف

^۱ Jennifer Doudna and Emmanuelle Charpentier

^۲ Gene Knockout

اندونوکلاز SpCas9، اندونوکلاز *Francisella novicida* Cpf1 (FnCpf1) فقط نیازمند به یک sgrRNA و توالی شناسایی ۳'-TTN-۵' در ناحیه بالادست PAM جهت شناسایی جایگاه هدف می‌باشد (۴۴). تنوع بسیار مکانیسم‌های CRISPR در باکتری‌ها نشان می‌دهد که آنزیم‌های نوکلئاز دیگری نیز با خواص متمایز هنوز کشف نشده‌اند. ظرافت‌های بیوشیمیایی تشخیص و برش DNA، طراحی نوکلئازهای ایجادکننده جهش تصادفی و مورد هدف قرار دادن ژن در شکل ۲ بررسی شده است. با توجه به اینکه طیف جهش در مکانیسم ترمیم NHEJ اساساً تصادفی است، سبب تولید آلل‌هایی در کلونی‌های سلولی شده که می‌تواند غربالگری با توان عملکردی بالا را پیچیده می‌کند (۴۵). DSBRها می‌توانند جهش‌های Indel را به طور قابل پیش‌بینی تولید کنند (۴۶). رویدادهای ترکیبی مانند: مورد هدف قرار دادن یک آلل با استفاده از مکانیسم ترمیم HDR و حذف ژن بوسیله ترمیم NHEJ، می‌تواند مفید یا مضر باشد. رویدادهای ترکیبی با استفاده از sgrRNAهای چندگانه منجر به تولید جهش‌های متعدد در سلول‌های بنیادی یا جنینی موش، تسریع در تجزیه و تحلیل ژنتیکی و مطالعات ژنومیک عملکردی می‌شود (۴۷، ۴۸، ۴۹).

افزودن عملکرد به iPSCها از طریق انتقال ژن در جایگاه‌های امن^۱

هدف قرار دادن ژن ممکن است برای حذف، اصلاح یا معرفی عملکرد جدید استفاده شود. انتقال ژن با سیستم‌های ویروسی یا ترانسپوزونی دارای مزایای متعددی است، با این حال برای ادغام در جایگاه هدف به عنوان یک مبادله مستقیم کنترل نمی‌شود و نیازمند به استفاده از غربالگری چندین کلون برای شناسایی مناسب یا مقایسه سطوح بیان ژن می‌باشد (۱۴). آنزیم‌های نوکلئازی اجازه انتقال ترانس‌ژن‌ها را به جایگاه‌های هدف می‌دهند و تغییرات کلونال را با تعدیل اثرات مکانی^۲ به حداقل می‌رسانند (۵۰). انتقال ژن هدفمند با استفاده از مکانیسم ترمیم HDR کاربردهای متعددی مانند: نجات cDNA از ژن‌های جهش یافته، استفاده از آلل‌های حاوی فلورسنت برای گزارش بیان ژن انتقال یافته یا

^۱ - Safe-Harbor Loci

^۲ - Position Effects

نشان‌گذاری سلولی دارند (۵۱). شاید مشهورترین جایگاه امن^۱ شناخته شده AAVS1 باشد، که یک نقطه داغ^۲ (جهش‌پذیر) برای قرار دادن ویروس به درون اینترون شماره ۱ از ژن PPP1R12C است (۵۲). AAVS1 شبیه به جایگاه ROSA26 در موش می‌باشد، که یک فنوتیپ ناشناخته را در نتیجه ادغام هموزیگوت‌های ترانس‌ژن تولید می‌کند (۴۷). مورد هدف قرار دادن و بیان cDNAها از جایگاه AAVS1 سبب بهبود بیماری‌های تک‌ژنی^۳ مانند: گرانولوماتوز مزمن وابسته به کروموزوم X^۴ (عدم توانایی فرد برای از بین بردن برخی میکروب‌ها) و تالاسمی نوع آلفا^۵ می‌شود (۵۴، ۵۵). برعکس افزایش بیان ژن‌های کانال یونی مانند: KCNQ1 و KCNH2 از جایگاه AAVS1 می‌تواند سندرم QT طولانی^۶ (نقص فعالیت الکتریکی قلب) را سبب شود (۵۶).

جایگاه‌های امن دیگری نیز وجود دارد، مانند جایگاه هایپوزانتین فسفوریبوزیل ترانسفراز-۱ وابسته به کروموزوم X (HPRT1)^۷ که سبب کمبود HPRT و نهایتاً تولید طیف وسیعی بیماری از نفرس^۸ تا سندرم لش-نایهن^۹ می‌شود. جایگاه گالونو لاکتون اکسیداز (GULOP) انسانی^{۱۰} یک شبه ژن غیرفعال در انسان است که فرض بر این می‌باشد که از اثرات فنوتیپی جلوگیری شود. باید دقت داشت که علاوه بر نقص ژنی باید به اثرات موضعی توانایی پروموت‌های ترانس‌ژن نیز توجه نمود (۶۰). به عنوان مثال، جایگاه سیترات‌لیاز بتا-لایک (CLYBL)^{۱۱} که در ناحیه غیرفعال ژن در کروموزوم شماره ۱۳ انسان قرار دارد، بیان می‌شود اثرات کمی بر روی بیان ژن موضعی اعمال می‌کند (۶۱). در یک آزمایش بر روی هموفیلی نوع A و B موش‌ها، بیان فاکتورهای VIII و IX انسانی از

¹- Safe Harbor

²- Hotspot

³- Monogenic Diseases

⁴- X-linked Chronic Granulomatous

⁵- α -Thalassemia

⁶- Long-QT Syndrome

⁷- X-linked Hypoxanthine Phosphoribosyl Transferase 1 (HPRT1) locus

⁸- Gout

⁹- Lesch-Nyhan Syndrome

¹⁰- Human L-Gulonolactone Oxidase (GULOP) locus

¹¹- Citrate Lyase Beta-Like (CLYBL) locus

جایگاه آلبومین، سبب بیان طولانی مدت ترانسژن‌ها در سطوح درمانی شده است (۶۲). از این رو، جایگاه‌های امن ممکن است در مکان‌هایی یافت شوند که دارای سلول‌های متمایز هدف باشند که سرکوب شده و هیچ ارتباطی با فنوتیپ شناخته شده ندارد.

دستیابی به مهندسی ژنومی برای مدل‌های بیماری

به منظور ایجاد مدل‌هایی از بیماری‌های ژنتیکی انسان، تغییرات تک نوکلئوتیدی (SNV)^۱ بیشتر از حذف‌های بزرگ ترجیح داده می‌شود. آزمون‌های واقعی جهت ارزیابی نقش جهش‌های کاندید در بیماری انجام شده است مانند، ترمیم جهش در بیماران iPSC یا جایگزین نمودن iPSCهای طبیعی، اصلاح یا تولید جهش‌های خاص بیمار به روشی نیاز دارند که فاقد عناصر ژنتیکی خارجی باشند (۶۳). در انتقال هدفمند ژن به روش کلاسیک برای مکانیسم ترمیم HDR از سیستم انتخاب مثبت آنتی‌بیوتیکی در کاست‌های انتقالی استفاده می‌شود (۱۶) (شکل ۳، الف). استفاده از این روش برای حذف ژن^۲، تلفیق با ژن‌های گزارشگر^۳ و ژن درمانی بسیار مفید می‌باشد (۴۷، ۶۴). با این حال، تغییر در مناطق کوچک DNA مانند استفاده از کاست‌های انتخاب تک نوکلئوتیدی^۴ می‌تواند سبب بروز اختلال در جایگاه‌های اصلی ژن یا تولید اثرات پلیوتروپیک^۵ غیرقابل پیش‌بینی شود (۶۵). حذف کاست‌های انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک عموماً از طریق مکانیسم برش بوسیله آنزیم ریکامبیناز اختصاصی^۶ صورت می‌پذیرد (۶۶). در این روش جایگاه‌های شناسایی Cre/loxP یا Flp/FRT در مجاورت کاست قرار گرفته و سبب حذف کاست حاوی آنتی‌بیوتیک می‌شود (۶۷) (شکل ۳، ب). در این روش بوسیله بیان موقت ریکامبینازها بخش‌های اختصاصی از کاست برش یافته و جدا می‌شوند. البته ممکن است برخی عناصر در مناطق خنثی ژنتیکی مانند اینترون‌ها، اثرات و فنوتیپ‌های غیرمنتظره‌ای بر بیان ژن، باقی گذارند (۶۴). به عنوان

^۱- Single-Nucleotide Variations (SNVs)

^۲- Knockout

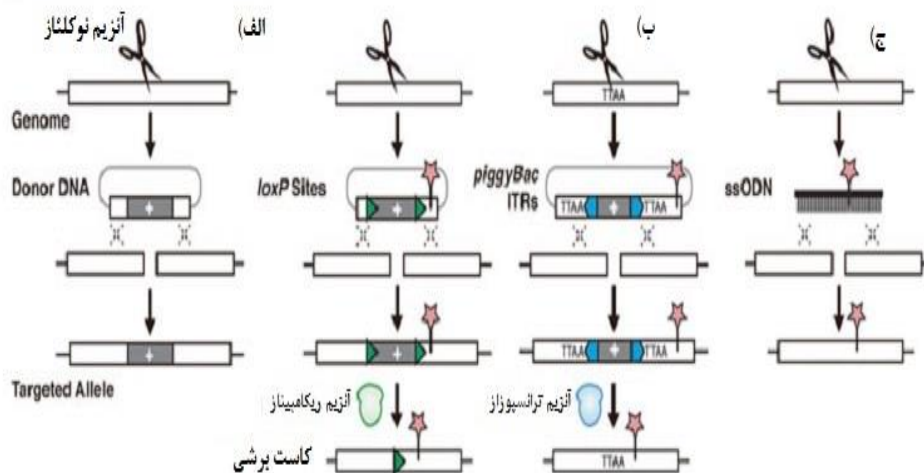
^۳- Reporters

^۴- Single Nucleotides Selection Cassettes

^۵- Pleiotropic Effects

^۶- Site-Specific Recombinase-Mediated Excision

یک جایگزین برای ریکامبینازها، ترانسپوزون (PB)^۱ با کیفیتی بی نظیر قابلیت برش ژنوم سلول‌های رویانی انسان و موش را دارد و به عنوان یک کاست مثبت/منفی برای اصلاح ژنومی توسعه یافته است (۶۸، ۶۹). یکی از احتمالات این است که عناصر PB فقط تترانوکلئوتیدهای TTA/TAA را شناسایی نموده و برش می‌زنند به طوری که باید یک توالی TTA/TAA در نزدیکی منطقه مورد مهندسی، حضور داشته باشد. با توجه به اینکه عناصر ترانسپوزونی PB ظرفیت و انعطاف‌پذیری بیشتری نسبت به ریکامبینازها دارند اما ممکن است جایگاه‌های برش یافته دوباره به یکدیگر متصل گردند و همچنین انواع ترانسپوزون‌های مختلف نرخ جهش‌زایی متفاوتی نیز نشان می‌دهند (۷۰).



شکل ۳ برش سلول‌های رویانی پلوریپوتنت (iPSC) انسانی توسط آنزیم نوکلئاز و ترمیم ژنوم بوسیله مکانیسم همسان (HDR)

الف) توالی برش‌یافته بوسیله قطعه ژنوم اهداکننده ترمیم می‌شود. ب) حذف ژن نشانگر انتخابی آنتی‌بیوتیکی بوسیله آنزیم ترانسپوزاز (سمت راست) و آنزیم ریکامبیناز (سمت چپ). ج) حذف جهش بوسیله مکانیسم ssODN

¹ - piggybac (PB) Transposons

علاوه بر روش‌های کلاسیک اصلاح ژنومی، مبتنی بر طراحی وکتورهای حاوی آنتی‌بیوتیک، توالی‌های الیگونوکلئوتیدی کوتاه تکرار شده‌ای (ssODN)^۱ در ترکیب با مکانیسم‌های ویرایش ژنومی مانند: ZFNها، TALENها و CRISPR/Cas9 نیز استفاده می‌شوند (۴۸، ۷۱، ۷۲، ۷۳). در این روش ssODNها دارای بیش از ۱۰۰ نوکلئوتید طول می‌باشند و همولوژی یکسانی با توالی دارای جهش نقطه‌ای در محل برش دارند (۷۴) (شکل ۳، ج). لازم به ذکر می‌باشد که جایگاه تغییر یافته بوسیله توالی ssODN از طریق مکانیسم ترمیم جهش NHEJ صورت می‌پذیرد. با توجه به اینکه عناصر مورد هدف بواسطه ssODN در لاین‌های سلولی فراوان می‌باشند، شناسایی توالی هدف با فراوانی اندک در iPSCها (کمتر از یک درصد) پیچیده و دشوار می‌باشد (۴۸، ۷۲، ۷۳).

یک روش پیشرفته برای ویرایش ژنومی دقیق در غربال‌گری جمعیت، استفاده از iPSCهای انسانی است که بوسیله روش ddPCR^۲ شناسایی می‌شوند (۷۷). پژوهشگران همگام با توسعه این روش، موفق به القای جهش در پنج ژن (PKP2، PHOX2B، RBM20، PRKAG2 و BAG3) مرتبط با بیماری شدند. یک روش ساده و کارآمد برای استخراج ژن‌های iPSC استفاده از ژن‌هایی با واسطه ssODN^۳ می‌باشد.

جلوگیری از نتایج نامطلوب: برش‌های غیرهدف و موزائیسیم^۴

برش توالی ژنومی بوسیله نوکلئازها ممکن است به دلیل عدم برش دقیق مناطق هدف، با خطاهایی همراه باشد و DSBRهای نامطلوبی را تولید نماید. در این موارد، DSBها ترجیحاً توسط مکانیسم NHEJ ترمیم می‌شوند. اینگونه اثرات ناخواسته ممکن است پیامدهای فنوتیپی داشته باشد (شکل ۲، ب).

تشخیص توالی غیرهدف با استفاده از توالی‌یابی کامل ژنوم (WGS)^۵ از کلون‌های مهندسی شده ژنوم iPSC قابل ارزیابی می‌باشد، که این روند از طریق تحلیل داده‌های

^۱- short single-strand Oligonucleotide (ssODN) Templates

^۲- Droplet Digital Polymerase Chain Reaction (ddPCR)

^۳- ssODN-mediated Gene

^۴- Mosaicism

^۵- Whole-Genome Sequencing (WGS)

حاصل از توالی‌یابی صورت می‌پذیرد (۷۹، ۸۰). در روش توالی‌یابی اگزوم^۱ تنها اطلاعات بخش کوچکی از ژنوم تامین می‌کند. چند نمونه از روش‌های غربالگری هدفمند مبتنی بر شباهت بین توالی sgRNA و مناطق غیرهدف ژنوم میزبان مانند آزمون برش هیبرید T7E1^۲، توالی‌یابی به روش سنگر^۳ و توالی‌یابی عمیق^۴ می‌باشد (۴۶، ۸۱، ۸۲). با این وجود، این روش‌های مرسوم توالی‌یابی، زمان بر بوده و کیفیت پیش‌بینی الگوریتم جایگاه‌های غیرهدف را محدود می‌سازند.

غربالگری جایگاه‌های غیرهدف، مبتنی بر آنزیم‌های نوکلئازی، دارای پتانسیل مناسبی بوده و بدون محدودسازی و تاثیرپذیری غربالگری را انجام می‌دهد. در روش ایمنی‌رسوب کروماتین^۵ با استفاده از آنتی‌بادی Cas9 می‌توان جایگاه‌های تعامل Cas9 با ژنوم را شناسایی نمود اما نمی‌تواند نواحی دقیق برش DNA را شناسایی کند (۸۳، ۸۴). روش LAM-PCR HTGTS^۶ یک روش ترکیبی است که با استفاده از تشخیص شکل جابجایی ژنوم^۷ می‌تواند برش‌های نواحی غیرهدف تولید شده بوسیله آنزیم نوکلئاز یا DSB‌های درونی را شناسایی نماید (۸۵). از سوی دیگر، وجود رویدادهای تکی ترمیم NHEJ، نشان داد که جذب عناصر DNA خارجی مانند تلفیق وکتورهای ناقص لنتی‌ویروس (IDLV)^۸، می‌تواند به عنوان یک نشانه^۹ برای توالی‌یابی هدفمند مورد استفاده قرار گیرد (۸۶، ۸۷). روش توالی‌یابی GUIDE-seq^{۱۰} نیز همان کار را انجام می‌دهد به این صورت که برای ساده‌سازی پردازش نمونه و ادغام داده‌ها از توالی‌های الیگونوکلئوتیدی سازگار با NGS^{۱۱} به

¹- Exome Sequencing

²- T7E1 Hybrid-Cleavage Assay

³- Sanger Sequencing

⁴- Deep Sequencing

⁵- Chromatin Immunoprecipitation

⁶- Linear Amplification-Mediated High-Throughput, Genome-Wide, Translocation Sequencing

(LAM-PCR HTGTS)

⁷- Genomic Translocations

⁸- Integration Defective Lentiviral Vectors (IDLV)

⁹- Tags

¹⁰- Genome-Wide, Unbiased Identification of DSBs Enabled by Sequencing (GUIDE-seq)

¹¹- Next-Generation Sequencing

عنوان نشانه استفاده می‌شود (۸۸). روش ترکیبی BLESS^۱ نیز برای عکس‌برداری از قطعات ژنومی در درون سلول پدید آمده است که نیاز به مراحل تثبیت و دستورزی پیچیده دارد (۸۹). از دیگر روش‌های توالی‌یابی استفاده از روش توالی‌یابی DiGenome می‌باشد که در آن بوسیله توالی‌یابی کل ژنوم (WGS) با شناسایی جهش‌های Indel، نواحی DSB‌های ژنومی را شناسایی می‌نماید (۹۰). تفاوت این روش‌ها در پروفایل‌ها و روش‌های تشخیصی می‌باشد که در نهایت صحت آن‌ها بوسیله آزمایش باید تأیید شود.

تشخیص درست نواحی برش غیرهدف یک اصل مهم در ویرایش ژنومی می‌باشد، با این حال هنوز به صورت کامل نتوانسته‌اند از اثرات ژنومی توالی غیرهدف به صورت مستقیم جلوگیری نمایند. بنابراین، باید روش‌های مهندسی جدیدی را فراهم آوریم تا رویدادهای شناسایی نواحی برش غیرهدف را به حداقل برساند و یا سبب افزایش شناسایی نواحی برش هدف گردد. یکی از روش‌های سریع و ساده می‌تواند القای محدودیت موقت در بیان ژن‌های Cas9 و gRNA باشد. اما با این حال، کاهش میزان بیان وکتور انتقال یافته، میزان نسبی برش‌های غیرهدف را کاهش نمی‌دهد (۹۰). برخلاف پلاسمیدها، که می‌توانند سبب بیان ژن بین دوره‌های زمانی بیش از ۳ تا ۴ روز شوند و یا حتی به طور تصادفی به درون ژنوم ادغام گردند، انتقال mRNA نسخه‌برداری شده *in vitro* (IVT)^۲ می‌توانند بیان ژن‌های نوکلئازی را ۱ تا ۲ روز کاهش داده و به عنوان یک روش مناسب برای شناسایی نواحی برش هدف بشمار می‌رود. یکی دیگر از روش‌های مناسب برای کاهش فعالیت آنزیم‌های نوکلئازی، تولید ذرات RNP^۳ است، که از طریق ترکیب پروتئین نوترکیب SpCas9 و IVT یا sgRNAهای مصنوعی و انتقال مستقیم آن‌ها به iPSCها با روش الکتروپوریشن^۴ یا روش شیمیایی صورت می‌پذیرد (۹۲، ۹۳). با استفاده از این روش‌ها می‌توان تجزیه و تحلیل‌های جامعی را انتظار داشت.

^۱- Direct in situ Breaks Labeling, Enrichment on Streptavidin, and Next-Generation Sequencing (BLESS)

^۲- *In Vitro* Transcribed (IVT) mRNA

^۳- Ribonucleoprotein Particle (RNP)

^۴- Electroporation

با این حال روشن است با محدود کردن موقت فعالیت آنزیم‌های نوکلئازی می‌توان کاهش موزائیسیم را در کلون سلول‌های iPSC انتظار داشت. موزائیسیم می‌تواند از طریق برش انفرادی DNA و DSBها در سلول‌های دختر iPSC حاوی نوکلئازهای منتقل شده، حاصل گردد که منجر به تولید دو یا چند جمعیت متفاوت در میان کلونی‌ها می‌شود (۹۴). موزائیسیم شناسایی نواحی غیرهدف که ممکن است زیر حد آستانه تشخیص در کلونی iPSCها باشد را، مختل می‌کند (۷۷).

استفاده از نوکلئازهای طبیعی مهندسی شده برای کاهش یا جلوگیری از برش‌های غیرهدف، ابتدا برای دامین‌های نوترکیب نوکلئازی FokI پیشنهاد شد (۹۵). با غیرفعال کردن دامین کاتالیزوری در یک مونومر از دایمر ZFN سبب کاهش میزان جهش‌زایی غیرهدف و همچنین کاهش فعالیت مکانیسم ترمیم HDR در نواحی هدف می‌شود (۹۶). همچنین به طور مشابه یک دامین نوکلئازی RuvC مشتق از SpCas9 که توسط جهش‌زایی غیرفعال شده است، می‌تواند به عنوان یک آنزیم DNA نیکاز^۱ عمل کند (۳۷). از این آنزیم به داشتن فعالیت برش غیرهدف کمتر از آنزیم‌های همتای خود، برای تولید شکاف در توالی استفاده می‌شود، زیرا یک مونومر SpCas9n بیشتر از DSB تک رشته‌ای تولید می‌کند (۹۷). با این وجود، مهم است بیاد داشته باشیم، که DNA برش یافته حاصل از جهش‌های Indel می‌تواند توسط مکانیسم NHEJ ترمیم شود و پیشنهاد می‌کند که استفاده از روش‌های جایگزین نیازمند بررسی‌های بیشتر می‌باشند (۹۸). با اتصال پروتئین SpCas9 و برقراری پیوند هیبرید DNA/RNA امکان شروع فرایند مهندسی SpCas9 پدید می‌آید (۹۹، ۱۰۰).

مدل‌سازی شیار مثبت DNA پیشنهاد می‌کند که تعامل دامین‌های نوکلئازی با توالی PAM، می‌تواند در ثبات رشته DNA غیرهدف دخالت داشته باشد. به عنوان مثال، جهش‌زایی دامین‌های نوکلئازی K848A، K1003A و R1060A در درون شیار DNA

¹- DNA Nickase

تقریباً ۶۰٪ هدفمند می‌باشد، در حالی که ۷-۱۲ نوکلئوتید خارج از ناحیه "اصلی"^۱ سبب افزایش عدم انطباق^۲ در اتصال sgRNA می‌گردد (۴۴، ۱۰۱).

اجزای تشکیل دهنده کمپلکس نوکلئازی Cas9 RNP رابطه مستقیمی با نسبت شناسایی توالی‌های هدف به غیرهدف دارند. پیشنهاد شده است، sgRNAهای کوتاه شده (truRNA)^۳، ممکن است توانایی برش اختصاصی را بدست آورد، با این وجود، توالی‌های ۱۶ نوکلئوتیدی truRNA در مقابل توالی‌های ۲۰ نوکلئوتیدی استاندارد sgRNA، محدودیتی را برای انجام آزمایشات CRISPR پدید نیاورده است (۱۰۲). مشخص شده است که طراحی مناسب sgRNA بر روی برش اختصاصی توالی هدف موثر است (۱۰۳). اخیراً، دونچ و همکاران در مورد قاعده تنظیم طراحی sgRNA، تجدید نظر نمودند و یک سیستم امتیازدهی قابل پیش‌بینی را برای افزایش شناسایی توالی هدف، جهت تعیین نواحی برش ژنوم، نشان دادند (۱۰۴). اما این سوال هنوز باقی مانده است که چگونه جامعه، اگر در شرایط مختلف آزمایشگاهی درست عمل کند، این مجموعه قوانین بیوانفورماتیکی را اتخاذ می‌کند.

انتخاب کلون‌های ایزوژنیک و کنترل‌های فنی

در فن‌آوری برنامه‌ریزی مجدد^۴، از یک قطعه ژنوم بیمار به عنوان منبع سلول پلوریپوتنت استفاده می‌کنند، به طوری که با مدل‌سازی بیماری در شرایط آزمایشگاهی قادرند سلول را از بیمار جدا کنند. به جز آزمایش بر روی مدل‌های حیوانی، با وجود پیشرفت‌های چشمگیر در ایجاد تمایزهای سلولی در شرایط آزمایشگاهی و معیارهای دقیق ارزیابی آزمایشات، نتایج حاصل از فنوتایپینگ محدود می‌باشد (۱۰۵). برای ایجاد رابطه مستقیم ژنوتیپ‌ها به فنوتیپ‌ها، استفاده از لاین‌های کنترل سلولی مناسب، اهمیت زیادی دارند.

¹- Seed Region

²- Mismatches

³- truncated sgRNA (truRNA)

⁴- Reprogramming Technology

لاین‌های کنترل سلول‌های iPSC به دلیل قرابت ژنتیکی زیاد، می‌توانند به عنوان نماینده سلول‌های مهندسی شده پلوریپوتنت، جهت افزایش دقت در مطالعات بیماری مورد استفاده قرار گیرند (۱۰۶). از سلول‌های iPSC افراد نرمال غیرمرتبط با در نظر گرفتن زمینه‌های مختلف ژنتیکی آن‌ها، برای تولید سلول‌های کنترل هدف استفاده می‌شود (شکل ۴، الف) (۱۰۷). همچنین، تعداد کلون‌های سلول iPSC افراد غیرمرتبط نیز برای تعیین میزان همبستگی ژنوتیپ با فنوتیپ مورد نیاز است (شکل ۴، ب). در حالت کلی، تعداد لاین‌های کنترلی سلول iPSC به طور عمده، به میزان همبستگی تغییرات ژنتیکی با فنوتیپ‌های مشاهده شده در جمعیت بیمار بستگی دارد (۱۰۸). یک استاندارد جهت کاهش تنوع ژنتیکی، برای مقایسه سلول‌های iPSC بیمار با سلول‌های iPSC نرمال که بسیاری از زمینه ژنتیکی سلول‌های ناتنی خود را از طریق انتقال خون به اشتراک گذاشته‌اند، وجود دارد (شکل ۴، الف). جالب توجه است که سلول‌های ESC، اغلب از مواد خارج شده از IVF^۱ مشتق شده‌اند که در واقع ممکن است میزان بالاتری از ارتباطات تنی^۲ در بین سلول‌های ESC نسبت به سلول‌های iPSC وجود داشته باشد (۱). با این وجود، تفاوت‌های نژادی افراد و ارتباط آن با فراوانی آلل‌های مرتبط با ناباروری ممکن است مزایای ذکر شده در بالا را تحت تاثیر قرار دهد. از سوی دیگر، پیشینه مستندات پزشکی در مورد سلول‌های اهداکننده به همراه تجزیه و تحلیل ژنتیکی، ممکن است به پیش‌بینی شدت انحراف فنوتیپی بین لاین‌های آزمایشگاهی و لاین‌های کنترلی سلول iPSC کمک کند.

تفاوت‌های جزئی بین ژنوم و اپی‌ژنوم در میان لاین‌های iPSC ممکن است فنوتیپ‌ها را تحت تاثیر قرار دهد (۱۱۰). نگرانی‌هایی در مورد تجمع جهش‌ها در فرایند برنامه‌ریزی مجدد، به عنوان یک استرس مطرح شده است (۱۱۱). همچنین برخلاف آنچه ذکر شد، مطالعات اخیر نشان داده است که سلول‌های iPSC مشتق شده به طور ذاتی در سطوح ژنتیکی پایدارند که نشان می‌دهد خطر افزایش رانش ژنتیکی^۳ برای هر دو نوع سلول ESC

^۱- In Vitro Fertilization (IVF)

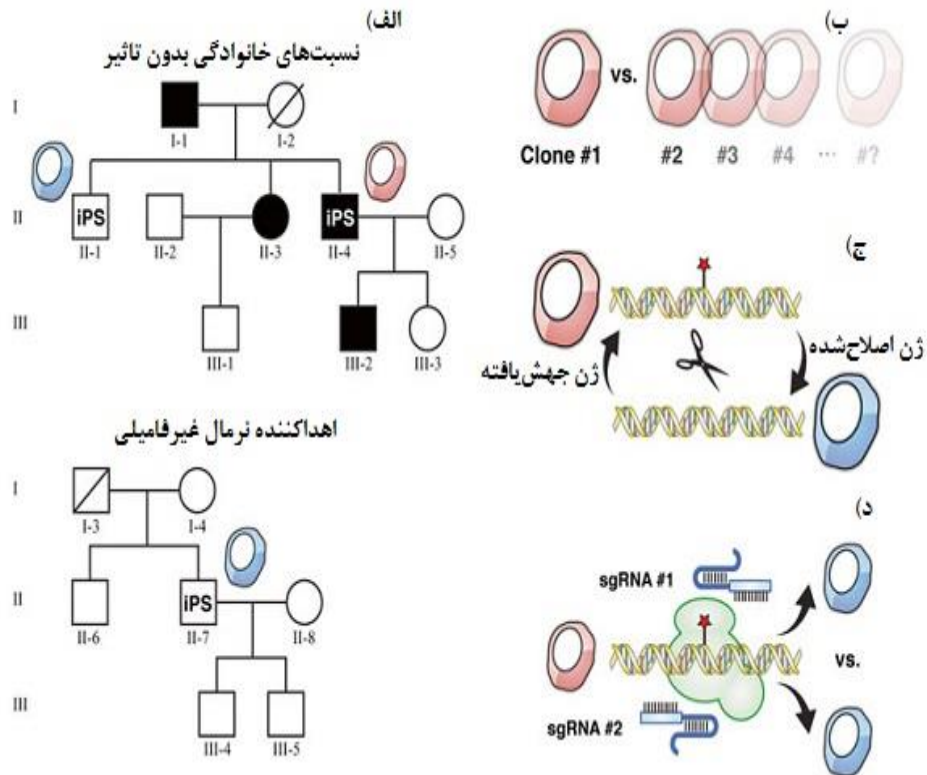
^۲- Sibling Relationship

^۳- Genetic Drift

و iPSC مشابه‌اند. با این حال، فرایند اشتقاق سلول‌های iPSC بصورت انتخابی عمل می‌کند، به طوری که جهش‌های سوماتیکی قبلی در بافت اهداکننده بیمار می‌تواند از طریق کلون کردن افزایش یابد (۱۱۳، ۱۱۴). همچنین پیشنهاد شده است که سلول‌های مجدد برنامه‌ریزی شده ممکن است حافظه اپی‌ژنتیکی سلول‌های سوماتیکی خود را حفظ کنند، که این عامل می‌تواند ظرفیت تمایز را تحت تاثیر قرار دهد (۱۱۵).

خوشبختانه، ژن‌های اصلاح‌شده سلول‌های iPSC^۱ می‌توانند به طور مستقیم از سلول‌های iPSC اهداکننده مشتق شوند (شکل ۴، ج) (۶۳). توصیه می‌شود به جای انجام توالی‌یابی عمیق یا مقایسه چندین کلون ژن اصلاح‌شده در یک آزمایش، از یک sgRNA ثانوی در خارج از توالی هدف استفاده شود (شکل ۴، د). به این ترتیب، می‌توان از رویدادهای معمول توالی غیرهدف که تاثیر مستقیم بر فنوتیپ دارد جلوگیری نمود.

^۱- Gene-Corrected iPSCs



شکل ۴) منابع مختلف کلون‌های کنترلی سلول‌های رویانی پلوریپوتنت (iPSC)

الف) از iPSCهای نسبت‌های فامیلی بدون اثر به طور معمول به عنوان کنترل استفاده می‌شود. ب) از iPSCهای چندگانه به طور معمول جهت کاهش خطای حاصل از تنوع کلونی استفاده می‌شود. ج) کلون‌های کنترلی ممکن است از طریق مهندسی ژنوم تولید شوند. د) برای جلوگیری از اثرات منفی برش‌های غیرهدف از sgRNAهای مختلف جهت تولید کلون نو ترکیب استفاده می‌شود

نتیجه‌گیری

تلفیق استفاده از فن‌آوری‌های iPSC و نوکلئاز، به ویژه سیستم ویرایش ژنومی CRISPR/Cas9، یک جهش بزرگی را در مدل‌سازی ژنتیک و بیماری‌های انسانی پدید آورده است. همچنین با استفاده از فن‌آوری‌های ویرایش ژنومی، دیگر نیازی به مدل‌سازی

سلول‌های iPSC اختصاصی بیمار^۱، نیست. در عوض، جهش‌های کاندید یا مجموعه‌های آلی ممکن است به صورت تکی یا ترکیبی طراحی گردند و به عنوان مرجع برای سلول‌های iPSC یا ESC مورد استفاده قرار گیرند. همچنین از پانل‌های استاندارد "iPSC" می‌توان برای تست‌های فیزیولوژیکی استفاده نمود. در آخر اینکه، از سلول‌های iPSC اختصاصی بیمار نیز می‌توان برای بررسی موتاسیون و اثرات ژنتیکی بومی مورد استفاده قرار داد. قطعاً افق آینده تحقیقات مربوط به بکارگیری تلفیقی مکانیسم ویرایش ژنومی و فرآیند برنامه‌ریزی مجدد ژن می‌شود که می‌تواند سبب کاربردی شدن بالینی سلول‌های رویانی در علم پزشکی گردد.

¹- Patient-Specific iPSCs

منابع

- 1- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 282(5391): 7-1145.
- 2- Gertow K, Przyborski S, Loring JF, Auerbach JM, Epifano O, Otonkoski T, et al. 2007. Isolation of human embryonic stem cell-derived teratomas for the assessment of pluripotency. *Curr Protoc Stem Cell Biol*. Chap. 1: Unit1B 4.
- 3- Keller G. 2005. Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes Dev*. 19(10): 55-1129.
- 4- Outten JT, Gadue P, French DL, Diamond SL. 2012. High-throughput screening assay for embryoid body differentiation of human embryonic stem cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol*. Chap. 1: Unit 1D 6.
- 5- Zacharias DG, Nelson TJ, Mueller PS, Hook CC. 2011. The science and ethics of induced pluripotency: what will become of embryonic stem cells. *Mayo Clin Proc*. 86(7): 40-634.
- 6- Takahashi K, Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 126(4): 76-663.
- 7- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 131(5): 72-861.
- 8- Takahashi K, Yamanaka S. 2016. A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 17(3): 93-183.
- 9- Inoue H, Nagata N, Kurokawa H, Yamanaka S. 2014. iPS cells: a game changer for future medicine. *EMBO J*. 33(5): 17-409.
- 10- Hindley C, Philpott A. 2013. The cell cycle and pluripotency. *Biochem J*. 451(2): 43-135.
- 11- Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, Nishiyama A, Matsumura M, Wataya T, et al. 2007. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 25(6): 6-681.

- 12- Nakagawa M, Taniguchi Y, Senda S, Takizawa N, Ichisaka T, Asano K, et al. 2014. A novel efficient feeder-free culture system for the derivation of human induced pluripotent stem cells. *Sci Rep.* 4: 1-3594.
- 13- Chen G, Gulbranson DR, Hou Z, Bolin JM, Ruotti V, Probasco MD, et al. 2011. Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nat Methods.* 8(5): 9-424.
- 14- Kim SI, Ocegüera-Yanez F, Sakurai C, Nakagawa M, Yamanaka S, Woltjen K. 2016. Inducible transgene expression in human iPSC cells using versatile all-in-one piggyBac transposons. *Methods Mol Biol.* 1357: 31-111.
- 15- Thomas KR, Capecchi MR. 1987. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell.* 51(3): 12-503.
- 16- Capecchi MR. 2005. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nat Rev Genet.* 6(6): 12-507.
- 17- Zwaka TP, Thomson JA. 2003. Homologous recombination in human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 21(3): 21-319.
- 18- Lieber MR, Lu H, Gu J, Schwarz K. 2008. Flexibility in the order of action and in the enzymology of the nuclease, polymerases, and ligase of vertebrate non-homologous DNA end joining: relevance to cancer, aging, and the immune system. *Cell Res.* 18(1): 33-125.
- 19- Jasin M. 1996. Genetic manipulation of genomes with rare-cutting endonucleases. *Trends Genet.* 12(6): 8-224.
- 20- Carroll D. 2004. Using nucleases to stimulate homologous recombination. *Methods Mol Biol.* 262: 195-207.
- 21- Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. 1996. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93(3): 60-1156.
- 22- Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD. 2010. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet.* 11(9): 46-636.

- 23- Smith J, Bibikova M, Whitby FG, Reddy AR, Chandrasegaran S, Carroll D. 2000. Requirements for double-strand cleavage by chimeric restriction enzymes with zinc finger DNA-recognition domains.
- 24- Pavletich NP, Pabo CO. 1991. Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science*. 252(5007): 17-809.
- 25- Maeder ML, Thibodeau-Beganny S, Sander JD, Voytas DF, Joung JK. 2009. Oligomerized pool engineering (OPEN): an ‘open-source’ protocol for making customized zinc-finger arrays. *Nat Protoc*. 4(10): 501-1471.
- 26- Mussolino C, Cathomen T. 2012. TALE nucleases: tailored genome engineering made easy. *Curr Opin Biotechnol*. 23(5): 50-644.
- 27- Cermak T, Doyle EL, Christian M, Wang L, Zhang Y, Schmidt C, et al. 2011. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res*. 39(12): e82.
- 28- Bogdanove AJ, Schornack S, Lahaye T. 2010. TAL effectors: finding plant genes for disease and defense. *Curr Opin Plant Biol*. 13(4): 394-401.
- 29- Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, et al. 2009. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*. 326(5959): 12-1509.
- 30- Moscou MJ, Bogdanove AJ. 2009. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*. 326(5959): 1-1501.
- 31- Chen S, Oikonomou G, Chiu CN, Niles BJ, Liu J, Lee DA, et al. 2013. A large-scale in vivo analysis reveals that TALENs are significantly more mutagenic than ZFNs generated using context-dependent assembly. *Nucleic Acids Res*. 41(4): 78-2769.
- 32- Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, et al. 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*. 2007;315(5819): 12-1709.

- 33- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. 2012. A programmable dual- RNA- guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 337(6096): 21-816.
- 34- Sander JD, Joung JK. 2014. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol*. 32(4): 55-347.
- 35- Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirzada ZA, et al. 2011. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*. 471(7340): 7-602.
- 36- Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, et al. 2013. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*. 339(6121): 6-823.
- 37- Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 339(6121): 23-819.
- 38- Niu J, Zhang B, Chen H. 2014. Applications of TALENs and CRISPR/Cas9 in human cells and their potentials for gene therapy. *Mol Biotechnol*. 56(8): 8-681.
- 39- Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, Lander ES. 2014. Genetic screens in human cells using the CRISPR- Cas9 system. *Science*. 343(6166): 4-80.
- 40- Koike-Yusa H, Li Y, Tan EP, Velasco-Herrera Mdel C, Yusa K. 2014. Genome-wide recessive genetic screening in mammalian cells with a lentiviral CRISPR-guide RNA library. *Nat Biotechnol*. 32(3): 73-267.
- 41- Ran FA, Cong L, Yan WX, Scott DA, Gootenberg JS, Kriz AJ, et al. 2015. In vivo genome editing using Staphylococcus aureus Cas9. *Nature*. 520(7546): 91-186.
- 42- Hou Z, Zhang Y, Propson NE, Howden SE, Chu LF, Sontheimer EJ, et al. 2013. Efficient genome engineering in human pluripotent stem cells using Cas9 from Neisseria meningitidis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 110(39): 9-15644.

- 43- Kleinstiver BP, Prew MS, Tsai SQ, Nguyen NT, Topkar VV, Zheng Z, et al. 2015. Broadening the targeting range of *Staphylococcus aureus* CRISPR-Cas9 by modifying PAM recognition. *Nat Biotechnol.* 33(12): 8-1293.
- 44- Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, Makarova KS, Essletzbichler P, et al. 2015. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell.* 163(3): 71-759.
- 45- Shi J, Wang E, Milazzo JP, Wang Z, Kinney JB, Vakoc CR. 2015. Discovery of cancer drug targets by CRISPR-Cas9 screening of protein domains. *Nat Biotechnol.* 33(6): 7-661.
- 46- Cho SW, Kim S, Kim Y, Kweon J, Kim HS, Bae S, et al. 2014. Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res.* 24(1): 41-132.
- 47- Ocegüera-Yanez F, Kim SI, Matsumoto T, Tan GW, Xiang L, Hatani T, et al. 2015. Engineering the AAVS1 locus for consistent and scalable transgene expression in human iPSCs and their differentiated derivatives. *Methods.* Epub 2015/12/29.
- 48- Yang H, Wang H, Shivalila CS, Cheng AW, Shi L, Jaenisch R. 2013. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell.* 154(6): 9-1370.
- 49- Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, et al. 2013. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell.* 153(4): 8-910.
- 50- Papapetrou EP, Lee G, Malani N, Setty M, Riviere I, Tirunagari LM, et al. 2011. Genomic safe harbors permit high beta-globin transgene expression in thalassemia induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol.* 29(1): 8-73.
- 51- Hockemeyer D, Soldner F, Beard C, Gao Q, Mitalipova M, DeKaveler RC, et al. 2009. Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol.* 27(9): 7-851.

- 52- Smith JR, Maguire S, Davis LA, Alexander M, Yang F, Chandran S, et al. 2008. Robust, persistent transgene expression in human embryonic stem cells is achieved with AAVS1-targeted integration. *Stem Cells*. 26(2): 496-504.
- 53- Soriano P. 1999. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet*. 21(1): 1-70.
- 54- Zou J, Sweeney CL, Chou BK, Choi U, Pan J, Wang H, et al. 2011. Oxidase-deficient neutrophils from X-linked chronic granulomatous disease iPS cells: functional correction by zinc finger nuclease-mediated safe harbor targeting. *Blood*. 117(21): 72-5561.
- 55- Chang CJ, Bouhassira EE. 2012. Zinc-finger nuclease-mediated correction of alpha-thalassemia in iPS cells. *Blood*. 120(19): 14-3906.
- 56- Wang Y, Liang P, Lan F, Wu H, Lisowski L, Gu M, et al. 2014. Genome editing of isogenic human induced pluripotent stem cells recapitulates long QT phenotype for drug testing. *J Am Coll Cardiol*. 64(5): 9-451.
- 57- Sakurai K, Shimoji M, Tahimic CG, Aiba K, Kawase E, Hasegawa K, et al. 2010. Efficient integration of transgenes into a defined locus in human embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res*. 38(7): e96.
- 58- Inai Y, Ohta Y, Nishikimi M. 2003. The whole structure of the human nonfunctional L-gulonolactone oxidase gene the gene responsible for scurvy and the evolution of repetitive sequences thereon. *J Nutr Sci Vitaminol*. 49(5): 9-315.
- 59- Li X, Burnight ER, Cooney AL, Malani N, Brady T, Sander JD, et al. 2013. piggyBac transposase tools for genome engineering. *Proc Natl Acad Sci USA*. 110(25): 87-E2279.
- 60- Lombardo A, Cesana D, Genovese P, Di Stefano B, Provasi E, Colombo DF, et al. 2011. Site-specific integration and tailoring of cassette design for sustainable gene transfer. *Nat Methods*. 8(10): 9-861.

- 61- Cerbini T, Funahashi R, Luo Y, Liu C, Park K, Rao M, et al. 2015. Transcription activator-like effector nuclease (TALEN)-mediated CLYBL targeting enables enhanced transgene expression and one-step generation of dual reporter human induced pluripotent stem cell (iPSC) and neural stem cell (NSC) lines. *PLoS One*. 10(1): e0116032.
- 62- Sharma R, Anguela XM, Doyon Y, Wechsler T, DeKolver RC, Sproul S, et al. 2015. In vivo genome editing of the albumin locus as a platform for protein replacement therapy. *Blood*. 126(15): 84-1777.
- 63- Kim HS, Bernitz JM, Lee DF, Lemischka IR. 2014. Genomic editing tools to model human diseases with isogenic pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev*. 23(22): 86-2673.
- 64- Zou J, Mali P, Huang X, Dowey SN, Cheng L. 2011. Site-specific gene correction of a point mutation in human iPS cells derived from an adult patient with sickle cell disease. *Blood*. 118(17): 608-4599.
- 65- Meier ID, Bernreuther C, Tilling T, Neidhardt J, Wong YW, Schulze C, et al. 2010. Short DNA sequences inserted for gene targeting can accidentally interfere with off-target gene expression. *FASEB J*. 24(6): 24-1714.
- 66- Davis RP, Costa M, Grandela C, Holland AM, Hatzistavrou T, Micaleff SJ, et al. 2008. A protocol for removal of antibiotic resistance cassettes from human embryonic stem cells genetically modified by homologous recombination or transgenesis. *Nat Protoc*. 3(10): 8-1550.
- 67- Grindley ND, Whiteson KL, Rice PA. 2006. Mechanisms of site-specific recombination. *Annu Rev Biochem*. 75: 567-605.
- 68- Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, Desai R, Mileikovsky M, Hamalainen R, et al. 2009. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*. 458(7239): 70-766.
- 69- Yusa K, Rashid ST, Strick-Marchand H, Varela I, Liu PQ, Paschon DE, et al. 2011. Targeted gene correction of alpha1-

- antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells. *Nature*. 478(7369): 4-391.
- 70- Kim H, Kim K, Kim J, Kim SH, Yim J. 2012. Mutagenesis by imprecise excision of the piggyBac transposon in *Drosophila melanogaster*. *Biochem Biophys Res Commun*. 417(1): 9-335.
- 71- Orlando SJ, Santiago Y, DeKolver RC, Freyvert Y, Boydston EA, Moehle EA, et al. 2010. Zinc- finger nuclease-driven targeted integration into mammalian genomes using donors with limited chromosomal homology. *Nucleic Acids Res*. 38(15): e152.
- 72- Chen F, Pruett-Miller SM, Huang Y, Gjoka M, Duda K, Taunton J, et al. 2011. High-frequency genome editing using ssDNA oligonucleotides with zinc-finger nucleases. *Nat Methods*. 8(9): 5-753.
- 73- Ding Q, Lee YK, Schaefer EA, Peters DT, Veres A, Kim K, et al. 2013. A TALEN genome-editing system for generating human stem cell-based disease models. *Cell Stem Cell*. 12(2): 51-238.
- 74- Soldner F, Laganier J, Cheng AW, Hockemeyer D, Gao Q, Alagappan R, et al. 2011. Generation of isogenic pluripotent stem cells differing exclusively at two early onset Parkinson point mutations. *Cell*. 146(2): 31-318.
- 75- Radecke S, Radecke F, Cathomen T, Schwarz K. 2010. Zinc-finger nuclease-induced gene repair with oligodeoxynucleotides: wanted and unwanted target locus modifications. *Mol Ther*. 18(4): 53-743.
- 76- Howden SE, Maufort JP, Duffin BM, Elefanty AG, Stanley EG, Thomson JA. 2015. Simultaneous reprogramming and gene correction of patient fibroblasts. *Stem Cell Rep*. 5(6): 18-1109.
- 77- Miyaoka Y, Chan AH, Judge LM, Yoo J, Huang M, Nguyen TD, et al. 2014. Isolation of single-base genome-edited human iPS cells without antibiotic selection. *Nat Methods*. 11(3): 3-291.
- 78- Richardson CD, Ray GJ, DeWitt MA, Curie GL, Corn JE. 2016. Enhancing homology-directed genome editing by catalytically active and inactive CRISPR-Cas9 using asymmetric donor DNA. *Nat Biotechnol*. 34: 44-339.

- 79- Smith C, Gore A, Yan W, Abalde-Atristain L, Li Z, He C, et al. 2014. Whole-genome sequencing analysis reveals high specificity of CRISPR/Cas9 and TALEN-based genome editing in human iPSCs. *Cell Stem Cell*. 15(1): 3-12.
- 80- Veres A, Gosis BS, Ding Q, Collins R, Ragavendran A, Brand H, et al. 2014. Low incidence of off- target mutations in individual CRISPR-Cas9 and TALEN targeted human stem cell clones detected by whole-genome sequencing. *Cell Stem Cell*. 15(1): 27-30.
- 81- Kim HJ, Lee HJ, Kim H, Cho SW, Kim J-S. 2009. Targeted genome editing in human cells with zinc finger nucleases constructed via modular assembly. *Genome Res*. 19: 88-1279.
- 82- Brinkman EK, Chen T, Amendola M, van Steensel B. 2014. Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition. *Nucleic Acids Res*. 42(22): e168.
- 83- Fujita T, Fujii H. 2013. Efficient isolation of specific genomic regions and identification of associated proteins by engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP) using CRISPR. *Biochem Biophys Res Commun*. 439(1): 6-132.
- 84- Wu X, Scott DA, Kriz AJ, Chiu AC, Hsu PD, Dadon DB, et al. 2014. Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells. *Nat Biotechnol*. 32(7): 6-670.
- 85- Frock RL, Hu J, Meyers RM, Ho YJ, Kii E, Alt FW. 2015. Genome-wide detection of DNA double- stranded breaks induced by engineered nucleases. *Nat Biotechnol*. 33(2): 86-179.
- 86- Gabriel R, Lombardo A, Arens A, Miller JC, Genovese P, Kaepffel C, et al. 2011. An unbiased genome-wide analysis of zinc-finger nuclease specificity. *Nat Biotechnol*. 29(9): 23-816.
- 87- Wang X, Wang Y, Wu X, Wang J, Wang Y, Qiu Z, et al. 2015. Unbiased detection of off-target cleavage by CRISPR-Cas9 and TALENs using integrase-defective lentiviral vectors. *Nat Biotechnol*. 33(2): 8-175.

