

طراحی، مدل سازی و آنالیز محاسباتی crRNA ژن eLF4E1 دخیل در مقاومت به ویروس Y سیب زمینی با استفاده از تکنیک های 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: ۱۴۰۳/۱۲/۰۷ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۶/۲۹)

چکیده

ویروس ها تهدیدی جدی برای تولید محصولات کشاورزی به شمار می روند و مهندسی ضد ویروس با استفاده از بیوتکنولوژی مولکولی، رویکردی مؤثر برای پیشگیری و کنترل این ویروس ها است. استفاده از ابزارهای محاسباتی، به ویژه در زمینه مدل سازی و داکینگ، می تواند دقت طراحی ها را به طور قابل توجهی افزایش دهد. پژوهش حاضر با ادغام بیوانفورماتیک و فناوری CRISPR به طراحی، مدل سازی و ارزیابی محاسباتی crRNA هدف گیری ژن eLF4E1 پرداخته است. ساختار آنزیم های 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) شبیه سازی و به منظور بررسی نحوه اتصال و سطح انرژی اتصالی crRNA با آنزیم های Cas از سرور برخط Hdock استفاده شد. در نتایج طراحی و انتخاب crRNA ها، بهترین توالی طراحی شده توالی GTATAGTTCTTGATGCAGTGTGG بود. crRNA های انتخابی برای هدف گیری ژن هدف eLF4E1 با استفاده از نرم افزار macromolecule builder مدل سازی شد. به منظور بررسی نحوه اتصال و سطح انرژی اتصالی crRNA با آنزیم های 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 به دست آمده از نحوه اتصال و سطح انرژی اتصالی crRNA با آنزیم های Cas، بهترین و اختصاصی ترین سازه مربوط به crRNA مورد نظر با آنزیم Cas13b بود و پس از آن به ترتیب آنزیم های Cas13a، Cas13d و Cas9 بود. از آن جایی که موفقیت آمیز بودن سیستم CRISPR-Cas برای اصلاح صفات یا مقابله با ویروس های RNA آلوده کننده سیب زمینی نیازمند انتخاب دقیق نوع پروتئین Cas و بیان مناسب آن در گیاه است، بر اساس نتایج این پژوهش می توان آنزیم Cas13b را گزینه ای مناسب برای اصلاح صفات یا مداخله علیه ویروس های RNA در سیب زمینی در نظر گرفت.

واژه های کلیدی

داکینگ ملکولی
بیوانفورماتیک
CHOPCHOP
CRISPR

مقدمه

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، Cas13): 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 آر‌ان‌ای‌های 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 گوجه‌فرنگی با Cas9 منجر به تداخل در همانندسازی ویروس شد و کاهش ژنوم ویروس را در گیاهان تراریخته نشان داد (Tashkandi et al. 2018).

سیب‌زمینی به‌عنوان یکی از مهم‌ترین منابع غذایی جهان به‌دلیل محتوای بالای نشاسته، ویتامین‌ها، پروتئین و عملکرد مطلوب خود شناخته می‌شود. ایران با تولید سالانه ۲.۴ میلیون تن، از تولیدکنندگان بزرگ این محصول در جهان به‌شمار 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 ۳۴.۴٪ 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

ژن *eIF4E1* برای ارزیابی میل اتصال و کارایی برش را شبیه سازی می کند (Li et al. 2024).

مواد و روش ها

این مطالعه با ادغام بیوانفورماتیک و فناوری CRISPR به طراحی، مدل سازی و ارزیابی محاسباتی crRNA هدف گیری ژن *eIF4E1* پرداخته است. مراحل کلیدی این فرآیند شامل موارد زیر است: (۱) شناسایی دامنه های محافظت شده در *eIF4E1* که برای تکثیر PVY حیاتی هستند. (۲) طراحی crRNA بهینه با استفاده از ابزار محاسباتی CHOPCHOP و تأیید پیش بینی های اصلاحات غیرهدف برای به حداقل رساندن ویرایش های ژنومی ناخواسته. (۳) شبیه سازی های پیچیده crRNA-Cas برای درک دینامیک های ساختاری و عملکردی برش هدف.

