مجله پژوهش های معاصر در علوم و تحقیقات
سال دوم، شماره ۹، فروردین ۱۳۹۹
ISSN: ۲۶۷۶-۵۷۶٤
www.jocrisar.ir

تازه ترین اقدامات انجام شده در زمینه ی ویرایش ژن به کمک کریسپر

ملیکا نصر اصفهانی[۱]

[۱] دانشجوی مقطع کارشناسی رشته ی زیست شناسی سلولی ــ ملکولی گرایش ژنتیک

چکیده

در این مقاله مروری تلاش شده است تا مجموعه ای کوچک از تحقیقات گسترده انجام شده ی اخیر در ارتباط با ویرایش ژن توسط سیستم CRISPR در زمینه های شناسایی تومور و سلول های سرطانی، درمان سرطان گردن با منشاء HPV ، شناسایی سرطان و عرضه سلول ها به سیستم ایمنی تحت عنوان MAEGI ، ایجاد تغییر در الگوی همانند سازی ژن ها ی سلول های کارسیتوما کبدی، یافتن درمانی برای بیماری های کشنده ویروسی که منشاء RNA ای دارند، تولید بیو اکتیو و آنتی بیوتیک های جدید با روش CRISPR-BEST ، و راهی برای درمان دیابت نوع ۱ (T۱D) جمع آوری و ارائه گردد.

واژه‌های کلیدی: کریسپر ، کریسپر- کس ۹ ، WRN ، کریسپر- کس ۱۳ ، CARVER، HPV، CRISPR – BEST، MAEGI، Merck's PD-۱، D۱T

مقدمه :

در دنیای امروز تلاش برای دستیابی به تازه ترین فناوری و تکنولوژی در زمینه های مختلف روبه فزونی است . یکی از زمینه هایی که توجه گسترده ای را به خود معطوف کرده است ؛ مهندسی ژنتیک و ژن درمانی می باشد . برای ایجاد تغییر در ساختار و عملکرد هر سیستمی اعم از زنده و غیر زنده نیاز به تغییر و تحول پایه ای در اجزاء شکل دهنده آن به اصطلاح مرکز فرماندهی نظام است. ژنوم ، جایگاه فرماندهی موجودات زنده می باشد پس برای بروز تغییری در ساختمان موجودات ، نیاز به ایجاد تغییر در ژن های آنان است.

Clustered Regulatory Interspaced Short Palindrome Repeats یا به اختصار CRISPR ابزاری برای اصلاح ژن است که امروزه کاربرد فراوانی در کشاورزی ، پرورش دام و طیور ، مهندسی تولید محصولات پزشکی یا تولید بافت ، صنعت غذایی و بیوتکنولوژی ، در حوزه ی انسانی و پزشکی از جمله : درمان بیماری ها با منشاء ژنتیکی ، انواعی از سرطان ها ، بیماری ها ی وراثتی مانند دیستروفی عضلانی و ... دارد.

در واقع کریسپر کس۹ نوعی سیستم ایمنی در برخی باکتری ها به حساب می آید که به طور طبیعی و در پاسخ به عوامل مهاجم ویروسی یا باکتریوفاژ ها فعال می شود . بدین گونه که کریسپر در باکتری ها قسمتی از DNA بیگانه (ویروسی) را برش داده وارد ژنوم خود باکتری کرده و در برخورد های بعدی با این عامل ، باکتری واکنش تهاجمی نشان داده ، عامل را از بین برده و در مقابل آن ویروس مقاوم می شوند .

کریسپر ؛ تاریخچه ، عملکرد و طبقه بندی سیستم کریسپر :

سیستم کریسپر برای نخستین بار در باکتری *Escherichia Coli* به عنوان یک توالی تکراری ۲۹ نوکلئتیدی با فاصله ۲۲ نوکلئتیدی توسط یک گروه تحقیقاتی در ژاپن در سال ۱۹۸۷ مطرح شد که باکتری ها و آرکی باکتری ها را از حمله باکتریوفاژ ها و پلاسمید ها محافظت می کند . این سیستم های دفاعی به یک RNA کوچک شناساگر توالی خاصی تکیه می کنند و اسید های نوکلئیک خارجی را خاموش می کند .Francisco Mojica و همکارانش در سال ۱۹۹۳ تکرار های مشابهی را در چندین گونه میکروبی دیگر یافتند .

