

بسمه تعالی



دانشگاه زنجان

دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

ژنتیک مولکولی

CRISPR

داوود فرج زاده (دانشجوی کارشناسی زیست شناسی سلولی و مولکولی)

استاد مربوطه: دکتر اسکندری

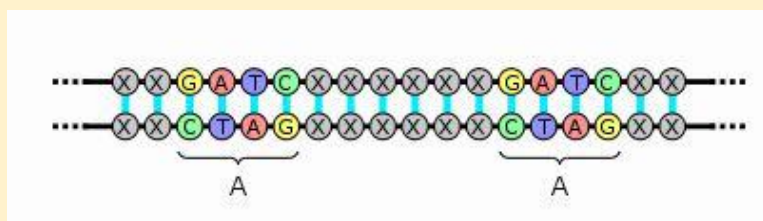
1401



کریسپر:

توالی‌های کوتاه فاصله‌دار منظم خوشه‌ای پالیندرومیک

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats



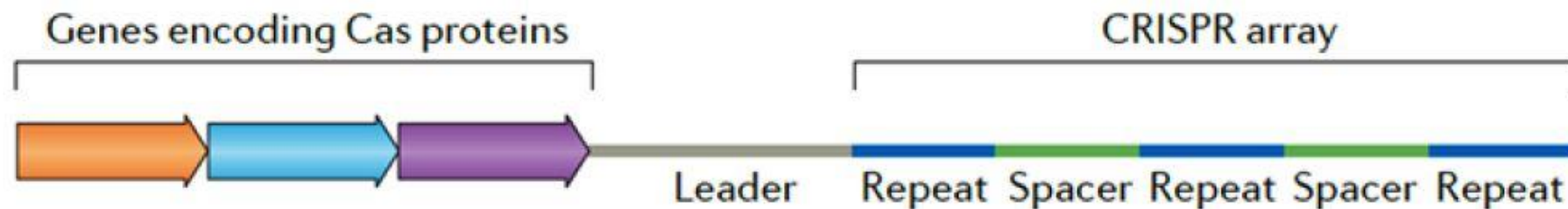
سه کلاس از سیستم CRISPR شناسایی شده است:

- ۱. نوع 1 با وجود ژن *cas3*
- ۲. نوع 2 با وجود ژن *cas9*
- ۳. نوع 3 با وجود ژن *cas10*

که نوع ۲ (Class II) بیشتر از بقیه مورد مطالعه قرار گرفته است.

در بسیاری از ژنوم باکتری‌ها و آرکئی باکترها، توانستند تناوب‌های کوتاه پالیندروم فاصله‌دار منظم خوشه‌ای که با عنوان سیستم کریسپر یا سیستم کریسپر مرتبط با ژن *cas* است را شناسایی کنند.

نقش فیزیولوژیکی این سیستم در پروکاریوت‌ها با عنوان سیستم ایمنی دفاعی در مقابل مهاجم خارجی، تشخیص داده شده است. از عناصر اصلی‌های راهنما کوچک RNA، که نوکلئازها را به سوی اسید نوکلئیک‌های مکمل خود در ویروس‌ها و پلاسمیدها هدایت میکنند. (کریسپر باکتری را قادر به کشف دی‌ان‌ای ویروس و بعد نابودیشان می‌کند)



در هنگام ورود DNA خارجی مهاجم به درون باکتری، این DNA توسط آنزیم های نوکلئازی Cas شکسته می شود و سپس بخشی از آن در جایگاه کریسپری و بین دو توالی تکراری قرار می گیرد که در این حالت به آن spacer گفته می شود. توالی های spacer به عنوان الگوهایی به منظور تولید توالی های RNA کوتاه کریسپری (crRNA) مورد استفاده قرار گرفته و کمپلکسی را با مولکول tracrRNA تشکیل می دهد. این دو توالی به همراه هم به عنوان یک توالی راهنما، پروتئین Cas9 را به سمت DNA مهاجم هدایت می کنند. به محض اتصال پروتئین Cas9 به DNA مهاجم، این پروتئین توالی DNA خارجی مکمل crRNA و توالی مقابل آنرا به ترتیب از طریق دومین های نوکلئازی NHN و RuvC1-Like می برد

بخشی از سیستم کریسپر، پروتئینی به نام (Cas9) است، که قابلیت جستجو، برش زدن و سرانجام جایگزینی DNA را به روشی خاص دارد.
(دومین های نوکلئازی Cas9 شامل HNH و RuvC)