برای انجام این پژوهش، ابتدا توالی ژن هدف *eIF4E1* 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 توالی های crRNA با ویژگی های متفاوت را براساس داده های ورودی برای توالی هدف مورد انتظار، ارائه می دهد. با استفاده از این ابزار، محققان می توانند اطمینان حاصل کنند که crRNA/sgRNA های بهینه را انتخاب می کنند که ژن هدف آن ها را با کارایی بالا و اثرات جانبی کم هدف قرار می دهند و این آن را به یک منبع ضروری برای آزمایش های CRISPR تبدیل می کند.

در این مطالعه به منظور افزایش اختصاصیت و بهبود عملکرد کمپلکس CRISPR، علاوه بر بررسی های 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 ریونوکلئوپروتئینی تشکیل شده از نقطه نظر بیوانفورماتیک ساختاری و میزان تمایل اتصال آنزیم و crRNA نیز مورد بررسی قرار گرفت.

با پیشرفت سریع فناوری CRISPR/Cas، نمونه های موفق تری در مقابله با ویروس های گیاهی مشاهده شده است. این فناوری برای مقاومت در برابر ویروس هایی 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).

استفاده از فناوری CRISPR/Cas می تواند به دو روش اصلی به بهبود مقاومت گیاهان در برابر ویروس ها کمک کند. (۱) ایجاد جهش های هدفمند در ژن های خاص گیاه میزبان برای کاهش تکثیر و انتشار ویروس در گیاه (Bortesi et al. 2016). (۲) هدف گیری مستقیم ویروس ها 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 ویروس های گیاهی و بهبود مقاومت محصولات کشاورزی ایجاد کرده است.

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

تحلیل و مدل سازی محاسباتی نقش حیاتی در تحقیقات CRISPR ایفا می کند و (۱) امکان انتخاب سایت هدف را فراهم می آورد و نواحی محافظت شده و عملکردی در ژن *eIF4E1* که با RNA ویروس PVY تعامل دارند را شناسایی می کند. (۲) اصلاحات غیرهدف را پیش بینی می کند. (۳) بهینه سازی کارایی را انجام می دهد و فعالیت توالی های crRNA برای حداکثر کردن موفقیت ویرایش را پیش بینی می کند (Doench et al. 2016). (۴) مدل سازی مولکولی را انجام می دهد، تعاملات بین crRNA، پروتئین های Cas و

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 ۴۰٪ بود و همچنین هیچ ساختار مکملی با خود نشان نداد و درصد کارایی حدود ۶۸٪ 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.

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.