پس از حمله به سلول توسط عناصر ژنتیکی خارجی مانند باکتریوفاژ ها یا پلاسمید ها ، آنزیم های ویژه مرتبط *CRISPR* به نام *Cas* توالی های Spacer را از توالی های Protospacer جدا کرده و آن ها را به درون لوکوس –های کریسپر موجود در ژنوم پروکاریوت ها وارد و متصل می کنند . وجود این فضا های خالی به دقت کار می –افزاید . به طور کلی کریسپر یک کپی از RNA غیر کدونی است که از نظر آنزیمی و از طریق مسیر های متمایز که برای دو نوع سیستم کریسپر منحصر به فرد است ، بالغ می شود .

سیستم کریسپر به ۵ نوع تقسیم می شود که دارای ۱۶ زیرنوع بر اساس ویژگی های مشترک و شباهت تکاملی است ؛ که بر اساس ساختار پیچیده ای که DNA ژنوم را تجزیه می کند آن را به دو دسته ی بزرگ تقسیم می کنند.

کریسپر و سرطان :

هدف گزینی سلول های سرطانی :

شناسایی صحیح و سریع سلول های سرطانی به کمک آنالیز مولکولی یا آنالیز تومور و انتخاب روش - درمان به همراه حداقل اثرات جانبی یکی از مزیت های تکنولوژی امروز برای یافتن تومور های سرطانی است . هزینه - های پایین و بازدهی بالای روش های آزمایشی و ردیابی تغییر و دگرگونی سلول های سوماتیک در تومور ها ، جهش های ایجاد شده در سرطان ملانوما ، سرطان سینه ،سرطان ریه [بدون سلول کوچک] و برخی از انواع لوکمیا و با استفاده از ایمنوتراپی امکان تشخیص و درمان بیماران مبتلا به سرطان را به ما می دهد . این عمل به کمک آنتی بادی ها با مرگ برنامه ریزی شده نوع ۱ (PD-۱) امروزه برای درمان هر نوع سرطان صرف نظر از بافت ، آزمایش شده است که بی ثباتی میکروستلایت که نشان دهنده ی تعمیر نقص های حاصل از جفت شدن اشتباهی DNA را نشان می دهد . با وجود این موفقیت های آشکار تنها عده ی کمی از بیماران از برش عمودی مولکولی تومور بهره برده اند . از معایب آن می توان به شکست در توالی یابی اکثر تومورها برای شناسایی انکوژن موتانت (غده سرطانی جهش یافته) و در اکثر موارد مواجه شدن با کمبود عوامل درمانی فعال و موثر حتی برای تایید انکوژن ها اشاره کرد .

در تازه ترین روش برای ردیابی سلول های سرطانی با کمک علم ساختار ژنوم و روش های ویرایش ژنوم برای توالی هایی که حذف هر کدام از ژن های انسان بر تکثیر و قابلیت زیستی کشت سلول های سرطانی انسان تاثیر می گذارد . از کریسپر کس ۹ برای حذف تقریبی ۱۸۰۰۰ ژن مختلف در ۳۳۹ یا ۵۱۷ کشت سلول سرطانی در روش موازی بزرگ و دسترسی پیدا کردن به هدایت حذف هر ژن .

WRN ؛ کد داخلی یک خانواده DNA ای جهش یافته Rec Q در سندروم وارنر ، برای حفاظت از سرطان های ناشی از بی ثباتی میکروستلایت به کار می رود . هلیکاز ها Rec Q ناخواسته با باز های DNA جفت می شوند و می توانند ساختار های دوم در DNA مقرر کنند ؛ به عبارت دیگر آنها عامل خطا های همانند سازی کروموزومی – اند . آنها همچنین فعالیت اگزونوکلئازی شامل حذف باز های نوکلئتیدی از رشته DNA دارند که نشان از فعالیت هلیکازی WRN که با آزادی سلول سرطانی در دارا بودن WRN سالم و بی عیب و نیز رابطه هلیکاز WRN با میکروستلایت دارد . به عبارتی WRN عامل بقاء بی ثباتی میکروستلایت است .

به کمک این روش می توان در بافت ؛ تغییر ژنتیکی به منظور هدف گزینی و شناخت اثرات جانبی سرطان که به زودی به داروی مستقیم یا آنتی بادی های هدف در می آیند ، ایجاد کرد . در این نمونه فعالیت هلیکاز WRN یک هدف تازه امید بخش در درمان سرطان می باشد .

