

ویرایش هدف دار ژنوم با میانجی گری نوکلئازهای مهندسی شده؛ رویکردی نو در ژن درمانی

محمد رضا نوری دلویی^۱، رسول عبدالله زاده^۲، کاظم اسدالهی^۳

^۱ استاد گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

^۲ دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

^۳ دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، انستیتو بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران

نشانی نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه ژنتیک پزشکی، دکتر محمد رضا نوری دلویی

E-mail: nooridalooii@sina.tums.ac.ir

وصول: ۹۲/۱۰/۵، اصلاح: ۹۲/۱۱/۱۷، پذیرش: ۹۲/۱۲/۲۱

چکیده

زمینه و هدف: مهندسی هدف دار ژنوم (genome targeting engineering)، یکی از مهم ترین پیشرفت های مهندسی ژنتیک در هزاره ی سوم است. اساس این فرایند در عملکرد اندونوکلئازهای مهندسی شده نهفته است. این ابزارها از طریق ایجاد برش های دو رشته ای در یک ناحیه ی شناخته شده از ژنوم و به دنبال آن ترمیم این برش ها توسط سازوکارهای نو ترکیبی هومولوگ (Homologous Recombination) یا اتصال انتهای غیر هومولوگ (Non-Homologous End Joining)، می توان تغییرات ژنتیکی مورد نظر را ایجاد کرد. اندونوکلئازهای ویرایش کننده ی ژنوم، از توانایی بالایی در راستای فهم عملکرد ژن و کاربردهای ژن درمانی برخوردارند. مگانوکلئازها (Meganucleases)، اولین رده از این ابزارها هستند که به طور طبیعی در همه ی قلمروهای حیات یافته شده و نقش مهمی را در مهندسی هدف دار ژنوم ایفاء کرده اند. دومین رده، نوکلئازهای انگشت روی [Zinc Finger Nucleases (ZFNs)] هستند که از یک سری قلمرو انگشت روی شناسایی کننده ی DNA ی ادغام شده با قلمرو کاتالیتیک آنزیم FokI ساخته شده اند. رده ی دیگر نوکلئازهای افکتور شبه فعال کننده ی رونویسی -[Transcription Activated-Like Effector Nucleases (TALENs)] می باشند که قلمروهای شناسایی کننده ی DNA از باکتری بیماری زای گیاهی از جنس گزانتوموناس (Xanthomonas) مشتق شده اند و مانند رده ی دوم با قلمرو کاتالیتیک FokI ادغام می شوند. آخرین رده اندونوکلئازهای مهندسی شده، برگرفته از سیستم ایمنی اکتسابی باکتریایی است که Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated (CRISPR/ Cas) نامیده می شوند. در این سیستم اندونوکلئاز Cas9 توسط یک RNA راهنما که با DNA هدف جفت می شود به توالی مورد نظر فراخوانده شده و سپس DNA توسط زیرواحدهای آنزیم برش می خورد. در این مقاله، با استفاده از تجربیات شخصی و بهره گیری از ده ها منبع معتبر و روزآمد، ویژگی های چهار رده ی اندونوکلئاز مطرح شده در بالا، و پیشرفت های انجام گرفته برای افزایش کارایی و ویژگی آن ها در پژوهش های پایه ای و کاربردی مورد بررسی و بحث قرار گرفته است.

واژه های کلیدی: نوکلئازهای صناعی؛ شکست های دو رشته ای، هدف گیری ژنی، ژن درمانی

مقدمه

در پژوهش‌های پایه و کاربردی زیست‌شناسی، توانایی ایجاد تغییرات هدف‌دار در ژنوم پستانداران، دارای اهمیت حیاتی است. مطابق نظریه‌ی اهداف درمانی، برای طیف وسیعی از بیماری‌های ژنتیکی که در اثر رخداد جهش در یک ژن ایجاد می‌شوند، درمان با ژن درمانی روشی مؤثر به شمار می‌آید (۳،۲،۱). راه‌کارهایی با میانجی‌گری ویروس برای تحویل کارآمد ژن بیگانه به ژنوم پستانداران توسعه یافته است (۴،۵). با این وجود، فرآیند ورود ژن بیگانه به ژنوم پستانداران اغلب تصادفی بوده که این پدیده، ممکن است ژن‌های درونی معینی را تخریب کرده و به فنوتیپ‌های غیر قابل پیش‌بینی که استفاده‌ی وسیع از این تکنولوژی را محدود می‌کند، بینجامد (۶،۳). نوکلئازهای مهندسی‌شده، با وجود قراردادن در مرحله‌ی مقدماتی، برای ورود ژن بیگانه به درون یک توالی خاص، در حال توسعه بوده و البته در ایجاد تغییرات ژنتیکی مورد نظر در ارگانیسم‌های متفاوت موفقیت‌هایی نیز داشته‌اند. اهمیت ویرایش ژنوم با میانجی‌گری نوکلئازهای مهندسی‌شده، طوری بوده که به‌عنوان روش سال ۲۰۱۱ توسط Nature Methods مطرح شده است (۷). مهم‌ترین بخش راه‌کار در مهندسی هدف‌دار ژنوم، ایجاد برش‌های دو رشته‌ای اختصاصی جایگاه در یک لوکوس از پیش تعیین شده به وسیله‌ی اندونوکلیزهای مهندسی‌شده است. ترمیم نهایی این برش‌های دو رشته‌ای، به وسیله‌ی نوترکیبی هومولوگیا اتصال پایانه‌های غیرهومولوگ، تغییرات ژنتیکی مورد نظر و دلخواه را ایجاد می‌کند (۸، ۹). ساز و کار اتصال پایانه‌های غیرهومولوگ، به دلیل واردشدگی‌ها یا حذف‌های کوچک (Indel)، می‌تواند سبب تخریب ژن با میانجی‌گری ایجاد جهش‌های تغییر چارچوب (Frame shift mutation) شود. در حالی که ساز و کار نوترکیبی هومولوگ، می‌تواند تبادل نوکلئوتیدی بین یک ناحیه‌ی ژنومی درونی و یک قطعه DNA ی بیگانه را که توسط توالی‌های هومولوگ احاطه شده، واسطه‌گری کند تا سبب

واردشدگی، حذف و یا جایگزینی یک توالی خاص شود (شکل ۱) (۱۰).

برای اینکه یک اندونوکلیز مهندسی‌شده، بتواند به‌طور گسترده‌ای در ویرایش هدف‌دار ژنوم کاربرد داشته باشد باید دارای دو معیار اصلی باشد: الف) توالی بلندی از DNA را با ویژگی بالا شناسایی کند تا از ایجاد سمیت ناشی از برش‌های خارج از جایگاه هدف (off-target) جلوگیری شود. زیرا برش‌های خارج از جایگاه هدف، سبب ایجاد تغییرات در لوکوس‌های ناخواسته شده و فنوتیپ‌های غیرقابل پیش‌بینی را به همراه دارد. ب) شناسایی و برش در یک توالی تعریف‌شده به‌آسانی طراحی شود. چهار رده‌ی اصلی از داکسی اندونوکلیزها، شامل مگانوکلیزها، اندونوکلیزهای انگشت روی، اندونوکلیزهای افکتور شبه فعال کننده‌ی رونویسی و سیستم CRISPR/Cas هستند که به‌عنوان ابزار مهندسی ژنوم توسعه یافته محسوب می‌شوند و هر کدام دارای معایب و مزایایی می‌باشند (جدول ۱) (۱۱). در این مقاله، سعی می‌شود که هر کدام از آنها با توجه به میزان اهمیت و کارایی‌شان در مهندسی هدف‌دار ژنوم مورد بررسی و توصیف قرار گیرد.

