تکنولوژی CRISPR/Cas9 و کاربرد آن در درمان بیماری‌های ژنتیکی

• دکتر صادق ولیان بروجنی
متخصص ژنتیک پزشکی، استاد ژنتیک، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، بخش ژنتیک
svallian@sci.ui.ac.ir

• دکتر فرزانه محمدی فارسانی
دکتری ژنتیک مولکولی، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، بخش ژنتیک

چکیده

معرفی تکنولوژی DNA نوترکیب در سال ۱۹۷۰ عصر جدیدی در حوزه زیست شناسی گشود. با ارائه این تکنیک برای اولین بار محققان زیستی توانستند مولکول‌های DNA را به منظور ابداع راهکارهای درمانی جدید دستکاری نمایند. امروزه روش‌های هدفمند تغییر ژنوم سلول‌های زنده ابزار قدرتمندی در درمان بیماری‌های ژنتیکی فراهم نموده است. تکنیک CRISPR/Cas9 یکی از جدیدترین ابزارهای تغییر ژنوم است که بر پایه روش‌های ویرایش ژن سیستم ایمنی باکتری طراحی شده است. این تکنیک بسیار کارآمد، سریع و ساده می‌باشد که امید می‌رود تا بتوانیم هر نوع ژنی را از سلول حذف یا به اضافه نموده و یا تغییر دهیم. در این نوشتار اساس این تکنیک و کاربرد آن در درمان بیماری‌های ژنتیکی مورد بررسی قرار گرفته است.

کلمات کلیدی: ویرایش ژن، درمان بیماری‌های ژنتیکی

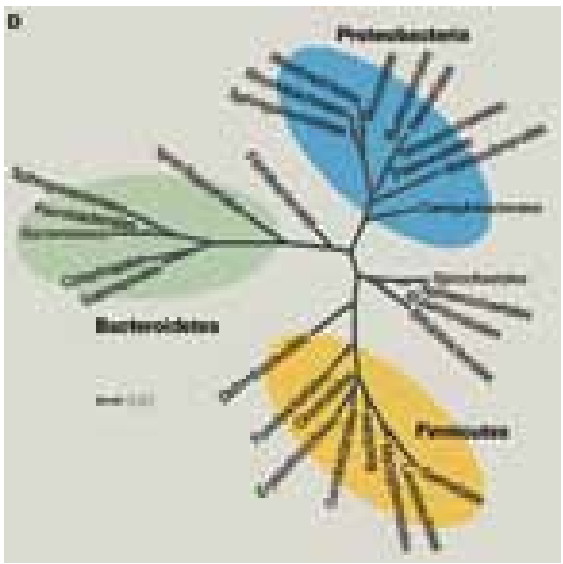
معرفی سیستم CRISPR/Cas9

ارائه یک راهکار با ارزش و کارآمد در ویرایش هدفمند ژنوم[1] سلول‌های زنده یکی از مهم‌ترین اهداف محققان زیستی در سال‌های اخیر بوده است. اولین مرحله اساسی برای تغییر هدفمند ژنوم، ایجاد یک شکسته دو رشته[2](DSB) در مکان مورد نظر می‌باشد که عموماً توسط یک آنزیم نوکلئاز[3] انجام می‌شود. CRISPR/Cas9[4] سیستمی متشکل از یک پروتئین نوکلئاز (Cas9) متصل به RNA (CRISPR) است که توسط باکتری‌ها (مانند استرپتوکوک پایوژنز[5]) و آرکی‌ها برای جلوگیری از تهاجم عوامل ژنتیکی بیگانه (مانند ویروس‌ها و باکتری‌ها) مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱). امروزه این سیستم به عنوان یک ابزار بسیار قدرتمند جهت دستکاری ژنوم با اهداف درمانی استفاده می‌شود. مولکول RNA موجود در سیستم CRISPR/Cas9 باکتری، ترادفی از چند توالی تکراری کوتاه است که با اتصال به مولکول DNA خارجی، امکان تجزیه آن را توسط Cas9 فراهم می‌کند. جایگزینی

