

The Most Important Techniques for Gene and Genome Editing

Mokhtar Jalali Javaran 

*Corresponding author. Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. E-mail: m_jalali@modares.ac.ir

Maryam Mohaghegh 

MSc Student, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. E-mail: maryam.mohaghegh@modares.ac.ir

Sedighe Setayesh 

MSc Student, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. E-mail: setayesh.s@modares.ac.ir

Mahsa Zarei 

PhD Student, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. E-mail: mahsa.zarei@modares.ac.ir

Sina Nosratabady 

PhD Student, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. E-mail: sina.nosratabadi@gmail.com

Abstract

Objective

This article aims to provide a comprehensive overview of the history of the discovery of these tools, their mechanisms of action, along with their advantages, disadvantages, challenges, applications, and future prospects, presented in a concise and informative manner for enthusiasts.

Materials and methods

Targeted genome editing is based on the induction of double-strand breaks, followed by the repair of the desired strand through mechanisms such as homologous recombination repair (HDR) or non-homologous end joining (NHEJ), which have been utilized across various organisms for diverse purposes. This review summarizes two main categories of editing systems: site-specific recombinases (SSR) and site-specific nucleases (SSN), including meganucleases (MegaN), zinc-finger nucleases (ZFN), transcription activator-like effector nucleases (TALEN), CRISPR/Cas systems, and Fanzor nucleases.

Results

Successful examples of these techniques include the treatment of certain diseases: in 2018, Hunter syndrome was treated by introducing the IDS gene into liver cells using the ZFN method in vivo. The TALEN method was used to treat Duchenne muscular dystrophy. In 2021, scientists were able to treat sickle cell anemia using the CRISPR/Cas system through single-base editing techniques.

Conclusions

In modern gene and genome editing methodologies, nuclease proteins are capable of introducing targeted modifications such as insertions, deletions, or substitutions within nucleotide sequences, thereby editing genetic information and the epigenome. These tools are capable of editing pathogenic genes by silencing them or activating inhibitory genes, finding applications in agriculture, medicine, and the treatment of genetic diseases. This system is also effective in gene tagging and modulating gene expression levels.

Keywords: CRISPR/Cas, gene and genomic editing, TALEN, ZFN

Paper Type: review Paper.

Citation: Jalali Javaran, M., Mohaghegh, M., Stayesh, S., Zarei, M., & Nosratabadi, S. (2025). The Most Important Techniques for Gene and Genome Editing. *Agricultural Biotechnology Journal*, 18(2), 41-68.

Agricultural Biotechnology Journal, 18(2), 41-68.

DOI: 10.22103/jab.2026.23417.1570

Received: December 01, 2025.

Received in revised form: January 28, 2026.

Accepted: January 29, 2026.

Published online: February 28, 2026.

Publisher: Shahid Bahonar University of Kerman & Iranian

Biotechnology Society.

© the authors



Introduction

Advances in gene and genome editing technologies have profoundly transformed modern biotechnology, enabling precise, targeted modifications within the genetic material of diverse organisms. The ability to induce controlled changes at specific genomic loci has provided researchers with tools to decipher gene function, engineer desirable traits in crops, and design therapeutic strategies for a wide range of genetic disorders. Editing technologies have evolved from the first-generation systems based on site-specific recombinases (SSR) to highly adaptable, programmable nucleases known as site-specific nucleases (SSN). These SSN platforms including meganucleases (MegaN), zinc-finger nucleases (ZFN), transcription activator-like effector nucleases (TALEN), CRISPR/Cas systems, and the recently identified Fanzor nucleases enable precise DNA cleavage followed by targeted sequence alterations through endogenous DNA repair pathways. The discovery of CRISPR/Cas, in particular, marked a paradigm shift, providing

researchers with an efficient, scalable, and relatively easy-to-design genome-editing platform. Subsequent innovations such as base editing, prime editing, epigenome editing, and RNA-targeting systems have expanded the scope of editability beyond classical double-strand break (DSB)–dependent mechanisms. Despite the rapid adoption of these technologies, each platform possesses unique strengths and limitations related to efficiency, specificity, design complexity, delivery, and off-target potential. Understanding these features is essential for selecting the most appropriate tool for different biological and biotechnological applications. This review provides a comprehensive synthesis of the evolution, functional mechanisms, and applications of major gene-editing systems, highlighting their impact on agriculture, medicine, and synthetic biology as well as emerging trends shaping the future of genome engineering.

Materials and methods

This review integrates published findings covering molecular mechanisms, engineering strategies, and comparative evaluations of major genome-editing systems. Three principal DNA repair pathways homologous recombination repair (HDR), classical non-homologous end joining (NHEJ), and microhomology-mediated end joining (MMEJ) were examined to explain how cells process DSBs and generate insertions, deletions, or precise sequence replacements. For each editing tool, parameters evaluated included DNA-binding modality (protein–DNA vs. RNA–DNA recognition), nuclease architecture, target sequence length and constraints, ease of reprogramming, editing efficiency, off-target rates, delivery feasibility, and organism-specific performance. The historical development of genome-editing nucleases was outlined using primary research articles and key milestone case studies. The first specialized nuclease, MegaN, was discovered in 1985, marking the inception of gene editing. Subsequently, the discovery of the ZF motif led to the development of ZFN, TALEN, CRISPR, and Fanzor nucleases, which have been employed for genome editing in living organisms. These nucleases function by binding to the DNA strand, identifying the target sequence, and, through their nuclease domain, introducing a cut. The discovery of the CRISPR/Cas system heralded a new era in gene editing research. The mechanism of action in this system involves the identification of the target sequence by the nuclease through the interaction of DNA and a guide RNA strand; following target sequence identification, the cut is made by the nuclease domain. Ultimately Special emphasis was placed on practical applications in plant biotechnology, clinical gene therapy, and disease modeling to contextualize the relevance of each platform.

Results

Meganucleases represent the earliest class of programmable nucleases. Their long recognition sequences (14–40 bp) confer exceptionally high specificity, but their DNA-binding surfaces are difficult to re-engineer, limiting their widespread use. Despite these constraints, MegaN demonstrated for the first time that sequence-specific genome modification was feasible, laying the foundational concept for modern targeted nucleases. ZFNs combine engineered zinc-finger protein arrays, each recognizing a 3-bp DNA segment, with the FokI nuclease domain which induces targeted double-strand breaks in the DNA. Their modular structure allows custom target-

site recognition. However, ZFNs require extensive protein engineering expertise, and their tendency for off-target activity can lead to harmful effects on cell viability. A landmark achievement was the 2018 *in vivo* ZFN-based treatment for Hunter syndrome, demonstrating clinical feasibility and establishing ZFNs as a viable therapeutic platform. TALENs utilize TALE repeats in which each repeat binds a specific nucleotide via repeat-variable diresidues (RVDs). This one-to-one nucleotide recognition greatly simplifies design and improves targeting precision. TALENs produce fewer off-target events compared to ZFNs and retain strong activity across diverse organisms. They have been successfully applied in correcting mutations associated with Duchenne muscular dystrophy and generating targeted knockouts in numerous plant and animal models. Their predictable design and high specificity make TALENs a robust option for precise editing when target flexibility is required. CRISPR/Cas technologies revolutionized genome editing by separating DNA recognition from protein structure: a customizable guide RNA directs the nuclease (Cas9 or Cas12) to its target. Advantages include simple design, rapid scalability, multiplexing capacity, and adaptability across organisms. CRISPR variants have expanded editing possibilities, including RNA targeting (Cas13), base editing for point mutations without DSBs, prime editing for template-free sequence rewriting, and CRISPRi/a for transcriptional modulation. In 2021, CRISPR-based single-nucleotide correction was used for treating sickle-cell anemia, marking a historic therapeutic milestone. Despite their power, concerns remain regarding off-target cleavage, delivery challenges, and immune responses to bacterial Cas proteins. Fanzor nucleases represent a newly discovered class of compact RNA-guided eukaryotic nucleases evolutionarily related to CRISPR-associated proteins. Their small size offers advantages for viral vector delivery, particularly in therapeutic contexts. While research is still emerging, Fanzor nucleases may form the basis of next-generation editing systems with improved efficiency and broader delivery compatibility. Genome editing has become indispensable in agriculture for enhancing stress tolerance, disease resistance, yield potential, and nutritional content. In medical biotechnology, programmable nucleases enable correction of pathogenic mutations, development of cell-based therapies, and targeted epigenetic modifications. Synthetic biology applications include metabolic engineering, gene circuit design, and construction of novel biological systems. As tools become more precise and efficient, their integration into routine laboratory and therapeutic workflows continues to expand.

Conclusions

Genome-editing technologies have evolved rapidly, enabling diverse and precise modifications of genetic material. While meganucleases provided the earliest proof-of-concept for targeted editing, modern research is dominated by TALEN and CRISPR/Cas systems due to their versatility, efficiency, and ease of customization. Emerging tools such as Fanzor nucleases promise further innovation, particularly in delivery-constrained therapeutic environments. Continued improvements in nuclease fidelity, editing precision, and delivery platforms will further expand the impact of genome engineering across agriculture, medicine, and industrial biotechnology. Ultimately, genome editing has transitioned from a conceptual possibility to a

central component of biological research and applied biotechnology, with transformative potential for addressing global challenges in food security, health, and sustainability.

Author contributions

Jalali Javaran M., and Mohaghegh, M. conceptualized the review, designed its structure, and prepared the initial draft; Setayesh, S., Zarei, M., and Nosratabadi, S. contributed to literature acquisition, content development, and critical revision of the manuscript; Jalali Javaran, M. oversaw supervision and coordination of the project; All authors reviewed and approved the final version of the manuscript.

Data availability statement

No new data were created in this study. Data sharing is not applicable.

Acknowledgements

The authors would like to thank the reviewers for carefully reading the manuscript and for their constructive, scientific, and valuable comments.

Ethical Considerations

Not applicable. This review article did not involve human participants, animal subjects, or any experimental procedures requiring ethical approval. The authors adhered to ethical standards in scientific publishing and avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and any form of research misconduct.


Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Conflict of Interest


The authors declare no conflict of interest.

مهمترین تکنیک‌های ویرایش ژن و ژنوم

مختار جلالی جواران 


*نویسنده مسئول: استاد گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران. رایانامه:

m_jalali@modares.ac.ir

مریم محقق 


دانشجوی کارشناسی ارشد گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران. رایانامه:

maryam.mohaghegh@modares.ac.ir

صدیقه ستایشی 


دانشجوی کارشناسی ارشد گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران. رایانامه:

setayesh.s@modares.ac.ir

مهسا زارعی 

دانشجوی دکتری گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران. رایانامه:

mahsa.zarei@modares.ac.ir

سینا نصرت آبادی 

دانشجوی کارشناسی ارشد گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران. رایانامه:

sina.nosratabadi@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۹/۱۰ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۴/۱۱/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۱/۰۹

چکیده

هدف: این مقاله مروری کلی بر تاریخچه کشف، مکانیسم عملکرد، مزایا، محدودیت‌ها و چالش‌ها، کاربردها و چشم‌اندازهای آینده فناوری‌های ویرایش ژن و ژنومی ارائه می‌دهد تا اطلاعاتی مفید، دسته‌بندی و خلاصه شده را در اختیار پژوهشگران و علاقه‌مندان قرار دهد.

