مجله ایمنی زیستی
دوره ۱۰، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۶

معرفی جدیدترین روش‌های ویرایش ژنوم با استفاده از اندونوکلئازها

نیره ولی‌خانلو[۱]، مقصود پژوهنده[۲]*
۱-دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، ۲- دانشیار گروه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، کیلومتر ۳۵ جاده تبریز- آذرشهر، ایران

n.valikhanlou@yahoo.com pazhouhandeh@gmail.com

چکیده

ابزارهای ویرایش ژنومی بسیاری تا به‌امروز معرفی و به‌طور موفقیت‌آمیزی برای اصلاح و دست‌ورزی ژنوم جانداران مختلف به‌کار گرفته شده‌اند. ویرایش ژنتیکی با استفاده از آنزیم‌ها یک ابزار قوی در تحقیقات بیولوژیکی است. تاکنون دو نسل از ابزارهای ویرایش ژنومی آنزیمی معرفی شده‌اند، (SSRs: Genome editing mediated by Site- Specific recombinases) ریکامبینازهای اختصاصی محل و (SSNs: Genome editing mediated by Site- Specific Nucleases)، نوکلئازهای اختصاصی محل. نیاز وجود یک روش ویرایش ژنوم کاربردی برای دست‌ورزی ژن در موجودات یوکاریوتی و پروکاریوتی، صرفه‌جویی در وقت و هزینه‌های اجرایی، بهبود کیفیت و کمیت محصولات، کاربردهای درمانی، تولید دارو یا متابولیت‌های ثانویه، فهم عملکرد ژن‌ها و روابط بین ژنی، همگی موجب پیشرفت سریع ابزارهای ویرایش ژنوم شده است. طی دهه‌ی اخیر، دو نوع نوکلئاز ویرایش‌کننده به‌نام‌های TALEN و ZFN با موفقیت برای ویرایش و اصلاح گیاهان مورد استفاده قرار گرفته است. اخیرا یک تکنیک جدید دیگری به نام CRISPR/cas9 کشف شده و به‌طور چشمگیری برای ویرایش ژنومی در سطح وسیعی از گونه‌ها استفاده می‌شود. امروزه با استفاده از سیستم CRISPR/cas9 و RNAهای قابل برنامه‌ریزی، انقلاب عظیمی در تحقیقات بیولوژیکی به‌وجود آمده است. در این مقاله به معرفی و بحث در مورد ویرایش ژنوم بر پایه اندونوکلئازهای مهندسی شده پرداخته شده است.

کلمات کلیدی: اندونوکلئاز، ویرایش ژنوم، هدف‌گیری ژنی، CRISPR/cas9

مقدمه

ویرایش ژن یا ژنوم، شامل چندین تکنیک جدید برای کمک به پژوهشگران، به‌منظور اصلاح و دست‌ورزی توالی ژنوم و انجام تحقیقات زیستی و نوآوری‌های صنعتی است [۱]. تکنیک‌هایی که ما را قادر به تنظیم الگوی بیان ژن در ناحیه از پیش تعیین شده، ایجاد بینش جدید برای تسهیل انجام ژنومیک کاربردی هر موجود، تهیه غذای جمعیت انسانی در حال افزایش جهان و بهبود تولیدات کشاورزی کرده است [۲]. مهندسی ژنتیک یک فرصت عالی برای اصلاح

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-04]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.10.3]

محصولات و پایداری کشاورزی فراهم می‌کند. معرفی واریته‌های متنوع ژنتیکی در گونه‌های کشاورزی، یک چشم‌انداز و کلید اصلی در آینده کشاورزی است [۱, ۳]. ظهور ویرایش ژنوم، تهییج چشمگیری را به‌خصوص در زمینه کشاورزی به ارمغان آورده است. اصلاح محصولات کشاورزی با ویرایش ژنی، محدوده انتخابی وسیعی را به‌وسیله‌ی تغییر فقط تعداد کمی نوکلئوتید، از بین بیلیون‌ها نوکلئوتید ژنوم سلول‌های زنده یا تغییر کل آلل با ادغام ژن جدید در ناحیه مدنظر ژنوم، فراهم می‌کند. به‌دلیل بهبود روش‌های پرورش محصولات رایج کشاورزی و روش‌های استاندارد مهندسی ژنتیک، ویرایش ژن اهمیت می‌یابد. بنابراین این تکنیک، یک ابزار قوی است که می‌تواند پیرامون تامین نیاز غذای جهانی به‌کار گرفته شود. علاوه براین، برای اصلاح ارزش مواد غذایی، تولید محصولات مقاوم به آفات و شرایط اقلیمی سخت بسیار موثر است [۲, ٤, ٥]. مهندسی ژنتیک برای عموم قابل قبول‌تر از دستکاری ژنتیکی گیاهان با وارد کردن یک DNA خارجی در ژنوم آن‌ها است. در حالی‌که این فرآیند به‌صورت طبیعی و بدون نیاز به مهندسی ژنتیک به‌طور مصنوعی انجام می‌پذیرد. ویروس‌ها و عوامل RNA زیرویروسی به‌عنوان یک وکتور برای تغییر توالی‌های ژنتیکی، هم به‌صورت طبیعی و هم به‌صورت مصنوعی استفاده می‌شوند [٦]. ژنتیک معکوس برای بررسی عملکرد ژن و حاشیه‌نویسی توالی DNA، شامل خاموشی درجا و غیرفعال کردن ژن با استفاده از اصلاح ترنسپوزون، ریکامبینازهای مخصوص توالی و RNA مداخله‌گر است. با این حال، هدف‌گیری ژنی، ساده‌ترین شکل در بین چندین نوع تکنیک دست‌ورزی ژنی برای جست‌وجوی عملکرد ژن در محیط درون شیشه است [۷]. دست‌ورزی ژنی با استفاده از ترنسپوزون، سطح بیان ژن القا شده را در نتیجه‌ی ادغام تصادفی در موقعیت ژن تحت تاثیر قرار می‌دهد، در حالی‌که RNA مداخله‌گر، تاثیرات فوری کاهشی خواهد داشت، اما تاثیرات خاموشی ژنی غیرقابل پیش‌بینی دارد. انواع متنوعی از SSNs برای مهندسی ژنتیک استفاده می‌شوند. با این‌که جزئیات هر سیستم متفاوت است، اما فرآیند کلی هر سه سیستم SSNs، مشابه است [۱].

ویرایش ژنوم با استفاده از ریکامبینازهای مخصوص توالی‌یابی یا به اختصار SSRs

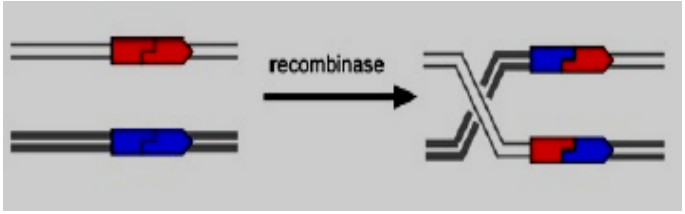
نوترکیبی اختصاصی در محل، برای اولین بار در باکتری‌ها معرفی شد و مثال اصلی سیستمی بود که موجب قطع ژنوم و مهاجرت از محل خاصی در باکتریوفاژ لاندا، به ژنوم میزبان *اشرشیاکلای* بود. بعد از آن، هزاران سیستم نوترکیبی خاص محل در بخش عمده‌ای از باکتری‌ها و همچنین بعضی از آرکئی‌ها و یوکاریوتهای میکروبیال (به‌خصوص در مخمرها) شناسایی شدند. در نوترکیبی خاص محل، دو توالی کوتاه DNA در مکان‌های جداگانه‌ای بر روی تک مولکول DNA یا مولکول‌هایDNA جدا از هم، نیاز است. رشته‌های DNA در محل خاصی باند فسفودی استر را می‌شکنند و انتهاهای شکسته به‌هم متصل شده و نوترکیبی انجام می‌گیرد. شناسایی توالی و کاتالیز شیمیایی واکنش، توسط آنزیم مخصوصی انجام می‌شود که به اصطلاح SSR: Site Specific Recombinator نامیده می‌شود. فرآیند، بدون نیاز به هیچ سنتز با تخریب و یا کوفاکتور خاص و ATP انجام می‌شود [۸] (شکل۱). SSRها ابزار مفیدی برای

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-04]

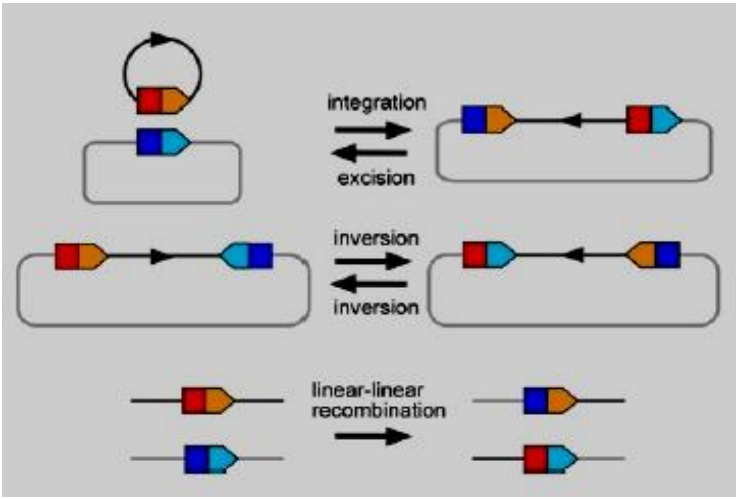
[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.10.3]

دست‌ورزی ژنوم‌ها و فعال یا غیرفعال کردن بیان ژن در موجودات مختلف هستند. ریکامبینازهای مخصوص توالی، با سرعت بخشیدن به ایجاد شکاف و اتصال مجدد رشته‌های DNA، موجب بازآرایی توالی‌ها در توالی‌های کوتاه مخصوص می‌شوند [۹] (شکل۲).

