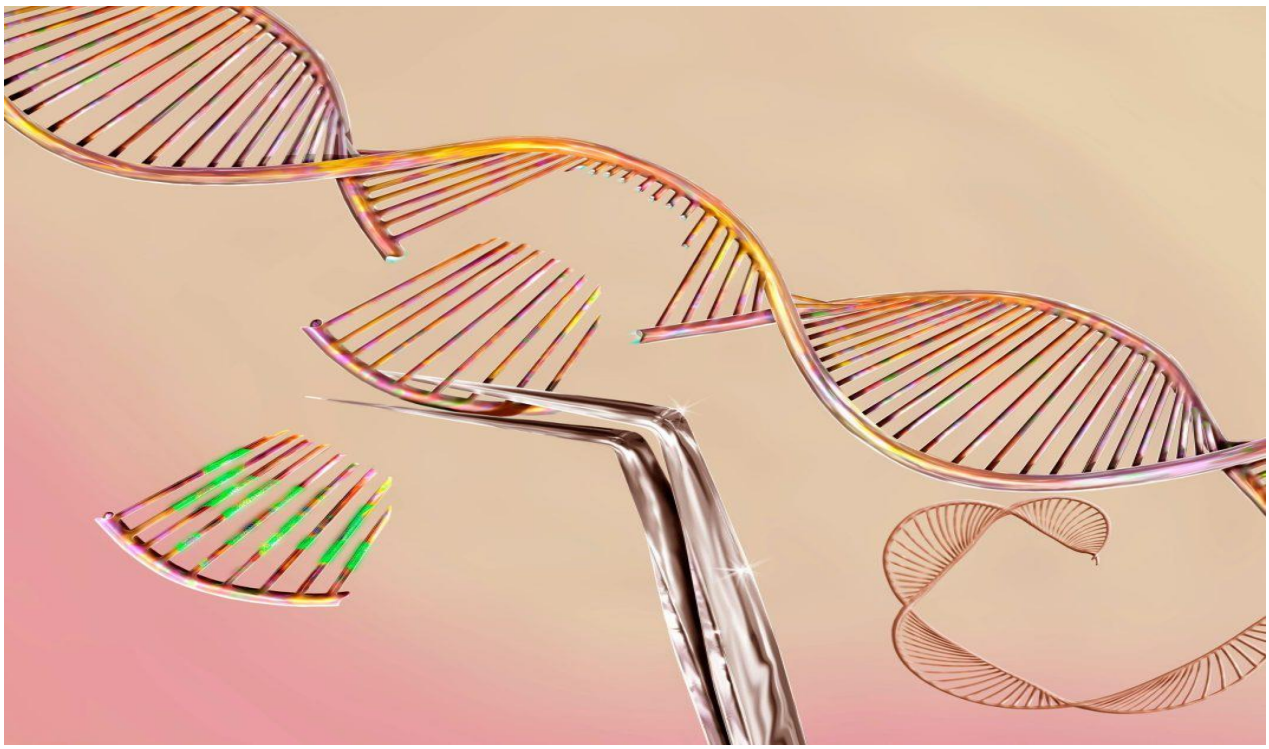
(دکتر مریم اسلامی)

