

# تکنولوژی CRISPR/Cas9 و کاربرد آن در درمان بیماری‌های ژنتیکی

• دکتر صادق ولیان بروجنی

متخصص ژنتیک پزشکی، استاد ژنتیک، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، بخش ژنتیک  
[svallian@sci.ui.ac.ir](mailto:svallian@sci.ui.ac.ir)

• دکتر فرزانه محمدی فارسانی

دکتری ژنتیک مولکولی، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، بخش ژنتیک

## چکیده

معرفی تکنولوژی DNA نو ترکیب در سال ۱۹۷۰ عصر جدیدی در حوزه زیست‌شناسی 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.

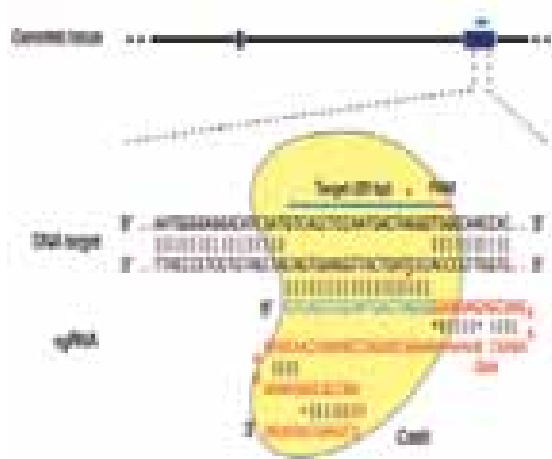
**کلمات کلیدی:** ویرایش ژن، درمان بیماری‌های ژنتیکی

## معرفی سیستم CRISPR/Cas9

ارائه یک راهکار با ارزش و کارآمد در ویرایش هدفمند ژنوم 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<sup>۲</sup> (DSB) در مکان مورد نظر می‌باشد که عموماً توسط یک آنزیم نوکلئاز<sup>۳</sup> انجام می‌شود. CRISPR/Cas9 سیستمی متشکل از یک پروتئین نوکلئاز (Cas9) متصل به CRISPR RNA (CRISPR) است که توسط باکتری‌ها (مانند استرپتوکوک پایوژنز<sup>۴</sup>) 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

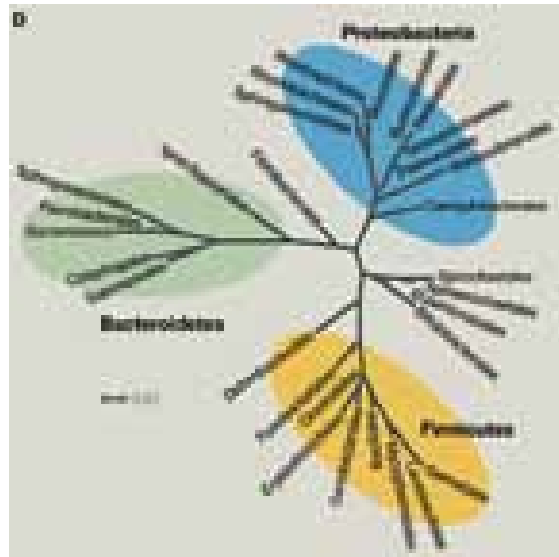
متصل شونده به crRNA عموماً موتیف کوچکی وجود دارد که PAM<sup>۷</sup> نامیده می‌شود. سیستم CRISPR نوع II یکی از شناخته شده ترین سیستم‌ها بوده و حاوی نوکلئاز Cas9، آرایه crRNA به عنوان RNA راهنما (sgRNA) و یک RNA داربستی است. هر واحد crRNA موجود در این سیستم حاوی ۲۰ نوکلئوتید و یک تکرار مستقیم ویژه است و با ۲۰ نوکلئوتید موجود در توالی هدف تشکیل جفت بازهای واتسون کریک می‌دهد (شکل 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 این تصویر Cas9 با استفاده 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).