مواد و روش‌ها: ویرایش هدفمند ژنوم مبتنی بر ایجاد شکست دو رشته‌ای DNA و به دنبال آن ترمیم رشته موردنظر از طریق مکانیسم‌های ترمیمی نوترکیبی همولوگ (HDR) و یا اتصال انتهای غیرهمولوگ (NHEJ) است که در بسیاری از موجودات

زنده جهت اهداف مختلف مورد استفاده قرار گرفته است. به منظور انجام ویرایش ژنی، اولین نوکلئاز اختصاصی Megan بود که در سال ۱۹۸۵ کشف شد و پس از آن با کشف موتیف ZF، نوکلئاز ZFN، TALEN، CRISPR و Fanzor توسعه یافتند که برای ویرایش ژنوم موجودات زنده مورد استفاده قرار گرفتند. این نوکلئازها با قرارگیری روی رشته DNA و شناسایی توالی هدف و اتصال به آن‌ها، با استفاده از دُمین نوکلئازی برش را ایجاد می‌کنند. با کشف سیستم CRISPR/Cas دوره جدیدی از تحقیقات در زمینه ویرایش ژن آغاز شد. مکانیسم عمل در این روش، شناسایی توالی هدف توسط این نوکلئاز بر اساس برهم‌کنش DNA و رشته RNA راهنما است که پس از شناسایی توالی هدف، برش توسط دُمین نوکلئازی انجام می‌شود.

نتایج: از نمونه‌های موفقیت‌آمیز در استفاده از تکنیک‌های ویرایش ژنی می‌توان به درمان برخی از بیماری‌ها اشاره کرد: در سال ۲۰۱۸ بیماری سندروم هانترا با وارد کردن ژن IDS به سلول‌های کبد با استفاده از روش ZFN به صورت درون‌تنی درمان شد. از روش TALEN برای درمان بیماری دیستروفی عضلانی دوشن استفاده شد. در سال ۲۰۲۱ دانشمندان توانستند با تکنیک ویرایش تک باز، بیماری کم خونی داسی شکل را با بهره‌گیری از سیستم CRISPR/Cas درمان کنند.

بحث: در روش‌های نوین ویرایش ژن و ژنومی، پروتئین‌های نوکلئازی قادرند به طور هدفمند تغییراتی مانند درج، حذف و یا جایگزینی در توالی نوکلئوتیدی، ویرایش اطلاعات ژنتیکی و اپی‌ژنوم را انجام دهند. این ابزارها می‌توانند از طریق ویرایش ژن‌های عامل بیماری‌ها از طریق خاموش کردن آن‌ها و یا فعال کردن ژن‌های مهارکننده در حوزه‌های کشاورزی، پزشکی و درمان بیماری‌های ژنتیکی به کار برده شوند. چنین سیستم‌هایی، در نشانه‌گذاری و همچنین کاهش یا افزایش بیان ژن‌ها کاربرد مؤثری دارند. با توسعه روش‌های جدیدتر و دقیق‌تر، استفاده از نوکلئازهای Megan کاهش یافت و بیشتر مطالعات و آزمایش‌ها بر روی روش‌های TALEN و CRISPR/Cas متمرکز گردیده است.

کلیدواژه‌ها: ویرایش ژن و ژنوم، CRISPR/Cas، TALEN، ZFN

نوع مقاله: مروری.

استناد: جلالی جواران مختار، محقق مریم، ستایش صدیقه، زارعی مهسا، نصرت آبادی سینا (۱۴۰۴) مهم‌ترین تکنیک‌های ویرایش

ژن و ژنوم. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۸(۲)، ۴۱-۶۸

Publisher: Shahid Bahonar University of Kerman & Iranian

Biotechnology Society.



© the authors

مقدمه

روش‌های سنتی اصلاح نباتات با نجات جان میلیون‌ها انسان، دستاوردهای ارزشمندی داشته‌اند؛ امروزه پیشرفت‌های علمی و فناوری، استفاده از روش‌های نوین ویرایش ژنوم را برای اصلاح ژن‌ها و توالی آنها امکانپذیر ساخته است (Chen & Gao,)

2014). تکنیک‌های هدف‌گیری ژن و افزایش اختصاصیت آنزیم‌های محدودکننده منجر به پیشرفت تکنیک‌های ویرایشی شد که در افزایش عملکرد و کیفیت گیاهان و مقاومت گیاهان به تنش‌ها، بیماری‌ها، بهبود عملکرد، تولید متابولیت‌های با ارزش در صنعت، مهندسی ژنوم میکروارگانیزم‌ها در صنایع غذایی و ارائه راهکارهای درمانی نقش بسیار موثری دارد. تحقیقات انجام شده در حوزه ویرایش ژنی تا کنون عمدتاً در زمینه‌های پیوند سلول‌های بنیادی، عفونت‌های ویروسی، بیماری‌های قلبی-عروقی، عصبی، اختلالات متابولیک، نقص‌های اولیه سیستم ایمنی، هموفیلی، بیماری‌های چشمی، دیستروفی عضلانی و درمان سرطان بوده است (Li et al., 2020; Nidhi et al., 2021). در گذشته دانشمندان از روش‌های ژنتیک معکوس مانند خاموشی و کاهش بیان ژن مانند RNA interference (iRNA) و Antisense RNA جهت اهداف مختلف، مانند بررسی عملکرد ژن استفاده می‌کردند (Javaran, 1999; Napoli et al., 1990). با وجود کم‌هزینه و سریع بودن این روش‌ها، به دلیل کارایی پایین و اثرات خارج از هدف، دانشمندان با حذف یا اضافه کردن چند نوکلئوتید از طریق ایجاد DSB^۱ و بهره‌گیری از مکانیسم‌های ترمیمی به این هدف دست می‌یابند (Matsumoto & Nomura, 2023). تاکنون دو خانواده آنزیمی SSR^۲ و SSN^۳ برای ویرایش هدفمند ژنومی معرفی شده است (Lino et al., 2018; Olorunniji et al., 2016). نوعی از آنزیم‌ها که توانایی اتصال به DNA و ایجاد شکست در محل‌های مشخص را دارند SSN نام دارند که برای ایجاد تغییرات هدفمند، مانند جهش، حذف، درج ژن و جایگزینی ژن استفاده می‌شوند (Adli, 2018). شکست‌های ایجاد شده توسط مکانیسم‌های خود سلول ترمیم می‌شود. این نوکلئازها به خانواده‌های مگانوکلئازها (MegaN)^۴، نوکلئازهای انگشت روی (ZFNs)^۵، نوکلئازهای شبه فعال‌کننده رونویسی (TALENs)^۶، تکرارهای کوتاه متقارن فاصله‌دار وابسته به پروتئین Cas (CRISPR/Cas)^۷ و نوکلئازهای Fanzor تقسیم می‌شوند که عملکرد کلی آن‌ها تا حدودی مشابه است (Tröder & Zevnik, 2022). از آنجایی که ویرایش ژن مبتنی بر DSB در درمان‌های بالینی کاربرد چندانی ندارد، از سیستم CRISPR/Cas به‌منظور افزایش یا کاهش بیان ژن، خاموش کردن یا فعال کردن ژن، بازآرایی کروموزومی و دیگر تغییرات اپی‌ژنتیکی بدون ایجاد شکستگی در دو رشته (DSB) استفاده می‌شود (Li et al., 2020). باتوجه به اهمیت، کاربردها و چشم‌انداز روش‌های مختلف ویرایش ژن، هدف از نگارش این مقاله، مقایسه کلی روش‌های ویرایش ژن و ژنومی، بیان نقاط قوت و ضعف آن‌هاست تا علاقه‌مندان به این تکنولوژی کمک کند که از ابزار و روش مناسب‌تری برای نیل به اهداف خود بهره‌گیرند.

۱. Double Strand Breaks
۲. Site-specific recombinases
۳. Site-specific Nucleases
۴. Meganucleases
۵. Zinc-finger nucleases
۶. Transcription activator-like effector nucleases
۷. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

ویرایش ژنوم با استفاده از SSR

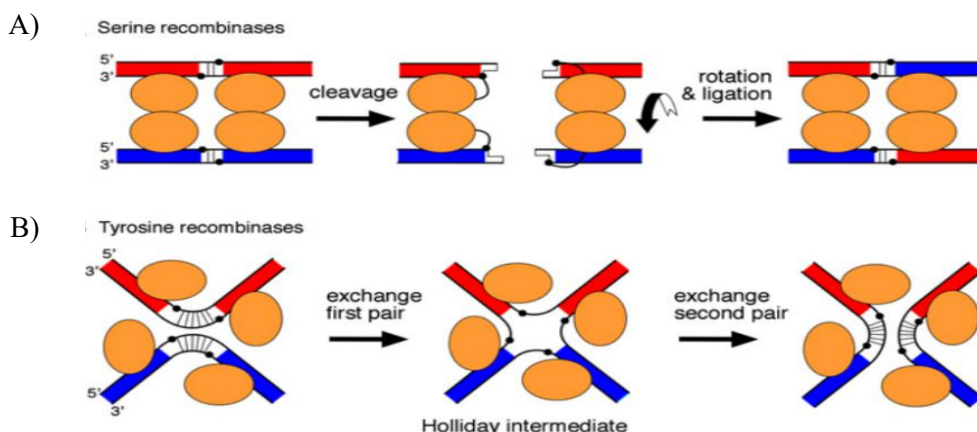
برای اولین بار SSR در باکتری *Escherichia coli* (*E. coli*) کشف شد که می‌توانست ژنوم باکتريوفاژ λ را در یک مکان خاص از ژنوم میزبان جدا کند. این روش بر اساس جایگاه فعال آنزیم و شناسایی توسط گروه r آمینواسیدی به دو خانواده کلی ریکامبینازهای سرین و ریکامبینازهای تیروزین تقسیم می‌شوند که امروزه از آن‌ها برای وارد کردن DNA به داخل ژنوم باکتری‌ها از طریق نوترکیبی استفاده می‌شود (Olorunniji et al., 2016; Dymond et al., 2011). از SSR برای وارد کردن یک قطعه DNA یا وارونگی آن و خاموش کردن ژن استفاده کرد. این روش در ساخت و ادغام پلاسمید نیز کاربرد دارد (Dymond et al., 2011). در نوترکیبی خاص محل، دو توالی کوتاه DNA در دو جایگاه متفاوت از یک مولکول یا دو مولکول جداگانه، توسط زیر واحدهای آنزیم SSR شناسایی می‌شوند و سیناپس تشکیل می‌دهند، سپس با شکسته شدن پیوند فسفودی‌استر در مکان مشخص، انتهای شکسته شده بدون صرف ATP یا کوفاکتور دیگری با آرایش جدید در کنار هم قرار می‌گیرند و نوترکیبی رخ می‌دهد (شکل ۱). در این فرایند، هیچ قطعه DNA سنتز یا تخریب نمی‌شود و بر خلاف روش HR^A، به توالی DNA مشابه در سایر جایگاه‌ها نیاز ندارد (Olorunniji et al., 2016; Akopian & Stark, 2005). از مزایای این روش می‌توان به بازده و اختصاصیت آن اشاره کرد؛ به گونه‌ای که بازده این روش بالاتر از روشی مانند HR است و جایگاه شناسایی با ۳۰ الی ۴۰ bp به ندرت در ژنوم یافت می‌شود. از معایب این روش می‌توان به برگشت‌پذیری واکنش، اثرات خارج از هدف، ایجاد سمیت و عدم کارایی آن اشاره کرد (Karow & Calos 2011; Olorunniji et al. 2016). برای حل این مشکلات می‌توان از بیان گذرا^۹ استفاده کرد (Abdallah et al., 2015).

