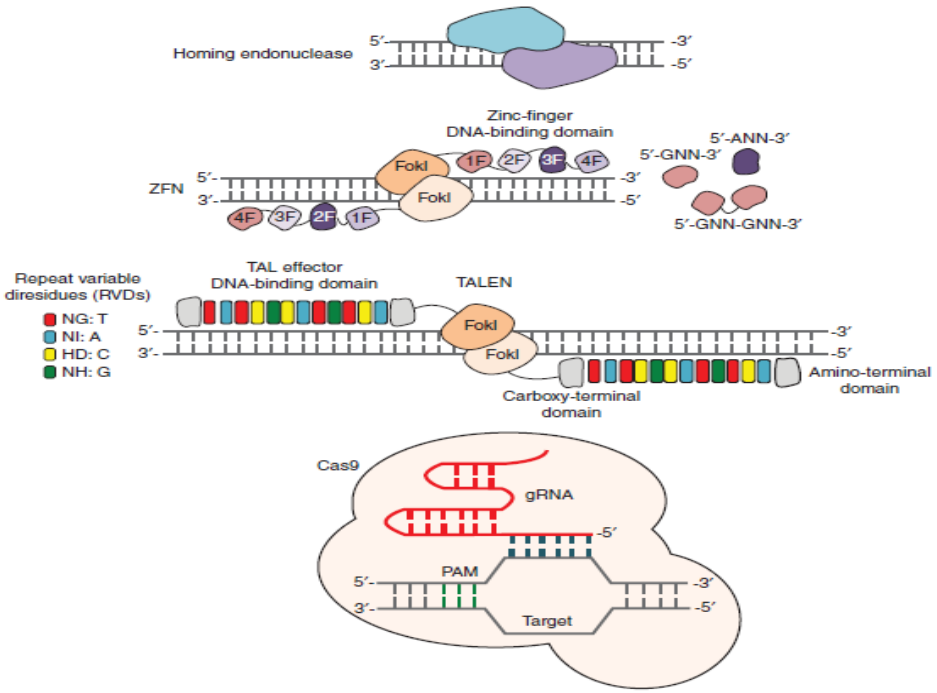
سارا کبیرنتاج
s.nataj@takato.ir
کارشناس تحقیقات بیوتکنولوژی مرکز تحقیقات کاربردی و تولید بذر، شرکت توسعه کشت دانه‌های روغنی

مهندسی ژنوم (بخش اول)

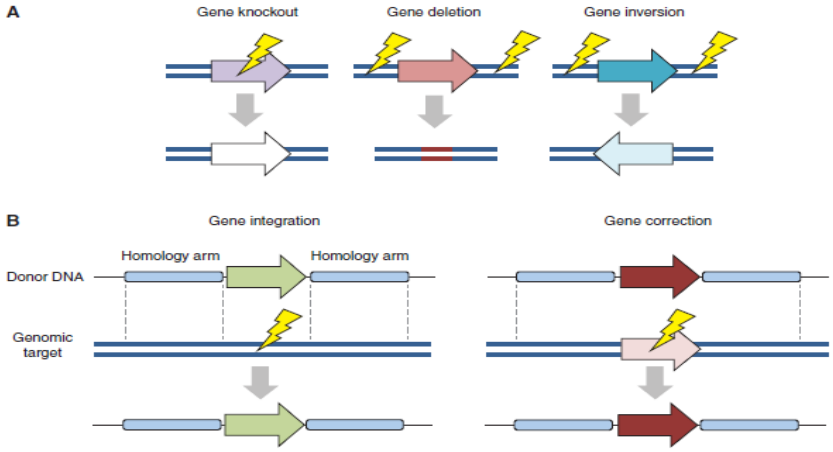
Genome engineering (Part ۱)

در سال‌های اخیر، ظهور فناوری‌های بسیار متنوع ویرایش ژنوم این توانایی را برای محققان ایجاد کرده است که با سرعت بالا و هزینه پایین تغییرات مشخصی را در توالی‌های خاص در ژنوم انواع سلول‌ها و ارگانیسم‌ها ایجاد کنند. فناوری‌های اصلی که امروزه به طور معمول برای تسهیل ویرایش ژنوم استفاده می‌شود، در شکل ۱ نشان داده شده است: (۱) homing endonucleases یا مگا نوکلئازها، (۲) Zinc-Finger Nucleases (ZFNs)، (۳) Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALENs) و (۴) Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)



