

Editiranje genoma pomoću sustava CRISPR/Cas9

Divjak, Leda

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:396288>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-02**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijски odsjek

Leda Divjak

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

Editiranje genoma pomoću sustava CRISPR/Cas9

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Marko Močibob

Zagreb, 2021. godina.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

16. srpnja 2021.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

24. rujna 2021.

Mentor rada: doc. dr. sc. Marko Močibob

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD	1
§ 2. SUSTAV CRISPR/CAS9.....	3
2.1. Porijeklo i biološka osnova sustava CRISPR/Cas9	3
2.1.1. Porijeklo sustava CRISPR/Cas9.....	3
2.1.2. Biološka osnova sustava CRISPR/Cas9.....	5
2.2. Struktura CRISPR/Cas9 i podjela CRISPR/Cas sustava	9
2.2.1. Struktura sustava CRISPR/Cas9.....	9
2.2.2. Podjela CRISPR/Cas sustava	12
2.3. Inhibitori sustava CRISPR/Cas9	14
2.4. Primjena CRISPR/Cas9.....	17
2.4.1. Alzheimerova bolest.....	17
2.4.2. Anemija srpastih stanica	19
2.4.3. HIV.....	21
2.4.4. Tumori.....	23
2.4.5. Biljke	24
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	XXVIII

§ Sažetak

Otkriće strukture molekule DNK dovelo je do procvata biokemije te raznih otkrića koja su omogućila razvoj raznih načina za editiranje genoma. Jedan od tih načina je korištenje CRISPR/Cas sustava. Ovi sustavi dijele se u dvije klase, a najistraženiji je CRISPR/Cas9 sustav. Od raznih otkrivenih CRISPR/Cas sustava, CRISPR/Cas9 pokazao se kao najbolja opcija za editiranje genoma. CRISPR/Cas9 sustav u prirodi se nalazi u bakterijama i dio je njihovog imunološkog odgovora na viruse. Od otkrića CRISPR-a do usavršavanja CRISPR/Cas9 sustava za editiranje genoma koje još uvijek traje, prošlo je mnogo godina u kojima su znanstvenici otkrivali dio po dio CRISPR/Cas9 slagalice. Jednostavnost i dostupnost velika je prednost ovog sustava, ali još uvijek postoje dijelovi mehanizma djelovanja sustava koji ga čine nesigurnim za korištenje. Otkrićem inhibitora CRISPR sustava te daljnjim razvojem njihova djelovanja moguć je razvoj CRISPR/Cas9 sustava sigurnog za korištenje. Jednostavnost korištenja ovog sustava čini ga izvrsnim alatom za mnoge primjene i trenutno se provode razna istraživanja za primjenu na raznim bolestima te modifikacijama biljaka. U 2020. godini je za otkriće CRISPR/Cas9 genetskih škara dodijeljena Nobelova nagrada za kemiju.

§ 1. UVOD

1953. godine kemičarka Rosalind Franklin fotografirala je pedeset i prvi uzorak DNK dobiven difrakcijom rentgenskih zraka.¹ Ta fotografija postala je ključna u otkrivanju strukture DNK koju su otkrili znanstvenici James Watson i Francis Crick iste godine i time omogućili daljnja istraživanja.¹ Biokemičar Arthur Kornberg radio je na otkrivanju enzima koji su potrebni za sintezu DNK. Nakon otkrića DNK polimeraze 1956. godine sintetizirao je molekulu DNK *in vitro*.² Otkriće DNK ligaza 1967. znanstvenika iz „Gellert, Lehman, Richardson, and Hurwitz laboratories“ i otkriće restrikcijskih enzima mikrobiologa Wenera Arbera doveli su do stvaranja rekombinantne DNK (rDNK) 1973. godine u kojem su sudjelovali biokemičar Stanley N. Cohen i istraživač Herbert W. Boyer.³⁻⁵ Najvažnije svojstvo rekombinantne DNK je mogućnost prirodnog repliciranja bez obzira na to što je umetnuta u neki drugi organizam.

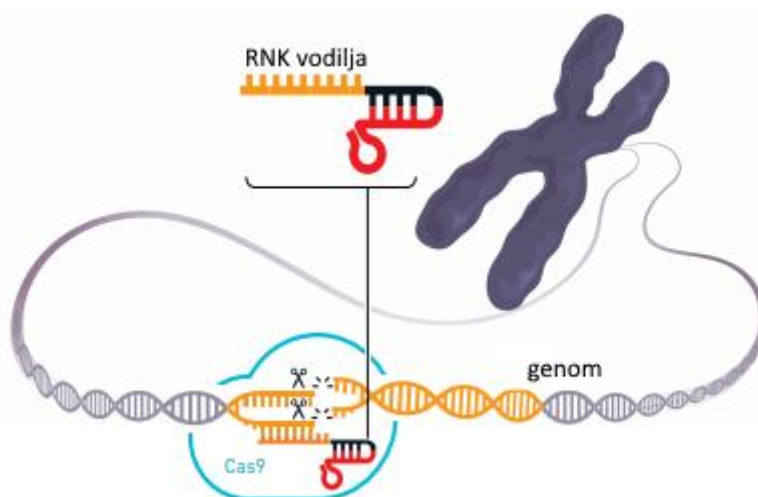
Sve su to bila vrlo bitna otkrića bez kojih molekularni biolog Yoshizumi Ishino ne bi mogao otkriti CRISPR. Y. Ishino istraživao je *iap* gen, gen odgovoran za konverziju izozima alkalne fosfataze u bakteriji *Escherichia coli*. Sekvenciranjem fragmenta DNK u kojem se nalazio *iap*, primjetili su da se isti slijed ponavlja više puta.⁶ Niz sljedova koji se ponavljaju kasnije su nazvani CRISPR.

Cas proteini su nukleaze koje imaju važnu ulogu u imunološkom odgovoru određenih bakterija. CRISPR/Cas9 pripada tipu II CRISPR/Cas sustava te je za funkcioniranje takvog tipa CRISPR/Cas sustava potreban Cas9 protein.⁷

Prije otkrića CRISPR sustava za editiranje genoma, metoda koja se često koristila za editiranje genoma bile su nukleaze cinkovih prstiju, restrikcijski enzimi dobiveni spajanjem domene koja cijepa DNK i domene DNK na koju se veže cinkov prst, strukturni motiv koji ima mogućnost koordinatnog vezanja s jednim ili više iona cinka. Ove nukleaze uspješno su editirale, ali su bile vrlo skupe za korištenje. Otkrićem CRISPR metode, znanstvenici su dobili metodu editiranja genoma koja je jeftina, brza i jednostavna za korištenje. Ova metoda također omogućuje vrlo široku primjenu od istraživanja raznih bolesti uzrokovanih virusima, autoimunih bolesti do tumora te modificiranja biljaka. Editiranje genoma pomoću CRISPR-a omogućilo je editiranje genoma u mnogim organizmima. Zbog pretpostavke da bi mogao ubrzati gensku terapiju, CRISPR sustav se također koristi u istraživanju genskih terapija za

razne bolesti. Jedna od najvažnijih značajka CRISPR sustava je specifičnost u editiranju genoma.⁸

2020. godine, znanstvenicama Emmanuelle Charpentier i Jennifer Doudna dodijeljena je Nobelova nagrada za kemiju za otkriće CRISPR/Cas 9 genetskih škara (slika 1). Važnost ovog otkrića je editiranje genoma s vrlo visokom preciznošću što otvara vrata za pronalazak novih terapija za razne bolesti, a možda u budućnosti i izlječenje nasljednih bolesti.⁷



Slika 1. CRISPR/Cas9 sustav (preuzeto i prilagođeno iz ref. 7)

U nastavku su opisani porijeklo i biološka uloga, stuktura i podjela CRISPR/Cas sustava, inhibicija te primjena sustava CRISPR/Cas9.

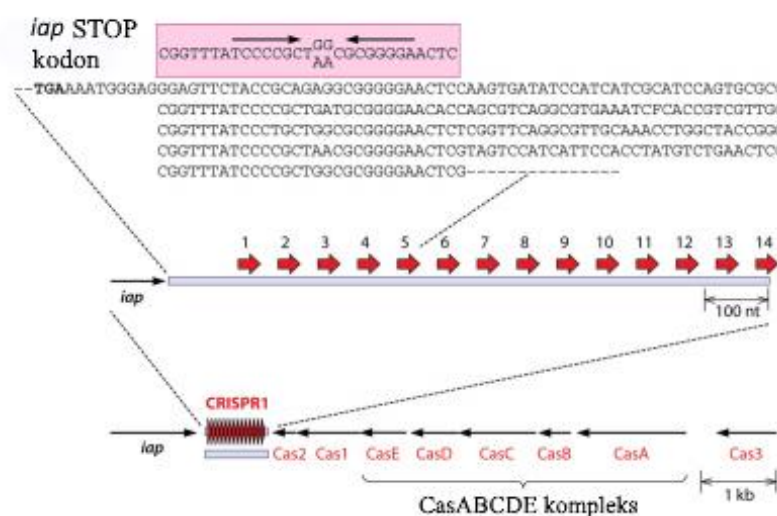
§ 2. SUSTAV CRISPR/Cas9

2.1. Porijeklo i biološka osnova sustava CRISPR/Cas9

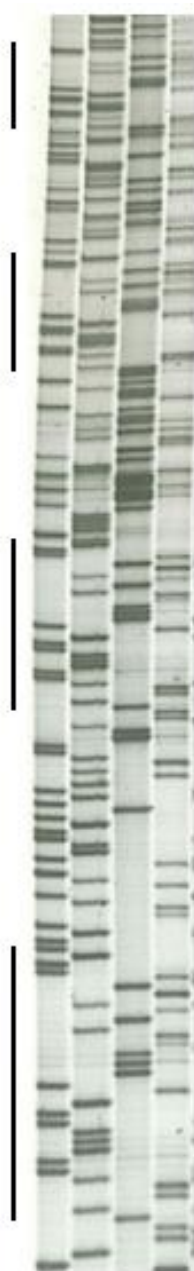
2.1.1. Porijeklo sustava CRISPR/Cas9

Bakterije su jednostanični organizmi. Jedan su od najranijih oblika života na Zemlji te žive u svakom mogućem staništu. Jedan od mnogih načina podjela bakterija je podjela na Gram pozitivne i Gram negativne bakterije koja ih dijeli po kemijskim i fizičkim svojstvima stanične stijenke. U procesu metode bojanja po Gramu, bakterije koje su obojane plavo su Gram pozitivne, a one koje su obojane crveno su Gram negativne.⁹ Arheja su jednostanični mikroorganizmi koji najčešće žive u ekstremnim uvjetima. Najvažnija razlika između bakterija i arheja je ta da stanična stijenka arheja ne sadrži peptidoglikan.¹⁰