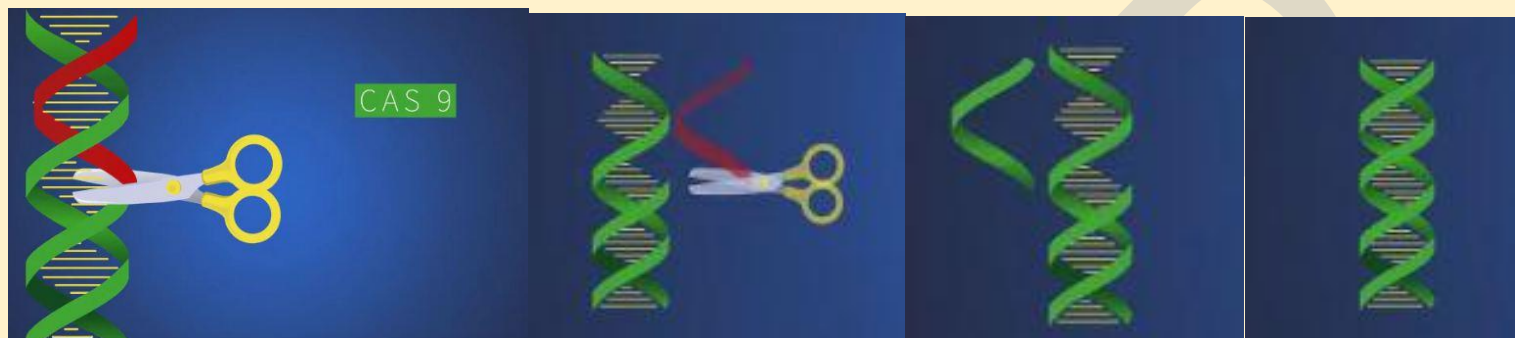


Figure 1

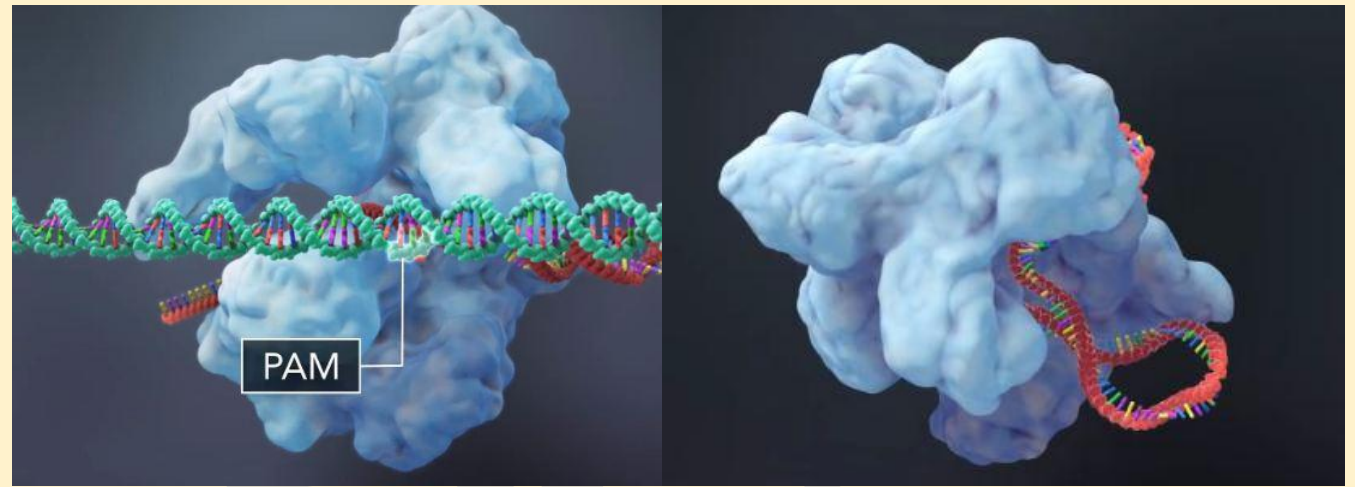
فناوری کریسپر موجب تغییراتی در DNA سلول ها (چه ویروس چه جانور) میشود. (در زمان کوتاه چند هفته با هزینه کم)

دو جزء در این سیستم وجود دارد:

(1) یک پروتئین برش DNA به نام Cas9

(2) یک مولکول RNA که به عنوان راهنما شناخته می شود

این دو همراه باهم یک سازه رو تشکیل می دهند که می تواند بخش هایی از DNA را شناسایی کرده و برش دهد اول Cas9 باید یک دنباله عادی در ژن با نام PAM را پیدا کرده و به آن وصل شود بمحض آنکه به PAM متصل شد آنگاه RNA راهنما ساختار مارپیچ دوتایی را از هم باز می کند رشته RNA طوری طراحی شده تا با یک دنباله بخصوص در DNA متناسب بوده و بتواند به آن وصل شود بمحض آنکه دنباله صحیح را پیدا کرد آنگاه Cas9 آن بخش از DNA را برش می دهد.



Cas9-RNA2 Figure

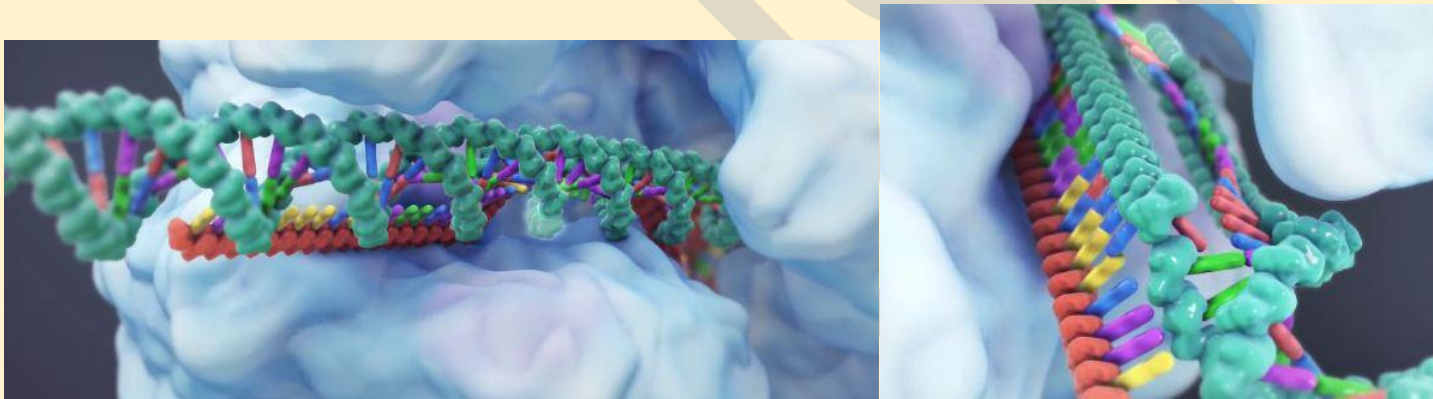
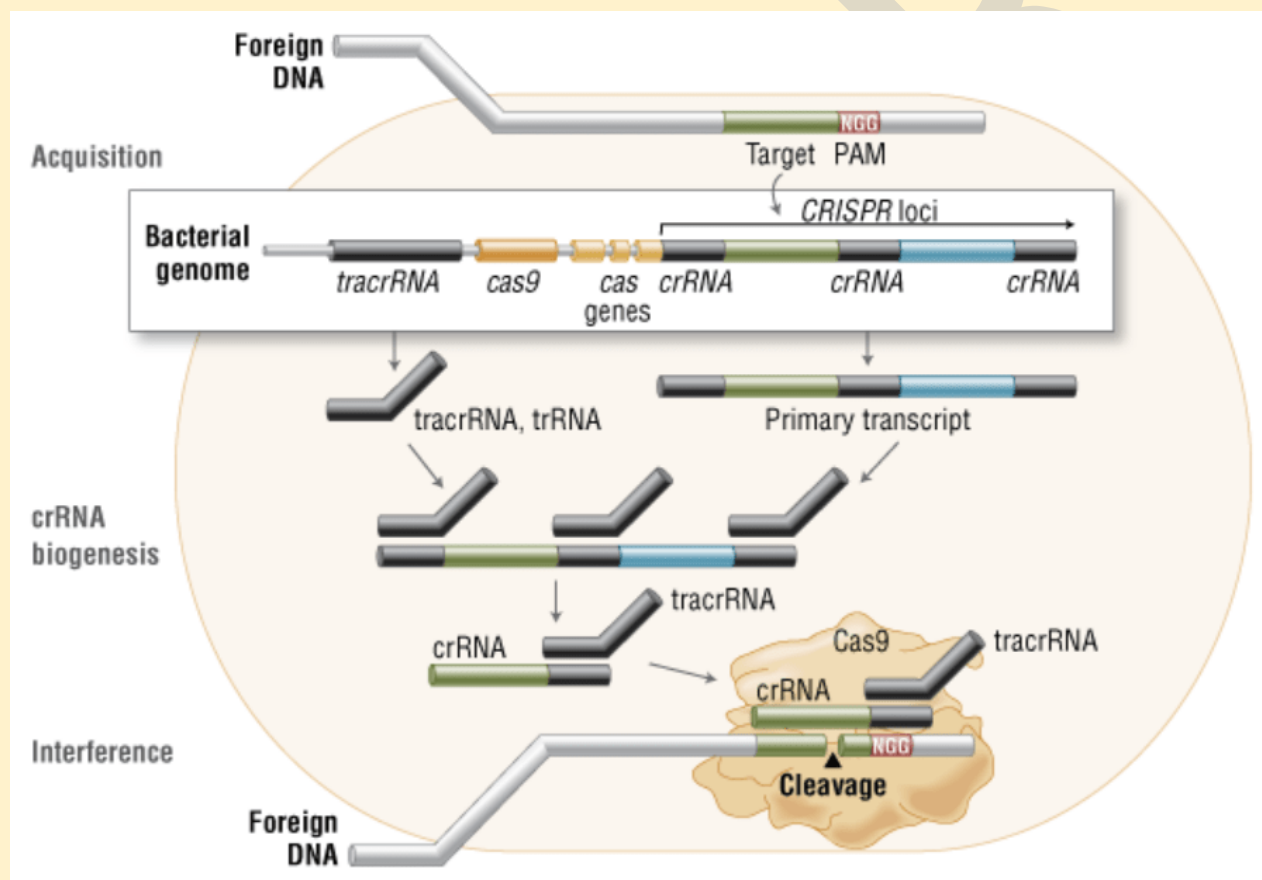


