

کاربرد و مکانیسم سیستم CRISPR-Cas در درمان بیماری‌های عفونی

● فاطمه محمدی

کارشناسی ارشد میکروب شناسی، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران



● دکتر حبیب ضیغمی

دانشیار میکروب شناسی، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران



zeighami@zums.ac.ir

چکیده

ژن‌ها، نقش به‌سزایی دارند. در این مقاله مروری، به‌طور خلاصه زیست‌شناسی و مکانیسم سیستم‌های CRISPR-Cas را مورد بررسی قرار می‌دهیم و همچنین کاربردهای جدید را برای ارزیابی این سیستم از جمله: ارتباط بین میزبان و پاتوژن، تشخیص دقیق، پیشگیری و درمان بیماری‌های عفونی را مورد بحث قرار خواهیم داد.

کلمات کلیدی: بیماری‌های عفونی، سیستم CRISPR-Cas، ویرایش ژنوم

مقدمه

درک بهتر از ساختار و عملکرد سیستم کریسپر و اجزای آن، منجر به گسترش سریع تحقیقات و برنامه‌های بالینی خواهد شد. تکرارهای خوشه‌ای کریسپر برای اولین بار در سال ۱۹۸۷ توسط Ishiuro و همکاران در باکتری اشریشیا کلای شناسایی شدند که به‌طور مشابه عناصر تکراری سازمان یافته در کروموزوم‌های شیگلا دیسانتری و سروتایپ تیفی ماریوم سالمونلا انتریکا یافت شد (۱).

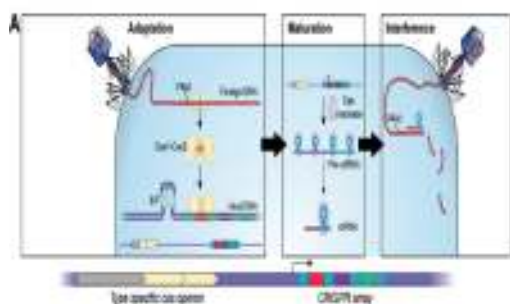
بیماری‌های عفونی همچنان یک تهدید جهانی محسوب که سالانه افراد زیادی به این بیماری همه‌گیر مبتلا می‌شوند. شناخت بهتر چگونگی بیماری‌زایی باکتری‌ها، ویروس‌ها، قارچ‌ها و انگل‌ها به‌همراه تشخیص سریع و درمان عفونت‌های انسانی برای بهبود نتایج بیماری‌های عفونی در سراسر جهان ضروری است. در بسیاری از ژنوم باکتری‌ها و آرکی‌ها، 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 اصلی این سیستم دفاعی پروکاریوتی، RNA های راهنما کوچک است که نوکلئازها را به سوی اسید نوکلئیک‌های مکمل خود در ویروس‌ها و پلاسمیدها هدایت می‌کنند. در حال حاضر فناوری CRISPR-Cas9 به‌طور معمول برای پیشرفت در علم پزشکی بیولوژیکی در حوزه ویرایش کارآمد



ویرایش ژنوم در علوم پایه و داروهای بالینی شده است.

❑ بیولوژی و مکانیسم سیستم CRISPR-CAS

از ویژگی‌های مهم سیستم‌های CRISPR-Cas، محافظت از پروکاریوت‌ها در برابر عناصر ژنتیکی خارجی است. لوکوس ژنومی CRISPR به عنوان یک واحد ذخیره‌سازی اطلاعات است. در آن توالی فاصله دهنده اسید نوکلئیک ناشی از تهاجم عناصر ژنتیکی، جدا می‌شود و بعداً برای هدایت پروتئین‌های Cas برای از بین بردن عناصر خارجی فرا خوانده می‌شوند. در سطح مولکولی، سیستم‌های CRISPR-Cas از طریق فرآیندهای سازگاری، بلوغ و crRNA و تداخل با تنوع بیولوژیکی قابل توجهی در بین سیستم‌ها عمل می‌کنند. (شکل ۱)



شکل ۱. مکانیسم دفاعی سیستم CRISPR-Cas

دارای سه مرحله سازگاری، بلوغ و تداخل است

در سیستم نوع I-E، مرحله سازگاری با شناسایی DNA خارجی توسط PAM مرتبط با مجموعه Cas1-Cas2 نیز آغاز می‌شود. پروتئین میزبان IHF، بخشی از اپرون Cas نیست. این پروتئین، DNA میزبان را خم می‌کند تا مجموعه Cas1-Cas2 بتواند با توالی فاصله دهنده ادغام شود. در طول بلوغ، تولید پیش ساز crRNA از توالی CRISPR رونویسی می‌شود و در crRNA های بالغ به صورت فردی پردازش می‌شود. در مرحله تداخل crRNA های بالغ، نوکلئاز Cas را به توالی اسید نوکلئیک هدف نیز هدایت کرده است و منجر به تجزیه DNA خارجی می‌شود (۱۲).