ویرایش ژنوم با استفاده از روش SSN

به طور طبیعی در توالی‌های ژنی و کروموزومی تغییراتی ممکن است رخ دهد که این تغییرات به نام جهش شناخته می‌شوند. جهش‌ها انواع مختلفی مانند، نقطه‌ای، جابه‌جایی، وارونگی و ... دارند که به هنگام وقوع، شکست پیوند فسفودی‌استری بین مولکول‌های DNA در طول یک رشته صورت می‌گیرد. هنگامی که دو رشته در کروموزوم شکسته می‌شوند، برای حیات سلول بسیار خطرناک هستند و بایستی به سرعت ترمیم شوند. در صورتی که ترمیم DSB به خوبی صورت نگیرد، باعث از دست دادن اطلاعات ژنتیکی و در نهایت مرگ سلول خواهد شد. از این رو، سلول‌ها مکانیسم‌های طبیعی برای ترمیم این شکست‌ها ایجاد کرده‌اند.

۱. Homologous Recombination

۲. انتقال و بیان ژن به سلول، بدون وارد شدن به ژنوم میزبان



شکل ۱. مکانیسم عمل ریکامبینازها. (A) ریکامبینازهای سرین قبل از بازآرایی انتهای شکسته شده DNA و اتصال مجدد رشته‌ها، DSB را ایجاد می‌کنند. (B) ریکامبینازهای تیروزین یک جفت رشته DNA را بریده و تعویض می‌کنند، سپس جفت دیگری از رشته‌ها را بریده و تعویض می‌کنند. در دو خانواده، نو ترکیبی توسط یک تترامر SSR کاتالیز می‌شود (Olorunniji et al., 2016)

Figure 1. Mechanism of recombinases. (A) Serine recombinases create a DSB before repairing the broken DNA ends and rejoining the strands. (B) Tyrosine recombinases cut and replace one pair of DNA strands, then cut and replace another pair of strands. In two families, recombination is catalyzed by an SSR tetramer (Olorunniji et al., 2016)

بنابراین، با ایجاد شکست هدفمند در توالی و استفاده از مکانیسم ترمیم درون‌زا می‌توان ویرایش یا جهش مد نظر را در ژنوم ایجاد کرد. اولین گام در ویرایش ژن، کشف مکانیسم نو ترکیبی همولوگ بود. دانشمندان دریافته‌اند که چگونه قطعه DNA در دو انتهای خود که دارای قطعات همولوگ است، می‌تواند در ژنوم میزبان ادغام شود (Smithies et al., 1985; Thurtle - Schmidt & Lo, 2018). ترمیم شکست‌های دو رشته‌ای بسته به مرحله چرخه سلولی به دو روش کلی صورت می‌گیرد؛ اتصال مجدد انتهاها (NHEJ و MMEJ) و یا توسط الگوی ترمیمی مبتنی بر همسانی (HDR) که به واسطه مولکول DNA جداگانه به‌عنوان اهداکننده انجام می‌شود (Tröder & Zevnik, 2022). بین توالی رشته DNA گیرنده و اهداکننده (کروماتید خواهری)، در بالادست و پایین‌دست محل برش خورده همولوژی وجود دارد که به آن بازوی همولوگ می‌گویند. در مکانیسم ترمیمی HDR، ترمیم در فازهای S و G2 چرخه سلولی و پس از همانندسازی رخ می‌دهد^۳ (شکل ۲). این مکانیسم ترمیمی

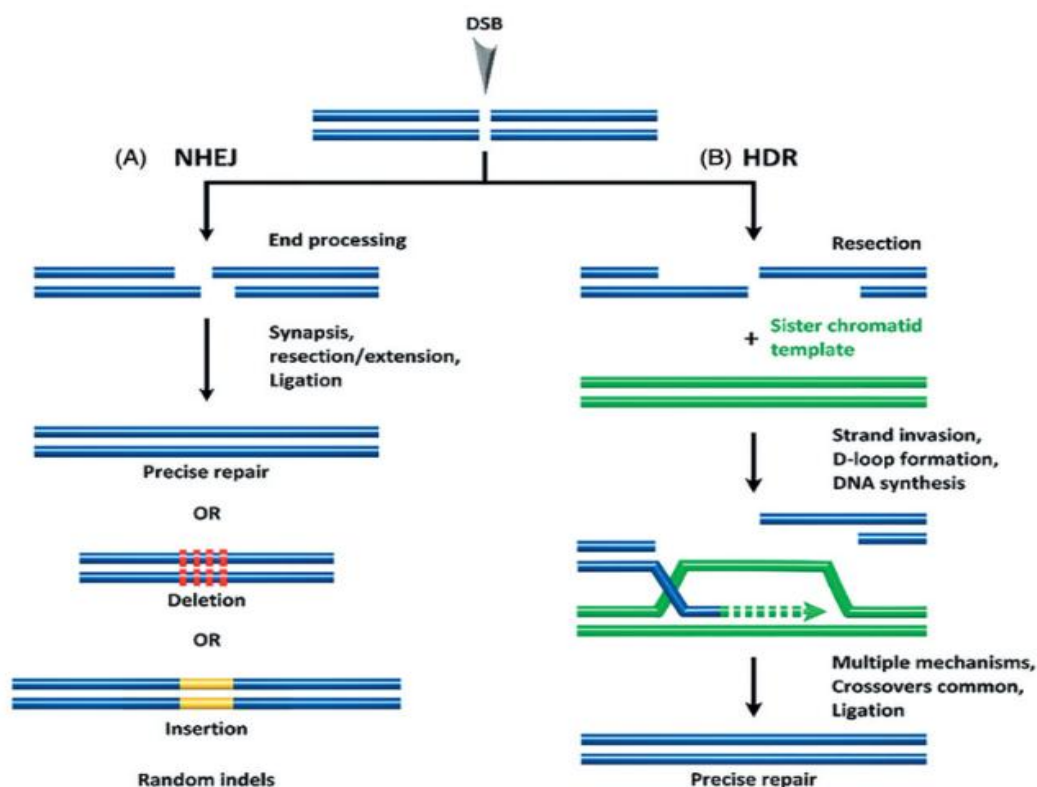
۱. اتصال انتهای غیر همولوگ - Non Homologous End-Joining

۲. اتصال دو انتها با واسطه میکروهمولوژی - Microhomology-Mediated End Joining

۳. Homology-Directed Repair

این عمل به‌صورت کپی و چسباندن توسط آنزیم لیگاز، RecA و Rad51 جهت جلوگیری از تاخوردگی دو رشته انجام می‌شود. ۴.

خطای کمی دارد و در انسان فراوانی بیشتری نسبت به گیاهان دارد. از این مکانیسم بیشتر برای وارد کردن قطعات ژن استفاده می‌شود (Hadipour et al., 2023). مکانیسم ترمیمی NHEJ در مرحله اینترفاز رخ می‌دهد و از DNA غیرهمولوگ استفاده می‌کند؛ در این روش پس از بروز شکست در دو رشته DNA، توالی هدف توسط پلی‌نوکلئوتید کیناز پوشانده می‌شود تا اتصال مجدد بین دو رشته صورت نگیرد^۴. این مکانیسم ترمیمی به دلیل ناپایداری و خطای زیاد می‌تواند بروز جهش از نوع درج، حذف و یا جلیه‌جایی در حدود ۱۰ الی ۲۰ bp را ایجاد کند و اغلب برای خاموش کردن ژن هدف و برهم‌زدن قلب خولندن از آن استفاده می‌شود (شکل ۲) (Hadipour et al., 2023). روش MMEJ متکی بر همولوژی کوتاه در دو طرف توالی شکست است، می‌تواند درج یا حذف را در رشته موردنظر ایجاد کند.



شکل ۲. مکانیسم‌های ترمیمی بعد از DSB. ترمیم رشته DNA در حضور یک DNA الگو از طریق HDR انجام می‌شود و برای وارد کردن قطعه ژن جدید و ویرایش ژن به کار می‌رود. از مکانیسم NHEJ برای ویرایش ژن، حذف یا درج ژن استفاده می‌شود (Lino et al., 2018)

Figure 2. Mechanisms of DSB repair. DNA strand repair is performed in the presence of a DNA template through HDR and is used to insert a new gene fragment and gene editing. NHEJ mechanism is used for gene editing, deletion or insertion (Lino et al., 2018)

دیگر اجزای فعال در این فرایند DNA لیگاز IV و Ku DNA-PKcs می‌باشند و از خوردگی دو سر توالی جلوگیری می‌کنند. ۵

روش‌های مگانوکلنازی (Mega N)

مگانوکلنازاها، اندودئوکسی ریبونوکلنازهایی هستند که به اندونوکلنازهای خانگی مشهورند، به فراوانی در ژنوم موجودات یافت می‌شوند و در سال ۱۹۸۳ در مخمر کشف شدند (Kostriken R, et al., 1983). آن‌ها در اینترون‌ها، اینتین‌ها و در مکان‌های مستقل کد می‌شوند؛ به اندونوکلنازهای اینترون پیشوند I و به اندونوکلنازهای اینتین پیشوند PI داده می‌شود (Becker & Boch, 2021; Khalil, 2020). مگانوکلنازاها بر اساس توالی و موتیف‌های ساختاری به پنج دسته (GIY-YIG, PD- (D/E)XK, HNH, His-Cysbox, LAGLIDADG) تقسیم می‌شوند و با اتصال بخش صفحات بتا به DNA، بسته به نوع آنزیم، توالی DNA را از ۱۴ تا ۴۰ bp را شناسایی کرده و برش می‌زنند (Galburt and Jurica., 2005). خانواده LAGLIDADG بیشتر از بقیه گروه‌ها مورد مطالعه قرار گرفته است. شناخته‌شده‌ترین مگانوکلنازاها PI-SceI و I-CreI هستند. مگانوکلنازاها ساختاری به صورت صفحات بتا آنتی پارالل^{۱۵} دارند که DNA را شناسایی می‌کنند. این نوکلناز با قرارگیری روی شیار بزرگ DNA آن را برش می‌زنند (Becker & Boch, 2021; Khalil, 2020). از محدودیت مگانوکلنازاها می‌توان به متمیله شدن DNA، تمایل اتصال آنزیم به DNA کاهش فعالیت کاتالیتیکی آنزیم، طراحی دشوار و هزینه‌بر پروتئین‌ها اشاره کرد. به دلیل طول زیاد توالی شناسایی این نوکلنازاها برش‌های نادری را ایجاد می‌کند، با این وجود توانایی اتصال به مکان‌های غیراختصاصی را نیز دارد و برش‌های ناخواسته ایجاد می‌کند (Khalil, 2020). در سال ۲۰۱۳ درمان بیماری دیستروفی عضلانی دوشن، با هدف‌گیری ژن DMD، در میوبلاست انسان با استفاده از مگانوکلناز و مکانیسم ترمیمی نوترکیبی همولوگ انجام شد (Popplewell et al., 2013).

روش نوکلناز انگشت روی (ZFN)

اولین موتیف انگشت روی در سال ۱۹۸۵ کشف شد که به عنوان بخشی از فاکتور رونویسی AIII بود و تمایل زیادی به اتصال با DNA داشت (Chen et al., 2011). چند سال بعد، FokI کشف شد که شامل دُمین متصل‌شونده به DNA و دُمین برش‌دهنده نوکلنازی بود و نشان‌دهنده آن بود که می‌توان با اتصال دُمین برش‌دهنده به دُمین متصل‌شونده به توالی موردنظر، برشی اختصاصی و برنامه‌ریزی‌شده انجام داد (Kim, 2016). در سال ۱۹۹۶ برای اولین بار توالی DNA هدف با اتصال پروتئین ZF به آنزیم نوع^{۱۶} FokI، توانستند به طور اختصاصی، دو پیوند فسفودی‌استری را برش دهند. از آنجایی که ZFN توانایی ویرایش ژن در همه مراحل چرخه سلولی را دارد، حتی با احتمال اینکه برش در مرحله S چرخه سلولی اتفاق افتد، ZFN به تمام توالی در طول همانند سازی دسترسی دارد (Carroll et al., 2011). با کاهش دما به زیر حد فیزیولوژیکی می‌توان چرخه سلولی را کند کرد و زمان بیشتری به ZFN جهت اتصال به DNA را داد (Petersen & Niemann, 2015). این نوکلناز پس از برش در ۹ نوکلئوتید

۱۰. نوعی ساختار ثانویه در پروتئین‌ها که در آن رشته‌های بتای مجاور در جهت‌های مخالف نسبت به یکدیگر قرار دارند.

