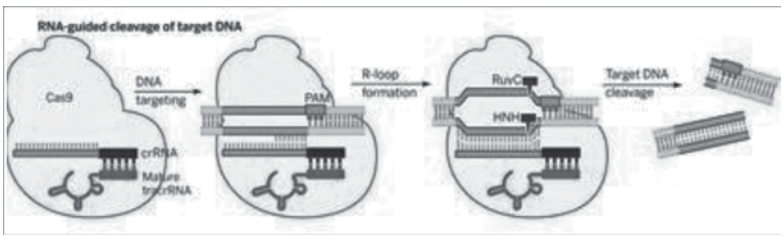
امیرحسن فرضعلیزاده؛ پژوهشگر تحقیقاتی زیست فناوری پزشکی و سیستم بیولوژی سرطان
دکتر طاهره ناجی؛ دانشیار گروه سلولی و مولکولی، دانشکده علوم و فناوری های نوین

سیر تکاملی ابزارهای ویرایش ژنوم و جایگاه تکنیک CRISPR در ژن درمانی —بخش دوم

توالی ژنی سیستم CRISPR/Cas شامل چند قسمت است که به ترتیب از ۵: شامل ژن های Leader، Cas، tracrRNA sequence، توالی تکراری و توالی غیرتکراری Spacer است.

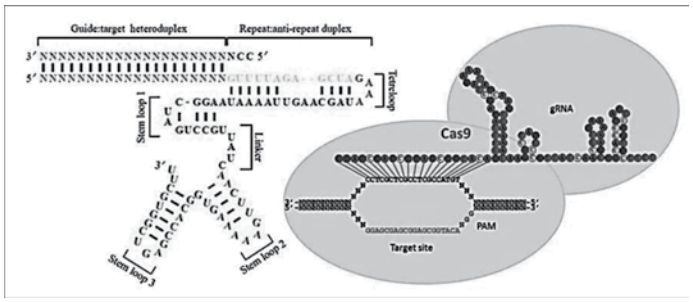
لوکوس های کریسپر دارای ترکیبی از پروتئین های مرتبط با کریسپر (Cas) و همچنین عناصر RNA غیر کد کننده هستند که باعث برش هدفمند نوکلئیک اسید می گردد. درواقع عملکرد کریسپرها و پروتئین های Cas، باعث ایجاد ایمنی در باکتری ها در مقابل حمله ویروس ها و پلاسمید هاست. یک ویژگی مهم هر لوکوس کریسپر، وجود یک آرایه از توالی های تکراری (تکرارهای مستقیم) است که به وسیله تکرارهای کوتاهی از توالی های غیرتکراری (spacers) از هم فاصله گرفته اند. Spacer ها، توالی هایی هستند که منشأشان از ژنوم های مهاجم (فاژو پلاسمید) در درون باکتری است. در اصل بخشی حیاتی از ژنوم عنصر مهاجم هستند که یک کپی از آن در ژنوم باکتری و در درون آرایه CRISPR نگه داشته می شود که مانند سلول های خاطره سیستم ایمنی انسان عمل می کنند.

به خاطر گستردگی تاریخی ویرایش ژنومی «کریسپر» و تنوع ساختاری آن به لحاظ تفاوت در توالی های PAM(Protospacer Adjacent Motif) و نوع پروتئین های Cas، در این نوشته فقط تیپ نوع II آن که به عملکرد پروتئین Cas9 دلالت دارد مورد بحث قرار می گیرد. آنزیم اندونوکئاز Cas9 کار برش DNA مهاجم را به دو تکه انجام می دهد و به محض اتصال پروتئین Cas9 به DNA مهاجم، این پروتئین توالی DNA خارجی مکمل crRNA و توالی مقابل آن را به ترتیب از طریق دومین های نوکلئازی HNH و RuvC1 می برد و باعث جلوگیری از همانندسازی عامل مهاجم می شود (شکل-۱)



شکل ۱- نحوه برش توالی هدف توسط کریسپر به کمک دومین های نوکلئازی HNHو RuvC1

در سال ۲۰۱۲جنیفر دودنا و همکارانش براساس توالی crRNA و tracrRNA، سکانسی مشابه را در آزمایشگاه سنتز کردند و به جای توالی spacer، توالی همولوگ با ناحیه هدف مورد نظر را در DNA قراردادند و دو توالی سنتز شده crRNA و tracrRNA را با لینکر به هم متصل کردند و آن را sgRNA (RNA راهنمای تک رشته ای)نام نهادند. sgRNA با پروتئین Cas9 تشکیل کمپلکس داده و پس از لینک شدن با توالی هدف، به صورت کاملا اختصاصی ناحیه هدف را برش می زند. بدین ترتیب امکان استفاده از سیستم CRISPR/Cas9 در ویرایش ژنوم سایر موجودات از جمله انسان فراهم شد (Chakraborty et al, ۲۰۱٤). (شکل-۲)



