ورقة بحثية مجلة مفتوحة

تقنية كريسبر واستخدامها الواعد في العلاج الجيني

ميرا سليمان*، د. صفاء دلا**

**(كلية الصيدلة ، جامعة المنارة

البريد الإلكتروني: safaadalla@hotmail.de, mira.a.suliman@gmail.com)

الملخص

بعد الاكتشافات الهامة لبنية المادة الوراثية ودورها في كل مايعمل ويظهر عند الكائن الحي، بدأ العمل على استهداف المادة الوراثية بتقنيات الهندسة الوراثية لتحسين صفات أو وظائف محددة. ليس في مجال التحسين فقط بل وصلت الأبحاث إلى إضافة صفات جديدة لكائن ما من خلال إدخال مورثة ما إلى جينوم هذا الكائن أو التعديل على عمل مورثة ما لعلاج حالة مرضية وراثية. واجهت التقنيات في بدايتها العديد من التحديات من حيث الدقة وفشلت في تأمين الاستمرارية المطلوبة كما أنها أدت في بعض الأحيان إلى طفرات خطيرة. وفي ظل الجهود والدراسات وتطوير الأبحاث المرتبطة بهذا المجال، ظهرت تقنية كريسبر التي أعادت الأمل لمبدأ التعديل والعلاج الجيني. تعتبر تقنية كريسبر الأكثر حداثة في مجال التعديل والعلاج الجيني حيث تسمح باستهداف مورثة معينة ضمن كائن حي وإجراء التعديل الجيني على هذه المورثة لإيقاف تعبيرها الجيني أو تخفيضه. وكما هو الحال في الكثير من الاكتشافات في مجال البيولوجية الجزيئية فإن الفضل الحقيقي لظهور هذه التقانة يعود للمخترع الأساسي والعقل المدبر ألا وهو البكتيريا.

كلمات مفتاحية – كريسبر، كريسبر اكاس9 ، تعديل جيني ، علاج جيني.

I. مقدمة

الجينات عبارة عن تسلسلات نكليوتيدية مرمزة لبروتينات معينة، مختلفة عن بعضها البعض بعدد النكليوتيدات ونوعها. يمتلك البشر عشرات الآلاف من الجينات التي تحمل على الحمض النووي المنقوص الأوكسجين (DNA) المتكون من سلسلتين من النكليوتيدات ملتفتين حول بعضهما بشكل حلزوني. لكل شخص نسخته الخاصة من الـ DNA التي تميزه عن غيره من البشر هذه النسخة مسؤولة عن التكاثر والاستمرار والوظائف بالإضافة إلى دورها الأساسي في صحة الانسان واستعداده لكثير من الأمراض [5].

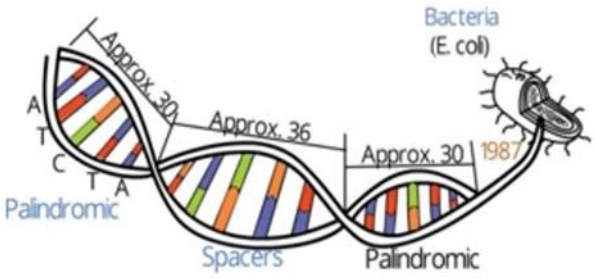
مع تقدم العلم اكتشف الباحثون ان عدداً كبيراً من الأمراض سببها طفرات وراثية أو وجود استعداد وراثي معين عند المرضى. بفضل التقنيات الحديثة وأهمها الـDNA Sequencing تم تحديد التسلسل الوراثي للعديد من الجينات التي تلعب دوراً في إحداث الأمراض [6].

طور العلماء آليات الهندسة الوراثية لتعديل الجينات المرضية ومنها استعمال الفيروسات المعدلة وراثياً التي تعد أفضل ناقل مورثي من خلال إدراج مادتها الوراثية داخل المادة الوراثية للمضيف وسيطرتها على مصنع البروتين فيها [5].

قام العلماء بهندسة الفيروسات وراثياً وتحميلها جينات سليمة مرغوبة وتعطيل قدرتها على إحداث المرض وبالفعل نجحت الطريقة، ولكن مع الأسف فإن قلة دقتها شكلت عائق كبير أمام استخدامها حيث أن هذه الفيروسات قد تقوم بإدراج الجينات العلاجية في مكان خاطئ محدثةً طفرات قد تكون خطيرة. ومن هنا أتت الحاجة لتطوير آليات جديدة للتعديل الجيني تضمن الدقة في الاستهداف وتساهم بنتائج دائمة وسليمة [3].