1- Targeted genome editing
2- DNA double-stranded break
3- Nuclease
4- Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-associated protein-9 nuclease
5- Streptococcus pyogenes

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-11-02]

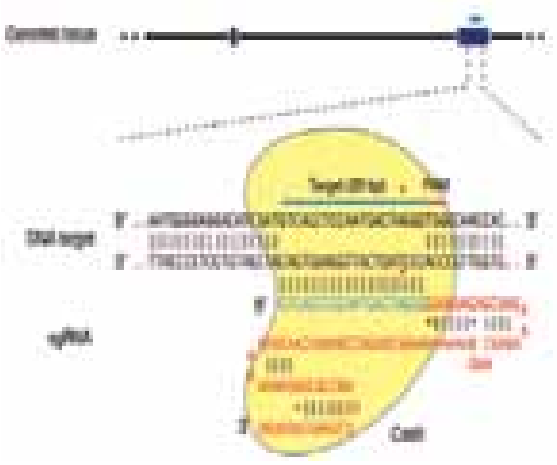
RNA موجود در CRISPR/Cas9 با یک مولکول RNA هدفمند و انتقال آن به سلول، امکان ویرایش ژنوم سلول زنده فراهم می‌شـود (۲). شـکل ۱ درخت تبار زایشی گونه‌های حاوی سیستم ایمنی CRISPR/Cas9 را نشان می‌دهد.



شکل ۱. درخت تبار زایشی گونه‌های مختلف دارای سیستم ایمنی CRISPR/Cas9(۱).

اجزا سیستم CRISPR/Cas9

بـه طـور کلی سـه نـوع سیسـتم CRISPR (شـامل سیستم‌های نوع I، II و III) در رنج وسیعی از باکتری‌ها و آرکی باکتری‌ها شناسـایی شده است که هر کدام شامل یک RNA غیر کد کننده حاوی توالی‌های تکرار مستقیم هستند. این تکرارها عموماً بـا توالی‌هایی کوتاه و متغیر از یکدیگر جدا می‌شـوند. این توالی‌ها که از ژنوم های خارجی منشـأ گرفته‌اند، آرایه crRNA[6] نامیده می‌شوند و با DNA هدف مکمـل می‌شـوند. درون DNA هـدف در نزدیکی توالی متصل شـونده به crRNA عمومـاً موتیف کوچکی وجود دارد که PAM[7] نامیده می‌شـود. سیستم CRISPR نوع II یکی از شناخته شـده ترین سیستم‌ها بوده و حاوی نوکلئاز Cas9، آرایه crRNA به عنوان RNA راهنما (sgRNA) و یک RNA داربستی اسـت. هر واحد crRNA موجود در این سیسـتم حاوی ۲۰ نوکلئوتید و یک تکرار مسـتقیم ویژه است و با ۲۰ نوکلئوتید موجود در توالی هدف تشکیل جفت بازهای واتسـون کریک می‌دهد (شـکل ۲). سیستم CRISPR/Cas9 را می‌توان با بهینه کردن کدهای Cas9 براساس کدهای ژنتیکی پستانداران و نیز فراهم نمودن اجزا RNA آن، در سلول‌های انسان نیز مورد استفاده قرار داد. با تغییر توالی ناحیه ۲۰ نوکلئوتیدی نیز می‌توان هر نوع ژنی را در این سلول‌ها مورد هدف قرار داد (۲).



شکل ۲. تصویری شماتیک از نوکلئاز Cas9 هدایت شونده توسط RNA

در ایـن تصویر Cas9 با اسـتفاده از یک sgRNA حاوی ۲۰ نوکلئوتید راهنما (به رنگ آبی) و یک RNA داربستی (به رنگ قرمز) یک ناحیه از ژنوم را هدف قرار داده است (۲).