۱- مگانوکلیزها

مگانوکلیزها که در تمام قلمروهای حیات یافته می‌شوند، توالی‌های بلندی از DNA را به طول ۱۴-۴۰ جفت باز شناسایی می‌کنند و یک ابزار نویدبخش برای ایجاد برش‌های دو رشته‌ای در کروموزوم‌ها برای مهندسی هدف‌دار ژنوم هستند (۱). مگانوکلیزها براساس توالی و موتیف‌های ساختاری به پنج خانواده تقسیم می‌شوند که بیشترین مطالعات بر روی اعضای خانواده‌ی LAGLIDADG به‌جهت آن‌که بیشترین ویژگی را در شناسایی توالی‌های DNA نشان‌داده‌اند (۱۲)، انجام گرفته است. ژن‌های کدکننده‌ی مگانوکلیزهای LAGLIDADG که تحت عنوان «نوکلئازهای خانگی» (Homing endonuclease) نیز خوانده می‌شوند، بیشتر در درون

ایترون‌ها واقع شده و تا امروز نقش دقیق آنها در میزبان مشخص نشده و جزء عناصر ژنتیک خودخواه (selfish) دسته بندی می‌شوند (۱۳). دو مورد از مهمترین اعضای این خانواده I-CreI (۱۴) و PI-SceI (۱۵) می‌باشند که هر دو به صورت ساختار ثانویه ی صفحه ی آنتی پارالل- بتا در می‌آیند که به عنوان واحد شناسایی DNA عمل کرده و با تشکیل یک ساختار زین مانند بر روی شیار بزرگ ماریپچ DNA قرار می‌گیرند. برش DNA با میانجی‌گری کاتیون-های فلزی دو ظرفیتی که در جایگاه فعال آنزیم واقع شده‌اند، کاتالیز می‌شود (شکل ۲) (۱۰، ۱۲).

برخی از مگانوکلازها همودایمر تشکیل می‌دهند و جایگاه‌های هدف پالیندرومی (palindromic) و پالیندرومی کاذب را شناسایی می‌کنند در حالی که برخی دیگر از آنها مونومری بوده و توالی‌های غیرپالیندرومی را شناسایی می‌کنند.

مگانوکلازها، با وجود دارا بودن مزایای قابل توجه مانند ویژگی بسیار بالا در شناسایی توالی مورد نظر، اما سه محدودیت اصلی نیز دارند که کاربرد وسیع آنها را کاهش می‌دهد: الف) وجود شبکه‌ای پیچیده از برهم-کنش‌های بین DNA و مگانوکلاز است که تا کنون کد آن شناسایی نشده است. ب) متیله شدن DNA در توالی‌های دو نوکلئوتیدی CpG سبب کاهش تمایل (affinity) آنزیم در اتصال به DNA و همچنین کاهش فعالیت کاتالیتیکی آنزیم می‌شود (۱۶). ج) احتمال وجود یک جایگاه شناسایی در ژنوم برای هر آنزیم بسیار پایین است. برای نمونه، اگر طول جایگاه شناسایی یک آنزیم حدود ۱۸ جفت باز باشد، ژنوم انسان باید ۲۰ برابر بزرگ‌تر از مقدار فعلی باشد تا یک جایگاه شناسایی برای آنزیم مورد نظر وجود داشته باشد.

برای ایجاد مگانوکلازهای مهندسی شده، دو رویکرد ذیل مورد تاکید قرار گرفته است:

الف) تغییر ویژگی مگانوکلازهای طبیعی از طریق تغییر توالی اسید آمینه‌ای آنها و سپس انتخاب آنزیم‌های

عملکردی که جایگاه مورد نظر را شناسایی کرده و برش دهند (۱۷، ۱۸). ب) ادغام قلمروهای پروتئین‌های متفاوت و ایجاد پروتئین‌های کایمری (chimeric) با توالی شناسایی جدید (۱۸، ۱۹). از مگانوکلازها، به‌طور وسیعی برای هدف‌گیری ژن‌ها در انواع سلول‌ها و ارگانسیم‌های متفاوت استفاده شده است. مگانوکلاز Icre-I، اولین اندونوکلازی بوده که به‌طور موفقیت آمیزی یک توالی تعریف شده در ژنوم انسان را به‌طور اختصاصی هدف قرار داده است. واریانت‌های مختلفی از Icre-I طراحی شده-اند که ژن‌های مختلفی را، از جمله ژن RAG1 که جهش در آن سبب بیماری ژنتیکی نقص ایمنی مرکب شدید (SCID) می‌شود (۲۰، ۲۱)، و ژن XP که سبب آگزودرما پیگمنتوزوم می‌شود (۲۲)، مورد هدف دارند. مطالعه‌ای جالب در سال ۲۰۱۳، توسط Popplewell و همکاران بر روی میوبلاست‌های افراد مبتلا به دیستروفی عضلانی دوشن (DMD) و با استفاده از مگانوکلازهای مهندسی شده، صورت گرفته است. آنها توانسته‌اند ژن دیستروفین را که در آگزون‌های ۴۵-۵۲ دچار حذف شده، تصحیح کنند (۲۳).

۲- نوکلنازهای انگشت‌روی

نوکلنازهای انگشت‌روی، پروتئین‌های صناعی هستند که با ادغام چندین قلمرو از رده عامل‌های رونویسی تحت عنوان پروتئین‌های انگشت‌روی به یک قلمرو برش‌دهنده مستقل از توالی مربوط به اندونوکلاز محدودکننده نوع IIS از FokI ساخته شده‌اند. هر قلمرو انگشت‌روی، شامل ۳۰ اسید آمینه است که دارای یک اتم روی می‌باشد که با دو اسید آمینه هیستیدین و دو اسید آمینه سیستئین پیوند غیرکووالان برقرار می‌کند (۲، ۲۴، ۲۵). یک ماریپچ- آلفا در هر قلمرو انگشت‌روی، یک توالی سه تایی اختصاصی از DNA را شناسایی می‌کند که در مطالعات اولیه هر ZFN مورد استفاده تنها سه قلمرو انگشت‌روی را داشته که به یک توالی ۹ جفت بازی از DNA متصل شده است. بنابراین، دایمرهای ZFN (گونه-

های فعال) را قادر ساخته که یک توالی ۱۸ جفت بازی را برای هر برش شناسایی کنند (۲۶). به دلیل اینکه قلمرو نوکلئاز FokI به صورت دایمر عمل می‌کند، نوکلئازهای عملکردی انگشت‌روی زمانی شکل می‌گیرند که قلمروهای انگشت‌روی در نزدیکی همدیگر قرار گیرند و همچنین دارای جهت‌گیری مناسبی باشند. به طوری که قلمروهای کاتالیتیک آنزیم FokI در کنار هم قرار گیرند (شکل ۳) (۲۶، ۲۷).

راه کارهای متفاوتی برای ساخت پروتئین‌های انگشت‌روی وجود دارند که یکی از آنها modular assembly است که در آن قلمروهای انگشت‌روی اختصاصی، ابتداء، به صورت جداگانه برای هر توالی سه-تایی ساخته شده و سپس براساس توالی مورد نظر این قلمروها به همدیگر متصل می‌شوند [۲۵، ۲۶]. فنون قوی-تری نیز وجود دارند که یکی از آنها، راه کار OPEN (Oligomerized Pool Engineering) است که نیازمند مجموعه‌ای کامل از ۱۹۲ پروتئین انگشت‌روی می‌باشد [۲۷، ۲۸]. در رویکرد دیگری، برای ایجاد ZFP های با ویژگی جدید، از یک سیستم انتخاب باکتریایی شبیه به سیستم OPEN استفاده می‌شود. با این تفاوت که برای ساخت کتابخانه‌ی ZFP ها از یک روش متفاوت بهره‌برده می‌شود (۳۲). برای به حداقل رساندن برش‌های ناخواسته، تغییرات متنوعی را می‌توان در مورد ZFN ها اعمال کرد: الف) نوکلئازهای انگشت‌روی را طوری طراحی کرده که تنها به صورت هترو دایمر عمل کنند. برای نیل به این هدف، واریانتهایی را در قلمرو کاتالیتیک آنزیم FokI ایجاد می‌کنند که تنها ساختارهای هترو دایمر تشکیل شوند و همودایمرها ناپایدار باشند (۳۳، ۳۴). ب) طول فاصله انداز (Spacer) بین دو مونومر ZFN معمولاً حدود ۴-۶ جفت باز است، اما از طریق ایجاد تغییرات در طول رابط (Linker) بین ZFP و FokI نیز می‌توان تاحدی از دایمریزاسیون غیر اختصاصی و در نتیجه برش‌های خارج از جایگاه هدف جلوگیری کرد (۳، ۳۵، ۳۶). ج) یکی دیگر