Figure 3RAN-DNA

فعالیت اندونوکلازی دو رشته‌ای Cas9 همچنین مستلزم این است که یک توالی کوتاه (۲ تا ۵ نوکلئوتیدی) حفاظت شده به نام Protospacer-associated motif (یا PAM)، بلافاصله در انتهای ۳ پرایم (۳') توالی مکمل crRNA (در DNA هدف) وجود داشته باشد. در حقیقت حتی توالی‌های کاملاً مکمل نیز در غیاب این توالی PAM، توسط Cas9-RNA نادیده گرفته می‌شوند.



در ایمنی اکتسابی، DNA خارجی (مهاجم) در ژنوم باکتریایی، در لوکوس CRISPR گنجانده می‌شود. سپس لوکوس CRISPR رونویسی و بصورت crRNAهای کوچک پردازش می‌شود. اندونوکلاز Cas9 با یک crRNA و tracrRNA مجزا تشکیل یک کمپلکسی را می‌دهد که می‌تواند DNA خارجی حاوی یک توالی ۲۰ نوکلئوتیدی مکمل با crRNA، در مجاورت توالی PAM را برش بزند.

در دو ناحیه نوکلئاز (Nuclease) آن هر یک برشی ایجاد می‌کنند که باعث پاره شدن کل این رشته دوتایی می‌شود در حالی که سلول سعی در تعمیر این قسمت پاره شده می‌کند اما این فرایند تعمیری همراه با خطا خواهد بود و اغلب دارای جهش‌های ناخواسته است که موجب بلا استفاده شدن ژن می‌گردد و این موضوع باعث می‌شود که CRISPR یک ابزار عالی برای غیرفعال کردن ژن‌های بخصوص باشد .

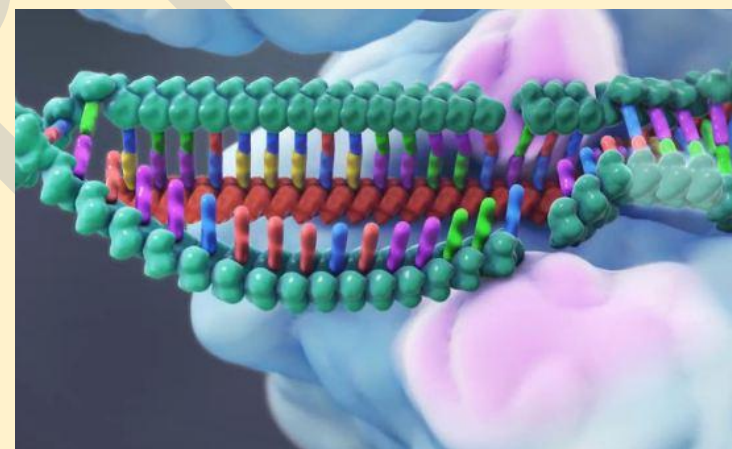


Figure 4 برش RAN

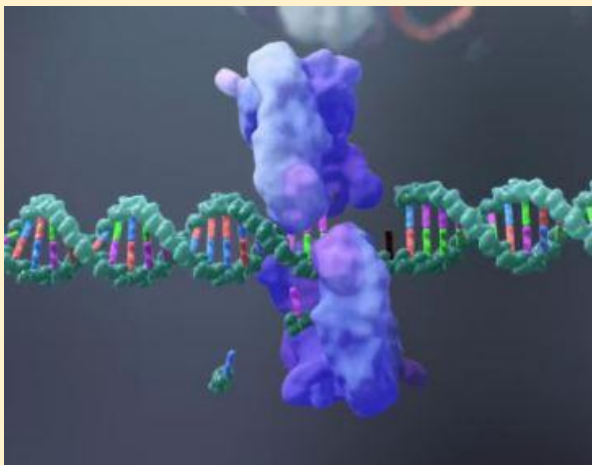
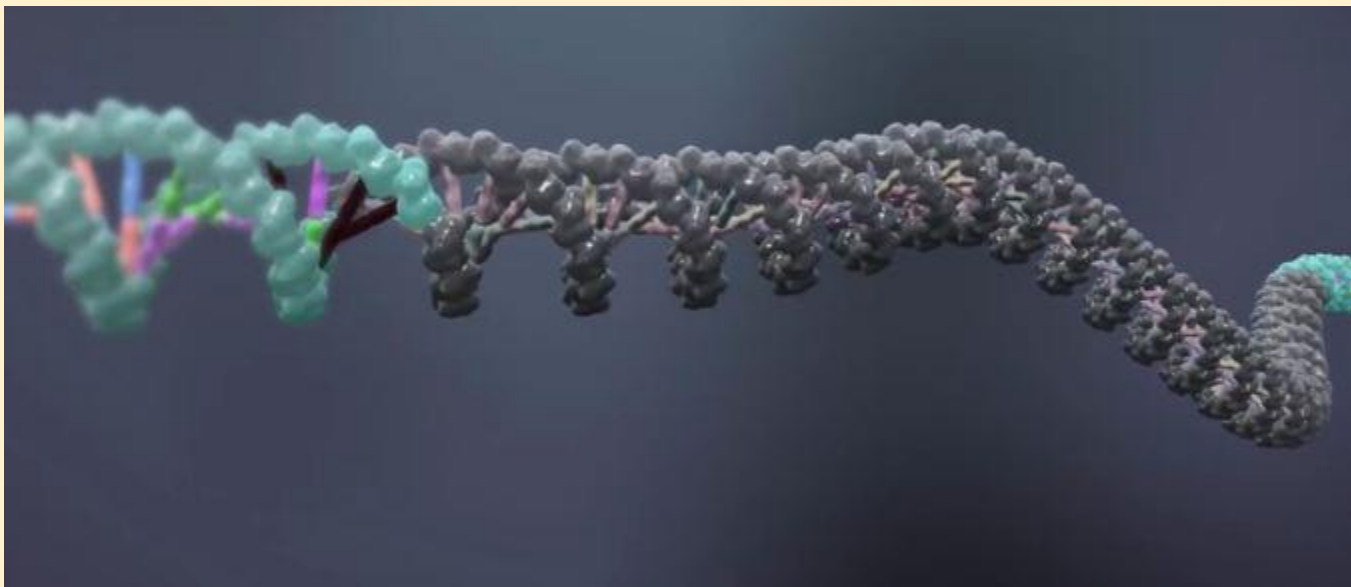