امروزه دو کلاس از سیستم‌های CRISPR-Cas

نقش فیزیولوژیکی توالی تکراری DNA در آن زمان شناسایی نشده است. در مطالعه‌های دیگر گزارش کردند که این توالی‌های تکراری اغلب در ژنوم هر دو باکتری و آرکی باکترها وجود داشته است (۲). یکی از ویژگی بارز این است که، تکرارها توسط توالی‌های غیر رمزگذاری شده و یکسان با طول مشابه انجام گرفت (۲). در سال ۲۰۰۲ براساس پژوهش‌های جانسن و همکارانش نشان داده شد که این لوکوس‌های ژنی تکراری همیشه با مجموعه‌هایی از ژن‌های رمزگذاری شده و آنزیم‌های پردازش اسید نوکلئیک، از جمله پروتئین‌های نوکلئاز یا هلیکاز همراه بوده‌اند. در پژوهشی دیگر که در سال ۲۰۰۵ صورت گرفت، مشاهده شد که برخی از توالی‌های فاصله دار ۱۰۰٪ با توالی‌های DNA از ویروس‌ها و پلاسمیدها یکسان هستند. پیشنهاد شده است که این سیستم CRISPR-Cas می‌تواند یک سیستم دفاعی جدید باشد (۳-۵). تجزیه و تحلیل ژنومی نشان داده است که این سیستم کریسپر و ژن‌های مرتبط با cas در گروه‌های مختلف فیلوژنتیک باکتریایی متنوع بودند. در نتیجه، طبقه بندی این ژن‌ها به چندین خانواده پروتئینی صورت گرفت (۶-۸). ماکارووا و همکاران در سال ۲۰۱۱ طبقه بندی سیستم‌های مختلف CRISPR-Cas را به سه نوع اصلی زیرارائه دادند: سیستم‌های CRISPR-Cas نوع I، براساس وجود ژن cas3، سیستم‌های CRISPR-Cas نوع II، مبتنی بر وجود ژن cas9 و سیستم CRISPR-Cas نوع III، بر اساس وجود ژن cas10 نامگذاری شده است (۹). همچنین این پژوهشگران دریافتند که این نواحی دارای یک بارکد اختصاصی تحت عنوان فاصله دهنده ناشی از منشأ پلاسمیدی و یا ویروسی خود هستند که این تکرارها در دفاع اکتسابی پروکاریوت‌ها نقش دارند. شروع فعالیت این سیستم در زمان مواجهه سلول باکتریایی با باکتریوفاژ و یا اسید نوکلئیک مهاجم است که موجب حذف عنصر ژنتیکی خارجی می‌شود (۱۰، ۱۱). شناسایی پروتئین Cas9 یک کشف مهم در زیست شناسی سیستم کریسپر است. این پروتئین باعث ایجاد شکست دو رشته در DNA یا RNA هدف با کمک CRISPR(cr)RNA و کمپلکس ترانس اکتیو (Trans activating CRISPR RNA:tracrRNA) می‌شود. فناوری CRISPR-Cas9 باعث تحول در زمینه

تا فاصله دهنده به درستی در جایگاه خودش قرار بگیرد (۱۲، ۱۳).

□ مرحله بلوغ crRNA

تولید crRNA بالغ با رونویسی از pre-crRNA آغاز می‌شود که رونویسی از توالی رهبر CRISPR شروع می‌شود و نتیجه آن در بخش‌های تکراری چندگانه و فاصله دهنده است. این بخش‌ها به crRNA های بالغ تکی جدا می‌شوند که پروتئین‌های Cas را به هدف خارجی خود هدایت می‌کند (شکل ۱، Maturation).

در کلاس ۱، سیستم‌های نوع I و III، آنزیم‌های Cas6، بخش‌های تکراری را در هنگام ساخت crRNA بالغ نیز شکاف می‌دهند. (شکل 1، Class 2، Maturation) عملکرد Cas5d به جای Cas6 در زیر سیستم I-C و احتمالاً در زیر سیستم‌های III-C و III-D است (۱۴). در اکثر سیستم‌های نوع I، Cas6 به crRNA متصل می‌شود، به عنوان یک ساختار متوقف کننده برای کمپلکس مداخله گر عمل می‌کند. زیرگروه‌های I-A و I-B استثنا هستند که هنگام جدا سازی توالی تکراری، Cas6 جدا می‌شود. در سیستم‌های نوع III، Cas6 دایمر و آزاد است.

مکانیسم بلوغ crRNA در سیستم‌های نوع IV مشخص نشده است. در سیستم‌های کلاس ۲، پردازش crRNA با استفاده از همان پروتئین‌های Cas به کار رفته در مرحله تداخل و در برخی موارد پروتئین‌های غیر از Cas استفاده می‌شود. (شکل 2، Class 2، Maturation)

در سیستم‌های زیرگروه II-A و B، پروتئین Cas9 به یک مجموعه crRNA-tracrRNA متصل می‌شود و RNase III، پروتئین میزبان را نیاز دارد تا قسمت تکراری pre-crRNA را برش دهد (۱۵). برای بلوغ crRNA در سیستم‌های نوع II و زیر گروه V-B مورد نیاز است، اما در سیستم‌های کلاس ۲ دیگر لازم نیست. در سیستم‌های CRISPR-Cas نوع V و VI، هر دو برای پردازش و مرحله تداخل crRNA توسط پروتئین‌های Cas12 و Cas13 به ترتیب انجام می‌شوند.

که شامل شش نوع و چند زیر گونه توصیف شده است. سیستم‌های CRISPR-Cas کلاس ۱ شامل انواع I، III و IV هستند که از یک مجموعه مداخله‌ای متشکل از چندین پروتئین Cas استفاده می‌کنند. در حالی که سیستم‌های کلاس ۲ شامل زیر گونه‌های II، V و VI که تنها از یک پروتئین Cas برای مداخله استفاده می‌کنند (۱۲).

□ مرحله سازگاری

در طی این مرحله، عناصر ژنتیکی خارجی شناسایی می‌شوند و توالی‌های protospacer یا فاصله دهنده انتخاب و پردازش می‌شوند. سپس فاصله دهنده در توالی CRISPR ادغام می‌شود (شکل ۱، Adaptation). به منظور جلوگیری از خود ایمنی سیستم CRISPR-Cas برای از بین بردن توالی CRISPR خود، باید توانایی تمایز بین DNA خارجی و خودی را داشته باشد. این ویژگی در سیستم‌های CRISPR-Cas نوع I و II به خوبی مشخص شده است. با شناسایی توالی PAM در تمایز توالی خودی از عناصر ژنتیکی خارجی کمک می‌کند. در زیر سیستم I-E، مجموعه Cas1-Cas2 یک توالی PAM سازگار را تشخیص می‌دهد و DNA خارجی را جدا می‌کند و اندازه protospacer را برای ادغام در توالی CRISPR تنظیم می‌کند. ادغام فاصله دهنده جدید به توالی CRISPR از سمت رشته رهبر غنی از AT است که همزمان با اتصال سیستم CRISPR-Cas به DNA خارجی اتفاق می‌افتد. در زیر سیستم CRISPR I-E مستقل از پروتئین، ترکیب IHF (integrated host factor) می‌تواند DNA را خم کند تا کمپلکس Cas1-Cas2 بتواند توالی رهبر CRISPR را شناسایی کند و فاصله دهنده به درستی در جایگاهش قرار بگیرد و با عنوان یک مجموعه اینتگرز عمل می‌کند. در زیر سیستم II-A اجزای آن از جمله Cas9، Csn2 و tracrRNA علاوه بر سیستم Cas1-Cas2، برای اتصال فاصله دهنده مورد نیاز است. شناخت توالی رهبر در سیستم زیر گروه II-A مستقل از IHF است. سیستم Cas1-Cas2 به طور مستقیم از LAS (leader-anchoring site) را شناسایی می‌کند