نحوه ی انجام این روش را می توان بدین گونه بیان نمود : ادغام سلول ها سرطانی با قطعه ای از ژن باکتری حاوی لنتوویروس که توسط آنزیم کس ۹ تشخیص و هضم می شود و سپس به کمک کریسپر در محل ورود ژن هدف در دو رشته ی DNA شکست ایجاد کرده و موجب خطا در همانند سازی DNA شده که توسط مکانیسم تعمیر DNA سبب خروج ژن می شود و به این روش سلول های سرطانی نشانه گذاری و تخریب می شوند .

جلوگیری از پیشرفت سرطان گلو به کمک کریسپر :

محققین دانشگاه گریفت استرالیا از کریسپر کس ۹ برای درمان سرطان گردن با عامل ویروس پاپیلوما یا HPV در موش ها استفاده کرده اند . عفونت های پاپیلوما ویروسی انسان (HPV) عامل بیشتر سرطان های گلویی هستند . این ویروس دو ژن مشخص E۶ و E۷ را وارد ژنوم انسان ها می کند که توانایی ایجاد سرطان دارند که بهترین هدف برای کریسپر می باشند . کریسپر مقطع مشخصی از DNA که شامل ژن های سرطان است را دنبال می کند ، برش داده و سپس آن را خارج کرده و با عاملی خوش خیم و بی خطر جایگزین می کند . در این نمونه دانشمندان به جای افزودن اطلاعات بیشتر که ژن را تحریف می کند ؛ ذرات نانو ژن عامل سرطان را در سلول - های سرطانی پیدا می کند و آن را در معرض مقداری DNA اضافی که موجب بد خوانی و سپس توقف ساخته - شدن پروتئین می شود قرار می دهند . این عمل مشابه افزودن مقداری واژه اضافی در یک کلمه است که ویرایشگر آن را تشخیص نمی دهد . در این آزمایش مجموعه کریسپر در درون نانو ذرات قرار داده و سپس مخلوط را به موش های آلوده تزریق کردند . نتایج به دست آمده شگفت انگیز بود ؛ تومور ها در موش ها مورد درمان واقع شده کاملا ناپدید شد و حیوانات جان سالم به در بردند . همچنین موش ها هیچ سیگنال و پیامی مبنی بر اثرات جانبی مانند التهاب نشان ندادند . از عوارض احتمالی این روش می توان به تغییر یافتن ژن هایی که مورد بررسی نبوده اند و بروز نشانه هایی از موتاسیون های خاموش اشاره کرد . امید است تا با پیشرفت تکنولوژی در این حوزه ، بتوان از کریسپر در درمان انواع سرطان ها استفاده کرد .

MAEGI به کمک سیستم ایمنی در تشخیص سلول های سرطانی می آید :

دارو های انکولوژی ایمنی مانند : Merck's PD-۱ ، بازدارنده ی Keytruda با مسدود کردن پروتئین های مشخص سلول های سرطانی برای ردیابی گریز و تخریب توسط سیستم ایمنی استفاده می شود اما اغلب سلول ها می توانند از تبدیل شدن به اشکالی دیگر برای فرار از حمله ایمنی استفاده کنند . برای رفع این مشکل ، ترکیب کریسپر با نوعی ژن درمانی طراحی شده برای کمک به سیستم ایمنی برای پیدا کردن نقاط دشوار سلول های توموری استفاده می شود . این تکنولوژی برای قطعه ، قطعه کردن DNA و جایگزین کردن آنها نیست بلکه به منظور به دام انداختن آن برای ده ها از هزاران ژن مربوطه ی سرطان است . کریسپر سلول هایی که دارای این نوع ژن ها هستند را نشانه گذاری می کند ؛ بنابراین سیستم ایمنی می تواند آن را تشخیص دهد . به این سیستم MAEGI یا ژن های درونی پیچیده به عنوان ایمنوتراپی می گویند . MAEGI با ترانسفورمینگ یا دگرگون کردن بافت های سرطانی کار می کند . دگرگونی تومور ها از سرد به گرم به سیستم ایمنی اجازه شناسایی سرطان و شروع یک حمله را می دهد و نیز نخستین سلول های شناسایی شده به سیستم ایمنی کمک می کند که در برخورد های بعدی موثر تر عمل کند .