از تغییرات ایجاد شده برای ویژگی بیشتر ZFN ها، افزایش فعالیت کاتالیتیک قلمرو FokI می‌باشد که واریانتهایی با فعالیت افزایش یافته گزارش شده‌اند (۳۷). د) طراحی نیکازهای انگشت‌روی (ZFNickases) از طریق ایجاد واریانتهایی در قلمرو کاتالیتیک FokI یکی از مونومرها، به طوری که فعالیت اندونوکلئازی آنزیم از دست رفته، اما تأثیری بر فرآیند دایمریزاسیون نداشته باشد. در نتیجه، پس از دایمریزاسیون تنها یکی از رشته‌های DNA برش خورده و به اصطلاح یک Nick ایجاد می‌شود که برای ترمیم آن سلول بیشتر از سازوکار نوترکیبی هومولوگ در مقایسه با ساز و کار اتصال پایانه‌های غیر هومولوگ استفاده می‌کند (۳۲). نوکلئازهای انگشت‌روی در مقایسه با مگانوکلئازها به دلیل دارا بودن ویژگی Modularity طراحی آسان‌تری دارند (جدول ۱).

هر چند که نوکلئازهای انگشت‌روی برای ویرایش هدف‌دار ژنوم در طیف متنوعی از سلول‌ها و ارگانیسم‌ها استفاده شده‌اند (۲۶)، اما دو محدودیت اصلی، کاربردهای گسترده‌ی آنها را محدود کرده است: الف) قلمروهای انگشت‌روی به دلیل اثرات context-dependent DNA binding ظرفیت محدودی دارند که هدف قرار دادن هر توالی مورد نظر از DNA را برای نوکلئازهای انگشت‌روی دشوار می‌کند (۳۸). ب) فقدان ویژگی برخی از قلمروهای انگشت‌روی، می‌تواند برش‌هایی را در جایگاه‌های غیرهدف ایجاد کند که سبب جهش‌های ناخواسته و در نتیجه ایجاد فنوتیپ‌های غیر قابل پیش بینی و یا به-عبارتی، سبب میزان سمیت بالایی شوند (۳۹).

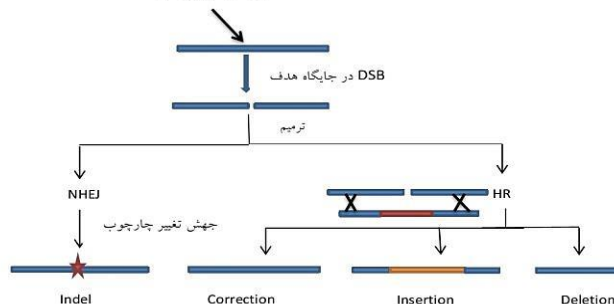
۳- نوکلئازهای افکتور شبه فعال کننده‌ی رونویسی

اخیراً نوکلئازهای افکتور شبه فعال کننده‌ی رونویسی TALENs به عنوان یک ابزار دیگر در ویرایش ژنوم ظهور کرده‌اند (۴۰). مشابه با نوکلئازهای انگشت‌روی، نوکلئازهای افکتور شبه فعال کننده‌ی رونویسی هم، قلمرو غیر اختصاصی FokI را به عنوان واحد برش دهنده‌ی DNA مورد استفاده قرار می‌دهند و به صورت دایمر عمل

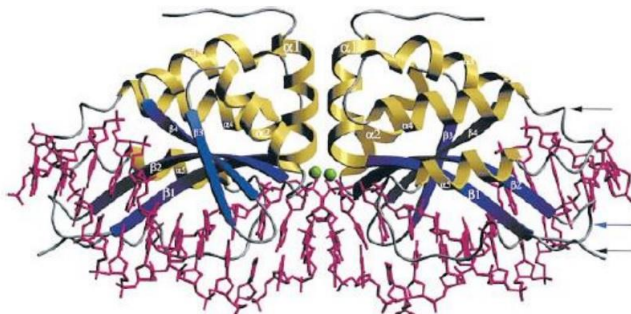
جدول 1. مقایسه‌ی چهار اندونوکلاز مهندسی شده‌ی اختصاصی جایگاه

Cas9t	TALEN	ZFN	Meganuclease	ابزار
20 جفت باز + PAM (5-2)	50-30 جفت باز و فاصله انداز	24-18 جفت باز و فاصله انداز 7-5 جفت باز	40-14 جفت باز	طول جایگاه شناسایی
ندارد	زیاد	متوسط	کم	Modularity
1. ساخت آن از لحاظ زمان و هزینه به صرفه‌تر است 2. توانایی هدف قرار دادن چند لوکوس به طور همزمان 3. الگوهای برش متنوع	1. طراحی آسان در ویژگی برای سویترا 2. طول جایگاه شناسایی به دلخواه تنظیم می‌شود.	1. طراحی نسبتاً آسان در ویژگی برای سویترا 2. ویژگی، تمایل اتصال و سمیت شناخته شده دارند.	1. عدم نیاز به کلونو برش دهنده‌ی DNA از FokI 2. کارایی بالای برش DNA	مزایا
1. ایجاد برش‌های خارج از جایگاه هدف	1. نبود کد اختصاصی برای شناسایی گرانتین 2. ویژگی و سمیت به طور سیستماتیک تعیین نشده است. 3. اندازه‌ی بزرگ پروتئین ممکن است تحویل آن را با مشکل روبه‌رو کند.	1. ترجیح توالی‌های غنی از گرانتین 2. ایجاد برش‌های خارج از جایگاه هدف و سمیت ناشی از آن.	1. مشکل بودن طراحی در ویژگی برای سویترا 2. ویژگی و سمیت به طور سیستماتیک تعیین نشده‌است.	معایب

اندونوکلازهای ویژه جایگاه



شکل 1. ایجاد برش‌های دورشته‌ای اختصاصی جایگاه توسط DNA- اندونوکلازهای مهندسی شده و سپس تغییرات ژنتیکی به وجود آمده بر اساس نوع سازوکار ترمیم که می‌تواند HR یا NHEJ باشد (شرح جزئیات در متن).



شکل 2. اتصال دایمر مگانوکلازها به شیار بزرگ DNA از طریق ساختارهای زین مانند متشکل از صفحات آنتی- پارالل بتا. دایره‌های سبز رنگ نشان دهنده‌ی کاتیون‌های دو ظرفیتی هستند که برای فعالیت آنزیم ضروری می‌باشند. (شرح جزئیات در متن. برگرفته از مرجع شماره 10)

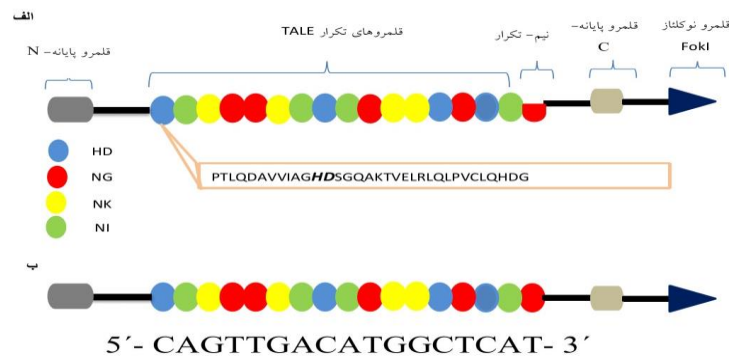
این امر در مورد TALEN ها رخ نمی دهد و به آسانی و سریع برای هر توالی از DNA به دلیل کد ساده‌ی پروتئین-DNA ساخته می‌شوند. افزون بر این، نشان داده شده که TALEN ها به‌طور قابل توجهی، برش‌های غیر اختصاصی و سمیت را در مقایسه با ZFN ها کاهش می- دهند، از این رو، ابزار سودمندتری برای ویرایش ژنوم به- شمار می‌آیند(۴۱). بر اساس آزمایش گزارشگر مخمر (yeast reporter assay)، طول بهینه‌ی فاصله انداز بین دو

