فصلنامه رویکردهای نوین در تحقیقات علوم پایه، فنی و مهندسی
سال سوم، شماره ۱۱،زمستان ۱۳۹۹
ISSN: ۲٦٤٥-٥٤٣٩
www.jonarbset.ir

مروری بر آنتی کریسپرها

مهیار انصاری [۱] ، محمدرضا کریم‌زاده [۲]

[۱] دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان ، دامغان ، ایران(نویسنده مسئول)
[۲] گروه ژنتیک پزشکی ، دانشکده ی پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی بم، بم ، ایران

چکیده

امروزه مهندسی ژنتیک کاربرد زیادی در علوم پایه، علوم پزشکی، کشاورزی و زمینه های مرتبط با آن دارد. یکی از مهم ترین ابزارهایی که در مهندسی ژنتیک استفاده می شود، سیستم CRISPR است. این سیستم به دلیل سرعت بالا و هزینه ی کم نسبت با سایر روش‌های دستکاری ژنتیکی، بسیار مورد توجه قرار گرفته است. CRISPR ، یک سیستم ایمنی تطبیقی در باکتری ها مقابل عوامل بیگانه خارجی می‌باشد. که محققان با استفاده از این ویژگی و گسترش آن ابزاری را برای دستکاری ژنومی ایجاد کرده‌اند. تعدادی از مهارگرهای طبیعی برای سیستم کریسپر وجود دارد که به آنها آنتی کریسپر (acr) میگویند . این مهارگرها می‌توانند باعث افزایش اختصاصیت CRISPR در زمینه‌ی دستکاری ژنوم شود. برای مثال می‌توانند منجر محدود شدن اثر off target که بوسیله آنزیم cas9 بوجود می آید، گردند. از همین رو بررسی جایگاه acr ها اهمیت زیادی دارد.

واژه‌های کلیدی: کریسپر، آنتی کریسپر، مهندسی ژنتیک، cas ، پروتئین

۱. مقدمه

سیستم کریسپر یکی از ابزارهای مهم دستکاری ژنتیکی است .انواع مختلفی از این سیستم وجود دارد. که به دو کلاس اصلی CRISPR-cas طبقه بندی می‌شود .این دو کلاس نیز به شش زیرگروه تقسیم می‌شود. اساس تفاوت آن‌ها در نوع آنزیم cas آنهاست. کلاس یک ، به زیرگروه‌های یک ، سه و چهار تقسیم می‌شود. این گروه از پروتئین‌های افکتور چند زیر واحدی برای تخریب DNA هدف بهره می‌برد. کلاس دو ، شامل زیرگروه‌های دو ، پنج و شش است و فقط از یک نوع پروتئین افکتور یا آنزیم استفاده می‌کند.(۱) لازم به ذکر است که هر یک از این زیرگروه‌ها ، نیز به چندین دسته‌ی دیگر تقسیم می‌شوند.

مهم‌ترین نوع کریسپر ، که در مهندسی ژنتیک بیشترین استفاده را داشته است ، سیستم ۲ کریسپر می‌باشد. این سیستم از یک نوع آنزیم استفاده میکند. از طرفی نوع دوم سیستم کریسپر نیز دارای چند زیر مجموعه است که مهم‌ترین آن CRISPR-cas9 می‌باشد. اجزای CRISPR-cas9 در مهندسی ژنتیک شامل gRNA،pam و cas9 است.

با وجود مزایا و امکاناتی که این سیستم در زمینه های تحقیقاتی فراهم کرده است ولی با مشکلاتی روبروست. یکی از این مشکلات ، اثر off target است که باعث ایجاد جهش در مکان غیر اختصاصی می‌شود که تشابه زیادی با مکان هدف دارد. در مطالعات اخیر پروتئین هایی به نام آنتی کریسپر (acr) کشف شده‌اند که توانایی کاهش فعالیت برش cas9 را دارا هستند.(۲) به این ترتیب می‌توانند منجر به افزایش اختصاصیت اثر CRISPR-cas9 شوند.

باکتری‌ها هنگام آلوده شدن با عوامل خارجی ، از CRISPR به عنوان یک سیستم ایمنی تطبیقی استفاده می‌کنند. به این ترتیب می‌توانند ماده‌ی ژنتیکی تولید شده توسط عامل مهاجم خارجی را از بین ببرند. با این حال برخی این عومل می‌توانند به وسیله‌ی پروتئین هایی موسوم به anti-CRISPR یا acr توانایی مهار این سیستم ایمنی تطبیقی را کسب کنند.(۳) این پروتئین‌ها به دسته‌های I-C, I-D, I-E, I-F, II-A, II-C, و V-A تقسیم می‌شوند.(۴) پروتئین‌های arc ، براساس نوع سیستم کریسپری که مهار می‌کنند ، نامگذاری می‌شوند.(۵) اکثر این acrها از باکتریوفاژ و پروفاژ منشا می‌گیرند و تعداد اندکی هم از آرکئی‌ها مشتق شده‌اند.(۶) پروتئین‌های arc اولین بار در فاژهای آلوده‌کننده‌ی Pseudomonas aeruginosa کشف شدند که شامل سیستم I-F CRISPR-Cas بودند.(۷)

در این مطالعه‌ی مروری قصد داریم به طور خلاصه مکانیسم‌های acr های مختلف‌را بررسی کنیم.

