

Applied molecular biology

Vol.4, issu.7, Summer. 2025

P.P 81-98

Cancer diagnosis by identifying transcription factors and using CRISPR technology

Fatemeh Farokhi¹, Fatemeh Akbarian^{2*}

1. MS.C, Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Ale Taha Institute of Higher Education, Tehran, Iran

2. Assistant Professor, Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Ale Taha Institute of Higher Education, Tehran, Iran. (Corresponding author: f.akbarian@aletaha.ac.ir, ORCID: 0000-0002-4009-0827)

Article history:

Received:18/08/2025

Revised:02/09/2025

Accepted:16/09/2025

Abstract

Transcription factors (TFs) are essential cellular proteins that regulate gene expression, and their abnormal expression levels are directly associated with physiological disorders and diseases such as cancer. Given that accurate and timely cancer diagnosis plays a crucial role in determining the efficacy of therapeutic interventions and mitigating disease complications, the development and implementation of precise and effective diagnostic methods for their detection are of paramount importance. In recent years, CRISPR-based systems have revolutionized the life sciences, particularly in the diagnosis of various infectious, genetic, and epigenetic diseases, owing to their programmable nature, high precision, and sensitivity. In this study, we aim to explore CRISPR-based diagnostic approaches designed for cancer detection through the identification of transcription factors.

Keywords: Cancer, Transcription factors, Diagnosis, CRISPR- Cas12a, CRISPR- dCas9, CRISPRreader.

زیست‌شناسی مولکولی کاربردی

سال چهارم / شماره ۷ / تابستان ۱۴۰۴

صفحات : ۸۱-۹۸

کاربرد فناوری کریسپر در شناسایی فاکتورهای رونویسی مرتبط با سرطان

فاطمه فرخی^۱، فاطمه اکبریان^{۲*}

۱. کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، مؤسسه آموزش عالی آل‌طه، تهران، ایران.

۲. استادیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، مؤسسه آموزش عالی آل‌طه، تهران، ایران.

(نویسنده مسئول: f.akbarian@aletaha.ac.ir, ORCID: 0000-0002-4009-0827)

تاریخ بارگزاری: ۱۴۰۴/۰۵/۲۷ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۶/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۶/۲۵

چکیده

فاکتورهای رونویسی پروتئین‌هایی حیاتی در سلول هستند که بیان ژن‌ها را تنظیم می‌کنند و تغییر غیرطبیعی سطح آن‌ها، به طور مستقیم با اختلالات فیزیکی و بیماری‌هایی همچون سرطان مرتبط است. با توجه به اینکه تشخیص دقیق و به هنگام سرطان نقش مهمی در میزان تاثیرگذاری روش‌های درمانی و بهبود عوارض بیماری دارد، طراحی و استفاده از روش‌های تشخیصی دقیق و موثر برای شناسایی آن، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در سال‌های اخیر، سیستم‌های مبتنی بر کریسپر به علت قابل برنامه‌ریزی بودن و همچنین دقت و حساسیت بالا، تحول عظیمی در علوم زیستی، به خصوص در حوزه تشخیص بیماری‌های مختلف عفونی، ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی، ایجاد کرده‌اند. در این مطالعه قصد داریم به بررسی روش‌های تشخیصی مبتنی بر سیستم‌های کریسپری که برای شناسایی سرطان با استفاده از فاکتورهای رونویسی طراحی شده‌اند، بپردازیم.

واژه‌های کلیدی: کریسپر، تشخیص سرطان، فاکتور رونویسی و CRISPR.

مقدمه

فاکتورهای رونویسی پروتئین‌هایی هستند که به نواحی تنظیمی خاصی از DNA از جمله نواحی تقویت‌کننده (enhancer) یا خاموش‌کننده (silencer) و پروموتور متصل می‌شوند و به تبدیل مولکول DNA به RNA در طی فرایند رونویسی کمک می‌کنند (۱ و ۲). این پروتئین‌ها در فراخوانی کوفاکتورهای رونویسی و آنزیم RNA پلی‌مراز به جایگاه مناسب رونویسی به منظور تشکیل کمپلکس آغاز رونویسی نقش دارند (۳). تاکنون مطالعات زیادی در مورد نقش فاکتورهای رونویسی در سلول انجام شده است. نتایج حاصل از این مطالعات نشان می‌دهد فاکتورهای رونویسی دارای نقش‌های مهم و متنوعی در سلول هستند و به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های اصلی عملکردهای طبیعی سلولی و مولکولی، از تکامل جنین، تمایز سلولی و رشد، تا تنظیم اختصاصی فرایندهای ایمنی در سلول فعالیت دارند (۴ و ۵). در واقع، فاکتورهای رونویسی متعددی که به‌عنوان تنظیم‌کننده اصلی عمل می‌کنند، در حالت طبیعی نقش مهمی در پیشگیری از بیماری‌ها از جمله سرطان دارند، اما در صورتی که از حالت طبیعی خود خارج شوند، می‌توانند به عاملی برای ایجاد بیماری تبدیل شوند (۶ و ۷)؛ بنابراین بروز تغییراتی مثل جهش‌ها یا تغییرات اپی‌ژنتیکی در فاکتورهای رونویسی، ممکن است منجر به ایجاد اختلال در عملکرد طبیعی آنها شده و سبب بروز بیماری‌های نئوپلاستیک یا غیرنئوپلاستیک شود (۸ و ۹).

