مروری بر سیستم CRISPR/Cas9 بعنوان ابزار ویرایش ژنوم کارآمد در توسعه گیاهان تراریخته

شهنوش نیری[۱]، مسعود توحیدفر[۲]، عباس سعیدی[۳*]

تهران، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم و فنآوری زیستی ، گروه علوم و زیست فناوری گیاهی

تاریخ دریافت: ۹۶/۶/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۱۶

چکیده

سیستم تناوب‌های کوتاه پالیندروم فاصله‌دار منظم خوشه‌ای Cas9 (CRISPR/Cas9) یکی از روش‌های موثر و جدید ویرایش هدفمند ژنوم است که در جهت ارتقای کیفیت و عملکرد گیاهان زراعی و ایجاد صفات جدید گیاهی مورد استفاده است. سازوکار CRISPR/Cas9 بطور گسترده در ویرایش ژنوم، خاموشی ژن، کنترل فرآیند رونویسی همراه با اختصاصیت بالا و کاهش اثرات توالی‌های غیرهدف توسط برش‌های دورشته ای (DSBs) در DNA ژنومی و تغییر در توالی نوکلئوتیدی ژن هدف در بسیاری از سیستم‌های گونه‌های متنوع گیاهی و جانوری توسعه یافته است. در این مقاله مروری، جنبه‌های وسیع کاربرد سیستم CRISPR/Cas9 در ویرایش هدفمند ژنوم جهت توسعه گیاهان ویرایش ژنتیکی شده، دستیابی به تطابق محیطی و کشاورزی بیوانرژیک و ملاحظات زیست محیطی و مقبولیت جوامع بشری این سیستم را به اجمال مرور می‌شود. توسعه گیاهان زراعی ویرایش ژنتیکی (GE) به طور کامل مشابه با گیاهان زراعی اصلاحی معمول نشاندهنده کارآمدی و پایداری این محصولات در شرایط مختلف آب‌وهوایی بوده، از نظر پذیرش اجتماعی، ملاحظات زیست محیطی و سلامت انسان، تراریخته در روند آزادسازی در اولویت مصرف هستند.

واژه های کلیدی: گیاهان زراعی ویرایش ژنتیکی شده، ویرایش ژنوم گیاهی، Cas9/gRNA، CRISPR/Cas9

* نویسنده مسئول ، تلفن: ۲۹۹۰۳۲۴۴-۰۲۱ ، پست الکترونیکی: abbas.saidi@gmail.com

مقدمه

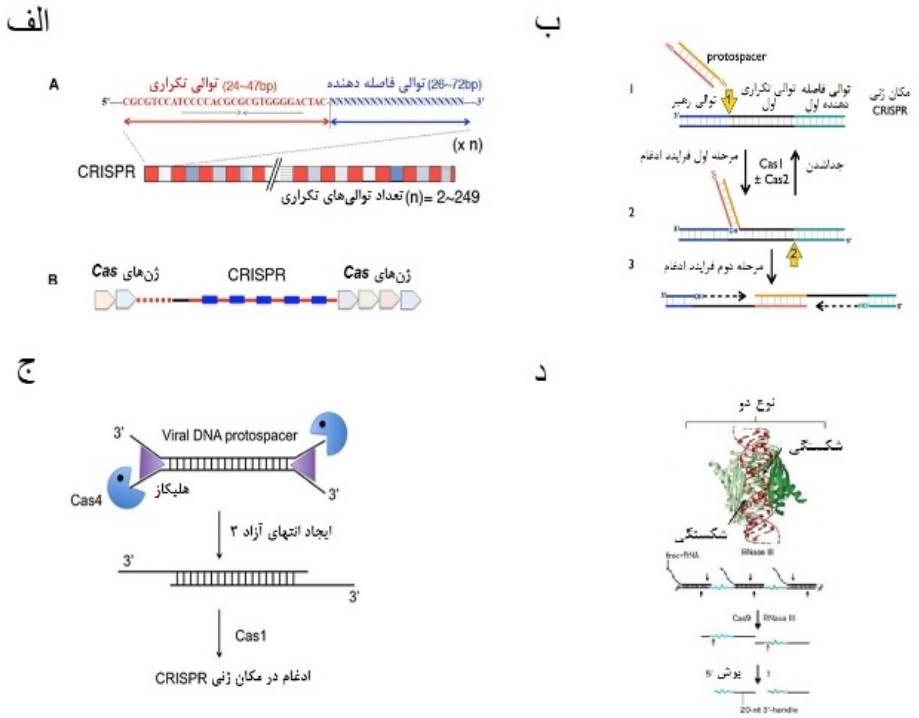
ویرایش هدفمند ژنوم با استفاده از نوکلئازهای اختصاصی پتانسیل بسیار بالایی را برای بهبود کیفیت و عملکرد گیاهان زراعی در جهت تامین نیاز غذایی مردم جهان و فراهم کردن یک سیستم کشاورزی پایدار و پرمحصول ایجاد کرده است (۵۲). در اصلاح نباتات سنتی، گیاهان زراعی توسط روش‌های معمول اصلاح نباتات، دورگ‌گیری و تلاقی‌های برگشتی و جهش اصلاح می‌شوند. در حال حاضر بدلیل اثرات انکارناپذیر اصلاح نباتات سنتی از جمله کاهش تنوع گیاهی، نبود ژرم پلاسم، نیاز به وجود گونه‌های خویشاوند و سازگار جنسی گیاه هدف، صرفه هزینه بالا و زمان‌بر بودن فرآیندهای اصلاحی، از ایرادهای این روش اصلاحی است (۶). چراکه، امروزه تولید غذا، هم از ابعاد کمی و کیفی و نیز تولیدات جدید گیاهی در کشورهای در حال توسعه و توسعه یافته، نمی‌تواند صرفا به کشاورزی سنتی متکی باشد. تامین امنیت غذایی جامعه و نیاز به افزایش مداوم تولیدات کشاورزی بستگی به مسلح شدن و در آمیختن موثر اصلاح نباتات سنتی با زیست فناوری نوین و ابزار قوی مهندسی ژنتیک دارد. مهندسی ژنتیک پیچیده‌ترین شاخه زیست فناوری است که شامل روش‌های انتخاب ژن مورد نظر، مکان‌یابی، جداسازی، خالص سازی، تکثیر و انتقال ژن‌ها و ارزیابی بروز آنها در موجود زنده است. در

حال حاضر، اهمیت و توانایی بسیار بالای مهندسی ژنتیک با ایجاد تغییر و تحول هدفمند در ژنوم گیاهان و جانوران در جهت رفع بسیاری از محدودیت‌های اصلاح نباتات سنتی، ایجاد خصوصیات جدید و بهبود کمیت و کیفیت محصولات غذایی توسط تولید گیاهان زراعی و باغی تراریخته بر کسی پوشیده نیست. اگرچه، زیست فناوری نوین به عنوان یکی از راه‌های تولید محصولاتی که کاربردهای گسترده‌ای در پزشکی، کشاورزی و صنعتی دارند، مورد قبول واقع شده است ولی در نظر گرفتن جنبه‌های ایمنی موجودات زنده اصلاح شده ژنتیکی یا تراریخته (LMO) و فرآورده‌های حاصل از آنها نیز باید قبل از استفاده دقیقا مورد بررسی قرار گیرد. از مهمترین ملاحظات تاثیرگذار در بهره‌برداری از محصولات تراریخته، دخول قطعات DNA غیر گیاهی به ژنوم گیاه والد، فرار ژن و انتقال عمودی ژن هدف، ژن‌های گزینشگر مانند ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک و علف‌کش نام برده می‌شود (۲۶، ۲۷ و ۴۷). بنابراین، نیاز به استفاده از روش‌های پیشرفته تولید گیاهان تراریخته مانند تناوب‌های کوتاه پالیندروم فاصله‌دار منظم خوشه‌ای Cas9 (CRISPR/Cas9) که نوعی روش ویرایش ژنوم است، جهت بهبود کیفیت و عملکرد موثر گیاهان زراعی با کارایی بالا بیش از پیش احساس می‌شود. به طوری که این سیستم با ایجاد جهش‌هایی در مکان‌های ژنی چندگانه و ایجاد حذف‌های بزرگ می‌تواند اصلاح گیاهان را بدون انتقال ژن خارجی شتاب دهد. این روش می‌تواند عملکرد و فعالیت ژن‌های گیاهی را بهبود بخشیده و صفات جدید ایجاد کند (۵۸). در طول ۳ سال گذشته، فرآیند این تکنیک پیشرفته به طور گسترده‌ای توسط مثال‌های متعددی از ایجاد جهش‌های هدفمند و تنظیم کنترل فرآیند نسخه‌برداری در انواع گیاهان زراعی مورد بررسی قرار گرفته است و این امر جنبه تاثیرگذار این سیستم جدید را به نمایش گذاشته است (۳۰). تاکنون سیستم Cas9 به طور گسترده در خاموشی ژن، جایگزینی ژن، ویرایش چندگانه ژن‌ها، شناسایی عملکرد ژن و در تنظیم فرآیند نسخه‌برداری در جانوران و گیاهان مورد استفاده قرار گرفته است (۳۱).