۲ . روش

به منظور جمع‌آوری اطلاعات مورد نظر ، در پایگاه‌های sciencedirect و wiley ، با استفاده از کلیدواژه‌ی anti-CRISPR به جستجو پرداختیم.

۳. نتایج:

در بررسی مقاله‌های موجود مشاهده شد که arc های مختلف مکانیسم‌های متفاوتی را برای سرکوب CRISPR دارند. از میان مقاله‌های موجود به چند نمونه‌ی شاخص از مکانیسم‌های acrها را انتخاب کردیم .

۱- اولین مورد پروتئین acrIIA1 می‌باشد . فاژهای باکتری Listeria monocytogenes توانایی کد کردن سه پروتئین با خاصیت anti-CRISPR را دارد. از میان این سه پروتئین acrIIA1 حضور همیشگی دارد.این پروتئین به آنزیم cas9 متصل شده و از طریق دومین c-terminal خود این آنزیم را مهار میکند. دومین N-terminal این باکتری ، یک مهارگر مهم رونویسی پروموتر anti-CRISPR است. در زمان ایجاد آلودگی توسط فاژ ، رونویسی anti-CRISPR با سرعت زیادی انجام می‌شود که می‌تواند به یکسری فیدبک‌های منفی منجر شود.در صورتی که مصونیت CRISPR وجود نداشته باشد ، acrIIA1 با دومین N-terminal خود باعث بهینه شدن تقسیم فاژی می‌شود. در صورت وجود مصونیت CRISPR ، پروتئین acrIIA1 از ساختار دو دومین خود به عنوان سنسور cas9 استفاده می‌کند و بیان acr را بر اساس سطح cas9 تنظیم می‌کند.(۸)

۲- دومین مورد پروتئین AcrID1 می‌باشد که مصونیت حاصل از I-D CRISPR-Cas مهار می‌کند و این کار به وسیله‌ی واکنش مستقیم با زیرواحد بزرگ Cas10d کمپلکس افکتور انجام می‌شود. (۶)

۳- مورد سوم ، پروتئین AcrIIIB1 است که می‌تواند مصونیت حاصل از III-B CRISPR-Cas را توسط مکانیسم تداخل با ژن‌های هدف مهار کند.(۶)

۴-مورد چهارم ، پروتئین AcrIIA6 می‌باشد که به آنزیم cas9 باکتری Streptococcus thermophilus متصل شده و به عنوان یک مهارگر آلوستریک عمل می کند.

۵-مورد پنجم ، پروتئین AcrIIA5 است و همه‌ی همولوگ‌های CRISPR-Cas9را که به منظور دستکاری ژنتیکی مورد استفاده قرار می‌گیرد ، تخریب می‌کند. همانطور که اشاره کردیم ، یکی از روش‌های کنترل CRISPR-cas9 استفاده از arcها می‌باشد. با استفاده از این پروتئین‌ها امکان کنترل فعالسازی ژن‌ها (CRISPRa) و تداخل ژن‌ها (CRISPRi) در سلول‌های مخمر و پستانداران شده است. همچنین پروتئین‌های مذکور باعث کاهش سمیت CRISPR-Cas9 انتقال‌یافته با وکتور آدنوویروسی به سلول‌های بنیادی انسانی شده‌اند. پروتئین‌های cas9 بیشترین استفاده را در مهندسی ژنتیک دارند. Cas9 شامل دو گروه است. II-A Cas9 که از باکتری‌های Streptococcus pyogenes و Streptococcus pyogenes منشا گرفته‌اند و همچنین II-C Cas9 که از باکتری‌های Neisseria meningitidis و Campylobacter jejuni مشتق شده‌اند. این گروه‌ها در اختصاصیت توالی PAM ، اندازه و فعالیت off-target متفاوت‌اند. در تحقیقات نشان داده شده است که AcrIIA5 تولید شده توسط فاژ ۴۲۷۶D (آلوده‌کننده‌ی Streptococcus thermophilus) گسترده‌ترین فعالیت مهارکنندگی آنزیم‌های مورد استفاده در مهندسی ژنتیک را داشته‌است.(۹)

بحث:

به منظور توسعه‌ی کاربرد acrها ، شناسایی گونه‌های جدیدتر آن‌ها دارای اهمیت زیادی است. مهم‌ترین روش برای شناسایی arcها ، استفاده از ژن‌های aca می‌باشد. اکثر ژن‌های acr در در مجاورت ژن‌های anti CRISPR associated یا aca هستند. ژن‌های aca ،پروتئین‌هایی تولید می‌کنند که دارای یک موتیف helix-turn-helix متصل‌شونده به DNA است. ژن‌های حفاظت شده‌ی aca به عنوان راهنمایی به منظور شناسایی ژن‌های acr محسوب می‌شوند.(۹)

لازم به ذکر است که از ماشین لرنینگ نیز برای شناسایی acrها استفاده شده‌است. در سال‌های اخیر، تکنولوژی ماشین لرنینگ دریچه های جدیدی را در زمینه‌های مختلف به خصوص در علوم زیستی گشوده است و نوید یک آینده‌ی روشن را می‌دهد . در سال ۲۰۲۰ با محققان با استفاده از یادگیری ماشین ابزار AcRanker را به منظور شناسایی acrهای بالقوه طراحی نمودند. (۱۰) این ابزار در چند مورد شناسایی ، موفقیت‌هایی داشته است ، اما نیازمند توسعه و بهبود بیشتری می‌باشد.