II. اكتشاف تقنية كريسبر

بدأ الأمر في عام 1987 عندما اكتشف مجموعة من العلماء اليابانيين تسلسلات نكليوتيدية غريبة ضمن DNA جراثيم العصيات القولونية. تميزت تلك التسلسلات بأنها متناظرة وكل تسلسل منها مكون من حوالي 30 أساس آزوتي يفصل بينها فواصل (spacers) مؤلفة كحد اقصى من 36 أساس آزوتي. لم يستطع العلماء وقتها تحديد ماهية تلك التسلسلات (الشكل 1)



الشكل 1. شكل يوضح التسلسلات المتناظرة على دنا الجراثيم.

لاحقاً خلال عام 1990 قام العالم الاسباني فرانسيسكو موهيكا بملاحظة تلك التسلسلات ودراستها في بدائيات النوى حيث أطلق عليها مسمى CRISPR

Clustered regularly interspaced short) (palindromic repeats

أي التكرارات العنقودية المتناظرة القصيرة منتظمة التباعد.

وهنا قام العالم موهيكا باستخلاص تلك الفواصل وتحليلها باستخدام تقنية Blast للتحليل [5].

وفي ظل تلك الدراسات المكثفة اكتشف موهيكا أن تلك التسلسلات تتطابق تماماً مع تلك العائدة لفيروسات العاثيات التي تغزو الجراثيم مما جعله يتوصل لاحقاً لمعرفة أن تلك التسلسلات هي عبارة عن الآليات المناعية للبكتيريا في الدفاع عن نفسها ضد الفيروسات. عندما يقوم الفيروس بغزو الخلية الجرثومية فإنه يحقن حمضه النووي داخلها مما يمكنه من التكاثر بأعداد كبيرة ضمنها تؤدي الى قتل الخلية الجرثومية. تلك العملية تحفز البكتيريا على تفعيل نظامها المناعي الأقوى ألا وهو كريسبر، لتقوم بعدها بجمع قطع من الحمض النووي لذلك لفيروس، ومن ثم تخزين تلك الشيفرة في أرشيف يدعى "كريسبر" محمل على جينوم البكتيريا، يتألف من التتاليات النكليوتيدية المخزنة الخاصة بالفيروس [5].

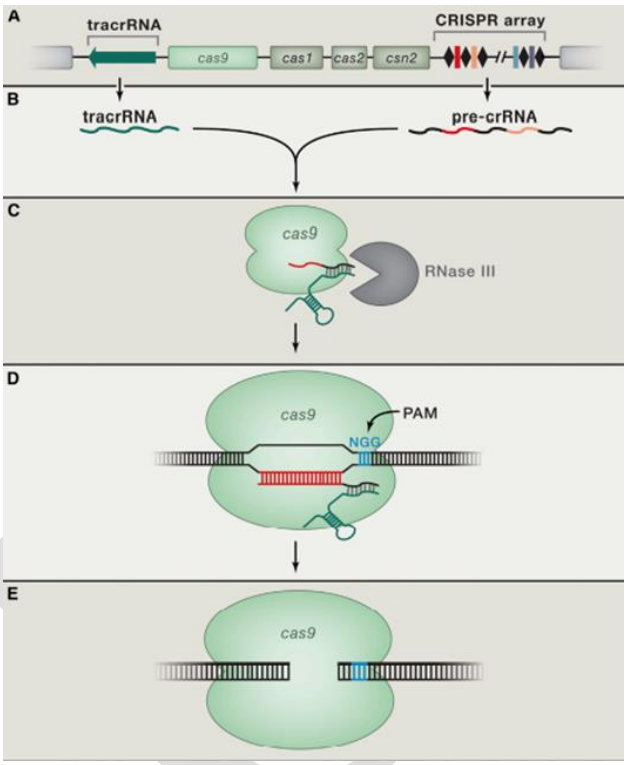
كما يحوي أيضا جينوم البكتيريا على جين يعبر عن جزيء tracr RNA يكمن دوره في تثبيت جزيء crRNA في مكانه (الشكل 2).