□ مرحله تداخل

مرحله تداخل به خوبی در سیستم‌های CRISPR-Cas مورد بررسی قرار گرفته است و درک بهتر مجموعه تداخل سیستم CRISPR-Cas از جمله DNA در مقابل RNA هدف قرار دادن و جدا شدن اسید نوکلئیک خاص در مقابل اسید نوکلئیک‌های معمولی و همچنین در کاربردهای متنوع و نو ظهور فناوری CRISPR نقش داشته است.

□ مجموعه تداخل کلاس ۱

مجموعه تداخل سیستم CRISPR-Cas کلاس ۱ از کمپلکس چند پروتئینی تشکیل شده است (شکل 2.1 Class Interference). در مرحله تداخل CRISPR-Cas نوع I به مجموعه‌ای مرتبط با CRISPR برای دفاع ضد ویروسی، Cascade گفته می‌شود. در حالی که اجزای Cascade در زیر گروه‌های نوع I متفاوت است (I-A تا I-f و I-u) ولی دارای ویژگی‌های ثابت شامل: شناسایی PAM در اهداف خارجی، Cas6 یا Cas5 باعث اتصال crRNA به DNA هدف، ساختار Cas7، تثبیت حلقه R و شکاف توالی هدف توسط Cas3 است. مجموعه تداخل زیر گروه I-E به خوبی مشخص شده است و تشکیل شده است از Cas5 و Cas6 متصل به قسمت‌های تکراری ۵' و ۳' مربوط به crRNA و همچنین در قسمت مرکزی ساختار حاوی شش پروتئین Cas7، یک زیر واحد بزرگ Cas8 که واسطه شناخت PAM می‌باشد و شروع به باز کردن دو رشته DNA خارجی می‌کند. دو زیر واحد کوچک Cas11 که ساختار حلقه R را به وجود می‌آورند. تغییرات ساختاری در زیر واحدهای Cas8 و Cas11 باعث استفاده مجدد از cas3 و شکاف رشته DNA آزاد در R-loop شده است (۱۶).

ساختار و عملکرد مجموعه تداخل سایر زیرگروه‌های نوع I کاملاً مشخص نشده است. مجموعه تداخل نوع III مانند Cascade است، اما جدا شدن DNA خارجی در این سیستم به اتصال کمپلکس تداخل به RNA رونویسی شده از DNA خارجی بستگی دارد. سیستم‌های مداخله‌ای از

زیر گروه‌های III-A و III-B به ترتیب Csm و Cmr نامیده می‌شوند. از Cas5 متصل به انتهای ۵' crRNA بالغ، ساختار پروتئین خانواده Cas7 و زیر واحدهای بزرگ و کوچک Cas10 و Cas11 به ترتیب تشکیل شده‌اند. شناخت PAM یا RNA PAM (موجود در RNA رونویسی) توسط بعضی از سیستم‌های نوع III اما نه همه آن‌ها، برای تمایز دادن توالی خودی از سایرین به کار می‌رود، لازم است. هنگامی که مجموعه تداخل متصل می‌شود، Cas7 رونویسی ssRNA را در فواصل منظم قطع می‌کند و Cas10 نیز DNA هدف را جدا می‌کند (۱۷، ۱۸).

اخیراً مشاهده شده است که شکاف DNA توسط Cas10 در زیر مجموعه Csm III-A، باعث تولید پیام رسان‌های ثانویه (آدنیلات حلقوی) می‌شود و باعث جدا شدن RNA غیر اختصاصی توسط Csm6 که یک RNase مرتبط با Cas است، می‌شوند. اطلاعات کمی درباره مکانیسم‌های تداخل زیرگروه III-C و III-D و نوع IV وجود دارد.

□ مجموعه تداخل کلاس ۲

سیستم‌های کلاس 2 CRISPR-Cas با کلاس ۱ متفاوت هستند زیرا مرحله تداخل با یک نوکلئاز منفرد به جای یک مجموعه پروتئین انجام می‌شود. (شکل 2.2 Class Interference)

ویژگی‌های تعریف شده سیستم نوع II شامل: پروتئین bilobed Cas9 و نیاز به tracrRNA همراه با crRNA جهت کمک به نوکلئاز Cas9 است (۱۹). tracrRNA به توالی‌های تکمیلی از مناطق تکرار شده از pre-crRNA و این کمپلکس Cas9 متصل می‌شود (۱۵). پروتئین Cas9 توالی‌های PAM را بر روی DNA هدف شناسایی می‌کند و کمپلکس crRNA-tracrRNA با DNA مکمل اتصال می‌یابد و باعث ایجاد شکاف دو رشته‌ای در DNA هدف توسط پروتئین Cas9 می‌شود (۲۰). زیر گروه‌های سیستم نوع II شامل II-A، II-B و II-C است که براساس اندازه و تنوع توالی در ژن Cas9 تمایز می‌یابند. (شکل B)

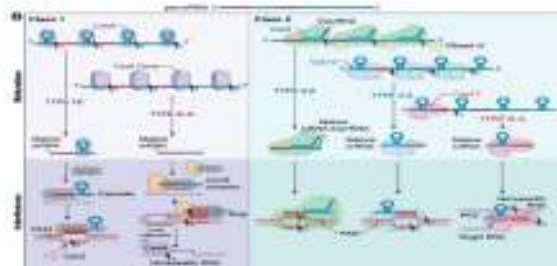
کاربردهای گسترده‌ای در زمینه بیماری‌های عفونی شده است. فناوری CRISPR ابزاری را فراهم می‌کند که تعامل بین میزبان و میکروب‌ها را به طور چشم‌گیری آشکار سازد و در توسعه تشخیص سریع و دقیق و پیشگیری و درمان بیماری‌های عفونی، نقش به‌سزایی دارد (۱۲).