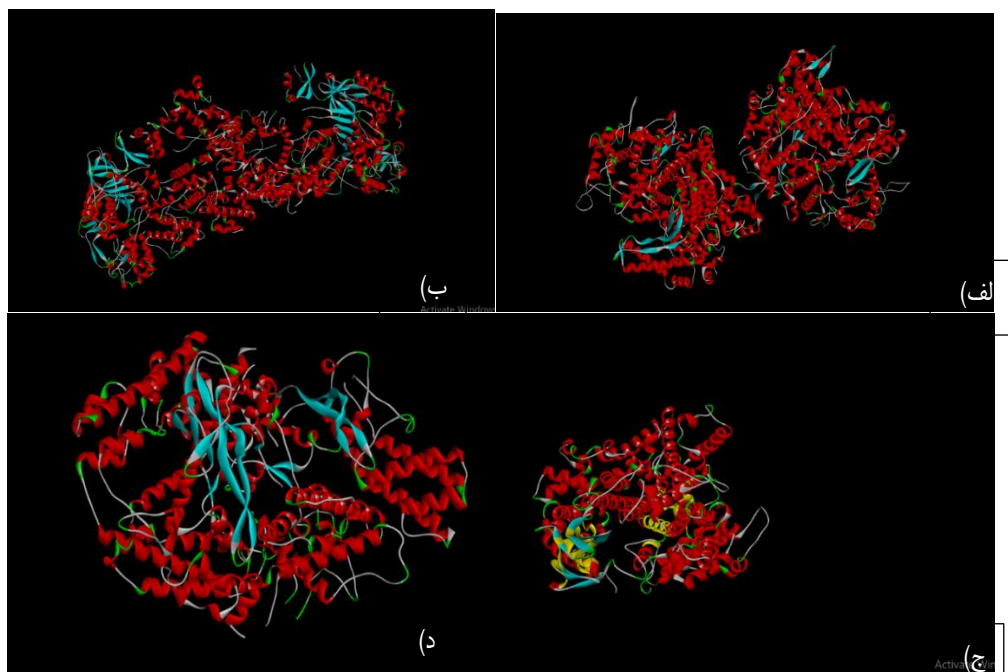
ساختار کریستالوگرافی آنزیم‌های Cas از پایگاه داده پروتئین به آدرس www.rcsb.org دریافت و با استفاده از نرم‌افزار ۵.۳ DS Visualizer (Hanwell et al. 2012) لیگاند و کوفاکتورهای اضافی و مولکول‌های آب موجود در ساختار کریستالی پروتئین حذف شدند. به منظور انجام داکینگ مولکولی بین RNAهای شبیه‌سازی شده با آنزیم‌های Cas از سرور HDOCK استفاده شد. این سرور برخط به منظور 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 به طور معمول در تحقیقات دارویی مدرن برای درک و پیش‌بینی رابطه بین یک مولکول دارو و یک پروتئین هدف از یک میکروپ استفاده می‌شود.

جدول ۱- طراحی crRNA با استفاده از سیستم برخط CHOPCHOP

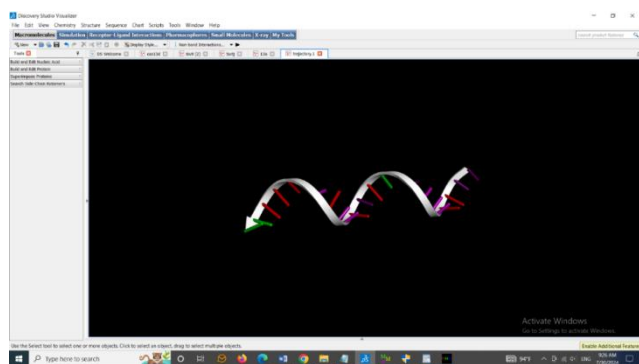
رتبه	توالی هدف	موقعیت ژنومی	رشته	محتوای GC (%)	خود مکملی	کارایی
1	TTAACCCCTTGATACCACCAAAGG	seq:2624	-	40	1	69.07
2	TTCGTAAGGTTGGTAGG	seq:3202	+	45	0	67.98
3	GTATAGTTCTTGATGCAGTGTGG	seq:3162	+	40	0	67.82
4	TTTTGCAGGACGATGCAAAGAGG	seq:3109	+	45	3	67.16
5	TCAACCGGTAACAGCTGAAAGG	seq:2857	-	45	0	64.02
6	CTGATTATCTGCCTTCACATAGG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

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	AGAGAAGGGGACGAAAAGAAAAG	218
2	seq:2519-2541	TGGAAGTTAAGAGGGGAAGTCA	seq:2748-2770	AGAGAAGGGGACGAAAAGAAAAG	251
3	seq:2552-2574	GGAAGTGCTCCTTGTGAGAAAT	seq:2746-2768	AGAAGGGGACGAAAAGAAAAGAT	216
4	seq:2519-2541	TGGAAGTTAAGAGGGGAAGTCA	seq:2746-2768	AGAAGGGGACGAAAAGAAAAGAT	249
5	seq:2551-2573	AGGAAGTGCTCCTTGTGAGAAA	seq:2748-2770	AGAGAAGGGGACGAAAAGAAAAG	219



