دومین همایش ملی دانش سلامتی در مواجهه با کرونا
و حکمرانی در جهان پساکرونا
۲۹-۲۸ دیماه ۱۴۰۰ -دانشگاه آزاد اسلامی واحد نجف‌آباد
2nd national conference on health knowledge production,
confronting COVID-19 and governing the post-corona world
18-19Jan,2022

COVID-19 در تشخیص و درمان CRISPR-Cas پتانسیل سیستم

سارا سلطانی تهرانی[۱۵۷]شبنم کرمانی[۲]

۱. دانشجوی سلولی ملکولی، گروه علوم و فناوری های زیستی، دانشکده مهندسی مواد، واحد نجف آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، نجف آباد، ایران

ایمیل: sarahsoltani13777731@gmail.com

۲. استادیار، گروه علوم و فناوری های زیستی، دانشکده مهندسی مواد، واحد نجف آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، نجف آباد، ایران(نویسنده مسئول).

ایمیل: sh_kermany@yahoo.com

چکیده

ساختارهای پروتئینی کریسپر تکرارهای کوتاه پالیندرومیک خوشه ای منظم است و پروتئین مرتبط با آن (CRISPR/Cas) برای اولین بار در سال ۱۹۸۷ در E. coli شناسایی شدند که از سلول های پروکاریوتی در برابر هر گونه پاتوژن مهاجم، مضر و پلاسمیدها با شناسایی و برش محافظت می کردند. چندین رویکرد ویرایش ژنوم بر اساس این مکانیسم ها بکار برده شده است. جدیدترین آنها به عنوان CRISPR/Cas شناخته می شود که توجه زیادی را در جامعه علمی، به ویژه برای تشخیص و درمان بیماری، به خود جلب کرده است، زیرا سریع‌تر، ارزان‌تر و دقیق‌تر از سایر روش‌های ویرایش ژنوم است. گسترش بی سابقه COVID-19 در سراسر جهان، چالش های جدیدی را ایجاد کرده است. شواهد حاصل از جهش‌های ژنی در بیماران خاص و استفاده از CRISPR/Cas می‌تواند به پیش‌بینی برنامه درمانی بهینه برای بیماران کمک کند همچنین تکثیر در کشت سلولی کروناویروس‌ها ،طبقه بندی CRISPR/Cas به عنوان ابزارهای بسیار حساس و انتخابی برای تشخیص ژن های مختلف از اهداف نوآورانه در این تحقیقات است. علاوه بر این، CRISPR/Cas ابزاری برای دستکاری نواحی غیر کدکننده فراهم می‌کند و بنابراین بررسی این مناطق با مشخصه ضعیف ژنوم را تسریع می‌کند و نقشی حیاتی در پیشرفت کتابخانه‌های کل ژنوم ایفا می‌کند.

هدف : بررسی مکانیسم‌های تکنیک‌های CRISPR،به‌عنوان ابزاری برای مطالعه جهش‌های طبیعی و دستکاری‌های ژنومی، و بررسی چگونگی عملکرد CRISPR/Cas دردرمان COVID-19 میباشد.

کلمات کلیدی: CRISPR/Cas,COVID-19,استراتژی‌های درمانی,تشخیص

مقدمه:

بیماری عفونی کروناویروس ناشی از سندرم حاد تنفسی ویروس (SARS-CoV-2) است. COVID-19 اولین بار در اواخر دسامبر ۲۰۱۹ در ووهان چین رخ داد [۱،۲]. در ابتدا، COVID-19 ناشناخته بود و باعث تلفات جانی در مقیاس بزرگ ودرگیری شدید از ابتلا به این بیماری در بسیاری از کشورها شد. از آنجایی که همه‌گیری ویروس کرونا (CoV) در سراسر جهان در حال افزایش است، دانشمندان بر روی توسعه ابزارهای تشخیصی جدید، واکسن‌ها و درمان‌ها تمرکز کرده‌اند. برخی از واکسن‌ها مانند Pfizer-BioTNech (BNT162b2)، Moderna (mRNA-1273)، جانسون و جانسون (JNJ-78436735) Janssen، Astra Zeneca و Covishield آکسفورد و Covaxin Bharath Biotech برای استفاده اضطراری تایید شده‌اند. با این حال، گسترش این ویروس هنوز متوقف نشده است. انواع جهش یافته های جدید مانند B.1.1.7، B.1.1.7.2، B.1.526، و P.1 از CoV ها نگرانی های جدی برای سلامتی، به ویژه در ایران ایجادکرده است. ویروس کرونا خانواده ای از ویروس های RNA تک رشته ای (ssRNA) هستند که بینی، گلو و سینوس ها را آلوده می کنند که منجر به بیماری های عصبی و تنفسی در انسان می شود [۳،۴]. قبل از SARS-CoV-2، شش گونه CoV اصلی دیگر از جمله SARS-CoV و سندرم تنفسی خاورمیانه (MERS-CoV) وجود داشت [۴]. سازمان بهداشت جهانی (WHO) اعلام کرد که COVID-19 یک بیماری عفونی بزرگ برای جهان است [۵]. گزارش های اخیر نشان می دهد که بیش از ۱۶۱ کشور به شدت تحت تأثیر COVID-19 قرار گرفته اند [۵،۶]. بنابراین، دانشمندان مجبور به توسعه واکسن های کارآمد برای جلوگیری از گسترش این جدید SARS-CoV-2 هستند. [۷،۸].