وسایل و ابزارهای ویرایش ژن

Mining (and Refining) the Stuff of Gene Editing Tools

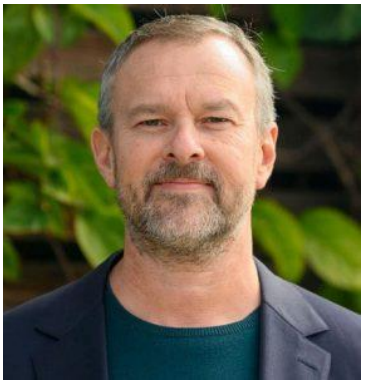


دنیای ویرایش ژن توسط سیستم برنده جایزه نوبل CRISPR-Cas9 متحول شده است. اگرچه CRISPR-Cas9 مزایایی را نسبت به روش‌های قبلی ویرایش ژنوم ارائه می‌دهد، اما لزوماً آخرین کلمه نیست. در واقع، دهه گذشته محدودیت‌های CRISPR-Cas9 را آشکار کرده است، که نمی‌تواند با انواع مختلف اختلالات در توالی DNA زمینه‌ای بیماری ژنتیکی مقابله کند. از آنجایی که راه حل یکسانی برای ویرایش ژن وجود ندارد، شرکت‌های بیوتکنولوژی برای استخراج طبیعت به منظور شناسایی هسته‌های اضافی CRISPR و ایجاد پلتفرم‌های انعطاف‌پذیرتر برای ویرایش ژنوم، بر اساس CRISPR ایجاد می‌کنند.

جست‌وجوی هسته‌ها

شرکت بیوتکنولوژی Metagenomi به جای منتظر ماندن منفعلانه برای تازگی، فعالانه به دنبال آن است. دکتر برایان توماس، بنیانگذار و مدیر عامل شرکت، می گوید: «هر سه ماهه به مکان های متعددی می رویم و از محیط نمونه برداری می کنیم. "این به ما امکان می دهد تا به زندگی در این سیاره که ما نمی دانستیم وجود دارد و هرگز مطالعه نکرده ایم، دسترسی پیدا کنیم."

توماس نزدیک به 18 سال را در تحقیقات دانشگاهی در دانشگاه برکلی گذراند. برای 10 سال از آن سال ها، او با جیلیان بانفیلد، دکترا، استاد علوم زمین و سیاره شناسی و استاد علوم محیطی، سیاست گذاری و مدیریت کار کرد. زمانی که توماس در گروه بانفیلد بود، در بیش از 100 نشریه در فضای متاژنومیکس/میکروبیوم مشارکت داشت.



Brian Thomas, PhD

Metagenomi

اخیراً، این تجربه به فناوری پلتفرم کشف و تخصص تحلیلی Metagenomi کمک کرده است. با ترکیب اطلاعات متاژنومی، این شرکت می تواند ماشین آلات سلولی جدید را شناسایی کند. سپس شرکت می تواند یافته های خود را با ابزارهای درمانی تطبیق دهد.

توماس استدلال می کند که نمونه های بالقوه زیادی در محیط طبیعی وجود دارد که Metagenomi می تواند مجموعه نمونه های خود را بر اساس ویژگی های خاصی از موجودات اولویت بندی کند. به عنوان مثال، اگر این شرکت به مکانیسم‌های دفاعی ویروسی شبیه CRISPR علاقه داشت، می‌توانست بر روی گرفتن نمونه‌های طبیعی از مناطقی که بار

ویروسی بالایی دارند تمرکز کند. به گفته توماس، انجام این کار، شانس Metagenomi را برای یافتن چیزی شبیه به CRISPR افزایش می دهد.

اما اگر کسی می‌خواهد نوکلئازهای جدیدی به دست آورد، نیازی به جستجو در داده‌های خصوصی که از نمونه‌هایی که به سختی به دست آمده‌اند، یعنی نمونه‌هایی که از نقاط دوردست جهان جمع‌آوری شده‌اند، بگردید. در عوض، می‌توان از منابع داده‌ای در دسترس عموم استفاده کرد که عظیم و پربار هستند. رویکرد کمتر مشایی مورد علاقه Arbor Biotechnologies است، یک شرکت ویرایش ژن نسل بعدی که توسط فنگ ژانگ، دکترای موسسه براد، دکتر دیوید آر. والت از موسسه Wyss، و دو فارغ التحصیل آزمایشگاه ژانگ، دیوید اسکات، دکترا، و وینستون تاسیس شده است. Yan, MD, PhD.