در اینجا، بر آن داریم که جنبه‌های وسیع کاربردی آنزیم نوکلئاز Cas9 در ویرایش هدفمند ژنوم گیاهان جهت توسعه گیاهان تراریخته را به صورت اجمالی مرور کنیم. در این مقاله، همچنین فرصت‌های ویرایش هدفمند ژنوم توسط سیستم Cas9/short guide (sg)RNA برای دستیابی به تطابق محیطی و کشاورزی بیوانرژیک و توسعه گیاهان تراریخته توسط این فناوری پیشرفته در موازات رفع شک و تردیدهای ایمنی زیستی، نگرانی زیست محیطی و مقبولیت جوامع بشری مورد بررسی قرار گرفته است.

مروری بر سازوکار سیستم CRISPR/Cas9 : سیستم CRISPR/Cas برای اولین بار در سال ۱۹۸۷ در ژنوم باکتری *Escherichia coli* به عنوان یک سیستم ایمنی اکتسابی در برابر هجوم باکتریوفاژها و ورود DNA خارجی مانند پلاسمیدها به درون سلول باکتری شناسایی شد و به دنبال آن در سال ۲۰۰۰ میلادی خانواده‌های ژنی CRISPR در تمام پروکاریوت‌ها شناسایی شد (۲۱ و ۳۸). بر اساس دانسته‌های برگرفته از پایگاه داده‌های CRISPRdb (http//: www.crispr.i2bc.paris-saclay.fr)، مکان ژنی CRISPR در حدود ۸۴٪ در ژنوم archaea و ۴۵٪ در ژنوم باکتری‌ها وجود دارد (۱۴). سیستم CRISPR از دو ناحیه شامل ژن‌های رمز کننده آنزیم‌های نوکلئازی Cas و مکان ژنی آرایه‌های CRISPR (CRISPR array) حاوی توالی‌های تکراری (repeat sequence) و توالی‌های فاصله دهنده (spacer sequence) مابین آنها تشکیل شده است. طول توالی‌های تکراری در حدود ۵۰–۲۵ جفت باز و به تعداد بیش از ۲۴۹ عدد و ناحیه فاصله دهنده محتوی توالی‌های غیر تکراری در حدود ۷۲–۲۶ جفت بازی است (۳۱). همچنین توالی رهبر به طول تقریبی ۵۰۰–۲۰۰ جفت باز از توالی‌های غنی از AT تشکیل شده که به عنوان یک توالی پیشبر (Promoter) برای نسخه برداری آرایه‌های مکان ژنی

CRISPR ضروری است. ژن‌های (Cas) CRISPR associated به تعداد ۴ عدد (Cas 1-4) در نزدیک ناحیه CRISPR array قرار گرفته‌اند که رمز کننده پروتئین‌های ضروری جهت القای پاسخ ایمنی توسط باکتری در برابر حمله ویروس هستند (شکل ۱(الف)) (۳۱ و ۴۵).



شکل ۱- مکان ژنی CRISPR و ژن‌های Cas بهمراه سازوکار CRISPR/Cas. الف) A) مکان ژنی CRISPR شامل توالی‌های تکراری پالیندرومیک به طول ۴۷-۲۴ جفت باز (مربع‌های قرمز) که توسط توالی فاصله دهنده به طول ۷۲-۲۶ جفت باز از هم جدا شده اند (مربع‌های آبی). بیشترین تعداد توالی‌های تکراری ۲۴۹ عدد است. B) ژن‌های پروتئین Cas در نزدیکی مکان ژنی CRISPR (۳۱ و ۴۵). ب) در مرحله اول انتهای ′۳ توالی protospacer به مکان ژنی کروموزومی CRISPR در موقعیت مابین توالی رهبر و توالی تکرار شونده اول قرار می‌گیرد. سپس یک واکنش ترانس – استریفیکاسیون (TES) (فلش زرد ۱) توسط پروتئین نوکلئاز Cas1 انجام شده و توالی protospacer به انتهای ′۵ توالی تکراری ۱ می‌پیوندد. در برخی از مواقع واکنش معکوس این مرحله هم می‌تواند رخ دهد. در مرحله ۲، یک واکنش TES دیگر (فلش زرد ۲) رشته دیگر protospacer را به انتهای ′۵ رشته sense توالی تکراری اول متصل می‌کند که منجر به ایجاد یک فضای خالی در دوپلکس DNA می‌شود. در مرحله ۳، فضای خالی دوپلکس توسط سیستم تکثیر DNA سلول میزبان ترمیم شده و درنتیجه یک قطعه DNA فاصله دهنده جدید در موقعیت اول اضافه می‌شود (۴۳). ج) در مرحله انطباق توالی protospacer سازوکار CRISPR، این توالی دو رشته‌ای می‌تواند تحت تاثیر پروتئین هلیکازی Cas3 قرار گرفته و تبدیل به سوبسترای مناسبی برای پروتئین Cas4 باشد. فعالیت پروتئین Cas4 منجر به ایجاد دو انتهای تک رشته‌ای ′۳ در protpspacer می‌شود که امکان درج آن را در مکان ژنی CRISPR کروموزومی ایجاد می‌کند (۵۷). د) تنوع سازوکارهای پردازش crRNA. در سیستم CRISPR نوع II، توالی tracrRNA با توالی‌های تکراری pre-crRNA دورگ شده و تشکیل دوپلکس gRNA را می‌کنند که این دوپلکس gRNA می‌تواند سوبسترای مناسبی برای تجزیه اندونوکلئازی توسط یک آنزیم RNaseIII (PDB ID: 2EZ6) بهمراه Cas9 باشد. در مرحله بعد انتهای ′۵ توالی تکراری توسط آنزیم‌های نوکلئازی نامشخص (فلش‌های قرمز) ویرایش می‌شود (۴۹).

به طور کلی سیستم طبیعی CRISPR/Cas از سه مرحله تشکیل شده است:

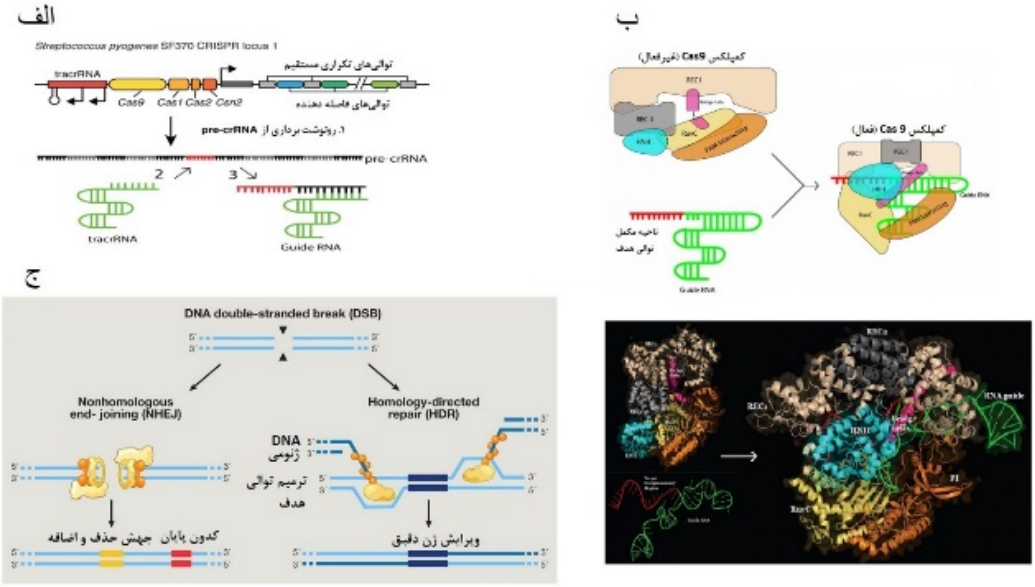
۱ - مرحله انطباق (Adaptation): زمانی که سلول باکتریایی مورد هجوم باکتریوفاژها قرار می‌گیرد، ژنوم ویروس وارد سلول میزبان شده و قسمت کوچکی از ژنوم ویروس به طول تقریبی ۷۲-۲۶ جفت باز به نام protospacer در مکان ژنی CRISPR مابین اولین توالی تکراری (inverted repeats) و انتهای ناحیه پیشبری مکان ژنی CRISPR به عنوان توالی spacer غیرتکراری جدید

