

In Silico Modeling of a Mutant Cas9 Protein for High-Fidelity Genome Editing

Ghasemi Mahsa¹, Zamani Javad², Minucmehr Zarrin^{3*}, Shamsara Mehdi^{4*}

• Received: 2 Jan 2024

• Accepted: 19 Feb 2024

Introduction: CRISPR/Cas system is a bacterial-acquired immune system against viruses. spCas9 protein-derived from *Streptococcus pyogenes* is the most common Cas protein used in genome editing. The Cas9 proteins suffer from some problems like unwanted off-target cleavage, which is the major limitation in the application of the CRISPR system, especially for therapeutic issues. The present study aimed to in silico design of a mutant Cas protein to enhance the fidelity of the enzyme.

Method: In this study, a new Cas9 protein was designed in silico via the selection of some mutations. The interaction of the mutant and wild-type Cas9 proteins with DNA was determined by molecular docking. Finally, the stability of the mutant and wild-type proteins was evaluated using molecular dynamics.

Results: The outcome of this study resulted in designing a mutant Cas9 protein bioinformatically containing 5 amino acid substitutions. Molecular docking scores for the wild-type and mutant proteins were -1073.86 and -349.41, respectively.

Conclusion: Molecular docking indicated that the number of hydrogen bonds between protein and DNA reduced in the mutant state. Moreover, based on the molecular dynamic findings, the stability of both mutant and wild-type Cas9 proteins was similar.

Keywords: High-fidelity Cas9, Molecular dynamic, Molecular docking, CRISPR/Cas, Protein engineering, Gene editing

• **Citation:** Ghasemi M, Zamani J, Minucmehr Z, Shamsara M. *In Silico* Modeling of a Mutant Cas9 Protein for High-Fidelity Genome Editing. Journal of Health and Biomedical Informatics 2024; 10(4): 357-66. [In Persian] doi: 10.34172/jhbmi.2024.04

1. M.Sc. in Cellular and Molecular Biology, Department of New Sciences and Technologies, Tehran Electronics Branch Faculty, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Ph.D. in Agricultural Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

3. Ph.D. in Biophysics, Assistant Professor, Institute of Industrial and Environmental Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

4. Ph.D. in Molecular Genetics, Associate Professor, Department of Animal Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

***Corresponding Author:** Zarin Minucmehr, Mehdi Shamsara

Address: National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Shahrak-e Pajooheh, km 15, Tehran-Karaj Highway, Postal code: 1497716316

• **Tel:** 02144787362, 02144787414

• **Email:** minucmehr@nigeb.ac.ir • **Email:** shamsa@nigeb.ac.ir

مدل سازی *in silico* یک پروتئین Cas9 جهش یافته با هدف افزایش دقت ویرایش ژنوم

مهسا قاسمی^۱، جواد زمانی^۲، زرین مینوچهر^۳، مهدی شمس آرا^{۴*}

• پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۱۱/۳۰

• دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۱۰/۱۲

مقدمه: سیستم CRISPR/Cas، سیستم ایمنی اکتسابی باکتری‌ها در مقابله با عوامل مهاجم خارجی است. پروتئین Cas9 باکتری *استرپتوکوکوس پیوژنز*، رایج‌ترین پروتئین Cas استفاده شده در ویرایش ژنوم می‌باشد؛ اما پروتئین‌های Cas9 دارای مشکلاتی مانند وقوع جهش‌های نابه‌جا هستند که مانعی مهم در مسیر به کارگیری آن‌ها برای مقاصد درمانی می‌باشد. هدف از این مطالعه، طراحی یونفورماتیکی یک پروتئین Cas9 جهش یافته به منظور افزایش دقت آنزیم در امر ویرایش ژنوم است.

روش: در این مطالعه ابتدا با انتخاب برخی از جهش‌ها و اعمال آن در پروتئین، Cas9 جدید به صورت *in silico* طراحی شد. با روش داکینگ مولکولی نحوه اتصال spCas9 جهش یافته و وحشی به DNA مورد بررسی قرار گرفت. در آخر، پایداری دو پروتئین جهش یافته و وحشی با استفاده از دینامیک مولکولی مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: نتایج این مطالعه منجر به طراحی یک پروتئین جهش یافته با ۵ جهش شد. نتایج داکینگ مولکولی امتیاز ۱۰۷۳/۸۶- را برای پروتئین تیپ وحشی و امتیاز ۳۴۹/۴۱- را برای پروتئین جهش یافته نشان داد.

نتیجه‌گیری: بررسی داکینگ مولکولی نشان داد که از پیوندهای بین پروتئین و DNA در حالت جهش یافته کاسته شده است. همچنین، نتایج دینامیک مولکولی نشان داد که پایداری دو پروتئین جهش یافته و تیپ وحشی مشابه یکدیگر می‌باشند.

کلیدواژه‌ها: Cas9 با دقت بالا، دینامیک مولکولی، داکینگ مولکولی، CRISPR/Cas، مهندسی پروتئین، ویرایش ژن

• **ارجاع:** قاسمی مهسا، زمانی جواد، مینوچهر زرین، شمس آرا مهدی. مدل سازی *in silico* یک پروتئین Cas9 جهش یافته با هدف افزایش دقت ویرایش ژنوم. مجله انفورماتیک سلامت و زیست پزشکی ۱۴۰۲؛ ۱۰(۴): ۳۵۷-۳۶۶. doi: 10.34172/jhbm.2024.04