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



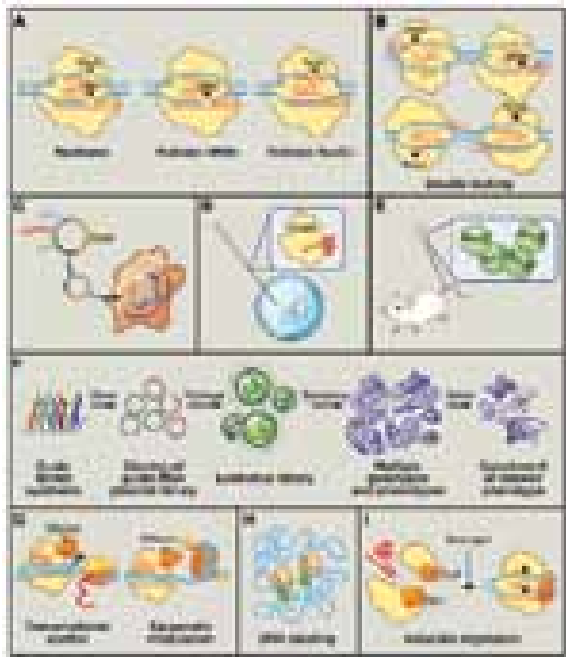
شکل ۱. درخت تبار زایشی گونه‌های مختلف دارای سیستم ایمنی CRISPR/Cas9 (۱).

### اجزا سیستم CRISPR/Cas9

به طور کلی سه نوع سیستم CRISPR (شامل سیستم‌های نوع I، II، و III) در رنج وسیعی از باکتری‌ها و آرکی باکتری‌ها شناسایی شده است که هر کدام شامل یک RNA غیر کد کننده حاوی توالی‌های تکرار مستقیم هستند. این تکرارها عموماً با توالی‌هایی کوتاه و متغیر از یکدیگر جدا می‌شوند. این توالی‌ها که از ژنوم‌های خارجی منشأ گرفته‌اند، آرایه crRNA<sup>۶</sup> نامیده می‌شوند و با DNA هدف مکمل می‌شوند. درون DNA هدف در نزدیکی توالی

6- CRISPR RNA (crRNA) array

7- Protospacer adjacent motif



شکل ۴. شمایی کلی از انواع کاربردهای تکنیک CRISPR/Cas9 در مهندسی ژنوم (A)

در پروتئین Cas9 دو دومین نوکلئازی با نام‌های HNH و RuvC 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 رشته‌ای 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

## 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. دستکاری‌های 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 ۴ 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 هیستون‌ها یا متیلاسیون DNA و تعیین مکان ژنومی یک لوکوس خاص با استفاده از پروتئین‌های فلئورسنت مورد استفاده قرار داد (۳).

مرحله دوم، sgrRNA راهنما در یک پلاسمید بیانی که حاوی RNA داربستی و توالی کدکننده پروتئین Cas9 است کلون می‌شود. سپس این پلاسمید که حاوی تمام اجزا مورد نیاز برای هدف‌گیری ژن مورد نظر است، به سلول‌های هدف انتقال داده می‌شود. در آخرین مرحله سلول‌هایی که پلاسمید را دریافت کرده‌اند تکثیر داده می‌شوند (۲).

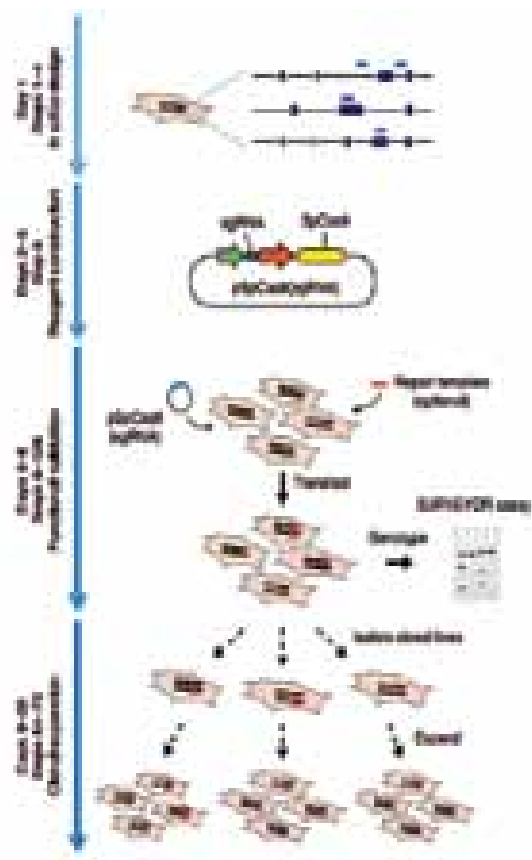
به طور خلاصه برای انجام این تکنیک، در اولین مرحله sgrRNA مورد نیاز برای هدف‌گیری ژن مورد نظر و نیز پرایمرهای مورد نیاز برای تعیین ژنوتایپ توسط ابزارهای *in silico* (مانند CRISPR Design Tools) طراحی می‌شود. در مرحله دوم، توالی sgrRNA راهنما در یک پلاسمید بیانی که حاوی RNA داربستی و توالی کدکننده پروتئین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

