

Tehnologija CRISPR-Cas9: Načela i primjene u genetičkom inženjerstvu

Kukolj, Matea

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, University of Split, Faculty of science / Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:166:915255>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**

Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Science](#)



Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno – matematički fakultet

**TEHNOLOGIJA CRISPR-CAS9: NAČELA I
PRIMJENE U GENETIČKOM INŽENJERSTVU**

Diplomski rad

Matea Kukolj

Split, Listopad 2019.

Od srca se zahvaljujem prof. dr. sc. Jasni Puizini na odličnom mentorstvu i pomoći pruženoj tijekom izrade ovog diplomskog rada. Zahvaljujem se i povjerenstvu na kvalitetnim savjetima, kao i brojnim profesorima te kolegama upoznatima tijekom studija.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Odjel za fiziku
Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Hrvatska

Diplomski rad

Tehnologija CRISPR-Cas9: Načela i primjene u genetičkom inženjerstvu

Matea Kukolj

Sveučilišni diplomski studij Fizika, smjer Biofizika

Sažetak:

Specifične kratke palindromske sekvence DNA nazvane CRISPR („Clustered, Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats“) pronađene su u gotovo svim arheobakterijama i dijelu eubakterija, a kroz proteklih 20 godina proučavana je njihova uloga i moguća primjena. S tim sekvencama povezan protein kaspaza 9 (Cas9), endonukleaza, koja se vođena kratkom molekulom RNA (vodič, engl. *guide RNA*, gRNA) veže uz ciljnu molekulu DNA i potom ju cijepa. Prenosivost kaspaze 9 među vrstama omogućila je brojne primjene sustava CRISPR-Cas9 u genetičkom inženjerstvu. Programiranje sustava CRISPR-Cas9 u laboratoriju u pravilu se sastoji od dizajniranja vodič RNA i odabira popravka izazvanog dvolančanog loma DNA, a moguće je i izazivanje mutacija u domenama kaspaze 9 sa svrhom promjena u specifičnosti sustava. Razvoj tehnika poput mikroskopije atomskih sila (AFM) od ključne su važnosti za vizualizaciju ponašanja sustava CRISPR-Cas9 u stvarnom vremenu. Do sada su tehnologijom CRISPR-Cas9 genetički modificirani brojni usjevi, ali postoje i brojna istraživanja učinkovitosti tehnologije kod bolesti ljudi. Usavršavanje tehnike CRISPR-Cas9 ključno je za provođenje kliničkih ispitivanja, koja će biti od iznimne važnosti za liječenje širokog spektra bolesti u ljudi.

Ključne riječi: CRISPR, Cas9, gRNA, genetičko inženjerstvo, AFM

Rad sadrži: 54 stranice, 26 slike, 3 tablice, 106 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku

Mentor: prof. dr. sc. Jasna Puizina

Ocjenjivači: prof. dr. sc. Jasna Puizina
izv. prof. dr. sc. Larisa Zoranić
doc. dr. sc. Željka Sanader Maršić

Rad prihvaćen: 30. listopada 2019.

Rad je pohranjen u knjižnici Prirodoslovno – matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu.

Basic documentation card

University of Split
Faculty of Science
Department of Physics
Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Croatia

Master thesis

CRISPR-Cas9 technology: principles and applications in genetic engineering

Matea Kukolj

University graduate study programme Physics, orientation Biophysics

Abstract:

CRISPR (“Clustered, Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats”) sequences were found in almost all archaea and partially in bacteria and over past 20 years their role and possible applications have been studied. Protein Cas9, that is connected with those sequences, is a nuclease that, guided by short RNA molecule (guide RNA, gRNA) binds to the target DNA molecule and cleaves it. Transferability of Cas9 between the species has allowed multiple applications of CRISPR-Cas9 system in genetic engineering. Programmability of CRISPR-Cas9 system includes designing gRNA and choosing the repair pathway for induced double-strand break on DNA, but there are also possibilities like introducing mutations in Cas9 domains in order to influence system specificity. Development of techniques such as atomic force microscopy (AFM) will play a key role in visualization of CRISPR-Cas9 system in real-time. So far, plenty of fruit crops have been modified using CRISPR-Cas9 technology, but there has also been a lot of research of technology’s efficiency in field of human diseases. Perfecting the CRISPR-Cas9 technique is key for conduction of clinical trials, which will be of great importance in treatment of a wide spectrum of human diseases.