كما يحوي جينات تدعى Cas مرمزة لأنزيمات تلعب دوران اساسيان هما:

1. دور أنزيمات helicase التي تقوم بشطر الروابط الهيدروجينية بين سلسلتي DNA.
2. دور أنزيمات nuclease التي تقطع سلاسل DNA.

عند تعرض البكتيريا لفيروس مماثل مرة أخرى، تقوم بنسخ الحمض النووي المخزن في كريسبر على هيئة RNA، يسمى crRNA الذي سيشكل معقد مع انزيم الـ cas9 و جزيء tracr RNA هذا المعقد (crRNA+Cas9 +tracr RNA) سيبدأ بالتحري عن تتاليات DNA المطابق لتتاليات الفواصل(التتالي النكليوتيدي الخاص بالفيروس) ليقوم بقصه وتدميره من خلال الارتباط بمستقبل خاص هذا الارتباط يتم بمساعدة جزيئة PAM التي تعمل كقبضة جزيئية تساعد بروتين الـ cas9 على التثبت على الموقع الهدف (الشكل 2).

يمتلك أنزيم الـ cas9 موقعين يستطيع من خلالهما بشكل مثيرٍ للإعجاب، قص السلسلتان المنتمة وغير المتممة [2].



الشكل 2. مخطط يمثل نظام كريسبر لدى Streptococcus thermophilus

III. برمجة كريسبر واستخدامه في التعديل الوراثي:

في عام 2006 بدأ مجموعة من العلماء من ضمنهم العالم جون فان دي أوست بالتعمق بدراسة الجهاز المناعي البكتيري كريسبر. حيث قامو بإدخال نظام كريسبر الخاص بأحد سلالات جراثيم العصيات القولونية إلى سلالة شبيهة مفتقرة لهذا النظام. لاحقاً تبين أن السلالات المعدلة أصبحت منيعة ضد العاثيات. هذه التجارب جعلت من العالم جون أول من استطاع برمجة نظام كريسبر المناعي وخلقه في الجرثوم من خلال إدخال تتاليات نكليوتيدية تابعة لفيروسات معينة بآلية شبيهة بالتمنيع المحدث عند البشر من خلال اللقاحات. خلال عام 2013 بدأ العلماء يتنافسون على دراسة هذه التقنية التي كانت غريبة في ذلك الوقت، حيث نجح العالم Virginlius Siksnys في تطبيق هذه التقنية خارج الكائن الحي in vitro وداخل الكائن الحي in vivo بينما استطاعت العالمتان Jennifer Doudna و Emmanuelle Charpentier (الحاصلتان على جائزة نوبل في الكيمياء عام 2020، أثناء دراسة نظام كريسبر لدى جراثيم *Streptococcus pyogenes*) برهنة أنه من السهل برمجة كريسبر في المختبر من خلال استخدام قطع crRNA مصنعة مسبقاً.

تضمنت التجربة مركبان أساسيان وهما:

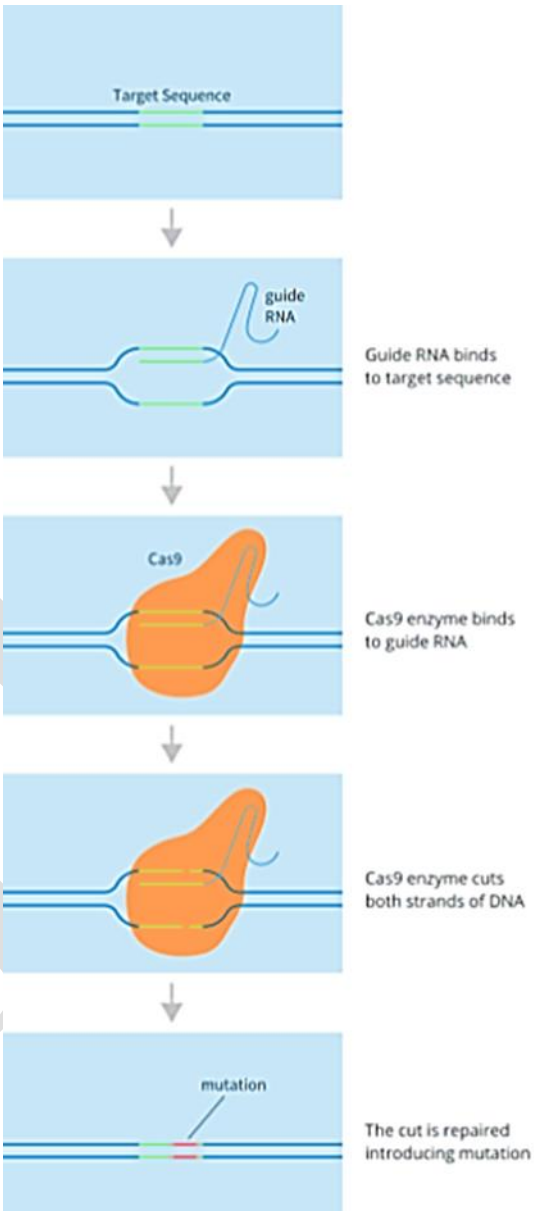
1. جزيء RNA مصنع مخبرياً حاوي على تسلسل نكليوتيدي متمم لتسلسل الـ DNA المراد اقتطاعه دُعي لاحقاً ب guideRNA مؤلف من crRNA+tracr RNA
2. بروتين cas9 الخاص بتلك الجراثيم الذي سيشكل معقد مع guideRNA ومن ثم يقوم بالتعرف على التسلسل المطلوب قصه والقيام بعملية القص. (الشكل 3) عرفت هذه التقنية بالمقص الجزيئي أو نظام كريسبر–كاس9.