۱۱. نوعی آنزیم محدود کننده که توانایی شناسایی توالی خاصی از DNA و ایجاد برش در توالی، به دور از جایگاه شناسایی را دارند.

پایین تر از جایگاه شناسایی، یک انتهای چسبان با ۴ نوکلئوتید به جای می‌گذارد (Carroll et al., 2006). انگشت روی انواع مختلفی دارد که مشهورترین آن $C2H2$ است. هر ZFN حداقل از سه دُمین ZF تشکیل شده است که بخش آلفا هلیکس هر دُمین با یک توالی ۳ جفت بازی در ارتباط است (Tröder & Zevnik, 2022). هر دُمین از ۳۰ اسید آمینه تشکیل شده است و موتیف آن شامل یک آلفا هلیکس، دو صفحه بتا^{۱۷} آنتی‌پارالل و یک اتم روی است. عنصر روی با دو هیستیدین و دو سیستئین پیوند غیر کووالانسی برقرار می‌کند. دُمین $C2H2$ فراوان‌ترین دُمین متصل شونده به DNA است و به بخش شیار بزرگ DNA متصل می‌شود (شکل ۳). برای برش دو رشته، ZFN باید به صورت دایمر باشد و برای هر سایت باید دو طراحی صورت‌گیرد. تشخیص توالی و اختصاصیت ZFN به تعداد موتیف‌های ZF، توالی آمینواسیدی هر ZF و برهمکنش دُمین نوکلئازی بستگی دارد (Li et al., 2020). یکی از روش‌های طراحی و ساخت این سازه مونتاژ است که شامل استفاده از کتابخانه از پیش مشخص شده از انگشت روی است، در این روش ابتدا دومین‌های انگشت روی به طور جداگانه ساخته شده و سپس به هم متصل و در نهایت به نوکلئاز foki متصل می‌شوند. جهت افزایش کارایی در سال ۲۰۰۸ روش دیگری به نام (OPEN) Oligomerized pool engineering^{۱۸} (Maeder et al., 2008) و در سال ۲۰۱۱ روش Context-dependent assembly (CoDA)^{۱۹} ابداع شد (Sander et al., 2011). از معایب آن‌ها می‌توان به هزینه بالا، طراحی دشوار، توانایی اتصال به مکان‌های غیراختصاصی اما با تمایل اتصال کمتر و ایجاد سمیت اشاره کرد؛ این مشکل با استفاده از چند آرایه ZF به منظور افزایش اختصاصیت و بالابردن میل ترکیبی قابل حل است (Hadipour et al., 2023). باید در نظر داشت که نمی‌توان ZFN را وارد ژنوم اصلی جاندار هدف کرد، چرا که موجب رونویسی دائم و برش غیراختصاصی می‌شود (Petersen & Niemann, 2015). از دیگر چالش‌های استفاده این روش می‌توان به محدودیت دسترسی به برخی از نواحی کروماتین و رساندن ZFN به موجودات زنده و بافت‌ها اشاره کرد. برای اولین بار از این نوکلئاز در سال ۲۰۰۸ برای ایجاد تغییرات در ژن *SuRA* در توتون استفاده شد (Maeder et al., 2008). از نوکلئاز انگشت روی برای ایجاد اختلال در ژن $CCR5$ ^{۲۰} که اصلی‌ترین گیرنده ویروس نقص ایمنی انسان (HIV) است استفاده شده است (Tebas et al., 2014).

روش نوکلئازهای افکتور شبه‌فعال کننده رونویسی (TALEN)

در باکتری‌های *Xanthomonas* نوعی فاکتورهای رونویسی به نام TALE^{۲۱} وجود دارند که در سال ۲۰۱۰ کشف شدند و قادر بودند به طور طبیعی رونویسی ژن‌ها را در گیاه میزبان تغییر دهند (Li et al., 2020; Samanta et al., 2016). اکثر

۲. β -sheet

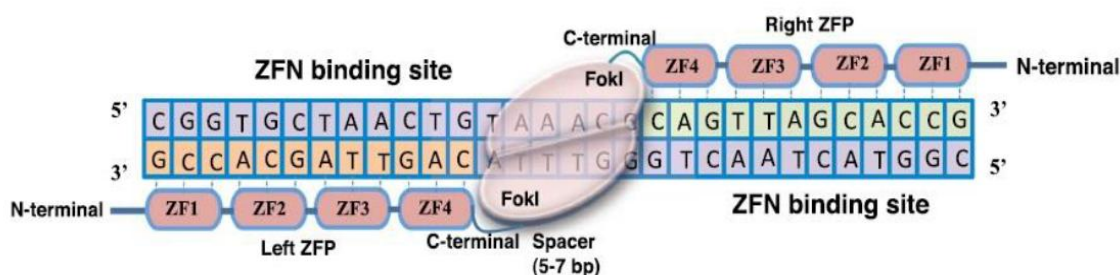
۳. مهندسی مجموعه الیگومری

۴. مونتاژ وابسته به شرایط

۱. C-C chemokine receptor type 5

۲. Transcription activator-like effector

TALENها مانند ZFN از FokI جهت برش دو رشته DNA استفاده می‌کند. دُمین متصل شونده به DNA از چندین تکرار تشکیل شده که هر کدام از تکرارها ۳۳ تا ۳۵ آمینواسید دارد و هر کدام از دُمین‌ها یک نوکلئوتید را شناسایی می‌کند؛ تکرار آخر که نیمه تکرار نام دارد، دارای ۲۰ آمینواسید است. اختصاصیت نوکلئوتید توسط آمینواسیدهایی در موقعیت ۱۲ یا ۱۳ (RVD) هر تکرار تعیین می‌شود.



شکل ۳. نحوه اتصال ZFN به DNA هدف. نوکلئاز انگشت روی از دومین نوکلئازی FokI جهت برش رشته DNA و چند دومین انگشت روی جهت شناسایی توالی تشکیل شده است و هر دومین ZF سه نوکلئوتید را شناسایی می‌کند (Samanta et al., 2016)

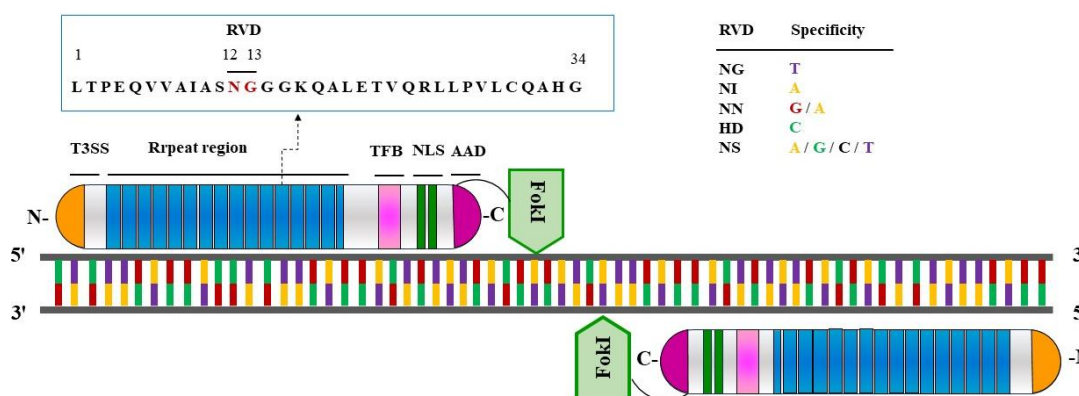
Figure 3. How ZFN binds to target DNA. Zinc finger nuclease is composed of FokI nuclease domain for breaking DNA strand and several zinc finger domains for sequence recognition and each ZF domain recognizes three nucleotides (Samanta et al., 2016)

در نتیجه طراحی آن‌ها راحت‌تر از طراحی ZFN است؛ آن‌ها همچنین اثرات خارج از هدف کمتر و فعالیت آنزیمی بیشتری دارند (Becker & Boch, 2021; Bhardwaj & Nain, 2021). جهت افزایش کارایی اتصال، معمولاً آخرین نوکلئوتید در انتهای 5'، تیمین قرار می‌گیرد و جهت افزایش اختصاصیت شناسایی و برش تکرشته ای می‌توان از TALENickase استفاده کرد (Becker & Boch, 2021; Abdallah et al., 2015). آرایه‌های TALE را می‌توان با استفاده از روش‌هایی مانند Golden Gate cloning به یکدیگر مونتاژ کرد. برای این کار به پلاسمیدهایی حاوی تکرارهای TALE، آنزیم لیگاز و آنزیم محدودکننده نوع II نیاز است. اتصال آرایه‌ها توسط PCR نیز می‌تواند صورت گیرد (Cermak et al., 2011; Hadipour et al., 2023; Li et al., 2020) از دیگر روش‌های ابداع شده برای ویرایش ژنوم با توان بالاتر می‌توان به مونتاژ Fast ligation-based و (FLASH) automatable solid-phase high-throughput (Reyon et al., 2012) و Ligation-independent

۳. Repeat Variable di-residues

۱. اتصال سریع خودکار در فاز جامد با توان بالا

cloning^{۲۴} (Schmid-Burgk et al., 2013) اشاره کرد. نوکلئاز TALE از سه بخش اصلی تشکیل شده است؛ ناحیه N-ترمینال (NTR)، C-ترمینال (CTR) و دُمین اتصال به DNA (DBDS) که از چند تکرار تشکیل شده است (شکل ۴). توالی انتهایی N دارای پپتیدهای ترش‌حی باکتریایی است که فعالیت غیراختصاصی اتصال به DNA و میل به آن را ایجاد می‌کند. توالی انتهایی C دارای یک رابط برهم‌کنش برای فاکتور رونویسی گیاهی AII (TFB)^{۲۵}، پپتیدهای سیگنال موقعیت‌یاب هسته‌ای (NLS)^{۲۶} و دُمین فعال‌سازی اسیدی (AAD)^{۲۷} هستند. عامل TALE به صورت یک سوپر کویل، شامل آلفا هلیکس راست‌گرد به دور DNA می‌پیچد و به جست‌وجوی توالی هدف می‌پردازد. با شناسایی توالی هدف، اتصال آن با DNA محکم می‌شود. در صورتی که اکثر پروتئین‌های متصل‌شونده به توالی خاص DNA، از مکانیسم پرش استفاده می‌کنند (Adli, 2018; Becker & Boch, 2021).