- 88- Tsai SQ, Zheng Z, Nguyen NT, Liebers M, Topkar VV, Thapar V, et al. 2015. GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. *Nat Biotechnol.* 33(2): 97-187.
- 89- Crosetto N, Mitra A, Silva MJ, Bienko M, Dojer N, Wang Q, et al. 2013. Nucleotide-resolution DNA double-strand break mapping by next-generation sequencing. *Nat Methods.* 10(4): 5-361.
- 90- Kim D, Bae S, Park J, Kim E, Kim S, Yu HR, et al. 2015. Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells. *Nat Methods.* 12(3): 237-243.
- 91- Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, et al. 2013. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol.* 31(9): 6-822.
- 92- Kim S, Kim D, Cho SW, Kim J, Kim JS. 2014. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Res.* 24(6): 9-1012.
- 93- Liang X, Potter J, Kumar S, Zou Y, Quintanilla R, Sridharan M, et al. 2015. Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. *J Biotechnol.* 208: 44-53.
- 94- Merkle FT, Neuhausser WM, Santos D, Valen E, Gagnon JA, Maas K, et al. 2015. Efficient CRISPR-Cas9-mediated generation of knockin human pluripotent stem cells lacking undesired mutations at the targeted locus. *Cell Rep.* 11(6): 83-875-83.
- 95- Sanders KL, Catto LE, Bellamy SR, Halford SE. 2009. Targeting individual subunits of the FokI restriction endonuclease to specific DNA strands. *Nucleic Acids Res.* 37(7): 15-2105.
- 96- Ramirez CL, Certo MT, Mussolino C, Goodwin MJ, Cradick TJ, McCaffrey AP, et al. 2012. Engineered zinc finger nickases induce homology-directed repair with reduced mutagenic effects. *Nucleic Acids Res.* 40(12): 8-5560.
- 97- Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, et al. 2013. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell.* 154(6): 9-1380.

- 98- Certo MT, Ryu BY, Annis JE, Garibov M, Jarjour J, Rawlings DJ, et al. 2011. Tracking genome engineering outcome at individual DNA breakpoints. *Nat Methods*. 8(8): 6-671.
- 99- Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, Dohmae N, et al. 2014. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*. 156(5): 94-935.
- 100- Jinek M, Jiang F, Taylor DW, Sternberg SH, Kaya E, Ma E, et al. 2014. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science*. 343(6176): 1-1247997.
- 101- Kleinstiver BP, Pattanayak V, Prew MS, Tsai SQ, Nguyen NT, Zheng Z, et al. 2016. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*. 529(7587): 5-490.
- 102- Fu Y, Sander JD, Reyon D, Cascio VM, Joung JK. 2014. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat Biotechnol*. 32(3): 84-279.
- 103- Doench JG, Hartenian E, Graham DB, Tothova Z, Hegde M, Smith I, et al. 2014. Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation. *Nat Biotechnol*. 32(12): 7-1262.
- 104- Doench JG, Fusi N, Sullender M, Hegde M, Vaimberg EW, Donovan KF, et al. 2016. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol*. 34(2): 91-184.
- 105- Murry CE, Keller G. 2008. Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell*. 132(4): 80-661.
- 106- Merkle FT, Eggan K. 2013. Modeling human disease with pluripotent stem cells: from genome association to function. *Cell Stem Cell*. 12(6): 68-656.
- 107- Kondo T, Asai M, Tsukita K, Kutoku Y, Ohsawa Y, Sunada Y, et al. 2013. Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular A β and differential drug responsiveness. *Cell Stem Cell*. 12(4): 96-487.

- 108- Zeltner N, Studer L. 2015. Pluripotent stem cell-based disease modeling: current hurdles and future promise. *Curr Opin Cell Biol.* 37: 10-102.
- 109- Osafune K, Caron L, Borowiak M, Martinez RJ, Fitz-Gerald CS, Sato Y, et al. 2008. Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines. *Nat Biotechnol.* 26(3): 5-313.
- 110- Bock C, Kiskinis E, Verstappen G, Gu H, Boulting G, Smith ZD, et al. 2011. Reference maps of human ES and iPS cell variation enable high-throughput characterization of pluripotent cell lines. *Cell.* 144(3): 52-439.
- 111- Ronen D, Benvenisty N. 2012. Genomic stability in reprogramming. *Curr Opin Genet Dev.* 22(5): 9-444.
- 112- Bhutani K, Nazor KL, Williams R, Tran H, Dai H, Dzakula Z, et al. 2016. Whole-genome mutational burden analysis of three pluripotency induction methods. *Nat Commun.* 7: 1-10536.
- 113- Abyzov A, Mariani J, Palejev D, Zhang Y, Haney MS, Tomasini L, et al. 2012. Somatic copy number mosaicism in human skin revealed by induced pluripotent stem cells. *Nature.* 492(7429): 42-438.
- 114- Young MA, Larson DE, Sun CW, George DR, Ding L, Miller CA, et al. 2012. Background mutations in parental cells account for most of the genetic heterogeneity of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 10(5): 82-570.
- 115- Kim K, Doi A, Wen B, Ng K, Zhao R, Cahan P, et al. 2010. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature.* 467(7313): 90-285.
- 116- Nasu A, Ikeya M, Yamamoto T, Watanabe A, Jin Y, Matsumoto Y, et al. 2013. Genetically matched human iPS cells reveal that propensity for cartilage and bone differentiation differs with clones, not cell type of origin. *PLoS One.* 8(1): e53771.
- 117- Kytala A, Moraghebi R, Valensisi C, Kettunen J, Andrus C, Pasumarthy KK, et al. 2016. Genetic variability overrides the

- impact of parental cell type and determines iPSC differentiation potential. *Stem Cell Rep.* 6(2): 12-200.
- 118- Turner M, Leslie S, Martin NG, Peschanski M, Rao M, Taylor CJ, et al. 2013. Toward the development of a global induced pluripotent stem cell library. *Cell Stem Cell.* 13(4): 4-382.
- 119- Rosenberg NA, Huang L, Jewett EM, Szpiech ZA, Jankovic I, Boehnke M. 2010. Genome-wide association studies in diverse populations. *Nat Rev Genet.* 11(5): 66-356.
- 120- Yusa K. 2013. Seamless genome editing in human pluripotent stem cells using custom endonuclease- based gene targeting and the piggyBac transposon. *Nat Protoc.* 8(10): 78-2061.
- 121- Woltjen K, Hamalainen R, Kibschull M, Mileikovsky M, Nagy A. 2011. Transgene-free production of pluripotent stem cells using piggyBac transposons. *Methods Mol Biol.* 767: 87-103.

فصل چهارم

CRISPR/Cas9 و فناوری‌های دستوری ژنوم موش

خلاصه

با شروع انقلاب CRISPR در سال ۲۰۱۳ بسیاری از محققان در سراسر جهان مبادرت به استفاده از این تکنیک در بخش‌های مختلف علوم بیولوژی بویژه در بخش ژنتیک مولکولی موش، ورزیدند. مکانیسم ویرایش CRISPR یکی از چند جهش عظیم در علوم بیولوژی و دستوری ژنتیکی در طی ۳۰ سال گذشته بشمار می‌رود. در این فصل به چگونگی دستوری در ژنوم موش با استفاده از فناوری CRISPR پرداخته شده است.

مقدمه

در طول سه دهه گذشته، تکنیک‌ها و روش‌های دستورزی ژنوم با استفاده از موش‌های آزمایشگاهی، به دلیل وجود سلول‌های رویانی جنینی (ES)، توسعه و تکامل یافتند. سلول‌های رویانی موش، به عنوان یک ابزار قدرتمند و کارآمد برای غربال نمودن نوترکیبی همسان (HR) جهت ایجاد تغییرات ژنتیکی هدفمند در ژنوم پستانداران به حساب می‌آیند. در گذشته عملاً روش‌هایی جهت دستورزی هدفمند ژنوم بدون استفاده از سلول‌های رویانی موش امکان‌پذیر نبود. طی چند سال اخیر، بسیاری از تکنیک‌ها شامل: ZFNها، TALENها و CRISPR/Cas9 توسعه داده شدند و قادر به انجام ویرایش ژنومی گونه‌ها بدون استفاده از سلول‌های رویانی می‌باشند. این تکنیک‌های جدید محدودیت‌های گونه‌ای را از بین برده به طور یکپارچه راه خود را در عرصه ویرایش ژنوم ادامه می‌دهند.

در میان روش‌های ویرایش ژنومی که از آنزیم‌های نوکلئازی جهت مهندسی نمودن توالی هدف استفاده می‌شود، سیستم ویرایش ژنومی CRISPR/Cas9 از محبوبیت بیشتری برخوردار است. سادگی، سرعت در طراحی و موفقیت بالا در انجام آزمایشات، تقریباً در هر گونه‌ای که تا به امروز مورد آزمایش قرار گرفته است، دلیل این محبوبیت می‌باشد. در دوران قبل از ظهور مکانیسم CRISPR، سلول‌های رویانی نقش اصلی در زمینه مهندسی نمودن ژنوم را ایفا می‌نمودند، که می‌توان به توسعه ده‌ها هزار فاکتور جهت حذف ژن‌ها (KO)¹ در موش اشاره نمود. در حال حاضر، جوامع علمی به شدت به رویکردهای ویرایش ژنوم مبتنی بر مکانیسم CRISPR حرکت می‌کنند. در این فصل، به چگونگی تاثیر این فناوری در زمینه دستورزی ژنوم موش‌ها پرداخته است.

فناوری‌های مرسوم دستورزی ژنوم موش در دوران قبل از CRISPR

توسعه فناوری‌های مهندسی ژنتیک موش در دهه ۱۹۸۰ با تلاش برای انتقال DNA (ژن) خارجی به درون ژنوم موجودات جهت تولید حیوانات ترانس‌ژنیک یا تغییر یافته ژنتیکی

¹ - Knock Out (KO)

(Tg)^۱ و همچنین حذف یا غیرفعال^۲ کردن ژن‌های داخلی جهت تولید حیوانات ناکاوت (KO)^۳ آغاز شد. مکانیسم انتقال ژن^۴ از طریق انتقال DNA خالص به سلول‌های تخم بارور شده^۵ با استفاده از تکنیک میکرواینجکشن^۶ حاصل شد و سپس با انتقال تخم‌ها به حیوانات شبه‌باردار^۷ جهت تولید حیوانات زنده صورت پذیرفت. با این حال، برای دستوری ژن، تزریق ساده DNA به سلول تخم کافی نبود و باید یک ابزار ویژه برای مهندسی نمودن سلول‌های رویانی ایجاد می‌شد، به این صورت که در ابتدا باید ژن‌های داخلی با استفاده از مکانیسم نوترکیبی همسان (HR) دچار تغییر می‌شدند. در مرحله بعد سلول‌های رویانی حاوی ژن تغییر یافته به درون جنین‌های بلاستوسیت^۸ انتقال می‌یافت و پس از گذشت حدود ۳ روز حیوانات شیمری^۹ حاصل می‌شدند (۱). حیوانات شیمر دارای دو نوع سلول می‌باشند که شامل: سلول‌های مشتق شده از بلاستوسیت جنینی و همچنین سلول‌هایی که از ژن‌های خارجی انتقال یافته به درون سلول‌های رویانی حاصل شده‌اند. تغییر موش شیمر به یک موش وحشی، باعث انتقال عمودی آлл اصلاح شده ژن به فرزندان هتروزیگوت می‌گردد. تلاقی بین نتاج هتروزیگوت منجر به تولید موش‌های هموزیگوت اشتقاق یافته از سلول‌های رویانی می‌گردد. سومین نوع تولید حیوانات دستوری شده ژنتیکی، ناک‌این (KI)^{۱۰} می‌باشند که به درج هدفمند DNA حاوی تغییرات دلخواه ژنتیکی به درون ژنوم، اشاره دارد است. همچنین تولید موش‌های ناک‌این نیز، نیازمند سلول‌های رویانی می‌باشد. روش‌های مرسوم Tg، KO و KI تقریباً برای سه دهه بکار گرفته شدند و به تولید هزاران

1- Transgenic (Tg) Animals

2- Inactivate

3- Knock Out (KO) Animals

4- Transgenesis

5- Fertilized Zygotes

6- Microinjection

7- Pseudo-Pregnant

^۸ - Blastocyst Embryos: بلاستوسیت به مرحله‌ای از مراحل جنینی مهره‌داران (بین ۳ تا ۵ روزه) گفته می‌شود

^۹ - Chimeric Animals: شیمر یا بافت ناهمسان به یک جانور یا بخشی از یک جانور که دارای مخلوطی از دو یا

چند نوع سلول با ژنتیک متفاوت باشد، گفته می‌شود.

10- Knockin (knock-in, KI)

مدل از بیماری‌های موش کمک کردند. با این وجود این روش‌ها دارای محدودیت‌های متعددی بودند که با آن‌ها اشاره خواهد شد.

روش‌های مرسوم Tg و محدودیت‌های آن

موش‌های ترانس ژنیک (Tg) از طریق انتقال مستقیم قطعه DNA هدف (حاوی: پروموتور، cDNA، ترمیناتور و غیره) توسط میکرواینجکشن به هسته تخم‌های بارور شده نیم‌روزه، تولید می‌شوند و پس از آن به درون لوله رحمی^۱ موش‌های شبه‌باردار انتقال داده می‌شوند. نتاج زنده به دست آمده به نام حیوانات بنیان‌گذار (G₀)^۲ نامیده می‌شوند. اگر این نتاج حاوی DNA مورد نظر بودند، برای تثبیت لاین‌های سلولی Tg مورد استفاده قرار می‌گرفتند. شرح کاملی از نحوه طراحی و تولید موش‌های دست‌ورزی شده به روش KO و KI توسط تیم تحقیقاتی هارویاما و کولکاری بررسی شده است (۲).

روش‌های تولید مرسوم موش‌های Tg دارای محدودیت‌های ذاتی متعددی هستند شامل:
 ۱- ادغام تصادفی توالی ژن هدف در محل عناصر تنظیم‌کننده ممکن است بر بیان ژن هدف تاثیر گذارد، و یا ممکن است خود ژن هدف بر بیان ژن‌های تنظیم‌کننده اثر بگذارد، ۲- ادغام شدن در چندین جایگاه یا وجود چندین کپی از ژن هدف، گاهی اوقات به بیان غیرقابل اعتماد یا خاموش شدن ژن هدف منجر می‌شود (۳). به دلیل وجود چنین مشکلاتی، قبل از اینکه لاین‌ها برای آزمایش‌های بیشتر بکار گرفته شوند، به صورت تصادف چند لاین سلولی از TGهای G₀ را برای تعیین میزان بیان ژن هدف، مورد بررسی قرار می‌دهند (۴).

روش‌های مرسوم KO و KI و محدودیت‌های آن‌ها

روش‌های مرسوم KO و KI از طریق استفاده از سلول‌های رویانی تولید می‌شوند که از طریق نوترکیبی همسان می‌توان توالی DNA مورد نظر را درون ژنوم جای داد. این فرآیند

¹- Oviduct

²- Founder (G₀)

در ۴ مرحله صورت می‌پذیرد: ۱- ساخت وکتور مولکولی (کانستراکت)^۱ هدفمند ۲- انتقال کانستراکت از طریق الکتروپوریشن به سلول‌های رویانی و بررسی کلون‌های نوترکیب به روش نشانگرهای انتخابی مثبت/ منفی^۲ ۳- انتقال سلول‌های رویانی نوترکیب به تخمک بلاستوسیت و متعاقباً انتقال آن‌ها به لوله رحمی موش‌های شبه‌باردار برای تولید حیوانات شیمر ۴- بررسی لاین‌های سلولی شیمر از لحاظ وجود ژن هدف در موش‌های تولید شده (۵).

روش‌های مرسوم تولید موش‌های نوترکیب به روش KO و KI نیز دارای چندین محدودیت ذاتی می‌باشند. نخست اینکه، سلول‌های رویانی بایستی قابلیت پلوریپوتنسی برای تولید لاین‌های سلولی داشته باشند و با انتقال عمودی جهش القا شده را به نسل بعد منتقل کنند. دوم، سلول‌های رویانی مستعد حاوی کانستراکت مورد نظر، فقط به تعداد بسیار اندکی از سویه‌های موش قابل انتقال است نه به تمامی انواع آن‌ها. در بسیاری از مدل‌های حیوانی که نمی‌توان پس‌زمینه ژنتیکی خالص از گونه‌ها را تولید نمود باید نسل‌های بسیاری از طریق روش اصلاحی تلاقی برگشتی^۳ خالص‌سازی شوند (۶). سوم، قرارگیری مناسب کانستراکت هدفمند، نیازمند به وجود بازوهای همسان جهت اتصال می‌باشد که در انتهای هر توالی قرار دارد، که البته برای برخی ژن‌ها دشوار است. چهارم، کانستراکت هدفمند باید دارای عناصری مانند: نشانگر انتخابی مثبت (به عنوان مثال، ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک نوومایسین یا پورمایسین) و نشانگر انتخابی منفی (به عنوان مثال، تیمیدین کیناز یا سم دیفتری) جهت انتخاب کلون‌های نوترکیب حاوی DNA هدف باشد. پنجم، درج نشانگرهای انتخابی مثبت طویل (مانند: فلیپازها^۴ یا ریکامبینازهای Cre) ممکن است منجر به اختلال در عمل عناصر تنظیمی در مجاورت ژن هدف گردند. ششم، استراتژی KI/KO در صورتی که جهت حذف یک ژن تک‌اگزونی باشد، بسیار دشوار است. هفتم، ژن هدف به همه لاین‌های سلولی نتایج شیمری، منتقل نمی‌شود. هشتم، ویرایش ژنومی به روش مرسوم در آزمایشگاه تنها برای

¹- Construct

²- Positive/Negative Selective Markers

³- Backcross Breeding

⁴- Flippase (Flp)

تولید یک ژن از طریق استراتژی KI/KO امکان پذیر است. در نهایت اینکه طراحی و تولید مدل‌های حیوانی از طریق استراتژی KI/KO طاقت‌فرسا، زمان‌بر و هزینه‌بر می‌باشد.

میکرواینجکشن و محدودیت‌های آن

هر دو تکنیک Tg و KO/KI مستلزم تزریق مستقیم ژن هدف به جنین‌های موش هستند. اگرچه این روش‌ها ملال‌آور، کارآمد، هزینه‌بر و نیازمند ذرات طلا می‌باشند اما برای بیش از سه دهه جهت طراحی و تولید مدل‌های ژنتیکی بکار گرفته شدند. در روش Tg کاست DNA هدف به روش میکرواینجکشن به سلول‌های تخم موش انتقال می‌یابد، درحالی‌که در استراتژی KO/KI سلول‌های رویانی جنینی حاوی ژن هدف از طریق انتقال مستقیم ژن به سلول‌های بلاستوسیت تولید می‌شوند. سول‌های تخم یا جنین‌ها از لقاح سلول‌های جنسی ماده با نر تولید می‌شوند. جهت حصول اطمینان از وجود تعداد کافی از لاین‌های سلولی ترانسژنیک G₀ یا شیمرها، به طور معمول ۱۰۰ سلول تخم یا ۵۰ جنین به ترتیب برای پروژه Tg یا KO/KI مورد تزریق قرار می‌گیرند. جنین‌های دست‌ورزی شده باید به لوله رحمی ماده‌های شبه‌باردار منتقل شود تا فرزندان زنده تولید کنند.

به طور کلی، میکرواینجکشن نظامی منسجم در مورد هدف قرار دادن ژن موش است، اما دو محدودیت اصلی آن وجود تجهیزات پیچیده و متخصصین با تجربه برای انجام پروژه می‌باشد. به طور معمول حدود ۱۰۰ تا ۲۰۰ هزار دلار جهت اجرای پروژه‌های انتقال مستقیم ژن به روش میکرواینجکشن مورد نیاز می‌باشد. همچنین حداقل یک سال زمان جهت یادگیری مهارت‌های فنی برای یک محقق در انجام پروژه میکرواینجکشن لازم است.

CRISPR/Cas9 و ویرایش ژنومی موش

ویرایش ژنومی به روش CRISPR از سال ۲۰۱۳ تقریباً تمامی زمینه‌های علوم بیولوژی را متحول ساخته است. به طور خلاصه، تکنیک کریسپر شامل یک RNA راهنما (sgRNA) به طول حدود ۲۰ نوکلئوتید می‌باشد که به محل توالی هدف در ژنوم متصل شده تا آنزیم نوکلئازی Cas9 را به محل هدف برساند و سبب برش توالی DNA گردد. توالی برش یافته

نهایتاً به روش اتصال پایانه غیرهمسان (NHEJ) ترمیم شده و سبب اختلال در عمل ژن می‌گردد. محل برش یافته می‌تواند بوسیله یک الیگونوکلوئوتید کوتاه (۳۰ الی ۶۰ نوکلئوتید) یا بلند (۵/۰ الی ۲ kb) که دارای دو انتهای چسبان باشند پر شود. همچنین توالی برش یافته به ندرت بوسیله مکانیسم پایانه همسان (HDR) ترمیم می‌شود (۷).

از فناوری CRISPR می‌توان به عنوان یک "اخلال‌گر" نام برد زیرا ساختار انجام آزمایش‌های مهندسی ژنومی از طریق روش‌های Tg و KO/KI که اساساً طی سه دهه بدون تغییر باقی مانده بود را متحول ساخت. علاوه بر این، کریسپر جایگزین دو روش دیگر ویرایش ژنومی به نام ZFN و TALEN شد، که حدود ۳ تا ۵ سال قبل از ظهور فن‌آوری CRISPR مورد استفاده بودند. به دلیل سادگی، سهولت نسبی و سرعت در دستوری ژنوم، تکنیک CRISPR/Cas9 بسیاری از محققین را به فکر استفاده از این روش در زمینه‌های مختلف تحقیقاتی ترغیب نموده است (جدول ۱).

جدول ۱- مقایسه روش‌های مرسوم مهندسی ژنتیک و ویرایش ژنومی کریسپر

روش‌های مرسوم مهندسی ژنتیک	ویرایش ژنومی کریسپر
نیازمند سلول‌های رویانی جنینی برای تولید موجودات دستوری شده می‌باشند (هزینه‌بر و زمان‌بر).	تولید موجودات دستوری شده بدون نیاز به سلول‌های رویانی جنینی (مقرون به صرفه از لحاظ هزینه و زمان)
جهت دستوری نیازمند سویه‌های خاصی از سلول‌های رویانی جنینی است	دستوری در اکثر سویه‌های سلولی قابل اجراست
بدون انتقال توالی ژن هدف به درون ژنوم دستوری امکان پذیر نمی‌باشد	امکان دستوری بدون انتقال ژن هدف
تولید موجودات دستوری شده هموزیگوت در لاین‌های سلولی نسل اولیه G ₀ امکان پذیر نمی‌باشد	امکان تولید موجودات دستوری شده هموزیگوت در نسل اولیه لاین‌های سلولی G ₀

¹- Disruptor

تولید لاین‌های سلولی چندگانه به آسانی	به جز در مورد تکنیک‌های پیشرفته، تولید لاین‌های سلولی چندگانه (Multiplexing) دشوار است
تلفیق توالی هدف به صورت کاملاً دقیق صورت می‌پذیرد	به جز در مورد تکنیک‌های پیشرفته، تلفیق کاست حاوی ژن هدف به درون ژنوم به صورت تصادفی رخ می‌دهد و ممکن است سبب خاموشی عناصر تنظیمی گردد
ادغام توالی‌های بزرگ به آسانی امکان‌پذیر است	ادغام توالی‌های بزرگ بسیار دشوار است
از الکتروپوریشن می‌توان به عنوان جایگزین میکرواینجکشن استفاده نمود، امکان دستورزی همزمان بسیاری از جنین‌ها	میکرواینجکشن یک مرحله حیاتی است برای دستورزی؛ هر جنین باید به صورت دستی تزریق شود و نهایتاً به ماده شبه‌باردار منتقل گردد

چالش‌های کنونی مهندسی ژنوم موش به روش CRISPR / Cas9

کار آبی ضعیف توالی انتقال یافته در جایگاه‌های برش بوسیله نوکلئاز Cas9

اگرچه گزارشات متعددی وجود دارد که نشان می‌دهند درج کاست‌های بزرگ DNA در جایگاه‌های برش داده شده بوسیله نوکلئاز Cas9 سبب افزایش بهره‌وری می‌شود اما جهت نیل به مورد هدف قرار دادن جایگاه‌های متعدد درون ژنوم، نیازمند به توسعه بیشتر می‌باشد. یکی از محدودیت‌ها در روش کریسپر ممکن است کارایی ضعیف توالی RNA راهنما (sgRNA) باشد که به جایگاه هدف متصل می‌شود و یا عدم طراحی مناسب DNA اهداکننده.

چالش‌های موجود در توسعه مدل‌های حاصل از سیستم KO

استفاده از ریکامبینازهای *loxP* در مجاورت اگزون‌های هدف، یک روش مرسوم استاندارد در تولید موش‌های دستورزی شده به روش KO می‌باشد که در سلول‌های رویانی جنینی بکار گرفته می‌شوند. امروزه بسیاری از آزمایشگاه‌های سراسر دنیا در تلاشند تا با استفاده از

سیستم کریسپر مدل‌های دستوری شده به روش KO را توسعه دهند. درج دو جایگاه ریکامبیناز *loxP* با استفاده از یکی از این دو روش امکان‌پذیر می‌باشد: ۱- با استفاده از یک DNA اهداکننده دورشته‌ای متشکل از بازوهای کوتاه همسان (تقریباً ۱ kb) و دو جایگاه ریکامبیناز *loxP* در مجاورت منطقه هدف (۲۳). ۲- استفاده از دو ssODN (الیگو داکسی نوکلئوتید تک رشته‌ای)^۱ مجزا کدکننده جایگاه *loxP* در وسط و بازوهای کوتاه همسان (تقریباً ۶۰ bp) در انتهای کاست و نهایتاً انتقال آن‌ها با دو کریسپر جداگانه به درون ژنوم (۲۴). درج دو جایگاه *loxP* با کارایی بالا به صورت سیس^۲ هنوز با چالش‌هایی همراه است، شامل: ۱- دو gRNA مستقل باید به طور موثر در ایجاد برش دو رشته در جایگاه‌های هدف خود قرار گیرند، اگر یکی از آن‌ها نتواند به خوبی برش دهد، روند تولید آل‌های دلخواه مختل خواهد شد، ۲- چالش در ژنوتیپی که در جایگاه ریکامبیناز *loxP* درج شده است، بویژه زمانی که از روش ssODN استفاده گردد (مربوط به بخش چالش‌های مرتبط با ژنوتایپینگ).

اثرات غیرهدف^۳

از آنجایی که توالی تشخیص gRNA فقط ۲۰ نوکلئوتید طول دارد و عدم انطباق (mismatch) نوکلئوتیدها در زمانی که gRNA به DNA ژنومی متصل می‌شود، نادیده گرفته می‌شود، استفاده از CRISPR می‌تواند منجر به اشتباهات ناخواسته غیرهدف گردد. همچنین برخی از مطالعات اولیه در کشت سلولی نشان داده‌اند که اثرات غیرهدف می‌توانند نگرانی‌های عمده‌ای در استفاده از فناوری CRISPR پدید آورند (۲۵، ۲۶). جهت به حداقل رساندن یا حذف اشتباهات ناخواسته اثرات غیرهدف چند استراتژی بکار گرفته می‌شود شامل: ۱- استفاده از روش Cas9 نیکاز^۴ (nCas9 یا Cas9n)، که در این روش از یک آنزیم Cas9 جهش‌یافته استفاده می‌شود که به جای ایجاد برش دورشته‌ای تولید شکاف^۵ می‌کند،

^۱- ssODNs (single-stranded Oligo Deoxynucleotides)

^۲- Cis Orientation

^۳- Off-Target Effects

^۴- Cas9 Nickase

^۵- Nick

با استفاده از دو آنزیم نیکاز که توسط دو gRNA تولید می‌شود، دو شکاف در مجاورت جایگاه هدف ایجاد می‌گردد (۲۷، ۲۸). ۲- روش انتقال Cas9 به شکل mRNA یا پروتئین به جای پلاسمید، به دلیل اینکه بیان دائم Cas9 توسط DNA پلاسمید منجر به تجمع پروتئین Cas9 در مدت طولانی شده که این عامل سبب افزایش پتانسیل برش غیرهدف نسبت به می‌شود.

طبق مطالعات صورت گرفته به نظر می‌رسد که احتمال برش غیرهدف در سیستم‌های کشت سلولی بالا باشد. با وجود این، برخی از گزارش‌ها نیز نشان دادند که استفاده از Cas9 به شکل mRNA یا پروتئین در مدل‌های موش تولید شده از طریق سیستم CRISPR سبب حذف یا کاهش اثرات غیرهدف شده است (۲۹، ۳۰، ۳۱). همچنین، نگرانی در مورد برش‌های غیرهدف در مدل‌های موش را می‌تواند از طریق القای جهش‌های مجزا به روش تلافی برگشتی در لاین‌های سلولی G₀ برطرف نمود.

چالش‌های مرتبط با ژنوتایپینگ

شناسایی ژنوتیپ نتاج تولید شده توسط سیستم CRISPR یکی دیگر از چالش‌های عمده بشمار می‌رود، زیرا کریسپر می‌تواند نتایج بسیار غیر منتظره‌ای مانند: درج نامناسب قالب اهداکننده و یا ایجاد بیش از دو نوع آلل (موزائیسیم)^۱ در نتاج تولید کند. شناسایی این گونه نتایج غیر منتظره مستلزم تجزیه و تحلیل دقیق بسیاری از نتاج تولید شده از موش‌های G₀ می‌باشد. در برخی موارد جهت شناسایی ژنوتیپ این نتایج ممکن است تنها استفاده از روش ساده PCR کافی نباشد و نیازمند اطلاعات توالی‌یابی از هر نتاج باشیم. برای اجتناب از مواجهه شدن با چنین مشکلاتی می‌توان از یک gRNA در مجاورت جایگاه‌های شناسایی اندونوکلازهای محدودگر (RE)^۲ استفاده نمود یا جهت کمک به طراحی ژنوتایپینگ بر پایه RFLP-PCR^۳ می‌توان با درج یک RE در قالب اهداکننده^۴ مشکل را برطرف نمود.

¹- Mosaicism

²- Restriction Endonucleases (RE)

³- RFLP-PCR (Restriction Fragment Length Polymorphism- Polymerase Chain Reaction)-based Genotyping

⁴- Donor Template

ژنوتایپینگ به ویژه در مورد روش ssODN جهت حصول اطمینان از درج صحیح جایگاه‌های *loxP* در همان آلل، بسیار چالش برانگیز است. به طور خاص، جداسازی صحیح ژنوتیپ هدف می‌تواند دشوار باشد، در صورتی که، ۱- دو جایگاه *loxP* دور از هم باشند و نتوان بوسیله PCR کل ناحیه هدف را تکثیر نمود، ۲- اگر حیوانات G₀ حداقل در یکی از جایگاه‌های درج شده هموزیگوت نباشند. در چنین شرایطی استفاده از تکنیک سادرن بلاتینگ^۱ جهت تایید درج صحیح *loxP* در همان آلل ضروری می‌باشد.

تأثیر CRISPR/Cas9 بر آینده دست‌ورزی ژنوم موش

امروزه بر همگان کاملاً روشن است که سیستم ویرایش ژنومی CRISPR/Cas9 توانسته بسیاری از زمینه‌های علوم بیولوژی از جمله دست‌ورزی در ژنوم موش را متحول سازد. در این راستا نیز هر روزه ابزارها و روش‌های جدیدی نیز به طور مداوم به این سیستم اضافه می‌گردد. همچنین اخیراً چندین آنزیم نوکلئازی جدید که دارای ویژگی‌ها و قابلیت‌های متمایزی هستند به جعبه ابزار ژنومی CRISPR اضافه شده است (۳۲، ۳۳). ظهور چنین پیشرفت‌هایی می‌تواند تأثیر قابل توجهی بر فناوری‌های TG و KO/KI داشته باشد.

تأثیر بر فناوری‌های TG تصادفی^۲

اکثر مدل‌های موش ترانسژنیک تولید شده تا به امروز از نوع Tg تصادفی هستند. در بسیاری از موارد، در چنین پروژه‌هایی امکان تولید موفق لاین‌های سلولی ترانسژن G₀ با کارایی بالا، بسیار پایین است. اگر CRISPR/Cas9 بتواند کاست‌های بزرگ DNA را بصورت دقیق به درون ژنوم در محل مناسب درج نماید، احتمال دارد که جامعه علمی جهانی نام این سیستم را به "ترا ریخته کریسپر"^۳ تغییر دهند و در نهایت ممکن است تولید موش ترانسژنیک مبتنی بر ادغام تصادفی منسوخ شود. اگرچه گزارش‌های زیادی در مورد موفقیت درج صحیح کاست‌های بزرگ DNA به روش CRISPR/Cas9 وجود ندارد، اما

¹- Southern Blotting

²- Random Tg

³- CRISPR Transgenesis

استراتژی‌های خاصی که اخیراً توسعه یافته‌اند، راه را برای ادغام توالی‌هایی با طول بزرگ هموار نموده‌اند (۳۱، ۳۴، ۳۶).

تأثیر بر فناوری‌های KO/KI

همانطور که قبلاً اشاره شد، در بخش مطالعاتی مربوط به ژنتیک مولکولی موش‌ها استفاده از سیستم CRISPR/Cas9 جهت تولید جهش‌های نقطه‌ای KI به سرعت در حال افزایش است. اگرچه نشان داده شده است که مدل‌های KO را نیز می‌توان با استفاده از سیستم CRISPR تولید نمود ولی به دلیل مشکلات ذاتی در ارتباط با درج صحیح دو جایگاه *loxP* در مجاورت جایگاه هدف به صورت سیس، هنوز به عنوان یک روش متداول قابل استفاده نیست. این احتمال وجود دارد که، در آینده‌ای نزدیک، پیشرفت‌های فنی به طور آسان و کارآمد به منظور توسعه مدل‌های KO تکامل یابند (۲۴).

تأثیر بر تکنیک میکرواینجکشن

اگرچه در گذشته، تکنیک‌های الکتروپوریشن و GONAD¹ در میان جامعه علمی محبوب بودند، اما امروزه روش‌های مبتنی بر CRISPR نیازی به انجام مراحل تخصصی میکرواینجکشن و متخصصین ماهر ندارند، که این امر می‌تواند بسیاری از محققین را قادر به اجرای پروژه‌های ویرایش ژنومی نماید. GONAD یک روش جدید امیدوارکننده جهت انتقال مستقیم کمپلکس CRISPR به درون تخم‌های موجود در لوله رحمی از طریق روش الکتروپوریشن می‌باشد. در مقایسه با روش میکرواینجکشن، تکنیک GONAD نیاز به غلظت‌های زیادی از معرف‌ها برای اطمینان از صحت جذب و فعالیت جنین دارد. احتمالاً کاربرد وسیع این تکنیک در آینده منجر به تکامل سریع‌تر و بهبود تکنیک CRISPR خواهد شد، و نهایتاً سبب سهولت در زمینه ویرایش ژنومی می‌گردد.

¹- Genome Editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery (GONAD)

نتیجه‌گیری

تکنیک‌های دستوری ژنتیکی مرسوم در طول سه دهه گذشته، برای توسعه هزاران مدل موش استفاده شده است. علاوه بر این اخیراً ابزارهای ویرایش ژنومی مانند ZFN، TALEN و CRISPR/Cas9 باعث شده‌اند تا گام‌های بزرگی در زمینه مهندسی ژنتیک برداشته شود. در میان این روش‌ها سیستم ویرایش ژنومی کریسپر، در طول ۲ تا ۳ سال گذشته به طور گسترده‌ای پذیرفته شده است. سهولت و کاربرد گسترده آن در میان گونه‌های مختلف سلولی، روند دستوری ژنومی را سریع‌تر، ارزان‌تر و کارآمدتر ساخته است. همچنین به توسعه دهندگان فناوری کمک کرده است تا روش‌های جدیدتری را که در دوران قبل از ظهور CRISPR عملاً غیرممکن بود، طراحی کنند. امروزه تحقیقات به سرعت در حال انجام‌اند برای کشف مولکول‌های جدید نوکلئازی CRISPR و همچنین یافتن استراتژی‌های جدیدتر برای بهبود کارایی درج DNA و تسهیل درج توالی‌های بزرگ DNA به درون ژنوم. همه این پیشرفت‌ها سبب سهولت ویرایش ژنی برای تحقق مطالعات علوم مختلف بیولوژی و پزشکی در سال‌های آینده خواهند شد.

منابع

- 1- Behringer R, Gertsenstein M, Nagy KV, Nagy A. 2014. Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor: CSHL Press*.
- 2- Haruyama N, Cho A, Kulkarni AB. 2009. Overview: engineering transgenic constructs and mice. *Curr Protoc Cell Biol*. Chap. 19: Unit 19.10.
- 3- Garrick D, Fiering S, Martin DI, Whitelaw E. 1998. Repeat-induced gene silencing in mammals. *Nat Genet*. 18: 9-56.
- 4- Ohtsuka M, Miura H, Sato M, Kimura M, Inoko H, Gurusurthy CB. 2012. PITT: pronuclear injection- based targeted transgenesis, a reliable transgene expression method in mice. *Exp Anim*. 61: 489-502.
- 5- Hall B, Limaye A, Kulkarni AB. 2009. Overview: generation of gene knockout mice. *Curr Protoc Cell Biol*. Chap. 19: Unit 19.12 19.12.1-17.
- 6- Gurusurthy CB, Joshi PS, Kurz SG, Ohtsuka M, Quadros RM, Harms DW, Lloyd KCK. 2015. Validation of simple sequence length polymorphism regions of commonly used mouse strains for marker assisted speed congenics screening. *Int J Genomics*. 2015: 1-735845.
- 7- Peng Y, Clark KJ, Campbell JM, Panetta MR, Guo Y, Ekker SC. 2014. Making designer mutants in model organisms. *Development*. 141: 54-4042.
- 8- Ohtsuka M, Ogiwara S, Miura H, Mizutani A, Warita T, Sato M, Imai K, Hozumi K, Sato T, Tanaka M, Kimura M, Inoko H. 2010. Pronuclear injection-based mouse targeted transgenesis for reproducible and highly efficient transgene expression. *Nucleic Acids Res*. 38: e198.
- 9- Ohtsuka M, Miura H, Mochida K, Hirose M, Hasegawa A, Ogura A, Mizutani R, Kimura M, Isotani A, Ikawa M, Sato M, Gurusurthy CB. 2015. One-step generation of multiple transgenic mouse lines using an improved Pronuclear Injection-based Targeted Transgenesis (i-PITT). *BMC Genomics*. 16: 1-274.

- 10- Kaneko T, Sakuma T, Yamamoto T, Mashimo T. 2014. Simple knockout by electroporation of engineered endonucleases into intact rat embryos. *Sci Rep.* 4: 1-6382.
- 11- Kaneko T, Mashimo T. 2015. Simple genome editing of rodent intact embryos by electroporation. *PLoS One.* 10: e0142755.
- 12- Hashimoto M, Takemoto T. 2015. Electroporation enables the efficient mRNA delivery into the mouse zygotes and facilitates CRISPR/Cas9-based genome editing. *Sci Rep.* 5: 1-11315.
- 13- Takahashi G, Gurusurthy CB, Wada K, Miura H, Sato M, Ohtsuka M. 2015. GONAD: genome- editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery system: a novel microinjection independent genome engineering method in mice. *Sci Rep.* 5: 1-11406.
- 14- Skarnes WC. 2015. Is mouse embryonic stem cell technology obsolete. *Genome Biol.* 16: 1-109.
- 15- Pettitt SJ, Liang Q, Rairdan XY, Moran JL, Prosser HM, Beier DR, Lloyd KC, Bradley A, Skarnes WC. 2009. Agouti C57BL/6N embryonic stem cells for mouse genetic resources. *Nat Methods.* 6: 5-493.
- 16- Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, Jaenisch R. 2013. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell.* 153: 8-910.
- 17- Yu Y, Bradley A. 2001. Mouse genomic technologies: engineering chromosomal rearrangements in mice. *Nat Rev Genet.* 2: 90-780.
- 18- Scheer N, Kapelyukh Y, Chatham L, Rode A, Buechel S, Wolf CR. 2012. Generation and characterization of novel cytochrome P450 Cyp2c gene cluster knockout and CYP2C9 humanized mouse lines. *Mol Pharmacol.* 82: 9-1022.
- 19- Yoshimi K, Kunihiro Y, Kaneko T, Nagahora H, Voigt B, Mashimo T. 2016. ssODN-mediated knockin with CRISPR-Cas for large genomic regions in zygotes. *Nat Commun.* 7: 1-10431.
- 20- Horii T, Arai Y, Yamazaki M, Morita S, Kimura M, Itoh M, Abe Y, Hatada I. 2014. Validation of microinjection methods for

- generating knockout mice by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Sci Rep.* 4: 1-4513.
- 21- Gurumurthy CB, Takahashi G, Wada K, Miura H, Sato M, Ohtsuka M. 2016. GONAD: a novel CRISPR/Cas9 genome editing method that does not require ex vivo handling of embryos. *Curr Protoc Hum Genet.* 88: 12-15.8.1.
- 22- Sato M, Ohtsuka M, Watanabe S, Gurumurthy CB. 2016. Nucleic acids delivery methods for genome editing in zygotes and embryos: the old, the new, and the old-new. *Biol Direct.* 11(1): 1-16.
- 23- Lee AY, Lloyd KCK. 2014. Conditional targeting of Ispd using paired Cas9 nickase and a single DNA template in mice. *FEBS Open Bio.* 4: 42-637.
- 24- Yang H, Wang H, Shivalila CS, Cheng AW, Shi L, Jaenisch R. 2013. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell.* 154: 9-1370.
- 25- Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, Sander JD. 2013. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol.* 31: 6-822.
- 26- Pattanayak V, Lin S, Guilinger JP, Ma E, Doudna JA, Liu DR. 2013. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nat Biotechnol.* 31: 43-839.
- 27- Ran FA, Hsu PD, Lin C-Y, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, Scott DA, Inoue A, Matoba S, Zhang Y, Zhang F. 2013. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell.* 154: 9-1380.
- 28- Shen B, Zhang W, Zhang J, Zhou J, Wang J, Chen L, Wang L, Hodgkins A, Iyer V, Huang X, Skarnes WC. 2014. Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. *Nat Methods.* 11: 399-402.

- 29- Iyer V, Shen B, Zhang W, Hodgkins A, Keane T, Huang X, Skarnes WC. 2015. Off-target mutations are rare in Cas9-modified mice. *Nat Methods*. 12: 1-479.
- 30- Harms DW, Quadros RM, Seruggia D, Ohtsuka M, Takahashi G, Montoliu L, Gurumurthy CB. 2014 Mouse genome editing using the CRISPR/Cas system. *Curr Protoc Hum Genet*. 83: 27-15.7.1.
- 31- Aida T, Chiyo K, Usami T, Ishikubo H, Imahashi R, Wada Y, Tanaka KF, Sakuma T, Yamamoto T, Tanaka K. 2015. Cloning-free CRISPR/Cas system facilitates functional cassette knock-in in mice. *Genome Biol*. 16: 87.
- 32- Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, Makarova KS, Essletzbichler P, Volz SE, Joung J, van der Oost J, Regev A, Koonin EV, Zhang F. 2015. Cpf1 Is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*. 163: 71-759.
- 33- Shmakov S, Abudayyeh OO, Makarova KS, Wolf YI, Gootenberg JS, Semenova E, Minakhin L, Joung J, Konermann S, Severinov K, Zhang F, Koonin EV. 2015. Discovery and functional characterization of diverse class 2 CRISPR-Cas systems. *Mol Cell*. 60: 97-385.
- 34- Nakade S, Tsubota T, Sakane Y, Kume S, Sakamoto N, Obara M, Daimon T, Sezutsu H, Yamamoto T, Sakuma T, Suzuki KT. 2014. Microhomology-mediated end-joining-dependent integration of donor DNA in cells and animals using TALENs and CRISPR/Cas9. *Nat Commun*. 5: 1-5560.
- 35- Quadros RM, Harms DW, Ohtsuka M, Gurumurthy CB. 2015. Insertion of sequences at the original provirus integration site of mouse ROSA26 locus using the CRISPR/Cas9 system. *FEBS Open Bio*. 5: 7-191.
- 36- Miura H, Gurumurthy CB, Sato T, Sato M, Ohtsuka M. 2015. CRISPR/Cas9-based generation of knockdown mice by intronic insertion of artificial microRNA using longer single-stranded DNA. *Sci Rep*. 5: 1-12799.

فناوری ویرایش ژنومی در سیستم CRISPR/Cas

(چگونه کارایی Knock-In در سلول‌های تخم موش

افزایش میابد)

خلاصه

استفاده از خوشه‌های منظم میان پالیندروم‌های کوتاه تکراری (CRISPR) و RNA راهنما درون آنزیم نوکلئاز Cas9، به عنوان سیستم CRISPR/Cas شناخته می‌شود، که نشان‌دهنده پیشرفت عمده فناوری در علوم مهندسی ژنتیک می‌باشد. سیستم کریسپر قادر به ویرایش ژنومی از طریق ایجاد برش دورشته‌ای DNA و متعاقباً ترمیم توالی برش‌یافته از طریق مکانیسم اتصال پایانه‌های ناهمسان (NHEJ) یا اتصال همسان (HDR) می‌باشد. این سیستم به عنوان ابزار موثر برای ناک‌اوت (knockout) کردن ژن از طریق NHEJ کشف شده است، اما برای ویرایش دقیق توالی ژنوم به روش HDR ناکارآمد است. با وجود این، ویرایش ژن به وسیله HDR برای ناک‌اوت کردن ژن، انتقال ژن‌های گزارشگر و همچنین

القای جهش نقطه‌ای دقیق در موش ضروری است. مطالعات بسیاری در مورد شرایط آنزیم نوکلئاز Cas9 و RNA راهنما (gRNA) و همچنین روش‌های افزایش کارایی آن‌ها صورت گرفته است. در این بخش به مطالعه روش‌های مختلف افزایش کارایی ویرایش ژنومی در سلول تخم موش پرداخته است.

مقدمه

موش‌ها به دلیل قابلیت سهولت در اعمال تغییرات ژنتیکی بطور گسترده به عنوان مدل آزمایشگاهی پستانداران مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. روش‌های مرسوم هدف‌گیری ژنوم از طریق نوترکیبی همسان در سلول‌های بنیادی جنینی (ESC) موش‌ها و به دنبال آن تولید لاین‌های سلولی شیمر صورت می‌پذیرفت. با این حال، این فناوری‌ها در گونه‌های غیر از موش در دسترس نیستند. پیشرفت‌های اخیر در زمینه کشف آنزیم‌های اندونوکلئاز اختصاصی جهت برش انتخابی ژنوم گام‌های موثری در مهندسی ژنتیک بوده است، این فناوری‌ها شامل: ZFN، TALEN و CRISPR/Cas می‌باشند (۱، ۲، ۳). این فناوری‌ها تولید سریع ویرایش ژنومی را نه تنها در موش‌ها بلکه در گونه‌های دیگر نیز افزایش دادند. در گذشته، بیش از یک سال زمان برای بدست آوردن موش‌های دارای جهش هموزیگوت از طریق روش‌های مرسوم با استفاده از ESC‌ها به طول می‌انجامید اما در حال حاضر، موش‌های بنیان‌گذار (نسل اولیه F₀) را می‌توان در طی یک ماه با استفاده از این فناوری‌ها تولید نمود. به طور خاص، ساخت CRISPR/Cas بسیار ساده‌تر و ارزان‌تر از سایر آنزیم‌های اندونوکلئاز است که این ویژگی سبب محبوبیت این سیستم در اجرای پروژه‌های ویرایش ژنومی شده است.