بر اساس ویژگی‌های ژنومی، شرکت‌های بیودارویی از آزمایش‌های تشخیصی یعنی qRT-PCR و(RT-LAMP) برای تأیید SARSCoV-2 استفاده می‌کنند[9]. با این حال، این تکنیک‌های تشخیص با ارائه نتایج منفی کاذب، که به بیماران آلوده اجازه می‌دهد به گسترش ویروس ادامه دهند، آسیب می زند. همچنین به ابزارهای پیچیده و نیروی انسانی ماهر نیاز دارد. از این رو، یک روش تشخیصی آسان، ساده و سریع با دقت برای تشخیص سریع عفونت SARS-CoV-2 ضروری است. [۱۰-۱۲]

دانشمندان شروع به کاوش ابزارهای مولکولی مدرن از جمله سیستم‌های ویرایش ژنوم، به‌ویژه سیستم‌های تکرارهای کوتاه پالیندرومیک (CRISPR) و پروتئین‌های مرتبط با کریسپر (Cas) برای تشخیص سریع SARS-CoV-2 کردند که اخیراً اختراع شده و برنده جایزه نوبل شده است [11,12] استفاده از CRISPR (تکرارهای کوتاه پالیندرومی با فواصل منظم خوشه‌ای) Cas می‌تواند یک رویکرد مؤثر، جدید و جامع برای هدف قرار دادن RNA ویروسی برای تخریب آن باشد [۱۳. ۱۴]و بنابراین، تکثیر ویروس را در سلول‌های میزبان محدود کند و در نتیجه کنترل شود. سیستم CRISPR-Cas به عنوان بخشی از سیستم ایمنی تطبیقی درباکتری‌ها در برابر عفونت‌های ویروسی شناسایی شده است [۴۱]. و کاربردهای آن در انسان بعداً یافت شد [۳۸]. این سیستم ابزاری امیدوارکننده برای توسعه تشخیص‌های جدید و همچنین برای توسعه روش‌های درمانی برای از بین بردن عفونت‌های ویروسی است. یک درمان ضد ویروسی جدید برای درمان بیماران HIV با استفاده از فناوری CRISPR-Cas ایجاد شده است [۲۳] اگرچه در اولین تلاش بیمار را درمان نکرد، اما مشخص شد که درمان بی

خطر است زیرا در طول ۱۹ ماه پیگیری هیچ عارضه جانبی ایجاد نکرد. انواع مختلفی از پروتئین های cas وجود دارد. Cas1، Cas2، Cas3، Cas6، Cas9 و Cas10 [15,16]. در این میان، پروتئین Cas9 سیستم ویرایش ژنوم کارآمد برای هدف قرار دادن DNA دو رشته ای (dsDNA) یا تک رشته ای (ssDNA) دارد. به دنبال پروتئین Cas9، پروتئین های Cas12 و Cas13 در تشخیص بیماری های ویروسی مورد توجه بیشتری قرار می گیرند. پروتئین Cas12 ssDNA و dsDNA را می شکافد، در حالی که پروتئین Cas13 ssRNA را می شکافد. بنابراین، این پروتئین ها نقش مهمی در تشخیص کرونا ویروس ها دارند. در این بررسی، پتانسیل سیستم‌های CRISPR/Cas شامل پروتئین‌های Cas9، Cas12 و Cas13 را که برای تشخیص عفونت SARS-CoV-2 استفاده می‌شوند، خلاصه می‌کنیم.

ویژگی و تشخیص عفونت SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 دارای یک RNA خطی که عفونت های کشنده را به همه موجودات یوکاریوتی منتقل می کند [17]. کروناویروس جدید یا nCoV-۲۰۱۹ یک RNA بتا-کرونا ویروس محصور شده، تک رشته ای است [18,19] که حدود ۲۹,۹ کیلوبایت است و دارای ساختار کلاهکی در انتهای ۵ آن و دم پلی A در انتهای آن پایان ′3 است [20]. مانند سایر کروناویروس‌ها، دارای ژن‌های مشابه ویروسی خاص در تعداد متغیر چارچوب خواندن باز (ORF) است [21,22] که پروتئین‌های حیاتی (23,24) را برای تکثیر ویروسی، نوکلئوکپسید کد می‌کند [25,26]. دو سوم RNA ویروسی که عمدتاً در انتهای ′5در اولین ORF (ORF1a/b) قرار می گیرد، دو پلی پروتئین (PP)، pp1a و pp1b را ترجمه می کند که ۱۶ پروتئین غیر ساختاری (NSP) را کدگذاری می کند [27]. در مقابل، بقیه ORF ها حداقل هشت پروتئین کمکی (ORF3a، ORF6، ORF7a، ORF7b، ORF8، ORF9a، ORF9b، و ORF10) را رمزگذاری می کنند که با پاسخ ایمنی ذاتی میزبان مداخله می کنند [28]. لازم به ذکر است که ارتباطات درون ویروسی پروتئین-پروتئین بین اکثر این پروتئین ها وجود دارد که وضعیت را پیچیده تر از قبل می کند. ژنوم جدید CoV که ۷۹٪ شباهت با SARS-CoV قبلاً شناسایی شده داشت [۲۹،30]. روش آزمایش RT-PCR به عنوان یک روش تشخیص RNA پیام رسان بسیار خاص برای تشخیص حضور CoV استفاده شد [32,31]. آزمایش RT-PCR از رنگ‌های فلورسنت استفاده می‌کند که محققان را قادر می‌سازد تا افراد مشکوک را تشخیص دهند [32]. مراکز کنترل و پیشگیری از بیماری از ایالات متحده پرایمری را توسعه دادند که ژن نوکلئوکپسید ویروسی (N1 و N2) را هدف قرار می دهد، و WHO سنجشی را توسعه داد که ژن RNA پلیمراز وابسته به RNA و ژن E را هدف قرار می دهد [32]. با این حال، RT-PCR به نیروی انسانی ماهر و تجهیزات تخصصی نیاز دارد که سرعت تشخیص بیماری را کاهش می‌دهد. بنابراین، برای تشخیص این عفونت نوظهور به یک روش تشخیصی پیشرفته نیاز است.

