

طراحی و ساخت ناقل نو ترکیب CRISPR حاوی ژن LRRK2 بیماری پارکینسون

آزاده ثمره غلامی ^۱، حسینعلی ساسان ^{۱*}، محمد هاشم آبادی ^۲، هادی روان ^۱ Ph.D.^۱ دانشگاه شهید باهنر کرمان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، کرمان، ایران
^۲ دانشجوی Ph.D، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: hsasa@uk.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۲/۱۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۸/۲۲

چکیده

هدف: هدف از این مطالعه تخریب ژن کیناز غنی از لوسین شماره ۲ (LRRK2)، مهم‌ترین ژن درگیر در بیماری پارکینسون با استفاده از تکنولوژی CRISPR-Cas بود.

مواد و روش‌ها: مراحل همسانه سازی قطعات راهنما در این پژوهش با استفاده از کیت کلونینگ gRNA سیستم کریسپر (شماره کاتالوگ C8324K شرکت زاور زیست آزما) انجام شد. ابتدا ۴ الیگونوکلوئید برای توالی اگزون ۴ ژن LRRK2 توسط نرم افزار ساخت RNA راهنمای CRISPR با عنوان CHOCHOP طراحی شدند. این دو gRNAs (RNA راهنما) در دو طرف اگزون فوق در نظر گرفته شدند. مولکول‌های دو رشته‌ای DNA بر اساس دستورالعمل استاندارد در آزمایشگاه ساخته شدند. قطعات دو رشته‌ای ۲۰ جفت بازی راهنما که برای تشکیل کمپلکس Cas9-gRNA استفاده می‌شوند، با استفاده از آنزیم DNA لیگاز به وکتور بیانی یوکاریوتی کریسپر Px459 متصل و پلاسمیدهای نو ترکیب به درون باکتری *E. Coli DH5a* میزبان با روش شوک حرارتی منتقل شدند. نتایج آزمایش‌ها به وسیله روش‌های PCR و تعیین ردیف DNA ارزیابی شدند.

نتایج: آزمایش‌های چندگانه RCP با استفاده از پلاسمیدهای نو ترکیب به عنوان DNA الگو و توالی‌یابی DNA، همسانه سازی قطعه‌های کوچک راهنما در پلاسمید بیانی کریسپر را نشان داد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد، سیستم CRISPR می‌تواند به عنوان یک ابزار قوی فراگیر برای ویرایش و تنظیم بسیاری از ژن‌های موثر در بیماری‌ها از جمله بیماری پارکینسون استفاده شود.

واژگان کلیدی: بیماری پارکینسون، ژن LRRK2، کریسپر

مقدمه

برخی باکتری‌ها دارای سیستم ایمنی اکتسابی شامل تکرارهای پالیندرومی فاصله‌دار منظم خوش‌های Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) همراه با ژن پروتئینی Cas می‌باشند. این سیستم مقاومت اکتسابی در برابر هجوم عوامل بیگانه شامل باکتریوفاژ یا هر DNA خارجی وارد شده را ایجاد می‌کند (۱،۲،۳). CRISPR شامل توالی‌های تکراری محافظت شده در ژنوم می‌باشد که توسط قطعات DNA متغییر منحصر به فرد تحت عنوان فاصله‌انداز (Spacer) که از DNA عامل بیگانه منشا می‌گیرند، از هم جدا شده‌اند. ایمنی در برابر حملات بعدی عوامل بیگانه‌ای که ردیف‌های نوکلئوتیدی یکسان با قطعات ادغام شده Spacer مربوط به ژنوم آن‌را حمل می‌کند، ایجاد می‌شود (۴،۵،۶،۷). تا به امروز سه نوع سیستم CRISPR باکتریایی شناسایی شده است. سیستم کریسپر نوع I برای برش از ریبونوکلئوپروتئین‌های Cas1، Cas5 و Cas6 به همراه پروتئین‌های متعدد کمکی دیگری استفاده می‌کند. همچنین قادر به برش فقط یک رشته DNA هدف می‌باشد. سیستم کریسپر نوع III نیز برای فعالیت به پروتئین‌های زیادی از جمله Cas2، Cas6 و پروتئین‌های دیگری نیاز دارد. به علاوه این نوع سیستم کریسپر فقط DNA تک رشته‌ای و در مواردی RNA را برش می‌دهد. در مقابل سیستم کریسپر نوع II برای فعالیت به پروتئین‌های کمتری از جمله Cas9 نیاز داشته و قادر به برش DNA دورشته‌ای می‌باشد (۸،۹،۱۰). سیستم CRISPR یک تکنولوژی قدرتمند و ویرایش ژنوم است که انقلابی را در زمینه تحقیقات زیست پزشکی ایجاد کرده است (۵،۱۱،۱۳). این سیستم امکان انجام انواع تغییرات در سطح ژنوم شامل اصلاح، روشن و خاموش کردن ژن‌ها را با دقت، سرعت، ارزان و نسبتاً ساده را به وجود آورده است. با استفاده از این تکنولوژی ایجاد انواع مدل‌های سلولی، حیوانی و همچنین بررسی سیستماتیک ژنوم فراهم شده است (۱۴،۱۹).

بیماری پارکینسون (PD) یک اختلال عصبی-حرکتی پیشرونده شایع می‌باشد. این بیماری به دلیل انحطاط نورون‌های دوپامینرژیک منجر به کاهش سطح انتقال دهنده عصبی دوپامین می‌شود. از ویژگی‌های اصلی کلینیکی این بیماری می‌توان لرزش اعضای بدن از جمله دست و پا در حالت استراحت، کندی حرکات، بی‌ثباتی در راه رفتن و سفتی عضلات را نام برد (۲۰،۲۳). میزان بروز این اختلال مزمن عصبی با بالا رفتن سن، افزایش می‌یابد شیوع این بیماری یک درصد در جمعیت بالای ۶۵ سال و ۴ درصد در جمعیت بالای ۸۵ سال است. PD یک اختلال پیچیده است که احتمالاً ناشی از تعاملات بین عوامل خطر محیطی و ژنتیکی است (۲۴،۲۶). با بررسی‌های مولکولی انجام گرفته چندین ژن دخیل در بروز PD شناسایی شده‌اند. ژن‌های LRRK2، SNCA، DJ-1، PINK1، PARKIN، ATP13A2 از جمله مهم‌ترین این ژن‌ها هستند (۲۲).