Figure 5 ترمیم DNA



Figure 6 اشتباه در نوکلئوتید

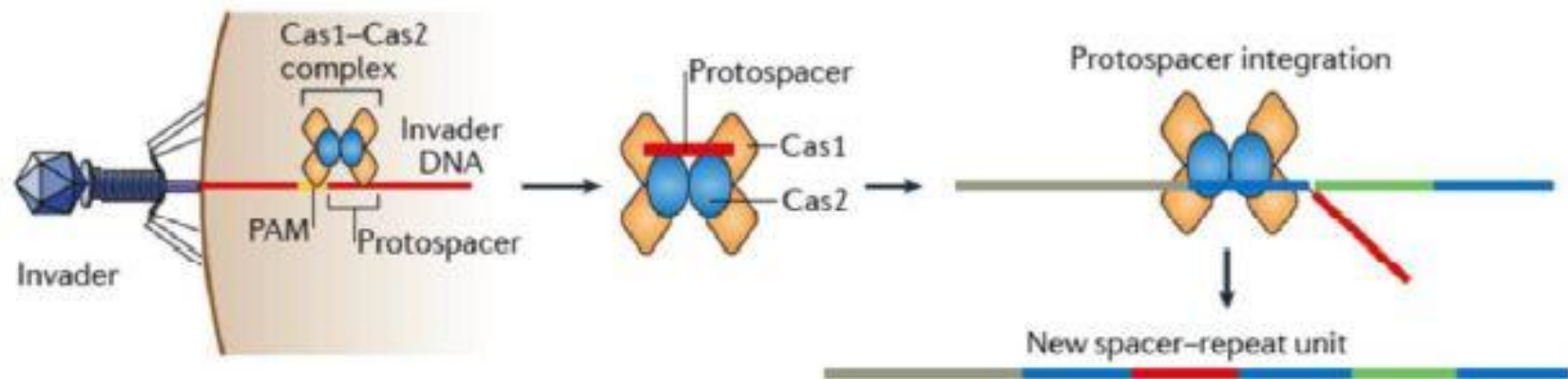


غير فعالسازی ژن Figure 7

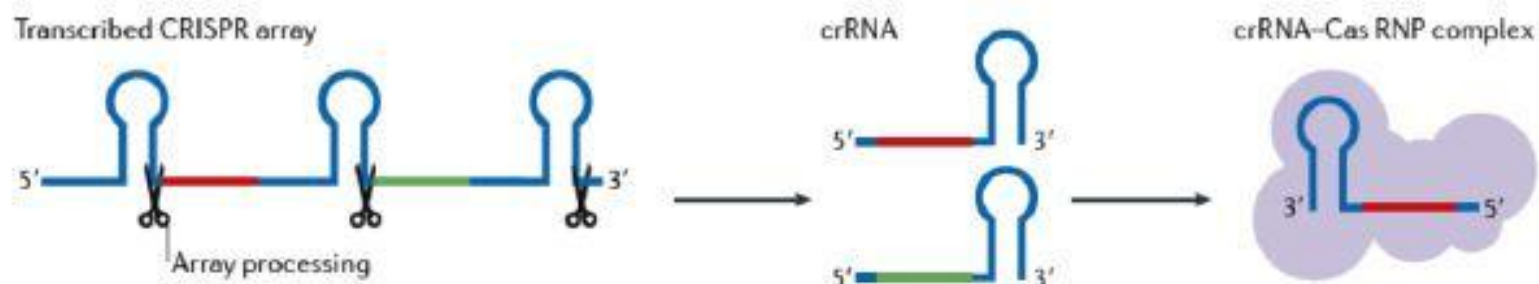
مکانیسم عمل سیستم CRISPR/Cas :

مکانیسم عمل سیستم CRISPR/Cas شامل سه مرحله میباشد:

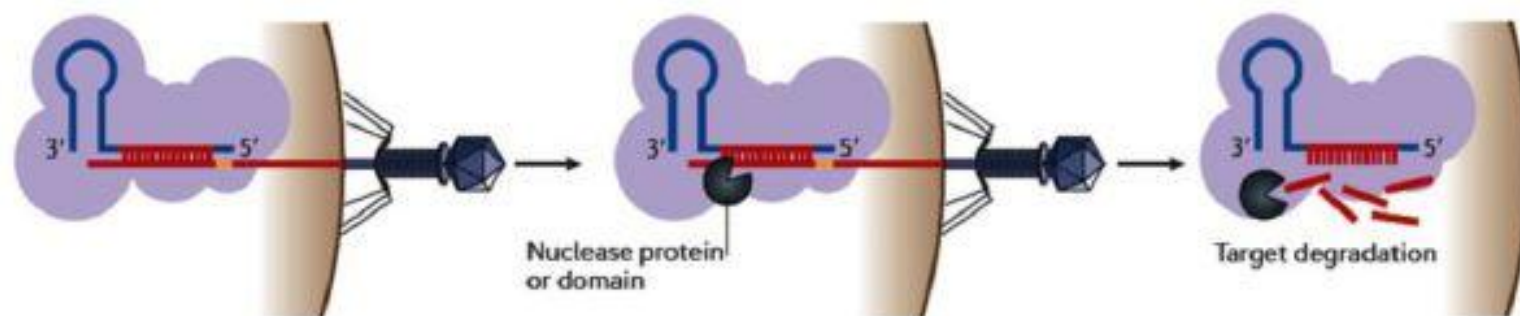
Adaptation -1: در مرحله انطباق کمپلکس Cas1/Cas2 براساس موتیف PAM سکانس Protospacer را در ژنوم پاتوژن شناسایی و برش زده و در آرایه کریسپر (بین اولین ناحیه تکراری و سکانس راهنما) درج میکنند.



2- expression and maturation: در مرحله بیان و بلوغ آرایه کریسپر رونویسی میشود و پس از پردازش منجر به ایجاد crRNA ها میشود.