6- CRISPR RNA (crRNA) array
7- Protospacer adjacent motif

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-11-02]

کاربرد و مکانیزم عمل تکنیک CRISPR/Cas9 در مهندسی ژنوم

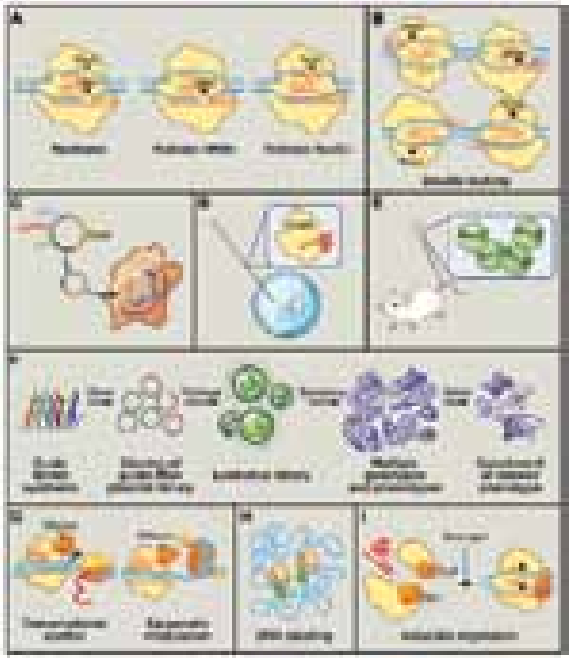
سیستم Cas9 را می‌توان در رنج وسیعی از دستکاری‌های ژنومی مورد استفاده قرار داد. به طور کلی دستکاری‌های ژنتیکی به کلیه فرآیندهایی گفته می‌شود که ژن‌هایی را درون سلول هدف گیری نموده و تغییر داد. دستکاری های ژنتیکی اساس بسیاری از فعالیت‌های علمی، بیوتکنولوژی، تأمین غذا و داروی انسان است (شکل ۳) (۱).



شکل ۳. کاربردهای مختلف ویرایش ژنومی

کنترل ژنیک و اپی ژنتیک سلول‌ها با استفاده از تکنولوژی‌های تغییر ژنوم، اساس بسیاری از فعالیت‌های بیولوژیکی، بیوتکنولوژی و دارویی انسان است (۱).

انواع کاربردهای تکنیک CRISPR/Cas9 در ویرایش ژنوم در شکل ٤ نشان داده شده است. تکنیک CRISPR/Cas9 را می‌توان جهت حذف و اضافه‌های کوچک ژنومی، حذف‌ها یا بازآرایی‌های بزرگ (شامل واژگونی یا جابجایی)، فعال سازی ژن، تنظیم بیان ژن با تغییر آرایش هیستون ها یا متیلاسیون DNA و تعیین مکان ژنومی یک لوکوس خاص با استفاده از پروتئین‌های فلئورسنت مورد استفاده قرار داد (۳).



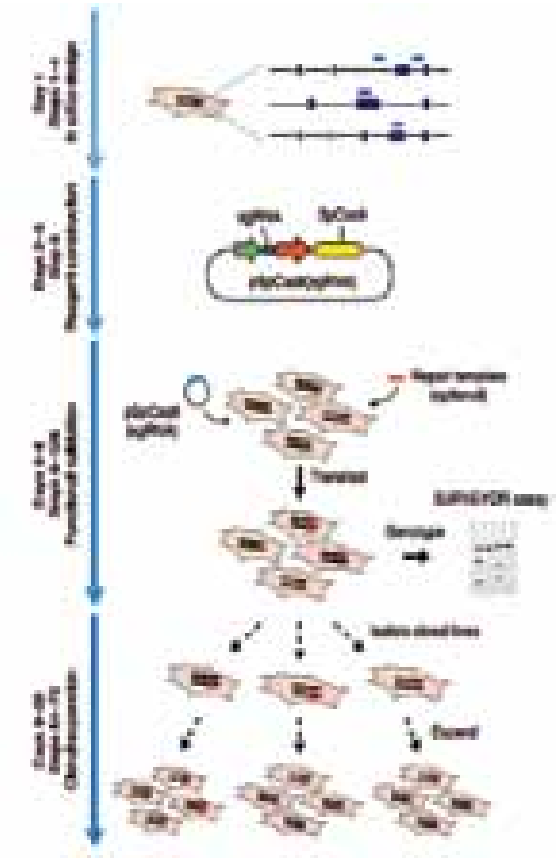
شکل ٤. شمایی کلی از انواع کاربردهای تکنیک CRISPR/Cas9 در مهندسی ژنوم (A)

