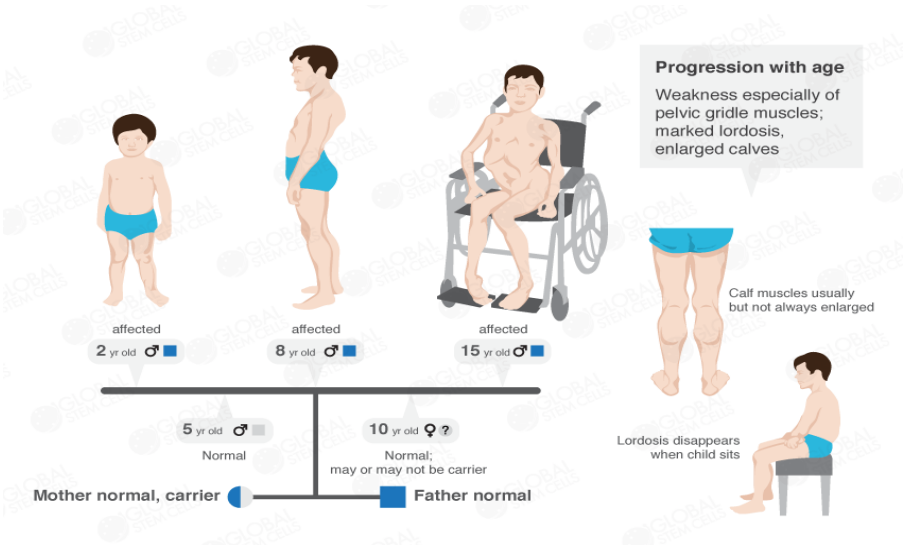
انجمن حمایت از
مبتلایان به دیستروفی
IRAN MUSCULAR DYSTROPHY ASSOCIATION

تکنیک کریسپر: راهی برای درمان بیماری دیستروفی عضلانی

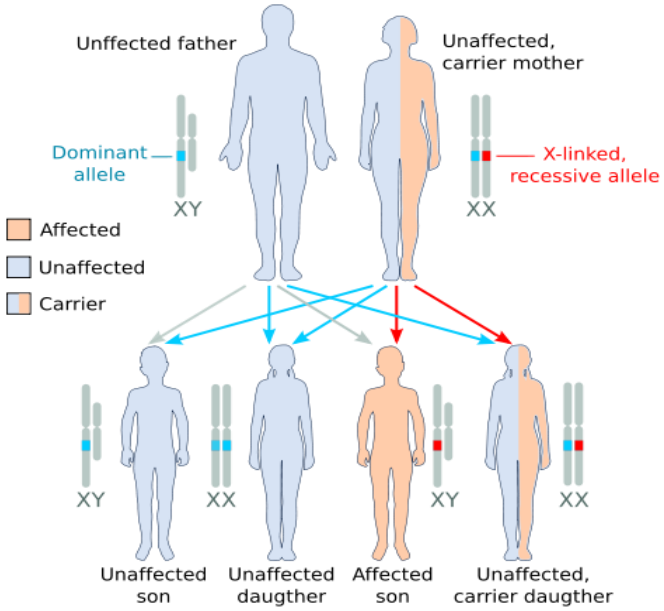
دیستروفی عضلانی دوشن و بکر که تحلیل عضلانی شدید و پیشرونده است که گاهی با نام دیستروفی های XP۲۱ نامیده می شود و نرخ بروز آن حدود ۱/۵۰۰۰ در بچه های تازه متولد شده پسر می باشد و علت نامگذاری آن ناشی از جهش های ژن دیستروفین در این لکوس است . دیستروفی عضلانی دوشن که به اختصار DMD نامیده می شود شایع ترین نوع دیستروفی عضلانی بوده و نوع بکر که به اختصار BMD نامیده می شود از آن خفیف تر است . هردونوع DMD و BMD دارای توارث وابسته به X مغلوب هستند .



