کاربرد و مکانیسم سیستم CRISPR-Cas در درمان بیماری‌های عفونی

● دکتر حبیب ضیغمی
دانشیار میکروب شناسی، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران
zeighami@zums.ac.ir

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

❑ چکیده

بیماری‌های عفونی همچنان یک تهدید جهانی محسوب که سالانه افراد زیادی به این بیماری همه گیر مبتلا می‌شوند. شناخت بهتر چگونگی بیماری زایی باکتری‌ها، ویروس‌ها، قارچ‌ها و انگل‌ها به همراه تشخیص سریع و درمان عفونت‌های انسانی برای بهبود نتایج بیماری‌های عفونی در سراسر جهان ضروری است. در بسیاری از ژنوم باکتری‌ها و آرکئی باکتر ها، توانستند تناوب‌های کوتاهِ پالیندرومِ فاصله‌دارِ منظمِ خوشه‌ای که با عنوان سیستم کریسپر یا سیستم کریسپر مرتبط با ژن cas است را شناسایی کنند. نقش فیزیولوژیکی این سیستم در پروکاریوت ها 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 نوکلئاز ها را به سوی اسید نوکلئیک های مکمل خود در ویروس‌ها و پلاسمید ها هدایت می‌کنند. در حال حاضر فناوری CRISPR-Cas9 به طور معمول برای پیشرفت در علم پزشکی بیولوژیکی در حوزه ویرایش کارآمد ژن‌ها، نقش به سزایی دارند.

در این مقاله مروری، به طور خلاصه زیست شناسی 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

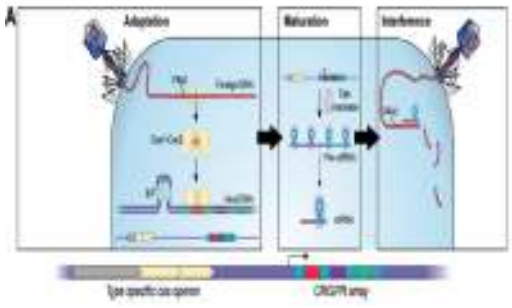
درک بهتر از ساختار و عملکرد سیستم کریسپر و اجزای آن، منجر به گسترش سریع تحقیقات و برنامه‌های بالینی خواهد شد. تکرارهای خوشه‌ای کریسپر برای اولین بار در سال ۱۹۸۷ توسط Ishiuo و همکاران در باکتری اشریشیا کلای شناسایی شدند که به طور مشابه عناصر تکراری سازمان یافته در کروموزوم‌های شیگلا دیسانتری و سروتایپ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

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-02-22]

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 لوکوس های ژنی تکراری همیشه با مجموعه‌هایی از ژن‌های رمز گذاری 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 (۵-۳). 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 (۸-۶). ماکاروا و همکاران در سال ۲۰۱۱ طبقه بندی سیستم‌های مختلف CRISPR-Cas را به سه نوع اصلی زیر ارائه 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 پروکاریوت ها 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 ویرایش ژنوم در علوم پایه و داروهای بالینی شده است.

❑ بیولوژی و مکانیسم سیستم CRISPR-CAS

از ویژگی‌های مهم سیستم‌های CRISPR-Cas، محافظت از پروکاریوت ها 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 crRNA و تداخل با تنوع بیولوژیکی قابل توجه ای 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 crRNAهای 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

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-02-22]

که شـامل شـش نوع و چند زیر گونه توصیف شده است. سیسـتم‌های CRISPR-Cas کلاس ۱ شـامل انواع I، III و IV هسـتند که از یک مجموعه مداخله‌ای متشـکل از چندیـن پروتئین Cas اسـتفاده می‌کنند. در حالی که سیسـتم‌های کلاس ۲ شامل زیر گونه‌های II، V و VI که تنها از یک پروتئین Cas برای مداخله اسـتفاده می‌کنند (۱۲).