شکل ۲- طراحی sgRNA تشکیل کمپلکس sgRNA-Cas9 جهت ایجاد برش های هدفمند

توانایی ویرایش دقیق و هدفمند هرنقطه ای از ژنوم موجودات برای سال های طولانی آرزوی دانشمندان بوده است و امروزه دانشمندان بیش از گذشته به این هدف نزدیک شده اند. با کشف سیستم CRISPR/Cas9 ، دانشمندان اکنون قادر به خاموش کردن (knock–out) و وارد کردن (knock– in) هر ژنی در هر نقطه ای از ژنوم هستند. ویرایش ژنوم بر اساس سیستم CRISPR Cas9، یک ابزار کارآمد و با پتانسیل است که قادر به کنارزدن و جایگزینی با روش های قدیمی مانند Zinc Finger و TALEN است. از این تکنیک به عنوان قیچی جراحی ژنوم و معجزهای پیش رو برای درمان بیماری های ژنتیکی یاد می شود. فناوری "کریسپر" که به زبان ساده بریدن و جدا کردن ژن معیوب از ترکیب ژنتیکی سلول است شیوه ای سریع‌تر و ارزان‌تر و دقیق‌تر از شیوه‌های رایج فعلی در ویرایش ژن است. از این سیستم می توان در درمان بیماری های ژنتیکی با استفاده ار تغییر در ژن عامل بیماری (Gene Therapy) استفاده کرد. از جمله بیماری های ژنتیکی تک ژنی، بیماری های سرطان، بیماری های ویروسی نظیر هپاتیت و...

ابزارهای جدید بر پایه سیستم (CRISPR)

طبقه بندی Makarova و همکارانش نشان داد که بر اساس نوع پروتئین Cas که باcrRNA تشکیل کمپلکس می دهد، سیستم CRISPR/Cas به ۵ نوع و ۱۶ زیرنوع (Subtypes) تقسیم می شود. در تمام این ۵ نوع، Cas2/Cas1 مشترک بوده و مسئول جداسازی و درج Spacer است. پروتئین Cas۹ از سیستم کریسپر کلاس ۲ منشا گرفته است. سیستم های کریسپر کلاس۲ ، حاوی پروتئین های Cas با عملکرد چندگانه هستند که به واسطه اتصال به crRNA به سوی هدف خود هدایت شده و DNA را برش می دهند. کلاس۲ کریسپر خود به انواع مختلفی شامل (V) ، (II) و (IV) تقسیم می شود. آنزیم Cpf1 یک اندونوکلئاز نوع (V) است که در سلول های پستانداران فعالیت می کند. آنزیم اندونوکلئاز Cpf1 یا FnCpf1 که برای اولین بار از عملکرد باکتری Francisella novicida U112 شناسایی شد نمونه ای جدید از آنزیم های سیستم CRISPR/Cas هست که برای مهندسی ژنوم معرفی شده است. سیستم CRISPR/Cpf1 را می توان مانند سیستم CRISPR/Cas9 برای ویرایش ژنوم به کار برد(شکل–۹). این آنزیم چندین برتری نسبت به آنزیم Cas9 دارد:

۱. ایجاد انتهای برش دارای overhang که موجب تسریع سیستم تعمیریHDR می‌شود.