سرطان، دومین علت مرگ‌ومیر در جهان به‌شمار می‌رود (۱۰). طبق آمار جهانی سرطان در سال ۲۰۱۸، از هر پنج الی شش نفر، یک نفر احتمال ابتلا به سرطان در طول زندگی خود را دارد (۱۱). این بیماری چالش‌های متعددی از جمله رشد کنترل‌نشده سلولی، متاستاز و مقاومت به درمان ایجاد می‌کند که نیاز به روش‌های تشخیصی دقیق و به‌هنگام را ضروری می‌سازد. یک رویکرد پیشگیرانه برای تشخیص سرطان در مراحل اولیه می‌تواند درمان‌ها را مؤثرتر، با عوارض جانبی کمتر و ماندگارتر کند. در حال حاضر روش‌هایی مثل بیوپسی مایع، تصویربرداری مولکولی پیشرفته و سیستم‌های مبتنی بر کریسپر (CRISPR) انقلابی در حوزه تشخیص سرطان ایجاد کرده‌اند.

کریسپر نوعی سیستم ایمنی تطابق پذیر در باکتری‌ها و آرکی‌هاست که قابلیت بالایی به منظور استفاده در زمینه مهندسی ژنتیک دارد. سیستم کریسپر به‌طور گسترده در تشخیص و درمان عفونت‌ها، بیماری‌های ژنتیکی، اختلالات متابولیکی و سرطان‌ها استفاده می‌شود. سیستم‌های مبتنی بر کریسپر از دو جزء اصلی به نام‌های پروتئین Cas و مولکول راهنما (gRNA) تشکیل شده است. این دو مولکول به یکدیگر متصل می‌شوند و هریک وظیفه‌ای را در راستای پیشبرد اهداف سیستم برعهده دارد. پروتئین Cas وظیفه برش توالی DNA یا RNA هدف را برعهده دارد و مولکول gRNA، پروتئین Cas را به محل دقیق و اختصاصی که قرار است برش در آنجا اتفاق بیفتد، هدایت می‌کند (۱۲). سیستم‌های کریسپری براساس نوع و تعداد پروتئین‌های Cas، به دو گروه کلی کلاس I و کلاس II تقسیم می‌شوند. سه نوع پروتئین Cas9، Cas12 و Cas13 در کلاس II سیستم‌های کریسپری قرار می‌گیرند (۱۳ و ۱۴). Cas9 از شناخته‌شده‌ترین پروتئین‌های سیستم کریسپری است که در زمینه‌های مختلف کاربرد دارد و در حوزه‌های بالینی برای تشخیص و درمان استفاده می‌شود (۱۵). Cas12 و Cas13 به علت داشتن توانمندی خاص در ایجاد «برش جانبی» (Collateral cleavage)، بیشتر در حوزه تشخیص کاربرد دارد. این پروتئین‌ها در صورت اتصال به ناحیه هدف خود، فعال شده و می‌توانند هر توالی نوکلئوتیدی در اطراف خود را برش دهند؛ بنابراین چنانچه در محیط آزمایش، پروب‌های فلوروفور / خاموش‌کننده وجود داشته باشد، در صورت فعال شدن پروتئین Cas، این پروب‌ها نیز برش‌خورده و سیگنال فلئورسنت آزاد خواهد شد (۱۶). در سال‌های اخیر، کریسپر به یک فناوری رایج برای اصلاح ژن تبدیل شده است که می‌توان از آن برای تغییر گونه‌ها و بررسی عملکرد ژن‌ها استفاده کرد (۱۷). آنزیم‌های نوکلئازی سیستم‌های کریسپری مثل پروتئین cas9 قادرند در هر دو رشته DNA شکست ایجاد کنند و همچنین، به‌واسطه الگوهای همولوگ، ترمیم DNA را به‌صورت نوترکیب انجام دهند (۱۸). ایجاد جهش در آنزیم‌های نوکلئازی مثل cas9 می‌تواند قابلیت‌های جدیدی در آن‌ها به‌وجود آورد که برای اهداف گوناگون مورد استفاده قرار گیرند. به‌عنوان مثال، deadcas9 (dcas9) شکل تغییریافته‌ای از پروتئین cas9 است که قادر است با کمک gRNA به ناحیه خاصی از DNA متصل شود، اما

توانایی ایجاد برش در توالی هدف را ندارد (۱۹). این محدودیت به علت ایجاد جهش در دمین‌های نوکلئازی پروتئین cas9 شامل HNH و RuvC حاصل می‌شود و به محققان اجازه می‌دهد تا با استفاده از این آنزیم، بدون ایجاد برش در ناحیه مورد نظر، توالی‌های خاصی از DNA و فرایندهای سلولی را مورد هدف قرار دهند (۲۰). از آنزیم dCas9 به دو صورت کلی می‌توان استفاده کرد که با عناوین CRISPRi و CRISPRa شناخته می‌شود. در روش CRISPRi، آنزیم dCas9 با اتصال به ناحیه پروموتری ژن، مانع از اتصال RNA پلی‌مراز به این ناحیه شده و از آغاز رونویسی جلوگیری می‌کند. در CRISPRa، این آنزیم با اتصال به فعال‌کننده‌های رونویسی، آن‌ها را در معرض نواحی فعال‌کننده پروموتری ژن قرار می‌دهد تا میزان بیان ژن افزایش یابد (۲۱). این قابلیت dCas9 یعنی تنظیم بیان ژن‌های هدف در سلول، از طریق حس کردن القاکننده‌های برون‌زا یا پروتئین‌های درون‌زا فعال می‌شود (۲۲). این ویژگی سبب می‌شود که آنزیم dCas9 قادر به شناسایی سیگنال‌های کلیدی و مهم سلول‌های توموری باشد. به این ترتیب، تنظیم بیان ژن‌های پایین‌دست از طریق dCas9 القایی در شناسایی سلول‌های سرطانی مؤثر است و حتی می‌تواند از رشد تومورهای بدخیم نیز جلوگیری کند (۲۳).