استفاده از SSRs برای مهندسی ژنتیک، وارد دهه سوم می‌شود. کشف اولیه آن مربوط به ریکامبینازهای سیستم هترولوگوس است. در ژنوم گیاهان به‌طور موثری برای حل پیچیدگی‌های ناشی از تعیین تعداد کپی ژن خارجی، حذف ناخواسته DNA و ادغام موثر DNA در محل شناخته شده‌ای از ژنوم استفاده می‌شود [۵, ۸]. بهترین سیستم‌های ریکامبیناز مخصوص توالی‌یابی، متعلق به باکتری‌ها و مخمرهاست. بیشتر این سیستم‌ها به دو گروه عمده تقسیم می‌شوند، که براساس ریکامبینازی که استفاده می‌شود، ریکامبینازهای تیروزین و ریکامبینازهای سرین نامیده می‌شوند. علت نام‌گذاری به‌دلیل رزیدو آمینواسید نوکلئوفیلیکی است که به رشته DNA حمله کرده و از طریق تیروزین یا سرین در طول تعویض به آن متصل می‌شود. دو خانواده به‌هم مرتبط نمی‌باشند و ساختار پروتئینی و مکانیسم واکنش متفاوتی دارند [۹].



شکل۱- پیش ماده و محصول نهایی حاصل از عمل ریکامبیناز [۱۰]



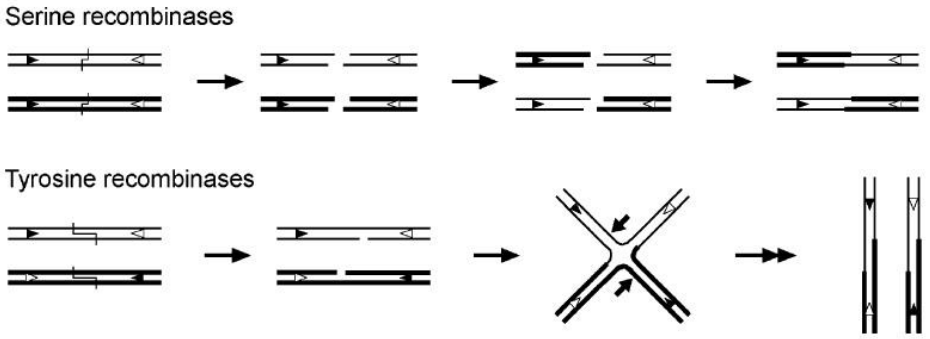
شکل۲- نتایج حاصل از نوترکیبی[۱۰]

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-04]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.10.3]

مکانیسم عمل ریکامبینازها

دو سایت DNA برای نوترکیب شدن، ابتدا باید توسط پروتئین ریکامبیناز شناسایی شوند. سایت‌های اتصال پروتئینی تشکیل سیناپس داده و مقابل رشته تعویض شونده قرار می‌گیرند که شامل حذف و اتصال مجدد رشته‌های DNA است. در طی تعویض، ریکامبیناز به‌طور موقت از هیدروکسیل رزیدو تیروزین یا سرین، به‌صورت به فسفات ستون DNA کوالانس متصل می‌شود. رشته‌ها از محل نقاط مقطوع شکسته می‌شوند. ریکامبیناز تیروزین، رشته‌ها را هربار یک جفت باز تعویض کرده، ولی ریکامبیناز سرین واسطه‌گری شکست هر چهار رشته DNA که در دو سایت دارای نوترکیبی هستند را انجام می‌دهد (شکل۳). محل‌های نوترکیبی، عموما توالی مشابهی داشته و دارای یک انتهای چپ و یک انتهای راست می‌باشند. هر انتهای چپ به انتهای راست دست توالی شریکش متصل می‌شود، که موجب ایجاد بازسازی توالی‌های مشابه در محصولات حاصل از نوترکیبی می‌شوند. این قطبیت معمولا توسط میزان مشابهت توالی هم‌پوشان، بین ابتدا و انتهای رشته تعویض شده اندازه‌گیری می‌شود [۸, ۹].



شکل ۳- مکانیسم عمل ریکامبیناز سرین که موجب شکست هر چهار رشته DNA در محل نوترکیبی می‌شود و عمل ریکامبیناز تیروزین که دو رشته از چهار رشته DNA در محل نوترکیبی را می‌شکند [۹].

سیستم‌های وابسته به ریکامبینازهای بسیاری مثل Cre/loxP, Flp/FRT برای انجام بازآرایی DNA شناسایی شده‌اند. ریکامبینازها به‌طور گسترده‌ای برای دست‌ورزی DNA گیاهان، باکتری‌ها، مخمرها و پستانداران از طریق ایجاد (knockout) یا (knock in)مورد استفاده قرار می‌گیرند [۱۰]. یکی از مزایای ریکامبینازها نبود مکانیسم ترمیمی بین سلولی و همچنین توانایی اجرایی با عدم نیاز به شکستگی در رشته دوتایی است. علاوه براین، ریکامبینازها DNA دهنده را با ژنوم ادغام می‌کنند، طوری‌که شناسایی فعالیت آن‌ها ساده است. ضعف این آنزیم‌های شیمر، سطح بالای اثرات غیرهدف (off-target) و سمیت با بیان بالای آن‌هاست [۱].

ویرایش ژنوم با استفاده از اندونوکلئازهای مخصوص توالی‌یابی یا به اختصار (SSNs)

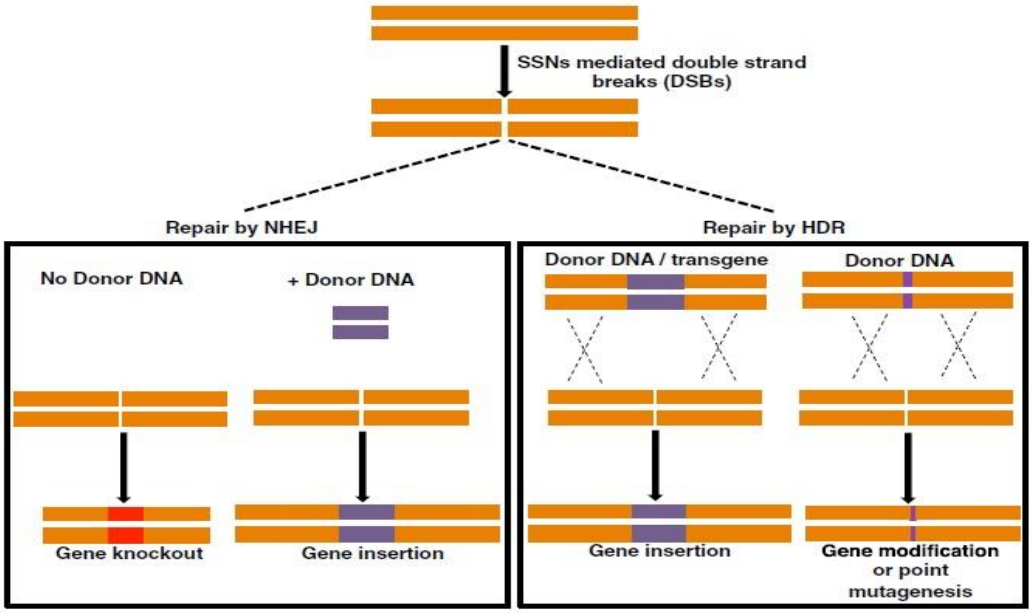
ویرایش با استفاده از SSNها وابسته به اندونوکلئازهایی با توانایی ایجاد شکست در محلهای

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-04]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.10.3]

خاصی از توالی DNA هستند. SSNها دارای یک دمین متصل شونده به توالی DNA یا RNA هستند که به توالی هدف می‌چسبد. شکافت توالی هدف با SSNها، با مکانیسم ترمیمی درون سلولی دنبال می‌شود، که درنهایت منجر به تصحیح ژن در محل موردنظر می‌شود. انواع متنوعی از SSNs برای مهندسی ژنتیک استفاده می‌شود. با این‌که جزئیات هر سیستم متفاوت است، اما فرآیند کلی هر سه سیستم SSNs مشابه است [۱]. در تمام حالات، هدف توالی خاصی از DNA و شکستن رشته دوتایی در محل ژن هدف است. ترمیم رشته دوتایی شکسته شده به دو روش امکان‌پذیر است:

مسیر ترمیمی اتصال انتهاهای غیر همولوگ (Non-Homologous End-Joining (NHEJ))، مسیر ترمیمی همولوگ (Homology-Directed Repair (HDR)). نتیجه ویرایش ژنومی توسط SSNs می‌تواند بسیار متفاوت باشد که نتیجه تغییرات ژنومی وابسته به مسیر اصلاح و تعمیرهایی است که گفته شد [۱] (شکل٤).



شکل ۴- نتایج محتمل حاصل از ویرایش ژنوم با استفاده از SSNs. بعداز شکسته شدن رشته دوتایی توسط SSNs، ممکن است در غیاب رشته دهنده نتیجه به خاموش کردن ژن منتهی شود، یا در صورت حضور DNA دهنده، ادغام ژن صورت پذیرد و با ترمیم انتهای غیر همولوگ، بازسازی انجام گیرد. نتیجه ترمیم شکست رشته دوتایی با مسیر همولوگ، ممکن است ایجاد جهش و یا ادغام ژن مورد نظر باشد [۱۱].