❑ درک تعامل بین میزبان و پاتوژن

شناخت مکانیسم‌هایی که با استفاده از آن‌ها باکتری‌ها، ویروس‌ها، قارچ‌ها و انگل‌ها باعث ایجاد بیماری‌های انسانی می‌شوند برای هدایت مراقبت‌های بالینی بهتر و طراحی منطقی روش‌های درمانی و واکسن‌های هدفمند ضروری است. ویرایش ژن مبتنی بر CRISPR-Cas9 در پاتوژن‌های متنوع مورد استفاده قرار گرفته است تا همکاری ژن و پروتئین را در پاتوژن مولکولی آگاه سازد (۲۱).

وینتر و همکاران از یک کتابخانه CRISPR-Cas9 و RNA راهنما تک رشته برای روشن شدن مکانیسم آلفا همولیزین، که یک فاکتور ویروانس استافیلوکوکوس اورئوس است و باعث القاء سمیت داخل سلولی می‌شود، استفاده کردند (۲۲). در این پژوهش سه ژن (ARFRP1، SYS1 و TSPAN14) را مشخص کردند که پس از رونویسی یک دومین Disintegrin و Metalloproteinase حاوی پروتئین- (ADAM) را تنظیم می‌کند و میزان آن را روی سطوح سلولی کاهش می‌دهند. بنابراین باعث کاهش اتصال و سمیت آلفا همولیزین می‌شوند.

MA و همکاران، با استفاده از یک صفحه گسترده ژنومی از ویروس نیل غربی (WNV) و یک کتابخانه CRISPR sgrRNA، توانستند هفت ژن (HRD1، UBE2J1، UBE2G2، DERL2، SEL1L، EMC3، EMC2) را شناسایی کنند. با غیر فعال کردن این ژن‌ها، سلول‌ها را در برابر تحریک مرگ سلول عصبی ناشی از ویروس WNV محافظت می‌کند. این ژن‌ها بخشی از مسیر تخریب پروتئین وابسته به شبکه آندوپلاسمی هستند و محققان به این نتیجه رسیدند که این مسیر از طریق واسطه سیتوپاتولوژی ناشی از WNV است و می‌تواند هدفی برای توسعه داروهای جدید باشد (۲۳). ژنوم قارچ‌های رشته‌ای به دلیل کارایی پایین



شکل ۲. مرحله بلوغ در سیستم‌های کلاس ۱ از نوع I-E و III-A توسط Cas6 انجام می‌شود

مرحله بلوغ در سیستم کلاس ۲ توسط همان پروتئین استفاده شده در مرحله تداخل انجام می‌شود. در مرحله بلوغ سیستم‌های نوع II-A، پروتئین Cas9 به مجموعه tracrRNA-crRNA متصل می‌شود. مرحله بلوغ در سیستم نوع V-A و VI-A به ترتیب توسط Cas12 و Cas13 انجام می‌شود.

مرحله تداخل در سیستم‌های کلاس ۱ با یک کمپلکس چند پروتئینی و در سیستم‌های کلاس ۲، با یک نوکلئاز شروع می‌شود. در سیستم نوع I-E، Cascade متصل به crRNA بالغ، توالی PAM را در DNA خارجی شناسایی می‌کند و Cas3، DNA را برش می‌دهد. در سیستم نوع III-A، کمپلکس Csm با اتصال به crRNA بالغ، توالی‌های اسید نوکلئیک هدف را تشخیص می‌دهد و ssRNA و DNA دو رشته‌ای را برش می‌دهد که منجر به تولید آدنیلات حلقوی می‌شود. در نتیجه باعث فعال شدن Csm6 و RNA غیر اختصاصی حذف می‌شود. در مرحله تداخل سیستم نوع II-A، با اتصال پروتئین Cas9 به مجموعه crRNA-tracrRNA بالغ شروع می‌شود. این مجموعه، PAM را بر روی DNA هدف شناسایی و برش می‌دهد. در سیستم نوع V-A با استفاده از Cas12 متصل به crRNA بالغ این مرحله صورت می‌گیرد. در سیستم‌های نوع VI با استفاده از Cas13 همراه با crRNA بالغ، ssRNA هدف را با PFS مرتبط شناسایی و برش می‌دهد (۱۲).

❑ کاربرد CRISPR-CAS در بیماری‌های عفونی

درک بهتر زیست‌شناسی CRISPR-Cas منجر به



ویرایش ژنوم، دست کاری آن‌ها دشوار است (۲۴). برای رفع این مشکل نودویگ و همکاران، ژن Cas9 از استرپتوکوک پیوژنز را ویرایش کرده و پروموتور sgRNA را اصلاح کردند تا با قارچ‌ها سازگارتر باشد (۲۵). با استفاده از این سیستم توانستند، جهش‌های RNA راهنما در آلل شش گونه *Aspergillus* با پشتیبانی از ابزار فناوری CRISPR برای اکتشاف زیست‌شناسی قارچ‌ها را ارائه دهند. انگل‌ها از جمله *Trypanosoma cruzi* و *Toxoplasma gondii* که عوامل اتیولوژیک توکسوپلاسموز و بیماری شاگاس به ترتیب هستند، نیز با استفاده از فناوری CRISPR بررسی شده‌اند.