ژن LRRK2 ژن بزرگی است که بر روی کروموزوم شماره ۱۵ موش قرار گرفته است. شامل ۵۱ اگزون و طولی به اندازه‌ی ۷۵۸۴ نوکلئوتید دارد. این ژن پروتئینی را شامل ۲۵۲۷ آمینواسید همراه با دومین‌های عملکردی متعدد کدگذاری می‌کند (۲۷،۲۸). در بیماران پارکینسونی حاصل از جهش در این ژن معمولاً میزان بیان آن بالا می‌رود. LRRK2 یک پروتئین سیتوزولی است که در رشد نورونی، فرایندهای سلولی پیچیده در نورون‌ها و همچنین به علت داشتن تعداد زیادی دومین به عنوان مرکز مسیرهای متعدد سیگنالینگ که برای عملکرد نورون‌ها حیاتی است، دخیل می‌باشد. این ژن در مغز و دیگر اندام‌ها بیان می‌شود. بیان آن عمدتاً در مناطق گره‌های قاعده‌ای که با اختلالات حرکتی در بیماری پارکینسون ارتباط دارد و همچنین در داخل نواحی غیر حرکتی مثل هیپوکامپ صورت می‌گیرد. در بیماری پارکینسون حاصل از جهش در ژن LRRK2، تجمع نوروفیبریلاری، آسیب به سلول‌های شاخه‌ای قدامی و تخریب مسیرهای عصبی در بخش جسم سیاه مغز رخ می‌دهد (۲۹،۳۲).

با استفاده از سیستم CRISPR ژن LRRK2 در رده سلولی انسانی دچار جهش کسب عملکرد شد. در مقایسه با نمونه‌های کنترل اثرات مخرب سلول‌های ترانسفورم شده بر فرایند سیستم عصبی مشاهده شد. این امر نقش مهم ژن فوق را در مکانیزم بیماری پارکینسون نشان داد. همچنین اهمیت سیستم ویرایشی کریسپر را در ایجاد مدل‌های سلولی و حیوانی به‌منظور کاربردهای احتمالی درمانی مشخص کرد (۳۳،۳۴). تعداد ۲۸ لکوس ژنی به‌عنوان فاکتورهای اصلی درگیر در بیماری پارکینسون دخالت دارند. از میان این ردیف‌های ژنی، موتاسیون‌های ویژه ژن LRRK2 به‌عنوان اصلی‌ترین عوامل ایجاد بیماری فوق شناخته شده اند. با توجه به پیچیدگی مکانیزم ایجاد بیماری پارکینسون، دخالت ژن‌های متعدد و الگوهای متفاوت وراثت غالب و مغلوبی ژن‌های فوق، سیستم ویرایشی کریسپر برای غربالگری، تشخیص و استفاده‌های احتمالی دارویی برای این بیماری و سایر بیماری‌های مشابه تحلیل برنده سیستم عصبی پیشنهاد شده است (۳۸،۳۵). در پژوهش حاضر هدف ساخت ناقل نو ترکیب CRISPR ویژه ژن LRRK2 با طراحی gRNA برای ناحیه‌ای از اگزون ۴۱ ژن فوق و کلونینگ آن در باکتری *E. coli DH5a* می‌باشد.

مواد و روش‌ها

سویه باکتری، طراحی پیش سازهای قطعه راهنما، پرایمرها و پلاسمید: در مطالعه حاضر، از سویه اشرشیاکلی *DH5a* از بخش زیست‌شناسی دانشگاه شهید باهنر کرمان به‌عنوان میزبان بیانی کلونینگ و همچنین از پلاسمید pSpCas9(BB)-2A-Puro (Add gene) به‌عنوان ناقل کلونینگ و بیان ژن LRRK2 استفاده شدند. برای طراحی پیش‌سازهای gRNA، ناحیه‌ای از اگزون ۴۱ ژن LRRK2 از ژنوم موش سویه CL57BL6 استفاده شد. در ابتدا به‌منظور یافتن توالی اگزون ۴۱ از سایت‌های ENSEMBL و NCBI انتخاب شد. پس از بارگذاری توالی ژن مورد نظر به‌منظور تایید صحیح بودن ردیف بازی توالی، از سایت CLUSTALW2 برای بررسی هم‌ردیفی استفاده شد. سپس با استفاده از نرم‌افزار CHOPCHOP طراحی پیش‌سازها gRNA انجام شد. این سایت تعدادی gRNA را معرفی می‌نماید که از این بین، بایستی gRNA مناسبی که دارای ویژگی‌هایی همچون بالا بودن Score و کم بودن تعداد Off target را انتخاب نمود. gRNAهای انتخاب شده دارای Score برابر با ۹۶ بودند. توالی پرایمرهای پیش‌ساز gRNA در جدول ۱ نشان داده شده است. به‌منظور تایید همسانه سازی قطعه DNA با اندازه ۲۰ جفت بازی مربوط به gRNA در ناقل و تکثیر آن در باکتری میزبان واکنش PCR انجام شد. علاوه بر الیگونوکلئوتیدهای مکمل رفت و برگشت gRNA، آغازگرهای لازم برای تکثیر یک قطعه حدود ۴۰۰ جفت بازی در دو طرف DNA مربوط به gRNA بر روی پلاسمید نیز با عناوین PPF و PPR طراحی شدند. از ترکیب متفاوت آغازگرهای قطعه فوق و پرایمرهای راهنما در واکنش PCR در صورت تکثیر قطعات سه‌گانه با اندازه‌های مورد انتظار (۴۰۰، ۱۵۰ و ۲۷۰ جفت بازی) همسانه سازی اثبات می‌شود (جدول ۱).