در جانداران دیپلوئید مثل انسان، رایج‌ترین فرم HDR است که توالی مشابه طویلی بین DNA دهنده و گیرنده وجود دارد. در حضور الگوی دهنده (الیگو نوکلئوتید تک رشته‌ای مناسب)، DSB در طول فازهای S وG2 سیکل سلولی ترمیم می‌شوند. یک مسیر پیش فرض‌برای ترمیم DSB در سلول‌های پستاندران NHEJ، می‌باشد زیرا غیروابسته به سیکل سلولی و طی دو حالت امکان‌پذیر است:

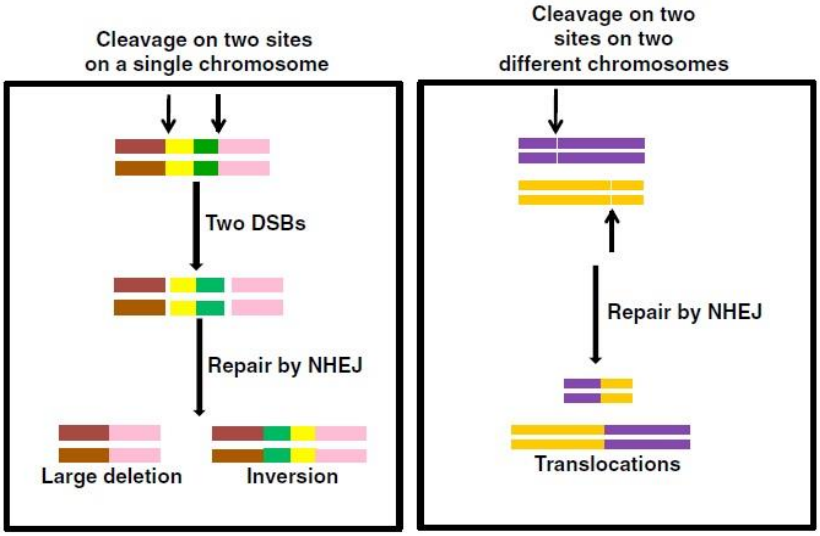
۱- مسیر کلاسیک: که شامل اتصال پروتیئن‌های هترودایمرKu70-Ku80 و سایر پرتئین‌های مرمت‌کننده

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-04]
[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.10.3]

DNA در محل DSB و سپس اتصال دو انتهای DNA است.

۲- مسیر متناوب: که عامل بسیاری از جابجایی‌های القا شده توسط DSB و مستلزم جابه‌جایی انکوژنی است. این مسیر، عامل جابه‌جایی‌ها و نوآرایی‌های کرموزومی است، مخصوصا زمانی‌که تعداد زیادی از off-taget DSB ها صورت بگیرد.

یکی از مشکلات باقی مانده در ویرایش ژنومی تعمیر شده با HDR، چگونگی با هم انتقال دادن SSNها و بازسازی رشته الگو است. کارایی آن بستگی به توالی، محل مورد نظر و ناحیه هدف دارد [۱۲] (شکل۵).



شکل ۵- شکستگی دو رشته در دو نقطه و ترمیم NHEJ. هنگامی‌که از SSNs برای تولید شکستگی دو رشته در دو نقطه از یک کروموزوم استفاده می‌شود، ممکن است تعمیر شکستگی به سمت حذف یا ادغام بخش طویلی از رشته هدف پیش برود، وقتی شکستگی دو رشته در دو نقطه روی دو کروموزوم متفاوت ایجاد می‌شود، NHEJ موجب جابه‌جایی آن قطعه می شود [۱۰].

Off-target activity (نتیجه غیر هدف) یکی دیگر از نگرانی‌های اجرایی در این روش است. با این‌که آنالیز کل ژنوم گیاه مکان‌های off-target کمی را نشان می‌دهد و این جهش‌های off-target می‌توانند با back-crossing حذف شوند [۱۲].

چهار خانواده نوکلئاز مهندسی شده برای ویرایش ژنوم موجود است: مگانوکلئاز مهندسی شده (MegaN)، نوکلئاز انگشت روی (ZFNs)، نوکلئاز فعال کننده بیان رونویسی (TALENs)، و خوشه تکرارهای کوتاه پالیندرومیک منظم پخش شده بین فواصل منظم وابسته به پروتئین Cas9 (CRISPR/Cas9). این سیستم‌ها این فرصت را فراهم می‌کنند که بتوانیم بصورت ارزان و موثرتری اصلاح ژنوم کنیم.

مهندسی ژنوم با استفاده از مگانوکلئازها

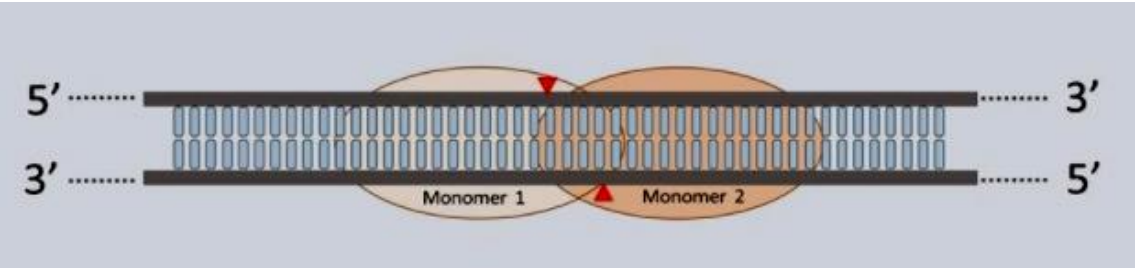
مگانوکلئازها نوکلئازهایی طبیعی هستند که در اواخر۱۹۸۰ کشف شدند. آن‌ها متعلق به خانواده‌ای از نوکلئازها هستند که توالی‌های وسیعی از DNA (از ۱۲ تا ٤٠ جفت باز) را شناسایی کرده و به‌طور خاصی

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-04]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.10.3]

برش می‌دهند. علاوه براین، آن‌ها در مقایسه با روش‌های دیگر مانند ZFNs، سمیت سلولی کمتری دارند. سایت‌های وسیع شناخته شده مگانوکلئاز، آن‌را تبدیل به یک ابزار مناسب برای مهندسی ژنتیک کرده است. اما تعداد وقوع طبیعی مگانوکلئازها محدود بوده و به‌طور مناسب و موثری کل ژنوم را پوشش نمی‌دهند [۱۳]. از دیگر معایب مگانوکلئازها این است که ساخت آنزیم‌های مشخصی برای تمام توالی‌های احتمالی در مقایسه با سایر سیستم‌های SSNs هزینه‌بر و وقت‌گیر است. هر هدف جدید مهندسی ژنوم، نیازمند یک مرحله اولیه مهندسی پروتئین برای هر مگانوکلئاز سفارشی است. بنابراین، مگانوکلئازها برای انجام کار از لحاظ فنی به چالش کشیده شدند (شکل٦).

طی دهه‌ی اخیر دو نوع نوکلئاز ویرایش کننده ژنوم به‌نام‌های TALEN و ZFN با موفقیت برای ویرایش و اصلاح گیاهان مورد استفاده قرار گرفته است. اخیرا یک تکنیک جدید دیگری به نام CRISPR/cas9 کشف شده و به‌طور چشمگیری برای ویرایش ژنومی در سطح وسیعی از گونه‌ها استفاده می‌شود.



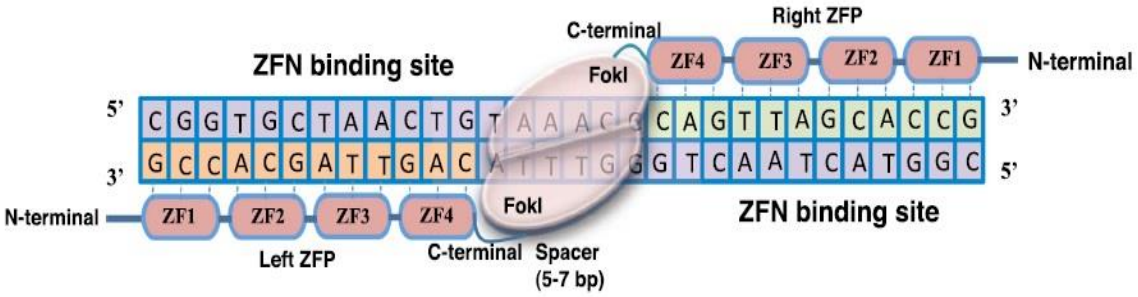
شکل ۶- شمای کلی طرز عمل مگانوکلئاز بر روی DNA دو رشته‌ای

سیستم ویرایش ژنوم وابسته به نوکلئاز انگشت روی یا ZFN

اولین نسل ابزارهای ویرایش ژنومی Zinc (ZFN) Finger Nuclease بود. این تکنیک دارای دو جزء پروتئین‌های تکرار شونده انگشت روی (ZFP) و دمین متصل شونده به DNA می‌باشد. هر ZFP از ۳۰ آمینواسید و یک موتیف آلفا هلیکس که توسط یک پیوند روی به دو صفحه بتا متصل شده است t تشکیل شده و پروتئین‌های تکرار شونده پشت سرهم به توالی ۱۸-۹ نوکلئوتیدی قسمت ژن هدف متصل می‌شوند [۱, ۱٤]. دایمر اندونوکلئاز FOKI برای ایجاد DSB در DNA است. ZFN و TALEN هر دو برای شکستن DSB از نوکلئاز رایج و معمولی FOKI استفاده می‌کنند. دو واحد مونومری ZFN به نزدیکی ناحیه ژن هدف متصل می‌شوند و رشته‌ها را از هم جدا کرده تا فاصله‌ی مناسبی برای ایجاد DSB در ژنوم ایجاد شود. چون در غیر این‌صورت تشکیل دایمر اندونوکلئاز FOKI غیر ممکن می‌شود [۱۵].

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-04]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.10.3]



شکل ۷- تصویر دایمر نوکلئاز انگشت روی متصل به قطعه DNA هدف. القای شکستگی در رشته دوتایی، نیازمند یک جفت ZFNs، که هریک شامل ۳ الی ۶ پروتئین انگشت روی (در این شکل ۴ تا از آن‌ها نشان داده شده) در انتهای N-terminal و دمین شکافنده اندونوکلئاز محدودگر FOKI در انتهای C-terminal می‌باشد. حدود ۳۶-۱۸ نوکلئوتید توسط دایمر ZFN شناسایی شده، و آنزیم FOKI موجب شکست در دو رشته DNA در توالی هدف می‌شود. دو توالی شناسایی ZFN توسط توالی ۷-۵ نوکلئوتیدی جداگر از یکدیگر جدا می‌شوند [۱۰].