در پروتئین Cas9 دو دومین نوکلئازی با نام‌های RuvC و HNH وجود دارد که هر کدام با برش یک رشته از DNA سبب ایجاد شکست‌های دو رشته با انتهای صاف در آن می‌شوند. با ایجاد جهش در یکی از این دو دومین می‌توان آنزیم‌هایی تولید کرد که شکست‌های تک رشته در DNA هدف ایجاد می‌کنند. (B) با استفاده از دو مولکول Cas9 جهش‌دار می‌توان سیستمی طراحی کرد که شکاف دو رشته ای با دو شکست یکسان در ژنوم ایجاد می‌نماید. (C) پلاسمید حاوی توالی‌های کد کننده Cas9 و sgRNA را می‌توان به سادگی به هر نوع سلول دلخواه انتقال داد. (D) سیستم CRISPR/Cas9 تخلیص شده را می‌توان به سلول تخمک تزریق نمود. (E) سیستم CRISPR/Cas9 را می‌توان برای تغییر ژنتیکی سلول‌های سوماتیک با کارایی بالایی مورد استفاده قرار داد. (F) با سنتز و انتقال RNA راهنما می‌توان غربالگری عملکردی در سطح ژنوم انجام داد. (G) با اتصال یک فاکتور فعال‌کننده رونویسی یا یک فاکتور عملکردی تغییرات

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-11-02]

اپی ژنتیکی بـه Cas9 غیرکاتالیتیک (Cas9 در حالت جهش یافتـه به طریقی که نتواند در DNA برش ایجاد کنـد) می‌توان ایـن فرآیندها را در سـلول کنترل نمود. Cas9 (H) متصل به یک ترکیب فلئورسـنت می‌تواند برای تعیین مکان ژنومی DNA هدف مورد استفاده قرار گیـرد. (I) بـا اتصال دو پروتئین هـدف به اجزا Cas9 می‌تـوان ایجاد یک هترودومین خاص را در سـلول القا نمود (۱).

مراحل هدف گیری یک ژن در سـلول توسط سیستم CRISPR/Cas9 به طور شـماتیک در شـکل ۵ نشان داده شده است.



شکل ۵. مراحل طراحی و انتقال سیستم CRISPR/Cas9 به سلول

در اولین مرحله sgRNA مورد نیاز برای هدف گیری ژن مـورد نظر و نیـز پرایمرهای مورد نیـاز برای تعیین ژنوتایپ توسط ابزارهای in silico طراحی می‌شوند. در مرحله دوم، sgRNA راهنما در یک پلاسـمید بیانی که حاوی RNA داربستی و توالی کدکننده پروتئین Cas9 اسـت کلون می‌شود. سپس این پلاسمید که حاوی تمام اجزا مورد نیاز برای هدف گیری ژن مورد نظر اسـت، به سـلول‌های هدف انتقال داده می‌شود. در آخرین مرحله سـلول‌هایی که پلاسـمید را دریافت کرده‌اند تکثیر داده می‌شوند (۲).

به طور خلاصه برای انجام این تکنیک، در اولین مرحله sgRNA مورد نیاز برای هدف گیری ژن مورد نظر و نیز پرایمرهای مورد نیاز برای تعیین ژنوتایپ توسط ابزارهای in silico (مانند CRISPR Design Tools) طراحی می‌شـود. در مرحله دوم، توالی sgRNA راهنما در یک پلاسمید بیانی که حاوی RNA داربستی و توالی کدکننده پروتئین Cas9 اسـت کلون می‌شود. پلاسمید کلون شده در نهایت pSpCas9(sgRNA) خوانده می‌شـود. این پلاسمید که حاوی تمام اجزا مورد نیاز برای هدف گیری ژن مورد نظر اسـت، در مرحله بعد به سـلول‌های هدف انتقـال داده می‌شـود. در آخرین مرحله سـلول‌هایی که پلاسمید را دریافت کرده‌اند تکثیر داده می‌شوند (۲).