سیستم CRISPR/Cas

سیستم CRISPR/Cas یک اندونوکلئاز هدایت‌شده با RNA است ابزاری مبتنی بر تشخیص نوکلئیک اسید که زمینه ژنومیک، اصلاح ژنوم، ژن درمانی و نقشه برداری ژنوم را تغییر داده است [۳۲،۳۳]. پروتئین‌های CRISPR و Cas سیستم‌های ایمنی تطبیقی در برابر باکتری‌ها وآرکی آ باکتری ها هستند [۳۴،۳۵]. جایگاه‌های CRISPR از یک آرایه

CRISPR تشکیل شده‌اند که توسط یک توالی فاصله‌گر منحصر به فرد (۳۰-۴۰ پایه) از هم جدا شده‌اند. در مجاورت آرایه CRISPR، بسیاری از ژن‌های Cas کشف شدند که آنزیم‌های مؤثر سیستم CRISPR را کد می‌کنند. ایمنی با واسطه CRISPR شامل سه مرحله است: (۱) سازگاری، (۲) بلوغ CRISPR RNA (crRNA)، و (۳) تداخل است [۳۶]. سیستم CRISPR/Cas بر اساس ترکیب کمپلکس تداخل به دو کلاس تقسیم می‌شود، یعنی کلاس ۱ که شامل انواع I، III و IV است و کلاس ۲ شامل انواع II، V و VI است [۳۷،۳۸]. سیستم کلاس ۱ از crRNA با کمپلکس چند عاملی برای برش توالی ژنوم هدف استفاده می کند، در حالی که سیستم کلاس ۲ از پروتئین Cas چند دامنه ای منفرد با crRNA برای تداخل استفاده می کند (جدول ۱) [۳۹]. در این کلاس‌ها، سیستم CRISPR نوع II به طور گسترده توسط جامعه علمی برای تشخیص دقیق‌تر و سریع‌تر عفونت‌ها پذیرفته شده است [۴۰-۴۲]. اخیراً سیستم‌های CRISPR/Cas12 و Cas13 در تشخیص عفونت‌های انسانی از جمله باکتری‌ها و ویروس‌ها استفاده شده‌اند[44].

جدول ۱. جزئیات طبقه بندی سیستم های CRISPR/Cas.

جزئیاتی مانند کلاس، نوع، نام پروتئین، مولکول هدف، مکانیسم اکتساب فاصله‌گذار، پردازش Pre-CRISPR، خود در مقابل عدم تبعیض، و ارگانیسم میزبان همراه با مراجع آنها گنجانده شده است.

Class	Type	Protein	Target	Spacer acquisition of CRISPR system	Interference of CRISPR system	Pre-CRISPR processing	Self vs non-self discrimination	Host organism	References
Class 1	I	Cas3	ssDNA	Cas1/Cas2/ Cas4	Cas7, Cas5, Cas8, and Cas3	Cas6	PAM	*E. coli*	[45]
	III	Cas10	ssDNA	Cas1/Cas2	Cas7, Cas5, and Cas1	Cas6	CRISPR Repeat	*S. epidermics*	[43]
	IV	Csf1	-	NA	Cas7, Cas5, and Csf1	-	-	-	[34]
Class 2	II	Cas9	dsDNA	Cas1/Cas2/ Cas4	Cas9	RNase III, and tracrRNA	PAM	*S. thermophilus* and *S. pyogenes*	[15,44]
	V	Cpf1	ssDNA and dsDNA	Cas1/Cas2/ Cas4	Cas12	Cpf1	PAM	*F. novicida*	[50]
	VI	C2c2	ssRNA	Cas1/Cas2	Cas13	-	-	-	[55]

کاربردهای CRISPR-Cas به عنوان یک روش درمانی در برابر عفونت های ناشی از ویروس هایssRNA

فناوری CRISPR-Cas توسط زیست شناسان مولکولی برای تنظیم اپی ژنتیکی در سیستم های یوکاریوتی استفاده شده است. از آن به عنوان یک ابزار آزمایشگاهی برای ویرایش DNA/RNA برای رفع نقایص ژنتیکی و افزایش صفات ژنتیکی استفاده شده است .جوامع علمی در سراسر جهان نیز از این فناوری برای از بین بردن ویروس ها در سلول های انسانی استفاده کرده اند. اخیراً Freije و همکاران در مؤسسه Broad موسسه فناوری ماساچوست و دانشگاه هاروارد، ایالات متحده، استفاده بالقوه از آنزیم Cas13 را در کشت سلولی برای مهار تکثیر سه ویروس ssRNA نشان دادند.[56]. ویروس کوریومننژیت لنفوسیتی، ویروس آنفولانزای A و ویروس استوماتیت تاولی [۵۶] . gRNA از دو بخش تشکیل شده است: crispr RNA (crRNA)، یک توالی ۱۷-۲۰ نوکلئوتیدی مکمل DNA هدف، و یک tracr RNA که به عنوان داربست اتصالی برای نوکلئاز Cas عمل می کند. پروتئین مرتبط با CRISPR یک اندونوکلئاز غیر اختصاصی است در نتیجه این گروه مکان‌های هدف بالقوه Cas13 crRNA را شناسایی کردند که در RNA ویروسی بسیار محافظت شده‌اند و بعداً از مدل‌های کشت سلولی برای