❑ مرحله سازگاری

در طی ایـن مرحله، عناصر ژنتیکی خارجی شناسـایی می‌شـوند و توالی‌هـای protospacer یـا فاصله دهنده انتخاب و پردازش می‌شـوند. سپس فاصله دهنده در توالی CRISPR ادغام می‌شود (شـکل 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 عناصـر ژنتیکی خارجی کمک می‌کند. در زیر سیسـتم 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 می‌کنـد. ادغام فاصله دهنده جدید بـه توالی CRISPR از سـمت رشـته رهبر غنی از AT اسـت کـه همزمان با اتصـال سیسـتم CRISPR-Cas بـه DNA خارجی اتفاق می‌افتد. در زیر سیسـتم CRISPR I-E مسـتقل از پروتئین، ترکیـب IHF(integrated host factor) می‌توانـد DNA را خم کند تـا کمپلکس Cas1-Cas2 بتوانـد توالی رهبر CRISPR را شناسـایی کند و فاصله دهنده به درسـتی در جایگاهش قرار بگیرد و با عنوان یک مجموعه اینتگراز عمل می‌کند. در زیر سیستم II-A اجزای آن از جمله Cas9، Csn2 و tracrRNA علاوه برسیستم Cas1-Cas2، برای اتصال فاصله دهنده مورد نیاز اسـت. شـناخت توالی رهبر در سیسـتم زیر گروه II-A مستقل از IHF اسـت. سیسـتم Cas1-Cas2 به طور مستقیم LAS (leader-anchoring site) را شناسایی می‌کند تا فاصله دهنده به درسـتی در جایـگاه خودش قرار بگیرد (۱۲، ۱۳).

❑ مرحله بلوغ crRNA

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

در کلاس ۱، سیستم‌های نوع I و III، آنزیم‌های Cas6، بخش‌های تکراری را در هنگام سـاخت crRNA بالغ نیز شـکاف می‌دهند.(شـکل 1، Class 2،Maturation) عملکـرد Cas5d به جای Cas6 در زیر سیسـتم I-C و احتمالاً در زیر سیسـتم‌های III-C و III-D است (۱۴). در اکثر سیسـتم‌های نوع I، Cas6 بـه crRNA متصل می‌شود، به عنوان یک ساختار متوقف کننده برای کمپلکس مداخله گر عمل می‌کند. زیرگروه‌های I-A و I-B اسـتثنا هسـتند که هنگام جـدا سـازی توالی تکـراری،Cas6 جدا می‌شـود. در سیسـتم‌های نـوع III ، Cas6 دایمر و آزاد است.

مکانیسم بلوغ crRNA در سیستم‌های نوع IV مشخص نشده است. در سیستم‌های کلاس ۲، پردازش crRNA با اسـتفاده 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 سیسـتم‌های زیرگـروه II-A و B، پروتئین Cas9 به یک مجموعه crRNA-tracrRNA متصل می‌شـود و RNase III، پروتئیـن میزبـان را نیاز دارد تا قسـمت تکـراری pre-crRNA را برش دهد (۱۵). tracrRNA برای بلوغ crRNA در سیسـتم‌های نـوع II و زیر گروه V-B مورد نیاز اسـت، اما در سیسـتم‌های کلاس ۲ دیگر لازم نیسـت. در سیسـتم‌های CRISPR-Cas نـوع V و VI، هـر دو بـرای پردازش و مرحلـه تداخل crRNA توسـط پروتئین‌هـای Cas12 و Cas13 به ترتیب انجام می‌شوند.

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-02-22]

❑ مرحله تداخل

مرحلـه تداخـل بـه خوبـی در سیسـتم‌های CRISPR-Cas مورد بررسـی قرار گرفته اسـت و درک بهتر مجموعه تداخل سیسـتم CRISPR-Cas از جمله DNA در مقابـل RNA هـدف قرار دادن و جدا شـدن اسـید نوکلئیـک خاص در مقابـل اسـید نوکلئیک های معمولی و همچنین در کاربردهای متنوع و نو ظهور فناوری CRISPR نقش داشته است.

