8th International Conference on Applied Research in Basic Sciences, Engineering and Technology
September 19, 2023
Tbilisi - Georgia
CINVU
Avicenna International Community College LLC
Archive of SID

مروری بر کاربردهای پروتئین های CRISPR/Cas در مهندسی ژنوم

گلشن برات وند[۱]، زهرا پوراسماعیل[۲]

۱- گروه ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران

۱- گروه ژنتیک ، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران

چکیده

امروزه فنــاوری CRISPR/Cas در پیشرفت علم پزشکی بیولوژیکی خصوصا در حوزه ویرایش کارآمد ژن ها، نقش به سزایی دارد. ویرایش ژنوم یا ویرایش ژن یک فناوری محبوب است که در دارو درمانی، مطالعات عفونی و بیوتکنولوژی کشاورزی استفاده می شود. ابزارهای ویرایش ژنوم برای مطالعه عملکرد دقیق یک ژن با برش و تغییر در یک مکان برنامه ریزی شده از طریق درج، حذف یا جایگزینی استفاده شده است.درابتدا،تکنیک‌های مرسوم ویرایش ژن مانند نوترکیبی همولوگ HRبرای غیرفعال‌سازی ژن مورد استفاده قرار می‌گرفت، اما اثربخشی HR بسیار کم بود ،بعد ها ، کاهش هدفمند ژن با استفاده از تکنیک تداخل RNA ، فناوری سریع و کم هزینه ای را در اختیار محققان قرار داد تا ژن مورد نظر را برای مطالعه عملکردهای آن خاموش کنند. با این حال، همچنین نتوانست توالی مورد نظر را که با اثرات غیرقابل پیش‌بینی خارج از هدف مواجه بود و تنها به طور موقت یا جزئی از عملکرد ژن بازداری می‌کرد، به طور کامل از بین ببرد .ویرایش ژن مبتنی بر CRISPR به عنوان یک ابزار قدرتمند برای درمان طیف گسترده ای از بیماری های ژنتیکی ظاهر شده است .در این مطالعه مروری، به بررسی مکانیسم و کاربردهای پروتئین های CRISPR/Cas9/Cas12/Cas13/Cas14 در مهندسی ژنوم خواهیم پرداخت.

واژگان کلیدی: CRISPR/Cas،ویرایش ژنوم، اندونوکلئاز DNA، RNA targeting

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

مقالات تکنیک ویرایش ژنوم به اندونوکلئازهای توالی خاص قابل برنامه ریزی نیاز دارد تا شکستگی های تک رشته ای خاص (SSBs) یا شکستگی های دو رشته ای(DSBs) را در محل مورد نظر ایجاد کنند که این امکان را به مکانیسم های ترمیم درون زا می دهد تا شکستگی ها را پر کنند (Que, 2019). این شکستگی ها توسط هر یک از دو مکانیسم تعمیر اصلی، (۱) تعمیر مبتنی بر همسانی(HDR) و (۲) تعمیر اتصال انتهایی غیر همولوگ (NHEJ)رفع می شوند. برای تسهیل شکست‌های خاص DNA، ابزارهای مختلف ویرایش ژنوم قبلاً توسعه داده شده‌اند، مانند مگانوکلئازها یا اندونوکلئازهای خانگی ، نوکلئازهای زینک فینگر (ZFNs)و نوکلئازهای مؤثر فعال‌کننده رونویسی (TALENs).اما این ابزارها نیازمند تلاش‌های زیادی برای شبیه‌سازی و ساخت پروتئین در ساخت DSB هستند که این ابزارها را از کاربردهای معمول ویرایش ژنوم باز می‌دارد(Danner, 2017) . در سال ۲۰۱۲، محققین ابزارهای ویرایش ژنوم مبتنی بر سیستم تکرارهای کوتاه پالیندرومیک CRISPRو پروتئین های مرتبط با CRISPR (Cas) را توسعه دادند . سیستم CRISPR/Cas واسطه سیستم های ایمنی تطبیقی گسترده ای در برابر فاژها یا پلاسمیدها است. به دلیل ویژگی های منحصر به فرد از جمله سادگی در طراحی، مقرون به صرفه بودن و کارایی بالا، محققان بلافاصله سیستم CRISPR/Cas را به عنوان یک ابزار هدف گیری DNA با RNA ، برای ویرایش ژنوم در گونه های مختلف پذیرفته است (Doudna, 2014). بر اساس مکانیسم، سیستم CRISPR به دو کلاس اصلی (۱ و ۲) و شش نوع(I-VI) تقسیم شده است . انواع I تا III به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفتند، در حالی که انواع IV و VI اخیرا کشف شدند. نوع I، II و V،DNA را قطع می کند، نوع VI،RNA را می شکافد، نوع III هم DNA و هم RNA را می شکافد و فعالیت برش نوع IV هنوز شناسایی نشده است(Liu Z. D., 2020) .پروتئین Cas9 برای کاربردهای متنوعی مانند تصویربرداری فلورسنت، ویرایش پایه و فعال سازی رونویسی، جدای از برش هدفمند dsDNA استفاده شده است(Pickar-Oliver, 2019) . پروتئین Cas10 نیز مانند Cas9 در کاربردهای مختلفی مانند تصویربرداری فلورسنت، ویرایش پایه و ردیابی RNA نقش دارد. به عنوان جایگزینی برای Cas9 و Cas10، پروتئین Cas12 کارایی ویرایش ژنوم را با هدف قرار دادن تنها موتیف های غنی از T بدون استفاده از tracrRNA افزایش داد. بنابراین سیستم Cas12 کاربردهای ویرایشی مانند ویرایش پایه و تشخیص تغییرات رونویسی را گسترش داده است. پروتئین Cas13 همچنین برای کاربردهای متنوعی مانند تصویربرداری، ویرایش پایه و تشخیص تغییرات رونویسی استفاده می‌شود. اخیراً، پروتئین Cas14 کارایی ویرایش ژنوم را بدون نیاز به موتیف پیش‌اسپیسر مجاور PAM پیشرفته کرده است و رگرسیون رونویسی و ویرایش پایه را انجام می‌دهد. این بررسی انواع Cas از دو دسته از سیستم‌های CRISPR را که برای ویرایش ژنوم استفاده می‌شوند، توصیف می‌کند (Hillary, 2023).

