تنظیم بیان ژن با استفاده از CRISPR-dCas9

چکیده

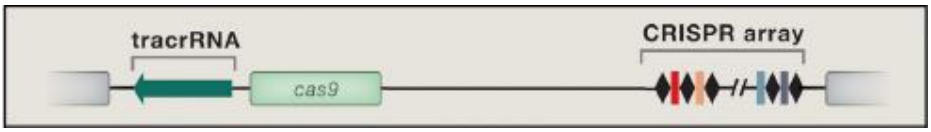
با کشف سیستم CRISPR، پتانسیل بسیار بالا آن برای هدایت عناصر مختلف به سمت هدف های ژنی آشکار شد. یکی از کاربرد های آن تغییر در میزان بیان ژن است به این صورت که یک عامل فعال کننده یا سرکوب کننده بیان ژن به سیستم CRISPR متصل می شود سپس با استفاده از gRNA که برای هدف خاصی طراحی شده آن را به سمت ژن مورد نظر هدایت می کنند. مزیت این روش نسبت به دست ورزی ژنی این است که در این روش دیگر جهش ایجاد نمی کنیم و در نتیجه کار ما ایمن تر و قابل برگشت است.

مقدمه

سیستم CRISPR-Cas9 مجموعه ای متشکل از آنزیم اندونکلئاز Cas9 و یک RNA هدایت کننده (gRNA) می باشد، که اولین بار در سال 1993 کشف شد. در سال 2003 به نقش آن در حفاظت از باکتری در برابر باکتریوفاژها و پلاسمیدها پی بردند، در سال 2012 این سیستم به منظور دست ورزی ژنتیکی سلول های یوکاریوتی مورد استفاده قرار گرفت [1]. از موارد دیگر استفاده از این سیستم می توان به تنظیم بیان ژن ها اشاره نمود که در این مورد از یک آنزیم Cas9 غیرفعال از نظر کاتالیزی استفاده می گردد که قابلیت برش DNA را ندارد، در واقع این فرآیند نسبت به ایجاد جهش ایمن تر است. در ابتدا به مکانیسم مولکولی CRISPR در باکتری می پردازیم سپس در مورد چگونگی کاربرد آن در تنظیم بیان ژنها صحبت می شود.

مکانیسم مولکولی کریسپر در باکتری

عملکرد CRISPR به این صورت است که یک مجموعه متشکل از یک آنزیم اندونوکلئاز و یک gRNA است، gRNA مکمل بخشی از DNA فاژ می باشد در نتیجه زمانی که فاژ باکتری را آلوده می کند gRNA بخشی از DNA فاژ را شناسایی کرده و آن قسمت را با استفاده از آنزیم اندونوکلئاز برش می زند. ژن های کریسپر در منطقه ای بر روی ژنوم باکتری قرار گرفته اند که این منطقه از 3 ناحیه مجزا شامل ژن آنزیم Cas9، آرایه های کریسپر و ژن tracrRNA تشکیل شده است (شکل 1). در ادامه در مورد هر کدام از بخش ها بحث می کنیم.[1]

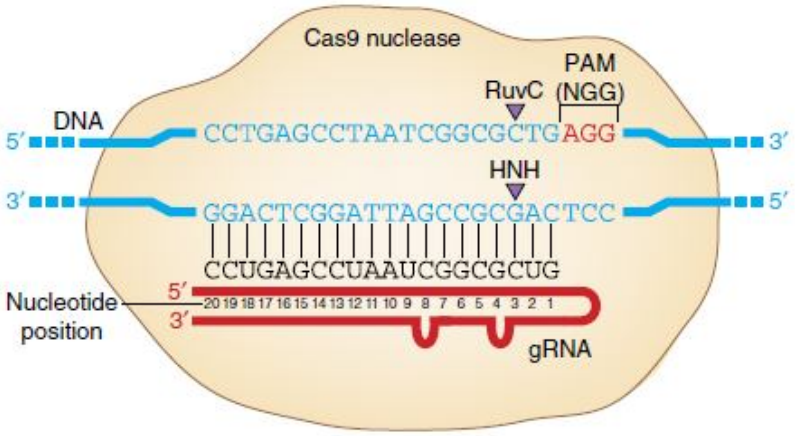


شکل1. لوکوس ژنومی CRISPR [1]

