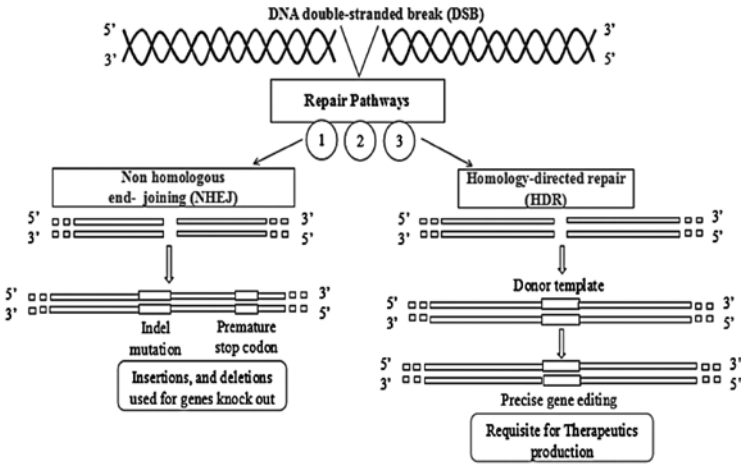
مرضیه موسی زاده، دانشجوی کارشناسی بیوتکنولوژی، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه الزهرا(m.mosazadeh۷۴@yahoo.com)
زکیه سادات حسینی، دانشجوی کارشناسی ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان(z.uni.genetic@gmail.com)
زهرا رضایی، دانشجوی کارشناسی ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان(Rezaee.genetic@gmail.com)
فریبا دهقانیان، دانشجوی دکتری ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان(fd.dehghanian@gmail.com)

سیستمCRISPR-Cas9 و سرطان

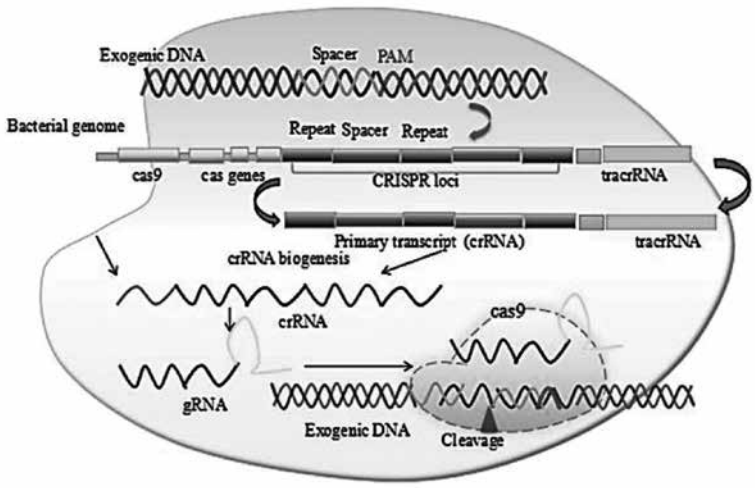
ویرایش ژنوم همواره عرصه‌ای بوده که دانشمندان زیادی را به چالش کشیده تا با ارائه روش‌های کارآمدتر بتوانند تغییرات هدفمندی را در ژنوم ایجاد نمایند. امروزه سیستم ترمیمی کریسپر (CRISPR/cas9)یکی از گزینه‌های مناسب و امیدوارکننده برای ویرایش ژنوم به حساب می‌آید. این سیستم برتری‌های زیادی نسبت به روش‌های پیشین ویرایش ژن داشته و انقلابی را در این زمینه به وجود آورده است. در مقایسه با سیستم‌های پیشین، سیستم کریسپر می‌تواند بدون دخالت در مکانیسم‌های داخل سلولی منجر به غیر فعال کردن یک ژن یا خارج نمودن کامل ژن از سلول شود. بنابراین از این سیستم می‌توان در درمان بیماری‌هایی چون انواع سرطان و تحقیقات مرتبط با شناسایی نحوه‌ی عملکرد ژن‌های معیوب در این بیماری‌ها استفاده کرد. با توجه به تأثیر عوامل ژنتیکی و اپی ژنتیکی مختلف در ایجاد سرطان، مدل‌سازی سرطان با استفاده از سیستم کریسپر نقش مهمی در کشف و شناسایی فاکتورهای دخیل در سرطان و ارائه روش‌های درمانی موثرتر خواهد داشت.



شکل۱: ساختار کریسپر [۵]