حيث تم بنجاح من خلال هذه العملية البسيطة تعطيل الجين المستهدف،ولكن في الوقت ذاته تعتمد هذه التقنية مبدأ محاولة الخلية إصلاح الخطأ، الأمر الذي قد يؤدي إلى طفرات متعددة.

حالياً تقنية كريسبر–كاس9 تعتبر أداة الجيل الأول حيث يتم في الوقت الحالي تطوير تقنيات جديدة ستحدث ثورة في الأوساط العلمية وسيتمكن العلماء من خلالها إدخال جين جديد في موقع الجين الذي تم قصه وبالتالي فتح العديد من الأبواب في مجال التعديل الجيني.

هناك نوعان من التعديل الجيني:

1. تعديل الحمض النووي في الخلايا المنتجة للأعراس، التعديلات هنا تنتقل عبر الأجيال.
2. تعديل الحمض النووي في الخلايا الجسدية ، التغييرات التي تطرأ على هذه الخلايا تؤثر فقط على الكائن الذي يتم عليه التعديل الجيني.



الشكل 3. مخطط يمثل تقنية كريسبر–كاس9

IV. كريسبر والعلاج الجيني للأمراض الوراثية:

تحدث الأمراض الوراثية نتيجة خلل في واحدة أو أكثر من المورثات. أو خلل في تركيب أو عدد الصبغيات أغلبها تصيب الفرد أثناء المرحلة الجنينية ويمكن لبعضها الانتقال من جيل لأخر. يستهدف العلاج الجيني معالجة الأمراض الوراثية من خلال تصحيح الخلل الحاصل عن طريق استبدال الجين الفاقدة لوظيفتها نتيجة الطفرات بجين سليمة تعيد للإنسان النمط الظاهري السليم [4].

لطالما كانت الأ مراض الوراثية محط اهتمام الباحثين، وإيجاد العلاج المناسب لها مازال رحلة مستمرة في البحث والتجريب. الأمراض التي تتم دراستها حالياً متنوعة كأمراض الدم الناعور التلاسيميا وفقر الدم المنجلي، الأمراض السرطانية والعصبية المختلفة [1].

علاج أمراض الدم:

1. فقر الدم المنجلي:

أحد فاقات الدم الانحلالية ناتجة عن شذوذات مورثية نوعية في بروتين الهيموغلوبين. يحدث نتيجة لطفرة في جين بيتا غلوبين أحد الجينات المرمزة للهيموغلوبين. ينتج عن ذلك إنتاج خضاب شاذ (خضاب S) الغير سوي من الناحية الشكلية والوظيفية. وبالتالي كريات دم حمراء منجلية غير طبيعية.

العلاج يتم بسحب دم من المريض وتعديل الطفرة الحاصلة في جين بيتا غلوبين بحيث تقوم تلك الكريات الحمراء بإنتاج مستويات عالية من خضاب F الجنيني الذي يثبط تبلمر الخضاب S، عند إعادة حقن تلك الكريات المعدلة لوحظ انخفاض كبير في حدة الأعراض المرافقة للمرض [4].