1987. godine u bakteriji *E. coli*, Gram negativnoj bakteriji, otkriveni su sljedovi DNK koji se ponavljaju te su razdvojeni pravilnim razmacima (slika 2). 1991. ti pravilni razmaci otkriveni su u kompleksu *Mycobacterium tuberculosis*, Gram pozitivne bakterije evolucijski udaljene od *E.coli*.¹¹ Francisco Mojica je 1993. godine otkrio CRISPR u arhejama istraživajući regulacijske mehanizme arheje *Haloferax mediterranei* kad je primjetio da postoje dijelovi DNK koji se ponavljaju i razmaknuti su pravilnim razmacima (slika 3). Od 1996. do 1999. otkriveni su slični ponavljajući segmenti u drugim bakterijama i arhejama.¹²



Slika 2. CRISPR niz bakterije *E. Coli* (preuzeto i prilagođeno iz ref. 6)



Slika 3. Autoradiograf Sangerovog sekvenciranja DNK *H. mediterranei*. Pravilni razmaci označeni su vertikalnom linijom (preuzeto iz ref. 12)

Funkcija CRISPR-a u bakterijama i arhejama nije bila jasna do otkrića da su sljedovi koji čine pravilne razmake između ponavljajućih sljedova homologni sa sljedovima DNK u bakteriofazima i plazmidima. 2002. godine prilikom istraživanja regulacije gena bakterije *Streptococcus pyogenes* pronađena je mala molekula RNK koja se u bakteriji nalazila u velikoj količini, ali njena uloga u regulaciji gena još nije bila poznata. Zaključeno je da je

nukleotidni slijed ove RNK vrlo blizak CRISPR sljedu bakterijskog genoma.⁷ Ovo otkriće dovelo je do ideje da CRISPR sustav sudjeluje u obrani bakterije od virusa odnosno da su CRISPR/Cas sustavi stečeni imunološki sustavi bakterija i arheja.¹¹ Funkcija CRISPR/Cas sustava kao prokariotskog stečenog imuniteta dokazana je 2007. godine pomoću bakterije *Streptococcus thermophilus*. Umetanje DNK slijeda bakteriofaga u segment regularnih razmaka u CRISPR-u dovelo je do razvijanja rezistencije te bakterije na odgovarajući bakteriofag. Ekspresijom CRISPR/Cas sustava *S. thermophilus* u *E. coli* pokazala se heterologna¹ zaštita od infekcije bakteriofagom pomoću CRISPR/Cas9 sustava bakterije *S. thermophilus*. Ovo istraživanje je također pokazalo kako je Cas9 glavni protein koji je odgovoran za funkcioniranje CRISPR/Cas9 sustava.⁶ 2008. godine dokazano je da RNK molekule koje proizvodi CRISPR, crRNK, imaju ključnu ulogu u obrani bakterija od virusa. Rezultati istraživanja su također ukazali na to da je DNK meta CRISPR sustava. Za Cas proteine se pretpostavljalo, a kasnije je i dokazano da su oni efektori prokariotskog imuniteta. Daljnjim istraživanjima zapaženo je da je CRISPR/Cas sustav sličan stečenom imunitetu kralježnjaka s bitnom razlikom da se kod kralježnjaka stečeni imunitet ne nasljeđuje. 2011. godine otkriveno je kako je nepoznata molekula RNK, sada nazvana tracrRNK, neophodna da dugačka RNK koja nastaje iz CRISPR slijeda u genomu prijeđe u aktivnu formu. 2012. godine E. Charpentier i J. Doudna otkrile su da tracrRNK nije potrebna samo za prijelaz crRNK u aktivnu formu. Kad Cas9 ima pristup tracrRNK, molekula DNK će biti pocijepana u dva dijela. Spajanjem tracrRNA i crRNK dobile su molekulu koju su nazvale sgRNK ili RNK vodilja. sgRNK komplementarna je dijelu DNK na kojem će molekula biti pocijepana.¹³

2.1.2. Biološka osnova sustava CRISPR/Cas9

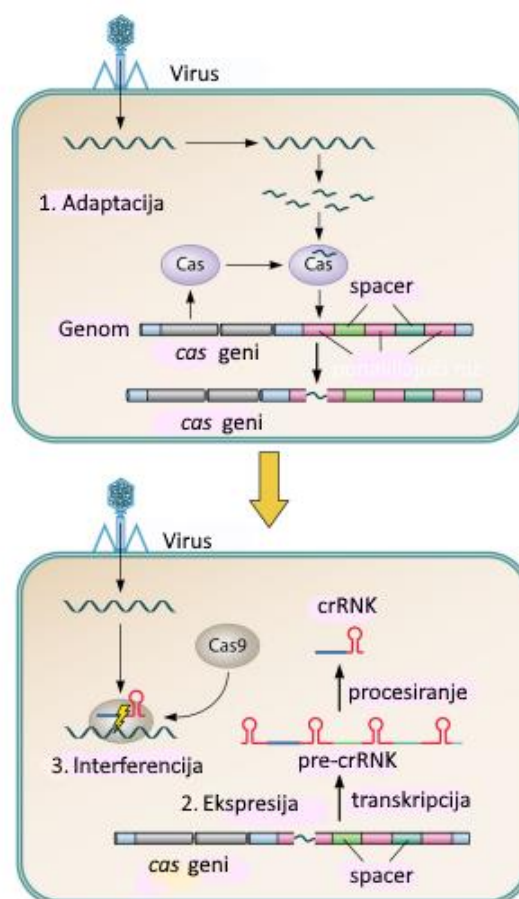
Imunost je sposobnost organizma da se obrani od bioloških ili kemijskih opasnosti poput infekcija i bolesti. Postoje dva dijela imunosti: nespecifična (prirodna) i specifična (stečena) imunost. Stečena imunost razvija se u kontaktu s patogenima te ima sposobnost prepoznati razne karakteristike patogena i odgovoriti na prikladan način.¹⁴ Zbog jednostavnosti prokariota i kompleksnosti stečenog imunostnog sustava, smatralo se da bakterije nemaju

¹ Zaštita pomoću heterologne ekspresije gena koja podrazumijeva ekspresiju određenog gena u domaćinu koji on prirodno ne sadrži

takav sustav do otkrića CRISPR/Cas sustava. CRISPR se može pronaći u bakterijskom kromosomu i u plazmidu. Aktivnost CRISPR-a zahtjeva prisutnost *cas* gena koji kodiraju proteine koji su potrebni za imunološki odgovor.¹⁵

Genski lokus^{II} CRISPR/Cas sustava naziva se CRISPR niz. Sadrži dvadeset do pedeset parova baza koji su odvojeni sljedovima DNK koji se nazivaju „spacer“, odnosno razmaknica, kojima prethode regije bogate adeninom i timinom.¹⁵ DNK virusa koji napada bakterije ima slijed koji je identičan određenoj razmaknici i naziva se „protospacer“, odnosno proto-razmaknica. Dodavanjem novih razmaknica mogu se raspoznati novi virusi. Nove razmaknice dodaju se na jednu stranu CRISPR-a te čine CRISPR kronološkim slijedom virusa s kojim se bakterija susrela.¹⁶

Mehanizam djelovanja CRISPR/Cas9 sustava kao stečenog imuniteta ima tri faze: adaptacija, ekspresija i interferencija (slika 4)

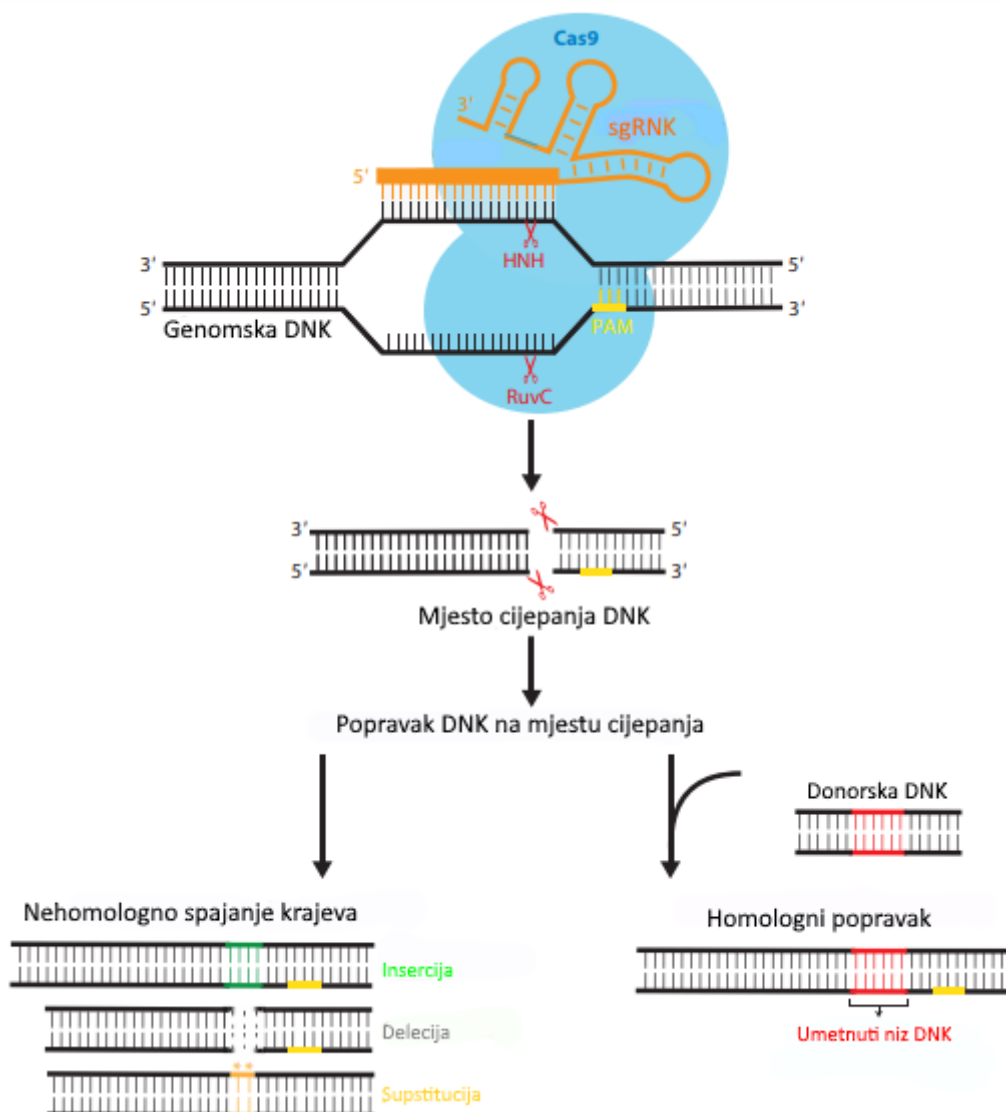


Slika 4. Mehanizam djelovanja CRISPR/Cas9 sustava (preuzeto i prilagođeno iz ref. 6)