3- Interference: در مرحله تداخل crRNA و پروتئین Cas تشکیل کمپلکس پروتئینی Cas-crRNA داده و سلول را بمنظور یافتن توالی همولوگ با crRNA جستجو میکنند. از آنجا که crRNA از پاتوزن مشخص جدا، درج و رونویسی شده بود طبیعتاً مکمل توالی از همان فاز اولیه میباشد (حافظه ایمنی) و هنگامی که به توالی مکملش متصل شد نوکلئاز Cas شروع به تخریب ژنوم فاز میکند.



modifications of Cas9

با تغییر در دامین های مختلف Cas9 انواع مختلف Cas9 ایجاد شد که در ویرایش ژنوم کاربرد دارند.

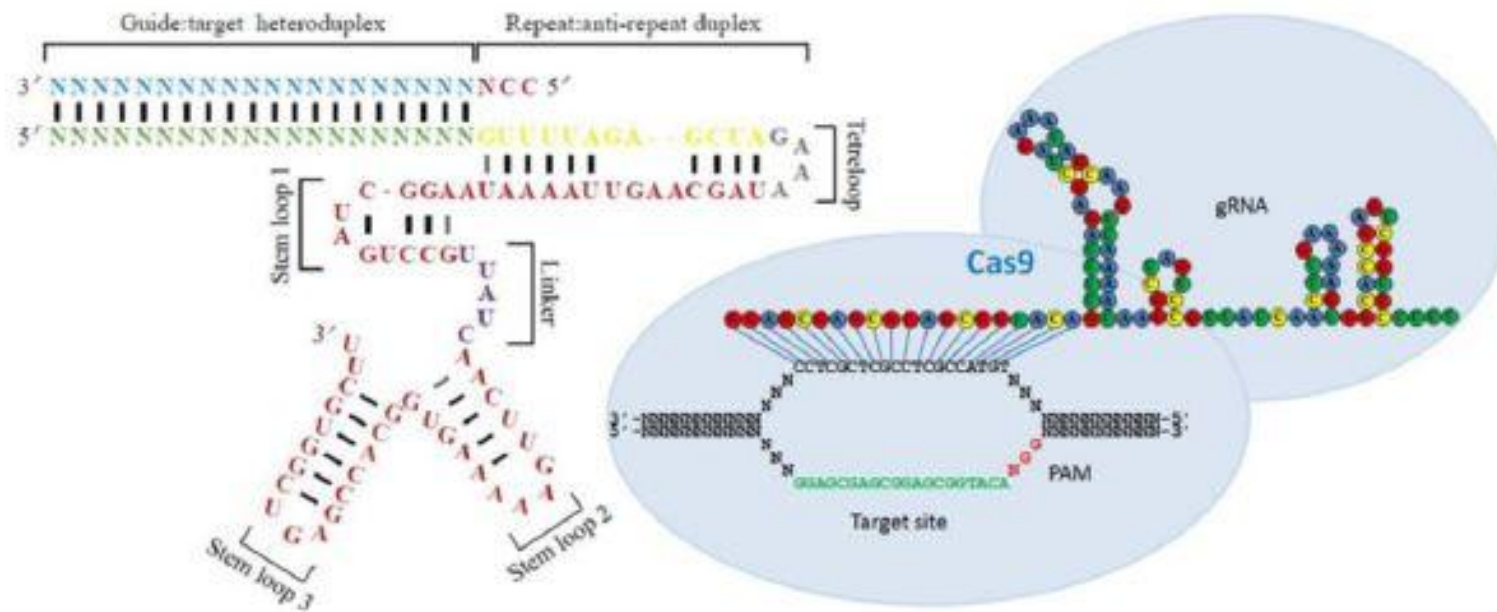
WT Cas9 : نوع وحشی Cas9 که امکان اتصال و برش هر دو رشته DNA را دارد.

Cas9 nicknase : یکی از دامین های Cas9 خاصیت برش دهنده را از دست میدهد. بنابراین فقط یک دامین ایجاد برش در یک رشته از دو رشته DNA را میکند و ایجاد Nick میکند.

Dead Cas9 : هر دو دامین Cas9 خاصیت برشی را از دست میدهند و تنها امکان شناسایی و اتصال به توالی مشخص DNA را دارند و قادر به برش نخواهند بود.

structure of sgRNA

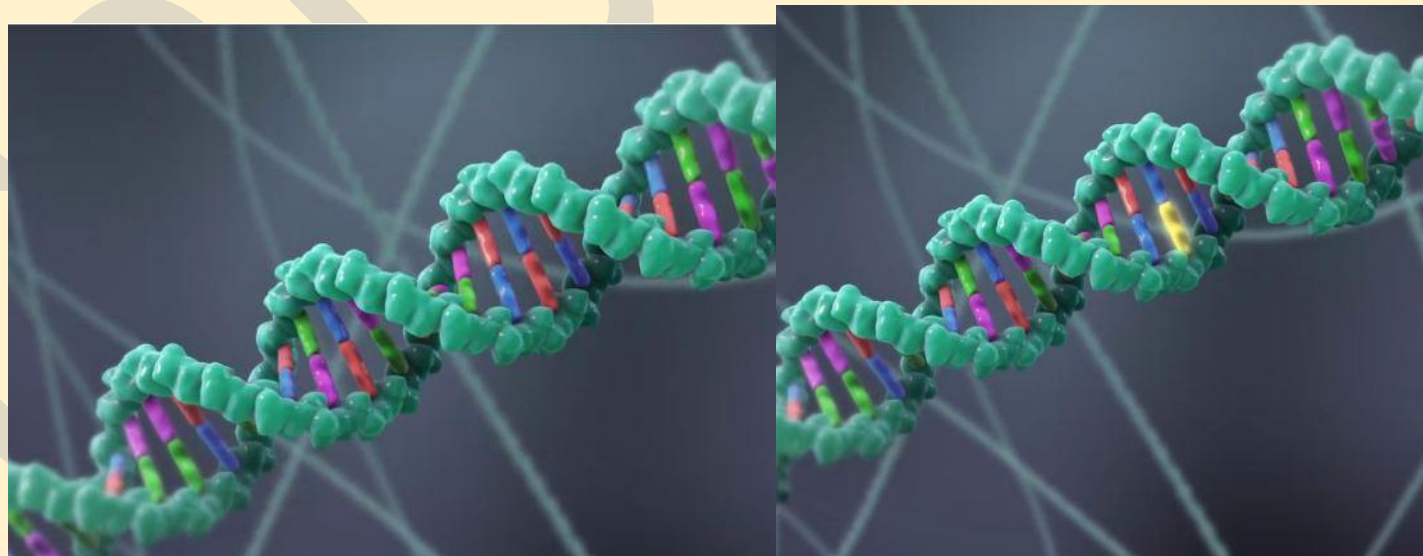
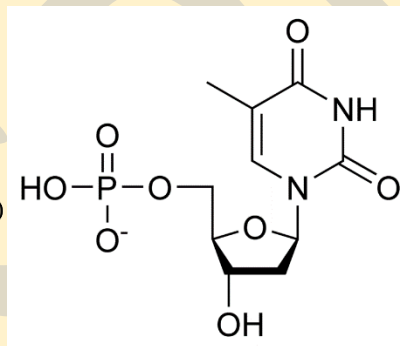
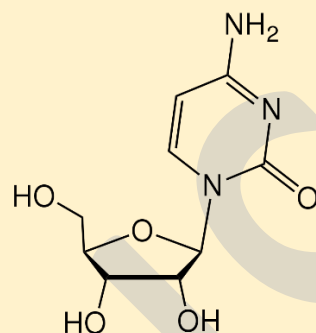
در سال 2012 جنیفر دودنا و همکارانش بر اسال توالی crRNA و tracrRNA سکاتسی مشابه را در آزمایشگاه سنتز کردند و به جای توالی spacer توالی همولوگ با ناحیه هدف مورد نظر در DNA را قراردادند و دو توالی سنتز شده crRNA و tracrRNA را با لینکر به هم متصل کردند و آن را sgRNA (RNA راهنمای تک رشته) نام نهادند. sgRNA با پروتئین Cas9 تشکیل کمپلکس داده و پس از لینک شدن با توالی هدف بصورت کاملاً اختصاصی ناحیه هدف را برش میزنند. بدین ترتیب امکان استفاده از CRISPR- Cas9 System در ویرایش ژنوم سایر موجودات از جمله انسان فراهم شد.



