



سیستم ژن درمانی CRISPR/Cas

ابزاری نوین برای درمان بیماری‌های ژنتیکی پیچیده

ابوالفضل عرب

دانشجوی کارشناسی سلولی و مولکولی،

دانشگاه تهران

abolfazlarab@ut.ac.ir

مطهره جدیدی

دانشجوی کارشناسی سلولی و مولکولی،

دانشگاه تهران

motahareh.jadidi@ut.ac.ir

کریسپر، نام یک منطقه ژنی در باکتری‌ها و آرکی‌ها است؛ این منطقه ژنی در شناسایی ویروس‌های مهاجم و فعال کردن آنزیم‌های نوکلئازی برای نابود کردن ژنوم آن‌ها، فعالیت می‌کند. دانشمندان با به کارگیری ابزارهای مولکولی این سیستم دفاعی میکروبی، روش‌هایی را ابداع کرده‌اند که توسط آن می‌توان با کارایی بسیار بالایی، مناطق ژنی مختلفی را نشانه‌گیری کرد. دانشمندان با الگو برداری از سیستم ایمنی میکروب‌ها که پیش تر معرفی شد، قطعه RNA کوچک سنتز شده‌ای تحت عنوان RNA راهنما (guide RNA یا به اختصار gRNA)، به همراه آنزیم نوکلئازی Cas9 را برای مطالعات خود به کار می‌گیرند؛ در برخی مطالعات با ایجاد تغییر ژنتیکی در ژن این آنزیم که موجب تغییر در ساختار فضایی آن و طبعاً عملکردش می‌گردد، این آنزیم را، برای مقاصد مختلف بهینه سازی می‌نمایند. از این روش می‌توان جهت دست‌ورزی ژنی، روشن یا خاموش کردن ژن‌ها، نشانه گذاری و رهگیری منطقه خاصی از ژنوم و بسیاری موارد دیگر، در سطح DNA موجودات زنده استفاده نمود. این شیوه سریع‌تر، ارزان‌تر و دقیق‌تر از شیوه‌های رایج ویرایش ژن (TALEN و ZFNs) است. فناوری کریسپر به قدری توانسته است جای پای خود را در مطالعات ژنتیک مولکولی و علوم تحت تاثیر آن باز کند، که امروزه به یک بحث داغ علمی تبدیل شده است؛ به طوری که، همه روزه اخباری تازه از نوآوری‌ها و کاربردهای جدید آن را در بخش‌های مختلف علوم، مانند زیست‌شناسی پایه، زیست‌فناوری و پزشکی مولکولی شاهد هستیم.

شما می‌توانید کریسپر را به عنوان یک چاقوی کوچک جراحی مولکولی در نظر بگیرید. این یک راه برای ایجاد تغییری دقیق در یک موجود زنده، مانند تغییر یک ژن جهش یافته بیماری‌زا به یک توالی سالم است.

۶۶

tracrRNA را همزمان برعهده دارد. بخشی که نقش نشانه‌گیری دارد دارای توالی مکمل بخشی از توالی ویروس‌های مهاجم پیشین هستند که موجب می‌گردند در دفعات بعدی مواجهه میکروب با آن ویروس، سیستم کریسپر فعال شود؛ درنتیجه، با اتصال gRNA به توالی مکمل خود بر روی ژنوم ویروس مهاجم و قرارگیری آنزیم Cas9 در مجاورت آن، کمپلکس فعال شکل می‌گیرد و دامین‌های نوکلئازی این آنزیم فعالیت نوکلئازی را علیه ژنوم ویروس مهاجم انجام می‌دهند؛ درنتیجه، میکروب نسبت به ویروس مقاومت نشان می‌دهد. این فعالیت آنزیمی موجب شکست در دو رشته (DSB^۵) از ژنوم ویروس مهاجم می‌گردد و ویروس توانایی فعالیت خود را از دست می‌دهد. آنزیم Cas9 از نظر ساختار و نحوه عملکرد نسبت به سایر نوکلئازهای کریسپری، پیچیدگی مولکولی کمتری دارد و به صورت تک زیرواحدی است. همین مسئله، موجب شده‌است که دانشمندان بتوانند از این آنزیم (که در سیستم نوع II کریسپر وجود دارد) به عنوان آنزیم نوکلئاز برای دست‌کاری ژنی بهره ببرند.