جدول ۱: الیگونوکلئوتیدهای لازم برای پیش‌ساز gRNA و تکثیر قطعات پلاسمید نو ترکیب طراحی شده برای دست ورزی در ژن LRRK2

نام	(۵' → ۳')	Score	Amplicon size (dsDNA)
gRNAF gRNAR	GTTGCGAAGATTGCGGACTA TAGTCCGCAATCTTCGCAAC	۹۶	20 bps, guide fragment
PPF PPR	GGGCCTATTTCCCATGATTCTT CGCGCTAAAAACGGACTAGC		~ 400 bps
gRNAF PPR	GTTGCGAAGATTGCGGACTA CGCGCTAAAAACGGACTAGC		~150 bps
PPF gRNAR	GGGCCTATTTCCCATGATTCTT TAGTCCGCAATCTTCGCAAC		~270 bps

طراحی پرایمرهای مربوط به پلاسمید با استفاده از نرم افزار Primer 3 صورت گرفت. اختصاصیت پرایمرهای طراحی شده با نرم افزار BLAST در پایگاه NCBI تایید شد. توالی پرایمرهای پلاسمید در جدول ۱ نشان داده شده است.

آنیلینگ یا اتصال پرایمرهای پیش ساز grNA فرایند ساخت ناقل نو ترکیب کریسپر در این مطالعه با استفاده از کیت کلونینگ grNA سیستم کریسپر شرکت زاور زیست آزما (شماره کاتالوگ C8324K، شماره ثبت اختراع ۹۸۷۸۵) انجام شد. به طور خلاصه، مقدار ۳ میکرولیتر پرایمر رفت با غلظت ۱۰۰ میکرومولار، ۳ میکرولیتر پرایمر برگشت با غلظت ۱۰۰ میکرومولار مربوط به پیش سازهای grNA، ۴ میکرولیتر نمک NaCl نیم مولار، ۳ میکرولیتر بافر آنزیم T4 DNA Ligase و ۷ میکرولیتر آب را براساس دستورالعمل با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر مخلوط کرده و سپس محلول حاصل را در دستگاه PCR به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد و به مدت ۲ ثانیه در دمای ۹۲ درجه سانتی گراد قرار داده شد. در مرحله بعد به منظور سرد شدن تا دمای ۲۵ درجه سانتی گراد حرارت دستگاه PCR به گونه ای تنظیم شد که دما یک درجه یک درجه به فاصله زمانی ایستایی هر درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه کاهش یافت. در ادامه به منظور رقیق سازی یک میکرولیتر از نمونه را به ۵۰ میکرولیتر بافر آنزیم T4 DNA Ligase اضافه و به عنوان پیش سازهای grNA استفاده شدند.

هضم آنزیمی پلاسمید *pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459)*: به منظور خطی کردن پلاسمید حلقوی مقادیر ۵ میکرولیتر بافر آنزیم برشگر BBS1، ۵ میکرولیتر وکتور حلقوی (غیربرشی) و ۱ میکرولیتر آنزیم برشگر BBS1 را مخلوط و با استفاده از آب مقطر حجم نمونه ها در سطح ۵۰ میکرولیتر تنظیم شدند. سپس به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و بعد از آن به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. در مرحله بعد محصول برش آنزیمی پلاسمید بر روی ژل آگارز ۱ درصد سیستم الکتروفورز منتقل و توسط کیت Bioneer بر اساس دستورالعمل استخراج از ژل قطعه مورد نظر خالص سازی شد.

اتصال قطعه الیگونوکلوئوتید راهنما با پلاسمید *pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459)-V2-0* ساخت DNA

نو ترکیب: به منظور اتصال قطعه راهنما به ناقل مقدار ۴/۵ میکرولیتر پلاسمید خطی، ۲/۵ میکرولیتر بافر آنزیم T4 DNA Ligase (لیگاز)، یک میکرولیتر آنزیم T4 DNA Ligase و یک میکرولیتر محلول رقیق شده پیش ساز grNA را با هم ترکیب و پس از تنظیم حجم نهایی به وسیله آب مقطر تا حجم ۲۰ میکرولیتر نمونه ها به مدت یک ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی گراد و سپس ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند.

ترانسفورماسیون: برای انتقال وکتور نو ترکیب در سلول های باکتری *E. coli* مستعد، از روش شوک حرارتی استفاده شد. بدین ترتیب که پس از مایع شدن میکروتیوپ حاوی ۱۰۰ میکرولیتر سلول مستعد میزبان (کلرید کلسیم ۰/۱ مولار) بر روی یخ، میزان ۷ میکرولیتر از محصول ناقل نو ترکیب را به نمونه سلولی در میکروتیوپ افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد. سپس به مدت ۶۰ ثانیه میکروتیوپ را در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد قرار داده و مجدداً نمونه ها را به مدت ۱ دقیقه بر روی یخ نگهداری شدند. در گام آخر میزان ۸۰۰ میکرولیتر محیط کشت مایع LB فاقد آنتی بیوتیک را به هر میکروتیوپ اضافه و به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در انکوباتور با چرخش ۱۵۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. در ادامه میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محلول باکتری های ترانسفورم شده را بر روی محیط کشت جامد حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین (غلظت یک میلی گرم در میلی لیتر) توزیع و به مدت ۱۶ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. کلنی های رشد داده شده در محیط کشت مایع حاوی آنتی بیوتیک جهت استخراج پلاسمید و اثبات همسانه سازی مورد استفاده قرار گرفتند.

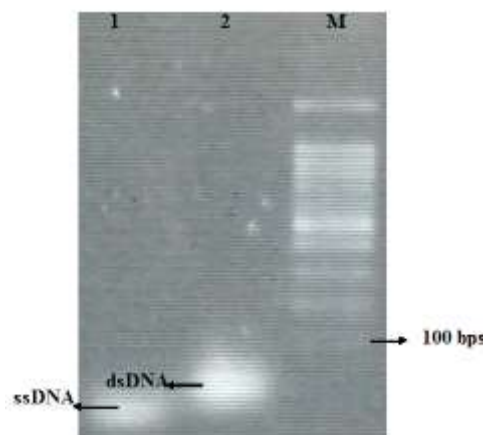
واکنش PCR و تعیین ردیف DNA به منظور تایید همسانه سازی و غربالگری باکتری‌های نو ترکیب از روش PCR استفاده شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر حاوی ۵ میکرولیتر از بافر 10X، ۱.۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰ میلی‌مولار)، یک میکرولیتر از dNTPs (۱۰ میلی‌مولار)، یک میکرولیتر از هر پرایمر (۱۰۰ میکرومولار)، یک میکرولیتر از آنزیم Taq DNA polymerase، ۲ میکرولیتر از DNA الگو و ۳۷/۵ میکرولیتر آب انجام شد. برنامه PCR شامل ۵ دقیقه جهت دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و سپس ۳۳ سیکل شامل یک دقیقه ۹۵ درجه سانتی‌گراد، یک دقیقه ۵۷ درجه سانتی‌گراد، یک دقیقه ۷۲ درجه سانتی‌گراد و نهایتاً ۵ دقیقه ۷۲ درجه سانتی‌گراد با استفاده از دستگاه ترموسایکلر شرکت Bioneer کره جنوبی انجام شد. نمونه‌های پلاسمیدی نو ترکیب به همراه آغازگرهای جلوبرنده و برگشت قطعه راهنما به منظور تایید همسانه سازی به شرکت تکاپو زیست برای تعیین ردیف DNA ارسال شدند.