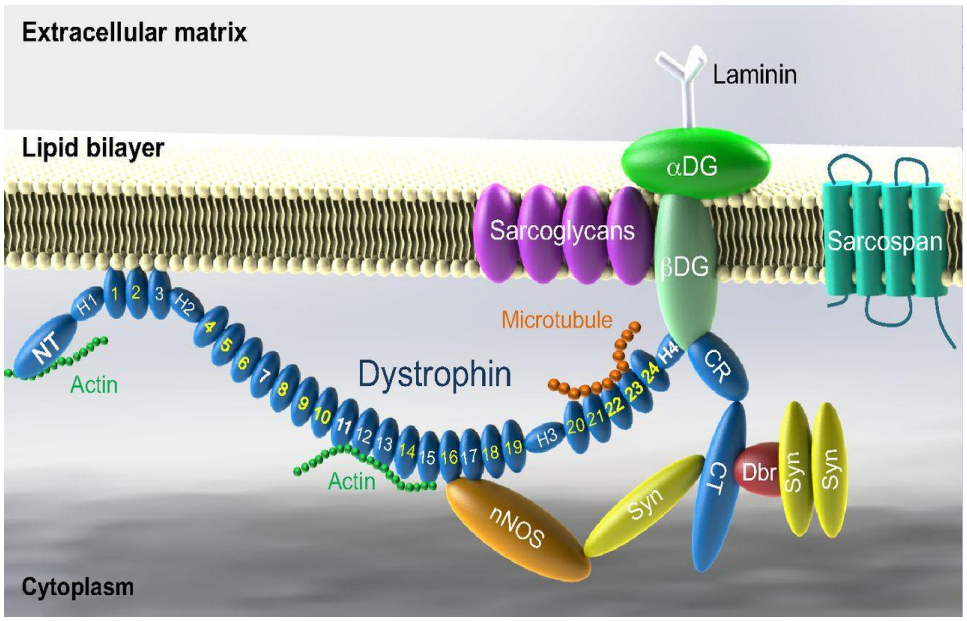
ژن دیستروفین از بعد مولکولی ژن بزرگی است که واجد ۷۹ اگزون و DNA ژنومی آن حاوی ۲/۳ میلیون جفت باز طول دارد ولی نکته جالب توجه آن است که فقط ۱۴ کیلوباز از آن به یک mRNA بالغ رونویسی می شود . رونویسی در مغز و ماهیچه ها انجام می شود که توضیح دهنده این است که چرا پسران مبتلا به DMD دارای مشکلات یادگیری هستند و اندازه بزرگ ژن نیز ممکن است توجیه کننده نرخ بالای جهش آن باشد .

این حذف ها در هرمکانی از ژن دیستروفین می توانند رخ دهند که حدود ۲/۳ جهش های دیستروفین را شامل شده و منحصرا در میوز مادری طی پدیده کراسینگ اور نابرابر رخ داده است . یافته ها حاوی از آن است که جهش های حذفی بیشتر در ۲۰ اگزون اول و درحوالی اگزونهای ۴۵ تا ۵۳ می باشند . یکی از این نقاط حذف

در اینترون ۷ است . جهش حذفی در مبتلایان DMD معمولا سبب می شود که قاب خواندن در ترجمه مختل شود اما در نوع BMD حذف های ایجاد شده معمولا باعث تغییر در قاب خواندن نمی شود .