شناسایی سلول‌های سرطانی براساس فاکتورهای رونویسی c-Myc و Get1 تشخیص مبتنی بر CRISPR-Cas9

گروهی از دانشمندان به منظور شناسایی سلول‌های سرطانی مثانه با کمک فاکتورهای رونویسی، یک مدار منطقی زیستی (Logical circuit AND gate) طراحی کردند. در این روش دو شرط برای سیستم تعریف می‌شود و تنها در صورتی که هر دو شرط برقرار باشد، سیستم عملکرد خواهد داشت. در مطالعه‌ای که توسط این محققان صورت گرفت، یک مدار ژنی طراحی شد. پروموتری hUPII که به صورت اختصاصی در سلول‌های بافت مثانه یافت می‌شود و mRNA تولیدکننده Cas9 را بیان می‌کند، پروموتری hTERT که در سلول‌های سرطانی فعالیت دارد و sgRNA را تولید می‌کند، پروموتری CMV که با پروتئین LacI مهار می‌شود و ژن تولیدکننده پروتئین لوسیفراز، اجزای اصلی تشکیل‌دهنده این مدار ژنی هستند. در سرطان مثانه، دو فاکتور رونویسی c-Myc و

Get1 به میزان زیادی بیان می‌شوند. در صورت اتصال این دو پروتئین به نواحی تنظیمی پروموتورهای hUPII و hTERT این دو پروموتور فعال می‌شوند. پروموتور TERT تحت تأثیر فاکتور رونویسی c-Myc و پروموتور UPII بر اثر اتصال Get1 فعال می‌شود (۲۴) و (۲۵). در صورتی که هر دوی این پروموتورها فعال شوند، sgRNA و Cas9 بیان شده و با ایجاد کمپلکس تأثیرگذار (Effector complex)، ژن LacI را حذف می‌کند. با حذف LacI، مهار پروموتور CMV برداشته می‌شود، در نتیجه ژن لوسیفراز که در پایین دست این پروموتور قرار دارد، بیان شده و در نهایت، سلول به صورت درخشان دیده می‌شود. در صورت فعال نشدن هر یک از پروموتورهای hUPII یا hTERT، این سیستم عملکرد تشخیصی نخواهد داشت. نتایج بررسی‌ها نشان می‌دهد فعال شدن هر دو پروموتور، در صورت وجود فاکتورهای رونویسی c-Myc و Get1 اتفاق می‌افتد و این شرایط تنها در سلول‌های سرطانی مثانه ایجاد می‌شود (۲۶).

تشخیص مبتنی بر CRISPRReader

یکی از مشکلاتی که در روش‌های مبتنی بر کریسپر وجود دارد، انتقال سیستم‌های کریسپری به سلول‌های هدف است. Adeno associated virus (AAV) که کارآمدترین وکتور ژن درمانی برای کاربردهای بالینی است، ظرفیتی کمتر از طول سیستم‌های کریسپری دارد (۲۷ و ۲۸). AAVها نمی‌توانند بیش از ۵kb از توالی DNA را در خود جای دهند (۲۹-۳۱). به همین دلیل، محققان نوعی از سیستم کریسپری را طراحی کردند که در آن فاکتور رونویسی کریسپر و یک فعال‌کننده ترجمه RNA در کنار هم قرار می‌گیرند و قادرند بیان ژن را به صورت مستقل از پروموتور کنترل کنند. تمام اجزای این سیستم کریسپری می‌تواند درون یک AAV منفرد قرار بگیرد. این تکنولوژی که CRISPRReader نامیده می‌شود، بیان ژن را در هر دو سطح رونویسی و ترجمه کنترل می‌کند (۳۲ و ۳۳). فناوری CRISPRReader علاوه بر این که در فرایندهای اصلاح ژن و تنظیم بیان نقش دارد، در تشخیص سلول‌های سرطانی براساس شناسایی فاکتورهای رونویسی نیز مؤثر است. پژوهشگرانی که برای تشخیص سلول‌های سرطانی مثانه با کمک فاکتورهای رونویسی، مدار منطقی زیستی طراحی کرده بودند (۲۶)، پس از مدتی

با ایجاد تغییراتی در این سیستم، به دنبال راهکاری برای افزایش دقت و حساسیت آن بودند. به همین منظور از فناوری CRISPRReader استفاده کردند و با حذف توالی‌های پروموتور، تقویت‌کننده (enhancer) و 5'UTR، طراحی ساده‌تری برای مدار ژنی ارائه دادند (۳۳). با این کار، حدود ۳/۲ kb از طول مدار ژنی که در مطالعه اولیه طراحی شده بود، کاهش یافت و یک مدار ژنی کوچک ایجاد شد. این مدار کوچک با استفاده از یک وکتور منفرد به سلول‌ها منتقل می‌شود در حالی که مدار ژنی قبلی، باید با استفاده از چندین وکتور پلاسمیدی به سلول‌های هدف انتقال می‌یافت.

