Gene drives – igranje evolucijom

Ranogajec, Sabina

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:468661

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

GENE DRIVES – IGRANJE EVOLUCIJOM

GENE DRIVES – CHEATING EVOLUTION

SEMINARSKI RAD

Sabina Ranogajec

Preddiplomski studij molekularne biologije

(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: doc. dr. sc. Nenad Malenica

Zagreb, 2018.

SADRŽAJ

1.UVOD.....1

2.*GENE DRIVE* SUSTAVI.....2

2.1 Osnovne karakteristike.....3

2.2 Primjeri i usporedba.....4

2.2.1 *Gene drive* sustavi temeljeni na ciljajućim endonukleazama.....5

3. PRIMJENA.....8

3.1 CRISPR-Cas9 tehnologija u funkciji kreiranja sintetskih *gene drive* sustava.....8

3.2 Suzbijanje malarije pomoću CRISPR-Cas9 *gene drive* sustava.....10

3.2.1 Modifikacija populacije prijenosnika malarije komarca *Anopheles stephensi*.....10

3.2.2 Supresija populacije prijenosnika malarije komarca *Anopheles gambiae*.....11

3.3 Modeliranje multigenskih bolesti i suzbijanje otočnih populacija glodavaca.....12

4. POTENCIJALNA OGRANIČENJA UPORABE.....15

4.1 Pojava rezistencije na *gene drive*.....15

4.1.1 Supresija rezistentnih alela.....15

4.2 Opasnosti.....16

4.3 Mjere opreza – kontrola i smanjenje negativnog utjecaja.....17

5. ZAKLJUČAK.....19

6. LITERATURA.....20

7. SAŽETAK.....22

8. SUMMARY.....23

1.UVOD

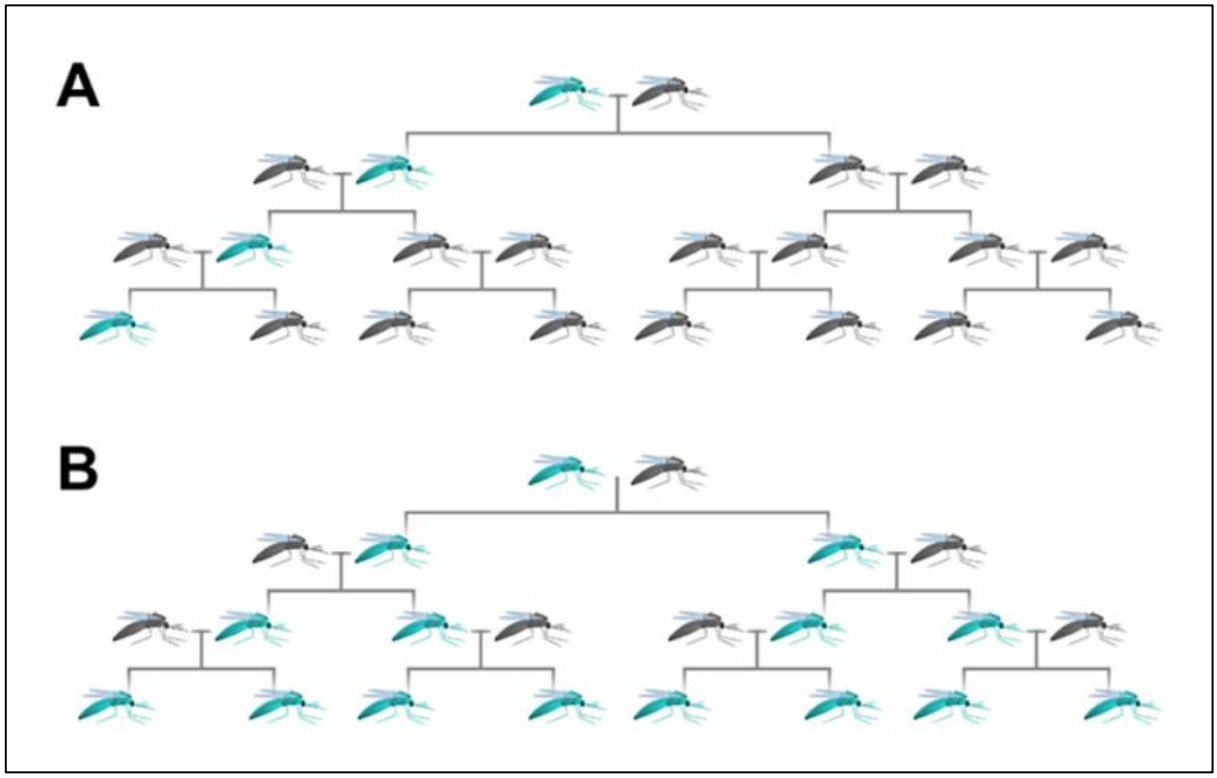
Adaptacije živih organizama koje omogućavaju preživljavanje i razmnožavanje rezultat su prirodne selekcije. Za većinu gena, selekcija alternativnih alela zasniva se na tome koliko doprinose preživljavanju i razmnožavanju nekog organizma. *Gene drives* su genetički elementi koji „prkose“ prirodnoj selekciji, koja je glavni mehanizam evolucije, i nasljeđuju se čak i ako sveukupno nemaju pozitivnih efekata za domaćina. Oni zaobilaze Mendelova pravila nasljeđivanja - umjesto 50% šanse da će potomak nasljediti određeni alel, za *gene drive* alele ta šansa raste na 60%, ili čak 99%. Prirodno se to događa na nekoliko načina, i to u organizmima poput vinskih mušica, kornjaša, miševa i nekih drugih.

Austin Burt je 2003. prvi predložio kako bi se takvi prirodni „sebični“ genetički elementi mogli iskoristiti za ciljano uređivanja genoma i manipulaciju divljih populacija. Međutim, u to vrijeme nije postojala odgovarajuća tehnologija za realizaciju te ideje. Eksperimentiranje sa sintetskim *gene drive* sustavima doživjelo je veliki uzlet od otkrića CRISPR-Cas9 tehnologije 2012. godine (Cong i sur. 2013) koja je omogućila brže, preciznije i efikasnije dizajniranje *gene drive* alela.

Teoretski, mogućnosti primjene *gene drive* sustava su praktički neograničene. Zahvaljujući njima znanost ima izvanrednu šansu da na revolucionaran način pristupi zdravstvenim i ekološkim problemima kao što su bolesti prenošene životinjskim vektorima (npr. malarija i tropska groznica), invazivne vrste glodavaca, korovi, ugrožene vrste i sl. Sama metoda naizgled se čini toliko jednostavnom da bi se ovakav način manipuliranja evolucijom mogao opisati kao igranje. Ipak, smatra se da će organizmi ipak razviti rezistenciju na *gene drive*, što će biti glavna tehnička prepreka pri njihovom praktičnom korištenju. Uz to, g*ene drive* sustavi sa sobom nose i potencijalne opasnosti za ekosustav, pri čemu nekih opasnosti znanstvenici još nisu ni svjesni. U tom kontekstu igranje s *gene drive* sustavima, ili u konačnici igranje evolucijom, dobiva sasvim drugo značenje.

2. *GENE DRIVE* SUSTAVI

Kod organizama sa spolnim razmnožavanjem i s po dvije kopije svakog kromosoma, svaki alel bilo kojeg gena ima 50% šanse da se prenese na potomstvo (jer svaka gameta prima po jedan alel). *Gene drives* su genetički elementi koji zaobilaze ovo pravilo i imaju značajno povećanu šansu, u odnosu na alele divljeg tipa, da se prenesu na potomstvo. Pojam *drive* (hrv. upravljanje) označava, dakle, vjerojatnost prijenosa gena na potomstvo veću od očekivane vjerojatnosti koja proizlazi iz Mendelovih zakona. Posljedica toga je pak da će jedinke s *gene drive* alelom proizvesti više potomaka s *gene drive* alelom nego bez njega (Slika 1) i zbog toga se *gene drive* elementi mogu proširiti populacijom čak i ako smanjuju *fitness* organizama nosioca (Champer i sur. 2016).



Slika 1. A) Organizam nosioc jedne kopije nekog promijenjenog gena (plavo-zeleno) normalno prenosi taj gen na 50% potomaka u svakoj generaciji. **B)** Ako promijenjeni alel sadrži *gene drive*, u idealnim uvjetima *drive* će osigurati da se takav alel proširi na 100% potomaka. Preuzeto sa https://wyss.harvard.edu/faqs-gene-drives/.