به دست آوردن مجموعه‌ای از crRNAهای ضد ویروسی استفاده کردند که می‌توانستند به روشی ترکیبی چندگانه شوند. کاهش کارآمد RNA ویروسی در سلول‌های پستانداران توسط آنزیم Cas13dead با هدایت crRNA نشان داده شد [56]. Cas13 می تواند آرایه CRISPR را پردازش کند تا crRNA فردی برای هدف قرار دادن RNA های ویروسی متعدد تولید کند. گزارش‌هایی در مورد القای جهش در مکان‌های هدف توسط ضد ویروس‌های مبتنی بر CRISPR با استفاده از Cas9 وجود دارد[11]در حالی که هیچ جهشی در مکان هدف crRNA به دنبال درمان Cas13 مشاهده نشد[56]. این گزارش ها پتانسیل آنزیم Cas13 را به عنوان یک ضد ویروس موثر برای مدیریت عفونت SARS-CoV-2 نشان می دهد.

ویژگی های Cas13 و پلتفرم های تشخیصی

نوکلئاز CRISPR نوع VI اخیراً به‌عنوان یک عامل Case با هدایت RNA خاص و هدف‌گیری RNA شناسایی شده است [49, 54]. فعالیت نوکلئازی این پروتئین‌ها امکان نابودی ژن را بدون تغییر ژنومی فراهم می‌کند. برای شناسایی RNA هدف، پروتئین‌های Cas13 قطعه crRNA را که از یک حلقه ساقه تکرار مستقیم (DR) و یک RNA فاصله‌گذار (gRNA) تشکیل شده است، جذب می‌کنند. این مجموعه RNA هدف را با هیبریداسیون RNA-RNA شناسایی می کند. همانند سایر انواع پروتئین‌هایCas ، Cas13برای تعیین RNA هدف، اما با حداقل محدودیت، به یک توالی جانبی اولیه نیاز دارد. پروتئین های Cas13 به زیرگروه های مختلفی از جملهCas13a ، Cas13bو Cas13d تقسیم می شوند. پروتئین Cas13a (C2c2) اولین بار توسط موسسه Broad در سال ۲۰۱۵ معرفی شد که نقش مهمی در برش RNA دارند. طول Cas13a crRNA کوتاه است (۲۴ جفت باز) که فقط برای اتصال و برش RNA هدف استفاده می شود

اخیراً یک نوع متمایز از نوع VI CRISPR-Cas به نام subtype VID (Cas13d) معرفی شده است. این گونه‌ها برش هدف قوی و فعالیت‌های RNase را همراه با توانایی خود برای پردازش pre-crRNA اعمال می‌کنند. اندازه موثر و کوچکتر Cas13d (۹۶۷ اسید آمینه)، ویژگی بالا و فعالیت کاتالیزوری شدید، Cas13d را به جای سایر پروتئین‌های Cas13 برای تداخل RNA تعیین می کند (Zhang et al., 2019a). تا به امروز، سه نوع از تأثیرگذارهای Cas13 شامل PguCas13b، PspCas13b، و RfxCas13d معرفی شده‌اند که با فعالیت بالای RNA روی هدف با حداقل اثرات ناخواسته (off-target) مشخص می‌شوند [۵۶]. ابزار تشخیصی به نام (SHERLOCK) اولین پلت فرم مبتنی بر سیستم های CRISPR-Cas13 است. از RPA (recombinase polymerase amplification) یا رونویسی معکوس RPA- (RT) و Cas13a تشکیل شده است [۵۴]. این کمپلکس مبتنی بر Cas13a به صراحت اسید نوکلئیک هدف را می‌شناسد و می‌شکند. اثر جانبی Cas13a باعث برش RNA غیر هدف جفت شده به گزارشگر فلورسنت می شود. این شکاف ها خاموش کننده ها را آزاد می کنند و یک سیگنال فلورسنت برای تشخیص سریع و خاص ویروس ها حتی در غلظت های بسیار کم ارائه می دهند. SHERLOCK قادر به سنجش زیستی با حساسیت برای تشخیص هر دو ویروس DNA و RNA با تمایز تک پایه است. این سیستم مبتنی بر Cas13a برای تشخیص قوی ویروس‌های زیکا و دنگی استفاده شده است Cas13b .[54] در نسخه ۲,۰ SHERLOCK استفاده شد که می تواند ssRNA ویروس Zikaو Dengue و همچنین جهش را در نمونه های بیوپسی مایع بیمار از طریق dipstick تشخیص دهد.

این یافته ها پتانسیل استفاده از SHERLOCK را به عنوان یک پلت فرم تشخیص سریع، قابل حمل، قابل حمل و کمی برای عفونت های ویروسی در حال ظهور نشان داده است [43].