1. آنزیم Cas9

سیستم CRISPR انواع متنوعی دارد که بر حسب نوع آنزیم، آن ها را طبقه بندی می کنند. سیستم CRISPR-Cas9 در کلاس[1] 2 و نوع[2] 2 سیستم های CRISPR طبقه بندی می شود. آنزیم Cas9 یک اندونکلئاز است که در باکتری های *S. thermophilus* و *S. pyogenes* مشاهده شده است.[1]

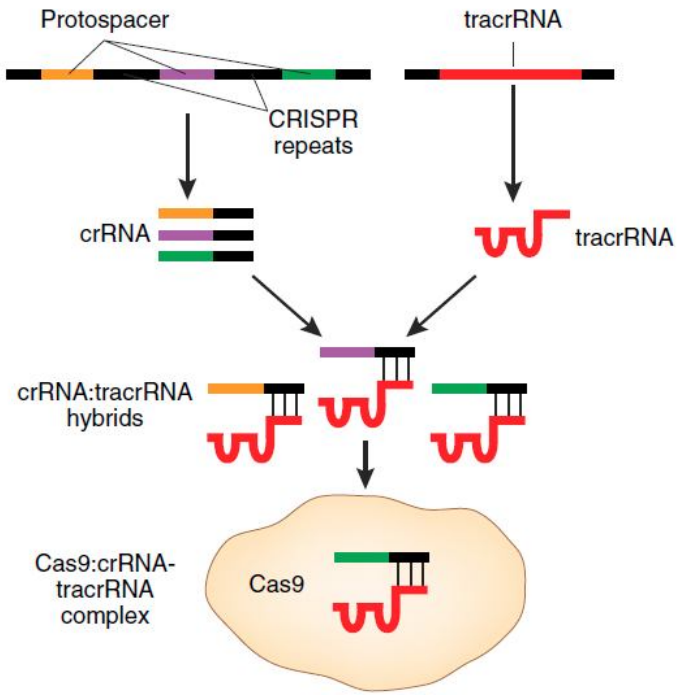
آنزیم Cas9 را به زیرواحد شناسایی کننده ی هدف و زیرواحد نوکلئازی تقسیم بندی می کنند. لوب شناسایی کننده وظیفه شناسایی هدف را با استفاده از gRNA دارد، DNA در شیاری دارای بار مثبت بر سطح آنزیم Cas9 قرار می گیرد. لوب نوکلئازی وظیفه برش رشته هدف و رشته مقابل آن را دارد. در این لوب دو دُمین نوکلئازی وجود دارد، دُمین HNH رشته DNA ای را که مکمل gRNA هست را برش می زند و دُمین RuvC رشته دیگر DNA را برش می زند (شکل 2). بعد از شناسایی هدف توسط gRNA دُمین ها نوکلئازی در صورتی رشته DNA را برش می زنند که یک توالی مخصوص به نام PAM در 3' رشته ی مقابل هدف وجود داشته باشد.PAM برای هر آنزیم اختصاصی است و PAM آنزیم Cas9 توالی NGG می باشد(به جای N هر نوکلوتیدی می تواند قرار بگیرد.)[2]



شکل2. دُمین های نوکلئازی Cas9[3]

2. آرایه CRISPR و ژن tracrRNA در باکتری

یک توالی پالیندرومیک به طول 30 نوکلوتید در سرتاسر ناحیه آرایه CRISPR تکرار می شود، که بوسیله توالی های 36 نوکلوتیدی متفاوت از هم جدا شده اند که به این توالی های 36 نوکلوتیدی متفاوت فاصله انداز (protospacer) می گویند. در واقع بخشی از فاصله انداز مکمل بخشی از DNA فاژ های آلوده کنند باکتری می باشد. از روی ناحیه آرایه CRISPR یک RNA طویل ساخته می شود که به آن pre-crRNA می گویند، سپس pre-crRNA به RNA های کوچک تری به نام crRNA تبدیل می شود که هر کدام شامل یک رونوشت از توالی پالیندرومیک و فاصله انداز می باشد. 20 نوکلوتید انتهای 5' crRNA، هدف ما را در DNA فاژ شناسایی می کند. توالی tracrRNA ثابت است و بخشی از آن با یک ناحیه از crRNA که در واقع رونوشت توالی پالیندرومیک می باشد رابطه مکملی بر قرار می کند. و در واقع وظفیه آن نگهداری crRNA بر روی آنزیم Cas9 می باشد. در اتصال crRNA و tracrRNA آنزیم RNaseIII نقش دارد. به هیبرید crRNA و tracrRNA را gRNA می گویند (شکل3)[4] .