شکل ۴. ساختار TALE و نحوه اتصال آن به DNA. هر RVD، نوکلئوتید به‌خصوصی را شناسایی می‌کند و برش توسط FokI انجام می‌شود. نوکلئاز TALEN از N ترمینال، C ترمینال و دُمین متصل‌شونده به DNA تشکیل شده است. AAD دُمین فعال‌سازی اسیدی، NLS سیگنال موقعیت‌یاب هسته‌ای، TFB محل اتصال فاکتور رونویسی و T3SS سیگنال ترش‌حی نوع ۳ است

Figure 4. TALE structure and how it binds to DNA. Each RVD recognizes a specific nucleotide and cleavage is performed by foki. TALEN nuclease consists of N-terminal, C-terminal and DNA-binding domain. AAD is the acidic activation domain, NLS is a nuclear localization signals, TFB is transcription factor binding site and T3SS is a type III secretion signal

۲. کلونینگ مستقل از لیگاز

۳. Transcription Factor Binding site

۴. Nuclear Localization Signals

۵. Acidic Activation Domain

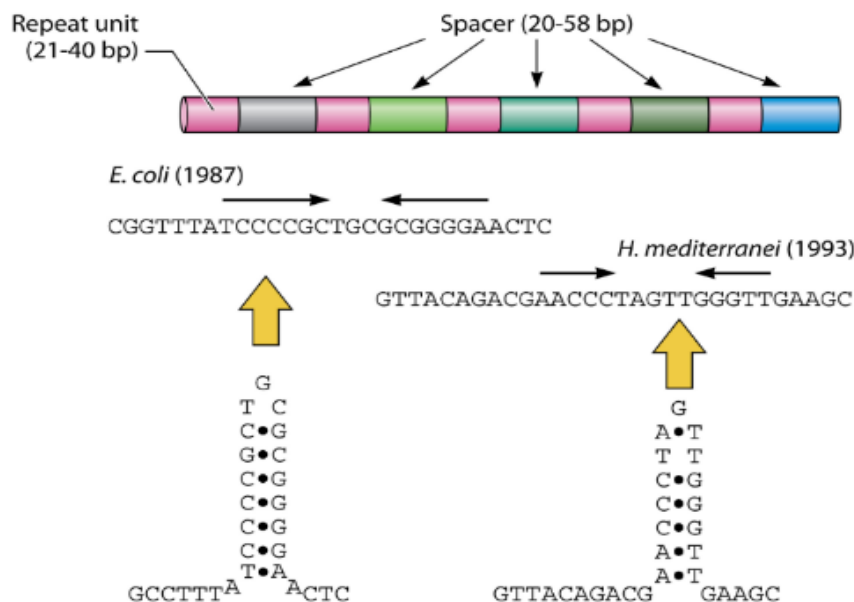
جهت کاهش اثرات خارج از هدف و افزایش کارایی اتصال می‌توان پروتئین TALE را به جای FokI، با دیگر آنزیم‌های برش دهنده مانند PvuII که خود بخشی از یک مگانوکلاز است، ادغام کرد؛ همچنین با کوتاه کردن ناحیه C ترمینال کارایی افزایش می‌یابد (Becker & Boch 2021). پروتئین‌های TALE قادر هستند بین دو توالی هدف که تنها در یک نوکلئوتید متیله تفاوت دارند تمایز قائل شوند به همین جهت، در ویرایش ژن‌های وابسته به متیلاسیون به کار می‌روند و کمترین اثرات خارج از هدف را بین دیگر نوکلئازها دارند. همچنین برتری آن‌ها نسبت به ZFN، توانایی تشخیص تک نوکلئوتیدی است (Becker & Boch, 2021). نرم‌افزارها و وبسایت‌های متعددی برای طراحی این نوع نوکلئاز، شناسایی مکان‌های خارج از هدف، پیشنهاد مکان‌های احتمالی اتصال TALEN و طراحی RVD مناسب وجود دارد که برخی از آن‌ها مانند: ChopChop، PROGNOSE، TALE-NT، TALENoffer هستند (Huang et al., 2022). کمپلکس TALEN را می‌توان با استفاده از روش‌های انتقال فیزیکی (مانند تفنگ ژنی^{۲۸}، ریز تزریقی^{۲۹}، الکتروپوریشن^{۳۰} و ...)، انتقال مبتنی بر باکتری (مثل سیستم ترشحی طبیعی)، انتقال مبتنی بر ویروس (مانند آدنووایروس^{۳۱} یا باکولوویروس^{۳۲}) و انتقال به‌وسیله مواد شیمیایی (مثل لیپوزوم^{۳۳}، PEG^{۳۴} و...) به سلول منتقل کرد. تا کنون از این روش برای اختلال در ژن درون‌زا NTF3^{۳۵} و CCR5 در سلول‌های سرطان خون (Miller et al., 2011) و برای ایجاد مقاومت به بیماری سوختگی باکتریایی در گیاه برنج (Li et al., 2012) از TALEN استفاده شده است. این مازول‌های متصل‌شونده به DNA (ZFN و TALEN) را می‌توان با افکتورهای مختلف مانند ریکامبینازها، ترانسپوزازها، متیل ترانسفرازها، استیل ترانسفرازها و فعال‌کننده‌ها و سرکوب‌کنندگان رونویسی ترکیب کرد تا ساختار و عملکرد ژنوم را تحت‌تأثیر قرار دهند (Dymond et al., 2011; Frangoul et al., 2021; Gaj et al., 2011; Gaj et al., 2013).

روش تکرارهای کوتاه متقارن فاصله‌دار وابسته به پروتئین Cas (CRISPR/Cas)

در اواخر دهه ۱۹۸۰، در ژنوم باکتری اشرشیا کلی (*E. coli*) توالی‌های تکراری ۲۹ نوکلئوتیدی مشاهده شدند که توسط توالی‌های غیر تکراری فاصله دهنده که ۳۲ نوکلئوتید داشتند، از هم جدا شده بودند (شکل ۵) (Yao et al., 2018). در سال ۲۰۱۱ جنیفر دودنا^{۳۶} و امانوئل چارپنتیئر^{۳۷} نشان دادند که چگونه می‌توان با استفاده از پروتئین Cas9 مرتبط با CRISPR، در دو رشته

۱. Gene gun
۲. Microinjection
۳. Electroporation
۴. Adenoviruses
۵. Baculovirus
۶. Liposomes
۷. Polyethylene glycol
۱. Neurotrophin 3
۲. Jennifer A. Doudna
۳. Emmanuelle Charpentier

DNA هدف برش ایجاد کرد (Jinek et al., 2012) که این کشف موجب تحقیقات زیادی در زمینه درمان بیماری‌های ژنتیکی شد.



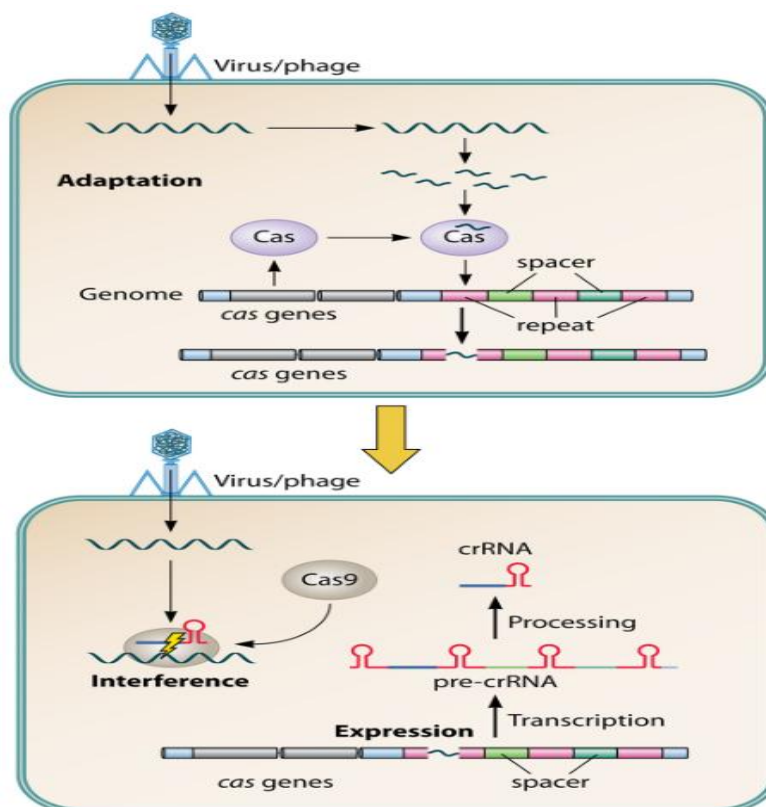
شکل ۵. ساختار CRISPR کشف شده در اولین باکتری و آرکی. توالی‌های تکراری عموماً دارای طول ثابت و متقارن هستند تا ساختار پالیندرومیک را تشکیل دهند. نواحی ثابت دارای طول ثابتی هستند اما در توالی آن‌ها همولوژی وجود ندارد (Ishino et al., 2018)

Figure 5. Structure of CRISPR discovered in the first bacteria and archaea. Repeated sequences are generally of constant length and symmetrical to form a palindromic structure. Constant regions are of fixed length, but there is no homology in their sequence (Ishino et al., 2018)

سیستم CRISPR/Cas یک سیستم دفاعی محسوب می‌شود و دارای سه مرحله انطباق^{۳۸}، بیان^{۳۹} و مداخله^{۴۰} است؛ بدین صورت که باکتری‌ها یا آرکی‌ها ابتدا با وارد کردن توالی کوتاهی از ژنوم ویروس یا پلاسمید مهاجم به جایگاه CRISPR، یک حافظه سلولی به دست می‌آورند. از این فاصله‌اندازها، نوعی RNA به نام crRNA رونویسی می‌شود که می‌تواند با کمک پروتئین Cas، توالی فاژ مهاجم را شناسایی کند و برش بزند. پس از رونویسی از توالی CRISPR، یک قطعه RNA طولی به نام pre-crRNA ایجاد می‌شود که با ژنوم مهاجم همولوژی دارد. سپس RNA دیگری به نام tracrRNA در بالادست CRISPR

۱. Adaptation
۲. Expression
۳. Interference

رونویسی می‌شود که مکمل توالی‌های تکراری CRISPR است و با متصل شدن به pre-crRNA یک RNA دو رشته‌ای ایجاد می‌کند. این RNA دو رشته‌ای توسط RNase III برش می‌خورد و به مجموعه crRNA:tracrRNA یا همان RNA راهنما (sgRNA) تبدیل می‌شود که دارای حدوداً ۲۰ نوکلئوتید است. این مجموعه با پیوستن به پروتئین Cas9 به DNA هدف متصل می‌شود (Thurtle - Schmidt & Lo, 2018). اختصاصیت و شناسایی DNA مهاجم در باکتری *Streptococcus pyogenes* توسط توالی سه نوکلئوتیدی (NGG) به نام PAM^۴ در انتهای ۳ ژنوم مهاجم انجام می‌شود (Gasiunas et al., 2012); اگر PAM مکمل RNA راهنما باشد، هیبرید DNA-RNA تشکیل می‌شود. پروتئین Cas9 یک اندونوکلاز طبیعی به صورت تک واحدی است که دو رشته DNA را می‌شکند و یک انتهای صاف ایجاد می‌کند. این رشته شکسته شده در نهایت تخریب و تجزیه می‌شود (شکل ۶) (Thurtle - Schmidt & Lo, 2018). با ایجاد جهش در دُمین‌های Cas9، سیستم Nickase CRISPR/Cas و Dead Cas (dCas) ایجاد شده است. مجموعه dCas9 قادر است ویرایش اپی ژنوم (متیلاسیون و استیلاسیون) را با کمک پروتئین‌های اصلاح‌کننده هیستون انجام دهد و می‌تواند به طور اختصاصی در رونویسی، اتصال RNA پلیماز و یا اتصال دیگر عوامل رونویسی اختلال ایجاد کند (Liu et al., 2016; Qi et al., 2013) از دیگر کاربردهای CRISPR/Cas می‌توان به تصویربرداری فلورسنت، ویرایش بازاها، ردیابی RNA و شناسایی بیماری‌ها و جهش‌ها، بازآرایی ژنوم و... اشاره کرد (Komor et al., 2016). در گذر زمان انتخاب طبیعی بر تکامل سیستم‌های CRISPR/Cas نیز اثر گذاشته؛ در تحقیقی نشان می‌دهد که بر اساس رابطه تکاملی لوکوس‌های CRISPR و ژن‌های Cas، و اینکه چند پروتئین Cas در برش رشته هدف نقش دارند، این سیستم‌ها را به دو کلاس طبقه‌بندی می‌شوند (Hillary & Ceasar, 2023). از مزیت‌های سیستم کریسپر می‌توان به سادگی طراحی، هزینه کم، دقت و کارایی بالای آن اشاره کرد؛ به‌گونه‌ای که با طراحی چند grNA می‌توان با یک پروتئین Cas چندین نقطه ویرایش ژنوم انجام داد. از معایب این سیستم می‌توان به اثرات خارج از هدف (off target) و وزن مولکولی بالای مجموعه اشاره کرد (Hadipour et al., 2023). از فناوری ویرایش ژنوم برای درمان بیماری‌های مرتبط با جهش در ژنوم از طریق جایگزینی آن‌ها با ژن سالم و طبیعی استفاده می‌شود. از CRISPR برای درمان بیماری داسی‌شکل و بتا تالاسمی که دو بیماری تک ژنی هستند، (Frangoul et al., 2021) استفاده شده است. با شیوع بیماری COVID-19، در مطالعه‌ای از نوعی پروتئین Cas جهت تشخیص سریع این بیماری از عصاره RNA در پنبه آغشته به بزاق افراد استفاده کردند (Broughton et al., 2020). از این نوکلئاز برای اصلاح ژن *CsLOB1* جهت ایجاد مقاومت به بیماری شانکر مرکبات استفاده شده است (Peng et al., 2017). در صنعت برای بهینه‌سازی مسیرهای متابولیکی و تولید ایزوپنتانول از CRISPR\Cas استفاده است (Siripong et al., 2020).