پس از حذف توالی‌های پروموتوری، عناصر اتصالی فاکتورهای رونویسی جایگزین آن‌ها شدند. فاکتورهای رونویسی c-Myc و Get1 که در سلول‌های سرطانی مثانه وجود دارند، با اتصال به این عناصر، میزان بیان sgrNA₁ و sgrNA₂ را افزایش می‌دهند. افزایش بیان sgrNA₁ سبب اتصال این مولکول به همراه پروتئین dCas9 به نواحی بالادست ژن‌های c-Myc و Get1 شده و پس از فراخوانی پروتئین‌های فعال‌کننده رونویسی مثل VP64، بیان آن‌ها را تقویت می‌کند و به این ترتیب، مکانیسم بازخورد مثبت (Positive feedback mechanism) و تقویت سیگنال ایجاد می‌شود. کمپلکس Cas9-VP64 در صورت اتصال به مولکول sgrNA₂، به توالی ژن LacI متصل شده و با اعمال خاصیت نوکلئازی، آن را حذف می‌کند. این تفاوت در عملکرد پروتئین Cas9 به علت تفاوت در طول مولکول‌های sgrNA₁ و sgrNA₂ است (۳۴ و ۳۲). طول توالی spacer در مولکول sgrNA₁، ۱۴ نوکلئوتید و در sgrNA₂، ۲۰ نوکلئوتید است. پس از حذف مهارکنندگی LacI از پروموتور CMV، پروتئین لوسیفراز بیان می‌شود.

در انتهای این مطالعه، وضعیت سلول‌های سالم و بیمار که با مدار ژنی سنتی (تهیه شده در مطالعه قبلی) و مدار ژنی کوچک (حاصل از انجام این مطالعه) مورد بررسی قرار گرفته بودند، پس از گذشت ۴۸ ساعت از انتقال وکتورها به سلول‌ها، با یکدیگر مقایسه شد. نتایج این مقایسه نشان می‌داد هر دو روش در شناسایی سلول‌های سالم از بیمار موفق هستند؛ چرا که در سلول‌های اپیتلیالی طبیعی و سالم مثانه، به دلیل اثر مهاری حاصل از LacI، رونویسی از گزارشگر لوسیفراز به طور مؤثر انجام نشده و این ژن خاموش می‌ماند، اما برای ایجاد تمایز بین سلول‌های سرطانی بسیار بدخیم و سلول‌های

سرطانی که میزان بدخیمی کمتری دارند، مدار ژنی کوچک کارآمدتر است؛ زیرا دارای قابلیت تشخیص بیان ۱/۵ برابری نشانگر لوسیفراز در سلول‌های سرطانی بسیار بدخیم نسبت به سلول‌هایی با بدخیمی کمتر است (۳۳). این روش نه تنها قادر به شناسایی و ایجاد تمایز بین سلول‌های سرطانی است، بلکه می‌تواند با استفاده از ژن‌های درمانی، در از بین بردن این سلول‌ها و درمان نیز مؤثر واقع شود.

شناسایی سلول‌های سرطانی براساس فاکتور رونویسی Ets-۱

محدودیتی که در استفاده از مدار ژنی مبتنی بر CRISPRReader حساس به c-Myc و Get1 وجود دارد، این است که به علت اختصاصیت عملکرد فاکتورهای رونویسی استفاده شده در آن، فقط برای تشخیص سرطان مثانه قابل استفاده است. به همین علت پژوهشگران روی فاکتور رونویسی دیگری به نام Ets-۱ مطالعاتی انجام داده‌اند. این فاکتور رونویسی در طیف وسیعی از سلول‌های توموری بیان می‌شود (۳۵). براساس مطالعات گذشته، پروموتور TERT در تعداد زیادی از تومورها نرخ بالایی از جهش را نشان می‌دهد. این جهش‌ها به خصوص در جایگاه اتصال فاکتور رونویسی Ets-۱ بسیار فراوان هستند (۳۶ و ۳۷). به همین علت، استفاده از فناوری CRISPRReader برای شناسایی Ets-۱ می‌تواند گزینه مناسبی به منظور توسعه یک ابزار پرکاربرد برای شناسایی سرطان‌ها باشد. بررسی‌ها نشان می‌دهد این روش قادر به تشخیص طیف گسترده‌ای از سرطان‌ها از جمله سرطان مثانه و سرطان معده است و همچنین می‌تواند القاکننده آپوپتوز در سلول‌های سرطانی باشد.

• شناسایی سلول‌های سرطانی مثانه با فاکتور رونویسی Ets-۱

محققان به منظور ارزیابی اختصاصیت سیستم CRISPRReader در شناسایی سلول‌های سرطانی مثانه از سلول‌های سالم، آزمایشی طراحی کردند. در این آزمایش، پلاسمیدهای حاوی سیستم CRISPRReader به دو گروه از رده‌های سلولی مختلف شامل سلول‌های سرطانی مثانه (۲۴-T، ۵۶۳۷، RT۴) و سلول‌های اپیتلیالی طبیعی مثانه (۱-SV-HUC) منتقل شدند (۲۳). فاکتور رونویسی Ets-۱ در سلول‌های سرطانی برخلاف سلول‌های سالم، بیان بالایی دارد (۳۵)؛ بنابراین انتظار می‌رفت سیستم مذکور