www.SID.ir

Archive of SID

تاریخچه سیستم CRISPR/Cas

گروهی از محققان CRISPRs را با تجزیه و تحلیل ژن آلکالین فسفاتاز، که مسئول تبدیل ایزوآنزیم آلکالین فسفاتاز (iap)در سویه E. coli K-12 است، شناسایی کردند(Ishino, 2018) .آنها یک منطقه ژنومی را شناسایی کردند که شامل یک سری از ۳۲ نوکلئوتید از توالی های متمایز است که با تکرارهای پالیندرومیک ثابت در انتهای ۳' ژن iap احاطه شده اند .بعدها، توالی‌های موازی متمایز در سایر سویه‌های E. coli و انتروباکتری‌ها (Shigella dysenteriae) و (Salmonella enterica)یافت شد. به طور مشابه، در طول مطالعه سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، محققان تکرارهای ۳۶ جفت باز را با فاصله‌کننده‌های منحصربه‌فرد ۳۵ تا ۴۱ جفت باز شناسایی کردند(Xue, 2019) .در مطالعات بعدی، آرایه CRISPR در آرکی باکتری ها (Haloferax mediterranei) و (Streptococcus thermopile) یافت شد و همان در ۹۰٪ ژنوم های باکتریایی و ۴۰٪ ژنوم های آرکی باکتری شناسایی شد ، این توالی ژنومی عجیب ابتدا مشخص شد که طرح کلی آرایه CRISPR است(Mojica, 2016) . با این حال، به دلیل عدم وجود داده های توالی ژنوم ضروری، عملکرد بیولوژیکی CRISPR مبهم باقی مانده است. یانسن و همکاران در سال ۲۰۰۲ ژن های مرتبط با CRISPR را توصیف کرد . به دنبال این، چندین ژن CRISPR/Cas شناسایی شدند. در سال ۲۰۰۵، توالی اسپیسر در بسیاری از ژنوم‌ها شناسایی شد و مناطق فضایی منحصربه‌فردی در آرایه CRISPR یافت شد . این نتایج نشان داد که CRISPR یک سیستم ایمنی سازگار برای دفاع از سلول های پروکاریوتی در برابر عفونت فاژ از طریق فرآیند هدایت RNA است(Shmakov S. A., 2017) .

طبقه بندی سیستم CRISPR/Cas

سیستم CRISPR به دو کلاس عمده طبقه بندی شده است. در سیستم کلاس ۱، برش هدف هدایت شده با RNA به چندین پروتئین مؤثر نیاز دارد، اما سیستم کلاس ۲ برای شکافتن توالی های DNA تنها به یک اندونوکلئاز هدایت شده با RNA نیاز دارد(Shmakov S. A., 2015) .

سیستم کلاس ۱ CRISPR به سه نوع I، III و IV و سیستم کلاس ۲ به انواع II، V و VI تقسیم می شود .در سیستم نوع I، مکان CRISPR/Cas حاوی ژن امضاکننده Cas3 است که پروتئین بزرگی را با هلیکاز برای باز کردن DNA- DNA و RNA-DNA دوبلکس کد می کند (Makarova K. S., 2020) . منبع نوع II پروتئین چند دامنه ای را

www.SID.ir

Archive of SID

برای هدف قرار دادن و شکافتن dsDNA کد می کند . نوع CRISPR/Cas III دارای ژن امضای Cas10 است، یک پروتئین چند دامنه ای را با دامنه کف برای هدف رمزگذاری می کند و ssDNA را می شکافد . سیستم نوع IV حاوی فاکتور پیوند ۱ (Csf1) مرتبط با CRISPR است که یک پروتئین ریبونوکلئیک را کد می کند، اما عملکرد دقیق این سیستم هنوز شناسایی نشده است .نوع VI حاوی Cas13 (C2c2) است که یوکاریوت‌های بالاتر و دامنه اتصال به نوکلئوتید پروکاریوت‌ها (HEPN) را کد می‌کند، که ssRNA را می‌شکافد(Jia, 2022) .

سیستم CRISPR/Cas از سه مرحله برای دفاع در برابر ویروس ها یا مواد ژنتیکی خارجی استفاده می کند .در مرحله اول، پروتوسپیسرها به عنوان فاصله بین تکرارهای crRNA در جایگاه میزبان CRISPR گنجانده می شوند، در مرحله بعد، پروتئین‌های Cas بیان می‌شوند، یک فاصله‌گر به pre-crRNA رونویسی می‌شود، و pre-crRNA توسط پروتئین‌های Cas جدا می‌شود و به‌عنوان یک crRNA بالغ عمل می‌کند ، در مرحله سوم، پروتئین Cas با کمک crRNA هدف را تشخیص می‌دهد و برش ژنوم را ایجاد می‌کند ، بسیاری از سیستم‌های CRISPR بر اساس وجود یک PAM اختصاصی توالی عمل می‌کنند که در مجاورت سایت اختصاصی crRNA در ژنوم هدف قرار دارد (Makarova K. S., 2011).