شکل ۶. نقش CRISPR/Cas در فرایند ایجاد ایمنی اکتسابی. در مرحله انطباق (بالا) DNA مهاجم توسط Cas شناخته شده و پس از قطعه قطعه شدن در ژنوم میزبان جای می‌گیرد. در مرحله بیان (پایین)، pre-crRNA از CRISPR رونویسی می‌شود، به crRNA بالغ تبدیل می‌شود و در نهایت در مرحله تداخل (پایین) کمپلکس CRISPR/Cas دو رشته DNA را برش می‌زند (Ishino et al., 2018)

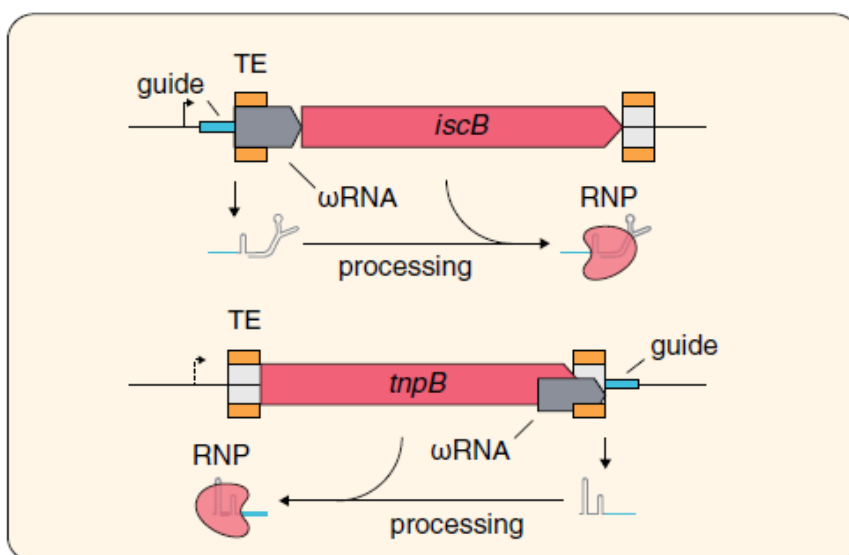
Figure 6. The role of CRISPR/Cas in the process of acquired immune system. In the adaptation phase (top), the invading DNA is recognized by Cas and after fragmentation, it is inserted into the host genome. In the expression step (bottom), pre-crRNA from CRISPR is transcribed, converted to mature crRNA, and finally, in the interference step (bottom), the CRISPR/Cas complex cuts the two DNA strands (Ishino et al., 2018)

روش انتقال سازه حاوی gRNA و تأیید ویرایش انجام شده

سازه CRISPR را می‌توان به صورت DNA، mRNA یا ریونوکلوپروتئین، بسته به نوع آن با روش‌های انتقال مستقیم، فیزیکی، ناقل‌های ویروسی و ناقل‌های غیر ویروسی به سلول هدف منتقل نمود (Yin et al., 2016). بسته به نوع ویرایش ژن، می‌توان با استفاده از روش‌های مختلف مانند انجام PCR و توالی‌یابی قطعه موردنظر از صحت ویرایش ژن مطمئن شد (Peng et al., 2017).

فناوری ویرایش Fanzor

سیستم ویرایش ژنومی هدایت شده با RNA راهنما که از طریق مکملی بازهای بین RNA راهنما و توالی هدف برای شناسایی عناصر ژنتیکی و اتصال به آن استفاده می‌کند، نقش اساسی در فرایندهای بیولوژیکی در موجود زنده دارد. به‌عنوان مثال سیستم CRISPR/Cas در پروکاریوت، یک سیستم ایمنی برای باکتری در برابر عناصر ژنتیکی خارجی مهیا می‌کند که افکتورهای Cas مانند Cas9 و Cas12 با خاصیت نوکلئازی خود، DNA را برش می‌دهند (Badon et al., 2024, Hille et al., 2018). مطالعات اخیر سیستم OMEGA⁴² را در پروکاریوت‌ها شناسایی و معرفی کرده‌اند که این سیستم هدایت شده با RNA راهنما، پروتئین‌های اندونوکلئازی (پروتئین‌های TnpB، IscB یا IsrB) و یک RNA غیرکدکننده (که ωRNA نامیده می‌شود) که نقش RNA راهنما را ایفا می‌کند را شامل می‌شود و نحوه عمل آن مشابه سیستم CRISPR/Cas می‌باشد (Altae-Tran et al., 2021). از این‌رو، تیم تحقیقاتی فنگ ژانگ سیستم OMEGA را به لحاظ تکاملی، منشأ سیستم CRISPR/Cas می‌دانند (Saito et al., 2023).



شکل ۷. ساختار OMEGA کشف شده در اولین باکتری. سیستم OMEGA لوکوس‌های ژنی خود را به دنباله توالی هدف منتقل می‌کند و به همراه توالی هدف آن را به ωRNA تبدیل می‌کند (Altae-Tran et al., 2021)

Figure 7. Structure of OMEGA discovered in the first bacteria. The OMEGA system transfers its gene loci to the sequence of the target sequence and converts it to ωRNA together with the target sequence (Altae-Tran et al., 2021)

پروتئین Fanzor برای اولین بار در سال ۲۰۱۳ گزارش شد که یک پروتئین یوکاریوتی Tnpb-IS200/IS605 است که در عناصر قابل انتقال (Transposoe) کدگذاری می‌شود و فعالیت این عناصر قابل انتقال را تنظیم می‌کند (Bao and Jurka, 2013). این پروتئین یوکاریوتی با افکتور TnpB پروکاریوتی همولوژی دارد و همانند سیستم OMEGA فعالیت می‌کند. بنابراین می‌توان گفت که سیستم Fanzor (Fz) نوع یوکاریوتی سیستم‌های CRISPR/Cas و OMEGA است. با مطالعات فیلوژنیک، بیوشیمیایی و ساختاری پروتئین Fz، توانسته‌اند با برنامه‌ریزی مجدد فعالیت آنزیمی و مکانیسم عمل آن، برای ویرایش ژنوم انسان استفاده کنند (Saito et al., 2023). یافته‌های حاصل از مطالعه یوکاریوت‌ها حاکی از آن است که پروتئین‌های Fz در دو شاخه Fz1 و Fz2 تقسیم می‌شوند. پروتئین‌های Fz1 به طور گسترده‌ای در قارچ‌ها، به‌ویژه گونه‌های *incertae sedis* به وفور یافت می‌شوند. اگرچه در آغازیان، گیاهان، بندپایان و ویروس‌های یوکاریوتی نیز یافت می‌شود. پروتئین Fz2 عمدتاً در قارچ‌ها و تعداد کمی در تاژک‌داران، و ویروس‌های یوکاریوتی یافت می‌شود (Bao and Jurka, 2013). پروتئین Fz دارای دُمین‌هایی است که از مهم‌ترین آن‌ها دُمین WED و REC هستند که ناحیه TAM⁴³ در توالی DNA هدف را شناسایی می‌کنند و به آن متصل می‌شوند. ناحیه TAM توالی ۴ تا ۸ نوکلئوتیدی است که اگر TAM مکمل ωRNA باشد، Fz به آن متصل می‌شود و هیبرید DNA-RNA تشکیل می‌شود. دُمین RuvC با خاصیت نوکلئازی خود سبب ایجاد برش DNA توسط این پروتئین می‌شود. پروتئین Fz در نواحی ترانسپوزونی کد می‌شود که شامل یک ORF است که توسط نواحی حفاظت شده IR در سمت انتهایی ۵' (حدوداً ۳۰ نوکلئوتید) احاطه شده است. علاوه بر این، دو نوکلئوتید CA نیز در بالادست انتهایی ۵' آن‌ها به‌صورت حفاظت شده وجود دارد. این ناحیه کدکننده حدود ۵۵۰ نوکلئوتید حفاظت شده دارد. همچنین بین ناحیه IR در جهت ۳' و کدون پایان بین ۷۵ تا ۹۰ نوکلئوتید وجود دارد که به‌صورت RNA غیرکدکننده در می‌آیند. حدود ۷۵ نوکلئوتید این RNA غیرکدکننده که حفاظت شده در هر خانواده Fz است، با ایجاد ساختارهای ثانویه حلقه مانند، نقش داربست^{۴۴} (همانند tracrRNA در سیستم CRISPR/Cas) را ایفا می‌کند و حدود ۱۵ نوکلئوتید پس از آن که متغییر است و حفاظت شده نیست، نقش RNA راهنما (gRNA) دارد. این مجموعه را ωRNA می‌نامند. به این صورت، پروتئین Fz به همراه ωRNA ناحیه TAM را شناسایی و به آن متصل می‌شود و از طریق ایجاد هیبرید DNA-RNA در نوکلئوتید ۱۴-۱۷ در رشته غیرهدف (غیرمکمل) و در نوکلئوتید ۹-۲۰ در رشته هدف (رشته مکمل) بسته به نوع Fz برش دو رشته ایجاد می‌شود و انتهایی ۳' یا ۵' چسبان و یا انتهایی صاف ایجاد خواهد شد (Saito et al., 2023). با طراحی RNA راهنما که در ادامه ناحیه کد شونده پروتئین Fz قرار دارد، دانشمندان توانسته‌اند در شرایط آزمایشگاهی ژنوم انسان را با استفاده از این سیستم مورد ویرایش قرار دهند (Saito et al., 2023). مهم‌ترین مزیت این روش ویرایش ژنومی این است که این سیستم یوکاریوتی می‌باشد. پروتئین‌های Fz قابلیت حذف تک نوکلئوتید را دارند، این امر، دقت بالای این سیستم را بیان می‌کند. همچنین، از آنجایی که ناحیه TAM در این سیستم توالی بین ۴ تا ۸ نوکلئوتیدی است، انتظار می‌رود اثرات خارج

۱. Target-Adjacent Motif

۲. Scaffold

هدف بسیار کمتری داشته باشد. از طرفی، این پروتئین‌های کوچک، با وزن مولکولی پایین (حدوداً نصف پروتئین‌های Cas) امکان دست‌ورزی و مهندسی آن را ساده‌تر کرده است (Badon et al., 2024). با توجه به نوظهور بودن این سیستم، انجام مطالعات و ارزیابی‌های بیشتر ضروری است تا مزایا و محدودیت‌های آن به طور جامع شناسایی شود.