عملکرد مولکولی تکنولوژی کریسپر

آنزیم Cas9 به همراه gRNA در کنار هم قرار می‌گیرند و با تشکیل اتصالات غیرکوالان، یک کمپلکس عملکردی را ایجاد می‌کنند. RNA راهنما (gRNA) دارای دو بخش داربستی (Scaffold) و حذف‌فصل (Spacer) یا نشانه‌گیر (Tar-geting) است. با بیان پروتئین Cas9،

در سطح مولکولی، تا سال ۲۰۰۷ به طور کامل مشخص نشد. تا به حال سه نوع سیستم کریسپر (I, II, III) در قلمرو باکتری‌ها و آرکی‌ها شناسایی شده‌است، که از این بین نوع II بیش‌تر مورد مطالعه قرار گرفته‌است.

در واقع سیستم کریسپر یک سیستم ایمنی پروکاریوتی است که باعث مقاومت به عناصر ژنتیکی خارجی، مانند DNA فآژها می‌شود (همانند روش تداخل RNA^۱ (RNAi) که در موجودات یوکاریوتی وجود دارد). باکتری دارای سیستم ایمنی کریسپر، بعد از اولین مواجهه با ویروس مهاجم پس از تخریب ماده وراثتی آن، توالی‌های (حدود ۲۰ نوکلئوتیدی) متعددی از ژنوم ویروس هیدرولیز شده را وارد لوکوس ژنی کریسپر می‌نماید. این مهم موجب می‌شود در مواجهه‌های بعدی میکروب با ویروس، مجموعه‌های ریبوپروتئینی^۲ (در هر یک از انواع کریسپر مجموعه‌های پیچیده مولکولی متفاوتی ظاهر می‌شوند) نقش ایفا کنند. کریسپر نوع II از همه ساده‌تر است و ابزارهای مولکولی آن شامل یک آنزیم تحت عنوان Cas9^۳، به همراه دو قطعه RNA کوچک (crRNA و tracrRNA) می‌باشد. RNAهای کوچک دارای دو عملکرد داربستی و نشانه‌گیری هستند (دانشمندان برای به‌کارگیری این سیستم جهت استفاده در سطح آزمایشگاه یک قطعه RNA به نام RNA راهنما (gRNA یا sgrRNA) طراحی کرده‌اند که نقش crRNA و

بیوشیمیست، جنیفر دودنا (Jenni-fer Doudna) -پژوهشگر گروه زیست‌شناسی سلولی-مولکولی و شیمی دانشگاه کالیفرنیا در برکلی- می‌گوید: « شما می‌توانید کریسپر را به عنوان یک چاقوی کوچک جراحی مولکولی در نظر بگیرید. این یک راه برای ایجاد تغییری دقیق در یک موجود زنده، مانند تغییر یک ژن جهش یافته بیماری‌زا به یک توالی بی‌ضرر است. » سهولت استفاده از روش کریسپر-Cas هم‌چنین می‌تواند به یک پردازنده کلمات تشبیه شود که کلمه را در متن ویرایش و جایگزین می‌کند. از زمان شناسایی این منطقه ژنی حدود ۳۰ سال می‌گذرد (Ishino et al., 1987)؛ این درحالی است که در سال‌های اخیر دانشمندان با به‌کارگیری ابزار این سیستم دفاعی میکروبی، روش‌هایی را ابداع کرده‌اند که توسط آن می‌توان با کارایی بسیاری بالایی مناطق ژنی مختلفی را نشانه‌گیری نمود.