نتایج

ساخت قطعه راهنمای دو رشته‌ای و همسانه سازی قطعات راهنما با استفاده از پلاسمید سیستم کریسپر و

***E. coli DH5a* باکتری‌های شایسته میزبان**

شکل ۱ نتایج اتصال الیگونوکلئوتیدهای جلو برنده و برگشت جهت ایجاد قطعه راهنمای دو رشته‌ای برای تولید RNA راهنما را نشان می‌دهد. خط شماره ۲ حالت تک رشته‌ای و خط شماره ۳ حالت جفت شده یا دو رشته‌ای قطعه راهنما را با اندازه کمی سنگین‌تر مشخص می‌کند. M به عنوان مارکر استفاده شده است.

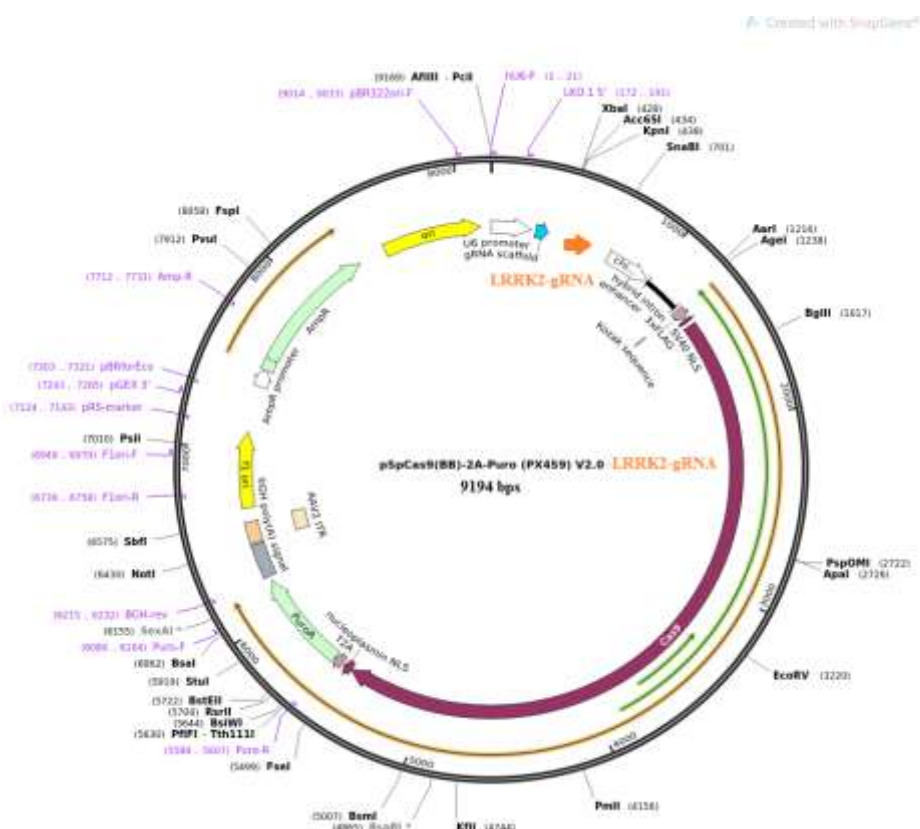


شکل ۱: ساخت قطعه راهنمای دو رشته‌ای را نشان می‌دهد. خط M: مارکر، خط ۱: حالت تک رشته‌ای و خط ۲: فرم دو رشته‌ای قطعه راهنما را با اندازه کمی سنگین‌تر نشان می‌دهد.

در شکل ۲ کلنی‌های باکتری ترانسفورم شده نو ترکیب و غیرنو ترکیب بر روی محیط کشت لوریا - برتانی (LB (Luria-Bertani) حاوی آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین دیده می‌شوند. تعداد نسبتاً زیاد کلنی‌های تک ایجاد شده نشان از دقت و موفقیت مراحل همسانه سازی شامل برش، اتصال، تهیه سلول‌های شایسته میزبان، و انتقال است. DNA پلاسمیدی از باکتری‌های نو ترکیب و غیرنو ترکیب با روش لیز قلیایی موجود در آزمایشگاه استخراج شدند. شکل ۳ نقشه پلاسمیدهای نو ترکیب LRRK2-pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459)-V2-0-LRRK2-gRNA حاوی قطعه راهنما برای ویرایش ژن LRRK2 بیماری پارکینسون را نشان می‌دهد. قطعه راهنما بعد از محل Scaffold وارد شده است تا با استفاده از پروموتور موجود بیان آن صورت گیرد.



شکل ۲: کلنی های نو ترکیب و غیرنو ترکیب رشد داده شده بر روی محیط کشت جامد حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین را نشان می دهد.

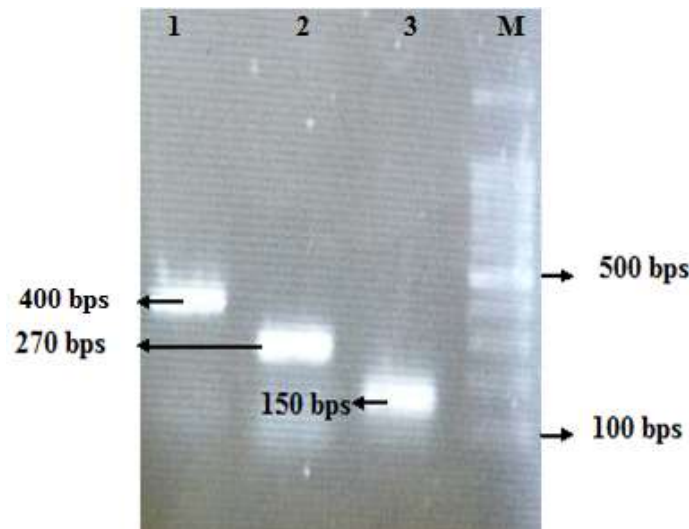


شکل ۳: نقشه پلاسمید نو ترکیب pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459)-V2.0-LRRK2-gRNA حاوی بخش راهنمای اضافه شده بعد از Scaffold RNA با عنوان LRRK2-gRNA با رنگ قرمز را نشان می دهد. قطعه اضافه شده بیست جفت باز اندازه دارد.