شکل3. پردازش آرایه CRISPR و tracrRNA [3]

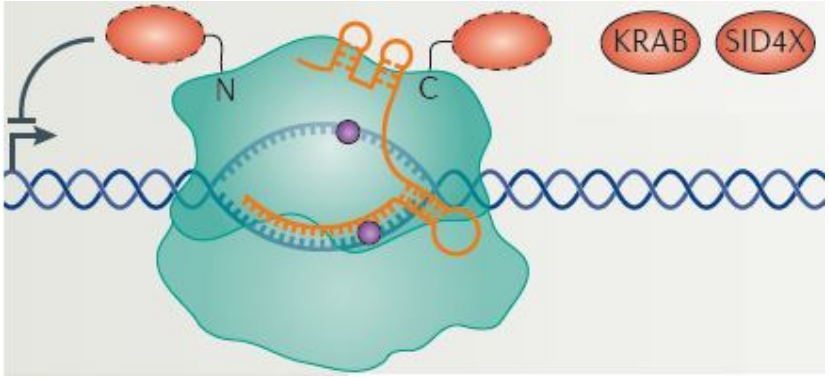
تنظیم بیان ژن

برای تغییر درمیزان بیان یک ژن راه های گوناگونی از قبیل تغییرات اپی ژنتیکی، فاکتور های رونویسی و موارد دیگر وجود دارد. در استفاده از فاکتور های رونویسی برای تغییر در میزان بیان یک ژن یک چالش اصلی هدایت این فاکتورها اختصاصا به سمت ژن مورد نظر است. با کشف سیستم CRISPR که می تواند منحصرا یک نقطه خاص در ژنوم را هدف قرار دهد این امکان برای محققین فراهم شده که به منظور تغییر در بیان یک ژن، فاکتور های رونویسی را به طور اختصاصی به سمت آن ژن هدایت کنند. تمامی این روش ها بر یک اصل کلی استوار هستند آن هم اتصال عامل تغییر دهنده بیان ژن به بخش از پروتئین غیرفعال Cas9 است.به دلیل اینکه ما در این روش می خواهیم فقط بیان ژن را تغییر دهیم با جهشی که در پروتئین Cas9 ایجاد می کنیم دُمین های نوکلئازی آن را غیر فعال می کنیم که به این نوع از آن dCas9 می گویند. در نتیجه dCas9 توانایی ایجاد برش در DNA را ندارد.

کاهش بیان ژن

اولین نتایج موفق از کاهش بیان ژن با استفاده از dCas9 در E.coil مشاهده شد. یکی از ساده ترین روش های خاموش کردن ژن این است که gRNA را به گونه انتخاب کنیم که dCas9 در پایین دست نقطه آغاز رونویسی قرار بگیرید و بدین صورت از مرحله طویل سازی رونویسی توسط RNA پلی مراز جلوگیری می کند.[5, 6] به این نوع از سیستم CRISPR که سبب مهار بیان ژن می شود CRISPRi (CRISPR interference) می گویند. استفاده از dCas9 برای کاهش بیان ژن بدون عامل مهار کننده بیان ژن، در پستانداران بیان ژن (*egfp*) enhanced GFP را در رده ی سلولی HEK293T به میزان نسبتا کم کاهش داد. استفاده از دُمین های مهار کننده رونویسی مانند Krüppel-associated box (KRAB) یا اتصال چهار دمین برهمکنشی mSin3 (mSin3 interaction domain)که یک دُمین عملکردی در چندین پروتئین مهار کننده رونویسی می باشد- به هم و تشکیل SID4X بیان ژن های transferrin receptor CD71, C-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR4) and tumour protein 53 (TP53), را تا بیش از