درج می‌شود. نحوه انجام این مرحله به طور کامل مشخص نیست. با این حال دو نوع از پروتئین‌های Cas به نام‌های Cas1 و Cas2 تشکیل یک ساختار پروتئینی تترامی را می‌دهند که توالی protospacer DNA (به طول تقریبی ۷۱-۲۶ جفت باز) ویروس را از ناحیه موتیف مجاور protospacer (PAM) شناسایی کرده و طی یک واکنش آنزیمی به انتهای ′۳ توالی رهبر (leader) اضافه می‌کند. در مرحله بعدی توسط آنزیم‌های پلیمرازی و آنزیم لیگاز موجود در باکتری عمل ویرایش و سنتز رشته مکمل توالی‌های تکراری انجام می‌شود (شکل ۱(ب)) (۱۹ و ۴۳). البته این سیستم ادغام توالی protospacer در مکان ژنی CRISPR با شبهاتی همراه است. بر اساس مطالعات انجام گرفته علاوه بر پروتئین‌های نوکلئازی Cas1 و Cas2، نوع دیگری از پروتئین Cas به نام Cas4 شناسایی شده است که با فعالیت اگزونوکلئازی در جهت ′۵ به ′۳ و با ایجاد 3′-overhang امکان ادغام protospacer به مکان ژنی CRISPR را فراهم می‌کند (شکل ۱(ج)) (۵۷).

۲ - مرحله سنتز و پردازش crispr RNA (crRNA): درنتیجه انجام فرآیند نسخه برداری از مکان ژنی CRISPR یک توالی RNA تک رشته‌ای به هم پیوسته از توالی‌های تکراری (حاوی نواحی پالیندرومیک) و توالی‌های spacer غیرتکراری ایجاد می‌شود. به طوری که نواحی پالیندرومیک ساختار ساقه-حلقه یا pre-crRNA یا CRISPR RNA اولیه را تشکیل می‌دهند. در نهایت پردازش crRNA اولیه (CRISPR RNA processing) توسط نوکلئازی پروتئین‌های Cas انجام گرفته و crRNAهای بالغ را ایجاد می‌کند. در سیستم CRISPR/Cas به طور کلی سه نوع سیستم پردازش و سنتز crRNA به نام سازوکارهای پردازش I، II و III در باکتری‌ها شناسایی شده است که توسط پروتئین‌های نوکلئازی مختلف Cas ایجاد می‌شوند. بر اساس پژوهش‌های صورت گرفته، سازوکار تیپ II مبتنی بر پروتئین SpCas9 مستخرج از باکتری *Streptococcus pyogenes* بطور گسترده در ویرایش ژنوم گونه‌های متنوع و انواع مختلف سلول‌ها مانند سلول‌های انسانی، باکتریایی، مخمر، موش آزمایشگاهی، مگس سرکه، نماتد، گیاهان زراعی، حشرات، میمون مورد استفاده قرار گرفته است. در سازوکار پردازش نوع II (crRNA processing mechanism type II) توالی (tracrRNA) trans activating crRNA به توالی‌های تکراری متصل شده و ایجاد کمپلکس crRNA/tracrRNA می‌کند. سپس توسط پروتئین Cas9 و با فعالیت آنزیم RNaseIII، crRNA های بالغ را تولید می‌کند. این سیستم پردازش بسیار شناخته شده بوده و در مهندسی ژنتیک و ویرایش ژنوم بسیار مورد استفاده می‌کند. crRNAهای تولید شده دارای توالی‌های ۲۰ نوکلئوتیدی در انتهای ′۳ خود هستند (شکل ۱(د)) (۱۹ و ۴۹). شکل ۲(الف) مکان ژنی CRISPR بهمراه مکان ژنی کد کننده پروتئین‌های Cas9 و tracrRNA در باکتری *S. pyogenes* نشان می‌دهد. در این سیستم crRNAهای بالغ پس از نسخه برداری توالی pre-crRNA از مکان ژنی CRISPR و توسط پروتئین Cas9 تولید می‌شود (۷، ۲۴ و ۳۷).

۳ - مرحله تداخل (Interference): در مرحله بعدی توالی tracrRNA که دارای یک ناحیه T شکل (۲۰ نوکلئوتیدی) و سه ناحیه حلقه است به ناحیه توالی تکراری crRNA متصل شده و تشکیل یک دوپلکس crRNA/tracrRNA به نام RNA راهنما (gRNA) می‌دهد (۲۳ و ۳۹). سپس بین gRNA و کمپلکس Cas9 بر همکنش انجام می‌شود (۲۴). همانطور که درشکل ۲(ب) نشان داده شده است کمپلکس غیرفعال Cas9 دارای ۶ دمین است که شامل ۱- دمین RECI: بزرگترین دمین پروتئین Cas9 است و در اتصال gRNA دخالت دارد. ۲- دمین RECII: فعالیت دمین RECII نامشخص است. ۳- دمین برهمکنش PAM: فعالیت این دمین در شناسایی توالی PAM و اتصال gRNA است. ۴- دمین Bridge-helix: غنی از نوکلئوتیدهای گوانوزین در نگهداری gRNA و امکان

ایجاد برش توسط دمین‌های HNH و RuvC را در ایجاد هیبریداسیون بین gRNA و DNA هدف ایجاد می‌کند. در هنگام ایجاد کمپلکس بین پروتئین Cas9 و gRNA کنفورماسیون دمین های RECII، HNH و RuvC تغییر کرده و تولید کمپلکس فعال Cas9 را می‌کنند.



شکل۲- الف) مکان ژنی CRISPR بهمراه مکان ژنی کد کننده پروتئین‌های Cas9 و tracrRNA در باکتری *S. pyogenes*. ب) پروتئین Cas9. فعالیت پروتئین Cas9 در حضور RNA راهنما (gRNA). اتصال gRNA باعث ایجاد تغییر در ساختار کونفورماسیونی پروتئین Cas9 شده و باعث فعال سازی پروتئین Cas9 می‌شود (۲۴). در پایین شکل (ب) تصویر کریستالوگرافی شکل فعال پروتئین Cas9 ثبت شده در پایگاه PDB (PDB ID: 4UN3) (۳). ج) سازوکارهای HDR و NHEJ در ویرایش ژنوم و سیستم CRISPR/Cas9 (۱۹).

دمین‌های HNH و RuvC ۴-۳ نوکلئوتید در بالادست توالی PAM را برش می‌دهند. در واقع ۱۸-۱۲ جفت باز بالادست توالی PAM ناحیه seed region نامیده می‌شود که بین توالی gRNA و DNA هدف هیبریداسیون ایجاد می‌شود. اختصاصیت این ناحیه در میزان کارایی سیستم CRISPR/Cas9 بسیار حائز اهمیت است. کمپلکس Cas9 با ایجاد برش‌های دورشته ای (DSBs) در DNA ژنومی باعث ایجاد ویرایش ژنوم در توالی ژن هدف می‌شود (۲۴ و ۳۹).

پرده برداری از سازوکار CRISPR/Cas9 در سال ۲۰۱۲ باعث شناسایی کاربردهای گسترده این فناوری در ویرایش محتوای ژنوم موجودات با عنوان نوکلئازهای مبتنی بر RNA مهندسی شده (RGENs) است که به عنوان نوکلئازهای اختصاصی در برش توالی نوکلئوتیدی و تغییرات ژنتیکی دخیل هستند. RGENها به عنوان نوکلئازهای برنامه‌پذیر متشکل از دو جز کمپلکس Cas9 و gRNA تشکیل شده است که در سلول برای انجام ویرایش ژنوم بیان می‌شود (۸، ۱۱ و ۳۴). برش با Cas9 منجر به دو نوع فرآیند ویرایش شامل سازوکارهای Non-Homologous End Joining (NHEJ) و Homologous Directed Repair (HDR) می شود. در سازوکار NHEJ تنها DSBs در توالی ژنوم ایجاد شده و در توالی حذف و اضافه (indels) مشاهده می‌شود؛ این درحالی است که در سازوکار HDR که توسط نوترکیبی همولوگ موضعی انجام می‌شود توالی جدید به این ناحیه برش یافته اضافه می‌شود (شکل ۲(ج)) (۷ و ۱۹).