می‌کنند. هر تکرار ۳۳-۳۵ اسیدامینه را شامل می‌شود و یک نوکلئوتید را شناسایی می‌کند. آخرین تکرار معمولاً تنها ۲۰ اسیدامینه دارد. به همین دلیل یک نیم- تکرار (Half- repeat) نامیده می‌شود. ویژگی شناسایی DNA با میانجی‌گری اسیدامینه‌های شدیداً متنوع در موقعیت‌های ۱۲ و ۱۳ هر تکرار انجام می‌گیرد (شکل ۴.الف). بر خلاف ZFN ها که context-dependent DNA binding رخ می‌دهد و طراحی آن‌ها را با مشکل روبه‌رو می‌ساخته،

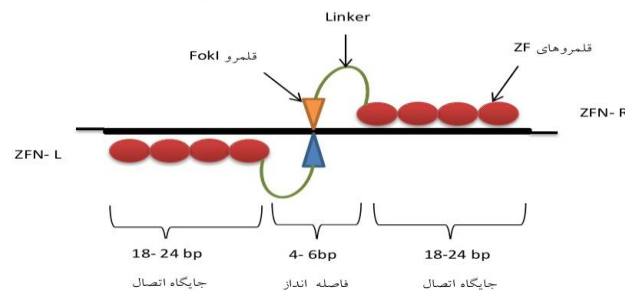
FokI که به‌طور ترجیحی ایجاد هتروداایمر می‌کنند، به طرز موفقیت‌آمیزی برش‌های غیراختصاصی را کاهش می‌دهد (۴۵، ۴۶). ویژگی شناسایی DNA به وسیلهی RVD ها (Repeat-Variable Diresidues) در موقعیت‌های ۱۲ و ۱۳ از هر تکرار صورت می‌گیرد. بیش از ۲۰ RVD مختلف در TALE ها شناسایی شده که در این میان NI، NG، HD، NN، HG به مراتب رایج‌ترند و هر کدام به- ترتیب نوکلئوتیدهای T، A/G، C، T/A را شناسایی می‌کنند (شکل ۴.ب) (۴۷، ۴۸).

هر واحد تکراری دارای دو هلیکس چپ‌گرد است که لوپ در برگرفتهی RVD را در معرض شیار بزرگ DNA قرار می‌دهد (۴۹، ۵۰). اولین ریشه از هر RVD که همستیدین (H) یا آسپاراژین (N) است، به‌طور مستقیم با DNA برهم‌کنش نمی‌دهد. در عوض زنجیره‌ی جانبی هر کدام از این دو اسیدامینه یک پیوند هیدروژنی را با اکسیژن گروه کربونیل از آلانین در موقعیت ۸ از هر واحد تکراری برقراری کند که سبب پایداری ساختار فضایی حلقه در برگرفتهی RVD می‌شود. برهم‌کنش‌های اختصاصی توالی از TALE ها با DNAی هدف، توسط دومین ریشه از هر RVD انجام می‌گیرد. HD RVD که در موقعیت ۱۳ دارای اسیدامینه آسپاراتات (D) است، برای نوکلئوتید C کاملاً اختصاصی است. زیرا اتم اکسیژن گروه کربوکسیلات از Asp یک پیوند هیدروژنی را با گروه آمین از باز سیتوزین برقراری کند (شکل ۵.الف) (۴۲). RVD های HG/NG برای نوکلئوتید T اختصاصی‌اند. به- دلیل ایجاد برهم‌کنش واندروالاس غیر قطبی بین کربن آلفا گلیسین و گروه متیل از تیمین (شکل ۵.ب و ۵.ج) (۴۲) در RVD NI که برای نوکلئوتید A اختصاصی است، زنجیره‌ی جانبی چربی‌دوست ایزولوسین (I) ایجاد برهم‌کنش‌های واندروالاس را با C8 و N7 از باز آدنین می‌کند (شکل ۵.د) (۴۲). RVD NN معمولاً برای شناسایی نوکلئوتید گوانین استفاده می‌شود. بدین ترتیب که زنجیره‌ی جانبی آسپاراژین یک پیوند هیدروژنی را با N7 از گوانین

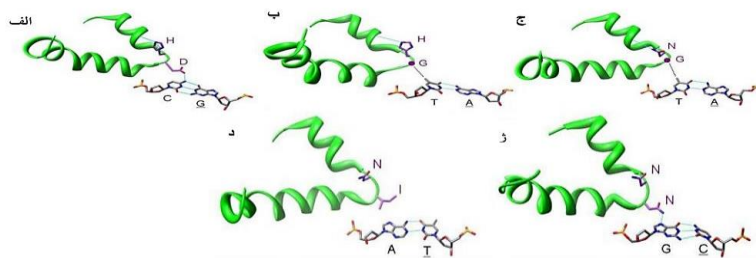
جایگاه اتصال TALEN که حدود ۱۶-۳۱ جفت باز است (۴۲)، مشخص شده است. TALE های طبیعی، عامل‌های رونویسی از باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی هستند که در توالی انتهای N دارای پپتیدهای ترش‌حی پروتئین می‌باشند، در حالی که در توالی انتهای C دارای پپتیدهای سیگنال موقعیت‌یابی هسته‌ای به همراه قلمرو فعال‌کننده‌ی رونویسی هستند (۴۳). این توالی‌ها، می‌توانند فعالیت کاتالیتیکی را وقتی که با قلمرو برش‌دهنده‌ی FokI ادغام می‌شوند تضعیف کنند. برای تعیین ساختار بهینه-ی TALEN با بیشترین بازدهی برش و کمترین بخش پپتید، بهینه‌سازی چارچوب (scaffold optimization) به- وسیله‌ی چندین گروه انجام شده است که جالب‌ترین آن مربوط به گروه Gao در سال ۲۰۱۲ می‌باشد. این پژوهشگران نشان‌داده که یک توالی ۱۲۷ اسیدامینه‌ای دقیقاً پیش از واحدهای تکرار مرکزی واقع شده و از چهار تکرار پیوسته تشکیل می‌شود که هر تکرار هم دارای دو مارپیچ- آلفا و یک لوپ میانجی می‌باشد. اگرچه این قطعه‌ی ۱۲۷ اسیدامینه‌ای در پایانه‌ی N، نقشی در شناسایی اختصاصی DNA بازی نمی‌کند اما برای اتصال پایدار بخش مرکزی به DNA بسیار حیاتی است. این ویژگی توضیح می‌دهد که چرا همه‌ی TALEN ها باید حداقل دارای این قطعه‌ی ۱۲۷ اسیدامینه‌ای در پایانه‌ی N باشند (۴۴). به دلیل این که قلمرو کاتالیتیک FokI برای فعال شدن باید دایمر شود، زیر واحدهای TALEN باید در جایگاه برش به صورت هترو دایمر تجمع یابند. همودایمرهای TALEN استعداد بالایی در برش‌های غیر اختصاصی دارند که سبب کاهش ایمنی و کارایی در ویرایش ژنوم می‌شوند. برای حل این مشکل در قلمرو کاتالیتیک TALEN ها جهش‌هایی را ایجاد می‌کنند که از طریق تداخل در برهم‌کنش‌های الکتروستاتیک و هیدروفوب سبب جلوگیری از تشکیل همودایمر می‌شود. بنابراین، همه‌ی دایمرهای پایدار تشکیل شده در جایگاه اختصاصی برش از نوع هترو می‌باشند. ایجاد واریانت‌های



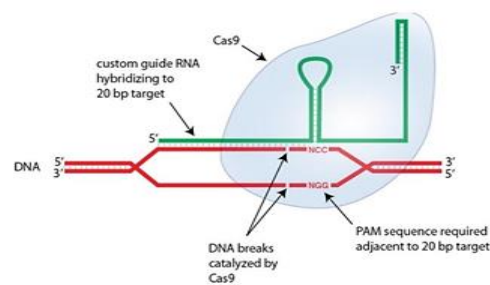
شکل 4. قلمروهای شناسایی کننده‌ی DNA (بیضی‌های رنگی) هرکدام به طور متوسط حدود 34 آمینو اسید طول داشته و شناسایی باز مورد نظر توسط آمینو اسیدهای بسیار متنوع موقعیت 12 و 13 (RVDs) در هر تکرار صورت می‌گیرد (الف). شناسایی یک توالی اختصاصی از DNA توسط TALEN (ب). (شرح جزئیات در متن).



