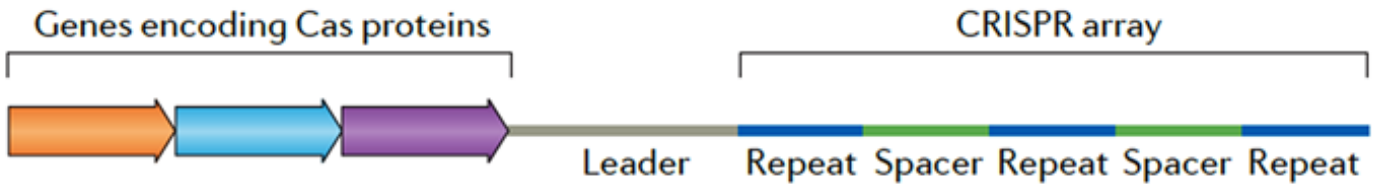
CRISPR/Cas system

(clustered regularly interspaced short palindromic repeats)

این سیستم که در سال 1987 توسط ژاپنی ها کشف شد ، مشابه سیستم ایمنی در باکتریها و آرکئی ها عمل میکند و با تشکیل حافظه بیولوژِک انها را در برابر پاتوژنها (فاژها و پلازمیدها) ایمن میسازد .توالی ژنی سیستم CRISPR/Cas شامل سه قسمت میباشد:

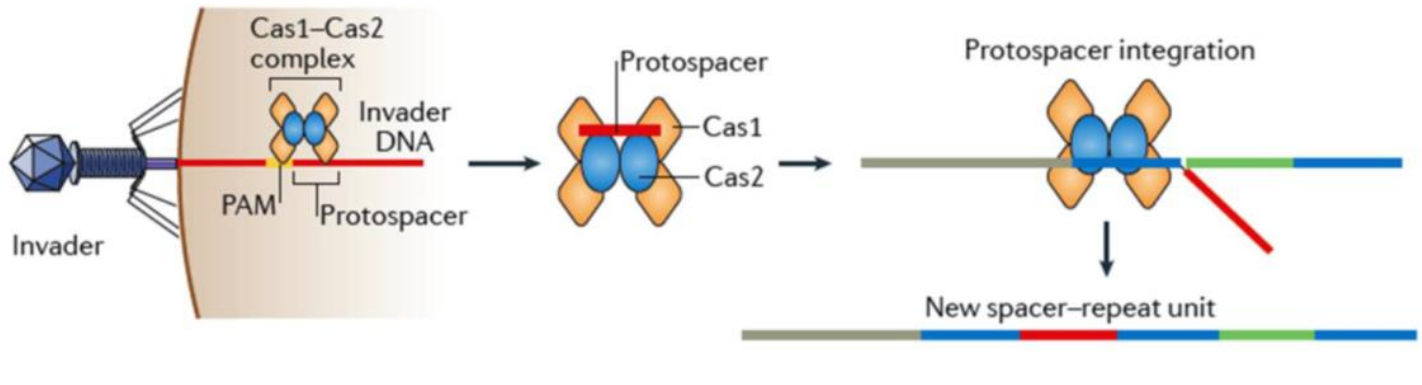
1) CRISPR array ارایه کریسپر : شامل توایهای تکراری پالیندرمی repeat که توسط نواحی Spacer از هم جدا شده اند.
2) leader sequence توالی راهنما: شامل پروموتور رونویسی عناصر تکراری پالیندرمی repeat است.
3) توالی کدکننده پروتئین های Cas (نوکلئازهای Cas)



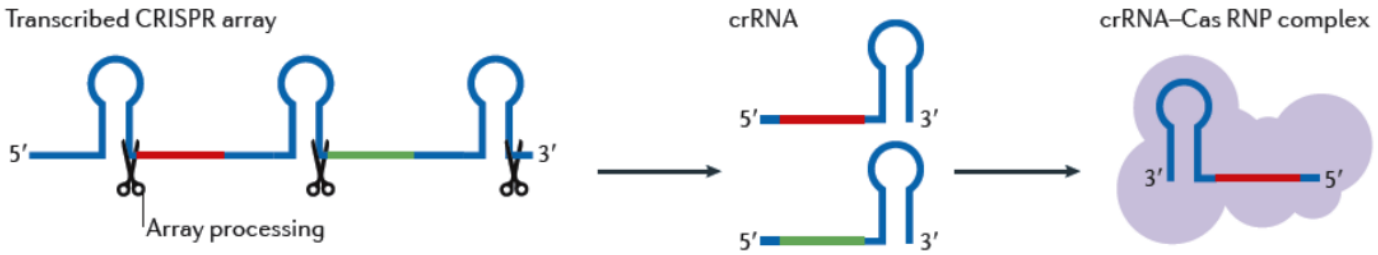
مکانیسم عمل سیستم CRISPR/Cas :