ویرایش هدفمند ژنوم جهت ایجاد تغییرات هدفمند در ژنوم مانند خاموشی ژن، جایگزینی ژن، ویرایش ژن‌ها،

شناسایی عملکرد ژن و در تنظیم فرآیند نسخه‌برداری توسط RGENها انجام می‌شود (۳۱). پس از ایجاد DSB، سازوکار بازسازی نوترکیبی همولوگ می‌تواند در بازه وسیعی از موجودات و انواع سلول‌ها تغییرات نوکلئوتیدی دلخواه را ایجاد کند (۸). این فناوری به عنوان یک فناوری نوپا و بدیع بدلیل طراحی ساده و استفاده آسان پژوهش‌ها ژنتیک و زیست شناسی مولکولی را تحت تاثیر قرار داده است. درحال حاضر انواع متنوعی از توالی gRNA در دسترس است که می‌تواند در شاخه بیوتکنولوژی گیاهی کاربردهای وسیعی داشته باشند (۲۹).

تنوع RNA راهنما: علاوه بر تغییرات اعمال شده در سیستم اصلی پروتئین Cas9، برخی تغییرات نیز در gRNA سیستم CRISPR/Cas9 اعمال شده است که میزان کارایی و اختصاصیت این فناوری را از بسیاری جهات افزایش می‌دهد (۲۹). از جمله این تغییرات در gRNA می‌توان به ۱- gRNA ناقص (truRNA): قادر است با توالی ژن هدف تنها ۱۷ نوکلئوتید همولوژی داشته باشد و به این ترتیب میزان اختصاصیت نوکلئاز Cas9 و نوکلئاز Cas9n نیکاز از طریق کاهش تعداد توالی‌های غیرهدف افزایش می‌یابد (۱۲). ۲- Polycistronic tRNA-gRNA (PTG/Cas9): در این سیستم gRNA حاوی واحدهای متناوب از چندین tRNA-gRNA است که مابین آنها توالی‌های فاصله‌دهنده اختصاصی هدف برای هدفگیری چندین جایگاه در توالی ژنوم است (۵۳). پس از نسخه‌برداری از PTG، نسخه اولیه آن از طریق سیستم پردازش tRNA و آنزیم‌های RNaseP و RNaseZ به gRNA بالغ تبدیل می‌شود و در سلول موجود زنده آزاد می‌شود. هر یک از این gRNAهای بالغ با پروتئین Cas9 برهمکنش داده و بدلیل تعداد بسیار زیاد با اختصاصیت بالایی می‌توانند چندین ژن را مورد هدف قرار دهند. این سیستم کارایی سیستم ویرایش ژنوم را به میزان زیادی در گیاهان افزایش داده است. به طوری که Xie و همکارانش (۲۰۱۵) دریافتند که هدفگیری یک ژن توسط چندین gRNA در سیستم CRISPR/Cas9 می‌تواند کارایی ویرایش ژنوم در مقایسه خاموشی کامل ژن هدف بسیار افزایش دهد (۵۳).

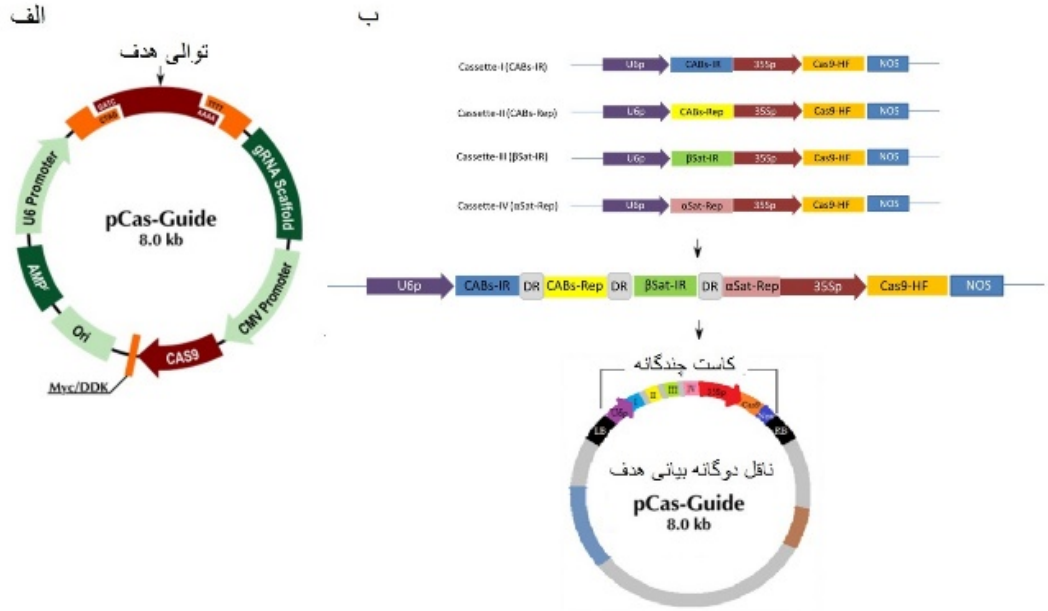
اختصاصیت سیستم CRISPR/Cas9 : همانطور که در بالا اشاره شد، در سیستم CRISPR/Cas9 توالی ژن هدف توسط توالی PAM شناسایی می‌شود که توالی موتیف به طور معمول در باکتری *Streptococcus pyogenes* به صورت زیر 5′-NGG است. این توالی در ژنوم انسان به ازای هر ۸ نوکلئوتید به طور میانگین توسط پروتئین کمپلکس Cas9 قابل شناسایی است. در جدول ۱ انواع توالی اختصاصی PAM در سویه‌های مختلف *S. pyogenes* و سایر گونه‌های باکتریایی شناسایی شده ارائه شده است.

جدول۱- انواع توالی‌های PAM در سویه های مختلف *S. pyogenes* و سایر جنس و گونه های باکتریایی (۱).

توالی اختصاصی PAM	گونه باکتریایی/ انواع پروتئین Cas9
NGG	*Streptococcus pyogenes* (SP); SpCas9
NAG	SpCas9 D1135E variant
NGCG	SpCas9 VRER variant
NGAG	SpCas9 EQR variant
NGAN یا NGNG	SpCas9 VQR variant
NNGRRT یا NNGRR(N)	Staphylococcus aureus (SA); SaCas9
NNNNGATT	*Neisseria meningitidis* (NM)
NNAGAAW	*Streptococcus themophilus* (ST)
NAAAAC	*Treponema denticola* (TD)
TTN	Cpf1 (از گونه‌های متنوع)
توالی PAM شناسایی نشده است	سایر پروتئین‌های Cas9s برگرفته از گونه‌های مختلف

براساس پژوهش‌های صورت گرفته، افزایش طول توالی PAM میزان اختصاصیت سیستم CRISPR/Cas9 را در هدفگیری DNA ژن هدف را افزایش می‌دهد (۱).

طراحی gRNA و ناقل‌های مبتنی بر CRISPR/Cas9 : به طور کلی، سیستم CRISPR/Cas9 از دو جزء اساسی یعنی gRNA و پروتئین Cas9 تشکیل یافته است. کمپلکس Cas9/gRNA می‌تواند جهت ایجاد یک شکستگی دو رشته‌ای در ناحیه مشخصی از ژن هدف مورد استفاده قرار گیرد. سلول‌های گیاهی به طور معمول از سیستم NHEJ جهت القای DSBها در سازوکار ترمیم DNA در ژن‌های داخلی استفاده می‌کنند. اگرچه، گاهی استفاده از دو شکستگی دورشته ای جداگانه می‌تواند به سادگی باعث خاموشی ژن هدف شود، ولی حذف قسمتی از توالی ژن هدف و غربال‌گری آن بسیار ساده‌تر از ایجاد جهش‌های کوچک و ایجاد خاموشی است. به طور کلی جهت فعال سازی سازوکار CRISPR/Cas9 در سلول‌های گیاهی استفاده از کاست‌های حاوی ژن‌های Cas9 و gRNA ضروری است. به طوری که ادغام پایدار این کاست در ژنوم گیاهی احتمال ایجاد جهش‌های indels را بدلیل ایجاد DSBهای مکرر افزایش داده و در نتیجه آن، احتمال ترمیم DNA کاهش یافته و ژنوم ناقص خواهد بود (۴۰). به طور کلی جهت انتقال این کاست sgRNA-Cas9 به درون سلول گیاهی توسط روش‌های انتقال مستقیم و غیرمستقیم مهندسی ژنتیک نیاز به طراحی ناقل‌های بیانی اختصاصی CRISPR/Cas9 است. این ناقل‌ها دارای یک ساختار عمومی متشکل از توالی sgRNA تحت پیشبر U6 ubiquitin promoter و توالی ژن Cas9 تحت پیشبر 35S CaMV هستند که در شکل ۳(الف) نشان داده شده است (۲۸).