CRISPR-Cas9 توسط Sidik و همکاران برای تجزیه و تحلیل توان بالا از عملکرد ژن *Toxoplasma gondii* به کار گرفته شده است (۲۶). لندر و همکاران. برای خاموش کردن ژن *Trypanosoma cruzi* کد کننده پروتئین GP72 که برای اتصال فلاژل و میله پارافلاژل (PFR) پروتئین ۱ و ۲ لازم است (۲۷).

در پژوهش‌های دیگر، نویسندگان نشان دادند که پروتئین‌های PFR1 و ۲ برای اتصال فلاژل به سطح سلول و حرکت انگل مورد نیاز است. مثال‌های فوق ارزش برنامه‌های CRISPR را برای ارزیابی اثرات متقابل میزبان و پاتوژن در ارگانیسم‌های مختلف را نشان می‌دهد.

□ پیشرفت تشخیص برای بیماری‌های عفونی

آزمایش‌های تشخیصی سریع و دقیق به تشخیص زود هنگام و درمان بیماری‌های عفونی کمک می‌کند تا مراقبت‌های بالینی بهتر و اجرای به موقع کنترل عفونت و سایر اقدامات بهداشت عمومی برای محدود کردن گسترش بیماری انجام شود. تشخیص سریع و ایده آل باید حساس و خاص، آسان برای انجام و تفسیر و مقرون به صرفه باشد به گونه‌ای که ممکن است در کارهای بالینی متنوعی از جمله مناطق محدود به منابع ضروری مورد استفاده قرار گیرد. زیست‌شناسی CRISPR-Cas به پیشرفت‌های مهم در تشخیص سریع و دقیق بیماری‌های عفونی کمک کرده است. سیستم CRISPR-Cas9 توسط محققان متعددی برای تشخیص بیماری‌های عفونی در حال

توسعه به کار گرفته شده است. پردی و همکاران، تقویت مبتنی بر توالی اسید نوکلئیک ترکیبی (NASBA)، یک روش تقویت ایزوترمال است که با استفاده از سیستم CRISPR-Cas9 بین گونه‌های ویروسی مشابه با Zika در شرایط آزمایشگاهی و در یک مدل میمون تمایز دادند. محققان توالی مصنوعی را به NASBA که با RNA ویروسی تقویت شده است را اضافه کردند و از یک مجموعه sgRNA-Cas9 برای شکاف dsDNA استفاده کردند. وجود یا عدم وجود یک گونه خاص توالی PAM، منجر به شکاف بر تمام طول قطعه یا قسمت کوتاهی از DNA توسط پروتئین Cas9 می‌شود (۲۸).

مولر و همکاران، ترکیب CRISPR-Cas9 با نقشه برداری DNA بصری را برای شناسایی ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک باکتریایی مورد استفاده قرار دادند. در این مدل یک کمپلکس gRNA-Cas9، توالی اسید نوکلئیک خاص پلاسمیدی را که حاوی ژن‌های مقاومت و یک رنگ فلورسنت YOYO-1 و نتروپسین است را برش و اتصال می‌دهد. در نتیجه شدت انتشار خاص برای هر قسمت DNA متفاوت است. با استفاده از این روش، پلاسمیدهای تولید کننده بتا-لاکتامازهای مختلف با طیف گسترده (ESBLs) که شامل سفوتاکسیم (CTX-M-15) و (CTX-M-14) و کارباپنماز (KPC) و (NDM-1) را تفکیک کردند. علاوه بر این crRNA های متعدد، امکان شناسایی ژن‌های مقاومت را در واکنش مشابه را فراهم می‌کند (۲۹).

گوک و همکاران از CRISPR-Cas9 همراه با فلورسنت DNA در هیبریداسیون درجا (FISH) برای تشخیص استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) استفاده کردند. این روش با استفاده از غیر فعال کردن یک سیستم Cas9 (d) که در آن یک مجموعه sgRNA-dCas9 همراه با یک پروب فلورسنت SYBR-Green I، ژن *MRSA mecA* را تشخیص می‌دهد. در حالی که این کمپلکس توالی DNA هدف را شناسایی می‌کند، dCas9 باعث شکاف در DNA نمی‌شود، باعث آماده سازی DNA برای تشخیص مناسب توسط FISH می‌شود. این روش می‌تواند MRSA را در

غلظت 10 cfu/ml تشخیص دهد و سویه‌های استافیلوکوک اورئوس دارای ژن *mecA* یا عدم وجود آن را شناسایی می‌کند (۳۰).

□ دلایل استفاده از سیستم‌های CRISPR-Cas برای هدف قرار دادن مقاومت باکتری‌ها

در حالی که همه باکتری‌ها از سیستم‌های CRISPR-Cas استفاده نمی‌کنند، شواهد روز افزون نقش این سیستم‌ها، در جلوگیری از دستیابی به عناصر ژنومی دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی را پشتیبانی می‌کند و این احتمال را ایجاد می‌کند که سیستم دفاعی خود باکتری‌ها می‌تواند در درمان باکتری‌ها مؤثر باشد.

آیدین و همکاران نشان دادند که یک سیستم CRISPR نوع I-F در اشریشیا کلای با حساسیت آنتی‌بیوتیکی همراه است (۳۱). همچنین در مطالعه‌ای توسط Price و همکاران گزارش شد که سویه‌های انتروکوکوس فکالیس با حذف ژن *Cas9*، احتمالاً عناصر مقاومتی را از طریق کونژوگاسیون به دست می‌آورند.

در کنترل عفونت باکتریایی انسانی، استفاده از آنتی‌بیوتیک طیف گسترده که اغلب به صورت تجربی آغاز می‌شود، فشار را برای رشد باکتری‌های مقاوم اعمال می‌کند. نتایج آزمایشگاهی اخیر نشان می‌دهد که قرار گرفتن در معرض آنتی‌بیوتیک‌های طیف گسترده ممکن است فعالیت CRISPR-Cas را سرکوب کند، که در واقع به دستیابی باکتری‌ها به عناصر مقاومت آنتی‌بیوتیکی کمک می‌کند.