شکل 3. نمای شماتیک نحوه‌ی اتصال اندونوکلیزهای انگشت روی به DNA (شرح جزئیات در متن)



شکل 5. نحوه‌ی برهمکنش اختصاصی بین RVDهای HD, NG, HG, NI و NN مربوط به TALEN به ترتیب با بازهای سیتوزین، تیمین، آدنین و گوانین در DNA (شرح جزئیات در متن. برگرفته از مرجع شماره 42).



شکل 6. نحوه‌ی شناسایی DNA و ایجاد برش در آن توسط سیستم Cas9. Guide RNA (gRNA) با تشکیل یک ساختار سنجاق-سر (Hairpin) عملکرد هر دو نوع crRNA و tracrRNA را تقلید می‌کند. crRNA از طریق برهمکنش اختصاصی با توالی DNA مورد نظر از طریق 20 ریبونوکلیتید انتهای 5' و همچنین برهمکنش با tracrRNA سبب فراخوانی و تحرک فعالیت کاتالیتیک آنزیم Cas9 می‌شود. سپس این آنزیم از طریق دو زیرواحد کاتالیتیک HNH و RuvC دو رشته‌ی DNA را حدود 3 جفت باز در بالا دست توالی PAM (5'NGG) برش می‌دهد.

به دلیل اینکه RVD های HD و NN پیوندهای هیدروژنی قوی را با بازهای DNA برقرار می کنند، تمایل اتصالی HD به سیتوزین و NN به گوانین از برهمکنش واندروالاس NI به آدنین و NG/HG به تیمین قوی-

برقراری کند. البته ممکن است برهمکنش مشابهی با N7 از آدنین دقیق با همان فراوانی را نیز داشته باشد (شکل 5:42). به همین دلیل RVD NN برای هر دو باز گوانین و آدنین استفاده می شود.

اتصال (Restriction Enzyme And Ligation) یا به اختصار REAL را توصیف کرده‌اند که تک واحدهای تکراری TALE با استفاده از فن هضم محدودکننده و اتصال به یکدیگر متصل می‌شوند. در این فن، آنها ابتدا یک کتابخانه‌ای از پلاسمیدها را با استفاده از سنتز DNA ساخته که هر کدام یک تکرار TALE را کد می‌کرده‌است. در مرحله‌ی تجمع ابتدا دو تکرار TALE توسط آویزه‌های سازگار هم که به وسیله‌ی هضم با اندونوکلاز ایجاد می‌شوند، به هم متصل می‌گردند. در مرحله‌ی بعدی، محصول اتصال که دو تکرار TALE را کد می‌کند به یک دایمر TALE دیگر متصل شده و ایجاد یک قطعه‌ی DNA را می‌کند که کدکننده‌ی چهار تکرار TALE می‌باشد. این فرآیند در یک الگوی تکرار شونده ادامه پیدا می‌کند تا سرانجام ردیفی از تکرارهای TALE موردنظر ساخته شود (۵۵). دومین روش برای تجمع توالی‌های تکراری TALE استفاده از راه‌کار کلون سازی "Golden Gate" است که سنتز ژن های TALE را آسانتر و سریع‌تر کرده‌است. در این فن، اندونوکلازهای محدودکننده‌ی نوع دو به کارگرفته می‌شوند که جایگاه برش و جایگاه شناسایی متفاوتی دارند و در نهایت، یک توالی غیر پالیندرومی چهارنوکلئوتیدی (4nt) در پایانه‌ی 5' ایجاد می‌کنند. به دلیل عدم یکسان بودن جایگاه‌های برش و شناسایی، ضرورتاً هر توالی 4nt می‌تواند در انتهای 5' به صورت آویزه ایجاد شود. به دلیل این که محصولات حاصل از اتصال صحیح، فاقد جایگاه‌های شناسایی آنزیم هستند، نمی‌توانند دوباره برش داده شوند. برش و اتصال می‌توانند در یک مخلوط واکنش و در یک مرحله انجام گیرند. [۵۴، ۵۳].

از دیگر فن‌های آوری‌ها برای سنتز TALEN ها، راه‌کار Fast Ligation-based Automatable Solid-)FLASH (phase High throughput است که کلون کردن ژن‌های TALE را با توان بالا و ارزانتر در مقیاس صنعتی مهیا کرده است. راه‌کار FLASH یا Solid-phase واحدهای

تراست که پیشنهادکننده‌ی این ایده‌هاست که برای ساختن TALEN های کارآمد باید حداقل ۳-۴ RVD قوی را به کار برد (۵۱). فقدان RVD اختصاصی برای بازگوانین کارکردهای وسیعتر TALEN ها را محدود می‌کرد. زیرا اتصال غیراختصاصی می‌تواند برش‌های بیرون از جایگاه را ایجاد کند که سبب ناپایداری غیرمنتظره‌ی ژنومی و افزایش سمیت می‌شود. در سال ۲۰۱۰، گروه Morbitzer و همکاران دریافتند که RVD NK می‌تواند هدف‌گیری نوکلئوتید G را تسهیل کند (۵۲). در سال ۲۰۱۱، گروه Miller و همکاران هم دریافتند که RVD NK به مثابه یک کد قابل اعتماد، برتری قوی‌تری برای گوانین نسبت به آدنین دارد (۵۳). اما مشکلی که در جایگزینی NN با NK پیش می‌آید، این است که به‌طور شدیدی فعالیت کاتالیتیک TALEN مربوط کاهش می‌یابد (۵۱، ۵۴). مطالعات بیشتر موكداً نشان داده که RVD NH هم برای باز گوانین بسیار اختصاصی است و هم نسبت به RVD NK کارایی بیشتری دارد (۵۱، ۵۵). در همه‌ی جایگاه‌های اتصال TALE، در موقعیت ۰ یک 5'-تیمین وجود دارد. چرا که پژوهشگران، پیشتر معتقد بوده‌اند برای عملکرد TALE ضروری است (۴۷، ۴۸). ساختار کریستال TALE آشکار کرد که دو تکرار پیش از قلمرو تکرار مرکزی؛ یعنی R0 و R(-1) در برهم‌کنش با 5'-تیمین نقش مهمی را ایفاء می‌کند. حلقه‌ی ایندول یک ریشه‌ی تریپتوفان در تکرار R(-1) یک برهم‌کنش واندروالاس را با گروه متیل از باز تیمین ایجاد می‌کند (۴۲، ۵۰).

به دلیل تشابه بالای واحدهای تکراری TALE، ساخت پلاسمیدهایی که ردیف‌های طولی از تکرارهای TALE را کد میکنند، چالش برانگیز است. برای رفع این محدودیت چندین روش برای کنار هم قراردادن قلمروهای تکرار مرکزی TALE توسعه یافته‌اند که هم سریع و هم از لحاظ هزینه مقرون به صرفه تر هستند. براساس یک راه‌کار استاندارد و عملیات کلون‌سازی ژنی، Sander و همکاران، روشی در آنزیم محدودکننده و

دست توالی هدف، یک موتیف کوتاه سه نوکلئوتیدی که به عنوان PAM عمل می‌کند، به صورت NGG وجود دارد که در شناسایی توالی هدف توسط Cas9 نقش بسیار حیاتی را ایفاء می‌کند. نوکلئاز Cas9 برش دو رشته‌ای در DNA هدف را حدود سه جفت باز بالا دست PAM ایجاد می‌کند (شکل ۶) (۷۱، ۷۰، ۶۵). در مهندسی هدف‌دار ژنوم crRNA و tracrRNA را به صورت یک RNA کایمری تحت عنوان gRNA (Guide RNA) سنتز می‌کنند که از طریق ایجاد یک ساختار سنجاق-سری عملکرد هر دو RNA را تقلید می‌کند (۷۲، ۷۰). نوکلئازهای Cas9 برش‌های اختصاصی جایگاه را به وسیله قلمرو-های نوکلئازی محافظت شده‌ی HNH و RuvC ایجاد می‌کنند که با ایجاد جهش در یکی از این قلمروها می‌توان واریانت‌هایی از Cas9 را ایجاد کرد که فقط توانایی برش یکی از دو رشته‌ی DNA را داشته باشند که به اصطلاح Cas9n (Cas9 Nickase) نامیده می‌شود (۷۱، ۷۰). برای ترمیم برش‌های تک رشته‌ای سلول بیشتر از ساز و کار نوترکیبی هومولوگ استفاده می‌کند. بنابراین از ایجاد جهش‌های ناخواسته‌ی Indel حاصل از NHEJ در جایگاه‌های غیرهدف کاسته می‌شود (۷۳). از طرفی دیگر، با استفاده از یک جفت gRNA مناسب و ایجاد برش‌های دو رشته‌ای توسط Cas9n می‌توان ویژگی شناسایی جایگاه هدف را ده‌ها برابر افزایش داد (۷۴، ۷۵، ۷۶).