اولین موفقیت استفاده ازZFN ایجاد جهش در ژن زردی دروزوفیلا [٤] در حدود یک دهه پیش بود و تاکنون در مورد بسیاری از سلول‌ها و جانداران مورد استفاده قرار گرفته است. به‌طور مثال در زیگوت ماهی زبرا به‌طور مستقیم در سال ۲۰۰۸، در زیگوت خانواده موش‌ها در سال ۲۰۱۰ [۵, ۱٦, ۱۷].

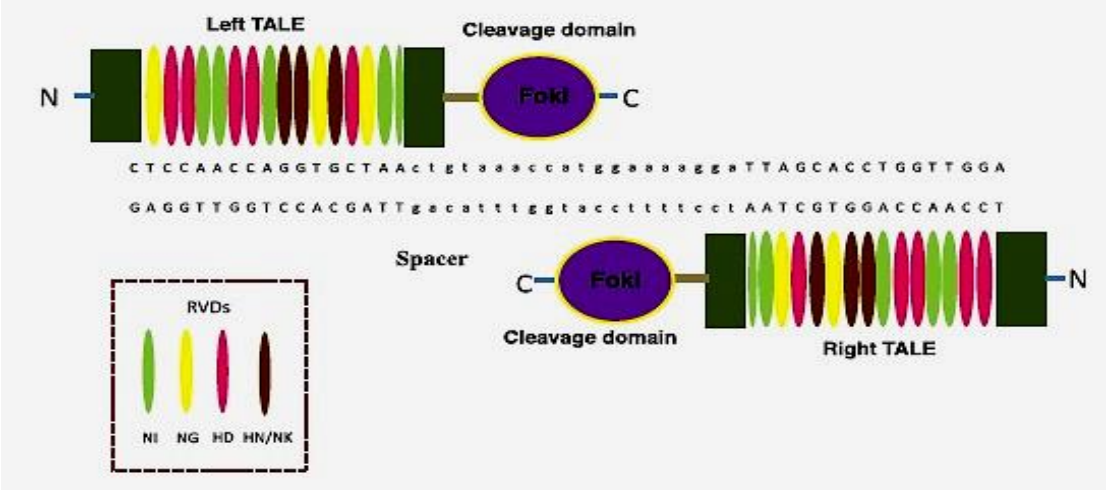
استفاده از ZFN برای درمان بیماری‌ها: ایجاد اختلال در بیان ژن CCR5 در انسان (ژن سلول $CD34^+$) برای مقاومت به ویروس HIV و نهایتا موجب حفاظت از سلول‌های ایمنی بدن و درمان HIV می‌شود [٦].

سیستم ویرایش ژنومی وابسته به اندونوکلئاز فعال کننده رونویسی یا به اختصار TALEN

TALEN به‌سرعت بعد از ZFN ظهور کرد. در این روش نیز همانند ZFN از پروتئین‌های شیمر استفاده می‌شود [۷]. دایمر اندونوکلئاز FOKI موجب DSB می‌شود. اجزای آن به‌ترتیب فاکتورهای شبه فعال کننده‌ی ترجمه و دمین متصل شونده به DNA هستند. فاکتورهای شبه فعال کننده‌ی ترجمه، پروتئین‌هایی هستند که به‌طور طبیعی از باکتری‌های خانواده زانتاموناس ترشح می‌شوند و به توالی‌هایی در ژنوم گیاهان میزبان اتصال می‌یابند. دمین متصل شونده به DNA نیز از تکرارهای متنوعی تشکیل شده که هر کدام حدود ۳۵-۳۳ آمینواسید طول دارند. هر تکرار یک تک نوکلئوتید را در توالی DNA هدف شناسایی می‌کند که اختصاصیت نوکلئوتیدی توسط دو آمینواسید در موقعیت‌های ۱۳-۱۲ تایید می‌شود [۲] (شکل۸).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-04]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.10.3]



شکل۸- تصویر نوکلئاز TALEN جفت شده با توالی DNA هدف. هر توالی TALEN دارای افکتورهای شبه فعال کننده رونویسی در انتهای N-terminal (TALEs) و دومین شکافنده اندونوکلئاز FOKI در انتهای C-terminal است. هر TALEs شامل ۲۰-۱۵ تکرار متغیر دو رزیدویی (RVDs) و هر RVDs یک جفت نوکلئوتید از توالی DNA هدف را شناسایی می‌کند. جفت‌های TALEN حدودا ۴۰-۳۰ جفت باز را روی DNA هدف شناسایی می‌کنند و دو جفت از توالی هدف TALEN توسط ۲۱-۱۲ جفت باز از جداگرDNA از هم جدا می‌شوند (در تصویر با فونت کوچک مشخص شده‌اند) [۱۰].

روش The golden gate cloning system برای جمع‌آوری کتابخانه‌ای از انواع پلاسمیدهای TALEN برای ۱۸،۷۴۰ پروتئین انسانی در سال ۲۰۱۳ توسط کیم و همکارانش انجام شد.

TALEN انعطاف‌پذیری و کارایی بیشتری نسبت به ZFN دارد، ولی عیب آن مشکل بودن شناسایی نوکلئوتیدها و ٤-۳ بار بلندتر بودن تکرارهای آن نسبت به ZFN است. شباهت تکرارهای TALEN و پیچیده و دشوار بودن جمع‌آوری و نگهداری آن‌ها در یک پلاسمید و کدگذاری آن‌ها در سلول‌های میزبان از دیگر معایب این تکنیک است. علاوه براین تکرارهای پشت سرهم آن‌ها چالش بزرگی برای بسته‌بندی آن‌ها در وکتورهای آدنو وایرال و رترو وایرال است.

اولین استفاده از TALEN در ویرایش ژن‌های *NTF3* و*CCR5* در لاین‌های سلولی و شناسایی ۵ لوکوس در سلول‌های پایه جنینی انسان در سال ۲۰۱۱ بود. در این روش، میزان جهش‌های Off-target کاهش یافته و سیتوتوکسیتی مرتبط با نوکلئازها کاهش می‌یابد.

CRISPR/cas9 یک ابزار پیشرفته و سریع برای ویرایش ژنوم

اخیرا یک ابزار جدید به‌نام CRISPR/cas9 برای ویرایش ژن به‌صورت سریع و موثر کشف شده است. سوای اندونوکلئازهای برشی FokI، CRISPR/cas9 یک اندونوکلئاز باکتریایی است که به‌طور خاص به‌جای اتصال به پروتئین‌های متصل‌شونده به DNA، برای رسیدن به هدف، به توالی RNAی ۲۰bp می‌چسبد، که آنرا به سمت DNA هدف می‌رساند. تحقیقات بیولوژیکی امروزه به سمت ایجاد انقلاب در مهندسی ژنتیک حیوانات و گیاهان با استفاده از سیستم CRISPR/cas9 و RNA با قابلیت برنامه‌ریزی است. CRISPR اولین‌بار در سال ۱۹۸۷ در باکتری *E.coli* شناسایی شد. در سال ۱۹۸۷ کشف شد که

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-04]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.10.3]

ژنوم باکتری‌ها حاوی ۲۹ نوکلئوتید در بین هر ۳۲ نوکلئوتید غیرتکراری است. در طی ۱۰ سال بعد عناصر تکراری دیگری در باکتری‌های مختلف و آرکئی‌ها گزارش شد. در سال ۲۰۰۰ موجیکا و همکارانش [۱۸] این توالی‌های تکراری بین ژنی را در یک خانواده خاص دسته‌بندی کردند که در بیش از ٤۰ درصد باکتری‌ها و ۹۰ درصد آرکئی‌ها وجود دارد. در سال ۲۰۰۲ جیسون و همکارانش [۱۹] برای اولین بار از عبارت CRISPR برای شرح توالی‌های تکراری در ژنوم باکتری‌ها استفاده کردند. اهمیت این توالی‌ها وقتی مشخص شد که محققین به شباهت توالی ژنوم فاژها با توالی‌های بین لوکوس‌های CRISPR پی بردند [۲۰]. در سال ۲۰۰۲ مشخص شد که لوکوس CRISPR ترجمه می‌شود و ویروس‌ها قادر به آلوده کردن آرکئی‌های دارای توالی CRISPR نیستند [۲۱]. در ادامه، تمام این یافته‌ها موجب شناسایی سیستم CRISPR به‌عنوان یک حافظه ایمنی و مکانیسم دفاعی در برابر آلودگی باکتریوفاژی شد. مطالعات نشان دادند که CRISPR Spacer دارای اختصاصیت برای ژن هدف هستند و آنزیم‌های مرتبط با CRISPR آنزیم‌های Cas می‌باشند که کنترل کننده‌ی اکتساب Spacerها و کنترل آلودگی فاژی هستند. در سال ۲۰۱۱ سه جزء کلیدی که در این سیستم نقش دارند شناسایی شد [۲۲]:

۱- CRISPR RNA (CrRNA)

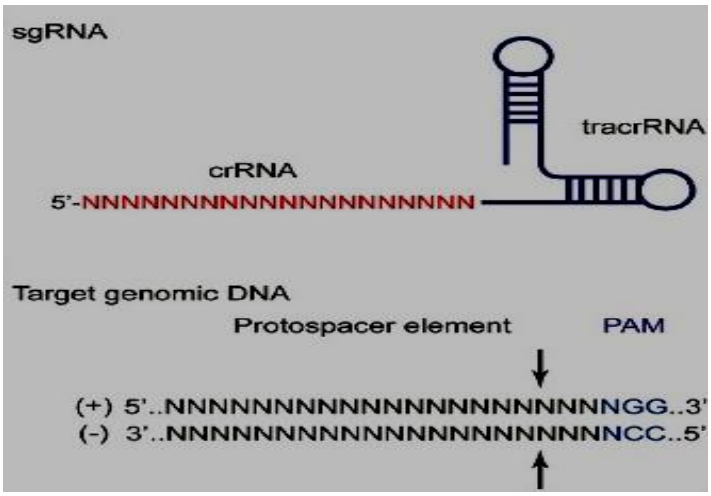
۲- Trans-activating RNA (tracrRNA)