### قابلیت CRISPR/Cas9 در هدف‌گیری بیماری‌های ژنتیکی

گرچه Cas9 به طور وسیعی به عنوان یک ابزار تحقیقاتی مورد استفاده قرار می‌گیرد، می‌توان از آن به عنوان یک وسیله برای هدف‌گیری بیماری‌های ژنتیکی نیز استفاده نمود. به طور کلی تکنیک CRISPR/Cas9 را برای ویرایش ژنومی بیماری‌هایی می‌توان مورد استفاده قرار داد که در آن‌ها نیاز به ویرایش یک آلل وجود داشته باشد. استفاده از این تکنیک برای بیماری‌های نیازمند تصحیح دو آلل کارایی کمتری دارد (۴). در مورد بیماری‌های پیچیده، درمان با استفاده از CRISPR/Cas9 می‌تواند بسیار مشکل‌ساز باشد. با این حال، امکان درمان چنین بیماری‌هایی با استفاده از این تکنیک در آینده ای نزدیک پیش‌بینی می‌شود (۵). جدول ۱ لیستی از بیماری‌هایی را نشان می‌دهد که امروزه مورد هدف تکنیک CRISPR/Cas9 قرار گرفته‌اند (۶).

ابری ژنتیکی به Cas9 غیرکاتالیتیک (Cas9) در حالت جهش یافته به طریقی که نتواند در DNA برش ایجاد کند) می‌توان این فرآیندها را در سلول کنترل نمود. Cas9 (H) متصل به یک ترکیب فلئورسنت می‌تواند برای تعیین مکان ژنومی DNA هدف مورد استفاده قرار گیرد. (I) با اتصال دو پروتئین هدف به اجزا Cas9 می‌توان ایجاد یک هترودومین خاص را در سلول القا نمود (۱).

مراحل هدف‌گیری یک ژن در سلول توسط سیستم CRISPR/Cas9 به طور شماتیک در شکل ۵ نشان داده شده است.



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

در اولین مرحله sgrRNA مورد نیاز برای هدف‌گیری ژن مورد نظر و نیز پرایمرهای مورد نیاز برای تعیین ژنوتایپ توسط ابزارهای *in silico* طراحی می‌شوند. در

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

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

اساس این دو مکانیسم در شکل ۳ نشان داده شده است. به طور کلی Cas9 برای ویرایش ژنوم یک شکست دو رشته‌ای در DNA ایجاد می‌کند. ترمیم این شکست در سلول با توجه به اجزا موجود در سیستم CRISPR/Cas9 با یکی از دو روش HDR یا NHEJ انجام می‌شود (۶).

چنانچه بیماری نتیجه تولید یک محصول معیوب در سلول باشد، CRISPR/Cas9 با مکانیسم اتصال انتهای غیرهمولوگ<sup>۸</sup> (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<sup>۹</sup> (HDR) با یک آلل سالم جایگزین می‌شود.