قابلیت CRISPR/Cas9 در هدف گیری بیماری‌های ژنتیکی

گرچـه Cas9 بـه طور وسـیعی به عنوان یـک ابزار تحقیقاتی مورد اسـتفاده قـرار می‌گیرد، می‌توان از آن به عنوان یک وسیله برای هدف گیری بیماری‌های ژنتیکی نیز استفاده نمود. به طور کلی تکنیک CRISPR/Cas9 را برای ویرایش ژنومی بیماری‌هایی می‌توان مورد استفاده قـرار داد که در آن‌ها نیـاز به ویرایش یـک آلل وجود داشـته باشـد. اسـتفاده از این تکنیک برای بیماری‌های نیازمند تصحیح دو آلل کارایی کمتری دارد (٤). در مورد بیماری‌های پیچیده، درمان با استفاده CRISPR/Cas9 می‌تواند بسـیار مشکل‌سـاز باشـد. با این حـال، امکان درمـان چنین بیماری‌هایی با اسـتفاده از این تکنیک در آینده ای نزدیک پیش بینی می‌شود (۵). جدول ۱ لیستی از بیماری‌هایی را نشـان می‌دهـد که امروزه مورد هدف تکنیک CRISPR/Cas9 قرار گرفته‌اند (٦).

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-11-02]

جدول ۱. بیماری‌های ژنتیکی که به طور موفقیت آمیز با استفاده از تکنیک CRISPR/Cas9 مورد هدف قرار گرفته‌اند (٦).

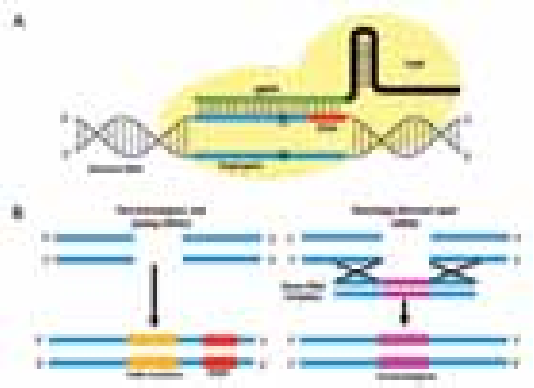
نام بیماری	ژن هدف	روش انتقال	سلول هدف	میزان کارایی(%)
بتا تالاسمی	حذف ژن HHB	الکتروپوریشن تزریق درون سیتوپلاسمی	سلول‌های iPSCs انسانی زیگوت انسانی	۱۷/٦ ۱٤/۳
کیستیک فیبروز	حذف ژن CFTR	لیپوفکشن	سلول‌های ارگانوئید روده انسان	---
تیروزینمی توارثی	جهش نقطه‌ای در ژن FAH	تزریق هیدرودینامیک	سلول‌های in vivo کبد موش	۰/٤±۰/۱۲
HIV-1	CCR5 Δ32 غیرفعال سازی DNA پرووویروس	الکتروپوریشن تزریق هسته ای	سلول‌های iPSCs انسانی سلول‌های JLat10.6	۱۰۰ ۳۰
دیستروفی عضلانی دوشن	حذف اگزونی در ژن دیستروفین	الکتروپوریشن	سلول‌های iPSCs انسانی	۵۰
ناکارآمدی α۱-آنتی‌تریپسین	جهش نقطه ای در SERPINA1	الکتروپوریشن	سلول‌های iPSCs انسانی	۱۸/۸
پلی سیتمی ورا	جهش نقطه ای در JAK2	الکتروپوریشن	سلول‌های iPSCs انسانی	۹/۱۵
آب مروارید	حذف Crygc	الکتروپوریشن	سلول‌های اسپرماتوگونی و بنیادی موش	۲۹/۷
LDL-C	تخریب Pcsk9	آدنوویروس ویروس مرتبط با آدنو	سلول‌های in vivo کبد موش	۵۰ ٤۰