۳- آنزیم Cas

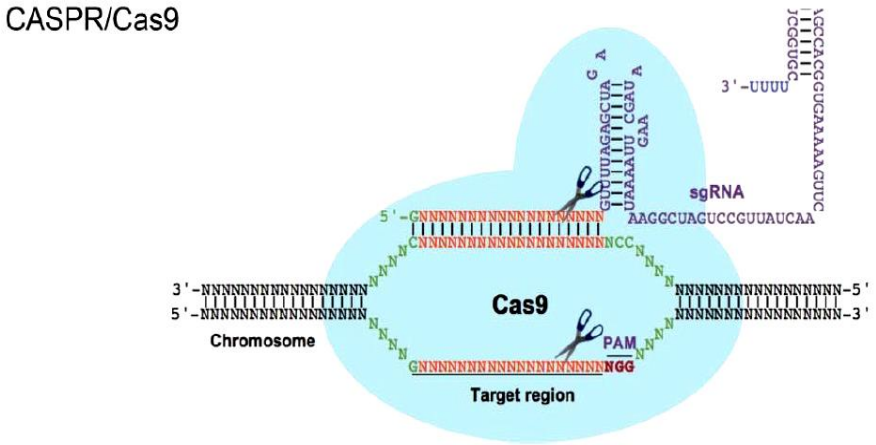
ویژگی حیاتی و ضروری دیگر Cas9، PAM است. PAM سه نوکلئوتید در نزدیکی انتهای ۳ از DNA هدف است که اختصاصیت را در جستجوی ژن هدف تعیین می‌کند. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که شناسایی PAM شامل راه‌اندازی انتقال بین Cas9 که هدفش اتصال است و کانفورماسیون شکاف می‌باشد. شروع تشکیل هترودوپلکس RNA-DNA در ناحیه PAM انجام می‌گیرد [۲۳]. اتصال CrRNA/tracrRNA به نزدیکی PAM بعد از حمله و شروع فعالیت نوکلئازی Cas9 از میان دمین‌های Ruv و HNH انجام می‌گیرد. توالی PAM برای هر ارتولوگ Cas9 خاص است. برای مثال Cas9 استرپتوکوکوس پیوژنز (Sp Cas9) می‌تواند توالی‌های دارای 5-NAG و 5-NGG را در PAM مورد هدف قرار دهد. Cas9 نایسریا مننژیتیدیس (NM Cas9) می‌تواند PAMهای دارای توالی 5-NNNNGATT را هدف قرار دهد. اخیرا سیستم NM Cas9 برای سلول‌های پایه Pluri potent انسانی مورد استفاده قرار گرفته است [۲٤]. هر هیبرید CrRNA به همراه tracrRNA است و هر دو باهم یک RNA راهنمای شیمر با ساختار سنجاق سر را تشکیل می‌دهند (شکل۹). tracrRNA به‌عنوان داربستی برای اتصال نوکلئاز Cas به محل شکاف عمل می‌کند. اختصاصیت اتصال Cas با DNA هدف توسط دو توالی SgRNA که DNA هدف را براساس مکمل بودن جفت بازها تشخیص می‌دهد و حضور یک پروتوراسپیسر مجاور موتیف PAM با توالی NGG که بلافاصله در پایین دست ناحیه هدف قرار دارد، تعیین می‌شود. چندین خوشه ژنیِ شدیدا محافظت شده Cas در مجاورت عناصر تکراری یافت شده‌اند. خانواده پروتئینی Cas9 توسط دو دمین RuvC و HNH شناسایی می‌شوند.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-04]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.10.3]



شکل ۹- تصویر یک RNA راهنما، یک مولکول RNA سنتز شده نتیجه اتصال crRNA (۲۰ نوکلئوتید قرمز رنگ) و داربست tracrRNA (به رنگ آبی) می‌باشد. sgRNAها برای هدف‌گیری توالی مخصوص در ژنوم برای اندونوکلئاز Cas9 مناسب و مورد نیاز هستند. توالی DNA هدف که شامل پروتواسپیسر (۲۰ نوکلئوتید به رنگ مشکی) و در بالادست عناصر کمکی (PAM, NGG به رنگ آبی). فلش‌ها محل ایجاد شکستگی ایجاد شده توسط اندونوکلئاز Cas9 نشان می‌دهند [۲۴].



شکل۱۰- نمای کلی از سیستم CRISPR/Cas9. تصویر نمایشی DNA هدف به‌همراه هدف‌گیری توسط sgRNA-guide. یک sgRNA، دارای ۲۰ نوکلئوتید crRNA spacer و دم tracrRNA، که اندونوکلئاز Cas9 را برای متصل شدن به محل مورد نظر راهنمایی کرده و پیچ و تاب حدود ۲۰ نوکلئوتید از محل مورد نظر بر روی ژنوم را باز می‌کند. محل هدف باید در چارچوب 50-N20-NGG باشد. ابتدا و انتهای رشته DNA ژنومی توسط دومین RUV و دمین HNH از Cas9 برای ایجاد شکستگی رشته دوتایی در نزدیکی PAM حدود سه جفت باز شکافته می‌شود [۲۵].

مطالعات اولیه نشان دادند که حداقل ۱۱ نوع سیستم CRISPR/Cas وجود دارند و تمام این سیستم‌ها در سه گروه عمده I,II, III تقسیم می‌شوند. نوع I و III حاوی انواع مختلف پروتئین Cas هستند که برای تسهیل شناسایی نوکلئیک‌اسیدهای هدف با CrRNA تشکیل یک کمپلکس را می‌دهند. اما در نوع II فقط از یک پروتئین Cas بنام نوکلئاز Cas9 استفاده می‌شود، که به‌دلیل ساده بودن بیشتر مورد مطالعه قرار گرفته و تبدیل به یک ابزار ژنومی مناسب جهت ویرایش شده است [۲۶ و ۲۷].

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-04]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.10.3]

سیستم CRISPR/Cas نوع I

پروتئین‌های این سیستم شامل Cas3 و Cascade (CRISPR-associated complex for antiviral defense) می‌باشد. مجموعه CRISPR به پیش‌ساز CrRNA تبدیل می‌شود و طی پردازش بر روی توالی‌های تکراری تبدیل به یک CrRNA کوتاه و بالغ می‌شود [۲۸]. 7 Cascade دارای فعالیت مخصوص تکرار می‌باشد. ۸ نوکلئوتید تکراری بالادست توالی جداکننده را می‌شکافد و CrRNA کوتاه دارای کل توالی واقع شده در کنار تکرارها را رها می‌کند. CrRNA ارتباط خود را با مجموعه Cascade حفظ کرده و مجموعه را به سمت هدف هدایت می‌کند.

ایمنی موثر نیازمند میان‌کنش بین اولین نوکلئوتید از ۸ نوکلئوتید هدف (که به‌عنوان Target seed شناخته می‌شود) و کل توالی CrRNA راهنما است. در انتهای `5 دوپلکس RNA:DNA وقوع جهش در شش نوکلئوتید بجز Target seed در *اشرشیاکلای* سیستم ایمنی CRISPR را تحت تاثیر قرار نمی‌دهد. که به دلیل ساختار رشته‌ای نانوکانونیکال تشکیل شده توسط CrRNA راهنما و رشته DNA هم‌جنس‌اش با مجموعه Cascade است. این استقرار وضعیت نیازمند چرخش خارجی هر یک نوکلئوتید از هیبرید CrRNA:ssDNA است. همچنین، ششمین نوکلئوتید از Seed می‌تواند بدون جفت شدن با این ساختار غیرمعمول باقی بماند. در نتیجه جهش در این موقعیت اختلالی در ایمنی ایجاد نمی‌کند. دومین جز مهم برای ایمنی نوع اول، حضور موتیف نوکلئوتیدی بلافاصله بعد از بالادست توالی هدف بنام PAM یا (protospacer-adjacent motif) است. در سیستم نوع I-E در *اشرشیاکلای*، یک توالی سه نوکلئوتیدی AWG است که به‌نام CasA شناخته می‌شود و جزئی از مجموعه Cascade می‌باشد [۲۹]. به‌نظر می‌رسد که وجود PAM یک نوع مقاومت به خود ایمنی ایجاد می‌کند و مانع از خود ایمنی در برابر توالی‌های DNA جداکننده که مکمل رمز خود در CrRNA هستند. غیاب PAM در انتهای 5 توالی تکراری مانع از هدف‌گیری می‌شود. همانند توالی Seed، جهش در PAM موجب گریز و در امان ماندن باکتریوفاژ از اثر سیستم ایمنی CRISPR می‌شود [۳۰]. هر گاه هر دو توالی PAM و Seed در مقابل هم قرار گیرند، Cas3 به‌عنوان نوکلئاز DNA دو رشته‌ای توسط مجموعه Cascade برای شکافت رشته DNA در محل هدف‌گیری از انتهای 3 به سمت 5 به‌کار گرفته می‌شود [۳۵-۳۱].