۱. کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی، گروه علوم و فناوری‌های نوین دانشگاه آزاد اسلامی واحد الکترونیک تهران، تهران، ایران
 ۲. دکتری تخصصی بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران
 ۳. دکتری تخصصی بیوفیزیک، دانشیار، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، پژوهشگاه صنعت و محیط زیست، گروه زیست فناوری سامانه‌ای، تهران، ایران
 ۴. دکتری تخصصی ژنتیک مولکولی، دانشیار، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، پژوهشگاه زیست فناوری کشاورزی، گروه زیست فناوری دامی، تهران، ایران
- * **نویسنده مسئول:** مهدی شمس آرا، زرین مینوچهر

آدرس: اتوبان تهران - کرج، کیلومتر ۱۵، شهرک علم و فناوری پژوهش، بلوار پژوهش، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، کدپستی: ۱۴۹۷۷۱۶۳۱۶

• **شماره تماس:** ۰۲۱۴۴۷۸۷۴۶۲، ۰۲۱۴۴۷۸۷۴۱۴ • **Email:** minucheher@nigeb.ac.ir • **Email:** shamsa@nigeb.ac.ir

مقدمه

تکرارهای کوتاه پالیندرومی فاصله‌دار منظم خوشه‌ای (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) CRISPR و پروتئین‌های همراه با CRISPR (CRISPR-associated proteins) Cas یک ابزار ویرایش ژنوم قوی و بسیار کارآمد در طیف وسیعی از موجودات زنده می‌باشد [۱-۳]. سیستم CRISPR/Cas در واقع یک ابزار ایمنی اکتسابی در باکتری‌ها می‌باشد که اولین بار در سال ۱۹۸۷ کشف شد. فعالیت این ابزار بدین گونه است که در مواجهه سلول باکتریایی با عامل بیگانه از جمله باکتریوفاژ فعال شده و موجب برش و حذف توالی بیگانه می‌شود [۴]. با توجه به دست ورزی راحت‌تر، مراحل ساده‌تر و پایین‌تر بودن هزینه‌ها CRISPR/Cas به عنوان ابزار برتر و انقلابی بزرگ در پژوهش‌های زیست‌شناسی انتخاب شده است. امید آن می‌رود که این سیستم به واسطه ارتقای روش‌های درمانی به بهبود شرایط سلامتی انسان‌ها و مقابله با بسیاری از بیماری‌ها منجر شود [۵]. توالی CRISPR برای اولین بار توسط Ishino و همکاران در باکتری *Escherichia coli* کشف شد [۶]. همچنین گزارش‌های بیشتر بر وجود چنین توالی‌هایی در *Mycobacterium* [۷]، *Haloferax spp* [۸] و *Archaeoglobus fulgidus* دلالت داشت؛ اما با این حال، چنین توالی‌هایی در ژنوم‌های یوکاریوتی یا ویروسی شناسایی نشدند [۹، ۱۰]. تا به امروز سیستم‌های CRISPR/Cas تقریباً در ۵۰ درصد باکتری‌ها و ۸۵ درصد در آرکی‌ها یافت شده‌اند [۱۱]. این ابزار شامل سه بخش crRNA (CRISPR RNA)، tracrRNA (Transactivating CRISPR RNA) و پروتئین اندونوکلاز Cas9 است. crRNA بخشی از توالی ژنوم مهاجم است که در آرایه‌های جایگاه کروموزومی CRISPR به صورت توالی فاصله‌انداز (Spacer) ذخیره می‌شود. زمانی که باکتری مجدداً در معرض عنصر مهاجم قرار می‌گیرد، این قطعه بیان شده و با tracrRNA هیبرید می‌شود. سپس دوپلکس RNA به Cas9 متصل شده و به سمت توالی هدف در ژنوم مهاجم هدایت می‌شود تا با برش آن DNA بیگانه را غیرفعال کند. در تحقیقات مهندسی ژنوم، دو قطعه crRNA و tracrRNA به هم متصل شده‌اند و مولکول منحصربه‌فردی به نام sgRNA (Single guide RNA) جایگزین این دو قطعه شده است. پروتئین Cas9 دارای دو قلمرو برشی HNH و RuvC می‌باشد که به ترتیب رشته مکمل و غیر مکمل را برش

می‌دهند. لازم به ذکر است فعالیت نوکلئاز Cas9 علاوه بر عوامل ذکر شده به وجود توالی موسوم به PAM در مجاورت بالادست جایگاه اتصال crRNA است. این توالی برای هر پروتئین Cas9 متفاوت است و برای Cas9 گرفته شده از باکتری *استرپتوکوکوس پیوژنز* (spCas9) به صورت NGG می‌باشد. توالی PAM در آرایه‌های CRISPR وجود نداشته و تنها بر روی ژنوم مهاجم قرار دارد؛ بنابراین امکان برش ژنوم باکتری میزبان توسط Cas9 وجود ندارد [۱۲-۱۴]. سیستم CRISPR/Cas در کنار سادگی استفاده و برش‌های اختصاصی توالی هدف که تحت عنوان برش‌های به جا (On-target) نامیده می‌شود، دارای نواقصی هم هست مثل محدودیت‌های مربوط به وجود توالی PAM و برش نواحی ژنومی غیرهدف که به آن برش‌های نابه‌جا (Off-target) می‌گویند [۱۵]. گاهی Cas9 هدایت شده توسط grRNA جایگاه ژنومی غیرهدف را برش داده و می‌تواند مشکلاتی را به وجود آورد [۱۶]. برای حل این مشکلات راه‌حل‌های زیادی از جمله کوتاه کردن طول RNA راهنما، اضافه کردن دو نوکلئوتید به RNA راهنما، تنظیم غلظت Cas9 یا بیان القایی Cas9 پیشنهاد شده است [۱۷].

