ژنتیک نوین
دوره بیستم، شماره ۱، بهار ۱٤۰٤
صفحه ۹ - ۱

طراحی، مدل‌سازی و آنالیز محاسباتی crRNA ژن eLF4E1 دخیل در مقاومت به ویروس Y سیب‌زمینی با استفاده از تکنیک‌های مختلف CRISPR

Design, Modeling and Computational Analysis of crRNA Gene eLF4E1 Involved in Resistance to Potato Y Virus Using Various CRISPR Techniques

مرضیه اتحادپور*[۱]

۱- استادیار، گروه تولیدات گیاهی، مرکز آموزش عالی کشاورزی بردسیر، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

Etehadpour M*[1]

1- Assistant Professor, Agricultural Faculty of Bardsir, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: etehadpour@uk.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱٤۰۳/۱۲/۰۷ - تاریخ پذیرش: ۱٤۰٤/۰٦/۲۹)

چکیده

ویروس‌ها تهدیدی جدی برای تولید محصولات کشاورزی به شمار می‌روند و مهندسی ضد ویروس با استفاده از بیوتکنولوژی مولکولی، رویکردی مؤثر برای پیشگیری و کنترل این ویروس‌ها است. استفاده از ابزارهای محاسباتی، به‌ویژه در زمینه مدل‌سازی و داکینگ، می‌تواند دقت طراحی‌ها را به‌طور قابل توجهی افزایش دهد. پژوهش حاضر با ادغام بیوانفورماتیک و فناوری CRISPR به طراحی، مدل‌سازی و ارزیابی محاسباتی crRNA هدف‌گیری ژن eIF4E1 پرداخته است. ساختار آنزیم‌های Cas از پایگاه داده RCSB و توالی ژن eLF4E1 از پایگاه داده NCBI تهیه شد. با استفاده از سیستم برخط CHOPCHOP، crRNA هدف گیرنده توالی مورد نظر طراحی و از نظر اختصاصیت مورد ارزیابی قرار گرفت. ساختار سه بعدی crRNA طراحی شده با استفاده از سرور MMB (macromolecule builder) شبیه‌سازی و به‌منظور بررسی نحوه اتصال و سطح انرژی اتصالی crRNA با آنزیم‌های Cas از سرور برخط Hdock استفاده شد. در نتایج طراحی و انتخاب crRNAها، بهترین توالی طراحی شده توالی GTATAGTTCTTGATGCAGTGTGG بود. crRNAهای انتخابی برای هدف‌گیری ژن هدف eLF4E1 با استفاده از نرم‌افزار macromolecule builder مدل‌سازی شد. به‌منظور بررسی نحوه اتصال و سطح انرژی اتصالی crRNA با آنزیم‌های Cas با استفاده از سرور برخط Hdock، ۱۰۰ مدل داکینگ ارائه شد که ۱۰ مدل برتر بر اساس سطح انرژی انتخاب شدند. بر اساس نتایج به‌دست آمده از نحوه اتصال و سطح انرژی اتصالی crRNA با آنزیم‌های Cas، بهترین و اختصاصی‌ترین سازه مربوط به crRNA مورد نظر با آنزیم Cas13b بود و پس از آن به‌ترتیب آنزیم‌های Cas13d، Cas13a و Cas9 بود. از آن‌جایی که موفقیت‌آمیز بودن سیستم CRISPR-Cas برای اصلاح صفات یا مقابله با ویروس‌های RNAآلوده‌کننده سیب‌زمینی نیازمند انتخاب دقیق نوع پروتئین Cas و بیان مناسب آن در گیاه است، بر اساس نتایج این پژوهش می‌توان آنزیم Cas13b را گزینه‌ای مناسب برای اصلاح صفات یا مداخله علیه ویروس‌های RNA در سیب‌زمینی در نظر گرفت.

واژه‌های کلیدی

داکینگ ملکولی
بیوانفورماتیک
CHOPCHOP
CRISPR

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-10-07]

مقدمه

سیب‌زمینی به‌عنوان یکی از مهم‌ترین منابع غذایی جهان به‌دلیل محتوای بالای نشاسته، ویتامین‌ها، پروتئین و عملکرد مطلوب خود شناخته می‌شود. ایران با تولید سالانه ۲.٤ میلیون تن، از تولیدکنندگان بزرگ این محصول در جهان به شمار می‌آید (FAO 2023). ویروس وای سیب‌زمینی (PVY) یکی از شایع‌ترین و مهم‌ترین بیماری‌های ویروسی این محصول است که در بسیاری از مناطق کشت سیب‌زمینی، از جمله ایران، مشاهده می‌شود (Nikan 2016). بررسی‌های انجام‌شده در استان‌های مختلف کشور، مانند خراسان، گیلان، مازندران، گلستان، کرمان، همدان و اصفهان، شیوع گسترده این ویروس را با میانگین آلودگی ۳٤.٤٪ تأیید کرده‌اند (Pourrahim et al. 2007). این ویروس با کاهش کمیت و کیفیت محصول، خسارت‌های اقتصادی قابل‌توجهی وارد می‌کند که بسته به رقم، شرایط اقلیمی و منطقه کشت، می‌تواند بین ۱۰ تا ۹۰ درصد متغیر باشد. در حال حاضر، تنها راه‌حل مؤثر در کشور برای مقابله با این ویروس، تولید یا واردات غده‌های بذری عاری از ویروس است که نیازمند سرمایه‌گذاری بالا و تجهیزات تخصصی می‌باشد. با توجه به فقدان منابع مقاومت طبیعی در ارقام سیب‌زمینی، استفاده از فناوری‌های نوین برای ایجاد ارقام مقاوم ضرورت دارد.

برخی از روش‌های مدیریت ویروس PVY شامل: کشت سیب‌زمینی در مناطقی با جمعیت پایین شته‌های ناقل، تناوب زراعی و حذف علف‌های هرز میزبان، استفاده از ارقام مقاوم به ویروس، بهره‌گیری از غده‌های بذری سالم و گواهی‌شده، تغییر تاریخ کاشت و برداشت بر اساس تغییرات جمعیت شته‌های ناقل در هر منطقه، ضدعفونی انبوه با سموم سیستمیک و سمپاشی مزارع برای کنترل ناقلان است. مهندسی ضدویروس، که از طریق بیوتکنولوژی مولکولی توسعه یافته است، به‌عنوان راهکاری مؤثر برای پیشگیری و کنترل ویروس‌های گیاهی مطرح می‌باشد (Nikan 2016). پیشرفت‌های اخیر در زمینه ویرایش هدفمند DNA یا RNA با استفاده از سیستم CRISPR، ابزارهای جدیدی برای محافظت از گیاهان در برابر ویروس‌ها فراهم کرده است.