سیستم CRISPR/Cas

سیستم CRISPR/Cas ابتدا به عنوان یک سیستم ایمنی اکتسابی در باکتری شناخته شد. این سیستم نیاز به آنزیم نوکلئاز Cas9 و دو RNA کوچک^۱ شامل: crRNA^۲، که

^۱ - Small RNA

^۲ - CRISPR RNA (crRNA)

کمپلکس Cas9 را به سمت توالی هدف هدایت می‌کند و tracrRNA^۱، که به crRNA متصل می‌شود و تولید RNA راهنما (gRNA)^۲ می‌کند. آنزیم نوکلئاز Cas9 و RNA راهنما تولید برش دورشته‌ای در توالی DNA^۳ می‌کند (۴). پس از برش توالی هدف توسط کمپلکس Cas9-gRNA توالی هدف بوسیله یکی از دو روش ترمیم می‌شوند، ۱- مکانیسم اتصال پایانه‌های ناهمسان (NHEJ) یا ۲- مکانیسم اتصال همسان (HDR) (۵، ۶، ۷، ۸). ترمیم برش ناشی از NHEJ، معمولاً به طور عمدی رخ می‌دهد و سبب القای Indel^۴ در جایگاه برش یافته می‌شود. این مکانیسم باعث تولید جهش تغییر چهارچوب^۵ و نهایتاً اختلال در عملکرد ژن می‌گردد. همچنین مکانیسم ترمیم HDR با درج یک توالی DNA تک‌رشته‌ای یا دورشته‌ای به درون ژنوم که با دو انتهای قطعه برش‌یافته همولوژی داشته باشند، صورت می‌گیرد.

در حال حاضر، مکانیسم ترمیم NHEJ جهت ناکاوت^۶ نمودن ژن بسیار پرکاربرد می‌باشد. به عنوان مثال ناکاوت ژن‌های کدکننده پروتئین ۲۰ تا ۶۰ درصد در سلول‌های تخم و سلول‌های بنیادی رویان موش مشاهده شده‌اند. در مقابل، القای دقیق جهش نقطه‌ای بوسیله مکانیسم ترمیم HDR هنوز از کارایی کافی برخوردار نمی‌باشد (۹، ۱۰). برای افزایش کارایی مکانیسم ویرایش ژنومی نیازمند فرآیند غربالگری لاین‌های سلولی تولید شده می‌باشد. بنابراین، این استراتژی به طور خیلی جزئی برای سلول‌های تخم کارایی دارد، زیرا تعداد سلول‌های تخم‌های در مقایسه با سلول‌های کشت شده بسیار محدوداند. بنابراین، افزایش کارایی ویرایش ژنومی در سلول‌های تخم، یک چالش عمدی باقی مانده است. در این بخش، ما بررسی مطالعاتی را پیگیری می‌کنیم که به دنبال افزایش کارایی ویرایش ژنومی، به ویژه از طریق مکانیسم ترمیم HDR است.

^۱- trans-activating crRNA (tracrRNA)

^۲- guide RNA

^۳- Double-Stranded Break (DSB)

^۴- Insertions or Deletions (Indel)

^۵- Frameshift Mutation

^۶- Knockout

سیستم انتقال Cas9 و gRNA

میکرواینجکشن روش متداولی برای انتقال ژن به سلول تخم جهت تولید موش‌های دستورزی شده به روش سیستم CRISPR/Cas می‌باشد. برای القای جهش به روش مکانیسم ترمیم NHEJ نیازمند انتقال دو ترکیب به سلول تخم می‌باشد که شامل: آنزیم نوکلئاز Cas9 و gRNA که بصورت مکمل با توالی DNA هدف طراحی شده‌اند. همچنین برای تولید موش‌های ناکاوت به روش HDR باید یک توالی DNA دهنده به سلول هدف انتقال یابد. از آنجا که بسیاری از وکتورهای بیانی را می‌توان به راحتی از کشت وسیع باکتری‌های دستورزی شده ژنتیکی تولید نمود، ساده‌ترین روش برای تولید موش‌های دستورزی شده، انتقال وکتورهای بیانی حاوی Cas9 و gRNA به هسته سلول هدف می‌باشد. امروزه، بسیاری از آزمایشگاه‌های بیولوژی روش‌های رایجی را برای تزریق DNA جهت تولید موش‌های تراریخته ایجاد کرده‌اند. با این حال، این روش تزریق، خطر ادغام وکتور با کروموزوم‌های غیرهدف را افزایش می‌دهد. ماشیکو و همکاران طی مطالعه‌ای گزارش نمودند که حدود ۴/۳ درصد از سلول‌های جهش‌یافته موش با روش DNA حلقوی، حاوی hCas9 بودند (۱۲، ۱۳). اگرچه این روش بازده کمتری نسبت به روش DNA خطی (۳۳/۴ درصد) نشان داد ولی یکپارچگی انتقال وکتورها به کروموزوم تا حدودی رخ داده است. بنابراین، تزریق RNA رونویسی شده یک روش جایگزین مناسبی است و این روش امروزه به طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد. با این حال، به دلیل عملکرد متفاوت Cas9 و gRNA در مکان‌های مختلف سلول مانند: سیتوپلاسم و هسته، این روش نیازمند بهینه‌سازی می‌باشد. هوری و همکاران، طی پژوهشی سه تکنیک انتقال ژن را مورد مقایسه قرار دادند: ۱- انتقال DNA حلقوی به هسته، ۲- انتقال به RNA هسته، ۳- انتقال به RNA سیتوپلاسم (۱۴). نتایج حاصل نشان داد که انتقال RNA به سیتوپلاسم، کارآمدترین روش از نظر کارایی در ناکاوت نمودن ژن و همچنین تولید تعداد بلاستوسیت و سلول‌های تخم است. اصولاً در تولید موش‌های ناکاوت شده بسیار حائز اهمیت است که DNA دهنده در کجای ژنوم قرار می‌گیرد. به طور کلی، موش‌های دستورزی شده به وسیله انتقال DNA به هسته تولید می‌شوند نه انتقال RNA به سیتوپلاسم. یانگ و همکاران

(۱۰) سه روش مختلف انتقال ژن را جهت بهینه‌سازی روش HDR برای سیستم CRISPR/Cas، مورد بررسی قرار دادند که شامل: ۱- انتقال همزمان RNA و DNA دهنده به سیتوپلاسم، ۲- انتقال همزمان RNA و DNA دهنده به هسته، ۳- انتقال DNA به هسته ۲ ساعت پس از انتقال RNA به سیتوپلاسم. نتایج حاصل از مقایسات نشان دادند، انتقال همزمان تمام اجزا به داخل سیتوپلاسم، توانست ۹ تا ۱۹ درصد از بلاستوسیت‌ها را مورد هدف قرار دهد. بنابراین، حتی اگر DNA دهنده در ابتدا به داخل سیتوپلاسم منتقل شده باشد، می‌تواند به درون هسته نیز منتقل شود. به همین ترتیب، انتقال همزمان تمام اجزا به درون هسته، ۱۸ تا ۲۹ درصد از بلاستوسیت‌های مدنظر را هدف قرار دادند. اما، روش دو مرحله‌ای توانست حداکثر ۳ درصد از بلاستوسیت‌ها را دست‌ورزی نماید. این نتایج نشان می‌دهد که تزریق همزمان RNA و DNA به سیتوپلاسم یا هسته، کارآمدترین روش برای رسیدن به هدف است. علاوه بر این، بعضی گروه‌های تحقیقاتی نیز گزارش کردند که انتقال همزمان RNA و DNA به هسته و سیتوپلاسم سلول‌های تخم منجر به تولید نسبتاً بالایی از جنین‌های هدفمند می‌شود (۱۵، ۱۸). همچنین موش‌های دست‌ورزی شده ژنی می‌توانند به جای تولید آنزیم Cas9 به شکل mRNA بوسیله انتقال مستقیم پروتئین Cas9 تولید شوند. اخیراً مطالعه‌ای انجام شد که نشان داد تولید آنزیم Cas9 به شکل کمپلکس تلفیقی پروتئین-gRNA می‌تواند کارایی بالایی را در دست‌ورزی موش‌های ناکاوت به روش ترمیم NHEJ نشان دهد (۱۹). مطالعات نشان داده است که عملکرد آلل‌های جهش‌یافته به میزان دوز انتقالی به جایگاه هدف بستگی دارد، به این صورت که بالاترین دوز ۸۸ درصد و پایین‌ترین دوز ۷۱ درصد به ترتیب مربوط به انتقال ژن به هسته و سیتوپلاسم می‌باشد. آیدا و همکارانش گزارش دادند که آنزیم Cas9 به شکل پروتئین نیز می‌تواند برای تولید موش‌های ناکاین گزارشگر^۱ مفید باشد (۲۰). در ابتدا، آن‌ها تلاش کردند موش‌های ناکاین را با انتقال مستقیم کمپلکس تلفیقی پروتئین-gRNA به هسته تولید کنند. با این حال، آن‌ها نتوانستند با موفقیت همه موش‌ها را دست‌ورزی نمایند. در

^۱ Reporter Knock-in Mice

ادامه آن‌ها سعی نمودند به روش میکروآی‌ن‌جکشن پروتئین Cas9 را با کمپلکس crRNA و tracrRNA به جای gRNA انتقال دهند، که منجر به انتقال هدفمند ژن با عملکرد حدود ۴۵/۵ درصد شدند. اگرچه هنوز کاملاً روشن نیست که چرا کمپلکس crRNA-tracrRNA عملکرد بهتری نسبت به gRNA دارد.

فوجی و همکاران طی پژوهشی کارایی انواع مختلف gRNA (توالی‌های کوتاه و بلند) را برای تولید موش‌های ناک‌اوت به روش NHEJ مقایسه کردند (۲۱). نوع کوتاه این gRNA حدود ۴۰ نوکلئوتید و نوع بلند آن ۸۰ نوکلئوتید طول دارد. نتایج این پژوهش نشان داد کارایی ویرایش ژنومی جهت انتقال ژن به سلول تخم با gRNA بلند بسیار بیشتر از gRNA کوتاه است (۲۲). علاوه بر میکروآی‌ن‌جکشن، روش الکتروپوریشن نیز توانایی انتقال موثر ژن به سلول‌های تخم موش را دارد. روش میکروآی‌ن‌جکشن جهت دست‌ورزی در مقیاس بزرگ بسیار زمان‌بر و نیازمند مهارت‌های ویژه است، در حالی که، روش انتقال ژن بوسیله الکتروپوریشن بسیار ساده و قابل استفاده برای افراد آماتور می‌باشد. علاوه بر این، دو دانشمند به نام هاشیموتو و تاکیموتو با استفاده از روش HDR و انتقال ssODN به سلول هدف، توانستند ریکامبیناز *loxP* را در جایگاه هدف در ۳۶/۴ درصد از جنین موش‌ها انتقال دهند (۲۳).

الیگونوکلئوتیدهای تک‌رشته‌ای (ssODN) و دورشته‌ای (dsODN) به عنوان رشته‌های الگو

امروزه مطالعات بسیاری در زمینه موفقیت در تولید موش‌های دست‌ورزی شده با استفاده از الیگونوکلئوتیدهای تک‌رشته‌ای (ssODN)^۱ به عنوان الگو به ثبت رسیده است (جدول ۱) در حالی که، موفقیت در روش الیگونوکلئوتیدهای دورشته‌ای (dsODN)^۲ به ندرت حاصل گشته است (جدول ۲). در مقایسه این دو توالی می‌توان اشاره نمود که قالب ssODN دارای بازوهای کوتاه همسان^۳ است و با راندمان بسیار بالایی در محل هدف درج می‌گردد در حالی

^۱- single-stranded Oligo-DNA (ssODN)

^۲- double-stranded Oligo-DNA (dsODN)

^۳- Small Homology Arms

که قالب dsODN دارای بازوهای همسان بلند است و این عامل سبب کاهش کارایی آن شده است (۱۸، ۲۵). با ظهور اپی-توپ‌های^۱ کوچک (V5، HA، یا FLAG) و یا ریکامبینازهای *loxP* آن‌ها نیازمند به ssODN‌هایی دارای بازوهای همسان به طول ۴۰-۶۰ جفت‌بازی بودند. در مقابل، در بسیاری از موارد برای اپی-توپ‌های بزرگتر یا نشانگرهای فلورسنت (GFP، mCherry، GST) الیگونوکلوئوتیدهای dsODN با طول بازوی ۱ تا ۳ کیلوباز مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۶، ۲۸).

با توجه به محدودیت ssODN‌ها به دلیل درج توالی‌های کوتاه، از dsODN برای انتقال توالی‌های باند استفاده می‌شود. حداکثر طول سنتز شده تجاری در ssODN‌ها حدود ۲۰۰ نوکلئوتید می‌باشد. میورا و همکاران یک روش دو مرحله‌ای برای سنتز مولکول‌های ssODN با طول بلندتر (حدود ۵۱۴ جفت‌باز) ابداع نمودند که به طور قابل توجهی جهت ناک‌این نمودن موجودات به روش CRISPR/Cas مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۶). در این سیستم، RNA ابتدا از قالب DNA ساخته، و سپس نسخه‌برداری معکوس RNA^۲ برای تولید ssODN انجام شد. با استفاده از این روش، آن‌ها نشان دادند که کاست ژن‌های میکروآرنا مصنوعی (amiRNA)^۳ در مقابل eGFP خارجی یا Otx2 اندوژنیک داخلی^۴ می‌توانند به طور موثر به یک محل دقیق (دقت درج بین ۴۴/۴ تا ۸۳/۳ درصد) درج گردد.

مولکول‌هایی که کارایی HDR را افزایش می‌دهند

بر اساس مطالعات صورت گرفته، راندمان ناک‌اوت نمودن ژن از طریق NHEJ و ناک‌این نمودن ژن از طریق HDR، تفاوت قابل توجهی را نشان نمی‌دهند (جداول ۱ و ۲). با وجود این، کارایی حقیقی ویرایش ژنومی به روش HDR کمتر از NHEJ است زیرا، HDR در حال رقابت با NHEJ می‌باشد. به عنوان مثال در طی آزمایشات انجام شده بر روی یک

^۱- Epitope Tags

^۲- RNA Reverse Transcription

^۳- artificial microRNA (amiRNA)

^۴- Endogenous Orthodenticle Homeobox 2 (Otx2)

نمونه خاص نشان داد که کارایی NHEJ ۱۰۰ درصد بود، اما کارایی HDR در حدود ۳۰ درصد. بنابراین، مهار NHEJ یا ارتقا HDR برای افزایش کارایی HDR ضروری است. تحقیقات اخیر نشان داد که یک آنزیم به نام SCR7 سبب افزایش کارایی HDR از لحاظ میزان هزینه نسبت به NHEJ شد. به طور خاص، مکانیسم ترمیم NHEJ به دو زیر کلاس تقسیم می شود: ۱- NHEJ وابسته به KU و DNA لیگاز IV^۱ یا NHEJ کانونیکال (C-NHEJ)^۲، ۲- NHEJ جایگزین وابسته به DNA لیگاز I یا III (a-EJ یا alt-NHEJ)^۳ (SCR7). SCR7 یک آنزیم مهارکننده DNA لیگاز IV، در مسیر C-NHEJ است. در حقیقت، SCR7 باعث افزایش کارایی ویرایش ژنومی به روش HDR به میزان ده برابر (از ۵/۸ به ۵۶/۲ درصد) در نتاج می شود (۱۸). مارویاما و همکاران گزارش دادند که استفاده از آنزیم مهارکننده SCR7 سبب افزایش کارایی مکانیسم HDR تا ۱۹ برابر در چهار ژن (*Kell*, *Sgms2*, *Os9*, *Igkc*) موش می شود (۲۷).

جدول ۱- میزان کارایی ناکاین نمودن ژن در موش با استفاده از ssODN به عنوان DNA دهنده

منبع	میزان کارایی ناکاین	مرحله سلولی	روش انتقالی	gRNA	Cas9	ژن هدف	DNA دهنده
۹	٪ ۶۶/۷	بلاستوسیت	سیتوپلاسمی	gRNA	mRNA	<i>Tet1</i>	LoxP
۱۰	٪ ۶۰	بلاستوسیت	سیتوپلاسمی	gRNA	mRNA	<i>Tet2</i>	LoxP
۱۰	٪ ۷/۱	بلاستوسیت	سیتوپلاسمی	gRNA	mRNA	<i>Tet1</i> , <i>Tet2</i>	LoxP (<i>Tet1</i> , <i>Tet2</i>)
۲۸	٪ ۳۴/۳	پست ناتال	سیتوپلاسمی	gRNA	mRNA	<i>Sox2</i>	V5 tag
۲۸	٪ ۱۶/۳	پست ناتال	سیتوپلاسمی	gRNA x2	mRNA	<i>Mecp2</i>	LoxP (Left, Right)

¹- KU- and DNA ligase IV-dependent

²- Canonical (C-NHEJ)

³- DNA ligase I- or ligase III-dependent alternative end-joining (a-EJ or alt-NHEJ)

۲۶	٪ ۴۶	پست ناتال	سیتوپلاسمی	gRNA	mRNA	<i>Crygc</i>	<i>Crygc</i>
۱۸	٪ ۲۵/۵	پست ناتال	سیتوپلاسمی	gRNA x2	D10A, mRNA	<i>Hprt</i>	FLAG- tag
۱۸	٪ ۱۷/۲	پست ناتال	هسته‌ای	gRNA	mRNA	<i>Dmd</i>	<i>Dmd</i>
۲۷	٪ ۲۵/۹	پست ناتال	هسته‌ای و سیتوپلاسمی	gRNA	mRNA	<i>Tex15</i>	جهش نقطه‌ای به TA (CG)
۲۷	٪ ۸۰	پست ناتال	هسته‌ای	gRNA	mRNA	<i>Cdk2</i>	جهش خاموش
۲۷	٪ ۳/۴	پست ناتال	سیتوپلاسمی	gRNA	mRNA	<i>Kell</i>	LPETG
۲۷	٪ ۶/۹	جنین (E10)	سیتوپلاسمی	gRNA	mRNA	<i>Igkc</i>	LPETG
۲۷	٪ ۲۵	جنین (E10)	سیتوپلاسمی	gRNA	mRNA	<i>Os9</i>	کدون ختم
۱۶	٪ ۳۶/۸	جنین (E13.5)	هسته‌ای و سیتوپلاسمی	gRNA	mRNA	<i>EGFP</i>	amiR- EGFP
۱۶	٪ ۸۳/۳	جنین (E14.5)	هسته‌ای و سیتوپلاسمی	gRNA	mRNA	<i>eEF2</i>	amiR- Otx
۱۶	٪ ۶۶/۷	جنین (E14.5)	هسته‌ای و سیتوپلاسمی	gRNA	mRNA	<i>EGFP</i>	loxP- amiR- EGFP- loxP
۲۳	٪ ۳۶/۴	جنین (E9)	الکتروپوریشن	gRNA	mRNA	<i>mCherry</i>	loxP

جدول ۲- میزان کارایی ناکاین نمودن ژن در موش با استفاده از dsDNA به عنوان DNA دهنده

منبع	میزان کارایی ناکاین	مرحله سلولی	روش انتقالی	gRNA	Cas9	ژن هدف	DNA دهنده
۱۰	٪ ۸/۱	پست ناتال	سیتوپلاسمی	gRNA	mRNA	<i>Nanog</i>	mCherry
۱۰	٪ ۳۰	پست ناتال	سیتوپلاسمی	gRNA	mRNA	<i>Oct4</i>	GFP
۱۷	٪ ۵۷	بلاستوسیت	هسته‌ای و سیتوپلاسمی	gRNA	mRNA	<i>Ramp2</i>	PGK EGFP pA
۱۵	٪ ۷/۷	پست ناتال	هسته‌ای و سیتوپلاسمی	gRNA x2	D10A, mRNA	<i>Ispd</i>	Ispd flox
۲۰	٪ ۴۵/۵	پست ناتال	هسته‌ای	crRNA: tracrRNA	Protein	<i>Actb</i>	TetO- FLEX - EGFP- polyA
۲۷	٪ ۱۲/۵	جنین (E10)	سیتوپلاسمی	gRNA	mRNA	<i>Sgms2</i>	Stop cassette

برای افزایش فرکانس مکانیسم HDR، چو و همکارانش با استفاده از تکنیک خاموشی ژن برای سرکوب مولکول‌های کلیدی KU70 و DNA لیگاز IV استفاده کردند، و در نتیجه، کارایی HDR را تا ۴/۵ برابر افزایش دادند. آن‌ها همچنین نشان دادند که بیان

همهانگ پروتئین‌های E1B55K (Ad4) و E4orf6، که سبب برش یوبی کوئیتیناسیون^۱ و پروتئوزومال^۲ آنزیم DNA لیگاز IV می‌شود، کارایی HDR را تا هشت برابر در سلول‌های انسان و موش افزایش می‌دهد.

یو و همکارانش یک روش غربال‌گری مبتنی بر گزارشگر^۳ برای شناسایی ترکیبات شیمیایی با توان بالا که کارایی ویرایش ژنومی از روش HDR را افزایش دهد، توسعه دادند (۳۲). با استفاده از این روش غربال‌گری، آن‌ها دو مولکول کوچک با نام L755507 و Brefeldin A را شناسایی کردند که می‌توانند کارایی HDR را برای درج قطعات بزرگ و القای جهش نقطه‌ای به ترتیب ۳ و ۹ برابر افزایش دهند. آن‌ها همچنین مولکول‌های کوچکی با نام آزیدوتیمیدین (AZT)^۴ و تری‌فلوریدین (TFT)^۵ را یافتند که کارایی HDR را کاهش می‌دهند. بجز آنزیم مهارکننده SCR7، این مولکول‌ها در سلول‌های تخم‌مورد آزمایش قرار نگرفته‌اند اما می‌توان از آن‌ها برای افزایش فرکانس HDR بکار گرفته شوند. سایر مولکول‌های کوچک نیز می‌توانند به طور موثر سبب فعال یا غیرفعال نمودن برخی مسیرهای ترمیم DNA گردند، اما تاکنون در سیستم CRISPR/Cas مورد استفاده قرار نگرفته‌اند. همچنین از این مولکول‌های کوچک می‌توان برای تنظیم ویرایش ژنومی به روش CRISPR و ترمیم DNA از طریق مسیر HDR استفاده نمود. از سوی دیگر، تابش نور با دوز کم^۶ سبب افزایش دقت هدف‌گیری ژن در سلول‌های بنیادی پلورپوتنت انسانی^۷ می‌شود (۳۵). هاتادا و همکارانش گزارش دادند که تابش نور با دوز کم با استفاده از اشعه‌ی گاما (γ) یا اشعه ایکس (X)، کارایی CRISPR/Cas را به روش HDR به طور قابل توجهی افزایش داد، احتمالاً از طریق القا ماشین ترمیم DNA مانند: آتاکسی-تلانژکتازی

¹- Ubiquitination

²- Proteasomal

³- Reporter-Based Screening Approach

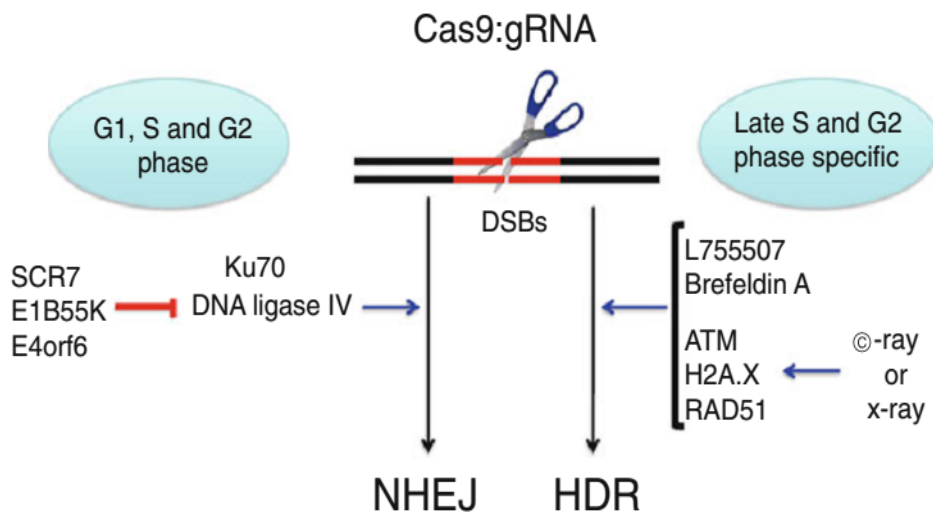
⁴- Azidothymidine (AZT)

⁵- Trifluridine (TFT)

⁶- Low-Dose Irradiation

⁷- Human Pluripotent Stem Cells

جهش یافته (ATM)^۱، هیستون H2A.X و پروتئین RAD51. در شکل ۱ مولکول‌هایی را که سبب افزایش کارایی HDR می‌شود را بطور خلاصه بیان نموده است.



شکل ۱- مولکول‌های تنظیم‌کننده کارایی مکانیسم ترمیم HDR و NHEJ

چرخه سلولی

مکانیسم ترمیم DNA به روش NHEJ در طول مرحله اینترفاز G₁، S و G₂ انجام شده، در حالی که مکانیسم ترمیم HDR محدود به اواخر فاز S و G₂ است یعنی زمانی که همانندسازی DNA تکمیل شده و کروماتیدهای خواهر به عنوان قالب ترمیم در دسترس باشند (۳۶). با این حال، کمپلکس Cas9-gRNA معمولاً به سلول‌های ناهمسان و تخم^۲ وارد می‌شود. لین و همکاران بررسی کارایی HDR را مربوط به هر مرحله از چرخه سلولی با استفاده از سلول‌های همسان^۳ مورد بررسی قرار دادند (۳۷). فراوانی مکانیسم ترمیم HDR به طور چشم‌گیری تا حدود بیش از ۳۸ درصد، در آزمایشات مربوط به سلول‌های ناهمسان

¹- Ataxia-Telangiectasia Mutated (ATM)

²- Unsynchronized Cells and Zygotes

³- Synchronized Cells

HEK293T افزایش یافت. به ویژه، تیمار سلول‌ها با ماده شیمیایی نوکودازول^۱، که سبب بلوکه نمودن سلول‌ها در فاز M شده و نهایتاً افزایش کارایی HDR را به همراه دارد. از سوی دیگر همسان‌سازی سلول‌های تخم‌هنوز گزارش نشده است. سلول‌های تخم‌در مرحله پیش‌هسته‌ای^۲ با توجه به اندازه پیش‌هسته و محل آن‌ها در سیتوپلاسم به پنج مرحله (PN1-PN5) تقسیم می‌شوند (۳۸). معمولاً Cas9 و gRNA در خلال مرحله PN3 تا PN5 (مرحله S تا G₂) به روش میکرواینجکشن به هسته یا سیتوپلاسم تزریق می‌شوند. بنابراین، چرخه سلولی تخم‌ها می‌تواند تقریباً برای ناک‌این نمودن ژن به روش HDR مناسب باشد.

چشم‌انداز آینده

ویرایش ژنومی به روش HDR برای ناک‌اوت نمودن ژن، انتقال ژن‌های گزارشگر و جهش‌های نقطه‌ای دقیق در حیوانات آزمایشگاهی بکار گرفته شدند. علاوه بر این، مطالعات انجام شده بر روی موش‌های آزمایشگاهی نشان داده است که سیستم ویرایش ژنومی CRISPR/Cas می‌تواند بیماری‌های ناشی از جهش‌ها را اصلاح کند (۲۸، ۳۹). با این حال، هدف نهایی اصلاح ژن، استفاده از آن درمان بیماری‌های انسان است. اخیراً تحقیقاتی مبنی بر اصلاح دقیق ژن‌های جهش‌یافته در سلول‌های بنیادی القا شده پلورپوتنت انسان (iPSC)^۳ صورت پذیرفته است (۴۰، ۴۴). پیشنهاد می‌شود که ژن مهار شده توسط HDR با مکانیسم ویرایش ژنومی CRISPR/Cas برای ژن درمانی موثر باشد. لیانگ و همکاران طی پژوهشی اصلاح ژن به روش CRISPR/Cas را در سلول‌های تخم‌پیش‌هسته گزارش نمودند (۴۵). به طور خاص، آن‌ها دریافتند که کارایی مکانیسم ترمیم HDR در ژن بتاگلوبین (HBB)^۴ انسان پایین است، زیرا مکانیسم ویرایش CRISPR/Cas به طور موثری ژن HBB را تجزیه می‌کند. همچنین، برش‌های غیرهدف و موزائیسیم در جنین‌ها نیز اصلاح

¹- Nocodazole

²- Pronuclear Stage

³- Human-induced Pluripotent Stem Cells (iPSC)

⁴- Human β -globin (HBB)

شدند. بنابراین اصلاح ژن سلول‌های تخم انسان نیازمند بهبود بیشتر سیستم CRISPR/Cas می‌باشد.

نتیجه‌گیری

در این بخش روش‌ها و مولکول‌های مختلفی جهت افزایش کارایی HDR معرفی شدند. بسیاری از مولکول‌ها می‌توانند کارایی مکانیسم ترمیم HDR را در سلول‌های کشت شده افزایش دهند اما اکثر آن‌ها در سلول تخم مورد بررسی قرار نگرفته‌اند. در آینده، ترکیبی از این مولکول‌ها با روش‌های بهینه شده می‌توانند کارایی ناکاوت نمودن ژن را با روش HDR افزایش دهند.

منابع

- 1- Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. 1996. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Nat Acad Sci USA*. 93(3): 60-1156.
- 2- Miller JC, Tan S, Qiao G, Barlow KA, Wang J, Xia DF, Meng X, Paschon DE, Leung E, Hinkley SJ, Dulay GP, Hua KL, Ankoudinova I, Cost GJ, Urnov FD, Zhang HS, Holmes MC, Zhang L, Gregory PD, Rebar EJ. 2011. TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol*. 29(2): 8-143.
- 3- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. 2012. A programmable dual- RNA- guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 337(6096): 21-816.
- 4- Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirzada ZA, Eckert MR, Vogel J, Charpentier E. 2011. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*. 471(7340): 7-602.
- 5- Barnes DE. 2001. Non-homologous end joining as a mechanism of DNA repair. *Curr Biol*. 11(12): 7- 455.
- 6- Lieber MR. 2010. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem*. 79: 181-211.
- 7- Van den Bosch M, Lohman PH, Pastink A. 2002. DNA double-strand break repair by homologous recombination. *Biol Chem*. 383(6): 92-873.
- 8- Wyman C, Kanaar R. 2006. DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annu Rev Genet*. 40: 83-363.
- 9- Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, Jaenisch R. 2013. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*. 153(4): 8-910.
- 10- Yang H, Wang H, Shivalila CS, Cheng AW, Shi L, Jaenisch R. 2013. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*. 154(6): 9-1370.

- 11- Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. 2013. RNA- guided human genome engineering via Cas9. *Science*. 339(6121): 6-823.
- 12- Mashiko D, Young SA, Muto M, Kato H, Nozawa K, Ogawa M, Noda T, Kim YJ, Satouh Y, Fujihara Y, Ikawa M. 2014. Feasibility for a large scale mouse mutagenesis by injecting CRISPR/Cas plasmid into zygotes. *Dev Growth Differ*. 56(1): 9-122.
- 13- Mashiko D, Fujihara Y, Satouh Y, Miyata H, Isotani A, Ikawa M. 2013. Generation of mutant mice by pronuclear injection of circular plasmid expressing Cas9 and single guided RNA. *Sci Rep*. 3: 1-3355.
- 14- Horii T, Arai Y, Yamazaki M, Morita S, Kimura M, Itoh M, Abe Y, Hatada I. 2014. Validation of microinjection methods for generating knockout mice by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Sci Rep*. 4: 1-4513.
- 15- Lee AY, Lloyd KC. 2014. Conditional targeting of Ispd using paired Cas9 nickase and a single DNA template in mice. *FEBS Open Bio*. 4: 42-637.
- 16- Miura H, Gurusurthy CB, Sato T, Sato M, Ohtsuka M. 2015. CRISPR/Cas9-based generation of knockdown mice by intronic insertion of artificial microRNA using longer single-stranded DNA. *Sci Rep*. 5: 1-12799.
- 17- Sakurai T, Watanabe S, Kamiyoshi A, Sato M, Shindo T. 2014. A single blastocyst assay optimized for detecting CRISPR/Cas9 system-induced indel mutations in mice. *BMC Biotechnol*. 14: 1-69.
- 18- Singh P, Schimenti JC, Bolcun-Filas E. 2015. A mouse geneticist's practical guide to CRISPR applications. *Genetics*. 199(1): 1-15.
- 19- Sung YH, Kim JM, Kim HT, Lee J, Jeon J, Jin Y, Choi JH, Ban YH, Ha SJ, Kim CH, Lee HW, Kim JS. 2014. Highly efficient gene knockout in mice and zebrafish with RNA-guided endonucleases. *Genome Res*. 24(1): 31-125.

- 20- Aida T, Chiyo K, Usami T, Ishikubo H, Imahashi R, Wada Y, Tanaka KF, Sakuma T, Yamamoto T, Tanaka K. 2015. Cloning-free CRISPR/Cas system facilitates functional cassette knock-in in mice. *Genome Biol.* 16: 1-87.
- 21- Fujii W, Kawasaki K, Sugiura K, Naito K. 2013. Efficient generation of large-scale genome-modified mice using gRNA and CAS9 endonuclease. *Nucleic Acids Res.* 41(20): 1-187.
- 22- Shen B, Zhang J, Wu H, Wang J, Ma K, Li Z, Zhang X, Zhang P, Huang X. 2013. Generation of gene- modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting. *Cell Res.* 23(5): 3-720.
- 23- Hashimoto M, Takemoto T. 2015. Electroporation enables the efficient mRNA delivery into the mouse zygotes and facilitates CRISPR/Cas9-based genome editing. *Sci Rep.* 5: 1-11315.
- 24- Kaneko T, Sakuma T, Yamamoto T, Mashimo T. 2014. Simple knockout by electroporation of engineered endonucleases into intact rat embryos. *Sci Rep.* 4: 1-6382.
- 25- Yang H, Wang H, Jaenisch R. 2014. Generating genetically modified mice using CRISPR/Cas- mediated genome engineering. *Nat Protoc.* 9(8): 68-1956.
- 26- Fujii W, Onuma A, Sugiura K, Naito K. 2014. Efficient generation of genome-modified mice via offset-nicking by CRISPR/Cas system. *Biochem Biophys Res Commun.* 445(4): 4-791.
- 27- Maruyama T, Dougan SK, Truttmann MC, Bilate AM, Ingram JR, Ploegh HL. 2015. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nat Biotechnol.* 33(5): 42-538.
- 28- Wu Y, Liang D, Wang Y, Bai M, Tang W, Bao S, Yan Z, Li D, Li J. 2013. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell.* 13(6): 62-659.
- 29- Chu VT, 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. *Nat Biotechnol.* 33(5): 8-543.

- 30- Srivastava M, Nambiar M, Sharma S, Karki SS, Goldsmith G, Hegde M, Kumar S, Pandey M, Singh RK, Ray P, Natarajan R, Kelkar M, De A, Choudhary B, Raghavan SC. 2012. An inhibitor of nonhomologous end-joining abrogates double-strand break repair and impedes cancer progression. *Cell*. 151(7): 87-1474.
- 31- Bétermier M, Bertrand P, Lopez BS. 2014. is non-homologous end-joining really an inherently error- prone process. *PLoS Genet*. 10(1): e1004086.
- 32- Yu C, Liu Y, Ma T, Liu K, Xu S, Zhang Y, Liu H, La Russa M, Xie M, Ding S, Qi LS. 2015. Small molecules enhance CRISPR genome editing in pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 16(2): 142-733.
- 33- Hollick JJ, Golding BT, Hardcastle IR, Martin N, Richardson C, Rigoreau LJ, Smith GC, Griffin RJ. 2003. 2,6-Disubstituted pyran-4-one and thiopyran-4-one inhibitors of DNA-dependent protein kinase (DNA-PK). *Bioorg Med Chem Lett*. 13(18): 6-3083.
- 34- Rahman SH, Bobis-Wozowicz S, Chatterjee D, Gellhaus K, Pars K, Heilbronn R, Jacobs R, Cathomen T. 2013. The nontoxic cell cycle modulator indirubin augments transduction of adeno-associated viral vectors and zinc-finger nuclease-mediated gene targeting. *Hum Gene Ther*. 24(1): 67-77.
- 35- Hatada S, Subramanian A, Mandefro B, Ren S, Kim HW, Tang J, Funari V, Baloh RH, Sareen D, Arumugaswami V, Svendsen CN. 2015. Low-dose irradiation enhances gene targeting in human pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med*. 4(9): 998-1010.
- 36- Heyer WD, Ehmsen KT, Liu J. 2010. Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu Rev Genet*. 44: 39-113.
- 37- Lin S, Stahl BT, Alla RK, Doudna JA. 2014. Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. *elife*. 3: e04766.
- 38- Adenot PG, Mercier Y, Renard JP, Thompson EM. 1997. Differential H4 acetylation of paternal and maternal chromatin precedes DNA replication and differential transcriptional activity in

- pronuclei of 1-cell mouse embryos. *Development*. 124(22): 25-4615.
- 39- Yoshimi K, Kaneko T, Voigt B, Mashimo T. 2014. Allele-specific genome editing and correction of disease-associated phenotypes in rats using the CRISPR-Cas platform. *Nat Commun*. 5: 1-4240.
- 40- Huang X, Wang Y, Yan W, Smith C, Ye Z, Wang J, Gao Y, Mendelsohn L, Cheng L. 2015. Production of gene-corrected adult beta globin protein in human erythrocytes differentiated from patient iPSCs after genome editing of the sickle point mutation. *Stem Cells*. 33(5): 9-1470.
- 41- Li HL, Fujimoto N, Sasakawa N, Shirai S, Ohkame T, Sakuma T, Tanaka M, Amano N, Watanabe A, Sakurai H, Yamamoto T, Yamanaka S, 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 Rep*. 4(1): 54-143.
- 42- Ousterout DG, Kabadi AM, Thakore PI, Majoros WH, Reddy TE, Gersbach CA. 2015. Multiplex CRISPR/Cas9-based genome editing for correction of dystrophin mutations that cause Duchenne muscular dystrophy. *Nat Commun*. 6: 1-6244.
- 43- Song B, Fan Y, He W, Zhu D, Niu X, Wang D, Ou Z, Luo M, Sun X. 2015. Improved hematopoietic differentiation efficiency of gene-corrected beta-thalassemia induced pluripotent stem cells by CRISPR/Cas9 system. *Stem Cells Dev*. 24(9): 65-1053.
- 44- Xie F, Ye L, Chang JC, Beyer AI, Wang J, Muench MO, Kan YW. 2014. Seamless gene correction of β -thalassemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and piggyBac. *Genome Res*. 24(9): 33-1526.
- 45- Liang P, Xu Y, Zhang X, Ding C, Huang R, Zhang Z, Lv J, Xie X, Chen Y, Li Y, Sun Y, Bai Y, Songyang Z, Ma W, Zhou C, Huang J. 2015. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripnuclear zygotes. *Protein Cell*. 6(5): 72-363.

تولید سلول‌های بنیادی گزارشگر

چکیده

سلول‌های بنیادی پلوریپوتنت و قابلیت‌های آن‌ها برای تشکیل هر نوع سلول در بدن انسان، به محققین اجازه داده است تا از آن‌ها به عنوان ابزار تحقیق برای کاربرد در غربال‌گری دارو، تحقیقات نمو پایه، و کاربردهای درمانی بالقوه استفاده کنند. یک فاکتور اساسی در زیست‌شناسی سلول‌های بنیادی، تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های بالغ، اختصاصی و عملکردی است. سلول‌های بنیادی گزارشگر مدل‌های ارزشمندی هستند که وقوع غیرمهاجم، پایش به صورت زنده و بیان در حالت اختصاصی سلول را ممکن می‌کنند. روش‌های مختلفی طراحی شده است تا چنین لاین‌های سلولی را بر اساس بیان گزارشگر مشتق شده از پروموتور استخراج کنیم. یک روش جهت بیان تنظیم شده با اضافه نمودن گزارشگر در جایگاه پروموتور داخلی به دست آمد که به دلیل دشواری فنی کمتر استفاده شد ولی پیشرفت‌های جدید در فناوری‌های ویرایش ژنوم این موانع برای ایجاد لاین‌های

گزارشگر کاهش داده است. این فصل مروری بر روش‌شناسی و کاربردهای بالقوه لاین‌های سلول بنیادی گزارشگر فراهم کرده است.

مقدمه

سلول‌های بنیادی پلورپوتنت انسان (PSCs)^۱، مانند سلول‌های بنیادی جنین (hESC)^۲ و سلول‌های بنیادی پلورپوتنت القا شده (iPSC)^۳ امید بزرگی در جهان امروز پزشکی اصلاحی ایجاد کرده است. توانایی آن‌ها برای بازسازی و تمایز به هر سلول اختصاصی در بدن به محققین در زمینه پزشکی زیستی ابزار خاصی را داده است که تحقیق خودشان را به کلینیک انتقال دهند. PSCs این پتانسیل را دارند که در انواع رویه‌های تحقیقاتی مختلف استفاده شوند: از اندام در حال رشد تا حفاظت از حیوانات در معرض خطر، یا به عنوان سلول درمانی برای جایگزینی سلول‌های مرده یا در حال مرگ. ولی یکی از مفیدترین و امیدبخش‌ترین استفاده‌های PSCs در توانایی آن‌ها برای ایجاد مدل‌های سلول انسان به صورت آزمایشگاهی (*in vitro*) است.

یک معضل مهم در درک کامل پتانسیل سلول‌های بنیادی پلورپوتنت، فقدان روش محکمی برای پیگیری و پایش رفتار سلول است. در دسترس بودن سلول‌های بنیادی تغییر یافته پایدار که گزارشگرهای اختصاصی را قابل رویت کنند، یک ابزار ایده‌آل برای پیگیری و پایش سلول‌ها را ارائه می‌دهد. چنین لاین‌های گزارشگری وقتی که سلول‌ها از حالت پلورپوتنت به حالت تمایز یافته تبدیل می‌شوند مشاهده ژن گزارشگر استفاده شده را، تسهیل می‌کنند. این لاین‌های سلولی روش‌های بصری برای تشخیص تمایز را ممکن می‌کند که می‌توانیم رفتارهای مختلف سلول را در حالت طبیعی و بیمار بررسی کنیم.

طبق روش مرسوم، سازه‌های گزارشگر از گزارشگرهای کوتاه، اختصاصی و مشتق از پروموترهایی مانند ژن‌های فلورسنت یا نشانگرهای انتخابی دارویی تشکیل شده‌اند و با استفاده از روش‌های تصادفی منتقل شده‌اند. امروزه در اندیشه ساخت سازه‌های بزرگی

¹- Human Pluripotent Stem Cells (PSCs)

²- Embryonic Stem Cells (hESC)

³- induced Pluripotent Stem Cells (iPSC)

هستیم که عناصر تنظیمی بزرگ را حمل می‌کنند. روش‌های ویرایش ژنوم از طریق نوترکیبی همسان (HR)^۱ استفاده شده است تا مدل‌های بیماری را از طریق هدف‌گیری و تغییر ژن ایجاد کنیم. این روش‌ها همچنین ورود هدف‌گیری شده گزارشگر را در نواحی پروموتری ممکن می‌سازند در صورتی که فقط در حالت اختصاصی بیان می‌شوند مانند بیان در سلول تمایز یافته. این فصل روش‌های استفاده شده برای تولید لاین‌های سلول بنیادی پلوریپونتت گزارشگر را بررسی می‌کند.

لاین‌های پلوریپونتت ژن گزارشگر به عنوان مدل‌های سلولی

روش‌های رنگ‌آمیزی آنتی‌بادی یا واکنش زنجیره‌ای پلیمرز-نسخه‌برداری معکوس (RT-PCR)^۲ که برای آنتی‌ژن یا نشانگرهای ژن اختصاصی تولید شده بودند، ردیابی نوع سلول خاص را در مخلوط ناهمسان فراهم می‌کردند. اما این روش‌ها به تعداد زیادی سلول نیاز داشتند و عموماً سنجش‌هایی بودند که اجازه غربال‌گری سلول‌ها در زمان واقعی^۳ را نمی‌داند.

گزارشگرهای ژن یک ابزار آزمایشگاهی ارزشمند هستند که پایش سلول زنده و هدف‌گیری سلول مورد نظر را تسهیل می‌کنند. لاین‌های گزارشگرهای با استفاده از سیستم‌های گزارشگر مشتق شده از پروموتور اختصاصی یا در اثر اضافه شدن گزارشگر به ناحیه پروموتور داخلی ایجاد شده‌اند. انتخاب گزارشگر بر اساس نوع کاربرد ضروری است. اگرچه طیف وسیعی از گزارشگرها وجود دارند که می‌توان استفاده نمود، ولی هر سیستم مزایا و محدودیت‌های خودش را دارد (جدول ۱).

^۱- Homologous Recombination (HR)

^۲- Reverse Transcriptase-Polymer Chain Reaction (RT-PCR)

^۳- Real-Time

جدول ۱- گزارشگرهای متداول مورد استفاده جهت رویت و غنی‌سازی انواع مختلف سلول

گزارشگر		پروموتور
معایب	مزایا	روش
نیاز به ثابت نمودن سلول برای رویت می‌باشد	روشی آنزیمی است و متعاقبا تقویت سیگنال را به همراه دارد	bGal, AP, bLac
در شرایط بیان زیاد نیازمند اتوفلورسنت می‌باشد	قابلیت رویت سلول	پروتئین‌های فلورسنت: GFP/CFP/YFP/DsRED
نیازمند کوفاکتورها، سوبستراها و تجهیزات مخصوص می‌باشد	تشخیص حساسیت و استفاده از آن در آزمایش‌های بیوشیمیایی	نشانگر بیولومینسنس: لوسیفراز
بقای پایین در تراکم اندک سلولی	حساس زیاد حتی در سطوح پایین بیان	نشانگرهای انتخابی دارویی: Neo/Puro/ Hyg BSD
بقای پایین در تراکم اندک سلولی	قابلیت غنی‌سازی و حذف سلول	/HSV-TK diphtheria

پروتئین فلورسنت سبز (GFP)^۱ و ارقامی مانند پروتئین فلورسنت سبزآبی (CFP)^۲، پروتئین فلورسنت زرد (YFP)^۳، و DsRed، جهت رویت سلول‌ها به صورت عمومی استفاده می‌شوند. این نوع از نشانگرها به دلیل ایمنی و کاربردی بودن به خوبی در سیستم‌های مدل موش بکار گرفته شده است. ولی، حتی با نسخه‌های بهبودیافته GFP، تعداد حدوداً ۱۰^۵

¹- Green Fluorescent Protein (GFP)

²- Cyan Fluorescent Protein (CFP)

³- Yellow Fluorescent Protein (YFP)

نسخه در هر سلول پستاندار برای رویت فلورسنس^۱ لازم است. بنابراین بر خلاف سهولت در دستیابی اینگونه روش‌ها، ابزارهایی دارای آستانه حساسیت پایین می‌باشند. در مقابل، برچسب‌های ژن مانند بتالاکتاماز^۲، وقتی با سوبستراهای استری غشایی^۳ بکار برده می‌شوند می‌شود، در سطوح کم نیز (۵۰ مولکول در هر سلول) قابل ردیابی است. فایده دیگر گزارشگرهای بیولومینسنس^۴ برای سنجش‌های بیوشیمیایی، حساسیت بالای ردیابی و زمان انتشار آن‌هاست. نشانگرهای مقاومت دارویی^۵ گزینه جایگزین دیگری است که تعداد نسخه‌های اندکی از گزارشگرها برای غنی‌سازی جمعیت سلولی مطلوب هستند و به صورت گسترده استفاده شده‌اند. محدودیت اصلی این رویکرد عدم رویت نشانگر و همچنین نیازمند بهینه‌سازی دارو برای هر نوع سلول هدف می‌باشد. اما، ترکیبی از یک یا بیشتر این سیستم‌های گزارشگر را می‌توان به صورت موفقیت‌آمیزی استفاده کرد تا پیگیری محکم و لاین‌های سلول گزارشگر غنی را بسازیم. ترکیبی از گزارشگر فلورسنت با ژن مقاومت دارویی به صورت عمومی استفاده شده است. ولی تفاوت در حساسیت نسبی آن‌ها، به خصوص پروموتورهای ضعیف، می‌تواند به سلول‌های مقاوم به دارو ختم شود که فلورسنت قابل مشاهده نشان نمی‌دهند.

روش‌های تولید سلول‌های بنیادی پلوریپوتنت گزارشگر

دو روش اصلی برای ایجاد لاین‌های گزارشگر وجود دارند: اول با القا بیان گزارشگر توسط پروموتور اختصاصی و دوم ورود ژن گزارشگر به جایگاه پروموتور داخلی.