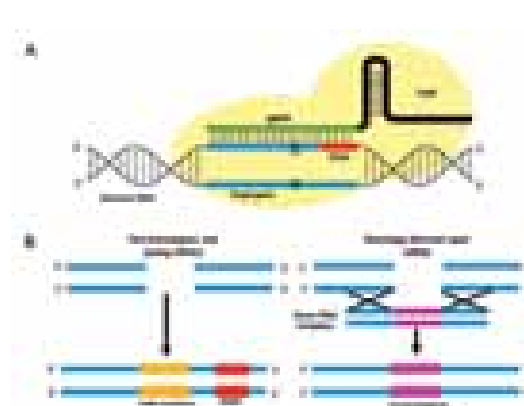
8- Non-homologous end joining

9- Homology-directed repair

سال‌های اخیر پیشرفت‌های بیشتری در این راستا صورت پذیرفته است. در بیماری‌هایی که با پیوند سلول‌های بنیادی درمان می‌شوند، به طور کارآمدی تا میزان ۱۰۰ درصد می‌توان سلول‌ها 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 فیروز 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 اشاره شد Cas9 را می‌توان با استفاده از یک توالی ۲۰ نوکلئوتیدی راهنما برای هدف‌گیری اختصاصی ژنوم مورد استفاده قرار داد. تنها جزء مورد نیاز برای عملکرد Cas9، توالی PAM که درست در ناحیه 3' توالی ۲۰ نوکلئوتیدی ژن هدف قرار دارد. هر سیستم Cas9 توالی PAM اختصاصی خود را شناسایی می‌کند. برای مثال SpCas9 که مربوط به استرپتوکوک پایوژنز است، نیازمند توالی NGG در ناحیه PAM است که ممکن است در مورد برخی توالی‌ها این PAM در ناحیه مورد نظر یافت نشود. با این حال این امر هدف‌گیری بسیاری از توالی‌های ژنومی را با محدودیت مواجه نمی‌سازد. در ژنوم انسان به طور متوسط به ازای هر ۸ الی ۱۲ نوکلئوتید، چنین PAM‌هایی یافت می‌شوند (۲). مشکل دیگری که در استفاده از سیستم CRISPR/Cas9 با آن مواجه هستیم، کارایی پایین روش HDR است که در درمان بسیاری از انواع بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. امروزه راهکارهای بسیاری جهت افزایش کارایی این متد ارائه شده است از جمله طراحی یک DNA تک رشته‌دهنده، مهار مسیر NHEJ و افزایش شباهت الگوی دهنده و جایگاه‌های شکست دو رشته‌ای. از دیگر چالش‌های تکنیک CRISPR/Cas9 می‌توان به روش‌های انتقال آن به درون بدن اشاره نمود. گرچه روش‌های اخیر



شکل ۶. تصویری شماتیک از مکانیسم‌های ویرایش ژنوم توسط CRISPR/Cas9 (A)

مکمل شدن توالی ۲۰ نوکلئوتیدی sgrRNA با ژنوم هدف و ناحیه PAM سبب بارگیری Cas9 در محل مربوطه و ایجاد یک شکست دو رشته‌ای در DNA هدف می‌شود. (B) ترمیم شکست دو رشته‌ای ایجاد شده توسط دو نوع مکانیسم HDR و NHEJ در سلول انجام می‌شود. NHEJ برای حذف ژن معیوب و HDR برای جایگزینی آن با یک آلل سالم مورد استفاده قرار می‌گیرد (۶).

### کاربرد و پیشرفت‌های تکنیک CRISPR/Cas9 در ژن درمانی

همان گونه که می‌دانیم ژن درمانی زمانی مناسب خواهد بود که در سلول‌های معیوب نسخه جهش یافته ترمیم شود. بررسی‌ها نشان داده است که CRISPR/Cas9 روش مناسبی جهت انجام ژن درمانی است (۷). تنها چند ماه پس از معرفی سیستم CRISPR/Cas9 به سلول‌های پستانداران مشخص شد که این روش را می‌توان برای کاهش میزان بیان ویروس HIV در سلول‌های T انسان مورد استفاده قرار داد (۸). پس از آن تلاش‌های بیشتری برای کشف قابلیت استفاده از این سیستم در ژن درمانی بیماری‌های عفونی مانند ویروس هپاتیت B و ویروس پاپیلوما‌ی انسانی صورت پذیرفت. با این حال این مطالعات تنها روی سلول‌ها و مدل‌های حیوانی انجام شده است. در

10- X-linked severe combined immuno deficiency



این مسائل، حصول موفقیت‌های اخیر CRISPR/Cas9 در ژن درمانی مدل‌های حیوانی، آینده روشنی را برای استفاده از این تکنیک در درمان بیماری‌های ژنتیکی به تصویر می‌کشد (۱۰).

در انتقال *in vivo* موفقیت‌آمیز بوده است اما هنوز مسائل حل نشده‌ای در این زمینه وجود دارد. برای مثال در انتقال درون ماهیچه ای این سیستم برای مثال شمار تزریق‌های سلولی باید به طور قابل توجهی بالا باشد. با وجود تمامی

## 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.