نتایج آزمایش های PCR و تعیین ردیف DNA برای تایید همسانه سازی قطعه راهنما

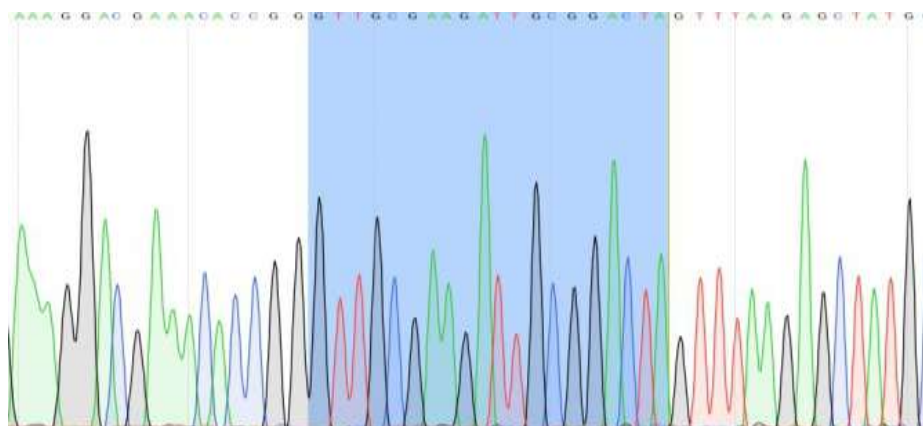
نتایج آزمایشات PCR در شکل ۴ نشان داده شده است. با توجه به قطعه بسیار کوچک همسانه سازی شده راهنما، حدود ۲۰ جفت باز، تایید همسانه سازی با روش برش آنزیمی امکان پذیر نبود. از مکانیزم های تعیین ردیف DNA و PCR چندگانه برای اثبات این امر استفاده شد. آغازگرها به صورتی طراحی شدند که پرایمرهای جلو برنده و برگشت PPF و PPR یک قطعه حدود ۴۰۰ جفت بازی را در دو طرف قطعه راهنما در پلاسمید تکثیر کنند. همچنین پرایمر جلو برنده PPF و الیگونوکلئوتید آنتی سنس قطعه راهنما، gRNAR، یک قطعه ۲۷۰ جفت بازی و بالاخره پرایمر برگشت PPR و الیگونوکلئوتید سنس قطعه

راهنما، gRNAF، یک قطعه ۱۵۰ جفت بازی را در صورت همسانه سازی موفقیت آمیز قطعه راهنما تکثیر کنند. در آزمایشات PCR از پلاسمیدهای استخراج شده احتمالی نو ترکیب به عنوان DNA الگو استفاده شد. شکل ۴ تکثیر قطعات سه گانه فوق را که تایید کننده همسانه سازی قطعه راهنما در پلاسمید مورد نظر است، نشان می دهد. توضیحات در زیر نویس شکل آورده شده است.



شکل ۴: نتایج آزمایشات PCR به منظور تایید همسانه سازی قطعه راهنمای ۲۰ جفت بازی ویژه ژن LRRK2 بیماری پارکینسون در پلاسمید کریسپر. pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459)-V2-0M مارکر ۱۰۰ جفت بازی، خط ۲: قطعه ۲۷۰ جفت بازی حاصل تکثیر پرایمر جلوبرنده پلاسمید و الیگونوکلو تید آنتی سنس راهنما، خط ۱: حاصل تکثیر یک بخش ۱۵۰ جفت بازی با اثر پرایمر برگشت پلاسمید و رشته سنس راهنما. خط ۳: قطعه ۴۰۰ جفت بازی حاصل تکثیر پرایمرهای رفت و برگشت (سنس و آنتی سنس) پلاسمید. تکثیر قطعات سه گانه فوق تایید کننده همسانه سازی موفقیت آمیز است. برای توضیح جزئیات بیشتر به متن و جدول ۱ مراجعه شود.

شکل ۵ نتایج تعیین ردیف DNA قطعه راهنمای همسانه سازی شده در پلاسمید کریسپر pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459)-V2-0 با درجه همخوانی تشابه ۱۰۰ درصد نشان می دهد. با توجه به نتایج حاصل، همسانه سازی قطعه راهنمای ژن LRRK2 بیماری پارکینسون در پلاسمید ویرایشی کریسپر در این مطالعه به وسیله آزمایشهای PCR و تعیین ردیف DNA اثبات شد (شکل های ۴ و ۵).



شکل ۵: نتایج تعیین ردیف DNA قطعه همسانه سازی شده راهنما مربوط به ژن LRRK2 بیماری پارکینسون در پلاسمید ویرایشی pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459)-V2-0 را نشان می دهد. درجه همخوانی تشابه ۱۰۰ درصد است که نشان دهنده همسانه سازی قطعه فوق است.