^{II} Specifična pozicija određenog gena u DNK

U fazi adaptacije proto-razmaknica se umeće u CRISPR čime se dobije nova razmaknica. Na ovaj način bakterija može zapamtiti genetski materijal virusa. Proteini Cas1 i Cas2 potrebni su za umetanje proto-razmaknica. Oni formiraju kompleks kako bi uhvatili segment strane DNK i umetnuli ju u CRISPR niz. Niz nazvan PAM nalazi se pored proto-razmaknice i ključan je za lociranje točne proto-razmaknice te za interferenciju. Održavanje faze adaptacije preduvjet je za održavanje ekspresije i interferencije. U fazi ekspresije, CRISPR niz se prvo transkribira u dugački lanac prekursora CRISPR RNK, pre-crRNK, koji kasnije prelazi u zrelu CRISPR RNK, crRNK, koja sadrži informaciju o virusu. Značajka crRNK je ta da je svaka specifična za određenu metu. Za pretvorbu pre-crRNK u crRNK potrebna je ribonukleaza III i tracrRNK te Cas9 protein.¹⁶ tracrRNK ima strukturu ukosnice i sadrži niz koji je djelomično komplementaran CRISPR nizu koji se ponavlja što omogućuje vezanje za crRNK i stvaranje kompleksa s Cas9. tracrRNK i pre-crRNK tvore dupleks koji je stabiliziran pomoću Cas9, a RNaza III prepoznaje taj dupleks i procesira ga te nastane crRNK.¹⁷ crRNK dalje prelazi u manje molekule RNK. U fazi interferencije, crRNK se koriste kao vodiči za prepoznavanje strane DNK. Sustav koristi PAM niz da identificira željeni niz koji će napasti. tracrRNK-crRNK dupleks tvori ribonukleoproteinski kompleks s Cas9, jedinim proteinom potrebnim u ovoj fazi, te ga vode do mjesta u ciljnoj molekuli na kojem će se dogoditi cijepanje.¹⁶ Cas9 se veže za tracrRNK-crRNK dupleks pomoću motiva bogatim argininom koji se nalazi na unutarnjoj strani režnja koji sadrži α -zavojnicu. Vezanjem dupleksa dolazi do konformacijske promjene u Cas9 koja rezultira stvaranjem kanala koji pozicionira nukleinsku kiselinu duž proteina. Endonukleazna domena prelazi u konformaciju za cijepanje ciljne molekule. Važnost PAM niza kod pronalaska mete je ta da Cas9 zbog PAM niza ne identificira vlastiti kromosom kao metu. Cas9 se nasumično veže za DNK dok ne nađe na PAM niz. Domena koja interagira s PAM nizom čvrsto se veže za ciljnu molekulu DNK. Ovim vezanjem dolazi do druge konformacijske promjene Cas9 zbog koje se DNK koja će se cijepati zarobi u prostoru između dva režnja Cas9. Cas9 cijepa DNK na udaljenosti od 3 bazna para od PAM niza. Dolazi do razdvajanja lanaca DNK i pozicioniranja u endonukleazna aktivna mjesta koja koriste ione metala. Cijepanje se događa pomoću dvije domene: HNH i RuvC. HNH domena cijepa lanac DNK koji je komplementaran sgRNK, a RuvC domena cijepa drugi DNK lanac, onaj koji nije komplementaran sgRNK. Aktivna mjesta u kojima se događa cijepanje koriste

ion magnezija kao dvovalentni kation, ion mangana se također može koristiti, a ion kalcija nije pogodan jer inhibira aktivnost.¹⁷ Nakon cijepanja strane DNK, ta DNK se deaktivira. Kod editiranja gena pomoću CRISPR/Cas9 sustava, mjesto na kojem je DNK pocijepana može se popraviti nehomolognim spajanjem krajeva ili homolognim popravkom koji rezultira genomskom modifikacijom na mjestu cijepanja pomoću homolognog predloška za popravak (slika 5).¹⁸

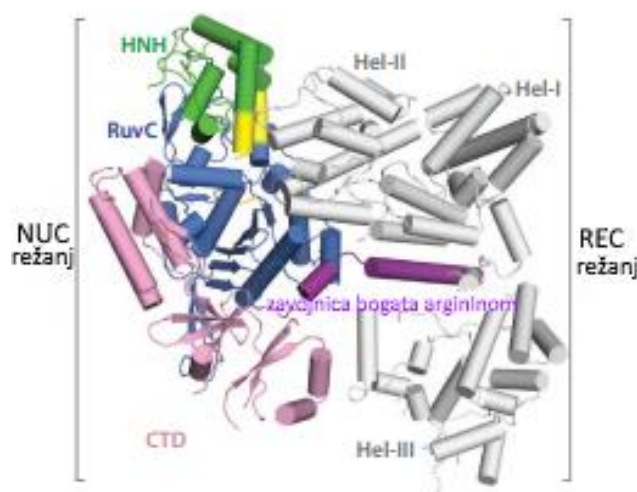


Slika 5. Mehanizmi popravka DNK kod editiranja gena (preuzeto i prilagođeno iz ref. 18)

2.2. Struktura CRISPR/Cas9 i podjela CRISPR/Cas sustava

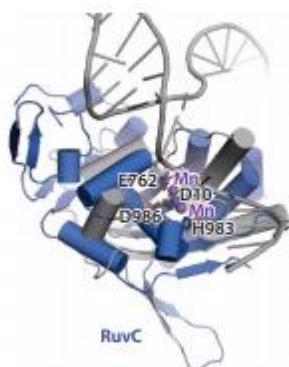
2.2.1. Struktura sustava CRISPR/Cas9

Cas9 protein bakterije *S. pyogenes* (SpyCas9) velika je multifunkcionalna DNK endonukleaza koja se sastoji od više domena. U neaktivnom obliku Cas9 mogu se razaznati dva reznja: REC, reznj koji služi za prepoznavanje zavojnice i NUC, reznj koji sadrži dvije nukleazne domene HNH i RuvC, te CTD domenu (slika 6). Reznjevi su povezani pomoću zavojnice bogate argininom i pomoću još jedne poveznice. REC reznj sadrži 3 domene koje sadržavaju alfa zavojnice, Hel-I, Hel-II i Hel-III. CTD domena sadrži regiju za interakciju s PAM nizom. U inaktivnoj formi enzima regija za interakciju s PAM nizom je neuređena i ne može prepoznati ciljnu DNK što je u skladu s činjenicom da za prepoznavanje DNK, odnosno aktivaciju endonukleaze, Cas9 mora biti vezan za sgRNK.¹⁸



Slika 6. Struktura neaktivnog oblika proteina Cas9 bakterije *S. Pyogenes* (preuzeto i prilagođeno iz ref. 18)

RuvC domena proteina Cas9 strukturalno je slična retroviralnim integrazama, enzimima koji kataliziraju umetanje virusne DNK u stanicu koju napadaju, koji imaju specifičan način smatanja. Ova sličnost sugerira da u katalitičkom mehanizmu za cijepanje nekomplementarnog lanca sudjeluju dva metalna iona (slika 7). HNH domena ima tip smatanja $\beta\beta\alpha$ -metal koji je karakterističan za HNH endonukleaze i za razliku od RuvC domene koristi jedan metalni ion u katalizi (slika 8).¹⁸

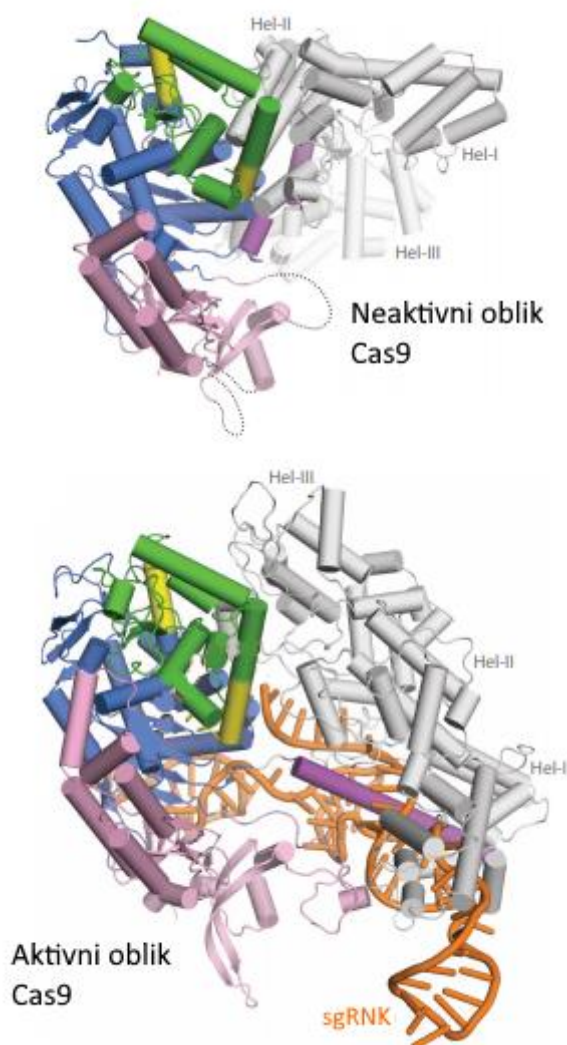


Slika 7. RuvC domena proteina Cas9 (preuzeto iz ref. 18)