کریسپر و نقش آن در مقابله با ویروس‌ها

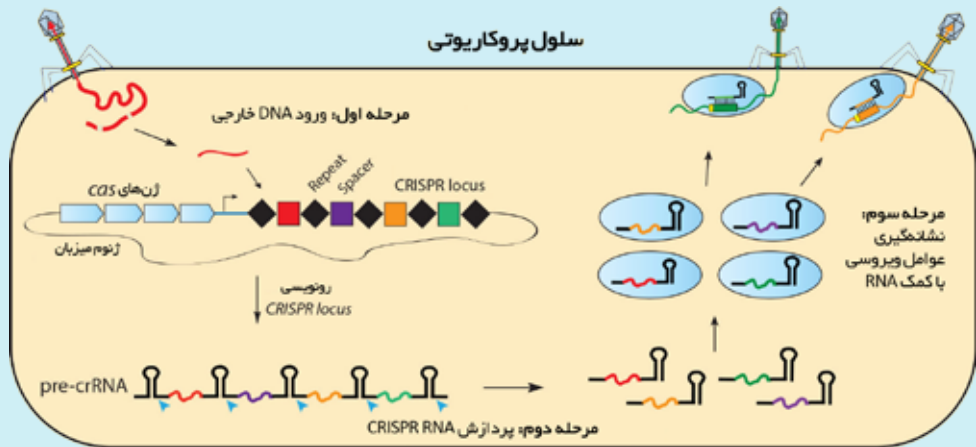
کریسپر (CRISPR)، مخفف عبارت Clustered regularly interspaced short palindromic repeats، به قطعاتی از DNA پروکاریوتی شامل تکرارهایی کوتاه از توالی نوکلئوتیدی گفته می‌شود. کریسپرهای در ۴۰ درصد از ژنوم باکتری‌های توالی‌یابی شده و در ۹۰ درصد از آرکی‌ها یافت می‌شوند. لوکوس کریسپر، به عنوان بخشی از ژنوم باکتری دارای مجموعه‌ای از توالی‌های تکراری (تکرارهای مستقیم) است که به وسیله قطعات کوتاهی از توالی‌های غیرتکراری (spacers) بینشان فاصله ایجاد شده است. این الگوهای تکرار شونده معنی‌داری که اکنون به عنوان منطقه ژنی کریسپر می‌باشد، برای اولین بار در دهه ۱۹۸۰ در باکتری E. Coli نظر پژوهشگران را به خود جلب کرد (Ishi-no et al., 1987)؛ ولی عملکردشان

۱. RNA interference.

۲. Riboprotein Complex.

۳. CRISPR Associated Protein.

۴. Guide RNA or Single-Guide RNA.



عکس ۱: نحوه عملکرد سیستم ایمنی ویروسی CRISPR نوع II در پروکاریوتی. مرحله اول: ورود DNA خارجی. در مواجهه سلول پروکاریوتی با ویروس، ژنوم ویروس وارد سلول می‌گردد؛ سلول میزبان موجب می‌شود ژنوم ویروس مهاجم توسط نوکلئازهای عمومی برش داده شود. به دنبال آن بخشی از ژنوم ویروس (۲۰ تا ۱۵۰ نوکلئوتید) به بخش Spacer در محل ژنی CRISPR (CRISPR Locus) وارد می‌شود. مرحله دوم: پردازش CRISPR RNA. به دنبال رونویسی ژن CRISPR، RNA اولیه پردازش نشده به دست می‌آید که شامل چند RNA راهنما متوالی است؛ این قطعه RNA پردازش به قطعات کوچکتر عملکردی تقسیم می‌شود. مرحله سوم: نشانه‌گیری عوامل ویروسی با کمک RNA. هر یک از RNAهای بالغ شده در مرحله قبل، در کنار یک آنزیم Cas9 قرار می‌گیرند و ساختار عملکردی ریبونوکلئوپروتئینی gRNA/Cas9 شکل می‌گیرد. آن کمپلکس ریبونوکلئوپروتئینی که شامل RNA حاوی قطعه‌ای از توالی ژنوم ویروس مهاجم در مرحله اول است، در مواجهه مجدد سلول با ویروس مشابه، با کمک RNA راهنما با سرعت و کارایی بسیار بالا ژنوم ویروس مهاجم را شناسایی می‌کند و با ایجاد برش دو رشته‌ای (DSB) در DNA ویروسی، آن را غیرفعال می‌نماید.