نتایج و بحث

تکنولوژی ویرایش ژن و ژنومی نقش ارزشمندی در رفع نیازهای انسان بویژه، ارتقا کیفیت زندگی، کاهش فشار وارد بر منابع طبیعی و پاسخگویی به چالش‌های بزرگ جامعه (مانند فراهم کردن دارو، واکسن، مبارزه با بیماری‌ها، فراهم کردن غذای ایمن و استفاده از انرژی تجدیدپذیر در صنعت) را ایفا کرده و توانسته است به صورت مستقیم و غیرمستقیم اقتصاد جامعه را تحت تأثیر قرار دهد. گسترش بازار ویرایش ژنی به دلیل رقابت بین شرکت‌ها برای توسعه درمان و محصولات نوآورانه است. بازار ویرایش ژن و ژنومی بر اساس محصول، کاربرد و خدمات تا سال ۲۰۲۳ در حدود ۸ میلیارد دلار بوده، پیش‌بینی‌ها نشان می‌دهد که تا سال ۲۰۳۲ با نرخ رشد مرکب سالانه ۱۸/۱ درصدی به بیش از ۳۶ میلیارد دلار خواهد رسید (MarketResearch, 2022). گرچه انتقال CRISPR/Cas به موجود زنده و استفاده از آن در سلول‌های زایشی در انسان بحث و چالش‌های بزرگی را از لحاظ ایمنی و اخلاقی فراهم کرده است، اما کشف آن انقلابی در زمینه ویرایش ژنوم ایجاد کرد که منجر به تحقیقات و آزمایش‌های بسیاری در زمینه‌های مختلف شد. به عنوان مثال در سال ۲۰۱۶ یک تیم تحقیقاتی چینی برای نخستین بار با خاموش کردن ژن کد کننده پروتئین PD-1 در انسان، موفق شدند ایمنی موثری را در برابر سرطان ریه به وجود آورند (Cyranoski et al. 2016). درخواست‌ها و پرونده‌های مالکیت معنوی مرتبط با CRISPR نیز در حال افزایش است. برای استفاده از این فناوری در درمان‌های بالینی بیماری‌ها به تحقیقات بیشتر نیازمند است تا واکنش سیستم ایمنی انسان را به طور دقیق هنگام ورود این عناصر خارجی به سلول دریابیم. با توجه به این چالش‌ها در حال حاضر پرکاربردترین و دقیق‌ترین ابزار ویرایش ژنوم TALEN شناخته می‌شود (Khalil, 2020). چالش‌های زیادی در استفاده از اندونوکلازها وجود دارد که برخی مزایا و ویژگی‌های آن‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است. مهم‌ترین چالش در استفاده از سیستم CRISPR/Cas، اثرات خارج از هدف است که با کشف انواع مختلف پروتئین Cas و کنترل فعالیت آنزیمی قابل رفع است. کنترل فعالیت آنزیم از طریق روش‌های شیمیایی (مانند انتقال آنزیم به هسته و نحوه تاخوردگی پروتئین جهت کاهش زمان تحریک شیمیایی و فعالیت آنزیم)، فتوشیمیایی (استفاده از پروتئین‌های حساس به نور طبیعی یا ماورابنفش جهت فعال کردن فعالیت نوکلئازها و ... می‌تواند صورت گیرد (Matsumoto & Nomura, 2023; Chou & Deiters, 2011). از دیگر چالش‌های موجود انتخاب روشی ساده و کارآمد جهت انتقال ژن و کمپلکس‌های پروتئینی به سلول است. فرایند انتقال سازه‌های بزرگ به دلیل موانعی مانند غشا سلولی، پروتئازها و نوکلئازهای سلول میزبان می‌تواند به دشواری صورت گیرد (Khalil, 2020).

جدول ۱. مقایسه روش‌های مهم ویرایش ژنی و ژنومی

Table 1. Comparison of important methods of gene and genomic editing

References	CRISPR/Cas	TALEN	ZFN	
(Khalil, 2020)	22 bp + PAM	28 – 40 bp	18 – 36 bp	طول DNA هدف Length of target DNA
(Khalil, 2020; Randhawa & Sengar, 2021)	نیاز به PAM در توالی هدف Requirement of PAM in the target sequence	نیاز به 5'T و 3'A در توالی هدف Requirement of 5'T and 3'A in the targeted sequence	نیاز به سایت‌های دارای G بالا Need for G-rich sites	محدودیت هدف‌گذاری Targeting limitations
(Randhawa & Sengar, 2021)	نسبتاً آسان، نیازمند به کیت حاوی پلاسمید Cas9 و sgRNA Relatively easy, requires kit containing Cas9 plasmid and sgRNA	ساده‌تر از ZFN، پیچیده‌تر نسبت به CRISPR Simpler than ZFN, More complex than CRISPR	پیچیده، مونتاژ آرایه‌ها می‌تواند اختصاصیت اتصال آرایه مجاور را تغییر دهد. Complicated, Array assembly could alter binding specificity of adjacent ZFN motif	طراحی Design
(Randhawa & Sengar, 2021)	وکتورهای بیانی Cas9 به طور گسترده در دسترس هستند Cas9 expression vectors are widely available	با استفاده از روش Golden Gate assembly نیاز به متصل کردن موتیف‌های چندگانه نیست Using the Golden Gate assembly method, there is no need to linkage separate individual motifs	نیاز به اتصال موتیف‌های ZF Requirement to linkage of ZF motifs	Cloning
(Randhawa & Sengar, 2021)	ساده‌تر از TALEN، پیچیده‌تر نسبت به ZFN Simpler than TALEN, more complex than ZFN	نسبتاً دشوار به دلیل بزرگ بودن سازه Relatively difficult due to the large size of the structure	نسبتاً ساده به دلیل کوچک بودن سازه Relatively simple due to the small size of the structure	سهولت در انتقال Ease of delivery
(Chen et al., 2011)	1-3	5-7	5-7	زمان ساخت (روز) Time for construction (days)
(Randhawa & Sengar, 2021)	مقرون به صرفه Cost effective	ارزان‌تر از ZFN، اما مقرون به صرفه نیست Cheaper than ZFN but Not cost effective	بالا Expensive	هزینه Cost effectiveness
(Khalil, 2020)	~90%	~99%	~24%	نرخ موفقیت Success rate

در خاتمه این مقاله می‌توان فناوریهای ویرایش ژنی بویژه کریسپر را به جعبه ابزاری تشبیه نمود که برای توسعه کشورها بسیار موثر است. پیش‌بینی می‌شود از این روش‌ها جهت شناسایی مکانیسم توسعه و پیشرفت بیماری‌ها و در نهایت ارائه راه‌های درمانی جدید، بهبود گیاهان از لحاظ کمیت، کیفیت، عملکرد، شناسایی مکانیسم تمایز سلولی و تبدیل سلول‌های بنیادی به

سلول‌های تمایز یافته (عصبی، خونی یا ماهیچه‌ای)، ذخیره‌سازی اطلاعات ژنتیکی، ایجاد مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی و کمک به حفظ تنوع ژنتیکی و حتی ذخیره‌سازی داده‌های دیجیتالی، تصاویر و فیلم‌ها در موجودات زنده استفاده شود. لازم به ذکر است که اگر بتوانیم به موقع بر قطار فناوری‌های ویرایش ژن و ژنومی (مخصوصاً کریسپر) سوار شویم می‌توانیم از مواهب آن بهره‌مند شده و زمینه توسعه همه جانبه کشور عزیزمان ایران را در زمینه‌های مختلف (پزشکی، کشاورزی، صنعتی و...) فراهم نماییم و اگر جا بمانیم، بعداً باید دنبال این فناوری بدویم که شاید هم به آن نرسیم و خیلی دیر شده باشد. به تصمیم سازان، تصمیم گیران و مجریان توصیه موکد می‌شود (قبل از آنکه خیلی زود، یر شود) با برنامه ریزی دقیق برای بهره برداری مفید و موثر از این فناوری نوظهور اقدام نمایند.

سپاسگزاری: از داوران محترم به خاطر مطالعه متن مقاله حاضر و ارائه نظرهای ساختاری، علمی و ارزشمند سپاسگزاری

می‌شود.

References

- Abdallah, N. A., Prakash, C. S., & McHughen, A. G. (2015). Genome editing for crop improvement: challenges and opportunities. *GM Crops & Food*, 6(4), 183-205. <https://doi.org/10.1080/21645698.2015.1129937>
- Adli, M. (2018). The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nature communications*, 9(1), 1911. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04252-2>
- Akopian, A., & Stark, W. M. (2005). Site-specific DNA recombinases as instruments for genomic surgery. *Advances in Genetics*, 55, 1-23. [https://doi.org/10.1016/S0065-2660\(05\)55001-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2660(05)55001-6)
- Altae-Tran H, Kannan S, Demircioglu F.E., Oshiro R., Nety S.P., McKay L.J., Dlakić M, Inskip W.P., Makarova K.S., Macrae R.K., Koonin E.V., Zhang F. (2021). The widespread IS200/IS605 transposon family encodes diverse programmable RNA-guided endonucleases. *Science*, 374(6563), 57-65. <https://doi.org/10.1126/science.abj6856>
- Arnould, S., Delenda, C., Grizot, S., Desseaux, C., Paques, F., Silva, G. H., & Smith, J. (2011). The I-CreI meganuclease and its engineered derivatives: applications from cell modification to gene therapy. *Protein Engineering, Design & Selection*, 24(1-2), 27-31. <https://doi.org/10.1093/protein/gzq083>
- Badon I.W., Oh Y., Kim H.J., & Lee S.H. (2024). Recent application of CRISPR-Cas12 and OMEGA system for genome editing. *Molecular Therapy* 3;32(1). 32-43. <https://doi.org/10.1016/j.yymthe.2023.11.013>.
- Bao W., Jurka J. (2013). Homologues of bacterial TnpB_IS605 are widespread in diverse eukaryotic transposable elements. *Mob DNA*, 4(1), 12. <https://doi.org/10.1186/1759-8753-4-12>
- Becker, S., & Boch, J. (2021). TALE and TALEN genome editing technologies. *Gene and Genome Editing*, 2, 100007. <https://doi.org/10.1016/j.ggedit.2021.100007>
- Bhardwaj, A., & Nain, V. (2021). TALENs—an indispensable tool in the era of CRISPR: a mini review. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00225-z>