لین و همکاران مشاهده کردند که قرار گرفتن باکتری در معرض آنتی‌بیوتیک طیف گسترده ایمی پنم، باعث جلوگیری از فعالیت CRISPR-Cas در کلبسیلا پنومونیه می‌شود که از طریق تحریک سرکوبگر رونویسی H-NS، سیستم را سرکوب می‌کند (۳۲).

□ هدف قرار دادن بیماری‌زایی و مقاومت به دارو در باکتری‌ها

فناوری CRISPR ممکن است برای تولید آنتی‌بیوتیک‌های انتخابی و قابل تیتراسیون برای از بین بردن باکتری‌های بیماری‌زا مورد استفاده قرار گیرد.

گوما و همکاران، از نخستین محققانی بودند که این مفهوم را در شرایط *in vitro* با استفاده از زیر سیستم I-E CRISPR-Cas برای اثبات از بین بردن گونه‌های جدا شده از اشریشیا کلای و سالمونلا انتریکا در آزمایش‌های کشت خالص و مخلوط به اثبات رساندند (۳۳).

Citorik و همکاران، با استفاده از فاگمید که یک پلاسمید بسته بندی شده در کپسیدهای فاژها است، RNA راهنما *Cas9* را انتقال می‌دهد. برای از بین بردن ژن *eae* در اشریشیا کلای انتروهموراژیک استفاده می‌شود. این ژن یک فاکتور ویروالانس برای چسبندگی باکتری‌ها به سلول‌های اپیتلیال میزبان را کد می‌کند. هدف قرار دادن ژن *eae* در شرایط آزمایشگاهی منجر به کاهش ۲۰ برابر در تعداد باکتری‌ها شده است در حالی که هدف قرار دادن *eae* در لارو گالریا ملونلا آلوده به EHEC منجر به بقای بهتر در مقایسه با گروه کنترل نشده و تحت درمان با کلرامفنیکل گردید. این نویسندگان همچنین با موفقیت ژن‌های بتا-لاکتاماز سولفیدریل متغیر (SHV-18) و NDM-1 از اشریشیا کلای را به طور جداگانه یا ترکیبی در یک سیستم چندگانه که منجر به مرگ باکتریایی شده است را هدف قرار دادند و از بین بردند (۳۴).

حذف عناصر ژنتیکی مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها و احیای حساسیت به آن‌ها نیز با استفاده از فناوری CRISPR در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفته است. یوسف و همکاران برای از بین بردن عناصر مقاومت، بدون کشتن باکتری میزبان از فاژهای معتدل برای تحویل یک سیستم فرعی CRISPR-Cas I-E که پلاسمیدهای رمزگذاری شده NDM-1 و CTM-X-15 را حذف کرده و در برابر فاژهای لیتیک محافظت می‌کند، استفاده کردند. در حالی که میزبان اشریشیا کلای را نمی‌کشد (۳۵). در ادامه بحث فاژهای لیتیک، باکتری‌های مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک از بین رفتند بنابراین باکتری‌های حساس به آنتی‌بیوتیک غنی‌سازی شدند. به طور مشابه، کیم و همکاران استفاده از سیستم CRISPR-Cas9 یک روش مبتنی بر حساس‌سازی دوباره به آنتی‌بیوتیک‌ها دارای مقاومت (ReSAFR) برای بازیابی فعالیت آنتی‌بیوتیکی بتا-لاکتام در اشریشیا کلای برای تولید ESBL، مورد



توسعه روش‌های تشخیص جدید بیماری‌های عفونی به آن اضافه شده است. شاید بزرگ‌ترین پیشرفت در تشخیص مبتنی بر CRISPR برای بیماری‌های عفونی، برش اسید نوکلئیک‌های غیر اختصاصی است که در سیستم‌های CRISPR-Cas نوع III، V و VI مشاهده می‌شود تا تشخیص دقیق و هدفمند را فراهم کند. این فناوری نوظهور ضرورتاً نیاز به ارزیابی دقیق‌تر و آزمایش میدانی را دارند تا از عملکرد نهایی این سیستم اطمینان حاصل شود. درمان‌های مبتنی بر CRISPR نوید بخش درمان سرطان و اختلالات ارثی مانند بیماری کم خونی داسی شکل و پیشگیری و درمان بیماری‌های عفونی هستند. تبدیل مشاهدات پیش از بالینی به روش‌های درمانی اثبات شده، تأیید نشده است. زیرا هیچ روش درمانی مبتنی بر CRISPR در دسترس نیست و فقط تعداد محدودی از آزمایش‌های اولیه بالینی در حال انجام است. انتقال هدفمند و کارآمد فناوری CRISPR در داخل بدن همچنان یک چالش محسوب می‌شود (۱۲). وکتورهای ویروسی از جمله آدنوویروس‌ها و لنتی ویروس‌ها ممکن است یک ساختار CRISPR را به هدف مورد نظر تحویل دهند، اگر چه نگرانی‌های مربوط به توانایی کارسینوژن و ایمنی زایی باقی مانده است. وکتورهای غیر ویروسی شامل ترکیبات لیپیدی و پلیمری مانند پلی‌اتیلن آمین، پلی‌L-lysine، دندریمرهای پلی آمین و کیتوزان نیز تحت بررسی هستند (۳۸). گزارش‌های اخیر حاکی از آن است که CRISPR-Cas9 می‌تواند باعث ایجاد آسیب در مکانیسم ترمیم DNA با واسطه p53 شود که نگرانی‌های موجود را با توجه به ارتباط جهش‌های p53 و سرطان ایجاد می‌کند (۳۹).