ساخت پروتئین‌های Cas9 با دقت بالا (High fidelity Cas9) که با جایگزین کردن برخی از اسیدآمینه‌های باردار در Cas9 تیپ وحشی (Wild-type Cas9) به وجود می‌آیند، روش دیگری برای مقابله با برش‌های نابه‌جا است. پروتئین Cas9 از طریق برخی قسمت‌های خود شامل لوب REC، قلمروهای نوکلئازی HNH و RuvC و نیز قلمرو شناسایی کننده PAM به توالی DNA متصل می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند که برخی از این اتصالات برای فعالیت برشی Cas9 نه تنها ضروری نیستند، بلکه باعث ایجاد خطا در برش و شکافته شدن توالی‌های نابه‌جا می‌شوند و با حذف برخی از این اتصالات می‌توان اختصاصی بودن برش Cas9 را افزایش داد [۱۸]. Slaymaker و همکاران با جایگزین کردن اسیدآمینه آلانین به جای آرژنین در موقعیت ۱۰۶۰ و لیزین در موقعیت‌های ۸۴۸ و ۱۰۰۳ یک پروتئین Cas9 با دقت بالا تحت عنوان eSpCas9 ساختند و نشان دادند که کاهش برهم‌کنش‌های غیرضروری بین پروتئین و DNA می‌تواند به کاهش برش‌های نابه‌جا منجر شود [۱۹]. در مطالعه‌ای دیگر، نشان داده شد که جهش‌های آرژنین در موقعیت‌های ۱۰۶۰ و ۶۶۱ لیزین در موقعیت‌های ۸۴۸ و ۱۰۰۳، گلوتامین در موقعیت‌های ۹۲۶ و ۶۹۵ و آسپارژین در موقعیت ۴۹۷ به اسیدآمینه خنثی آلانین می‌تواند منجر به کاهش برش‌های نابه‌جا شود [۲۰].

در این پژوهش با استفاده از مطالعات پیشین و روش بیوانفورماتیکی اقدام به طراحی یک پروتئین *spCas9* با دقت بالا انجام شد. به همین جهت تمام جهش‌های موجود در مطالعات مربوط به پروتئین‌های *Cas9* با دقت بالا جمع‌آوری شد. موقعیت هر جهش و پیامد آن در عملکرد پروتئین مورد ارزیابی قرار گرفت. بر مبنای این اطلاعات، مجموعه‌ای از جهش‌ها بر اساس موقعیت جهش و عملکرد آن انتخاب شد. جهش‌های مورد نظر با استفاده از نرم افزار Molegro که یک نرم افزار شبیه سازی مولکولی است [۲۱] بر روی پروتئین *Cas9* تیپ وحشی اعمال شد و سپس با داکینگ مولکولی تأثیر جهش در برهم‌کنش هیدروژنی بین پروتئین و DNA مورد بررسی قرار گرفت. همچنین با استفاده از دینامیک مولکولی تأثیر جهش در پایداری پروتئین جهش یافته نسبت به پروتئین نوع وحشی ارزیابی شد.

روش

شناسایی جهش

ابتدا با بررسی مطالعات قبلی [۲۰، ۳۰، ۳۱] جدولی از تمام انواع پروتئین‌های *Cas9* جهش یافته آماده شد و جهش‌های اعمال شده در هر پروتئین مشخص و در ساختار پروتئین مکان‌یابی شد (جدول ۱). موقعیت هر جهش و پیامد آن در عملکرد پروتئین مورد ارزیابی قرار گرفت. بر مبنای این اطلاعات، مجموعه جدیدی از جهش‌ها بر اساس موقعیت و ماهیت جهش و عملکرد آن انتخاب شد. در مرحله بعد فایل پروتئین تیپ وحشی از بانک داده‌های پروتئین (PDB (Protein Data Bank دریافت شد و با استفاده از نرم‌افزار Molegro جهش‌های انتخابی در آن اعمال شد [۲۲].

داکینگ مولکولی

داکینگ مولکولی با سرور HDOCK (<http://hdock.phys.hust.edu.cn/>) انجام شد و برهم‌کنش هر دو پروتئین *Cas9* تیپ وحشی و جهش یافته طراحی شده با *sgRNA* و توالی DNA هدف به صورت *in silico* مورد ارزیابی قرار گرفت. براساس ساختارهای کریستالوگرافی موجود در PDB (<https://www.rcsb.org>)، *Cas9* با کد 4UN3 بازایی

شد. مکان برهم‌کنش *Cas9* با *sgRNA* مشخص شد و در فرآیند داکینگ مورد استفاده قرار گرفت. برای انجام داکینگ مولکولی سه فایل ورودی شامل فایل مولکول گیرنده (پروتئین)، فایل مولکول لیگاند (DNA و *sgRNA*) و فایل اسیدهای آمینه فعال (Active residues) (شامل اسیدهای آمینه نواحی از پروتئین *Cas9* که در اتصال به DNA دخیل بودند) در اختیار سرور HDOCK قرار گرفت. سایر پارامترهای داکینگ به صورت پیش فرض باقی ماند.

