

تاریخچه ویرایش ژنوم در پستانداران

چکیده

ویرایش ژنوم در حال حاضر یک روال معمول در بسیاری از آزمایشگاه های ژنتیک پستانداران است. سابقه به ظاهر کوتاه اما قوی دستورالعمل های ویرایش ژنوم نشان می دهد که چگونه یک تکنولوژی مخرب می تواند به طور جهانی در یک زمینه مورد استفاده قرار گیرد ، زمانی که دریافتند که این روش جدید می تواند ژنوم پستاندار را در مکان های خاص تغییر دهد، به نتایج کارآمد و قوی دست یافتند . این بررسی خلاصه ای از توسعه اولیه ویرایش ژنوم با استفاده از نوکلئاز ها ، از آزمایش های اولیه ای که از مگانوکلئاز های مخمر استفاده کردند ، تا آخرین نوکلئازهای پروکاریوتی که برای دستکاری ژنوم دقیق استفاده می شوند، ارائه می دهد . نوکلئازهای ویرایش ژن متعلق به یکی از سه دسته شناخته شده زیر هستند:

1. zinc-finger nucleases (ZFN) : نوکلئاز انگشت روی
2. transcription activator-like effector nucleases (TALEN) : افکتور نوکلئاز شبه فعال کننده رونویسی
3. clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) and their associated proteins (Cas) tools : تناوب های کوتاه پالیندروم فاصله دار منظم خوشه ای و پروتئین های مرتبط با آن

همه این سه روش بر اساس یک اصل عمل می کنند؛ همه آنها قادر به ایجاد یک شکست دو رشته (DSB) در توالی مشخصی از ژنوم هستند که سپس این شکست با مکانیسم های اندوژن ترمیم DNA اصلاح می شود. DSB ها می توانند از طریق اتصال انتهاهای غیر همولوگ (NHEJ) ترمیم شوند، و در نتیجه منجر به حذف و یا

جایگزینی های کوچک (INDEL ها) در ژنوم می شود و از اینرو اغلب منجر به اختلال در ژن می شوند. به جای آن، DSB ها می توانند با استفاده از مکانیسم ترمیم بر اساس همولوژی (HDR)، در حضور توالی های DNA همولوگوس دهنده، ترمیم شوند و منجر به رویدادهای ویرایش ژن شوند.

مقدمه

تبادل توالی ژنومی اندوژنیک برای مولکول های DNA اهداکننده خارجی با استفاده از نوترکیبی همولوگ (HR) فرایندی است که برای دهه ها شناخته شده است. مطالعات اولیه توسط مرحوم الیور اسمیتیس نشان داد که چگونه مولکولهای همولوگ DNA میتوانند دوباره با هم ترکیب شوند و به درستی در مکانهای کروموزومی تعریف شده در ژنوم پستانداران جایگزین شوند (Smithies et al., 1984, 1985). این یافته ها برای پیش بینی و توسعه روش های هدف گیری ژن در سلول های بنیادی جنینی موش (ES) موثر بود و Smithies همراه با ماریو Capecchi و مارتین ایوانز به طور مشترک جایزه نوبل در فیزیولوژی و پزشکی در سال 2007 (مجله 2007) را به خاطر این کشف دریافت کردند. در این آزمایشات اولیه، بازده حفظ یکپارچگی ژنی که هدف HR قرار می گیرد در رده های سلولی کشت داده شده، حتی در حضور انتخاب، نسبتاً کم بود (در بهترین حالت 1 در 1000) (Smithies و همکاران 1985). با این وجود، این روش حداقل 10 برابر کارایی بیشتری نسبت به تلاش برای قرار دادن یک قطعه ژنتیکی DNA در محل کروموزوم مربوط به آن توسط HR با استفاده از میکرواینجکشن مستقیم پیش هسته ای تخمک های بارور شده موش دارد؛ همانطور که با تلاش های رالف برینستر و همکاران نشان داده شد. (Brinster et al. 1989).

به سرعت واضح شد که باز کردن مولکول DNA اهدا کننده از طریق شکست دو رشته (DSB) در منطقه همولوژی بطور قابل توجهی فرکانس HR درون ژن را افزایش می دهد (Kucherlapati و همکاران 1984؛ Smithies و همکاران 1985). زمانی که آلان برادلی افزایش بهره وری هدف گیری را با استفاده از وکتورهای insertion در مقابل replacement نشان داد؛ مشاهدات مشابهی چند سال بعد در سلول های موشی ES تأیید شد، (Hasty et al., 1991). بنابراین، مزایای کارایی ادغام برای آنهایی که با القای DSB ها در الگوی DNA

اهدا کننده به هم متصل می شوند، بیشتر است ، بنابراین در معرض قرارگیری توالی های همولوگ در پایان این مولکول های DNA، یک مفهوم کلی بود که به طور کامل نهادینه شده بود. مشاهدات نقش اساسی در تحولات بعدی ایفا می کند که منجر به اولین راهبردهای ویرایش ژنوم می شود.

در واقع، گام بعدی در راستای ایجاد اولین راهبردهای ویرایش ژنوم براساس استفاده از مگانوکلازهای I-SceI مخمر بود که یک اندونوکلاز برش دهنده نادر بود که توالی مورد شناسایی آن 18 نوکلئوتید طول داشت و مسئول جایگزینی اینترون در میتوکندری های مخمر بود (Jacquier and Dujon 1985). 10 سال پس از کشف آن، نشان داده شده است که مگانوکلاز I-SceI می تواند برای القای HR در کروموزوم های پستانداران با فراوانی دو مرتبه بیشتر از HR خودبخودی (Choulika et al., 1995) مورد استفاده قرار گیرد. نویسندگان نشان دادند که ترمیم موثر DSB های خاص القا شده توسط I-SceI با مولکولهای DNA اهداکننده حاوی مناطق همولوگ در کنار سایت I-SceI اندوژن در سلول های موشی صورت می گیرد که احتمالاً یکی از اولین تلاش ها برای استفاده از استراتژی های ویرایش ژنوم بر اساس I-SceI meganuclease برای ایجاد DSB برای ترمیم با مکانیسم های سلولی اندوژن بود. پس از آن، معرفی رستریکشن سایت های I-SceI در لوکوس ژنومی موش توسط HR در سلول های ES و بیان موفقیت آمیز این مگانوکلاز در حضور یک وکتور جایگزین با توالی های homologous DNA در اطراف سایت I-SceI معرفی شده، منجر به افزایش قابل توجه کارایی هدفگیری شد (تحریک 100 برابر) (Cohen-Tannoudji و همکاران، 1998). البته، این روش طولانی و پر زحمت بود و به دو مرحله متوالی HR و دو نشانگر انتخابی نیاز داشت. همچنین خیلی عملی نبود، زیرا القای ادغام مبتنی بر I-SceI به شدت وابسته به معرفی قبلی سایت های مورد شناسایی I-SceI در لوکوسی بود که باید اصلاح می شد. علاوه بر این، گزارش های اخیر نشان می دهد که HR با مگانوکلازهای القا شده توسط DSB ها ممکن است در سلول های پستاندار وابسته به لوکوس باشد (Fenina et al., 2012). معرفی سایت های مگانوکلاز I-SceI در هر دو انتهای ترانس ژن ها و تزریق همزمان با مگانوکلاز همچنین باعث افزایش کارایی ترانسژن در جنین های medaka (Thermes et al. 2002) fish و زئوپوس (Pan et al. 2006)، اما نه در جنین های پستانداران شد. به

تازگی، بر این محدودیت با استفاده از یک مگانوکلاز اصلاح شده با سیگنال لوکالایز هسته ای (NLS) غلبه شده است، که به طور موثر ترانس ژنزیس بین جنین های موش و خوک را واسطه گری می کند (وانگ و همکاران 2014).