بحث

در پژوهش حاضر ابتدا پیش‌سازهای لازم برای قطعه ۲۰ جفت بازی dsDNA تولید کننده gRNA مخصوص ژن LRRK2 بیماری پارکینسون با استفاده از نرم افزارهای کامپیوتری طراحی شدند. پس از تشکیل قطعه دورشته‌ای راهنما، با استفاده از آنزیم برشگر BBS1 و آنزیم DNA لیگاز ناقل نو ترکیب (pSpCas9(BB)-2A-PuroPX459)-LRRK2 ساخته شد. عمل ترانسفورماسیون با کمک روش شوک حرارتی انجام و همسانه سازی قطعه راهنما در سلول‌های باکتری *E. coli DH5a* میزبان با موفقیت انجام شد. همسانه سازی با استفاده از روش PCR و تعیین ردیف DNA اثبات شد. ژن LRRK2 یکی از شایع‌ترین ژن‌های درگیر در بیماری پارکینسون می‌باشد. این بیماری یکی از مهم‌ترین اختلالات مزمن سیستم اعصاب مرکزی در انسان است که تاکنون هیچ درمان کاملی برای این بیماری پیدا نشده است (۲۶). بیان بیش از حد یا زیاد این پروتئین آثار تخریبی نرون‌ها را در مگس سرکه آشکار کرده است (۳۷). خاموش کردن این ژن ممکن است در بهبود بیماری مغزی-عصبی پارکینسون مفید واقع شود (۳۸). جهش‌های ژنتیکی بر روی ژن LRRK2 با استفاده از روش‌های ZFN، TALEN، CRISPR و حتی پیش بینی‌های بیوانفورماتیکی صورت گرفته است (۳۹،۴۰،۴۱،۴۲،۴۳،۴۴). این بررسی‌ها بر روی برخی ژن‌های دیگر بیماری پارکینسون و سایر بیماری‌های تحلیل برنده عصبی نیز انجام شده است. مثلاً با ایجاد جهش در ژن LRRK2 عملکرد و مسیر این ژن در بیماری پارکینسون مشخص شد (۴۷،۳۳). همچنین نتایج حاصل از عمل سیستم ZFN، برخی اثرات ضد جهشی بر روی ژن‌های میتوکندری را نشان داد. جهش در ژنوم میتوکندری نیز از جمله عوامل بیماری پارکینسون است (۴۱، ۴۸). استفاده از روشی راحت، مقرون به صرفه، سریع و اختصاصی همچون CRISPR جهت ایجاد تغییر ژنتیکی در ژن LRRK2 به‌عنوان یک گزینه داروی زیستی یا بیوتکنولوژی با هدف ژن‌درمانی بیماری پارکینسون و موارد مشابه می‌تواند مد نظر قرار گیرد.

تغییر ژنتیکی مواد ژنومی مبتنی بر سیستم ویرایش ژنی CRISPR با توجه به فاکتورهایی همچون هزینه پایین، دقت زیاد، کارایی مطلوب و سرعت بالا تاکنون موفقیت‌های زیادی حاصل کرده است (۴۹، ۵۰). از سیستم ویرایشی فوق جهت تخریب یا تغییر ژن‌های درگیر در بیماری‌های گوناگون از جمله انواع سرطان‌های مختلف مانند سرطان ریه و همچنین بیماری‌های سیستم عصبی مانند دیستروفی عضلانی، بیماری اسکروز جانبی آمیوتروفیک استفاده شده است (۴۳، ۵۰، ۴۴). در مقایسه سیستم‌های ویرایش ژنی همچون ZFN، TALEN و CRISPR، اگرچه نحوه عمل همه‌ی این سیستم‌ها یکسان است و با راه‌اندازی مکانیسم‌های ترمیم موجب ایجاد جهش در ژنوم می‌شوند، ولی سیستم CRISPR دارای مزایای بیشتری است. از لحاظ حساسیت به متیله بودن DNA، سیستم کریسپر به این تغییر در ژنوم حساس نیست و توانایی برش DNA متیله و غیرمتیله را دارد. در مقابل TALEN و ZNF به‌شدت به این تغییر حساس هستند و توانایی برش جایگاه متیله را ندارند. علاوه بر این، برای طراحی جایگاه‌های برش متفاوت، در سیستم کریسپر فقط یک قطعه‌ی ۲۰ نوکلوتیدی را می‌توان تغییر داد، در صورتی‌که این تغییر برای ZNF و TALEN در سطح پروتئین با تغییر اسید آمینه‌های دخیل در جایگاه تشخیصی سیستم امکان‌پذیر است. این فرایند زمان‌بر، همراه با هزینه بیشتر و پیچیده‌تر است (۵۱، ۵۲). در مقایسه جهش‌زایی سیستم‌های ZFN، TALEN و CRISPR در ژن بتاکازین گوساله و بز، میزان کارایی سیستم ZFN حدود ۷ درصد، سیستم TALEN حدود ۲۵ درصد و برای سیستم CRISPR حدود ۷۵ درصد مشخص شد (۵۳). مزیت و کارایی قدرت ترمیم روش CRISPR نسبت به دو روش دیگر با اثر بر روی ژن بتاگلوبین انسانی نیز مشاهده شد (۵۴). بهره‌وری بیشتر سیستم CRISPR حتی نسبت به روش‌های ویرایش ژنی همچون microRNA و siRNA به دلیل کارایی بالا، سادگی و کاربردهای چندگانه کلینیکی مورد تایید قرار گرفته است (۵۵). استفاده از روش CRISPR-Cas9 که در این مطالعه به‌طور کاملاً دقیق منجر به ایجاد ناقل نو ترکیب ژن LRRK2 دخیل در بیماری پارکینسون شد، می‌تواند روزنه امید برای درک

هرچه بهتر مکانیسم‌های دخیل در ایجاد بیماری، تولید حیوانات مدل و درمان احتمالی بیماری‌های مهمی از جمله پارکینسون باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به مزایای بسیار سودمند و کاربردی روش CRISPR در ویرایش ژنوم (Gene Targeting)، ساخت ناقل نو ترکیب کریسپیر ویژه ژن LRRK2 درگیر در بیماری عصبی پارکینسون که در این تحقیق انجام گرفت، می‌تواند در صورت توسعه و تکامل به‌عنوان یک گزینه مهم در امر ژن درمانی مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