شکل ۱- فناوری ویرایش ژنوم. به ترتیب از بالا به پایین homing endonucleases، ZFNs، TALENs و CRISPR/Cas۹. Homing endonucleases به طور کلی بسترهای DNA خود را به صورت دیمر می‌شکافند و دارای واحدهای اتصال به DNA و شکاف مجزای آن نیستند. ZFN ها ناحیه هدف را که از دو ناحیه اتصال انگشت روی و یک توالی جدا کننده ۵ تا ۷ جفت باز تشکیل شده‌اند را شناسایی کرده و توسط زیر واحد آنزیمی FokI، برش می‌دهند. TALENsها ناحیه هدف را که از دو ناحیه اتصال TALE و یک توالی جداکننده ۱۲ تا ۲۰ جفت باز تشکیل شده‌اند را شناسایی کرده‌اند و توسط زیر واحد آنزیمی FokI، برش می‌دهند. نوکلئاز Cas۹ توالی‌های DNA مکمل توالی RNA راهنما (gRNA) واقع شده در بالادست ناحیه Protospacer Adjacent Motif (PAM) مورد هدف قرار می‌دهد (Thomas et al, ۲۰۱۶) .

توانایی این ابزارها در اصلاح ژنوم، نتیجه توانایی آنها در ایجاد شکستگی‌های دو رشته‌ای[۱] در DNA است. این شکستگی‌های DNA باعث فعال شدن مسیرهای ترمیم DNA سلولی شده و ایجاد تغییرات ژنومی در مکان خاصی از ژنوم را تسهیل می‌کنند. این فرآیند اغلب برای خاموش کردن ژن از طریق اضافه/حذف شدن تصادفی نوکلئوتید در مکان برش استفاده می‌شود که می‌تواند با مکانیسم ترمیم Nonhomologous End Joining (NHEJ) ایجاد شود و یا در حضور یک الگوی مشابه با محل کروموزومی مورد نظر، وارد شدن قطعه به ژن یا اصلاح آن از طریق ترمیم به روش همسانی Homology-Directed Repair (HDR) رخ دهد. در واقع تطبیق پذیری گسترده آنزیم‌های اصلاح کننده ژنوم به دلیل عملکرد آنها به عنوان فاکتورهای رونویسی سنتتیک است و این امر موجب شده است که قادر به تنظیم بیان تقریباً هر ژنی درون ژنوم باشند.



شکل ۲- نتایج ویرایش ژنوم. نوکلئازهای هدف‌دار باعث ایجاد شکستگی‌های دو رشته‌ای (DSB) در DNA می‌شوند که در پی آن با مکانیسم NHEJ و یا در حضور الگوی اهداکننده و به روش همسانی (HDR) ترمیم می‌شوند. (A) در صورت عدم وجود الگوی اهداکننده، NHEJ منجر به درج یا حذف نوکلئوتید در محل شکست می‌شود که می‌تواند به اختلال در ژن منتهی شود. (B) در حضور DNA دهنده (پلاسمید یا الیگونوکلئوتید تک رشته)، نوترکیبی بین توالی‌های DNA همولوگ موجود در توالی دهنده و یک مکان کروموزومی مشخص می‌تواند ادغام هدفمند را تسهیل کند (Thomas et al, ۲۰۱۶).

مگانوکلئازها

مگا نوکلئازها، نوکلئازهایی طبیعی هستند که در اواخر ۱۹۸۰ کشف شدند. این نوکلئازها توالی‌های وسیعی از ۱۲ تا ۴۰ جفت باز را شناسایی کرده و برش می‌دهند. اگرچه سمیت سلولی این اندونوکلئاز از برخی روش‌های دیگر مانند ZFN کمتر است ولیکن تعداد مکان‌های شناسایی آنها محدود بوده و به طور مناسب و موثری کل ژنوم را پوشش نمی‌دهند. از دیگر معایب مگا نوکلئازها این است که طراحی و سنتز آنزیم‌ها برای توالی‌های هدف پرهزینه و وقت‌گیر است. هر هدف مکانی جدید در مهندسی ژنوم، نیازمند یک مرحله اولیه مهندسی پروتئین برای هر مگانوکلئاز است، بنابراین مگا نوکلئازها برای انجام کار از لحاظ فنی پرچالش هستند.

منبع

Gaj, T., Sirk, S. J., Shui,S. and Liu, J. ۲۰۱۶. Genome-Editing Technologies : Principles and Applications.

[۱] Double-Strand Breaks (DSB)