محدودیت آشکار توالی هدف مرتبط با I-SceI در نهایت با تولید مگانوکلازهای مهندسی شده با سایت های شناسایی سفارشی (تجاری شده) ، هنگامی که آنها بصورت تجاری در دسترس قرار گرفتند ، برطرف شد. یکی از این مگانوکلازهای مهندسی شده، که از I-CreI استخراج شده بود، برای ایجاد نوترکیبی هدفمند با فرکانس بالا در ژن SCID در سلول های انسانی مورد استفاده قرار گرفت (Grizot et al., 2009). اخیراً، یکی دیگر از I-CreI مهندسی شده، که یک توالی 22 جفت بازی از ژن Rag1 را برش می دهد، برای نشان دادن رویدادهای موثر هدفمند در جنین های موش و رت (Menoret و همکاران 2013) مورد استفاده قرار گرفت.

به رسمیت شناختن اینکه مگانوکلازها جز اولین مواردی بودند که به قصد ویرایش ژنوم مورد استفاده قرار گرفتند، و قبل از سایر نوکلئازهای مشهور و جدید (ZFN, nucleases of zinc finger؛ افکتورهای مرتبط با پروتئین فعال کننده رونویسی، TALEN؛ پروتئین های مرتبط با CRISPR) به خوبی استفاده می شدند؛ اغلب به اندازه کافی تایید نشده است، از این رو این مقدمه ای در مورد تاریخچه کوتاه مدت اما قوی ویرایش ژنوم در پستانداران است.

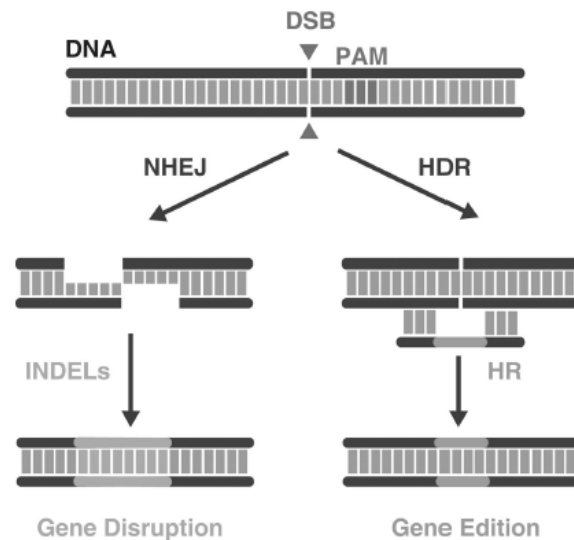
مکانیسمی که از طریق آن انواع مختلفی از نوکلئازها اختلال در ژن یا HR را در حضور مولکول های DNA اهدا کننده مناسب افزایش می دهند ، یکسان است. یعنی همه آنها به طور موثری DSB ها را در مکان های ژنومی خاص القا می کنند. پس از آن، مکانیسم های ترمیم سلولی اندوژن، در غیاب (اتصال انتهاهای غیر همولوگ، NHEJ) و یا حضور (ترمیم همولوگوس، HDR) مولکول های DNA دهنده مناسب، با توالی همولوگوس اطراف DSB، این شکاف در ژنوم را پر می کند. بسته به مسیر ترمیم بکار گرفته شده توسط سلول، DSB اصلی می تواند منجر به وقوع اختلال در ژن شود ، که با درج یا حذف نوکلئوتید ها (INDEL ها) از طریق NHEJ یا در رویدادهای ویرایش ژن مرتبط با HDR ، همراه است (شکل 1). در واقع، مزایای قابل اندازه گیری این نوکلئازها

در ارتباط با افزایش فرکانس وقایع HR ای که آنها می توانند القا کنند، در مقایسه با تلاش های قبلی بدون استفاده از نوکلئاز، حداقل 1000 برابر (Bibikova و همکاران 2001) تخمین زده می شود (Smithies et al., 1985)؛ Brinster و همکاران، 1989).

Zinc-finger nucleases (ZFN)

با وجود اینکه مگانوکلئازهای مخمر اولین مورد برای اصلاح ژنوم پستانداران بودند (Choulika et al., 1995)؛ Cohen-Tannoudji et al., 1998)، یک تغییر اساسی در متدولوژی در سال 2009 برای چگونگی تولید حیوانات ترانس ژن رخ داد. در یک مطالعه پیشگام، گوترز، جاموب و بولوو و همکارانش از نوکلئازهای انگشت روی (ZFN) برای تولید اولین موش های knockout در دنیا استفاده کردند (Geurts et al., 2009). رویکرد روش شناختی بر اساس استفاده از دومین اندونوکلئاز DNA از آنزیم محدود کننده باکتری FokI، مهندسی شده با دومین های zinc finger با ظرفیت اتصال پذیری مشخص DNA است که برای هدف گذاری و برش یک محل خاص ژنوم مورد استفاده قرار گرفت. در واقع نوکلئازهای انگشت روی (ZFN) چندین سال پیش طراحی شده بودند، زمانی که اولین پروتئین کایمیریک حاصل از فیوژن دومین اندونوکلئاز FokI با دومین DNA-binding zinc-finger مهندسی شده، نشان داده شد که به طور موثری برش و HR را در توالی های ژنومی خاص در جنین های زنبوپوس القا می کند. (Bibikova et al 2001). تکنولوژی چند سال بعد از این بهبود یافت و نشان داده شد که ZFN مهندسی شده می تواند جهش SCID انسان در سلول ها را از طریق HR توسط یک DNA دهنده خارج کروموزومی با راندمان بالا (بیش از 18 درصد از سلول ها) بدون انتخاب اصلاح کند (Urnov et al 2005).

تولید DSB مورد انتظار، نیازمند دیمیریزاسیون دمین اندونوکلئاز FokI است، که نشان می دهد که اثر ترکیبی دو ZFN برای برش موثر DNA در هر دو رشته مورد نیاز است (Mani et al 2005). به زودی روش هایی برای طراحی ZFN برای ویرایش ژنوم، ژن های پستانداران ایجاد شد (Porteus 2008).