سیستم CRISPR/Cas

دانشمندان یک سیستم دفاعی میکروبی جدید کشف کرده اند که از خود در برابر عناصر ژنتیکی ویروسی و متحرک دفاع می کند. یکی از مکانیسم‌های دفاعی موجود در باکتری‌ها و آرکی باکتری ها، سیستم CRISPR/Cas نامیده می‌شود. با ادغام توالی‌های DNA در ژنوم آن‌ها که مشابه مهاجمان قبلی است، باکتری‌ها و آرکی باکتری ها یک حافظه سلولی از آنها ایجاد می‌کنند .این توالی‌های اکتسابی به آن‌ها اجازه می‌دهد تا ویروس‌ها یا مهاجمان ژنتیکی متحرک را که منجر به تخریب توالی‌های مهاجم می‌شود، شناسایی کرده و به عنوان یک سیستم ایمنی سازگار عمل کنند(Rocha, 2022) . ایمنی CRISPR طی چند مرحله مشخص می شود. در مرحله سازگاری، باکتری و آرکیا حافظه سلولی فاژهای مهاجم را به دست می آورند .توالی‌های ژنوم فاژ در جایگاه CRISPR ژنوم‌های باکتریایی یا باستانی، متشکل از ۲۴ تا ۴۷ جفت باز (bp)تکرار شده و توسط اسپیسر جدا می‌شوند. مکان های منحصر به فرد سیستم CRISPR برای اولین بار در سال ۱۹۸۷ کشف شد بعدها، دانشمندان نشان دادند که سیستم CRISPR/Cas به عنوان یک سیستم ایمنی تطبیقی عمل می

www.SID.ir

Archive of SID

کند که در نهایت به عنوان یک سیستم همه کاره برای ویرایش ژنوم قابل برنامه ریزی RNA مورد استفاده قرار گرفت (Ishino, 2018) .

پروتئین های Cas سیستم CRISPR

پروتئین‌های Cas در میان جامعه تحقیقاتی برای کاربردهای مهندسی ژنوم گسترده‌تر محبوبیت پیدا کرده‌اند و در حال حاضر در زمینه‌های مختلف از جمله بیوتکنولوژی، کشاورزی و تحقیقات پزشکی استفاده می‌شوند. پروتئین های قابل برنامه ریزی Cas که اخیراً کشف شده اند مانند Cas 12، Cas 13 و Cas 14 دقت ویرایش ژنوم با واسطه CRISPR/Cas را بهبود بخشیده اند . مکانیسم این پروتئین های مختلف Cas، جوانب مثبت و منفی، و کاربردهای آن ها به تفصیل در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفته است.

پروتئین های Cas1 و Cas2

Cas1 و Cas2 به طور کلی پروتئین های حفاظت شده در سیستم ایمنی سازگار پروکاریوتی هستند . سیستم CRISPR/Cas از یک آرایه CRISPR شامل تکرارها (حدود ۳۰ تا ۴۰ جفت باز) جدا شده توسط اسپیسرها، یک ماژول مجاور شامل Cas1 و Cas2 و پروتئین‌های امضای متمایز تشکیل شده است(Nuñez, 2014) .

مکانیسم پروتئین های Cas1 و Cas2

Cas1 و Cas2 متعلق به سیستم CRISPR نوع II هستند که در E. coli یافت می شود . E. coli کمپلکس Cas1-Cas2 واسطه کسب اسپیسر در داخل بدن است. با این حال، مکانیسم مولکولی پشت این پروتئین ها در سراسر ایمنی نامشخص است. پروتئین های Cas1 و Cas2 یک کمپلکس اینتگراز متشکل از دو دیمر Cas1 دیستال تشکیل دادند که توسط یک دایمر Cas2 پل شده بودند . پروتئین‌های Cas1 و Cas2 مانند DNA دوقلو به پیش‌اسپیسر متصل می‌شوند. پیش فاصله‌ساز، ناحیه رهبر نزدیک آرایه CRISPR را با یک جفت تکرار معکوس در داخل تکرار CRISPR هدایت می کند(McGinn, 2019) .

www.SID.ir

Archive of SID

کاربردها،مزایا و معایب پروتئین های Cas1 و Cas2

Cas1 و Cas2 پروتئین های حفاظت شده در بین تمام سیستم های CRISPR/Cas هستند. مکانیسم مولکولی پشت پروتئین‌های Cas1 و Cas2 هنوز نامشخص است (Van Der Oost, 2014).تاکنون هیچ مطالعه ویرایش ژنومی از طریق پروتئین های Cas1 و Cas2 نشان داده نشده است. بنابراین، محاسن و معایب قابل توجه پروتئین Cas1 و Cas2 باید قبل از استفاده از آنها در زمینه های مختلف ارزیابی شود(Katalani, 2020) .

پروتئین Cas9

Cas9 پروتئینی است که با سیستم ایمنی تطبیقی CRISPR S. pyogenes مرتبط است و به آن پروتئین SpyCas9 می گویند. پروتئین SpyCas9 دارای یک دامنه چند منظوره بزرگ از ۱۳۶۸ اسید آمینه بود و به عنوان اندونوکلئاز DNA در سیستم‌های CRISPR/Cas طبیعی و مصنوعی عمل می‌کند(Safari, 2019) .

مکانیسم پروتئین Cas9

مکانیسم پروتئین Cas9 به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است. پروتئین Cas9 دارای شش دامنه است:

(۱) لوب تشخیص (REC I)،(۲)(REC II)،(۳) مارپیچ پل غنی از آرژنین، (۴) تعامل PAM،(۵) HNH، و (۶) RuvC

REC I دامنه اصلی مسئول اتصال با gRNA است. تابع REC II مطالعه نشده است .مارپیچ پل غنی از آرژنین پس از اتصال به توالی های هدف، فعالیت برش را آغاز می کند. تعامل با PAM ویژگی PAM را می دهد، که مسئول اتصال به دنباله هدف است. HNH و RuvC حوزه‌های نوکلئازی برای بریدن توالی هدف هستندپروتئین Cas9 به دلیل عدم وجود gRNA غیر فعال می ماند. gRNA مهندسی شده شکل T را تشکیل می دهد که در ۱ چهار حلقه و ۳ حلقه ساقه نقش دارد . gRNA طوری برنامه ریزی شده است که دارای یک انتهای ۵' است که مکمل توالی هدف است. gRNA برنامه ریزی شده به Cas9 متصل می شود و تغییراتی در پروتئین ایجاد می کند که پروتئین غیر فعال Cas9 را به شکل فعال خود هدایت می کند. هنگامی که فعال شد، با اتصال به دنباله ای که با توالی ('5'-NGG-3) PAM مطابقت دارد، دنباله هدف را جستجو می کند. سپس Cas9 با استفاده از دامنه های HNH و RuvC خود، dsDNA را در ۳ جفت

www.SID.ir

Archive of SID

باز در بالادست PAM قطع می کند(Hillary, 2023) . سیستم spyCas9 برای برش DNA هدف، یک توالی "دانه[1]" کوتاه با دی نوکلئوتید ۵'- 'NGG-3حاوی PAM را تشخیص می دهد(Schmidt, 2021) .