CTCF ؛ هدف برش کریسپر :

سازمان فضای کروماتینی برای مدل های همانند سازی و تثبیت حساس است . الگوی فعل و انفعال دور DNA از دومین های متجمع توپولوژی چند گانه زیاد فاکتور اتصال CCCTC مشخص می شود . تغییر کروماتین محلی سازنده از راه افزودن یا حذف کردن محل ها اتصال CTCF در موقعیت برای تنظیم فعالیت همانند سازی ژن ها درون یک TAD در سلول ها سرطانی و در

جست و جوی ضعیف در خانواده متالونین (MT) صورت می گیرد که به طور قابل توجهی در HCC داده ها ، TCGA کاهش داشته و خانواده ژنی MT درون TAD ، ۱,۲ مگاباز از ۱۶q۱۳ قرار داشته تا محل های اتصال CTCF توزیع شود .

کریسپر کس ۹ برای تخریب محل های اتصال CTCF در سلول های Huh-۷ در نزدیکی خانواده MT در کشت Hep GZ و Huh-Z سلول ها کبدی کارسینوما جگر انسان (HCC) و حضور همانند سازی تنظیم شده MTs سلول ها GRL-۱۲۴۶۱ مقایسه می شود . در حین انجام تغییر DNA H۳k۴me۳ و H۳k۹me۳ ، تغییر بر ژن - های مختلف MT پس از تخریب دومین محل های اتصال CTFC مشاهده شد و با گروه کنترل درباره به کار گرفتن و به دام انداختن کنفورماسیون کروموزوم ۳ و رسوب ایمنی کروماتین (chip) مقایسه شد . تنظیم کردن همانند سازی یک سری ژن ها از تغییر محل تنظیمات ژنی برای درمان بیماری ها می باشد .

کریسپر راهی برای مقابله با ویروس های RNA دار :

بسیاری از بیماری های لاعلاج ، عاملی ویروسی دارند که از جمله آن ها می توان به ابولا ، زیکا و آنفولانزا اشاره کرد . گروهی از پژوهشگران دانشگاه MIT و هاروارد روش آنزیم برشی RNA کریسپر یا CRISPR RNA-Cutinary enzyme در عامل ضد ویروسی امتحان کرده اند که می تواند برای ردیابی و تخریب ویروس های RNA ای در سلول های انسانی برنامه ریزی شود . محققان پیش تر آنزیم Cas۱۳ را به عنوان ابزار برش و ویرایش RNA و روش تشخیص برای ردیابی حضور ویروس ها ، باکتری و دیگر اهداف به کار می بردند .

این مطالعه یکی از نخستین استفاده های کس ۱۳ بر سلول های کشت شده ی انسانی می باشد . محققین فعالیت ضد - ویروسی Cas۱۳ را با توانایی تشخیص و ردیابی آن ترکیب کرده و یک سیستم جدید که بتوان برای هر دو هدف تشخیص و درمان عفونت های ویروسی از جمله عفونت هایی که با عامل ویروسی تازه کشف شده ، استفاده کرد . آنها آن را CARVER (Cas۱۳-Assisted Restriction of Viral Expression Readout) یا کس ۱۳ ؛ پروتئین محدود کننده الحاقی به بیان ویروسی و بازخوانی ، نامیدند .

ویروس های بیماری زای انسانی بسیار گوناگونند و به طور پیوسته و بدون نیاز به وجود هیچ گونه ویروس با محیط اطرافشان تطابق می پذیرند که هر دو چالش و نیاز برای عرضه دارو های ضد ویروسی منعطف را تاکید می کند . CARVER به عنوان روش تشخیص برنامه پذیر سریع و تکنولوژی ضد ویروسی برای واریته و گونه - های وسیعی از ویروس ها پایه گذاری شده است .

نیاز برای دستیابی به یک ضد ویروس جدید ضروری است . در طی ۵۰ سال گذشته ۹۰ داروی ضد ویروسی بالینی تولید شده است که تنها قادر به درمان ۹ بیماری هستند و نیز این نکته حائز اهمیت است ؛ ویروس ها بیماری زا سریع تکامل یافته و ژنوم خود را تغییر داده و با محیط خود سازگار می شوند که نتیجه ی آن مقاومت آنها نسبت به دارو های تولید شده است .