شکل 1 طرح اصلی نشان دهنده روند ویرایش ژنوم بوسیله نوکلئازها. این طرح برای تمام انواع شناخته شده ویرایش ژنوم معتبر است. نوکلئازهای مربوطه برش DNA را در مکان های ژنومی خاص آغاز می کنند و این باعث شکست دو رشته (DSB) می شود که در نهایت از طریق یکی از دو مسیر احتمالی ترمیم می شود: NHEJ یا HDR، همانطور که اشاره شد. توالی PAM برای رایج ترین سیستم CRISPR-Cas9 که برای اهداف ویرایش ژنوم استفاده می شود، نشان داده شده است. DSB : شکست دو رشته ای. NHEJ اتصال انتهای غیر همولوگ، HDR: ترمیم همولوگ. PAM: موتیف مجاور INDEL, Protospacer: جایگزاری و حذف، HR: نوترکیبی

همولوگ

نوکلئاز انگشت روی (ZFN) به سرعت تبدیل به ابزار کارآمد برای ویرایش ژن شد که برای ایجاد پستانداران ترانسژن استفاده شد. همانطور که قبلاً ذکر شد، اولین مورد از این گزارشات، در مورد تولید رت های knockout (Geurts و همکاران، 2009) بود. رت ها گونه های پستاندارانی هستند که در آن روش رویکرد کلاسیک هدف قرار دادن ژن به علت عدم وجود سلول های معادل ES رت امکان پذیر نبود. در واقع، سلول های ES رت چند ماه قبل از انتشار مطالعه رت knockout جدا شده بودند (Buehr و همکاران 2008). استفاده از ZFN برای تولید پستانداران ترانس ژنیک به سرعت در میان آزمایشگاه های متعدد منتشر شد (Remy و همکاران، 2010) و به زودی نشان داده شد که ZFN در آزمایشات ویرایش ژنوم در موش (Carbery و همکاران، 2010؛ Meyer و

همکاران، 2010)، احشام (یو و همکاران، 2011؛ لیو و همکاران 2013؛ Wei و همکاران، 2015) و خوک ها (Hauschild و همکاران، 2011؛ Carlson و همکاران، 2012؛ Kwon و همکاران 2013؛ چیان و همکاران 2015) با موفقیت همراه بوده است .

بزرگترین تأثیر ZFN احتمالاً در گونه های دام بود، زیرا عدم وجود سلول های ES واجد شرایط خاص گونه، تغییرات ژنومی را که نیازمند رویدادهای HR بود را محدود می کرد (Petersen and Niemann 2015). نمونه های خوبی از ZFN برای برنامه های کاربردی دام، با گاوهای اصلاح شده ژنومی با افزایش مقاومت به ماستیت (التهاب پستان) نشان داده شده است (لیو و همکاران، 2014a, b) و یا خوک های اهلی که ژنوم آنها ویرایش شده و حامل یک واریانت ژن RELA مشتق از گراز با هدف انتقال خاصیت بهبودی مرتبط با تب خوک آفریقایی (Lillico et al 2016) هستند.

برنامه های کاربردی ژن درمانی با ZFN همچنین در کشت بافت (مثلاً Overlack و همکاران 2012) بکار برده شدند و مورد بررسی قرار گرفتند . این برنامه ها شامل انتقال ساختارهای بیانی برای این نوکلئازهای کایمیریک از طریق ذرات مرتبط با ویروس آدنو (AAV) بود (Ellis et al. 2013). به موازات همین، با این حال، برخی از پیامدهای ناخواسته کشف شد. به عنوان مثال، مشاهده شد که اختصاصیت توالی ZFN دقیق نیست و توالی های ژنومی مشابه (که off-targets نامیده می شود) نیز می تواند مورد هدف قرار گیرند و در نهایت با مولکول DNA اهدا کننده ترمیم شود، که این یکی از محدودیت های فعلی نوکلئاز ویرایش ژنوم را برجسته می کند (Radecke و غیره 2010). با این وجود، برخی از مطالعات پری کلینیک استفاده کننده از ZFN در سلول های انسانی تا مرحله آزمایشات بالینی پیشرفت کرده اند؛ همانطور که این مسئله با غیر فعال شدن CCR5 که کو رسپتور اچ آی وی است نشان داده است و توسط مقامات نظارتی ایالات متحده تصویب شده است (Tebas et al. 2013).
al. 2014).

به عنوان یک نکته نهایی برای این بخش، مشخص شد که متدولوژی ZFN برای آزمایشگاه های زیست شناسی استاندارد به راحتی قابل دسترس نیست و همچنین مقرون به صرفه نیست و این واقعیت ممکن است موفقیت و

تاثیر ZFN را در ترانسژنزیس پستانداران محدود کند. در واقع، اگر چه برخی از پلتفرم ها باز برای تولید ZFN (Hermann و همکاران، 2012) ایجاد شد، اکثر آنها توسط شرکت هایی که دارای حق ثبت اختراع برای این فناوری بودند، تجاری شدند (Swarthout و همکاران، 2011).

افکتور نوکلئاز شبه فعال کننده رونویسی (TALEN)^۱

در سال 2011، نوع جدیدی از نوکلئاز ویرایش کننده ژنوم، که به عنوان افکتور نوکلئاز شبه فعال کننده رونویسی (TALEN) شناخته می شود، در این زمینه گزارش شده است، که نشان دهنده یک جایگزین بالقوه برای ZFN است. مشابه آنچه که برای ZFN ذکر شد، TALEN اولین بار برای تولید موش های knockout، استفاده شد (Tesson et al., 2011). با وجود اینکه برای هدفگیری ژن در موش ها از سال 1987 پرتکل استاندارد تعریف شد، ویرایش دقیق ژنوم در رت دهه ها امکان پذیر نبود و این مسئله به احتمال زیاد توضیح می دهد که چرا این فن آوری های جدید برای اولین بار در رت استفاده شد و در نهایت به موش منتقل شد. در واقع، به زودی پس از آن، استفاده از TALEN برای ویرایش ژنوم در موشها گسترش یافت، بطوری که تعداد زیادی از مدل های جدیدی knockout به سرعت ایجاد شد (Panda et al. 2013؛ Sung et al. 2013a؛ Wang et al. 2013؛ Wefers et al. 2013). TALEN نیز برای تولید گونه های حیوانی که ژنوم آنها ویرایش شده (Carlson et al. 2012)، از جمله خوک ها (Xin et al. 2013)، بز (Cui و همکاران، 2015)، گوسفند و گاو (Proudfoot et al. 2015؛ Wei et al. 2015 و همکاران 2015) و پریمت های غیر انسانی (Liu et al 2014a، b) استفاده شد. باز هم همانند آنچه که برای ZFN مشاهده شد، TALEN به عنوان ابزار قوی و قابل اعتماد برای چندین کاربرد بیوتکنولوژی و زیست پزشکی در دام ها شناخته شده است و به ویژه به عنوان یک استراتژی کارآمد برای تولید مدل های بزرگ حیوانات از بیماری های انسانی به کار گرفته شده است (Whitelaw et al 2016). برنامه های کاربردی کشاورزی با استفاده از TALEN شامل تولید گاوهای اصلاح شده ژنومی بدون شاخ، مطابق با یک آلل

¹Transcription activator-like effector nucleases
(TALEN)

جهش یافته طبیعی (Tan و همکاران 2013) و یا تولید گاو اصلاح شده ژنومی با افزایش مقاومت به سل است (Wu et al. 2015).