Mnogi prirodni „sebični“ genetički elementi identificirani su u različitim jednostaničnim mikroorganizmima i višestaničnim organizmima, npr. miševima. Takvi prirodni sustavi bili su

inspiracija sintetskim biolozima da počnu dizajnirati umjetne (sintetske) *gene drive* sustave. Primjena sintetskih *gene drive* sustava može biti usmjerena prema unapređenju ili suzbijanju populacija ciljnih vrsta. Unapređenje populacije postiže se ako *gene drive* sustav sa sobom prenosi gene koji osiguravaju bolju šansu za preživljavanje populacije, ili ako pak prenosi gene koji možda nemaju evolucijsku prednost za vrstu, ali je čine korisnijom za čovjeka. Na temelju takvih sustava mogle bi se razviti strategije za smanjenje ili eliminaciju bolesti koje prenose insekti, za uklanjanje invazivnih vrsta ili čak kao protumjera za već razvijene rezistencije na insekticide i herbicide i to na ekonomski održiv i ekološki prihvatljiv način. Geni korisni za neku populaciju bi se pomoću ovakvih sustava širili brže i temeljitije nego što to dozvoljava prirodna selekcija, npr. brzo širenje gena za rezistenciju moglo bi spasiti populaciju ugrožene vrste izloženu opasnom patogenu (Champer i sur. 2016).

2.1 Osnovne karakteristike

Iako ne postoji jedinstveni molekularni mehanizam na kojem se temelje svi *gene drive* sustavi, do usmjerenog nasljeđivanja obično dolazi na dva načina. Prva strategija je kopiranje *gene drive* alela na suprotni homologni kromosom (engl. *homing*), pri čemu većina ili cijelo potomstvo nasljeđuje *gene drive* alel. Druga strategija ili tzv. mejotski *drive* nastaje kada Y-kromosom nosi *gene drive* alel koji uzrokuje specifično cijepanje X-kromosoma za vrijeme mejoze u mužjacima, pa tako samo gamete s Y-kromosomom i *gene drive* alelom mogu oploditi jaje, dok su gamete divljeg tipa tj. ženske gamete nevijabilne i ne prenose se na potomstvo.

Gene drive sustavi mogu se okarakterizirati brojnim svojstvima, uključujući brzinu širenja, specifičnost za vrstu, cijenu *fitnessa*, podložnost rezistenciji i uklonjivost. Dva su tipa sintetskih *gene drive* sustava; „modifikacijski *drive",* dizajniran da sa sobom nosi poželjna svojstva (gene) i uzrokuje njihovo širenje unutar populacije, i „supresijski *drive*", koji ima efekt smanjenja populacije ciljne vrste (Champer i sur. 2016). *Gene drives* koji se brzo šire smatraju se invazivnima, te je dovoljno unijeti manji broj modificiranih jedinki u okoliš, dok su *gene drive* sustavi sporog širenja ograničeni na lokalne populacije i zahtijevaju otpuštanje velikog broja modificiranih jedinki u okoliš.

Poželjna svojstva *gene drive* sustava su visoka specifičnost za vrstu od interesa, niski utjecaj na sveukupni *fitness* jedinke (smanjeni *fitness* usporio bi brzinu širenja u populaciji te time i dugoročnu sposobnost supresije populacije), te mala vjerojatnost nastanka rezistentnih

alela (više o tome u 4. poglavlju). Poželjno je i da *drive* aleli budu kompletno uklonjivi iz populacije uvođenjem jedinki divljeg tipa ili konvertibilni u neutralnu konfiguraciju reverznim *gene drive* sustavom (također 4. poglavlje).

2.2 Primjeri i usporedba

U prirodi postoji nekoliko primjera nedizajniranih (dobivenih evolucijom) *gene drive* sustava. Neki su prikazani u Tablici 1. Danas možda najpopularniji *gene drive* sustav inspiriran je razredom prirodnih sebičnih genetičkih elemenata poznatih kao ciljajuće HEaze (engl. *homing endonucleases*) iz jednostaničnih eukariota poput kvasaca i algi (Burt 2003). Intracitoplazmična bakterija *Wolbachia* je prisutna u gotovo polovini svih vrsta insekata. Od ostalih *gene drive* sustava razlikuje se po tome što se ne integrira u genom domaćina već se nasljeđuje citoplazmatski (po majčinskoj liniji). Nosioci *Wolbachie* imaju veće izglede za stvaranje vijabilnog potomstva, tj. potomstvo mužjaka zaraženog *Wolbachiom* preživjet će samo ako dođe do križanja sa ženkom koja nosi *Wolbachiu* istog soja (Champer i sur. 2016).

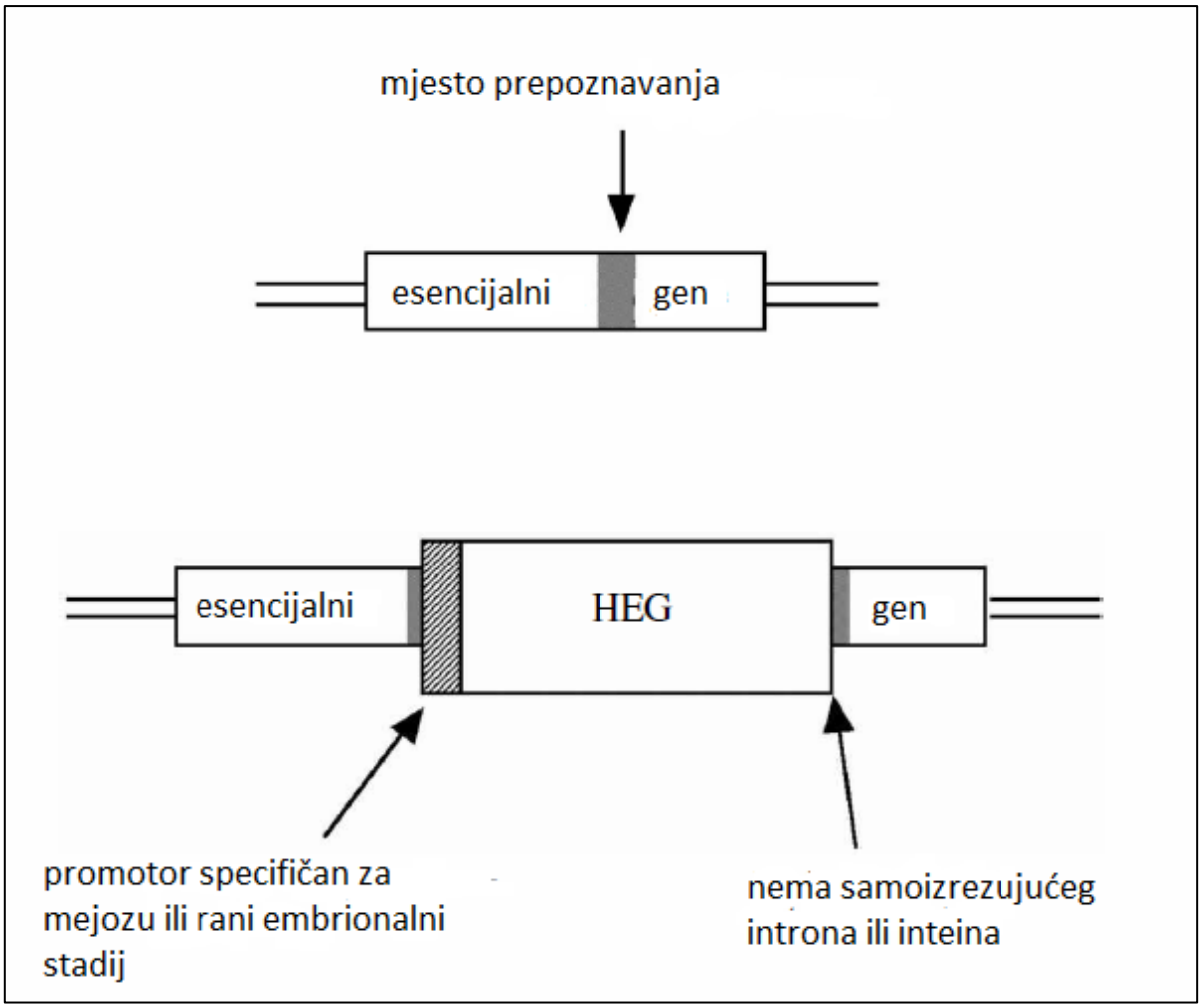
Tablica 1. Usporedba različitih vrsta *gene drive* sustava. Izrađeno po uzoru na Champer i sur, 2016.