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

پایداری کمپلکس پروتئین‌های *Cas9* با *sgRNA* با شبیه‌سازی دینامیک مولکولی مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این کار، از نرم‌افزار GROMACS نسخه ۲۰۱۸ استفاده شد. برای ایجاد فایل‌های توپولوژی از میدان نیروی AMBER03 استفاده شد. فایل‌های مورد نیاز برای شبیه‌سازی دینامیک مولکولی شامل خروجی‌های داکینگ مولکولی با فرمت PDB می‌باشد. برای کمینه‌سازی انرژی، کاهش‌سازی گام به گام (Algorithm) انجام شد. بار کلی سیستم با استفاده از بارهای سدیم و کلر خنثی شد. از مدل آب SPC/E برای مدل‌سازی استفاده شد و در پروتئین وحشی از ۳ یون مثبت و در پروتئین جهش یافته از ۶ یون کلر استفاده شد و تعداد مولکول‌های آب اضافه شده به سیستم ۱۵۴۲۰ بود و ابعاد جعبه مکعبی $30 \times 30 \times 30$ نانومتر در نظر گرفته شد. همچنین برای برهم‌کنش‌های غیر واندوالس ۱ نانومتر در نظر گرفته شد. برای گرمادهی از الگوریتم v-rescale استفاده شد. سیستم‌ها در دمای ۳۰۰ درجه کلوین و فشار ۱ بار به تعادل رسیدند. شبیه‌سازی دینامیک مولکولی نهایی به مدت ۵۰ نانوثانیه بدون قید انجام شد. برای ترسیم نمودارها از نرم‌افزار Grace استفاده شد.

نتایج

انتخاب جهش‌ها و طراحی یک پروتئین *Cas9* جهش یافته

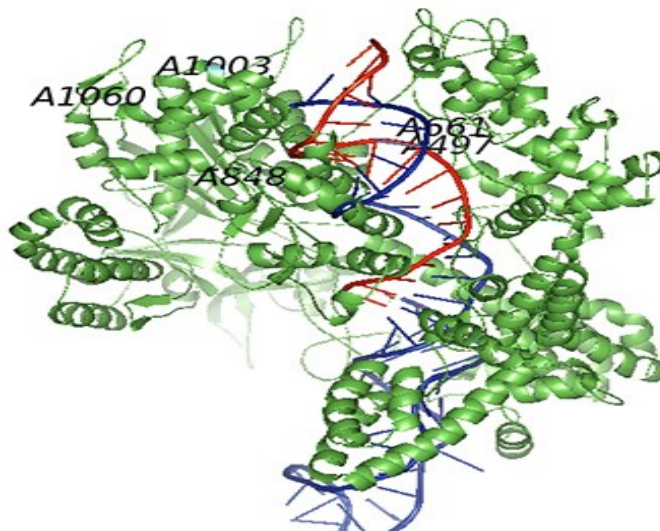
طبق نتایج به دست آمده از بررسی جهش‌های مطالعات انجام شده تمام جهش‌های موجود در مطالعات پیشین در جدول ۱ خلاصه شد.

جدول ۱: فهرست پروتئین‌های Cas9 با دقت بالا و جهش‌های آن‌ها

نام	جهش‌ها	قلمرو	منابع
eSpCas91.1	K848A, K1003A, and R1060A	HNH, RuvC	۲۳
SpCas9-HF1	N497A/R661A/Q695A/Q926A	HNH, RuvC, RecI	۱۸
Sp Cas9HF3/4	L169/ Y450	RecI	۱۸
HeFSpCas9	N497A, R661A, Q695A, K848A, Q926A, K1003A, R1060A	HNH, RuvC, RecI	۲۰
HypaCas9	N692A/M694A/Q695A/H698A	HNH, RuvC, RecI	۲۴
evoCas9	M495V, Y515N, K526E, R661Q	RuvC, RecI	۲۶ و ۲۵
HiFi Cas9	R691A	RecI	۲۷
Sniper-Cas9	F539S, M763I, K890N	HNH, RuvC, RecI	۲۸
SuperFi-Cas9	Y1010D, Y1013D, Y1016D, V1018D, R1019D, Q1027D, K1031D	RuvC, PAM	۲۹
SpartaCas	D23A, T67L, Y128V, D1251G	RuvC, RecI, PAM	۳۰

توالی هدف روی DNA نقش دارد. در حدواسط قلمروهای نوکلئازی HNH و RuvC شیاری با بار مثبت وجود دارد که به رشته غیرهدف DNA متصل می‌شود؛ لذا جهش‌ها در قسمت‌هایی از پروتئین انتخاب شدند که در برهم‌کنش با DNA نقش داشتند. همچنین اسیدآمینه‌هایی که دچار جهش شدند جزو اسیدآمینه‌های بازی (مثل لیزین و آرژنین) و اسیدآمینه آبدوست و قطبی (مثل آسپارژین) بودند که در برقراری برهم‌کنش‌ها بین ماکرومولکول‌ها دخالت می‌کنند (شکل ۱).

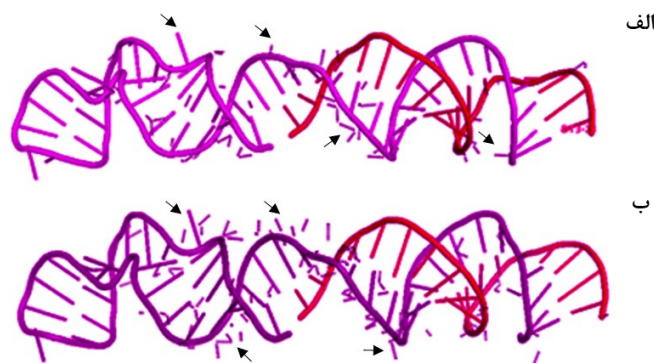
پس از بررسی جهش‌هایی که در مطالعات گذشته انجام شده بودند، ترکیب جدیدی از جهش‌ها برای ایجاد یک پروتئین جدید انتخاب شد. جهش‌های انتخابی در موقعیت‌های N497A/R661A/K848A/K1003A/R1060A قرار داشتند. به لحاظ قلمرو، جهش K848A در قلمرو نوکلئازی HNH، جهش‌های K1003A و R1060A در قلمرو نوکلئازی RuvC و جهش‌های R661A و N497A در لوب REC اعمال شد. لوب REC در شناسایی و اتصال sgRNA به پروتئین Cas9 و متعاقب آن در برهم‌کنش با



شکل ۱: پیشگویی ساختار فضایی مجموعه پروتئین جهش یافته، gRNA و DNA هدف

جهش‌های اعمال شده در پروتئین در موقعیت‌های اسیدآمینه‌ای ۴۹۷، ۶۶۱، ۸۴۸، ۱۰۰۳ و ۱۰۶۰ مشخص شده‌اند. پروتئین به رنگ سبز، sgRNA، رنگ آبی و DNA به رنگ قرمز نشان داده شده است. تصویر با نرم‌افزار Pymol نسخه ۲.۵.۵ ترسیم شده است.