در حالی که TALEN دارای شباهت هایی با ZFN است، برخی تفاوت های جذاب نیز وجود دارد. هر دو ZFN و TALEN پروتئین های کایمریکی هستند که بوسیله اتصال یک DNA-binding domain با دامین اندونوکلاز مشابه، از رستریکشن آنزیم FokI ایجاد شده اند. آنها همچنین به عنوان دایمر عمل می کنند، بدین ترتیب یک جفت از ZFN یا TALEN همیشه باید در نظر گرفته شود تا مکان ژنومی مورد نظر را هدف قرار دهند. این به طور معمول از طریق الگوریتم های مبتنی بر وب به دست می آید که به محققان کمک می کند تا بهترین توالی های DNA هدف را در هر دو رشته در لوکوس هدف پیدا کنند. (Periwal 2016). با این حال، در حالی که ZFN به طور کامل در آزمایشگاه، با اختصاصیت اتصال به DNA مشخص، بر اساس یک کد احتمالی که گروه های سه اسید آمینه ای را با سه نوکلئوتید لینک می کند، مهندسی شده است؛ TALEN حاصل از پروتئین TALE است که در طبیعت وجود دارد و توسط برخی از پاتوژن های آلوده کننده گیاهی استفاده می شود تا آنها بتوانند دستگاه های سلولی را برای حمایت از چرخه زندگی پاتوژن به کار گیرند (موسولینیو و کاتومان 2012). از طریق بررسی سیستماتیک پروتئین های متعدد TALE، رمزگشایی یک کد مرتبط با دو آمینو اسید دقیق موجود در درون پروتئین با ظرفیت آن برای اتصال به یک نوکلئوتید مشخص، امکان پذیر بود (Bochtler 2012). بر خلاف ZFN، که به یک شرکت اختصاص داده شده بود و باید از طریق آن سفارش داده می شد، تولید TALEN مهندسی شده بصورت لوکال راحت بود. در واقع هر آزمایشگاه بیولوژی مولکولی می تواند به راحتی یک مجموعه بزرگ از عوامل واسطه ای را که به صورت پلاسمید در دسترس هستند، خریداری کند، که می تواند برای تولید TALEN سفارشی با استفاده از پروتکل کلونینگ گام به گام گلدن گیت بر اساس کاربرد ابتکاری از آنزیم های محدود الاثر نوع II برای سرهم بندی قطعات DNA مورد استفاده قرار گیرد (Cermak et al 2015 DNA). از لحاظ تئوری، کیت مونتاژ گلدن گیت و پروتکل آن، امکان طراحی و تولید آسان هر TALEN ای را مطابق با توالی DNA هدف فراهم می کند. در واقع، با این وجود، این فرایند می تواند

طولانی و پر زحمت باشد زیرا پلاسמיד های متعددی برای تولید یکی از این نوکلئازهای مهندسی شده مورد نیاز است. علاوه بر این، اینکه آیا TALEN نهایی، در نهایت می تواند توالی DNA مورد نظر را مورد هدف قرار دهد و آنرا برش دهد یا خیر، متاسفانه غیر قابل پیش بینی باقی می ماند و تنها با تایید هر TALEN جدید تولید شده در آزمایشگاه و *in vivo* (Seruggia and Montoliu 2014) حل و فصل می شود.

افکتور نوکلئاز شبه فعال کننده رونویسی (TALEN) همچنین برای برنامه های ژن درمانی کاربرد دارد که در آن تعدادی از راهبردهای پری کلینیکال، از جمله سلول های بنیادی پرتوان انسانی القا شده (iPSC)، با موفقیت مورد بررسی قرار گرفته اند (به عنوان مثال Osborn et al. 2013؛ Ramalingam et al. 2014؛ Biffi 2015؛ Garate et al. 2015).

در زمینه ژنتیک موش، TALEN به عنوان یک ابزار ویرایش ژنوم امکان کاربردهای بزرگی را فراهم کرده است. بعنوان مثال یک مطالعه با هدف اصلاح جهش موثر بر عملکرد شبکه ای که در ارتباط با موش های C57BL / 6N دیده می شود، انجام شد. این نوع موش ها یکی از شایع ترین گونه های موشی *inbred* هستند که در حال حاضر توسط کنسرسیون بین المللی فنوتایپینگ موش مورد استفاده قرار می گیرد (IMPC؛ <http://www.mousephenotype.org>). این جهش غیر منتظره می تواند تفسیر فنوتیپ چشم موتاسیون های موشی اضافی تولید شده در پس زمینه ژنتیکی مشابه را مختل کند (Mattapallil et al. 2012). محققان از TALEN برای اصلاح جهش های اختصاصی C57BL / 6N در لوکوس *Crb1* (آلل جهش یافته rd8) استفاده کردند و موشهای C57BL / 6N با ژنوم ویرایش شده بدون دژنراسیون شبکه ای را تولید کردند (Low et al. 2014).

تناوب های کوتاه پالیندروم فاصله دار منظم خوشه ای (کریسپر) و پروتئین های مرتبط با کریسپر (Cas)
در سال 2013، جامعه علمی یک ابزار جدید ویرایش ژنوم با توانایی قابل ملاحظه ای برای ایجاد تغییرات ژنومی دقیق با راندمان بالا را کشف کرد و این سیستم در عین حال در هر آزمایشگاه بیولوژی مولکولی بسیار کاربردی بود.

این تکنولوژی مخرب در سال 2012 توسط حداقل دو گروه مختلف (Jinek و همکاران 2012؛ Gasiunas و همکاران 2012) پیش بینی شده بود، اما تا سال 2013، زمانی که ظرفیت آن به عنوان یک ابزار قدرتمند ویرایش ژنوم قابل اثبات بود، خیلی مورد توجه نبود. تناوب‌های کوتاه پالیندروم فاصله‌دار منظم خوشه‌ای (کریسپر) و پروتئین‌های مرتبط با کریسپر (Cas) اجزای یک سیستم ایمنی اکتسابی هستند که بیش از دو دهه پیش در پروکاریوتها کشف و بررسی شده است (Mojica and Montoliu 2016). سیستم CRISPR-CAS و یا ساده تر ابزار CRISPR، اولین بار برای آزمایش ژنوم در سلول‌های پستانداران در کشت مورد بررسی و استفاده قرار گرفت (Cong و همکاران 2013؛ مال و همکاران 2013) و کمی بعد از آن در موش مورد بررسی قرار گرفت (Wang et al. 2013b). بلافاصله مشخص شد که این ابزار ویرایش ژنوم نسل سوم ساده‌ترین، قوی‌ترین و کارآمدتر از هر چهار روش نوکلئاز گزارش شده، یعنی ZFN، meganucleases و TALEN و CRISPR خواهد بود.