1- Fluorescence

2- β -lactamase

3- membrane- permeant ester substrates

4- Bioluminescence Reporters

5- Drug Resistance Markers

بیان حداقل گزارشگر مشتق شده از پروموتور

پروموتور اختصاصی و قطعات تنظیمی را می‌توان در بالادست^۱ یک ژن گزارشگر کلون نمود تا گزارشگرهای پروموتور اختصاصی سلول را تولید نماییم. در بیشتر موارد، توالی‌های DNA بالادست نواحی کدکننده ژن حاوی عناصر سیس^۲ هستند که در بین گونه‌های مختلف محافظت شده‌اند، و به عنوان ناحیه پروموتور طراحی شده‌اند. این مورد یک ارائه بسیار محدود از عناصر تنظیمی را نشان می‌دهد که در بعضی موارد تنظیم ژنی پیچیده دارد و به ترکیبی از عناصر مجاور و دور نیازمند است. در نتیجه، نگرانی اولیه در استفاده از سیستم‌های پروموتور-گزارشگر^۳ این است که گزارشگر ممکن است نتواند فعالیت ژن هدف داخلی را از سر گیرد. بنابراین انجام ارزیابی گسترده پروموتور-گزارشگر برای تأیید بیان در بافت اختصاصی گزارشگر ضروری است.

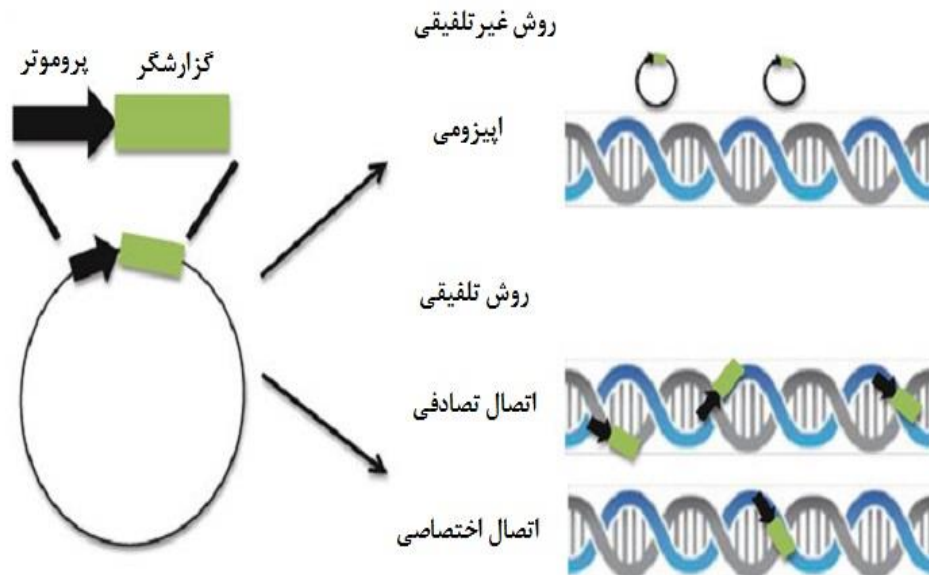
سطح بیان نیز به اینکه چگونه سازه برای بیان پایدار به سلول‌های میزبان منتقل می‌شود، بستگی دارد. سازه پروموتور-گزارشگر هم می‌تواند به صورت موقت اپیزومی^۴ (بدون تلفیق)، یا تلفیق شده به صورت تصادفی یا اختصاصی در ژنوم میزبان وارد شود (شکل ۱).

¹- Upstream

²- Cis-acting Elements

³- Promoter- Reporter

⁴- Episomally



شکل ۱- روش‌های تولید لاین‌های گزارشگر با استفاده از سازه‌های گزارشگر- پروموتور

روش‌های غیرتلفیقی که از ناقلین موقت استفاده می‌کنند مانع از تلفیق ژنومی تراژن می‌شوند، در حالی که روش‌های تلفیقی منجر به درج تصادفی یا اختصاصی تراژن به ژنوم میزبان می‌شوند

روش‌های غیرتلفیقی^۱

ناقلین موقتی بر اساس ویروس Epstein-Barr^۲ به صورت موفقیت‌آمیزی برای بیان پایدار ژن مورد نظر در انواعی از سلول‌ها بدون تلفیق در ژنوم میزبان استفاده شده‌اند (۱۶). این سیستم یک جایگزین مناسب است زیرا نسبتاً عاری از اثرات کروموزومی مرتبط با روش‌های تلفیق ژنومی است و برای ایجاد لاین‌های گزارشگر پلوریپوتنت با پروموتور Pou5F1 (Oct4) استفاده شده است. ناقلین EBV از نظر اندازه بزرگ هستند (بیش از ۱۰ کیلو باز) و در غیاب یک روش انتقال مناسب، این روش می‌تواند محدودکننده باشد (۱۷).

^۱- Nonintegrational Methods

^۲- Epstein-Barr Virus (EBV)

روش‌های تلفیقی^۱

چندین روش مختلف بر اساس DNA و ویروس، تلفیق سازه منتقل شده را در ژنوم میزبان هم در حالت تصادفی و هم اختصاصی تسهیل کرده‌اند.

تلفیق تصادفی سازه پروموتور-گزارشگر را با انتقال DNA یا ذرات لنتی ویروس^۲ می‌توان به دست آورد. در هر دو مورد، تعداد رونوشت بالای سازه را می‌توان با انتقال مناسب به سلول به دست آورد (۱۸). ولی از آنجا که بیان به شدت به ناحیه تلفیق بستگی دارد، بیان ژن گزارشگر اغلب کاهش یافته یا خاموش می‌شود. همچنین سلول‌های ESC که با جریان ویروسی تراژن GFP منتقل شده‌اند، نشان داده‌اند که قابلیت تمایز را کاهش می‌دهند (۱۹). تلفیق اختصاصی سازه پروموتور-گزارشگر در یک ناحیه امن اثرات جایگاه ژنومی را به حداقل می‌رساند. نوترکیبی بواسطه تلفیق کاست‌ها^۳ نشان داده است که به صورت مؤثری از نظر ژنتیکی جایگاه فعال رونویسی ROSA26 را در ESC انسان تغییر می‌دهد (۲۰). همچنین PhiC31 اینتگراز هدف‌گیری تراژن را برای نقاط اختصاصی ایجاد می‌کند و به صورت موفقیت‌آمیزی برای ایجاد بیان دائمی و اختصاصی استفاده شده است که کروموزوم ۱۳ را در ESC انسان مورد هدف قرار می‌دهد (۲۱، ۲۲). سایر جایگاه‌های ژنومی نیز مانند: ENYV و AAVS1 بیان پایدار تراژن را در سلول‌های بنیادی جنینی نشان داده‌اند (۲۳). محدودیت اصلی گزارشگر مشتق شده از پروموتور اختصاصی این است که یک یا دو نسخه از ژن ممکن است برای تسهیل بیان گزارشگر مناسب نباشند (۲۴). بهترین روش برای غلبه بر موانع با سیستم‌های سازه پروموتور-گزارشگر ایجاد لاین‌های گزارشگر با جهش اضافه شدن پروموتور است.

اضافه شدن گزارشگر به ناحیه پروموتور داخلی

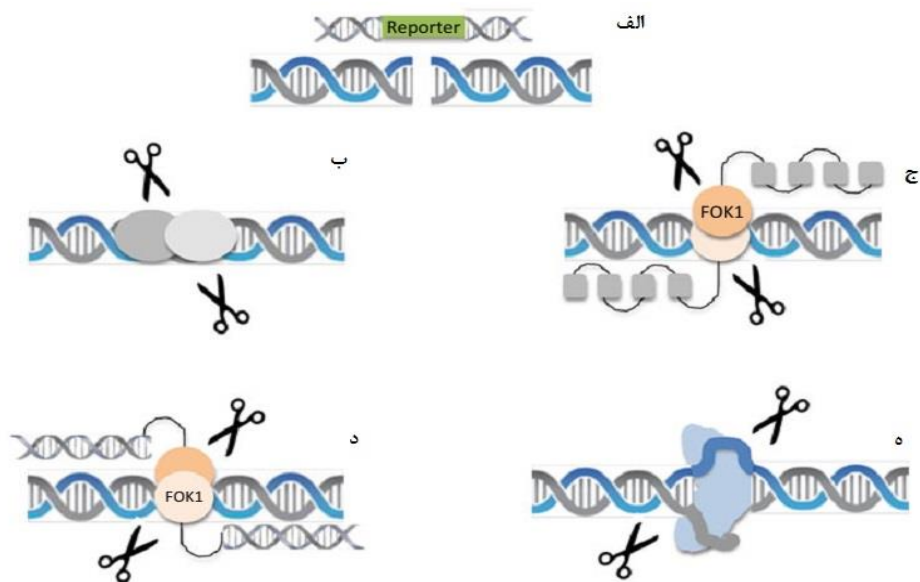
ژن‌های گزارشگر را می‌توان به نواحی ژنومی اختصاصی مورد نظر به روش نوترکیبی همسان وارد نمود (۲۵). سازه از ناحیه اصلی تشکیل شده که کاست گزارشگر را حمل می‌کند و با

¹- Integrational Methods

²- Lentiviral Particles

³- Cassette

دو بازوی یکسان احاطه شده است که با جایگاه ژنومی هدف نو ترکیب شده و منجر به ورود گزارشگر اختصاصی می‌شود (۲۶). این فرایند نسبتاً نامناسب است، که عموماً رخداد آن به میزان یک در میلیون در سلول است که در حضور شکست دورشته‌ای به صورت معنی‌داری افزایش می‌یابد (۲۷). روش‌های جدید هدف‌گیری ژن به امید آن است که به صورت دقیق جایگاه ژنومی را برش بزند تا ورود یا حذف ژن در ناحیه برش اختصاصی را تسهیل کند (شکل ۲). چند لاین گزارشگر در ESC و iPSC با استفاده از این روش‌ها تولید شده‌اند (جدول ۲).



شکل ۲- روش‌های مختلف ویرایش ژنومی جهت درج اختصاصی گزارشگر

جدول ۲- تولید انواع لاین‌های سلولی پلوریپوتنت گزارشگر با استفاده از روش‌های مختلف ویرایش ژنومی

منبع	مدل سلولی	روش	گزارشگر	جایگاه	نوع سلول
۲۸	Pluripotency	HR/ ZFN	GFP	POU5F1	ESC / iPSC
۲۹	Pluripotency	HR/AAV	Neomycin	NANOG	KhES3/ HUES3
۳۱	Neuroepithelium	HR	GFP	NESTIN	ESC
۳۲	Corticospinal neuron	HR	YFP	FEZF2	HUES9
۳۳	Forebrain	HR	GFP	NKX2.1	HES3/ MEL1
۳۴	Oligodendrocyte	HR	GFP	Olig-2	BG01
۳۵	Motor neuron	HDAVs	GFP	HB9	KhES3
۳۶	Astrocyte	ZFN	GFP	GFAP	iPSC
۲۴	Dopamine neuron	ZFN	GFP	PITX3	iPSC
۳۷	hematopoietic	HR	GFP	MIXL1	ESC
۳۸	Cardiac progenitor	HR	GFP	NKX2.5	ESC
۳۹	Cardiac progenitor	HR	mCherry/eGFP	MESP1/NKX2.5	ESC

نو ترکیبی همسان

از زمانی که ایده ترمیم شکست دورشته‌ای (DSB) با HR تشریح شد، این روش، روش قوی برای ایجاد مدل‌های سلولی در سلول‌های بنیادی انسان فراهم کرده است (۴۰). اخیراً، این روش به کار گرفته شده است تا ESCs انسانی مهندسی شده را تولید کند. در سال ۲۰۰۳، زواکا و تامسون ویرایش ژن هدف‌گیری شده را در دو جایگاه ESC انسان، HPRT-1 و POUF1 انجام دادند و به مدت کوتاهی، سایر محققین هم به صورت موفقیت‌آمیزی چند

جایگاه مختلف را مورد هدف قرار دادند که شامل ژن الیگودندروسیت^۱ اختصاصی Olig2 و جایگاه hROSA26 بود (۲۸، ۳۴).

بر خلاف این مطالعات، روش مرسوم مهندسی ژنومی با HR کمبودهایی داشت. با توجه به راندمان کم موفقیت، این روش نیازمند میلیون‌ها سلول بود. به علاوه، انتقال موفق و جداسازی کلونی ESCs تغییر یافته چالشی است زیرا این سلول‌ها ترجیح می‌دهند که به صورت دسته باقی بمانند (۲۰، ۴۱). بنابراین، مشکل بعدی در ویرایش ژنوم ایجاد روش‌های مناسب‌تر القا HR بود. این روش‌ها به شناسایی توالی‌های DNA اختصاصی بستگی دارد که شکست دورشته‌ای را مجاور ناحیه هدف کروموزومی القا کند، بنابراین وقایع نو ترکیبی بیشتری را تسهیل می‌کند.

مگانوکلئازها^۲

پروتئین‌های اختصاصی متصل‌شونده به DNA می‌باشند که از کتابخانه آنزیم‌های برشی انتخاب شده‌اند تا برش اختصاصی DNA را برای افزایش راندمان نو ترکیبی همسان و کاهش طول همولوژی DNA ژنومی تولید کنند (۴۲).

نوکلئازهای انگشت روی (ZFN)^۳

نوکلئازهای انگشت روی شامل دامین برش FokI متصل شده به پروتئین‌های انگشت روی است که از سه تا چهار موتیف انگشت روی تشکیل شده‌اند که هر موتیف به صورت اختصاصی توالی نوکلئوتیدهای سه‌تایی^۴ را شناسایی می‌کند (۴۴، ۴۷). چند نوع سلول به صورت موفقیت‌آمیزی با استفاده از هدف‌گیری ژن با واسطه ZFN مورد هدف واقع شده‌اند (۴۳). در اولین مطالعه با استفاده از این روش بر اساس لنتی‌ویروس و کاست بیان ZFN و انتقال به ESC انسان گزارش شد (۴۵). مطالعات بعدی به صورت موفقیت‌آمیزی از DNA پلاسمید در ESC و iPSC انسان برای هدف‌گیری گزارشگرهای مقاومت دارویی نسبت به

¹- Oligodendrocyte

²- Mega Nucleases

³- Zinc-Finger Nucleases (ZFN)

⁴- Nucleotide Triplet

ژن‌های اختصاصی و به خصوص برای ایجاد لاین‌های گزارشگر اختصاصی با هدف‌گیری جایگاه داخلی مانند Oct4 (Pou5F1)، PITX3 و GFAP استفاده کرد (۲۴، ۳۶).

TALEN

نوکلئازهای افکتور شبه فعال‌کننده رونویسی یا TALEN^۱، یک روش ویرایش ژنومی است که باعث شکست دورشته‌ای بسیار اختصاصی در هر توالی DNA می‌شود. اختصاصیت با شناسایی ناحیه تکراری مرکزی ۳۳-۳۵ آمینواسیدی با دو آمینواسید متغیر به دست می‌آید که دو آمینواسید متغیر تکراری (RVD)^۲ نام دارند (۴۸). TALEN‌ها به صورت جفتی طراحی می‌شوند که از ترکیبی از پروتئین‌های اختصاصی متصل‌شونده به DNA به نام پروتئین‌های افکتور شبه فعال‌کننده رونویسی (TALEs) و یک نوکلئاز مصنوعی یا آنزیم برشی مانند FokI استفاده می‌کنند تا به نواحی هدف DNA متصل شوند تا یک برش دورشته‌ای تولید کنند. این روش به صورت موفقیت‌آمیزی برای اضافه کردن پروموتورهای داخلی Oct4 و PITX3 در سلول‌های ESC و iPSC با فراوانی مشابه آنچه با ZFN مشاهده شده است، استفاده شد. ترکیب، راندمان بالای هدف‌گیری و طراحی آسان‌تر، با کد شناسایی ساده‌تر، این ابزار قوی را برای تغییر پایدار سلول‌های بنیادی پلورپوتنت مناسب کرده است (۴۹).

CRISPR

آخرین پیشرفت در ویرایش ژنومی ایجاد خوشه‌های منظم درون پالیندورم‌های تکراری کوتاه (CRISPR)^۳ هدایت شده با برش بواسطه آنزیم نوکلئاز Cas9 است (۵۰). جنبه اصلی CRISPR/Cas9 که آن را منحصر به فرد می‌کند این است که روش CRISPR/Cas9 فقط به سنتز یک RNA راهنما جدید نیاز دارد به جای اینکه یک نوکلئاز اختصاصی هدف جدید تولید کند (۵۱). RNA راهنما یک نسخه تکی حاوی دو قسمت نوع وحشی است: crRNA اختصاصی هدف و tracrRNA که کمک می‌کند تا Cas9 به درستی در

^۱- Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALEN)

^۲- Repeat Variable Diresidues (RVD)

^۳- Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeat (CRISPR)

جایگاهش قرار بگیرد (۵۲). برش بعد از اتصال این RNA به رشته هدف مکمل ۱۷ تا ۲۰ نوکلئوتیدی بالادست دامین مجاور اولین جداکننده ۳ نوکلئوتیدی NGG (PAM)^۱ رخ می‌دهد. بزرگترین مزیت سیستم ویرایش ژنومی CRISPR-Cas9 اختصاصیت، راندمان بالا و سهولت است که می‌توان تا چند مکان را به صورت تکی یا با هم، مورد هدف قرار دهیم (۵۳).

روش‌های جایگزین

روش‌هایی که در بخش‌های ابتدایی تشریح شد به تغییر پایدار سلول‌ها بستگی دارد، که زمان و تلاش قابل ملاحظه‌ای می‌طلبد تا کلون‌های پایداری را تولید و ارزیابی کنیم. اخیراً، میکی و همکاران، استفاده از microRNA سنتزی (miRNA)^۲ را گزارش کردند که برای ردیابی و خالص‌سازی جمعیت‌های سلولی خاص تولید می‌شوند. در این روش از شناسایی و خالص‌سازی بر اساس فعالیت miRNA داخلی استفاده می‌کنند. یک miRNA اختصاصی با یک گزارشگر مانند پروتئین فلورسنت برچسب شده و به عنوان mRNA سنتزی منتقل می‌شود (۵۴). با استفاده از miRNA سنتزی، کاردیومیوسیت‌ها^۳، هپاتوسیت‌ها^۴، و سلول‌های تولیدکننده انسولین به صورت موفقیت‌آمیزی از کشت‌های iPSC انسان در حال تمایز خالص‌سازی شدند. این روش رویکرد قوی را فراهم کرد زیرا که به نوع توالی DNA بستگی ندارد همچنین روش ایمن قابل تجزیه‌ای می‌باشد. محدودیت این روش این است که microRNAها نیمه‌عمر کوتاهی دارند و تبدیل‌ها نمی‌تواند در کاربردهایی که به پایش دوره زمانی طولانی نیاز دارند استفاده شوند.

کاربردهای بالقوه سلول‌های بنیادی گزارشگر

کاربردی بودن لاین‌های گزارشگر در سلول‌های پلوریپوتنت در شکل ۳ به صورت خلاصه بیان شده است. گزارشگرها را نیز می‌توان در حالت پلوریپوتنت بیان نمود و با تمایز خاموش

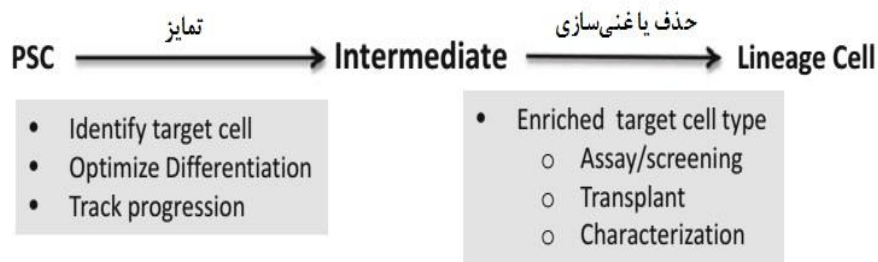
^۱- Protospacer Adjacent Domain (PAM)

^۲- Synthetic microRNA (miRNA)

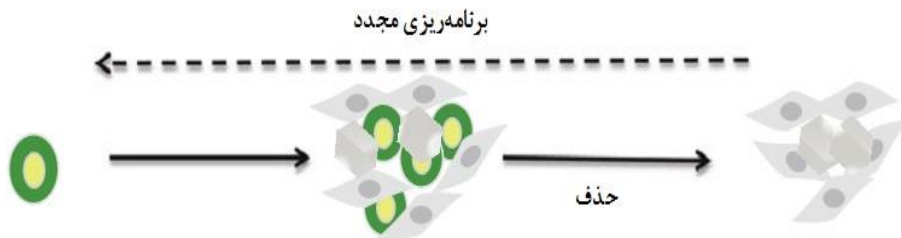
^۳- Cardiomyocytes

^۴- Hepatocytes

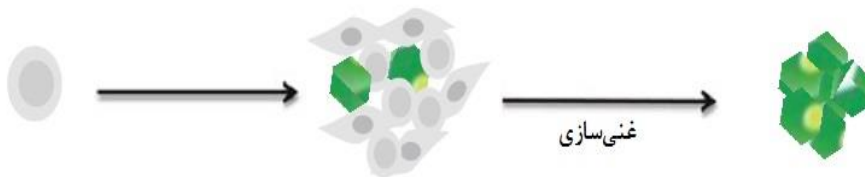
کرد و بر عکس، به این صورت که بیان گزارشگر در حالت شروع خاموش باشد ولی با تمایز روشن شود. به علاوه، یک گزارشگر بصری این فرصت را برای پیگیری پیشرفت سرنوشت سلول در سلول‌های کبد امکان پذیر می‌سازد.



گزارشگر پلوریپوتنت: از حالت روشن به خاموش



لاین‌های گزارشگر: از حالت خاموش به روشن



شکل ۳- گزارشگرهای لاین‌های و پلوریپوتنت و کاربردهای آن‌ها

سلول هدف (سبز) که می‌تواند غنی شده یا از سایر سلول‌ها (طوسی) در یک مخلوط ناهمگن سلول‌ها بر اساس بیان گزارشگر، حذف شود

در مورد گزارشگرهای پلوریپوتنت، ایجاد و مشخص کردن لاین گزارشگر نسبتاً آسان است زیرا کلون‌ها را می‌توان بر اساس بیان گزارشگر استخراج نمود. یک لاین گزارشگر پلوریپوتنت را می‌توان به عنوان یک مدل استفاده کرد تا شرایط کشت و نگهداری را شناسایی نماید. به علاوه، حضور سلول‌های تمایز نیافته باقی مانده را می‌توان پایش و حذف نمود. اگرچه سلول‌های بنیادی مهندسی شده مانع بزرگتری برای پیوند هستند، ولی این مدل‌های سلولی ابزار ارزشمندی را برای شناسایی راه حل جریان کار بصری فراهم می‌کنند. از طرف دیگر فعالیت گزارشگرها همچنین به میزان بیان گزارشگر در سلول هدف نیز بستگی دارد، به عنوان مثال تمایز سلول‌های پلوریپوتنت در کاردیومیوسیت نسبت به سلول قلبی بهتر ایجاد می‌شود. گزارشگرهای فلورسنت و نشانگرهای انتخابی دارویی که با پروموتورهای اختصاصی قلبی و α -MHC یا NCX-1 برای غنی‌سازی انواع سلول قلبی استفاده شده‌اند، تا بیش از ۹۰ درصد سلول‌ها را خالص نمودند. ولی با توجه به اینکه α -MHC و NCX-1 در همه کاردیومیوسیت‌ها بیان می‌شوند، سلول‌های حاصل، مخلوطی از سلول‌های دهلیزی، بطنی و گرهی بودند. این رویکرد بعداً برای غنی‌سازی اختصاصی سلول قلبی بطنی در زنجیره سبک میوسین بطنی 2v (MLC2v)^۱ - گزارشگر eGFP و سلول‌های شبه‌گره‌ی cGATA6- گزارشگر GFP استفاده شد. اخیراً، لاین‌های موتانت ESC انسان MESP1-mCherry, NKX2.5-GFP، و یک گزارشگر قلبی دوگانه که هر دو این گزارشگرها را حمل می‌کرد پایش تمایز hESC را برای تبدیل مزودرم پیش‌قلبی به سلول قلبی تسهیل کرده است. جالب اینکه یک رویکرد جدید از تبدیل‌های miRNA هم اخیراً استفاده شده است تا کاردیومیوسیت‌های مشتق شده از ESC را خالص کند. در روش، یک mRNA سنتزی تشکیل شده از miRNA اختصاصی کاردیومیوسیت، بیان یک گزارشگر انتخابی به دست آمده از کاردیومیوسیت‌ها که بیش از ۹۰ درصد خلوص داشت، به دست آمد (۳۱). سلول‌های حاصل بعداً به صورت موفقیت‌آمیزی در موش دارای نقص ایمنی^۲، پیوند داده شدند (۳۳، ۵۴). با این وجود، این روش‌ها ارزش بالایی برای

^۱ - Ventricular Myosin Light Chain 2v (MLC2V) -eGFP reporter

^۲ - Immunocompromised

بهینه‌سازی روش‌های تمایز فراهم کرده است. همچنین رویکرد مشابهی نیز برای شناسایی مراحل مختلف انواع زیر-سلول‌های عصبی که از سلول‌های بنیادی پلوریپوتنت مشتق شده‌اند، استفاده شده است (۳۴، ۳۶).

نتیجه‌گیری

گزارشگرها مدل‌های سلولی ارزشمندی برای نقشه‌برداری و غنی‌سازی انواع سلول هدف هستند. با پیشرفت در روش‌های ویرایش ژن، یک یا چند گزارشگر را می‌توان در یک لاین سلول بنیادی پلوریپوتنت مهندسی نمود. این رویکرد دیگر با روش‌های ویرایش ژن محدود نمی‌شود ولی از پروتکل‌های تمایز استفاده می‌کند که می‌تواند انواع سلول بالغ را استخراج کند و نشانگر مورد نظر را در سطوح بالایی بیان نماید.

منابع

- 1- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 282(5391): 7-1145.
- 2- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 131(5): 72-861.
- 3- Giudice A, Trounson A. 2008. Genetic modification of human embryonic stem cells for derivation of target cells. *Cell Stem Cell*. 2(5): 33-422.
- 4- Cai J, Zhao Y, Liu Y, Ye F, Song Z, Qin H, Meng S, Chen Y, Zhou R, Song X, et al. 2007. Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatic cells. *Hepatology*. 45(5): 39-1229.
- 5- Shim JH, Kim SE, Woo DH, Kim SK, Oh CH, McKay R, Kim JH. 2007. Directed differentiation of human embryonic stem cells towards a pancreatic cell fate. *Diabetologia*. 50(6): 38-1228.
- 6- Wang J, Zhao HP, Lin G, Xie CQ, Nie DS, Wang QR, Lu GX. 2005. In vitro hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells induced by co-culture with human bone marrow stromal cells and low dose cytokines. *Cell Biol Int*. 29(8): 61-654.
- 7- Hentze H, Graichen R, Colman A. 2007. Cell therapy and the safety of embryonic stem cell-derived grafts. *Trends Biotechnol*. 25(1): 24-32.
- 8- Long JZ, Lackan CS, Hadjantonakis AK. 2005. Genetic and spectrally distinct in vivo imaging: embryonic stem cells and mice with widespread expression of a monomeric red fluorescent protein. *BMC Biotechnol*. 5: 1-20.
- 9- Hadjantonakis AK, Macmaster S, Nagy A. 2002. Embryonic stem cells and mice expressing different GFP variants for multiple non-invasive reporter usage within a single animal. *BMC Biotechnol*. 2: 1-11.
- 10- Tsien RY. 1998. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*. 67: 44-509.

- 11- Zlokarnik G, Negulescu PA, Knapp TE, Mere L, Burres N, Feng L, Whitney M, Roemer K, Tsien RY. 1998. Quantitation of transcription and clonal selection of single living cells with beta-lactamase as reporter. *Science*. 279(5347): 8-84.
- 12- de Almeida PE, van Rappard JR, Wu JC. 2011. In vivo bioluminescence for tracking cell fate and function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 301(3): 71-663.
- 13- Wang D, Haviland DL, Burns AR, Zsigmond E, Wetsel RA. 2007. A pure population of lung alveolar epithelial type II cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104(11): 54-4449.
- 14- Anderson D, Self T, Mellor IR, Goh G, Hill SJ, Denning C. 2007. Transgenic enrichment of cardiomyocytes from human embryonic stem cells. *Mol Ther*. 15(11): 36-2027.
- 15- van Weerd JH, Badi I, van den Boogaard M, Stefanovic S, van de Werken HJ, Gomez- Velazquez M, Badia-Careaga C, Manzanares M, de Laat W, Barnett P, et al. 2014. A large permissive regulatory domain exclusively controls Tbx3 expression in the cardiac conduction system. *Circ Res*. 115(4): 41-432.
- 16- Yates JL, Warren N, Sugden B. 1985. Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature*. 313(6005): 5-812.
- 17- Thyagarajan B, Scheyhing K, Xue H, Fontes A, Chesnut J, Rao M, Lakshmiathy U. 2009. A single EBV-based vector for stable episomal maintenance and expression of GFP in human embryonic stem cells. *Regen Med*. 4(2): 50-239.
- 18- Xia X, Zhang Y, Zieth CR, Zhang SC. 2007. Transgenes delivered by lentiviral vector are suppressed in human embryonic stem cells in a promoter-dependent manner. *Stem Cells Dev*. 16(1): 76-167.
- 19- Clements MO, Godfrey A, Crossley J, Wilson SJ, Takeuchi Y, Boshoff C. 2006. Lentiviral manipulation of gene expression in human adult and embryonic stem cells. *Tissue Eng*. 12(7): 51-1741.

- 20- Irion S, Luche H, Gadue P, Fehling HJ, Kennedy M, Keller G. 2007. Identification and targeting of the ROSA26 locus in human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 25(12): 82-1477.
- 21- Thyagarajan B, Liu Y, Shin S, Lakshmipathy U, Scheyhing K, Xue H, Ellerstrom C, Strehl R, Hyllner J, Rao MS, et al. 2008. Creation of engineered human embryonic stem cell lines using phiC31 integrase. *Stem Cells.* 26(1): 26-119.
- 22- Macarthur CC, Xue H, Van Hoof D, Lieu PT, Dudas M, Fontes A, Swistowski A, Touboul T, Seerke R, Laurent LC, et al. 2012. Chromatin insulator elements block transgene silencing in engineered human embryonic stem cell lines at a defined chromosome 13 locus. *Stem Cells Dev.* 21(2): 191-205.
- 23- Costa M, Dottori M, Ng E, Hawes SM, Sourris K, Jamshidi P, Pera MF, Elefanty AG, Stanley EG. 2005. The hESC line Envy expresses high levels of GFP in all differentiated progeny. *Nat Methods.* 2(4): 60-259.
- 24- 24. Hockemeyer D, Soldner F, Beard C, Gao Q, Mitalipova M, DeKolver RC, Katibah GE, Amora R,
- 25- Boydston EA, Zeitler B, et al. Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and
- 26- iPSCs using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol.* 2009;27(9):851-7.
- 27- Davis RP, Grandela C, Sourris K, Hatzistavrou T, Dottori M, Elefanty AG, Stanley EG, Costa M. 2009. Generation of human embryonic stem cell reporter knock-in lines by homologous recombination. *Curr Protoc Stem Cell Biol.* Chap. 5: Unit 5B 34-111.
- 28- Fontes A, Lakshmipathy U. 2013. Advances in genetic modification of pluripotent stem cells. *Biotechnol Adv.* 31(7): 994-1001.
- 29- Jasin M. 1996. Genetic manipulation of genomes with rare-cutting endonucleases. *Trends Genet.* 12(6): 8-224.
- 30- Zwaka TP, Thomson JA. 2003. Homologous recombination in human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 21(3): 21-319.

- 31- Mitsui K, Suzuki K, Aizawa E, Kawase E, Suemori H, Nakatsuji N, Mitani K. 2009. Gene targeting in human pluripotent stem cells with adeno-associated virus vectors. *Biochem Biophys Res Commun.* 388(4): 7-711.
- 32- Fischer Y, Ganic E, Ameri J, Xian X, Johannesson M, Semb H. 2009. NANOG reporter cell lines generated by gene targeting in human embryonic stem cells. *PLoS One.* 5(9): e12533.
- 33- Noisa P, Urrutikoetxea-Uriguen A, Li M, Cui W. 2010. Generation of human embryonic stem cell reporter lines expressing GFP specifically in neural progenitors. *Stem Cell Rev.* 6(3): 49-438.
- 34- Ruby KM, Zheng B. 2009. Gene targeting in a HUES line of human embryonic stem cells via electroporation. *Stem Cells.* 27(7): 506-1496.
- 35- Goulburn AL, Alden D, Davis RP, Micallef SJ, Ng ES, Yu QC, Lim SM, Soh CL, Elliott DA, Hatzistavrou T, et al. 2011. A targeted NKX2.1 human embryonic stem cell reporter line enables identification of human basal forebrain derivatives. *Stem Cells.* 29(3): 73-462.
- 36- Xue H, Wu S, Papadeas ST, Spusta S, Swistowska AM, MacArthur CC, Mattson MP, Maragakis NJ, Capecchi MR, Rao MS, et al. 2009. A targeted neuroglial reporter line generated by homologous recombination in human embryonic stem cells. *Stem Cells.* 27(8): 46-1836.
- 37- Aizawa E, Hirabayashi Y, Iwanaga Y, Suzuki K, Sakurai K, Shimoji M, Aiba K, Wada T, Tooi N, Kawase E, et al. 2012. Efficient and accurate homologous recombination in hESCs and hiPSCs using helper-dependent adenoviral vectors. *Mol Ther.* 20(2): 31-424.
- 38- Zhang PW, Haidet-Phillips AM, Pham JT, Lee Y, Huo Y, Tienari PJ, Maragakis NJ, Sattler R, Rothstein JD. 2016. Generation of GFAP::GFP astrocyte reporter lines from human adult fibroblast-derived iPS cells using zinc-finger nuclease technology. *Glia.* 64: 63-75.

- 39- Davis RP, Ng ES, Costa M, Mossman AK, Sourris K, Elefanty AG, Stanley EG. 2008. Targeting a GFP reporter gene to the MIXL1 locus of human embryonic stem cells identifies human primitive streak-like cells and enables isolation of primitive hematopoietic precursors. *Blood*. 111(4): 84-1876.
- 40- Elliott DA, Braam SR, Koutsis K, Ng ES, Jenny R, Lagerqvist EL, Biben C, Hatzistavrou T, Hirst CE, Yu QC, et al. 2011. NKX2-5(eGFP/w) hESCs for isolation of human cardiac progenitors and cardiomyocytes. *Nat Methods*. 8(12): 40-1037.
- 41- Den Hartogh SC, Schreurs C, Monshouwer-Kloots JJ, Davis RP, Elliott DA, Mummery CL, Passier R. 2015. Dual reporter MESP1 mCherry/w-NKX2-5 eGFP/w hESCs enable studying early human cardiac differentiation. *Stem Cells*. 33(1): 56-67.
- 42- Resnick MA. 1976. The repair of double-strand breaks in DNA: a model involving recombination. *J Theor Biol*. 59(1): 97-106.
- 43- Zou J, Maeder ML, Mali P, Pruett-Miller SM, Thibodeau-Beganny S, Chou BK, Chen G, Ye Z, Park IH, Daley GQ, et al. 2009. Gene targeting of a disease-related gene in human induced pluripotent stem and embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*. 5(1): 97-110.
- 44- Cohen-Tannoudji M, Robine S, Choulika A, Pinto D, El Marjou F, Babinet C, Louvard D, Jaissier F. 1998. I-SceI-induced gene replacement at a natural locus in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*. 18(3): 8-1444.
- 45- Beerli RR, Barbas III CF. 2002. Engineering polydactyl zinc-finger transcription factors. *Nat Biotechnol*. 20(2): 41-135.
- 46- Segal DJ, Dreier B, Beerli RR, Barbas III CF. 1999. Toward controlling gene expression at will: selection and design of zinc finger domains recognizing each of the 5'-GNN-3'DNA target sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96(6): 63-2758.
- 47- Lombardo A, Genovese P, Beausejour CM, Colleoni S, Lee YL, Kim KA, Ando D, Urnov FD, Galli C, Gregory PD, et al. 2007. Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and

- integrase-defective lentiviral vector delivery. *Nat Biotechnol.* 25(11): 306-1298.
- 48- Ptaszek LM, Cowan CA. 2007. New tools for genome modification in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell.* 1(6): 2-600.
- 49- Wu J, Kandavelou K, Chandrasegaran S. 2007. Custom-designed zinc finger nucleases: what is next. *Cell Mol Life Sci.* 64(22): 44-2933.
- 50- Bogdanove AJ, Voytas DF. 2011. TAL effectors: customizable proteins for DNA targeting. *Science.* 333(6051): 6-1843.
- 51- Hockemeyer D, Wang H, Kiani S, Lai CS, Gao Q, Cassady JP, Cost GJ, Zhang L, Santiago Y, Miller JC, et al. 2011. Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nat Biotechnol.* 29(8): 4-731.
- 52- Harrison MM, Jenkins BV, O'Connor-Giles KM, Wildonger J. 2014. A CRISPR view of development. *Genes Dev.* 28(17): 72-1859.
- 53- Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. 2013. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc.* 8(11): 308-2281.
- 54- Ding Q, Regan SN, Xia Y, Oostrom LA, Cowan CA, Musunuru K. 2013. Enhanced efficiency of human pluripotent stem cell genome editing through replacing TALENs with CRISPRs. *Cell Stem Cell.* 12(4): 4-393.
- 55- Veres A, Gosis BS, Ding Q, Collins R, Ragavendran A, Brand H, Erdin S, Cowan CA, Talkowski ME, Musunuru K. 2014. Low incidence of off-target mutations in individual CRISPR- Cas9 and TALEN targeted human stem cell clones detected by whole-genome sequencing. *Cell Stem Cell.* 15(1): 27-30.
- 56- Miki K, Endo K, Takahashi S, Funakoshi S, Takei I, Katayama S, Toyoda T, Kotaka M, Takaki T, Umeda M, et al. 2015. Efficient detection and purification of cell populations using synthetic MicroRNA switches. *Cell Stem Cell.* 16(6): 699-711.

- 57- Kamp TJ. 2011. Recognizing heart cells in a crowd. *Nat Methods*. 8(12): 6-1013.
- 58- Den Hartogh SC, Passier R. 2016. Fluorescent reporters in human pluripotent stem cells: contributions to cardiac differentiation and their applications in cardiac disease and toxicity. *Stem Cells*. 34: 13-26.
- 59- Kita-Matsuo H, Barcova M, Prigozhina N, Salomonis N, Wei K, Jacot JG, Nelson B, Spiering S, Haverslag R, Kim C, et al. 2009. Lentiviral vectors and protocols for creation of stable hESC lines for fluorescent tracking and drug resistance selection of cardiomyocytes. *PLoS One*. 4(4): e5046.
- 60- Ovchinnikov DA, Hidalgo A, Yang SK, Zhang X, Hudson J, Mazzone SB, Chen C, Cooper- White JJ, Wolvetang EJ. 2015. Isolation of contractile cardiomyocytes from human pluripotent stem- cell- derived cardiomyogenic cultures using a human NCX1-EGFP reporter. *Stem Cells Dev*. 24(1): 11-20.
- 61- Xu XQ, Zweigerdt R, Soo SY, Ngoh ZX, Tham SC, Wang ST, Graichen R, Davidson B, Colman A, Sun W. 2008. Highly enriched cardiomyocytes from human embryonic stem cells. *Cytotherapy*. 10(4): 89-376.
- 62- Ross RS, Navankasattusas S, Harvey RP, Chien KR. 1996. An HF-1a/HF-1b/MEF-2 combinatorial element confers cardiac ventricular specificity and established an anterior-posterior gradient of expression. *Development*. 122(6): 809-1799.
- 63- Zhu WZ, Xie Y, Moyes KW, Gold JD, Askari B, Laflamme MA. 2010. Neuregulin/ErbB signaling regulates cardiac subtype specification in differentiating human embryonic stem cells. *Circ Res*. 107(6): 86-776.

فصل هفتم

ویرایش ژنومی در درمان بیماری‌های قلب و عروق

چکیده

طی دهه گذشته، جهش‌های ژنتیکی فراوانی در القای بیماری‌زایی بیماری‌های قلب و عروق (CVDs) به کار رفته است. با شروع عصر پزشکی دقیق در ژانویه سال ۲۰۱۵، فناوری‌های نوظهور مانند سلول‌های بنیادی پلورپوتنت القاشده (iPSC) و ویرایش ژنومی به خوبی در موقعیتی قرار گرفته‌اند که ابزار قوی برای همبستگی ژنوتیپ و فنوتیپ فراهم کرده‌اند. این فناوری‌های جدید کمک می‌کنند تا جهش‌های اختصاصی مرتبط با CVD انسانی را شناسایی کنیم. کاردیومیوسیت‌های مشتق شده از iPSC اختصاصی بیمار (iPSC-CMs) یک سکوی آزمایشی جذاب برای مدل کردن CVDs، مطالعه مولکولی زیست‌شناسی قلب و عروق و تسریع آزمون‌های سمیت‌شناسی دارو، ارائه می‌دهد. با مجهز شدن روز افزون ابزار مهندسی ژنومی، دانشمندان در حال آشکار کردن مکانیزم‌های مولکولی تحت بیماری‌زایی CVDs هستند، که مسیر ایجاد پیش‌بینی شخصی، ممانعت و درمان بیماری‌ها را هموار می‌کند.

ژنومیکس بیماری‌های قلب و عروق

پزشکی دقیق^۱

بیماری قلب و عروق (CVD)^۲ یک مشکل اساسی است که بر بیش از ۸۵ میلیون نفر در ایالات متحده اثر گذاشته است (۱). یکی از اهداف کلیدی در تحقیقات پزشکی شناسایی ژن‌ها و واریانت‌های اختصاصی مرتبط با CVD در انسان‌هاست. در روش‌های نوین این امید وجود دارد که سلامتی انسان را با ایجاد پیش‌بینی، پیشگیری و درمان بیماری‌های قلب و عروق روی یک فرد تغییر دهد (۲). این رویکرد پزشکی دقیق اصولاً بر اساس توانایی تشخیص و طبقه‌بندی بیماران به گروه‌های درمانی مختلف با انطباق ژنوتیپ بیمار به همراه فنوتیپ سلولی مرتبط است، که نشان می‌دهد چگونه تفاوت‌های ژنتیکی در بین افراد می‌تواند بر پاسخ‌هایشان به درمان اثر بگذارد. ولی فهم پتانسیل درمان بیماران به ایجاد یک سیستم تشخیص دقیق و هزینه‌بر و مدل‌های بیماری قابل اعتماد نیاز دارد.

ژنتیک بیماری قلب و عروق

بیماری‌های قلبی عروقی انسان شامل طیف وسیعی از نقص‌ها، مانند: بیماری‌های قلبی مادرزاد^۳، بیماری‌های بزرگ شدن قلب (کاردیومیوپاتی)^۴، رگ‌دار (عروق) شدن بدن^۵، و نقص‌های رسانش الکتریکی^۶ می‌شود (۳، ۴). پیشرفت‌های اخیر نشان داده‌اند که عوامل ژنتیکی در ایجاد خطر برای این نقص‌ها مهم است (۵، ۷). بیش از ۱۰۰۰ جهش ژنتیکی در بیش از ۱۰۰ ژن با CVD ارثی مرتبط هستند که شامل عضله قلب بزرگ شده یا منبسط شده (DCM و HCM)^۷، دیسپلازی/کاردیومیوپاتی اریتموژنیک بطن راست (ARVC/D)^۸،

1- Precision Medicine

2- Cardiovascular Disease (CVD)

3- Congenital Heart Diseases

4- Cardiomyopathies (CM)

5- Vasculature

6- Electrical Conduction Disorders

7- Dilated and Hypertrophic Cardiomyopathy (DCM and HCM)

8- Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia (ARVC/D)

سندرم QT طولانی (LQTS)^۱، آنوریسم آئورتیک (بزرگ‌شدن یا بیرون‌زدگی دیواره سرخرگ آئورت)^۲ و هایپرکلسترولمی (افزایش کلسترول خون)^۳ می‌شود (۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲).

در سال ۱۹۷۵، گلدستین و همکاران یک جهش دگرمعنی^۴ هموزیگوت را در ژن گیرنده لیپوپروتئین با چگالی کم (LDLR)^۵ در یک بیمار با هایپرکلسترولمی فامیلی (FH) شناسایی کردند، که اولین بیان واریانت ژنتیکی در CVD مندلی بود. از آن زمان، بسیاری از اشکال مندلی (نقص مونوژنی) CVD به صورت موفقیت‌آمیزی با توالی‌یابی DNA یا تحلیل لینکاژ شناسایی شدند (۱۳، ۱۶). ولی، این الگوی اختصاصی وراثت نادر است و حداقل موارد را تشکیل می‌دهد (۴، ۱۷) (شکل ۱). بیشتر CVD معمول شامل چند ژن است و الگوی وراثت آن‌ها می‌تواند متغیر و پیچیده باشد (۱۸). یکی از چالش‌های اصلی در تحقیق ژنتیکی شناسایی ژن‌هایی است که به بیماری‌های پیچیده مربوط می‌شوند. به همین دلیل، چاپ اولین پیش‌نویس در مورد ژنوم انسان در سال ۲۰۰۱ یک منبع ارزشمند از اطلاعات جزئی در مورد ساختار، سازماندهی و عمل ژن‌های انسان بود (۱۹، ۲۰).

یک دهه بعد، مطالعات مرتبط با کل ژنوم (GWAS)^۶، که ارقام ژنتیکی را بررسی می‌کرد تا ارقام ایجاد کننده بیماری را بین مورد و شاهد تعیین کند، صدها جایگاه ژنی مرتبط با CVDs و صفات را معرفی کرد (۲۱). اگرچه جایگاه‌های کشف شده جدید فراوانی مرتبط با عوامل خطر و بیماری قلبی عروقی گزارش شده‌اند، ولی کاربرد این یافته‌ها برای تشخیص، پیش‌بینی، پیشگیری و درمان بیماری هنوز در ابتدای کار است و به تحقیق بیشتری نیاز دارد.

¹- Long-QT Syndromes (LQTS)

²- Aortic Aneurysms

³- Hypercholesterolemia

⁴- Missense Mutation

⁵- Low-Density Lipoprotein Receptor (LDLR)

⁶- Genome-Wide Association Studies (GWAS)

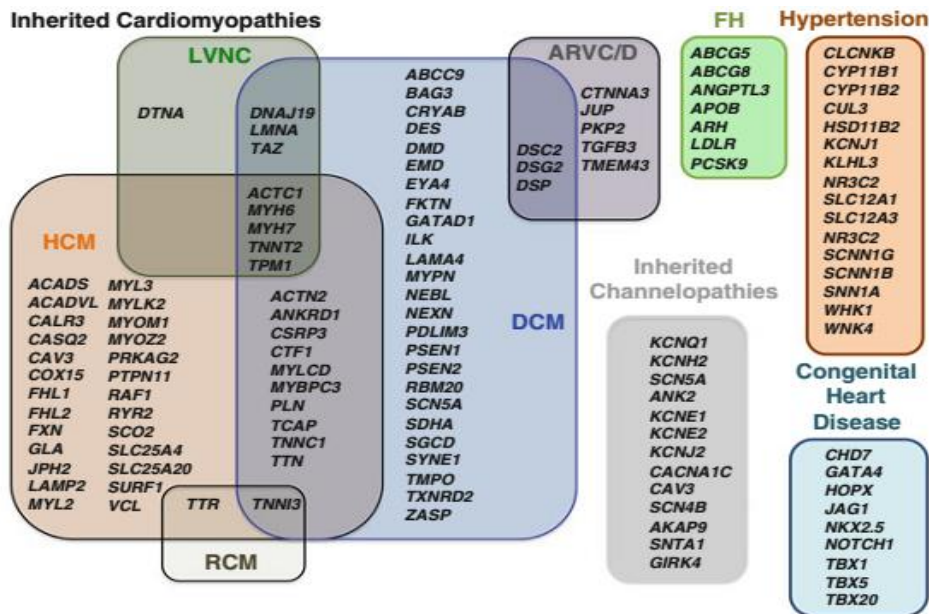
در گستره فقط چند سال، پیشرفت‌های سریعی در فناوری توالی‌یابی نسل بعدی (NGS)^۱ هم بصورت خاص و هم بصورت کل ژنوم، ژن‌های مرتبط با CVD را شناسایی کرده و کشفیات فراوان جدیدی همچنان ادامه دارد. توالی‌یابی هدفمند (خاص)^۲ هم اکنون استفاده می‌شود تا نواحی کاندید ژنوم انسان را توالی‌یابی کند. در مطالعه اخیر، ویلسون و همکاران، بیان کردند که جهش‌های ژن مرتبط با عضله قلب را می‌توان با صحت بالایی با استفاده از سنجش توالی‌یابی هدفمند نسل بعدی با علمکرد بالای درجه‌بندی کلینیکی شناسایی کرد، که ابزار قوی جدیدی برای کشف ارقام CVD است (۱۷). توالی‌یابی DNA کل ژنوم شامل توالی‌یابی کل اگزوم (Whole-Exome) و کل ژنوم می‌شود. در توالی‌یابی کل اگزوم، ارقام ژنتیکی نادر CVD را می‌توان با توالی‌یابی نواحی کدکننده پروتئین در دسته‌های بزرگ با وراثت‌پذیری بالا، توالی‌یابی نمود. به علت اینکه بیشتر محتوای ژنومی از نواحی غیر کدکننده تشکیل شده‌اند، توالی‌یابی کل ژنوم یک رویکرد جامع است که ارقام جدید را در هر دو ناحیه کدکننده و غیر کدکننده شناسایی می‌کند (۱۹، ۲۰). داده‌ها از طرح ENCODE^۳ پیشنهاد کرد که ۳۷ درصد کل ژنوم انسان ممکن است عملکرد داشته باشند و احتمالاً در بافت‌های اختصاصی تنظیم می‌شوند (۲۲). مطالعات اخیر توسط کردل و همکاران، بیان کرد که جهش‌ها در نواحی ژنومی غیررمزکننده نیز با چند بیماری قلبی ارثی مرتبط است مانند تترالوژی فالوت (ترکیب چهار عارضه قلبی در زمان تولد)^۴ می‌شود (۲۳)، (۲۴). بنابراین، همانطور که توالی‌یابی کل ژنوم بسیار گسترده استفاده می‌شود، ارقام بیماری بیشتری مرتبط با RNAهای کدکننده و غیر کدکننده کشف می‌شود.