استفاده از arc ها باعث افزایش کیفیت دستکاری‌های ژنومی مبتنی روش کریسپر می‌شود همچنین می‌تواند منجر به افزایش ایمنی در درمان های مبتنی بر کریسپر شود.(۱۱) از این رو شناسایی انواع مختلف آن‌ها اهمیت ویژه‌ای دارد. از طرفی به دلیل اینکه این پروتئین‌ها به تازگی کشف شده اند ، هنوز بسیاری از ابعاد آن ها ناشناخته مانده است. تاکنون ، علت تنوع گسترده‌ی این پروتئین‌ها و چگونگی تشکیل آن‌ها ، به طور دقیقی مشخص نشده‌است . همچنینarc ها ویژگی ساختاری و توالی مشخصی ندارند . به همین دلیل دانشمندان ، احتمال می‌دهند که arcها ممکن است حاصل تکامل denovo باشند . اما هنوز نحوه‌ی تکامل acrها ناشناخته مانده‌است . (۱۲) بنابراین تحقیقات بیشتری در این زمینه نیاز است . با توجه به مزایای acrها می‌توان در آینده از آن‌ها ، به عنوان یک عامل مهم درمان بیماری‌ها ، بهره برد.

منابع:

1- Van Gent, Michiel & Gack, Michaela. (2018). “ Viral Anti-CRISPR Tactics: No Success without Sacrifice”. Immunity. 49. 391-393.

2 - Zhu, Yalan & Gao, Ang & Zhan, Qi & Wang, Yong & Feng, Han & Liu, Songqing & Gao, Guangxia & Serganov, Alexander & Gao, Pu. (2019). “Diverse Mechanisms of CRISPR-Cas9 Inhibition by Type IIC Anti-CRISPR Proteins”. Molecular Cell. 74.

3 - Lee SY, Kim GE, Kim YG, Park HH. (2020) “ A 1.3 Å high-resolution crystal structure of an anti-CRISPR protein, AcrI E2”. Biochem Biophys Res Commun. 25:S0006-291X(20)31814-3.

4- Stanley SY, Borges AL, Chen KH, et al.(2019) “Anti-CRISPR-Associated Proteins Are Crucial Repressors of Anti-CRISPR Transcription”. Cell.178(6):1452-1464.e13.

5- Zhang, F, Song, G, Tian, Y. (2019) “Anti-CRISPRs: The natural inhibitors for CRISPR-Cas systems”. Animal Model Exp Med. 2: 69– 75.

6- Peng, Xu & Mayo Muñoz, David & Bhoobalan, Yuvaraj & Martínez-Álvarez, Laura. (2020). “Anti-CRISPR Proteins in Archaea”. Trends in Microbiology.

7- Liang Liu, Maolu Yin, Min Wang, Yanli Wang.(2019) “Phage AcrIIA2 DNA Mimicry: Structural Basis of the CRISPR and Anti-CRISPR Arms Race “.Molecular Cell .Volume 73, Issue 3. Pages 611-620.e3,

8- Osuna, Beatriz & Karambelkar, Shweta & Mahendra, Caroline & Sarbach, Anne & Johnson, Matthew & Kilcher, Samuel & Bondy-Denomy, Joe. (2020). “Critical Anti-CRISPR Locus Repression by a Bi-functional Cas9 Inhibitor”. Cell Host & Microbe. 28. .

9- Garcia B, Lee J, Edraki A, et al. (2019) “Anti-CRISPR AcrIIA5 Potently Inhibits All Cas9 Homologs Used for Genome Editing”. Cell Rep.29(7):1739-1746.e5.

10- Simon Eitzinger, Amina Asif, Kyle E Watters, Anthony T Iavarone, Gavin J Knott, Jennifer A Doudna, Fayyaz ul Amir Afsar Minhas, Machine learning predicts new anti-CRISPR proteins, Nucleic Acids Research, Volume 48, Issue 9, 21 May 2020, Pages 4698–4708

11- Chevallereau, Anne & Meaden, Sean & Fradet, Olivier & Landsberger, Mariann & Maestri, Alice & Biswas, Ambarish & Gandon, Sylvain & Houte, Stineke & Westra, Edze. (2019). “Exploitation of the Cooperative Behaviors of Anti-CRISPR Phages”. Cell Host & Microbe. 27.

12-Liu, Q., Zhang, H. and Huang, X. (2020), “Anti-CRISPR proteins targeting the CRISPR-Cas system enrich the toolkit for genetic engineering”. FEBS J, 287: 626-644.