شکل ۲- ساختار آنزیم های cas9 (الف)، cas13a (ب)، cas13b (ج) و cas13d (د) در نرم افزار Discovery Studio



شکل ۱- crRNA طراحی شده در نرم افزار Discovery Studio

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

ساختار آنزیم های Cas (Cas9, Cas13a, Cas13b و Cas13d) از پایگاه داده RCSB با شماره های دسترسی 6DTD, 7OS0, 4CMP و 6IV9 به دست آمد (شکل ۲). پس از شبیه سازی ساختار سه بعدی crRNA با استفاده از سرور MMB (macromolecule builder)، به منظور بررسی نحوه اتصال و سطح انرژی اتصال crRNA با آنزیم های Cas از سرور برخط Hdock استفاده شد. ۱۰۰ مدل داکینگ ارائه شد. از میان این ۱۰۰ مدل پیش بینی شده، ۱۰ مدل برتر بر اساس سطح انرژی انتخاب شدند. همین طور اطلاعات مربوط به سطح انرژی اتصال (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).

جدول ۳- سطح انرژی اتصال (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
rmsd لیگاند (Å)	112.87	71.18	95.46	91.19	78.90	84.85	88.28	90.73	143.99	65.80

جدول ۴- سطح انرژی اتصال (اسکور داکینگ)، اسکور اطمینان و Ligand rmsd (Å) ۱۰ پیشنهاد برتر مربوط به آنزیم 13cas a

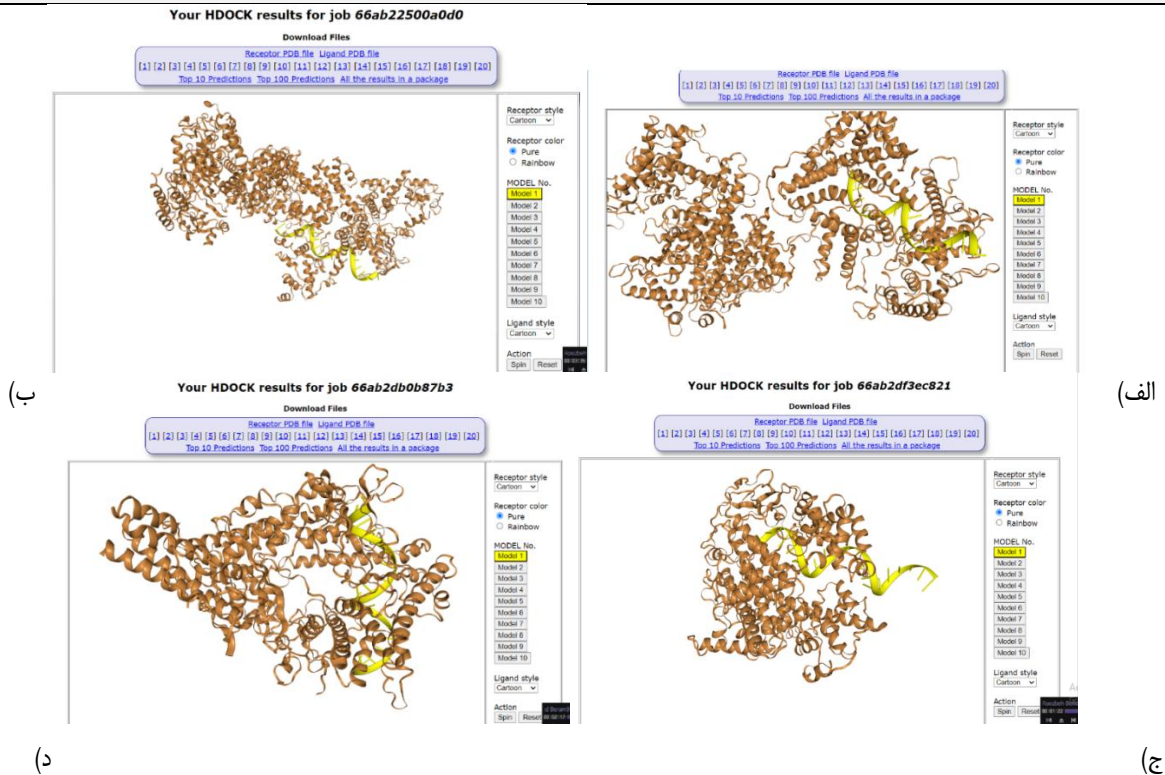
رتبه	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
امتیاز داکینگ	-358.3	-352.4	-347.5	-343.5	-338.1	-337.8	-336.7	-332.4	-325.4	-319.9
امتیاز اطمینان	0.9847	0.9828	0.9811	0.9796	0.9773	0.9772	0.9767	0.9746	0.9710	0.9677
rmsd لیگاند (Å)	92.64	93.47	84.33	94.55	93.48	156.69	88.68	99.23	117.51	70.52