قادر به شناسایی پروتئین Ets-1 در این سلول‌ها باشد و با خنثی کردن اثر پروتئین‌های مهاری، ژن گزارشگر لوسیفراز یا GFP را بیان کند. در صورتی که در سلول‌های سالم به علت عدم بیان Ets-1، قادر به حذف ژن پروتئین مهاری نبوده و نمی‌تواند GFP یا لوسیفراز را تولید کند. نتایج حاصل از این آزمایش با پیش‌بینی‌های صورت گرفته به‌طور کامل تطابق داشت. فعالیت لوسیفراز به میزان قابل‌توجهی در گروه سلول‌های سرطانی افزایش یافته بود، درحالی‌که هیچ فعالیت قابل اندازه‌گیری از نشانگرها در سلول‌های طبیعی مشاهده نمی‌شد؛ بنابراین مشخص شد سیستم CRISPR/Reader قادر به تمایز اختصاصی سلول‌های نئوپلاستیک مثانه از سلول‌های طبیعی براساس سطح بیان Ets-1 است.

• شناسایی سلول‌های سرطانی معده با فاکتور رونویسی Ets-1

مشابه روشی که برای شناسایی سلول‌های سرطانی مثانه انجام شد، آزمایشی برای ارزیابی امکان تشخیص سرطان معده با کمک فناوری CRISPR/Reader صورت گرفت. با این تفاوت که این‌بار به‌جای سلول‌های سرطانی و سالم مثانه، از رده‌های سلولی معده استفاده شد. پلاسمیدهای حاوی مدار ژنی طراحی شده، به رده‌های سلولی ۱۶۴۰ RPMI، BGC-۸۲۳ و HGC-۲۷ به‌عنوان سلول‌های سرطانی معده و GES-1 به‌عنوان سلول‌های اپیتلیالی طبیعی معده منتقل شدند. بیان بالای لوسیفراز در رده‌های سلولی سرطانی نشان‌دهنده پتانسیل روش CRISPR/Reader در ایجاد تمایز بین سلول‌های سالم و سرطانی معده است (۲۳).

حسگرهای مبتنی بر CRISPR/Cas12a برای شناسایی فاکتورهای رونویسی

در سال ۲۰۲۱ دو حسگر زیستی مبتنی بر CRISPR/Cas12a به منظور شناسایی فاکتورهای رونویسی براساس اصولی متفاوت طراحی شدند (۳۸ و ۳۹). یکی از این حسگرهای زیستی با ادغام روش «ایجاد رقابت مولکولی» و «فناوری کریسپر» قادر به شناسایی فاکتورهای رونویسی شده است (۳۸) درحالی‌که حسگر زیستی دیگر، «محافظت اگزونوکلئازی» را جایگزین «رقابت مولکولی» کرده و بدین‌وسیله، شناسایی فاکتورهای رونویسی را محقق می‌سازد (۳۹). به‌منظور اطمینان از صحت عملکرد و

کارایی این حسگرها، توانمندی آنها در شناسایی فاکتور رونویسی NF- κ B مورد ارزیابی قرار گرفت. فاکتور هسته‌ای کاپا-B (NF- κ B) یک فاکتور رونویسی فراگیر در سلول‌های پستانداران است (۴۰) و بیان بیش از ۱۵۰ ژن را تنظیم می‌کند و در پاسخ به استرس التهابی (۴۱)، عفونت‌های ویروسی (۴۲)، تکثیر سلولی (۴۳) و آپوپتوز (۴۴ و ۴۵) شرکت دارد. تغییر سطح این پروتئین به شدت در آرتريت روماتوئید (۴۶)، سرطان (۴۷ و ۴۸) و اختلالات عصبی (۴۹) نقش دارد و آن را به یک نشانگر زیستی بالقوه در تشخیص و درمان بالینی تبدیل می‌کند.

• شناسایی فاکتورهای رونویسی با استفاده از CRISPR/Cas12a و ایجاد رقابت مولکولی

در این روش یک پروب dsDNA طراحی می‌شود که دارای توالی اتصال به فاکتور رونویسی است. در حالت عادی (بدون حضور فاکتور رونویسی) این پروب می‌تواند توسط Cas12a-crRNA شناسایی شده و به این ترتیب، فعالیت DNase پروتئین Cas12a را فعال کند. در این صورت، ssDNA که در دو سر آن مولکول‌های فلوروفور و خاموش‌کننده وجود دارد توسط Cas12a برش می‌خورد و نور فلوروسنت آزاد می‌شود، اما زمانی که فاکتور رونویسی در محیط وجود داشته باشد، به دلیل داشتن توالی اختصاصی، به پروب متصل می‌شود. این اتصال مانع از شناسایی پروب توسط Cas12a-crRNA شده و در نتیجه فعالیت DNase پروتئین Cas12a غیرفعال می‌ماند و در نتیجه سیگنال فلوروسنت آزاد نخواهد شد (۳۸).

• شناسایی فاکتورهای رونویسی با استفاده از CRISPR/Cas12a و محافظت اگزونوکلئازی

در این روش نیز یک پروب dsDNA به نام «فعال‌کننده» طراحی می‌شود که دارای توالی اتصال به فاکتور رونویسی است. در صورتی که فاکتور رونویسی در محیط وجود داشته باشد و به این پروب متصل شود، آن را از هضم شدن توسط آنزیم اگزونوکلئاز III حفظ می‌کند. در غیر این صورت، پروب توسط اگزونوکلئاز III تجزیه می‌شود. پروب‌هایی که بر اثر اتصال به فاکتور رونویسی از هضم شدن توسط این آنزیم در امان مانده‌اند، با اتصال به CRISPR/Cas12a باعث فعال شدن پروتئین Cas12a می‌شوند. در نتیجه این

اتفاق، ssDNAهای موجود در محیط نیز توسط این پروتئین برش می‌خورند و سیگنال فلئورسنت آزاد می‌شود (۳۹). از این حسگر زیستی می‌توان برای تشخیص اندازه‌گیری فاکتورهای رونویسی در نمونه‌های بیولوژیک و همچنین برای شناسایی مولکول‌هایی که مانع اتصال فاکتورهای رونویسی به DNA می‌شوند (مهارکننده‌ها) استفاده کرد.