سرطان بعد از بیماری‌های قلبی و عروقی به عنوان دومین عامل مرگ و میر در جوامع شناخته شده و یافتن روش‌های نوین و کارآمد برای درمان این بیماری ضروری به نظر می‌رسد (۱). امروزه روش‌های ویرایش ژنی به عنوان ابزارهای جدید در راستای تحقیقات سرطان و درمان این بیماری محسوب می‌شود. در ابتدا به این منظور اغلب از دو روش ZFNs و TALENs استفاده می‌شد. این روش‌ها به دلیل هزینه‌های بالا، دشواری طراحی سیستم اندونوکلئازی و نیز پایین بودن کارآیی ایجاد برش‌های دقیق محدودیت‌هایی را به دنبال داشتند (۲،۳، ٤). سیستم ویرایش ژنی CRISPR–cas۹ روشی دقیق و مطمئن در تحقیقات مربوط به بیماری‌های ژنتیکی به خصوص سرطان بوده و اولین بار در باکتری استرپتوکوک پایوژنز کشف شده است (۲،٤). سرطان به دلایل مختلف ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی در ژن‌های سرطان‌زا و یا ژن‌های سرکوبگر سرطان ایجاد می‌شود (۲،۵). بنابراین، سیستم CRISPR–cas۹ می‌تواند با توانایی ایجاد جهش‌های دقیق از طریق خاموش کردن ژن‌های سرطان‌زا و یا روشن کردن ژن‌های سرکوبگر سرطان به درمان این بیماری بپردازد. با توجه به اینکه تلومرازها در انواع سرطان‌ها فعال شده و موجب نامیرایی سلول‌های سرطانی می‌شوند، خاموش کردن تلومراز توسط کریسپر نیز یکی دیگر از روش‌های پیشنهادی برای درمان سرطان است(٦). سیستم کریسپر اولین بار به عنوان سیستم دفاعی باکتری اشریشیاکلی علیه ویروس‌ها کشف شد. کریسپر باعث ایجاد برش دو رشته‌ای در DNA هدف شده و این برش توسط سیستم ترمیمی مستعد خطا و یا نوترکیبی همولوگ ترمیم می شود. تاکنون بیش از سیزده سیستم کریسپر مختلف شناسایی شده که در سه گروه طبقه بندی می‌شوند]۵[. رایج ترین سیستم کریسپر، CRISPR–cas۹ تیپ دو بوده که از باکتری استرپتوکوک پایوژنز گرفته شده و دارای یک توالی ۳ نوکلئوتیدی به نام(PAM NAG یا NGG) است. CRISPR–cas۹ توالی PAM را در DNA هدف

شناسایی کرده و سه یا چهار نوکلئوتید بالادست آن را برش می‌دهد. در سیستم‌های طراحی شده یک توالی sgRNA وجود دارد که عملکرد دو RNA یعنی crRNA و tracrRNA را بر عهده دارد (۴،۲). در سیستم طبیعی کریسپر، crRNA ناحیه‌ی ثابت بین قطعات مختلفی از ژنوم ویروس در ژنوم باکتری است. tracrRNAنیز بعد از جفت شدن نسبی با crRNA باعث جذب پروتئین Cas۹ به سیستم کریسپر شده و در ادامه Cas۹ با خاصیت اندونوکلئازی خود برش دلخواه



شکل۲: برش دو رشته ای توسط کریسپر[۵]

را ایجاد می‌کند (شکل۱). DNA بعد از برش توسط کریسپر دو مسیر احتمالی را ادامه خواهد داد. مسیر اتصال پایانه های غیرهمسان که مستعد خطا بوده ولی کارآیی بالاتری داشته و دیگری مسیر نوترکیبی همولوگ که طبق الگوی DNA طراحی شده صورت می‌گیرد.

این دو سیستم بعد از برش در سلول با هم در رقابت بوده و در بعضی از سیکل‌های سلولی مسیر اتصال پایانه های غیرهمسان توسط سلول ترجیح داده می شود. به علاوه، چنانچه DNA همولوگی که طراحی می‌شود همولوژی بیشتر و طول کوتاه تر داشته باشد (حدود ۴۰۰جفت باز) ، احتمال انجام نوترکیبی همولوگ بیشتر خواهد بود (شکل۲). میزان اختصاصیت کریسپر و عدم اثر همزمان آن بر روی ژن‌های دیگر از نگرانی‌های موجود در این زمینه است. اخیراً در ویروس‌ها پروتئین‌های ضد کریسپری شناخته شده که حافظه‌ی ایمنی ویروسی کریسپر را در باکتری به کلی پاک کرده و این موضوع بر چالش‌ها و نگرانی‌های مربوط به کریسپر افزوده است. با این وجود، پیش بینی شده است که این سیستم می‌تواند در آینده نزدیک جهت درمان بیماری‌های ژنتیکی متفاوت مورد استفاده قرار گیرد (۵).

برای انتقال کریسپر به درون سلول سه روش وجود دارد:

- وارد نمودن ژن Cas۹ و sgRNA درون وکتور پلاسمیدی و قرار دادن آن در لیپوزوم
- وارد کردن mRNA مربوط به Cas۹ و sgRNA از طریق لیپوزوم
- وارد کردن پروتئین Cas۹ به همراه sgRNA به لیپوزوم (شکل۳)