پژوهشگران در مهندسی ژنتیک قرار گرفته است. پژوهشگر در هنگام انتخاب پلازمید و طراحی سیستم CRISPR/Cas9 برای پژوهش خود، باید به وجود توالی PAM متناسب با گونه Cas9 مورد استفاده در آزمایش، در بالادست ژن هدف خود توجه کند. مجموعه Cas9-gRNA به هر توالی از ژنوم که توالی PAM^۸ را داشته باشند متصل می‌شود، اما Cas9 تنها در حالتی برش را انجام می‌دهد که توالی حذف‌فصل (نشانه‌گیر) از gRNA با توالی هدف به میزان کافی همسانی (homology) داشته باشد. در این حالت مدت زمان این اتصال بیشتر خواهد بود و در نهایت، دامین‌های نوکلئازی Cas9 می‌توانند عملکرد نوکلئازی خود را انجام دهند. این عملکرد در اثر ایجاد یک برش دورشته‌ای (DSB) در محل توالی هدف رخ می‌دهد.

۸. Protospacer Adjacent Motif؛ بلافاصله بالادست توالی هدف قرار دارد و حضور آن برای اتصال Cas9 به توالی هدف ضروری است.

” در واقع سیستم کریسپر یک سیستم ایمنی پروکاریوتی است که باعث ایجاد مقاومت به عناصر ژنتیکی خارجی، مانند DNA فاژها می‌شود.

“ * توالی هدف در بین کل توالی‌های ژنوم موجود زنده تا حد امکان منحصر به فرد باشد. توالی PAM بلافاصله در بالادست ژن هدف وجود داشته باشد.

حضور توالی PAM در بالادست ژن هدف، برای فعالیت نوکلئازی Cas9 ضروری است. این توالی می‌تواند متناسب با گونه Cas9 متنوع باشد (به عنوان مثال برای *Strep. pyogenes* Cas9؛ *S. pyogenes* Cas9 مربوط به گونه بیش‌تر از سایرین مورد استفاده گسترده

بخش داربستی gRNA به بخشی از سطح قابل‌دسترس و دارای بار مثبت از Cas9 متصل می‌شود و تشکیل یک ساختار ریبوپروتئینی^۶ می‌دهد. تشکیل این ساختار با تغییر ساختار فضایی در دامین‌های پروتئینی Cas9 همراه است؛ که در پی آن، Cas9 از حالت غیرفعال (حالت غیراتصال به DNA) به حالت فعال (حالت اتصال به DNA) تغییر پیدا می‌کند. در پی تشکیل این ساختار، توالی حذف‌فصل (نشانه‌گیر) از gRNA، در خارج از کمپلکس Cas9-gRNA قرار می‌گیرد.

همان‌طور که شرح داده شد، فناوری CRISPR/Cas9، می‌تواند با همراهی یک gRNA، توالی ژنی مکمل آن را در DNA میزبان شناسایی نماید و توسط فعالیت نوکلئازی کمپلکس Cas9 ژن از پیش تعیین شده‌ای را هدف قرار دهد و منهدم (knock-out) کند. توالی هدف می‌تواند هر توالی ۲۰ نوکلئوتیدی از ژنوم یک موجود پیچیده باشد، به شرط آن‌که این دو مشخصه را دارا باشد:

۶. Up Stream .V

۷. Riboprotein Complex

مختلفی از جمله جهش حذف، جهش اضافه و یا جهش تغییر چارچوب^{۱۰} شود. در بهترین حالت، نتیجه این برش و ترمیم از مسیر NHEJ، موجب جهش از دست رفتن عملکرد^{۱۱} در ژن هدف می‌شود.