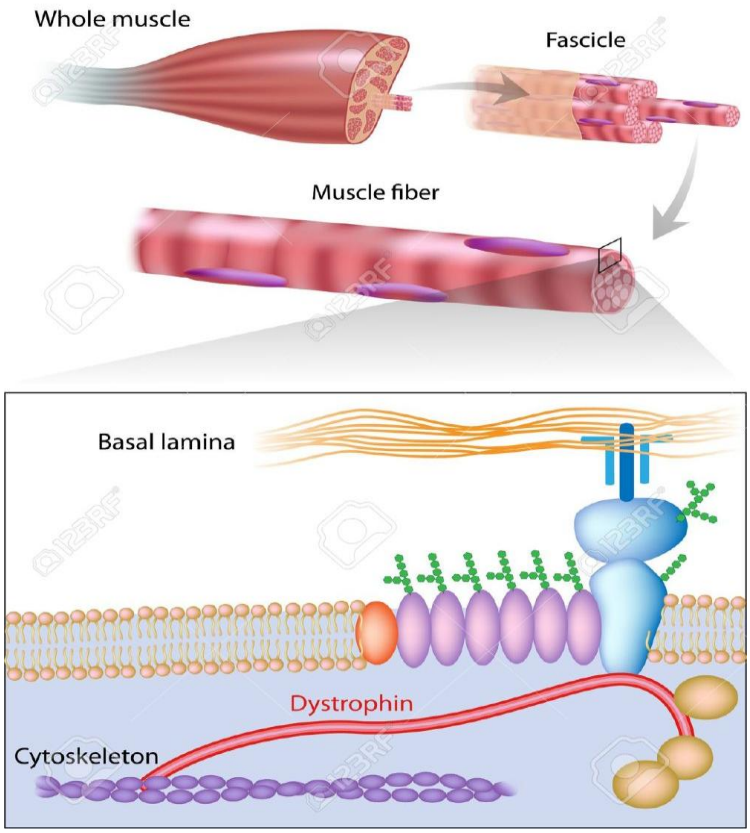


دیستروفین از طریق دومین های انتهای کربوکسیل خود به کمپلکس گلیکوپروتینی در غشای سلول ماهیچه ای متصل می شود که این کمپلکس گلیکوپروتینی شامل چندین زیرواحد است .



پروتئین ۴۲۷ کیلودالتونی دیستروفین برای اتصال اکتین به درون سلول به لامینین خارج سلولی در اطراف غشای سلول ماهیچه ای تجمع پیدا می کند . عدم حضور دیستروفین ؛ مانند آنچه در DMD دیده می شود

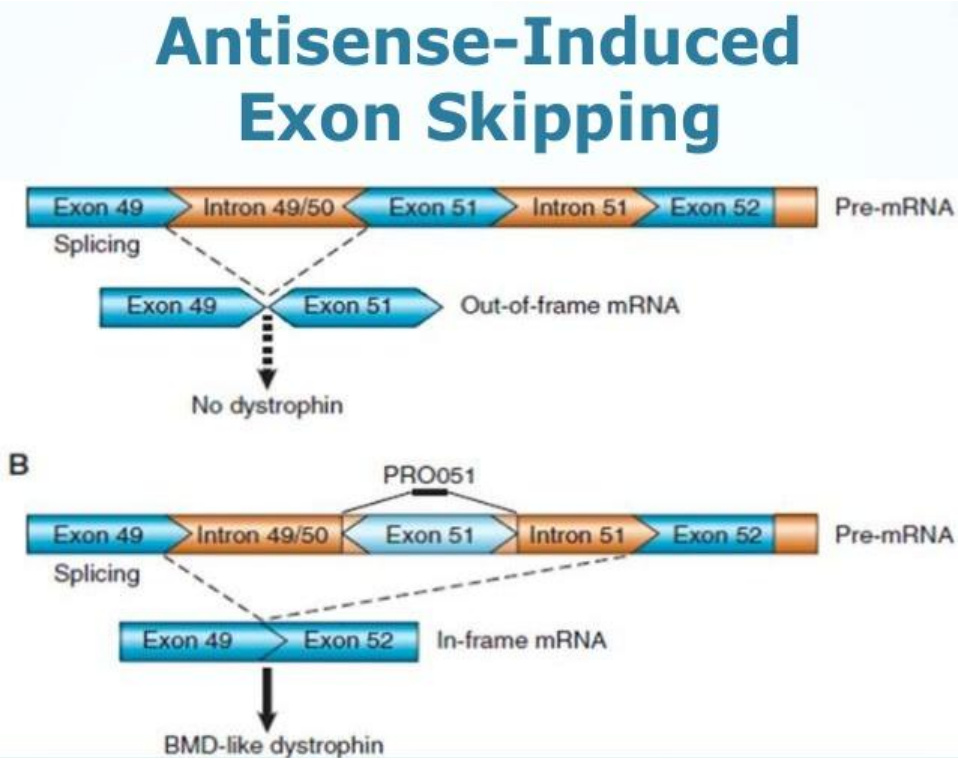
باعث تحلیل تدریجی سلولهای ماهیچه ای می شود . حضور دیستروفین را در نمونه های بیوپسی ماهیچه می توان بوسیله ایمونوفلورسانس ارزیابی کرد . بطوریکه سطوح کمتر از ۳ درصد قابل تشخیص است .
از آنجایی که این بیماری موثر برعضلات قلبی و اسکلتی می باشد چنانچه درمان موثری صورت نگیرد علایم در طی ۱۰ تا ۱۲ سال شدت یافته و منجر به مرگ زودرس در اوایل سنین ۲۰ سالگی بعلت نقص در عملکرد عضله قلبی می شود .