ابزار CRISPR از یک سیستم دفاعی اکتسابی که در بسیاری از آرکی‌ها و باکتری یافت می‌شود، مشتق شده است. به طور خلاصه، سیستم CRISPR نیاز به دو جزء اساسی دارد: یک مولکول کوچک RNA، که مسئول جفت شدن با توالی همولوگ DNA در سایت هدف است و یک Endonuclease DNA، که DNA را برش می‌دهد و DSB منحصر به فرد را در محدوده انتخابی که توسط مولکول کوتاه RNA هدایت می‌شود، را تولید می‌کند. مولکول RNA کوچک ذکر شده در واقع معادل مولکول اصلی RNA که توسط پروکاریوتها مورد استفاده قرار می‌گیرد یعنی crRNA و tracrRNA است و این RNA‌ها به ترتیب مسئول جفت شدن با توالی هدف و تعامل با Cas endonuclease هستند. دو مولکول کوچک RNA به صورت سنتتیک برای ایجاد یک RNA راهنما (sgRNA) و یا به اختصار grRNA توسط آزمایشگاه‌های جنیفر دوند و امانوئل چارپینتر در مقاله آنها در سال 2012 با هم ادغام شدند، به این ترتیب این سیستم را که قبلاً خودش نسبتاً ساده بود، ساده‌تر می‌کند (Jinek et al. 2012). شایع‌ترین ابزار CRISPR از سیستم CRISPR-CAS موجود در Streptococcus pyogenes مشتق شده است، که در آن Cas endonuclease مربوطه، Cas9 است. به همین دلیل، ابزار

CRISPR اغلب به عنوان CRISPR-Cas9 گزارش می شود. با این حال، از آنجایی که در حال حاضر ما می دانیم که انواع مختلفی از سیستم CRISPR در پروکاریوت ها وجود دارد، هر یک از آنها با مجموعه ای متفاوت از پروتئین های Cas (Makarova و همکاران 2015) همراه است، توصیه می شود به این ابزار ها به عنوان CRISPR-CAS یا حتی ساده تر، ابزارهای CRISPR اشاره شود (Mojica و Montoliu 2016).

مکانیسمی که توسط آن ابزار CRISPR می تواند توالی های خاص DNA را برای تولید یک DSB هدف قرار داده و آنرا برش دهد، مشابه با ZFN یا TALEN است. در اصل، تمام این سه مجموعه ابزار از یک سیستم دوتایی استفاده می کنند که از یک اندونوکلاز و یک عنصر برای هدایت آن به مکان ژنومی خاص استفاده می کنند. همانطور که قبلا ذکر شد، در مورد ZFN و TALEN، پروتئین های کایمریک مهندسی شده، دمین اندونوکلاز را از آنزیم محدود الاثر FokI باکتریایی بدست می آورند. در مقابل، سیستم های CRISPR از اندونوکلازهای طبیعی خود، یک CAS پروتئین، معمولا Cas9، استفاده می کنند. در حالی که هر دو ZFNs و TALEN ها از طریق تعاملات پروتئین-DNA توالی های ژنوم مورد نظر را از طریق کد های مختلف آمینو اسید / نوکلئوتید شناسایی می کنند، سیستم CRISPR به شریک طبیعی خود، یعنی یک مولکول RNA کوچک، برای اتصال به توالی DNA هدف از طریق جفت شدن کد های نوکلئوتیدی استاندارد واتسون و کریک که از لحاظ بیوشیمیایی پایدارتر از تعامل الکترواستاتیک بین مولکولهای DNA و پروتئین است، وابسته است (Seruggia and Montoliu 2014).

انعطاف پذیری و سادگی شگفت انگیز برای تولید ابزار CRISPR (Harms و همکاران، 2014) همراه با اثربخشی اثبات شده آنها در ترویج تخریب ژن (از طریق NHEJ) یا ویرایش ژن (از طریق HDR در حضور الگوهای DNA خارجی)، CRISPR را به محبوب ترین ابزار ویرایش ژنومی و روش مورد انتخاب برای ویرایش ژن تبدیل کرده است. با استفاده از عوامل CRISPR، هر آزمایشگاه بیولوژی مولکولی می تواند به راحتی یک استراتژی برای غیرفعال کردن یک لوکوس را از طریق INDEL ها یا برای ایجاد درجهای بزرگ یا حذف، جایگزینی، تکرار، معکوس کردن، knockins و بسیاری جهش های پیچیده دیگر و یا بازآرایی های کروموزومی ارائه دهد.

ابزار CRISPR با موفقیت برای تولید انواع زیادی از تغییرات ژنومیک مناسب در بسیاری از گونه های پستانداران استفاده شده است. مثال های دیگر شامل؛ استراتژی های معرفی INDEL های کوچک (Wang et al. 2013b، Han و همکاران 2015)، جایگزینی ها و جابجایی ها (Yang et al. 2013؛ Ma et al. 2014؛ Platt et al. 2014؛ Peng et al. 2015)، حذف و اضافه های بزرگ (Xiao و همکاران 2013؛ Seruggia و همکاران، 2015؛ Zhang و همکاران، 2015؛ Birling و همکاران، 2017)، inversions (Xiao و همکاران 2013، Seruggia و همکاران، 2015)، و تکرار و دیگر تغییرات کروموزومی (Maddalo و همکاران، 2014) می باشد. بزرگترین حذف شناخته شده و تغییرات کروموزومی بزرگ اخیراً در موش و رت گزارش شده است که در آن برش قطعات ژنومی تا 4.4 مگاباز ممکن است توسط CRISPR انجام شود (Birling et al 2017). ابزار CRISPR همچنین برای بررسی نقش و ارتباط عناصر تنظیم کننده DNA تعریف شده در مناطق ژنومی غیر کدکننده (Han et al. 2015؛ Seruggia et al. 2015؛ Guo et al. 2015؛ Lupiañez et al. 2015) مورد استفاده قرار گرفته است.

همانطور که انتظار می رود، استفاده از رویکردهای CRISPR برای برنامه های کاربردی ژن درمانی در حال آغاز است. ابزار CRISPR با موفقیت برای ایجاد یا اصلاح جهش در iPSC انسانی (به عنوان مثال، Flynn و همکاران، 2015) مورد استفاده قرار گرفته است.

علاوه بر این، عوامل CRISPR که به صورت کپسول در AAV و یا ذرات غیر ویروسی قرار داده شده اند نیز برای بازگردانی نسبی عملکرد ژن در تعدادی از مدل های حیوانی از اختلالات ژنتیکی انسان مانند دیستروفی عضلانی دوشن (Nelson et al 2016 Duchene)، تری زومی ارثی انسانی (Yin et al 2016) یا رتینیت پیگمنتو زوا مورد استفاده قرار گرفته است. گزارش های مقدماتی برای استفاده از CRISPR در ویرایش ژن در جنین انسان گزارش شده است. با این حال، این مطالعات نتایج مشابهی را به دست آورند؛ به این صورت که آنها مشاهده کردند که در جنین های دیگر گونه های پستانداران، آلل های متعدد ایجاد شده که "موزاییسیسم نامیده می شود" و با هم در بالای آلل مورد انتظار وجود دارند و همچنین برخی از تغییرات در نواحی غیر هدف را نیز

مشاهد کردند (Kang et al., Liang et al. 2015). به طور کلی، این گزارش ها نشان می دهد که ویرایش ژنوم به واسطه کریسپر ممکن است هنوز به دلیل تغییرات غیر قابل برگشتی که در ژنوم انسان ایجاد می کند، مورد استفاده قرار نگیرند. مگر اینکه دلیل خوبی برای انجام آن وجود داشته باشد.