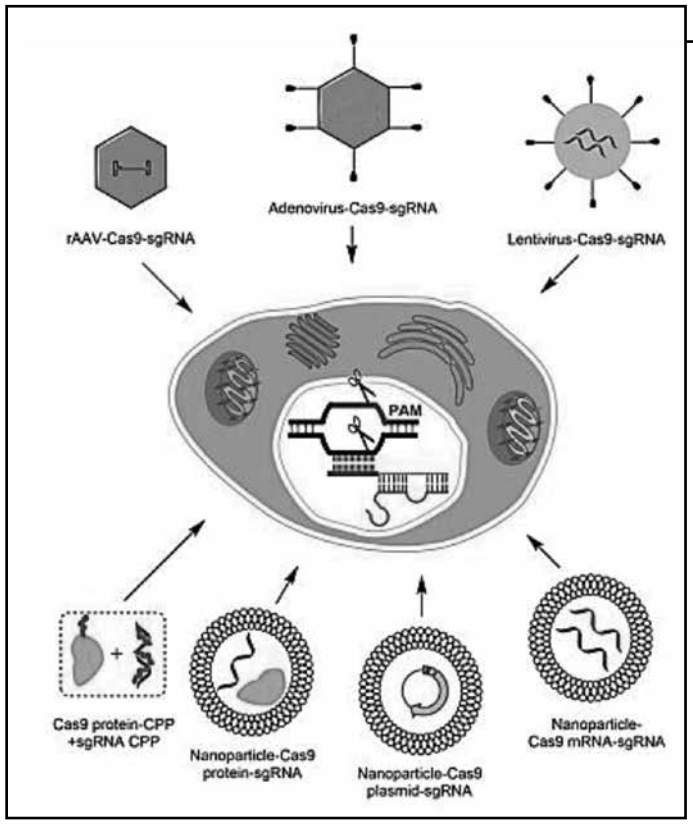
در راستای افزایش اختصاصیت عملکرد سیستم می‌توان از پوشش سطح لیپوزوم‌ها با استفاده از مولکول‌های خاصی که با رسپتور سطح سلول هدف واکنش می‌دهند استفاده کرد. به علاوه از وکتورهای ویروسی مانند وکتورهای آدنوویروسی Adeno associated virus، رتروویروس و لنتی ویروس نیز می‌توان در سیستم کریسپر استفاده کرد. در این موارد باید طول ژن Cas۹ کاهش یابد و به این منظور استفاده از سیستم کریسپر جداشده از باکتری استافیلوکوک اورئوس پیشنهاد می‌شود. در این ارتباط، ایمنی علیه وکتورهای ویروسی نیز مطرح شده که با استفاده از Adeno associated virus به جای آدنوویروس‌ها قابل حل است. به طور کلی استفاده از وکتورهای ویروسی بازده کار را افزایش می‌دهد(۴).

امروزه سیستم کریسپر کاربردهای گسترده‌ای در حوزه‌ی سرطان داشته که از آن جمله می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

بررسی‌های اپی ژنتیک سرطان (۴)، خاموش و روشن کردن ژن‌های دخیل در ایجاد سرطان، مدل سازی سرطان، بررسی دومین‌های پروتئینی دخیل در سرطان به منظور ارزیابی اهداف دارویی، بررسی و مدل سازی سرطان‌هایی که چند ژن در آن دخیل است و یا سرطان هایی که ناشی از به هم ریختگی و بازآرایی کروموزوم هاست، شناسایی ژن های دخیل در ایجاد سرطان و غیره (۹،۸،۷،۲). سیستم کریسپر جهت کاربردهای پزشکی شخصی نیز استفاده می‌شود. به این صورت که سلول‌های بنیادی جنینی را از یک فرد گرفته، با کریسپر ویرایش کرده و آنگاه مجدداً آن را به فرد بیمار تزریق می‌کنند (۲) (شکل۴). به این ترتیب هر فرد متناسب با ویژگی های ژنتیکی خود تحت درمان قرار گرفته و مستقیماً ژن های معیوب او اصلاح می شوند.

گاهی اوقات با ایجاد جهش در دومین های پروتئینی Cas۹ (NHN – RUVC) کریسپرهایی ایجاد می‌کنند که خاصیت اندونوکلئازی نداشته و جهت اهداف هدف‌گیری و آنزیمی خاص به کار می‌روند (شکل۵)(۱۰،۲). به این ترتیب که جهش‌های هدفمند ایجاد شده در Cas۹ باعث می‌شود تا این پروتئین خاصیت اندونوکلئازی و برش دادن خود را از دست داده ولی همچنان به خاطر وجود توالی‌های sgRNA بتواند مکان ژنی هدف خود را شناسایی کرده و به آن متصل شود. کاربرد این سیستم این است که آنزیم‌های دیگری را به دنباله Cas۹ وصل می کنند تا همراه با Cas۹ به مکان هدف متصل گشته و به جای ایجاد برش، آن آنزیم فعالیت مخصوص خود را انجام دهد.

به طور کلی می‌توان گفت که کریسپر به عنوان ابزار دستکاری ژنوم در آینده نزدیک بخش‌های متفاوتی از سرطان شامل حوزه‌های تشخیصی، درمانی و کلینیکی را تحت تأثیر قرار خواهد داد. در ادامه به بررسی برخی از یافته‌های جدید در ارتباط با کاربردهای اختصاصی سیتم کریسپر در سرطان خواهیم پرداخت.



شکل۳: وارد کردن کریسپر به سلول هدف

چگونگی عملکرد سیستم کریسپر

تا دهه پیش تصور بر این بود که ایمنی اکتسابی یکی از ویژگی‌های یوکاریوت‌ها بوده، اما کشف کریسپر و مشاهده این سیستم در باکتری‌ها و آرکئی باکترها در سال ۲۰۰۷ این تفکر را تغییر داد. در ادامه مکانیسم عملکرد سیستم کریسپر به طور مختصر بررسی می‌شود.