در بالا نشان می‌دهد که پروتئین تیپ وحشی پیوندهای بیشتری را با DNA نسبت به پروتئین جهش یافته ایجاد می‌کند. مطابق شکل ۲، نتایج داکینگ مولکولی نشان داد که پروتئین Cas9 جهش یافته طراحی شده در مقایسه با پروتئین تیپ وحشی پیوند هیدروژنی کمتری را با DNA برقرار می‌کند و بر اساس یافته‌های قبلی کاهش تعداد پیوندهای هیدروژنی بین پروتئین Cas9 و DNA باعث افزایش دقت ویرایش ژنوم می‌شود [۱۸].

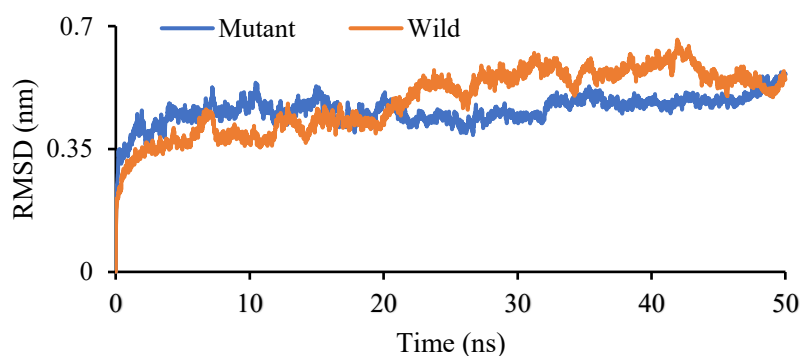


شکل ۲: الف) پیوندهای هیدروژنی بین پروتئین Cas9 جهش یافته با DNA. ب) پیوندهای هیدروژنی بین پروتئین Cas9 تیپ وحشی با DNA (sgRNA) به رنگ بنفش، DNA به رنگ قرمز و برخی از پیوندهای هیدروژنی با فلش نشان داده‌اند. چنانچه در شکل دیده می‌شود، تعداد پیوندهای هیدروژنی ما بین پروتئین جهش یافته و DNA (الف) در مقایسه با پروتئین تیپ وحشی (ب) کاهش نشان می‌دهد.

یک ساختار مرجع است. همان‌طور که در نمودار ۱ نشان داده شده است، نوسانات نمودار RMSD پروتئین Cas9 جهش یافته نسبت به Cas9 تیپ وحشی کمتر است که نشانه نوسانات کمتر پروتئین جهش یافته در طول شبیه‌سازی و پایدار بودن آن است.

نتایج دینامیک مولکولی

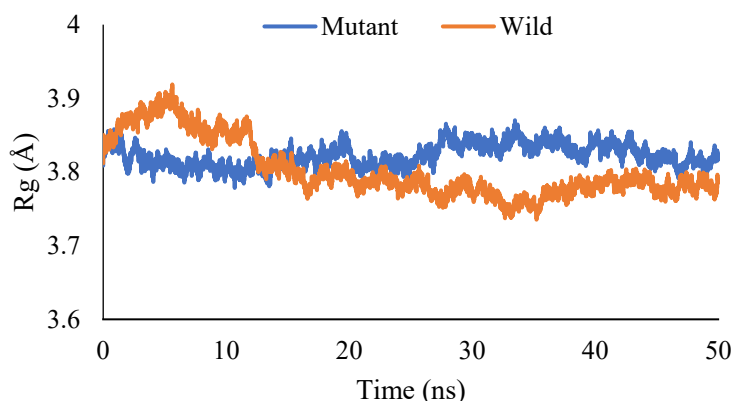
ساختارهای به دست آمده از داکینگ مولکولی توسط نرم‌افزار شبیه‌ساز دینامیک مولکولی به نام GROMACE مورد تجزیه تحلیل قرار گرفت. جذر میانگین مربع انحرافات RMSD (Root Mean Square Deviation) نشان دهنده تغییرات ساختار پروتئین در طول شبیه‌سازی نسبت به



نمودار ۱: بررسی میزان انحراف پروتئین Cas9 تیپ وحشی و پروتئین Cas9 جهش یافته از موقعیت مرجع با استفاده از نمودار RMSD

(آلانین) در ارتباط است. چرا که کاهش اسیدهای آمینه باردار می‌تواند باعث کاهش پیوندهای الکتروستاتیک در پروتئین و در نتیجه کاهش تراکم پروتئین شود [۲۳]. از سوی دیگر، اسیدآمینه آلانین به لحاظ اندازه نسبت به آرژنین، آسپارژین و لیزین کوچک‌تر است و ممانعت فضایی کمتری دارد و این شاید دلیل دیگری برای متراکم‌تر بودن پروتئین جهش یافته در مقایسه با پروتئین وحشی است.