بحث و نتیجه‌گیری

تغییر غیرطبیعی در سطح بیان فاکتورهای رونویسی می‌تواند نشانه‌ای از بروز خطا در عملکرد صحیح سلول و ایجاد بیماری باشد؛ بنابراین، فاکتورهای رونویسی شناساگرهای زیستی مهمی به‌شمار می‌روند که در تشخیص بیماری‌های مختلفی مثل سرطان کاربرد دارند. پروتئین‌های c-Myc و Get1 دو فاکتور رونویسی مربوط به سرطان مثانه هستند که برای شناسایی آن‌ها، روشی مبتنی بر CRISPR-Cas9 با استفاده از مدار زیستی منطقی، طراحی شده است. روش تشخیصی دیگری که با همین هدف توسعه یافته است، سیستم CRISPRReader است. این سیستم، علاوه بر پروتئین‌های c-Myc و Get1، می‌تواند پروتئین ETS-1 را نیز که در اکثر سرطان‌ها از جمله سرطان معده بیان می‌شود، شناسایی کند. علاوه بر این موارد، سیستم CRISPR-Cas12a نیز در ترکیب با دو روش مجزای محافظت اگزونوکلئازی و رقابت مولکولی، فاکتورهای رونویسی مختلفی مثل NF- κ B را شناسایی و اندازه‌گیری می‌کند. با استفاده از این روش‌ها می‌توان سرطان را در مراحل اولیه شناسایی کرده و از پیشرفت بیماری و بروز عوارض متعدد آن جلوگیری کرد. با این حال، چالش‌هایی نیز برای استفاده از این روش وجود دارد. به‌عنوان مثال، ممکن است به‌دلیل وجود مولکول‌های مختل‌کننده (مانند سایر پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک آزاد)، حساسیت و اختصاصیت آن کاهش یابد. علاوه بر این، طراحی توالی‌های اتصال اختصاصی برای هر فاکتور رونویسی، امری زمان‌بر است؛ زیرا هر فاکتور رونویسی توالی منحصر به‌فردی دارد. همچنین، بهینه‌سازی سیستم‌های کریسپری نیازمند تقویت سیگنال برای تشخیص فاکتورهای رونویسی با غلظت بسیار کم (مانند مراحل اولیه سرطان) است که معمولاً با روش‌های پیش‌تقویتی مانند LAMP و RPA انجام می‌شود و ممکن است باعث پیچیدگی فرایند شود. با این وجود، استفاده از

سیستم‌های بدون سلول و یا ادغام این روش با فناوری نانو می‌تواند تا حد زیادی چالش‌های این روش تشخیصی را برطرف ساخته و امکان شناسایی سرطان در مراحل اولیه و همچنین پایش میزان پاسخ به درمان را با بررسی تغییرات جزئی در فاکتورهای رونویسی فراهم کند.

تضاد منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ تضاد منافی ندارند.

منابع

1. Alberts, B., Johnson A., Lewis, J., et al. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science;. From DNA to RNA. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26887/>
2. Li, X., Yang, J., Yuan R., Y. Xiang., Y. (2019). Programming cascaded recycling amplifications for highly sensitive and label-free electrochemical sensing of transcription factors in tumor cells, *Biosens. Bioelectron.*
3. Lelli, K.M., Slattery M., Mann, R.S. (2012). "Disentangling the many layers of eukaryotic transcriptional regulation". *Annual review of genetics*. Dec 15;46(1): 43-68.
4. Morgan, M.P., Finnegan, E., Das, S. (2022). "The role of transcription factors in the acquisition of the four latest proposed hallmarks of cancer and corresponding enabling characteristics". *Semin Cancer Biol.*;86(Pt 3):1203-1215. doi:10.1016/j.semcancer.
5. Li, Y.F., Altman, R.B. (2018). "Systematic target function annotation of human transcription factors". *BMC Biol*; 16(1):4. Published, Jan 10. doi:10.1186/s12915-017-0469-0
6. Latchman, D.S. (1996). "Transcription-factor mutations and disease". *N Engl J Med*;334(1):28-33. doi:10.1056/NEJM199601043340108.
7. Tavassoli, M., and Francesco P. (2019). "Oncogenesis and tumour suppression". *Oxford Textbook of Cancer Biology*: 136.
8. Karamouzis, M.V., Gorgoulis, V.G., Papavassiliou, A.G (2002). "Transcription factors and neoplasia: vistas in novel drug design". *Clin Cancer Res*;8(5):949-961.
9. Darnell, J., E., J.r. (2002). "Transcription factors as targets for cancer therapy". *Nature reviews. Cancer*, 2(10), 740–749. <https://doi.org/10.1038/nrc906>
10. Karmakar, P.R. (2022). *Epidemiology of Cancer: Asian Perspective Revised*.