Keywords: CRISPR, Cas9, gRNA, genetic engineering, AFM

Thesis consists of: 54 pages, 26 figures, 3 tables, 106 references. Original language: Croatian

Supervisor: Prof. Dr. Jasna Puizina

Reviewers: Prof. Dr. Jasna Puizina
Asoc. Prof. Dr. Larisa Zoranić
Assist. Prof. Dr. Željka Sanader Maršić

Thesis accepted: October 30th, 2019.

Thesis is deposited in the library of the Faculty of Science, University of Split.

Sadržaj

1	Uvod	1
1.1	Povijesni pregled genetičkog inženjerstva.....	2
1.1.1	Nukleaze s cinkovim prstima i TALEN	3
2	Otkriće sustava CRISPR-Cas kao imunološkog sustava u bakterija	7
2.1	Otkriće i razvoj sustava CRISPR.....	7
2.2	Popravlak dvolančanog loma DNA	12
2.3	Prirodni mehanizam adaptivnog imunološkog sustava kod bakterija	13
2.3.1	Fizikalni model stanja ko-evolucije bakterije i faga.....	15
3	CRISPR sustav tipa II i građa kompleksa Cas9	17
3.1	Klasifikacija CRISPR lokusa u tipu II.....	17
3.2	Građa proteina Cas9	17
4	Adaptacija sustava CRISPR-Cas9 u genetičkom inženjerstvu	20
4.1	Programiranje sustava u laboratoriju	20
4.2	Unos kompleksa Cas9 u stanicu	22
5	Dosadašnji uspjesi i trenutne primjene.....	23
5.1	CRISPR-Cas9 i HIV	23
5.2	Primjene CRISPR-Cas9 u poljoprivredi na voćnim usjevima.....	26
5.3	Klinička istraživanja	29
6	Dobijanje slika proteina u akciji	35
6.1	Mikroskopija atomskih sila.....	35
6.1.1	Rad s mikroskopom atomskih sila.....	38
6.1.2	Vizualizacija dinamike CRISPR-Cas9 mikroskopijom atomskih sila velikih brzina	39
7	Budućnost metode CRISPR-Cas9 i etička pitanja.....	43
8	Zaključak.....	46
9	Literatura.....	48

1 Uvod

Genetičkim inženjerstvom smatra se svaki proces ciljanih modifikacija genoma. Od razvoja tehnologije rekombinantne DNA u 1970-ima do danas došlo je do značajnog razvoja biotehnologije, a time i brojnih otkrića u medicini i biologiji. Tako danas znanstvenici mogu direktno mijenjati funkciju DNA sekvenci u samom organizmu i proučavati promjene u funkcionalnom organizmu (Hsu i sur., 2014).

Kroz zadnjih 15 godina 20. stoljeća u brojnih jednostaničnih organizama došlo je do otkrića određenih gena koji sadrže specifične sekvence, čije su zajedničko obilježje ponavljajući sljedovi točno određene veličine (24-40 parova baza), međusobno odijeljeni sljedovima veličine od 20 do 58 parova baza. Takve ponavljajuće sekvence su pronađene u gotovo svim arheobakterijama i velikom dijelu eubakterija, a nisu uočene u virusima ni eukariotima. Znanstvena zajednica usuglasila se oko naziva CRISPR (engl. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*).

Usljedio je niz eksperimenata, ponajviše na bakterijama *Streptococcus thermophilus* i *E. coli* gdje je otkriveno kako CRISPR igra važnu ulogu u obrani bakterija od virusa te da se zbog toga može smatrati svojevrsnim „imunološkim sustavom“ bakterija. Potvrđene su tri faze mehanizma; adaptacija, ekspresija i interferencija, koje izvide specifični proteini povezani sa sustavom CRISPR (Bonomo i Deem, 2018). Među najvažnijim takvim proteinima su kaspaze (Cas), proteini koji imaju funkciju DNA endonukleaza, odnosno sposobnost da sijeku fosfodiesterske veze u polinukleotidnom lancu molekule DNA.