	Temeljenima na ciljajućim endonukleazama	***X - shredder***	***Medea***	**Toksin – antitoksin**	**Kromosom razmještanje**	***Wolbachia***
Mehanizam	Supresija i modifikacija	Supresija	Modifikacija	Modifikacija	Modifikacija i kratkoročna supresija	Modifikacija, moguća i supresija s mužjacima
Brzina širenja	Brzo	Umjereno	Umjereno	Sporo	Sporo	Umjereno
Lokalna ograničenost	Ne	Ne	Ne, ako je cijena *fitnessa* niska	Da	Da	Ne, ako je cijena *fitnessa* niska
Stopa nastanka rezistentnih alela	Visoka	Niska	Niska	Umjerena	Jako niska	Nepoznato
Reverzibilnost	Da	Da	Da	Da	Da	Ne
Uklonjivost divljim tipom	Ne	Ne	Ne, ako je cijena *fitnessa* niska	Da	Da	Ne, ako je cijena *fitnessa* niska
Dosadašnja primjena	*Drosophila, Saccharomyces, Anopheles stephensi, Anopheles gambiae*	Djelomično u *Anopheles gambiae*	*Drosophila*	*Drosophila*	Prirodni primjeri	Terenska ispitivanja

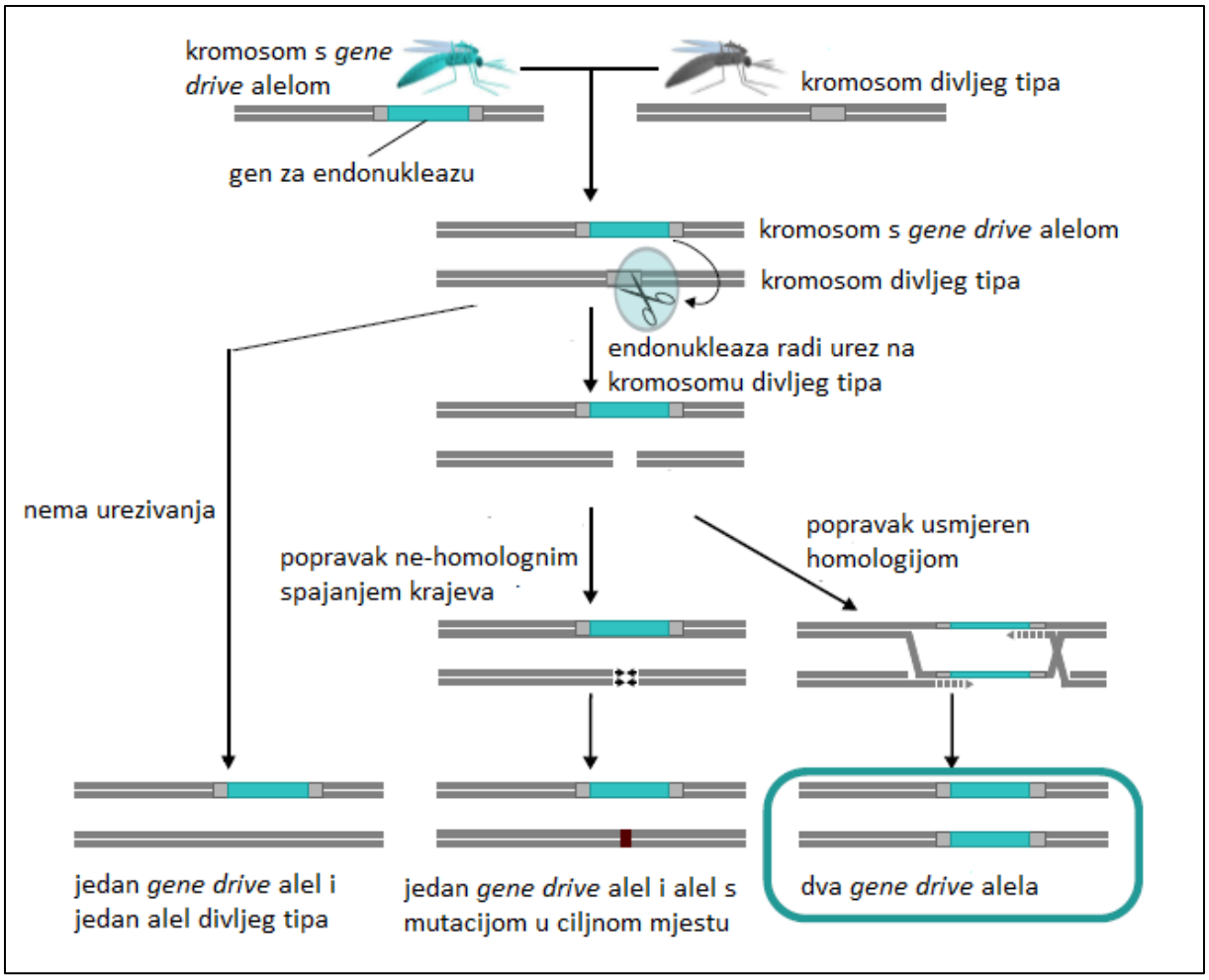
2.2.1. Gene drive sustavi temeljeni na ciljajućim endonukleazama

Ciljajuće endonukleaze su enzimi kodirani tzv. genom HEG (engl. *homing endonuclease gene*), koji se smatra sebičnim genetičkim elementom. Ovi enzimi prepoznaju i cijepaju sekvence od 20-30 pb na susjednom kromosomu koji ne sadrži kopiju HEG. HEG se ubacuje u središte iste sekvence koju prepoznaje pa su tako oni kromosomi koji nose HEG ujedno i zaštićeni od toga da kasnije budu pocijepani. Ciljajuće endonukleaze imaju svoje prirodne sekvence prepoznavanja čija je vjerojatnost nasumična pojavljivanja u genomu mala (Jasin 1996), no mogu se i modificirati da prepoznaju neke druge sekvence od interesa, npr. sekvence unutar esencijalnih gena (Burt 2003) kao na Slici 2.

Izrezani HEG^- kromosom će najčešće biti popravljen pomoću staničnog mehanizma za popravak usmjeren homologijom (engl. *homology directed repair* - HDR) koji kao kalup koristi HEG^+ homologni kromosom. Nakon popravka oba kromosoma će sadržavati kopiju HEG gena, tj. heterozigot će postati homozigot (Burt 2003). Još su dva moguća ishoda: da endonukleaza uopće ne uspije pocijepati metu ili da se lom popravi ne-homolognim spajanjem DNA krajeva (NHEJ) koji kompetira s HDR (Slika 3). U tim slučajevima neće doći do kopiranja *gene drive* alela (Esvelt i sur. 2014). Oba mehanizma popravka aktivna su u većini stanica, a kojim će se mehanizmom popraviti dvostruki lom ovisi o tome da li postoji DNA kalup homologan sekvenci unutar koje se dogodio lom - ukoliko postoji, aktivirat će se HDR. Kalup može biti prirodno prisutan u obliku sestrinskih kromatida u kasnoj S fazi i G2 fazi staničnog ciklusa (Heyer i sur. 2010) ili se može umjetno dodati u obliku donorske DNA (Lin i sur. 2014).



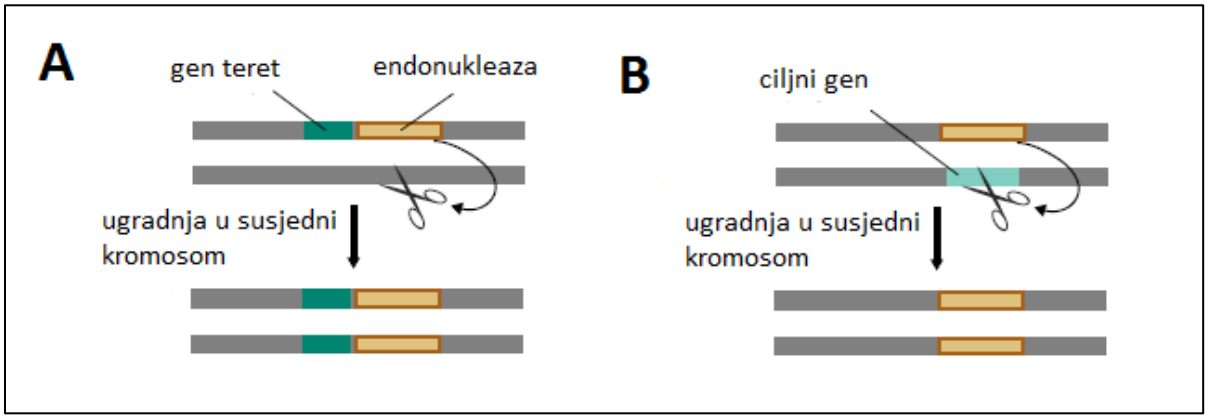
Slika 2. HEG (engl. *homing endonuclease gene*) se može modificirati da prepoznaje sekvencu u esencijalnom genu koji ima recesivni *knock-out* fenotip. HEG se ugrađuje u središte sekvence koju je prethodno pocijepao. Preuzeto i prilagođeno iz Burt 2003.



Slika 3. Različiti ishodi koji mogu uslijediti nakon aktivnosti ciljajuće endonukleaze: lijevo - kada endonukleaza ne uspije napraviti urez, sredina – kada se urez (lom) popravi ne-homolognim spajanjem DNA krajeva i desno – kada se urez popravi popravkom usmjerenim homologijom. Preuzeto i prilagođeno prema Esvelt i sur. 2014.