دیوید چنگ، مدیر ارشد فناوری در Arbor Biotechnologies می‌گوید: «مزیت مجموعه داده‌های عمومی این است که توالی‌بندی‌های زیادی در دنیا در حال انجام است. «تعداد زیادی از تلاش‌های ترتیب‌دهی در مکان‌های عمومی سپرده می‌شوند که آن را برای جمع‌آوری و حاشیه‌نویسی در دسترس ما قرار می‌دهند.»

الک کردن برای ویژگی های خاص نوکلئاز

فهرستی از هزاران نوکلئاز فرضی، چه از داده‌های خصوصی و چه از داده‌های عمومی، نقطه شروع خوبی است، اما با داشتن یک نوکلئاز جدید آماده برای سلول‌های انسانی فاصله زیادی دارد. برای شناسایی امیدوارکننده‌ترین نوکلئازها در حین تجزیه مقادیر عظیم داده‌های توالی ژنوم، Metagenomi و Arbor Biotechnologies هسته‌هایی را که به نظر می‌رسد دارای ویژگی‌های خاصی هستند، علامت‌گذاری می‌کنند.

یکی از ویژگی‌های نوکلئاز که توسط هر دو شرکت ارزشمند است، توانایی هدف‌گیری نقطه مناسب در یک توالی DNA است. این ویژگی به چیزی بیش از RNA راهنما بستگی دارد. در مجاورت محل هدف، باید یک موتیف مجاور پروتوسپیسر ((PAMمتناظر وجود داشته باشد - یک توالی DNA کوتاه (معمولاً دو تا شش جفت باز به طول) که ناحیه DNA هدف‌گذاری شده برای برش توسط یک هسته را دنبال می‌کند.

توماس توضیح می دهد: "توالی PAM بخشی از ساختار فعال آنزیم است." «اگر ساختار فعال درستی نداشته باشید، Cas9 قطع نمی‌شود. بنابراین، به نوکلئازهای مختلف با PAMهای خاص برای توضیح تنوع در توالی در کنار سایت‌های ویرایش برای هدف قرار دادن نقطه مناسب DNA نیاز است.

علاوه بر قابلیت هدف گیری، یک ویژگی مهم، نوع برش هسته است. چنگ خاطرنشان می‌کند: «به عنوان مثال، اگر فردی در تلاش است تا یک اکسیزیون انجام دهد، پس داشتن هسته‌هایی که به روش‌های کمی متفاوت بریده می‌شوند تا نتایج ویرایش کمی متفاوت داشته باشند، می‌تواند منجر به تنوع بیشتر شود. بنابراین، این می‌تواند به ما [فرصتی] بدهد تا هسته‌ای مناسب را برای یک برنامه کاربردی انتخاب کنیم.»

اثرات خارج از هدف یکی دیگر از خصوصیات حیاتی نوکلئازهای احتمالی است. توماس اصرار دارد: «یکی از نگرانی‌هایی که در مورد این فناوری جدید وجود دارد ایمنی است. این چیزها با ژنوم‌ها در تعامل خواهند بود و ما می‌خواهیم مطمئن شویم که آنها این کار را به روشی کنترل‌شده انجام می‌دهند.»

از آنجایی که تحویل بخش کلیدی ویرایش ژن است، Metagenomi و Arbor Biotechnologies آنزیم های کوچک را غربالگری و اولویت بندی کرده اند. توماس می گوید: «این توانایی ما را برای فکر کردن به محدودیت های بسته بندی در سیستم های تحویل فعلی آزاد می کند. اما همچنین، وقتی به تولید فکر می کنید، مزایایی نیز وجود دارد. یک مولکول طولانی تر طول می کشد و هزینه بیشتری دارد. و هنگامی که یک پروتئین خارجی را در سلول پستانداران قرار می دهید، بین اندازه و سمیت خود مولکول همبستگی وجود دارد.