سیستم CRISPR-Cas یک فناوری پیشرفته و دقیق برای ویرایش ژنوم است که ابتدا به‌عنوان یک مکانیسم ایمنی در باکتری‌ها و آرکی‌ها شناسایی شد. این سامانه، با الهام از سازوکار دفاعی پروکاریوت‌ها در برابر فاژها، به سرعت به یکی از ابزارهای کلیدی در زیست‌فناوری نوین تبدیل شد (Barrangou and Doudna 2016). سیستم CRISPR-Cas از دو جزء اصلی تشکیل شده است: RNA راهنما :(gRNA) مولکولی مصنوعی است که مکمل بخشی از توالی هدف در ژنوم می‌باشد و Cas را به محل دقیق هدایت می‌کند. پروتئین Cas مانند (Cas9 ، Cas12، یاCas13): آنزیمی است که وظیفه ایجاد برش در DNA یا RNA هدف را بر عهده دارد.

مکانیسم عملکرد: پس از ورود این سامانه به سلول، RNA راهنما به توالی هدف متصل شده و آنزیم Cas با ایجاد برش دو رشته‌ای در DNA در (Cas9) یا تخریب RNA در (Cas13) زمینه اصلاح یا خاموش‌سازی ژن مورد نظر را فراهم می‌سازد. از مزایای این فناوری می‌توان به سهولت طراحی، دقت بالا، و توانایی چندجانبه در اصلاح صفات، خاموشی ژن‌ها و حذف ویروس‌های RNA اشاره کرد. به همین دلیل، سیستم‌های مبتنی بر Cas13b نیز در گیاهان برای مقابله با ویروس‌های RNA پیشنهاد شده‌اند (Aman et al. 2018).

سیستم‌های CRISPR/Cas نسبت به سایر فناوری‌های ویرایش دی‌ان‌ای مانند ZEN و TALEN مزایای بیشتری در دستکاری هدفمند دارند و به سرعت در مهندسی ضد ویروسی گیاهان استفاده می‌شوند. این فناوری در زمینه‌های مختلف زیستی، به‌ویژه در پزشکی و بیوتکنولوژی، تحولی عظیم ایجاد کرده است و در اصلاح گیاهان نیز استفاده می‌شود (Baltes et al. 2015; Ji et al. 2015; Zhang et al. 2018). با استفاده از آر ان‌ای‌های راهنمای زیرژنومی (sgRNA)، سیستم CRISPR/Cas می‌تواند مناطقی مرتبط با همانندسازی ویروس‌ها را هدف قرار دهد و نتایج امیدوارکننده‌ای در کاهش آلودگی و افزایش مقاومت گیاهان در برابر ویروس‌ها مانند ویروس پیچیدگی چغندر قند، ویروس پیچیدگی برگ پنبه و ویروس کوتولگی زرد لوبیا ایجاد کرده است (Baltes et al. 2015; Ji et al. 2015; Yin et al. 2019). برای مثال، هدف‌گیری ژنوم ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی با Cas9 منجر به تداخل در همانندسازی ویروس شد و کاهش ژنوم ویروس را در گیاهان تراریخته نشان داد (Tashkandi et al. 2018).

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-10-07]

با پیشرفت سریع فناوری CRISPR/Cas، نمونه‌های موفق‌تری در مقابله با ویروس‌های گیاهی مشاهده شده است. این فناوری برای مقاومت در برابر ویروس‌هایی مانند ویروس کوتولگی گندم و موز، و همچنین برای بیماری پیچیدگی برگ پنبه که محدودیت اصلی در تولید پنبه است، استفاده شده است (Kis et al. 2019; Tripathi et al. 2019; Uniyal et al. 2019).

استفاده از فناوری CRISPR/Cas می‌تواند به دو روش اصلی به بهبود مقاومت گیاهان در برابر ویروس‌ها کمک کند. ۱) ایجاد جهش‌های هدفمند در ژن‌های خاص گیاه میزبان برای کاهش تکثیر و انتشار ویروس در گیاه (Bortesi et al. 2016). ۲) هدف‌گیری مستقیم ویروس‌ها با استفاده از CRISPR/Cas برای جلوگیری از تکثیر و گسترش ویروس در گیاهان (Ming et al. 2020). این فناوری انقلابی در علم بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات، امیدهایی برای مقابله با ویروس‌های گیاهی و بهبود مقاومت محصولات کشاورزی ایجاد کرده است.

ویروس‌های گیاهی از عوامل میزبان برای تسهیل فرآیندهای آلودگی استفاده می‌کنند. به همین دلیل، عوامل مربوط به ترجمه مانند *eIF4E* و *eIF4G* به‌عنوان ژن‌های مقاومت در برابر ویروس‌ها شناسایی شدند. سیستم CRISPR/Cas9 برای هدف قرار دادن این ژن‌ها در گیاهان موجب مقاومت کامل در برابر ویروس‌های مختلف مانند ویروس موزاییک زرد کدو سبز، ویروس پاپایا و ویروس زردی رگبرگ خیار شد (Chandrasekaran et al. 2016). همچنین، جهش‌های ایجاد شده در *eIF4G* در برنج و *eIF* (iso) *4E* در کاساوا و آرابیدوپسیس منجر به مقاومت در برابر ویروس‌های خاص شد (Ji et al. 2015; Tashkandi et al. 2018).

تحلیل و مدل‌سازی محاسباتی نقش حیاتی در تحقیقات CRISPR ایفا می‌کند و ۱) امکان انتخاب سایت هدف را فراهم می‌آورد و نواحی محافظت‌شده و عملکردی در ژن *eIF4E1* که با RNA ویروس PVY تعامل دارند را شناسایی می‌کند. ۲) اصلاحات غیرهدف را پیش‌بینی می‌کند. ۳) بهینه‌سازی کارایی را انجام می‌دهد و فعالیت توالی‌های crRNA برای حداکثر کردن موفقیت ویرایش را پیش‌بینی می‌کند (Doench et al. 2016). ٤) مدل‌سازی مولکولی را انجام می‌دهد، تعاملات بین crRNA، پروتئین‌های Cas و ژن *eIF4E1* برای ارزیابی میل اتصال و کارایی برش را شبیه‌سازی می‌کند (Li et al. 2024).