نتایج مطالعه اخیر برگرفته از بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته ژنتیک خانم آزاده ثمره غلامی از دانشگاه شهید با هنر کرمان می‌باشد. بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی و فناوری دانشگاه متبوع قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, et al. CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science*. 2017; 315(5819): 1709-1712.
2. Mojica FJ, García-Martínez J, Soria E. Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. *J Mol Evol*. 2005;60(2): 174-182.
3. Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, et al. Small CRISPR RNAs Guide Antiviral Defense in Prokaryotes. *Science*. 2008; 321(5891): 960-964.
4. Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJ, et al. Evolution and Classification of the CRISPR-Cas Systems. *Nat Rev Microbiol*. 2011; 9(6): 467-77.
5. Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea. *Science*. 2010; 327(5962):167-170.
6. Westra ER, Swarts DC, Staals RHJ, Jore MM, et al. The CRISPRs, They Are A-changing': How Prokaryotes Generate Adaptive Immunity. *Annu Rev Genet*. 2012; 46: 311-339.
7. van der Oost J, Jore MM, Westra ER, Lundgren M, et al. CRISPR-Based Adaptive and Heritable Immunity in Prokaryotes. *Trends Biochem Sci*. 2009; 34(8): 401-407.
8. Babu M, Beloglazova N, Flick R, Graham C, et al. A Dual Function of the CRISPR-Cas System in Bacterial Antivirus Immunity and DNA Repair. *Mol Microbiol*. 2011; 79(2): 484-502.
9. Yosef I, Goren MG, Qimron U. Proteins and DNA Elements Essential for the CRISPR Adaptation Process in *Escherichiacoli*. *Nucleic Acids Res*. 2012; 12: 5569-5576.
10. Datsenko KA, Pougach K, Tikhonov A, Wanner BL, et al. Molecular Memory of Prior Infections Activates the CRISPR/Cas Adaptive Bacterial Immunity System. *Nat Commun*. 2012; 3: 945.
11. Carte J, Pfister NT, Compton MM, Terns RM, et al. MP. Binding and Cleavage of CRISPR RNA by Cas6. *RNA*. 2010; 16(11): 2181-2188.
12. Djordjevic M, Djordjevic M, Severinov K. CRISPR Transcript Processing: A Mechanism for Generating a Large Number of Small Interfering RNAs. *Biol Direct*. 2012; 7(1): 24.
13. Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, et al. CRISPR RNA Maturation by Trans-Encoded Small RNA and Host Factor RNase III. *Nature*. 2011; 741(7340): 602-607.
14. Burmistrz M, Pyrc K. CRISPR-Cas Systems in Prokaryotes. *Pol J Microbiol*. 2015; 64(3):193-202.

15. Mali P, Esvelt KM, Church GM. Cas9 as a Versatile Tool for Engineering Biology. *Nat Methods*. 2012; 10(10): 957-963.
16. Redman M, King A, Watson C, King D. What is CRISPR/Cas9. *Arch Dis Child Educ Pract Ed*. 2016; 101(4): 213-215.
17. Makarova KS, Grishin NV, Shabalina SA, Wolf YI, et al. A Putative RNA-Interference-Based Immune System in Prokaryotes: Computational Analysis of the Predicted Enzymatic Machinery, Functional Analogies with Eukaryotic RNAi, and Hypothetical Mechanisms of Action. *Biol Direct*. 2006; 1: 7.
18. Garneau JE, Dupuis MÈ, Villion M, Romero DA, et al. The CRISPR/Cas Bacterial Immune System Cleaves Bacteriophage and Plasmid DNA. *Nature*. 2010; 468(7320): 67-71.
19. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell*. 2014; 157(6): 1262-1278.
20. Sveinbjornsdottir, S. The clinical symptoms of Parkinson's disease. *J neurochem*. 2016; 139: 318-324.
21. Kalia LV, Lang AE. Parkinson's disease. *Lancet*. 2015; 386(9996): 896-912.
22. Bekris LM, Mata IF, Zabetian CP. The Genetics of Parkinson Disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol*. 2010; 23(4): 228-242.
23. Tarazi FI, Sahli ZT, Wolny M, Mousa SA. Emerging Therapies for Parkinson's Disease: From Bench to Bedside. *Pharmacol Ther*. 2014; 144(2): 123-133.
24. Gasser T. Update on the Genetics of Parkinson's Disease. *Mov Disord*. 2007; 22(17): 343-350.
25. Launer LJ, Berger K, Breteler MM, Dartigues JF, et al. Prevalence of Parkinson's Disease in Europe: A Collaborative Study of Population-Based Cohorts. *Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. Neurology*. 2000; 54(5): 21-23.
26. Savitt JM, Dawson VL, Dawson TM. Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: Molecules to Medicine. *J Clin Investig*. 2009; 116(7): 1744-1754.
27. Gasser T. Mendelian forms of Parkinson's Disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2009; 1792(7): 587-596.
28. Mastrangelo L. The Genetics of Parkinson Disease. *Adv Genet*. 2017; 98: 43-62.
29. Collier TJ, Kanaan NM, Kordower JH. Aging as a Primary Risk Factor for Parkinson's Disease: Evidence from Studies of Non-Human Primates. *Nat Rev Neurosci*. 2011; 12(6): 359-66.
30. Wood-Kaczmar A, Gandhi S, Wood NW. Understanding the Molecular Causes of Parkinson's Disease. *Trends Mol Med*. 2006; 12(11): 521-528.
31. Lin TK, Liou CW, Chen SD, Chuang YC, et al. Mitochondrial Dysfunction and Biogenesis in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Chang Gung Med J*. 2009; 32(6): 589-599.
32. Willis AW, Evanoff BA, Lian M, Galarza A, et al. Metal Emissions and Urban Incident Parkinson Disease: A Community Health Study of Medicare Beneficiaries by Using Geographic Information Systems. *Am J Epidemiol*. 2009; 172(12): 1357-1363.
33. Xiaobing Q, Walter J, Jarazo J, Arias-Fuenzalida J, et al. CRISPR/Cas9 and piggyBac-mediated footprint-free LRRK2-G2019S knock-in reveals neuronal complexity phenotypes and α -Synuclein modulation in dopaminergic neurons. *Stem Cell Res*. 2017; 24: 44-50.
34. Yoichi Imaizumi, Okano H. 2014. Modeling human neurological disorders with Induced Pluripotent stem cells. *J. of Neurochemis*. 2014; 129(3): 388-399.
35. Artyukhova MA, Tyurina YY, Chu CT, Zharikova TM, et al. Interrogating Parkinson's disease associated redox targets: Potential application of CRISPR editing. *Free Radical Biol. and Medicine*. 2019; 144: 279-292.
36. Nivya Kolli, Lu M, Maiti P, Rossignol J, et al. Application of the gene editing tool, CRISPR-Cas9, for treating neurodegenerative diseases. *Neurochem Int*. 2017; 112: 187-196.