❑ مجموعه تداخل کلاس ۱

مجموعه تداخـل سیسـتم CRISPR-Cas کلاس ۱ از کمپلکـس چنـد پروتئینـی تشـکیل شـده اسـت (شکل 1، Class 2، Interference)

در مرحله تداخل CRISPR-Cas نوع I به مجموعه‌ای مرتبط با CRISPR برای دفاع ضد ویروسی، Cascade گفتـه می‌شـود. در حالی که اجـزای Cascade در زیر گروه‌های نوع I متفاوت اسـت (I-A تا I-f و I-u) ولی دارای ویژگی‌های ثابت شامل: شناسایی PAM در اهداف خارجـی، Cas6 یـا Cas5 باعث اتصـال crRNA به DNA هدف، سـاختار Cas7، تثبیت حلقه R و شکاف توالی هدف توسـط Cas3 اسـت. مجموعـه تداخل زیر گروه I-E به خوبی مشـخص شده اسـت و تشکیل شده اسـت از Cas5 و Cas6 متصل به قسـمت‌های تکراری ۵' و ۳'مربوط به crRNA و همچنین در قسمت مرکزی ساختار حاوی شش پروتئین Cas7، یک زیر واحد بزرگ Cas8 که واسـطه شـناخت PAM می‌باشد و شروع به باز کردن دو رشـته DNA خارجی می‌کند. دو زیر واحد کوچک Cas11 که ساختار حلقه R را به وجود می‌آورند. تغییرات سـاختاری در زیر واحدهـای Cas8 و Cas11 باعث اسـتفاده 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 اسـت، اما جدا شـدن DNA خارجی در این سیستم به اتصال کمپلکس تداخل به RNA رونویسی شده از DNA خارجی بسـتگی دارد. سیستم‌های مداخله‌ای از زیـر گروه‌هـای III-A و III-B به ترتیب Csm و Cmr نامیده می‌شـوند. از Cas5 متصل به انتهای ۵' crRNA بالغ، سـاختار پروتئیـن خانواده Cas7 و زیـر واحدهای بـزرگ و کوچـک Cas10 و Cas11 به ترتیب تشـکیل شـده‌اند. شـناخت PAM یا RNA PAM (موجود در RNA رونویسـی) توسط بعضی از سیستم‌های نوع III اما نه همه آن‌ها، برای تمایز دادن توالی خودی از سـایرین به کار می‌رود، لازم اسـت. هنگامی که مجموعه تداخل متصل می‌شـود، Cas7 رونویسـی ssRNA را در فواصل منظم قطع می‌کند و Cas10 نیـز DNA هدف را جدا می‌کند (۱۷، ۱۸).

اخیراً مشـاهده شـده است که شـکاف DNA توسط Cas10 در زیـر مجموعـه III-A Csm، باعـث تولید پیام رسـان‌های ثانویه (آدنیلات حلقوی) می‌شـود و باعث جدا شـدن RNA غیر اختصاصی توسط Csm6 که یک RNase مرتبط با Cas اسـت، می‌شـوند. اطلاعات کمی درباره مکانیسم‌های تداخل زیرگروه III-C و III-D و نوع IV وجود دارد.

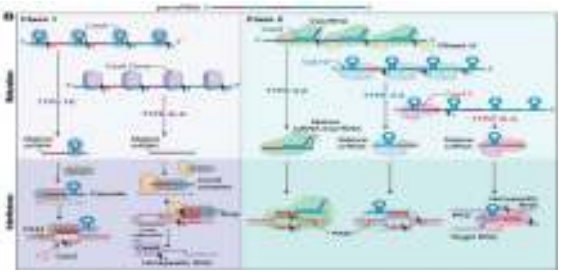
❑ مجموعه تداخل کلاس ۲

سیسـتم‌های کلاس CRISPR-Cas 2 بـا کلاس ۱ متفـاوت هسـتند زیرا مرحلـه تداخل با یـک نوکلئاز منفـرد به جـای یک مجموعـه پروتئین انجام می‌شـود. (شکل 2، Class، Interference)

ویژگی‌های تعریف شـده 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 شناسـایی می‌کند و کمپلکـس crRNA -tracrRNA بـا DNA مکمل اتصال می‌یابد و باعث ایجاد شـکاف دو رشـته‌ای در DNA هدف توسط پروتئین Cas9 می‌شود (۲۰). زیر گروه‌های سیسـتم نوع II شامل II-A، II-B و II-C اسـت که براساس اندازه و تنوع توالی در ژن Cas9 تمایز می‌یابند. (شکل B)