مواد و روش‌ها

این مطالعه با ادغام بیوانفورماتیک و فناوری CRISPR به طراحی، مدل‌سازی و ارزیابی محاسباتی crRNA هدف‌گیری ژن *eIF4E1* پرداخته است. مراحل کلیدی این فرآیند شامل موارد زیر است: ۱) شناسایی دامنه‌های محافظت‌شده در *eIF4E1* که برای تکثیر PVY حیاتی هستند. ۲) طراحی crRNA بهینه با استفاده از ابزار محاسباتی CHOPCHOP و تأیید پیش‌بینی‌های اصلاحات غیرهدف برای به حداقل رساندن ویرایش‌های ژنومی ناخواسته. ۳) شبیه‌سازی‌های پیچیده crRNA-Cas برای درک دینامیک‌های ساختاری و عملکردی برش هدف.

برای انجام این پژوهش، ابتدا توالی ژن هدف *eLF4E1* با شماره رفرنس NC_015440.3 از پایگاه داده NCBI تهیه شد. برای طراحی crRNA هدف گیرنده، از سرور برخط CHOPCHOP استفاده شد. CHOPCHOP الگوریتمی است که امکان طراحی crRNA برای تکنیک CRISPR را فراهم آورده است. سیستم CHOPCHOP لیستی از توالی‌های crRNA با ویژگی‌های متفاوت را براساس داده‌های ورودی برای توالی هدف مورد انتظار، ارائه می‌دهد. با استفاده از این ابزار، محققان می‌توانند اطمینان حاصل کنند که crRNA/sgRNAهای بهینه را انتخاب می‌کنند که ژن هدف آن‌ها را با کارایی بالا و اثرات جانبی کم هدف قرار می‌دهند و این آن را به یک منبع ضروری برای آزمایش‌های CRISPR تبدیل می‌کند.

در این مطالعه به‌منظور افزایش اختصاصیت و بهبود عملکرد کمپلکس CRISPR، علاوه بر بررسی‌های قابل انجام در انتخاب crRNA،با سرور CHOPCHOP که بر مبنای تعداد off targetها در ژنوم و ترانسکریپتوم، درصد GC، موقعیت قرارگیری در توالی ژنومی و ... است، پایداری کمپلکس ریبونوکلئوپروتئینی تشکیل شده از نقطه نظر بیوانفورماتیک ساختاری و میزان تمایل اتصال آنزیم و crRNA نیز مورد بررسی قرار گرفت.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-10-07]

crRNAهای انتخابی برای هدفگیری ژن هدف *eLF4E1* با استفاده از نرم‌افزار macromolecule builder مدل‌سازی شد. این نرم‌افزار که با عنوان MMB نیز شناخته شده، برای شبیه‌سازی پروتئین، DNA و RNA مورد استفاده قرار می‌گیرد. این شبیه‌سازی بر اساس ویژگی‌های ساختاری crRNA و نواحی تشکیل دهنده ساقه و حلقه انجام شد. این فرآیند امکان بررسی تاخوردگی صحیح RNA راهنما در تکنیک CRISPR را فراهم می‌نماید.

ساختار کریستالوگرافی آنزیم‌های Cas از پایگاه داده پروتئین به آدرس www.rcsb.org دریافت و با استفاده از نرم‌افزار DS ۵.۳ Visualizer (Hanwell et al. 2012) لیگاند و کوفاکتورهای اضافی و مولکول‌های آب موجود در ساختار کریستالی پروتئین حذف شدند. به‌منظور انجام داکینگ مولکولی بین RNAهای شبیه‌سازی شده با آنزیم‌های Cas از سرور HDOCK استفاده شد. این سرور برخط به‌منظور انجام داکینگ مولکولی پروتئین-پروتئین، پروتئین DNA و پروتئین RNA-مورد استفاده قرار می‌گیرد. HDOCK از داکینگ سراسری برای ایجاد کمپلکس‌ها استفاده می‌نماید بنابراین نیازی به داشتن اطلاعات اولیه در مورد محدوده اتصال نیست. کمپلکس‌های حاصل از داکینگ با استفاده از نرم‌افزارهای PyMol و VMD مورد بررسی و مقایسه قرار گرفتند. داکینگ مولکولی یکی از تکنیک‌های زیر مجموعه مدلینگ مولکولی در علم بیوانفورماتیک می‌باشد. این روش به‌طور معمول در تحقیقات دارویی مدرن برای درک و پیش‌بینی رابطه بین یک مولکول دارو و یک پروتئین هدف از یک میکروب استفاده می‌شود.

نتایج و بحث

در این مطالعه، توالی ژن هدف *eLF4E1* با شماره رفرنس NC_015440.3 از پایگاه داده NCBI تهیه شد. نتایج طراحی و انتخاب crRNAها با سرور CHOPCHOP با تنظیم پارامترهای مورد نیاز در این سرور، کاندیدهایی بر اساس توالی RNA ورودی و الگوریتم‌های جستجو دقیق جایگاه‌های غیرهدف، برای توالی ورودی ارائه شد. بنابر نتایج حاصل از سرور CHOPCHOP، crRNAهای مناسب با در نظر گرفتن پارامترهای جایگاه شروع و پایان crRNA مورد نظر، درصد GC، کمترین تعداد جایگاه غیرهدف در ترانسکریپتوم و ژنوم که نشان دهنده اختصاصیت توالی طراحی شده است، انتخاب شد (جدول ۱). بهترین توالی طراحی شده توالی GTATAGTTCTTGATGCAGTGTGG بود که روی استرند مثبت و دارای محتوای GC ٤٠٪ بود و همچنین هیچ ساختار مکملی با خود نشان نداد و درصد کارایی حدود ٦٨٪ نشان داد. علاوه بر این در این سیستم بهترین پرایمرها برای crRNA مورد نظر طراحی شد (جدول ۲).

crRNAهای انتخابی برای هدف‌گیری ژن هدف *eLF4E1* با استفاده از نرم‌افزار macromolecule builder مدل‌سازی شد. این نرم‌افزار با کدهای C++ نوشته شده است و برای انواع سیستم‌های عامل قابل استفاده است. مدل طراحی شده crRNA در نرم‌افزار Discovery Studio در (شکل ۱) نشان داده شده است.