3. PRIMJENA

Unatoč širokoj primjeni i važnosti *gene drive* sustava, u prošlim desetljećima dogodio se vrlo skroman napredak u njihovom razvoju. *Gene drive* sustavi koji mogu funkcionirati u divljim populacijama kreirani su samo u malom broju organizama: kvascu, vinskoj mušici (*Drosophila melanogaster)* i u dvije vrste komaraca *Anopheles stephensi* i *Anopheles gambiae*. Razlog tome jest težina genetičkog dizajna čak i modelnih organizama. Burt (2003) je predložio korištenje sintetskih *gene drive* sustava za prijenos odabranih transgena ili za ometanje postojećih gena (Slika 4).



Slika 4. A) *Gene drive* aleli mogu, osim gena za endonukleazu, sa sobom nositi druge gene od interesa – npr. transgen (zeleno) koji blokira prenošenje malarije. B) *Gene drive* može zamijeniti ili inaktivirati ciljne gene (svijetlo plavo) –npr. zamijeniti gen komarca važan za prijenos malarije. Preuzeto i prilagođeno prema Esvelt i sur. 2014.

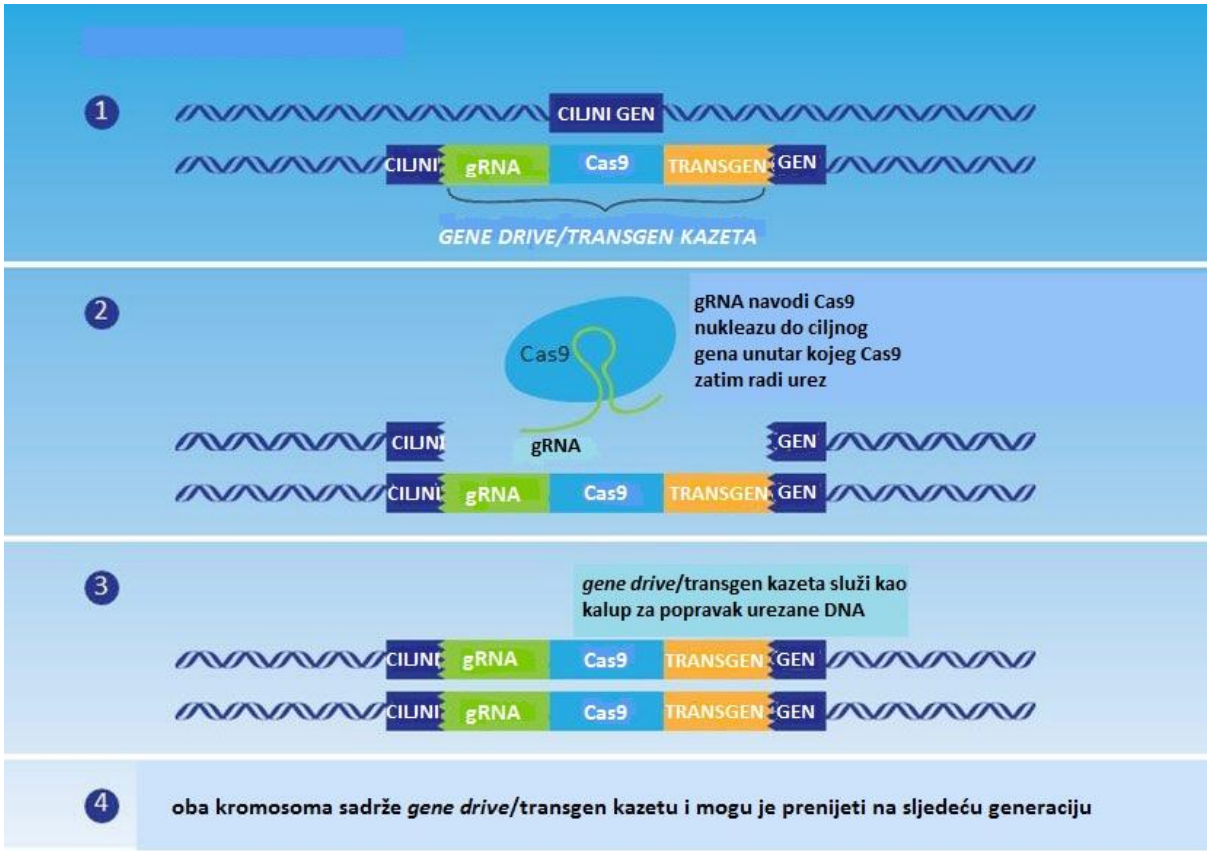
3.1 CRISPR-Cas9 tehnologija u funkciji dizajniranja sintetskih gene drive sustava

Alat koji najviše obećava je sustav RNA-vođene CRISPR-Cas9 endonukleaze (engl. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats – CRISPR associated 9*) koji se može koristiti u kombinaciji s malim RNA molekulama vodiljama, tzv. gRNA (engl. *guide RNA*), u svrhu cijepanja specifičnih sekvenci (Champer i sur. 2016).

Gantz i Bier (2015) prvi su koristili RNA-vođenu endonukleazu da bi kreirali *gene drive* sustav temeljen na ciljajućoj endonukleazi (kodiranoj s genom HEG – engl. *homing endonuclease gene)* te su u vinskoj mušici razvili strategiju za pretvorbu heterozigotne recesivne mutacije u stanje homozigota koje se manifestira kao mutantni fenotip.

Autokatalitičke insercijske mutante dobili su pomoću konstrukta koji je sadržavao tri komponente: 1) gen za Cas9 eksprimiran u somatskim i embrionalnim stanicama, 2) gRNA (RNA za navođenje) koja usmjerava Cas9 na genomsku sekvencu od interesa, i 3) mjesta homologije sa svake strane Cas9/gRNA kazete koja se podudaraju s dvije genomske sekvence neposredno uz svaku stranu ciljnog mjesta cijepanja. U takvom tripartitnom konstruktu Cas9 prvo cijepa sekvencu u genomu homolognu s gRNA te pomoću popravka usmjerenog homologijom (engl. *homology – directed repair*, HDR) unosi Cas9/gRNA kazetu na mjesto dvolančanog loma (Slika 5). Ugrađeni (insertirani) alel ponovno stvara Cas9 i gRNA koji sad cijepaju isti alel na homolognom kromosomu, nakon čega opet slijedi popravak usmjeren homologijom (HDR) i ugrađivanje Cas9/gRNA kasete u homologni kromosom.

Ova metoda nazvana je MCR (engl. *mutagenic chain reaction*) i u vinskoj mušici funkcionira kao *gene drive* sustav s efikasnošću ugrađivanja *gene drive* kazete (konstrukta) na homologni kromosom od čak 96%. Od tada, *gene drive* sustavi temeljeni na endonukleazi Cas9 i gRNA razvijeni su u kvascu, komarcima i, odnedavno, u sisavcima.



Slika 5. CRISPR-Cas9 *gene drive.* Preuzeto iz https://www.science.org.au/support/analysis/reports/synthetic-gene-drives-australia-implications-emerging-technologies/gene

3.2 Suzbijanje malarije pomoću CRISPR-Cas9 gene drive sustava

Malariju uzrokuje parazit *Plasmodium* spp., a s čovjeka na čovjeka prenosi se isključivo preko ugriza ženki komaraca malog broja vrsta roda *Anopheles.* Nakon što su im proteklih godina sekvencirani genomi, znanstvenici su počeli identificirati gene odgovorne za sposobnosti ovih insekata da koloniziraju ljudska staništa, njihovu reproduktivnu biologiju i osjetljivost na infekciju parazitom. Na temelju poznavanja gena komaraca odgovornih za ključne faktore pri prijenosu uzročnika malarije, teoretski bi se u insekte mogle uvesti genetičke modifikacije koje bi smanjile efikasnost tog prijenosa. Ideja je među znanstvenicima prisutna zadnjih 20 godina, sve otkad su pronađeni načini za unos gena u komarce.

Najveći izazov bilo je pitanje kako proširiti takve genetske modifikacije s nekoliko laboratorijski uzgojenih komaraca na cijelu divlju populaciju u relativno kratkom vremenskom periodu. S obzirom da u većini slučajeva genetička modifikacija koja kodira za svojstvo od interesa ne bi imala pozitivan efekt na ukupni *fitness* jedinke, nije vjerojatno da bi se tijekom vremena ista modifikacija uspjela proširiti populacijom (Nolan 2017). Rješenje ovog problema moglo bi biti upravo u kreiranju i uvođenju *gene drive* sustava u komarce.