^۱- Next Generation Sequencing (NGS)

^۲- Targeted Sequencing

^۳- Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE)

^۴- Tetralogy of Fallot



شکل ۱- اساس مندلی بیماری‌های ژنتیکی قلبی عروقی.

جهش‌ها در بیش از ۱۰۰ ژن با بیماری‌های قلبی عروقی مندلی مرتبط شده‌اند. بیماری قلب و عروق وراثتی، که با همپوشانی معنی‌داری مشخص شده است، شامل بیماری عضله قلب بزرگ شده (HCM)، بیماری عضله منبسط شده (DCM)، بیماری عضله محدودشده (RCM)، non-compaction بطن چپ (LVNC)، دیسپلازی/کاردیومیوپاتی اریتموژنیک بطن راست (ARVC/D) و هایپرکلسترولمی فامیلی (FH).

مدل‌سازی بیماری با سلول‌های بنیادی پلوریپوتنت انسان

برخلاف پیشرفت‌های فراوانی که امروزه در علم ژنتیک صورت گرفته است، مکانیزم مولکولی بیماری‌زایی CVD بسیار کمتر شناخته شده است. مدل‌های بیماری‌نگرش‌های مهمی را در مورد اساس مولکولی زیست‌شناسی و بیماری قلب و عروق فراهم کرده و در ادامه هم فراهم خواهد کرد. مدل‌های دستورزی حیوانی و سیستم‌های سلول انسان در درک بهتر CVD انسان بسیار ارزشمند هستند (۲۱، ۲۵). ولی تفاوت‌های قابل ملاحظه‌ای بین مدل‌های

حیوانی و سلول انسان وجود دارد، و بنابراین مدل‌های بر اساس انسانی به خصوص برای تحقیقات قلبی عروقی مهم هستند (۲۶).

کشف اخیر فناوری iPSC انسان، و بهبود در روش تمایز iPSC در انواع سلول مرتبط با بیماری مانند کاردیومیوسیت‌ها (iPSC-CMs)^۱، سلول‌های ماهیچه‌ای نرم (iPSC-SMCs)^۲، و سلول‌های اندوتلیال (iPSC-ECs)^۳، یک فرصت غیرقابل پیش‌بینی برای تولید مدل‌های بر اساس سلول اختصاصی بیمار برای مدل‌سازی بیماری، غربالگری دارو، و رویکردهای اصلاحی فراهم کرده‌اند (۲۷، ۳۰، ۳۵). در واقع، پیشرفت‌های مهمی در فناوری iPSC-CM صورت گرفته است، که برای مدل کردن بیماری‌های تک‌ژنی به صورت آزمایشگاهی استفاده شده است (۳۴، ۳۷، ۳۸). بیماری‌هایی مانند LQT (LQTS1، LQTS2، LQTS3، LQTS8 یا سندرم تیموتی)، تاکی‌کاردی (ضربان بالای قلب) بطنی پلی‌مورفیک کاتکولامینرژیک (CPVT)^۴، HCM، ARVC/D، و DCM با استفاده از iPSC-CMs بیشتر روشن شده‌اند (۳۹، ۴۰، ۴۱). به خصوص، این فناوری ابزاری را فراهم کرده است که فیزیولوژی بیماری مریض را می‌تواند به صورت آزمایشگاهی مطالعه نماید (۲۹). ولی، میزانی که مطالعات از iPSCs بیمار استفاده می‌کنند می‌تواند هر فایده‌ای برای درک بهتر بیماری‌زایی CVD داشته باشد که هنوز مشخص نشده است (۴۴، ۴۵، ۵۳). به علاوه، تفسیر هر فنوتیپ مشاهده شده در یک سلول حاصل از iPSCs بیمار را فقط می‌توان با مقایسه با سلول‌های شاهد مناسب متوجه شد (۵۴). حتی در مطالعاتی که نزدیکان سالم به عنوان شاهد برای بیماران هم استفاده شده‌اند، تفاوت‌های فنوتیپی مشاهده شده، نتیجه تنوع طبیعی در ژنوم می‌باشند تا اینکه جهش‌های مرتبط با بیماری فرضی باشند (۲۹، ۵۸، ۵۹). بنابراین، مقایسه‌ای بین لاین‌های سلولی ایده‌آل خواهد بود، که فقط در رقم ژنتیکی (یعنی لاین‌های سلولی ایزوژنیک) متفاوت هستند. یک روش برای اطمینان از مقایسه،

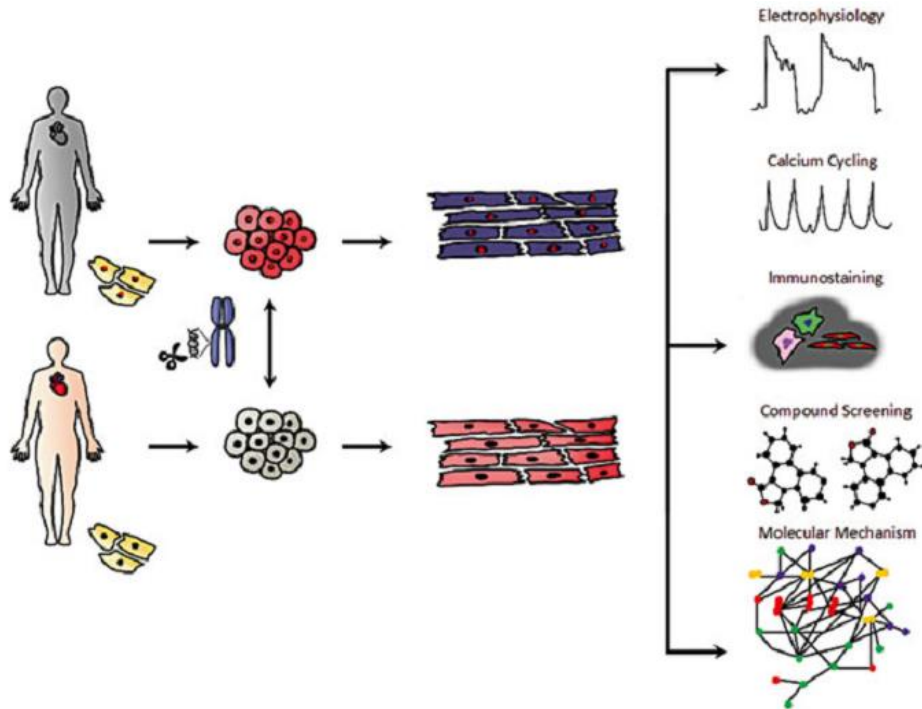
¹- Cardiomyocytes (iPSC-CMs)

²- Smooth Muscle Cells (iPSC-SMCs)

³- Endothelial Cells (iPSC-ECs)

⁴- Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia (CPVT)

استفاده از شاهد نوع وحشی ایزوژنیک و لاین‌های سلولی جهش‌یافته مشتق از ویرایش ژنومی اختصاصی، از همان لاین سلولی والدی می‌باشد (۶۰) (شکل ۲).



شکل ۲- استفاده از سلول‌های بنیادی پلوریپوتنت القا شده (iPSC) و فناوری‌های ویرایش ژنومی برای مدل‌سازی بیماری‌های قلبی عروقی

فناوری ویرایش ژنومی اختصاصی امکان برش دورشته‌ای هدفمند (DSB) DNA را در جایگاه کروموزومی مورد نظر ممکن می‌سازد. DSB ماشین ترمیم داخلی را برای اتصال پایانه غیرهمسان (NHEJ) یا ترمیم پایانه همسان (HDR) به کار می‌گیرند (۵۷، ۶۱، ۶۲). مسیر NHEJ اضافه یا حذف‌های تصادفی را در مکان DSB ایجاد می‌کند، ولی HDR توالی‌های DNA دهنده همسان را از کروماتیدهای خواهری، کروموزوم‌های همولوگ، یا الگوی DNA خارجی به کار می‌گیرد تا تغییر ژنتیکی دقیق را تولید کند. HDR و NHEJ برای جنبه‌های مختلف مهندسی ژنوم استفاده می‌شوند: NHEJ مخصوص غیرفعال‌سازی ژن

است، در حالی که HDR برای اضافه کردن، تصحیح، حذف یا جایگزینی دقیق ژن (۴۸)، (۶۳).

تاکنون، چهار رده اصلی نوکلئازهای برنامه‌ریزی شده شامل مگانوکلئازها و مشتقات آن‌ها، نوکلئازهای انگشت روی (ZFNs)، نوکلئازهای افکتور شبه فعال‌کننده رونویسی (TALENs) و خوشه‌های منظم درون پالیندروم‌های تکراری کوتاه (CRISPR/Cas) ایجاد شده‌اند که قادر به مهندسی ژنومی اختصاصی به صورت دقیق و قابل پیش‌بینی هستند (۶۷)، (۶۸). در واقع، ژن‌ها در جایگاه خاص وارد شده‌اند، و جهش‌های ژنی در مدل‌های بیماری قلبی عروقی بر اساس iPSC انسان وارد یا تصحیح شده‌اند (۷۷، ۸۵). مطالعات فراوانی از ویرایش ژنوم و فناوری‌های iPSC استفاده کرده‌اند که نه تنها مکانیزم زیستی CVD ژنتیک را مطالعه کنند بلکه درمان‌های اختصاصی برای این بیماری‌ها فراهم کنند (۶۶، ۸۶).

مدل‌سازی بیماری ژنتیکی قلب و عروق

کاردیومیوپاتی وراثتی

پیشرفت جذابی در زمینه تعریف علت‌شناسی بیماری کاردیومیوپاتی وراثتی شامل HCM، DCM، کاردیومیوپاتی محدودکننده (RCM)^۱، کاردیومیوپاتی نامتراکم بطن چپ (LVNC)^۲ و ARVC/D صورت گرفته است (۴۰، ۹۵). تا به حال، جهش‌های فراوانی در بیش از ۵۰ ژن که با بیماری‌زایی کاردیومیوپاتی وراثتی بوده است کشف شده است (۱۷). اگرچه تلاش‌ها برای تحلیل مولکولی نگرش‌های مهمی در مورد نقش ژنتیک در بیماری کاردیومیوپاتی بیان کرده است، مکانیزم مولکولی تحت HCM، DCM، RCM، LVNC و ARVC/D مشخص نشده است.

در سال‌های اخیر، فناوری iPSC-CM استفاده شده است تا بیماری کاردیومیوپاتی وراثتی را مدل کند. ولی یکی از محدودیت‌های اصلی که هنوز باقی مانده است تنوع حاصل از تفاوت‌های زمینه ژنتیکی بین لاین‌های iPSC است (۵، ۴۱). در یک مطالعه توسط وانگ

¹ Restrictive Cardiomyopathy (RCM)

² Left Ventricular Non-Compaction Cardiomyopathy (LVNC)

و همکاران، iPSC-CMs انسان از دو بیمار با سندرم بارث (BTHS)^۱، کاردیاک وابسته به X^۲ و میوپاتی میتوکندریایی اسکلتی^۳ حاصل از جهش ژن کدکننده تافازین (TAZ)^۴ تولید شد (۹۶، ۹۷). در این مطالعه از مکانیسم NHEJ با واسطه CRISPR/Cas9 استفاده شد تا در TAZ جهش ایجاد کرده و بیان کند که iPSC-CMs جهش یافته فنوتیپ مشابه iPSC-CMs اختصاصی سندرم بارث، شامل: محتوای کاردیولیپین نابالغ^۵، اعمال میتوکندری غیرطبیعی^۶، نقص ساختار سارکومر^۷ و استرس انقباضی افسردگی^۸ را نشان می‌دهد.

همچنین از فناوری ویرایش ژنومی نیز استفاده شد تا بیماری‌زایی DCM فامیلی را مطالعه کند. در یک مطالعه توسط کاراکیکس و همکاران، جهش p.R14del در ناحیه کدکننده ژن فسفولامبان (PLN)^۹ با ترمیم پایانه همسان بواسطه TALEN در iPSC اختصاصی بیمار تصحیح شد (۵۶). پس از تمایز در کاردیومیوسیت، فنوتیپ DCM در iPSC-CMs تصحیح شده با TALEN در مقایسه با سلول‌های جهش یافته PLN ایزوژنیک کاهش یافت، که شامل تعدیل حالت غیرطبیعی کاربرد Ca^{2+} ، عدم ثبات الکتریکی، و انتشار غیرطبیعی سیتوپلاسمی پروتئین PLN است.

اخیراً هینسون و همکاران، از iPSC و فناوری ویرایش ژنوم استفاده کردند تا بیماری‌زایی ارقام ژن تیتین (*TTN*)^{۱۰} را ارزیابی کنند (۵۷). در مطالعه آن‌ها از نوترکیبی همسان با واسطه CRISPR/Cas9 استفاده شد تا هم جهش‌های دگرمعنی یا تغییر چارچوب را در چند جایگاه ژن *TTN* وارد یا تصحیح کردند، که شامل چهار جهش بر پیوند A و دو جهش بر پیوند I اثر گذاشتند. با ترکیب تحلیل‌های عملکردی با توالی‌یابی RNA لاین‌های ایزوژنیک، آن‌ها بیان کردند که جهش‌های دامین پیوند A از ژن *TTN* باعث DCM

¹- Barth Syndrome (BTHS)

²- X-linked Cardiac

³- Skeletal Mitochondrial Myopathy

⁴- Tafazzin (TAZ)

⁵- Immature Cardiolipin Content

⁶- Abnormal Mitochondrial Functions

⁷- Impaired Sarcomere Organization

⁸- Depressed Contractile Stress

⁹- Phospholamban (PLN)

¹⁰- Titin (TTN)

می‌شود، اما در پیوند I قابل تحمل است. این مطالعه همچنین نشان داد که بیماری‌زایی DCM با القای *TTN* با نقص ساختار سارکومر، نقص پاسخ به تنش‌های مکانیکی، و سیگنالینگ بتا-آدرنرژیک غیرطبیعی^۱، مرتبط است.

کانل‌پاتی وراثتی^۲

سندرم QT طولانی (LQTS) یک بیماری اریتمی قلبی اکتسابی یا وراثتی است، که بیماران را برای اریتمیاس بطنی^۳ و مرگ قلبی ناگهانی^۴ آماده می‌کند (۹، ۱۰). جهش‌های ۱۳ ژن در بیماری‌زایی LQTS فامیلی به کار رفته است (۹۸). کانال‌های پتاسیم، ولتاژ خروجی شبه KQT از زیرخانواده Q^۵، عضو ۱ (*KCNQ1*; LQTS1)، ولتاژ خروجی مرتبط با *eag* از زیرخانواده H^۶ و عضو ۲ (*KCNH2*; LQTS2) عمومی‌ترین ژن‌های جهش‌یافته مرتبط با LQTS هستند. از آنجا که هر دو *KCNQ1* و *KCNH2* به صورت هموترامر عمل می‌کنند، مونومر جهش‌یافته یک اثر منفی غالب را با نقص تترامریزاسیون مونومرهای نوع وحشی نشان داد (۴۲).

در ۵ سال گذشته، LQTS1، LQTS2، LQTS3 و LQTS8 یا سندرم تیموتی با استفاده از iPSC-CMs مدل شده است (۴۷، ۴۸، ۴۹). ولی، این رویکرد را تا حدودی می‌توان محدود کرد زیرا به دست آوردن نمونه‌های بیمار با ارقام ژنتیکی مطلوب مشکل است (۹، ۹۹). مطالعه‌ای توسط وانگ و همکاران، بیان کرد که اولین قدم در تولید کاردیومیوسیت‌های انسانی این است که LQTS با درج ژن‌های جهش‌یافته در جایگاه (*AAVS1/PPP1R12C*) جمع گردد (۴۲، ۴۴). در مطالعه آن‌ها از ZFNs استفاده کردند تا یک کاست بیانی کدکننده یک واریانت بیماری‌زا را از *KCNQ1* و *KCNH2* در iPSCs نوع وحشی وارد کردند. *KCNH2* و *KCNQ1* جهش‌یافته وقتی که با شاهد ایزوژنیک

¹- Abnormal Beta-Adrenergic Signaling

²- Inherited Channelopathies

³- Ventricular Arrhythmias

⁴- Sudden Cardiac Death

⁵- Voltage-Gated KQT-like Subfamily Q

⁶- Voltage-Gated *eag*-related Subfamily H

iPSC-CMs مقایسه شدند، دوره عمل طولانی (APD)^۱ و غیرطبیعی بودن استعمال کلسیم را نشان دادند. این مطالعه یک رویکرد جایگزین برای استفاده از نمونه‌های بیمار واقعی را نشان داد و راه جدیدی برای مطالعه ارقام ژنتیکی ارائه کرد که اثرات منفی غالب را نشان می‌دهند.

مطالعه دیگری توسط بلین و همکاران، از یک رویکرد HDR استفاده کرد (بدون استفاده از نوکلئازهای اختصاصی) تا لاین‌های جهش‌یافته ایزوژنیک و نوع وحشی جهش دگرمعنی *KCNH2p.N996I* هتروزیگوت را تولید کنند (۱۰۰). این پژوهش جهش جریان الکتریکی بوسیله کانال *HERG (IKr)*^۲ و دوره پتانسیل عمل در iPSC-CMs را اصلاح نمود. همانطور که انتظار می‌رفت، ورود جهش ژنتیکی یکسان، *IKr* را کاهش داد و دوره پتانسیل عمل در iPSC-CMs را طولانی نمود. مطالعه آن‌ها بیان کرد که iPSC-CMs جهش‌یافته ایزوژنیک، کانال *KCNH2* کمتری را در غشا سلولی نسبت به iPSC-CMs نوع وحشی ایزوژنیک، بیان کرد. درمان بیماری با منع‌کننده پروتئازوم (Proteasomal Inhibitors)، لاکتاسیستین (Lactacystin) و لئوپتین (Leupeptin)، سطوح پروتئین *KCNH2* را روی غشا سلول در iPSC-CMs جهش‌یافته افزایش داد که نقش پروتئازوم را در بیماری‌زایی LQTS2 بیان می‌کند.

والولوپاتی وراثتی^۳

در دهه گذشته، نقص‌های مادرزادی دریچه آئورت که با عنوان دریچه آئورت دو لتی (BAV)^۴ شناخته می‌شود با فاکتور نسخه‌برداری متصل به غشا *NOTCH1 (NI)* مرتبط شده است. BAV در ۱-۲ درصد جمعیت رخ می‌دهد و به جای دریچه سه لتی نرمالی دریچه دو لتی دارد (۱۰۱). اگرچه این مکانیزم هنوز ناشناخته مانده است، ولی BAV یک عامل خطر اصلی برای کلسیفیکاسیون اولیه دریچه آئورت^۵ است، شرایطی که باز شدن

¹- Prolonged Action Potential Duration (APD)

²- Electrical Current Conducted by the HERG Channel (IKr)

³- Inherited Valvulopathies

⁴- Bicuspid Aortic Valve (BAV)

⁵- Early Aortic Valve Calcification

دریچه را ناقص کرده و مسئول بیش از ۱۰۰۰۰۰۰ پیوند دریچه در سال در ایالات متحده است.

مطالعه‌ای توسط تئودوریس و همکاران، دو خانواده را معرفی کرد که یک جهش بدون معنی^۱ هتروزیگوت *NI* را حمل می‌کردند، که مشکوک به BAV مادرزادی است (۱۰۲). در مطالعه آن‌ها از مکانیسم ترمیم HDR با واسطه TALEN استفاده شد تا جهش *NI* را در لاین‌های iPSC اختصاصی بیمار، تصحیح کند. در مقایسه iPSC-ECs جهش یافته ایزوژنیک و شاهد، سطوح mRNA *NI* تا حد ۳۰-۴۰ درصد در iPSC-ECs جهش یافته ایزوژنیک کاهش یافت، که نشان می‌داد که جهش *NI* یک اثر نامناسب روی بیماری‌زایی BAV دارد. پس از مواجهه iPSC-ECs ایزوژنیک با تنش برش، سلول‌های جهش یافته ایزوژنیک *NI* عدم تنظیم اپی‌ژنتیکی را نشان دادند، که منجر به سرکوب پنهان شبکه ژنی پرواستئوژنیک (سرطان‌های استخوانی)^۲ و پیش‌التهابی شد.

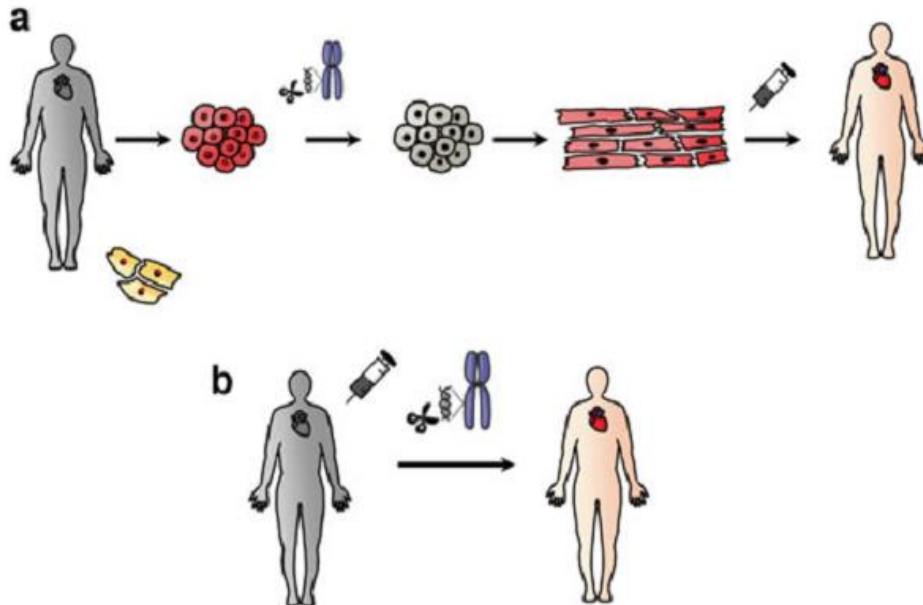
درمان فردی بیماری‌های ژنتیکی قلب و عروق

چالش‌های درمان مهندسی ژنومی

اگرچه انواع مختلف سلول توانایی‌های مجزایی برای تعمیر DSB دارند، فازهای مختلف چرخه سلولی انتخاب مسیرهای NHEJ یا HDR را اداره می‌کند. NHEJ ترمیم DNA را طی فازهای G1، S و G2 انجام می‌دهد، در حالی که HDR به اواخر فاز S و فاز G2 محدود می‌شود (۱۰۳، ۱۰۴). این تفاوت در فعالیت سلولی چالشی را در درمان بیماری‌هایی که نیاز به ترمیم DSB با HDR (تصحیح ژن یا ورود ژن) است را نسبت به ترمیم با واسطه NHEJ (غیرفعال‌سازی ژن)، ایجاد می‌کند. چند مطالعه بیان کرده‌اند که مداخله شیمیایی یا ژنتیکی مسیر NHEJ می‌تواند برای HDR مناسب باشد؛ ولی چنین دستورزی را به سختی می‌توان به کار گرفت و برای سلول مضر است (۱۰۵، ۱۰۶).

^۱- Nonsense Mutation

^۲- Pro-Osteogenic



شکل ۳- درمان فردی بیماری قلبی عروقی ژنتیکی (CVD).

استفاده بالقوه از فناوری ویرایش ژنوم در درمان قلبی عروقی را می‌توان به دو رویکرد تقسیم کرد: *in vitro* و *in vivo* انجام می‌شود. (a) با رویکردهای *in vitro*، فرایند ویرایش با لاین‌های iPSC کشت شده اختصاصی بیمار به دست می‌آید و این لاین‌های iPSC بعداً به سلول مورد نظر انسانی با استفاده از پروتکل‌های تثبیت شده، تمایز می‌یابند. این سلول‌های ویرایش شده را می‌توان به بیماران انتقال داد تا CVD خاصی را درمان کنیم. (b) درمان ویرایش ژنوم *in vivo* با نوکلئازهای قابل برنامه‌ریزی منتقل شده به بیمار به دست می‌آید که جهش‌های مورد نظر را تصحیح یا مختل کنند.

استفاده بالقوه از فناوری ویرایش ژنومی در درمان بیماری قلبی عروقی را می‌توان به دو رویکرد تقسیم کرد: شامل روش‌های آزمایشگاهی (*in vitro*) و روش‌های طبیعی (*in vivo*) انجام می‌شود. با رویکردهای طبیعی تثبیت شده، فرایند ویرایش در لاین‌های iPSC انسان به دست می‌آید، و این لاین‌های iPSC بعداً به سلول مورد نظر انسان تمایز می‌یابد، مانند iPSC-CMs یا iPSC-ECs، که از پروتکل‌های تمایز تثبیت شده استفاده می‌شود (شکل ۳). این سلول‌های تصحیح شده را می‌توان به بیماران انتقال داد تا CVD اختصاصی را

درمان کنیم (۳۱، ۳۴، ۳۷، ۳۸). در مقابل، درمان ویرایش ژنومی *in vivo* هنوز تا پیشرفت نهایی فاصله دارد. برای مثال، یک محدودیت این است که کاردیومیوسیت‌های بالغ در فاز G₀ متوقف شده‌اند، که در این فاز مکانیزم HDR غیرفعال و NHEJ بسیار محدود است. به علاوه، کاردیومیوسیت‌های بالغ همانندسازی بسیار اندکی دارند، بنابراین برای به دست آوردن اثرات درمانی، کارایی تغییر باید به اندازه کافی بالا باشد (۱۰۷). با وجود این، درمان با روش ویرایش ژنومی *in vivo* از نظر فنی در انواع سلول‌های موجود شامل هیپاتوسیت‌ها^۱ و سلول‌های ماهواره‌ای^۲، آسان‌تر است، زیرا این نوع سلول‌ها بهتر تکثیر شده و از لحاظ نظری می‌توانند با سلول‌های بیمار درونی رقابت کنند (۱۰۸، ۱۱۰).

اهداف کنونی برای درمان بوسیله ویرایش ژنومی *In Vivo*

غلظت کلسترول لیپوپروتئین با چگالی کم (LDL-C)^۳ در خون عامل تثبیت شده بسیاری از بیماری‌های عروق کرونر (CHD)^۴ است (۱۱۱). عوامل دارویی که سطوح LDL-C را کاهش می‌دهند، که استاتین^۵ نام دارند، هم‌اکنون مؤثرترین وسیله کاهش این نوع از بیماری قلبی می‌باشند. ولی، تعداد زیادی از بیماران نسبت به درمان با استاتین حساسیت دارند. امروزه PCSK9^۶ به عنوان عامل بیماری اتوزومی غالب FH شناخته شده است (۱۱۲). PCSK9 به خصوص در اندام شش، بیان و ترشح می‌شود و به عنوان آنتاگونیست برای LDLR عمل می‌کند. بنابراین، PCSK9 به عنوان هدف درمانی امیدبخش برای ممانعت از CHD شناخته شده است.

مطالعات نشان داده‌اند که افراد با جهش حذفی در PCSK9 کاهش معنی‌داری از میزان LDL-C و در نتیجه خطر CHD را تجربه کرده‌اند. چنانچه ممکن است انتظار رود، جهش‌های اضافه کردن میزان LDL-C را افزایش می‌دهد که به وقوع زود هنگام CHD در

¹- Hepatocytes

²- Satellite Cells

³- Low-Density Lipoprotein Cholesterol (LDL-C)

⁴- Coronary Heart Disease (CHD)

⁵- Statins

⁶- Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type 9 (PCSK9)

بیمارانی منجر می‌شود که دارای FH هستند. در سال ۲۰۱۵، یک آنتی‌بادی مونوکلونال هدفمند PCSK9 (آلیروکوماب)^۱ توسط سازمان غذا و دارو آمریکا برای درمان FH تأیید شد (۱۱۲). اگرچه این آنتی‌بادی نشان داده است که برای درمان FH مؤثر است، ولی اثرات آن بر LDL-C موقت است (۱۱۳). بیماران باید تزریقات را هر چند هفته دریافت کنند تا سطح مطلوب آنتی‌بادی مونوکلونال هدفمند PCSK9 ثابت بماند (۱۱۶، ۱۱۷).

مطالعه‌ای توسط دینگ و همکاران که از NHEJ با واسطه CRISPR-Cas9 استفاده کردند تا به صورت دائم ژن PCSK9 را در موش مختل نمایند. آن‌ها بیان کردند که بعد از ورود آدنووایروس برای بیان CRISPR-Cas9 که PCSK9 را در موش مورد هدف قرار داده بود، حداقل ۵۰ درصد آلل‌های PCSK9 در کبد تغییر کردند؛ این حالت منجر به کاهش معنی‌داری در مقدار PCSK9 پلاسما، و همچنین افزایش در سطوح LDLR هپاتیک و کاهش سطح LDL-C پلاسما از ۳۵ تا ۴۰ درصد شد. مطالعه آن‌ها اولین مطالعه‌ای است که پتانسیل مهندسی ژنومی را برای ممانعت از CVD به صورت *in vivo* بیان کرد.

اخیراً مطالعه‌ای توسط ران و همکاران، بیان کرد که آنزیم نوکلئاز Cas9 از باکتری *Staphylococcus aureus* (SaCas9) می‌تواند ژنوم را با راندمان مشابه Cas9 از باکتری *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) تغییر دهد، در حالی که با ژنی کد می‌شود که بیش از یک کیلو باز کوتاه‌تر است (۱۱۸). SaCas9 (حدود ۳/۳ کیلوباز) می‌تواند مهندسی ژنومی *in vivo* را با استفاده از ویروس مرتبط با آدنو (AAV) انجام دهد که در غیر این صورت با اندازه حمل محدودکننده AAV ممانعت می‌شود (حدود ۴/۵ کیلو باز) (۱۱۹). همین مطالعه از CRISPR/SaCas9 استفاده کرد تا ژن PCSK9 را در کبد موش مورد هدف قرار دهد. همانند مطالعه قبلی، بیش از ۴۰ درصد تغییر ژن مشاهده شده، که با کاهش معنی‌داری در سرم PCSK9 و مقدار کلسترول همراه شد. ارزیابی اثرات غیرهدف با توالی‌یابی کامل هیچ جهش حذف و اضافه را نشان نداد. این مطالعه پیشنهاد می‌کند که

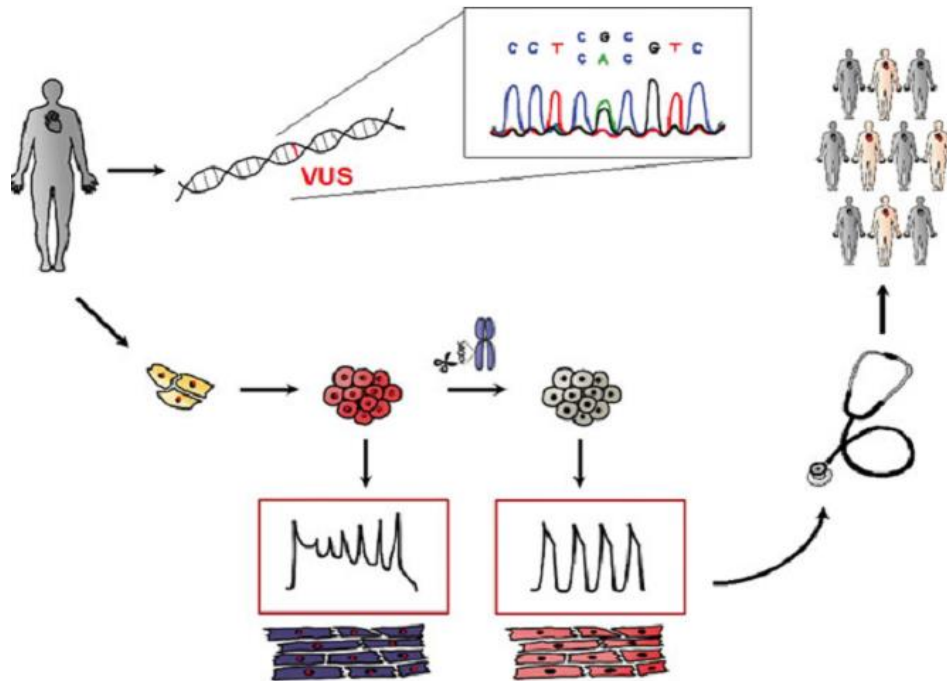
¹- Alirocumab

ویرایش ژنومی *in vivo* با استفاده از CRISPR/SaCas9 پتانسیل راندمان اختصاصیت بالایی را دارد.

نتیجه‌گیری و چشم‌انداز آینده

با راه‌اندازی پزشکی دقیق، فناوری‌های نوظهور مانند iPSC و ویرایش ژنومی توانستند تا ابزارهایی قوی برای مطالعه روابط ژنوتیپ و فنوتیپ فراهم کنند، تا خطرات قلبی عروقی بیماران و پاسخ آن‌ها به درمان را پیش‌بینی کنیم (۲). فناوری iPSC انقلابی برپا کرده و در حال تکامل است. از آنجا که ویرایش جهش‌ها در iPSC آسان‌تر شده است، دسترسی به اهمیت متغیرهای ژنتیکی روی نفوذ بیماری آسان خواهد شد (شکل ۴) (۹). فناوری ویرایش ژنومی به سرعت در حال پیشرفت است و کاربردهای جذابی را ارائه کرده است. ولی، چالش‌های مهمی باقیمانده است، که شامل: افزایش اختصاصیت و به حداقل رساندن اثرات غیرهدف، افزایش راندمان و بهبود انتخاب نواحی هدف‌گیری شده و روش‌های انتقال و به خصوص برای مهندسی ژنوم *in vivo* است. پالایش بیشتری برای کشف پتانسیل ویرایش ژنوم لازم است تا ابزار حیاتی درمان پزشکی دقیق آینده برای CVD باشد.

ما رؤیای آن را داریم که استفاده از مهندسی ژنومی برای تولید مدل‌های بیماری بر اساس سلول انسان یک رویکرد استاندارد در آزمایشگاه شود، که به محققین اجازه دهد که مکانیزم‌های مولکولی ارقام ژنتیکی را کشف کرده و راز CVD را برملا کنند. با وجود این، تاکنون بسیاری از موانع بدون راه حل باقی مانده است. سری داده‌ها بر اساس جمعیت برای شناسایی ارقام ژنتیکی جدید که به CVDs مربوط هستند ضروری هستند. بیوانفورماتیک ابزار مهمی برای تعیین رابطه بین ژنوتیپ و فنوتیپ است، زیرا بسیاری از بیماری‌های مورد سؤال چندژنی هستند. در نهایت، از نظر جنبه تشخیص ژنتیکی، تحقیق باید بر بهبود صحت، انعطاف پذیری و هزینه توالی‌یابی نسل بعدی تمرکز کند.



شکل ۴- چشم‌انداز آینده فناوری‌های ویرایش ژنومی در تحقیقات قلبی عروقی

منابع

- 1- Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, et al. 2015. Heart disease and stroke statistics 2015 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 131(4): e29-39322.
- 2- Collins FS, Varmus H. 2015. A new initiative on precision medicine. *N Engl J Med*. 372(9): 5-793.
- 3- Kathiresan S, Srivastava D. 2012. Genetics of human cardiovascular disease. *Cell*. 148(6): 57-1242.
- 4- O'Donnell CJ, Nabel EG. 2011. Genomics of cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 365(22): 109-2098.
- 5- Karakikes I, Termglinchan V, Wu JC. 2014. Human-induced pluripotent stem cell models of inherited cardiomyopathies. *Curr Opin Cardiol*. 29(3): 9-214.
- 6- Wigle ED, Rakowski H, Kimball BP, Williams WG. 1995. Hypertrophic cardiomyopathy. Clinical spectrum and treatment. *Circulation*. 92(7): 92-1680.
- 7- Dec GW, Fuster V. 1994. Idiopathic dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 331(23): 75-1564.
- 8- Corrado D, Thiene G. 2006. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: clinical impact of molecular genetic studies. *Circulation*. 113(13): 7-1634.
- 9- Sallam K, Li Y, Sager PT, Houser SR, Wu JC. 2015. Finding the rhythm of sudden cardiac death: new opportunities using induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Circ Res*. 116(12): 1989-2004.
- 10- Priori SG, Schwartz PJ, Napolitano C, Bloise R, Ronchetti E, Grillo M, et al. 2003. Risk stratification in the long-QT syndrome. *N Engl J Med*. 348(19): 74-1866.
- 11- Loeys BL, Schwarze U, Holm T, Callewaert BL, Thomas GH, Pannu H, et al. 2006. Aneurysm syndromes caused by mutations in the TGF-beta receptor. *N Engl J Med*. 355(8): 98-788.
- 12- Hobbs HH, Brown MS, Russell DW, Davignon J, Goldstein JL. 1987. Deletion in the gene for the low-density-lipoprotein

- receptor in a majority of French Canadians with familial hypercholesterolemia. *N Engl J Med.* 317(12): 7-734.
- 13- Goldstein JL, Brown MS. 2009. The LDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 29(4): 8-431.
 - 14- Brown MS, Goldstein JL. 1975. Lipoprotein receptors and genetic control of cholesterol metabolism in cultured human cells. *Naturwissenschaften.* 62(8): 9-385.
 - 15- Goldstein JL, Dana SE, Brunschede GY, Brown MS. 1975. Genetic heterogeneity in familial hypercholesterolemia: evidence for two different mutations affecting functions of low-density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 72(3): 6-1092.
 - 16- Sudhof TC, Goldstein JL, Brown MS, Russell DW. 1985. The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins. *Science.* 228(4701): 22-815.
 - 17- Wilson KD, Shen P, Fung E, Karakikes I, Zhang A, InanlooRahatloo K, et al. 2015. A rapid, high- quality, cost-effective, comprehensive and expandable targeted next-generation sequencing assay for inherited heart diseases. *Circ Res.* 117(7): 11-603.
 - 18- Lee DS, Pencina MJ, Benjamin EJ, Wang TJ, Levy D, O'Donnell CJ, et al. 2006. Association of parental heart failure with risk of heart failure in offspring. *N Engl J Med.* 355(2): 47-138.
 - 19- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. 2001. The sequence of the human genome. *Science.* 291(5507): 51-1304.
 - 20- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 409(6822): 860-921.
 - 21- Lohmueller KE, Pearce CL, Pike M, Lander ES, Hirschhorn JN. 2003. Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nat Genet.* 33(2): 82-177.

- 22- Consortium EP. 2012. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*. 489(7414): 57-74.
- 23- Cordell HJ, Topf A, Mamasoula C, Postma AV, Bentham J, Zelenika D, et al. 2013. Genome-wide association study identifies loci on 12q24 and 13q32 associated with tetralogy of Fallot. *Hum Mol Genet*. 22(7): 81-1473.
- 24- Cordell HJ, Bentham J, Topf A, Zelenika D, Heath S, Mamasoula C, et al. 2013. Genome-wide association study of multiple congenital heart disease phenotypes identifies a susceptibility locus for atrial septal defect at chromosome 4p16. *Nat Genet*. 45(7): 4-822.
- 25- Houser SR, Margulies KB, Murphy AM, Spinale FG, Francis GS, Prabhu SD, et al. 2012. Animal models of heart failure: a scientific statement from the American Heart Association. *Circ Res*. 111(1): 50-131.
- 26- Dixon JA, Spinale FG. 2009. Large animal models of heart failure: a critical link in the translation of basic science to clinical practice. *Circ Heart Fail*. 2(3): 71-262.
- 27- Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, et al. 2008. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol*. 26(1): 6-101.
- 28- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 131(5): 72-861.
- 29- Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Yamanaka S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat Protoc*. 2(12): 9-3081.
- 30- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 318(5858): 20-1917.
- 31- Burridge PW, Matsa E, Shukla P, Lin ZC, Churko JM, Ebert AD, et al. 2014. Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nat Methods*. 11(8): 60-855.

- 32- BurrIDGE PW, Keller G, Gold JD, Wu JC. 2012. Production of de novo cardiomyocytes: human pluripotent stem cell differentiation and direct reprogramming. *Cell Stem Cell*. 10(1): 16-28.
- 33- Karakikes I, Senyei GD, Hansen J, Kong CW, Azeloglu EU, Stillitano F, et al. 2014. Small molecule-mediated directed differentiation of human embryonic stem cells toward ventricular cardiomyocytes. *Stem Cells Transl Med*. 3(1): 18-31.
- 34- Lian X, Bao X, Zilberter M, Westman M, Fisahn A, Hsiao C, et al. 2015. Chemically defined, albumin-free human cardiomyocyte generation. *Nat Methods*. 12(7): 6-595.
- 35- Bajpai VK, Mistriotis P, Loh YH, Daley GQ, Andreadis ST. 2012. Functional vascular smooth muscle cells derived from human induced pluripotent stem cells via mesenchymal stem cell intermediates. *Cardiovasc Res*. 96(3): 391-400.
- 36- Dash BC, Jiang Z, Suh C, Qyang Y. 2015. Induced pluripotent stem cell-derived vascular smooth muscle cells: methods and application. *Biochem J*. 465(2): 94-185.
- 37- Adams WJ, Zhang Y, Cloutier J, Kuchimanchi P, Newton G, Sehrawat S, et al. 2013. Functional vascular endothelium derived from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Rep*. 1(2): 13-105.
- 38- Hu S, Zhao MT, Jahanbani F, Shao NY, Lee WH, Chen H, et al. 2016. Effects of cellular origin on differentiation of human induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells. *JCI Insight*. 1(8): 1-e85558.
- 39- Matsa E, Sallam K, Wu JC. 2014. Cardiac stem cell biology: glimpse of the past, present, and future. *Circ Res*. 114(1): 7-21.
- 40- Karakikes I, Ameen M, Termglinchan V, Wu JC. 2015. Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: insights into molecular, cellular, and functional phenotypes. *Circ Res*. 117(1): 8-80.

- 41- Matsa E, Burridge PW, Wu JC. 2014. Human stem cells for modeling heart disease and for drug discovery. *Sci Transl Med.* 6(239): 6-239.
- 42- Wang Y, Liang P, Lan F, Wu H, Lisowski L, Gu M, et al. 2014. Genome editing of isogenic human induced pluripotent stem cells recapitulates long QT phenotype for drug testing. *J Am Coll Cardiol.* 64(5): 9-451.
- 43- Egashira T, Yuasa S, Suzuki T, Aizawa Y, Yamakawa H, Matsushashi T, et al. 2012. Disease characterization using LQTS-specific induced pluripotent stem cells. *Cardiovasc Res.* 95(4): 29-419.
- 44- Moretti A, Bellin M, Welling A, Jung CB, Lam JT, Bott-Flugel L, et al. 2010. Patient-specific induced pluripotent stem-cell models for long-QT syndrome. *N Engl J Med.* 363(15): 409-1397.
- 45- Matsa E, Rajamohan D, Dick E, Young L, Mellor I, Staniforth A, et al. 2011. Drug evaluation in cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells carrying a long QT syndrome type 2 mutation. *Eur Heart J.* 32(8): 62-952.
- 46- Lahti AL, Kujala VJ, Chapman H, Koivisto AP, Pekkanen-Mattila M, Kerkela E, et al. 2012. Model for long QT syndrome type 2 using human iPS cells demonstrates arrhythmogenic characteristics in cell culture. *Dis Model Mech.* 5(2): 30-220.
- 47- Itzhaki I, Maizels L, Huber I, Zwi-Dantsis L, Caspi O, Winterstern A, et al. 2011. Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells. *Nature.* 471(7337): 9-225.
- 48- Davis RP, Casini S, van den Berg CW, Hoekstra M, Remme CA, Dambrot C, et al. 2012. Cardiomyocytes derived from pluripotent stem cells recapitulate electrophysiological characteristics of an overlap syndrome of cardiac sodium channel disease. *Circulation.* 125(25): 91-3079.
- 49- Yazawa M, Hsueh B, Jia X, Pasca AM, Bernstein JA, Hallmayer J, et al. 2011. Using induced pluripotent stem cells to investigate cardiac phenotypes in Timothy syndrome. *Nature.* 471(7337): 4-230.

- 50- Jung CB, Moretti A, Mederos y Schnitzler M, Iop L, Storch U, Bellin M, et al. 2012. Dantrolene rescues arrhythmogenic RYR2 defect in a patient-specific stem cell model of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *EMBO Mol Med.* 4(3): 91-180.
- 51- Novak A, Barad L, Zeevi-Levin N, Shick R, Shtrichman R, Lorber A, et al. 2012. Cardiomyocytes generated from CPVTD307H patients are arrhythmogenic in response to beta-adrenergic stimulation. *J Cell Mol Med.* 16(3): 82-468.
- 52- Asimaki A, Kapoor S, Plovie E, Arndt AK, Adams E, Liu ZZ, et al. 2014. Identification of a new modulator of the intercalated disc in a zebrafish model of arrhythmogenic cardiomyopathy. *Sci Transl Med.* 6(240): 74-240.
- 53- Kim C, Wong J, Wen J, Wang S, Wang C, Spiering S, et al. 2013. Studying arrhythmogenic right ventricular dysplasia with patient-specific iPSCs. *Nature.* 494(7435): 10-105.
- 54- Lan F, Lee AS, Liang P, Sanchez-Freire V, Nguyen PK, Wang L, et al. 2013. Abnormal calcium handling properties underlie familial hypertrophic cardiomyopathy pathology in patient-specific induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 12(1): 13-101.
- 55- Sun N, Yazawa M, Liu J, Han L, Sanchez-Freire V, Abilez OJ, et al. 2012. Patient-specific induced pluripotent stem cells as a model for familial dilated cardiomyopathy. *Sci Transl Med.* 4(130): 47-130.
- 56- Karakikes I, Stillitano F, Nonnenmacher M, Tzimas C, Sanoudou D, Termglinchan V, et al. 2015. Correction of human phospholamban R14del mutation associated with cardiomyopathy using targeted nucleases and combination therapy. *Nat Commun.* 6: 1-6955.
- 57- Hinson JT, Chopra A, Nafissi N, Polacheck WJ, Benson CC, Swist S, et al. 2015. Heart disease. Titin mutations in iPS cells define sarcomere insufficiency as a cause of dilated cardiomyopathy. *Science.* 349(6251): 6-982.

- 58- Wu H, Lee J, Vincent LG, Wang Q, Gu M, Lan F, et al. 2015. Epigenetic regulation of phosphodiesterases 2A and 3A underlies compromised β -adrenergic signaling in an iPSC model of dilated cardiomyopathy. *Cell Stem Cell*. 17(1): 89-100.
- 59- Davis J, Davis LC, Correll RN, Makarewich CA, Schwanekamp JA, Moussavi-Harami F, et al. 2016. A tension-based model distinguishes hypertrophic versus dilated cardiomyopathy. *Cell*. 165(5): 59-1147.
- 60- Musunuru K. 2013. Genome editing of human pluripotent stem cells to generate human cellular disease models. *Dis Model Mech*. 6(4): 896-904.
- 61- Kim H, Kim JS. 2014. A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nat Rev Genet*. 15(5): 34-321.
- 62- Rouet P, Smih F, Jasin M. 1994. Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. *Mol Cell Biol*. 14(12): 106-8096.
- 63- Boissel S, Jarjour J, Astrakhan A, Adey A, Gouble A, Duchateau P, et al. 2014. megaTALs: a rare-cleaving nuclease architecture for therapeutic genome engineering. *Nucleic Acids Res*. 42(4): 601-2591.
- 64- Smith J, Grizot S, Arnould S, Duclert A, Epinat JC, Chames P, et al. 2006. A combinatorial approach to create artificial homing endonucleases cleaving chosen sequences. *Nucleic Acids Res*. 34(22): e149.
- 65- Thierry A, Dujon B. 1992. Nested chromosomal fragmentation in yeast using the meganuclease I-Sce I: a new method for physical mapping of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res*. 20(21): 31-5625.
- 66- Thierry A, Perrin A, Boyer J, Fairhead C, Dujon B, Frey B, et al. 1991. Cleavage of yeast and bacteriophage T7 genomes at a single site using the rare cutter endonuclease I-Sce I. *Nucleic Acids Res*. 19(1): 90-189.