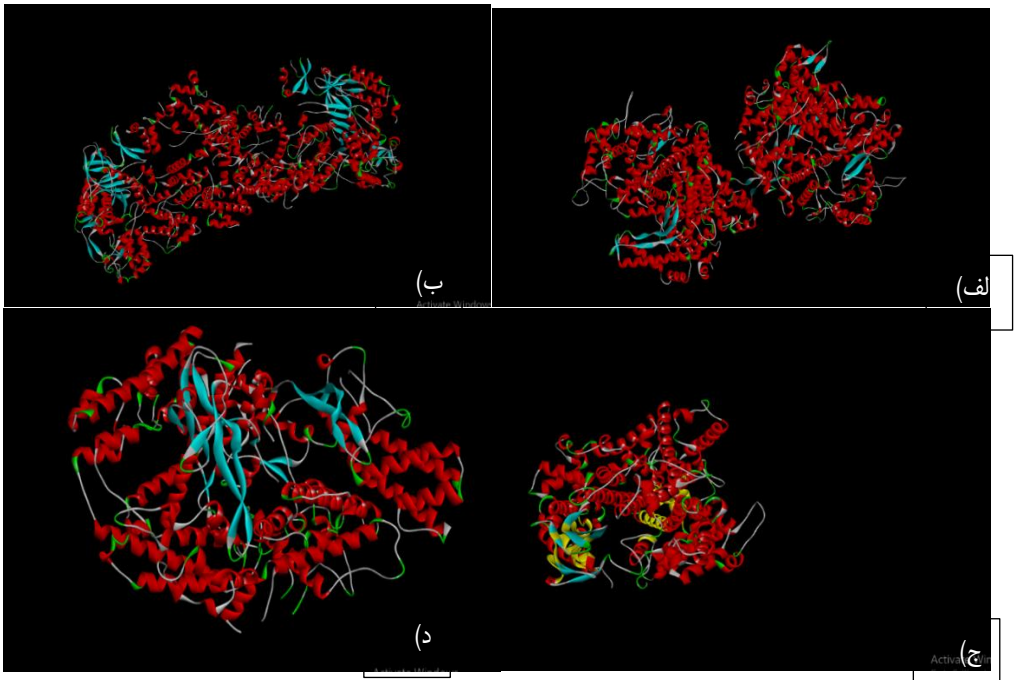
جدول ۱- طراحی crRNA با استفاده از سیستم برخط CHOPCHOP

رتبه	توالی هدف	موقعیت ژنومی	رشته	محتوای GC (%)	خود مکملی	کارایی
1	TTAACCCTTGATACCACCAAAGG	seq:2624	-	40	1	69.07
2	TTCGTACTGGAAAGGTTGGTAGG	seq:3202	+	45	0	67.98
3	GTATAGTTCTTGATGCAGTGTGG	seq:3162	+	40	0	67.82
4	TTTTGCAGGACGATGCAAAGAGG	seq:3109	+	45	3	67.16
5	TCAACCGGTAAACAGCTGAAAGG	seq:2857	-	45	0	64.02
6	CTGATTATCTGCCTTCACATAGG	seq:795	+	40	1	63.89
7	AAACACAATTCGTACTGGAAAGG	seq:3194	+	35	0	62.32
8	AAGTTGAAGGCCGCCGATGGAGG	seq:64	+	60	0	60.95
9	TTCCTTGCACAATCTTGTGTAGG	seq:1279	+	40	1	57.34
10	GTTGTTAGTGTCCGGGCTAAGGG	seq:2302	+	50	0	55.32

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-10-07]

جدول ۲- لیست پرایمرهای طراحی شده برای crRNA مورد نظر

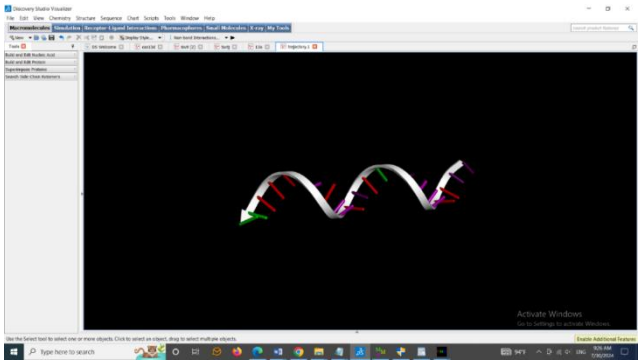
جفت	مختصات پرایمر چپ	پرایمر چپ	مختصات پرایمر راست	پرایمر راست	اندازه محصول
1	seq:2552-2574	GGAAGTGCTCCTTGTGAGAAAT	seq:2748-2770	AGAGAAGGGGACGAAAGAAAAG	218
2	seq:2519-2541	TGGAAGTTAAGAGGGGAAGTCA	seq:2748-2770	AGAGAAGGGGACGAAAGAAAAG	251
3	seq:2552-2574	GGAAGTGCTCCTTGTGAGAAAT	seq:2746-2768	AGAAGGGGACGAAAGAAAAGAT	216
4	seq:2519-2541	TGGAAGTTAAGAGGGGAAGTCA	seq:2746-2768	AGAAGGGGACGAAAGAAAAGAT	249
5	seq:2551-2573	AGGAAGTGCTCCTTGTGAGAAA	seq:2748-2770	AGAGAAGGGGACGAAAGAAAAG	219



شکل ۲- ساختار آنزیم‌های cas9 (الف)، 13cas a (ب)، cas13b (ج) و cas13d (د) در نرم‌افزار Discovery Studio

ساختار آنزیم‌های Cas (Cas9، Cas13a ، Cas13b و Cas13d) از پایگاه دادهRCSB با شماره‌های دسترسی 4CMP، 7OS0، 6DTD و 6IV9 به‌دست آمد (شکل ۲). پس از شبیه‌سازی ساختار سه بعدی crRNAبا استفاده از سرور MMB (macromolecule builder)، به‌منظور بررسی نحوه اتصال و سطح انرژی اتصالی crRNA با آنزیم‌های Cas از سرور برخط Hdock استفاده شد. ۱۰۰ مدل داکینگ ارائه شد. از میان این ۱۰۰ مدل پیش‌بینی شده، ۱۰ مدل برتر بر اساس سطح انرژی انتخاب شدند.