- In: Basu, S.K., Panda, C.K., Goswami, S. (eds) *Cancer Diagnostics and Therapeutics*. Springer, Singapore.
https://doi.org/10.1007/978-981-16-4752-9_23
11. Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). "Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries". *CA: a cancer journal for clinicians*, 74(3), 229–263.
<https://doi.org/10.3322/caac.21834>
 12. Nidhi, S., Anand, U., Oleksak, P., et al. (2021). "Novel CRISPR-Cas Systems: An Updated Review of the Current Achievements, Applications, and Future Research Perspectives". *Int J Mol Sci*;22(7):3327. Published 2021 Mar 24. doi:10.3390/ijms22073327
 13. Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Iranzo, J., Shmakov, S. A., Alkhnbashi, O. S., Brouns, S. J. J., Charpentier, E., Cheng, D., Haft, D. H., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F. J. M., Scott, D., Shah, S. A., Siksny, V., Terns, M. P., Venclovas, Č., White, M. F., Yakunin, A. F., Yan, W., ... Koonin, E. V. (2020). "Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants". *Nature reviews. Microbiology*, 18(2), 67–83.
<https://doi.org/10.1038/s41579-019-0299-x>
 14. Schindele, P., Wolter, F., & Puchta, H. (2018). Transforming plant biology and breeding with CRISPR/Cas9, Cas12 and Cas13. *FEBS letters*, 592(12), 1954–1967. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13073>
 15. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity". *Science (New York, N.Y.)*, 337(6096), 816–821.
<https://doi.org/10.1126/science.1225829>
 16. Mustafa, M. I., & Makhawi, A. M. (2021). "SHERLOCK and DETECTR: CRISPR-Cas Systems as Potential Rapid Diagnostic Tools for Emerging Infectious Diseases". *Journal of clinical microbiology*, 59(3), e00745-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.00745-20> (Retraction published J Clin Microbiol. 2024 Jan 17;62(1):e0152123. doi: 10.1128/jcm.01521-23.)
 17. Lino CA, Harper JC, Carney JP, Timlin JA. Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. *Drug Deliv*. 2018;25(1):1234-1257. doi:10.1080/10717544.2018.1474964
 18. Doudna, J.A., Charpentier, E. Genome editing (2014). "The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9". *Science*. 2014;346(6213):1258096. doi:10.1126/science.1258096
 19. Dai, X., Chen, X, Fang, Q., Li, J., Bai, Z. (2018). Inducible CRISPR genome-editing tool: classifications and future trends. *Crit Rev Biotechnol*;38(4):573-586. doi:10.1080/07388551.2017.1378999
 20. Brocken, D.,J.,W., Tark-Dame, M., Dame, R.T. (2018). dCas9: A Versatile Tool for Epigenome Editing. *Curr Issues Mol Biol*; 26:15-32.

doi:10.21775/cimb.026.015

21. Moradpour, M., Abdulah, S.N.A (2020). CRISPR/dCas9 platforms in plants: strategies and applications beyond genome editing. *Plant Biotechnol J*;18(1):32-44. doi:10.1111/pbi.13232
22. Liu, Y., Zhan, Y., Chen, Z., et al (2016). Directing cellular information flow via CRISPR signal conductors. *Nat Methods*; 13(11): 938-944. doi: 10.1038/nmeth.3994
23. Yang, K., Zhou, Y., Zhong, H (2021). CRISPReader System Sensing the Ets-1 Transcription Factor Can Effectively Identify Cancer Cells. *Front Mol Biosci*; May 28;8:672040. doi: 10.3389/fmolb.2021.672040. PMID: 34124154; PMCID: PMC8194308.
24. Yuan, X., Larsson, C., Xu, D (2019). "Mechanisms underlying the activation of TERT transcription and telomerase activity in human cancer: old actors and new players". *Oncogene*. 2019; 38(34): 6172-6183. doi:10.1038/s41388-019-0872-9
25. Yu, Z., Mannik, J., Soto, A., Lin, K.K., Andersen, B (2009). "The epidermal differentiation-associated Grainyhead gene *Get1/Grhl3* also regulates urothelial differentiation". *EMBO J*;28(13):1890-1903. doi:10.1038/emboj.2009.142
26. Liu, Y., Zeng, Y., Liu, L., et al (2014). "Synthesizing AND gate genetic circuits based on CRISPR-Cas9 for identification of bladder cancer cells". *Nat Commun*;5:5393. Published 2014 Nov 6. doi:10.1038/ncomms6393
27. Ran, F.A, Cong, L., Yan, W.X., et al (2015). "In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9". *Nature*;520(7546):186-191. doi:10.1038/nature14299
28. Kemaladewi, D.U., Maino, E., Hyatt, E., et al (2017). "Correction of a splicing defect in a mouse model of congenital muscular dystrophy type 1A using a homology-directed-repair-independent mechanism". *Nat Med*;23(8):984-989. doi:10.1038/nm.4367
29. Chew, W.L., Tabebordbar, M., Cheng, J.K., et al. (2016). "A multifunctional AAV-CRISPR-Cas9 and its host response". *Nat Methods*;13(10):868-874. doi:10.1038/nmeth.3993
30. Yang, Y., Wang, L., Bell, P., et al (2016). "A dual AAV system enables the Cas9-mediated correction of a metabolic liver disease in newborn mice". *Nat Biotechnol*. 2016;34(3):334-338. doi:10.1038/nbt.3469
31. Truong, D.J, Kühner, K., Kühn, R., et al. (2015). "Development of an intein-mediated split-Cas9 system for gene therapy". *Nucleic Acids Res*;43(13):6450-6458. doi:10.1093/nar/gkv601
32. Zhan, H., Zhou, Q., Gao, Q., Li, J., Huang, W., Liu, Y. (2019). "Multiplexed promoterless gene expression with CRISPReader". *Genome Biol*; Jun 3;20(1):113. doi: 10.1186/s13059-019-1712-5. PMID: 31159834; PMCID: PMC6545682.
33. Liu, Y., Huang, W., Cai, Z. (2020). "Synthesizing AND gate minigene circuits