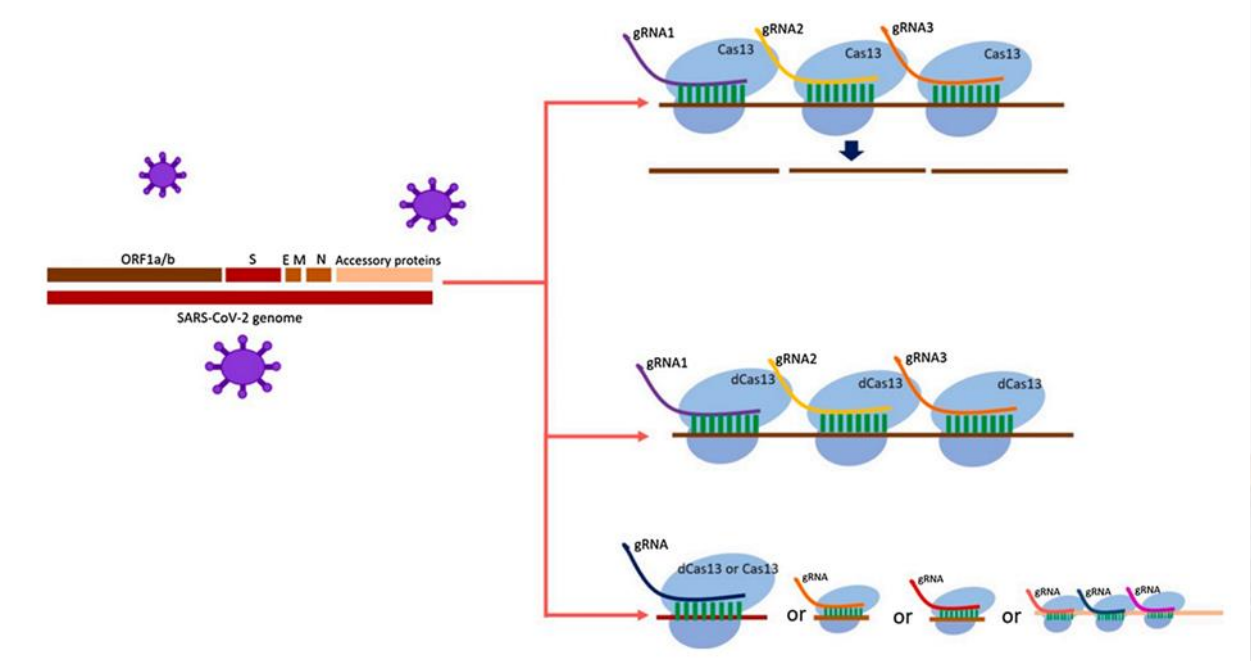
به عنوان یک ابزار درمانیCRISPR/Cas13

تجزیه و تحلیل ژنوم RNA COVID-19 از ۱۹ مورد تایید شده از چین، استرالیا و ایالات متحده نشان می دهد که این ویروس دارای جهش های مختلف است. آنها گزارش می دهند که این جهش ها پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNPs) هستند، به عنوان مثال، مهمترین آنها در چارچوب خواندن باز (ORF8) روی اسیدهای آمینه ۶۲ و ۸۴ COVID-19. این یافته ها ایده قبلی در مورد انتقال ویروس از خفاش به انسان را پیچیده می کند. تجزیه و تحلیل ژنومی نشان می دهد که این گونه های جهش یافته COVID-19 می توانند از تله ضد ویروسی که در قالب داروها تنظیم شده است فرار کنند. این چالش یکی از موانع اصلی در توسعه دارویی موثر و در عین حال ایمن در برابر COVID-19 و حتی در مسیر توسعه واکسن آن است. نتایج حاصل نشان می دهد که این ویروس با به دست آوردن جهش جدید می تواند از داروهای ضد ویروسی معمولی یا اخیر دور شود. همین مشکلات در مواردی مانند مرس یا سارس MERS یا SARS)و سایر ویروس های RNA نیز وجود دارد. نگوین و همکارانش از مرکز پزشکی بوستون، ایالات متحده، با استفاده از روش CRISPR/Cas13d، یک رویکرد کارآمد و انعطاف‌پذیر را برای هدف RNA اجرا کردند. نگوین و همکاران پیشنهاد کردند که این سیستم باید ژنوم RNA COVID-19 را از بین ببرد و در نتیجه توانایی انتقال و تولید مثل کرونا را محدود کند.

برای تداخل در عملکردCOVID-19 ، آنها از RNA های راهنما (gRNAs) استفاده کردند که به طور همزمان ORF1ab و پروتئین اسپایک) به ترتیب ژن replicate/transcriptase و ژن (S را تحریک می کنند. کار آنها بر اساس سیستم /CRISPR Cas13dبود. این روش یک سیستم CRISPR هدایت‌شده با RNA هدف‌گیری است که می‌تواند برای از بین بردن ژنوم RNA COVID-19توسط پروتئینی به نام Cas13d به همراهRNA های راهنما و اسپیسرها spacers سازگار شود. یکی از نکات مثبت این روش انعطاف پذیری آن در طراحی gRNA است. بر خلاف ویرایش DNA که به هر موتیف پایه نوکلئوتیدی (NGG)نیاز دارد، برش RNA توسط Cas13d مستقل از توالی‌های مجاور است. یکی از مزایای در نظر گرفتن CRISPR/Cas13dنسبت به روش‌های دیگر، سرعت و دقت آن در طراحی gRNA است. طیف گسترده ای از ویروس ها که ممکن است از درمان های معمولی فرار کنند. یکی از ویژگی‌های متمایز CRISPR/Cas13d با نیاز به طراحی سریع و دقیق gRNAبرای هدف قرار دادن طیف گسترده‌ای از ویروس‌هایی که ممکن است ایجاد شوند و داروهای معمولی را از بین ببرند، مطابقت دارد. با بزرگ‌تر شدن، نگوین و همکاران بیش از ۱۰۰۰۰ gRNA طراحی کردند تا دقیقاً با ۱۰ ناحیه از مناطق کدکننده پپتید ژنوم RNA کووید-۱۹ مطابقت داشته باشد، بدون اینکه با رونوشت‌های انسانی مطابقت داشته باشد. به دلیل درجه ایمنی بالا و عوارض جانبی ناچیز، ویروس مرتبط با آدنو (AAV) باید به عنوان یک ناقل برای انتقال عامل Cas13d به افراد مبتلا به کووید-۱۹ عمل کند. اثرگذار Cas13d از نظر اندازه کوچک است، بنابراین اندازه آن باعث می‌شود که Cas13d برای تحویل" AAV کل بسته" همراه با آرایه gRNA عالی باشد. به احتمال زیاد، حداکثر سه gRNA که نواحی کدکننده مختلف ژنوم RNA کووید-۱۹ را هدف قرار می‌دهند، باید در یک وکتور AAV ذخیره شوند و به طور سیستماتیک برای