مکانیسم عمل سیستم CRISPR/Casشامل سه مرحله میباشد:

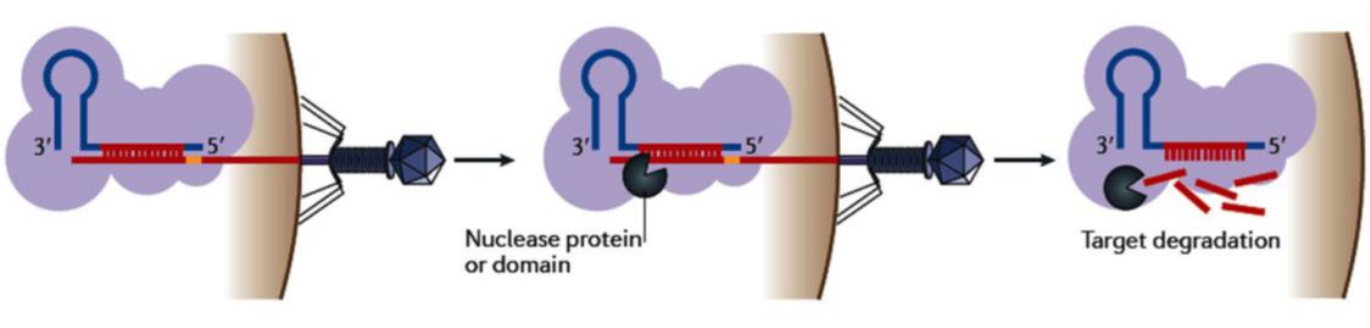
1- Adaptation :در مرحله انطباق کمپلکس Cas1/Cas2 براساس موتیف PAM سکانس Protospacer را در ژنوم پاتوژن شناسایی و برش زده ودر ارایه کریسپر (بین اولین ناحیه تکراری و سکانس راهنما) درج میکنند.



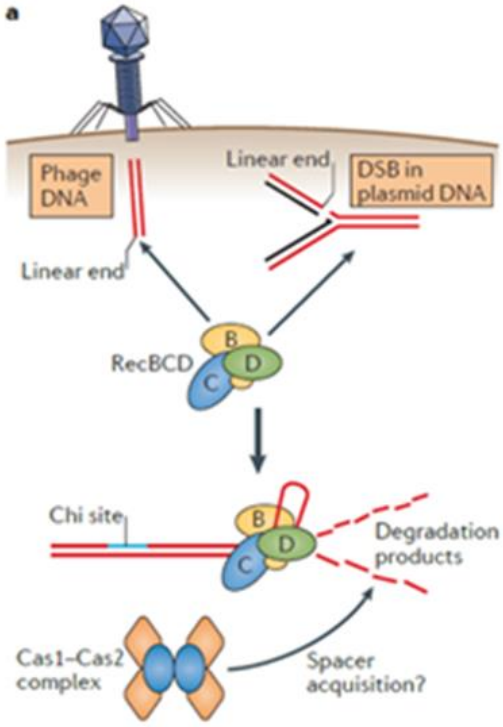
2- expression and maturation :درمرحله بیان و بلوغ ارایه کریسپر رونویسی میشود و پس از پردازش منجر به ایجاد crRNA ها میشود .