Mogućnost odabira ciljne sekvence DNA (programibilnost sekvenci) otvorila je vrata CRISPR-Cas sustavu kao danas vodećem mehanizmu za ciljanu korekciju gena (engl. *gene editing*) i uslijedila su brojna istraživanja s ciljem uspješnih i značajnih modifikacija gena. Jedna od najpoželjnijih aplikacija CRISPR-a je upravo u liječenju bolesti i u proteklih nekoliko godina odobreno je više kliničkih istraživanja.

Korištenjem tehnika poput elektronske mikroskopije i AFM-a (engl. *Atomic Force Microscopy*) uspjele su se dobiti slike CRISPR-Cas mehanizma „u akciji“, što su izuzetni rezultati. Tako danas postoje 3D slike enzima u procesu cijepanja DNA koje će zasigurno pomoći u daljnjem razvijanju sustava i poboljšanju njegove efikasnosti.

Uz svako spominjanje genetičkog inženjerstva automatski se vežu i etička pitanja – razumno je brinuti koliko daleko se može ići prije nego što se dođe do točke nakon koje više nema povratka i upravo se zato u velikom broju zemalja modifikacija spolnih i embrionalnih stanica ne odobrava.

1.1 Povijesni pregled genetičkog inženjerstva

Struktura deoksiribonukleinske kiseline (DNA) kao dvostruke zavojnice smatra se najvažnijim otkrićem genetike. To otkriće Watsona i Cricka 1953. godine omogućilo je uzlet biologiji i genetici kakve danas poznajemo i za to su 1962. godine nagrađeni Nobelovom nagradom u području fiziologije i medicine. Njihovom uspjehu pridonio je rad znanstvenice Rosalind Franklin, koja je u ranim 1950-ima X zrakama dobila difrakcijske slike DNA, zahvaljujući kojima su Watson i Crick zaključili da DNA ima strukturu dvostruke zavojnice.

Da bi se DNA mogla sintetizirati u laboratoriju, uz svih pet nukleotida (uracil umjesto timina u RNA) potrebni su i enzimi koji ih sklapaju u DNA (ili RNA). U periodu od godine dana nakon izolacije DNA polimeraze I iz bakterijskih ekstrakata došlo je do prve „*in vitro*“ sinteze DNA (Bessman i sur., 1958). Za to postignuće Arthur Kornberg je nagrađen Nobelovom nagradom.

Kod ekspresije gena potrebno je moći prepoznati kada i kod kojih stanica dolazi do ekspresije ciljanih gena. Upravo zato jako važna je bila izolacija zelenog fluorescentnog proteina (GFP), prisutnog kod meduze *Aequorea victoria*, koji pri izloženosti svjetlosti valne duljine plave boje emitira zelenu fluorescenciju (Shimomura i sur., 1962). Fuzijom gena *GFP* i gena koji kodira za protein od interesa stvaraju se tzv. „reporter proteini“ – „proteini izvjestitelji“, koji pružaju informaciju kada i u kojim stanicama dolazi do ekspresija ciljanih gena.

DNA ligaze, koje danas popularno zovemo „molekularnim ljepilima“, otkrivene su 1967. godine. Ligaze su specifičan tip enzima koje sudjeluju u spajanju lanaca DNA na način da kataliziraju formiranje dviju fosfodieterskih veza između 3' hidroksilnog kraja nukleotida akceptora i 5' fosfatnog kraja nukleotida donora. DNA ligaze važne su pri popravku DNA i replikaciji DNA, a široku upotrebu zadobile su u eksperimentima s rekombinantnom DNA. Poremećaji funkcije DNA ligaza povezuju se s kliničkim simptomima koji uključuju imunodeficienciju i abnormalnosti u razvoju (Shuman, 2009).