پاکسازی ویروس و جلوگیری از تشکیل مقاومت استفاده شوند. علاوه بر این، بیان Cas13d باید توسط پروموتورها، مانند بافت خاص، هدایت شود تا درمان دقیق روی اندام عفونی ثابت شود. علاوه بر این، AAVها دارای جایگاه هایی هستند که برای ریه که ارگان اصلی مرگ و میر در تمام موارد بسیار اختصاصی است، بنابراین باید در درمان هدفمند با این روش CRISPR استفاده شود. جالب اینجاست که این روش را می توان به سایر ویروس های RNA نیز تعمیم داد.

با توجه به اندازه کوچک عامل Cas13d، یکی از بهترین گزینه‌ها AAV است که حداکثر سه RNA راهنما که مناطق مختلف کدکننده پپتید ژنوم RNA SARS-CoV-2 را هدف قرار می‌دهند، می‌توانند در یک AAV بسته‌بندی شوند. علاوه بر این، AAV دارای سروتیپ‌های بسیار خاص برای ریه، اندام مرکزی آلوده به SARS-CoV-2 است و می‌تواند برای انتقال هدفمند سیستم CRISPR استفاده شود [46]. با این حال، از آنجایی که می‌توان SARS-CoV-2 را در سلول‌های اولیه میمون و رده‌های سلولی مانند Vero و LLCMK2 کشت داد [47]، می‌توانیم یک ناقل SARS-CoV-2 بسازیم که فقط از پروتئین‌های ساختاری مانند پروتئین‌های S و N تشکیل شده باشد. به دلیل میل ترکیبی بالای ACE2 به عنوان یک ناقل ویروسی قادر به ترانسفکت کردن اجزای CRISPR/Cas13 با استفاده همزمان از سرکوبگرهای ایمنی می باشد. اگرچه تمام ژن های کد کننده پروتئین که قبلا ذکر شد (NSP1-NSP16 و پروتئین های جانبی) به صورت جداگانه و مستقل می توانند به عنوان یک هدف درمانی CRISPR/Cas13، ORF1a/b در نظر گرفته شوند (دانشمندان RNA های راهنمای متعددی را برای هدف قرار دادن مناطق کد کننده پپتید طراحی کرده اند. ORF1a/b])، که پلی پروتئین‌ها را کد می‌کند و برای پاتوژنز SARS-CoV-2 ضروری است، می‌تواند هدف مناسبی برای Cas13 فعال و غیرفعال کاتالیزوری (dead Cas13) برای مهار تولید و فعال‌سازی پلی‌پروتئین‌ها باشد. از طریق استفاده از چندین RNA راهنمای مکمل از توالی های مختلف در ORF1a/b (قابلیت ذاتی Cas13 برای پردازش pre-crRNA به crRNA های منفرد می تواند هدف گیری همزمان mRNA های متعددی را که در یک یا چند مسیر کمک می کنند ساده کند [48])،که می توانیم آن را با غیرفعال کردن با بریدن RNA آن یا با استفاده از dCas13[49] و RNA های راهنمای متعدد به جای جدا کردن آن، می توانیم آن را با ایجاد موانعی در مسیر ترجمه (تولید پروتئین) و رونویسی آن غیرفعال کنیم (شکل ۱).



شکل ۱. مکان های مناسب مختلف ژنوم SARS-CoV-2، که می توانند توسط CRISPR Cas13 یا deadCas13 CRISPR مورد هدف قرار گیرند.

محدودیت و چشم انداز آینده

تشخیص بر اساس سیستم CRISPR-Cas یک روش سریع و ساده است. شروع استفاده از سیستم CRISPR در تشخیص اسید نوکلئیک نیازمند تعداد زیادی مولکول RNA هدفمند است. علاوه بر این، نرخ مثبت کاذب نگران کننده بود. در مقایسه باRT-qPCR ، از آلودگی آئروسل جلوگیری می کند، که نرخ مثبت کاذب را کاهش می دهد(mNGS) .توالی یابی نسل بعدی متاژنومیک که تجزیه و تحلیل جامع مواد ژنتیکی میکروبی و میزبان (DNA یا RNA) در نمونه های بالینی بیماران است, می تواند مضرات RT-qPCR را برطرف کند و تشخیص مثبت سیستم CRISPR را بهبود بخشد. با این حال، زمان تجزیه و تحلیل mNGS بسیار طولانی است و نتایج را نمی توان به موقع تولید کرد, سیستم CRISPR مزایای زیادی دارد.