در رابطه با روش تحویل، دکتر جان مورفی، مدیر ارشد علمی Arbor Biotechnologies، می‌گوید که نوکلئازها و راهنماهای نوکلئاز را می‌توان به شکل mRNA تحویل داد و وسیله نقلیه تحویل می‌تواند یک نانوذره لیپیدی باشد. بنابراین، تحویل نوکلئاز می‌تواند شبیه تحویل پروتئین اسپایک باشد که توسط واکسن‌های SARS-CoV-2 مبتنی بر mRNA حاصل می‌شود. با این حال، روش های تحویل جایگزین ممکن است ارجح باشد. همانطور که مورفی اشاره می کند، با نوکلئازهای کوچک، سیستم های انتقال مانند ناقل های ویروسی مرتبط با آدنو در دسترس می شوند.

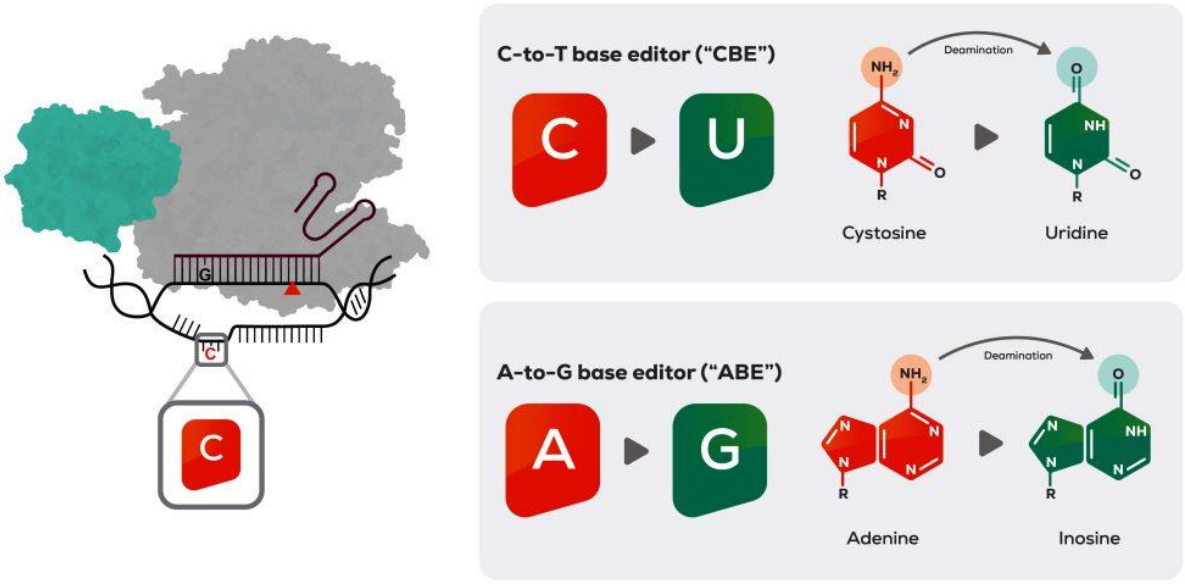
بالا بردن پایه، پیش‌بینی زمان اصلی

برای دستیابی به موفقیت در ویرایش ژن، همه مجبور نیستند از هسته های عجیب و غریب استفاده کنند. برخی از آنها به کار با نوکلئازهای آشنا، از جمله CRISPR-Cas9 قدیمی، راضی هستند. به عنوان مثال، Prime Medicine CRISPR-Cas9 را طوری اصلاح کرده است که به جای ایجاد شکاف های دو رشته ای در DNA، DNA را جدا می کند. "نیکاز" به یک ترانس کریپتاز معکوس مهندسی شده ادغام می شود، که منجر به سیستمی می شود که از رویکرد جستجو و جایگزینی پیروی می کند و قادر به معرفی جهش های نقطه ای است. اساساً این سیستم شکل پیشرفته ای از ویرایش پایه را ارائه می دهد. می تواند همه 12 تعویض تک پایه ممکن را معرفی کند.