3.2.1 Modifikacija populacije prijenosnika malarije komarca Anopheles stephensi

Da bi omogućili brzo širenje svojstva za otpornost na malariju u populaciji komaraca *A.stephensi* Gantz i sur. (2015) su uz *gene drive* alel vezali dva efektorska gena m1C3 i m2A10 koji kodiraju za protutijela usmjerena protiv proteina plazmodija (*Chitinase 1* i CSP), i u konačnici sprječavaju nastanak infektivnog stadija (sporozoita) u slinskim žlijezdama ženki komarca. Konstruirali su plazmid pAsMCRkh2 koji je sadržavao elemente potrebne za *drive* (gen za Cas9 nukleazu, gen za gRNA, dijelove homologne dijelovima genoma sa svake strane ciljnog mjesta cijepanja kh2) i antipatogenske efektorske gene (m2A10-m1C3). Kao selektivni marker za širenje *gene drive* konstrukta populacijom odabrali su boju očiju komarca (svojstvo koje ne utječe na sposobnost prijenosa malarije). Za ciljno mjesto ugradnje konstrukta odredili su gen koji kodira za enzim kinurenin hidroksilazu. Inaktivacija toga gena u nosiocima *gene drive* konstrukta dovodi do vidljive promjene boje očiju iz crne (divlji tip) u bijelu. Istraživanje je potvrdilo funkcionalnost konstrukta u komarcu *Anopheles stephensi* i

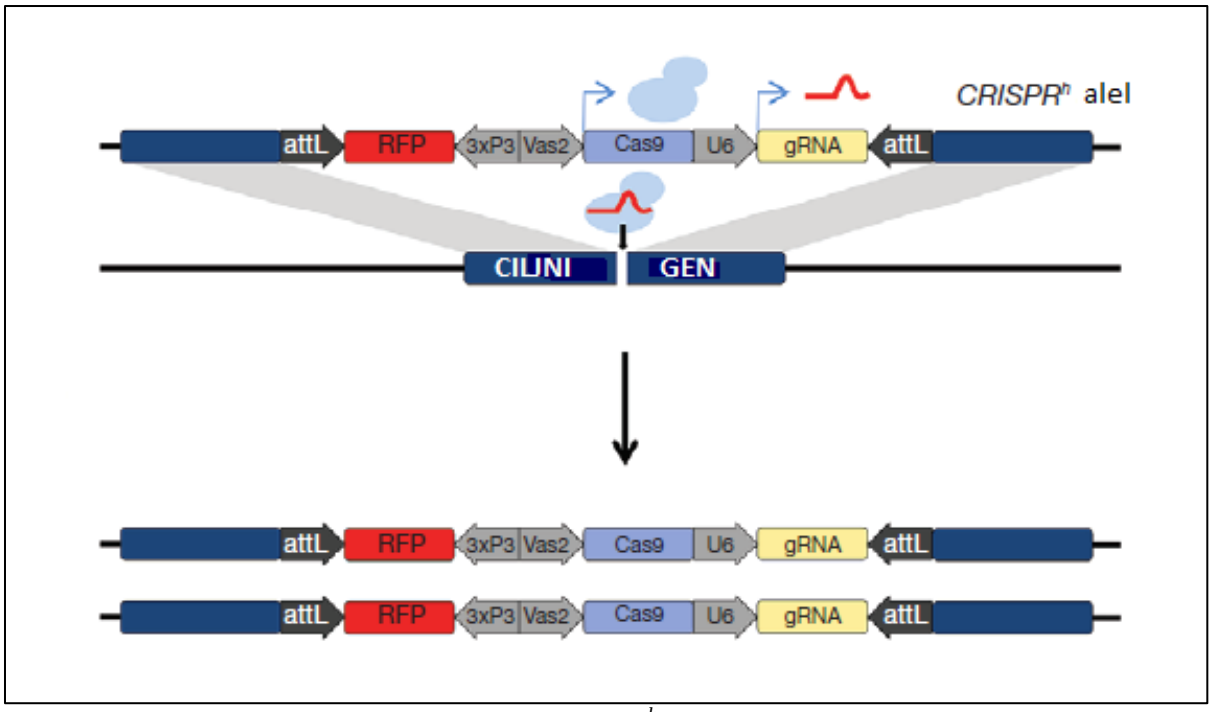
preferencijalno nasljeđivanje u prvoj generaciji, no ne i stvaran utjecaj konstrukta na parazita. Osim toga, metoda tek treba biti testirana u kaveznim populacijama komaraca (Nolan 2017).

Divlje bi populacije komaraca primjenom ovakve metode ostale intaktnima i nastavile ispunjavati svoju ekološku nišu. Komarci bi i dalje ujedali ljude, ali bi im sposobnost prijenosa malarije bila smanjena (Alphey 2016).

3.2.2 Supresija populacije prijenosnika malarije komarca Anopheles gambiae

Hammond i sur. (2016) razvili su CRISPR-Cas9 *gene drive* sustav usmjeren na sposobnost razmnožavanja ženki vrste *Anopheles gambiae*, glavnog prijenosnika malarije. Identificirali su tri gena (prisutna i u mužjacima i u ženkama) potrebna za plodnost ženki (AGAP005958, AGAP011377 i AGAP007280) i pokazali da se cijepanjem (inaktivacijom) oba alela bilo kojeg od ovih gena CRISPR-Cas9 nukleazom postiže neplodnost u ženkama. Zatim su unutar pocijepanih gena dodali *gene drive* konstrukt (nazvan $CRISPR^h$ alel) radi postizanja usmjerenog nasljeđivanja inaktivnog oblika gena. Konstrukt (Slika 6) između ostalih komponenata sadrži gen za Cas9 nukleazu pod kontrolom *vasa2* promotora, aktivnog u spolnim stanicama mužjaka i ženki, koji aktivnost nukleaze ograničava na spolne stanice, tj. ranu gametogenezu. Tako će ženke homozigoti za inaktivni gen AGAP005958, AGAP011377 ili AGAP007280 biti neplodne, dok će mužjaci i ženke heterozigoti biti plodni, ali će inaktivni gen prenositi na sve svoje gamete, i posljedično, na sve svoje potomke. Kako *gene drive* alel postaje sve prisutniji u populaciji, sve je veća šansa da će žensko potomstvo od oba roditelja nasljediti kopiju *gene drive* alela i biti sterilno (Nolan 2017).

Od tri gena, gen AGAP007280 pokazao se kao najpogodnija meta za inaktivaciju *gene drive* konstruktom, a tijekom četiri generacije male laboratorijske populacije komaraca zabilježeno je progresivno povećanje frekvencije jedinki s *gene drive* alelom od 50% do 75.1% (Hammond i sur. 2016). U teoriji, sustav bi mogao smanjiti broj *Anopheles gambiae* komaraca na nulu, odnosno dovesti do kompletnog izumiranja vrste.



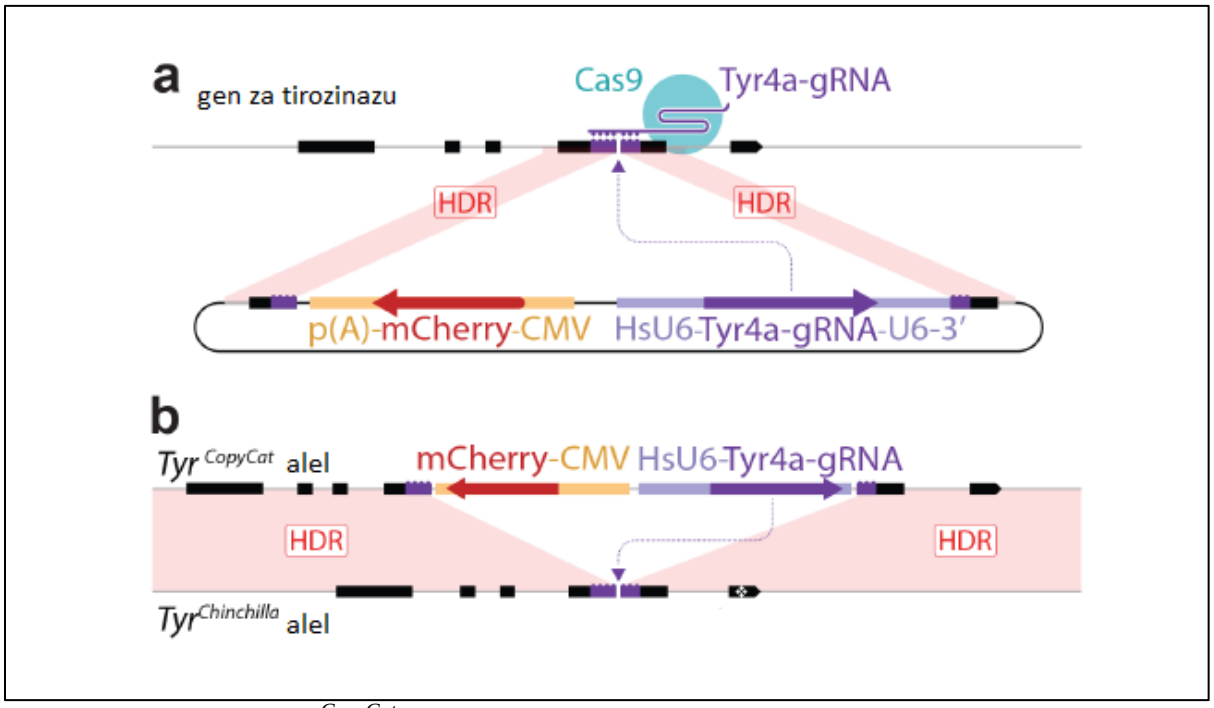
Slika 6. Ugradnja *gene drive* konstrukta (*CRISPR*^{h} alela) u ciljni gen važan za plodnost ženki *A. gambiae*. Konstrukt se sastoji od *3xP3::RFP* markera, *Cas9* pod transkripcijskom kontrolom *vasa2* promotora i gRNA pod kontrolom *U6* PolIII. *Cas9* uz gRNA (guide RNA) urezuje intaktni alel divljeg tipa. Lom (urez) popravlja se popravkom usmjerenim homologijom (HDR) i dolazi do kopiranja *CRISPR*^{h} alela na mjesto ureza. Preuzeto iz Hammond i sur. (2016).