- Broughton, J. P., Deng, X., Yu, G., Fasching, C. L., Servellita, V., Singh, J., ... & Chiu, C. Y. (2020). CRISPR–Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nature biotechnology*, 38(7), 870-874. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0513-4>
- Carroll, D. (2011). Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics*, 188(4), 773-782. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.131433>
- Carroll, D., Morton, J. J., Beumer, K. J., & Segal, D. J. (2006). Design, construction and in vitro testing of zinc finger nucleases. *Nature protocols*, 1(3), 1329-1341. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.231>
- Cermak, T., Doyle, E. L., Christian, M., Wang, L., Zhang, Y., Schmidt, C., ... & Voytas, D. F. (2011). Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic acids Research*, 39(12), e82-e82. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr218>
- Chen, F., Pruett-Miller, S. M., Huang, Y., Gjoka, M., Duda, K., Taunton, J., ... & Davis, G. D. (2011). High-frequency genome editing using ssDNA oligonucleotides with zinc-finger nucleases. *Nature methods*, 8(9), 753-755. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1653>
- Chen, K., & Gao, C. (2014). Targeted genome modification technologies and their applications in crop improvements. *Plant cell reports*, 33, 575-583. <https://doi.org/10.1007/s00299-013-1539-6>
- Chiang, T. W. W., Le Sage, C., Larrieu, D., Demir, M., & Jackson, S. P. (2016). CRISPR-Cas9D10A nickase-based genotypic and phenotypic screening to enhance genome editing. *Scientific reports*, 6(1), 24356. <https://doi.org/10.1038/srep24356>
- Chou, C., & Deiters, A. (2011). Light-activated gene editing with a photocaged zinc-finger nuclease. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 50(30), 6839. <https://doi.org/10.1002/anie.201101157>
- Dymond, J. S., Richardson, S. M., Coombes, C. E., Babatz, T., Muller, H., Annaluru, N., ... & Boeke, J. D. (2011). Synthetic chromosome arms function in yeast and generate phenotypic diversity by design. *Nature*, 477(7365), 471-476. <https://doi.org/10.1038/nature10403>
- Frangoul, H., Ho, T. W., & Corbacioglu, S. (2021). CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and β -Thalassemia. Reply. *The New England Journal of Medicine*, 384(23), e91-e91. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2031054>
- Gaj, T., Mercer, A. C., Gersbach, C. A., Gordley, R. M., & Barbas III, C. F. (2011). Structure-guided reprogramming of serine recombinase DNA sequence specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(2), 498-503. <https://doi.org/10.1073/pnas.1014214108>
- Gaj, T., Mercer, A. C., Sirk, S. J., Smith, H. L., & Barbas III, C. F. (2013). A comprehensive approach to zinc-finger recombinase customization enables genomic targeting in human cells. *Nucleic acids research*, 41(6), 3937-3946. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt071>
- Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., & Siksnys, V. (2012). Cas9–crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(39), E2579-E2586. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208507109>
- Hadipour, K., Asadishad, T., Mahya, L., Mohammadhassan, R., Rahbar, A., & Goudarziasl, F. (2023). A Comparative Review on Genome Editing Approaches. <https://doi.org/10.33263/BRIAC136.567>

- Herrmann, F., Garriga-Canut, M., Baumstark, R., Fajardo-Sanchez, E., Cotterell, J., Minoche, A., ... & Isalan, M. (2011). p53 Gene repair with zinc finger nucleases optimised by yeast 1-hybrid and validated by Solexa sequencing. *PloS one*, 6(6), e20913. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020913>
- Hillary, V. E., & Ceasar, S. A. (2023). A review on the mechanism and applications of CRISPR/Cas9/Cas12/Cas13/Cas14 proteins utilized for genome engineering. *Molecular Biotechnology*, 65(3), 311-325. <https://doi.org/10.1007/s12033-022-00567-0>
- Hille, F., Richter, H., Wong, S. P., Bratovič, M., Ressel, S., Charpentier, E. (2018). The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward. *Cell*, 172(6), 1239-1259. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.032>
- Huang, C., Li, Q., & Li, J. (2022). Site-specific genome editing in treatment of inherited diseases: possibility, progress, and perspectives. *Medical Review*, 2(5), 471-500. <https://doi.org/10.1515/mr-2022-0029>
- Ishino, Y., Krupovic, M., & Forterre, P. (2018). History of CRISPR-Cas from encounter with a mysterious repeated sequence to genome editing technology. *Journal of bacteriology*, 200(7), 10-1128. <https://doi.org/10.1128/jb.00580-17>
- Javaran, M. J. (1999). *Analysis of glutamine synthetase during leaf senescence of Brassica napus* (Doctoral dissertation, Imperial College London (University of London)). <https://doi.org/10.22099/iar.2001.4302>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *science*, 337(6096), 816-821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Karow, M., & Calos, M. P. (2011). The therapeutic potential of phiC31 integrase as a gene therapy system. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 11(10), 1287-1296. <https://doi.org/10.1517/14712598.2011.601293>
- Khalil, A. M. (2020). The genome editing revolution. *Journal of genetic engineering and biotechnology*, 18(1), 68. <https://doi.org/10.1186/s43141-020-00078-y>
- Kim, J. S. (2016). Genome editing comes of age. *Nature protocols*, 11(9), 1573-1578. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.104>
- Komor, A. C., Kim, Y. B., Packer, M. S., Zuris, J. A., & Liu, D. R. (2016). Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 533(7603), 420-424. <https://doi.org/10.1038/nature17946>
- Kostriken, R., Strathern, J. N., Klar, A. J., Hicks, J. B., & Heffron, F. (1983). A site-specific endonuclease essential for mating-type switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell*, 35(1), 167-174. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90219-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90219-2)
- Li, H., Yang, Y., Hong, W., Huang, M., Wu, M., & Zhao, X. (2020). Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects. *Signal transduction and targeted therapy*, 5(1), 1. <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0089-y>
- Li, T., Liu, B., Spalding, M. H., Weeks, D. P., & Yang, B. (2012). High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nature biotechnology*, 30(5), 390-392. <https://doi.org/10.1038/nbt.2199>

- Lino, C. A., Harper, J. C., Carney, J. P., & Timlin, J. A. (2018). Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. *Drug delivery*, 25(1), 1234-1257. <https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1474964>
- Liu, X. S., Wu, H., Ji, X., Stelzer, Y., Wu, X., Czauderna, S., ... & Jaenisch, R. (2016). Editing DNA methylation in the mammalian genome. *Cell*, 167(1), 233-247. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.056>
- Maeder, M. L., Thibodeau-Beganny, S., Osiak, A., Wright, D. A., Anthony, R. M., Eichtinger, M., ... & Joung, J. K. (2008). Rapid “open-source” engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification. *Molecular cell*, 31(2), 294-301. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.06.016>
- MarketResearch (2022). Gene Editing Market. Available at: <https://marketresearch.biz/report/gene-editing-market>. Published date: Feb 2022
- Matsumoto, D., & Nomura, W. (2023). The history of genome editing: advances from the interface of chemistry & biology. *Chemical Communications*, 59(50), 7676-7684. <https://doi.org/10.1039/D3CC00559C>
- Miller, J. C., Tan, S., Qiao, G., Barlow, K. A., Wang, J., Xia, D. F., ... & Rebar, E. J. (2011). A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nature biotechnology*, 29(2), 143-148. <https://doi.org/10.1038/nbt.1755>
- Napoli, C., Lemieux, C., & Jorgensen, R. (1990). Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *The plant cell*, 2(4), 279-289. <https://doi.org/10.1105/tpc.2.4.279>
- Nidhi, S., et al., *Novel CRISPR–Cas Systems: An Updated Review of the Current Achievements, Applications, and Future Research Perspectives*. International Journal of Molecular Sciences, 2021. 22(7): p. 3327 <https://doi.org/10.3390/ijms22073327>
- Olorunniji, F. J., Rosser, S. J., & Stark, W. M. (2016). Site-specific recombinases: molecular machines for the Genetic Revolution. *Biochemical Journal*, 473(6), 673-684. <https://doi.org/10.1042/BJ20151112>
- Peng, A., Chen, S., Lei, T., Xu, L., He, Y., Wu, L., ... & Zou, X. (2017). Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene Cs LOB 1 promoter in citrus. *Plant biotechnology journal*, 15(12), 1509-1519. <https://doi.org/10.1111/pbi.12733>
- Petersen, B., & Niemann, H. (2015). Advances in genetic modification of farm animals using zinc-finger nucleases (ZFN). *Chromosome Research*, 23(1), 7-15. <https://doi.org/10.1007/s10577-014-9451-7>
- Popplewell, L., Koo, T., Leclerc, X., Duclert, A., Mamchaoui, K., Gouble, A., ... & Dickson, G. (2013). Gene correction of a duchenne muscular dystrophy mutation by meganuclease-enhanced exon knock-in. *Human gene therapy*, 24(7), 692-701. <https://doi.org/10.1089/hum.2013.081>
- Qi, L. S., Larson, M. H., Gilbert, L. A., Doudna, J. A., Weissman, J. S., Arkin, A. P., & Lim, W. A. (2013). Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 152(5), 1173-1183. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.022>
- Randhawa, S., & Sengar, S. (2021). The evolution and history of gene editing technologies. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 178, 1-62. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2021.01.002>

- Reyon, D., Tsai, S. Q., Khayter, C., Foden, J. A., Sander, J. D., & Joung, J. K. (2012). FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. *Nature biotechnology*, 30(5), 460-465. <https://doi.org/10.1038/nbt.2170>
- Saito M., Xu P., Faure G., Maguire S., Kannan S., Altae-Tran H., Vo S., Desimone A., Macrae R.K., Zhang F. (2023). Fanzor is a eukaryotic programmable RNA-guided endonuclease. *Nature*, 620(7974), 660-668. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06356-2>
- Samanta, M. K., Dey, A., & Gayen, S. (2016). CRISPR/Cas9: an advanced tool for editing plant genomes. *Transgenic research*, 25, 561-573. <https://doi.org/10.1007/s11248-016-9953-5>
- Sander, J. D., Dahlborg, E. J., Goodwin, M. J., Cade, L., Zhang, F., Cifuentes, D., ... & Joung, J. K. (2011). Selection-free zinc-finger-nuclease engineering by context-dependent assembly (CoDA). *Nature methods*, 8(1), 67-69. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1542>
- Schmid-Burgk, J. L., Schmidt, T., Kaiser, V., Höning, K., & Hornung, V. (2013). A ligation-independent cloning technique for high-throughput assembly of transcription activator-like effector genes. *Nature biotechnology*, 31(1), 76-81. <https://doi.org/10.1038/nbt.2460>
- Siripong, W., Angela, C., Tanapongpipat, S., & Runguphan, W. (2020). Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for production of isopentanol (3-Methyl-1-butanol). *Enzyme and Microbial Technology*, 138, 109557. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109557>
- Smithies, O., Gregg, R. G., Boggs, S. S., Koralewski, M. A., & Kucherlapati, R. S. (1985). Insertion of DNA sequences into the human chromosomal β -globin locus by homologous recombination. *Nature*, 317(6034), 230-234. <https://doi.org/10.1038/317230a0>
- Tebas, P., Stein, D., Tang, W. W., Frank, I., Wang, S. Q., Lee, G., ... & June, C. H. (2014). Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *New England Journal of Medicine*, 370(10), 901-910. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1300662>
- Thurtle-Schmidt, D. M., & Lo, T. W. (2018). Molecular biology at the cutting edge: A review on CRISPR/CAS9 gene editing for undergraduates. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 46(2), 195-205. <https://doi.org/10.1002/bmb.21108>
- Tröder, S. E., & Zevnik, B. (2022). History of genome editing: From meganucleases to CRISPR. *Laboratory Animals*, 56(1), 60-68. <https://doi.org/10.1177/0023677221994613>
- Yant, S. R., Huang, Y., Akache, B., & Kay, M. A. (2007). Site-directed transposon integration in human cells. *Nucleic acids research*, 35(7), e50. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm089>
- Yao, L., Zhang, Y., Liu, C., Liu, Y., Wang, Y., Liang, D., ... & Kelliher, T. (2018). OsMATL mutation induces haploid seed formation in indica rice. *Nature plants*, 4(8), 530-533. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0193-y>
- Yin, H., Song, C. Q., Dorkin, J. R., Zhu, L. J., Li, Y., Wu, Q., ... & Anderson, D. G. (2016). Therapeutic genome editing by combined viral and non-viral delivery of CRISPR system components *in vivo*. *Nature biotechnology*, 34(3), 328-333. <https://doi.org/10.1038/nbt.3471>