Werner Arber primijetio je kako određene bakterije pri infekciji virusom izrezuju virusnu DNA. Postavio je hipotezu kako bakterijske stanice stvaraju dva tipa enzima – restrikcijske enzime koji

prepoznaju i režu stranu DNA i modifikacijske enzime koji prepoznaju i štite DNA domaćina. Hipoteza je dokazana eksperimentom u kojem su iz bakterije *E. coli* izolirana dva enzima – modifikacijski enzim metilaza te restriksijski enzim, koji je izrezao virusnu, nemetiliranu DNA. Restriksijski enzimi lociraju specifične sekvence na DNA na koje se vežu i potom režu fragment DNA na restriksijskom mjestu. Ovisno o lokaciji restriksijskog mjesta i o samoj strukturi enzima, uobičajena je podjela u pet tipova (I-V). Otkriće restriksijskih endonukleaza nagrađeno je Nobelovom nagradom 1978.

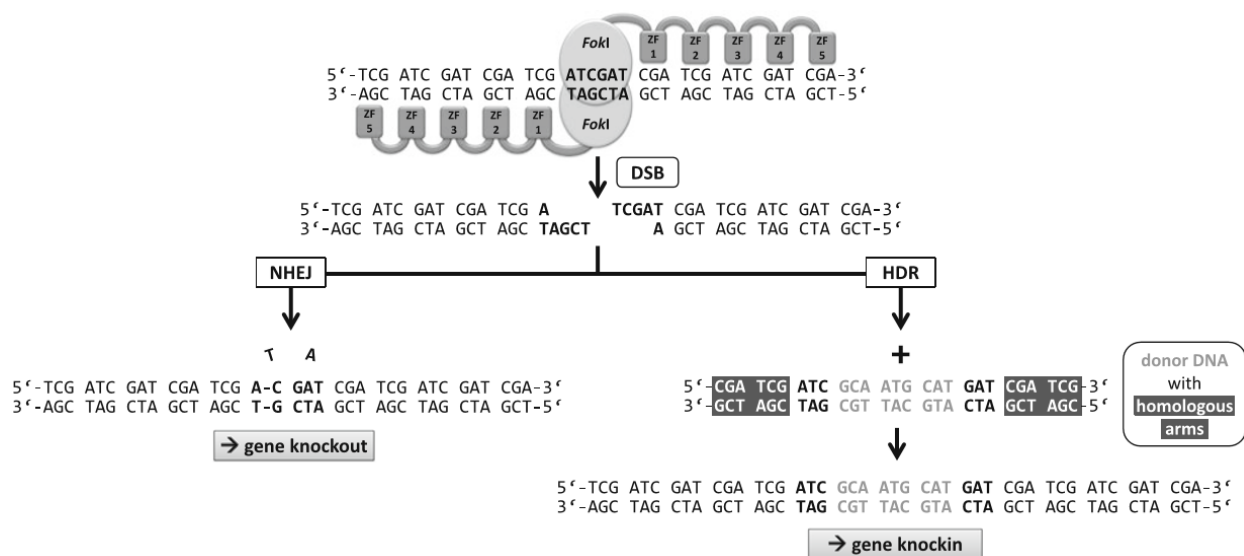
Ključni korak u genetičkom inženjerstvu bilo je kovalentno spajanje dviju molekula DNA iz različitih vrsta. To je postigao Paul Berg (i za to dobio Nobelovu nagradu 1980. godine) na način da je izrezao DNA iz dva virusa stvarajući tzv. „ljepljive krajeve“, inkubirao DNA i uz dodatak DNA ligaze došlo je do komplementarnog sparivanja njihovih krajeva. Hibridna DNA koja je nastala kombinacijom elemenata DNA iz različitih organizama zove se rekombinantna DNA i unatoč tome što je „umjetno“ uvedena u organizam ona se dalje prirodno replicira (Cohen i sur., 1973). Rekombinantnu DNA čini molekula vektorske DNA zajedno sa stranim genetskim materijalom koje on nosi u ciljanu stanicu. Vektori su klasificirani u četiri glavna tipa: plazmidi, virusni vektori, kozmidi i umjetni kromosomi. Najpoznatiji i najčešće korišteni vektori su plazmidi, najčešće pronađeni kod bakterija u obliku malih kružnih molekula DNA. Proces u kojem dolazi do prijelaza stranog genetskog materijala iz jedne u drugu bakteriju zove se transformacija (u stanicama sisavaca transfekcija).