کاربرد پروتئین Cas9

پروتئین Cas9 نوید زیادی برای کاربردهای مهندسی ژنوم کارآمد و هدفمند در تحقیقات، پزشکی و بیوتکنولوژی دارد. سهولت اصلاح ژنوم در بسیاری از گونه‌ها با طراحی ساده یک توالی gRNA، آزمایش‌های ویرایش ژنوم در مقیاس بزرگ را قادر می‌سازد تا عملکرد ژنوم را بیش از تکنیک‌های ویرایش ژن سنتی مانند TALEN و ZFN بررسی کنند (Bortesi, 2015). علاوه بر این، پروتئین Cas9 نیز با غیرفعال کردن حوزه‌های نوکلئاز برای کاهش سرعت رونویسی، به یک دستگاه خانگی هدایت‌شونده RNA (dCas9) تبدیل می‌شود. استفاده از همجوشی موثر پروتئین‌های Cas9 یا (sgRNA) برای تغییر حالت‌های رونویسی مکان‌های ژنومی خاص، یا بازآرایی ژنوم، می‌تواند به طور قابل توجهی اصلاح مهندسی ژنوم را با استفاده از سیستم CRISPR/Cas9 گسترش دهد. سیستم CRISPR/Cas9 به طور گسترده توسط محققان پذیرفته شده است و در زمینه‌های مختلف از جمله میکروب‌ها، گیاهان ، حیوانات ، حشرات و رده‌های سلولی انسانی استفاده شده است(Hsu, 2014) .

مزیت سیستم CRISPR/Cas9 سادگی طراحی با کارایی بیشتر نسبت به سیستم های موجود ZFN و TALEN است . ویرایش ژنوم چندگانه یکی دیگر از مزایای قابل توجه Cas9 است که می تواند با طراحی همزمان چند gRNA اختصاصی توالی به دست آید . علی‌رغم پیشرفت‌های متعدد، سیستم CRISPR/Cas9 با معایب متعددی مواجه شد و همچنین پرسش‌های متعددی درباره خطرات مرتبط با ویرایش باز کرد. یک مثال gRNA است که Cas9 را برای جدا کردن dsDNA یا ssDNA جهش‌های روی و خارج از هدف بالاتری را در ارگانیسم‌های هدف هدایت می‌کند . حتی بهترین سیستم CRISPR/Cas در دسترس که از HDR استفاده می کند نیز جهش های نامطلوب را ایجاد می کند. با این حال، این اثرات خارج از هدف را می توان با استفاده از نسخه Cas9 تغییر یافته به نام null Cas9 (nCas9) کاهش

[1] seeds sequence

www.SID.ir

Archive of SID

داد، که تنها در یک رشته نسبت به DSB ها یک خط ایجاد می کند . با این حال، با استفاده از nCas9، که نیاز به نسخه‌های Cas9 ارتقا یافته در آینده دارد، نمی‌توان ۱۰۰٪ اهداف را کاهش داد(Janik, 2020) .

پروتئین Cas12

Cas12 یک پروتئین همه کاره با کاربردهایی از جمله ویرایش اپی ژنوم است(Xu, 2021) . پروتئین Cas12 متعلق به سیستم CRISPR نوع V است(He, 2023) .پروتئین Cas12 اخیراً به‌عنوان یک اندونوکلئاز DNA هدایت‌شده با RNA مؤثر ظاهر شده است که جایگزینی برای پروتئین Cas9 برای ویرایش ژنوم می‌شود(Najafi, 2022) . پروتئین Cas12 از گونه های Acidaminococcus (AsCas12a) و باکتری Lachnospiraceae (LbCas12a) جدا شد که با ویروس های مهاجم مبارزه می کند. پروتئین Cas9 با دقت بیشتری در برابر عدم تطابق در ۱۰ جفت باز اولیه مارپیچ RNA-DNA نزدیک به دنباله PAMمتمایز می شود(Tang Y. G., 2021) . علاوه بر این، Cas12 کمی شبیه پروتئین Cas9 نیست. در نتیجه، این پروتئین می تواند crRNA پیش ساز را به تنهایی پردازش کند که به tracrRNA یا RNase III نیاز ندارد. این فرآیند محققان را به استفاده از پروتئین Cas12 برای ویرایش ژنوم چندگانه تشویق کرد(Zink, 2020) .

مکانیسم پروتئین Cas12

پروتئین Cas12 فقط به crRNA نیاز دارد تا یک برش کارآمد در ssDNA و dsDNA ایجاد کند. پروتئین Cas12 حاوی دومین RuvC و لوب نوکلئاز(NUC) برای فعالیت برش است. مانند Cas9، Cas12 با یک سایت هدف بالقوه در کنار یک دنباله PAM روبرو می شود. هنگامی که Cas12 شروع به اتصال می کند، حلقه R را ایجاد می کند که هیبریداسیون جفت پایه بین crRNA و رشته DNA هدف را تشکیل می دهد. در طول این مرحله، Cas12 با < ۱۷ جفت باز توالی هدف مطابقت دارد و منجر به تشکیل حلقه R می شود . هنگامی که حلقه R تشکیل شد، پروتئین Cas12 از دامنه فعال RuvC خود برای جدا کردن رشته غیرهدف با کمک دنباله PAM استفاده می کند . با این حال، عملکرد دامنه RuvC پروتئین Cas12 در برش رشته DNA هدف هنوز به وضوح مورد مطالعه قرار نگرفته است(He, 2023) و (Schindele, 2018).