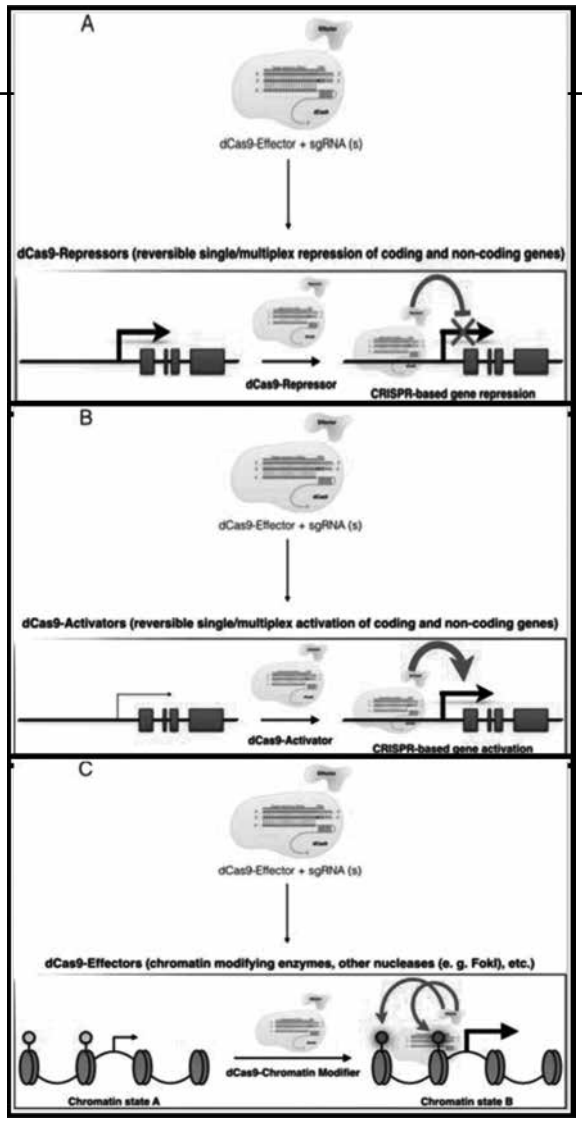
بررسی عملکرد سیستم کریسپر در سه مرحله قابل توضیح است:

۱) مرحله سازگاری

۲) مرحله بیان و بالغ سازی

۳) مرحله تداخل

در مرحله ی اول توالی protospacer از DNA مهاجم خارج شده و درون آرایه کریسپر (Crisper array) ذخیره می شود. در این راستا، ابتدا DNA خارجی به عنوان هدف برای کسب spacer شناخته می شود. این عمل توسط کمپلکس cas۱–cas۲ که از دو دایمر cas۱ و یک دایمر cas۲ تشکیل شده انجام می‌شود. پس از شناسایی توالی pro-tospacer و شناسایی آن توسط کمپلکس cas۱–cas۲ این توالی به عنوان یک spacer جدید به درون آرایه‌ی کریسپر جای داده شده و توالی تکراری نیز مضاعف می‌شود. در مرحله بیان و بالغ سازی، آرایه‌ی کریسپر رونویسی شده و سپس به crRNA های بالغ پردازش می‌گردد که هر کدام حاوی یک توالی spacer و قسمتی از توالی تکراری است. سپس crRNA به همراه پروتئین cas تشکیل یک ریبونوکلئوپروتئین را می‌دهد. در مرحله تداخل، کمپلکس (crRNA–cas(RNP، DNA هدف را از طریق جفت بازهای مکمل و حضور توالی PAM شناسایی کرده و سپس DNA هدف از طریق نوکلئازهای خاص برش می‌خورد (شکل۶)(۱۱). برش DNA دو رشته‌ای در سلول یوکاریوتی از طریق دو سیستم ترمیمی NHEJ و HDR بازسازی می‌شود (شکل۷). روش اول که در مکانیسم‌های سلولی غالب‌تر بوده و در فاز G۱ و G۰ سلول اتفاق می‌افتد، معمولاً منجر به تولید indel کوتاه در توالی هدف می‌شود. به همین دلیل این روش برای ایجاد جهش‌های تغییردهنده‌ی توالی کد کننده پروتئین مورد استفاده قرار می‌گیرد. روش دوم HDR، معمولا در فاز S و G۲ فعال بوده و از توالی همولوگ حاضر در ژنوم سلول استفاده می‌کند. بنابراین می توان از آن برای مهندسی دقیق ژنوم و بازسازی نقص‌های ژنی استفاده کرد(۱۲).



شکل٤: کریسپر و پزشکی شخصی]۲[

مدل سازی سرطان از طریق فعالسازی ژن‌های مهار کننده‌ی تومور و غیرفعالسازی ژن‌های سرطان زا