همین‌طور اطلاعات مربوط به سطح انرژی اتصالی (اسکور داکینگ)، اسکور اطمینان و Ligand rmsd (Å) ۱۰ پیشنهاد برتر مربوط به هر آنزیم در جدولی جداگانه در زیر آورده شده است که بهترین آن پیشنهاد اول می باشد (جداول ۳ -۶).



شکل ۱- crRNA طراحی شده در نرم‌افزار Discovery Studio

نتایج داکینگ ملکولی در این تحقیق نشان داد قوی‌ترین انرژی اتصال مربوط به crRNA مورد نظر با آنزیم Cas13b بود و پس از آن آنزیم‌های Cas13d و Cas13a بود. ضعیف‌ترین انرژی اتصال مربوط به آنزیم Cas9 با crRNA مورد مطالعه بود. نحوه اتصال crRNA مورد نظر با آنزیم‌های (Cas9، Cas13a، Cas13b و Cas13d) با استفاده از سرور Hdock در شکل ۳ نشان داده شده است.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-10-07]

جدول ۳- سطح انرژی اتصالی (اسکور داکینگ)، اسکور اطمینان و Ligand rmsd (Å) ۱۰ پیشنهاد برتر مربوط به آنزیم cas9

رتبه	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
امتیاز داکینگ	-316.7	-287.9	-287.4	-286.7	-285.7	-283.9	-274.4	-274.1	-266.2	-259.1
امتیاز اطمینان	0.9656	0.9404	0.9398	0.9390	0.9379	0.9358	0.9234	0.9230	0.9110	0.8987
rmsdلیگاند (Å)	112.87	71.18	95.46	91.19	78.90	84.85	88.28	90.73	143.99	65.80

جدول٤-. سطح انرژی اتصالی (اسکور داکینگ)، اسکور اطمینان و Ligand rmsd (Å) ۱۰ پیشنهاد برتر مربوط به آنزیم 13cas a

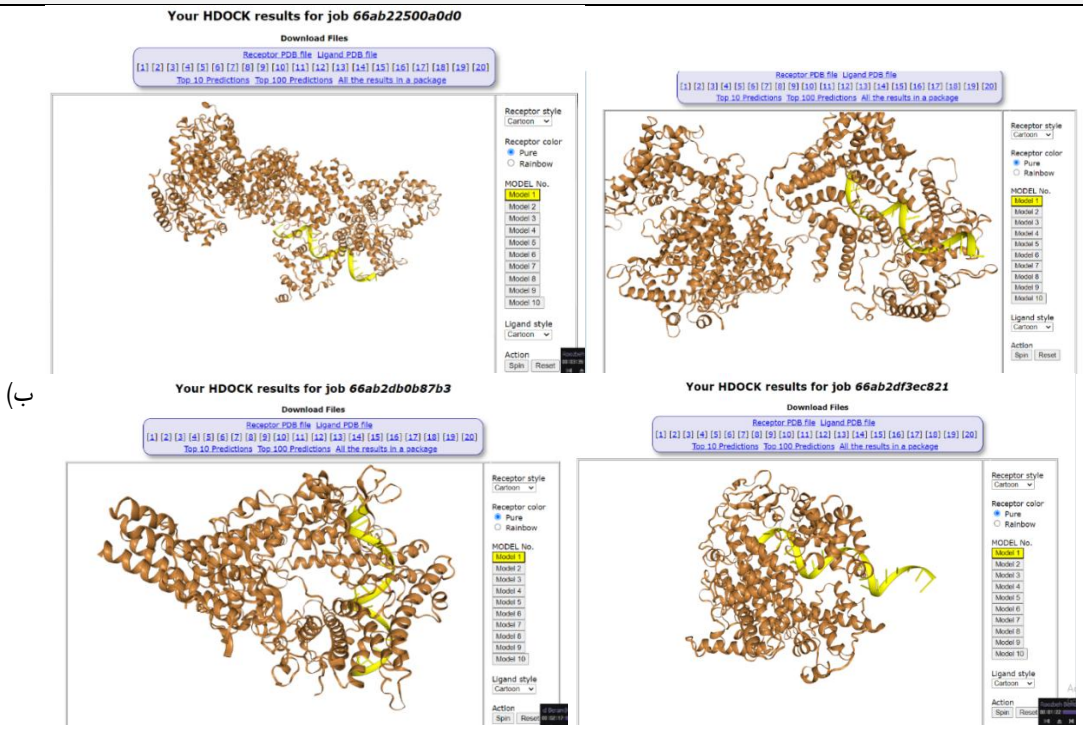
رتبه	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
امتیاز داکینگ	-358.3	-352.4	-347.5	-343.5	-338.1	-337.8	-336.7	-332.4	-325.4	-319.9
امتیاز اطمینان	0.9847	0.9828	0.9811	0.9796	0.9773	0.9772	0.9767	0.9746	0.9710	0.9677
rmsdلیگاند (Å)	92.64	93.47	84.33	94.55	93.48	156.69	88.68	99.23	117.51	70.52

جدول ٥- سطح انرژی اتصالی (اسکور داکینگ)، اسکور اطمینان و Ligand rmsd (Å) ۱۰ پیشنهاد برتر مربوط به آنزیم cas13b

رتبه	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
امتیاز داکینگ	-418.2	-388.6	-348.5	-333.4	-331.9	-325.2	-318.3	-312.9	-311.0	-305.6
امتیاز اطمینان	0.9953	0.9916	0.9815	0.9751	0.9744	0.9708	0.9666	0.9630	0.9616	0.9574
rmsdلیگاند (Å)	117.96	109.82	95.82	116.08	118.46	109.54	118.20	112.59	110.61	131.36

جدول ٦- سطح انرژی اتصالی (اسکور داکینگ)، اسکور اطمینان و Ligand rmsd (Å) ۱۰ پیشنهاد برتر مربوط به آنزیم cas13d

رتبه	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
امتیاز داکینگ	-373.4	-316.9	-312.6	-310.5	-299.6	-295.6	-286.0	-284.9	-280.6	-275.5
امتیاز اطمینان	0.9887	0.9657	0.9628	0.9613	0.9523	0.9485	0.9383	0.9370	0.9317	0.9250
rmsdلیگاند (Å)	86.19	83.96	87.28	75.48	66.78	88.80	95.90	85.13	85.67	94.77