Otkriće tehnike PCR (engl. *polymerase chain reaction*) bilo je ključno za daljnji razvoj eksperimentalnih otkrića u genetičkom inženjerstvu. Polimerazna lančana reakcija omogućava stvaranje ogromnog broja kopija određenog segmenta DNA. Sam razvoj PCR tehnologije u 1983. godini smanjio je vrijeme potrebno da se klonira DNA i time je mogućnost izvođenja eksperimenata, ali i njihova efikasnost, postala uvelike dostupna. Za izum tehnike PCR Kary Mullis i Michael Smith dobili su Nobelovu nagradu 1993. godine.

1.1.1 Nukleaze s cinkovim prstima i TALEN

1985. godine otkrivene su nukleaze s cinkovim prstima (engl. *zinc finger*, ZFNs) i za njih se može kazati kako su prva generacija ciljanih dizajnerskih nukleaza. Nukleaze s cinkovim prstima dobivaju se spajanjem domene za vezivanje uz DNA (engl. *DNA-binding*) i domene za cijepanje DNA (engl. *DNA-cleavage*), koja sadrži restriksijsku endonukleazu FokI. Te domene mogu biti

programirane da ciljaju željene DNA sekvence i to omogućava nukleazama ZFN da unutar genoma nalaze točno određene sekvence, a vežu se specifično na setove triju baza. Izazivanje dvolančanog loma omogućava nukleazama ZFN da uspješno onesposobe gene, zahvaljujući mehanizmu DNA popravka. U odsutnosti egzogenog homolognog popravka (engl. *homologous template*) najčešće dolazi do popravka nehomolognim spajanjem krajeva (engl. *nonhomologous end-joining*, NHEJ). Pokazano je da takav popravak često može uzrokovati insercije ili delecije i time dolazi do pomaka okvira čitanja, (engl. *frame-shifta*) što zaustavlja stvaranje funkcionalnih proteina (Bibikova i sur., 2001., 2002., 2003). Osim za inaktivaciju gena nukleaze ZF koriste se i za uređivanje sekvence DNA na način da izazovu mehanizam homolognog popravka pomoću fragmenta DNA koji služi kao predložak (engl. *template*). Na kromosomu se tada traži homologija između oštećenog dijela i predloška te se sekvenca predloška kopira, bez obzira sadrži li predložak točnu originalnu sekvencu. Tako se mogu postići „knockin“ ili „knockout“ jedinke, pri čemu „knockin“ jedinke (Slika 1.1) pokazuju ekspresiju novih gena, dok su „knockout“ jedinke doživjele izostanak funkcije nekog gena.



Slika 1.1. Stvaranje gena „knockout“ i „knockin“ pomoću nukleaza s cinkovim prstima. Nakon vezivanja molekula ZFN na ciljne sekvence, nukleazne domene cijepaju DNA. Popravak izazvanog dvolančanog loma preko nehomolognog povezivanja krajeva (NHEJ) može uzrokovati mutacije pomaka okvira čitanja i dovesti do inaktivacije gena (engl. *knockout*). Ako je dodana donorska DNA (svijetlo sivo) s homolognim krajevima (tamno sivo) sekvenca između krajeva se kopira čime nastaje novi gen (engl. *knockin*) (preuzeto iz Hauschild-Quintern i sur., 2013).