از جمله کاربرد های سیستم کریسپر می‌توان به مدلسازی سرطان‌های مختلف اشاره کرد. در گذشته ایجاد مدل‌های سرطانی موشی نیازمند ترانس ژن‌های مهندسی شده از لحاظ ژنتیکی و یا نوترکیبی همولوگ در سلول‌های بنیادی جنینی بوده است. این روش‌ها زمان‌بر و پر هزینه بوده و در نهایت منجر به تولید مدل‌های سرطانی دارای جهش‌های یگانه و یا دوگانه می‌شود. امروزه با به کارگیری سیستم کریسپر می‌توان در طی چهار هفته جهش‌های ژنتیکی دلخواه را ایجاد کرد. بنابراین با به کارگیری سیستم کریسپر می‌توان مدل‌های جنسی و سوماتیکی سرطان را از طریق مسیر آسان‌تر و کوتاه‌تر انجام داد (شکل۸). مدل‌های موشی جنسی از طریق ایجاد جهش‌های سرطانی در سلول های بنیادی جنینی موش و یا جنین موش ایجاد شده که ناشی از شکست در دو رشته DNA در جایگاه خاص به وسیله سیستم کریسپر و در مرحله تک سلولی جنینی است. در حالیکه برای مدل‌های سوماتیکی سیستم کریسپر به بافت درون بدن موجود زنده تزریق می شود. با توجه به اینکه بسیاری از سرطان های غیر خانوادگی در اثر تجمع جهش‌های ژنتیکی در سلول‌های سوماتیکی ایجاد می‌شوند، از مدل‌های سرطان سوماتیکی موش برای بررسی طبیعت سوماتیکی پیشرفت سرطان در طی نسل‌ها استفاده می‌شود(۱۳).

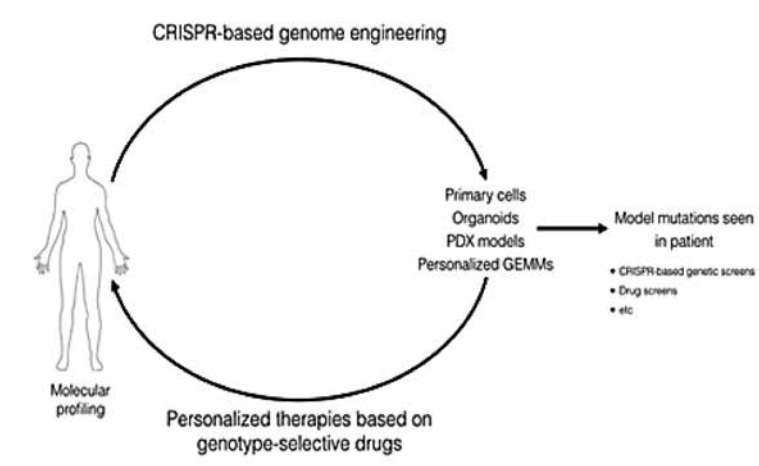
با به کارگیری سیستم کریسپر می توان مدل های سرطانی ایجاد کرد که در آنها بازآرایی کروموزومی صورت گرفته و یا جهش های کسب یا از دست دادن عملکرد اتفاق افتاده است. در ادامه مثال‌هایی از نمونه‌های مختلف به کارگیری سیستم کریسپر برای ایجاد تغییر در ژن‌های موثر در سرطان مورد بررسی قرار می‌گیرد. برای مثال سارکوماها گروهی از تومورهای هتروژن بوده که ۵۰ نوع متفاوت دارند. تغییرات متفاوتی در ژنوم می‌توانند منجر به سارکوما شوند. با وارد کردن ترکیبی از sgRNA و cas۹ از طریق وکتور lentiviral در یک سلول بنیادی سازنده خون جهش‌های از دست دادن عملکرد ایجاد شده در ژن‌های EZH۲، NF۱، RUNX۱، DNMT۳A، TET۲ منجر به میلوما شد. همچنین با ایجاد جهش‌های از دست دادن عملکرد در ژن‌های کد کننده‌ی تنظیم کننده‌های اپی ژنتیکی، فاکتورهای رونویسی و حد واسط‌های مسیر سیگنالینگ سیتوکاین ها مثل TET۲،DNMT۳a،RUNX۱، NF۱، SMC۳، P۵۳، ASXL۱، EZH۲ دانشمندان قادر به تولید مدل لوکمی میلوئیدی حاد شدند. جهش کسب عملکرد در ژن KRAS نیز در سلول بنیادی روده‌ای انسان با کمک سیستم CRIS-PR/cas۹ انجام شده است.

همچنین در تعدادی از تومورهای سارکوما ناهنجاری در تعداد و ساختار کروموزوم‌ها دیده شده است. در این موارد نیز سیستم کریسپر کاربرد داشته و مشکلات ایجاد این ناهنجاری‌های خاص را برطرف نموده و بررسی عملکرد و رفتار آنها را در رده‌های سلولی آسان نموده است. سه نوع بازآرایی کروموزومی توسط سیستم کرسپر به طور موفقیت آمیزی ایجاد شدند که منجر به پیشرفت سرطان ریه می‌شود. این سه نوع بازآرایی شامل جابجایی CDV٤–ROS۱، وارونگی EML٤–ALK و KLFSB RET هستند (١٤). در آزمایش دیگری ژن snail۱ از

طریق سیستم کریسپر سرکوب شد. ژن snail۱ یک فاکتور رونویسی را کد کرده که تبدیل بافت اپی‌تلیال به مزانشیمال را القا می‌کند. در طی این القا سلول‌های اپی تلیال اتصالات خود را از دست داده و اسکلت سلولی خود را باز آرایی کرده و همچنین بیان ژن خود را دوباره برنامه ریزی می‌کنند. رده سلولی حاوی سلول های دارای ژن سرکوب شده‌ی snail۱ از طریق کریسپر، افزایش اتصالات سلول به سلول و کاهش اتصالات سلول- سوبسترا و مهاجرت سلولی را در سلول‌های سرطانی تخمدان نشان می‌دهند(۱۵).