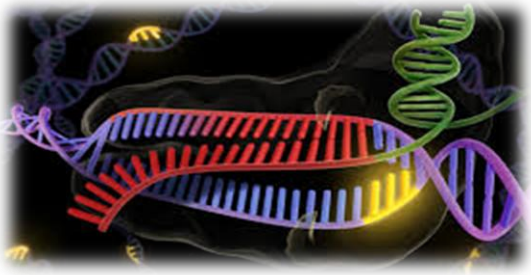
مصرف کورتیکواستروییدها مثل پردنیزون (Prednisone) در این بیماران منجر به تاخیر روند بیماری و حفظ استحکام عضلات در زمان بیشتری می شود اما بعلت اثرات جانبی ؛ مصرف مداوم آن مضر می باشد . ازجمله عوارض جانبی آن می توان افزایش وزن ؛ آب مروارید ؛عدم تحمل گلوکز ؛ ناراحتی معده ؛بروز آکنه و .... را نام برد .
قبل از ابداع آنالیز DNA ؛تشخیص ناقلین برمبنای ترکیبی از اطلاعات شجره نامه وآزمایش کراتین کیناز (ck) سرمی انجام میشد . سطح کراتین کیناز در پسران مبتلا به DMD افزایش شدید دارد .امروزه سنجش سطح ck فقط گاهی مورد استفاده قرار می گیرد . دربعضی شرایط ممکن است DNA فرد مذکر مبتلا درخانواده دردسترس نباشد ؛دراینصورت مطالعات پیوستگی هنوز می تواند مفید واقع شود .
درحال حاضرهیچ درمانی برای DMD و BMD وجود ندارد و از طریق فیزیوتراپی ؛ استفاده از استروییدها و CPAP به مدت چندسال بهبود می یابد .

در سالهای اخیر روشهای ژن درمانی زیادی در موش های طبیعی و ترانس ژنیک صورت گرفته که امیدبخش دستیابی به درمان بوده است شامل :تزریق مستقیم DNA نوترکیب ؛ تزریق میوبلاست ها و ترنسفکشن وکتورهای رترو ویروسی و آدنو ویروسی حامل مینی ژن دیستروفین (که حاوی توالی هایی است که دومین های مهم عملکردی را کد می کند) امتحان شدند .

روش دیگر که تکنولوژی آنتی سنس برای جلوگیری از فعالیت توالی تشدید کننده پیرایش اگزونی (پرش اگزونی) و تولید پروتیین با حذف هایی در چهارچوب که دارای مقداری عملکرد است (یعنی ایجاد فنوتیپ BMD بجای فنوتیپ DMD می باشد) .