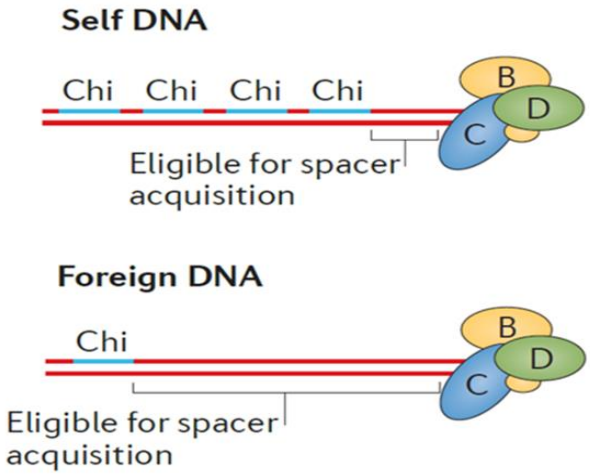
3- Interference : در مرحله تداخل crRNA و پروتین Cas تشکیل کمپلکس پروتئینی Cas–crRNAداده و سلول را بمنظور یافتن توالی همولوگ با crRNA جستجو میکنند .از انجا که crRNA از پاتوژن مشخص جدا ،درج و رونویسی شده بود طبیعتا مکمل توالی از همان فاژ اولیه میباشد (حافظه ایمنی) و هنگامی که به توالی مکملش متصل شد نوکلئاز Cas شروع به تخریب ژنوم فاژ میکند.



چگونه باکتری **DNA** خودی را از **DNA** بیگانه تشخیص میدهد؟



سیستم RecBCD در باکتریها مسئول ترمیم شکست های دو رشته ای DNA است. این سیستم انتهای خطی فاژ یا شکست دو رشته در پلازمید همگام همانندسازی را مشابه شکست دو رشته ای DNA خودی در نظر میگیرد و تارسیدن به توالیهای مشخصی بنام CHI دو رشته DNA را تخریب میکند . محصول این تخریب سوبستراهای لازم برای انتخاب Spacer را در اختیار کمپلکس Cas1/Cas2 قرار میدهد.



مسئله این است توالی های CHI در پاتوژن ها فاصله بسیار زیادی از هم دارند و طول ناحیه تخریبی در انها بیشتر است و سوبسترای زیادی در اختیار Cas1/Cas2 برای یافتن Spacer قرار میگیرد. در حالی که فاصله CHI ها در ژنوم باکتریها بسیار نزدیک بوده و محصول تخریب توسط RecBCD بسیار کم است و سوبسترای زیادی در اختیار Cas1/Cas2 برای یافتن Spacer قرار نمیگیرد

Anti-CRISPR Proteins

پروتئین های آنتی کریسپر که ابتدا در برخی فاژهای سودوموناس شناسایی شدند ، مانع عمکرد سیستم کریسپر در باکتریها میشوند. تا کنون پنج خانواده انتی کریسپر پروتیین در سیستم I-F و چهار خانواده انتی کریسپر پروتیین در سیستم I-E شناسایی شده اند. انواع پروتیین های انتی کریسپر مکانیسم عمل متفاوتی دارند .برخی مانع اتصال crRNA به توالی هدف میشوند و برخی با اتصال به پروتئین Cas مانع عمکرد نوکلئازی ان میشوند.

Classification

بر اساس نوع پروتئین Cas که با crRNA تشکیل کمپلکس میدهد، سیستم CRISPR/Cas به 3 تایپ و10 ساپ تایپ تقسیم میشود. در تمام این سه تایپ Cas1/Cas2 مشترک بوده و مسئول جداسازی و درج Spacer میباشد .ولی نوکلئازCas که با crRNA درمرحله تداخل کمپلکس تشکیل میدهد و شروع به تخریب ژنوم فاژ میکند در هر تایپ متفاوت است .

Type I (Cas3.Cas1.Cas2.Cas5.Cas6.Cas7)