3.3 Modeliranje multigenskih bolesti i suzbijanje otočnih populacija glodavaca

U nedavno objavljenom i još nerecenziranom članku (*preprint),* Grunwald i sur. (2018) opisuju prvi pokušaj implementacije CRISPR-Cas9 *gene drive* sustava na sisavcima, točnije miševima. Kada bi se ovaj moćan sustav pokazao uspješnim u laboratorijskim glodavcima, mogao bi omogućiti brzo sklapanje željenih genotipova s više inaktiviranih gena, što bi služilo za modeliranje multigenskih ljudskih bolesti. Izrada kompleksnih genetičkih modela zasad je ograničena vremenom, cijenom i potrebom za velikim brojem životinja radi dobivanja samo nekoliko jedinki željenog genotipa. Osim toga, sustav bi mogao poslužiti i za borbu protiv invazivnih populacija glodavaca otočnih država.

Grunwald i sur. (2018) testirali su *gene drive* sustav u ranim mišjim embrijima te u muškim i ženskim spolnim stanicama. Dizajnirali su tzv. *CopyCat* element koji kodira za

gRNA, a za Cas9 protein ne. Cas9 nukleaza je kodirana *in-trans*, tj. sa vanjskog izvora ili drugog mjesta u genomu. Za ciljno mjesto ugrađivanja odabrali su gen za tirozinazu (*Tyr*) jer homozigoti za gubitak funkcije tog gena imaju prepoznatljiv albino fenotip (bijelo krzno) – insercijom „CopyCat" elementa u mjesto cijepanja određeno s gRNA dobili su $Tyr^{CopyCat}$ *knock-in* alel (Slika 7, a). U odsutsvu Cas9 $Tyr^{CopyCat}$ je funkcionalno nul alel koji se prenosi po Mendelovim pravilima nasljeđivanja, a u kombinaciji s Cas9 nasljeđivanje bi trebalo biti usmjereno u korist $Tyr^{CopyCat}$ (više bijelih miševa). Križanjem miševa koji nose $Tyr^{CopyCat}$ s miševima koji proizvode Cas9 mogli su testirati da li će doći do supra-Mendelovog nasljeđivanja $Tyr^{CopyCat}$ alela. Kromosom iz Cas9 miševa u koji se *drive* treba ugraditi obilježili su *Chinchilla* alelom koji rezultira sivom bojom krzna miševa (Slika 7, b).

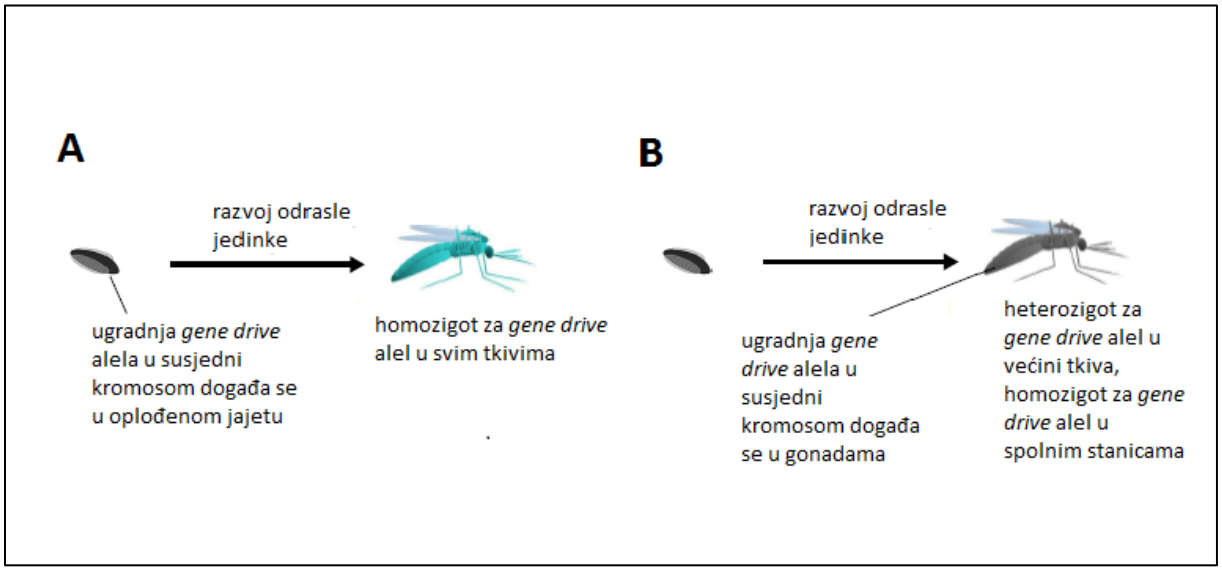


Slika 7. a) Nastanak $Tyr^{CopyCat}$ *knock-in* alela. Ugradnja *CopyCat* elementa (konstrukta) u gen za tirozinazu (*Tyr*). **b)** Ugradnja *CopyCat* elementa u gen za tirozinazu (*Tyr)* u miševima koji imaju ekspresiju Cas9. Preuzeto iz Grunwald i sur. (2018).

Njihovo istraživanje je pokazalo da tehnologija uspješno radi samo kada je ekspresija Cas9 ograničena na ženske spolne stanice. U ranim embrijima i muškim spolnim stanicama nije bilo kopiranja $Tyr^{CopyCat}$ alela s kromosoma donora na susjedni kromosom, iako je Cas9 bio aktivan i je prouzročio dvolančane DNA lomove. Autori smatraju da je razlog ove nedosljednosti rezultata u načinu na koji se popravljaju nastali dvolančani lomovi – što pak ovisi o staničnoj diobi i razvojnom stadiju. Ako homologni kromosomi nisu pravilno

poravnati (kao u mejozi), lom se ne može sanirati popravkom usmjerenim homologijom (HDR), dok u somatskim stanicama aktivna mašinerija za popravak DNA preferira ne-homologno spajanje DNA krajeva (NHEJ) pa tako ne dolazi do kopiranja *gene drive* alela u homologni kromosom. Time su pokazali da je za primjenu *gene drive* sustava u sisavcima ključno vremensko tempiranje Cas9 aktivnosti (Slika 8). Da bi metoda bila efikasna u sisavcima CRISPR-Cas9 aktivnost treba se ograničiti na vrijeme nastanka spolnih stanica tj. mejozu.

Procijenili su da bi sustav mogao povećati vjerojatnost nasljeđivanja pojedinačnog alela s 50% na 73%, a najviša stopa konverzije genotipa koju su zabilježili (79%) rezultirala bi 90-postotnom frekvencijom prijenosa željenog alela. Ipak, zasad je ovo istraživanje samo indikacija da bi tehnologija stvarno mogla funkcionirati u sisavcima. Potrebno je napraviti detaljnija istraživanja da bi se *gene drive* sustavi mogli smatrati kao koristan alat za kontrolu populacija glodavaca (Callaway 2018).



Slika 8. Različiti ishodi s obzirom na tempiranje aktivnosti nukleaze Cas9. **A)** Nukleaza Cas9 je aktivna nakon oplodnje u jajetu. **B)** Nukleaza Cas9 je aktivna u gonadama odrasle jedinke. Preuzeto i prilagođeno iz Esvelt i sur. 2014.