تحقیقات مبتنی بر سیستم CRISPR-Cas در حال گسترش است. اخیراً یک سویه ویروسی جدید به نام B1.1.7 در بریتانیا پیدا شد. سویه ویروس دارای ۲۳ جهش بود، N501Yیک جهش نگران کننده است. این جهش مهمترین بخش پروتئین اسپایک، دامنه اتصال گیرنده را که ویروس برای تماس با سلول های تنفسی انسان از آن استفاده می کند، تغییر می دهد. در حال حاضر، روش های مرسوم هنوز برای تشخیص ویروس استفاده می شود. اگرچه هیچ ارتباطی در مورد سیستم CRISPRبه کار رفته در تشخیص N501Y وجود ندارد، CRISPRبه شناسایی آن کمک خواهد کرد.

درمان های مبتنی بر سیستم CRISPR-Cas یک گزینه بالقوه برای درمان COVID-19 ارائه می دهد. بهینه سازی طراحی sgRNAو بهبود ویژگی پروتئین.Cas راه حل های ممکن در این ارتباط است. یکی از محدودیت ها، کاربرد سیستم CRISPR-Casاست CRISPR به طور گسترده در انسان استفاده نمی شود. بیشتر تحقیقات فعلی روی حیوانات انجام شده است و این محدودیت باید روزی برطرف شود .در نتیجه، در زمینه همه‌گیری COVID-19، فناوری‌های جدید به پیشبرد تشخیص و درمان بیماری کمک می‌کنند.

منابع:

1. Cascella M, Rajnik M, Cuomo A, et al. Features, evaluation and treatment coronavirus (COVID-19). Statpearls [internet]. StatPearls Publishing; 2020.
2. Li H, Liu S-M, Yu X-H, et al. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): current status and future perspective. Int J Antimicrob Agents. 2020;55(5):105951.
3. Battegay M, Kuehl R, Tschudin-Sutter S, et al. 2019-novel Coronavirus (2019-nCoV): estimating the case fatality rate–a word of caution. Swiss Med Wkly. 2020;150:w20203.
4. Corman VM, Eckerle I, Bleicker T, et al. Detection of a novel human coronavirus by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. Eurosurveillance 2012;17(39):20285.
5. Organization WH. World Health Organization coronavirus disease 2019 (COVID-19) situation report. 2020.
6. Organization WH. Novel coronavirus (2019-nCoV). Situat Rep. 2020;28
7. Alhazzani W, Møller MH, Arabi YM, et al. Surviving Sepsis Campaign: guidelines on the management of critically ill adults with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). Intensive Care Med. 2020;46(5):854–887.
8. Chen JS, Ma E, Harrington LB, et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. Science.2018;360(6387): 436–439.
9. Broughton JP, Deng X, Yu G, et al. CRISPR–Cas12-based detection of SARS-CoV-2. Nat Biotechnol. 2020;38(7):1–5.
10. Bhadra S, Jiang YS, Kumar MR, et al. Real-time sequence-validated loop-mediated isothermal amplification assays for detection of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV). PLoS One. 2015;10(4):e0123126.
11. Wang N, Luo C, Liu H, et al. Characterization of a new member of alphacoronavirus with unique genomic features in Rhinolophus bats. Viruses 2019;11(4):379.
12. Zaki AM, Van Boheemen S, Bestebroer TM, et al. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. N Engl J Med. 2012;367(19):1814–1820.
13. Garneau JE, Dupuis M-È, Villion M, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. Nature 2010;468(7320):67–71.
14. Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, et al. Cas9–crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. Proc Natl Acad Sci. 2012;109:2579–2586.
15. Mota DS, Marques JM, Guimarães JM, et al. CRISPR/Cas Class 2 systems and their applications in biotechnological processes. Genet Mol Res. 2020;20:1–10.
16. Makarova KS, Wolf YI, Koonin EV. Classification and nomenclature of CRISPR-Cas systems: where from here? Cris J. 2018;1(5):325–336
17. Li F. Structure, function, and evolution of coronavirus spike proteins. Annu Rev Virol. 2016;3(1):237–261.
18. P. Zhou, X.-L. Yang, X.-G. Wang, B. Hu, L. Zhang, W. Zhang, et al., Discovery of a novel coronavirus associated with the recent pneumonia outbreak in humans and its potential bat origin, Nature 57 (9) (2020)