www.SID.ir

Archive of SID

کاربرد پروتئین Cas12

یک سیستم مختصرتر، CRISPR/Cas12، dsDNAیا ssDNA را از طریق دامنه RuvC برش می‌دهد و به tracrRNAنیاز ندارد. اخیراً، گروه Doudna یک ابزار تشخیصی جدید CRISPR/Cas با نام گزارش‌دهنده CRISPRبا هدف DNA endonuclease (DETECTR) بر اساس پروتئین Cas12 معرفی کرده است . (Katalani, 2020) . این تکنیک DETECTR از آنزیم نوع V برای جدا کردن توالی ssDNA در یک فرآیند سه مرحله‌ای استفاده می کند:

(۱) پروتئین Cas12a و crRNA هدف به پروب‌های گزارشگر DNA تکمیل می‌شوند. هنگامی که crRNA توالی هدف خود را از طریق پروتئین Cas12a شناسایی کرد، پروتئین Cas12a فعالیت جانبی را آغاز می کند و ssDNA یا dsDNA هدف را می شکافد.(۲) کاوشگر DNA هدف با فلوروفورها و یک مولکول خاموش کننده متصل می شوند.(۳) تخریب کاوشگرهای DNA فلوروفور و خاموش کننده را آزاد می کند و یک سیگنال فلورسنت قوی برای تشخیص ssDNA یا برش dsDNA هدفمند تولید می کند.علاوه بر این، این سیستم حتی یک مولکول از ذرات ویروسی را شناسایی کرد. به عنوان مثال، چن و همکاران. (۲۰۱۸) از تکنیک DETECTR استفاده کرد و ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) را شناسایی کرد.به طور خلاصه، آنها ssDNA غیر اختصاصی Cas12 را با DETECTR ترکیب کردند و چندین سویه HPV16 و HPV18 را از عصاره‌های DNA خام نمونه‌های بالینی در عرض ۱ ساعت متمایز کردند. علاوه بر این، محققان ویروس تب خوکی آفریقایی (ASFV) را با استفاده از سیستم CRISPR/Cas12 شناسایی کردند(Hillary, 2023) .یک سیستم نقطه مراقبت مبتنی بر فلورسنت (POC) را با CRISPR/Cas12 ترکیب کردند و ASFV را در عرض ۲ ساعت شناسایی کردند. از این نتیجه، آنها گزارش دادند که CRISPR/Cas12 بسیار خاص است و می تواند حتی تا یک نوکلئوتید از یک ویروس هدف را شناسایی کند(Hillary, 2023) .

مزایا و معایب پروتئین Cas12

پروتئین Cas12 نیز مانند Cas9 به عنوان تنها عضو خانواده CRISPR برای ویرایش ژنوم در نظر گرفته شد ، اما در بیشتر شرایط، Cas12 برتر از پروتئین Cas9 تلقی می‌شد، زیرا پروتئین Cas12 ،DSBهای متحرک تولید می کند و مکانیسم تعمیر HDR را به جای NHEJ و HDR ترویج می کند .سیستم Cas12 همچنین بر معایب مرتبط با استراتژی

www.SID.ir

Archive of SID

های تشخیصی غلبه می کند(Hillary, 2023) و(Yang, 2023) . به عنوان مثال، تشخیص SARS-COV-2 با استفاده از qRT-PCR کمی به زمان بیشتری برای دریافت نتایج نیاز دارد. اما DETECTR مبتنی بر CRISPR/Cas12، SARS-CoV-2 را در عرض ۱ ساعت تشخیص می‌دهد .این نتایج مزیت سیستم CRISPR/Cas12 را ثابت کرد که می‌تواند در شناسایی ویروس‌های جدید در آینده نیز مورد استفاده قرار گیرد (Gupta, 2021). پیشرفت سریع سیستم CRISPR-Cas12 برای ویرایش ژنوم انقلابی برای علوم زیستی ثابت شده است. با وجود کاربرد گسترده این فناوری، سیستم CRISPR/Cas12 با چندین نقص قابل توجه مواجه است.اگرچه این سیستم با موفقیت برای وارد کردن دقیق DNA به جایگاه ژنومی مورد نظر استفاده شده است، اما اثربخشی آن بسته به نوع سلول متفاوت است(Watters, 2021) .

پروتئین Cas13

یکی از جدیدترین پروتئین Cas کشف شده Cas13 است(Schindele, 2018) . سیستم CRISPR/Cas13 به عنوان یک سیستم ایمنی «تطبیقی[2]» در آرکی باکتری ها و باکتری‌ها برای دفاع در برابر عناصر RNA مهاجم عمل می کند. خانواده پروتئین Cas13 شامل دو زیر گروه است(Mahas, 2019) :

(۱) پروتئین Cas13a از باکتری Leptotrichia shahii (LshCas13a)، که به طور رسمی به عنوان C2c2 شناخته می شود و متعلق به نوع VI است و (۲) Cas13b از Prevotella sp. (PspCas13b) متعلق به سیستم CRISPR/Cas نوع III است. این سیستم فقط ssRNA را هدف قرار می دهد و می شکافد، نه ssDNA یا dsDNA را(Pandita, 2021) .

مکانیسم پروتئین Cas13a

پروتئین Cas13a از طریق یک crRNA تک رشته مانند پروتئین Cas12 از پردازش قبل از crRNA فعال می شود. پروتئین Cas13a شامل crRNA، لوب های NUC، و دو حوزه RNase متصل شونده به نوکلئوتید(HEPN) برای هدف قرار دادن RNA است . LshCas13a با تشخیص توالی هدف (۲۲–۲۸ nt)مکمل فاصله‌گذار crRNA،

[2] adaptive

www.SID.ir

Archive of SID

ssRNA را می‌شکند . توالی هدف توسط یک سایت پروتوسپیسر-فلانکینگ(PFS) در انتهای ۳' احاطه شده است که دارای سوگیری نسبت به آدنوزین (A)، اوراسیل (U) و سیتوزین(C) است. LshCas13a و crRNA به یکدیگر متصل می شوند و ناحیه هدف ssRNA را بدون tracrRNA می شکافند(Liu L. L., 2017) .