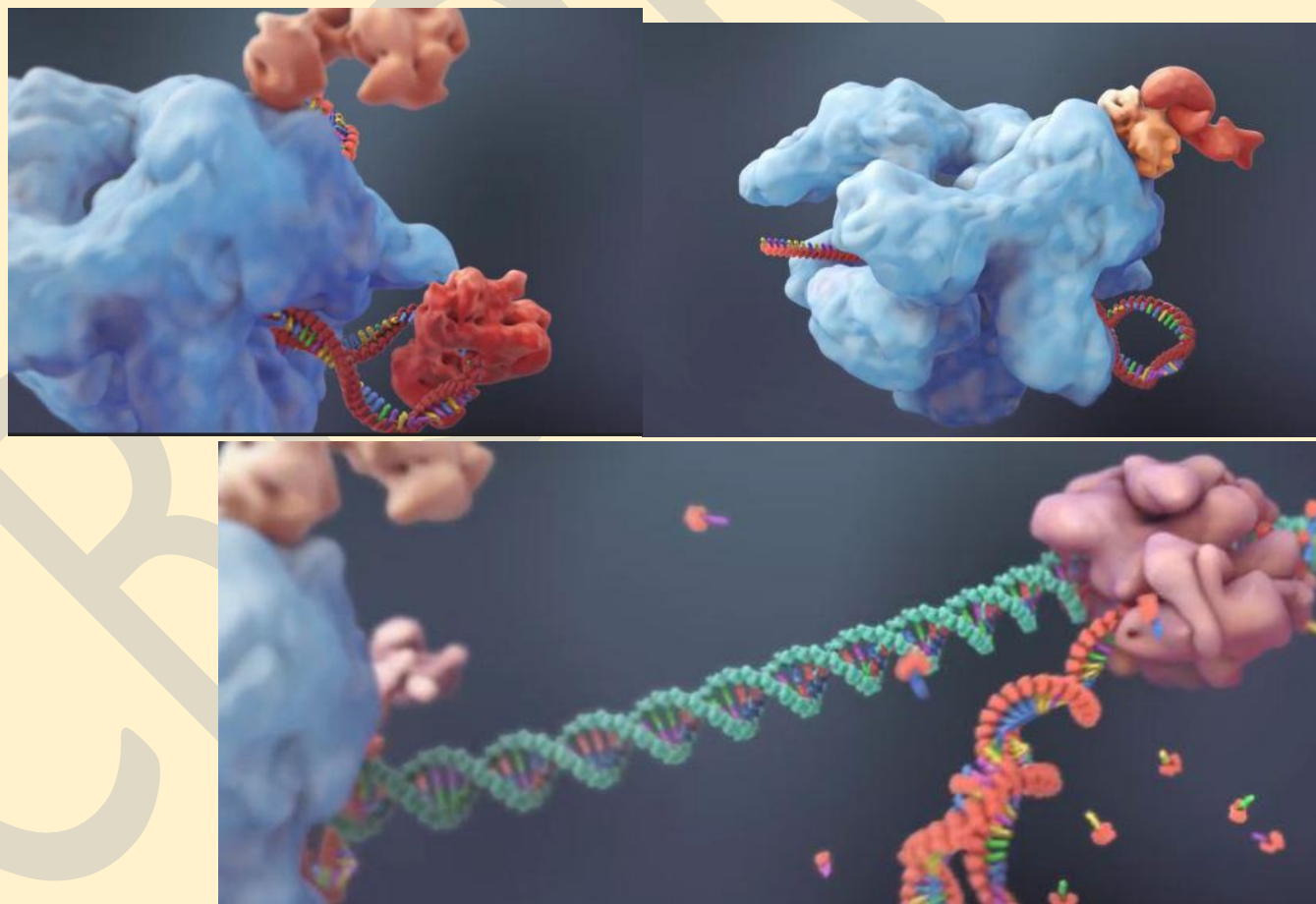
Cas Enzymes and PAM Sequences

Species/Variant of Cas9	PAM Sequence*
<i>Streptococcus pyogenes</i> (SP); SpCas9	3' NGG
SpCas9 D1135E variant	3' NGG (reduced NAG binding)
SpCas9 VRER variant	3' NGCG
SpCas9 EQR variant	3' NGAG
SpCas9 VQR variant	3' NGAN or NGNG
xCas9	3' NG, GAA, or GAT
SpCas9-NG	3' NG
<i>Staphylococcus aureus</i> (SA); SaCas9	3' NNGRRT or NNGRR(N)
<i>Acidaminococcus</i> sp. (AsCpf1) and <i>Lachnospiraceae</i> bacterium (LbCpf1)	5' TTTV
AsCpf1 RR variant	5' TYCV
LbCpf1 RR variant	5' TYCV
AsCpf1 RVR variant	5' TATV
<i>Campylobacter jejuni</i> (CJ)	3' NNNNRYAC
<i>Neisseria meningitidis</i> (NM)	3' NNNNGATT
<i>Streptococcus thermophilus</i> (ST)	3' NNAGAAW
<i>Treponema denticola</i> (TD)	3' NAAAAC
Additional Cas9s from various species	PAM sequence may not be characterized