علاوه بر تحقیقات پایه و مدل های جوندگان، کریسپر تاثیر زیادی در مدل های حیوانات بزرگ نیز داشته است. استراتژی های CRISPR برای تولید حیوانات ویرایش شده ژنومی برای کاربردهای بیومدیکال و بیوتکنولوژی، از جمله خوک ها (Tan et al. 2013; Hai et al. 2014; Peng et al. 2015; Lai et al. 2016)، گاو (وانگ 2015؛ Tan و همکاران، 2016)، گوسفند (Tan؛ Crispo et al. 2015) و همکاران (2016)، خرگوش (Lv، Guo et al 2016) و همکاران (2016) و بز (Ni و همکاران 2014 وانگ و همکاران 2015؛ Guo et al 2016) اعمال شده است. در واقع، ورود CRISPR ممکن است بعضی از کاربردهای زیست پزشکی، از قبیل xenotransplantation را زندگی دوباره بخشد و علت آن هم مربوط به موفقیت آن در غیر فعال کردن تمامی کپی های رترو ویروس اندوژن خوکی (PERV) در ژنوم خوک است (یانگ و همکاران، 2015). علاوه بر این، ابزارهای CRISPR، تولید مدل های جدید خوکی را که دارای آلل های ترانسژنیک چندگانه و knockout هستند را تسهیل کرده اند (Niemann and Petersen 2016؛ Wang et al 2016؛ Fisher et al. 2016). برخی از نمونه های اخیر می توانند برای نشان دادن قدرت ویرایش ژنوم تحت تاثیر CRISPR در گونه های دام مورد استفاده قرار گیرند. ابزار CRISPR برای غیرفعال کردن ژن پریون PRNP در ژنوم احشام به عنوان یک استراتژی معتبر برای جلوگیری از انتشار انسفالوپاتی اسفنجی گاوی یا بیماری جنون گاوی (Bevacqua و همکاران، 2016) مورد استفاده قرار گرفت. به عنوان یک مسیر برای تولید حیوانات با افزایش مقاومت به سل، استراتژی های CRISPR برای غیر فعال سازی لوکوس NRAMP1 در گاو مورد استفاده قرار گرفت (Gao et al 2017).

استفاده اخیر از ابزار CRISPR برای غیرفعال کردن ژن NANOS2 در خوک منجر به برش و جداسازی ژرم لاین خوک نر شد که می تواند به عنوان یک جایگزین برای پیوند سلول های بنیادی اسپرماتوگونیا اهدا کننده برای

افزایش دسترسی به گامت های نر مطلوب از لحاظ ژنتیکی (Parc et al 2017) گسترش یابد. در نهایت، استفاده اخیر و هیجان انگیز از CRISPR، استفاده از آن برای تولیدکایمرهای بین گونه ای است. آزمایش ها به منظور آغاز تمایز سلول های پر توان انسانی در جنین های خوکی در حال رشد، که قبلا ژنوم آنها توسط ابزار CRISPR ویرایش شده بود، طراحی شده اند. آنها این آزمایش را به منظور یافتن نسل های متمایز سلول های انسانی مرتبط با رده های مختلف سلولی و اندام های مختلف در جنین خوکی در حال رشد، انجام دادند. ایده ی پشت این آزمایش های نوآورانه و چالش برانگیز، تولید آینده اندام های انسانی برای پیوند است. اولین نتایج این شبیه سازی های بین گونه ای به تازگی منتشر شده است (وو و همکاران، 2017).

آینده نوکلئازهای ویرایش ژنوم

چهار تکنولوژی مختلف ویرایش ژنوم تا به امروز شناخته شده اند: مگانوکلئازهای مهندسی شده، ZFN، TALEN و CRISPR. سایر سیستم های جدید که از مکانیزم یا عناصر مختلف استفاده می کنند باید کشف شوند، اما اگر ما فقط سیستم CRISPR-CAS را در نظر بگیریم، متوجه می شویم که این ممکن است تنها نشان دهنده نوک قله کوه یخی در ارتباط با سیستم های دفاعی اکتسابی در پروکاریوت ها باشد. اکثر آزمایشگاه ها تنها از ابزار CRISPR مشتق شده از سیستم CRISPR-Cas9 یک باکتری: استرپتوکوک پیوژنز استفاده می کنند (Jinek و همکاران، 2012). این پروتئین Cas9 در حال حاضر مهندسی شده است و نسخه های جهش یافته جدید با افزایش بهره وری در هدف گیری و کاهش فعالیت off-target (غیر هدف)، با هدف یافتن ابزار مناسب برای برنامه های ژن درمانی تولید شده است (Kleinstiver et al., 2015, 2016; Slaymaker et al 2016). فراتر از Cas9، که همه ما عمدتاً از آن استفاده می کنیم، همچنین می دانیم که بسیاری از سیستم های CRISPR-CAS و انواع مختلفی از آن وجود دارد، که هر کدام دارای مزایا و معایب خاص خود هستند. به عنوان ابزار ویرایش ژن مورد استفاده قرار می گیرند (Makarova و همکاران 2015). هزاران سیستم جدید CRISPRCas در گونه های کشت داده شده شناخته شده، هنوز مورد شناسایی قرار نگرفته اند. مطالعه برخی از

این سیستم های جدید CRISPR اخیراً آغاز شده است ، از جمله این سیستم ها می توان به Cpf1 و C2c2، با پروتئین های مشابه Cas با خواص و الزامات مختلف ویرایش ژن (Zetsche و همکاران 2015، Abudayyeh و همکاران 2016) اشاره کرد. حتی شگفت آورتر سیستم جدید CRISPR-CAS است که اخیراً در میکروارگانسیم های غیرقابل کشت کشف شده است (Burstein et al 2017). باز کردن این فیلد به عنوان یک منبع تقریباً نامحدود از واکنش های CRISPR که بالقوه مفید هستند و هریک دارای خواص خاص خود هستند، شاید هر کدام از این انواع را برای یک نوع خاص از برنامه های کاربردی مناسب کند.