- 67- 67. Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD. 2010. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet.* 11(9): 46-636.
- 68- Urnov FD, Miller JC, Lee YL, Beausejour CM, Rock JM, Augustus S, et al. 2005. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature.* 435(7042): 51-646.
- 69- Bibikova M, Beumer K, Trautman JK, Carroll D. 2003. Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Science.* 300(5620): 1-764.
- 70- Bibikova M, Golic M, Golic KG, Carroll D. 2002. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics.* 161(3): 75-1169.
- 71- Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. 1996. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93(3): 60-1156.
- 72- Miller JC, Holmes MC, Wang J, Guschin DY, Lee YL, Rupniewski I, et al. 2007. An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol.* 25(7): 85-778.
- 73- Miller J, McLachlan AD, Klug A. 1985. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* 4(6): 14-1609.
- 74- Porteus MH, Baltimore D. 2003. Chimeric nucleases stimulate gene targeting in human cells. *Science.* 300(5620): 1-763.
- 75- Smith J, Bibikova M, Whitby FG, Reddy AR, Chandrasegaran S, Carroll D. 2000. Requirements for double-strand cleavage by chimeric restriction enzymes with zinc finger DNA-recognition domains. *Nucleic Acids Res.* 28(17): 9-3361.
- 76- Wolfe SA, Nekludova L, Pabo CO. 2000. DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 29: 183-212.

- 77- Ding Q, Lee YK, Schaefer EA, Peters DT, Veres A, Kim K, et al. 2013. A TALEN genome-editing system for generating human stem cell-based disease models. *Cell Stem Cell*. 12(2): 51-238.
- 78- Hockemeyer D, Wang H, Kiani S, Lai CS, Gao Q, Cassady JP, et al. 2011. Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nat Biotechnol*. 29(8): 4-731.
- 79- Miller JC, Tan S, Qiao G, Barlow KA, Wang J, Xia DF, et al. 2011. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol*. 29(2): 8-143.
- 80- Zhang F, Cong L, Lodato S, Kosuri S, Church GM, Arlotta P. 2011. Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription. *Nat Biotechnol*. 29(2): 53-149.
- 81- Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, et al. 2009. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*. 326(5959): 12-1509.
- 82- Christian M, Cermak T, Doyle EL, Schmidt C, Zhang F, Hummel A, et al. 2010. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*. 186(2): 61-757.
- 83- Li T, Huang S, Jiang WZ, Wright D, Spalding MH, Weeks DP, et al. 2011. TAL nucleases (TALNs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain. *Nucleic Acids Res*. 39(1): 72-359.
- 84- Mahfouz MM, Li L, Shamimuzzaman M, Wibowo A, Fang X, Zhu JK. 2011. De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci USA*. 108(6): 8-2623.
- 85- Moscou MJ, Bogdanove AJ. 2009. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*. 326(5959): 1-1501.
- 86- Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 339(6121): 23-819.

- 87- Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. 2013. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc.* 8(11): 308-2281.
- 88- Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, et al. 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science.* 315(5819): 12-1709.
- 89- Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. 2005. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology.* 151(8): 61-2551.
- 90- Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirzada ZA, et al. 2011. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature.* 471(7340): 7-602.
- 91- Garneau JE, Dupuis ME, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, et al. 2010. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature.* 468(7320): 67-71.
- 92- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. 2012. A programmable dual- RNA- guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 337(6096): 21-816.
- 93- Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, et al. 2013. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science.* 339(6121): 6-823.
- 94- Sapranaukas R, Gasiunas G, Fremaux C, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. 2011. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 39(21): 9275-9275.
- 95- Cahill TJ, Ashrafian H, Watkins H. 2013. Genetic cardiomyopathies causing heart failure. *Circ Res.* 113(6): 75-660.
- 96- Bione S, D'Adamo P, Maestrini E, Gedeon AK, Bolhuis PA, Toniolo D. 1996. A novel X-linked gene, G4.5, is responsible for Barth syndrome. *Nat Genet.* 12(4): 385-385.

- 97- Wang G, McCain ML, Yang L, He A, Pasqualini FS, Agarwal A, et al. 2014. Modeling the mitochondrial cardiomyopathy of Barth syndrome with induced pluripotent stem cell and heart-on-chip technologies. *Nat Med.* 20(6): 23-616.
- 98- Schwartz PJ, Crotti L, Insolia R. 2012. Long-QT syndrome: from genetics to management. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 5(4): 77-868.
- 99- Sinnecker D, Goedel A, Laugwitz KL, Moretti A. 2013. Induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: a versatile tool for arrhythmia research. *Circ Res.* 112(6): 8-961.
- 100- Bellin M, Casini S, Davis RP, D'Aniello C, Haas J, Ward-van Oostwaard D, et al. 2013. Isogenic human pluripotent stem cell pairs reveal the role of a KCNH2 mutation in long-QT syndrome. *EMBO J.* 32(24): 75-3161.
- 101- Garg V, Muth AN, Ransom JF, Schluterman MK, Barnes R, King IN, et al. 2005. Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. *Nature.* 437(7056): 4-270.
- 102- Theodoris CV, Li M, White MP, Liu L, He D, Pollard KS, et al. 2015. Human disease modeling reveals integrated transcriptional and epigenetic mechanisms of NOTCH1 haploinsufficiency. *Cell.* 160(6): 86-1072.
- 103- Heyer WD, Ehmsen KT, Liu J. 2010. Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu Rev Genet.* 44: 39-113.
- 104- Rothkamm K, Kruger I, Thompson LH, Lobrich M. 2003. Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol.* 23(16): 15-5706.
- 105- Maruyama T, Dougan SK, Truttmann MC, Bilate AM, Ingram JR, Ploegh HL. 2015. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nat Biotechnol.* 33(5): 42-538.
- 106- Shrivastav M, De Haro LP, Nickoloff JA. 2008. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res.* 18(1): 47-134.

- 107- Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabe-Heider F, Walsh S, et al. 2009. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science*. 324(5923): 98-102.
- 108- Cox DB, Platt RJ, Zhang F. 2015. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nat Med*. 21(2): 31-121.
- 109- Long C, McAnally JR, Shelton JM, Mireault AA, Bassel-Duby R, Olson EN. 2014. Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA. *Science*. 345(6201): 8-1184.
- 110- Yin H, Xue W, Chen S, Bogorad RL, Benedetti E, Grompe M, et al. 2014. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat Biotechnol*. 32(6): 3-551.
- 111- Ding Q, Strong A, Patel KM, Ng SL, Gosis BS, Regan SN, et al. 2014. Permanent alteration of PCSK9 with in vivo CRISPR-Cas9 genome editing. *Circ Res*. 115(5): 92-488..
- 112- Abifadel M, Varret M, Rabes JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, et al. 2003. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet*. 34(2): 6-154.
- 113- Cohen J, Pertsemlidis A, Kotowski IK, Graham R, Garcia CK, Hobbs HH. 2005. Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. *Nat Genet*. 37(2): 5-161.
- 114- Cohen JC, Boerwinkle E, Mosley Jr TH, Hobbs HH. 2006. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N Engl J Med*. 354(12): 72-1264.
- 115- Hooper AJ, Marais AD, Tanyanyiwa DM, Burnett JR. 2007. The C679X mutation in PCSK9 is present and lowers blood cholesterol in a Southern African population. *Atherosclerosis*. 193(2): 8-445.
- 116- Zhao Z, Tuakli-Wosornu Y, Lagace TA, Kinch L, Grishin NV, Horton JD, et al. 2006. Molecular characterization of loss-of-function mutations in PCSK9 and identification of a compound heterozygote. *Am J Hum Genet*. 79(3): 23-514.

- 117- Robinson JG, Farnier M, Krempf M, Bergeron J, Luc G, Averna M, et al. 2015. Efficacy and safety of alirocumab in reducing lipids and cardiovascular events. *N Engl J Med.* 372(16): 99-1489.
- 118- Ran FA, Cong L, Yan WX, Scott DA, Gootenberg JS, Kriz AJ, et al. 2015. In vivo genome editing using Staphylococcus aureus Cas9. *Nature.* 520(7546): 91-186.
- 119- Senis E, Fatouros C, Grosse S, Wiedtke E, Niopek D, Mueller AK, et al. 2014. CRISPR/Cas9- mediated genome engineering: an adeno-associated viral (AAV) vector toolbox. *Biotechnol J.* 9(11): 12-1402.
- 120- Cho SW, Kim S, Kim JM, Kim JS. 2013. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol.* 31(3): 2-230.
- 121- Kim Y, Kweon J, Kim A, Chon JK, Yoo JY, Kim HJ, et al. 2013. A library of TAL effector nucleases spanning the human genome. *Nat Biotechnol.* 31(3): 8-251.
- 122- Kim JS, Lee HJ, Carroll D. 2010. Genome editing with modularly assembled zinc-finger nucleases. *Nat Methods.* 7(2): 1-91.
- 123- Kim HJ, Lee HJ, Kim H, Cho SW, Kim JS. 2009. Targeted genome editing in human cells with zinc finger nucleases constructed via modular assembly. *Genome Res.* 19(7): 88-1279.
- 124- Kim Y, Kweon J, Kim JS. 2013. TALENs and ZFNs are associated with different mutation signatures. *Nat Methods.* 10(3): 1-185.
- 125- Kim S, Lee MJ, Kim H, Kang M, Kim JS. 2011. Preassembled zinc-finger arrays for rapid construction of ZFNs. *Nat Methods.* 8(1): 1-7.

استفاده از سیستم ویرایش ژنومی CRISPR-Cas9 در درمان بیماری دیابت

خلاصه

سلول‌های بنیادی پلورپوتونت انسانی (hPSCs) توانایی تشکیل انواع سلول‌های بدن را دارند، و این ویژگی آن‌ها را به عنوان یک منبع بالقوه عالی جهت تولید انسولین در سلول‌های بتای پانکراس برای درمان دیابت مستعد ساخته است. برای تولید این سلول‌ها به روش سیستم ویرایش ژنومی CRISPR-Cas9 در شرایط آزمایشگاهی نیازمند به درک کاملی از روند رشد طبیعی پانکراس هستیم. کریسپر به عنوان یک سیستم ایمنی اکتسابی در باکتری شناسایی شده است که با استفاده از یک RNA به توالی اختصاصی در ژنوم هدف متصل شده و تولید برش دورشته‌ای می‌نماید و نهایتاً بوسیله مکانیسم NHEJ یا HDR ترمیم می‌شود. در سال ۲۰۱۲ برای اولین بار تحقیقاتی به صورت کاملاً برنامه‌ریزی شده جهت برش توالی هدف بوسیله سیستم کریسپر به اجرا درآمد. به سرعت این روش بر

روی سایر موجودات مدل نیز مورد بررسی قرار گرفت همچنین مطالعاتی بر روی لاین‌های سلولی رویانی و سلول‌های تخصصی مانند سلول‌های بتای پانکراس نیز انجام شد.

اهمیت فناوری‌های ویرایش ژنومی در علوم پزشکی

سلول‌های بنیادی جنینی انسان (hESCs)^۱ سلول‌هایی با قابلیت چندگانه (پلوریپوتنت) هستند که در توده داخلی سلول‌های جنین از پیش جایگزین شده^۲ یافت می‌شوند. به خاطر ظرفیت نامحدود برای خودبازآرایی و توانایی تشکیل همه نوع سلول، hESCs منبع عالی از سلول‌های بالقوه برای پزشکی اصلاحی برای درمان بسیاری از بیماری‌ها شامل دیابت هستند. از آنجا که دیابت در اثر حذف سلول‌های بتا (β) تولیدکننده انسولین پانکراس ایجاد می‌شود، به سادگی با جایگزینی این سلول‌ها یک درمان بالقوه برای دیابت ارائه می‌شود. اگرچه پیشرفت بزرگی ایجاد شده است و پروتکل‌های حاضر به طور وسوسه‌انگیزی به هدف نهایی یعنی ایجاد سلول‌های β نزدیک شده‌اند ولی هنوز به طور کامل درک نشده‌اند، که احتمالاً به دلیل عدم ارزیابی سریع پروتکل، درک محدود از نمو پانکراس پستانداران طبیعی، و تفاوت‌های اساسی بلوغ سلول β بین موش و انسان است (۱، ۲). تولید لاین‌های سلولی hESC گزارشگر و موتانت به شدت به فهم بهتر ما از تمایز سلول β انسان کمک می‌کند و ما را به سمت هدف نهایی درمان دیابت با استفاده از سلول‌های درون‌ریز مشتق از سلول بنیادی سوق می‌دهد.

در گذشته ایجاد این لاین‌ها در hESC به دلیل میزان کم نوترکیبی همسان دشوار بود. ولی، گسترش روش‌های ویرایش ژنومی مانند: نوکلئازهای انگشت روی (ZFN)^۳، نوکلئازهای افکتور شبه فعال‌کننده رونویسی (TALENs)^۴ و خوشه‌های منظم درون پالیندروم‌های کوتاه تکراری (CRISPR/Cas)^۵ به تولید اختصاصی مکان برش در DNA دورشته‌ای اجازه می‌دهد تا کارایی نوترکیبی همسان را افزایش دهد (۳، ۵). تاکنون، محبوب‌ترین این روش‌ها

¹- human Embryonic Stem Cells (hESCs)

²- Inner Cell Mass of Preimplantation Embryos

³- Zinc-Finger Nucleases (ZFN)

⁴- Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALENs)

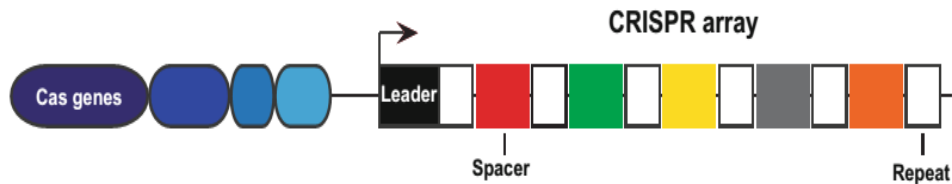
⁵- Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)

سیستم CRISPR-Cas بوده است که به دلیل سهولت نسبی، اختصاصیت و کارایی این روش می‌باشد. سیستم CRISPR-Cas از RNA استفاده می‌کند تا نوکلئاز Cas را به سمت توالی ژنوم هدف هدایت کند. سیستم ویرایش ژنومی CRISPR-Cas اولین بار در سیستم ایمنی اکتسابی باکتری کشف شد، به سرعت به عنوان ابزار ویرایش ژنوم پذیرفته شد و به یک اجبار برای هر محقق سلول بنیادی تبدیل شد.

شناسایی آرایه CRISPR

در سال ۱۹۸۷، یک ساختار غیرمعمول از DNA تکرارشونده بود که اولین بار در *E. coli* تشریح شد (۶). این توالی ژنومی شامل تکرارهای ۲۴ تا ۲۷ جفت‌بازی بود که دارای توالی‌های بینابینی منحصر به فردی با طول ۲۷ تا ۷۲ جفت‌باز بود و خوشه‌های منظم میان پالیندروم‌های کوتاه تکراری (CRISPR) توسط جانسون و همکاران در سال ۲۰۰۲ نامیده شد (۷). این تکرارها بیشتر در پروکاریوت‌ها بویژه در باکتری‌ها یافت شدند و تقریباً همه ژنوم‌های آرکئی باکترهای توالی‌یابی شده، این توالی‌ها را داشتند (۸). بر خلاف فراوانی آن‌ها، منبع و اهمیت این تکرارها یک راز ماند. اولین نشانه نقش زیستی آن‌ها حضور ژن‌هایی بود که دو آنزیم هلیکاز و هم پلی‌مراز را رمز می‌کردند، که پیشنهاد می‌کردند که ممکن است در تعمیر DNA نقش داشته باشند (۹).

در سال ۲۰۰۵، سه گروه تحقیقاتی مجزا کشف کردند که این توالی‌های جداکننده منحصر به فرد از ژنوم باکتریوفازهای مهاجم مشتق شده‌اند، که به این نظریه رسیدند که توالی‌ها قسمتی از سیستم ایمنی اکتسابی باکتری هستند که از میزبان علیه بیمارگر مهاجم با استفاده از مکانیزم تداخل RNA دفاع می‌کند (۱۰، ۱۲، ۱۳، ۱۵، ۱۶). هم اکنون مشخص شده است که وقتی DNA خارجی در سلول‌های پروکاریوتی یافت می‌شوند، سیستم CRISPR با تلفیق قطعات کوتاه DNA خارجی در کروموزوم میزبان در انتهای ۵' موقعیت CRISPR پاسخ می‌دهد و جداکننده حاصل به عنوان کارت‌های واکسیناسیون عمل می‌کند که به صورت ثبت ژنتیکی در اثر مواجهه پیشین با DNA خارجی عمل می‌کند (۱۷، ۱۸) (شکل ۱).



شکل ۱- ساختار آرایه CRISPR

توالی منحصر به فرد جداکننده (spacer) (جعبه‌های رنگی) مشتق شده از ژنوم فاژ که با تکرارهایی به طول ۲۴-۴۷ نوکلئوتید تفکیک شده‌اند. در مجاور آرایه‌های تکراری جداکننده، توالی‌های غنی از AT (جعبه سیاه) حاوی عناصر پروموتور و جایگاه‌های اتصال برای پروتئین‌های تنظیم‌کننده قرار دارد. پس از ورود ژنوم فاژ به درون باکتری، قطعات کوتاهی از DNA خارجی به عنوان توالی جداکننده به درون ژنوم باکتری در ناحیه انتهایی ۵' کریسپر تلفیق می‌شود

در یک تحقیق مشترک بین دانشگاه و صنعت براساس این فرضیه که توالی‌های تکراری DNA بخشی از سیستم ایمنی اکتسابی در باکتری‌ها، در اثر تعامل بین باکتری *Streptococcus thermophiles* با فاژهای جدا شده از ماست پدید آمده‌اند و پایش کشت‌های نتاج برای بررسی موتانت‌های مقاوم به باکتریوفاژ بررسی شد (۱۳). همه ۹ موتانت جدا شده دارای یک تا چهار توالی جداکننده جدید بودند که به انتهای توالی هدف اضافه شدند که از رشته سنس یا آنتی سنس DNA فاژ مشتق شده بودند. تعیین شد که توالی‌های جداکننده خاص برای مقاومت به آلودگی به صورت تفاوت‌های تک نوکلئوتیدی بین جداکننده و فاژ مقاومت را ایجاد نکردند. ورود با حذف توالی‌های جداکننده اختصاصی بیمارگر از جایگاه CRISPR منجر به مقاومت بهتر یا کمتر به آلودگی شد (۱۰). بنابراین، تعداد جداکننده در موقعیت CRISPR که همسان با توالی DNA مهاجم هستند، حساسیت میزبان به فاژ مهاجم را نشان می‌دهد. کشف این تکرارها و نقش ظاهری آن‌ها در سیستم ایمنی اکتسابی باکتری منجر به علاقه در مورد فهم ساختار و مکانیزم آن‌ها شده است (۱۱، ۱۴).

ساختار آرایه‌های CRISPR

موقعیت CRISPR تحت تاثیر گروهی از ژن‌های مرتبط با CRISPR تغییر می‌کند. یک مطالعه سیستماتیک که به دنبال بررسی پروتئین‌های مجاور موقعیت CRISPR بود تعیین نمود که کریسپر موقعیت بزرگ، ناهمگن و پیچیده‌ای دارد که دارای بیش از ۲۰ ژن Cas متفاوت است (۱۹). این ویژگی مشخص شده است که تکرارهای توالی‌های جداکننده با طول یکسان جدا شده‌اند و تعداد آن‌ها از چند عدد تا صدها می‌تواند متغیر باشد (۱۶، ۲۰، ۲۱). آرایه تکراری جداکننده، توالی غنی از AT را احاطه کرده‌اند که به نظر می‌رسد هم عناصر پروموتور و هم نواحی اتصال به پروتئین تنظیمی را دارند (۷، ۱۱، ۱۴). توالی‌های DNA خارجی که برای تلفیق انتخاب می‌شوند جداکننده اولیه^۱ نامیده می‌شوند و با موتیف‌های کنار جداکننده اولیه (PAMs) اختصاصی توالی احاطه می‌شود (۲۲، ۲۳، ۲۴).

به دلیل پیچیدگی و تنوع سیستم CRISPR-Cas، یک سیستم طبقه‌بندی دارای سه نوع اصلی (نوع I، II، III) بر اساس فیلوژنی ژن‌های cas، توالی/سازماندهی تکرارها، و ساختار بیان شد (۲۵). هر کدام از سه نوع اصلی سیستم‌ها از لحاظ نحوه ایمنی متفاوت هستند و بیش از یک نوع می‌تواند در یک زمان در موجود فعال باشد (۲۶). محدودیت فضایی این فصل از کتاب به ما اجازه می‌دهد فقط بر سیستم‌های نوع II و استفاده آن‌ها در ویرایش ژنومی تمرکز کنیم؛ ولی چند مرور نیز وجود دارد که انواع اصلی CRISPR را توضیح می‌دهد (۲۷، ۲۸).

سیستم نوع II فقط در باکتری‌ها یافت شده است و ساده‌ترین نوع، CRISPR میکروبی است (۲۸، ۳۰). فشرده‌ترین نوع فقط با چهار ژن cas است: cas1، cas2، cas9 و یا cas2 (نوع II-A یا cas4 (نوع II-B). Cas1 و Cas2 تنها پروتئین‌هایی هستند که به صورت عمومی در بین همه انواع سیستم‌های CRISPR-Cas محافظت شده هستند (۱۶، ۱۹). دو ویژگی معرف سیستم نوع II پروتئین بزرگ چند کاره Cas9 و لوازم RNA مرتبط با

¹ Protospacer

CRISPR چند فعالیتی (tracrRNA) است که در بالادست و رشته مخالف جایگاه CRISPR-Cas رمز می‌شود (۳۱).

مکانیزم ایمنی اکتسابی

سه مرحله ایمنی اکتسابی^۱ با واسطه CRISPR وجود دارند: ادغام جداکننده^۲، بلوغ crRNA، و تداخل^۳ (شکل ۲) (۳۰، ۳۲، ۳۳). ادغام جداکننده وقتی رخ می‌دهد که توالی کوتاه جداکننده اولیه DNA خارجی^۴ در آرایه CRISPR به عنوان جداکننده جدید وارد شود که به عنوان ثبت ژنتیکی آلودگی‌های قبلی عمل می‌کند (۱۸)؛ این مورد به توالی موتیف مجاور جداکننده اولیه (PAM) نیاز دارد (۱۳)، که شامل: یک توالی چهار تا پنج نوکلئوتیدی که به صورت مستقیم از سمت ۵' به سمت جداکننده بر روی رشته DNA هدف قرار گرفته است و در خود جداکننده واقع نشده است (شکل ۲، الف) (۱۰، ۱۵). توالی‌های PAM اولین بار به صورت توالی حفاظت شده در مجاورت جداکننده اولیه در DNA فاز کشف شدند که از تحلیل رایانه‌ای (*in silico*) استفاده شد و توالی PAM به نوع CRISPR-Cas بستگی دارد (۳۴). از توالی PAM برای تشخیص توالی خودی از غیرخودی با جدا کردن توالی‌های هدف از جداکننده CRISPR استفاده می‌شود زیرا جداکننده، حاوی توالی PAM، نیست (۳۵، ۳۶، ۳۷). به علاوه، توالی PAM برای اتصال مناسب با هدف لازم است (۱۴، ۳۸، ۳۹).

نیاز مستقیم به توالی PAM در سیستم CRISPR-Cas نوع II زمانی جلوگیری می‌کند از تجزیه DNA که توالی PAM باعث می‌شود که فازها سازگار شوند و در اثر این سازگاری از ایمنی CRISPR ممانعت کنند و همچنین وقتی که در توالی PAM جهش رخ دهد (۳۸، ۴۰، ۴۳).

¹- Adaptive Immunity

²- Spacer Acquisition

³- Interference

⁴- Protospacer Sequence of Foreign DNA

بعد از ادغام جداکننده و برای ایجاد ایمنی علیه بیمارگر، توالی‌های جداکننده باید بالغ شوند تا crRNA را تولید کنند. این فرایند به دو مرحله مجزا نیاز دارد (شکل ۲، ب): اول، جایگاه CRISPR به صورت پیش crRNA (pre-crRNA) رونویسی شود و دوم pre-crRNA به crRNA بالغ با آنزیم‌های اختصاصی Cas9 و RNase III فرآوری شوند. crRNA بالغ با tracrRNA هیبرید می‌شود تا یک dsRNA را تشکیل دهد که توسط RNase III طی بلوغ crRNA تجزیه می‌شود (۳۱). با حذف Cas9 از تولید crRNA جلوگیری می‌شود، Cas9 برای بلوغ crRNA لازم است ولی نقش دقیق آن در این فرایند شناخته شده نیست. همچنین طی مرحله بلوغ crRNA در ایمنی اکتسابی ژن‌های cas رونویسی و ترجمه می‌شوند (۳۱).

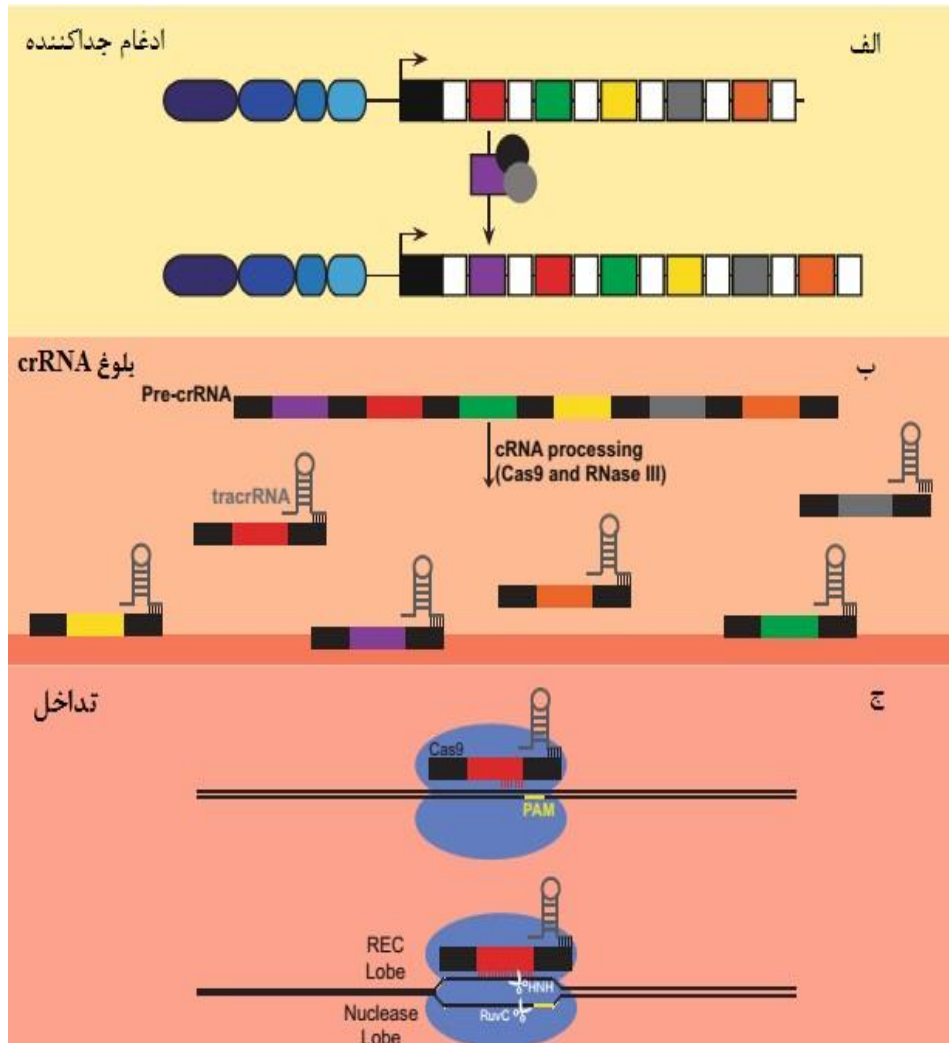
در نهایت، طی تداخل، crRNA بالغ پروتئین‌های cas را هدایت می‌کند تا نوکلئیک‌اسید مکمل را تجزیه کنند (شکل ۲، ج) (۳۳، ۴۰، ۴۵، ۴۶). در سیستم نوع II، این مورد شامل یک پروتئین تکی، Cas9 به همراه هترودوپلکس RNA دوتایی از tracrRNA و crRNA است (۳۱، ۴۰). Cas9 به هر دو crRNA بالغ و tracrRNA برای تجزیه DNA نیاز دارد که تداخل هدف رخ دهد و هر کدام از کمپلکس‌های crRNA:tracrRNA فقط هدفی را شناسایی می‌کنند که با توالی جداکننده‌ای دیکته می‌شود که حاوی آن است (۴۷، ۵۴).

موفقیت فاز تداخل ایمنی اکتسابی CRISPR به چند عامل نیاز دارد که شامل: بیان Cas9 است که نه تنها برای سنتز crRNA بلکه برای تداخل هدف هم لازم است. پروتئین Cas9 یک ساختار دو لبی^۱ دارد که شامل لوب شناسایی هدف و لوب نوکلئاز است که یک شیار با بار مثبت را در سطح مشترک دارد (۵۵). برای بررسی طبیعت دو لبی پروتئین Cas9، یک آنزیم تقسیم Cas9 ایجاد شد که لوب نوکلئاز و لوب شناسایی به صورت پپتید جداگانه بیان می‌شوند (۵۶). دو لوب با خودشان برهمکنش ندارند، ولی شیمیر crRNA:tracrRNA لازم و مناسب دیمر شدن لوب‌های نوکلئاز و شناسایی در یک

^۱ Bilobed Architecture

کمپلکس فعال هستند. در لوب نوکلئاز دو دامین وجود دارند: دامین HNH که مسئول تجزیه DNA رشته هدف و دامین شبه RuvC که DNA را روی رشته غیرهدف تجزیه می‌کند. تجزیه DNA در توالی جداکننده اولیه رخ می‌دهد تا یک محصول تجزیه با انتهای صاف را تولید کند (شکل ۲، ج) (۵۷).

اگرچه توالی PAM برای ادغام جداکننده لازم است، همچنین برای تداخل نیز لازم می‌باشد زیرا تجزیه DNA فقط وقتی رخ می‌دهد که یک توالی PAM روی DNA هدف وجود دارد، که باعث جفت شدن باز واتسون-کریک بین توالی crRNA:tracrRNA و توالی هدف مکمل آن شود. اگرچه Cas9 می‌تواند به صورت موقت و ضعیف با DNA در غیاب PAM واکنش دهد، ولی شاهی از سنجش‌های بر اساس تک مولکول پیشنهاد می‌کند که Cas9 ترجیحاً بیشتر با DNA با توالی PAM برهمکنش کرده و متصل می‌شود (۵۸، ۵۹). وقتی پروتئین Cas9 عامل محدودکننده برای تجزیه DNA توسط Cas9 است و توالی DNA با Cas9-RNA ای مورد سؤال واقع می‌شود که در توالی PAM شروع می‌شود و به صورت مستقیم به سمت انتهای دیگر توالی هدف پیش می‌رود، بنابراین توالی PAM برای ایمنی اکتسابی با واسطه CRISPR لازم است (۶۰).



شکل ۲- سه استراتژی ایمنی اکتسابی به روش CRISPR

سازگاری CRISPR-Cas نوع II برای ویرایش ژنومی

کشف یک سیستم تجزیه DNA بر اساس RNA در باکتری‌ها به سرعت برای ویرایش ژنومی سازگار شد با نام سیستم CRISPR-Cas نوع II از باکتری گرم مثبت *Streptococcus pyogenes*. عمومی‌ترین نوع سیستم کریسپر استفاده از RNA هدایت (gRNA) است که یک شیمیر RNA تکی است و با اتصال crRNA و tracrRNA

همچنین با اضافه کردن ۲۰ نوکلئوتید به انتهای ۵' (ناحیه جداکننده اولیه crRNA) تولید شده و برای هدایت Cas9 به یک ناحیه هدف خاص طراحی شده است. gRNA همچنین در انتهای ۳' هم طویل می‌شود تا فعالیت هدف‌گیری DNA را بهبود بخشد (۴۰). بنابراین، gRNA در این سیستم حدود ۱۰۰ نوکلئوتید طول با ۱۷ تا ۲۰ نوکلئوتید در انتهای ۵' است که توالی هدف DNA را اختصاصی می‌کند. ناحیه هدف با جفت شدن باز واتسون-کریک بین رشته gRNA و DNA هدف شناسایی می‌شود، و با شناسایی توالی PAM آنزیم Cas9 یک شکست دورشته‌ای (DSB) را ایجاد می‌کند (۱۶، ۴۰).

DSB که تولید می‌شود به یکی از این دو روش ترمیم می‌شوند: اتصال پایانه‌های غیر همسان (NHEJ) یا تعمیر پایانه‌های همسان همولوژی (HDR). DSB که با NHEJ تعمیر می‌شود، وقتی که شکست در یک چارچوب خوانش باز (ORF)^۱ رخ می‌دهد، می‌تواند جهش‌های افزایش یا کاهش (Indel) را القا کنند. برای HDR، یک توالی DNA الگو با بازوی همسان لازم است و می‌تواند به کوتاهی ۱۰ تا ۳۰ نوکلئوتید باشد (۶۱، ۶۲، ۶۳، ۶۴). زمانیکه از فناوری ویرایش ژنومی استفاده می‌کنیم، باید میزان راندمان هدف‌گیری را در نظر بگیریم، که به شدت به نوع سلول مورد هدف و جایگاه ژنومی هدف بستگی دارد (۶۶). چند مطالعه که یک جایگاه را مورد هدف قرار داده بودند از سیستم TALEN و CRISPR-Cas9 به صورت همزمان استفاده کردند که مشخص شد فناوری CRISPR مناسب‌تر است (۶۷). اگرچه گزارش شده است که وقتی که از TALEN استفاده می‌شود متیلاسیون DNA، کارایی را کاهش می‌دهد، ولی گزارش‌های محدودی پیشنهاد کرده‌اند که CRISPR-Cas9 ممکن است به متیلاسیون DNA حساس نباشند (۶۹). برای افزایش کارایی عملکرد HDR، می‌توان از کمپلکس‌های Cas9/guide RNA از پیش طراحی شده استفاده نمود. به علاوه، تولید KO (ناک‌اوت) با روش ترمیم NHEJ با استفاده از ساختار gRNA تغییر یافته با یک دوپلکس طویل شده و جهش چهارمین تیمین به سیتوزین یا گوانین بهبود می‌یابد (۶۸، ۷۰).

^۱ - Open Reading Frame (ORF)

کاهش خطر جهش‌زایی غیرهدف با استفاده از سیستم CRISPR-Cas9

یک ملاحظه مهم در زمان ویرایش ژنومی اختصاصیت هدف‌گیری است زیرا اتصال آنزیم‌های Cas9 در نواحی غیرهدف ژنوم می‌تواند منجر به شکست دورشته‌ای و ایجاد جهش شود. از آنجا که CRISPR-Cas9 فقط به اتصال یک RNA نیاز دارد تا یک شکست دورشته‌ای را ایجاد کند، یک شانس جهت اتصال نادرست به توالی هدف وجود دارد (۷۱). اختصاصیت سیستم‌های ویرایش CRISPR-Cas9 و TALEN با هدف‌گیری ژن GFP در جایگاه AAVS1 سپس با توالی‌یابی کل ژنوم مقایسه شدند، که تعیین نمود سیستم ویرایش ژنومی CRISPR-Cas9 نه تنها کارآمد است بلکه اختصاصیت بالاتری نیز نسبت به TALEN دارد (۷۲). این مورد با سایر مطالعات مطابقت داشت که تعیین می‌کرد که جهش‌های غیرهدف با Cas9 بسیار نادر هستند (۷۳). میزان جهش‌زایی هم بعداً مطالعه شد که از روش GUIDE-seq (شناسایی کل ژنوم بدون DSBs با استفاده از توالی‌یابی) استفاده شد، که شامل توالی‌یابی الیگو دنوکسی نوکلئوتیدهای دورشته‌ای هستند که در DSBs شرکت داشته‌اند و توسط Cas9 تولید شده‌اند (۷۴). با استفاده از این رویکرد محققین ۱۳ grNA مختلف را در سلول‌های انسان بررسی کردند و اتصالات غیرهدف را تعیین کردند که نشان دادند به شدت به توالی grNA بستگی دارد (۷۵، ۷۶).

داده‌های CHIP-seq حاصل از ۱۲ grNA و یک آنزیم Cas9 جهش‌یافته (dCas9) بیان کرد که اتصال غیرهدف از کمتر ۱۰ تا بیش از هزار نوکلئوتید فرق می‌کرد و به هر دو grNA و ناحیه ژنومی ۳' توالی PAM بستگی دارد (۷۷). برای تعیین اینکه آیا این اتصال برای ایجاد جهش مناسب است یا خیر، محققین یک توالی‌یابی کامل ژنومی را با استفاده از شکل فعال Cas9 انجام دادند و دریافتند که اگرچه بعضی از نواحی غیرهدف، جهش حذف یا اضافه داشتند، ولی فراوانی جهش‌ها به صورت معنی‌داری در مقایسه با آن‌هایی که در نواحی هدف مورد نظر هستند، کاهش یافته است (۷۹). این یافته که اتصال غیرهدف ممکن است منجر به اختلال نشود، به این نظریه ختم شد که یک مدل دو حالتی داریم به این صورت که تک نوکلئوتید موجب اتصال می‌شود ولی برای برش نیازمند به اتصال گسترده‌تری می‌باشیم (۷۸). موافق با این مطلب، ردیابی ذره‌ای Cas9 تعیین کرد که اتصال

غیرهدف در سلول‌های زنده کوتاه است و Cas9 توالی غیرهدف را متناسب با نوع توالی تجزیه می‌کند و نسبت به تعداد، موقعیت و نوکلئوتیدهای جفت نشده بین gRNA و توالی هدف حساس است (۸۰).

از آنجا که فعالیت غیرهدف Cas9 به gRNA وابسته است، باید دقت شود که توالی‌های هدف خاص را در ژنوم انتخاب کنیم، همچنین چندین ابزار مختلف نیز در وب سایت‌ها وجود دارد که به انتخاب توالی‌های هدف کمک می‌کند (۸۱). مدل‌های ابتدایی پیشنهاد کردند که هفت باز اولیه توالی gRNA برای اتصال مهم‌اند، ولی توالی‌یابی با عملکرد بالا^۱، پیشنهاد کرد که برای طراحی gRNA، باید به ۱۲ جفت بازی که نزدیک به توالی PAM است توجه خاصی نمود (۸۰، ۸۲، ۸۵). با استفاده از gRNA ناقص با طول کمتر از ۲۰ نوکلئوتید می‌توان جهش‌زایی غیرهدف را تا ۵۰۰۰ برابر کاهش داد ولی احتمالاً فعالیت کاهش می‌یابد (۸۶، ۸۷). به علاوه، غلظت gRNA را می‌توان کمتر کرد تا اثرات غیرهدف را به حداقل برسانیم، زیرا غلظت‌های بالای gRNA می‌تواند به تجزیه توالی غیرهدف یا عدم جفت شدگی منجر گردد (۷۴، ۸۸).

عامل دیگر برای طراحی هدفمند حضور توالی PAM است، زیرا به دلیل فراوانی آن‌ها در طول ژنوم و اتصال اشتباه gRNA احتمال تجزیه توالی غیرهدف را افزایش می‌دهد (۵۸). برای بررسی این مورد، مقایسه هم‌زمان آنزیم Cas9 از باکتری *Streptococcus pyogenes* که از توالی PAM "NGG" استفاده کرد و باکتری *Streptococcus thermophilus* که به PAM بلندتری نیاز داشت صورت گرفت (۸۹). اگرچه این دو آنزیم برای تجزیه هدف قابل مقایسه بودند، ولی Cas9 که به توالی PAM طولانی‌تری نیاز داشت به صورت معنی‌داری جهش‌زایی غیرهدف را کاهش داد (۹۰، ۹۱، ۹۲). بررسی بیشتر آنزیم‌های Cas9 یا طراحی بهبودیافته gRNA در آینده هم ممکن است خطر شناسایی توالی غیرهدف Cas9 را کاهش دهد. برای بهبود اختصاصیت، یک آنزیم نیکاز که فقط یک رشته DNA را برش می‌دهد را می‌توان استفاده کرد، مانند آنزیم Cas9D10A که دارای

¹ High-Throughput Sequencing

یک جهش در دامین‌های RuvC است که به DNA آسیب نمی‌رساند ولی به اندونوکلاز تک‌رشته‌ای منجر می‌شود و به شدت اختصاصی است (۹۳). استفاده از دو آنزیم نیکاز اثرات غیرهدف را از ۵۰ تا ۱۵۰۰ برابر در لاین‌های سلولی کاهش می‌دهد. اما، با این روش پرهزینه‌تر از آن است که دو توالی PAM را در مجاورت یکدیگر پیدا کنیم (۹۷). یک روش مشابه استفاده از RNA است که دو آنزیم نوکلئاز FokI را هدایت می‌کند که باید قبل از برش دایمریزه شود (۹۵). در این روش، وقتی که از تحلیل توالی‌یابی کامل استفاده شود، جهش‌زایی توالی غیرهدف را به سطح غیرقابل ردیابی کاهش می‌دهد و به اختصاصیت بیش از ۱۴۰ برابر در سلول‌های انسان منجر می‌شود (۹۴). همچنین این روش استفاده شده تا نواحی ژنومی بزرگ از ۱۰ کیلو تا ۱۵ مگابازی را با روش میکروآینجکشن در زیگوت موش حذف کند (۹۶).

استفاده جایگزین از سیستم CRISPR-Cas9

از سیستم CRISPR-Cas9 می‌توان جهت فعال یا غیرفعال نمودن رونویسی استفاده نمود (۹۸). بیان ژن‌های انسانی را می‌توان با استفاده از یک dCas9 متصل به دامین فعال‌سازی رونویسی VP64 (4xVP16) افزایش داد (۹۹). در حالت مشابه، سیستم CRISPR-On از RNA استفاده می‌کند تا dCas9 متصل به 3xVP16 (dCas9-VP48) را به درون سلول هدف هدایت کند این سیستم برای فعال‌سازی ژن‌های گزارشگر مناسب است (۱۰۰). با استفاده از تغییردهندگان اپی‌ژنتیکی، مانند هیستون استیل ترانسفراز^۱ p300، می‌تواند القای رونویسی dCas9-VP64 را افزایش داد (۱۰۱، ۱۰۲). در حالت معکوس، می‌توان رونویسی را با استفاده از dCas9 متصل به دامین سرکوبگر KRAB سرکوب نمود، که از RNA پلیمراز متصل به توالی‌های پروموتور ممانعت می‌کند یا به صورت یک خاتمه‌دهنده رونویسی با بلوک کردن RNA پلیمراز عمل می‌کند. مطالعات بیشتر پیشنهاد می‌کند که دامین سرکوبگر dCas9-KRAB، H3K9me3 را در نواحی افزایش‌دهنده القا می‌کند، که منجر به محدودیت دسترسی به توالی‌های ژنومی می‌گردد. این سیستم حتی نسبت به جفت

^۱- Histone Acetyltransferase

نشدن اندک هم حساس است، که آن را نسبت به سرکوب رونویسی ژن مورد نظر، اختصاصی می‌کند. از سوی دیگر، بیان ژن‌ها را نیز می‌توان با استفاده از CRISPRi خاموش نمود، که در این روش می‌توان از dCas9 استفاده کرد تا رونویسی را در اثر تداخل با طویل شدن رونویسی (اتصال به RNA پلیمراز) یا اتصال به فاکتورهای نسخه‌برداری (TF)^۱ ممانعت کند (۱۰۳، ۱۰۴). از این روش‌ها نیز برای القا یا سرکوب در مقیاس ژنوم استفاده می‌شود و کتابخانه‌هایی تا ۱۰ gRNA در هر TSS تولید شده است (۱۰۵).

برای کنترل شرطی سیستم CRISPR-Cas، یک شکل فعال‌شونده نوری از آنزیم Cas9 با یک آمینواسید لیزین که Cas9 را غیرفعال نگه داشته است، تولید شد (۱۰۶). پس از مواجهه با نور، Cas9 فعال شد. روش القاپذیر دیگر ویرایش ژنومی با نام iCRISPR شامل، بیان القاپذیر دئوکسی‌سایکلین Cas9 در سلول‌های hESC می‌باشد. با انتقال هر gRNA، حذف دو یا سه ژن ایجاد می‌شود که یک الگو ssDNA را فراهم می‌کند (۱۰۷). یک لاین سلولی hESCs با اضافه شدن ریکامیناز Flpe-ERT2 به جایگاه AAVS1 حذف القایی را ایجاد کرد: آگزون مورد نظر با نواحی Flp/FRT با استفاده از CRISPR-Cas9 احاطه شد، و بعد از اضافه شدن 4-OHT، آنزیم فلیپاز به هسته وارد شد و آگزون احاطه کننده frt را حذف کرد (۱۰۸).

در تحقیق دیگری برای کشف سایر پروتئین‌های Cas که منجر به هدف‌گیری همزمان می‌شوند، پروتئین Cas9 از *Neisseria meningitides* یافت شده که سلول‌های انسانی و باکتریایی را با راندمان بالایی هدف قرار می‌دهد (۹۰). در جستجوی یک پروتئین Cas9 کوچک برای بسته‌بندی در یک ناقل ویروسی مرتبط با آدنو (AAV)، شش ارتولوگ Cas9 دیگر نیز بررسی شدند که پروتئین Cas9 از باکتری *Staphylococcus aureus* از میان آن‌ها مناسب‌تر بود (۱۰۹). با استفاده از این روش، محققین ژن Pcsk9 را مورد هدف قرار داده و به حذف و اضافه‌هایی بیشتر از ۴۰ درصد در سلول‌های کبد در یک هفته پس از یک انتقال ناقل AAV رسیدند. در نهایت، مطالعه دیگری یک خانواده متفاوت از پروتئین‌ها را

¹- Transcription Factor

بررسی کرد که حاوی ۱۶ عضو با نام Cpf1 بودند. دو تا از این پروتئین‌ها از *Acidaminococcus* و *Lachnospiraceae* یافت شدند که ژنوم سلول‌های انسان را با راندمان بالا ویرایش کردند. ولی، آن‌ها از سایر پروتئین‌های Cas9 متفاوت بودند زیرا به tracrRNA نیاز نداشتند، یک PAM غنی از T داشتند، و DNA را با یک برش دورشته‌ای شطرنجی قطع می‌کردند و تولید انتهای چسبنده می‌نمودند که می‌توانست کارایی درج شدن در DNA را افزایش دهد (۱۱۰، ۱۱۱). انتقال این پروتئین‌های Cas همچنین برای هدف‌گیری چندگانه مناسب است که شامل هدف‌گیری سلول‌های مغز، کبد و سلول‌های ایمنی می‌شود (۱۱۲، ۱۱۳).

استفاده از فناوری CRISPR-Cas9 در موجودات مدل

درک ما از زیست‌شناسی سلولی پایه و مراحل نمو جنین با مطالعه موجودات مدل و مکانیسم ویرایش ژنومی کمک کرده است تا ژن‌های جدید را در فرایندهای نمو شناسایی کنیم. همچنین از مکانیسم ویرایش CRISPR-Cas در سلسله گیاهی نیز استفاده شده است تا ژنوم آرابیدوپسیس، توتون، سورگوم، برنج و پرتقال را تغییر دهد (۱۱۴). در مخمر *Saccharomyces cerevisiae*، بیان دائمی Cas9 با بیان موقت gRNA همراه شد و میزان نوترکیبی همسان را تا حدود ۱۰۰ برابر افزایش داد (۱۱۵). همچنین دو سویه تراژن مگس *Drosophila* تولید شدند که Cas9 با استفاده از U6 یا پروموتور *nanos* بیان شد، و منجر به القای جهش در حدود ۶۰ درصد از نتاج گردید. در حالت مشابه، نماتد *Caenorhabditis elegans* هم مورد هدف واقع شد (۱۱۶، ۱۱۷). علاوه بر این، از مکانیسم CRISPR-Cas9 در ماهی زبرافیش نیز استفاده شد تا حذف، معکوس‌شدگی کروموزومی یا تغییرات دوآلی را ایجاد کند و چند ژن با راندمان کوچکتر با سایر روش‌های ویرایش ژنوم مورد هدف واقع شدند (۱۱۸، ۱۱۹، ۱۲۰). در پستانداران نیز CRISPR-Cas استفاده شد تا با انتقال همزمان mRNA Cas9 و gRNA، پنج ژن را که کارایی بالایی در جنین موش داشتند مورد هدف قرار دهند (۱۲۱). در حالت مشابه، میمون‌های cynomolgus با انتقال همزمان mRNA Cas9 و gRNA در یک مرحله تک‌سلولی

جنین‌زایی، مورد هدف واقع شدند (۱۲۳، ۱۲۴). استفاده از سیستم CRISPR-Cas9 در موجودات مختلف اهمیت ویرایش ژنومی را در بسیاری از برنامه‌های تحقیقاتی مشخص نموده است (۱۲۲).