مکانیسم پروتئین Cas13b

پروتئین Cas13b دقیق‌تر از پروتئین Cas13a است چراکه یک PFS RNA را با A، U یا G در انتهای ۵' و PAM (NAN/NNA) در انتهای ۳' قرار می‌دهد. این پروتئین با crRNA بالغ مرتبط است ؛ کمپلکس CRISPR/Cas13b، ssRNA هدف را جستجو می‌کند و تغییرات ساختاری را در ssRNA ایجاد می‌کند که تغییرات حاصل منجر به برش غیراختصاصی RNA می‌شود، اما تا به امروز مکانیسم پشت پروتئین Cas13b به طور کامل آشکار نشده است، اما دانشمندان توانایی پروتئین cas13b را برای ویرایش RNA آزمایش کردند(David Oseghale, 2022) .

مزایا و معایب پروتئین Cas13

مانند Cas9 و Cas12، CRISPR/Cas13 نیز یک سیستم هدف‌گیری RNA قوی، دقیق و همه‌کاره است که افق‌های تحقیقاتی جدیدی را در زمینه‌های مختلف گسترده است(Zhang, 2021) .در مقایسه با سیستم های دستکاری RNA قبلی، CRISPR/Cas13 مزایای متعددی دارد(Ahmad, 2021) ، به عنوان مثال، ساختار مدولار آن، که از یک ماژول موثر پروتئین و یک ماژول راهنمای RNA تشکیل شده است، امکان مقیاس پذیری قابل توجهی را با امکان تولید کل کتابخانه های مختلف RNA های راهنما علاوه بر طراحی آسان و سریع فراهم می کند(Kim, 2014) . نسخه‌های جهش یافته Cas13 (Cas13x, dCas13) ،که به تازگی کشف شده‌اند و به عنوان پروتئین‌های قابل برنامه‌ریزی متصل به RNA عمل می‌کنند و به طور موثری اثرگذارهای مختلف را به RNAهای خاص هدف قرار می‌دهند تا جهش‌های خاص را القا کنند(Tang T. H., 2021) . با توجه به بیوژنز ذاتی crRNA، چندین RNA را می توان با استفاده از Cas13 دقیقاً هدف قرار داد.در مقایسه با RNAi، تغییرات ژنومی با واسطه CRISPR/Cas13 به هدف قرار دادن رونوشت های سیتوپلاسمی محدود نمی شود(Quansah, 2023) . علاوه بر این، Cas13 با حذف مستقیم رونوشت‌های mRNA سیتوپلاسمی، کاهش سریع‌تر بیان ژن را ممکن می‌سازد(Wolter, 2018) . اخیرا، SHERLOCK و SHERLOCKv2 مبتنی بر CRISPR/Cas13 نیز نقش حیاتی در توسعه ابزارهای تشخیصی

www.SID.ir

Archive of SID

مولکولی جدید برای شناسایی ویروس‌ها، از جمله SARS-CoV-2 ایفا کردند(Rotondo, 2022) . جدای از این مزیت‌های عمده، CRISPR/Cas13 با جهش‌های خارج از هدف مواجه شد که اشکال عمده این سیستم است (Colognori, 2023). با این حال، تحقیقات آینده به غلبه بر این مانع کمک می کند و به توسعه رویکردهای جدید حذف RNA با ویژگی و کارایی بیشتر کمک می کند.

پروتئین Cas14

گروه دودنا انواع دیگر و مشابه سیستم‌های Cas را که در طبیعت موجود بودند ، از جمله (Cas9، Cas12 و Cas13) را بررسی کردند. آنها با ایجاد یک پایگاه داده متاژنومیک از ژنوم باکتری برای جستجوی ژن های Cas غیر مشخص کاوش کردند، در نهایت آنها پروتئین Cas14 را پیدا کردند که پروتئین Cas کوچکتر با MW 40-70 kd را دارد. این پروتئین Cas14 بسیار کوچکتر (حدود ۴۰۰-۷۰۰ اسید آمینه) از سایر پروتئین های Cas14 است . به دلیل اندازه کوچک آنها، آزمایشگاه Doudna گزارش داد که پروتئین Cas14 می تواند ssDNA را بدون PAM مورد هدف قرار دهد(Hillary, 2023) .

مکانیسم پروتئین Cas14

پروتئین Cas14 ، ssDNA را می شکند و در برابر ویروس های دارای ژنوم ssDNA یا عناصر ژنتیکی متحرک(MGEs) ایمنی ایجاد می کند .پروتئین Cas14 ، ssDNA را تشخیص می‌دهد، واسطه تعامل ناحیه seed با ssDNA هدف می‌شود و موجب شکافت در ssDNA می شود ، نه dsDNA یاssRNA .مانند Cas9، پروتئین Cas14 به هر دو tracrRNA و crRNA برای هدف قرار دادن ssDNA نیاز دارد.راندمان برش پروتئین Cas14 از پروتئین Cas9 و Cas 13 بدون حضور منطقه PAM خاص تر است. بنابراین، این سیستم تمام معیارهای ویرایش ژنوم را دارد(Shahid, 2021) .