چنانچه بیماری نتیجه تولید یک محصول معیوب در سلول باشد، CRISPR/Cas9 با مکانیسم اتصال انتهای غیرهمولوگ[8] (NHEJ) آلل غالب را از سلول حذف می‌کند. اما چنانچه بیماری نتیجه از دست رفتن عملکرد یک ژن باشد، آلل معیوب به روش نوترکیبی همولوگ[9] (HDR) با یک آلل سالم جایگزین می‌شود.

اساس این دو مکانیسم در شکل ۳ نشان داده شده است. به طور کلی Cas9 برای ویرایش ژنوم یک شکست دو رشته ای در DNA ایجاد می‌کند. ترمیم این شکست در سلول با توجه به اجزا موجود در سیستم CRISPR/Cas9 با یکی از دو روش NHEJ یا HDR انجام می‌شود (٦).

8- Non-homologous end joining
9- Homology-directed repair

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-11-02]



شکل ٦. تصویری شماتیک ازمکانیسم های ویرایش ژنوم توسط CRISPR/Cas9 (A)

مکمل شـدن توالـی ۲۰ نوکلئوتیـدی sgRNA با ژنوم هـدف و ناحیه PAM سـبب بارگیـری Cas9 در محل مربوطه و ایجاد یک شکست دو رشته ای در DNA هدف می‌شود. (B) ترمیم شکست دو رشته ای ایجاد شده توسط دو نوع مکانیسم NHEJ و HDR در سلول انجام می‌شود. NHEJ بـرای حذف ژن معیوب و HDR برای جایگزینی آن با یک آلل سالم مورد استفاده قرار می‌گیرد (٦).

کاربرد و پیشرفت‌های تکنیک CRISPR/Cas9 در ژن درمانی

همان گونه که می دانیم ژن درمانی زمانی مناسب خواهد بود که در سلول‌های معیوب نسخه جهش یافته ترمیم شود. بررسی‌ها نشـان داده اسـت که CRISPR/Cas9 روش مناسـبی جهت انجـام ژن درمانی اسـت (۷). تنها چند ماه پـس از معرفی سیسـتم CRISPR/Cas9 به سـلول‌های پسـتانداران مشـخص شـد که این روش را می‌توان برای کاهش میزان بیان ویروس HIV در سـلول‌های T انسـان مورد اسـتفاده قرار داد (۸). پس از آن تلاش‌های بیشـتری برای کشـف قابلیت اسـتفاده از این سیستم در ژن درمانی بیماری‌هـای عفونـی مانند ویروس هپاتیـت B و ویروس پاپیلومای انسانی صورت پذیرفت. با این حال این مطالعات تنها روی سـلول‌ها و مدل‌های حیوانی انجام شده است. در سـال‌های اخیر پیشرفت‌های بیشتری در این راستا صورت پذیرفته است. در بیماری‌هایی که با پیوند سلول‌های بنیادی درمان می‌شـوند، به طـور کارآمدی تا میـزان ۱۰۰ درصد می‌توان سـلول‌ها را ویرایش نمود. برای بیماری‌هایی مانند کم خونی داسی شکل و یا نقص شدید ایمنی وابسته به X^{10} (X-SCID) با پیوند سلول‌های بنیادی قابل درمان هستند. اما بیماری‌هایی همچون کیستیک فیبروز که در آن‌ها استفاده از سلول‌های بنیادی امکان پذیر نیست باید سلول‌های درون بدن با استفاده از وکتورهای ویروسی به طور بسیار کارآمد مورد هدف قرار داده شوند (۹).