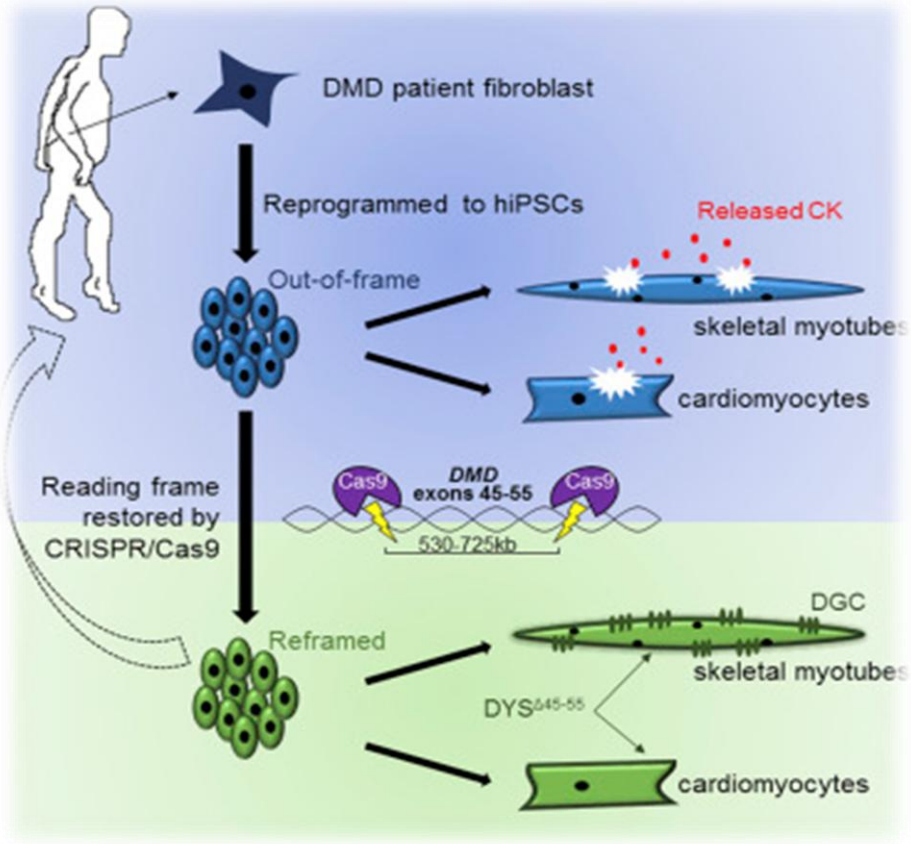
آخرین تکنیک نوید بخش ویرایش ژنی (Gene editing) است که با روش مولکولی بنام CRISPR دارای اهداف مشترکی می باشد و برمبنای توالی RNA عمل می کند که آنزیم Cas۹ را به جایگاه جهش در ژن دیستروفین هدایت می کند . آنزیم Cas۹ اگزون معیوب را برش داده و توالی DNA تعمیر می شود تا نسخه های کوتاهتر اما دارای عملکرد ژن را ایجاد نماید . این روش بهبود چشمگیر عملکرد را در موش هایی نشان داده است که با وکتور ویروسی در چندین جایگاه در عضله تزریق دریافت کرده بود .



تا قبل از روش CRISPR روشهای ویرایش ژنی دیگری بنام های TALEN و Zinc finger وجود داشت که محققان با کمک آن دو روش توانستند با خارج کردن ژن معیوب و یا جهش یافته و یا جایگزینی توالی سالم به اصلاح ژنتیکی در سلولهای بنیادی پرتوان انسانی بپردازند . درحقیقت اصلاح این بیماری حاصل از جهش ژنتیکی توسط نوکلئازها درسلولهای پرتوان انسانی در چندین مورد بیماری مثل کمبود آنتی تریپسین a_1 (توسط Chio و همکارانش در سال ۲۰۱۳) و بتاتالاسمی (توسط Maet و همکارانش در سال ۲۰۱۴) و یکسری بیماریهای دیگر با منشاء ژنتیکی انجام و گزارش شدند .

از آنجایی که بافت هدف بیماریها درطراحی روشهای درمانی ویرایش ژنی بسیار حایزاهمیت است چنانچه اختصاصیت در این روش کم باشد امکان تاثیر برروی بخش های دیگر ژنوم و ایجاد یکسری مشکلات جدید وجود دارد . اختصاصیت بافت هدف به عوامل مختلفی وابسته است از جمله جایگاه هدف ؛ویژگی های دومین های DNA متصل شونده ؛ شرایط اپی ژنتیکی جایگاه هدف و ....