تا به امروز تحقیقات اولیه در مورد روش‌های درمانی مبتنی بر CRISPR که بیماری‌های عفونی را هدف قرار داده‌اند، بر پیشگیری و درمان باکتری‌های بیماری‌زا مقاوم به آنتی بیوتیک متمرکز شده‌اند. زیرا این عفونت‌ها، از جمله باکتری‌های دارای مقاومت آنتی بیوتیکی به میزان قابل توجهی در بیماری‌های جهانی نقش دارند. به کارگیری سیستم CRISPR-Cas به عنوان یک درمان در حوزه بیماری‌های عفونی به روش‌های استانداردسازی برای ارائه یک درمان مناسب، نیاز دارند. در صورت

استفاده قرار گرفت. نویسندگان به طور مجزا توالی محافظت شده در میان چندین گونه SHV و TEM نوع ESBL در اشریشیا کلای را به ترتیب هدف قرار دادند. هدف قرار دادن این توالی‌ها حساسیت به آمپی سیلین و سفتازیدیم را بازیابی می‌کند (۳۶).

همچنین در باکتری‌های گرم مثبت، Bikard و همکاران با استفاده از RNA راهنما Cas9 که توسط فاگمید منتقل می‌شود، به طور انتخابی با کشتن گونه‌های بیماری‌زا استافیلوکوک اورئوس و از بین بردن پلاسمیدهای حامل ژن مقاومت به متی سیلین *mecA*، بدون کشتن باکتری‌های میزبان، به کار گرفته‌اند (۳۷). مطالعات که در بالا ذکر شده است شواهد مقدماتی را درباره سیستم‌های CRISPR-Cas بیان کرده است که احتمالاً برای هدف قرار دادن درمانی باکتری‌های خاص و از بین بردن ارگانسیم‌هایی که دارای مقاومت آنتی بیوتیکی هستند، سودمند باشد.

□ بحث و نتیجه گیری

سیستم CRISPR-Cas فناوری بی نظیری است که می‌تواند تحقیقات در زمینه بیوتکنولوژی و پزشکی را به طور کامل متحول کند، اما باید در نظر داشت که هنوز تمامی کاربردهای آن برای جامعه بشر به طور کامل آشکار نشده است. بنابراین خطرات احتمالی آن نیز چندان مشخص نبوده و تنها در حد حدس و گمان می‌باشد. به ویژه آن که آثار سوء احتمالی آن می‌تواند به تناسب موجودات زنده متفاوت ارزیابی شود.

پروکاریوت‌ها دارای سیستم‌های CRISPR-Cas متنوعی هستند که ایمنی سازگاری را به طور ارثی برای باکتری‌ها فراهم می‌کند. با توجه به این که دیدگاه‌های جدیدی در مورد ترکیب و عملکرد این سیستم‌ها آشکار می‌شود، کاربردهای بالینی برای فناوری CRISPR همچنان گسترش می‌یابد. بیماری‌های عفونی باعث نگرانی‌هایی در سرتاسر جهان شده است همچنین ابزارهای جدیدی برای مطالعه مکانیسم‌های اساسی، تشخیص دقیق و درمان عفونت‌ها به کار برده شده است. فناوری CRISPR-Cas9 در حال پیشبرد درک ارتباط بین میزبان و باکتری است که قبلاً امکان پذیر نبوده و برای



است که باعث تغییر شگرف در چشم انداز درمان بیماری‌های عفونی خواهد شد. اگر چه در کاربرد این سیستم با چالش‌های بسیار زیادی روبرو خواهیم شد، ولی به کارگیری این تکنولوژی ساده و به صرفه است و نتایج سودمندی را به دنبال خواهد داشت. همچنین می‌توان در برنامه ریزی‌های آینده برای درمان بیماری‌های عفونی از فناوری CRISPR به عنوان یک روش جدید استفاده کرد.

موفقیت، می‌توان یک استراتژی حذف مقاومت به آنتی بیوتیک را در باکتری‌ها تصور کرد که در آن بیماری‌ها که با ارگانسیم‌های تولیدکننده کاربایناماز آلوده شده‌اند، با استفاده از یک فرمول خوراکی از CRISPR-Cas هدفمند که ارگانسیم‌های دارای مقاومت را از دستگاه گوارشی از بین برده و بدین ترتیب باعث بازسازی میکروبیوم انسانی خواهد شد. روش‌های درمانی مبتنی بر CRISPR برای عفونت‌های ویروسی پایدار مؤثر

References

- 1- Nakata A, Amemura M, Makino K. Unusual nucleotide arrangement with repeated sequences in the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Journal of bacteriology*. 1989;171(6):3553-6.
- 2- Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, Soria E, Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Molecular microbiology*. 2000;36(1):244-6.
- 3- Mojica FJ, García-Martínez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of molecular evolution*. 2005;60(2):174-82.
- 4- Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology*. 2005;151(3):653-63.
- 5- Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*. 2005;151(8):2551-61.
- 6- Haft D, Selengut J, Mongodin EF, Nelson KE. 2005 A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput Biol*. 1:e60.
- 7- Lillestøl R, Redder P, Garrett RA, Brügger K. A putative viral defence mechanism in archaeal cells. *Archaea*. 2006;2(1):59-72.
- 8- Makarova KS, Grishin NV, Shabalina SA, Wolf YI, Koonin EV. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biology direct*. 2006;1(1):7.
- 9- Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Horvath P, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*. 20.77-467: (6)9;11.
- 10- Hale CR, Zhao P, Olson S, Duff MO, Graveley BR, Wells L, et al. RNA-guided RNA cleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex. *Cell*. 2009;139(5):945-56.
- 11- Ishino Y, Krupovic M, Forterre P. History of CRISPR-Cas from encounter with a mysterious repeated sequence to genome editing technology. *Journal of bacteriology*. 2018;200(7).
- 12- Strich JR, Chertow DS. CRISPR-Cas Biology and Infectious Diseases Applications. *Journal of Clinical Microbiology*. 2018;JCM. 01307-18.
- 13- Heler R, Samai P, Modell JW, Weiner C, Goldberg GW, Bikard D, et al. Cas9 specifies functional viral targets during CRISPR-Cas adaptation. *Nature*. 2015;519(7542):199-202.
- 14- Garside EL, Schellenberg MJ, Gesner EM, Bonanno JB, Sauder JM, Burley SK, et al. Cas5d processes pre-crRNA and is a member of a larger family of CRISPR RNA endonucleases. *Rna*. 2012;18(11):2020-8.
- 15- Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pizada ZA, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*. 2011;471(7340):602-7.
- 16- Xiao Y, Luo M, Hayes RP, Kim J, Ng S, Ding F, et al. Structure basis for directional R-loop formation and substrate handover mechanisms in type I CRISPR-Cas system. *Cell*. 2017;170(1):48-60. e11.
- 17- Staals RH, Zhu Y, Taylor DW, Kornfeld JE, Sharma K, Barendregt A, et al. RNA targeting by the type III-A CRISPR-Cas Csm complex of *Thermus thermophilus*. *Molecular cell*. 2014;56(4):518-30.