۲. مسیر ترمیم «همسانی هدایت شده» (HDR)^{۱۲}

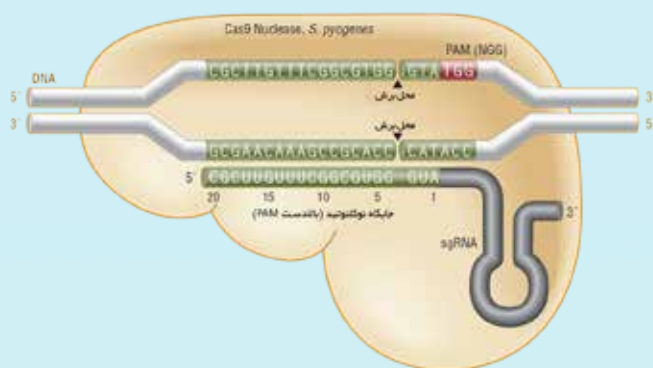
روش ترمیمی می‌باشد که برای ترمیم^{۱۳} nicks یا DSBs مورد استفاده قرار می‌گیرد. از روش HDR برای تغییر در یک نوکلئوتید تا اضافه کردن چندین نوکلئوتید به توالی هدف، می‌توان استفاده نمود. آن چیزی که ما به عنوان تغییر برنامه‌ریزی شده «دست‌ورزی ژنی» (Gene Editing) می‌شناسیم، در واقع توسط مسیر ترمیم همسانی هدایت شده صورت می‌پذیرد. درحالی که ترمیم برش دورشته‌ای (DSB) از طریق NHEJ، که به صورت معمول رخ می‌دهد، موجب تغییر ناقص و غیر قابل برنامه‌ریزی در توالی هدف می‌گردد.

۱۰. Frameshift mutation

۱۱. loss-of-function mutation

۱۲. Homology Directed Repair

۱۳. Nick؛ ایجاد برش در یک رشته از DNA دو رشته.



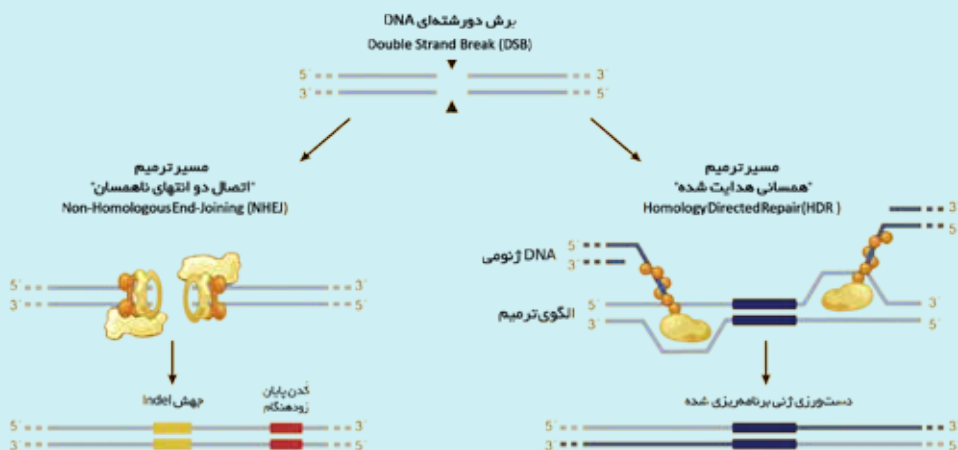
عکس ۲: ساختار عملکردی ریبونوکلوپروتئینی gRNA/Cas9 در اتصال به توالی هدف (Target Sequence). کمپلکس gRNA/Cas9 در هنگام اتصال به توالی هدف، دچار تغییر ساختار فضایی در آنزیم Cas9 می‌شود. این تغییر موجب می‌شود که دامین‌های نوکلئازی Cas9 در حالت عملکردی خود قرار بگیرند و در بالادست توالی PAM در هر یک از دو رشته DNA برش رخ دهد (Double Strand Break). در این تصویر آنزیم Cas9، راهنما RNA و توالی PAM مربوط به گونه باکتریایی S. pyogenes را مشاهده می‌کنیم

۱. مسیر ترمیمی «اتصال دو انتهای ناهمسان» (NHEJ)^{۱۴}

مسیر NHEJ مرسوم‌ترین روش ترمیمی جهت ترمیم DSB می‌باشد، اما در طی آن تعداد زیادی جهش حذف و اضافه (InDel) در محل برش (DSB) رخ می‌دهد. این تغییرات در توالی هدف موجب می‌شود که پس از ترمیم، DNA دست‌ورزی شده دچار جهش‌های

آنزیم نوکلئاز Cas9 دارای دو دامین نوکلئازی HNH و RuvC است. همان‌طور که پیش‌تر بیان شد، نتیجه عملکرد Cas9 برش دو رشته DNA (DSB) در محل توالی هدف و در حدود ۳-۵ نوکلئوتید بالادست PAM می‌باشد. نتیجه‌ی این برش، فراخوانی مکانیسم‌های ترمیم به این محل می‌باشد. دو مکانیسم ترمیمی مرسوم وجود دارد:

۹. Non-Homologous End-Joining



عکس ۳: در این تصویر دو مکانیسم ترمیم مختلف را که سلول‌های زنده با برش دورشته‌ای (DSB) از خود نشان می‌دهند: مسیر ترمیم "اتصال دو انتهای ناهمسان" - Non-Homologous End-Joining (NHEJ) و مسیر ترمیم "همسانی هدایت شده" - Homology Directed Repair (HDR) - مشاهده می‌کنیم.

