روشهای جدید ویرایش ژنوم مبتنی بر تکنیک CRISPR

مریم وحیدی* و فرید حیدری

تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، پژوهشکده کشاورزی

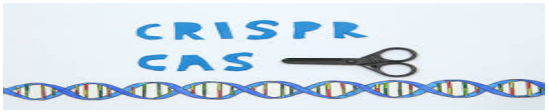
* پست الکترونیکی: Vahidi.mv7@gmail.com

کریسپر (CRISPR) به اختصار (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) به معنای توالی های کوتاه پالیندرومی فاصله دار منظم خوشه ای است. کریسپر در واقع نوعی سیستم ایمنی در باکتری ها است که علیه عناصر ژنتیکی مهاجم عمل می کند. این سیستم در زمان مواجهه سلول باکتری با باکتریوفاژ و یا اسید نوکلئیک مهاجم موجب نابودی مواد ژنتیکی خارجی می شود. تا به حال سه دسته از این سیستم شناسایی گردیده؛ سیستم کلاس II در باکتری *استرپتوکوکوس پیوژنز* یا همان CRISPR-Cas9، برای استفاده در سلول های یوکاریوتی مهندسی شده است. این سیستم شامل سه بخش تحت عنوان های پروتئین cas، crRNA، tracrRNA می باشد.

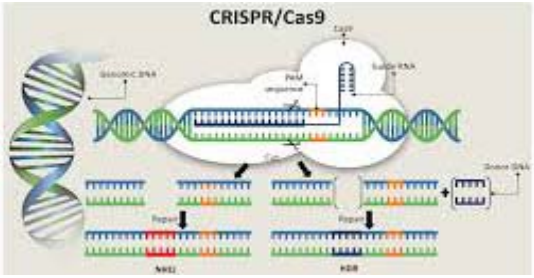
به زبان ساده کریسپر در واقع بریدن و جدا کردن ژن معیوب از ژنوماست. فن آوری کریسپر به دانشمندان اجازه می دهد که به صورتی دقیق تر و کارآمد تر و همچنین سریع تر نسبت به ویرایش ژنوم موجودات اقدام کنند.

مکانزیم عمل

سیستم کریسپردارای دو جزء است یکی توالی RNA کوتاه راهنما و دیگری اندونوکلئاز متداول Cas 9 نوکلئاز Cas9 دو دمین برنده DNA دارد که شامل دمین نوکلئازی HNH و دمین نوکلئازی RuvC1– Like است که منجر به شکستن DNA به صورت دو رشته ای DSB (Double Strand Break) می شود. واژه gRNA در این سیستم به یک RNA کایمر تک رشته ای مهندسی شده اشاره دارد، در واقع gRNA نقش tracerRNA و crRNA باکتریایی را دارد.



بیست جفت نوکلئوتید آخر انتهای ´۵ مربوط به gRNA را محقق بر علیه توالی ژنی مورد نظرجهت برش و ویرایش طراحی می کند؛ این توالی ۲۴ نوکلئوتیدی کمپلکس cas9/gRNA را به جایگاه ژنی مورد نظر درست در بالادست جایگاه PAM از طریق اتصال RNA-DNA هدایت می کند . توالی PAM در بین سویه های باکتری های مختلف و انواع پروتئین های CRISPR-Cas تفاوت دارد و این توالی برای باکتری *Streptococcus pyogenes* توالی 5´-NGG می باشد و سیستم CRISPR-Cas قابل استفاده موجود به سمت هر توالی DNA با آدرس 5´-N20-NGG هدایت شده و به صورت کاملا دقیق موجب شکست DNA به صورت blunt می شود. دو رشته DNA بریده شده توسط این سیستم به وسیله دو مکانیسم ترمیمی که در تمامی انواع ارگانیسم ها یافت می شود و مسیر ترمیمی اتصال انتهاهای غیر هومولوگ NHEJ و مسیر ترمیمی شباهتی HDR نام دارند، ترمیم می شود.



شکل ۱ – بیست جفت نوکلئوتید آخر gRNA به عنوان یک عامل شناسایی کننده توالی DNA هدف به کار رفته و اندونوکلئاز Cas9 را به توالی هدف هدایت می کند. سپس دو دومین برنده Cas9 موجب شکست در دو رشته DNAدر ناحیه ۰–۳ جفت باز پایین دست توالی PAM می شوند سپس DSB ایجاد شده یا توسط مسیر خطا دار NHEJترمیم شده یا توسط مسیر HDR ترمیم خواهد شد .