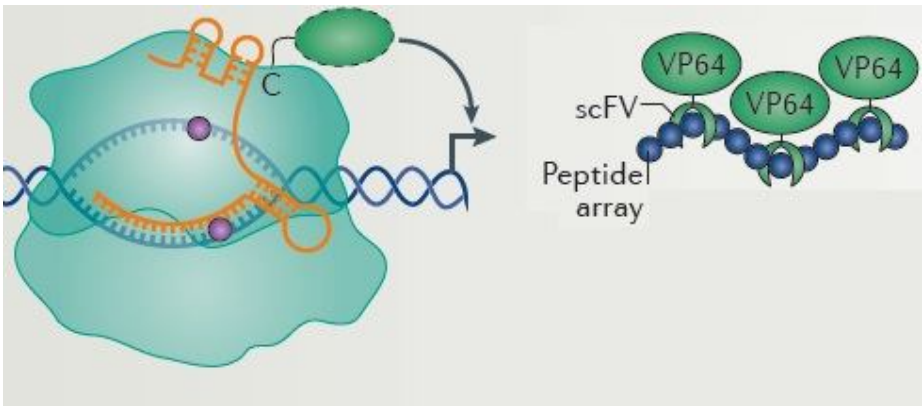
80 درصد کاهش می دهد. نحو اتصال این فاکتور های مهار کننده رونویسی به این صورت است که با مهندسی پروتئین Cas9 این عوامل را به پایانه C پروتئین متصل می کنند (شکل4) [7]. در روش دیگری به منظور کاهش بیشتر بیان ژن علاوه بر پایانه C پروتئین به پایانه N پروتئین نیز یک عامل مهار کتنده رونویسی متصل می کنند [8].



شکل4.کاهش بیان ژن [9] بخش سبز رنگ پروتئین Cas9، قسمت نارنجی gRNA

1. افزایش بیان ژن

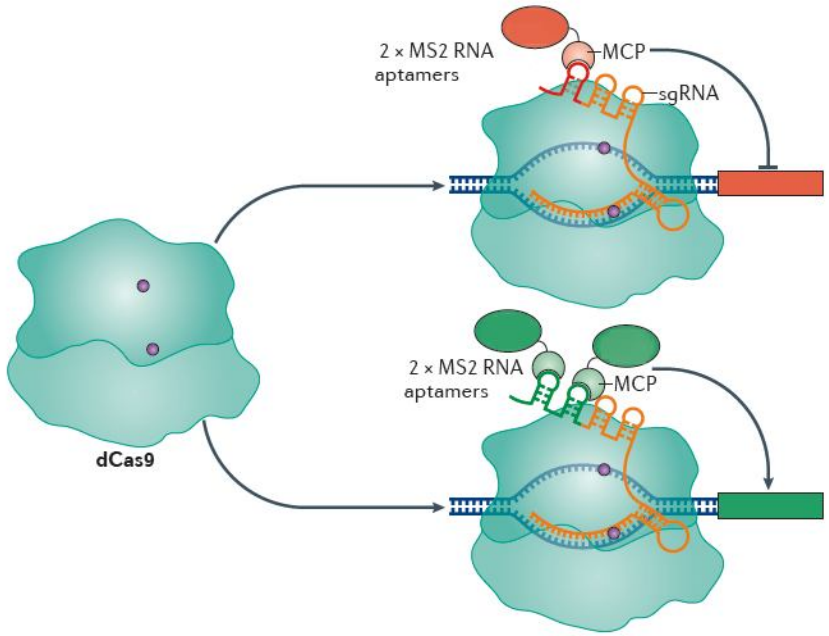
در یکی از روش های ساده برای افزایش بیان ژن در E.coil زیر واحد ω RNA پلی مراز به پروتئین dCas9 متصل کردند که اجازه منتاژ هولوآنزیم را در محل پروموتور ژن هدف می دهد [6]. برای افزایش بیان ژن در سلول های پستانداران از عوامل فعال کننده رونویسی از قبیل VP64 – کمپلکس حاصل از اتصال چهار پروتئین VP16- و سایر عوامل فعال کننده رونویسی استفاده می کنند. برای افزایش بیشتر میزان بیان فاکتور فعال کننده را به هر دو پایانه ی N و C پروتئین متصل می کنند [10, 11]. در یک روش پیچیده اما کارآمد برای اینکه باز هم بیان بیشتری از ژن داشته باشند. 10 عدد از پپتید هایی که نقش اپی توبی دارند را به هم متصل می کنند سپس ناحیه scFV آنتی بادی اختصاصی برای این اپی توب ها را جدا کرده و به آن ها VP64 و یا دیگر عوامل فعال کننده را متصل می کنند. دقت کنید که 10 عدد پپتید متصل به هم به پایانه C پروتئین dCas9 متصل هستندکه به این مجموعه آرایه SunTag می گویند (شکل4) [12].