در مثالی دیگر، کریسپر در ارتباط با سرطان گردنه رحم (دومین سرطان شایع در خانم ها) مورد استفاده قرار گرفته است. منشا اصلی این سرطان فاکتورهای HPV و HR و به خصوص HPV۱ وHPV۱٦ است. در مراحل اولیه آلودگی به HPV دو آنکوژن E٦ و EV بیان می شود. این دو انکوژن در بر هم زدن چرخه‌ی معمول سلولی نقش دارند. در طی آزمایشاتی با به کارگیری سیستم کریسپر، انکوژن EV در رده‌های سلولی دارای سرطان گردنه رحم که HPV۱٦ مثبت بودند حذف شد و در نهایت مرگ و سرکوب رشد مشاهده شد (۱٦).

یکی دیگر از راه‌های سریع و دقیق برای شناخت بیولوژی سرطان‌ها، بازسازی مجموعه‌های ژنی دخیل در ایجاد تومور در سلول‌ها یا موجودات خاص توسط سیستم کریسپر است. یکی از مزیت‌های این سیستم، امکان ایجاد و بررسی هم‌زمان چند جهش ژنی در شرایط in vivo بوده زیرا معمولاً توالی‌یابی ژنوم بیماران سرطانی تعداد زیادی جهش نقطه ای و بازآرایی‌های ژنتیکی را نشان می‌دهد. در گذشته مدل‌های سرطانی با استفاده از بیان اگزوژن ژن‌های دست ورزی شده توسط نوترکیبی همولوگ ایجاد می‌شدند. در این راستا از نوکلئاز های خاصی در روش‌های ZFNs و TALENs برای افزایش دقت کار استفاده می‌شد. در این روش‌ها، برهمکنش DNA–Proteinهدف قرار می‌گیرد. این در حالی است که کریسپر مستقیماً توسط sgRNA مکان ژنی خاصی را در ژنوم مورد هدف قرار داده و از آنجایی که ساخت و انتقال RNA به درون سلول آسان‌تر از طراحی دمین‌های پروتئینی است، مزیت کریسپر نسبت به روش‌های قدیمی مشخص می‌شود. این تکنیک برای انواعی از مدل‌ها شامل انسان، موش، رت، گورخرماهی، مگس میوه و میمون رزوس به کار می‌رود. تغییرات ژنومی زیادی شامل جابجایی، مضاعف شدن، حذف، واژگونی و جهش‌های نقطه‌ای که منجر به غیر



شکل۵: کاربردهای کریسپر مرده (۲)

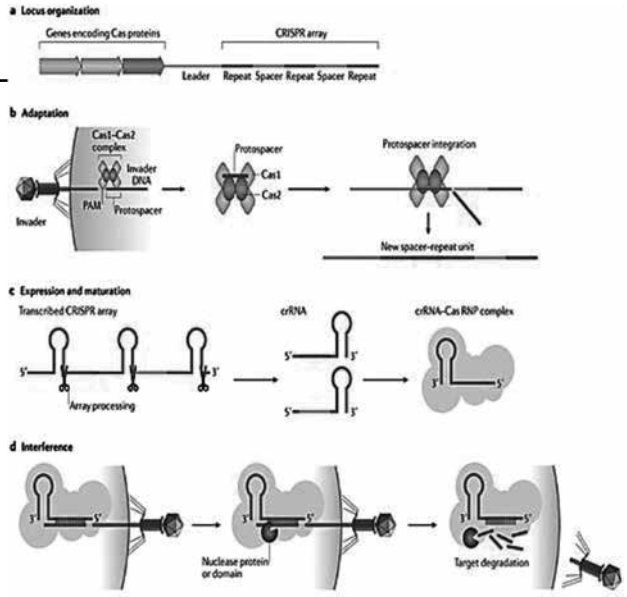
فعال شدن ژن‌های سرکوب کننده‌ی تومور یا فعال شدن ژن های سرطانی می‌شود و یا تغیر در ژن‌های سیستم ترمیمی در ایجاد تومور موثر می باشند. امکان شبیه سازی تمام این تغییرات با استفاده از سیستم دقیق و نسبتاً آسان کریسپر وجود دارد (۱۷).

کاربرد سیستم کریسپر در مدلسازی بازآرایی کروموزومی در شرایط in vitro

سیستم کریسپر این توانایی را دارد که شکست دورشته ای ایجاد شده درDNA را به طور دقیق بازآرایی نماید به گونه ای که مشابه بازآرایی ایجاد شده در سرطانی خاص باشد. به این منظور، یک جفت پلازمید بیان کننده cas۹ و دو sgRNA نیاز است که نقطه شکست را هدف قرار می دهند. در ادامه به برخی مطالعات که در آنها سیستم کریسپر برای مدلسازی بازآرایی کروموزومی مورد استفاده قرار گرفته است، اشاره می‌شود:

- ایجاد جابجایی کروموزومی Ewing sarcoma hallmark در رده سلولی HEK۲۹۳ و سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی
- ایجاد یک جابجایی کروموزومی ریه در سلول های HEK۲۹۳ و AALE. دو وارونگی پاراسنتریک (با شکست در بازوی کوتاه کروموزوم ۲انسانی) و پری سنتریک (در دو بازوی کروموزوم ۱۰ انسانی) عامل سرطان ریه
- ایجاد جابجایی کروموزومی عامل AML در سلول های CD ۳٤+ و HEK۲۹۳ انسانی

در این مطالعات نشان داده شده که هرچه فاصله ی بین دو شکست بیشتر باشد، کارایی سیستم کریسپر در بازسازی بازآرایی های کروموزومی کاهش می‌یابد.