37. Liu Z, Wang X, Yu YI, Li X, et al. A Drosophila Model for LRRK2-linked Parkinsonism. *Proc Natl Acad Sci India Sect B Biol Sci.* 2008; 105(7): 2693-2698.
38. Greggio E, Jain S, Kingsbury A, Bandopadhyay R, et al. Kinase Activity Is Required for the Toxic Effects of Mutant LRRK2/Dardarin. *Neurobiol Dis.* 2006; 23(2): 329-341.
39. Ashish KA, George Priya C, Doss, Siva R, Magesh R, et al. Molecular insights of the G2019S substitution in LRRK2 kinase domain associated with Parkinson's disease: A molecular dynamics simulation approach. *J Theoretical Biol.* 2019; 496: 163-171.
40. Senthilkumar SK, Xiong Y, Lee Y, Lawless ML, et al. LRRK2 G2019S transgenic mice display increased susceptibility to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-mediated neurotoxicity. *J Chem Neuroana.* 2016; 76(Pt B): 90-97.
41. Howlett EH, Jensen N, Belmonte F, Zafar F, et al. LRRK2 G2019S-induced mitochondrial DNA damage is LRRK2 kinase dependent and inhibition restores mtDNA integrity in Parkinson's disease. *Hum Mol Genet.* 2017; 26(22):4340-4351.
42. Cota-Coronado JA, Sandoval-Ávila S, Gaytan-Dávila YP, Diaz NF, et al. Nuevos modelos transgénicos para el estudio de la enfermedad de Parkinson basados en sistemas de edición con nucleasas. *Neurologia.* 2017; 1-14.
43. Hueng-Chuen F, Chi CS, Lee YG, Tsai JD, et al. The Role of Gene Editing in Neurodegenerative Diseases. *Cell Transplan.* 2018; 27(3): 364-378.
44. Scott CV, Babinski A, Tran N, To S, et al. In Vitro CRISPR/Cas9-Directed Gene Editing to Model LRRK2 G2019S Parkinson's Disease in Common Marmosets. *Sci Rep.* 2020; 10:3447.
45. Reinhardt P, Schmid B, Burbulla LF, Schöndorf DC, et al. Genetic correction of a LRRK2 mutation in human iPSCs links parkinsonian neurodegeneration to ERK-dependent changes in gene expression. *Cell Stem Cell.* 2013; 12(3): 354-367.
46. Marrone L, Bus C, Schöndorf D, Fitzgerald JC, et al. Generation of iPSCs carrying a common LRRK2 risk allele for in vitro modeling of idiopathic Parkinson's disease. *PloS one.* 2018; 13(3): p. e0192497.
47. Purllyte E, Dhekne HS, Sarhan AR, Gomez R, et al. Rab29 activation of the Parkinson's disease-associated LRRK2 kinase. *EMBO J.* 2018; 37(1): 1-18.
48. Laurie H. Sanders, Laganière J, Cooper O, et al. LRRK2 mutations cause mitochondrial DNA damage in iPSC-derived neural cells from Parkinson's disease patients: Reversal by gene correction. *Neurobiol Dis.* 2014; 62: 381-6.
49. Heidenreich M, Zhang F. Applications of CRISPR-Cas Systems in Neuroscience. *Nat Rev Neurosci.* 2016; 17(1): 36-44.
50. Sachdeva M, Sachdeva N, Pal M, Gupta N, et al. Majumdar M, Tiwari A. CRISPR/Cas9: Molecular Tool for Gene Therapy to Target Genome and Epigenome in the Treatment of Lung Cancer. *Cancer Gene Ther.* 2015; 22(11): 509-517.
51. Thomas Gaj, Gersbach CA, Barbas CF III. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.* 2013; 31(7): 397-406.
52. Wang S, Peng Z, Wang S, Yang L, et al. KRAB-type zinc-finger proteins PITA and PISA specifically regulate p53-dependent glycolysis and mitochondrial respiration. *Cell Res.* 2018; 28(5): 572-592.
53. Liu H, Chang L, Yu-hang Z, Xue-jie H, et al. Comparing successful gene knock-in efficiencies of CRISPR/Cas9 with ZFNs and TALENs gene editing systems in bovine and dairy goat fetal fibroblasts. *J of Integra Agricul.* 2018; 17(2): 406-414.
54. Eli JF, Hendel A, Kildebeck EJ, Caleb M, et al. A Comparison of Repair Pathway Choice between ZFNs, TALENs, and CRISPRs at Endogenous Loci via Simultaneous Measurement of NHEJ and HDR Using SMRT Sequencing. *Molecular Therapy.* 2014; 22: S34.

55. Sikandar Hayat Khan. 2019. Genome-Editing Technologies: Concept, Pros, and Cons of Various Genome-Editing Techniques and Bioethical Concerns for Clinical Application. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2019; 16: 326-334.

Design and Construction of Recombinant CRISPR Vector Harboring LRRK2 Gene for Parkinson's Disease

Samare Gholami A, M.SC¹, Sasan HA, Ph.D^{1,*}, Hashemabadi M, Ph.D².

Ravan H Ph.D¹.

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, KerAman, Iran

2. Ph.D student, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

* Email corresponding author: hsasa@uk.ac.ir

Received: 13 Nov. 2019

Accepted: 29 Feb. 2020

Abstract

Aim: In this study, the alteration of the Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) gene, as the most important gene involved in Parkinson's disease, was investigated using CRISPR-Cas editing technology.

Material and methods: Cloning the guide molecules of interest was performed using of gRNA CRISPR cloning kit (Catalog No. C8324K, Zaver Zist Azema). Two sets of forward and reversed gRNA oligonucleotides for exon 41 of the LRRK2 gene were designed using the CHOPCHOP CRISPR guide gRNA designing web software. Double-stranded DNA molecules were made according to standard instructions in the laboratory. 20 base-pair DNA segments were used to generate RNA-Cas-9 enzyme complex and then ligated into the Px459 CRISPR eukaryotic expression vector using Fermentas DNA ligase enzyme. Recombinant plasmids were transformed into E. coli DH5a host competent cells using of heat shock method.

Results: findings by multiple PCR experiments and also DNA sequencing blast analysis showed successful cloning the segments of interest into CRISPR plasmids. Clear PCR bands were in agreement with expected values and DNA sequencing results showed 100% similarity.

Conclusion: According to the results, development of CRISPR vector system may be used as a wide and powerful tool for editing and alteration of many encountered genes in different diseases such as Parkinson's disease.

Key Words: CRISPR, Parkinson's disease, LRRK2 gene