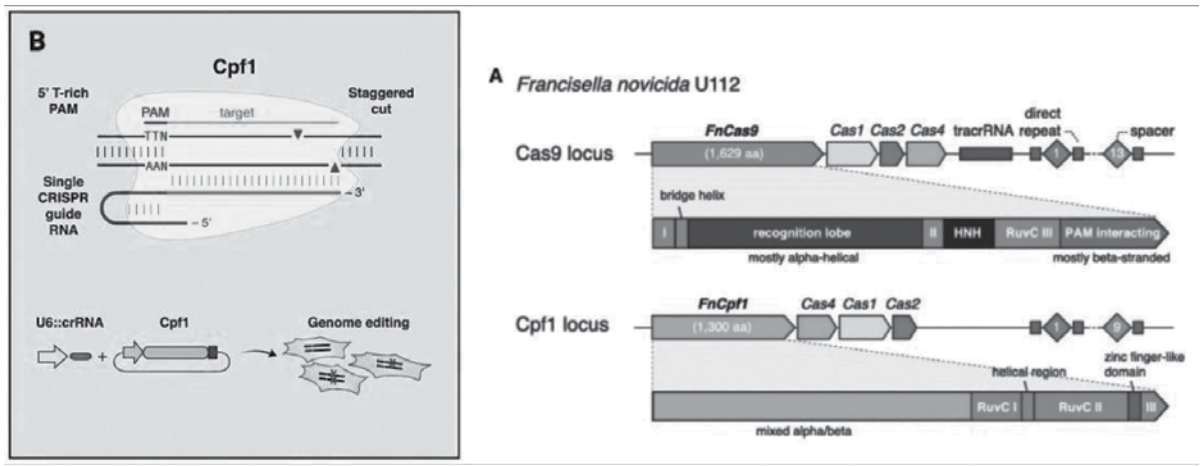
۲. تنها یک دمین برش دهنده بنام RuvC1 دارد ولی Cas9 دو دمین برشی بنام RuvC1 و HNH دارد. که این امر مهندسی Cpf1 را راحت تر می کند. مطالعات ساختاری، به تازگی یک دمین برشی ثانویه هم برای Cpf1 معرفی کرده اند که همولوگ مشخصی ندارد و در انتهای distal برش ایجاد می کند و باعث تسریع ایجاد انتهای overhang می شود.

۳. آنزیم Cpf1 علاوه بر دمین های DNase، دارای یک دمین RNase هم هست که در پیرایش RNA پیش ساز درگیر است که برخلاف Cas۹ که gRNA دو بخشی دارد، gRNA تک بخشی واحد دارد. این خود گویای All–in–one بودن آنزیم Cpf1 است.

٤. آنزیم Cpf1 برای برش DNA، هدف تنها نیازمند crRNA است و نیازی به حضور tracrRNA نیست. طول crRNA مورد نیاز برای Cpf1 در حد ٤٣ نوکلئوتید است. اما در مقابل طول sgRNA مورد نیاز برای پروتئین Cas9 باید حدود ۱۰۰ نوکلئوتید باشد. بنابراین با استفاده از crRNAهای سنتز شده و آنزیم Cpf1 می توان مهندسی ژنوم مقرون به صرفه تری نسبت به Cas9 انجام داد.

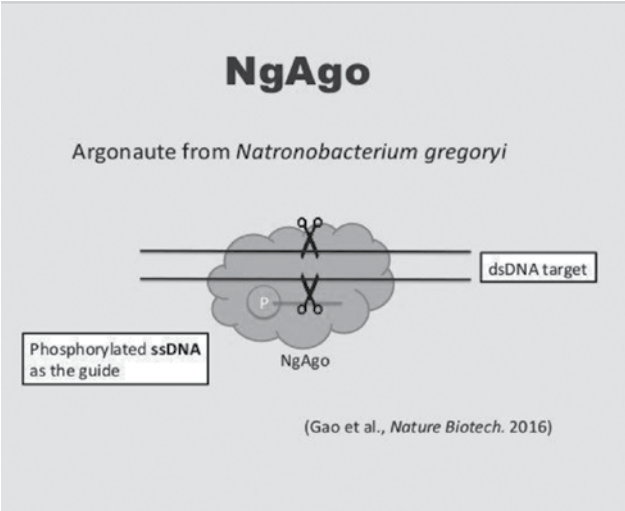
۵. ویژگی بارز نوکلئاز Cpf1شناسایی توالی های غنی از تیمیدین به عنوان PAM است.

٦. اندازه Cpf1 در مقایسه با Cas9 کوچکتر بوده که این



موضوع ترانسفکشن آن را به درون سلول ها تسهیل می کند.

شکل ۳- شماتیک کلی از ساختار و عملکرد آنزیم Cfp1 و مقایسه لوکوس ژنی آن با لوکوس Cas9 در باکتری Francisella novicida U112.



شکل ٤- ساختار و عملکرد سیستم NgAgo

سیستم NgAgo

این سیستم که بر پایه یک اندونوکلئاز خانواده آرگونات به نام Natronobacterium gregoryi Argonaute است و به طور موثری می تواند ژنوم پستانداران را با هدایت DNA ویرایش کند. این اندونوکلئازها از DNA تک رشته ای کوتاه(۲٤nt) و فسفریله شده در انتهای ۵‹ (gDNA) جهت برش توالی هدف استفاده می کنند. بنابراین می توان با ترانسفکشن NgAgo وP–ssDNA ۵‹ سنتز شده اقدام به ویرایش ژن ها کرد(شکل–٤).

از هم اکنون به کانال تلگرامی و اینستاگرام
ماهنامه تشخیص آزمایشگاهی بپیوندید
@Tashkhis_Magazine
Tashkhis_Magazine