شکل ۳- نحوه اتصال crRNA مورد نظر با آنزیم‌های cas9 (الف)، 13cas a (ب)، cas13b (ج) و cas13d (د)

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-10-07]

ویروس سیب‌زمینی Y (PVY) تهدیدی بزرگ برای تولید سیب‌زمینی در سطح جهانی باقی می‌ماند که عمدتاً به‌دلیل وابستگی آن به عوامل شروع ترجمه میزبان، مانند *eIF4E* و همولوگ آن *eIF(iso)4E* برای عفونت و تکثیر موفقیت‌آمیز در سلول‌های گیاهی است. این ویروس از پروتئین VPg خود استفاده می‌کند تا با این عوامل میزبان تعامل کرده و ترجمه RNA ویروسی را ترویج دهد و از این طریق گسترش سیستمیک آن را امکان‌پذیر کند. اختلال در این تعامل، به‌ویژه بین پروتئین VPg ویروس و پروتئین eIF4E میزبان، به‌عنوان استراتژی امیدوارکننده‌ای برای توسعه گیاهان مقاوم به PVY شناخته شده است. مطالعات اخیر از ابزارهای ویرایش ژنوم، به‌ویژه CRISPR/Cas9، برای هدف قرار دادن این عوامل میزبان و مسدود کردن تکثیر ویروسی استفاده کرده‌اند و بینش‌های جدیدی را در خصوص افزایش مقاومت به PVY در چندین گونه گیاهی، از جمله سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی و تنباکو ارائه داده‌اند (Hameed et al. 2020).

به‌عنوان مثال، مطالعه‌ای از (Noureen et al. 2022) پتانسیل CRISPR/Cas9 در مهندسی مقاومت به PVY در رقم سیب‌زمینی Kruda را نشان داد. با جهش در ناحیه محافظت‌شده ژن *eIF4E*، محققان توانستند تعامل VPg-eIF4E را مختل کنند و منجر به مقاومت قوی در برابر سویه PVY-O شوند. این روش نه تنها تکثیر و گسترش ویروس را مسدود کرد بلکه اثربخشی CRISPR/Cas9 را در تولید ارقام سیب‌زمینی مقاوم به ویروس تأیید کرد. تأیید نتایج از طریق DAS-ELISA و RT-PCR همچنین پتانسیل ویرایش ژن را در کنترل عفونت‌های PVY در مزارع سیب‌زمینی تأکید کرد. فراتر از سیب‌زمینی، مطالعات در سایر محصولات نیز پتانسیل ویرایش *eIF4E* برای مقاومت ویروسی را نشان داده‌اند. به‌عنوان مثال، حذف ژن *CleIF4E1* در هندوانه از طریق CRISPR/Cas9، مقاومت در برابر ویروس موزاییک زرد کدو (ZYMV) را فراهم کرد، هرچند این روش در برابر ویروس موزاییک خالدار سبز خیار (CGMMV) مؤثر نبود. این موضوع نشان می‌دهد که مقاومت مبتنی بر *eIF4E* ممکن است خاص ویروس باشد و نیاز به درک عمیق‌تر تعاملات بین ایزوفورم‌های مختلف *eIF4E* و پروتئین‌های ویروسی وجود دارد (Li et al. 2024). Kuroiwa et al. (2023) از ویرایش ژنوم برای القای جهش در ژن *eIF4E1* در گوجه‌فرنگی استفاده کرده و نواحی ضروری برای حساسیت به ویروس را هدف قرار داد. با ویرایش هر دو ناحیه، آن‌ها توانستند مقاومت به چندین پوتی‌ویروس را بدون تأثیر بر شروع ترجمه فراهم کنند. جالب توجه است که مطالعه آن‌ها همچنین امکان ویرایش پایه که منجر به تغییر در برش RNA و احتمالاً منجر به غیرفعال شدن ژن شد را نشان داد و به این ترتیب استخر ژنی در دسترس برای اصلاح گیاهان مقاوم به ویروس را گسترش داد. علاوه بر این، مطالعات نشان داده‌اند که افزایش یا حذف *eIF4E* می‌تواند نه تنها منجر به مقاومت مستقیم به PVY شود بلکه اثرات فیزیولوژیکی غیرمنتظره‌ای در گیاهان ایجاد کند. Gutierrez Sanchez . (2020) et al مشاهده کرد که سیب‌زمینی‌های با بیان بالای *eIF4E* مقاومت به PVY بیشتری نشان دادند و همچنین بیان بالاتر ژن‌های مرتبط با پاسخ‌های استرس سلولی را تجربه کردند. این نشان می‌دهد که *eIF4E* تنها در مقاومت مستقیم از طریق تعامل با ویروس نقش ندارد، بلکه در فعال‌سازی مکانیسم‌های سیگنال‌دهی ثانویه که دفاع‌های ضدویروسی در گیاهان را تقویت می‌کند، نیز دخیل است. این یافته‌ها افق‌های جدیدی برای اصلاح ژنتیکی مقاومت به PVY ایجاد می‌کند که ممکن است شامل پاسخ‌های ایمنی چندوجهی باشد که توسط دستکاری بیان *eIF4E* تحریک می‌شود.

علاوه بر این، تحقیقات در مورد تنباکو، گیاهی دیگر که به شدت از PVY آسیب می‌بیند، اهمیت هدف قرار دادن چندین عضو از خانواده ژن *eIF4E* را برای مقاومت مؤثر نشان داده است. Lucioli et al.(2022) از CRISPR/Cas9 برای حذف *eIF4E1* در رقم سیب‌زمینی Desirée استفاده کردند و طیف مقاومت به PVY را گسترش داده و تجمع و علائم PVY-NTN را کاهش دادند. مشابه این در تنباکو Le et al. (2022) با موفقیت چندین ژن *eIF4E* را در رقم آلتوتتراپلویید K326 ویرایش کرد. جهش در *eIF4E1-S* منجر به مقاومت بیشتر به PVY شد، اما تنها زمانی که جهش‌ها در *eIF4E1-S*، *eIF4E1-T*، *eIF4E2-S* و *eIF4E2-T* ترکیب شدند، مقاومت وراثتی بالا به PVY حاصل شد. این موضوع اهمیت در نظر گرفتن افزونگی ژنی و لزوم ویرایش ترکیبی ژن‌ها را برای ایجاد مقاومت پایدار در برابر ویروس‌ها نشان می‌دهد.