تولید سلول‌های بتا (β) از سلول‌های بنیادی پلورپوتنت انسانی برای درمان دیابت

رویکردهای ژن درمانی در علوم پزشکی برای تولید سلول‌های قابل پیوند در درمان بیماری‌ها نشان داده است که امید بیشتری در بعضی از بیماری‌ها مانند دیابت^۱ وجود دارد. دیابت حاصل از حذف یا عملکرد ناقص سلول‌های β پانکراس^۲ است که در جزایر لانگرهانس^۳ واقع شده‌اند. در سال ۲۰۰۰، شاپیرو و همکاران، یک درمان سرکوبگر ایمنی‌عاری از گلوکوکورتیکوئید^۴ را برای پیوند جزایر لانگرهانس تشریح کردند که مستقل از انسولین در بیماران با دیابت نوع I است (۱۲۵). فواید پیوند جزایر لانگرهانس شامل: کاهش پیچیدگی ثانویه و کمبود جزایر دهنده لانگرهانس انسانی که تحقیقات در این زمینه را برای افزایش تولید تعداد سلول‌های β قابل پیوند، تشویق می‌نماید. یک رویکرد بالقوه، تمایز سلول‌های بنیادی جنینی انسان (hESC) است (۱۲۶، ۱۲۹). پروتوکل‌های تمایز جدید که منجر به تولید سلول‌های پیشرو درون‌ریز^۵ می‌شوند که پس از پیوند به موش‌های دارای نقص ایمنی، کاملاً به سلول‌های β ترشح‌کننده انسولین، متمایز می‌شوند. آموزه ما قادریم که سلول‌های درون‌ریز نابالغ را در محیط کشت تولید کنیم، اما در حال حاضر هیچ پروتوکلی برای تولید سلول‌های β ترشح‌کننده انسولین حساس به گلوکز به صورت آزمایشگاهی (*in vitro*) موفق نبوده است (۱، ۲). برای تولید سلول‌های بالغ جهت پیوند به صورت آزمایشگاهی، ما به فهم دقیقی از شبکه‌ی نمو نیاز داریم که تشکیل سلول‌های β پانکراس را تنظیم می‌کند.

¹- Diabetes

²- Pancreatic β -cells

³- Islets of Langerhans

⁴- Glucocorticoid Free

⁵- Endocrine Progenitor Cells

روش‌های نوین ویرایش ژنومی مانند CRISPR-Cas9 فرصت بزرگی را برای درک بهتر ما از این فرایند فراهم نموده است. طبق روش مرسوم، هدف‌گیری سلول‌های پلورپوتنت بسیار دشوار بود زیرا به نوترکیبی همسان نیاز داشت و این یک واقعه نادر در سلول‌های بنیادی پلورپوتنت انسان است (۵، ۱۳۰). اما امروزه، استفاده از CRISPR-Cas9 کارایی هدف‌گیری در سلول‌های بنیادی پلورپوتنت القا شده (iPSC)^۱ را ۲ تا ۴ درصد بهبود بخشید و این مورد با استفاده از نشانگرهای فلورسنت برای انتخاب سلول‌های بیان‌کننده Cas9 از ۵۱ تا ۷۹ درصد افزایش داشت، که ایجاد لاین‌های ناک‌این یا ناک‌اوت^۲ را در تحقیقات سلول‌های بنیادی آسان‌تر می‌کند (۶۵، ۱۳۱).

اولین گام در اجرای پروتکل تمایز در هر نوع سلول سوماتیکی، از دست رفتن بیان ژن‌های پلورپوتنت مانند: OCT4، SOX2 و NANOG است (شکل ۳). OCT4/POU5F1 یک عضو مهم شبکه پلورپوتنسی است زیرا حذف Oct4 در جنین موش منجر به حذف سلول‌های پلورپوتنت می‌شود، و Oct4 برای تشکیل ژرم‌لاین جنینی به صورت آزمایشگاهی و طبیعی (*in vivo*) لازم است (۱۳۲، ۱۳۳). با توجه به نقش مهم این ژن در ایجاد تمایز، لاین‌های گزارشگر فراوانی تولید شده‌اند تا نقش OCT4 را در سلول‌های پلورپوتنت انسان را متوجه شوند (۱۳۴، ۱۳۶). با توجه به اینکه انتقال ژن به صورت مرسوم، صورت می‌پذیرفت، ولی پیشرفت‌های اخیر در ویرایش ژنوم موفق به درج مستقیم پروتئین فلورسنت به جایگاه OCT4 از سلول‌های hPSCs شده است (۶۶، ۱۳۷، ۱۳۸). عضو مهم دیگری از شبکه پلورپوتنت، Sox2 است که هماهنگ با Oct4 کار می‌کند تا رونویسی بسیاری از ژن‌ها را تنظیم کنند. با استفاده از نوترکیبی همسان توسط ویروس‌های مرتبط با آدنو (AAV)^۳، جایگزینی نواحی کدکننده SOX2 با eGFP- SV40-NeopA در سلول hESC H9 صورت پذیرفت، که بر تشکیل اندودرم^۴ اثری نداشت (۱۳۹، ۱۴۰). مطالعه دیگری با استفاده از نوترکیبی همسان صورت پذیرفت

¹- induced Pluripotent Stem Cells (iPSC)

²- Knock-out or Knock-in

³- Adeno-Associated Virus

⁴- Endoderm

تا eGFP را به اگزون شماره ۱ از ژن NANOG در سلول‌های رویانی HUES-1 و HUES-3 وارد کند و همپوشانی بیان eGFP را با ایمنوفلورسنت NANOG تعیین نماید (۱۴۱).

اهمیت نقش OCT4 هم در حفظ توانمندی و هم هدایت تمایز منجر به ابداع نسل جدیدی از روش‌ها شده است که رونویسی OCT4 را طی تمایز سلول‌های hPSC به اندودرم‌لاین^۱ (یک ژرم‌لاین مشتق شده از بسیاری از بافت‌ها، مانند پانکراس) کنترل کند. با استفاده از سیستم CRISPRi که در آن dCas9 به یک سرکوبگر رونویسی^۲ KRAB متصل شده است، از یک gRNA برای سرکوب رونویسی ژن OCT4a استفاده شد. در حالت دیگر، dCas9 به دامین فعال‌سازی VP16 استفاده شد تا بیان OCT4 را تا ۷۰ برابر افزایش دهد (۱۴۲). آزمایش مشابهی نیز با dCas9-VP64 برای القای بیان SOX17 (یک پروتئین مهم برای تشکیل اندودرم) انجام شد (۱۴۴). این روش با لاین گزارشگر H9 جفت شد که سلول‌های بیان‌کننده SOX17 را با GFP نشان می‌داد و فهم ما را از اتفاقات و نحوه تنظیم SOX17 بهبود بخشید (۱۴۳، ۱۴۵).

گروهی از سلول‌های اندودرم که فاکتور رونویسی پانکراس و هوم‌باکس دوازدهه (PDX1)^۳ را فعال می‌کنند، باعث تولید پانکراس و روده می‌شوند. موش‌های فاقد ژن Pdx1 که نقص پانکراس داشتند، در ابتدا تصور می‌شد در اثر کاهش تکثیر سلول‌های پیشرو باشد (۱۴۶، ۱۴۷). همانند نمو پانکراس موش، ژن PDX1 هم برای تشکیل پانکراس انسان لازم است، حتی اگر بیماران دارای حذف تک نوکلئوتیدی در ژن PDX1 باشند نیز دچار نقص پانکراس‌اند (۱۵۰، ۱۵۱). طبق این تحقیق، جهش‌های رخ داده در ژن PDX1 به دیابت در بلوغ جوان (MODY4)^۴ و دیابت دائمی نوزادان^۵، مرتبط می‌باشد (۱۴۸، ۱۴۹).

^۱- Endoderm Lineage

^۲- Transcriptional Repressor

^۳- Duodenal Homeobox 1 (PDX1)

^۴- Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY4)

^۵- Permanent Neonatal Diabetes

جهت بررسی نقش ژن PDX1 در نمو پانکراس انسان، لاین Cas9 القا پذیر دئوکسی سایکلین (iCRISPR)^۱، که کارایی انتقال gRNA در ترکیب با تیمار دئوکسی سایکلین، ناکاوت دوآلی^۲ را از ۱۷ تا ۶۷ درصد بهبود بخشیده، استفاده شد تا لاین گزارشگر PDX1-eGFP را تولید کند، همچنین به عنوان یک منبع مهم برای درک اختصاصیت پانکراس از سلول های اندودرم شناخته شده است (۱۰۷، ۱۵۲). ابزار مهم دیگر، فعال سازی بیان ژن های اختصاصی پانکراس به روش القایی است (۱۴۴). بیان ژن PDX1 با استفاده از gRNA و اتصال dCas9 به دامین ناپایدار دی هیدروفولات ردوکتاز (DHFR)^۳ کنترل شد، که البته DHFR فقط در اثر اضافه شدن تریمتوپریم^۴ پایدار می شود. این رویکرد زمانی مناسب می باشد که به صورت همزمان بیان ژن های PDX1 و NKX6.1 را طی تمایز سلول های hPSC در ترکیب با دئوکسی سایکلین^۵ MAFA فعال کنیم، که سهولت در کنترل، فعال سازی یا سرکوب برنامه های رونویسی را برای بهبود کارایی پروتکل های تمایز نشان می دهد.

اغلب تمایزات درون ریز در موش بین E13.5 و E15.5 در یک فرایند که انتقال ثانویه^۶ نامیده می شود رخ می دهد. نئوروژنین^۳ (Ngn3)^۷، یک عامل رونویسی مارپیچ- حلقه- مارپیچ اولیه^۸ است که به بخش انتهایی انتقال ثانویه ملحق می شود، و سلول هایی که قرار است سلول درون ریز شوند را نشاندار می کند و برای تشکیل همه انواع سلول درون ریز لازم است (۱۵۳، ۱۵۴). بعلاوه، بیان نابجای Ngn3 برای تولید همه انواع سلول های جزیره لانگرهانس به صورت طبیعی لازم است (۱۵۶). گروهی دیگر از سلول های درونی اپی تلیوم (پوششی) پانکراس^۹ نیز بیان Ngn3 را فعال می کنند، که از اپی تلیوم مهاجرت نموده و

1- Doxycycline- inducible Cas9 (iCRISPR) line

2- Biallelic Knockout

3- Dihydrofolate Reductase (DHFR)

4- Trimethoprim

5- Doxycycline

6- Secondary Transition

7- Neurogenin3 (Ngn3)

8- Basic-Helix-Loop-Helix Transcription Factor

9- Pancreatic Epithelium

شروع به فعال‌سازی بیان ژن اختصاصی می‌کنند (توسط پن و رایت مرور شده است) (۱۵۵). اما فرایندی که کنترل می‌کند کدام سلول پیشرو Ngn3 را فعال کنند و چرا Ngn3 فعال می‌شود به خوبی درک نشده است (۱۵۷، ۱۵۸). در انسان، در هفته هشتم بارداری بیان پروتئین NGN3 در یک سری از سلول‌های اپی‌تلیوم پانکراس ردیابی شده است. Neurog3 برای تشکیل همه انواع سلول درون‌ریز در پانکراس موش لازم هستند ولی بیماران با جهش دوآلی در NEUROG3 با سطوح پپتید C گردش‌کننده متولد می‌شوند، که پیشنهاد می‌شود NEUROG3 ممکن است برای تشکیل پانکراس درون‌ریز انسان مهم نباشد (۱۵۹). جهت بررسی نقش NEUROG3 در تشکیل پانکراس انسان از سیستم ویرایش CRISPR-Cas9 استفاده شد تا hPSCs را با جهش‌های هتروزیگوت یا هموزیگوت در NEUROG3 تولید کنند، و تشکیل سلول‌های غدد درون‌ریز هم با استفاده از پروتکل‌های تمایز هدایت شده تعیین شدند (۱۶۰). از این مطالعه مشخص شد که NEUROG3 برای تشکیل غدد درون‌ریز طی نمو پانکراس انسان لازم است. با توجه به سهولت نسبی تولید جهش‌های دوآلی در hPSCs با استفاده از CRISPR-Cas9، امکان تعیین نقش بسیاری از ژن‌های جدید در تمایز سلول‌های غدد درون‌ریز و همچنین درک برخی از جهش‌هایی که باعث دیابت تک‌ژنی می‌شود و همچنین امکان یادگیری اینکه چگونه ارقام ژنتیکی نمو دیابت نوع ۱ و ۲ را ایجاد می‌کنند، وجود دارد (۱۶۱).

نتیجه‌گیری

رویکردهای مهندسی ژنتیک در علم پزشکی برای درمان بیماری‌هایی مانند دیابت با تولید یک منبع نامحدود از سلول‌های قابل پیوند مانند: hESC یا iPSC، توجه بسیاری از محققین را به خود معطوف ساخته است. دستورزی ژنوم سلول‌های پلوریپوتنت در گذشته به دلیل میزان اندک نو ترکیبی همسان بسیار دشوار بود، اما امروزه روش‌های نوین ویرایش ژنومی مانند CRISPR-Cas اجازه ایجاد سریع لاین‌های دارای جهش حذفی و لاین‌های گزارشگر وارد شده را می‌دهند. مکانیسم کریسپر ابتدا در سیستم ایمنی اکتسابی باکتری‌ها کشف شد، ولی امروزه CRISPR-Cas به سرعت برای هر محقق سلول‌های بنیادی ضروری

شده است. اگرچه استفاده از ویرایش ژنومی در بررسی‌های مربوط به نمو پانکراس، انواع تک‌ژنی بیماری دیابت یا نقص متابولیکی هنوز در ابتدای کار می‌باشد، ولی سهولت نسبی و دسترسی CRISPR-Cas9 این امید را می‌دهد که شاهد پیشرفت‌های جدید فراوانی در این زمینه باشیم.

منابع

- 1- Rezania A, Bruin JE, Arora P, Rubin A, Batushansky I, Asadi A, et al. 2014. Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol.* 32(11): 23-1121.
- 2- Pagliuca FW, Millman JR, Gürtler M, Segel M, Van Dervort A, Ryu JH, et al. 2014. Generation of functional human pancreatic β cells in vitro. *Cell.* 159(2): 39-428.
- 3- Ding Q, Lee Y-K, Schaefer EAK, Peters DT, Veres A, Kim K, et al. 2012. A TALEN genome- editing system for generating human stem cell-based disease models. *Cell Stem Cell.* 12(2): 51-238.
- 4- Gaj T, Gersbach CA, Barbas III CF. 2013. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.* 31(7): 397-405.
- 5- Hockemeyer D, Jaenisch R. 2010. Gene targeting in human pluripotent cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 75: 9-201.
- 6- Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. 1987. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol.* 169(12): 33-5429.
- 7- Jansen R, Embden JDAV, Gaastra W, Schouls LM. 2002. Identification of genes those are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol.* 43(6): 75-1565.
- 8- Horvath P, Barrangou R. 2010. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science.* 327(5962): 70-167.
- 9- Makarova KS, Aravind L, Grishin NV, Rogozin IB, Koonin EV. 2002. A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and bacteria predicted by genomic context analysis. *Nucleic Acids Res.* 30(2): 96-482.
- 10- Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. 2005. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology.* 151(8): 61-2551.

- 11- Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G. 2005. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology*. 151(3): 63-653.
- 12- Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. 2005. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol*. 60(2): 82-174.
- 13- Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, et al. 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*. 315(5819): 12-1709.
- 14- Deveau H, Barrangou R, Garneau JE, Labonté J, Fremaux C, Boyaval P, et al. 2008. Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol*. 190(4): 400-1390.
- 15- Horvath P, Romero DA, Coute-Monvoisin AC, Richards M, Deveau H, Moineau S, et al. 2008. Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol*. 190(4): 12-1401.
- 16- Makarova KS, Grishin NV, Shabalina SA, Wolf YI, Koonin EV. 2006. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol Direct*. 1: 7.
- 17- Garneau JE, Dupuis M-È, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, et al. 2010. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*. 468(7320): 67-71.
- 18- Heler R, Marraffini LA, Bikard D. 2014. Adapting to new threats: the generation of memory by CRISPR-Cas immune systems. *Mol Microbiol*. 93(1): 1-9.
- 19- Haft DH, Selengut J, Mongodin EF, Nelson KE. 2005. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple

- CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput Biol.* 1(6): e60.
- 20- Kunin V, Sorek R, Hugenholtz P. 2007. Evolutionary conservation of sequence and secondary structures in CRISPR repeats. *Genome Biol.* 8(4): R61.
- 21- Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. 2007. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinformatics.* 8(1): 1-172.
- 22- Hale CR, Majumdar S, Elmore J, Pfister N, Compton M, Olson S, et al. 2012. Essential features and rational design of CRISPR RNAs that function with the Cas RAMP module complex to cleave RNAs. *Mol Cell.* 45(3): 292-302.
- 23- Pougach K, Semenova E, Bogdanova E, Datsenko KA, Djordjevic M, Wanner BL, et al. 2010. Transcription, processing and function of CRISPR cassettes in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 77(6): 79-1367.
- 24- Pul Ü, Wurm R, Arslan Z, Geißen R, Hofmann N, Wagner R. 2010. Identification and characterization of *E. coli* CRISPR-cas promoters and their silencing by H-NS. *Mol Microbiol.* 75(6): 512-1495.
- 25- Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJJ, Charpentier E, Horvath P, et al. 2011. Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. *Nat Rev Microbiol.* 9(6): 77-467.
- 26- Carte J, Christopher RT, Smith JT, Olson S, Barrangou R, Moineau S, et al. 2014. The three major types of CRISPR-Cas systems function independently in CRISPR RNA biogenesis in *Streptococcus thermophilus*. *Mol Microbiol.* 93(1): 98-112.
- 27- Hochstrasser ML, Doudna JA. 2015. Cutting it close: CRISPR-associated endoribonuclease structure and function. *Trends Biochem Sci.* 40(1):58-66.
- 28- Barrangou R, Marraffini LA. 2014. CRISPR-Cas systems: prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Mol Cell.* 54(2): 44-234.

- 29- Gasiunas G, Sinkunas T, Siksnys V. 2013. Molecular mechanisms of CRISPR-mediated microbial immunity. *Cell Mol Life Sci.* 71(3): 65-449.
- 30- Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA. 2012. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature.* 482(7385): 8-331.
- 31- Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirzada ZA, et al. 2011. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature.* 471(7340): 7-602.
- 32- Van der Oost J, Westra ER, Jackson RN, Wiedenheft B. 2014. Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol.* 12(7): 92-479.
- 33- Marraffini LA, Sontheimer EJ. 2008. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science.* 322: 5-1843.
- 34- Mojica FJM, Diez-Villasenor C, Garcia-Martinez J, Almendros C. 2009. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology.* 155(3): 40-733.
- 35- Marraffini LA, Sontheimer EJ. 2010. Self versus non-self discrimination during CRISPR RNA-directed immunity. *Nature.* 463(7280): 71-568.
- 36- Jore MM, Lundgren M, van Duijn E, Bultema JB, Westra ER, Waghmare SP, et al. 2011. Structural basis for CRISPR RNA-guided DNA recognition by Cascade. *Nat Struct Mol Biol.* 18(5): 36-529.
- 37- Van der Oost J, Jore MM, Westra ER, Lundgren M, Brouns SJJ. 2009. CRISPR-based adaptive and heritable immunity in prokaryotes. *Trends Biochem Sci.* 34(8): 7-401.
- 38- Semenova E, Jore MM, Datsenko KA. 2011. Interference by clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) RNA is governed by a seed sequence. *Proc Natl Acad Sci USA.* 108(25): 103-10098.

- 39- Yosef I, Goren MG, Qimron U. 2012. Proteins and DNA elements essential for the CRISPR adaptation process in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 40(12): 76-5569.
- 40- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. 2012. A programmable dual- RNA- guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 337(6096): 21-816.
- 41- Jiang W, Zhou H, Bi H, Fromm M, Yang B, Weeks DP. 2013. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Res.* 41(20): e188.
- 42- Westra ER, Semenova E, Datsenko KA, Jackson RN, Wiedenheft B, Severinov K, et al. 2013. Type I-E CRISPR-Cas systems discriminate target from non-target DNA through base pairing-independent PAM recognition. *PLoS Genet.* 9(9): e1003742.
- 43- Fineran PC, Gerritzen MJH, Suarez-Diez M, Kunne T, Boekhorst J, van Hijum SAFT, et al. 2014. Degenerate target sites mediate rapid primed CRISPR adaptation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 111(16): 38-E1629.
- 44- Gudbergdottir S, Deng L, Chen Z, Jensen JVK, Jensen LR, She Q, et al. 2010. Dynamic properties of the *Sulfolobus* CRISPR/Cas and CRISPR/Cmr systems when challenged with vector- borne viral and plasmid genes and protospacers. *Mol Microbiol.* 79(1): 35-49.
- 45- Brouns SJJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuis RJH, Snijders APL, et al. 2008. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science.* 321(5891): 4-960.
- 46- Hale C, Kleppe K, Terns RM, Terns MP. 2008. Prokaryotic silencing (psi) RNAs in *Pyrococcus furiosus*. *RNA.* 14(12): 9-2572.
- 47- Carte J, Wang R, Li H, Terns RM, Terns MP. 2008. Cas6 is an endoribonuclease that generates guide RNAs for invader defense in prokaryotes. *Genes Dev.* 22(24): 96-3489.

- 48- Haurwitz RE, Jinek M, Wiedenheft B, Zhou K, Doudna JA. 2010. Sequence- and structure-specific RNA processing by a CRISPR endonuclease. *Science*. 329(5997): 8-1355.
- 49- Sashital DG, Jinek M, Doudna JA. 2011. An RNA-induced conformational change required for CRISPR RNA cleavage by the endoribonuclease Cse3. *Nat Struct Mol Biol*. 18(6): 7-680.
- 50- Gesner EM, Schellenberg MJ, Garside EL, George MM, MacMillan AM. 2011. Recognition and maturation of effector RNAs in a CRISPR interference pathway. *Nat Struct Mol Biol*. 18(6): 92-688.
- 51- Lintner NG, Kerou M, Brumfield SK, Graham S, Liu H, Naismith JH, et al. 2011. Structural and functional characterization of an archaeal clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)-associated complex for antiviral defense (CASCADE). *J Biol Chem*. 286(24): 46-21643.
- 52- Hatoum-Aslan A, Maniv I, arraffini LA. 2011. Mature clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats RNA (crRNA) length is measured by a ruler mechanism anchored at the precursor processing site. *Proc Natl Acad Sci USA*. 108(52): 22-21218.
- 53- Richter H, Zoepfel J, Schermuly J, Maticzka D, Backofen R, Randau L. 2012. Characterization of CRISPR RNA processing in *Clostridium thermocellum* and *Methanococcus maripaludis*. *Nucleic Acids Res*. 40(19): 96-9887.
- 54- Nam KH, Haitjema C, Liu X, Ding F, Wang H, DeLisa MP, et al. 2012. Cas5d protein processes Pre-crRNA and assembles into a cascade-like interference complex in subtype I-C/Dvulg CRISPR-Cas system. *Structure*. 20(9): 84-1574.
- 55- Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, Dohmae N, et al. 2014. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*. 156(5): 94-935.
- 56- Wright AV, Sternberg SH, Taylor DW, Staahl BT, Bardales JA, Kornfeld JE, et al. 2015. Rational design of a split-Cas9 enzyme complex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 112(10): 9-2984.

- 57- Gasiunas G, Barrangou R. 2012. Cas9–crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 109(39): 86-E2579.
- 58- Sternberg SH, Redding S, Jinek M, Greene EC, Doudna JA. 2015. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*. 507(7490): 7-62.
- 59- Szczelkun MD, Tikhomirova MS, Sinkunas T, Gasiunas G, Karvelis T, Pschera P, et al. 2014. Direct observation of R-loop formation by single RNA-guided Cas9 and Cascade effector complexes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 111(27): 803-9798.
- 60- Jinek M, East A, Cheng A, Lin S, Ma E, Doudna J. 2013. RNA-programmed genome editing in human cells. *eLife*. 2: e00471.
- 61- Bedell VM, Wang Y, Campbell JM, Poshusta TL, Starker CG, Krug II RG, et al. 2013. In vivo genome editing using a high-efficiency TALEN system. *Nature*. 490(7422): 8-114.
- 62- Campbell JM, Hartjes KA, Nelson TJ, Xu X, Ekker SC. 2013. New and TALENted genome engineering toolbox. *Circ Res*. 113(5): 87-571.
- 63- Orlando SJ, Santiago Y, DeKolver RC, Freyvert Y, Boydston EA, Moehle EA, et al. 2010. Zinc- finger nuclease-driven targeted integration into mammalian genomes using donors with limited chromosomal homology. *Nucleic Acids Res*. 38(15): e152.
- 64- Wefers B, Meyer M, Ortiz O. 2013. Direct production of mouse disease models by embryo microinjection of TALENs and oligodeoxynucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA*. 110(10): 7-3782.
- 65- Ding Q, Regan SN, Xia Y, Oostrom LA, Cowan CA, Musunuru K. 2013. Enhanced efficiency of human pluripotent stem cell genome editing through replacing TALENs with CRISPRs. *Cell Stem Cell*. 12(4): 4-393.
- 66- Krentz NAJ, Nian C, Lynn FC. 2014. TALEN/CRISPR-mediated eGFP knock-in add-on at the OCT4 locus does not impact differentiation of human embryonic stem cells towards endoderm. *PLoS One*. 9(12): e114275.

- 67- Doyon Y, Vo TD, Mendel MC, Greenberg SG, Wang J, Xia DF, et al. 2010. Enhancing zinc-finger- nuclease activity with improved obligate heterodimeric architectures. *Nat Methods*. 8(1): 9-74.
- 68- Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. 2013. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*. 8(11): 308-2281.
- 69- Lin S, Staahl BT, Alla RK, Doudna JA. 2014. Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. *eLife*. 3: e04766.
- 70- Dang Y, Jia G, Choi J, Ma H, Anaya E, Ye C, et al. 2015. Optimizing sgRNA structure to improve CRISPR-Cas9 knockout efficiency. *Genome Biol*. 16: 1-280.
- 71- Smith C, Gore A, Yan W, Abalde-Atristain L, Li Z, He C, et al. 2014. Whole-genome sequencing analysis reveals high specificity of CRISPR/Cas9 and TALEN-based genome editing in human iPSCs. *Cell Stem Cell*. 15(1): 3-12.
- 72- Veres A, Gosis BS, Ding Q, Collins R, Ragavendran A, Brand H, et al. 2014. Low incidence of off- target mutations in individual CRISPR-Cas9 and TALEN targeted human stem cell clones detected by whole-genome sequencing. *Cell Stem Cell*. 15(1): 27-30.
- 73- Suzuki K, Yu C, Qu J, Li M, Yao X, Yuan T, et al. 2014. Targeted gene correction minimally impacts whole-genome mutational load in human-disease-specific induced pluripotent stem cell clones. *Cell Stem Cell*. 15(1): 6-31.
- 74- Tsai SQ, Zheng Z, Nguyen NT, Liebers M, Topkar VV, Thapar V, et al. 2014. GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. *Nat Biotechnol*. 33(2): 97-187.
- 75- Kondo S, Ueda R. 2013. Highly improved gene targeting by germline-specific Cas9 expression in *Drosophila*. *Genetics*. 195(3): 21-715.

- 76- Sebo ZL, Lee HB, Peng Y, Guo Y. 2014. A simplified and efficient germline-specific CRISPR/Cas9 system for Drosophilagenomic engineering. *Fly*. 8(1): 7-52.
- 77- Kuscü C, Arslan S, Singh R, Thorpe J, Adli M. 2014. Genome-wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by the Cas9 endonuclease. *Nat Biotechnol*. 32(7): 63-677.
- 78- Wu X, Scott DA, Kriz AJ, Chiu AC, Hsu PD, Dadon DB, et al. 2014. Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells. *Nat Biotechnol*. 32(7): 6-670.
- 79- Knight SC, Xie L, Deng W, Guglielmi B, Witkowsky LB, Bosanac L, et al. 2015. Dynamics of CRISPR-Cas9 genome interrogation in living cells. *Science*. 350(6262): 6-823.
- 80- Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, et al. 2013. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol*. 31(9): 32-827.
- 81- Cho SW, Kim S, Kim Y, Kweon J, Kim HS, Bae S, et al. 2014. Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res*. 24(1): 41-132.
- 82- Park J, Bae S, Kim J-S. 2015. Cas-Designer: a web-based tool for choice of CRISPR-Cas9 target sites. *Bioinformatics*. 31(24): 6-4014.
- 83- Li W, Xu H, Xiao T, Cong L, Love MI, Zhang F, et al. 2014. MAGeCK enables robust identification of essential genes from genome-scale CRISPR/Cas9 knockout screens. *Genome Biol*. 15(12): 1-554.
- 84- Doench JG, Hartenian E, Graham DB, Tothova Z, Hegde M, Smith I, et al. 2014. Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation. *Nat Biotechnol*. 32(12): 7-1262.
- 85- Gratz SJ, Ukken FP, Rubinstein CD, Thiede G, Donohue LK, Cummings AM, et al. 2014. Highly specific and efficient CRISPR/Cas9-catalyzed homology-directed repair in Drosophila. *Genetics*. 196(4): 71-961.

- 86- Pattanayak V, Lin S, Guilinger JP, Ma E, Doudna JA, Liu DR. 2013. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nat Biotechnol.* 31(9): 43-839.
- 87- Cradick TJ, Fine EJ, Antico CJ, Bao G. 2013. CRISPR/Cas9 systems targeting beta-globin and CCR5 genes have substantial off-target activity. *Nucleic Acids Res.* 41(20): 92-9584.
- 88- Fu Y, Sander JD, Reyon D, Cascio VM, Joung JK. 2014. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat Biotechnol.* 32(3): 84-279.
- 89- Muller M, Lee CM, Gasiunas G, Davis TH, Cradick TJ, Siksnys V, et al. 2016. Streptococcus thermophilus CRISPR-Cas9 systems enable specific editing of the human genome. *Mol Ther.* 24: 44-636.
- 90- Esvelt KM, Mali P, Braff JL, Moosburner M, Yaung SJ, Church GM. 2013. Orthogonal Cas9 proteins for RNA-guided gene regulation and editing. *Nat Methods.* 10(11): 21-1116.
- 91- Ran FA, Hsu PD, Lin C-Y, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, et al. 2013. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell.* 154(6): 9-1380.
- 92- Shen B, Zhang W, Zhang J, Zhou J, Wang J, Chen L, et al. 2014. Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. *Nat Methods.* 11(4): 399-402.
- 93- Tsai SQ, Wyvekens N, Khayter C, Foden JA, Thapar V, Reyon D, et al. 2014. Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol.* 32(6): 76-569.
- 94- Guilinger JP, Thompson DB, Liu DR. 2014. Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification. *Nat Biotechnol.* 32(6): 82-577.
- 95- Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science.* 339(6121): 23-819.

- 96- Fujii W, Kawasaki K, Sugiura K, Naito K. 2013. Efficient generation of large-scale genome- modified mice using gRNA and CAS9 endonuclease. *Nucleic Acids Res.* 41(20): e187.
- 97- Hara S, Tamano M, Yamashita S, Kato T, Saito T, Sakuma T, et al. 2015. Generation of mutant mice via the CRISPR/Cas9 system using FokI-dCas9. *Sci Rep.* 5: 1-11221.
- 98- Maeder ML, Linder SJ, Cascio VM, Fu Y, Ho QH, Joung JK. 2013. CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. *Nat Methods.* 10(10): 81-977.
- 99- Cheng AW, Wang H, Yang H, Shi L, Katz Y, Theunissen TW, et al. 2013. Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system. *Cell Res.* 23(10): 71-1163.
- 100- Nissim L, Perli SD, Fridkin A, Perez-Pinera P, Lu TK. 2014. Multiplexed and programmable regulation of gene networks with an integrated RNA and CRISPR/Cas toolkit in human cells. *Mol Cell.* 54(4): 698-710.
- 101- Bikard D, Jiang W, Samai P, Hochschild A, Zhang F, Marraffini LA. 2013. Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system. *Nucleic Acids Res.* 41(15): 37-7429.
- 102- Thakore PI, D'Ippolito AM, Song L, SafiA, Shivakumar NK, Kabadi AM, et al. 2015. Highly specific epigenome editing by CRISPR-Cas9 repressors for silencing of distal regulatory elements. *Nat Methods.* 12(12): 9-1143.
- 103- Gilbert LA, Horlbeck MA, Adamson B, Villalta JE, Chen Y, Whitehead EH, et al. 2014. Genome- scale CRISPR-mediated control of gene repression and activation. *Cell.* 159(3): 61-647.
- 104- Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, Liu Z, Brar GA, Torres SE, et al. 2013. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell.* 154(2): 51-442.
- 105- Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, et al. 2013. Repurposing CRISPR as an RNA-guided

- platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*. 152(5): 83-1173.
- 106- Hemphill J, Borchardt EK, Brown K, Asokan A, Deiters A. 2015. Optical control of CRISPR/Cas9 gene editing. *J Am Chem Soc*. 137(17): 5-5642.
- 107- González F, Zhu Z, Shi Z-D, Lelli K, Verma N, Li QV, et al. 2014. An iCRISPR platform for rapid, multiplexable, and inducible genome editing in human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 15(2): 26-215.
- 108- Chen Y, Cao J, Xiong M, Petersen AJ, Dong Y, Tao Y, et al. 2015. Engineering human stem cell lines with inducible gene knockout using CRISPR/Cas9. *Cell Stem Cell*. 17(2): 44-233.
- 109- Ran FA, Cong L, Yan WX, Scott DA, Gootenberg JS, Kriz AJ, et al. 2015. In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature*. 520(7546): 91-186.
- 110- Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, Makarova KS, Essletzbichler P, et al. 2015. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*. 163(3): 71-759.
- 111- Swiech L, Heidenreich M, Banerjee A, Habib N, Li Y, Trombetta J, et al. 2015. In vivo interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol*. 33(1): 6-102.
- 112- Platt RJ, Chen S, Zhou Y, Yim MJ, Swiech L, Kempton HR, et al. 2014. CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. *Cell*. 159(2): 55-440.
- 113- Xue W, Chen S, Yin H, Tammela T, Papagiannakopoulos T, Joshi NS, et al. 2014. CRISPR mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver. *Nature*. 514(7522): 4-380.
- 114- Jia H, Wang N. 2014. Targeted genome editing of sweet orange using Cas9/sgRNA. *PLoS One*. 9(4): e93806.
- 115- DiCarlo JE, Norville JE, Mali P, Rios X, Aach J, Church GM. 2013. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res*. 41(7): 43-4336.

- 116- Lo TW, Pickle CS, Lin S, Ralston EJ, Gurling M. 2013. Precise and heritable genome editing in evolutionarily diverse nematodes using TALENs and CRISPR/Cas9 to engineer insertions and deletions. *Genetics*. 195(2): 48-331.
- 117- Zhao P, Zhang Z, Ke H, Yue Y, Xue D. 2014. Oligonucleotide-based targeted gene editing in *C. elegans* via the CRISPR/Cas9 system. *Cell Res*. 24(2): 50-247.
- 118- Xiao A, Wang Z, Hu Y, Wu Y, Luo Z, Yang Z, et al. 2013. Chromosomal deletions and inversions mediated by TALENs and CRISPR/Cas in zebrafish. *Nucleic Acids Res*. 41(14): e141.
- 119- Blitz IL, Biesinger J, Xie X, Cho KWY. 2013. Biallelic genome modification in F0 *Xenopus tropicalis* embryos using the CRISPR/Cas system. *Genesis*. 51(12): 34-827.
- 120- Guo X, Zhang T, Hu Z, Zhang Y, Shi Z, Wang Q, et al. 2014. Efficient RNA/Cas9-mediated genome editing in *Xenopus tropicalis*. *J Embryol Exp Morphol*. 141(3): 14-707.
- 121- Hwang WY, Fu Y, Reyon D, Maeder ML, Tsai SQ, Sander JD, et al. 2013. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*. 31(3): 9-227.
- 122- Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, et al. 2013. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*. 153(4): 8-910.
- 123- Yang H, Wang H, Jaenisch R. 2014. Generating genetically modified mice using CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Nat Protoc*. 9(8): 68-1956.
- 124- Niu Y, Shen B, Cui Y, Chen Y, Wang J, Wang L, et al. 2014. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell*. 156(4): 43-836.
- 125- Shapiro A, Lakey J, Ryan E. 2000. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med*. 343(4): 8-230.
- 126- Kroon E, Martinson LA, Kadoya K, Bang AG, Kelly OG, Eliazer S, et al. 2008. Pancreatic endoderm derived from human

- embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nat Biotechnol.* 26(4): 52-443.
- 127- Kelly OG, Chan MY, Martinson LA, Kadoya K, Ostertag TM, Ross KG, et al. 2011. Cell-surface markers for the isolation of pancreatic cell types derived from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 29(8): 6-750.
- 128- Rezania A, Bruin JE, Xu J, Narayan K, Fox JK, O'Neil JJ, et al. 2013. Enrichment of human embryonic stem cell-derived NKX6.1-expressing pancreatic progenitor cells accelerates the maturation of insulin-secreting cells in vivo. *Stem Cells.* 31(11): 42-2432.
- 129- Rezania A, Bruin J, Riedel M, Mojibian M. 2012. Maturation of human embryonic stem cell-derived pancreatic progenitors into functional islets capable of treating pre-existing diabetes in mice. *Diabetes.* 61(8): 29-2016.
- 130- Capecchi MR. 1989. Altering the genome by homologous recombination. *Science.* 244(4910): 92-1288.
- 131- Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, et al. 2013. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science.* 339(6121): 6-823.
- 132- Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, et al. 1998. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell.* 95(3): 91-379.
- 133- Radzishchenskaya A, Le Bin CG, dos Santos RL, Theunissen TW, Castro LFC, Nichols J, et al. 2013. A defined Oct4 level governs cell state transitions of pluripotency entry and differentiation into all embryonic lineages. *Nat Cell Biol.* 15(6): 90-579.
- 134- Gerrard L, Zhao D, Clark AJ, Cui W. 2005. Stably transfected human embryonic stem cell clones express OCT4-specific green fluorescent protein and maintain self-renewal and pluripotency. *Stem Cells.* 23(1): 33-124.

- 135- Thyagarajan B, Liu Y, Shin S, Lakshmiathy U, Scheyhing K, Xue H, et al. 2008. Creation of engineered human embryonic stem cell lines using phiC31 integrase. *Stem Cells*. 26(1): 26-119.
- 136- Zwaka TP, Thomson JA. 2003. Homologous recombination in human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 21(3): 21-319.
- 137- Hockemeyer D, Soldner F, Beard C, Gao Q, Mitalipova M, DeKaveler RC, et al. 2009. Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol*. 27(9): 7-851.
- 138- Hockemeyer D, Wang H, Kiani S, Lai CS, Gao Q, Cassady JP, et al. 2011. Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nat Biotechnol*. 29(8): 4-731.
- 139- Rizzino A. 2013. Concise review: the Sox2-Oct4 connection: critical players in a much larger interdependent network integrated at multiple levels. *Stem Cells*. 31(6): 9-1033.
- 140- Brafman DA, Moya N, Allen-Soltero S, Fellner T, Robinson M, McMillen ZL, et al. 2013. Analysis of SOX2-expressing cell populations derived from human pluripotent stem cells. *Stem Cell* 141- 1(5): 48-464.
- 142- Fischer Y, Ganic E, Ameri J, Xian X, Johannesson M, Semb H. 2010. NANOG reporter cell lines generated by gene targeting in human embryonic stem cells. *PLoS One*. 5(9): e12533.
- 143- Zorn AM, Wells JM. 2009. Vertebrate endoderm development and organ formation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 25(1): 51-221.
- 144- Kearns NA, Genga RMJ, Enuameh MS, Garber M, Wolfe SA, Maehr R. 2014. Cas9 effector-mediated regulation of transcription and differentiation in human pluripotent stem cells. *Development*. 141(1): 23-219.
- 145- Balboa D, Weltner J, Euroala S, Trokovic R, Wartiovaara K, Otonkoski T. 2015. Conditionally stabilized dCas9 activator for controlling gene expression in human cell reprogramming and differentiation. *Stem Cell Rep*. 5(3): 59-448.
- 146- Wang P, Rodriguez RT, Wang J, Ghodasara A, Kim SK. 2011. Targeting SOX17 in human embryonic stem cells creates unique

- strategies for isolating and analyzing developing endoderm. *Cell Stem Cell*. 8(3): 46-335.
- 147- Jonsson J, Carlsson L, Edlund T, Edlund H. 1994. Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature*. 371(6498): 9-606.
- 148- Offield M, Jetton T, Labosky P, Ray M, Stein R, Magnuson M, et al. 1996. PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development*. 122(3): 95-983.
- 149- Schwitzgebel VM, Mamin A, Brun T, Ritz-Laser B, Zaiko M, Maret A, et al. 2003. Agenesis of human pancreas due to decreased half-life of insulin promoter factor 1. *J Clin Endocrinol Metab*. 88(9): 406-4398.
- 150- Stoffers DA, Zinkin NT, Stanojevic V, Clarke WL, Habener JF. 2004. Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence. *Nat Genet*. 15(1): 10-106.
- 151- Stoffers DA, Ferrer J, Clarke WL, Habener JF. 1997. Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1. *Nat Genet*. 17(2): 9-138.
- 152- Nicolino M, Claiborn KC, Senée V, Boland A, Stoffers DA, Julier C. 2010. A novel hypomorphic PDX1 mutation responsible for permanent neonatal diabetes with subclinical exocrine deficiency. *Diabetes*. 59(3): 40-733.
- 153- Zhu Z, Verma N, González F, Shi Z-D, Huangfu D. 2015. A CRISPR/Cas-mediated selection-free knockin strategy in human embryonic stem cells. *Stem Cell Rep*. 4(6):1-27.
- 154- Gu G, Dubauskaite J, Melton DA. 2002. Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development*. 129(10): 57-2447.
- 155- Gradwohl G, Dierich A, LeMeur M. 2000. neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97(4): 11-1607.

- 156- Schwitzgebel VM, Scheel DW, Conners JR, Kalamaras J, Lee JE, Anderson DJ, et al. 2000. Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas. *Development*. 127(16): 42-3533.
- 157- Apelqvist Å, Li H, Sommer L, Beatus P, Anderson DJ, Honjo T, et al. 1999. Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. *Nature*. 400(6747): 81-877.
- 158- Pan FC, Wright C. 2011. Pancreas organogenesis: from bud to plexus to gland. *Dev Dyn*. 240(3): 65-530.
- 159- Piper K, Brickwood S, Turnpenny L. 2004. Beta cell differentiation during early human pancreas development. *J Endocrinol*. 181(1):11-23.
- 160- Rubio-Cabezas O, Jensen JN, Hodgson MI, Codner E, Ellard S, Serup P, et al. 2011. Permanent neonatal diabetes and enteric anendocrinosis associated with biallelic mutations in NEUROG3. *Diabetes*. 60(4): 53-1349.
- 161- McGrath PS, Watson CL, Ingram C, Helmrath MA, Wells JM. 2015. The basic helix-loop-helix transcription factor NEUROG3 is required for development of the human endocrine pancreas. *Diabetes*. 64(7): 505-2497.
- 162- Teo AKK, Gupta MK, Doria A, Kulkarni RN. 2015. Dissecting diabetes/metabolic disease mechanisms using pluripotent stem cells and genome editing tools. *Mol Metab*. 4(9): 593-604.

ویرایش ژنومی در شبکیه چشم: مطالعات CRISPR انجام شده برای بیماران وراثتی تحلیل تدریجی شبکیه

خلاصه

با ظهور فناوری ویرایش ژنومی گام‌های بزرگی در زمینه چشم‌پزشکی و درمان بیماری‌های ژنتیکی چشم برداشته شد. چشم هدف ایده‌آلی برای ژن درمانی بشمار می‌رود به دلیل سهولت در دسترسی، تقسیم‌بندی‌های قابل توجه، وضعیت ایمن، شفافیت نوری و حضور کنتراست سلولی. یکی از اولین آزمایشات بالینی ژن درمانی در چشم‌پزشکی جهت درمان بیماری تحلیل تدریجی شبکیه به نام لیبر آموروزیس مادرزادی (LCA) بوده است. موفقیت در این گام، مشوق مهمی جهت درمان سایر اختلالات ارثی در رشته پزشکی شد. در این فصل به بررسی روش‌های مختلف ژن درمانی چشم، آزمایشات بالینی و همچنین مطالعه موردی در زمینه بیماری‌های نقص شبکیه چشم می‌پردازد.

تحلیل تدریجی شبکه

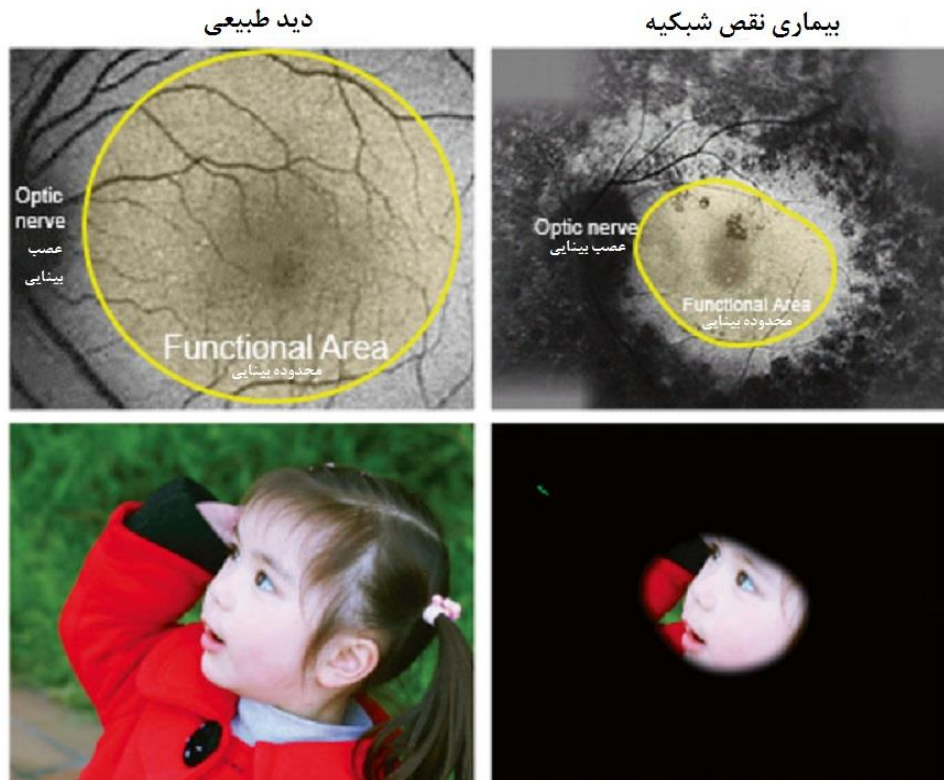
نقص رنگدانه شبکه و تحلیل تدریجی شبکه (RP)^۱ گروهی از نقص‌های شبکه است که با مرگ سلول گیرنده نور میله‌ای و مخروطی شناسایی می‌شوند: از هر ۴۰۰۰ نفر یک فرد تحت تأثیر واقع شده و بیش از ۲۰۰ ژن درگیر آن هستند، که به طیف وسیعی از علائم فنوتیپی منجر می‌گردد (۱، ۲، ۳). عموماً این بیماران، شب کوری هنگام بلوغ، بینایی کانونی در اوایل بلوغ و کوری از یک میدان بصری به شدت محدود در آینده را تجربه می‌کنند (شکل ۱) (۴). گزینه‌های درمانی محدودی موجود است. در حال حاضر، ویتامین A پالمیتات با دز بالا^۲، مکمل امگا ۳، و ممانعت از ویتامین E تنها توصیه‌های درمانی پذیرفته شده هستند، ولی آن‌ها فقط پیشرفت را کند می‌کنند و خطر نقص تولد و سمیت ریه را افزایش می‌دهند (۵، ۶).

امروزه دانشمندان به ژن درمانی^۳ رو آورده‌اند به امید اینکه یک درمان جایگزین، ایمن و مادام‌العمر برای RP باشد که مرگ سلولی را به صورت نامحدود متوقف کند (۷، ۸). آزمایشات ژن درمانی چندگانه برای درمان RP تمرکز یافته‌اند زیرا بسیاری از ژن‌هایی که باعث RP می‌شوند هم اکنون کلون شده‌اند و چند مدل موش شناسایی شده خوب هم وجود دارند. رویکرد مداخله گرایانه درمان به شرایط الگوی وراثت بستگی دارد: آلل مغلوب را می‌توان با کاربرد ژن بهبود بخشید، در حالی که بیمار با آلل غالب باید تصحیح ژن را بگذراند.