سیستم CRISPR/Cas نوع II

سیستم نوع دوم CRISPR بستگی به حضور اندونوکلئاز Cas9 دارد و ساده‌ترین نوع در بین تمام انواع سیستم‌های CRISPR می‌باشد. فرآیند تولید پیش‌ساز CrRNA نیازی به اندوریبونوکلئاز مخصوصی نیست. در عوض توالی خاص نوع دوم CRISPR یک tracrRNA را کد می‌کند که دارای ناحیه مکمل توالی‌های تکراری است [۲۲, ۲۶]. نوکلئاز Cas9 به tracrRNA متصل می‌شود که tracrRNA نیز به توالی‌های تکراری CrRNA متصل است. این ساختار RNA دو رشته‌ای توسط RNaseIII شکافته شده و یک Cas9 بارشده با tracrRNA و CrRNA تولید می‌کند. Cas9 تنها ژن مورد نیاز برای بروز ایمنی نوع دوم CRISPR است [۲۳]. همانند نوع اول، در نوع دوم نیز به شش الی ۸ نوکلئوتید از توالی

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-04]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.10.3]

Seed و PAM نیاز است [۲۲, ۳٦]. توالی Seed و PAM در انتهای ۳` هدف قرار دارند، که هدف‌گیری همانند سیستم نوع اول است و هر جهشی در این توالی‌ها موجب فرار ویروس‌ها از سیستم ایمنی می‌شود [۲۲, ۳٦] به‌محض آلودگی، مجموعه ریبونوکلئاز tracrRNA/crRNA/Cas9 ژنوم ویروسی را برای توالی PAM جست‌وجو می‌کند. اتصال Cas9 به PAM موجب باز شدن کلاف در بالادست توالی هدف شده و اتصال crRNA به توالی مکمل‌اش می‌شود [۳٦]. نتیجه‌ی اتصال فعالانه crRNA ایجاد لوپ در رشته هدف و شکافت آن توسط Cas9 است [۲۳, ۳۷]. لنگرگاه آنزیم برای اتصال دو موتیف HNH و RuvC که برای بروز ایمنی نیز ضروری هستند، می‌باشد. هر یک از این دمین‌ها یک رشته از DNA هدف را می‌شکنند [۳۸, ۳۹] tracrRNA به‌عنوان یک کوفاکتور در شکافت DNA هدف به Cas9 عمل می‌کند [۲۸].

سیستم CRISPR/Cas نوع III

سیستم نوع سوم پیچیده‌تر از بقیه است که با حضور ژن‌های کد کننده Cas10 و RAMP یا به‌عبارتی (repeat-associated mysterious protein) با زیرواحد Csm و یا Cmr با نوع III-A یا III-B که در مجموع باهم Cas10-Csm یا Cas10-Cmr نامیده می‌شوند [۲۷]. همانند سیستم نوع اول فرآیند پردازش توسط اندوریبونوکلئاز مخصوص تکرار Cas6 انجام می‌شود. برخلاف سیستم نوع اول، Cas6 جزئی از مجموعه Cas10 نمی‌باشد [٤۰, ٤۱] تضاد دیگر تولید crRNA و ایجاد شکاف در انتهای ۳ آن توسط Cas6 است که بلوغ crRNA نامیده می‌شود. طی آن توالی‌های تکراری انتهای ۳ حذف شده، یک جمعیت ناهمگونی از crRNAهای بالغ راهنما که در شش نوکلئوتید انتهایی متفاوت از هم هستند، تولید می‌شود. از جمله دو ویژگی خاص در سیستم نوع سوم CRISPR ۱) رونویسی از سرتاسر هدف برای بروز ایمنی ۲) شکافت هم RNA و هم DNA هدف است. فقط crRNA راهنما مکمل رشته کدکننده DNA – نه خود رشته DNA الگو –می‌باشد که موجب بروز ایمنی موثری می‌شود. برخلاف سایر انواع سیستم CRISPR، توالی Seed شناسایی نشده و وقوع جهشی در هدف اختلالی در ایمنی ایجاد نمی‌کند [٤۲]. توالی PAM نیز در این نوع سیستم CRISPR وجود ندارد. شباهت بسیار بالا بین توالی‌های بالادست و crRNA (که از توالی تکراری DNA رونویسی شده است)، موجب ممانعت از بروز خود ایمنی و همچنین حسن اجرای اهداف مورد نظر می‌شود که این ویژگی هم مزیت و هم معایب این سیستم محسوب می‌شود [۱۲].

مراحل سیستم CRISPR/Cas در سلول به‌منظور ایجاد ایمنی

۱- مرحله انطباق (Adaptation): هنگامی‌که سلول باکتریایی مورد هجوم باکتریوفاژها قرار می‌گیرد، ژنوم ویروس وارد سلول میزبان شده و قسمت کوچکی از ژنوم ویروس به طول تقریبی ۷۲-۲٦ جفت باز به نام protospacer در مکان ژنی CRISPR مابین اولین توالی تکراری (inverted repeats) و انتهای ناحیه پیشبری مکان ژنی CRISPR به عنوان توالی spacer غیرتکراری جدید درج می‌شود. دو نوع از پروتئین‌های Cas به نام‌های Cas1 و Cas2 تشکیل یک ساختار پروتئینی چهارتایی را می‌دهند که توالی

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-04]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.10.3]

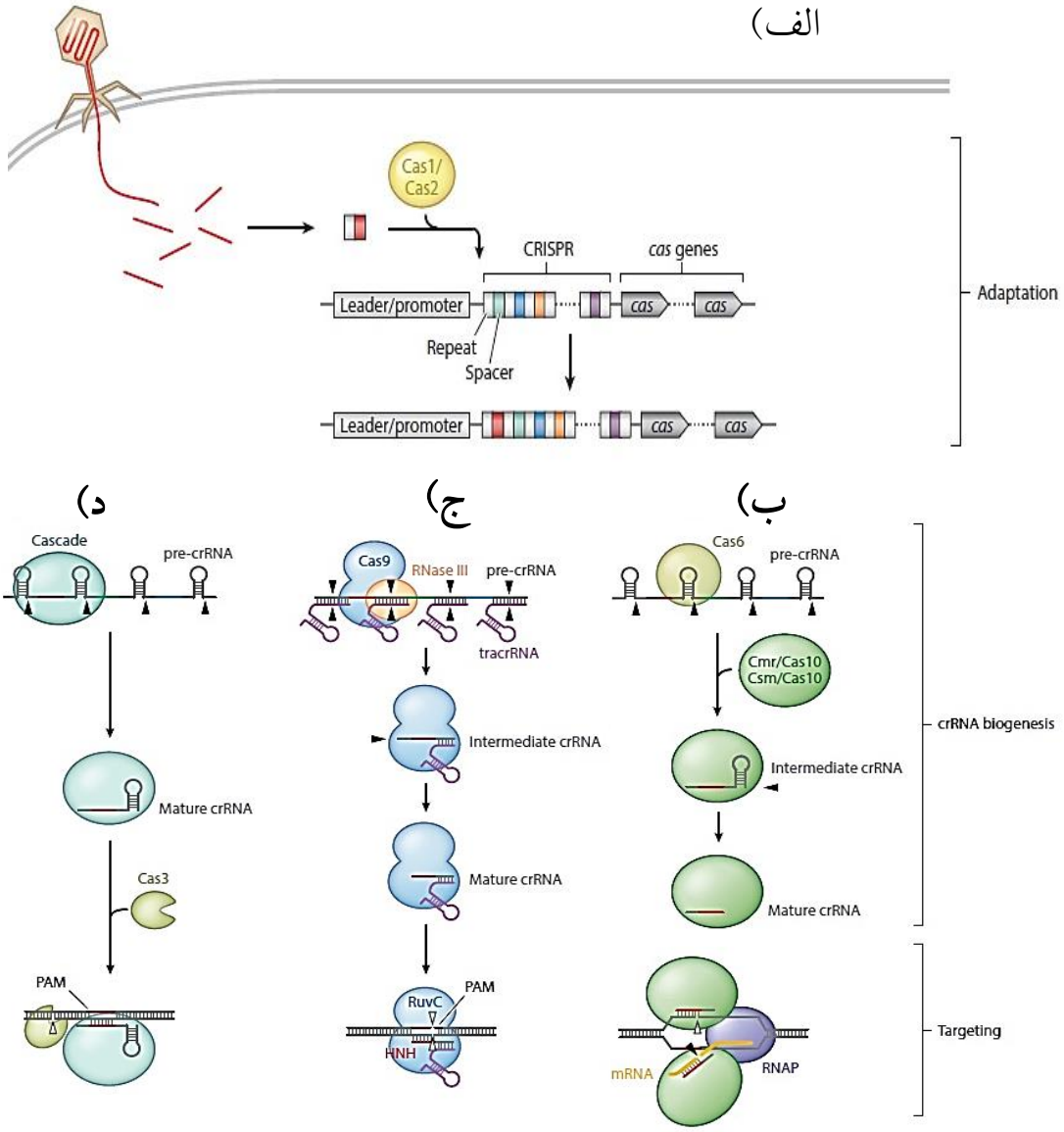
protospacer DNA (به طول تقریبی ۷۱-۲۶ جفت باز) ویروس را از ناحیه موتیف مجاور protospacer (PAM) شناسایی کرده و طی یک واکنش آنزیمی به انتهای ′۳ توالی رهبر (leader) اضافه می‌کند. در مرحله بعدی توسط آنزیم‌های پلیمرازی و آنزیم لیگاز موجود در باکتری، عمل ویرایش و سنتز رشته مکمل توالی‌های تکراری انجام می‌شود [٤٣]. بر اساس مطالعات انجام گرفته علاوه بر پروتئین‌های نوکلئازی Cas1 و Cas2، نوع دیگری از پروتئین Cas به نام Cas4 شناسایی شده است که با فعالیت اگزونوکلئازی در جهت ′۵ به ′۳ و با ایجاد 3′-overhang، امکان ادغام protospacer به مکان ژنی CRISPR را فراهم می‌کند [٤٤].

۲- مرحله سنتز و پردازش crispr RNA (crRNA): بعد از انجام نسخه‌برداری از مکان ژنی، CRISPR یک توالی RNA تک رشته‌ای به‌هم پیوسته از توالی‌های تکراری (حاوی نواحی پالیندرومیک) و توالی‌های spacer غیرتکراری ایجاد می‌شود. به‌طوری که نواحی پالیندرومیک ساختار ساقه-حلقه یا pre-crRNA یا CRISPR RNA اولیه را تشکیل می‌دهند. در نهایت پردازش crRNA اولیه (CRISPR RNA processing) توسط نوکلئازی پروتئین‌های Cas انجام گرفته و crRNAهای بالغ را ایجاد می‌کند.