شکل۳- ساختار ناقل بیانی CRISPR/Cas9. الف) توالی gRNA (قطعه قرمز تیره) همسانه‌سازی شده در ناقل راهنما pCas (۲۸). ب) مراحل ساخت کاست و ناقل بیانی CRISPR/Cas9 حاوی کاست multiple gRNA مربوط به ژن های CABs و α/β satellites (۲۰).

همان طور که قبلا نیز اشاره شد توالی gRNA از دو بخش crRNA و tracrRNA تشکیل یافته است. بیشتر شرکت‌های تجاری فعال در زمینه تولید وکتورهای بیانی مانند Sigma (www.sigmaaldrich.com/crisprs)، Addgene (https://www.addgene.org/crispr/)، Thermofischer scientific (www.thermofisher.com/tz/en/crispr-cas9-

(technology-information.html و... انواع وکتورهای اختصاصی CRISPR/Cas9 در سیستم‌های گیاهی، جانوری، مخمر و مگس سرکه را تولید می‌کنند که توالی ژن‌های Cas9 و tracrRNA در ناقل‌های بیانی وارد شده و تنها توالی crRNA و پیشبر بیانی U6 promoter مستخرج از *Arabidopsis thaliana* همسانه سازی می‌شود. پیشبر مورد استفاده در بالادست ژن‌های کد کننده پروتئین Cas9 به طور معمول پیشبر همیشه بیانی 35S CaMV promoter است. با توجه به ساختار ناقل‌های مبتنی بر CRISPR/Cas9 مهم‌ترین و کلیدی ترین بخش، طراحی ناحیه crRNA است که به طور اختصاصی از توالی ژن هدف طراحی شده و در ناقل CRISPR/Cas9 همسانه سازی می‌شود. توالی crRNA متشکل از یک توالی ژن هدف به طول ۲۰ جفت باز است که در انتهای ′۳ آن توالی موتیف PAM (′5-NGG-3′) قرار گرفته است (۴۰). جهت طراحی gRNAهایی با میزان off-target پایین، ابتدا توالی ژن مورد نظر را در پایگاه های طراحی gRNA (جدول ۲) وارد شده تا توالی‌های gRNA بر اساس شناسایی توالی موتیف PAM (NGG) طراحی شود (۲۹).

جدول۲- منابع تحت وب سرور قابل دسترس جهت طراحی gRNA سیستم CRISPR/Cas (۲۹).

نام ابزار یا ابزار تحت وب	توضیح	منبع
Addgene	منابع و مواد	https://www.addgene.org/crispr
sgRNA Designer	ابزار طراحی gRNA	http://broadinstitute.org/rnai/public/analysis-tools/sgrna-design
Cas9 Design	ابزار طراحی gRNA	http://cas9.cbi.pku.edu.cn
CHOPCHOP	ابزار شناسایی مکان توالی هدف	https://chopchop.rc.fas.harvard.edu
CRISPR Design	طراحی و تجزیه و تحلیل gRNA	http://crispr.mit.edu
CRISPR Genome Analyzer	انجام آزمایشات ویرایش ژنوم	http://crispr-ga.net
CRISPR-PLANT	ابزار شناسایی gRNA در سطح ژنوم در گیاه	http://genome.arizona.edu/crispr
CRISPRseek	ابزار طراحی gRNA	http://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/CRISPRseek.html
DNA 2.0 gRNA Design Tool	ابزار طراحی gRNA	https://dna20.com/eCommerce/cas9/input
E-CRISP	ابزار شناسایی توالی های هدف	http://e-crisp-test.dkfz.de/E-CRISP
RGEN Tools	ابزار پیش بینی مکان های off-target	http://rgenome.net/cas-offinder
sgRNAcas9	ابزار طراحی gRNA و پیش بینی جایگاه های غیر هدف	http://biootools.com
CRISPR MultiTargeter	ابزار طراحی gRNA چندگانه	/http://multicrispr.net
CRISPR-P	طراحی gRNA در گیاهان	/http://cbi.hzau.edu.cn/crispr
AGEseq	تجزیه و تحلیل ویرایش ژنوم توسط توالی یابی	https://github.com/liangjiaoxue/AGEseq
Stupar Lab's CRISPR Design	شناسایی جایگاه های هدف	http://stuparcrispr.cfans.umn.edu/CRISPR

در گیاهان، توالی gRNA به طور معمول تحت پیشبر بیانی که از آنزیم U6 RNA polymerase III و یا U3 RNA polymerase III که نیاز به جایگاه شروع نسخه برداری محدود هستند، بیان می‌شوند (۴۰). جهت بررسی ملاحظات مربوط به هدفگیری gRNA نسبت به توالی های غیر هدف (off-target) و کاهش میزان این نوع

هدفگیری‌ها، بهترین روش انجام همردیفی توالی نوکلئوتیدی gRNA با کل ژنوم گیاه مورد نظر است. جهت انجام همردیفی از ابزارهای تحت وب مانند BLASTn در پایگاه دانسته‌ها داده‌های NCBI (Http://www.ncbi.nih.gov.com) و همچنین CLUSTAL Omega در پایگاه دانسته‌ها داده‌های EMBL-EBI (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo) می‌توان استفاده کرد. باید به این نکته توجه داشت که نیمه انتهای ′۳ gRNA با همولوژی ۱۰۰٪ می‌تواند نشاندهنده وجود نواحی off-target برای gRNA در ژنوم گیاه هدف باشد. پس از اینکه تعداد off-target های هر gRNA طراحی شده نیز تخمین زده شد، از بین توالی های gRNA طراحی شده تنها تعداد اندکی از gRNAها به عنوان توالی های منتخب جهت هدفگیری توالی ژن مورد نظر مورد استفاده قرار می‌گیرند (۴۰).

از جمله مثال‌های کاربردی در زمینه طراحی gRNA و بیان ناقل‌های اختصاصی CRISPR/Cas9 می‌توان به خاموشی ژن‌های Rep (replication associate protein)، REn (Replication Enhancer protein) ، IR (Intergenic region) و CP (encoded coat protein) متعلق به ژنوم حلقوی CAB و ژن‌های Rep ، βC1 و IR متعلق به ALPHA/BETA satellites که از نظر عملکرد ویروس‌های CABs از خانواده Begomovirus عامل پیچیدگی برگ پنبه (CLCuD) بسیار حائز اهمیت هستند و برای اولین بار توسط Iqbal و همکارانش مورد بررسی قرار گرفت، اشاره نمود. در این مطالعه توالی های نوکلئوتیدی ژن های CABs و Alpha satellite و Beta satellite از GenBank در پایگاه داده‌های NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) استخراج شده و توسط نرم افزار Mega 6.0 همردیفی شده‌اند. نواحی که دارای بالاترین میزان همولوژی هستند به عنوان توالی‌های منتخب برای طراحی gRNA انتخاب شده‌اند. سپس توالی‌های مورد نظر در ابزار تحت وب CRISPR (http://crispr.mit.edu) براساس شناسایی توالی موتیف PAM (′5-NGG-3′) توسط نرم افزار انتخاب شدند. علاوه براین تعداد off-target های هر gRNA طراحی شده نیز توسط نرم افزار مورد نظر بررسی می‌شود. به طوری که، از بین توالی های gRNA طراحی شده تنها تعداد اندکی از gRNAها به عنوان توالی‌های منتخب و با کارایی بالا بر اساس درصد GC در حدود ۶۵-۴۵ درصد و حداقل انرژی آزاد ΔG° توسط نرم‌افزار UNAfold (http://mfold.rna.albany.edu) جهت هدفگیری توالی ژن مورد نظر مورد استفاده قرار می‌گیرد. پس از طراحی هریک از gRNAهای اختصاصی، طراحی کاست CRISPR/Cas9 به صورت یک کاست مجزا حاوی توالی gRNA اختصاصی برای هریک از ژن‌های هدف تحت کنترل پیشبر U6B promoter بهمراه ژن Cas9 تحت کنترل پیشبر 35S CaMV انجام می‌شود. پس از طراحی کاست‌ها مستقل برای هر ژن با قابلیت بیان مجزا، جهت هدفگیری چندین ژن به صورت همزمان توالی‌های gRNA مجزا به صورت پشت سرهم و به دنبال یک توالی تکراری مستقیم (DR) و تحت کنترل تنها یک پیشبر U6 به روش GoldenGate طی اتصال توسط آغازگرهای مکمل هم و در یک مرحله واکنش اتصال در یک تیوب به هم متصل می‌شوند (۹) و یک کاست gRNA چندگانه را ایجاد می‌کنند. سپس کاست مورد نظر در یک ناقل بیانی CRISPR/Cas9 حاوی ژن گزینشگر مقاومت به آنتی بیوتیک همسانه‌سازی می‌شود (شکل ۳(ب)). بر اساس نتایج حاصل از تحقیق Iqbal و همکارانش میزان ایجاد مقاومت به ویروس هدف بیش از ۸۰٪ بوده است (۲۰). ناقل‌های طراحی شده را می‌توان از طریق روش انتقال بیولیستیک و یا انتقال غیر مستقیم *Agrobacterium tumefaciens* به گیاه هدف منتقل نمود. در یک مطالعه‌ای که در ارتباط با تاثیر روش‌های انتقال ژن بر میزان کارایی ناقل‌های CRISPR/Cas9 انجام شده است، نشان داده شده است که ایجاد تغییرات ژنتیکی در سلول های جنین زای