نوکلئازهای ویرایش کننده ژنوم (TALEN، ZFN، meganucleases و CRISPR) برای افزایش دانش ما در مورد عملکرد عادی ژن با استفاده از روش های ژنتیکی کاربردی و سیستماتیک و برای تولید مدل های حیوانی و سلولی جدید و بهتر از بیماری های انسان بسیار مفید بوده است. این پیشرفت ها غیرقابل برگشت هستند و روش هایی برای ایجاد تغییرات ژنتیکی در پستانداران ایجاد کرده اند. کنسرسیوم های ژنومی عملکردی موش اکنون از ابزار CRISPR برای تولید موتانت های موشی باقی مانده برای دستیابی به هدف اعلام شده برای ایجاد یک کتابخانه از حیوانات knockout برای همه ژن های موشی استفاده می کنند. انتظار می رود که موج بعدی بر برنامه های ژن درمانی تمرکز کند. پروتکل های ZFN و TALEN اخیراً در کارآزمایی های پری کلینیکال و کلینیکال مورد استفاده قرار گرفته است. بررسی رویکردهای CRISPR برای ژن درمانی با احتیاط آغاز شده است . علت این احتیاط هم ، تنوع ذاتی آللهای ژنتیکی ایجاد شده در لوکوس هدف و امکان تغییر توالی های مشابه در مکان های ژنومی غیر هدف است. قبل از اینکه ظرفیت های ویرایش ژنوم CRISPR در نهایت به پروتکل های بالینی روتین منتقل شود، خطر جدی در مورد آنالیز سود استفاده از این روش باید به طور دقیق مورد ارزیابی قرار گیرد.

References

- Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Konermann S, Joung J, Slaymaker IM, Cox DB, Shmakov S, Makarova KS, Semenova E, Minakhin L, Severinov K, Regev A, Lander ES, Koonin EV, Zhang F (2016) C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science* 353(6299):aaf5573
- Bevacqua RJ, Fernandez-Martín R, Savy V, Canel NG, Gismondi MI, Kues WA, Carlson DF, Fahrenkrug SC, Niemann H, Taboga OA, Ferraris S, Salamone DF (2016) Efficient edition of the bovine PRNP prion gene in somatic cells and IVF embryos using the CRISPR/Cas9 system. *Theriogenology* 86:1886–1896
- Bibikova M, Carroll D, Segal DJ, Trautman JK, Smith J, Kim YG, Chandrasegaran S (2001) Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases. *Mol Cell Biol* 21:289–297
- Biffi A (2015) Clinical translation of TALENS: treating SCID-X1 by gene editing in iPSCs. *Cell Stem Cell* 16:348–349
- Birling MC, Schaeffer L, André P, Lindner L, Maréchal D, Ayadi A, Sorg T, Pavlovic G, Héroult Y (2017) Efficient and rapid generation of large genomic variants in rats and mice using CRISMERE. *Sci Rep* 7:43331
- Bochtler M (2012) Structural basis of the TAL effector-DNA interaction. *Biol Chem* 393:1055–1066
- Brinster RL, Braun RE, Lo D, Avarbock MR, Oram F, Palmiter RD (1989) Targeted correction of a major histocompatibility class II E alpha gene by DNA microinjected into mouse eggs. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:7087–7091
- Buehr M, Meek S, Blair K, Yang J, Ure J, Silva J, McLay R, Hall J, Ying QL, Smith A (2008) Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. *Cell* 135:1287–1298
- Burstein D, Harrington LB, Strutt SC, Probst AJ, Anantharaman K, Thomas BC, Doudna JA, Banfield JF (2017) New CRISPR-Cas systems from uncultivated microbes. *Nature* 542:237–241
- Carbery ID, Ji D, Harrington A, Brown V, Weinstein EJ, Liaw L, Cui X (2010) Targeted genome modification in mice using zinc-finger nucleases. *Genetics* 186:451–459
- Carlson DF, Tan W, Lillico SG, Stverakova D, Proudfoot C, Christian M, Voytas DF, Long CR, Whitelaw CB, Fahrenkrug SC (2012) Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:17382–17387
- Cermak T, Starker CG, Voytas DF (2015) Efficient design and assembly of custom TALENs using the Golden Gate platform. *Methods Mol Biol* 1239:133–159
- 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* 15:1968–1973
- 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* 18:1444–1448
- Cong L, Ran FA, 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* 339:819–823
- Crispo M, Mulet AP, Tesson L, Barrera N, Cuadro F, dos Santos-Neto PC, Nguyen TH, Crénéguy A, Brusselle L, Anegón I, Menchaca A (2015) Efficient generation of Myostatin knock-out sheep using CRISPR/Cas9 technology and microinjection into zygotes. *PLoS ONE* 10:e0136690
- Cui C, Song Y, Liu J, Ge H, Li Q, Huang H, Hu L, Zhu H, Jin Y, Zhang Y (2015) Gene targeting by TALEN-induced homologous recombination in goats directs production of β -lactoglobulin-free, high-human lactoferrin milk. *Sci Rep* 5:10482
- 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* 20:35–42
- Fenina M, Simon-Chazottes D, Vandormael-Pournin S, Soueid J, Langa F, Cohen-Tannoudji M, Bernard BA, Panthier JJ (2012) I-SceI-mediated double-strand break does not increase the frequency of homologous recombination at the *Det* locus in mouse embryonic stem cells. *PLoS ONE* 7:e39895
- Fischer K, Kraner-Scheiber S, Petersen B, Rieblinger B, Buermann A, Flisikowska T, Flisikowski K, Christan S, Edlinger M, Baars W, Kurome M, Zakhartchenko V, Kessler B, Plotzki E, Szczerbal I, Switonski M, Denner J, Wolf E, Schwizner R, Niemann H, Kind A, Schnieke A (2016) Efficient production of multi-modified pigs for xenotransplantation by 'combineering', gene stacking and gene editing. *Sci Rep* 6:29081
- Flynn R, Grundmann A, Renz P, Hänseler W, James WS, Cowley SA, Moore MD (2015) CRISPR-mediated genotypic and phenotypic correction of a chronic granulomatous disease mutation in human iPSCs. *Exp Hematol* 43:838–848
- Gao Y, Wu H, Wang Y, Liu X, Chen L, Li Q, Cui C, Liu X, Zhang J, Zhang Y (2017) Single Cas9 nickase induced generation of NRAMP1 knockin cattle with reduced off-target effects. *Genome Biol* 18:13
- Garate Z, Quintana-Bustamante O, Crane AM, Olivier E, Poirot L, Galetto R, Kosinski P, Hill C, Kung C, Agirre X, Orman I, Cerato L, Alberquilla O, Rodriguez-Fornes F, Fusaki N, Garcia-Sanchez F, Maia TM, Ribeiro ML, Sevilla J, Prosper F, Jin S, Mountford J, Guenechea G, Gouble A, Bueren JA, Davis BR, Segovia JC (2015) Generation of a high number of healthy erythroid cells from gene-edited pyruvate kinase deficiency patient-specific induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Rep* 5:1053–1066
- Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnyš V (2012) Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:E2579–E2586
- Geurts AM, Cost GJ, Freyvert Y, Zeitler B, Miller JC, Choi VM, Jenkins SS, Wood A, Cui X, Meng X, Vincent A, Lam S, Michalkiewicz M, Schilling R, Foeckler J, Kalloway S, Weiler