4. POTENCIJALNA OGRANIČENJA UPORABE

4.1 Pojava rezistencije na gene drive

Nedavna istraživanja pokazala su da je upravo evolucija ključna prepreka pri primjeni *gene drive* sustava na divljim populacijama (Callaway 2017). Već su Hammond i sur. (2016) u rezultatima svojih eksperimenata uz očekivano povećanje frekvencije *gene drive* mutacije kroz nekoliko generacija zabilježili i pojavu rezistencije na *gene drive* alel u nekim jedinkama. Champer i sur. (2017) istraživali su u kojoj fazi životnog ciklusa vinske mušice nastaju rezistentni aleli. Otkrili su da do nastanka rezistencije dolazi u spolnim stanicama prije oplodnje te nakon oplodnje u embriju zbog zaostale Cas9 nukleaze iz jajne stanice (majčinskog efekta). Aleli divljeg tipa mogu konvertirati u rezistentne alele na više načina: kada dođe do nepotpunog popravka usmjerenog homologijom (HDR) ili popravkom dvostrukog loma ne-homolognim spajanjem DNA krajeva (NHEJ) u spolnim stanicama majke npr. kada do ekspresije i aktivnosti Cas9 dođe ili prije nego postoje okviri za HDR ili kao alternativa popravku usmjerenog homologijom. Rezistentni aleli mogu nastati i zbog trajne ekspresije Cas9 tijekom mejoze ili u gameti kada kalup za HDR nije dostupan (Champer i sur. 2017). Prema Unckless i sur. (2016) rezistencija evoluira zbog pojave varijanti ciljnih mjesta koje gRNA više ne može prepoznati – pri čemu varijante mogu postojati od prije ili nastaju zbog *de novo* mutacija, ili ih pak kreira sam *gene drive* sustav kada se popravkom dvostrukog loma ne-homolognim spajanjem DNA krajeva (NHEJ) unesu mutacije na ciljno mjesto. S druge strane, rezistencija bi se mogla iskoristiti i kao jedan od mehanizama za kontrolu *gene drive* sustava (Unckless i sur. 2016).

Još jedan put do rezistencije na *gene drive* je i prirodna genetska varijabilnost divljih populacija koja bitno smanjuje prostor za ciljna mjesta novih *gene drive* sustava (Miles i sur. 2016). *Gene drive* sustavi koji počivaju na tehnologiji CRISPR/Cas9 rade tako da prepoznaju kratke sekvence genoma, a jedinke koje imaju polimorfizam u takvim sekvencama bile bi imune na ugradnju *gene drive* alela (Callaway 2017).

4.1.1 Supresija rezistentnih alela

Pojavu rezistencije na *gene drive* alele moguće je smanjiti boljom kontrolom ekspresije nukleaze Cas9. Ekspresija Cas9 nukleaze trebala bi biti pod kontrolom promotora s visokom stopom ekspresije, aktivnost kojeg bi bila ograničena na spolne stanice tako da neželjena

ekspresija Cas9 bude što manja nakon oplodnje i da se što manje zadržava u embrionalnim stanicama. Nastanak rezistentnih alela u embriju mogao bi se smanjiti korištenjem autosomalnog *gene drive* alela ograničenog na mužjake, ali tada bi rezistentni aleli koji nastaju u spolnim stanicama prije oplodnje i dalje bili problem (Champer i sur. 2017). Poslužiti bi mogla i metoda RNA interferencije, pri čemu bi gen za shRNA (engl. *short hairpin RNA*; dvolančana RNA) bio dio *drive* alela dizajniranog da potisne ne-homologno spajanje DNA krajeva (NHEJ) u spolnim stanicama i ranom embriju (Chu i sur. 2015).

Od ostalih metoda za izbjegavanje rezistencije predlaže se i korištenje *gene drive* sustava koji preko višestrukih gRNA ciljaju više gena istovremeno ili nekoliko mjesta unutar istoga gena, smanjujući tako brzinu kojom se razvija rezistencija. Nadziranjem prirodne genetske raznolikosti vrsta, *gene drive* sustavi bi se mogli usmjeriti prema genima koji su zajednički svim jedinkama (Callaway 2017.).

4.2 Opasnosti

Geni koji se prenose zajedno s *gene drive* alelom mogu imati nepredviđene učinke, dok neki sustavi imaju čak i potencijal da dovedu do izumiranja vrste i uzrokuju ekološke probleme. Iako malo vjerojatno, sustavi bi se mogli i zlouporabiti na štetu poljoprivrede i stočarstva. Zbog dugog generacijskog vremena, *gene drive* sustavi ne bi imali efekta na ljudske populacije, ali bi neki pojedinci mogli iskusiti alergijske reakcije na peptide u proteinu Cas9 kada bi došli u doticaj s osobom nositeljem (Oye i sur. 2014). *Gene drive* sustavi mogli bi promašiti ciljani DNA slijed i imati neželjene efekte, proširiti se izvan očekivanog geografskog područja ili prijeći na druge vrste (Esvelt i sur. 2014).

Pretpostavku da CRISPR-Cas9 *gene drive* sustavi ne bi mogli napasti divlje populacije zbog rezistentnih alela koji onemogućavaju izrezivanje eksplicitno su testirali Noble i sur. (2017) pomoću matematičkih modela baziranih na postojećim empirijskim podacima. Kvantificirali su vjerojatnost i veličinu širenja *gene drive* sustava nakon hipotetskog neautoriziranog propuštanja malog broja modificiranih laboratorijskih jedinki u divljinu – što bi se vrlo lako moglo dogoditi u stvarnosti. Njihov model je pokazao da je *gene drive* sustav dalekosežan i da bi se preko vrsta koje se spolno razmnožavaju i imaju relativno kratko generacijsko vrijeme mogao globalno rasprostraniti, čak i nakon malog propuštanja, a ovisno o efikasnosti ciljajuće nukleaze domaćina.

4.3 Mjere opreza – kontrola i smanjenje negativnog utjecaja

Kako bi se smanjio rizik od neželjenih scenarija, ispitivanja sustava prvo se izvode u velikim kavezima – u Italiji su kao dio projekta „Target Malaria“ izgrađeni sofisticirani kavezi za komarce na 150 kubičnih metara koji stimuliraju topla i vlažna staništa afričkog komarca *A.gambiae* (Callaway 2017), nakon čega bi trebala uslijediti početna terenska ispitivanja na izoliranim populacijama npr. na otocima (Champer i sur. 2016).

Jedinstvena sposobnost *gene drive* sustava temeljem s gRNA omogućila bi kontrolu drugih takvih sustava ili transgena. Esvelt i sur. (2014) predlažu tri tipa kontrolnih *gene drive* sustava: reverzni *gene drive, gene drive* za imunizaciju i precizni *gene drive* sustav. Reverzni *gene drive* sustav mogao bi revertirati promjene u genomu koje su se već proširile populacijom, na način da se reverzni *drive* prepiše preko jedne ili više promjena u genomu koje je prouzročio neželjeni primarni *gene drive. Gene drive* za imunizaciju blokirao bi druge *gene drive* sustave rekodiranjem ciljne sekvence neželjenog *gene drive* sustava, a koristili bi se preventivno ili naknadno te se širili jednakom brzinom kao i neželjeni *gene drive.* Precizni *gene drive* sustav bio bi ograničen na jednu genetički različitu vrstu ili subpopulaciju, a gRNA bila bi usmjerena na jedinstvene gene ili polimorfne sekvence. Sve dok je ta sekvenca dovoljno različita, precizni *gene drive* ne bi se mogao proširiti na neželjene populacije. Povećanje specifičnosti *gene drive* sustava za korištenje u otočnim (geografski izoliranim) populacijama moglo bi se postići npr. uvođenjem primarnog *gene drive* alela koji bi rekodirao ciljni gen bez drugih efekata. Primarni *gene drive* alel služio bi kao visoko-specifična ciljna sekvenca za sekundarni precizni *gene drive* alel koji bi imao krajnji željeni učinak. Pretpostavkom da se primarni *gene drive* alel ne proširi s otoka prije nego bude zamijenjen sekundarnim, visoko-specifična sekvenca primarnog *gene drive* alela u otočnoj populaciji omogućila bi daljnje precizno ciljanje s drugim *gene drive* sustavima i manju šansu za njihov prijenos na druge populacije (Esvelt i sur. 2014).

Novije istraživanje (Suzuki i sur. 2018) predlaže da se *gene drive* sustavi naprave na način da ih se može paliti i gasiti - modifikacijom *gene drive* procesa da na potomstvo garantirano prenosi promijenjeni gen samo ako organizam prehranom unese npr. određenu aminokiselinu. *Gene drive* bi radio samo u prisutstvu aminokiseline, a bez nje bi bio ugašen. Potomci koji bi ga sadržavali bili bi podležni samo uobičajenim zakonima nasljeđivanja. Radi se zapravo o kontroli uređivanja genoma preko ekspanzije genetskog koda. Naime, radi precizne kontrole u divljini koristila bi se aminokiselina koja ne postoji u prirodi, jeftini derivat lizina

Lys(Boc)(BOC). Lys(Boc) se lako razgrađuje i nije štetan za okoliš, no još se ne zna kolika bi bila potrebna količina te da li bi bio stabilan izvan laboratorija.