Slika 8. HNH domena proteina Cas9 (preuzeto iz ref. 18)

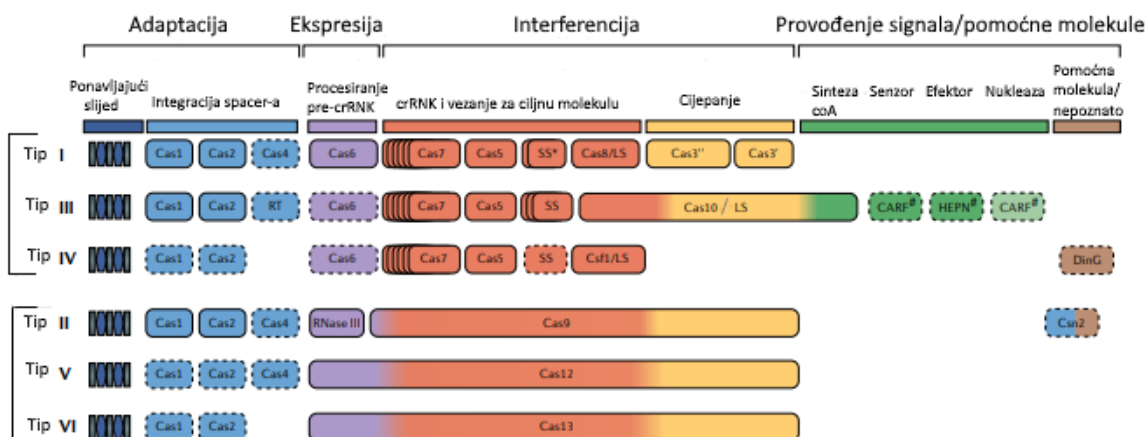
Da bi CRISPR/Cas9 sustav pocijepao DNK, Cas9 mora prijeći u aktivni oblik. Promjene koje se događaju prijelazom iz jednog oblika u drugi su vidljive usporedbom struktura inaktivnog Cas9 i aktivnog Cas9, odnosno Cas9 vezanog za sgRNK (slika 9). Najistaknutija konformacijska promjena događa se u REC režnju gdje se vezanjem sgRNK zavojnica Hel-III pomiče prema HNH domeni za 65 Å. Vezanje za ciljnu DNK i PAM niz ne uzrokuje takve velike konformacijske promjene što ukazuje na to da se većina strukturalnih promjena događa prije vezanja ciljne DNK i da je sgRNK važan regulator funkcija Cas9.¹⁸



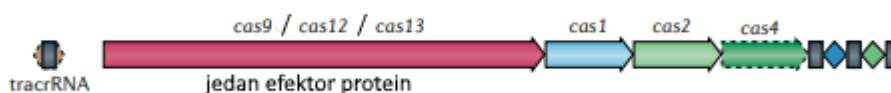
Slika 9. Usporedba aktivnog i neaktivnog oblika proteina Cas9 (preuzeto i prilagođeno iz ref. 18)

CRISPR sljedovi su kratki, pravilno razmaknuti ponavljajući palindromski nizovi. Palindromski nizovi su sljedovi baza koji imaju dvostruku os simetrije, a molekule koje sadrže palindromske sljedove često zauzimaju strukturu ukosnice (slika 10), npr. tracrRNA. Palindromski sljedovi se ne mogu translirati u funkcionalne proteine, ali kao i u CRISPR/Cas9 sustavima, proteini ih koriste za prepoznavanje mjesta na kojem će cijepati molekulu DNK. CRISPR regija sadrži promotor koji osigurava transkripciju u pre-crRNA. RNA molekule koje nastaju transkripcijom CRISPR nizova sastoje se od 23 do 47 parova baza.¹⁹

proteinom, RNazu III. Proteini Cas1 do Cas13 čine srž sustava klase 2 koja uz njih sadrži i mnoge pomoćne molekule koje su slabije povezane s CRISPR/Cas sustavom.²⁰

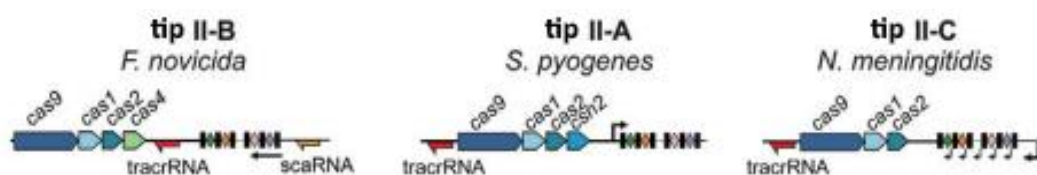


Slika 11. Podjela CRISPR/Cas sustava (preuzeto i prilagođeno iz ref. 20)



Slika 12. Klasa 2 CRISPR/Cas sustava (preuzeto i prilagođeno iz ref. 20)

Sustavi tipa II klase 2 dijele se na 3 podtipa: tip II-B, tip II-A i tip II-C (slika 13). Tip II-A sadrži *csn2* gen. Csn2 protein je važan za integraciju razmaknica, ali nije potreban za interferenciju. Tip II-B sadrži *cas4* gen. Cas4 protein je nukleaza i sadrži 5'- egzonukleaznu aktivnost. Tip II-B također sadrži dodatnu molekulu RNK, scaRNA koja uz Cas9 i tracrRNA sudjeluje u represiji mRNA koja kodira lipoproteine u bakteriji *F. novicida*. Svi sustavi tipa II sadrže *cas1* i *cas2* gene koji su potrebni za pronalazak razmaknice te *cas9* gen koji je značajka sustava tipa II.²⁰

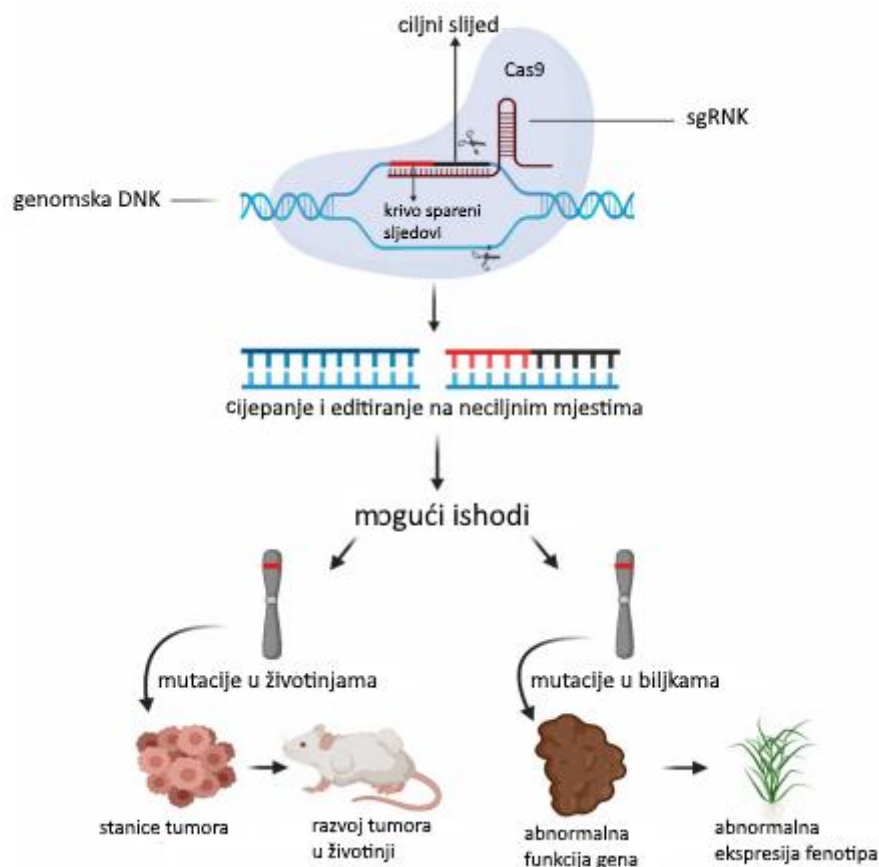


Slika 13. Sustavi tipa II klase 2 (preuzeto i prilagođeno iz ref. 20)

Sustavi tipa II-A i tipa II-C sadrže najpoznatije gene za Cas9 proteine koji sadrže oko 1100 ili 1400 aminokiselina. Oba Cas9 proteina dovode do cijepanja oba lanca dvostruke zavojnice DNK i pokazuju strukturnu sličnost s ostalim Cas9 proteinima.²⁰

2.3. Inhibitori sustava CRISPR/Cas9

Korištenje CRISPR/Cas9 sustava za editiranje genoma nailazi na nekoliko problema koje je potrebno riješiti kako bi se dobio sustav koji je siguran za korištenje. Najveći problem je cijepanje na neciljnim mjestima do kojeg dolazi zbog povećane nukleazne aktivnosti. Ovakvo cijepanje može dovesti do delecija i preuređivanja genoma koja se ne događaju kod uobičajenog cijepanja DNK. Mutacije koje nastaju cijepanjem na neciljnim mjestima mogu uzrokovati nestabilnost genoma i utjecati na funkcionalnost normalnih gena. Također mogu dovesti do letalnih genetskih mutacija i potpunog gubitka funkcije gena koja kod životinja može dovesti do razvoja tumora, a kod biljaka do razvoja biljaka vrlo osjetljivih na razne bolesti (slika 14). Protein Cas9 može se vezati za neciljna mjesta, a više od 3 krivo sparane baze između ciljnih sljedova i segmenta sgRNK koji se sastoji od 20 nukleotida može rezultirati neželjenim učincima koji su rezultat cijepanja na neciljnim mjestima. Kako bi se ovakav ishod korištenja CRISPR/Cas9 sustava spriječio koriste se anti-CRISPR proteini.²¹



Slika 14. Mogući ishodi cijepanja DNK pomoću Cas9 na neciljnim mjestima (preuzeto i prilagođeno iz ref. 21)

Anti-CRISPR proteini (Acr proteini) su proteinski inhibitori CRISPR/Cas sustava. Pomoću Acr proteina mogu se razviti načini primjene CRISPR/Cas9 sustava koji su precizniji i lakši za kontrolirati. Za klasu 2 CRISPR/Cas sustava otkriven je 21 Acr protein. Acr proteini nemaju puno sličnosti u sljedovima nukleotidnih baza ili strukturi, ali različiti *acr* geni se često nalaze jedan pored drugog što je olakšalo njihov pronalazak. Mogućnost Acr proteina da direktno interagiraju s CRISPR/Cas sustavima omogućava posttranslacijsku regulaciju. Acr proteini inhibiraju CRISPR/Cas sustave interakcijom s Cas proteinom kako bi spriječili vezanje, cijepanje, nastanak crRNA ili nastanak kompleksa koji tvori Cas protein. Kod Acr proteina koji interagiraju sa sustavima klase 2 događa se direktna interakcija s Cas proteinom koja ograničava vezanje DNK steričkim smetnjama ili dovodi do sprječavanja aktivacije HNH nukleazne domene koja dopušta vezanje DNK, ali sprječava cijepanje molekule.