سوماتیکی توسط CRISPR/cas9 به روش انتقال غیر مستقیم اگروباکتریوم در مقایسه با انتقال به روش مستقیم بیولیستیک از درصد خاموشی بالاتری برخوردار است. چراکه، انتقال به روش بیولیستیک منجر به شکستگی و نقص در ژن های کد کننده Cas9 می‌شود و درصد کارایی ناقل CRISPR/Cas9 را کاهش می‌دهد (۲۲).

کاربردهای فناوری CRISPR/Cas9 در بیوتکنولوژی: پروتئین نوکلئازی Cas9 در گستره وسیعی از کاربردهای مهندسی هدفمند ژنوم مورد استفاده قرار می‌گیرد. نوکلئاز Cas9 امکان ایجاد تغییرات ژنومی هدفدار و کارایی را در بسیاری از گونه‌های گیاهی در مقایسه با سایر روش‌های دستکاری ژنتیکی فراهم می‌کند. از اهم کاربردهای فناوری CRISPR/Cas9 می‌توان به موارد ذیل اشاره نمود: ۱- ایجاد شکستگی در DNA ژن هدف توسط روش NHEJ (بدون انتقال template DNA) که باعث ایجاد indels در توالی ژن هدف و امکان مطالعات ژنومیکس عملکردی را فراهم می‌کند. ۲- امکان ورود یک ژن گزارشگر در ناحیه DSBs توسط روش HDR. ۳- تغییر در توالی های ژنی غیر کدکننده پروتئین مانند توالی های کدکننده mi/siRNA و lncRNA و غیره... ۴- جهش زایی اختصاصی و هدفمند (specific mutation) توسط روش NHEJ و HDR: مانند ایجاد SNPهای هدفمند و اصلاح توالی نوکلئوتیدی ژن مورد نظر، ایجاد Indelsهای اختصاصی و نشاندار کردن ژن‌های هدف (نشانگرهای مولکولی که می‌توان از آنها در تجزیه و تحلیل عملکردی ژنوم، تخلیص پروتئین و یا مطالعات مربوط به تعیین مکان های سلولی RNA و پروتئین می‌توان استفاده نمود). ۵- مطالعه پیشبر از طریق انتقال ژن‌های گزارشگر مانند لوسیفراز و GFP. ۵- ادغام توالی loxP در دو طرف توالی ژن هدف توسط روش HDR که با استفاده از پروتئین Cre آن را برش داد و ژن هدف را خاموش نمود. ۶- ایجاد حذف های بزرگ در کروموزوم با استفاده از موتانت های Cas9 نیکاز در دمین RuvC و استفاده از ۲ نوع gRNA متفاوت. ۷- استفاده از سیستم CRISPRi/CRISPRa در خاموشی و فعال سازی ژن در مراحل بعد از نسخه برداری (PTGS) که در این سیستم‌ها کمپلکس dCas9 استفاده می‌شود که فاقد فعالیت برش DNA ژنومی است. ۸- علاوه بر این این روش در تنظیم بیان ژن و ایجاد تغییرات نوکلئوتیدی در نواحی Cis elements و نواحی تنظیمی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۳۳ و ۳۵).

دستاوردهای CRISPR/Cas9 در گیاهان: سیستم CRISPR/Cas9 جهش‌های پایدار و قابل توارثی را ایجاد می‌کند که به راحتی می‌توان از ساختار Cas9/gRNA جهت تغییرات بیشتر توسط CRISPR/Cas تمیز داد. این امر منجر به توسعه گیاهان هموزیگوت غیر تراریخته که تنها در یک نسل تولید شده اند، می‌شود (۱۰ و ۵۵). بر اساس مطالعه ای که Xu و همکارانش (۲۰۱۵) انجام دادند که توانستند یک رقم زراعی برنج غیر تراریخته همراه با جهش در ژن هدف توسط تفرق ترانسژن با ایجاد خودگشنی در نسل T1 به طور موفقیت آمیزی تولید کنند (۵۵). در سال ۲۰۱۴، Xing و همکارانش یک سری ناقل‌های دوتایی مبتنی بر سیستم CRISPR/Cas9 با قابلیت بیان پایدار در سیستم‌های گیاهی و یک سری ناقل‌های حاوی ماژول gRNA را طراحی کردند. از اینرو، انتقال تنها پروتئین نوکلئاز Cas9 و gRNA به درون سلول میزبان توسط روش‌های انتقال ژنتیکی تنها ضرورت ویرایش ژنوم گیاهی به شمار می‌رود (۵۴).

بر اساس گزارش، Baltes و همکارانش (۲۰۱۴) پیشنهاد کردند که رپلیکون جیمینی ویروس‌ها (GVRs) جهت انتقال ساختار Cas9/gRNA به درون سلول میزبان زمانی که ژن پروتئین آغازکننده همانندسازی (REP) ویروس همراه با ساختار Cas9/gRNA انتقال داده شود، می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد (۵). علاوه‌براین، جهت استفاده از این سیستم در ارتقا و کشف صفات ژنتیکی، روش‌های انتقال با کارایی بالا مانند ویروس‌های مبتنی بر همانندساز

DNA جهت انتقال مواد مهندسی ژنوم بدون نیاز به روش‌های انتقال مهندسی ژنتیک مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲ و ۵۶). براساس پژوهش‌های صورت گرفته، انتقال مستقیم با استفاده از ویروس جغجغه توتون (TRV)، ویروس پیچیدگی برگ کلم (CaLCuV)، امکان سنجی انتقال Cas9/gRNA توسط ویروس‌های مختلف در ویرایش ژنوم گیاهان مختلف به وضوح نشان داده شده است (۵۶).