270–273.
19. F. Wu, S. Zhao, B. Yu, Y.-M. Chen, W. Wang, Z.-G. Song, et al., A new coronavirus associated with human respiratory disease in China, Nature 579 (7798) (2020) 265–269.
20. A.R. Fehr, S. Perlman, Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. Coronaviruses, Springer, 2015, pp. 1–23.
21. S. van Boheemen, M. de Graaf, C. Lauber, T.M. Bestebroer, V.S. Raj, A.M. Zaki, et al., Genomic characterization of a newly discovered coronavirus associated with acute respiratory distress syndrome in humans, MBio 3 (6) (2012) e00473–12.
22. Z. Song, Y. Xu, L. Bao, L. Zhang, P. Yu, Y. Qu, et al., From SARS to MERS, thrusting coronaviruses into the spotlight, Viruses 11 (1) (2019) 59.
23. A. Wu, Y. Peng, B. Huang, X. Ding, X. Wang, P. Niu, et al., Genome composition and divergence of the novel coronavirus (2019-nCoV) originating in China, Cell Host Microbe 27 (3) (2020) 325–328.
[24. A. Zumla, J.F. Chan, E.I. Azhar, D.S. Hui, K.-Y. Yuen, Coronaviruses—drug discovery and therapeutic options, Nat. Rev. Drug Discov. 15 (5) (2016) 327.
25. nytimes, Bad News Wrapped in Protein: Inside the Coronavirus Genome 2020 April 3, Available from:, 2020 https://www.nytimes.com/interactive/2020/04/03/
26. Chen JS, Ma E, Harrington LB, et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. Science. 2018;360(6387): 436–439.
27. Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, et al. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. Microbiology 2009;155(3):733–740.
28. Van Der Oost J, Westra ER, Jackson RN, et al. Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR–Cas systems. Nat Rev Microbiol. 2014;12(7):479–492.
29. Koonin EV, Makarova KS. Mobile genetic elements and evolution of CRISPR-Cas systems: all the way there and back. Genome Biol Evol. 2017;9(10):2812–2825.
30. Li Y, Li S, Wang J, et al. CRISPR/Cas systems towards next-generation biosensing. Trends Biotechnol. 2019;37
(7):730–743.
31. Sternberg SH, Richter H, Charpentier E, et al. Adaptation in CRISPR-Cas systems. Mol Cell. 2016;61(6):797–808.
32. Koonin EV, Makarova KS, Zhang F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. Curr Opin Microbiol.
2017;37:67–78.
33. O'Connell MR. Molecular mechanisms of RNA targeting by Cas13-containing Type VI CRISPR–Cas systems. J Mol Biol. 2019;431 (1):66–87.
34. Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. Nat Rev Microbiol. 2015;13 (11):722–736.
35. Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science 2013;339(6121):819–823.
36. Guk K, Keem JO, Hwang SG, et al. A facile, rapid and sensitive detection of MRSA using a CRISPR-mediated DNA FISH method, antibody-like dCas9/sgRNA complex. Biosens Bioelectron. 2017;95:67–71.
37. Pardee K, Green AA, Takahashi MK, et al. Rapid, low-cost detection of Zika virus using programmable biomolecular components. Cell 2016;165(5):1255–1266.
38. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dualRNA–guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science 2012;337(6096):816–821.

39. Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. Science 2008;322(5909):1843–1845.
40. Sapranauskas R, Gasiunas G, Fremaux C, et al. The Streptococcus thermophilus CRISPR/Cas system provides immunity in Escherichia coli. Nucleic Acids Res. 2011;39(21):9275–9282.
41. Brouns SJJ, Jore MM, Lundgren M, et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. Science 2008;321:960–964
42. Koonin EV, Makarova KS. Mobile genetic elements and evolution of CRISPR-Cas systems: all the way there and back. Genome Biol Evol. 2017;9(10):2812–2825
43. Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. Cell 2015;163(3):759–771
44. Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Konermann S, et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. Science 2016;353(6299):aaf5573
45. Kumar P, Malik YS, Ganesh B, Rahangdale S, Saurabh S, Natesan S, Srivastava A, Sharun K, Yatoo M, Tiwari R, Singh RK. CRISPR-Cas system: an approach with potentials for COVID-19 diagnosis and therapeutics. Frontiers in cellular and infection microbiology. 2020 Nov 2;10:639.
46. Nguyen TM, Zhang Y, Pandolfi PP. Virus against virus: a potential treatment for 2019-nCov (SARS-CoV-2) and other RNA viruses. Cell Res 2020;30(03):189–190
47. New kind of CRISPR technology to target RNA, including RNA viruses like coronavirus. Accessed January 14, 2021 at: https:// www.sciencedaily.com/releases/2020/03/200316141514.htm.
48 Cockrell AS, Yount BL, Scobey T, et al. A mouse model for MERS coronavirus-induced acute respiratory distress syndrome. Nat Microbiol 2016;2(02):16226
49. Kellner MJ, Koob JG, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Zhang F. SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases. Nat Protoc 2019;14(10):2986–3012
50. T.R. Abbott, G. Dhamdhere, Y. Liu, X. Lin, L. Goudy, L. Zeng, et al., Development ofCRISPR as an antiviral strategy to combat SARS-CoV-2 and influenza, Cell 181 (4) (2020) 865–876.
51. T.M. Nguyen, Y. Zhang, P.P. Pandolfi, Virus against Virus: A Potential Treatmentfor 2019-nCov (SARS-CoV-2) and Other RNA Viruses, Nature Publishing Group,2020.
52.M.J. Loeffelholz, Y.-W. Tang, Laboratory diagnosis of emerging human coronavirus infections—the state of the art, Emerg. Microbes Infect. (2020) 1–26 (justaccepted).
53. A. East-Seletsky, M.R. O'Connell, S.C. Knight, D. Burstein, J.H. Cate, R. Tjian, et al., Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2 enable guide-RNA processing and RNA detection, Nature 538 (7624) (2016) 270–273.
54.D.B. Cox, J.S. Gootenberg, O.O. Abudayyeh, B. Franklin, M.J. Kellner, J. Joung, et al., RNA editing with CRISPR-Cas13, Science 358 (6366) (2017) 1019–1027.
56.Freije, C. A., Myhrvold, C., Boehm, C. K., Lin, A. E., Welch, N. L., Carter, A., et al. (2019). Programmable Inhibition and Detection of RNA Viruses Using Cas13. Mol. Cell. 76, 826–837. doi: 10.1016/j.molcel.2019.09.013