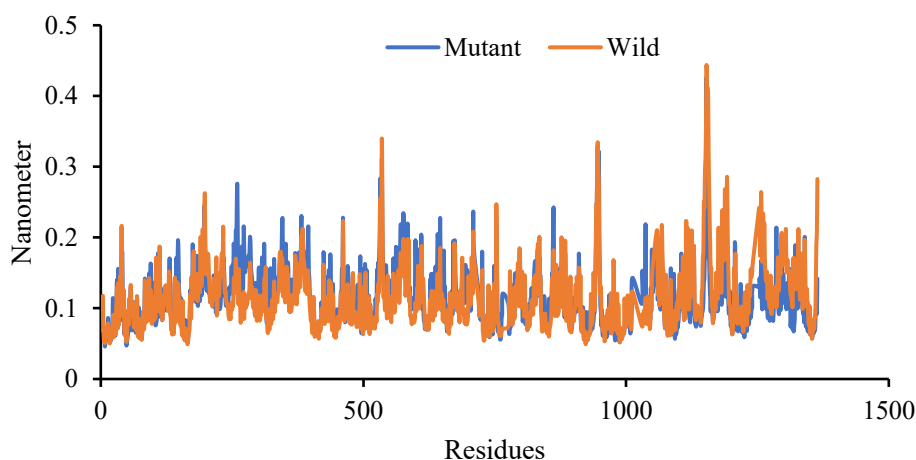
برای مقایسه میزان تراکم دو پروتئین جهش یافته و تیپ وحشی، شعاع ژیراسیون دو پروتئین در بازه زمانی ۵۰ نانوثانیه ارزیابی شد. چنانچه در نمودار ۲ نشان داده شده است، شعاع ژیراسیون پروتئین جهش یافته در بازه زمانی ۱۵ الی ۵۰ نانوثانیه بیش از پروتئین تیپ وحشی است. شعاع ژیراسیون با تراکم رابطه عکس دارد و این به معنی متراکم‌تر بودن پروتئین تیپ وحشی در مقایسه با پروتئین جهش یافته است. این موضوع با جهش اسیدهای آمینه باردار لیزین و آرژنین و نیز اسیدآمینه قطبی آسپارژین به اسیدآمینه خنثی



نمودار ۲: شعاع ژیراسیون پروتئین Cas9 تیپ وحشی و پروتئین Cas9 جهش یافته بر حسب زمان

تأثیری در نوسانات ساختاری پروتئین جهش یافته نداشته است. البته اختلافاتی در نوسانات برای مثال در موقعیت‌های اسیدآمینه‌ای ۳۱۱-۲۵۹ و ۱۱۹۲-۱۱۵۳ دیده می‌شود که بررسی ساختار پروتئین در آن قسمت‌ها وجود لوپ را تأیید می‌کند.

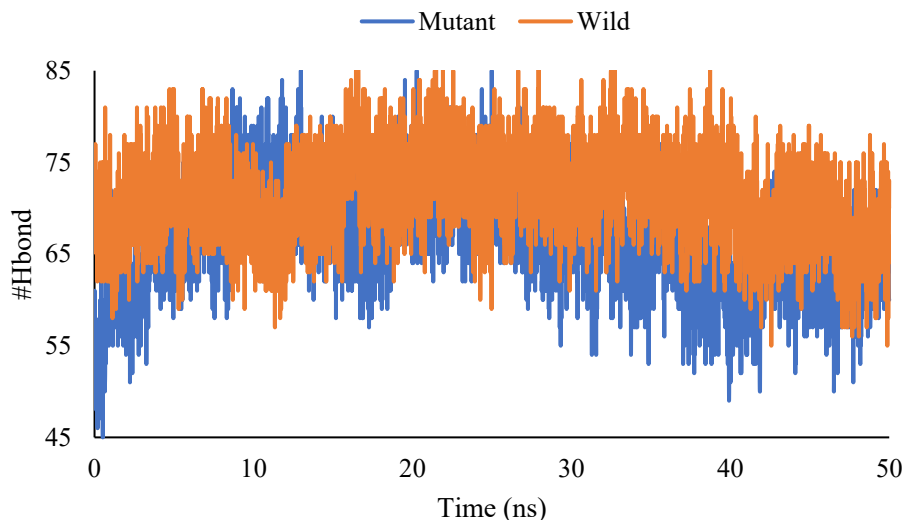
میزان نوسانات ساختاری قسمت‌های مختلف پروتئین Cas9 جهش یافته و تیپ وحشی به تفکیک اسیدآمینه با استفاده از جذر میانگین مجذور نوسانات (Root Mean Square Fluctuation) RMSF مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج RMSF مطابق نمودار ۳ نشان داد که جهش‌های اعمال شده در موقعیت‌های اسیدآمینه‌ای ۴۹۷، ۶۶۱، ۸۴۸، ۱۰۰۳ و ۱۰۶۰



نمودار ۳: مقایسه نوسانات ساختاری (RMSF) دو پروتئین Cas9 جهش یافته و تیپ وحشی

تعداد پیوندهای هیدروژنی پروتئین Cas9 با DNA در بازه زمانی ۵۰ نانوثانیه در دو پروتئین جهش یافته و تیپ وحشی بررسی شد. چنانچه در نمودار ۴ مشاهده می‌شود، میزان پیوندهای هیدروژنی در پروتئین جهش یافته در مقایسه با پروتئین Cas9 تیپ وحشی کمتر است که این موضوع با نتایج

به دست آمده از داکینگ مولکولی سازگار بود. کاهش میزان پیوندهای هیدروژنی بین پروتئین Cas9 و DNA می‌تواند از اتصالات غیرضروری که باعث ایجاد خطا و جهش نابه‌جا توسط آنزیم Cas9 می‌شود، جلوگیری کند.