شکل ۶: مکانیسم عمل کریسپر[۱۱]

کریسپر در مدلسازی جهش‌های نواحی غیرکدکننده و یا توالی پروموتور

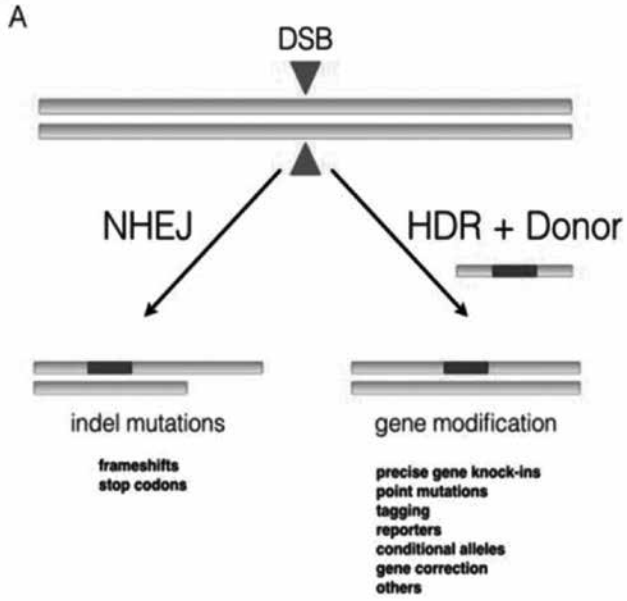
آزمایشی که در این زمینه انجام شده درمورد بررسی اثرات تغییر پروموتور TERT(Telomerase reverse transcriptase) در بسیاری از فرایندهای نئوپلاستیک بوده است. در این مطالعه با استفاده از دو sgRNA مجاور هم توانستند حذف‌هایی را در این پروموتور در سلول‌های بنیادی جنینی انسانی ایجاد نمایند که منجر به سرطان شد. البته تغییری در طول تلومر سلول‌های بنیادی مشاهده نشد. اما در زمان تمایز سلول‌ها به سلول‌های سوماتیکی، این جهش منجر به خاموش نشدن ژن تلومراز برخلاف سلول‌های کنترل و در نتیجه منجر به ایجاد تلومرهای بلند شد.[۱۷]

مدلسازی جهش‌های هدفمند توسط سیستم کریسپر

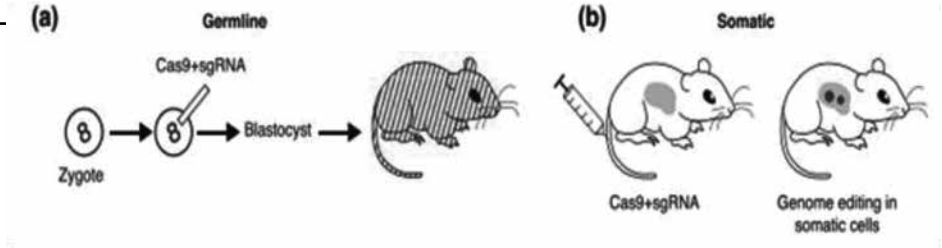
توانمندی تغییر ژنوم سلول‌های سوماتیکی سبب پی بردن به عملکرد ژن‌های مختلف به ویژه در بیولوژی سرطان می‌شود. محققان در سال ۲۰۱٤ برای اولین بار توانستند توسط سیستم کریسپر به طور هم‌زمان چندین جهش هماهنگ را القا نمایند. بدین صورت می‌توان هم زمان چندین پارامتر دخیل در انواع سرطان‌ها را بررسی نمود. در واقع از دو لنتی ویروس که به هم متصل شده بودند، برای بیان اجزای کریسپر در یک سلول HSPC موش استفاده کردند تا ۵ ژن را به صورت ex vivo تغییر دهند. جهش‌های فقدان عملکرد ایجاد شده در این سلول‌ها سبب طراحی مدل AML شد. این ژن‌ها، ژن های کدکننده‌ی تغییر دهنده‌های ژنتیکی، فاکتورهای رونویسی و حدواسط های سیگنالینگ سیتوکین‌ها بودند. سرطان دیگری که توسط مهندسی هم زمان چند هدف بررسی شده، سرطان روده می‌باشد. این بررسی ها روی سلول های بنیادی روده صورت گرفته است.[۱۷]

کاربرد کریسپر در مدلسازی تغییرات انکوژن در شرایط in vivo

یک مزیت سیستم کریسپر نسبت به سیستم های ویرایش قبلی مانند Cre/loxp امکان مدلسازی در سلول‌های سوماتیکی بالغ است. اولین مطالعه در این زمینه در اکتبر۲۰۱٤منتشر شد. پلازمید بیان کننده cas۹و sgRNA یک ژن منفرد یا به طور هم زمان ترکیبی از دو ژن را در سلول‌های کبد موش بالغ هدف قرار داد. این عمل منجر به ایجاد جهش‌های فقدان عملکرد در ژن‌های PTENیا P۵۳ یا هر دو ژن شد. بعد از سه ماه موش‌ها دارای تومورهای کبدی شدند. در نهایت محققان به این نتیجه رسیدند که انتقال پلاسمید بیان کننده‌ی کریسپر به همراه یک DNA تک رشته‌ای سبب جهش‌های کسب عملکرد از طریق نوترکیبی همولوگ می‌شود. در آزمایش دیگری که هدف ایجاد تومورهای ریوی در موش بود، سه sgRNA ژن‌های سرطان زا KRAS و ژن‌های سرکوب کننده تومور p۵۳ و Ikb۱ را هدف قرار دادند. همچنین بررسی‌های دیگری روی سرطان پانکراس و رشد سریع تومور صورت گرفته است(۱۷).