کاربرد پروتئین Cas14

سیستم CRISPR/Cas14 اکنون به عنوان برتر از سیستم Cas13 مهار شده است(Ahmad, 2021) . محققان سیستم CRISPR/Cas14 را با DETECTR به عنوان یک رویکرد تشخیصی برای تشخیص ssDNA با دقت بالا ترکیب

www.SID.ir

Archive of SID

کردند(Li, 2021) . هرینگتون و همکاران (۲۰۱۸) برای اولین بار از سیستم CRISPR/Cas14 با تکنیک DETECTR استفاده کرد. آنها gRNA را طراحی کردند که دامنه HECT و RLD حاوی (HERC2) ژن نمونه های بزاق انسان را از افراد دارای پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی چشم آبی(SNP) هدف قرار می دهد.آنها فعال سازی قوی تشخیص (SNP)چشم آبی توسط Cas14 را نشان دادند، در حالی که سیستم Cas12 نتوانست (SNP)چشم آبی را تشخیص دهد. این نتیجه نشان دهنده یک روش مقرون به صرفه برای غربالگری جهش های بیماری زا است و فرصتی عالی برای نقشه برداری از ژن های کاندید مرتبط با پاتوژن های مختلف فراهم می کند. گروهی دیگر Cas14 را برای تشخیص ویروسی در ترکیب با استخراج اسید نوکلئیک ساده شده پیشنهاد می کنند، که شامل استخراج نمونه پیچیده مانند حرارت دادن نمونه های تشخیصی استخراج نشده برای محو کردن نوکلئازها(HUDSON) نمی شود.نتایج پژوهش این گروه نشان داد که Cas14 می تواند در آینده یک پلت فرم پیشرفته برای غربالگری ویروسی فراهم کند (Hillary, 2023).

مزایا و معایب پروتئینCas14

پروتئین Cas14 که dsDNA، ssDNA و RNA را ویرایش می‌کند، مزایای مختلفی نسبت به پروتئین Cas9 سنتی دارد(Khan, 2019) . به عنوان مثال، پروتئین Cas14 دارای حدود ۵۰۰ اسید آمینه است بسیار کوچک است، بنابراین این پروتئین می تواند به راحتی به هر بافتی غیر از پروتئین Cas9 تحویل داده شود. علاوه بر این، گزینش پذیری پروتئین Cas14 وفاداری پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی(SNP) را بهبود می بخشد(Hazan, 2021) . در نهایت، پروتئین Cas14 نیازهای محدود کننده PAM کمتری دارد (فقط از توالی های غنی از T استفاده می کند) ، که به آن اجازه می دهد توالی های ژنومی هدفمند بیشتری را نسبت به پروتئین Cas9 ویرایش کند. با این حال، تا به امروز مطالعات زیادی بر این دسته از Cas پروتئین ها صورت صورت نگرفته است و نیاز به مطالعات و تحقیقات گسترده در آینده دارد (Anzalone, 2020).

www.SID.ir

Archive of SID

بحث و نتیجه گیری

در سال های اخیر استفاده از ابزارهای CRISPR/Cas موجب پیشرفت در مهندسی ژنوم شده است . سهولت استفاده، نیاز به تجهیزات کم و هزینه بسیار کم باعث شده است که بسیاری از آزمایشگاه ها از سیستم های مبتنی بر CRISPR/Cas برای مطالعه عملکرد ژن ها در موجودات مختلف استفاده کنند.کشف اولیه پروتئین Cas9، در سیستم CRISPR ، محققان را در یافتن انواع مختلف Cas مانند پروتئین‌های Cas12، Cas13 و Cas14 تقویت کرده است. این پیشرفت تحقیقاتی در پروتئین‌های Cas پلتفرم‌های هیجان‌انگیزی را در مهندسی ژنوم فراهم کرده است، از جمله شناسایی ویروس‌های RNA دار از گیاهان، حیوانات و انسان‌ها و درمان عفونت‌ها.در حال حاضر مطالعات متعددی برای یافتن گونه های جدید Cas از طبیعت در حال انجام است. با این حال، جنبه‌های متعددی از مکانیسم پروتئین‌های Cas هنوز شناسایی نشده است. بنابراین، درک مکانیسم مولکولی پروتئین‌های Cas، شناسایی پروتئین‌های Cas بدون PAM، پتانسیل استفاده از پروتئین‌های Cas را برای کاربردهای دقیق مهندسی ژنوم افزایش می‌دهد. علاوه بر این، شناسایی پروتئین‌های Cas پیشرفته که هنوز هم ممکن است در بسیاری از آرکی باکتری‌ها وجود داشته باشد، موجب پیشرفت عظیم در حوزه‌های مختلف از جمله تشخیص ویروس‌های جدید، درمان، کشاورزی، اصلاح نژاد و غیره می شود.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

References

Ahmad, A. M. (2021). An outlook on global regulatory landscape for genome-edited crops. *International journal of molecular sciences*, *22*(21), 11753.

Anzalone, A. V. (2020). Genome editing with CRISPR–Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. *Nature biotechnology*, *38*(7), 824-844.

Bortesi, L. &. (2015). The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology advances*, *33*(1), 41-52.

Colognori, D. T. (2023). Precise transcript targeting by CRISPR-Csm complexes. *Nature Biotechnology*, 1-9.

Danner, E. B. (2017). Control of gene editing by manipulation of DNA repair mechanisms. *Mammalian Genome*, *28*, 262-274.

David Oseghale, I. O. (2022). A Review of the CRISPR/Cas System and Its Potential for Early Cancer Diagnosis. *International Research Journal of Oncology*, *6*(4), 83-92.

Doudna, J. A. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, *346*(6213), 1258096.

Gupta, R. K. (2021). CRISPR detectives against SARS-CoV-2: a major setback against COVID-19 blowout. *Applied microbiology and biotechnology*, 1-13.

Hazan, J. &. (2021). CRISPR-Based Approaches for the High-Throughput Characterization of Long Non-Coding RNAs. *Non-coding RNA*, *7*(4), 79.

He, Y. Y. (2023). The CRISPR/Cas System: A Customizable Toolbox for Molecular Detection. *Genes*, *14*(4), 850.

Hillary, V. E. (2023). A review on the mechanism and applications of CRISPR/Cas9/Cas12/Cas13/Cas14 proteins utilized for genome engineering. *Molecular Biotechnology*, *65*(3), 311-325.

Hsu, P. D. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, *157*(6), 1262-1278.