Spriječavanje djelovanja Cas9 proteina na neciljna mjesta može se postići ograničavanjem nukleazne aktivnosti i ekspresije. Jedan od načina je umetanje već formiranog

ribonukleoproteinskog kompleksa u kojem se nalaze dodatne regulatorne domene. Loša strana dodatnih regulatornih domena je ta što povećavaju veličinu Cas9 i često trebaju dodatne ligande. Ovakav pristup nije prikladan za *in vivo* uvođenje pomoću virusnih vektora^{III}.

Odgođeno uvođenje Acr proteina predstavlja prilagodljiv način kontrole cijepanja neciljnih mjesta. Ovaj način se pokazao uspješnim za stanice koje koriste različite sgRNK za napad na β -globin.

Zbog male veličine, Acr proteini mogu se koristiti kao modulatori CRISPR/Cas sustava u adeno-povezanim vektorima (AAV) koji se često koriste za dostavu gena u specifična tkiva, ali su ograničeni veličinom. Razvijeno je nekoliko strategija za kontrolu ekspresije i aktivnosti Cas9 koje su se pokazale efikasnim za regulaciju SpyCas9, Cas9 proteina bakterije *S. pyogenes*.

Prednosti Acr proteina su mogućnost kodiranja gena i uvođenje pomoću virusnih vektora *in vivo*, široki spektar djelovanja (neki Acr proteini mogu inhibirati više Cas proteina), raznolikost u snazi i mehanizmu djelovanja te u veličini i lakoći upotrebe. Mane Acr proteina su to što su dodatna komponenta koja čini sustav većim, spora reverzibilnost reakcije u kojoj sudjeluju i moguća toksičnost.

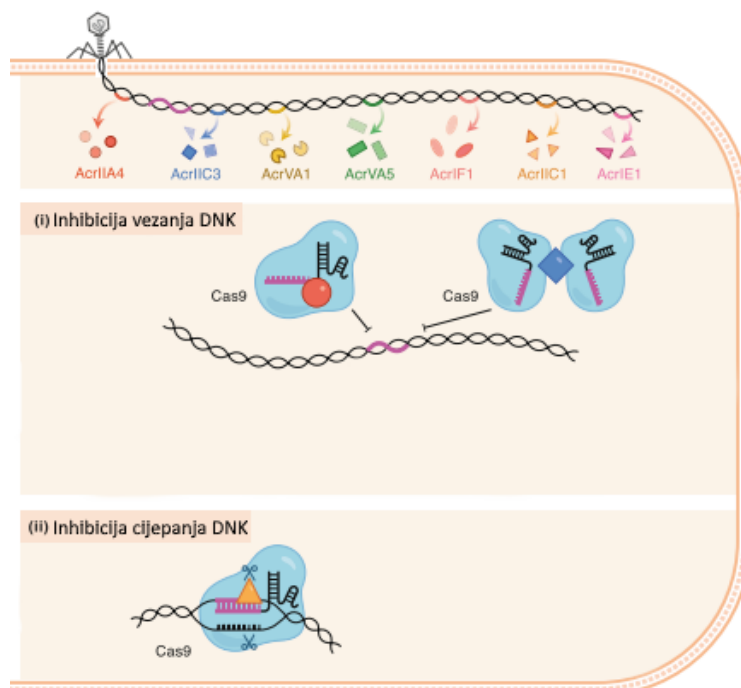
Kako bi dobili bolju i bržu kontrolu CRISPR/Cas sustava, razvijeno je nekoliko metoda za kontrolu aktivnosti i ekspresije Acr proteina. Prva metoda je transkripcijska metoda u kojoj se Anti-CRISPR povezani geni (*aca* geni) vežu na native *acr* promotore i sprječavaju transkripciju *acr* gena. *aca* geni se nalaze u istom operonu kao i *acr* geni. Druga metoda je posttranskripcijska regulacija Acr proteina koja koristi posebne molekule RNK, microRNK koje su razvijene za specifična tkiva. Ovakav način regulacije se postiže modifikacijom 3' netranslatirane regije *acrIIA4* i *acrIIC3*, koje imaju visoku razinu ekspresije u hepatocitima, u kojoj im se doda vezno mjesto za microRNK. microRNK reguliraju *AcrIIA4* i *AcrIIC3* u hepatocitima, ali dopuštaju inhibiciju Cas9 u drugim stanicama. Treća metoda je optogenetska metoda koja koristi LOV2 domenu fototrofina-1 biljke *Avena sativa*. Kada nema svjetlosti, *AcrIIA4*-LOV2 može vezati i inhibirati SpyCas9, ali u prisutnosti svjetlosti dolazi do gubitka afiniteta *AcrIIA4* za Cas9. Zadnja metoda se zasniva na ligandima. *AcrIIA4* se veže za

^{III} Molekule DNK u koje se mogu ugraditi željeni geni i zatim unijeti u stanicu domaćina

destabilizacijsku domenu. U prisutnosti liganda ta je domena stabilizirana i AcrIIA4 inhibira Cas9. Kad ligand nije prisutan, domena je destabilizirana i ne dolazi do inhibicije Cas9.

Primjer djelovanja Acr proteina je AcrIIA4 protein koji se veže za Cas9 i sprječava njegovo prepoznavanje PAM niza. AcrIIC3 protein dovodi do dimerizacije dva Cas9 proteina.

AcrIIC1 protein sprječava vezanje Cas9 na HNH nukleaznu domenu (slika 15).²²



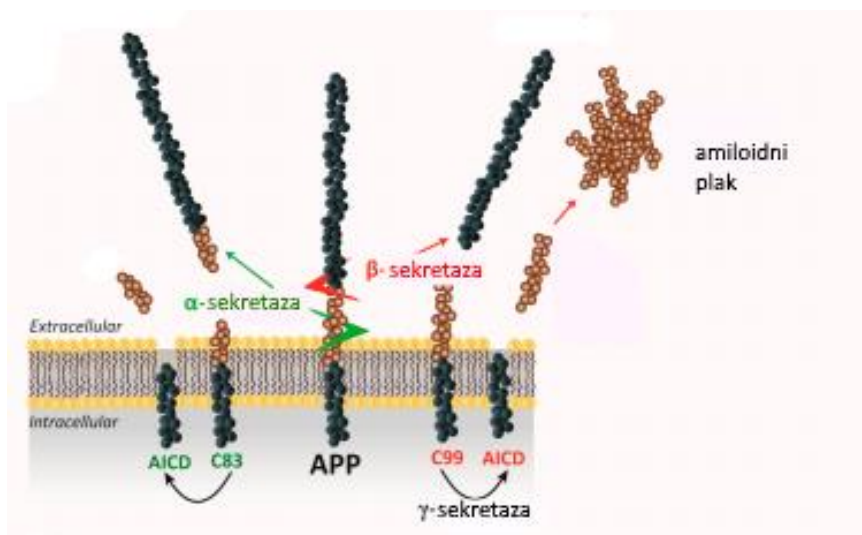
Slika 15. Primjeri djelovanja anti-CRISPR proteina (preuzeto i prilagođeno iz ref. 22)

2.4. Primjena CRISPR/Cas9

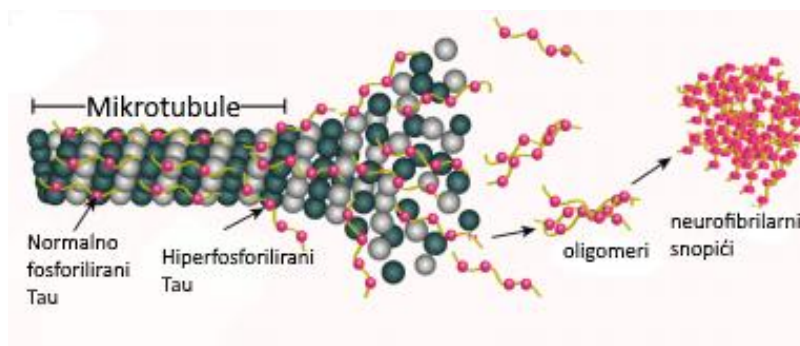
2.4.1. Alzheimerova bolest

Alzheimerova bolest najčešći je uzrok demencije. Genetske mutacije uzrokuju oko 1% slučajeva (FAD tip) dok su ostalih 99% uzrokovani kombinacijom genetskih i rizičnih faktora (SAD tip). Glavne neuropatološke karakteristike su izvanstanični amiloidni beta ($A\beta$) plakovi koji nastaju zbog povećane aktivnosti β -sekretaze 1 (*BACE1*) koja dovodi do akumulacije $A\beta$ monomera te prelazak u oligomere i u konačnici u plakove (slika 16), i unutarstanični neurofibrilarni snopići koji nastaju hiperfosforilacijom 3R i 4R tau proteina (slika 17). Protein prekursor amiloida (APP) podložan je proteolizi koju kataliziraju α -sekretaza, β -sekretaza i γ -sekretaza. Rizični faktori uključuju dob, spol, pretilost, fizičku aktivnost, stres, itd. Uzrok ranog početka bolesti (pojava simptoma kod osoba između 35 i 60 godina) su u preko 92% slučajeva genetske mutacije, dok je kod kasnog početka bolesti (pojava simptoma kod osoba

iznad 65 godina) uzrok kombinacija genetskih i rizičnih faktora. Genetske mutacije u *APP*, *PSEN1* i *PSEN2* gena uzroci su abnormalnog metabolizma $A\beta$. Prisutnost alela $\epsilon 4$ apolipoproteina E (*APOE*) rizični je faktor za SAD tip, ali prisutnost tog alela znači samo povećani rizik, ne i nužno oboljenje.²³



Slika 16. Nastanak amiloidnog plaka (preuzeto i prilagođeno iz ref. 23)



Slika 17. Nastanak neurofibrilarnih snopića (preuzeto i prilagođeno iz ref. 23)

CRISPR/Cas9 sustavi mogu biti uneseni pomoću virusnih i nevirusnih vektora. Virusni vektori koriste se *in vivo* i *in vitro* zbog efikasnosti i stabilnosti. Najčešće korišteni virusi su lentivirus i adeno-povezani virusi. Virusni vektori su najefikasniji za CRISPR/Cas9 sustave temeljene na plazmidima, ali mogu dovesti do nepoželjnih mutacija i jakih imunoloških odgovora koji mogu biti smrtonosni. Nevirusni vektori su sigurniji, jeftiniji i vrlo raznoliki te su prikladniji za korištenje kod Alzheimerove bolesti. Izbor nevirusnog vektora ovisi o vrsti CRISPR/Cas9 sustava koji se koristi. Još jedan način unosa su nanokompleksi koji se pripremaju kompleksiranjem negativno nabijenog CRISPR/Cas9 i pozitivno nabijenog

peptida, ali oni ne mogu prijeći krvno-moždanu granicu stoga se koriste metode direktnog injektiranja.