2. بيتا تلاسيميا:

أحد فاقات الدم الانحلالية الناتجة عن شذوذات كمية (نقص في سلاسل بيتا في الهيموغلوبين)

سببه طفرات في جين بيتا غلوبين.

العلاج يتم بحذف الجين الطافر واستبداله بجين صحيح لإعادة الوظيفة الطبيعية للهيموغلوبين [4].

3. علاج الألزهايمر:

هناك العديد من العوامل الوراثية التي قد تؤدي للإصابة بهذا الداء، ولازالت تلك العوامل قيد الدراسة، احد تلك الجينات المسؤولة عن بدء حدوث المرض هي جين Swedish APP والتي بدء العلماء بمحاولة استهدافها بتقنية كريسبر–كاس9 وبالتالي الحد من قدرتها على المشاركة في إحداث المرض [1].

4. علاج الإيدز:

سببه فيروس نقص المناعة البشرية، الذي يدمر الجهاز المناعي من خلال مهاجمة كريات الدم البيضاء.

تم إجراء محاولات لإيقاف انتشار المرض من خلال جعل كريات الدم البيضاء منيعة ضد هذا الفيروس من خلال استهداف جين CCR5 المرمز للبروتين المستقبل للفيروس على الخلايا المناعية [3].

5. علاج الداء السكري:

السكري هو مرض استقلابي يتمثل في عدم قدرة الجسم على استقلاب الغلوكوز بصورة طبيعية إما بسبب نقص الانسولين او انخفاض حساسية الأنسجة له، مما يؤدي الى ارتفاع تركيزه في الدم. الدراسات تركز حالياً على تعديل جين WFS1 في عينة من الخلايا الجذعية ومن ثم تحويلها إلى خلايا بيتا. حقن تلك الخلايا في فئران التجربة أظهر نتائج واعدة في معاكسة أعراض داء السكري [2].

5. علاج السرطان:

السرطان هو مصطلح طبي يشمل مجموعة واسعة من الامراض التي تتميز بتكاثر غير مضبوط للخلايا.

الدراسات الحديثة تتضمن تعديل الخلايا التائية "الرؤية" الخلايا السرطانية واستهدافها بشكل أفضل [6].

V. الناحية الأخلاقية لاستخدام كريسبر-كاس9:

من الجدير بالذكر أن استخدام هذه التقنية للتعديل الجيني سيخلق تغيير مجتمعي كبير جداً في المستقبل ويعزز الفجوة الطبقية فيما إذا تم تطويرها للحد الذي يسمح لنا بتعديل صفات الاجنة البشرية والحصول على أطفال مصممين وراثيًا بمواصفات معينة (طول، لون العينين،معدل الذكاء....) ولكن لحد الآن لا يزال هذا الاستخدام ضمن قائمة الأمور المحرمة دولياً في المجال العلمي لأسباب عديدة أهمها أنه كما ذكرنا سابقاً اي تغييرعلى الخلايا المولدة للأعراس أو الأجنة سيخلق تغيير دائم ينتقل من جيل إلى آخر. الأمر الذي قد يخلق مشكلة كبيرة في حال حدوث طفرة ما، على عكس تعديل الخلايا الجسدية الذي يؤثر فقط على من يتلقى العلاج بالإضافة لكون الشخص المعالج واعياً لما يخضع له. لكن هذا لم يردع بعض العلماء من التجريب على البشر كحادثة العالم الصينيHe Jiankui الذي أطلق مشروعًا عام 2018 لمساعدة الأشخاص المصابين بفيروس نقص المناعة البشرية ، والذي يشمل على وجه التحديد الآباء المصابين بفيروس نقص المناعة البشرية والأمهات غير المصابات بالفيروس قام العالم الصيني He بأخذ نطاف وبويضات من الأبوين والقيام بتلقيح البويضات ضمن المخبر (*in vitro*) تم تعديل جينوم البيضة المخصبة باستخدام تقنية كريسبر-كاس9 لإستهداف الجين CCR5 الذي يرمز البروتين الذي يعد مستقبل لفيروس HIV في الخلية، في محاولة سرية لخلق مقاومة وراثية ضد فيروس نقص المناعة البشرية. أدت هذه القضية إلى جدالات قانونية وأخلاقية ، مما أدى إلى اتهامه هو واثنين من معاونيه، والحكم عليه بالسجن بالإضافة لغرامات مالية كبيرة في محاولة لردع تلك الإجراءات التي تعتبر غير أخلاقية.