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-02-22]



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 DNA، cas3 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 زیست شناسی CRISRP-Cas منجر به کاربردهای گسترده‌ای در زمینه بیماری‌های عفونی شده است. فناوری CRISPR ابزاری را فراهم می‌کند که تعامل بین میزبان و میکروب‌ها را به طور چشم گیری آشکار سازد و در توسعه تشخیص سریع و دقیق و پیشگیری و درمان بیماری‌های عفونی، نقش به سزایی 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 پاتوژنز 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 ویرولانس 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) ۱۰ 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 sgRNA، توانستند هفت ژن (EMC2،EMC3، SEL1L، DERL2، UBE2G2، UBE2J1 و HRD1) 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

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-02-22]

ویرایش ژنوم، دست کاری آن‌ها دشوار است (۲۴). برای رفع این مشکل نودویگ و همکاران، ژن Cas9 از استرپتوکوک پیوژنز را ویرایش کرده و پروموتر 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 زیست شناسی قارچها را ارائه دهند. انگل‌ها از جمله Toxoplasma gondii و Trypanosoma cruzi 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. زیست شناسی 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 آنتی بیوتیک 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 کارباپنمازها از جمله کلبسیلا پنومونیه 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 متی سیلین (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

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-02-22]

غلظت cfu/ml ۱۰ 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 آنتی بیوتیکی 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 آنتی بیوتیکی 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 آنتی بیوتیک های طیف گسترده ممکن است فعالیت CRISPR-Cas را سرکوب کند، که در واقع به دستیابی باکتری‌ها به عناصر مقاومت آنتی بیوتیکی کمک می‌کند.

لین و همکاران مشاهده کردند که قرار گرفتن باکتری در معرض آنتی بیوتیک 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 بیماری زایی و مقاومت به دارو در باکتری‌ها

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

گوما و همکاران، از نخستین محققانی بودند که این مفهوم را در شرایط invitro با استفاده از زیر سیستم CRISPR-Cas ، I-E 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 ویرولانس 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 آنتی بیوتیک ها 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 I-E CRISPR-Cas 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 غنی سازی شدند. به طور مشابه، کیم و همکاران استفاده از سیستم CRISPR-Cas9 یک روش مبتنی بر حساس سازی دوباره به آنتی بیوتیک ها دارای مقاومت (ReSAFR) برای بازیابی فعالیت آنتی‌بیوتیکی بتا-لاکتام در اشریشیا کلای برای تولید ESBL، مورد

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-02-22]

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

همچنیـن در باکتری‌هـای گـرم مثبـت، Bikard و همـکاران با اسـتفاده از RNA راهنما Cas9 که توسـط فاگمید منتقل می‌شـود، به طور انتخابی با کشتن گونه‌های بیماری زا استافیلوکوک اورئوس و از بین بردن پلاسمیدهای حامل ژن مقاومت به متی سـیلین mecA، بدون کشـتن باکتری‌های میزبان، به کار گرفته‌انـد (۳۷). مطالعات که در بالا ذکر شـده است شـواهد مقدماتی را درباره سیستم‌های CRISPR-Cas بیان کرده است که احتمالاً برای هدف قرار دادن درمانی باکتری‌های خاص و از بین بردن ارگانیسم‌هایی که دارای مقاومت آنتی بیوتیکی هستند، سودمند باشد.

❑ بحث و نتیجه گیری

سیسـتم CRISPR-Cas فنـاوری بی نظیری اسـت که می‌توانـد تحقیقات در زمینه بیوتکنولوژی و پزشـکی را بـه طور کامـل متحول کند، اما باید در نظر داشـت که هنوز تمامی کاربردهای آن برای جامعه بشـر 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 سـوء احتمالی آن می‌تواند به تناسب موجودات زنده متفاوت ارزیابی شود.