Za FAD tip, CRISPR/Cas9 korišten je za targetiranje *BACE1* u dvije vrste miševa: ADF miševi (imaju umetnut egzon 16 i egzon 17 *APP*-a) i *5xFAD* miševi (ekspresiraju ljudski *APP* gen i *PSENI*). Negativno nabijeni Cas9/sgRNA kompleks specifičan za *BACE1* kompleksiran je s peptidom R7L10 te su se nastale nanočestice unijele direktno u hipokampus miševa. Sangerovo sekvenciranje napravljeno osam i dvanaest tjedana kasnije pokazalo je 70% nižu ekspresiju *BACE1* u hipokampusu tretiranih miševa te smanjenje koncentracije $A\beta$. Ova metoda vjerojatno ne može zaustaviti napredak bolesti. Targetiranje C-kraja *APP*-a bez utjecaja na N-kraj važno je jer dovodi do ometanja u inicijaciji amiloidogenog puta što na kraju dovodi do smanjenja *BACE1* aktivnosti.

Editiranje genoma u slučaju SAD tipa usredotočeno je na $\epsilon 4$ *APOE*. U jednom istraživanju korišten je sustav za ireverzibilnu pretvorbu jedne baze u drugu kako bi se iz *APOE4* dobio *APOE3r* koji ima smanjeni rizik za Alzheimerovu bolest. U sustavu koji je korišten, CRISPR/Cas9 kombiniran je s deaminazom citidina da se ne dobije dvostruki rez DNA kako bi se minimizirao efekt nepoželjnih mutacija. Sustav je rezultirao u 15-75% trajnom ispravku DNA.

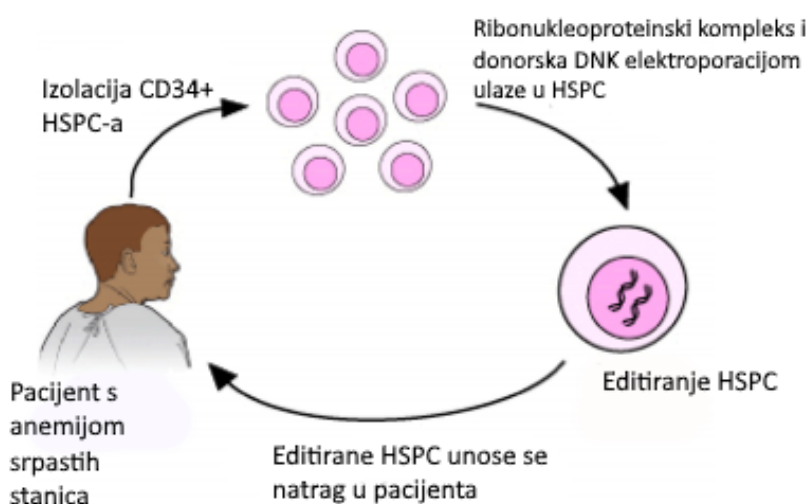
U oba tipa Alzheimerove bolesti pronađen je nepravilan metabolizam $A\beta$ te je korekcija povećane proizvodnje $A\beta$ pomoću CRISPR/Cas9 obećavajući način terapije.²³

2.4.2. Anemija srpastih stanica

Anemija srpastih stanica krvni je poremećaj koji je posljedica zamjene jednog nukleotida u genu β -globina (*HBB*). Dolazi do zamjene glutamata koji je hidrofilna aminokiselina s valinom koji je hidrofobna aminokiselina. Zbog drugačijih svojstava glutamata i valina, ova zamjena dovodi do polimerizacije hemoglobina pri uvjetima hipoksije ili pri kiselim uvjetima te deformacije crvenih krvnih stanica. Deformirane stanice ne mogu na pravilan način sudjelovati u prijenosu kisika. Kod zdravih odraslih osoba, sastav hemoglobina sastoji se od 97% odraslog hemoglobina, HbA, ($\alpha_2\beta_2$), 3% ili manje HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$) i do 1% fetalnog hemoglobina, HbF, ($\alpha_2\gamma_2$). HPFH je stanje koje rezultira povećanim postotkom HbF u odrasloj dobi. Osobe koje imaju anemiju srpastih stanica i HPFH imaju lakši oblik bolesti. Uz pomoć CRISPR/Cas9 sustava nastoji se doći do ispravka mutacije u *HBB*-u, do povećanog broja HbF-a targetiranjem HbF transkripcijskih represora i do uvođenja korisnih HPFH

mutacija. Većina pretkliničnih studija koristila je *ex-vivo* editiranje gena ljudskih hematopoetskih matičnih^{IV} i progenitornih^V stanica (HSPC) koje su zatim transplantirane u imunodeficiente miševe.

Jedna od strategija za liječenje anemije srpastih stanice je da se ljudske CD34⁺ HSPC stanice izoliraju te ostave u kulturi s citokinima nekoliko dana prije editiranja gena kako bi se povećala uspješnost editiranja. Ribonukleinski kompleks sgRNK i Cas9 proteina te kalupa donorske DNK ulaze u jezgru HSPC-a pomoću elektroporacije. Editirane HSPC se zatim unose natrag u pacijenta (slika 18).



Slika 18. Jedna od strategija za liječenje anemije srpastih stanica (preuzeto i prilagođeno iz ref. 24)

Istraživanjima genoma ljudi s HPFH-om nađeni su brojni transkripcijski faktori koji su uključeni u stišavanje HbF-a. Glavni regulator za HbF je BCL11A. Supresiranje ekspresije fetalnog hemoglobina događa se asocijacijom s drugim faktorima u lokusu β -globina. Do povećane ekspresije HbF-a doći će ometanjem samog BCL11A ili veznih motiva BCL11A. Jedna od istraživanih metoda koja je pokazala vrlo učinkovit rezultat je disrupcija GATA1 veznog mjesta na +58 BCL11A što je dovelo do redukcije ekspresije BCL11A i indukcije fetalnog hemoglobina u hematopoetskim matičnim stanicama.

^{IV} Stanice iz kojih nastaju krvne stanice i stanice imunološkog sustava

^V Nediferencirane stanice iz kojih nastaju razne diferencirane stanice

Uvođenje HPFH mutacija još je jedan način da se inducira nastajanje HbF-a. Glavni represori fetalnog hemoglobina su BCL11A i faktor vezan za leukemiju/limfom (LRF). Ta dva represora vezana su direkto na HBG (gen γ -globina) promotor i ometanje vezanja pomoću CRISPR/Cas9 dovodi do značajnog nastajanja HbF-a. Nedavna istraživanja su pokazala da je zamjena jednog nukleotida na veznom mjestu BCL11A na HBG promotoru dovoljno da se vezanje BCL11A omete i da se poveća ekspresija HBG-a.

Najizravniji način liječenja je ciljanje na samu mutaciju koja uzrokuje anemiju srpastih stanica (slika 18). Za ovaj pristup potreban je vektor. Najboljim se pokazao vektor baziran na adeno-povezanim virusima (AAV) jer ima nisku frekvenciju intergracije u DNK domaćina te nizak rizik mutageneze i toksičnosti. Uz AAV, korisnima su se pokazali i jednolančani oligodeoksinukleotidi (ssODN) u kombinaciji s ribonukleoproteinskim kompleksom koji ulazi u jezgru HSPC-a. *In vitro*, AAV se pokazao boljim zbog manje toksičnosti.

Zbog visoke cijene *ex vivo* editiranja genoma, pokušava se razviti način *in vivo* editiranja pomoću sustava CRISPR/Cas9. Problemi s kojima se susreće ovaj način editiranja su editiranje neciljnih stanica ili tkiva te korištenje virusnih vektora koji mogu dovesti do nekontrolirane ekspresije Cas9/ sgRNK što može dovesti do genotoksičnosti i imunološkog odgovora.

CRISPR/Cas9 sustav ima određenu toleranciju za krivo spajanje baza između ciljne DNK i sgRNK što može dovesti do nestabilnosti genoma, a dugotrajna ekspresija Cas9 preko plazmida i virusnih vektora može dovesti do akumulacije neciljnih cijepanja što za posljedicu može imati razne nuspojave koje je teško predvidjeti.²⁴

2019. provedeno je uspješno liječenje anemije srpastih stanica pomoću sustava CRISPR/Cas9 i disrupcije BCL11A gena u matičnim stanicama izoliranim iz periferne krvi oboljelih pacijenata.²⁵

2.4.3. HIV

HIV ili virus humane imunodeficijencije je virus koji uzrokuje stečeni sindrom imunodeficijencije odnosno AIDS. HIV spada u lentiviruse, subfamiliju retrovirusa, za koju je karakteristično dugo zadržavanje u domaćinu. Cjepivo još nije otkriveno, a za terapiju se koristi kombinacija lijekova koja se naziva antiretroviralna terapija (cART). cART može utišati replikaciju virusa, ali ne može dovesti do izlječenja zaražene osobe. Iako se pomoću cART-a virus uspješno može držati pod kontrolom, dugoročno korištenje terapije te mnoge

nuspojave koje ona uzrokuje dovele su do potrebe za novim načinima borbe protiv ovog virusa. Jedan od mogućih načina je korištenje CRISPR/Cas9 sustava za editiranje genoma. Kod pacijenata koji uzimaju cART, virus HIV-a je latentan te ga je potrebno pobuditi kako bi se otkrile zalihe virusa, odnosno stanice s latentnim virusom koje se trebaju uništiti.