محققانی چون Roussean و همکارانش در سال ۲۰۱۱ و Popplewell و همکاراتش در سال ۲۰۱۳ از تکنیک zinc finger و Rous Seau و همکارانش در سال ۲۰۱۱ و Ousterout و همکارانش در سال ۲۰۱۳ از روش TALEN که نوعی تکنیک های ویرایش ژنی است در سلولهای میوبلاست با واسطه نوکلئازها به ترمیم پروتئین دیستروفین تا حد زیادی نائل آمدند . اگرچه میوبلاست اولیه حاصل شده از این بیماران جهت گسترش کلونال نیاز به ترنسفورماسیون یکسری انکوژنها شبیه hTERT داشت .



ولی در عوض سلولهای بنیادی پرتوان انسانی می توانند بطورمستقیم از این بیماران جداشده و تکثیر و افزایش یابند . در این مقایسه دانشمندان موفق به گزارش اصلاح ژن دیستروفین درسلولهای بنیادی پرتوان مشتق شده از این بیماران به ۳ روش مختلف شدند :

۱ - اختلال در روند پیرایش اگزونی گیرنده یا پرش اگزون ۴۵

۲- شناساندن و معرفی Indel های کوچک و تولید پروتئین هایی با عملکرد درچهارچوب قاب خواندن .

۳ - وارد کردن توالی اگزون ۴۴ که حذف شده بود جهت بازگردانی عملکرد کامل پروتئین مورد نظر .

پس از انجام تمهیدات فوق آنها به بررسی و آنالیز ۱۴ کلونی از این سلولهای بنیادی پرتوان که مورد آزمایش بود پرداختند . نتایج حاکی از اصلاح ژن معیوب تا حد بالا و تولید پروتئین با عملکرد مناسب بود که این نوید بخش شناسایی روش درمانی موثر در آینده ای نزدیک در درمان بیماری دیستروفی و سایر بیماریها با منشاء ژنتیکی می باشد .

کریسپر که مخفف عبارت Clustered Regulary Interspaced Short Palindromic Repeat می باشد به معنای توالی های کوتاه پالیندرومی فاصله دار خوشه ای می باشد . کریسپر نوعی سیستم ایمنی سازگار در باکتریها است که سبب القای مقاومت به محتوای ژنتیکی عوامل بیماریزا و بیگانه می شود .

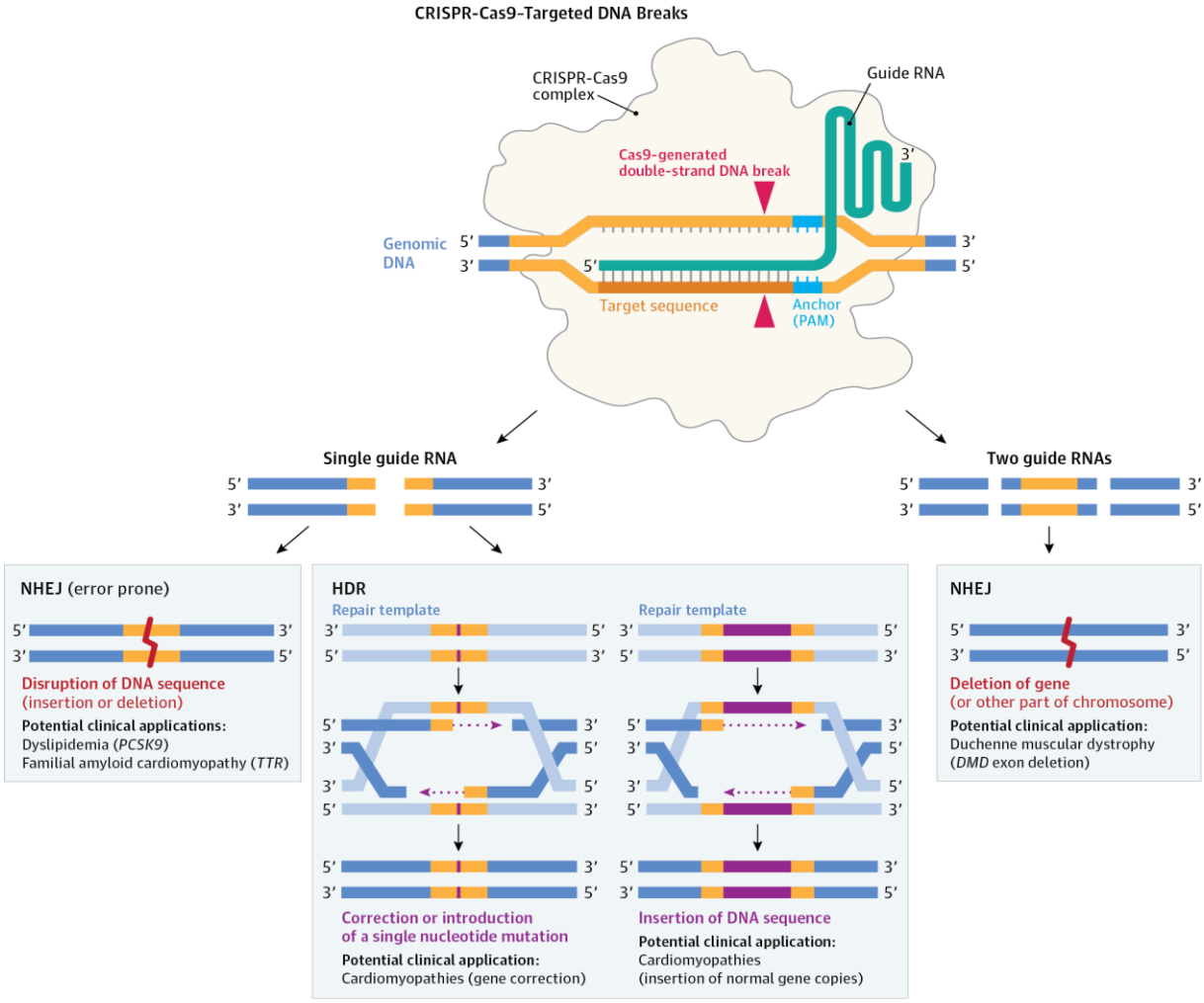
به پروتئین های دخیل در این مکانیسم CRISPR associated protein گفته می شود که نقش ایجاد کننده فاصله بین ژنهای خاص را ایفا می کند .