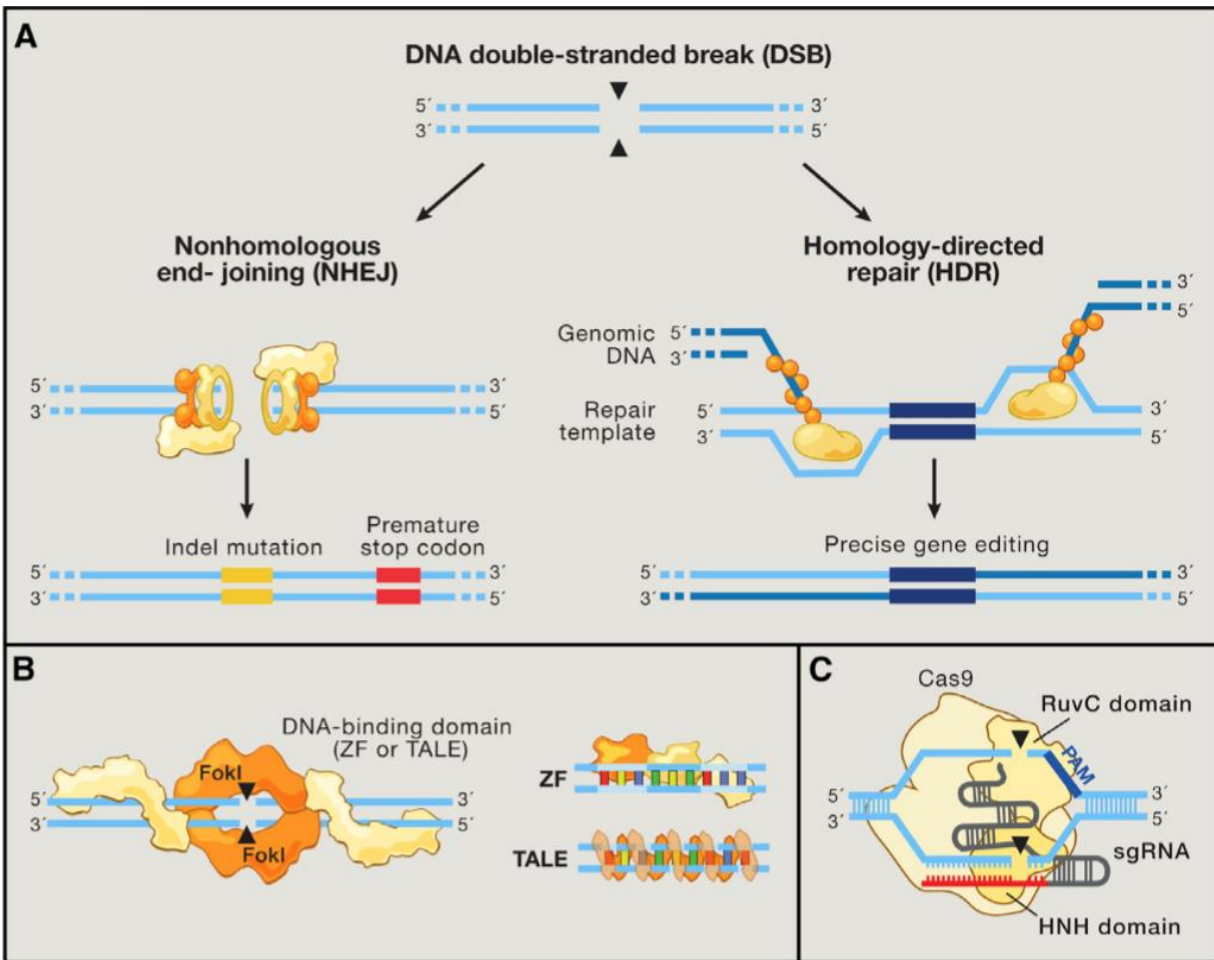
Godine 2011. pojavila se nova verzija dizajnerskih nukleaza TALEN (engl. *transcription activator-like effector nucleases*) (TALENs). Slično ZF nukleazama, one se dizajniraju spajanjem vezujuće domene za TAL efektor (engl. *TAL effector DNA-binding domain*) i domene za cijepanje

DNA (engl. *DNA-cleavage*), a za razliku od ZF nukleaza one prepoznaju jedan nukleotid (Slika 1.2.B). Sam proces dizajna nukleaza TALE je uvelike jednostavniji i brži nego za nukleaze ZF.

Osim jednostavnije proizvodnje, nukleaze TALE pokazale su mnogo manje tzv. „off-target“ rezultata, što znači da je došlo do manjeg broja lomova sekvenci na pogrešnom mjestu. Do lomova dolazi ako nukleaze nisu dovoljno specifične, a za posljedicu mogu imati lom kromosoma pa čak i smrt stanice. U odnosu na nukleaze ZF, kod nukleaza TALE zabilježena je i manja citotoksičnost za stanicu domaćina. Mana nukleaza TALE je njihova veličina, znatno su veće od nukleaza ZF i stoga je otežano njihovo dostavljanje i ekspresija „*in vivo*“ (web poveznica [1]).