دارد. برای منهدم کردن^{۱۶} یک پارچه‌ی ژنوم HIV-1، Cas9 به همراه RNA راهنما (gRNA) (در قالب‌های تکی و چندتایی) طراحی شده و مورد استفاده قرار گرفته است. توالی‌های هدف مشخصی در منطقه ژنی HIV-1 U3 LTR دست‌ورزی شدند. این سیستم طراحی شده Cas9/gRNAs، که در این آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گرفته‌اند، بازده نشانه‌گیری در دست‌ورزی ژنی را تا حد زیادی افزایش دادند و پژوهشگران اثر دور از هدف (off-target) کمتری را در آزمایش‌ها شاهد بوده‌اند. علاوه بر این، حضور gRNAهای متعدد در داخل سلول‌های بیان‌کننده‌ی Cas9 مانع از آلوده شدن به HIV-1 می‌شود و زمینه پیشگیری را نیز فراهم می‌آورد. نتایج نشان می‌دهد که سیستم Cas9/gRNAs طراحی شده، می‌تواند برای ارائه یک رویکرد درمانی و پیشگیری‌کننده علیه ایدز مهندسی شود. این موضوع هم‌چنان در مرحله پژوهش در سطح دانشگاه‌ها و پژوهشگاه‌های برتر دنیا قرار دارد و تا به‌کارگیری آن به عنوان روشی درمانی در سطح بیمارستان‌ها و بر روی انسان، مسیر زیادی را باید طی نماید.

دیستروفی عضلانی دوشن درمان می‌شود

دیستروفی عضلانی دوشن (به اختصار DMD^{۱۷})، شایع‌ترین و شدیدترین نوع از بیماری‌های دیستروفی ماهیچه‌ای از گونه‌ی X (پیوند یافته) و ژنتیکی است. از عوارض اصلی این بیماری تحلیل و نابودی ماهیچه‌های ارادی (که در کنترل بدن نقش حیاتی دارند) است که در مواقع شدید می‌تواند منجر به عدم توانایی در راه رفتن، معلولیت، مشکلات تنفسی و مرگ شود. تیم پژوهشگران دانشگاه دوک از تکنیک CRISPR/Cas9 برای انهدام بخشی از DNA که مانع تولید یک پروتئین ضروری برای کارکرد درست

۱۶. knock-out

۱۷. Duchenne muscular dystrophy

«بهترین شیوه‌ای که ما اکنون برای این کار در اختیار داریم بهره‌برداری از ویروس‌ها است؛ زیرا آن‌ها بلیون‌ها سال وقت را صرف تکامل در جهت یافتن چگونگی وارد کردن ژن‌هایشان به داخل سلول‌ها کرده‌اند.»

وحشی (Cas9 روی آن اثر نکرده)، توالی ترمیم شده به روش NHEJ (که ممکن است خرابی زیادی را به دنبال داشته باشد) و توالی‌هایی که به روش HDR ترمیم شده‌اند تقسیم شوند.