Prime Medicine توسط David R. Liu، دکترا، و Andrew Anzalone، MD، PhD، تأسیس شد که زمانی که هنوز در آزمایشگاه Liu’s Broad Institute بودند، شروع به توسعه رویکرد جستجو و جایگزینی خود کردند. در پایان ماه سپتامبر، Prime Medicine فاش کرد که قصد دارد به صورت عمومی عرضه شود. بر اساس گزارش رنسانس کپیتال، عرضه اولیه اولیه پرایم مدیسین می تواند به 200 میلیون دلار برسد که مبلغ هنگفتی برای عرضه اولیه اولیه در بازاری چالش برانگیز است.

از دیگر طرفداران ویرایش پایه می توان به Beam Therapeutics اشاره کرد. به گفته مدیر عامل این شرکت، جان ایوانز، ویرایش پایه بهترین داروی دقیق است. ایوانز در نشست مجازی ایالت بیوتکنولوژی که توسط GEN Edge میزبانی شد، گفت: «در اینجا ما در حال ایجاد تغییراتی در سطح بنیادی اطلاعات در ژنوم هستیم که یک پایه واحد است. این بهتر از یک مولکول کوچک است. این یک پلت فرم است.» او مشاهده کرد که فناوری ویرایش پایه در حال حاضر از شاهکار تغییر پایه های منفرد پیشی گرفته است. اکنون می توان چندین سایت را به طور همزمان ویرایش کرد و انواع مختلف ویرایش ها را برای کمک به درمان بیماری ترکیب کرد. او همچنین پیشنهاد کرد که ویرایش چندگانه می‌تواند کم و بیش شدید باشد و به داروهای مختلفی اجازه می‌دهد تا نتایج سم‌شناسی، بسته‌های نظارتی و ویژگی‌های بالینی مشابهی را ارائه دهند.

ایوانز معتقد است که با ابزارهایی مانند ویرایش پایه، وعده کمک به هر چه بیشتر مردم باز شده است. ایوانز خاطرنشان کرد: «ویرایش پایه یکی از اشکال جدیدتر ویرایش است. این نشانه پیشرفت در این زمینه است. ما به توسعه این ابزارها ادامه می دهیم."



سیستم‌های ویرایشگر پایه، نوعی از فناوری ویرایش ژن CRISPR-Cas9 را در خود جای می‌دهند که می‌تواند جهش‌های نقطه‌ای را در DNA بدون ایجاد شکستگی‌های دو رشته‌ای معرفی کند.

این سیستم‌ها همه کاره هستند و راهبردهای ویرایش ژن مانند اصلاح، اصلاح، فعال‌سازی و خاموش کردن را ممکن می‌سازند.