۳- مرحله تداخل یا اختلال (Interference): توالی tracrRNA که دارای یک ناحیه T شکل (۲۰ نوکلئوتیدی) و سه ناحیه حلقه است، به ناحیه توالی تکراری crRNA متصل شده و تشکیل یک دوپلکس crRNA/tracrRNA به نام RNA راهنما (gRNA) می‌دهد. سپس بین gRNA و کمپلکس Cas9 برهمکنش انجام می‌شود [۳۹]. کمپلکس غیرفعال Cas9 دارای ٦ دمین است که شامل ۱- دمین RECI: بزرگترین دمین پروتئین Cas9 است و در اتصال gRNA دخالت دارد. ۲- دمین RECII: فعالیت دمین RECII نامشخص است. ۳- دمین برهمکنش PAM: فعالیت این دمین در شناسایی توالی PAM و اتصال gRNA است. ٤- دمین Bridge-helix: غنی از نوکلئوتیدهای گوانوزین در نگهداری gRNA و امکان ایجاد برش توسط دمین‌های HNH و RuvC را در ایجاد هیبریداسیون بین gRNA و DNA هدف ایجاد می‌کند. در هنگام ایجاد کمپلکس بین پروتئین Cas9 و Grna، کنفورماسیون دمین‌های RECII، HNH و RuvC تغییر کرده و تولید کمپلکس فعال Cas9 را می‌کنند. دمین‌های HNH و RuvC ۳-٤ نوکلئوتید در بالادست توالی PAM را برش می‌دهند. در واقع ۱۸-۱۲ جفت باز بالادست توالی PAM ناحیهseed region نامیده می‌شود که بین توالی gRNA و DNA هدف هیبریداسیون ایجاد می‌شود. اختصاصیت این ناحیه در میزان کارآیی سیستم CRISPR/Cas9 بسیار حائز اهمیت است. کمپلکس Cas9 با ایجاد برش‌های دورشته‌ای (DSBs) در DNA ژنومی باعث ایجاد ویرایش ژنوم در توالی ژن هدف می‌شود [٤٥, ٤٦].

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-04]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.10.3]



شکل ۱۱- نمای کلی ویرایش ژنوم توسط سیستم‌های CRISPR. الف) آلودگی ژنوم توسط فاژ، ب) مراحل بیوسنتز CrRNA و هدف‌گیری ژن با استفاده از CRISPRIII، ج) مراحل بیوسنتز CrRNA و توسط tracrRNA RNAase III که نوکلئاز Cas9 به‌tracrRNA متصل می‌شود و tracrRNA نیز به توالی‌های تکراری CrRNA متصل است و هدف‌گیری ژنوم با استفاده از کمپلکس CRISPRII، د) مراحل تولید و تشکیل Cas3 و Cascade و هدف‌گیری ناحیه مکمل با CrRNA [11]

کشف نوکلئازهای Cas9 مختلف برای شناسایی PAMهای مختلف، میزان هدف‌گیری Cas9 را افزایش داده است. همچنین افزایش شناسایی سایت‌های PAM موجب افزایش تنوع سیستم ویرایش ژنومی CRISPR/Cas9 شده است. علاوه براین فهم ساختار پروتئینی و عملکردی Cas9 اصلاح و تغییرات مورد

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-04]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.10.3]

نیاز را برای طراحی و مهندسی جدید سایت‌های PAM امکان‌پذیر می‌کند. به‌دلیل راحتی استفاده‌ی تک RNA در سیستم ویرایش ژنومی CRISPR/Cas9، Guid-RNA (gRNA)های بسیاری برای ویرایش ژنومی اتخاذ شده‌اند. gRNAها دارای حدود ۲۰ اسید نوکلئیک در توالی راهنما هستند که برای هیبرید شدن به محل ژنومی خاصی طراحی شده‌اند.

سیستم CRISPR/Cas9 تحولی عظیم در علوم ژنتیک

سازگاری، اجتماع راحت، اختصاصیت بالا و کارایی بالا CRISPR/Cas9 را بسیار ارزشمندتر از ZFN و TALEN کرده است. CRISPR/Cas9 امروزه رایج‌ترین متد برای ویرایش ژنوم است. gRNAها و Cas9 پروتئین‌ها، قادر به بررسی کل ژنوم برای پیدا کردن توالی مناسب خود هستند که با DNA مکمل جفت شده و در یک محل خاص DSB ایجاد می‌کنند. در سال ۲۰۰۵ کشف شد که Spacerها بسیار ضروری‌اند و برای CRISPR و پروتئین‌های Cas مرتبط با سیستم ایمنی اکتسابی باکتری‌ها، نقش مهمی تعیین شد. دو سال بعد یعنی در سال ۲۰۰۷، مشخص شد که سیستم ایمنی اکتسابی باکتری به‌وسیله CRISPR در برابر حملات ویروسی ارتقا می‌یابد. همچنین مشخص شد که ایمنی اکتسابی براساس RNA تولید شده توسط DNA هدف و ایجاد شکاف در رشته دوتایی DNA مهاجم ایجاد می‌شود. هر تکرار یک توالی ۲۹ نوکلئوتیدی است و تکرارها در بین پنج توالی غیرتکراری ۳۲ نوکلئوتیدی پخش شده‌اند. ژن‌های مرتبط با CRISPR نیز شناسایی شده‌اند این ژن‌ها عموما مجاور عناصر تکراری (repeat elements) و به‌صورت حفاظت شده‌اند. در سال ۲۰۱۱ مشخص شد که انتقال لوکوس CRISPR نوع II از *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* به *اشرشیاکلای* می‌تواند موجب اختلال سیستم CRISPR در سویه باکتری متفاوت شود. در سال ۲۰۱۲ نشان داده شد که cas9 خالص‌سازی شده از *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* یا *استرپتوکوکوس پیوژنز* می‌تواند در شرایط in vitro به‌عنوان CrRNAs برای شکافتن DNA شود. تولید شکستگی در رشته دوتایی در شرایط درون شیشه‌ای، مسیر را برای توسعه سیستم CRISPR/cas9 به‌عنوان یک ابزار مهندسی ژنتیک هموار کرد. سرانجام هنگامی که کشف شد یک تک رشته RNA، موجب انتقال یک محتوی CrRNA به توالی هدف می‌شود و شکافت DNA توسط cas9 در شرایط آزمایشگاهی تسهیل می‌شود، سیستم CRISPR/cas9 از یک سیستم بیولوژیکی به یک ابزار مهندسی ژنتیک تبدیل شد. بعد از اولین توضیحات در مورد سیستم CRISPR/cas9، این تکنیک به‌عنوان یک تکنولوژی ویرایش ژنوم به‌کار گرفته شد. پنج گروه از محققین در سال ۲۰۱۳ دو جز سیستم عملکردی آن را در انسان و موش و ماهی زبرا تعیین کردند. در همان زمان در مورد اولین گونه‌های گیاهی دست‌ورزی شده تحت این تکنیک چندین گزارش داده شد. از جمله این گیاهان: آرابیدوپسیس تالیانا، نیکوتیانام بن‌تامیانا و برنج می‌باشد.

گیاهان دست‌ورزی شده را می‌توان با استفاده از تکنیک‌های مختلفی غربالگری کرد. برای مثال گیاهان ویرایش شده توسط CRISPR/cas9 را می‌توان با PCR و هیبریداسیون SB براساس ژن الحاق شده طراحی کرد. در صورت وجود ژن‌های گزارشگر یا ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها، گیاهان ویرایش

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-04]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.10.3]

شده را می‌توان از طریق مشاهده بیان فنوتیپی یا ژن‌های گزارشگر یا انتخاب آنتی‌بیوتیکی، غربالگری کرد. اضافه کردن دو ژن هدف، حذف، معکوس شدن یا جابجایی ژن در ناحیه هدف را می‌توان با متدهایی مثل Restriction enzyme digestion analysis ,Sequencing analysis ,SURVEYOR assay ارزیابی کرد. نوع غربالگری باید براساس نوع ویرایش ژن مورد نظر انتخاب شود. مهندسی ژنوم چندگانه تاکنون در آرابیدوپسیس، برنج و گوجه گزارش شده است. اخیرا یک وکتور بر پایه CRISPR/cas9 ایجاد شده و نقشه وکتور مدل gRNA به‌عنوان یک tool kit برای مهندسی ژنتیک چندگانه در گیاهان تولید شده که این کیت در مورد پروتوپلاست ذرت، لاین‌های تراریخت ذرت و آرابیدوپسیس و اختصاصیت بالا مورد استفاده قرار گرفته است. توانایی ایجاد gRNAهای چندگانه به‌طور مشابه و باهم می‌توانند برای تولید حذف‌های کروموزومی وسیع در مسیر موثری به‌کار گرفته شود. علاوه بر راحتی تولید sgRNAهای هدف و توانایی انجام مهندسی ژنتیک موثرتر، سیستم CRISPR/cas9 می‌تواند در تمام بافت‌های گیاهی استفاده شود. در بعضی گونه‌های گیاهی، جهش‌های هموزیگوت knockout را می‌توان در یک نسل ایجاد کرد. همچنین، انتقال ژن هدف یا (خاموشی درجا) برای قطعه DNA مورد نظر در ژنوم گیاهان به‌عنوان یک چالش باقی مانده است.

فهرست منابع

References

1- **Samanta M, D.A., Gayen S. 2016.** CRISPR/Cas9: an advanced tool for editing plant genomes Review of Transgenic Research. Springer International publishing. DOI 10.1007/s11248-016-9953-5.

2- **Pellagatti A, D.H., Yip BH, Valletta S, Boultwood J. 2015**. Application of genome editing technologies to the study and treatment of hematological disease. Advances in Biological Regulation,. doi: 10.1016/j.jbior.