آنزیم کس ۱۳ به طور طبیعی RNA ویروسی درون باکتری ها را هدف قرار می دهد ؛ به همین منظور این آنزیم می تواند برای هدف قرار دادن سکانس و توالی های مشخصی از RNA با محدودیت کم و نیز به علت دستیابی نسبی آسان به درون سلول ، از جمله سلول های انسانی به عنوان درمان ضد ویروسی به کار می رود . در این پژوهش ، دانشمندان پس از غربال RNA های

ویروسی ، به جست و جوی توالی های تکراری که کمترین و بیشترین احتمال جهش حین برش زدن داشتند ؛ به منظور ناتوان ساختن ویروس ، پرداختند . کس ۱۳قابلیت برنامه ریزی برای تقریبا هر قسمت از ویروس را دارد اما به علت تنوع گسترده میان گونه های ویروسی و بروز تغییرات ژنومی سریع تحت عنوان تکامل ویروسی امکان خطا در گزینش سایت برشی وجود دارد که در بهترین حالت می تواند بی اثر باشد . تاکنون هزاران سایت در صد ها هزار گونه ویروسی که قابلیت مورد هدف واقع شدن توسط کس ۱۳ را داشته اند ؛ شناسایی شده است .

در این تحقیق فعالیت کس ۱۳ در سلول ها انسانی آلوده به یکی از ۳ ویروس RNA ایی متمایز مورد بررسی قرار گرفته است ؛ LCMV(Lymphocytic Chriomeningitis Virus) که جزء آدنوویروس های تک رشته ای مثبت ، ویروس آنفولانزا نوع A یا IAV و ویروس ورم دهان و مخاط تاول دار یا VSV . ابتدا ژن کس ۱۳ بیان - شده و به کمک یک guide RNA سنتتیک و مهندسی شده وارد محیط کشت کرده و پس از گذشت ۲۴ ساعت در معرض ویروس ها قرار داده و پس از ۲۴ ساعت دیگر آنزیم ها ۱۳Cas سطح RNA ویروسی در سلول های کشت شده که بیش از ۴۰ بار پیچ خورده بودند ، کاهش داد .

تولید آنتی بیوتیک های جدید به کمک کریسپر :

به کمک کریسپر می توان یک جهش در باکتری ها و اکتینومیست ها بدون نیاز به شکستن DNA دو رشته ای ایجاد کرد . که این شکست موجب سستی و نا پایداری در ژنوم باکتری شده و آن را مجبور به تنظیم دوباره ژن و در برخی موارد ، حذف بخش اعظمی از کروموزومش می کند ؛ که بدین گونه می توان بیواکتیو ها و آنتی - بیوتیک های جدید علیه آن ها تولید نمود .

کریسپر ؛ درمان دیابت :

به کمک روش کریسپر کس ۹ می توان سلول های زایا چند نیرویی که CyT۴۹ نامیده می شوند را برای تغییر و تبدیل سلول های جزیره پانکراس مورد استفاده قرار داده ؛ به تبع آن برای درمان دیابت تیپ ۱ (T۱D) از آن بهره برد . این عمل ما را یک گام به دستیابی درمان موثر دیابت نوع ۱ ، با هدف گزینی سلول های ایمنی تخریب کننده ی سلول ها تولید کننده انسولین در پانکراس ؛ این نوع اختلال اتوایمن را درمان نمود .

مراجع :

"کریسپر چیست" ویکی پدیا فارسی

William C. Hahn, MD., Ph.D,"A CRISPR Way to Identify Cancer Targets", The New England Journal of Medicine

Michael Irving, "CRISPR-Cas۹ cure cervical cancer", New Atlas

Arlene Weintraub, "MAEGI System", Fierce Biotech

Wenjing Gong, Youde Liu, Huajun Qu, Aina Liu, Ping Sun, Xiumei Wang, "The effect of CTCF binding sites destruction by CRISPR/Cas۹ on transcription of metallothionein gene family in liver hepatocellular carcinoma" deepdyve.com

Karen Zusi, "CARVER System", The Harvard Gazette

Anders Monsted and Anne Lykke, "CRISPR-BEST", Science Daily

Douglas House, "Generate islet progenitor cells for type ۱ diabetes (T۱D) clinical trials by CRISPR-Cas۹", Seeking Alpha