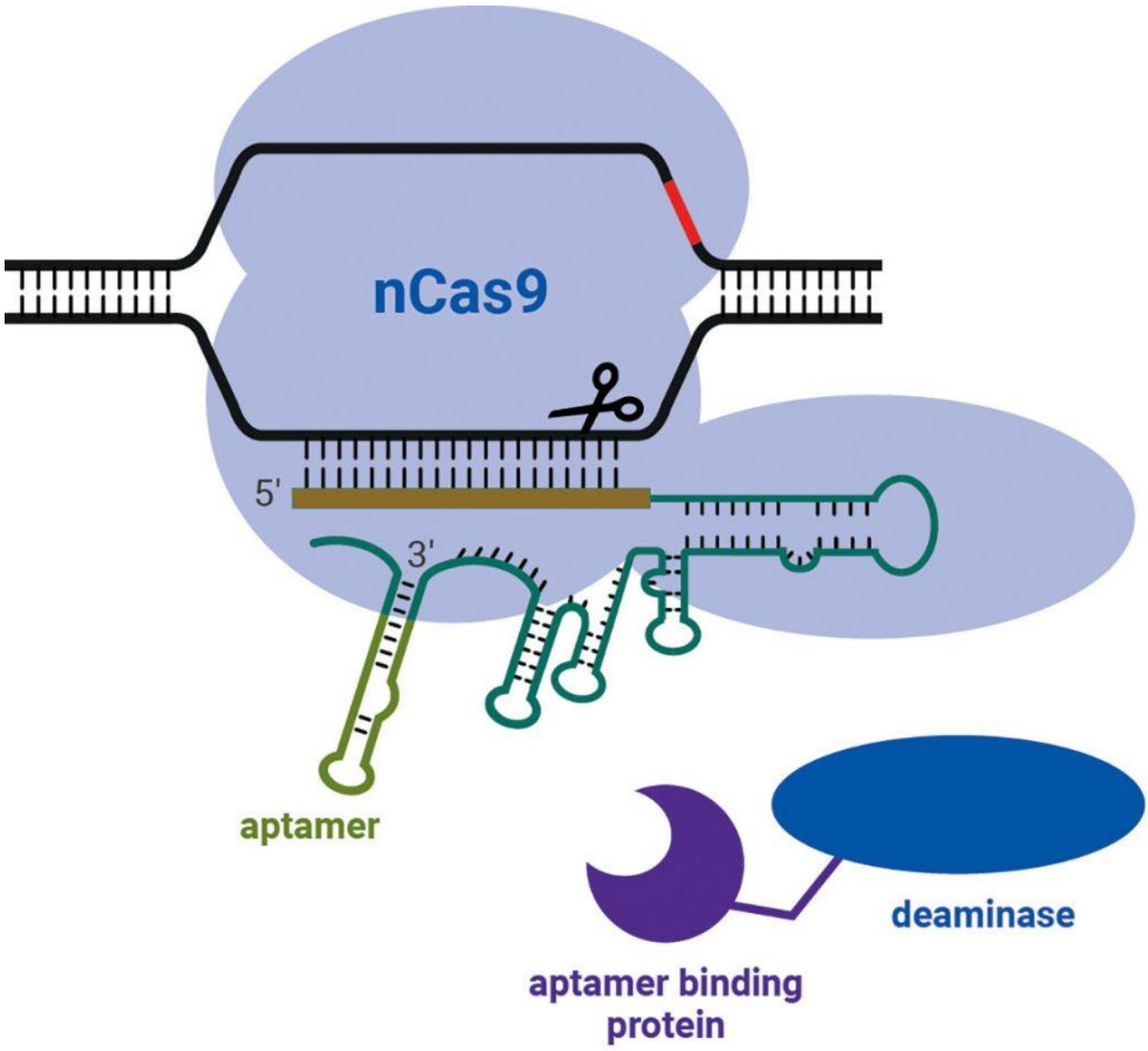
در Beam Therapeutics، فناوری‌های ویرایش پایه برای تولید داروهای ژنتیکی دقیق توسعه یافته‌اند.

فن‌آوری‌های این شرکت شامل ویرایشگر پایه سیتوزین (یعنی ویرایشگر پایه سیتوزین به تیمین یا C-to-T) و ویرایشگر پایه آدنین (یعنی آدنین به گوانین یا A-to-G)، ویرایشگر پایه).

یکی دیگر از شرکت های ویرایش ژن که در فضای ویرایش پایه کار می کند، PerkinElmer’s Horizon Discovery است. Horizon Discovery از IP دارای مجوز انحصاری از دانشگاه راتگرز برای یک ویرایشگر پایه جدید استفاده می کند که بخشی از سیستم Pin-point این شرکت است.

میشل فریزر، مدیر واحد تجاری، ویرایش پایه، می‌گوید: «این مانند سایر ویرایشگرهای پایه موجود در بازار نیست، و تفاوت اصلی این است که نیکاز Cas9 به دآمیناز مورد نیاز برای تبدیل نوکلئوتید ادغام نشده است. پرکین المر. "این مهم است [زیرا شما اکنون] یک سیستم مدولار دارید. بنابراین، می‌توانید آنزیم‌های Cas و دآمیناز‌های انتخابی را بسته به جایی که می‌خواهید ویرایش کنید، بهینه کنید.