کاربرد در درمان

سیستم CRISPR-Cas ابزاری قدرتمند بوده و پتانسل

بالایی درتحقیقات پایه و بالینی دارد. محققان چینی با نوع جدیدی از تکنیک کریسپر (نوعی که به جای بریدن DNA به طور شیمیایی عمل می کند) توانستند جهش هایی را که باعث نوعی بیماری خونریزی دهنده می شود درمان کنند. دانشمندان همچنین از کریسپر برای خنثی کردن دو ژن که پروتئین گیرنده T را کد گذاری می کنند، استفاده کردند که یک گیرنده مهندسی شده را قادر می‌سازد که سلول ها را تشخیص و به سلول های لوسمی حمله کند. همچنین دانشمندان قصد دارند از کریسپر به منظور ایجاد اختلال در ژن کد کننده پروتئین سطحی در T-cell ها برای مقابله با ویروس HIV استفاده کرده و سلول های T مقاوم در برابر ویروس ایجاد کنند. بعلاوه دانشمندان با استفاده از تکنیک کریسپر توانسته اند جهش های مولکولی که باعث بیماری های افزایش تکرار میکروستلایت ها مانند دیستروفی میوتونیک نوع ۱ و نوع ۲ و فرم های رایج ALS و هانتیگتون می شوند را تصحیح کنند. همچنین در یک مطالعه دانشمندان با استفاده از تکنولوژی کریسپر اقدام به اصلاح یک جهش ژنتیکی که مسبب بیماری بتا تالاسمی می شوند گردیدند.

از موارد استفاده از CRISPR در تحقیقات هم میتوان به یافتن توالی تنظیمی در ژن ها با استفاده از فرم تغییر یافته این تکنیک اشاره کرد به طور کلی از فن آوری کریسپر می توان جهت تحقیقات و همچنین درمان در موارد متعددی چون انواع سرطان ها و هپاتیت و ... استفاده کرد که موارد یاد شده اشاره بر اصلاح و دستکاری محتوای ژنوم سلول های سوماتیک دارد در حالی که با این تکنیک می توان به ویرایش محتوای ژنتیکی رده های جنینی و سلول های زایا دست زد اما این دستکاری ممکن است با منع اخلاقی توام باشد.

تنوع در سیستم CRISPR/Cas9

علاوه بر سیستم متداول در کریسپر، دو فرم جهش یافته آنزیم Cas9 به نامهای Nicakse Cas9 و فرم دوجهشه (Mutant Double Cas9) توسط محققان ابداع شده ؛ این دو فرم جهش یافته Cas9 کاربردها و مزایای خاص خود را دارند.

آینده کریسپر

همانطور که اشاره شد تکنیک کریسپر در بحث سلامت و درمان دارای اهمیت فراوانی است همچنین این فن آوری در حوزه های انرژی زیستی ، تولید مواد جدید، تولید دارو و کشاورزی و ... کاربرد دارد بنابراین به دلیل اهمیت این تکنیک افزایش بهبود و کارایی آن حایز اهمیت است محققین ناحیه ای کلیدی در پروتئین Cas 9 یافته اند که موجب افزایش دقت CRISPR _Cas 9 در جایگاه اتصال به هدف و کاهش Off-target می شود. هم چنین نشان داده شده است که پروتئین های anti-CRISPR ویروسی می توانند در بهبود عملکرد این سیستم نقش داشته باشند.

منابع

1- Corinna Richter et al., 2012, Function and Regulation of Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) / CRISPR Associated (Cas) Systems.

2- Jiyung Shin et al. ,2017, Disabling Cas9 by an anti-CRISPR DNA mimic.

3- Janice S. Chen et. al.,2017, enhanced proofreading governs CrISPr–Cas9 targeting accuracy.

4- norah M. E. Fogarty et al. , 2017, Genome editing reveals a role for OCT4 in human embryogenesis.

5- Batra R et al. , 2017,Elimination of Toxic Microsatellite Repeat Expansion RNA by RNA –Targeting Cas9.

6- Blake Wiedenheft and Royce Wilkinson, 2014, A CRISPR method for genome engineering.

7- Yumei Luo et al. , 2015 , Integrative Analysis of CRISPR/Cas9 Target Sites in the Human HBB Gene.

2- Daniel H. Haft et al. 2005, A Guild of 45 CRISPR-Associated (Cas) Protein Families and Multiple CRISPR/Cas Subtypes Exist in Prokaryotic Genomes.