- 18- Samai P, Pyenson N, Jiang W, Goldberg GW, Hatoum-Aslan A, Marraffini LA. Co-transcriptional DNA and RNA cleavage during type III CRISPR-Cas immunity. *Cell*. 2015;161(5):1164-74.
- 19- Hille F, Richter H, Wong SP, Bratovič M, Ressel S, Charpentier E. The biology of CRISPR-Cas: backward and forward. *Cell*. 2018;172(6):1239-59.
- 20- Garneau JE, Dupuis M-È, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*. 2010;468(7320):67-71.
- 21- Doerflinger M, Forsyth W, Ebert G, Pellegrini M, Herold M. CRISPR/Cas9—the ultimate weapon to battle infectious diseases? *Cellular microbiology*. 2017;19(2):e12693.
- 22- Winter SV, Zychlinsky A, Bardeol BW. Genome-wide CRISPR screen reveals novel host factors required for *Staphylococcus aureus* α -hemolysin-mediated toxicity. *Scientific reports*. 2016;6(1):1-9.
- 23- Ma H, Dang Y, Wu Y, Jia G, Anaya E, Zhang J, et al. A CRISPR-based screen identifies genes essential for West-Nile-virus-induced cell death. *Cell reports*. 2015;12(4):673-83.
- 24- Shi T-Q, Liu G-N, Ji R-Y, Shi K, Song P, Ren L-J, et al. CRISPR/Cas9-based genome editing of the filamentous fungi: the state of the art. *Applied microbiology and biotechnology*. 2017;101(20):7435-43.
- 25- Nødvig CS, Nielsen JB, Kogle ME, Mortensen UH. A CRISPR-Cas9 system for genetic engineering of filamentous fungi. *PloS one*. 2015;10(7):e0133085.
- 26- Sidik SM, Hackett CG, Tran F, Westwood NJ, Lourido S. Efficient genome engineering of *Toxoplasma gondii* using CRISPR/Cas9. *PloS one*. 2014;9(6):e100450.
- 27- Lander N, Chiurillo MA, Vercesi AE, Docampo R. Endogenous C-terminal tagging by CRISPR/Cas9 in *Trypanosoma cruzi*. *Bio-protocol*. 2017;7(10).
- 28- Pardee K, Green AA, Takahashi MK, Braff D, Lambert G, Lee JW, et al. Rapid, low-cost detection of Zika virus using programmable biomolecular components. *Cell*. 20. 66-1255: (5) 165; 16.
- 29- Müller V, Rajer F, Frykholm K, Nyberg LK, Quaderi S, Fritzsche J, et al. Direct identification of antibiotic resistance genes on single plasmid molecules using CRISPR/Cas9 in combination with optical DNA mapping. *Scientific reports*. 11-1: (1)6; 2016.
- 30- Guk K, Keem JO, Hwang SG, Kim H, Kang T, Lim E-K, et al. A facile, rapid and sensitive detection of MRSA using a CRISPR-mediated DNA FISH method, antibody-like dCas9/sgRNA complex. *Biosensors and Bioelectronics*. 2017;95:67-71.
- 31- Aydin S, Personne Y, Newire E, Laverick R, Russell O, Roberts AP, et al. Presence of Type I CRISPR/Cas systems is associated with antimicrobial susceptibility in *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2017;72(8):2213-8.
- 32- Lin T-L, Pan Y-J, Hsieh P-F, Hsu C-R, Wu M-C, Wang J-T. Imipenem represses CRISPR-Cas interference of DNA acquisition through H-NS stimulation in *Klebsiella pneumoniae*. *Scientific reports*. 2016;6:31644.
- 33- Goma AA, Klumpe HE, Luo ML, Selle K, Barrangou R, Beisel CL. Programmable removal of bacterial strains by use of genome-targeting CRISPR-Cas systems. *MBio*. 2014;5(1).
- 34- Citorik RJ, Mimee M, Lu TK. Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases. *Nature biotechnology*. 2014;32(11):15-141.
- 35- Yosef I, Manor M, Kiro R, Qimron U. Temperate and lytic bacteriophages programmed to sensitize and kill antibiotic-resistant bacteria. *Proceedings of the national academy of sciences*. 2015;112(23):7267-72.
- 36- Kim J-S, Cho D-H, Park M, Chung W-J, Shin D, Ko KS, et al. CRISPR/Cas9-mediated re-sensitization of antibiotic-resistant *Escherichia coli* harboring extended-spectrum beta-lactamases. *J Microbiol Biotechnol*. 2016;26(2):394-401.
- 37- Bikard D, Euler CW, Jiang W, Nussenzweig PM, Goldberg GW, Duportet X, et al. Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials. *Nature biotechnology*. 2014;32(11):1146-50.
- 38- Li L, He Z-Y, Wei X-W, Gao G-P, Wei Y-Q. Challenges in CRISPR/CAS9 delivery: potential roles of nonviral vectors. *Human gene therapy*. 2015;26(7):452-62.
- 39- Haapaniemi E, Botla S, Persson J, Schmierer B, Taipale J. CRISPR-Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. *Nature medicine*. 2018;24(7):927-30.