Ekspresija HIV-1 gena inducirana je LTR-ovima, dugim terminalnim ponavljajućim sljedovima koji pomažu pri inserciji retroviralne DNK u kromosom domaćina. Genetske modifikacije u LTR mjestima mogu dovesti do promjene u transkripciji. Za prvi uspješni pokušaj pobude latentnog virusa HIV-a korištena je dCas9, Cas9 protein koji nema endonukleaznu aktivnost. On se može vezati za ciljna mjesta, ali ne uzrokuje cijepanje. Ovaj pristup nije oštetio DNK, ali je moguće nastajanje raznih efekata uzrokovanih aktivacijom gena. dCas-VP64 protein je drugi dCas9 sustav koji je omogućio aktivaciju ekspresije gena pomoću HIV-LTR sustava u inficiranim stanicama u kojima je virus latentan. NF- κ B vezna mjesta na LTR-u najpogodnija su za vezanje sgRNK. Prednosti reaktivacije virusa pomoću CRISPR/Cas9 sustava je visoka specifičnost i reaktivacijska moć koja rezultira produkcijom virusa i smrću ciljanih stanica.

Glavni način ulaska HIV-1 u T-stanice^{VI} su CD4 receptor i CCR5 i CXCR4 koreceptori. Jedan od način liječenja infekcije HIV-om koji se istražuje je sterilizirajući lijek. Ovaj način se odnosi na potpunu eliminaciju provirusa koji imaju sposobnost replikacije. Dosadašnja dva uspješna pokušaja temeljila su se na transplantaciji CCR5 Δ 32 hematopoetskih progenitornih matičnih stanica. CRISPR/Cas9 sustav korišten je za disrupciju CCR5 uz pomoć transpozona^{VII} kako bi se generirala delecija CCR5 Δ 32 u induciranih pluripotentnim matičnim stanicama koje su nakon toga bile otporne na HIV-1. Lentiviralni vektori za ekspresiju Cas9 i sgRNK čija je meta bio CCR5 su korištene za sintezu CD4⁺ T-stanica koje su pokazale disrupciju u CCR5, ali i toksičnost u primarnim T-stanicama koje su vjerojatno rezultat odgovora stanica na stranu DNK. Uz antiretroviralnu terapiju, editiranje koreceptora pomoću CRISPR/Cas9 sustava obećavajući je pristup u liječenju bolesti uzrokovanih virusima.²⁶

Provedeno je djelomično uspješno istraživanje u kojem su hematopoetske matične stanice (izolirane iz periferne krvi zaraženog pacijenta) s CCR5 koji je imao deleciju 32 bazna para

^{VI} Stanice stečene imunosti

^{VII} Pokretni genetički elementi

unesene u pacijentima s HIV-1. Očekivani rezultati nisu dobiveni, ali nije bilo većih nuspojava.²⁵

2.4.4. Tumori

Dosadašnja istraživanja o liječenju tumora rezultirala su razvojem molekula i antitijela koje djeluju na specifične proteine u signalnim putevima. Ovakav pristup liječenja nije poznat za sve vrste tumora jer za mnoge signalni putevi još nisu dobro poznati.

U istraživanju djelovanja CRISPR/Cas9 sustava u liječenju tumora provodi se tzv. „CRISPR/Cas9 screening“. Ovaj proces se provodi uz populaciju stanica sa raznolikim genskim nokautom^{VIII}, sgRNK za koje se pretpostavlja da su učinkovite i da djeluju na svaki ciljani gen (za ovakve pretpostavke koriste se algoritmi). Sintetizirane sgRNK se kloniraju u lentiviralni plazmid, a nakon njih u plazmid ulaze virusne čestice. Takav plazmid se koristi za infekciju stanica koje ekspresiraju Cas9, a svaka ta stanica sadrži sgRNK kasetu^{IX} i specifični genski nokaut. Sekvenciranjem sgRNK mogu se odrediti stanice koje imaju specifični genski nokaut. Na ovaj način se može prikazati fenotipski efekt specifičnih genskih nokauta na cijeloj staničnoj populaciji te se mogu odrediti mete za terapiju. Glavni cilj ovakvih istraživanja je pronalaženje slabih točki genotipa koje mogu biti mete za djelovanje lijekova. Još jedna važna primjena ovog procesa je istraživanje interakcija između lijeka i stanica tumora na koje djeluje. Ovaj pristup korišten je za istraživanje antineoplastičnih lijekova^X čiji mehanizmi nisu bili dobro karakterizirani. CRISPR/Cas9 sustav se također koristi za istraživanje nekodirajućih dijelova genoma za čiju je ekspresiju kod tumora poznato da je neregulirana.

Kako bi se CRISPR/Cas9 sustav mogao primjeniti *in vivo* potrebna je metoda koja će učinkovito unijeti Cas9 i sgRNK i omogućiti visoku efikasnost editiranja i slab imunološki odgovor te učinkovit prijenos Cas9 i sgRNK do ciljnog tkiva. Za editiranje u stanicama sisavaca korišteni su plazmidi. U miševima su plazmidi unešeni pomoću elektroporacije ili hidrodinamičkih injekcija, ali je učinkovitost editiranja bila niska i aktivnost Cas9 se nije mogla kontrolirati. Adeno-povezani virusi su još jedan način za unos Cas9 i sgRNK. Ovaj

^{VIII} *Knock-out*, genetska tehnika koja gene organizma učini neoperativnim

^{IX} Pokretni genetski element koji sadrži gen i rekombinacijsko mjesto

^X Lijekovi koji se koriste za liječenje stanica tumora

pristup uspješno je korišten za editiranje gena za ornitin transkarbamilazu jetre miševa. Ekspresija Cas9 i AAV prouzročili su imunološki odgovor, ali jako oštećenje stanica nije opaženo. Još jedan način unosa su lipidne nanočestice.²⁷

Osim za terapiju, CRISPR/Cas9 sustav može se koristiti za razvoj mutantnih vrsta tumora u miševima za istraživanja rasta tumora i procesa metastaziranja. Kod mijeloidnih malignih bolesti uočena je mutacija u epigenetičkim regulatorima. Pomoću CRISPR/Cas9 sustava omogućena je ponovna ekspresija ASXL-1 proteina što je dovelo do značajnog pad rasta stanica s leukemijom kod miševa. Ciklin-ovisne kinaze (CDK) važne su za regulaciju staničnog ciklusa te njihova neregulirana aktivacija može dovesti do rasta tumora. CRISPR/Cas9 se koristi za utišavanje CDK11 gena kod osteosarkoma i CDK7 gena kod trostruko negativnog raka dojke. Otpornost na lijekove je veliki problem koji se susreće u liječenju tumora. MDR1 gen se previše eksprimira i dovodi do otpornosti na terapiju. CRISPR/Cas9 sustav korišten je u stanicama osteosarkoma kako bi vratio osjetljivost na terapiju.

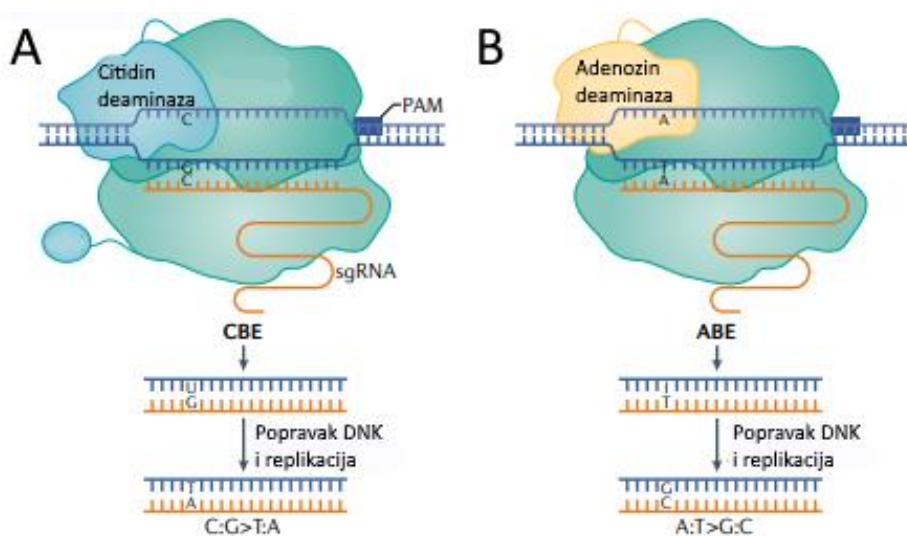
Kliničko istraživanje provedeno u Kini prvo je *ex vivo* kliničko istraživanje uz CRISPR/Cas9 sustav za pacijente s metastaziranim rakom pluća ne-malih stanica. Meta je bio PD-1 gen. Pomoću elektroporacije su u T-stanice uneseni sgRNK i Cas9 te su zatim uneseni u pacijente. Nedavno je prijavljeno opažanje editiranih T-stanica u svim pacijentima koji su ih primili.²⁵

2.4.5. Biljke

Proizvodnja biljaka sa poboljšanim karakteristikama važna je za razvoj agrikulture. Dolaskom novih metoda, uobičajena hibridizacija, tj. spolno križanje biljaka postalo je manje isplativo. Jedna od novih metoda je editiranje genoma biljaka pomoću CRISPR/Cas9. CRISPR/Cas9 sustav uspješno je korišten na vrstama poput riže, rajčice, banane, krumpira, itd. Cilj korištenja ovog sustava u biljkama je poboljšanje otpornosti na biotički i abiotički stres, poboljšanje prinosa te modifikacija metaboličkih puteva. Prednost korištenja CRISPR/Cas9 sustava je mogućnost istovremenog editiranja više gena. Pomoću raznih istraživanja istovremenog editiranja više gena zaključeno je da takvo editiranje oponaša proces domestikacije koji se događa tijekom evolucije.