شواهدی از درمان ایدز

بیماری ایدز (AIDS) با توجه به ادغام دائم ژنوم HIV-1 با ژنوم میزبان، که موجب فعال شدن مجدد ویروس حتی پس از درمان ضد رتروویروسی (antiretroviral therapy) می‌شود، علاج ناپذیر باقی می‌ماند. (درمان‌های ضد رتروویروسی، پیشرفت HIV به سمت ADIS را آهسته‌تر می‌کنند و در این حالت فرد چندین سال می‌تواند زندگی سالمی داشته باشد. متأسفانه در برخی موارد، درمان ضد ویروس پس از چند سال تأثیر خود را از دست می‌دهند و نیاز به تعویض رژیم دارویی می‌شود و در برخی موارد دیگر فرد از AIDS بهبود می‌یابد ولی با HIV دهه‌ها زندگی می‌کند ولی این افراد مجبورند که برای تمام عمر روزانه داروهای قوی مصرف کنند که گاه با عوارض جانبی ناخوشایند همراه است.) به همین منظور، استراتژی‌های جدیدی برای برداشتن ژنوم ویروسی از سلول‌های دچار عفونت مورد نیاز است؛ زیرا روش‌های فعلی بیش از حد ناکارآمد هستند و امکان ابتلا به عوارض جانبی و اثر بر توالی‌هایی غیر از توالی هدف (اثر دور از هدف^{۱۸}) در بیماران وجود

۱۸. off-target effects: Cas9. ممکن است در محل غیر از توالی مکمل gRNA (توالی‌های مشابه آن) برش ایجاد کند؛ این رخداد با بکارگیری روش double-nick (استفاده از دو Cas9-nickases بر روی توالی‌های هدف به صورتی که دارای بخشی توالی مکمل یکدیگر باشند) کمتر مشاهده می‌شود.

به منظور استفاده از HDR برای دست‌ورزی ژنی، یک قطعه DNA به عنوان «الگوی ترمیم^{۱۹}»، با توالی از پیش تعیین شده، باید به همراه آنزیم Cas9 و gRNA به سلول وارد شود. الگوی ترمیم، می‌بایست شامل توالی همسان بالادست و پایین‌دست در توالی هدف باشد (بازوی همسان چپ و راست؛ اندازه این دو بازو به اندازه توالی مدنظر برای دست‌ورزی بستگی دارد). باید توجه داشت که توالی الگوی ترمیم نباید توالی PAM داشته باشد (علت آن را خودتان حدس بزنید!). ضمن دقت بالای HDR باید توجه داشت که بازده روش HDR به طور معمول پایین (کمتر از ۱۰ درصد) است؛ حتی در سلول‌هایی که Cas9، gRNA و توالی مجزای الگوی ترمیم را دریافت کرده باشند. پژوهشگران به منظور استفاده بهتر از روش HDR در آزمایش‌ها، سعی می‌کنند از کشت سلول در مراحلی که HDR به میزان بیشتر فعال است استفاده کنند؛ و با ایجاد جهش در ژن حدواسط‌های عملکردی مرتبط با مکانسیم NHEJ، موجب کاهش انجام این روش ترمیم شوند و طبعاً میزان بازده HDR افزایش می‌یابد.

این بازده پایین در HDR به همراه بازده بسیار بالای Cas9 در شناسایی و ایجاد برش در توالی هدف، پیامدهای مهمی را به دنبال خواهد داشت. این مهم موجب می‌شود توالی‌های هدف به سه دسته توالی



عکس ۵: تصویر یک فرد مبتلی به دیستروفی عضلانی دوشن.

کریسپر؛ خوبی‌ها، بدی‌ها و ناشناخته‌ها (بخش ویژه نیچر)

مجله علمی نیچر، مطالب مفید و قابل توجهی در مورد سیستم کریسپر در یک بخش ویژه به عنوان «کریسپر؛ خوبی‌ها، بدی‌ها و ناشناخته‌ها» گردآوری نموده است. زیرصفحه مربوط به این بخش ویژه، در آدرس nature.com/crispr قابل دسترس می‌باشد.

منابع:

Web resources:

[i]. www.addgene.org/crispr

[ii]. RNA.berkeley.edu

[iii]. Nature.com/CRISPR | CRISPR EVERYWHERE, A Nature special issue

Articles:

[1]. Alex Reis, Ph.D., Bitesize Bio. (2014) CRISPR/Cas9 and Targeted Genome Editing: A New Era in Molecular Biology. *New England Biolabs, NEB expressions Issue 1, Inc.*

[2]. Kathy Butler. (2016): Reviews of Science for Science Librarians: CRISPR-Cas9 Revolutionizes Gene Editing, *Science & Technology Libraries*, Vol. 35, Iss. 3.