مهم‌ترین مزیت‌های سیستم CRISPR/ Cas9 بر راهکارهای TALEN و ZFN موارد ذیل است:

الف) برای هدف قرار دادن یک توالی جدید از DNA توسط Cas9 تنها کافی است که یک توالی gRNA ویژه توالی جدید را مورد استفاده قرار داد. اما در دو راه‌کار پیشین، از TALEN‌ها و ZFN‌های ویژه جایگاه هدف جدید استفاده می‌شود که بسیار پر هزینه و زمانبر هستند (۷۷).

ب) الگوی برش توسط Cas9 نسبت به دو راه‌کار دیگر از تنوع بالاتری برخوردار است. بدین معنی که با

تکراری TALE را بر روی یک مهره‌ی مغناطیسی پوشیده‌شده با استرپتوآویدین کنار هم قرار می‌دهد. این مهره همچنین شامل یک آداپتور DNA دو رشته‌ای بیوتینیل‌شده غیر متحرک می‌باشد که دارای یک جایگاه برای اندونوکلئاز محدودکننده در یک پایانه است (۵۸، ۵۹). آخرین راه‌کار برای تجمع واحدهای تکراری TALE، Ligation-Independent Cloning یا به اختصار LIC نامیده می‌شود که توانایی تولید بیش از ۶۰۰ ژن TALEN را در یک روز دارد (۶۰).

۴- سیستم CRISPR/ Cas

آخرین ابزار در مهندسی هدف‌دار ژنوم سیستم CRISPR/ Cas می‌باشد که یک سیستم ایمنی اکتسابی میکروبی است که نوکلئازهای هدایت شده با میانجی‌گری RNA را برای برش عناصر ژنتیکی بیگانه مورد استفاده قرار می‌دهد (۶۱-۶۶). تاکنون سه سیستم CRISPR در میان باکتری‌ها و آرکی‌ها شناسایی شده که هر کدام از این سیستم‌ها شامل یک مجموعه‌ی ژن مرتبط با CRISPR تحت عنوان Cas، RNAهای غیرکدکننده و یک ردیف مجزا از عناصر تکراری می‌باشند. در بین این تکرارها توالی‌های کوتاهی قرار گرفته که از DNA بیگانه مشتق شده‌اند و تحت عنوان protospacer خوانده می‌شوند که با هم crRNA (CRISPR RNA) را می‌سازند. در درون DNA ی هدف، هر protospacer همواره دارای یک موتیف مجاور تحت عنوان PAM (protospacer adjacent motif) است که بر اساس سیستم اختصاصی CRISPR می‌تواند متنوع باشد (۶۷-۶۹). سیستم‌های CRISPR نوع دو برای ایجاد برش‌های دو رشته‌ای در DNA ی هدف، نیازمند crRNA، tracrRNA (Trans-activating crRNA)، و یکی از پروتئین‌های مرتبط با CRISPR به نام Cas9 هستند (۷۰). برش هدف‌دار به وسیله Cas9 نیازمند ایجاد برهم‌کنش‌های اختصاصی بین crRNA با tracrRNA و همچنین ایجاد جفت باز بین crRNA با ۲۰ نوکلئوتید از DNA هدف می‌باشد. در پایین

از مهمترین این چالش‌ها است. به‌ویژه در مورد TALEN ها که پروتئین‌های نسبتاً بزرگی بوده و دارای توالی‌های تکراری پشت سر هم می‌باشند، تحویل کارآمد آن‌ها بسیار مشکل است. زیرا توالی‌های تکراری در همه‌ی سیستم‌های زیستی از ویروس‌ها و پروکاریوت‌ها گرفته تا یوکاریوت‌ها، طی همانندسازی DNA ناپایدارند. باین وجود، ناقل‌های آدنوویروسی تا حدودی توانایی حمل‌کردن و تحویل آن‌ها را به سلول‌های انسانی دارند (۷۸). این یافته‌ها مطرح می‌کنند که توسعه‌ی سیستم‌های جدید تحویل دهنده‌ی TALEN ها یکی از هیجان‌انگیزترین موضوعات آینده خواهد بود. هر چند سیستم‌های CRISPR/Cas نوید بزرگی برای مهندسی ژنتیک به ارمغان آورده، اما مشکلات مربوط به توالی PAM، بسیاری از کاربردهای این سیستم را محدود کرده است (۷۹). مطالعات بیشتری برای افزایش ویژگی و کاهش سمیت سیستم CRISPR/Cas لازم است. این فن‌آوری‌ها به پژوهشگران این توانایی را می‌دهند که هر ژنومی را به‌دلخواه تغییر دهند و ما را در فهم بهتر ساز و کار بیماری و درمان آن امیدوارکنند.

استفاده از Cas9n و طراحی gRNA مناسب، می‌تواند برش‌های مختلفی را ایجاد کرد، اما TALEN ها و ZFN برش را تنها در توالی لینکر مربوط ایجاد می‌کنند (۷۰، ۷۳). (ج) در سیستم Cas9 با طراحی gRNA مختلف، می‌توان چندین لوکوس را به‌طور همزمان مورد هدف قرار داد، در حالی که TALEN و ZFN تنها یک لوکوس را هدف قرار می‌دهند (۷۷).

نتیجه‌گیری

مگانوکلئازها، ZFN ها، TALEN ها و سیستم CRISPR/Cas ابزارهای روز، کارآمد و منعطفی هستند که توانایی ایجاد تغییرات اساسی ژنومی در پژوهش‌های زیستی و نیز پزشکی فردی را دارند. این فن‌آوری‌های در حال ظهور به طرز چشمگیری توانایی دستکاری و مطالعه‌ی ارگانسیم‌های الگو را گسترش داده، نوید بخش درمان بیماری‌های ژنتیکی شده‌اند. با وجود این فناوری‌ها، همچنان پرسش‌ها و چالش‌های مهمی برای رسیدن کامل به اهداف فوق وجود دارد. روش‌های بهینه‌سازی در تحویل این نوکلئازها به درون سلول‌ها و ارگانسیم‌ها، یکی