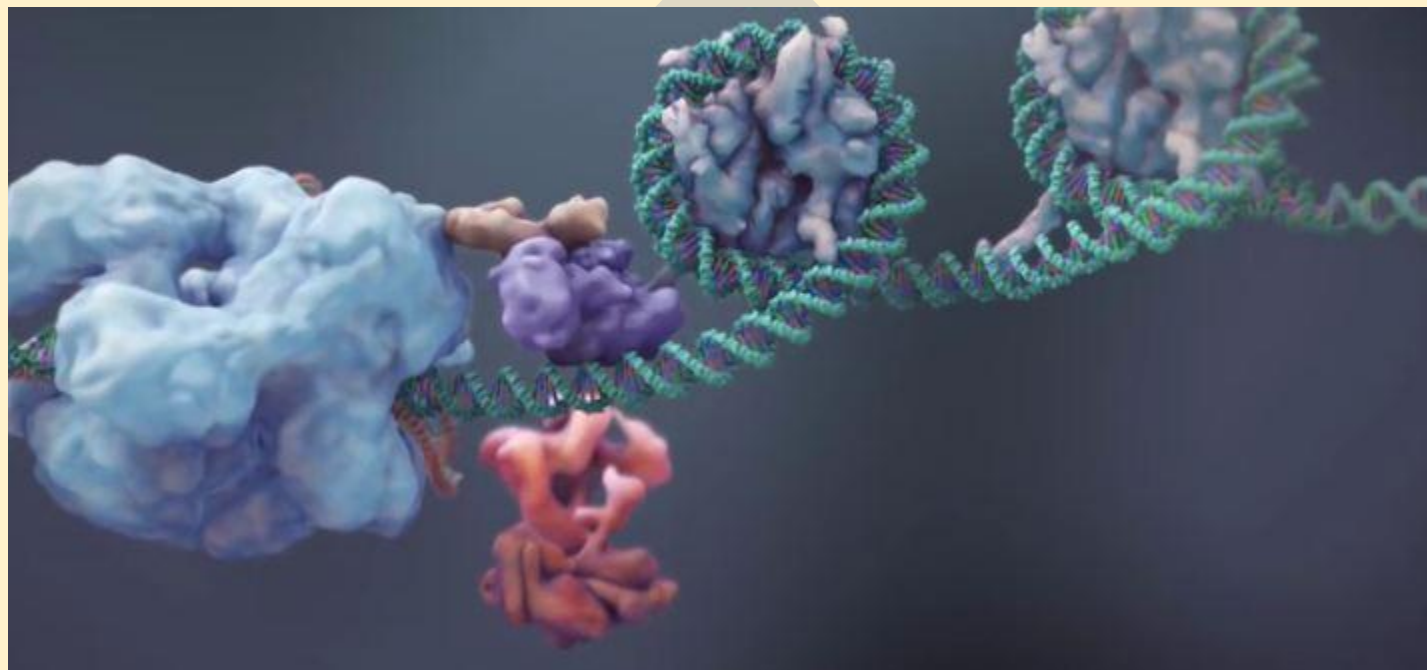
اما پاره کردن رشته دوتایی تنها کاری نیست که CRISPR می تواند بکند برخی از محققان یک یا هر دو بخش برش Cas9 را غیر فعال کرده اند و آنزیم های جدید را به درون این پروتئین وارد ساختند آنگاه از Cas9 می توان برای منتقل کردن آن آنزیم ها به یک دنباله بخصوص از DNA استفاده کرد یک مثال آن وارد کردن یک آنزیم به Cas9 با نام **دآمیناز (deaminase)** است که موجب ایجاد جهش های خاصی در عناصر پایه DNA می شود که در نهایت موجب جایگزین شدن **سیتیدین (Cytidine)** با **تیمین (Thymine)** می شود این روش دقیق ویرایش ژن می تواند جهش هایی که موجب ایجاد بیماری شده اند را به ژن های سالم تبدیل کند یا اینکه بخش توقف ژن در یک مکان خاص ایجاد کنند.