پروکاریوت هـا دارای سیسـتم‌های CRISPR-Cas متنوعی هسـتند که ایمنی سـازگاری را به طور ارثی برای باکتری‌هـا فراهم می‌کند. با توجه به ایـن که دیدگاه‌های جدیدی در مورد ترکیب و عملکرد این سیسـتم‌ها آشـکار می‌شـود، کاربردهـای بالینی برای فنـاوری CRISPR همچنـان گسـترش می‌یابـد. بیماری‌هـای عفونی باعث نگرانی‌هایی در سرتاسر جهان شده است همچنین ابزارهای جدیدی برای مطالعه مکانیسـم‌های اساسـی، تشـخیص دقیـق و درمان عفونت‌ها به کاربرده شـده اسـت. فناوری CRISPR-Cas9 در حـال پیشـبرد درک ارتباط بین میزبان و باکتری اسـت که قبلاً امـکان پذیر نبوده و برای توسعه روش‌های تشخیص جدید بیماری‌های عفونی به آن اضافه شـده است. شـاید بزرگ‌ترین پیشرفت در تشخیص مبتنی بر CRISPR برای بیماری‌های عفونی، برش اسید نوکلئیک های غیر اختصاصی اسـت که در سیسـتم‌های CRISPR-Cas نوع III، V و VI مشـاهده می‌شـود تا تشـخیص دقیق و هدفمند را فراهم کنـد. این فناوری نوظهـور ضرورتاً نیاز به ارزیابـی دقیق‌تر و آزمایش میدانی را دارنـد تا از عملکرد نهایی این سیسـتم اطمینان حاصل شـود. درمان‌های مبتنی بر CRISPR نوید بخش درمان سـرطان و اختلالات ارثی مانند بیماری کم خونی داسـی شـکل و پیشـگیری و درمان بیماری‌های عفونی هستند. تبدیل مشاهدات پیش از بالینی به روش‌های درمانی اثبات شـده، تأیید نشده اسـت. زیرا هیچ روش درمانی مبتنی بر CRISPR در دسـترس نیسـت و فقط تعداد محدودی از آزمایش‌هـای اولیـه بالینی در حال انجام اسـت. انتقال هدفمنـد و کارآمـد فنـاوری CRISPR در داخل بدن همچنان یک چالش محسـوب می‌شـود (۱۲). وکتورهای ویروسـی از جمله آدنوویروس ها و لنتی ویروس‌ها ممکن است یک ساختار CRISPR را به هدف مورد نظر تحویل دهند، اگر چـه نگرانی‌های مربوط به توانایی کارسـینوژن و ایمنی زایی باقی مانده اسـت. وکتورهای غیر ویروسـی شـامل ترکیبات لیپیدی و پلیمـری مانند پلی‌اتیلن آمین، پلی(L-lysine)، دندریمرهای پلی آمید آمین و کیتوزان نیز تحت بررسـی هسـتند (۳۸). گزارش‌های اخیر حاکی از آن اسـت کـه CRISPR-Cas9 می‌تواند باعث ایجاد آسـیب در مکانیسم ترمیم DNA با واسطه p53 شود که نگرانی‌هـای موجود را با توجه به ارتباط جهش‌های p53 و سرطان ایجاد می‌کند (۳۹).

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

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-02-22]

موفقیت، می‌توان یک استراتژی حذف مقاومت به آنتی بیوتیک را در باکتری‌ها تصور کرد که در آن بیمارانی که با ارگانیسم‌های تولیدکننده کارباپنماز آلوده شـــده‌اند، با استفاده از یک فرمول خوراکی از CRISPR-Cas هدفمند که ارگانیسم‌های دارای مقاومت را از دستگاه گوارشی از بین برده و بدین ترتیب باعث بازســـازی میکروبیوم انســـانی خواهد شـــد. روش‌های درمانی مبتنی بر CRISPR برای عفونت‌های ویروســـی پایدار مؤثر 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 ســـاده و به صرفه است و نتایج ســـودمندی 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.

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 palindrome 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, Pirzada 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.

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-02-22]

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, Bardoel 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 IF 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- Gomaa 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):1.5-141.

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.

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-02-22]