جدول ۵- سطح انرژی اتصال (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
rmsd لیگاند (Å)	117.96	109.82	95.82	116.08	118.46	109.54	118.20	112.59	110.61	131.36

جدول ۶- سطح انرژی اتصال (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
rmsd لیگاند (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 آنزیم های cas9 (الف)، 13cas a (ب)، cas13b (ج) و cas13d (د)

کرده و نواحی ضروری برای حساسیت به ویروس را هدف قرار داد. با ویرایش هر دو ناحیه، آن‌ها توانستند مقاومت به چندین پوتی ویروس را بدون تأثیر بر شروع ترجمه فراهم کنند. جلب 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 et al. 2020). 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 آلتوتراپلوئید K326 ویرایش کرد. جهش در *eIF4E1-S* منجر به مقاومت بیشتر به PVY شد، اما تنها زمانی که جهش‌ها در *eIF4E1-T*، *eIF4E1-S*، *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،

ویروس سیب‌زمینی (PVY) تهدیدی بزرگ برای تولید سیب‌زمینی در سطح جهانی باقی می‌ماند که عمدتاً به دلیل 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 RT-PCR و DAS-ELISA 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) ژنوم برای القای جهش در ژن *eIF4E1* در گوجه‌فرنگی استفاده

خارجی معمولاً از یک گونه غیرمرتبط وارد ژنوم میزبان می شود، در حالی که در گیاهان ویرایش شده ژنومی، معمولاً تنها توالی های درون زاد تغییر داده شده یا حذف می شوند و نیازی به وارد کردن ژن جدید وجود ندارد. ۲- **روش ویرایش:** ترانس ژنیک سازی متکی بر انتقال ژن خارجی از طریق ناقل هایی مانند *Agrobacterium* یا بیولستیک است، اما ویرایش ژنومی با استفاده از ابزارهایی نظیر CRISPR باعث ایجاد تغییرات هدفمند در ژنوم موجود می شود، بدون افزودن توالی های نو. ۳- **تبعات قانونی:** محصولات ترانس ژنیک در بسیاری از کشورها تحت قوانین سخت گیرانه GMO قرار دارند. اما بسیاری از کشورها محصولات حاصل از ویرایش ژنومی را - در صورتی که ژن خارجی وارد نشده باشد - از قوانین GMO مستثنی می دانند. ۴- **میزان پذیرش عمومی:** گیاهان ترانس ژنیک با مقاومت ها و نگرانی هایی از سوی عموم مردم و گروه های زیست محیطی مواجه اند، در حالی که محصولات ویرایش شده ژنومی به دلیل عدم استفاده از ژن خارجی و شباهت بیشتر به اصلاحات طبیعی، مقبولیت بالاتری دارند. ۵- **خطر درج خارج از هدف:** در روش های ترانس ژنیک احتمال درج غیرهدفمند ژن در مکان های حساس ژنومی وجود دارد. در حالی که در ویرایش ژنومی، به ویژه با استفاده از سیستم هایی مانند CRISPR-Cas9 یا Cas13، خطر درج خارج از هدف کمتر و قابل کنترل تر است (Davies et al. 2022).