VI. الاستنتاجات:

لازال هناك الكثير من الأسئلة المطروحة حول الـ DNA كما يوجد الآلاف من المورثات الغير محددة الوظيفة، بالتالي استخدام تقنيات التعديل المورثي قد يخلق طفرات كثيرة لايمكن التنبؤ بها، من الجدير بالذكر أن طرائق التعديل الوراثي كافة تعتبر أسلحة ذو حدين، فائدتها عظيمة ولكن احتمال إساءة استخدامها كبير جداً، وهذا لوحده سبب كافٍ لتحريم استخدامها، واذا تمعنّا لوهلة سنلاحظ ان الكثير مماكان يعتبر قصص من نسج الخيال العلمي أصبح حقيقة واقعية مليئة بالفرص والتحديات، ولكن السؤال الحقيقي، هل ستكون البشرية مستعدة لمواجهة تلك التحديات ؟

المراجع:

[1]. Haque Nirmal, Chandra Barman, Niuz Morshed Khan, Maidul Islam, Zulkar Nain, Rajib Kanti Roy. Anwarul "CRISPR-Cas9: A Promising Genome Editing Therapeutic Tool for Alzheimer's Disease." Neurol Ther, 2020: 9; 419-434.

[2]. Kristina G. Maxwell. "Gene-edited human stem cell-derived β cells from a patient with monogenic diabetes reverse preexisting diabetes in mice." Sci Transl Med, 2020: 12; 540-563.

[3]. Lei Xu, Jun Wang, Yulin Liu, Liangfu Xie. "CRISPR-Edited Stem Cells in a Patient with HIV and Acute Lymphocytic Leukemia." The new england journal of medicine, 2019: 381; 1240-7.

[4]. Chiara Antoniani, Vasco Meneghini, Annalisa Lattanzi, Tristan Felix, Oriana Romano. "Induction of fetal hemoglobin synthesis by CRISPR/Cas9-mediated editing of the human b-globin locus." Blood, 2018: 131; 1960-1973.

[5]. Eric S. Lander, The Heroes of CRISPR: Harvard USA: Elsevier Inc, 2016.

[6]. Shenghui He. "The first human trial of CRISPR-based cell therapy clears safety concerns as new treatment for late-stage lung cancer." Signal Transduction and Targeted Therapy, 2020 :168; 283-288.

منشورات المؤلف (د. صفاء دلا) :

[1]. Dobler, S., Dalla, S., Wagschal, V., and Agrawal, A.A. (2012). Community-wide convergent evolution in insect adaptation to toxic cardenolides by substitutions in the Na,K-ATPase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109:13040–13045.

[2]. Dalla, S., Swarts, H. G. P., Koenderink, J. B., and Dobler, S. (2013). Amino acid substitutions of Na,K-ATPase conferring decreased sensitivity to cardenolides in insects compared to mammals. Insect Biochem. Molec. Biol. 43:1109–1115.

[3]. Dalla, S. (2015). Analysis of resistance mechanisms in the Na,K-ATPase of cardenolide-adapted insects. *University of Hamburg*.

[4]. Dalla, S., and Dobler, S. (2016). Gene duplications circumvent trade-offs in enzyme function: Insect adaptation to toxic host plants. Evolution DOI: 10.1111/evo.13077.

[5]. Dalla, S., Baum, M., and Dobler, S. Substitutions in the cardenolide binding site and interaction of subunits affect kinetics besides cardenolide sensitivity of insect Na,K-ATPase. Insect Biochem. Molec. Biol. DOI: 10.1016/j.ibmb.2017.08.005.

[6]. Lohr, J., Meinzer,]., Dalla, S., Glüsing, R., & Dobler, S. (2017). The function and evolutionary significance of a triplicated Na,K-ATPase gene in a toxin specialized insect. BMC Evolutionary Biology DOI 10.1186/s12862-017-1097-6.

[7]. Dalla, S., Rajab, O., Abdalla, W. (2021). Stem cells in the treatment of peripheral nerve injury. *Manara journal*.

[8]. Suliman, M., Dalla, S. (2021). CRISPR technology and its promising use in gene therapy. *Manara journal.*