- based on CRISPRReader for identification of bladder cancer cells". *Nat Commun.*; Oct 30;11(1):5486. doi: 10.1038/s41467-020-19314-7. PMID: 33127914; PMCID: PMC7599332.
34. Kiani, S., Chavez, A., Tuttle, M., et al. (2015). "Cas9 gRNA engineering for genome editing, activation and repression". *Nat Methods*; 12(11):1051-1054. doi:10.1038/nmeth.3580
35. Hahne, J.C., Okuducu, A.F., Sahin, A., Fafeur, V., Kiriakidis, S., Wernert, N. (2008). "The transcription factor ETS-1: its role in tumour development and strategies for its inhibition". *Mini Rev Med Chem*. 2008;8(11):1095-1105. doi:10.2174/138955708785909934
36. Li, C., Wu, S., Wang, H., et al. (2015). "The C228T mutation of TERT promoter frequently occurs in bladder cancer stem cells and contributes to tumorigenesis of bladder cancer". *Oncotarget*. 205;6(23):19542-19551. doi:10.18632/oncotarget.4295
37. Liu, L., Liu, Y., Zhang, T., et al. (2016). "Synthetic Bax-Anti Bcl2 combination module actuated by super artificial hTERT promoter selectively inhibits malignant phenotypes of bladder cancer". *J Exp Clin Cancer Res*;35:3. Published 2016 Jan 8. doi:10.1186/s13046-015-0279-6
38. Li, B., Xia, A., Zhang, S., Suo, T., Ma, Y., Huang, H., Zhang, X., Chen, Y., & Zhou, X. (2021). "A CRISPR-derived biosensor for the sensitive detection of transcription factors based on the target-induced inhibition of Cas12a activation". *Biosensors & bioelectronics*;173, 112619. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112619>
39. Li, B., Shao, Z., Chen, Y. (2021). "An exonuclease protection and CRISPR/Cas12a integrated biosensor for the turn-on detection of transcription factors in cancer cells". *Analytica chimica acta*; 1165, 338478. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338478>
40. Hayden, M. S., Ghosh, S. (2008). "Shared principles in NF-kappaB signaling". *Cell*; 132(3), 344–362. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.020>
41. Abraham, A.C., Shah, S.A., Golman, M., Song, L., Li, X., Kurtaliaj, I., Akbar, M., Millar, N. L., Abu-Amer, Y., Galatz, L. M., Thomopoulos, S. (2019). "Targeting the NF-κB signaling pathway in chronic tendon disease" *Science translational medicine*, 11(481), eaav4319. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aav4319>
42. Griffin, G. E., Leung, K., Folks, T. M., Kunkel, S., Nabel, G. J. (1989). "Activation of HIV gene expression during monocyte differentiation by induction of NF-kappa B". *Nature*; 339(6219), 70–73. <https://doi.org/10.1038/339070a0>
43. Christian, F., Smith, E.L., & Carmody, R.J. (2016). "The Regulation of NF-κB Subunits by Phosphorylation". *Cells*; 5(1), 12. <https://doi.org/10.3390/cells5010012>
44. Ni, H., Ergin, M., Huang, Q., Qin, J. Z., Amin, H. M., Martinez, R. L., Saeed,

- S., Barton, K., & Alkan, S. (2001). "Analysis of expression of nuclear factor kappa B (NF-kappa B) in multiple myeloma: downregulation of NF-kappa B induces apoptosis". *British journal of haematology*; 115(2), 279–286. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2001.03102.x>
45. Oeckinghaus, A., Hayden, M.S., & Ghosh, S. (2011). "Crosstalk in NF-κB signaling pathways". *Nature immunology*; 12(8), 695–708. <https://doi.org/10.1038/ni.2065>
46. Aupperle, K.R., Bennett, B.L., Boyle, D.L., Tak, P.P., Manning, A.M., & Firestein, G.S. (1999). "NF-kappa B regulation by I kappa B kinase in primary fibroblast-like synoviocytes". *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*; 163(1), 427–433.
47. Zhang, Q., Lenardo, M.J., & Baltimore, D. (2017). 30 Years of NF-κB: "A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology". *Cell*; 168(1-2), 37–57. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.012>
48. Sui, H., Zhou, L.H., Zhang, Y.L., Huang, J.P., Liu, X., Ji, Q., Fu, X.L., Wen, H.T., Chen, Z.S., Deng, W.L., Zhu, H.R., Li, Q. (2016). "Evodiamine Suppresses ABCG2 Mediated Drug Resistance by Inhibiting p50/p65 NF-κB Pathway in Colorectal Cancer". *Journal of cellular biochemistry*, 117(6), 1471–1481. <https://doi.org/10.1002/jcb.25451>
49. Harari, O.A., Liao, J.K. (2010). "NF-κB and innate immunity in ischemic stroke". *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1207, 32–40. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05735.x>