ایمنی زیستی و مقبولیت CRISPR/Cas9 : جهش‌هایی که توسط سیستم CRISPR/Cas9 در گیاهان ایجاد می‌شوند ابعاد جدیدی را در پژوهش‌ها زیست شناسی گیاهی گشوده است. استفاده از جهش‌زایی تصادفی و سنتی بدلیل طبیعت ادغام تصادفی ژن‌ها قادر به غیرفعال سازی هرژنی نیست. فناوری CRISPR/Cas9 می‌تواند در ایجاد جهش‌های ژن‌های غیرقابل دسترس بهترین کمک باشد. به طوری که این سیستم با ایجاد جهش‌هایی در مکان‌های ژنی چندگانه و ایجاد حذف‌های بزرگ می‌تواند اصلاح گیاهان را بدون انتقال ژن خارجی شتاب دهد. این درحالی است که اگر برخی نگرانی‌ها و شک و تردیدهای مربوط به سلامتی انسان و محیط زیست گیاهان تراریخته را کنار بگذاریم، گیاهان زراعی تراریخته می‌توانند بهترین راه حل در توسعه و ارتقای کیفیت و عملکرد گیاهان زراعی حال حاضر باشند (۱۸ و ۴۶). با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک یک سازه DNA می‌تواند به طور مستقیم و تصادفی وارد یک یا چندین کروموزوم شود (۱۵، ۱۷، ۳۲ و ۴۸). روش‌های اصلاح سنتی گیاهان زراعی با استفاده از جهش‌های تصادفی و ایجاد تنوع ژنتیکی همواره یک صفت جدید را به ارقام زراعی وارد می‌کنند. این درحالی است که در سیستم CRISPR/Cas9 تغییرات ایجاد شده در ژنوم گیاهی بسیار دقیق، قابلیت وراثت و پایداری بالایی دارد (۵۱). سیستم Cas9/gRNA یکی از روش‌های اصلاح گیاهی جدید (NPBT) به دنبال سیستم نوکلئازی انگشت روی (ZFN) و سیستم نوکلئاز تحت تاثیر قرار دهنده مشابه فاکتورهای رونوشت‌برداری (TALEN) که از جمله فناوری‌های ویرایش ژنوم هستند (۴، ۴۱، ۴۴ و ۵۱). سیستم NPBT بسیار سریعتر از روش‌های اصلاحی سنتی بوده و می‌تواند یک لاین خالص را که فاقد هرگونه DNA خارجی است تولید نماید. گیاهانی که به روش NPBT تولید می‌شوند با گیاهان حاصل از اصلاح نباتات سنتی از نظر محصول نهایی برابر هستند (۱۳، ۱۶ و ۵۱). بنابراین، در مورد گیاهان ویرایش شده توسط سیستم CRISPR/Cas9 کلیه قوانین ایمنی تنظیمی منطبق با موجودات تراریخته (GMO) کنار گذاشته نشده است، بلکه چالش‌های جدیدی در ارتباط با پذیرش اجتماعی گیاهان زراعی ویرایش ژنومی شده (GE) با این سیستم مشاهده می‌شود. در حال حاضر، سیستم NPBT از نظر مقررات و قوانین GMO در واقع جزو محصولات مهندسی ژنتیک قرار نگرفته و از نظر پذیرش اجتماعی نسبت به محصولات اصلاح شده ژنتیکی در اولویت مصرف هستند (۴). بر اساس گزارشات، Araki و Ishii (۲۰۱۵) یک جنبه نظارتی جهانی برای طبقه بندی موجوداتی که از طریق ویرایش ژنوم ایجاد شده‌اند، پیشنهاد شد. بر اساس این پیشنهاد موجودات تراریخته به دو نوع طبقه بندی می‌شوند که شامل موجودات تراریخته مبتنی بر تغییر در مسیر متابولیکی و یا موجودات تراریخته مبتنی بر محصول نهایی است. این دانشمندان پیشنهاد کردند که آن محصولات زراعی که در سطح ویرایش ژنوم توسط فناوری CRISPR/Cas9 ویرایش ژنوم می‌شوند باید به عنوان موجودات تراریخته مبتنی بر محصول نهایی در نظر گرفته شوند (۴). چراکه محصول نهایی ویرایش ژنوم مبتنی بر سیستم CRISPR/Cas9، یک موجود اصلاح شده ژنتیکی تلقی می‌شود. این درحالی است که جهت بهینه سازی سیستم CRISPR/Cas9 در گیاهان به عنوان یک ابزار اصلی ویرایش ژنوم در تولید ارقام گیاهی با چندین ویژگی زراعی مفید مورد نیاز است (۴). علاوه براین این فناوری می‌تواند روش‌های اصلاحی کلاسیک را جهت درک

صفات کمی پیچیده که در اصلاح نباتات سنتی چندین ژن انتخاب می‌شود، پشتیبانی کند (۴۲). گیاهان زراعی GE دارای ساختارهای تنظیمی مناسب نسبت به گیاهانی که حامل DNA خارجی در ژنوم خود هستند، از نظر جوامع جهانی و عمومی پذیرفته‌تر هستند (۳۶). سازمان کشاورزی امریکا (FDA) گیاهان GE را که فاقد DNA خارجی هستند به عنوان GMO در نظر قرار نداده است؛ در حالی که اتحادیه اروپا در نظر دارد در آینده نزدیک عدم قطعیت قوانین وضع شده در رابطه با ویرایش ژنوم را اعلام کند (۲۵ و ۵۰). گسترش بهره برداری از فناوری CRISPR/Cas9 در پژوهش‌ها کاربردی گیاهان و مزیت‌های آن در اصلاح گیاهان زراعی جهت تامین امنیت غذایی جهانی به طور کامل بستگی به کارایی و پذیرش عمومی ارقام زراعی GE در جهان دارد.

تقدیر و تشکر

این مطالعه با حمایت دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم و بیوتکنولوژی، گروه بیوتکنولوژی صورت گرفته است.

منابع

1- Addgene. 2016. CRISPR 101: A desktop resource, 1st edition, Chapter 2: what is CRISPR?. New York, USA, 19.

2- Ali, Z., Abul-faraj, A., Piatek, M. and Mahfouz, M.M. 2015. Activity and specificity of TRV-mediated gene editing in plants. Plant signaling and behavior, 10(10): e1044191.

3- Anders, C., Niewoehner, O., Duerst, A. and Jinek, M. 2014. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. Nature, 513(7519): 569-573.

4- Araki, M. and Ishii, T. 2015. Towards social acceptance of plant breeding by genome editing. Trends in plant science, 20(3): 145-149.

5- Baltes, N.J., Gil-Humanes, J., Cermak, T., Atkins, P.A. and Voytas, D.F. 2014. DNA replicons for plant genome engineering. The Plant Cell, 26(1): 151-163.

6- Chen, K. and Gao, C. 2014. Targeted genome modification technologies and their applications in crop improvements. Plant cell reports, 33(4): 575-583.

7- Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A. and Zhang, F. 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science, 339(6121): 819-823.

8- Doudna, J.A. and Charpentier, E. 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science, 346(6213): 1258096.

9- Engler, C., Gruetzner, R., Kandzia, R. and Marillonnet, S. 2009. Golden gate shuffling: a one-pot DNA shuffling method based on type IIs restriction enzymes. PloS one, 4(5): e5553.

10- Fauser, F., Schiml, S. and Puchta, H. 2014. Both CRISPR/Cas-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in Arabidopsis thaliana. The Plant Journal, 79(2): 348-359.

11- Fichtner, F., Castellanos, R.U. and Ulker, B. 2014. Precision genetic modifications: a new era in molecular biology and crop improvement. Planta, 239(4): 921-939.

12- Fu, Y., Sander, J.D., Reyon, D., Cascio, V.M. and Joung, J.K. 2014. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. Nature biotechnology, 32(3): 279-284.

13- Giddings, L.V., Potrykus, I., Ammann, K. and Fedoroff, N.V. 2012. Confronting the Gordian knot. Nature Biotechnology, 30(3): 208.

14- Grissa, I., Vergnaud, G. and Pourcel, C. 2007. CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. Nucleic Acids Research, 35(suppl 2): W52-W57.

15- Habibi, S. Niknam, V. Ebrahimzadeh, H. and mirmasoumi, M. (2015). Virulence of Different Strains of Agrobacterium rhizogenes on genetic transformation in *Astragalus compactus*. Journal of Plant Researches, 27(5), 804-810.

16- Hartung, F. and Schiemann, J. 2014. Precise plant breeding using new genome editing techniques: opportunities, safety and regulation in the EU. The Plant Journal, 78(5): 742-752.

17- Hesami, R. and Shariati, M. 2015. Study of photosynthetic performance index (PIABS) response in AtNRT2.1 transgenic *Nicotiana plumbaginifolia* plants to nitrate deficiency using

chlorophyll a fluorescence. Journal of Plant Researches, 27(4): 569-579.

18- Hilbeck, A., Meier, M., Römbke, J., Jänsch, S., Teichmann, H. and Tappeser, B. 2011. Environmental risk assessment of genetically modified plants-concepts and controversies. Environmental Sciences Europe, 23(1): 13.

19- Hsu, P.D., Lander, E.S. and Zhang, F. 2014. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. Cell, 157(6): 1262-1278.

20- Iqbal, Z., Sattar, M.N. and Shafiq, M. 2016. CRISPR/Cas9: A tool to circumscribe cotton leaf curl disease. Frontiers in plant science, 7.

21- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M. and Nakata, A. 1987. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. Journal of Bacteriology, 169(12): 5429-5433.

22- Jacobs, T.B., LaFayette, P.R., Schmitz, R.J. and Parrott, W.A. 2015. Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9. BMC biotechnology, 15(1): 16.

23- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A. and Charpentier, E. 2012. A programmable dual-RNA–guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science, 337(6096): 816-821.

24- Jinek, M., Jiang, F., Taylor, D.W., Sternberg, S.H., Kaya, E., Ma, E., Anders, C., Hauer, M., Zhou, K., Lin, S. and Kaplan, M. 2014. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. Science, 343(6176): 1247997.