References

1. Marcaida MJ, Muñoz IG, Blanco FJ, Prieto J, Montoya G. Homing endonucleases: from basics to therapeutic applications. *Cell Mol life sci*. 2010; 67(5): 727-48.
2. Noori-Daloi MR. *Medical Molecular Genetics in The third millennium*. Tehran: Samer; Nashre Akhar. 2010. [Persian]
3. Noori-Daloi MR. *Emery's Elements of Medical Genetics*. Tehran: Jame-e- Negar and salami publishing: 2009. [persian]
4. Levasseur DN, Ryan TM, Pawlik KM, Townes TM. Correction of a mouse model of sickle cell disease: lentiviral/antisickling β -globin gene transduction of unmobilized, purified hematopoietic stem cells. *Blood*. 2003; 102(13):4312-9.
5. Noori Daloi MR, Fazilaty H, Tabrizi M. Cancer Metastasis, genetic and microenvironmental factors of distant tissue: a review article. *Tehran University Medical journal*. 2013;70(11): 671-83. [persian]
6. Check E. Gene therapy: a tragic setback. *Nature*. 2002; 420: 116-8.
7. Baker M. Gene-editing nucleases. *Nature methods*. 2012; 9: 23-6.
8. Jensen NM., Dalsgaard T, Jakobsen M, Nielsen RR, Sorensen CB, Bolund L, Jensen TG. An update on targeted gene repair in mammalian cells: methods and mechanisms. *J Biomed Sci*. 2011; 18(1): 10.
9. Perez-Pinera P, Ousterout DG, Gersbach CA. Advances in targeted genome editing. *Curr Opin Chem Biol*. 2012; 16(3-4): 268-77.
10. Pauwels K, Podevin N, Breyer D, Carroll D, Herman P. Engineering nucleases for gene targeting: safety and regulatory considerations. *N Biotechnol*. 2014; 31(1): 18-27.
11. Sun N, Abil Z, Zhao H. Recent advances in targeted genome engineering in mammalian systems. *Biotechnol J*. 2012; 7(9): 1074-87.
12. Zhao L, Bonocora RP, Shub DA, Stoddard BL. The restriction fold turns to the dark side: a bacterial homing

- endonuclease with a PD-(D/E)-XK motif. *EMBO J.* 2007; 26(9): 2432-42.
13. Gogarten JP, Hilario E. Inteins, introns, and homing endonucleases: recent revelations about the life cycle of parasitic genetic elements. *BMC evolutionary biology.* 2006; 6: 94.
 14. Heath PJ, Stephens KM, Monnat RJ Jr, Stoddard BL. The structure of I-Crel, a group I intron-encoded homing endonuclease. *Nature Structural & Molecular Biology.* 1997; 4: 468-76.
 15. Duan X, Gimble FS, Quijcho FA. Crystal structure of PI-SceI, a homing endonuclease with protein splicing activity. *Cell.* 1997; 89(4): 555-64.
 16. Valton J, Daboussi F, Leduc S, Molina R, Redondo P, Macmaster R, Montoya G, Duchateau P. 5'-Cytosine-phosphoguanine (CpG) methylation impacts the activity of natural and engineered meganucleases. *JBC.* 2012; 287(36):30139-50.
 17. Seligman LM, Chisholm KM, Chevalier BS, Chadsey MS, Edwards ST, Savage JH, Veillet AL. Mutations altering the cleavage specificity of a homing endonuclease. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30(17): 3870-9.
 18. Rosen LE, Morrison HA, Masri S, Brown MJ, Springstubb, Sussman D, Stoddard BL, Seligman LM. Homing endonuclease I-Crel derivatives with novel DNA target specificities. *Nucleic Acids Res.* 2006; 34(17): 4791-800.
 19. Arnould S, Chames P, Perez C, Lacroix E, Duclert A, Epinat JC, Stricher F, Petit AS, Patin A, Guillier S, et al. Engineering of large numbers of highly specific homing endonucleases that induce recombination on novel DNA targets. *J Mol Biol.* 2006; 355(3): 443-58.
 20. Muñoz IG, Prieto J, Subramanian S, Coloma J, Redondo P, Villate M, Merino N, Mrenchino M, D'Abramo M, Gervasio S, et al. "Molecular basis of engineered meganuclease targeting of the endogenous human RAG1 locus. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39(2):729-43.
 21. Smith J, Grizot S, Arnould S, Duclert A, Epinat JC, Chames P, Prieto J, Redondo P, Blanco FJ, Bravo J, et al. A combinatorial approach to create artificial homing endonucleases cleaving chosen sequences. *Nucleic Acids Res.* 2006; 34(22): e149.
 22. Redondo P, Prieto J, Muñoz IG, Alibés A, Stricher F, Serrano L, Cabaniols JP, Daboussi F, Arnould S, Perez C, et al. Molecular basis of xeroderma pigmentosum group C DNA recognition by engineered meganucleases. *Nature.* 2008; 456(7218): 107-11.
 23. Popplewell L, Koo T, Leclerc X, Mamchaoui K, Gouble A, Mouly V, Voit T, Pagues F, Cedrone F, et al. Gene correction of a Duchenne muscular dystrophy mutation by meganuclease-enhanced exon knock-in. *Hum Gene Ther.* 2013; 24(7):692-701.
 24. Miller J, McLachlan AD, Klug A. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* 1985; 4(6): 1609-14.
 25. Wolfe SA, Nekudova L, Pabo CO. DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 2000; 29: 183-212.
 26. Urnov, Fyodor D., Edward J. Rebar, Michael C. Holmes, H. Steve Zhang, and Philip D. Gregory. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nature Reviews Genetics.* 2010; 11(9): 636-46.
 27. Vanamee ES, Santagata S, Aggarwal AK, FokI requires two specific DNA sites for cleavage. *J Mol Biol.* 2001; 309(1): 69-78.
 28. Segal DJ, Beerli RR, Blancafort P, Dreier B, Effertz K, Huber A, Koksche B, Lund CV, Magnenat L, Valente D, et al. Evaluation of a modular strategy for the construction of novel polydactyl zinc finger DNA-binding proteins. *Biochemistry.* 2003; 42(7): 2137-48.
 29. Bae KH, Kwon YD, Shin HC, Hwang MS, Ryu EH, Park J, Yang HY, Lee DK, Lee Y, Park J, et al. Human zinc fingers as building blocks in the construction of artificial transcription factors. *Nature Biotechnology.* 2003; 21: 275-80.
 30. Ramirez CL, Certo MT, Mussolino C, Goodwin MJ, Cradick TJ, McCaffrey AP, Cathomen T, Scharenberg AM, Joung JK. Engineered zinc finger nickases induce homology-directed repair with reduced mutagenic effects. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40(12): 5560-8.
 31. Maeder ML, Thibodeau-Beganny S, Osiak A, Wright DA, Anthony RM, Eichinger M, Jiang T, Foley JE, Winfrey RJ, Townsend JA, et al. Rapid "open-source" engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification. *Mol Cell.* 2008; 31(2): 294-301.
 32. Meng X, Noyes MB, Zhu LJ, Lawson ND, Wolfe SA. Targeted gene inactivation in zebrafish using engineered zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol.* 2008; 26(6): 695-701.
 33. Bitinaite J, Wah DA, Aggarwal AK, Schildkraut I. FokI dimerization is required for DNA cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95(18): 10570-5.
 34. Geurts AM, Moreno C. Zinc-finger nucleases: new strategies to target the rat genome. *Clin Sci.* 2010; 119(8): 303-11.
 35. Shimizu Y, Bhakta MS, Segal DJ. Restricted spacer tolerance of a zinc finger nuclease with a six amino acid linker. *Bioorg Med Chem Lett.* 2009; 19(14): 3970-2.