Ishino, Y. K. (2018). History of CRISPR-Cas from encounter with a mysterious repeated sequence to genome editing technology. *Journal of bacteriology*, *200*(7), e00580-17.

Janik, E. N.-B. (2020). Various aspects of a gene editing system—crispr–cas9. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(24), 9604.

Jia, N. &. (2022). Structure-based evolutionary relationship between IscB and Cas9. *Cell Research*, *32*(10), 875-877.

Katalani, C. B. (2020). CRISPR-based diagnosis of infectious and noninfectious diseases. *Biological procedures online*, *22*(1), 1-14.

Khan, M. Z. (2019). Targeting plant ssDNA viruses with engineered miniature CRISPR-Cas14a. *Trends in biotechnology*, *37*(8), 800-804.

Kim, H. &. (2014). A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nature Reviews Genetics,*, *15*(5), 321-334.

www.SID.ir

Archive of SID

Li, P. W. (2021). Applications of the CRISPR-Cas system for infectious disease diagnostics. *Expert Review of Molecular Diagnostics, 21*(7), 723-732.

Liu, L. L. (2017). The molecular architecture for RNA-guided RNA cleavage by Cas13a. *Cell, 170*(4), 714-726.

Liu, Z. D. (2020). Application of different types of CRISPR/Cas-based systems in bacteria. *Microbial cell factories, 19*(1), 1-14.

Mahas, A. A. (2019). CRISPR-Cas13d mediates robust RNA virus interference in plants. *Genome biology, 20*, 1-16.

Makarova, K. S. (2011). Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology, 9*(6), 467-477.

Makarova, K. S. (2020). Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nature Reviews Microbiology, 18*(2), 67-83.

McGinn, J. &. (2019). Molecular mechanisms of CRISPR–Cas spacer acquisition. *Nature Reviews Microbiology, 17*(1), 7-12.

Mojica, F. J.-V. (2016). The discovery of CRISPR in archaea and bacteria. *The FEBS journal, 283*(17), 3162-3169.

Najafi, S. T. (2022). Therapeutic potentials of CRISPR-Cas genome editing technology in human viral infections. *Biomedicine & pharmacotherapy, 148*, 112743.

Nuñez, J. K. (2014). Cas1–Cas2 complex formation mediates spacer acquisition during CRISPR–Cas adaptive immunity. *Nature structural & molecular biology, 21*(6), 528-534.

Pandita, D. P. (2021). CRISPR/Cas13: a novel and emerging tool for RNA editing in plants. *RNA-Based Technologies for Functional Genomics in Plants*, 301-337.

Pickar-Oliver, A. &. (2019). The next generation of CRISPR–Cas technologies and applications. *Nature reviews Molecular cell biology, 8*, 490-507.

Quansah, E. C. (2023). CRISPR-Cas13 in malaria parasite: Diagnosis and prospective gene function identification. *Frontiers in Microbiology*, 14.

Que, Q. C. (2019). Plant DNA repair pathways and their applications in genome engineering. *Plant Genome Editing with CRISPR Systems:Methods and Protocols*, 3-24.

Rocha, E. P. (2022). Microbial defenses against mobile genetic elements and viruses: Who defends whom from what? *PLoS biology, 20*(1), e3001514.

Rotondo, J. C. (2022). Advanced Molecular and immunological diagnostic methods to detect SARS-CoV-2 infection. *Microorganisms, 10*(6), 1193.

Safari, F. Z.-M. (2019). CRISPR Cpf1 proteins: structure, function and implications for genome editing. *Cell & bioscience, 9*, 1-21.

Schindele, P. W. (2018). Transforming plant biology and breeding with CRISPR/Cas9, Cas12 and Cas13. *FEBS letters, 592*(12), 1954-1967.

Schmidt, M. J.-G. (2021). Improved CRISPR genome editing using small highly active and specific engineered RNA-guided nucleases. *Nature communications, 12*(1), 4219.

Shahid, M. S.-S. (2021). Next-generation sequencing and the CRISPR-Cas nexus: A molecular plant virology perspective. *Frontiers in Microbiology, 11*, 609376.

www.SID.ir

Archive of SID

Shmakov, S. A. (2015). Discovery and functional characterization of diverse class 2 CRISPR-Cas systems. *Molecular cell, 60*(3), 385-397.

Shmakov, S. A. (2017). The CRISPR spacer space is dominated by sequences from species-specific mobilomes. *MBio, 8*(5), e01397-17.

Tang, T. H. (2021). Programmable system of Cas13-mediated RNA modification and its biological and biomedical applications. *Frontiers in Cell and Developmental Biology, 9*, 677587.

Tang, Y. G. (2021). The CRISPR–Cas toolbox for analytical and diagnostic assay development. *Chemical Society Reviews, 50*(21), 11844-11869.

Van Der Oost, J. W. (2014). Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology, 12*(7), 479-492.

Watters, K. E. (2021). The CRISPR revolution and its potential impact on global health security. *Pathogens and global health, 115*(2), 80-92.

Wolter, F. &. (2018). The CRISPR/Cas revolution reaches the RNA world: Cas13, a new Swiss Army knife for plant biologists. *The Plant Journal, 94*(5), 767-775.

Xu, X. C. (2021). Engineered miniature CRISPR-Cas system for mammalian genome regulation and editing. *Molecular Cell, 81*(20), 4333-4345.

Xue, C. &. (2019). Mechanisms of type IE and IF CRISPR-Cas systems in Enterobacteriaceae. *EcoSal plus, 8*(2).

Yang, X. &. (2023). A review on CRISPR/Cas: a versatile tool for cancer screening, diagnosis, and clinic treatment. *Functional & Integrative Genomics, 23*(2), 182.

Zhang, S. C. (2021). Alleviation of neurological disease by RNA editing. *Methods, 194*, 94-99.

Zink, I. A. (2020). Heavily armed ancestors: CRISPR immunity and applications in archaea with a comparative analysis of CRISPR types in sulfolobales. *Biomolecules, 10*(11), 1523.

www.SID.ir