شکل4. افزایش بیشتر بیان ژن با استفاده از آرایه SunTag [9]

در رویکردی دیگر برای فعال کردن رونویسی به جای مهندسی پروتئین dCas9، gRNA مورد مهندسی قرار می گیرد و به جای بعضی از حلقه های آن از مولکول هایی از جنس RNA به نام آپتامر استفاده می شود که تمایل اتصال به یک مولکول پروتئینی را

دارند. در این رویکرد از RNA MS2 آپتامر استفاده شد، به پروتئین هایی که به این RNA متصل می شوند MS2 coat پروتئین می گویند. در این روش با استفاده از مهندسی پروتئین MS2 coat عامل فعال کننده یا غیر فعال کننده رونویسی را به آن متصل می کنند (شکل5)[13].



شکل5. طراحی جدید gRNA به منظور بیان ژن با واسطه سیستم کریسپر با استفاده از آپتامرهای RNA [9]

جمع بندی

کریسپر تکنولوژی قدرتمندی است که توانایی ما در کنترل، تغییر و شناسایی ژن ها را بشدت افزایش داده است. یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های کریسپر دستکاری همزمان چند ژن است کاری که تا پیش از این بسیار مشکل بود اما با کریسپر این فرآیند بسیار ساده‌تر شده است. یکی دیگر از کاربردهای کریسپر ایجاد مدل‌های حیوانی بیماری‌های مختلف می‌شود. در کل کریسپر تحول عظیمی در دنیا مهندسی ژنتیک ایجاد کرده است و ابزار قدرتمندی را در اختیار دانشمندان قرار می‌دهد تا با سرعت و دقت بیشتری نسبت به گذشته به مطالعه ژن‌ها و برهمکنش‌های آن‌ها با یکدیگر بپردازند.

مراجع:

۱. Lander ES: **The heroes of CRISPR**. *Cell* 2016, **164**(1):18-28.
۲. Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, Dohmae N, Ishitani R, Zhang F, Nureki O: **Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA**. *Cell* 2014, **156**(5):935-949.
۳. Sander JD, Joung JK: CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature biotechnology* 2014, 32(4):347-355.

۴. Westra ER, Buckling A, Fineran PC: **CRISPR-Cas systems: beyond adaptive immunity**. *Nature reviews Microbiology* 2014, **12**۳۲۶.-۳۱۷:(۵)

۵. Larson MH, Gilbert LA, Wang X, Lim WA, Weissman JS, Qi LS: **CRISPR interference (CRISPRi) for sequence-specific control of gene expression**. *Nature protocols* 2013, **8**(11):2180-2196.

۶. Bikard D, Jiang W, Samai P, Hochschild A, Zhang F, Marraffini LA: **Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system**. *Nucleic acids research* 2013, **41**(15):7429-7437.

۷. Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, Liu Z, Brar GA, Torres SE, Stern-Ginossar N, Brandman O, Whitehead EH, Doudna JA: **CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes**. *Cell* 2013, **154**(2):442-451.

۸. Gilbert LA, Horlbeck MA, Adamson B, Villalta JE, Chen Y, Whitehead EH, Guimaraes C, Panning B, Ploegh HL, Bassik MC: **Genome-scale CRISPR-mediated control of gene repression and activation**. *Cell* 2014, **159**(3):647-661.

۹. Dominguez AA, Lim WA, Qi LS: Beyond editing: repurposing CRISPR-Cas9 for precision genome regulation and interrogation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 201۵.

۱۰. Farzadfard F, Perli SD, Lu TK: Tunable and multifunctional eukaryotic transcription factors based on CRISPR/Cas. *ACS synthetic biology* 2013, 2(10):604.

۱۱. Gao X, Tsang JC, Gaba F, Wu D, Lu L, Liu P: Comparison of TALE designer transcription factors and the CRISPR/dCas9 in regulation of gene expression by targeting enhancers. *Nucleic acids research* 2014, 42(20):e155-e155.

۱۲. Tanenbaum ME, Gilbert LA, Qi LS, Weissman JS, Vale RD: A protein-tagging system for signal amplification in gene expression and fluorescence imaging. *Cell* 2014, 159(3):635-646.

۱۳. Konermann S, Brigham MD, Trevino AE, Joung J, Abudayyeh OO, Barcena C, Hsu PD, Habib N, Gootenberg JS, Nishimasu H: **Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex**. *Nature* 2014.