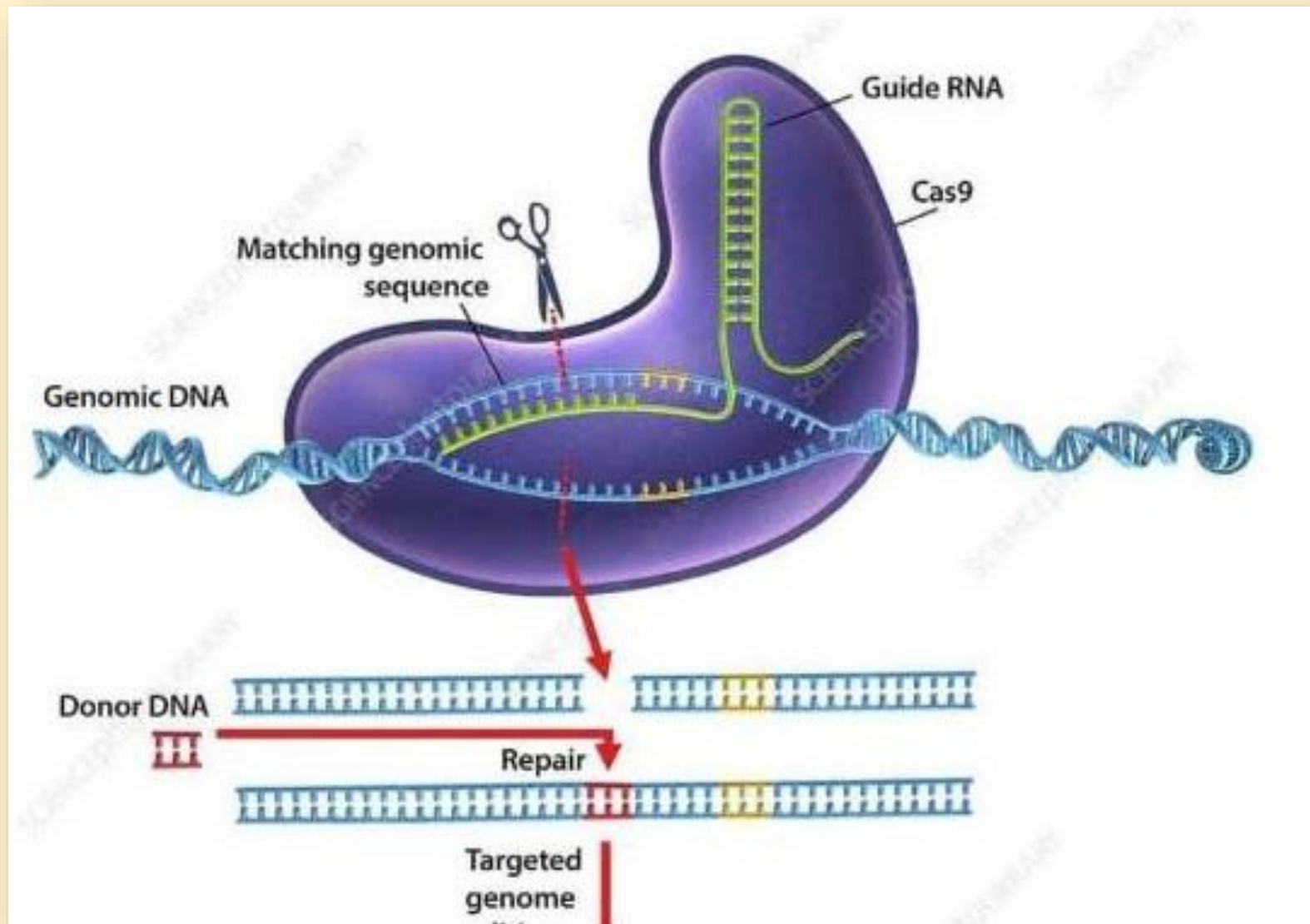


اما همه آن تنها در خصوص ویرایش ژن نیست بعضی از آزمایشگاه ها در حال استفاده از CRISPR برای ارتقا دادن رونویسی ژن هستند آنها این کار را با غیر فعال ساختن کامل Cas9 انجام می دهد به طوریکه دیگر نتواند DNA را برش دهد در عوض، فعال کنندگان رونویسی به Cas9 اضافه می شوند که یا به صورت مستقیم آن را وارد می کنند یا بوسیله رشته ای از پپتیدها (Peptide) که بر این اساس فعال کنندگان به RNA راهنما جذب می شوند این فعال کنندگان، دستگاه رونویسی سلول را به خود جذب می کنند و فاکتورهایی مانند RNA پلیمراز را به سمت هدف می آورند و باعث افزایش رونویسی آن ژن می شوند.



یک چنین اصولی در برش دهی ژن نیز وجود دارد ناحیه KRAB را وارد Cas9 می کنند و رونویسی را غیرفعال می سازند، آنها با جذب فاکتورهای بیشتر به خود به صورت فیزیکی ژن را بلوکه می کنند .





مراحل طراحی و انتقال سیستم CRISPR/Cas9 به سلول

1. sgRNA مورد نیاز برای هدف گیری ژن مورد نظر و نیز پرایمر های مورد نیاز برای تعیین ژنوتایپ توسط ابزار *in silico* طراحی میشوند.
2. sgRNA در یک پلازمید بیانی حاوی RNA داربستی و توالی کد کننده پروتئین Cas9 کلون میشود.
3. انتقال پلازمید به سلول هدف
4. تکثیر سلول های دریافت کننده پلازمید



جدول ۱. بیماری‌های ژنتیکی که به طور موفقیت آمیز با استفاده از تکنیک CRISPR/Cas9 مورد هدف قرار گرفته‌اند. (۶).

نام بیماری	ژن هدف	روش انتقال	سلول هدف	میزان کارایی (%)
بنا تالاسمی	حذف ژن HBB	الکتروپوریشن تزریق درون سپتوپلاسمی	سلول‌های iPSCs انسانی زیگوت انسانی	۱۷/۶ ۱۴/۳
کیستیک فیبروز	حذف ژن CFTR	لیپوفکشن	سلول‌های ارگاتوئید روده انسان	---
تیروزیمی توارثی	جهش نقطه‌ای در ژن FAH	تزریق هیدروداپتامیک	سلول‌های in vivo کبد موش	۰/۴±۰/۱۲
HIV-1	CCR5 Δ32 غیرفعال سازی پروویروس	الکتروپوریشن تزریق هسته ای	سلول‌های iPSCs انسانی JLat10.6	۱۰۰ ۳۰
دیستروفی عضلانی دوشن	حذف اکزونی در ژن دیستروفین	الکتروپوریشن	سلول‌های iPSCs انسانی	۵۰
ناکارآمدی α۱-آنتی‌تریپسین	جهش نقطه ای در SERPINA1	الکتروپوریشن	سلول‌های iPSCs انسانی	۱۸/۸
پلی سیمی ورا	جهش نقطه ای در JAK2	الکتروپوریشن	سلول‌های iPSCs انسانی	۹/۱۵
آب مروارید	حذف Crygc	الکتروپوریشن	سلول‌های اسپرمانوگونی و بنیادی موش	۲۹/۷
LDL-C	تخریب Pcsk9	آدنوویروس ویروس مرتبط با آدنو	سلول‌های in vivo کبد موش	۵۰ ۴۰

سیستم مدرن ویرایش ژنوم به صورت هدفمند با استفاده از تکنولوژی CRISPR/Cas9 دو جزء دارد:

1. یک اندونوکلاز

2. توالی RNA کوتاه راهنما

اندونوکلاز مورد نظر پروتئین اندونوکلازی Cas9 باکتریایی برگرفته از *Streptococcus pyogenes* می باشد. نوکلاز Cas9 دو دومین برنده DNA دارد که شامل دومین نوکلازی HNH و دومین نوکلازی RuvC1-Like می باشد و منجر به شکستن DNA دو رشته ای به صورت بلانت Double Strand Breaks می شود.

واژه gRNA در این سیستم خاموشی به یک RNA کایمر تک رشته ای مهندسی شده اشاره دارد که هم نقش tracrRNA و هم crRNA باکتریایی را دارد. بیست جفت نوکلئوتید آخر انتهای 5' مربوط به gRNA را محقق بر علیه توالی ژنی مورد نظر جهت برش و ویرایش طراحی می کند، این توالی 20 نوکلئوتیدی کمپلکس Cas9/gRNA را به جایگاه ژنی مورد نظر درست در بالادست جایگاه PAM از طریق اتصال RNA-DNA هدایت میکند.

توالی PAM در بین استرین 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 کاملاً دقیق موجب شکست DNA به صورت blunt می شود. دو رشته DNA بریده شده توسط این سیستم توسط دو مکانیسم ترمیمی که در تمامی انواع ارگانیسم ها یافت می شود و مسیر ترمیمی اتصال انتهاهای غیر همولوگ (non-homologous end-joining (NHEJ و مسیر ترمیمی شباهتی (homology-directed repair (HDR)) نام دارند، ترمیم می شود.

راه های انتقال gRNA و Cas9 به سلول هدف:

Lipofection

Electroporation

Lentiviral transduction

(AAV) adeno-associated virus

منابع:

1. کاربرد و مکانیسم سیستم CRISPR-Cas در درمان بیماری های عفونی (دکتر حبیب ضیغمی ، فاطمه محمدی)
2. تکنولوژی CRISPR/Cas9 و کاربرد آن در درمان بیماری های ژنتیکی (دکتر صادق ولیان بروجنی ، دکتر فرزانه محمدی فارسانی)
3. [/https://topazgene.com](https://topazgene.com)
4. از میکروبیوم تا کریسپر (ترجمه : دکتر مهسا آقائی ، دکتر مسرور ذاکری نسب ، داوود فرج زاده)
5. [/https://devako.com](https://devako.com)