به طور کلی، استفاده از ویرایش ژنوم مبتنی بر CRISPR برای هدف قرار دادن عوامل میزبان درگیر در تکثیر PVY استراتژی امیدوارکننده ای 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 قوی تر در برابر PVY را در گونه های مختلف گیاهی فراهم می کند. تحقیقات آینده باید بر بهینه سازی این استراتژی های ویرایش برای گسترش بیشتر تنوع ژنی در دسترس برای اصلاح گیاهان مقاوم به ویروس متمرکز شوند، تا از پایداری تولیدات کشاورزی در برابر سویه های نوظهور ویروسی اطمینان حاصل کنند.

سپاسگزاری

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

به ویژه در برابر PVY و سایر پوتی ویروس ها، اثبات شده است. با این حال، اجرای موفقیت آمیز آن نیازمند توجه دقیق به هم پوشانی ژنی، ویژگی ویروس، و توازن بین مقاومت و عملکرد محصول است. تحقیقات آینده با تمرکز بر ویرایش بافت ویژه، هدف گیری ترکیبی ایزوفورم های eIF4E و مقابله با سویه های جدید ویروسی، سودمندی این رویکرد را در کشاورزی بیشتر افزایش خواهد داد.

نتیجه گیری کلی

گسترش تکنیک های مولکولی نقش محوری در پیشگیری و کنترل ویروس های گیاهی بیماری زا دارند و ظهور و توسعه فناوری های کریسپر تولید و دستیابی به منابع مقاومتی جدید را سرعت می بخشد توسعه و درک سیستم های کریسپر اکتشاف و شناسایی عملکرد ژن های مقاومت مغلوب توسط این سیستم ها یک روش مهم در پیشگیری و کنترل بیماری های ویروسی است. در این تحقیق طراحی، مدل سازی و آنالیز محاسباتی crRNA ژن *eLF4E1* انجام شد و همچنین نحوه اتصال و سطح انرژی اتصال crRNA با آنزیم های Cas مورد بررسی قرار گرفت و بهترین و اختصاصی ترین سازه به منظور کاهش زمان، هزینه و دفعات آزمون و خطا معرفی شد. قوی ترین انرژی اتصال مربوط به crRNA مورد نظر با آنزیم Cas13b بود و پس از آن آنزیم های Cas13d و Cas13a بود. ضعیف ترین انرژی اتصال مربوط به آنزیم Cas9 با crRNA مورد مطالعه بود. لذا از آنجایی که نتایج موفقیت آمیز سیستم CRISPR-Cas برای اصلاح صفت یا تداخل با ویروس های آلوده کننده RNA سیب زمینی نیازمند انتخاب دقیق پروتئین Cas و بیان آن در گیاهان سیب زمینی است. با توجه به نتایج این تحقیق می توان از آنزیم Cas13b جهت اصلاح صفت یا تداخل با ویروس های آلوده کننده استفاده کرد. هر چند ذکر این نکته ضروری است که علاوه بر انتخاب دقیق پروتئین Cas، سایر پیش نیازها شامل انتخاب وکتورهای بیان، انتخاب پروموتور(های) مناسب و بهینه سازی کدون است.

از منظر زیست فناوری و چارچوب های قانونی، تفاوت های بنیادینی بین گیاهان تراریخته (GMO) و گیاهان ویرایش شده ژنومی (Genome-edited) وجود دارد که لازم است در مطالعات مربوط به کاربردهای سیستم CRISPR مورد توجه قرار گیرد. این تفاوت ها به شرح زیر هستند: ۱- **منشأ ژن:** در گیاهان ترانس ژنیک، یک ژن

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.