36. Händel EM, Alwin S, Cathomen T. 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.* 2009; 17(1): 104-11.
37. Guo J, Gaj T, Barbas CF III. Directed evolution of an enhanced and highly efficient FokI cleavage domain for zinc finger nucleases. *J Mol Biol.* 2010; 400(1): 96-107.
38. Ramirez CL, Foley JE, Wright DA, Müller-Lerch F, Rahman SH, Cornu TI, Winfrey RJ, Sander JD, Fu F, Townsend JA, et al. Unexpected failure rates for modular assembly of engineered zinc fingers. *Nature methods.* 2008; 5(5): 374-5.
39. Pattanayak V, Ramirez CL, Joung JK, Liu DR. Revealing off-target cleavage specificities of zinc-finger nucleases by in vitro selection. *Nat Methods.* 2011; 8(9): 765-70.
40. Joung JK, Sander JD. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2013; 14: 49-55.
41. Ding Q, Lee YK, Schaefer EA, Peters DT, Veres A, Kim K, Kuperwasser N, Motola DL, Meissner TB, Hendriks WT, et al. A TALEN genome-editing system for generating human stem cell-based disease models. *Cell Stem Cell.* 2013; 12(2): 238-51.
42. Sun N, Zhao H. Transcription activator-like effector nucleases (TALENs): A highly efficient and versatile tool for genome editing. *Biotechnol Bioeng.* 2013; 110(7): 1811-21.
43. White FF, Potnis N, Jones JB, Koebnik R. The type III effectors of *Xanthomonas*. *Molecular plant pathology.* 2009; 10(6): 749-66.
44. Gao H, Wu X, Chai J, Han Z. Crystal structure of a TALE protein reveals an extended N-terminal DNA binding region. *Cell Res.* 2012; 22(12): 1716-20.
45. Doyon Y, Vo TD, Mendel MC, Greenberg SG, Wang J, Xia DF, Miller JC, Urnov FD, Gregory PD, Holmes MC. Enhancing zinc-finger-nuclease activity with improved obligate heterodimeric architectures. *Nat Methods.* 2011; 8(1): 74-9.
46. Miller JC, Holmes MC, Wang J, Guschin DY, Lee YL, Rupniewski I, Beausejour CM, Waite AJ, Wang NS, Kim KA, et al. An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol.* 2007; 25(7): 778-85.
47. Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, Lahaye T, Nickstadt A, Bonas U. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science.* 2009; 126(5959): 1509-12.
48. Moscou MJ, Bogdanove AJ. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science.* 2009; 326(5959) 1501.
49. Deng D, Yan C, Pan X, Mahfouz M, Wang J, Zhu JK, Shi Y, Yan N. Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors. *Science.* 2012; 335(6069): 720-3.
50. Mak ANS, Bradley P, Cernadas RA, Bogdanove AJ, Stoddard BL. The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target. *Science.* 2012; 335(6069): 716-9.
51. Streubel J, Blücher C, Landgraf A, Boch J. TAL effector RVD specificities and efficiencies. *Nat Biotechnol.* 2012; 30(7): 593-5.
52. Morbitzer R, Römer P, Boch J, Lahaye T. Regulation of selected genome loci using de novo-engineered transcription activator-like effector (TALE)-type transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2010; 107(50): 21617-22.
53. Miller JC, Tan S, Qiao G, Barlow KA, Wang J, Xia DF, Meng X, Paschon DE, Leung E, Hinkley SJ, et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol.* 2011; 29(2): 143-8.
54. Cong L, Zhou R, Kuo YC, Cunniff M, Zhang F. Comprehensive interrogation of natural TALE DNA-binding modules and transcriptional repressor domains. *Nat Commun.* 2012; 3: 968.
55. Sander JD, Cade L, Khayter C, Reyon D, Peterson RT, Joung JK, Yeh JR. Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs. *Nat Biotechnol.* 2011; 29(8): 697-8.
56. Morbitzer R, Elsaesser J, Hausner J, Lahaye T. Assembly of custom TALE-type DNA binding domains by modular cloning. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39(13):5790-9.
57. Sanjana NE, Cong L, Zhou Y, Cunniff MM, Feng G, Zhang F. A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering. *Nat Protoc.* 2012; 7(1): 171-92.
58. Briggs AW, Rios X, Chari R, Yang L, Zhang F, Mali P, Church GM. Iterative capped assembly: rapid and scalable synthesis of repeat-module DNA such as TAL effectors from individual monomers. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40(15): e117.
59. Reyon D, Maeder ML, Khayter C, Tsai SQ, Foley JE, Sander JD, Joung JK. Engineering Customized TALE Nucleases (TALENs) and TALE Transcription Factors by Fast Ligation-Based Automatable Solid-Phase High-Throughput (FLASH) Assembly. *Curr Protoc Mol Biol.* 2013; 12: 12-16.
60. Schmid-Burgk JL, Schmidt T, Kaiser V, Höning K, Hornung V. A ligation-independent cloning technique for high-throughput assembly of transcription activator-like effector genes. *Nat Biotechnol.* 2013; 31(1): 76-

- 81.
61. Deveau H, Garneau je, Moineau S. CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions. *Annu Rev Microbiol.* 2010; 64: 475-93.
 62. Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science.* 2010; 327(5962): 167-70.
 63. Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJJ, Charpentier E, Horvath P, Moineau S, Mojica FJM, Wolf YI, Yakunin AF, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol.* 2011; 9(6): 467-77.
 64. Bhaya D, Davison M, Barrangou R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu Rev Genet.* 2011; 45 : 273-97.
 65. Garneau JE, Dupuis ME, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, Fremaux C, Horvath P, Magadán AH, Moineau S. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature.* 2010; 468(7320): 67-71.
 66. Noori-Dalooi MR, Nejatizadeh A. MicroRNA in disease an health: Diagnostic and therapeutic potentials. *Gene Therapy Development and future perspectives Rijeka, Croatia: InTech.* 2011:93-120. [Persian]
 67. Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *science.* 32008; 322(5909): 1843-5.
 68. Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuis RJ, Snijders AP, Dickman MJ, Makarova KS, Koonin EV, Van Der Oost J. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science.* 2008; 321(5891):960-4.
 69. Barrangou, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science.* 2007; 315(5819): 1709-12.
 70. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 2012; 337(6096): 816-21.
 71. Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2012; 109(39): E2579-86.
 72. Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pizada ZA, Eckert MR, Vogel J, Charpentier E. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature.* 2011; 471(7340): 602-7.
 73. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA. et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science.* 2013339(6121): 819-23.
 74. Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science.* 2013; 339(6121) 823-6.
 75. Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, Scott DA, Inoue A, Matoba S, Zhang Y, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell.* 2013; 154(6): 1380-9.
 76. Noori- Dalooi MR, Zekri A. Aura Kinase family roles in cancer diagnosis and treatment: a review article. *Med Sci J Islamic Azad Univ.* 2011; 21: 71-81. [Persian]
 77. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc.* 2013; 8(11): 2281-308.
 78. Holkers M, Maggio I, Liu J, Janssen JM, Miselli F, Mussolino C, Recchia A, Cathomen T, Gonçalves MA. Differential integrity of TALE nuclease genes following adenoviral and lentiviral vector gene transfer into human cells. *Nucleic Acids Res.* 2013. 41(5): e63.
 79. Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF 3rd. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.* 2013; 31(7): 397-405.

Targeted Genome Editing With Engineered Nucleases- a New Approach in Gene Therapy

Mohammad Reza Noori-Daloi

Department Of Medical Genetics, Faculty OF Medicine, Tehran University of Medical sciences, Tehran, Iran

Rasoul Abdollah zadeh

Department Of Medical Genetics, Faculty OF Medicine, Tehran University of Medical sciences, Tehran, Iran

Kazem Asadollahi

Institute of Biochemistry and Biophysics (IBB), University Of Tehran, Tehran, Iran

Received:26/12/2013, Revised:06/02/2014, Accepted:12/03/2014

Corresponding author:

Professor M.R. Noori- Dalooi,
Tehran University of Medical
sciences, Tehran, Iran
E-mail:
nooridaloi@sina.tums.ac.ir

Abstract

Nowadays, targeted genome engineering is one of the most important advances in genetic engineering. This process is based on the function of engineered endonucleases. These tools can make desirable genetic changes through creating double strand breaks followed by homologous recombination or non-homologous end joining mechanisms in a specific site on genome. Genome editing endonucleases have strong ability in understanding the gene performance and gene therapy applications. Meganucleases are the first group of these tools which are naturally found in all creatures and play a crucial role in the targeted genome engineering. zinc finger endonucleases (ZFNs) are the second class made using fusion of a series of DNA recognition Zinc finger domains with catalytic domain of FokI enzyme. Another class of these nucleases includes Transcription activator like-effector nucleases (TALENs) in which, DNA recognition domains are derivatives of transcription activator like-effector proteins from *Xanthomonas* species, plant pathogen bacteria, fused with catalytic domain of FokI enzyme, like previous class. The last class of these engineered endonucleases, modeled on bacterial adaptive immune system which are called CRISPR/Cas. In this system, Cas9 endonuclease is recruited to the target sequence by a guide RNA that pairs with target DNA and then the enzyme cuts the DNA. In this review, characteristics of the four endonucleases mentioned above and some advances in this area for enhancing its efficiency and specificity in basic and practical researches will discuss through personal experiences and up to date references.

Keywords: artificial nucleases ,Double- strand breaks, Gene targeting, Gene therapy