بخشی از سیستم کریسپر که پروتئینی به نام Cas می باشد قابلیت برش DNA مورد نظر ما را دارد . این پروتئین انواع مختلفی دارد که Cas۹ بیشتر مورد استفاده قرارگرفته است . Cas۹ در واقع پروتئین با عملکرد آنزیمی است که می توان با توجه به اینکه نقش برش توالی ویژه ای از DNA را دارد آن را نوکلئاز نامید .

فناوری کریسپر به دانشمندان اجازه می دهد که تغییراتی در DNA سلولها ایجاد کنند و این تغییر کاملا اختصاصی و موثر باشد . به زبان ساده تر ؛ کریسپر به معنای بریدن و جداکردن ژن معیوب از ژنوم سلول و گاهی جایگزینی DNA سالم می باشد . این شیوه علاوه بر دقت و اختصاصیت بالا نسبت به به دوروش TALEN و Zinc finger؛ سریعتر و ارزانتر نیز می باشد . به این ترتیب دانشمندان دریافتند که این سیستم به آنها امکان تغییر در هریک از کروموزوم های انسانی بدون نیاز به جهش ژنتیکی را می دهد .

همانطور که گفتیم آنزیم دخیل در این مکانیسم Cas۹ نام دارد که می تواند بخش های از DNA را شناسایی و قطع کند لذا تکه های DNA جدید مورد نظر در آن ناحیه قرارگرفته و یا حذف می شود . تکه های از RNA که آنها را gRNA (RNA راهنما) می نامند از بخش های ویژه ای ساخته شده اند . بدینصورت که ابتدا یک RNA با آرایش از پیش طراحی شده در داخل یک داربست از جنس RNA قرار می گیرد . این داربست RNA با بخش خاصی از DNA کمپلکس تشکیل داده و سپس بخش از پیش طراحی شده آن سبب فراخوانی آنزیم Cas می شود برهمین اساس درست در نقطه صحیح برش می خورد .

RNA راهنما بدین صورت مهندسی شده است که می تواند با توالی خاصی از بازهای DNA میزبان مکمل شود .