5. ZAKLJUČAK

Sintetski *gene drive* sustavi relativno su nova tehnologija s velikim potencijalom genetskog modificiranja cijelih populacija. S pravom je u nekim izvorima nazivaju kontroverznom – i stavljaju naglasak na bioetička pitanja vezana za primjenu ove tehnologije. Suprotno tome, drugi pak istraživači, koji se i sami bave istraživanjem sintetskih *gene drive* sustava, smatraju da će najveći problem vezan za *gene drive* sustave biti to što oni naprosto neće funkcionirati (Callaway 2017).

Uspješna implementacija CRISPR-Cas9 *gene drive* sustava na laboratorijske populacije komaraca *Anopheles stephensi* i *Anopheles gambiae* je obećavajuća, no dosadašnja istraživanja u svojim eksperimentalnim metodama nisu uspjela obuhvatiti i testirati sve varijable koje bi mogle imati utjecaj pri primjeni ovih sustava na divlje populacije. Tek će eksperimenti na genetski raznovrsnijim populacijama komaraca u kavezima koji simuliraju vanjske uvjete pokazati da li je tehnologija zaista primjenjiva za eliminaciju ili modifikaciju populacija komaraca u svrhu suzbijanja malarije. Primjena *gene drive* sustava na glodavcima tek je u začetku i također će biti potrebno još istraživanja prije no što se takav sustav bude smatrao korisnim alatom u kontroli populacija glodavaca.

Razumijevanje evolucije rezistencije na *gene drive* alele mogao bi biti ključan aspekt budućih istraživanja, jer uspješnost *gene drive* sustava ovisit će upravo o brzini evolucije rezistencije, odnosno o čovjekovoj sposobnosti da nađe način kako da je smanji. Ukratko, može se reći da je danas cijeli koncept sintetskih *gene drive* sustava još uvijek na hipotetskoj razini, ali s obzirom na potencijalnu ekološku i evolucijsku dobit koju bi funkcionalni sustavi omogućili, ne samo za čovjeka već i za druge vrste, uz još puno truda znanstvene zajednice ovi će sustavi biti biologija budućnosti.

6. LITERATURA

Alphey L, 2016. Can CRISPR-Cas9 gene drives curb malaria. Nature Biotechnology, 34, 2, 149-150.

Alphey L, 2014. Genetic control of mosquitoes. The Annual Review of Entomology, 59, 205-224.

Burt, A, 2003. Site-specific selfish genes as tools for the control and genetic engineering of natural populations. The Royal Society, 270, 921-928.

Callaway, E, 2018. Controversial CRISPR 'gene drives' tested in mammals for the first time. Nature, 559, 164.

Callaway, E, 2017. Gene drives meet the resistance. Nature, 542, 15.

Champer, J i sur. 2017. Novel CRISPR/Cas9 gene drive constructs in Drosophila reveal insights into mechanisms of resistance allele formation and drive efficiency in genetically diverse populations. Preprint na bioRxiv 112011. (dostupno na https://www.biorxiv.org/content/early/2017/02/27/112011).

Champer J, Buchman A, S. Akbari O, 2016. Cheating evolution: engineering gene drives to manipulate the fate of wild populations. Nature Reviews Genetics, 17, 146-159.

Chu, T. V, i sur, 2015. Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. Nature Biotechnology 33, 543-548.

Cong L i sur, 2013. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. Science, 339, 819-823

Esvelt K. M, Smidler A. L, Catteruccia F, Church G. M, 2014. Concerning RNA-guided gene drives for the alteration of wild populations. eLife 3, e03401

Gantz V. M i sur, 2015. Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito Anopheles stephensi. PNAS, 112, E6736-E6743

Grunwald H. A i sur, 2018. Super-Mendelian inheritance mediated by CRISPR/Cas9 in the female mouse germline. Preprint na bioRxiv 362558. (dostupno na https://www.biorxiv.org/content/early/2018/07/04/362558)

Hammond, A i sur, 2016. A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*. Nature Biotechnology, 34, 78-83.

Heyer, W. D i sur, 2010. Regulation of homologous recombination in eukaryotes. Annual Review of Genetics, 44, 113–139.

Jasin M, 1996. Genetic manipulation of genomes with rare-cutting endonucleases". Trends Genet, 12, 224–8.

Lin S i sur, 2014. Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. eLife, 3:e04766.

Miles A, 2016. Natural diversity of the malaria vector Anopheles gambiae. Preprint na bioRxiv 096289 (dostupno na https://www.biorxiv.org/content/early/2016/12/22/096289).

Noble C, Adlam B, Church M. G, Esvelt M. K, Nowak A. M, 2017. Current CRISPR gene drive systems are likely to be highly invasive in wild populations. Preprint na bioRxiv 21902 (dostupno na https://www.biorxiv.org/content/early/2017/11/16/219022).

Nolan T, Crisanti A, 2017. Driving out malaria. The Scientist, Jan 1, 24-31. (dostupno na: https://www.the-scientist.com/features/using-gene-drives-to-limit-the-spread-of-malaria-32286).

Oye, A. K, 2014. Regulating gene drives. Science, 345, 6197, 626-628.

Suzuki, T. i sur, 2018. Switchable genome editing via genetic code expansion. Nature Scientific Reports 8, 10051 (dostupno na https://www.nature.com/articles/s41598-018-28178-3).

Unckless R. L, Clark, A. G, Messer, P. W, 2016. Evolution of resistance against CRISPR/Cas9 gene drive. GENETICS Early Online, 209, 4.

http://www.sculptingevolution.org/genedrives

https://theconversation.com/gene-drives-accelerate-evolution-but-we-need-brakes-98401

https://phys.org/news/2017-07-gene-foiled-rapid-resistance.html#jCp

https://www.quantamagazine.org/gene-drives-will-clash-with-evolution-20160908

http://blogs.plos.org/dnascience/2017/11/30/an-argument-against-gene-drives-to-extinguish-new-zealand-mammals-life-finds-a-way/

https://www.quantamagazine.org/new-model-warns-about-crispr-gene-drives-in-the-wild-20171116/

https://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1006850

7. SAŽETAK

Kod organizama sa spolnim razmnožavanjem i s po dvije kopije svakog kromosoma, svaki alel bilo kojeg gena ima 50% šanse da se prenese na potomstvo (jer svaka gameta prima po jedan alel). *Gene drives* (hrv. gensko upravljanje) su sebični genetički elementi koji zaobilaze Mendelova pravila nasljeđivanja, pa njihovi aleli imaju šansu prijenosa na potomstvo veću od 50%.

U zadnjih nekoliko godina, prirodno prisutni *gene drive* sustavi u različitim organizmima poslužili su kao inspiracija za dizajniranje sintetskih *gene drive* sustava u svrhu genetskog modificiranja populacija, a nakon otkrića tehnologije CRISPR-Cas9 ideja je doživjela veliki napredak. Aktualna istraživanja bave se mogućnostima primjene sintetskih *gene drive* sustava za suzbijanje malarije modifikacijom populacije komarca *Anopheles stephensi* i supresijom populacije komarca *Anopheles gambiae*, te za kontrolu populacija glodavaca.

Neka od ograničenja uporabe sintetskih *gene drive* sustava su razvoj rezistencije na *gene drive* alele, potencijalni nepredvidljivi učinci, nekontrolirano širenje i zlouporaba. Da bi sintetski *gene drive* sustavi jednog dana mogli funkcionirati u divljim populacijama, istražuju se i mogućnosti supresije razvoja alela rezistentnih na *gene drive* te načini bolje kontrole širenja *gene drive* alela radi smanjenja negativnog utjecaja na neciljane vrste.

8. SUMMARY

In sexually reproducing organisms, with two copies of every chromosome, each allele of a particular gene has a 50% chance of being passed to progeny - because every gamete receives one of the alleles. Gene drives are selfish genetic elements that surpass the Mendelian laws of inheritance, so that the progeny has a chance greater than 50% to receive the gene drive allele. In the recent years, naturally occurring gene drive systems have inspired biologists to create synthetic gene drive systems that could be used as tools for genetic modification of entire populations. With the help of CRISPR-Cas9 technology, the idea has faced greater improvement. Current research focuses on using synthetic gene drive systems for malaria suppression either by modifying *Anopheles stephensi* mosquito population or suppressing *Anopheles gambiae* population, as well as for the population control of rodents.

Potential limitations of using synthetic gene drive systems are development of alleles resistant to gene drive, unforseen effects, uncontrolled propagation and malpractice. For the synthetic gene drive systems to work in wild populations in the future, the methods for resistant allele suppression and for lowering the unwanted effects by better confinement to target species need to be further investigated.