در نتیجه، ویرایش ژن eIF4E از طریق CRISPR به‌عنوان یک استراتژی بسیار مؤثر برای توسعه محصولات مقاوم به ویروس،

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-10-07]

به‌ویژه در برابر PVY و سایر پوتی‌ویروس‌ها، اثبات شده است. با این حال، اجرای موفقیت‌آمیز آن نیازمند توجه دقیق به هم‌پوشانی ژنی، ویژگی ویروس، و توازن بین مقاومت و عملکرد محصول است. تحقیقات آینده با تمرکز بر ویرایش بافت‌ویژه، هدف‌گیری ترکیبی ایزوفورم‌های eIF4E و مقابله با سویه‌های جدید ویروسی، سودمندی این رویکرد را در کشاورزی بیشتر افزایش خواهد داد.

نتیجه‌گیری کلی

گسترش تکنیک‌های مولکولی نقش محوری در پیشگیری و کنترل ویروس‌های گیاهی بیماری‌زا دارند و ظهور و توسعه فناوری‌های کریسپر تولید و دستیابی به منابع مقاومتی جدید را سرعت می‌بخشد توسعه و درک سیستم‌های کریسپر اکتشاف و شناسایی عملکرد ژن‌های مقاومت مغلوب توسط این سیستم‌ها یک روش مهم در پیشگیری و کنترل بیماری‌های ویروسی است. در این تحقیق طراحی، مدل‌سازی و آنالیز محاسباتی crRNA ژن *eLF4E1* انجام شد و همچنین نحوه اتصال و سطح انرژی اتصالی crRNA با آنزیم‌های Cas مورد بررسی قرار گرفت و بهترین و اختصاصی‌ترین سازه به‌منظور کاهش زمان، هزینه و دفعات آزمون و خطا معرفی شد. قوی‌ترین انرژی اتصال مربوط به crRNA مورد نظر با آنزیم Cas13b بود و پس از آن آنزیم‌های Cas13d و Cas13a بود. ضعیف‌ترین انرژی اتصال مربوط به آنزیم Cas9 با crRNA مورد مطالعه بود. لذا از آن‌جایی که نتایج موفقیت‌آمیز سیستم CRISPR-Cas برای اصلاح صفت یا تداخل با ویروس‌های آلوده کننده RNA سیب‌زمینی نیازمند انتخاب دقیق پروتئین Cas و بیان آن در گیاهان سیب‌زمینی است. با توجه به نتایج این تحقیق می‌توان از آنزیم Cas13b جهت اصلاح صفت یا تداخل با ویروس‌های آلوده کننده استفاده کرد. هر چند ذکر این نکته ضروری است که علاوه بر انتخاب دقیق پروتئین Cas، سایر پیش‌نیازها شامل انتخاب وکتورهای بیان، انتخاب پروموتر(های) مناسب و بهینه‌سازی کدون است.

از منظر زیست‌فناوری و چارچوب‌های قانونی، تفاوت‌های بنیادینی بین گیاهان تراریخته (GMO) و گیاهان ویرایش‌شده ژنومی (Genome-edited) وجود دارد که لازم است در مطالعات مربوط به کاربردهای سیستم CRISPR مورد توجه قرار گیرد. این تفاوت‌ها به شرح زیر هستند: ۱- **منشأ ژن:** در گیاهان ترانس‌ژنیک، یک ژن خارجی معمولاً از یک گونه غیرمرتبط وارد ژنوم میزبان می‌شود، در حالی که در گیاهان ویرایش‌شده ژنومی، معمولاً تنها توالی‌های درون‌زاد تغییر داده شده یا حذف می‌شوند و نیازی به وارد کردن ژن جدید وجود ندارد. ۲- **روش ویرایش:** ترانس‌ژنیک‌سازی متکی بر انتقال ژن خارجی از طریق ناقل‌هایی مانند *Agrobacterium* یا بیولستیک است، اما ویرایش ژنومی با استفاده از ابزارهایی نظیر CRISPR باعث ایجاد تغییرات هدفمند در ژنوم موجود می‌شود، بدون افزودن توالی‌های نو. ۳- **تبعات قانونی:** محصولات ترانس‌ژنیک در بسیاری از کشورها تحت قوانین سخت‌گیرانه GMOقرار دارند. اما بسیاری از کشورها محصولات حاصل از ویرایش ژنومی را – در صورتی‌که ژن خارجی وارد نشده باشد – از قوانین GMO مستثنی می‌دانند. ٤- **میزان پذیرش عمومی:** گیاهان ترانس‌ژنیک با مقاومت‌ها و نگرانی‌هایی از سوی عموم مردم و گروه‌های زیست‌محیطی مواجه‌اند، در حالی‌که محصولات ویرایش‌شده ژنومی به‌دلیل عدم استفاده از ژن خارجی و شباهت بیشتر به اصلاحات طبیعی، مقبولیت بالاتری دارند. ٥- **خطر درج خارج از هدف:** در روش‌های ترانس‌ژنیک احتمال درج غیرهدفمند ژن در مکان‌های حساس ژنومی وجود دارد. در حالی‌که در ویرایش ژنومی، به‌ویژه با استفاده از سیستم‌هایی مانند CRISPR-Cas9یاCas13، خطر درج خارج از هدف کمتر و قابل‌کنترل‌تر است (Davies et al. 2022).

به‌طور کلی، استفاده از ویرایش ژنوم مبتنی بر CRISPR برای هدف قرار دادن عوامل میزبان درگیر در تکثیر PVY استراتژی امیدوارکننده‌ای برای توسعه گیاهان مقاوم به ویروس است. توانایی ویرایش چندین عضو از خانواده ژن *eIF4E* و اختلال در تعامل ویروس–میزبان در سطوح مختلف امکان مقاومت قوی‌تر در برابر PVY را در گونه‌های مختلف گیاهی فراهم می‌کند. تحقیقات آینده باید بر بهینه‌سازی این استراتژی‌های ویرایش برای گسترش بیشتر تنوع ژنی در دسترس برای اصلاح گیاهان مقاوم به ویروس متمرکز شوند، تا از پایداری تولیدات کشاورزی در برابر سویه‌های نوظهور ویروسی اطمینان حاصل کنند.