نمودار ۴: میزان پیوندهای هیدروژنی پروتئین‌های Cas9 تیپ وحشی و جهش یافته با DNA در بازه زمانی صفر تا ۵۰ نانوثانیه

بحث و نتیجه‌گیری

CRISPR/Cas9 یک سیستم ویرایش ژنومی مشتق از باکتری‌ها است که در مقابل عوامل مهاجم چون ویروس‌ها فعال می‌شود. با تغییراتی که در این سیستم اعمال شده، امکان استفاده از آن در ویرایش ژنوم سایر موجودات فراهم شده است [۲۴-۲۶]؛ اما CRISPR/Cas9 دارای مشکل برش نواحی ژنومی نابه‌جا می‌باشد که به دلیل عدم رعایت قانون بازهای مکمل بین ناحیه جفت شده sgRNA و DNA اتفاق می‌افتد [۲۵]. یک راه حل برای جلوگیری از وقوع این اتفاق جهش‌زایی پروتئین Cas9 است [۱۹]. در این بررسی، ترکیب جدیدی از جهش‌ها در پروتئین spCas9 اعمال شد که در آن اسیدآمینه‌های بازی و باردار مثبت لیزین و آرژنین و نیز اسیدآمینه آبدوست قطبی آسپارژین به اسیدآمینه بدون بار و غیرقطبی آلانین تغییر یافتند. ارزیابی شعاع ژیراسیون که شاخص تراکم پروتئین است نشان داد که شعاع ژیراسیون پروتئین جهش یافته نسبت به پروتئین وحشی بیشتر است. این موضوع نشانه متراکم‌تر بودن پروتئین تیپ وحشی

در مقایسه با پروتئین جهش یافته بود. علت این اتفاق را می‌توان در جایگزینی اسیدآمینه‌های قطبی و باردار با اسیدآمینه خنثی آلانین ارزیابی کرد. در مطابقت با نتایج این مطالعه، Pandey و همکاران نشان دادند که ایجاد جهش آلانین در جایگاه کاتالیتیک آنزیم پنتوتانت سنتتاز باعث افزایش شعاع ژیراسیون در مقایسه با آنزیم تیپ وحشی می‌شود [۲۷].

RMSD میزان انحراف ساختار پروتئین نسبت به موقعیت مرجع را نشان می‌دهد [۲۸]. نوسانات زیاد نمودار RMSD نشانه ناپایداری مدل پروتئینی است [۲۹]. نمودار RMSD پروتئین Cas9 جهش یافته در مقایسه با پروتئین وحشی حکایت از کاهش نوسانات نمودار دارد که نشان می‌دهد جهش‌های اعمال شده باعث پایداری بیشتر پروتئین جهش یافته شده است. یکی از نگرانی‌ها درباره پروتئین‌های Cas9 با دقت بالا تحت تأثیر قرار گرفتن فعالیت برشی آنزیم است که باعث کاهش برش‌های به‌جا می‌شود [۳۰]. این مسئله ممکن است که روی کارایی ویرایش ژنوم توسط پروتئین‌های Cas9 با دقت بالا تأثیر منفی بگذارد. ممکن است

دارد) در برقراری پیوندهای هیدروژنی بین پروتئین Cas9 و DNA دخالت می‌کند و موجب برش‌های نابجا می‌شود این کاهش تعداد پیوند می‌تواند در راستای کاهش اتصالات غیرضروری بین پروتئین و DNA ارزیابی شود که منجر به افزایش عملکرد اختصاصی آنزیم می‌شود.

با توجه به نتایج به دست آمده از داکینگ مولکولی و دینامیک مولکولی، پروتئین جهش یافته طراحی شده در این مطالعه ضمن حفظ پایداری خود در مقایسه با پروتئین تیپ وحشی، اتصالات کمتری را با پروتئین برقرار می‌کند که این موضوع می‌تواند به مبدل شدن آن به پروتئین Cas9 با دقت بالا کمک کند. البته صحت این پیشگویی‌ها نیاز به بررسی آزمایشگاهی در مدل کشت سلولی دارد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری بابت در اختیار قرار دادن امکانات تشکر و قدردانی می‌نمایند.

تعارض منافع

بدین وسیله نویسندگان تصریح می‌نمایند که در مورد پژوهش حاضر هیچ‌گونه تضاد منافی وجود ندارد.

که افزایش پایداری این دست از پروتئین‌ها Cas9 گامی در جهت جبران کاهش فعالیت برشی به‌جا و کاهش کارایی پروتئین باشد. البته، از سوی دیگر ممکن است پایدار بودن پروتئین در سلول باعث افزایش برش‌ها و جهش‌های نابجا شود. به هر صورت این موضوعی است که باید در عمل در بوته آزمایش قرار بگیرد.

جزر میانگین مجذور نوسانات، معیاری از انعطاف‌پذیری و نوسانات اسیدآمینه‌های کمپلکس است. نمودار RMSF پروتئین جهش یافته و وحشی تفاوت عمده‌ای با یکدیگر نشان نداد. این نتیجه بیانگر آن است که دو پروتئین Cas9 جهش یافته و تیپ وحشی به لحاظ نوسانات بخش‌های مختلف مشابه یکدیگر می‌باشند. از عواملی که باعث می‌شود جهش منجر به افزایش نوسان و ناپایداری گردد می‌توان به ممانعت فضایی و با دافعه در اثر بار همنام اشاره کرد [۳۱]. در مطالعه حاضر، اسیدآمینه‌های آرژنین، آسپارژین و لیزین به آلانین تبدیل شدند که یک اسیدآمینه کوچک و بدون بار است؛ لذا این جایگزینی‌ها ممانعت فضایی و یا جاذبه یا دافعه الکترواستاتیک را در پی داشته است، لذا نتایج RMSF با تغییر همراه نبود.