[3]. Wenhui Hu, Rafal Kaminski. (2014): RNA-directed gene editing specifically eradicates latent and prevents new HIV-1 infection. *PNAS*, vol. 111, no.31.

[4]. Patrick D. Hsu, Eric S. Lander, Feng Zhang. (2014): Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell* 157, pg1264.

بود. که طی آن دانشمندان برای ویرایش، به جای تکنیک کریسپر از ویروس استفاده کردند، تا توالی‌ها را داخل DNA سلول قرار دهد. باید توجه داشت که اصلاح سلول‌ها در قسمتی مشخص، با استفاده از ویرایش روش کریسپر، بسیار آسان است. چه خوب چه بد، کریسپر *cas9* در حال تغییر دادن علم زیست‌شناسی است؛ و مادر حال حاضر در سپیده دم این عصر ویرایش ژنتیکی هستیم.

مطالعه بیشتر

درباره کریسپر، در بسیاری از منابع بحث و گفت‌وگو می‌شود. در این میان، مواردی هستند که اطلاعات جامعی را یکجا جمع کرده‌اند و برای شروع مطالعه در این زمینه، مراجعه به آن‌ها کمک کننده خواهد بود.

Addgene

سایت و پایگاه داده Addgene با هدفی غیرتجاری تشکیل شده و مجموعه‌ای از پلازمیدهای مختلف در آن دسته‌بندی شده‌اند و به پژوهشگران امکان بررسی و مقایسه آن‌ها را می‌دهد. هم‌چنین در این سایت، شرح جامعی از مفاهیم مولکولی مختلف وجود دارد که در این بین، سیستم CRISPR/Cas از منظر موضوعاتی از قبیل تاریخچه، مقایسه آن با سایر روش‌های دستکاری ژنی (ZFN و TALEN) و نحوه عملکرد آن بررسی شده است.

عضلات می‌شود، استفاده کرده‌اند. آن‌ها برای وارد کردن تغییرات در DNA سلول موش از یک ویروس استفاده کردند. این تیم در مقاله‌ای در نشریه Science نوشت که وقتی مواد درمانی مستقیماً به پاهای موش بزرگسال تزریق شد، باعث بهبود و تقویت عضلات گردید. هم‌چنین، وقتی این مواد به رگ‌های موش تزریق شد، آزمایش‌ها نشان داد که وضع عضلات قلب و ریه نیز بهتر شد. کریس نلسون، که این تحقیقات را هدایت کرده است گفت: «یکی از موانع بزرگ در ویرایش ژنتیکی، ایجاد تغییرات است. ما می‌دانیم کدام ژن‌ها باید برای بیماری‌های مشخص ترمیم شوند، اما دسترسی به این ژن‌ها با ابزار ویرایش ژنتیکی یک چالش عظیم است.» وی در ادامه می‌گوید: «بهترین شیوه‌ای که ما اکنون برای این کار در اختیار داریم بهره‌برداری از ویروس‌ها است، زیرا آن‌ها بیلین‌ها سال وقت را صرف تکامل در جهت یافتن چگونگی وارد کردن ژن‌هایشان به داخل سلول‌ها کرده‌اند.»

اولین آزمایش فناوری کریسپر آماده رویارویی با سرطان ریه

چین اولین آزمایش ویرایش ژنتیکی کریسپر را بر روی انسان، از اوایل سال جاری میلادی آغاز کرده است. دانشمندان برای از بین بردن سلول‌های سرطانی، گلبول‌های سفید خون افرادی مبتلا به سرطان ریه هستند را با استفاده از تکنولوژی کریسپر، ویرایش می‌کنند. سپس برای بهبود بیماری، این سلول‌های تغییر یافته را مجدداً به بدن بیمار وارد می‌کنند.

نتیجه‌ی این آزمایش به نتیجه‌ای که در آمریکا به دست آمد بسیار شباهت دارد. در این آزمایش سلول‌های ایمنی، که با استفاده از تکنیک ویرایش ژنی کریسپر اصلاح شده بودند، در چندین بیمار مبتلا به سرطان با انواع متفاوت بیماری، آزمایش شدند. آزمایش‌هایی با سلول‌های خونی ویرایش شده نیز قبلاً انجام شده