شکل۷: نحوه ی ترمیم برش ایجاد شده



شکل۸: انواع مدل های سرطانی در موش

سیستم کریسپر و فاکتورهای اپی ژنتیکی سرطان

متیلاسیون DNA و متیلاسیون و استیلاسیون هیستون‌ها که عوامل تنظیم بیان ژن‌ها است، از عوامل اپی ژنتیک محسوب می‌شود. در بعضی از سرطان‌ها آنزیم‌هایی که مسوول این تغییرات هستند دچار مشکل بوده و باعث غیرفعال شدن ژن‌های سرکوبگر سرطان و یا فعال شدن ژن‌های سرطان‌زا می شود. با استفاده از سیتم CRISPR–cas۹ می‌توان ژن‌های مورد نظر را خاموش و روشن کرد. حتی می‌توان از کریسپر مرده که فعالیت اندونوکلئازی خود را از دست داده استفاده نمود تا روی فعالیت آنزیم‌های مرتبط با اپی ژنتیک اثر بگذارد و فعالیت برگشت‌پذیر متیلاسیون و استیلاسیون را انجام دهد. کریسپر جهش‌های ژنی درآنزیم‌های مرتبط با اپی ژنتیک را با فرآیند برش در دورشته DNA و نوترکیبی همولوگ یا سیستم ترمیمی ایجاد خواهد کرد. این فرایند پایدار خواهد بود(٤).

نتیجه گیری

سیستم کریسپر یک ابزار ویرایش ژنی جدید است که در مقایسه با سیستم های قبلی پتانسیل‌ها و کاربردهای بیشتری دارد. از جمله ی این کاربردها می‌توان به کاربرد کریسپر در شناخت بیماری‌های ژنتیکی و اپی ژنتیکی مختلف مثل سرطان اشاره کرد. بررسی سرطان توسط سیستم کریسپر به دو روش شامل خاموش کردن ژن‌های سرطان‌زا و روشن کردن ژن‌های مهار کننده تومور انجام می‌گیرد. همچنین با توجه به قابلیت دقیق کریسپر، می توان از این سیستم جهت ایجاد جهش های دقیق در رده‌های مختلف سلولی به منظور مدلسازی سرطان‌های متنوع استفاده نمود. این گونه مدل سازی ها به شناسایی بهتر سرطان و توانایی تولید داروهای مؤثر می انجامد.

منابع

1.Brock Biology of Microorganisms; Madigan, Martinko, Stahl, Clark.

2. Sánchez-Rivera, Francisco J.; Jacks, Tyler; Applications of the CRISPR-Cas9 system in cancer biology. Nat Rev Cancer. 2015 July ; 15(7): 387–395.

3. Sachdeva M, Sachdeva N, Pal M, Gupta N, Khan IA, Majumdar M, Tiwari A. CRISPR/Cas9: molecular tool for gene therapy to target genome and epigenome in the treatment of lung cancer. Cancer gene therapy. 2015; 22: 509-517.

4. Yao, Shaohua; He, Zhiyao; Chen, Chong; CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing of Epigenetic Factors for Cancer Therapy. HUMAN GENE THERAPY ; 2015; VOLUME 26 NUMBER 7.

5. Ahmed Khan, Faheem; Pandupuspitasari, Nuruliarizki Shinta ; et al. CRISPR/Cas9 therapeutics: a cure for cancer and other genetic diseases. Oncotarget, 2016.

6. Calvin B. Harley; Telomerase and cancer therapeutics. Nature; march 2008 , volume 8.

7. Maresch, Roman; Mueller, Sebastian; Veltkamp, Christian ; et al. Multiplexed pancreatic genome engineering and cancer induction by transfection-based CRISPR/Cas9 delivery in mice. Nature; 2016.

8. Shi, Junwei; Wang, Eric ; et al. Discovery of cancer drug targets by CRISPR-Cas9 screening of protein domains. Nat Biotechnol. 2015 June ; 33(6): 661–667.

9. Weber, Julia; Öllinger, Rupert; Friedrich, Mathias ; et al. CRISPR/Cas9 somatic multiplex-mutagenesis for high-throughput functional cancer genomics in mice. PNAS. November 10, 2015. vol. 112.

10. Jinek M, et al. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. Science. 2012; 337:816–821.

11.Amitai, Gil; Sorek, Rotem. CRISPR-Cas adaptation: insights into the mechanism of action. Nature. 2016.

12. Kannan, Ram; Ventura, Andrea. The CRISPR revolution and its impact on cancer research. Swiss Med Wkly. 2015;145:w14230.