سپاسگزاری

نویسندگان از دانشگاه شهید باهنر کرمان جهت فراهم کردن امکانات لازم قدردانی می‌کنند.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-10-07]

منابع

Aman R, Ali Z, Butt H, Mahas A, Aljedaani F, Khan MZ, Ding S, Mahfouz M (2018) RNA virus interference via CRISPR/Cas13a system in plants. Genome biology 19:1-9

Baltes NJ, Hummel AW, Konecna E, Cegan R, Bruns AN, Bisaro DM, and Voytas DF (2015) Conferring resistance to geminiviruses with the CRISPR–Cas prokaryotic immune system. Nature Plants 1:1-4.

Barrangou R, Doudna JA (2016) Applications of CRISPR technologies in research and beyond. Nature biotechnology 34:933-941

Bortesi L, Zhu C, Zischewski J, Perez L, Bassié L, Nadi R, Forni G, Lade SB, Soto E, and Jin X (2016) Patterns of CRISPR/Cas9 activity in plants, animals and microbes. Plant biotechnology journal 14:2203-2216.

Chandrasekaran J, Brumin M, Wolf D, Leibman D, Klap C, Pearlsman M, Sherman A, Arazi T, and Gal-On A (2016) Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. Molecular plant pathology 17:1140-1153.

Davies G, Gorman R, McGlacken R, Peres S (2022) The social aspects of genome editing: publics as stakeholders, populations and participants in animal research. Laboratory Animals 56:88-96

Doench JG, Fusi N, Sullender M, Hegde M, Vaimberg EW, Donovan KF, Smith I, Tothova Z, Wilen C, and Orchard R (2016) Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. Nature biotechnology 34:184-191.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2023) World food and agriculture – statistical yearbook. Rome (Italy): FAO. Available from: https://doi.org/10.4060/cc8166en

Gutierrez Sanchez PA, Babujee L, Jaramillo Mesa H, Arcibal E, Gannon M, Halterman D, Jahn M, Jiang J, and Rakotondrafara AM (2020) Overexpression of a modified eIF4E regulates potato virus Y resistance at the transcriptional level in potato. BMC genomics 21:1-16.

Hameed A, Mehmood MA, Shahid M, Fatma S, Khan A, and Ali S (2020) Prospects for potato genome editing to engineer resistance against viruses and cold-induced sweetening. GM crops & food 11:185-205.

Ji X, Zhang H, Zhang Y, Wang Y, and Gao C (2015) Establishing a CRISPR–Cas-like immune system conferring DNA virus resistance in plants. Nature Plants 1:1-4.

Kis A, Hamar É, Tholt G, Bán R, and Havelda Z (2019) Creating highly efficient resistance against wheat dwarf virus in barley by employing CRISPR/Cas9 system. Plant biotechnology journal 17:1004.

Kuroiwa K, Danilo B, Perrot L, Thenault C, Veillet F, Delacote F, Duchateau P, Nogué F, Mazier M, and Gallois JL (2023) An iterative gene-editing strategy broadens eIF4E1 genetic diversity in Solanum lycopersicum and generates resistance to multiple potyvirus isolates. Plant Biotechnology Journal 21:918-930.

Le NT, Tran HT, Bui TP, Nguyen GT, Van Nguyen D, Ta DT, Trinh DD, Molnar A, Pham NB, and Chu HH (2022) Simultaneously induced mutations in eIF4E genes by CRISPR/Cas9 enhance PVY resistance in tobacco. Scientific Reports 12:14627.

Li M, Qiu Y, Zhu D, Xu X, Tian S, Wang J, Yu Y, Ren Y, Gong G, and Zhang H (2024) Editing eIF4E in the Watermelon Genome Using CRISPR/Cas9 Technology Confers Resistance to ZYMV. International Journal of Molecular Sciences 25:11468.

Lucioli A, Tavazza R, Baima S, Fatyol K, Burgyan J, and Tavazza M (2022) CRISPR-Cas9 targeting of the eIF4E1 gene extends the potato virus y resistance spectrum of the Solanum tuberosum l. cv. desirée. Frontiers in Microbiology 13:873930.

Ming M, Ren Q, Pan C, He Y, Zhang Y, Liu S, Zhong Z, Wang J, Malzahn AA, and Wu J (2020) CRISPR–Cas12b enables efficient plant genome engineering. Nature plants 6:202-208.

Nikan, J (2016) The most important aphid-borne viral diseases and their management in apple seed production fields. Extension Journal of the Iranian Research Institute of Plant Protection, No. 50111, 50 pages (In farsi).

Noureen A, Khan MZ, Amin I, Zainab T, and Mansoor S (2022) CRISPR/Cas9-mediated targeting of susceptibility factor eIF4E-enhanced resistance against potato virus Y. Frontiers in Genetics 13:922019.

Pourrahim R, Farzadfar Sh, Soltani H, Golnaraghi A, and Ahounmanesh A (2007) Evaluation of the efficacy of two neonicotinoid systemic insecticides absorbed through roots in controlling viral disease vectors in seed potato fields. Journal of Plant Pests and Diseases, Volume 75, Issue 2 (In farsi).

Tashkandi M, Ali Z, Aljedaani F, Shami A, and Mahfouz MM (2018) Engineering resistance against Tomato yellow leaf curl virus via the CRISPR/Cas9 system in tomato. Plant signaling & behavior 13:e1525996.

Tripathi JN, Ntui VO, Ron M, Muiruri SK, Britt A, and Tripathi L (2019) CRISPR/Cas9 editing of endogenous banana streak virus in the B genome of Musa spp. overcomes a major challenge in banana breeding. Communications Biology 2:46.

Uniyal AP, Yadav SK, and Kumar V (2019) The CRISPR–Cas9, genome editing approach: a promising tool for drafting defense strategy against begomoviruses including cotton leaf curl viruses. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology 28:121-132.

Yin K, Han T, Xie K, Zhao J, Song J, and Liu Y (2019) Engineer complete resistance to Cotton Leaf Curl Multan virus by the CRISPR/Cas9 system in Nicotiana benthamiana. Phytopathology Research 1:1-9.

Zhang T, Zheng Q, Yi X, An H, Zhao Y, Ma S, and Zhou G (2018) Establishing RNA virus resistance in plants by harnessing CRISPR immune system. Plant biotechnology journal 16:1415-1423.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-10-07]