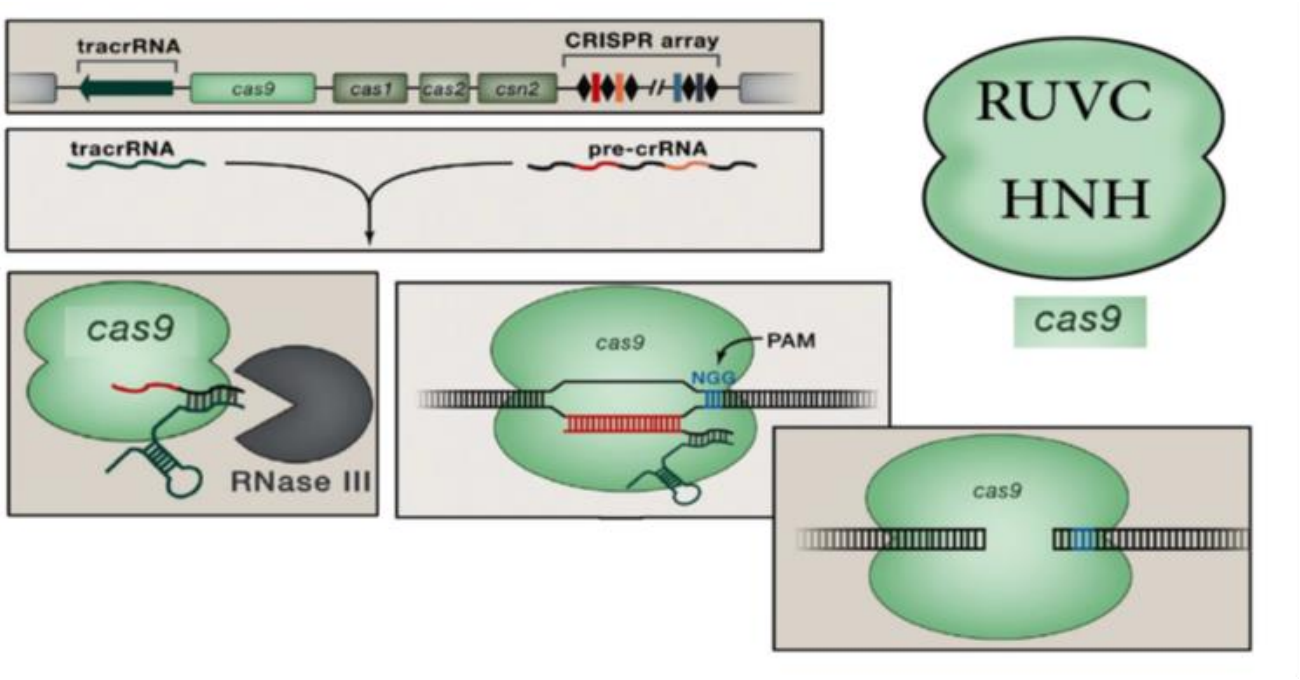
Type II(Cas9.Cas1.Cas2.Csn2)

Type III(Cas10.Cas6.Cas1.Cas2)

تمام انواع سیستم های CRISPR/Cas تنها DNAرا هدف تخریب قرار میدهند بجز ساب تایپ 3B که میتواند RNA را هدف تخریب قرار دهد. از انجا که در تمام این سه تایپ Cas1/Cas2 مشترک بوده و مسئول جداسازی و درج Spacer میباشد . مرحله انطباق در هر سه سیتم مشابه است اما مراحل بیان و بلوغcrRNA و تداخل در هر سه متفاوت میباشد. در تایپ 1و3 نوکلئاز اصلی Cas در مرحله تداخل کمپلکسی چند پروتئینی است اما در تایپ 2 نوکلئاز اصلیCas9 بوده و برای استفاده در سیستم های ویرایش ژنوم ، نوکلئاز Cas9 این مزیت را دارد که یک پروتئین با دمین های عملکردی مختلف میباشد.

Type II CRISPR-Cas9 System

تایپ 2 سیستم CRISPR/Cas تنها در باکترها موجود میباشد و نوکلئاز مرحله تداخل دراین تایپ نوکلئاز Cas9 میباشد.Cas9 شامل دو دمین RUVC و HNH میباشد که هرکدام مسئول برش یکی از رشته های DNAدورشته ای است.در تایپ 2بالادست اپرون Cas توالی ترنس با ارایه کریسپر بنام tracrRNA قراردارد.پس از رونویسی tracrRNA با بخشی از crRNA جفت میشود و با Cas9 بمنظور جستجوی توالی مکمل با Spacer کمپلکس تشکیل میدهد .و سپسCas9 دورشته DNA هدف را 3 جفت باز بالادست ناحیه PAM برش میزند(برش بسیار دقیق و اختصاصی)



modifications of Cas9

با تغییر در دمین های مختلف Cas9 انواع مختلف Cas9 ایجاد شد که در ویرایش ژنوم کاربرد دارند.