3- **Liu W, Y.J.a.S.C. 2013.** Advanced genetic tools for plant biotechnology. Nature reviews Genetics , doi: 10.1038/nrg3583.

4- **Bibikova M, G.M., Golic KG, Carroll D. 2002.** Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in Drosophila using zinc-finger nucleases. Genetics, (161): p. 1169-75.

5- **Carbery ID, J.D., Harrington A, Brown V, Weinstein EJ, Lia. 2010.** Targeted genome modification in mice using zinc-finger nucleases. Genetics, (186): p. 451-459.

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

7- **Joung JK, S.J. 2013.** TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. Nat Rev Mol Cell Biol, (14): p. 49-55.

8- **Femi J, R.S.a.S.M. 2016.** Site-specific recombinases: molecular machines for the Genetic Revolution. Biochem, (473): p. 673–684.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-04]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.10.3]

9- **Akopian A, S.M. 2005**. Site-Specific DNA Recombinases as Instruments for Genomic Surgery. Advances in Genetics. 55(12): p. 345-355.

10- **Gayen, M.K.S.A.D.S. 2016.** CRISPR/Cas9: an advanced tool for editing plant genomes. Springer International Publishing Switzerland. 5: p. 261-248.

11- **Marraffini, W.J.a.L.A. 2015.** CRISPR-Cas: New Tools for Genetic Manipulations from Bacterial Immunity Systems. Annu. Rev. Microbiol. 69: p. 209–28.

12- **Marraffini LA, S.E. 2010.** Self versus non-self discrimination during CRISPR RNA-directed immunity. Nature. (463): p. 568–71.

13- **Gogarten JP, H.E. 2006**. Inteins, introns, and homing endonucleases: recent revelations about the life cycle of parasitic genetic elements. BMC evolutionary biology. 6: p. 94-83.

14- **Wusheng Liu, J.S.Y.a.C.N.S.J. 2013.** Advanced genetic tools for plant biotechnology. Nature Reviews Genetics. 14: p. 13-1.

15- **Lu Y, a.Z.J. 2017**. Precise editing of a target base in the rice genome using a modified CRISPR/Cas9 system. Mol. Plant. doi: 10.1016/j.molp.2016.11.01.

16- **Cui X, J.D., Fisher DA, Wu Y, Briner DM, Weinstein EJ. 2011.** Targeted integration in rat and mouse embryos with zinc-finger nucleases. Nat Biotechnol. 29: p. 64-67.

17- **Meyer M ,d.A.M., Wurst W, Kuhn R, Miller JC, Tan S, Qiao. 2010.** Gene targeting by homologous recombination in mouse zygotes mediated by zinc-finger nucleases. Proc Natl Acad Sci USA, (107): p. 15022-6.

18- **Mojica FJ, D.-V.C., Garcia-Martinez J, Soria E. 2005.** Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. J Mol Evol .(2)6: p. 174–182

19- **Jansen R, E.J., Gaastra W, Schouls LM. 2002**. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. Mol Microbiol. 43(6): p. 1565–1575.

20- **Bolotin A, Q.B., Sorokin A, Ehrlich SD. 2005.** Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. Microbiology society, (151): p. 2551-61.

21- **Tang J, S.B., Makhatadze NJ, Zhang Y, Schaen M, Louie LG, Goedert JJ, Seaberg EC, Margolick JB, Mellors J, Kaslow RA. 2002**. Distribution of chemokine receptor CCR2 and CCR5 genotypes and their relative contribution to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) seroconversion, early HIV-1 RNA concentration in plasma, and later disease progression. J Virol,. 76(2): p. 662-72.

22- **Deveau H, B.R., Garneau JE, Labonte J, Fremaux C. 2008.** Phage response to CRISPRencoded resistance in Streptococcus thermophilus. Bacteriol, (190): p. 13400-421

23- **Sternberg SH, R.S., Jinek M, Greene EC, Doudna JA. 2014.** DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. Nature, (507): p. 62–67.

24- **Huo Y, N.K., Ding F, Lee H, Wu L. 2014.** Structures of CRISPR Cas3 offer mechanistic insights into Cascade-activated DNA unwinding and degradation. Nat. Struct. Mol. Biol, (21): p. 771–77.

25- **Naglaa A Abdallah, C.S.P.A.G.M. 2015.** Genome editing for crop improvement: Challenges and

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-04]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.10.3]

opportunities. Taylor & Francis,. 6: p. 183–205.

26- **Jain, V.K.a.M. 2014.** The CRISPR–Cas system for plant genome editing: advances and opportunities. Experimental Botany. doi:10.1093/jxb/eru429.

27- **Jiang W, M.L. 2015.** CRISPR-Cas: New Tools for Genetic Manipulations from Bacterial Immunity Systems. The Annual review of Microbiology. 69: p. 209-228.

28- **Brouns SJ, J.M., Lundgren M, Westra ER, Slijkhuis RJ. 2008.** Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. Science. (321): p. 960–964.

29- **Wiedenheft B, v.D.E., Bultema J, Waghmare S, Zhou K. 2011.** RNA-guided complex from a bacterial immune system enhances target recognition through seed sequence interactions. PNAS. (108): p. 10092–97.

30- **Semenova E, J.M., Datsenko KA, Semenova A, Westra ER, 2011.** Interference by clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) RNA is governed by a seed sequence. PNAS, (108): p. 10098–103

31- **Gong B, S.M., Sun J, Jung CH, Bolt EL. 2014.** Molecular insights into DNA interference by CRISPR-associated nuclease-helicase Cas3. PNAS, (111): p. 16359–64.

32- **Hochstrasser ML, T.D ,.Bhat P, Guegler CK, Sternberg SH. 2014.** CasA mediates Cas3-catalyzed target degradation during CRISPR RNA-guided interference. PNAS, (111): p. 6618–23.

33- **Mulepati S, B.S. 2013.** In vitro reconstitution of an Escherichia coli RNA-guided immune system reveals unidirectional, ATP-dependent degradation of DNA target. Biol. Chem. (288): p. 22184–92.

34- **Sinkunas T, G.G., Fremaux C, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. 2011.** Cas3 is a singlestranded DNA nuclease and ATP-dependent helicase in the CRISPR/Cas immune system. EMBO J. (30): p. 1335–42.

35- **Westra ER, v.E.P., Kunne T, Wong SP, Staals RH, 2012.** CRISPR immunity relies on the consecutive binding and degradation of negatively supercoiled invader DNA by Cascade and Cas3. Mol. Cell, (46): p. 595–605.

36- **Jiang W, B.D., Cox D, Zhang F, Marraffini LA, 2013.** RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. Nat. Biotechnol, (31): p. 233–39.

37- **Szczelkun MD, T.M., Sinkunas T, Gasiunas G, Karvelis T. 2014.** Direct observation of R-loop formation by single RNA-guided Cas9 and Cascade effector complexes. PNAS. (111): p. 9798–803.

38- **Gasiunas G, B.R., Horvath P, Siksnys V. 2012.** Cas9–crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. PNAS. 109(E257986).

39- **Jinek M, C.K., Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. 2012.** A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science . (337): p. 816–21.

40- **Hale CR, Z.P., Olson S, Duff MO. 2009.** Graveley BR, RNA-guidedRNAcleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex. Cell (139): p. 945–56.

41- **Hatoum-Aslan A, S.P., Maniv I, Jiang W, Marraffini LA. 2013**. A ruler protein in a complex for antiviral defense determines the length of small interfering CRISPR RNAs. Biol. Chem, (288): p. 27888–97.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-04]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.10.3]

42- **Manica A, Z.Z., Steinkellner J, Schleper C. 2013.** Unexpectedly broad target recognition of the CRISPR-mediated virus defence system in the archaeon Sulfolobus solfataricus. Nucleic Acids Res, (41): p. 10509– 17.

43- **Hsu PD, L.E., Zhang F. 2014.** Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. Cell. 157(6): p. 1262-1278.

44- **Zhang L, Z.Q. 2014.** CRISPR/Cas technology: a revolutionary approach for genome engineering. Life Sciences.Science China. 57(6): p. 639-645.

45- **Jinek M, C.K., Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. 2012.** A programmable dual-RNA–guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science. 337(6096): p. 816-821.

46- **Nishimasu H, R.F., Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, Dohmae N, Ishitani R, Zhang F. 2014.** Nureki O, Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. Cell. 156(5): p. 935-949.

Introduction of the new methods for Gene Editing by endonucleases

Nayyereh Valikhanlou[1], Maghsoud Pazhouhandeh[2*]
[1]MSc. Student of Biotechnology [2]Associate Professor of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Azarbayjan Shahid Madani University, 35 Km Tabriz-Azarshahr, Iran

n.valikhanlou@yahoo.com pazhouhandeh@gmail.com

Abstract
Many genome editing tools introduces and successfully used to modify the genome of various organisms up to now. Genetic modification using enzymes is a powerful tool in biological research. So far, two generations of enzyme genomic editing tools have been introduced, (SSRs: Genome editing mediated by Site- Specific recombinases) and (SSNs: Genome editing mediated by Site- Specific Nucleases). The need for an application to modify the genome for the effective administration of a variety of genes in eukaryotic and prokaryotic organisms, saving time and expenses, improving quality and increasing the quantity of agricultural products, Therapeutic applications, drug production, or secondary metabolites, understanding the function of genes and inter-gene relationships, all of this has made rapid evolution and progress of the genome editing tools. During the last decade, two types of genome-editing nucleases, TALEN and ZFN have been successfully used for editing and modifying plants. Recently, another new technique called CRISPR / cas9 has been discovered and is widely used for genomic editing in a wide range of species. Today, using the CRISPR / cas9 system and the programmable RNA, a huge revolution has been created in biological research and genetic engineering. In this article, we have introduced and discussed the genome editing based on engineered endonuclease.
Keywords: CRISPR/cas9, Endonuclease, Genome editing, Gene targeting

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-04]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.10.3]