محدودیت‌های سیستم CRISPR/Cas9

همان گونه که اشـاره شـد Cas9 را می‌توان با استفاده از یـک توالـی ۲۰ نوکلئوتیدی راهنما بـرای هدف گیری اختصاصـی ژنوم مورد اسـتفاده قرار داد. تنهـا جزء مورد نیـاز برای عملکـرد Cas9، توالی PAM که درسـت در ناحیـه ´3 توالی ۲۰ نوکلئوتیدی ژن هـدف قرار دارد. هر سیسـتم Cas9 توالی PAM اختصاصی خود را شناسایی می‌کند. بـرای مثال SpCas9 که مربوط به اسـترپتوکوک پایوژنز است، نیازمند توالی NGG در ناحیه PAM است کـه ممکن اسـت در مورد برخی توالی‌هـا این PAM در ناحیه مورد نظر یافت نشود. با این حال این امر هدف‌گیری بسـیاری از توالی‌هـای ژنومـی را بـا محدودیـت مواجه نمی‌سـازد. در ژنوم انسـان به طور متوسـط به ازای هر ۸ الی ۱۲ نوکلئوتید، چنین PAM هایی یافت می‌شـوند (۲). مشکل دیگری که در استفاده از سیستم CRISPR/Cas9 با آن مواجه هسـتیم، کارایی پایین روش HDR اسـت که در درمان بسـیاری از انـواع بیماری‌ها مورد اسـتفاده قرار می‌گیرد. امروزه راهکارهای بسیاری جهت افزایش کارآیی ایـن متد ارائه شـده اسـت از جمله طراحـی یک DNA تک رشـته‌دهنده، مهار مسـیر NHEJ و افزایش شـباهت الگوی دهنده و جایگاه‌های شکسـت دو رشته‌ای. از دیگر چالش‌های تکنیک CRISPR/Cas9 می‌توان به روش‌های انتقال آن به درون بدن اشـاره نمود. گرچه روش‌های اخیر

10- X-linked severe combined immuno deficiency

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-11-02]

در انتقال in vivo موفقیت‌آمیز بوده اســت اما هنوز مسائل حل نشــده‌ای در این زمینه وجود دارد. برای مثال در انتقال درون ماهیچه ای این سیســتم برای مثال شــمار تزریق‌های ســلولی باید به طور قابل توجهی بالا باشد. با وجود تمامی این مســائل، حصول موفقیت‌های اخیر CRISPR/Cas9 در ژن درمانــی مدل‌هــای حیوانی، آینده روشــنی را برای اســتفاده از ایــن تکنیــک در درمان بیماری‌هــای ژنتیکی به تصویر می‌کشد (۱۰).

References

1- Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. Cell. 2014;157(6):1262-78.

2- Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. Nature protocols.20-2281: (11)8; 308-13.

3- Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. Nature biotechnology. 2014;32(4):347-55.

4- Ye L, Wang J, Beyer AI, Teque F, Cradick TJ, Qi Z, et al. Seamless modification of wild-type induced pluripotent stem cells to the natural CCR5Δ32 mutation confers resistance to HIV infection. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2014;111(26):9591-6.

5- Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science. 2013;339(6121):819-23.

6- Lockyer EJ. The potential of CRISPR-Cas9 for treating genetic disorders. Bioscience Horizons: The International Journal of Student Research. 2016;9:hzw012.

7- Yin H, Xue W, Chen S, Bogorad RL, Benedetti E, Grompe M, et al. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. Nature biotechnology. 2014;32(6):551-3.

8- Ebina H, Misawa N, Kanemura Y, Koyanagi Y. Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. Scientific reports. 2013;3.

9- Schwank G, Koo B-K, Sasselli V, Dekkers JF, Heo I, Demircan T, et al. Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. Cell stem cell. 2013;13(6):653-8.

10- Dai W-J, Zhu L-Y, Yan Z-Y, Xu Y, Wang Q-L, Lu X-J. CRISPR-Cas9 for in vivo gene therapy: promise and hurdles. Molecular Therapy-Nucleic Acids. 2016;5:e349.

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-11-02]