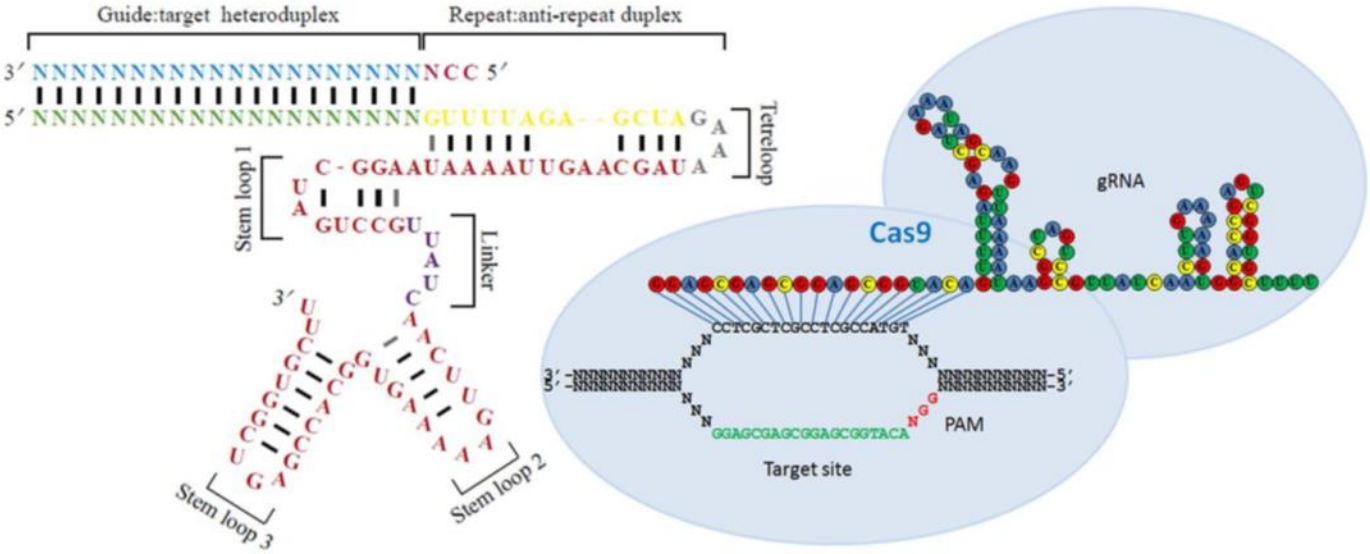
WT Cas9 : نوع وحشی Cas9 که امکان اتصال و برش هردو رشته DNA را دارد.

Cas9 nicknase : یکی از دمین ها ی Cas9 خاصیت برش دهندگی را از دست میدهد.بنابرین فقط یک دمین ایجاد برش در یک رشته از دو رشته DNA را میکند و ایجاد Nick میکند.

Dead Cas9 : هر دو دمین Cas9 خاصیت برشی را از دست میدهند و تنها امکان شناسایی و اتصال به توالی مشخص DNA را دارند و قادر به برش نخواند بود.

structure of sgRNA

در سال 2012 جنیفر دودنا و همکارانش بر اسال توالی crRNA و tracrRNA سکانسی مشابه را در ازمایشگاه سنتز کردند و به جای توالی spacer توالی همولوگ با ناحیه هدف مورد نظر درDNA را قراردادند و دو توالی سنتز شده crRNA وtracrRNA را با لینکر به هم متصل کردند و ان راsgRNA (RNAراهنمای تک رشته) نام نهادند. sgRNA با پروتئین Cas9 تشکیل کمپلکس داده و پس از لینک شدن با توالی هدف بصرت کاملا اختصاصی ناحیه هدف را برش میزند. بدین ترتیب امکان استفاده از CRISPR-Cas9 System در ویرایش ژنوم سایر موجودات از جمله انسان فراهم شد.



سنتز gRNA و Cas9 بسته به نوع کاربرد بر اساس دو روش صورت میگیرد :

1- سنتز gRNA بعنوان MRNA

2- یا سنتز gRNA وCas9 در پلازمید

راه های انتقال gRNA و Cas9 به سلول هدف:

Lipofection

Electroporation

Lentiviral transduction

(AAV) adeno-associated virus