^۱- Retinitis Pigmentosa (RP)

^۲- High-dose Vitamin A Palmitate

^۳- Gene Therapy



شکل ۱- مقایسه فنوتیپی و بینایی در بیماری نقص شبکیه چشم (Retinitis Pigmentosa)

تصاویر راست (بیمار) و چپ (نرمال) در بالا، مربوط به اتوفلورسنت از شبکیه چشم را نشان می‌دهد. جعبه راست در پایین نحوه دید در بیماران دارای نقص شبکیه و تصویر چپ در پایین نحوه دید طبیعی در افراد نرمال را نشان می‌دهد

مکمل‌سازی ژن

در شرایط آلل مغلوب، جهش‌های ژنی در هر دو آلل از تولید یک محصول ژن عملکردی جلوگیری می‌کند. مکمل‌سازی رونوشت وحشی ژن، می‌تواند فنوتیپ طبیعی را بازیابی کند (۹، ۱۰). مکمل‌سازی ژن^۱ از تصحیح ژن^۲ اینگونه متمایز می‌شوند که آلل‌های جهش‌یافته

¹- Gene Supplementation

²- Gene Correction

به صورت سالم رهاسازی می‌شوند، و بستگی به میزان ترجمه ژن وحشی دارد که پروتئین غیرفعال، غایب یا ناقص را جبران کند. معمول‌ترین روش جهت ورود ژن وحشی، انتقال ویروسی است. ژن‌ها در ناقلین ویروسی بسته‌بندی شده و به سلول اختصاصی هدف انتقال می‌یابد (۱۰). انتخاب ناقل باعث انعطاف‌پذیری روند درمان می‌شود بطوریکه دائمی بودن بیان ژن، بیماری‌زایی و خطر ورود عوامل جهش‌زا را در تعیین می‌کند (۱۱). بحث در مورد ناقلین عمومی و کاربرد آن‌ها در مدل‌های کلینیکی و پیش‌کلینیکی در بخش‌های بعدی آمده است.

روش‌های ژن درمانی با ویروس

آدنوویروس‌ها

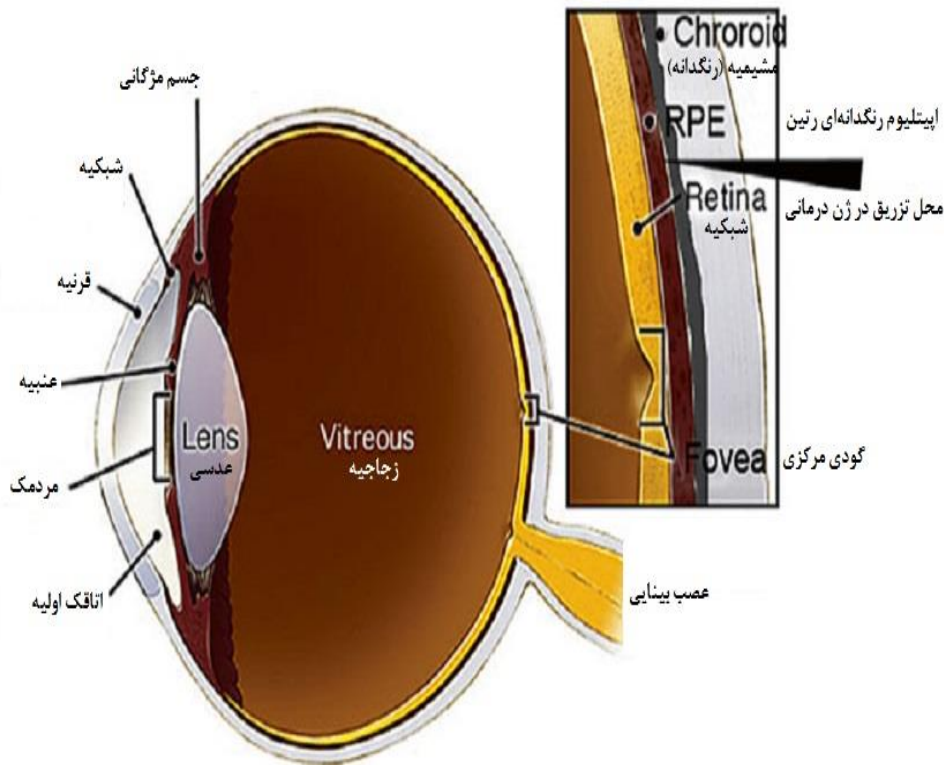
آدنوویروس‌ها^۱، ویروس‌هایی با DNA دورشته‌ای بدون پوشش هستند که طیف وسیعی را شامل می‌شوند (۹). ویروس به گیرنده‌های سطح سلول متصل شده و DNA را به درون آن انتقال می‌دهد. ژن‌ها در داخل ژنوم میزبان تلفیق نمی‌شوند، ولی به صورت اپیزوم‌های^۲ که رونویسی فعال دارند وجود دارند که در مقیاس زمانی طی روزها تا هفته تجزیه می‌شوند (۱۲). بنابراین بیان تراژن ناقل آدنوویروس موقت است، و ورود تکراری ناقل که فواید کلینیکی طولانی مدت داشته باشد، ضروری است. موقعیت تراژن به عنوان یک اپیزوم به شکل دیگری هم مفید است زیرا بیان آن فوری و مستقل از تولید مثل سلول است. نگرانی در مورد بیماری‌زایی آدنوویروس‌ها به تولید ویروس‌هایی با نقص همانندسازی منجر شده است ولی هنوز خطر نوترکیبی با آدنوویروس‌های نوع وحشی درون میزبان وجود دارد (۱۱). کروموزوم‌های کوچک آدنوویروس کپسیددار (EAM)^۳، که دارای همه انواع ژن‌های حذف شده ویروسی می‌باشند، قادر به حمل DNA به طول ۳۰ کیلو باز در مقایسه با ناقل آدنوویروس با ۸ کیلوباز هستند. راندمان EAMها توسط دو دانشمند با نام کومار-سینگ و

¹- Adenovirus

²- Episome

³- Encapsidated Adenoviral mini-chromosomes (EAM)

فاریب بیان شدند، که نجات عملکردی گیرنده نوری و بیان ژن ۹۰ روز به طول انجامید. این دستاورد پس از انتقال cDNA فسفودی استراز GMP حلقوی^۱ به زیرشبکیه^۲ موش که نقص شبکیه داشت با استفاده از ناقلین EAM حاصل گردید (شکل ۲) (۱۴، ۱۵).



شکل ۲- شکل شماتیک از اجزای مختلف تشکیل دهنده چشم و محل تزریق ناقلین EAM

ویروس‌های مرتبط با آدنو

ناقلین ویروس مرتبط با آدنو (AAV)^۳ روش دیگری از انتقال ژن بشمار می‌آیند. AAV، ویروس‌هایی با DNA تک‌ رشته‌ای و بدون کپسول هستند که سلول‌های میتوزی را آلوده می‌کنند، و ژن را به مکان خاصی وارد می‌کنند. AAVها با بیماری‌های مسری انسان مرتبط نیستند که آن‌ها را گزینه ایمن‌تری نسبت به آدنوویروس‌ها می‌سازند، و همچنین آن‌ها

¹- Cyclic GMP Phosphodiesterase cDNA

²- Sub retinal

³- Adeno-associated Virus (AAV)

احتمال ایجاد اثرات جانبی^۱ ناشی از ورود اشتباه درون ژنوم را کاهش می‌دهند. ولی آن‌ها از نظر ظرفیت حمل cDNA محدودتر هستند (۴/۵ کیلوباز)، و بیان آن‌ها به جای اینکه فوری باشد به آرامی صورت می‌گیرد (۱۱).

استفاده از ناقلین AAV در ژن درمانی چشم^۲ معمول است. طی پژوهشی یک ناقل AAV2/8 که رونوشت نوع وحشی ژن *PDE6a^{nmf363}* را با پروموتور رودوپسین^۳ اختصاصی سلول حمل می‌کند در شبکه‌ی موش *Pde6a^{nmf363}* (یک موجود مدل RP) انتقال داده شد. یک تزریق تکی سبب زنده نگه‌داشته شدن سلول‌های گیرنده نوری برای مدت ۶ ماه در مقایسه با موش‌های تیمار نشده زنده، شد (۱۷). آزمایشات مشابه در مدل موش RP مغلوب اتوزومی *Mfrp^{rd6}/ Mfrp^{rd6}* انجام شد، که حفاظت عملکردی بینایی با استفاده از آلودگی با AAV2/8-huMFRP به دست آمد (۱۸). این یافته‌ها در لاین سلول‌های رویانی پلوریپونت رنگدانه‌های پوششی شبکه‌ی مشتق شده از بیماران به صورت آزمایشگاهی تأیید شد که آلودگی با AAV، رنگدانه‌دار شدن سلول، مقاومت سلول‌های پوششی، سازماندهی ساختاری اکتین و میکروویلی انتهایی را برگرداند. چند آزمایش کلینیکی بر اساس ناقل درمانی AAV برای بیماری لیبر آموروزیس مادرزادی (LCA)^۴، انجام شد که در اثر جهش حذفی در پروتئین ۶۵ کیلودالتون پوششی رنگدانه شبکه‌ی (PRE65) صورت گرفت (۱۹)، (۲۱). محققین توانستند به صورت موفقیت آمیزی تراژن را با روش ناقل rAAV-RPE65 بیان کنند و به صورت موقت مانع از نقص گیرنده نوری شوند، ولی مرگ سلولی و نقص عملکردی سه روز بعد دوباره رخ داد. تحقیق برای تعیین زمان و مقدار ایده‌آل انتقال در حال بررسی است.

¹- Side Effects

²- Ocular Gene Therapy

³- Rhodopsin

⁴- Leber Congenital Amaurosis (LCA)

ویروس‌های RNA دار

بسیاری از ویروس‌های RNA دار شامل رتروویروس‌ها^۱، به ژنوم میزبان در موقعیت‌های تصادفی وارد شده و خطر القای جهش را افزایش می‌دهد. آن‌ها دارای قابلیت ۸ کیلوبازی برای درج توالی DNA می‌باشند و به سلول‌های میتوزی محدود می‌شوند زیرا قادر به ورود به هسته سلول‌هایی که در حال تقسیم نیستند، نمی‌باشند. لنتی‌ویروس‌ها^۲ از طرف دیگر، یک زیرکلاس از رتروویروس‌های RNA دار هستند که می‌توانند کمپلکس‌ها را از سلول‌های بدون تقسیم تشکیل دهند، به این معنی که می‌توانند سلول‌های میتوزی و بعد از میتوز را به یک صورت آلوده کنند (۲۲).

لنتی‌ویروس‌ها تغییرات مهمی را تحمل می‌کنند تا ایمنی خودشان برای استفاده کلینیکی را بهبود بخشند. ویروس‌های کاذب^۳، که فقط تراژن‌ها، نه ژن‌های ویروسی، را به میزبان ملحق می‌کنند، ایجاد شده‌اند تا از فعال‌سازی لمفوسیت‌های سلول T^۴ ممانعت کنند، که سبب التهاب و تخریب سلول‌های دارای ناقل می‌شوند. نگرانی‌ها در مورد کاربردهای کلینیکی لنتی‌ویروس‌ها که به لحاظ نظری می‌توانند HIV زنده را از نو ترکیبی ایجاد کنند، تلاش‌های بیشتری را برای ایجاد سازه‌های جدید با خطرات کمتر می‌طلبد.

ناقلین لنتی‌ویروس‌ها به صورت موفقیت‌آمیزی در مدل‌های موش با RP استفاده شده‌اند تا از نقص گیرنده نوری جلوگیری کنند. انتقال ژن با واسطه لنتی‌ویروس‌ها از *Opsin::Pde6b* در موش هموزیگوت *Pde6b^{H620Q}*، مرگ گیرنده نوری را به تأخیر انداخت (۲۳). در پژوهش دیگری با استفاده از مدل پیش کلینیکی مشابه که توسط دیویس و همکاران صورت پذیرفت، ناقل‌های دو قسمتی که هم ژن *Pde6b* نوع وحشی و هم RNA سنجاقت سری کوچک (shRNA)^۵ رمزکننده گوانیلات سیکلاز (GUCY)^۶ را رمز می‌کردند بقای گیرنده نوری را به صورت معنی‌داری در مقایسه با ناقلین تک قسمتی، افزایش دادند.

^۱- Retroviruses

^۲- Lentiviruses

^۳- Pseudo-typed Viruses

^۴- T-cell Lymphocytes

^۵- small hairpin RNA (shRNA)

^۶- Guanlyate Cyclase (GUCY)

معمولاً در آبشار انتقال نوری، پروتئین *Pde6b* وقتی فعال می‌شود که فوتون‌ها روی بخش‌های خارجی سلول میله‌ای برخورد کند و غلظت cGMP آزاد را با هیدرولیز کاهش می‌دهد که حالت برانگیزش گیرنده نوری را کاهش داده و مانع از رهاسازی انتقال‌دهنده عصبی از سلول‌های میله‌ای (شبکیه) می‌شود. در مقابل، GUCY که بخش مخالف پیوند *Pde6b* است تولید cGMP از گوانوزین ۵' تری فسفات (GTP) را تحریک می‌کند. در شرایط تاریکی، *Pde6b* غیرفعال است و سبب افزایش سطوح cGMP و کلسیم می‌شود. همچنین برای موتانت‌های هموزیگوس مانند *Pde6b^{H620Q/H620Q}*، *Pde6b* غیرفعال است و همیشه سطوح cGMP و کلسیم را افزایش می‌دهد که در نهایت باعث مرگ سلولی می‌شود. بنابراین، توقف در نقص گیرنده نوری که در این مطالعه مشاهده شد، به طور موجهی با بیان تراژن نوع وحشی به دست آمد در حالی که به صورت همزمان سطوح کلسیم را کاهش می‌دهد. این مشاهده بیان می‌کند که ژن درمانی ترکیبی، ممکن است نسبت به درمان‌های تکی مؤثرتر باشد.

تصحیح و ترمیم ژن

در شرایط آلل غالب، یکی یا تعداد بیشتری، آلل جهش اضافه یا منفی غالب را حمل می‌کنند که نمی‌تواند با ورود رونوشت نوع وحشی ژن، درمان شود. در عوض، آلل (یا آلل‌های) جهش یافته باید خاموش یا حذف شوند و در بعضی از موارد، ژن نوع وحشی باید در مکان خودش وارد شود. این ورود فرایندی دو مرحله‌ای است، که ابتدا آلل جهش یافته، حذف یا خاموش می‌شود و نهایتاً ژن عملکردی وارد می‌شود. چند رویکرد برای حذف ژن جهش یافته ایجاد شده است که شامل ریبوزایم درمانی^۱، ژن درمانی آنتی‌سنس^۲، آنتی‌آپوپتوز درمانی^۳، و جدیدترین رویکردها شامل: ZFN، TALEN و CRISPR است.

¹- Ribozyme Therapy

²- Antisense Gene Therapy

³- Antiapoptosis Therapy

تداخل ریبوزایم

آنزیم ریبوزایم، توالی mRNA خاصی را با هیدرولیز توالی‌های سه نوکلئوتیدی تجزیه می‌کند، که از ترجمه به پروتئین جلوگیری می‌کند (۲۵). آن‌ها از ناقلین سنتز می‌شوند و روش مفیدی برای تصحیح ژن با اختلال در محصول پروتئینی ژن جهش‌یافته غالب هستند (۲۶). حتی می‌توان آن‌ها را در روش‌های تصحیح ژن استفاده کرد. در یک حالت مستقل از جهش‌زایی، ریبوزایم می‌تواند طراحی شود که هم رونوشت نوع وحشی و هم mRNA موتانت را تجزیه کند (۱۱). لوین و همکاران، این روش را به صورت موفقیت‌آمیز استفاده کردند و روند نقص‌گیرنده نوری را برای ۳ ماه در یک مدل موش RP غالب اتوزومی، آهسته نمودند که از ریبوزایم استفاده شد تا mRNA موتانت تولید شده توسط جایگزینی پرولین با هیستیدین را در کدون ۲۳ ژن رودوپسین (P23H)، خاموش نماید (۲۷).

ژن درمانی آنتی‌سنس

این روش بسیار مشابه با تداخل ریبوزایم است، ژن درمانی آنتی‌سنس از توالی‌های DNA کوتاه مصنوعی استفاده می‌کند که با رونوشت mRNA هدف‌گیری شده مکمل شده و هترودوپلکس DNA-RNA را تشکیل داده و نهایتاً از ترجمه ممانعت به عمل می‌آورد. آنزیم RNase H سبب تجزیه mRNA شده و الیگو دئوکسی نوکلئوتید (ODN) را آزاد می‌سازد تا به رشته مکمل mRNA متصل شود. در مطالعه‌ای در مورد افزایش رگ‌های خونی چشم^۱، ODN‌های آنتی‌سنس مکمل mRNA محصول ژن نئوواسکولاریزاسیون^۲، فاکتور رشد عروق اندوتلیال (VEGF)^۳، قبل از وقوع رتینوپاتی تکثیری به کار گرفته شد (۲۸). این پژوهش نشان داد غلظت پروتئین VEGF ۴۰ تا ۶۶ درصد کاهش و رگ‌های خونی ۲۵ تا ۳۱ درصد افزایش داشتند.

¹- Ischemia-Induced Proliferative Retinopathies

²- Neovascularization

³- Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

ژن درمانی آنتی آپوپتوز

مرگ برنامه‌ریزی شده سلول با پروتئین آپوپتوز مانند *p53* تنظیم می‌شود. محققین ژن‌هایی را به کار برده‌اند که این پروتئین‌های آپوپتوز را کنترل می‌کند تا از مرگ گیرنده نوری در حالت مستقل از جهش جلوگیری کند. برای مثال انتقال ویروسی ژن آنتی آپوپتوز *bcl-2* به شبکه‌ی نشان داد که نقص را در چند مدل موش به تأخیر انداخت (۲۹). ولی انتقال به سلول‌های گره عصبی شبکه‌ی اثر معکوس داشت که باعث افزایش آپوپتوز شد، که پیشنهاد می‌کند که اثرات این ژن‌ها ممکن است اختصاصی نوع سلول باشد (۳۰). این روش امید بخش است و به تحقیقات و کشفیات بیشتری نیاز دارد.

پیشرفت‌های اخیر: ZFN، TALEN و CRISPR

دانشمندان مکانیزم‌های تعمیر DNA که به صورت طبیعی رخ می‌دهند را مطالعه نموده‌اند تا رویکردهای جدیدی را برای ژن درمانی هدفمند ارائه دهند. یک روش عمومی ترمیم طبیعی DNA است، که در پاسخ به شکست دورشته‌ای (DSBs) در DNA رخ داده است، که بصورت خودبخودی با تاثیر نیروهای خارجی مانند پرتوافکنی یا عمدی برای اهداف نوترکیبی ایجاد شده است (۳۱، ۳۲). این رویکرد ترمیم به دو صورت اتفاق می‌افتد: ۱- ترمیم اتصال پایانه‌های غیر همسان (NHEJ) است که انتهای رشته‌های DNA برش خورده به سادگی به هم بدون صحت توالی دوباره متصل می‌شوند. این فرایند باعث القای جهش افزایش یا کاهش (Indel) می‌شود که اغلب منجر به محصولات ژن غیر عملکردی می‌شوند. ۲- مکانیسم ترمیم نوترکیبی پایانه همسان (HDR) است که رشته‌های شکسته شده با یک کروماتید خواهری شکسته نشده یا کروموزوم همولوگ جفت می‌شوند، که به عنوان الگو برای تشکیل صحیح توالی DNA در ناحیه شکسته عمل می‌کند (۳۳). کشف این مکانیزم‌های ترمیم برای اهداف ژن درمانی هدفمند، با چالشی برای پیدا کردن یک ابزار مطمئن جهت القا در نقاط خاص، به تأخیر افتاده بود. نوکلئازهای پروتئینی به عنوان ابزاری جهت حل این معضل شناخته شدند، و نوکلئاز انگشت روی (ZFN) اولین نسل ژن درمانی‌ها بر اساس نوکلئاز بود.

نوکلئازهای انگشت روی (ZFN)

نوکلئازهای انگشت روی^۱ مصنوعی با اتصال دامین‌های اتصال انگشت روی به واحد کاتالیکی آنزیم برشی نوع *FokI*, *IIS* ساخته شدند (۳۱، ۳۲). هر انگشت حاوی ۳۰ آمینواسید، که ۴ تا از آن‌ها (۲ سیستئین و ۲ هیستیدین) یک اتم روی را احاطه می‌کنند. یک انگشت روی با سه جفت باز برهمکنش داشته و در نهایت سه انگشت متوالی برای اتصال کافی لازم هستند. دامین کاتالیکی *FokI* باید دایمر شود تا DNA را برش دهد، که به ZFN در هر ناحیه نیاز دارد.

فناوری ZFN به صورت موفقیت‌آمیزی در شبکه چشم استفاده شده است. گرین والد و همکاران، ZFN را طراحی کردند تا لاین‌های سلولی رتینوبلاست جنین انسان^۲ را هدف قرار دهد، همچنین آن‌ها میزان نوترکیبی همولوگ القا شده توسط ZFN را در ژن رودوپسین انسان پیدا کردند که در مقایسه با نوترکیب همولوگ داخلی ۱۷ درصد بیشتر بود (۳۴). مطالعه دیگری کاربردهای ZFN را برای سندرم یوشر^۳، شکلی از RP که منجر به کوری و کوری می‌شود، بررسی کرد. اگرچه ۵ ژن *USH1* شناسایی شدند، ولی آورلک و همکاران، بر جهش p.R31X در *Ush1c* موش صحرایی تمرکز کردند، تا ZFN معمولی را طراحی کنند (۳۵). نتایج مطالعات آن‌ها امکان تصحیح ژن در ناحیه هدف را تأیید کرد. یکی از موانع ZFN این است که همه انواع سه جفت باز نمی‌تواند مورد هدف واقع شود زیرا دامین‌های انگشت روی برای ترکیبات خاصی از نوکلئوتیدها هنوز مهندسی نشده‌اند. اختصاصیت و همبستگی قابل اطمینان به سختی به دست می‌آید، و دامین‌های مجاور در پروتئین ممکن است بر اختصاصیت پیوند اثر بگذارند (۳۱). عدم اطمینان از ZFN دانشمندان را به سمت تحقیق برای جایگزین دعوت کرده است.

¹- Zinc Finger Nuclease (ZFN)

²- Human Embryonic Retinoblast Cell Lines

³- Usher Syndrome

نوکلئازهای افکتور شبه فعال کننده رونویسی (TALEN)

باکتری‌های بیماری‌زایی گیاهی در جنس *Xanthomonas* به داخل ژنوم میزبان ملحق شده و آلودگی را با استفاده از ژن‌هایی که TALEN^۱ را کد می‌کنند القا می‌کنند. پروتئین‌های TAL دامین‌های متصل به DNA با تکرارهای متوالی ۳۴ آمینواسیدی هستند که در جایگاه‌های ۱۲ و ۱۳ به شدت محافظت شده هستند، که بر اساس ماهیت نوکلئوتید، توالی هدف متفاوت هستند. TALها به دامین کاتالیتیک *FokI* متصل می‌شود تا از ZFN پیروی کرده، و کمپلکس TALEN (نوکلئاز افکتور TAL) نامیده می‌شود. مشابه ZFN، TALEN از *FokI* استفاده می‌کند و بنابراین دایمر می‌شود تا DNA را برش دهد، ولی آن‌ها در اینکه یک TAL در هر نوکلئوتید وجود دارد، متفاوت هستند، که کد شناسایی را در مقایسه با ZFN آسان می‌کند و راندمان پیوند بیشتری را به همراه دارد. مانع نرخ یک به یک جفت باز نسبت به TALS این است که آرایه بلندی از TALS (حداقل ۱۲) لازم هستند تا همبستگی و اختصاصیت پیوند کافی را به دست آوریم.

TALENها به این علت استفاده شدند که یک مدل ماهی زیرافیش وابسته به جنس RP2^۲ را ایجاد کنند، تا نقص شبکه‌ی معمول که انسان را با تخریب ژن RP2 تحت تأثیر قرار می‌دهند را مد نظر قرار دهند. در کاربرد دیگر TALEN، لاین‌های سلولی رویانی پلوریپونت (iPS) که از بیماران دارای نقص ماکولار ویتلی‌فرم (BVMD)^۳ مشتق شدند، با استفاده از TALEN و القا ترمیم NHEJ، تخریب محصول ژن نقص ماکولار ویتلی‌فرم تصحیح شدند (۳۷). در آزمایش دیگر، ناهنجاری چشمی ایجاد شده با جهش در ژن *Crbl* با HDR بعد از برش القا شده توسط TALEN در مدل موش صحرایی تصحیح شدند. در این مطالعه، جنین‌های موش با جهش *Crbl^{rd8}* با TALENها تزریق شده که مکان ژن *Crbl* و الیگونوکلئوتیدهای مکمل تک‌رشته‌ای را مورد هدف قرار می‌دادند تا آلل را تصحیح کنند که فقط با تغییرات اندک نوکلئوتید در رشته انجام می‌شد و از هدف‌گیری با

^۱- Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALEN)

^۲- X-linked RP2 (RP2) Zebrafish

^۳- Best Vitelliform Macular Dystrophy (BVMD): یکی از انواع بیماری‌های ژنتیکی چشم می‌باشد که

سبب کوری در افراد می‌شود

TALEN ممانعت می‌شد. ۲۷ درصد از نتایج ترمیم توالی به صورت HDR را نشان دادند. موش تیمار شده فنوتیپ شبکه‌ی طبیعی را نشان داد ولی موش تیمار نشده نقص شبکه‌ی را نشان داد.

خوشه‌های منظم درون پالیندروم‌های تکراری کوتاه (CRISPR)

اخیراً، تحقیق درباره رویکردهای ایمنی باکتری و آرکئی باکترها به ایجاد فناوری تکاملی CRISPR/Cas9 منجر شد. نواحی اختصاصی از ژنوم باکتری کشف شد که برای ورود ژن‌های ویروسی مهاجم کنار گذاشته شده‌اند، که به قطعاتی می‌شکنند و درون ژنوم باکتری در خوشه‌های منظم درون پالیندروم‌های تکراری کوتاه (CRISPR)^۱ وارد می‌شوند. ژن‌های ویروسی وارد شده سپس به صورت RNA حاصل از CRISPR (crRNA) بیان می‌شوند، که با نوکلئاز مرتبط با CRISPR (Cas) و یک crRNA فعال‌شونده ترانس (tracrRNA) یک کمپلکس می‌سازند، که در بیوژنز و بلوغ سیستم CRISPR/Cas نوع II دخیل هستند (۳۳، ۴۰). کمپلکس crRNA-tracrRNA به صورت راهنما برای پروتئین Cas عمل می‌کند و آن را به سمت توالی‌های خاص روی رشته هدف هدایت می‌کند.

در سال ۲۰۱۲، جینک و همکاران crRNA و tracrRNA را به هم وصل کردند تا RNA راهنما (gRNA) شیمیری را ایجاد کنند که آن‌ها بیان کردند که این سازه از نظر سودمندی مانند کمپلکس crRNA-tracrRNA پروتئین Cas9 را هدایت می‌کند تا DNA را برش زده و می‌تواند هر تعداد ناحیه را مورد هدف قرار دهد (۴۱). RNA راهنما ۲۰ آمینواسید در ناحیه ۵' دارد و اختصاصیت هدف را تعیین نموده و قابل تغییر است. انتهای ۳' یک ناحیه ثابت دارد که برای کمپلکس شدن با پروتئین Cas9 لازم است. برای برش DNA، توالی هدف باید یک PAM^۲ داشته باشد که مستقیماً پایین دست ناحیه برش هدف باشد (۴۲). هیچ ناحیه مشابهی برای PAM در gRNA وجود ندارد. پروتئین Cas9، توالی NGG، را در ناحیه PAM شناسایی می‌کند، که N متغیر و G نوکلئوزید گوانین

^۱- Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

^۲- Protospacer-Adjacent Motif (PAM)

است. انتقال پروتئین Cas9 از طریق پلاسمید کمک‌کننده^۱ تکمیل می‌شود که دارای توالی رمزکننده و یک پروموتور می‌باشد. ورود RNA راهنما ممکن است دشوار باشد ولی با بیان gRNA از یک پلاسمید متصل به پروموتور RNA پلیمراز III ممکن می‌شود (۴۵). مزیت سیستم ویرایش ژنومی CRISPR/Cas9 نسبت به TALEN این است که راندمان هدف‌گیری بیشتری دارد، و CRISPR/Cas9 توانایی برش در حالت متیلاسیون توالی DNA هدف را دارد (۴۳). اختصاصیت CRISPR/Cas9 دقیق‌تر است، به خصوص با ایجاد نیکازهایی^۲ که اثرات غیرهدف را به حداقل می‌رساند. یک آنزیم نوکلئاز Cas9 جهش‌یافته، که نیکاز نام دارد، فقط یک رشته توالی DNA هدف را برش می‌دهد. نیکازها می‌توانند یک DSB را با القا دو شکست تک‌رشته‌ای (شکاف^۳) نزدیک به یکدیگر روی رشته‌های متفاوت DNA ایجاد کنند. وجود این شکاف‌ها اثرات غیرهدف را کاهش داده و اختصاصیت هدف‌گیری را افزایش می‌دهند (۴۶، ۴۷).

CRISPR/Cas9 یک فناوری جدید است که به سرعت در حال پیشرفت است، ولی در زمان کوتاهی نسبت به سایر روش‌های مبتنی بر نوکلئاز پیش افتاده است و در موجودات مدل فراوانی به کار رفته است (۳۹).

مطالعه موردی از آزمایشگاه تا بالین بیمار: روش، جهش غالب اتوزومی RP

D190N

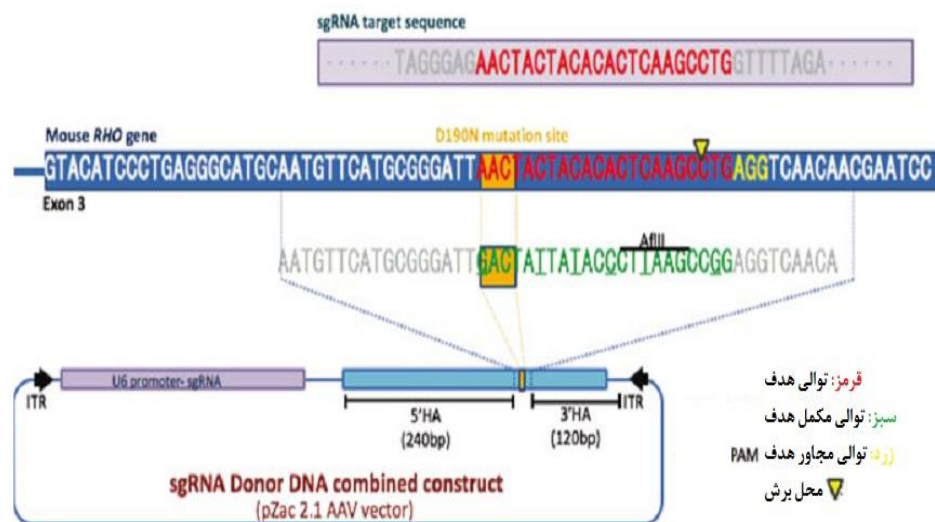
خانواده‌ای با جهش رودوپسین القایی RP (Asp190Asn یا D190N) که به صورت غالب اتوزومی به ارث می‌رسد، وجود دارد. رودوپسین (RHO) یک پروتئین G متصل به گیرنده است که در دیسک‌های بخش خارجی سلول‌های میله‌ای شبکیه واقع شده و مسئول شروع آبشار انتقال نوری است. جهش‌های RHO برای ۵۴ درصد RP غالب اتوزومی وجود دارد (۴۸). در حالت طبیعی، فوتون‌ها ایزومریزاسیون 11-*cis* را به صورت *trans* القا می‌کنند. این فرایند نقص در افراد D190N، به آرامی به مرگ سلولی منجر می‌شود که هنوز تعیین

¹- Helper Plasmid

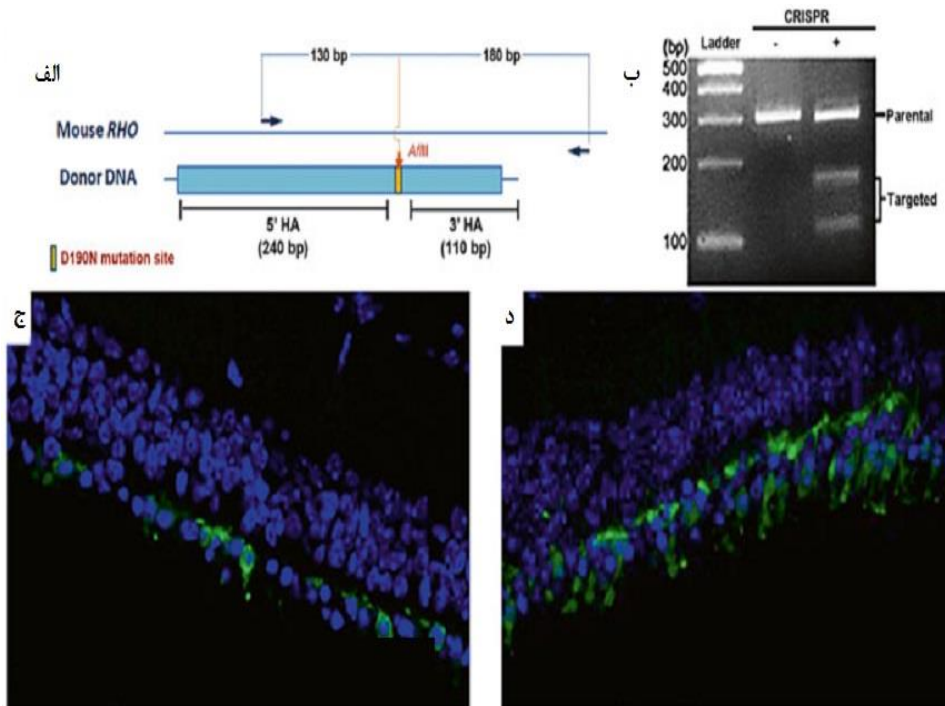
²- Nickase

³- Nick

نشده است. این یافته سبب ایجاد یک مدل موش شد. موش جهش‌یافته D190N هتروزیگوس توسط سانچو و همکاران تولید شد، و موتانت‌های هموزیگوس از هتروزیگوس اصلاح شدند (۴۸). الکتروفیزیولوژی، بافت‌شناسی، آنژیوگرافی، نتایج تصویربرداری و مقادیر عملکردی نشان دادند که به صورت صادقانه قادر است بیماری انسان را بازسازی می‌کند. به چشم‌های موش ناقلین دوتایی *AAV8::Cas9* و *AAV8::gRNA* تزریق شدند (شکل ۳). مرگ سلول‌های مخروطی اولین علت کوری است که با واسطه CRISPR/Cas9 محافظت شدند (شکل ۴). داده‌های الکترو رتینوگرام^۱ روی یک هتروزیگوت D190N بیان کرد که نجات عملکردی با موش تیمار شده با واسطه CRISPR/Cas9، میدان نوسان موج b بزرگتری در مقایسه با شاهد‌ها داشتند (شکل ۵). این داده‌های اولیه پیشنهاد کرد که CRISPR/Cas9 یک گزینه مناسب برای تصحیح جهش *RHO* در بیماران است.

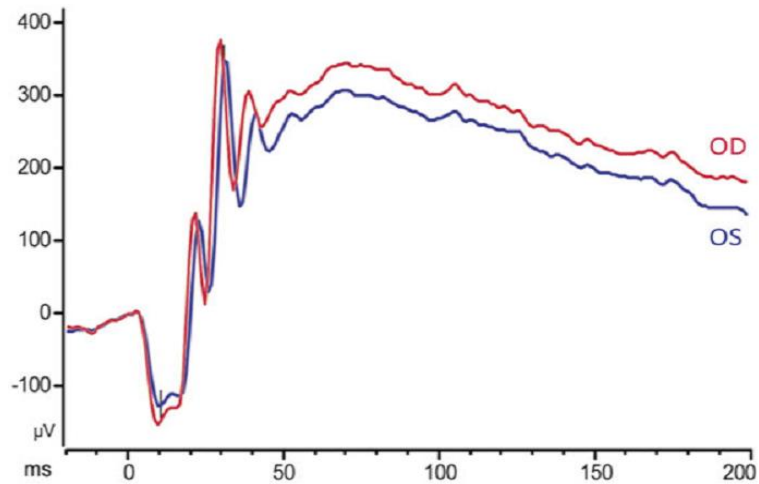


شکل ۳- ساختار ناقل ویروس مرتبط با آدنو (AAV) به همراه نوکلئاز Cas9



شکل ۴- ترمیم مدل *Rho* با واسطه ناقل ویروس مرتبط با آدنو (AAV)

الف) توالی ژنوم موش *Rho* با یک کدون توالی تغییر یافته دهنده جایگزین شد که حاوی جایگاه برشی *Afl II* (پیکان نارنجی) و جفت پرایمر برای تکثیر PCR (پیکان آبی) می باشد. ب) تکثیر توالی های سلول های نوترکیب حاوی ۱۳۰ و ۱۸۰ جفت باز و توالی والدینی دارای تک باند ۳۱۰ بازی بر روی ژل الکتروفورز. ج) مدل چشم $Rho^{D190N} / Rho^{D190N}$ که بوسیله ناقل $AAV8::Cas9$ مورد درمان قرار گرفته است تنها تعداد محدودی از سلول های مخروطی (نقاط سبز) در شبکیه تولید شد. د) مدل چشم $Rho^{D190N} / Rho^{D190N}$ که بوسیله CRISPR درمان شده تعداد بیشتری سلول مخروطی (نقاط سبز) شبکیه تولید شد.



شکل ۵- نتایج حاصل از الکترو رتینوگرام

نجات کاربردی در چشم راست، نمونه تیمار (OD) در مقایسه با چشم چپ، نمونه شاهد (OS)، قابل تشخیص است.

نتیجه‌گیری

طی چند سال اخیر پیشرفت‌های مهمی در ویرایش ژن صورت گرفته است. راندمان هدف‌گیری و اختصاصیت اتصال، به صورت معنی‌داری افزایش یافته است و استفاده ترکیبی از ناقلین ویروسی و روش‌های ویرایش DNA مانند CRISPR و TALEN هدف‌گیری اختصاصی مکان ژن را به صورتی بهبود بخشیده‌اند که قبل از آن به دست نیامده بود. با بکارگیری آخرین روش‌ها در ویرایش ژنوم، آینده پزشکی روشن‌تر از این خواهد بود.

منابع

- 1- Hartong DT, Berson EL, Dryja TP. 2006. Retinitis pigmentosa. *Lancet*. 368:809-1795.
- 2- Hamel C. 2006. Retinitis pigmentosa. *Orphanet J Rare Dis*. 1: 1-40.
- 3- Parmeggiani F. 2011. Clinics, epidemiology and genetics of retinitis pigmentosa. *Curr Genomics*. 12: 7-236.
- 4- Fahim AT, Daiger SP, Weleber RG. 1993. Retinitis pigmentosa overview. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, Bird TD, Fong CT, Mefford HC, Smith RJH, Stephens K. Seattle: University of Washington.
- 5- Lin MK, Tsai YTT, Tsang SH. 2015. Emerging treatments for retinitis pigmentosa: genes and stem cells, as well as new electronic and medical therapies, are gaining ground. *Retin Physician*. 12: 52-70.
- 6- Berson EL, Rosner B, Sandberg MA, Hayes KC, Nicholson BW, Weigel-DiFranco C, Willett W. 1993. A randomized trial of vitamin A and vitamin E supplementation for retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol*. 111: 72-761.
- 7- Wu WH, Tsai YT, Justus S, Lee T, Zhang L, Lin CS, Bassuk AG, Mahajan VB, Tsang SH. 2016. CRISPR repair reveals causative mutation in a preclinical model of retinitis pigmentosa. *Mol Ther*. In Press.
- 8- Bassuk AG, Zheng A, Li Y, Tsang SH, Mahajan VB. 2016. Precision Medicine: Genetic Repair of Retinitis Pigmentosa in Patient-Derived Stem Cells. *Scientific reports*. 6(19969).
- 9- Dalkara D, Sahel J-AA. 2014. Gene therapy for inherited retinal degenerations. *C R Biol*. 337: 92-185.
- 10- Boye SE, Boye SL, Lewin AS, Hauswirth WW. 2013. A comprehensive review of retinal gene therapy. *Mol Ther*. 21: 19-509.
- 11- Chaum E, Hatton MP. 2002. Gene therapy for genetic and acquired retinal diseases. *Surv Ophthalmol*. 47: 69-449.

- 12- McClements ME, MacLaren RE. 2013. Gene therapy for retinal disease. *Transl Res*. 161: 54-241.
- 13- Nash BM, Wright DC, Grigg JR, Bennetts B, Jamieson RV. 2015. Retinal dystrophies, genomic applications in diagnosis and prospects for therapy. *Transl Pediatr*. 4: 63-139.
- 14- Wert KJ, Skeie JM, Davis RJ, Tsang SH, Mahajan VB. 2012. Subretinal injection of gene therapy vectors and stem cells in the perinatal mouse eye. *J Vis Exp*. 69: 1-42.
- 15- Kumar-Singh R, Farber DB. 1998. Encapsidated adenovirus mini-chromosome-mediated delivery of genes to the retina: application to the rescue of photoreceptor degeneration. *Hum Mol Genet*. 7: 900-1893.
- 16- Kotterman MA, Schaffer DV. 2014. Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy. *Nat Rev Genet*. 15: 51-445.
- 17- Wert KJ, Davis RJ, Sancho-Pelluz J, Nishina PM, Tsang SH. 2013. Gene therapy provides long-term visual function in a pre-clinical model of retinitis pigmentosa. *Hum Mol Genet*. 22: 67-558.
- 18- Li Y, Wu W-H, Hsu C-W, Nguyen HV, Tsai Y-T, Chan L, Nagasaki T, Maumenee IH, Yannuzzi LA, Hoang QV, Hua H, Egli D, Tsang SH. 2014. Gene therapy in patient-specific stem cell lines and a preclinical model of retinitis pigmentosa with membrane frizzled-related protein defects. *Mol Ther*. 22: 97-1688.
- 19- Bainbridge JW, Smith AJ, Barker SS, Robbie S, Henderson R, Balaggan K, Viswanathan A, Holder GE, Stockman A, Tyler N, Petersen-Jones S, Bhattacharya SS, Thrasher AJ, Fitzke FW, Carter BJ, Rubin GS, Moore AT, Ali RR. 2008. Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med*. 358: 9-2231.
- 20- Cideciyan AV, Aleman TS, Boye SL, Schwartz SB, Kaushal S, Roman AJ, Pang JJ, Sumaroka A, Windsor EA, Wilson JM, Flotte TR, Fishman GA, Heon E, Stone EM, Byrne BJ, Jacobson SG, Hauswirth WW. 2008. Human gene therapy for RPE65 isomerase

- deficiency activates the retinoid cycle of vision but with slow rod kinetics. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105: 7-15112.
- 21- Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, Pugh Jr EN, Mingozzi F, Bennicelli J, Banfi S, Marshall KA, Testa F, Surace EM, Rossi S, Lyubarsky A, Arruda VR, Konkle B, Stone E, Sun J, Jacobs J, Dell'Osso L, Hertle R, Ma JX, Redmond TM, Zhu X, Hauck B, Zelenia O, Shindler KS, Maguire MG, Wright JF, Volpe NJ, McDonnell JW, Auricchio A, High KA, Bennett J. 2008. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med*. 358: 8-2240.
- 22- Balaggan KS, Ali RR. 2012. Ocular gene delivery using lentiviral vectors. *Gene Ther*. 19: 53-145.
- 23- Davis RJ, Hsu CW, Tsai YT, Wert KJ, Sancho-Pelluz J, Lin CS, Tsang SH. 2013. Therapeutic margins in a novel preclinical model of retinitis pigmentosa. *J Neurosci*. 33: 83-13475.
- 24- Tosi J, Sancho-Pelluz J, Davis RJ, Hsu CW, Wolpert KV, Sengillo JD, Lin C-SS, Tsang SH. 2011. Lentivirus-mediated expression of cDNA and shRNA slows degeneration in retinitis pigmentosa. *Exp Biol Med*. 236: 7-1211.
- 25- Lewin AS, Hauswirth WW. 2001. Ribozyme gene therapy: applications for molecular medicine. *Trends Mol Med*. 7: 8-221.
- 26- Sioud M. 2006. Ribozymes and siRNAs: from structure to preclinical applications. In: Handbook of experimental pharmacology. Springer, Berlin, pp 223-242.
- 27- Gorbatyuk M, Justilien V, Liu J, Hauswirth WW, Lewin AS. 2007. Preservation of photoreceptor morphology and function in P23H rats using an allele independent ribozyme. *Exp Eye Res*. 84:44-52.
- 28- Robinson GS, Pierce EA, Rook SL. 1996. Oligodeoxynucleotides inhibit retinal neovascularization in a murine model of proliferative retinopathy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93: 6-4851.
- 29- Tsang SH, Chen J, Kjeldbye H, Li WS, Simon MI, Gouras P, Goff SP. 1997. Retarding photoreceptor degeneration in

- Pdegtm1/Pdegtm1 mice by an apoptosis suppressor gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 38: 50-943.
- 30- Simon PD, Vorwerk CK, Mansukani SS, Chen SJ, Wilson JM, Zurakowski D, Bennett J, Dreyer EB. 1999. bcl-2 gene therapy exacerbates excitotoxicity. *Hum Gene Ther.* 10: 20-1715.
- 31- Gilles AF, Averof M. 2014. Functional genetics for all: engineered nucleases, CRISPR and the gene editing revolution. *EvoDevo.* 5: 1-43.
- 32- Carroll D. 2014. Genome engineering with targetable nucleases. *Annu Rev Biochem.* 83: 39-409.
- 33- Cong L, Ran AF, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science.* 339: 23-819.
- 34- Greenwald DL, Cashman SM, Kumar-Singh R. 2010. Engineered zinc finger nuclease-mediated homologous recombination of the human rhodopsin gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 51: 80-6374.
- 35- Overlack N, Goldmann T, Wolfrum U, Nagel-Wolfrum K. 2012. Gene repair of an Usher syndrome causing mutation by zinc-finger nuclease mediated homologous recombination. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 53: 6-4140.
- 36- Liu F, Chen J, Yu S, Raghupathy RK. 2015. Knockout of RP2 decreases GRK1 and rod transducin subunits and leads to photoreceptor degeneration in zebrafish. *Hum Mol Genet.* 24: 59-4648.
- 37- Sharma R, Rajan V, Wan Q. 2014. Engineering isogenic best vitelliform macular dystrophy patient iPS cell lines using TALEN technology. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 55: 1-3987.
- 38- Low BE, Krebs MP, Joung JK, Tsai SQ. 2014. Correction of the Crb1rd8 allele and retinal phenotype in C57BL/6N mice via TALEN-mediated homology-directed repair. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 55: 95-387.
- 39- Sander JD, Joung KJ. 2014. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol.* 32: 55-347.

- 40- Senís E, Fatouros C, Große S, Wiedtke E, Niopek D, Mueller AK, Börner K, Grimm D. 2014. CRISPR/Cas9-mediated genome engineering: an adeno-associated viral (AAV) vector toolbox. *Biotechnol J*. 9: 12-1402.
- 41- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. 2012. A programmable dual- RNA- guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 337: 21-816.
- 42- Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 346: 1-1258096.
- 43- Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. 2013. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*. 8: 308-2281.
- 44- Hsu PD, Lander ES, Zhang F. 2014. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*. 157: 78-1262.
- 45- Sakuma T, Nishikawa A, Kume S, Chayama K, Yamamoto T. 2014. Multiplex genome engineering in human cells using all-in-one CRISPR/Cas9 vector system. *Sci Rep*. 4: 1-5400.
- 46- Shen B, Zhang W, Zhang J, Zhou J, Wang J, Chen L, Wang L, Hodgkins A, Iyer V, Huang X, Skarnes WC. 2014. Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. *Nat Methods*. 11: 399-402.
- 47- Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, Scott DA, Inoue A, Matoba S, Zhang Y, Zhang F. 2013. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*. 154: 9-1380.
- 48- Sancho-Pelluz J, Tosi J, Hsu C-WW, Lee F, Wolpert K, Tabacaru MR, Greenberg JP, Tsang SH, Lin C-SS. 2012. Mice with a D190N mutation in the gene encoding rhodopsin: a model for human autosomal-dominant retinitis pigmentosa. *Mol Med*. 18: 55-549.