مقایسه تعداد پیوندهای هیدروژنی ما بین پروتئین Cas9 و DNA در دو حالت جهش یافته و وحشی نشان از کاهش تعداد پیوند هیدروژنی در حالت جهش یافته دارد. با توجه به این که لوب REC و شیار باردار مثبت (که پس از اتصال به DNA به وجود

References

1. Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science (New York, NY). 2014;346(6213):1258096.
2. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. Cell 2014;157(6):1262-78. doi:https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010
3. Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. Nature Biotechnology 2014;32(4):347-55.
4. Lander ES. The heroes of CRISPR. Cell 2016;164(1):18-28.
5. Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. Nature Reviews Genetics 2010;11(9):636-46.
6. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product. Journal of Bacteriology 1987;169(12):5429-33. doi: https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5429-33.1987

7. Groenen PM, Bunschoten AE, Soolingen DV, Erntden JD. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. Molecular Microbiology 1993;10(5):1057-65. https://doi.org/10.1111/j.13652958.1993.tb00976.x
8. Mojica FJ, Ferrer C, Juez G, Rodríguez-Valera F. Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning. Molecular Microbiology 1995;17(1):85-93. https://doi.org/10.1111/j.13652958.1995.mmi_17010085.x
9. Jansen R, van Embden JD, Gastra W, Schouls LM. Identification of a novel family of sequence repeats among prokaryotes. Omics: a Journal of Integrative Biology 2002;6(1):23-33. https://doi.org/10.1089/15362310252780816
10. Klenk HP, Clayton RA, Tomb JF, White O, Nelson KE, Ketchum KA, et al. The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. Nature 1997;390(6658):364-70. doi: 10.1038/37052.

11. Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinformatics* 2007;8:172. doi: 10.1186/1471-2105-8-172
12. Jiang F, Taylor DW, Chen JS, Kornfeld JE, Zhou K, Thompson AJ, et al. Structures of a CRISPR-Cas9 R-loop complex primed for DNA cleavage. *Science* 2016;351(6275):867-71. doi: 10.1126/science.aad8282
13. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012;337(6096):816-21. doi: 10.1126/science.1225829.
14. Rahimpour A, Ahani R, Najaei A, Adeli A, Barkhordari F, Mahboudi F. Development of Genetically Modified Chinese Hamster Ovary Host Cells for the Enhancement of Recombinant Tissue Plasminogen Activator Expression. *Malays J Med Sci* 2016;23(2):6-13.
15. Moon SB, Kim DY, Ko JH, Kim YS. Recent advances in the CRISPR genome editing tool set. *Exp Mol Med* 2019;51(11):1-11. doi: 10.1038/s12276-019-0339-7.
16. Fu Y, Sander JD, Reyon D, Cascio VM, Joung JK. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat Biotechnol* 2014;32(3):279-84. doi: 10.1038/nbt.2808.
17. Hess GT, Tycko J, Yao D, Bassik MC. Methods and applications of CRISPR-mediated base editing in eukaryotic genomes. *Mol Cell* 2017;68(1):26-43. doi: 10.1016/j.molcel.2017.09.029.
18. Kleinstiver BP, Pattanayak V, Prew MS, Tsai SQ, Nguyen NT, Zheng Z, et al. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature* 2016;529(7587):490-5. doi: 10.1038/nature16526.
19. Slaymaker IM, Gao L, Zetsche B, Scott DA, Yan WX, Zhang F. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science* 2016;351(6268):84-8. doi: 10.1126/science.aad5227.
20. Kulcsár PI, Tálas A, Huszár K, Ligeti Z, Tóth E, Weinhardt N, et al. Crossing enhanced and high fidelity SpCas9 nucleases to optimize specificity and cleavage. *Genome Biol* 2017;18(1):190. doi: 10.1186/s13059-017-1318-8.
21. Bitencourt-Ferreira G, de Azevedo WF. Molegro virtual docker for docking. *Methods Mol Biol* 2019;2053:149-67. doi: 10.1007/978-1-4939-9752-7_10.
22. Thomsen R, Christensen MH. MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. *J Med Chem* 2006;49(11):3315-21. doi: 10.1021/jm051197e.
23. Tazikeh-Lemeski E. The study of the interaction between amyloid beta protein and zinc ion and its role in Alzheimer's disease. *Medical Sciences* 2015;25(3):198-205. [In Persian]
24. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 2013;339(6121):819-23. doi: 10.1126/science.1231143.
25. Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol* 2013;31(9):827-32.
26. Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 2013;339(6121):823-6. doi: 10.1126/science.1232033.
27. Pandey B, Grover S, Goyal S, Kumari A, Singh A, Jamal S, et al. Alanine mutation of the catalytic sites of Pantothentate Synthetase causes distinct conformational changes in the ATP binding region. *Sci Rep* 2018;8(1):903. doi: 10.1038/s41598-017-19075-2.
28. Kufareva I, Abagyan R. Methods of protein structure comparison. *Methods Mol Biol* 2012;857:231-57. doi: 10.1007/978-1-61779-588-6_10.
29. Coutsiias EA, Seok C, Dill KA. Using quaternions to calculate RMSD. *J Comput Chem* 2004;25(15):1849-57. doi: 10.1002/jcc.20110.
30. Spasskaya DS, Davletshin AI, Bachurin SS, Tutyaeva VV, Garbuz DG, Karpov DS. Improving the on-target activity of high-fidelity Cas9 editors by combining rational design and random mutagenesis. *Appl Microbiol Biotechnol* 2023;107(7-8):2385-401. doi: 10.1007/s00253-023-12469-5.
31. Childers MC, Towse CL, Daggett V. The effect of chirality and steric hindrance on intrinsic backbone conformational propensities: tools for protein design. *Protein Eng Des Sel* 2016;29(7):271-80. doi: 10.1093/protein/gzw023.