- H, Ménoret S, Anegón I, Davis GD, Zhang L, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD, Jacob HJ, Buelow R (2009) Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science* 325:433
- Grizot S, Smith J, Daboussi F, Prieto J, Redondo P, Merino N, Vilate M, Thomas S, Lemaire L, Montoya G, Blanco FJ, Pâques F, Duchateau P (2009) Efficient targeting of a SCID gene by an engineered single-chain homing endonuclease. *Nucleic Acids Res* 37:5405–5419
- Guo Y, Xu Q, Canzio D, Shou J, Li J, Gorkin DU, Jung I, Wu H, Zhai Y, Tang Y, Lu Y, Wu Y, Jia Z, Li W, Zhang MQ, Ren B, Krainer AR, Maniatis T, Wu Q (2015) CRISPR inversion of CTCF sites alters genome topology and enhancer/promoter function. *Cell* 162:900–910
- Guo R, Wan Y, Xu D, Cui L, Deng M, Zhang G, Jia R, Zhou W, Wang Z, Deng K, Huang M, Wang F, Zhang Y (2016) Generation and evaluation of Myostatin knock-out rabbits and goats using CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep* 6:29855
- Hai T, Teng F, Guo R, Li W, Zhou Q (2014) One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system. *Cell Res* 24:372–375
- Han Y, Slivano OJ, Christie CK, Cheng AW, Miano JM (2015) CRISPR-Cas9 genome editing of a single regulatory element nearly abolishes target gene expression in mice—brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35:312–315
- 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* 83:1–27
- Hasty P, Rivera-Pérez J, Chang C, Bradley A (1991) Target frequency and integration pattern for insertion and replacement vectors in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 11:4509–4517
- Hauschild J, Petersen B, Santiago Y, Queisser AL, Carnwath JW, Lucas-Hahn A, Zhang L, Meng X, Gregory PD, Schwitzer R, Cost GJ, Niemann H (2011) Efficient generation of a biallelic knockout in pigs using zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:12013–12017
- Hermann M, Maeder ML, Rector K, Ruiz J, Becher B, Bürki K, Khayter C, Aguzzi A, Joung JK, Buch T, Pelczar P (2012) Evaluation of OPEN zinc finger nucleases for direct gene targeting of the ROSA26 locus in mouse embryos. *PLoS ONE* 7:e41796
- Jacquier A, Dujon B (1985) An intron encoded protein is active in a gene conversion process that spreads an intron into a mitochondrial gene. *Cell* 41:383–394
- 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* 337:816–821
- Kang X, He W, Huang Y, Yu Q, Chen Y, Gao X, Sun X, Fan Y (2016) Introducing precise genetic modifications into human 3PN embryos by CRISPR/Cas-mediated genome editing. *J Assist Reprod Genet* 33:581–588
- Kleinstiver BP, Prew MS, Tsai SQ, Topkar VV, Nguyen NT, Zheng Z, Gonzales AP, Li Z, Peterson RT, Yeh JR, Aryee MJ, Joung JK (2015) Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature* 523:481–485
- Kleinstiver BP, Pattanayak V, Prew MS, Tsai SQ, Nguyen NT, Zheng Z, Joung JK (2016) High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature* 529:490–495
- Kucherlapati RS, Eves EM, Song KY, Morse BS, Smithies O (1984) Homologous recombination between plasmids in mammalian cells can be enhanced by treatment of input DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:3153–3157
- Kwon DN, Lee K, Kang MJ, Choi YJ, Park C, Whyte JJ, Brown AN, Kim JH, Samuel M, Mao J, Park KW, Murphy CN, Prather RS, Kim JH (2013) Production of biallelic CMP-Neu5Ac hydroxylase knock-out pigs. *Sci Rep* 3:1981
- Lai S, Wei S, Zhao B, Ouyang Z, Zhang Q, Fan N, Liu Z, Zhao Y, Yan Q, Zhou X, Li L, Xin J, Zeng Y, Lai L, Zou Q (2016) Generation of knock-in pigs carrying Oct4-tdTomato reporter through CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *PLoS ONE* 11:e0146562
- 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 triploid zygotes. *Protein Cell* 6:363–372
- Lillico SG, Proudfoot C, King TJ, Tan W, Zhang L, Mardjuki R, Paschon DE, Rebar EJ, Urnov FD, Mileham AJ, McLaren DG, Whitelaw CB (2016) Mammalian interspecies substitution of immune modulatory alleles by genome editing. *Sci Rep* 6:21645
- Liu X, Wang Y, Guo W, Chang B, Liu J, Guo Z, Quan F, Zhang Y (2013) Zinc-finger nickase-mediated insertion of the lysostaphin gene into the beta-casein locus in cloned cows. *Nat Commun* 4:2565
- Liu H, Chen Y, Niu Y, Zhang K, Kang Y, Ge W, Liu X, Zhao E, Wang C, Lin S, Jing B, Si C, Lin Q, Chen X, Lin H, Pu X, Wang Y, Qin B, Wang F, Wang H, Si W, Zhou J, Tan T, Li T, Ji S, Xue Z, Luo Y, Cheng L, Zhou Q, Li S, Sun YE, Ji W (2014a) TALEN-mediated gene mutagenesis in rhesus and cynomolgus monkeys. *Cell Stem Cell* 14:323–328
- Liu X, Wang Y, Tian Y, Yu Y, Gao M, Hu G, Su F, Pan S, Luo Y, Guo Z, Quan F, Zhang Y (2014b) Generation of mastitis resistance in cows by targeting human lysozyme gene to β -casein locus using zinc-finger nucleases. *Proc Biol Sci* 281:20133368
- Low BE, Krebs MP, Joung JK, Tsai SQ, Nishina PM, Wiles MV (2014) Correction of the Crb1rd8 allele and retinal phenotype in C57BL/6 N mice via TALEN-mediated homology-directed repair. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 55:387–395
- 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* 161:1012–1025
- Lv Q, Yuan L, Deng J, Chen M, Wang Y, Zeng J, Li Z, Lai L (2016) Efficient generation of myostatin gene mutated rabbit by CRISPR/Cas9. *Sci Rep* 6:25029
- Ma Y, Ma J, Zhang X, Chen W, Yu L, Lu Y, Bai L, Shen B, Huang X, Zhang L (2014) Generation of eGFP and Cre knockin rats by CRISPR/Cas9. *FEBS J* 281:3779–3790
- Maddalo D, Machado E, Concepcion CP, Bonetti C, Vidigal JA, Han YC, Ogradowski P, Crippa A, Borkhtman N, de Stanchina E, Lowe SW, Ventura A (2014) In vivo engineering of oncogenic chromosomal rearrangements with the CRISPR/Cas9 system. *Nature* 516:423–427
- Maier DA, Brennan AL, Jiang S, Binder-Scholl GK, Lee G, Plesa G, Zheng Z, Cotte J, Carpenito C, Wood T, Spratt SK, Ando D, Gregory P, Holmes MC, Perez EE, Riley JL, Carroll RG, June CH, Levine BL (2013) Efficient clinical scale gene modification via zinc finger nuclease-targeted disruption of the HIV co-receptor CCR5. *Hum Gene Ther* 24:245–258
- Mak TW (2007) Gene targeting in embryonic stem cells scores a knockout in Stockholm. *Cell* 131:1027–1031
- Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Haft DH, Horvath P, Moineau S, Mojica FJ, Terns RM, Terns MP, White MF, Yakunin AF, Garrett RA, van der Oost J, Backofen R, Koonin EV (2015) An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol* 13:722–736