25- Jones, H.D. 2015. Regulatory uncertainty over genome editing. Nature plants, 1: 14011.

26- Jouzani, S.G., Tohidfar, M. and Sadeghi, A. 2010. Biosafety aspects of genetically modified plants. Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Tehran, Iran. (In Farsi with English abstract)

27- Jouzani, S.G. and Tohidfar, M. 2013. Plant Molecular Farming: Future Prospects and Biosafety Challenges. Biosafety, 2: 2.

28- Kedersha, N., Panas, M.D., Achorn, C.A., Lyons, S., Tisdale, S., Hickman, T., Thomas, M., Lieberman, J., McInerney, G.M., Ivanov, P. and Anderson, P. 2016. G3BP–Caprin1–USP10 complexes mediate stress granule condensation and associate with 40S subunits. Journal of Cell Biology, 212(7): 845-860.

29- Khatodia, S., Bhatotia, K., Passricha, N., Khurana, S.M.P. and Tuteja, N. 2016. The CRISPR/Cas genome-editing tool: application in improvement of crops. Frontiers in plant science, 7.

30- Khatodia, S. and Khurana, S.M. 2014. Trending: The Cas nuclease mediated genome editing technique. Biotech Today, 4(1): 46-49.

31- Kim, H. and Kim, J.S. 2014. A guide to genome engineering with programmable nucleases. Nature Reviews Genetics, 15(5): 321-334.

32- Lau, W., Fischbach, M.A., Osbourn, A. and Sattely, E.S. 2014. Key applications of plant metabolic engineering. PLoS Biol, 12(6): e1001879.

33- Lee, Y.H., Kuo, C.Y., Stark, J.M., Shih, H.M. and Ann, D.K. 2013. HP1 promotes tumor suppressor BRCA1 functions during the DNA damage response. Nucleic Acids Research, gkt231.

34- Liang, Q., Huashan, L., Yunhan, J. and Chunsheng, D. 2015. The molecular mechanism of CRISPR/Cas9 system and its application in gene therapy of human diseases. Yi chuan Hereditas, 37(10): 974-982.

35- Ling, F., Hori, A., Yoshitani, A., Niu, R., Yoshida, M. and Shibata, T. 2013. Din7 and Mhr1 expression levels regulate double-strand-break–induced replication and recombination of mtDNA at ori5 in yeast. Nucleic Acids Research, gkt273.

36- Lozano-Juste, J. and Cutler, S.R. 2014. Plant genome engineering in full bloom. Trends in plant science, 19(5): 284-287.

37- Mali, P., Aach, J., Stranges, P.B., Esvelt, K.M., Moosburner, M., Kosuri, S., Yang, L. and Church, G.M. 2013. CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. Nature Biotechnology, 31(9): 833-838.

38- Mojica, F.J., Díez-Villaseñor, C., Soria, E. and Juez, G. 2000. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. Molecular Microbiology, 36(1): 244-246.

39- Nishimasu, H., Ran, F.A., Hsu, P.D., Konermann, S., Shehata, S.I., Dohmae, N.,

Ishitani, R., Zhang, F. and Nureki, O. 2014. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. Cell, 156(5): 935-949.

40- Patron, N.J. 2013. How to knock-out plant genes using RNA-guided Cas9. TSL plasmid database. http://synbio.tsl.ac.uk/howtoassemblecas9crispr-constructsforuseinplants/

41- Podevin, N., Devos, Y., Davies, H.V. and Nielsen, K.M. 2012. Transgenic or not? No simple answer!. EMBO reports, 13(12): 1057-1061.

42- Quetier, F. 2016. The CRISPR-Cas9 technology: closer to the ultimate toolkit for targeted genome editing. Plant Science, 242: 65-76.

43- Rollie, C., Schneider, S., Brinkmann, A.S., Bolt, E.L. and White, M.F. 2015. Intrinsic sequence specificity of the Cas1 integrase directs new spacer acquisition. E life, 4: e08716.

44- Schaart, J.G., van de Wiel, C.C., Lotz, L.A. and Smulders, M.J. 2016. Opportunities for products of new plant breeding techniques. Trends in Plant Science, 21(5): 438-449.

45- Staals, R.H., Agari, Y., Maki-Yonekura, S., Zhu, Y., Taylor, D.W., van Duijn, E., Barendregt, A., Vlot, M., Koehorst, J.J., Sakamoto, K. and Masuda, A. 2013. Structure and activity of the RNA-targeting Type III-B CRISPR-Cas complex of *Thermus thermophilus*. Molecular cell, 52(1): 135-145.

46- Tohidfar, M. and Khosravi, S. 2015. Transgenic crops with an improved resistance to biotic stresses. A review. Biotechnology, Agronomy, Society of Environment, 19(1): 62.

47- Tohidfar, M., Maleki, N. and Abedini, R. 2009. Environmental risks of GM plants and the resistance management. Biosafety journal, 2: 24-36. (In Farsi)

48- Tohidfar, M., Zare, N., Jouzani, G.S. and Eftekhari, S.M. 2013. Agrobacterium-mediated transformation of alfalfa (Medicago sativa) using a synthetic cry3a gene to enhance resistance against alfalfa weevil. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 113(2): 227-235.

49- Wiedenheft, B., Sternberg, S.H. and Doudna, J.A. 2012. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. Nature, 482(7385): 331-338.

50- Wolt, J.D., Wang, K. and Yang, B. 2016. The Regulatory Status of Genome-edited Crops. Plant biotechnology journal, 14(2): 510-51.

51- Woo, J.W., Kim, J., Kwon, S.I., Corvalán, C., Cho, S.W., Kim, H., Kim, S.G., Kim, S.T., Choe, S. and Kim, J.S. 2015. DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. Nature biotechnology, 33: 1162-1164.

52- Wusheng, L., Joshua, S.Y. and C Neal, J.S. 2013. Advanced genetic tools for plant biotechnology. Nature Reviews Genetics, 14:11.

53- Xie, K., Minkenberg, B. and Yang, Y. 2015. Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. Proceedings of the National Academy of Sciences, 112(11): 3570-3575.

54- Xing, H.L., Dong, L., Wang, Z.P., Zhang, H.Y., Han, C.Y., Liu, B., Wang, X.C. and Chen, Q.J. 2014. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. BMC plant biology, 14(1) 327.

55- Xu, R.F., Li, H., Qin, R.Y., Li, J., Qiu, C.H., Yang, Y.C., Ma, H., Li, L., Wei, P.C. and Yang, J.B. 2015. Generation of inheritable and "transgene clean" targeted genome-modified rice in later generations using the CRISPR/Cas9 system. Scientific reports, 5: 11491.

56- Yin, K., Han, T., Liu, G., Chen, T., Wang, Y., Yu, A.Y.L. and Liu, Y. 2015. A geminivirus-based guide RNA delivery system for CRISPR/Cas9 mediated plant genome editing. Scientific reports, 5: 14926.

57- Zhang, J., Kasciukovic, T. and White, M.F. 2012. The CRISPR associated protein Cas4 Is a 5′ to 3′ DNA exonuclease with an iron-sulfur cluster. PLoS One, 7(10): e47232.

58- Zhang, L. and Zhou, Q. 2014 CRISPR/Cas technology: a revolutionary approach for genome engineering. Science China. Life Sciences 57(6): 639.

CRISPR/Cas9 System as an Efficient Genome Editing Tool in Developing GM Crops: A Review

Nayeri Sh., Tohidfar M. and Saidi A.

Plant Sciences and Biotechnology Dept., Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

The Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats associated Cas9/gRNA system (CRISPR/Cas9) is a novel and an efficient targeted genome-editing technique are used to achieve new traits and crops with high quality and quantity yields. Recently, CRISPR/Cas9 mechanism has been used extensively to genome editing, gene knockouts, reducing off-target effects and modulation of gene transcription with high specificity in several animal and plants through mediating double strand breaks (DSBs) in genomic DNA and making nucleotide changes in target gene. In this review, we have summarized the broad applicability of Cas9 nuclease-mediated targeted genome editing of plants for development of genetically edited crops, climate resilient and bio-energy agriculture and to develop non-GM plants along with regulating the uncertainty and the social acceptance of this new plant breeding technique. The development of GE crops, which is similar to conventional breeding crops show the high stability and efficient properties compared to genetically modified (GM) crops in different climates, social acceptance and environmental and human health concerns.

Key words: Cas9/gRNA, CRISPR/Cas9, GE crops, Plant genome editing