Unatoč mnogim korisnim stranama CRISPR/Cas9 sustava, najveću brigu predstavljaju nenamjerne mutacije koje se događaju na neciljnim mjestima. Cas9 protein uzrokuje cijepanje oba lanca dvostruke zavojnice DNK što može dovesti do nestabilnosti genoma. Kako bi se

izbjeglo takvo cijepanje, koristi se dCas9. dCas9 proteini uz DNK deaminaze tvore editore baza koji mogu promijeniti ciljani DNK niz bez cijepanja lanaca DNK. Razvijeni su editori baza koji koriste citidin deaminazu (CBE) i zamjenjuju citidin timidinom (slika 19a) i editori baza koji koriste adenin deaminazu (ABE) i zamjenjuju adenin gvaninom (slika 19b). Oba sustava su korištena za uspješno editiranje biljnog genoma. CBE katalizira deaminaciju citidina u uracil koji onda prelazi u timidin pomoću replikacije DNK ili mehanizma za popravak oštećenja DNK. ABE katalizira deaminaciju adenozina u inozin koji se može spariti s gvaninom i na taj način dolazi do ugradnje gvanina u novi lanac. Drugi način korištenja dCas9 proteina za editiranje biljnog genoma su epigenetske^{XI} modifikacije poput metilacije DNK ili modifikacije histona koji utječu na ekspresiju gena. dCas9 protein i epigenetski modifikator uzrokuju epigenetske modifikacije koje utječu na ekspresiju gena. Ovakve modifikacije utječu na ekspresiju gena bez izmjena u nukleotidnom slijedu DNK, ali nije jasno može li se epigenetska promjena održati u sljedećoj generaciji bez transgena^{XII}.²⁸



Slika 19. Editori baza (preuzeto i prilagođeno iz ref.28)

Nakon otkrića načina na koji se CRISPR/Cas9 sustav može primjenjivati na biljkama, fokus je prešao na eliminaciju transgena iz editiranih organizama, u ovom slučaju *Cas9* gena.

^{XI} Reverzibilne modifikacije DNK koje utječu na ekspresiju gena bez promjena DNK slijeda

^{XII} Gen koji se prenosi s jednog organizma na drugi

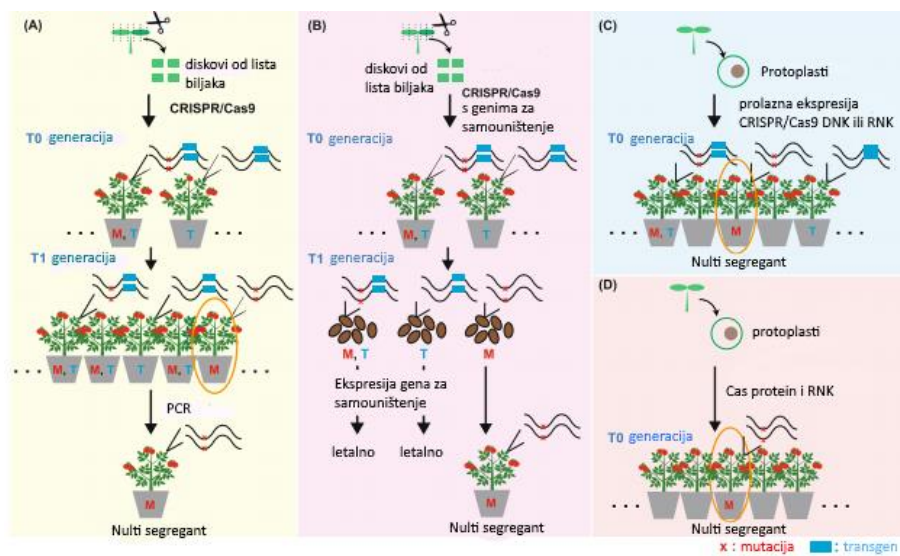
Eliminacija transgena je važna kako bi imali što preciznije editiranje, bez neželjenih promjena na neciljnim mjestima. Prvi način eliminacije temelji se na Mendelovim zakonima. Koriste se CRISPR/Cas9 kasete^{XIII}, a biljke koje koriste transgene se diferenciraju pomoću rezistencije na antibiotike. Nakon što znamo koje biljke su genetski modificirane, potrebni su njihovi potomci u kojima dolazi do odvajanja transgena prema Mendelovim zakonima. PCR^{XIV} se koristi za analizu DNK editiranih biljaka (slika 20A). Drugi način je korištenje specifičnih gena za samouništenje koji dovode do eliminacije *Cas9* gena u jednoj generaciji (slika 20B). Ovakav pristup nije prikladan za biljke koje se razmnožavaju aseksualno. Treći način je izbjegavanje insercije transgena tijekom transformacije pomoću prolazne ekspresije CRISPR/Cas9 DNK ili mRNK. Istraživanja su pokazala da se ovakav sustav može koristiti za proizvodnju i odvajanje nultih segreganta^{XV}, ali još uvijek postoji rizik integracije transgena (slika 20C). Četvrti način je editiranje genoma bez donorske DNK (slika 20D). U ovom pristupu koristi se ribonukleoprotein (RNP) koji se sastoji od Cas9 proteina i RNA vodilje. RNP se može formirati *in vitro* i umetnuti u protoplast^{XVI} biljke. Korištenjem RNP-a koji ne sadrži DNK izbjegava se integracija transgena. Ovaj sustav uspješno je korišten u protoplastima jabuke, kupusa, pšenice i kineskog kupusa.²⁹

^{XIII} Mobilni genetski element koji sadrži gen i rekombinacijsko mjesto

^{XIV} Lančana reakcija polimeraze

^{XV} Organizam koji ne sadrži DNK genetski modificiranog organizma

^{XVI} Živi dio stanice biljke



Slika 20. Načini eliminacije transgena: odvajanje transgena prema Mendelovim zakonima (A); samostalna eliminacija transgena u jednoj generaciji (B); prolazna ekspresija CRISPR/Cas9 DNK ili mRNK pomoću koje se izbjegava insercija transgena (C); editiranje genoma bez donorske DNK (D) (preuzeto i prilagođeno iz ref. 29)

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. <https://embryo.asu.edu/pages/photograph-51-rosalind-franklin-1952> (datum pristupa 3. lipnja 2021.)
2. <https://profiles.nlm.nih.gov/spotlight/wh/feature/synthesis> (datum pristupa 3. lipnja 2021.)
3. S. Schuman, *J. Biol. Chem.* **284** (2009) 17365-17369
4. P. Piguet, P. Poindron, *BioValley Monogr.* **3** (2012) 33-38
5. <https://www.sciencehistory.org/historical-profile/herbert-w-boyer-and-stanley-n-cohen> (datum pristupa 3. lipnja 2021.)
6. Y. Ishino, M. Krupovic, P. Forterre, *J. Bacteriol.* **200** (2018) 1-17
7. <https://www.nobelprize.org/uploads/2020/10/popular-chemistryprize2020.pdf> (datum pristupa 3. lipnja 2021.)
8. H. Ledford, *Nature* **522** (2015) 20-24
9. <https://www.technologynetworks.com/immunology/articles/gram-positive-vs-gram-negative-323007> (datum pristupa 3. lipnja 2021.)
10. <https://courses.lumenlearning.com/wm-biology2/chapter/archaea-vs-bacteria/> (datum pristupa 3. lipnja 2021.)
11. F. J. M. Mojica, L. Montoliu, *Trends Microbiol.* **24** (2016) 811-820
12. F. J. M. Mojica, F. Rodriguez-Valera, *FEBS J.* **283** (2016) 3162-3169
13. <https://www.nobelprize.org/uploads/2020/10/advanced-chemistryprize2020.pdf> (datum pristupa 3. lipnja 2021.)
14. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279396/> (datum pristupa 6. lipnja 2021.)
15. S. Khan, M. Shahid Mahmood, S. ur Rahman, H. Zafar, S. Habibullah, Z. Khan, A. Ahmad, *J. Biomed. Sci.* **25** (2018) 1-18
16. D. Rath, L. Amlinger, A. Rath, M. Lundgren, *Biochimie* **117** (2015) 119-128
17. H. K. Ratner, T. R. Sampson, D. S. Weiss, *Cold Spring Harb Protoc.* **12** (2016) 1-24
18. F. Jiang, J. A. Doudna, *Annu. Rev. Biophys.* **46** (2017) 505-529
19. <https://www.mpg.de/11823627/crispr-cas9-palindromes-structure> (datum pristupa 14. srpnja 2021.)

20. K. S. Makarova, Y. I. Wolf, J. Iranzo, S. A. Shmakov, O. S. Alkhnbashi, S. J. J. Brouns, E. Charpentier, D. Cheng, D. H. Haft, P. Horvath, S. Moineau, F. J. M. Mojica, D. Scott, S. A. Shah, V. Siksnys, M. P. Terna, Č. Venclovas, M. F. White, A. F. Yakunin, W. Yan, F. Zhang, R. A. Garrett, R. Backofen, J. van der Oost, R. Barrangou, E. V. Koonin, *Nat. Rev. Microbiol.* **18** (2020) 67-83
21. M. Naeem, S. Majeed, M. Z. Hoque, I. Ahmad, *Cells* **9** (2020) 1-23
22. N. D. Marino, R. Pinilla-Redondo, B. Csörgő, J. Bondy-Denomy, *Nat. Methods* **17** (2020) 471-479
23. A.S. Hanafy, S.Schoch, A. Lamprecht, *Pharmaceutics*, **12** (2020) 1-14
24. S.H. Park, G. Bao, *Transfu. Apher. Sci.* **60** (2021) 1-8
25. G. Sharma, A.R. Sharma, M. Bhattacharya, S. S. Lee, C. Chakraborty, *Mol. Ther.*, **29** (2021) 571-586
26. P.K. Dash, B.D. Kevadiya, H. Su, M.G. Banoub, H.E. Gendelman, *EBioMedicine*, **53** (2020) 1-12
27. T. Zhan, N. Rindtorff, J. Betge, M. P. Ebert, M. Boutros, *Semin. Cancer Biol.*, **55** (2019) 106-119
28. H. Zhu, C. Lin, C. Gao, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **21** (2020) 661-667
29. N. Wada, R. Ueta, Y. Osakabe, K. Osakabe, *BMC Plant Biol.* **20** (2020) 1-12