نیکاز و دآمیناز با هم برای هدف قرار دادن DNA توسط RNA راهنما که یک آپتامر متصل به آن دارد که با دامنه اتصال آپتامر روی دآمیناز مطابقت دارد، به کار گرفته می‌شوند. فریزر خاطرنشان می کند: «جداسازی نیکاز و دآمیناز به ما این امکان را می دهد که یک ناک-این و یک ناک اوت همه را در یک ویرایش در یک واکنش انجام دهیم. ما می‌توانیم ویرایش چندگانه را مانند ویرایشگرهای پایه انجام دهیم، اما همچنین می‌توانیم ضربه بزنیم.» به عنوان اثبات مفهوم، Horizon Discovery یک CAR را همزمان با حذف همه نشانگرهای ایمنی در سلول T برای ساخت یک سلول CAR T معرفی کرده است.



ویرایشگرهای پایه یک عنصر هدفمند DNA و یک عنصر ویرایشگر DNA را ترکیب می کنند. نوع اولی معمولاً یک Cas9 دارای نقص هسته‌دار با gRNA است (dCas9 یا nCas9)دومی یک آنزیم ویرایشگر پایه است. این عناصر ممکن است با هم ترکیب شوند، یا ممکن است جدا نگه داشته شوند و در صورت نیاز از طریق یک برهمکنش آپتامر به هم متصل شوند. گزینه آپتامر توسط Horizon Discovery برای سیستم Pin-point آن انتخاب شده است. با استفاده از Pin-point، gRNA به گونه‌ای مهندسی شده است که شامل یک آپتامر RNA باشد، که با یک پروتئین اتصال دهنده آپتامر، که به یک پروتئین مؤثر (مانند دآمیناز نشان داده شده در اینجا) ذوب می‌شود، برهم‌کنش می‌کند. این رویکرد امکان پیکربندی مجدد راحت اجزای سیستم را فراهم می کند.

نیمی از معادله

ابزارهای هسته ای تنها نیمی از انقلاب ویرایش ژنوم است که توسط CRISPR راه اندازی شده است. نیمی دیگر مربوط به عوامل مرتبط با CRISPR مانند ترانسپوزازها است.

دوین اسمیت، دکترا، مدیر عامل Arbor Biotechnologies می گوید: «ما هسته را به عنوان یک شاسی کلیدی در جعبه ابزار [ویرایش ژن] می بینیم. سپس می‌توانید عوامل یا هر کاری را که می‌خواهید با آن هسته انجام دهید اضافه یا حذف کنید تا DNA را در جایی که نیاز به ویرایش دارید ویرایش کنید.» آربور بیو مورفی می‌افزاید که ترانسپوزازها «سیستم‌های تکامل‌یافته‌ای هستند که در آن سیستم جابجایی یک Cas را برای وارد کردن دقیق محموله‌های بزرگ در DNA انتخاب کرده است».

در پایان روز، ابزار CRISPR، چه یک هسته یا یک عامل، باید با کاربرد یا درمانی مطابقت داشته باشد. هر بیماری ژنتیکی تعریف شده (و احتمالاً هر گروه مجزا از بیماران مبتلا به آن بیماری) ممکن است نیاز به توسعه سیستم های سفارشی CRISPR به عنوان درمان داشته باشد. برای پاسخگویی به تماس، ابتدا باید کل جعبه ابزار را پیش روی خود داشته باشیم.

Devyn Smith, PhD Arbor Biotechnologies

Michelle Fraser PerkinElme

John Evans Beam Therapeutics

John Murphy, PhD Arbor Biotechnologies

Davd Cheng Arbor Biotechnologies

https://www.genengnews.com/topics/genome-editing/mining-and-refining-the-stuff-of-gene-editing-tools/