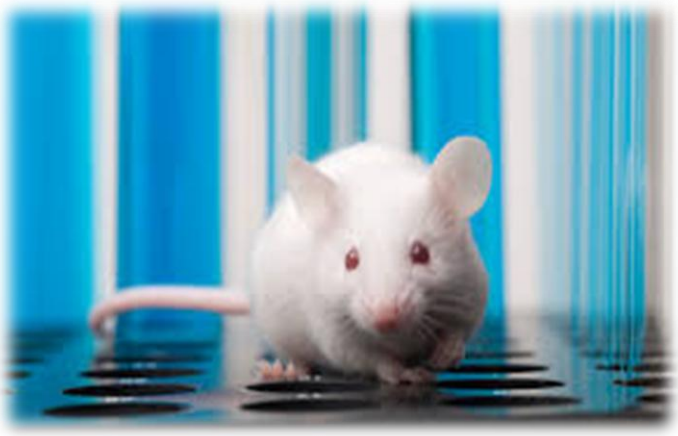


بعبارتی طراحی خاصی در راستای هدف به ناحیه خاصی از DNA است . هنگامی که Cas۹ به DNA متصل می شود و آن را برش می دهد ؛سیستم ترمیم وارد فرایند می شود و درصدد رفع آن برمی آید . درنیجه بواسطه ترمیم ایجاد شده سیستم شناسایی خود را اصلاح کرده و ایراد ژنتیکی برطرف می شود .

از فن آوری کریسپر می توان در آینده نزدیک برای درمان موارد متعددی مانند بیماریهای ژنتیکی مانند انواع سرطان ها ؛هپاتیت B و ALS و حتی کلسترول بالا و ... استفاده کرد . بسیاری از موارد عنوان شده برای کاربرد این فن آوری اصلاح و دستکاری محتوای ژنوم سلولهای سوماتیک است اما از موارد ویژه ای که به آن توجه خاصی معطوف شده است می توان به ویراش محتوای ژنتیکی رده های جنینی و نیز سلولهای زایا اشاره کرد . اما با توجه به اینکه هر تغییری در محتوای ژنتیکی سلولهای زایا می تواند از نسلی به نسل دیگر انتقال یابد این دستکاری با منع اخلاقی توام است .

امروزه محققین با استفاده از این تکنیک کریسپر توانستند به موفقیت جدیدی جهت درمان دیستروفی عضلانی در موش ها برسند . به تازگی سه گروه تحقیقاتی در نشریه Science اعلام نمودند که با استفاده از کریسپر؛ ژن معیوب در موش های دارای دیستروفی عضلانی دوشن (DMD) را حذف کرده و از این طریق به حیوانات

این امکان را داده اند که بتوانند یکی از پروتئین های اساسی در عضلات را تولید نمایند . این مورد ؛ اولین موفقیت کریسپر در درمان جانوران بالغ دارای بیماری ژنتیکی است .



قبلا اصلاح ژن معیوب در بیماری دیستروفی در بیمارانی که بیماری را از قبل داشته اند ؛ غیرممکن بنظر می رسید چرا که سلولهای عضلانی بالغ عموما تقسیم نمی شوند . اما با کمک کریسپر این امکان امروزه حاصل آمده است که اگزون اشتباه حذف و درنتیجه نسخه کوتاه تری از دیستروفین و به مانند نسخه طبیعی آن تولید شود . برهمین اساس محققان RNA راهنمای کریسپر و Cas۹ را توسط حامل آدنوویروس بی خطر ؛ به درون سلولهای عضلانی موش ها انتقال دادند و با استفاده از سیستم کریسپر ؛اگزون اشتباه را حذف نمودند . البته این روش نیاز به آزمایشات بیشتر دارد و این تحقیقات امیدبخش یافتن روشهای درمانی مناسب درآینده ای نزدیک است .

نویسنده: رابعه موقرنیا

References:

۱. Nat Commun. | Author manuscript | available in PMC ۲۰۱۵ August ۱۸
۲. Cell Research | Vol ۲۶ No ۵ | May ۲۰۱۶

هرگونه کپی برداری از این مقاله با ذکر منبع و نویسنده مجاز می باشد.