Nukleaze ZF mogu imati i problem vezanja, gdje se mogu umrežiti sa susjednim kompleksima, što bi značilo smanjenu efikasnost vezanja (Maeder i sur., 2008), a nukleaze TALE također mogu patiti od specifičnosti kompleksa, a i njihova sama konstrukcija je skupa zbog količine ponavljajućih sekvenci, odnosno njihove veličine (Juillerat i sur., 2014).

Jennifer Doudna i Emmanuelle Charpentier, zajedno sa svojim suradnicima, 2012. godine pokazale su potencijal CRISPR-Cas9 tehnologije. DNA endonukleaza Cas9 (Slika 1.2.C) vođena molekulom RNA iz tipa II bakterijskog adaptivnog imunološkog sustava CRISPR tako se pridružila grupi proteina kojima se postiže učinkovito uređivanje genoma. Detaljno o otkriću i razvoju tog mehanizma biti će objašnjeno u daljnjem dijelu rada.



Slika 1.2. (A) Popravlak dvolančanih lomova DNA pomoću dvaju glavnih mehanizama: nehomologno povezivanje krajeva (NHEJ) i homologijom vođeni popravlak (HDR). (B) Nukleaze ZF i TALE svaka prepoznaju jedan, odnosno 3 para baza i ti DNA vezujući proteini se mogu spojiti s FOKI endonukleazom za stvaranje programabilnih mjesno specifičnih nukleaza. (C) Cas9 nukleaza se lokalizirala na specifične sekvence DNA pomoću vodeće sekvence na njenoj RNA (crveno) i direktno se sparuju baze sa ciljnom DNA. Vežanje uz kratku sekvencu PAM (engl. *photospacer-adjacent motif*, plavo) pomaže usmjeravanju dvostrukog loma (preuzeto iz Hsu i sur., 2014).

2 Otkriće sustava CRISPR-Cas kao imunološkog sustava u bakterija

2.1 Otkriće i razvoj sustava CRISPR

U istraživanju koje su proveli Ishino i sur. 1987. godine analiziran je segment kromosomske DNA bakterije *Escherichia coli* koji sadrži gen *iap* i pripadajuće bočne regije, s ciljem proučavanja njegove uloge za konverziju izozima alkalne fosfataze. Na 3' kraju bočne regije gena zapažena je zanimljiva struktura - pet homolognih sekvenci od 29 ponavljajućih nukleotida s pravilnih razmacima od 32 nukleotida među njima (Slika 2.1.). Biološko značenje tih sekvenci tada nije bilo poznato niti su bili uočeni slični slučajevi kod drugih organizama.

```

TGA AAATGGGAGGGAGTTC TACCGCAGAGGCGGGGAACTCCAAGTGATATCCATCATCGCATCCAGTGGCC (1,451)
(1,452) CGGTTTATCCCCGCTGATGCGGGGAACACCAGCGTCAGGCGTGAAATCTCACCGTCGTTGC (1,512)
(1,513) CGGTTTATCCCTGCTGGCGCGGGGAACTCTCGGTTTCAGGCGTTGCAAACCTGGCTACCGGG (1,573)
(1,574) CGGTTTATCCCCGCTAACGCGGGGAACTCGTAGTCCATCATTCCACCTATGTCTGAACTCC (1,634)
(1,635) CGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACTCG (1,664)

consensus: CGGTTTATCCCCGCTGGAACGCGGGGAACTC
    
```

Slika 2.1. Usporedba ponavljajućih sekvenci na 3' kraju bočne regije gena *iap*. Homologni nukleotidi koji su pronađeni u barem dva DNA segmenta su podcrtani, a na dnu slike je izdvojena konsenzus sekvenca 29 visoko konzerviranih nukleotida (preuzeto iz Ishino i sur., 1987).

Pretragom dostupne baze podataka 2000. godine pronađen je značajan broj organizama koji sadrže palindromske sekvence (24 – 40 parova baza) s pravilnim međurazmacima (20 – 58 parova baza). Ti onavljajući sljedovi poznati su kao kratka pravilna ponavljanja (engl. *Short Regularly Spaced Repeats*, SRSRs). Njihova funkcija u prokariota tada još nije bila jasna, a postojala je i ideja da su oni samo ostatak starih sekvenci ('molekularni fosili') i da je evolucijom njihova uloga nestala (Mojica i sur., 2000).

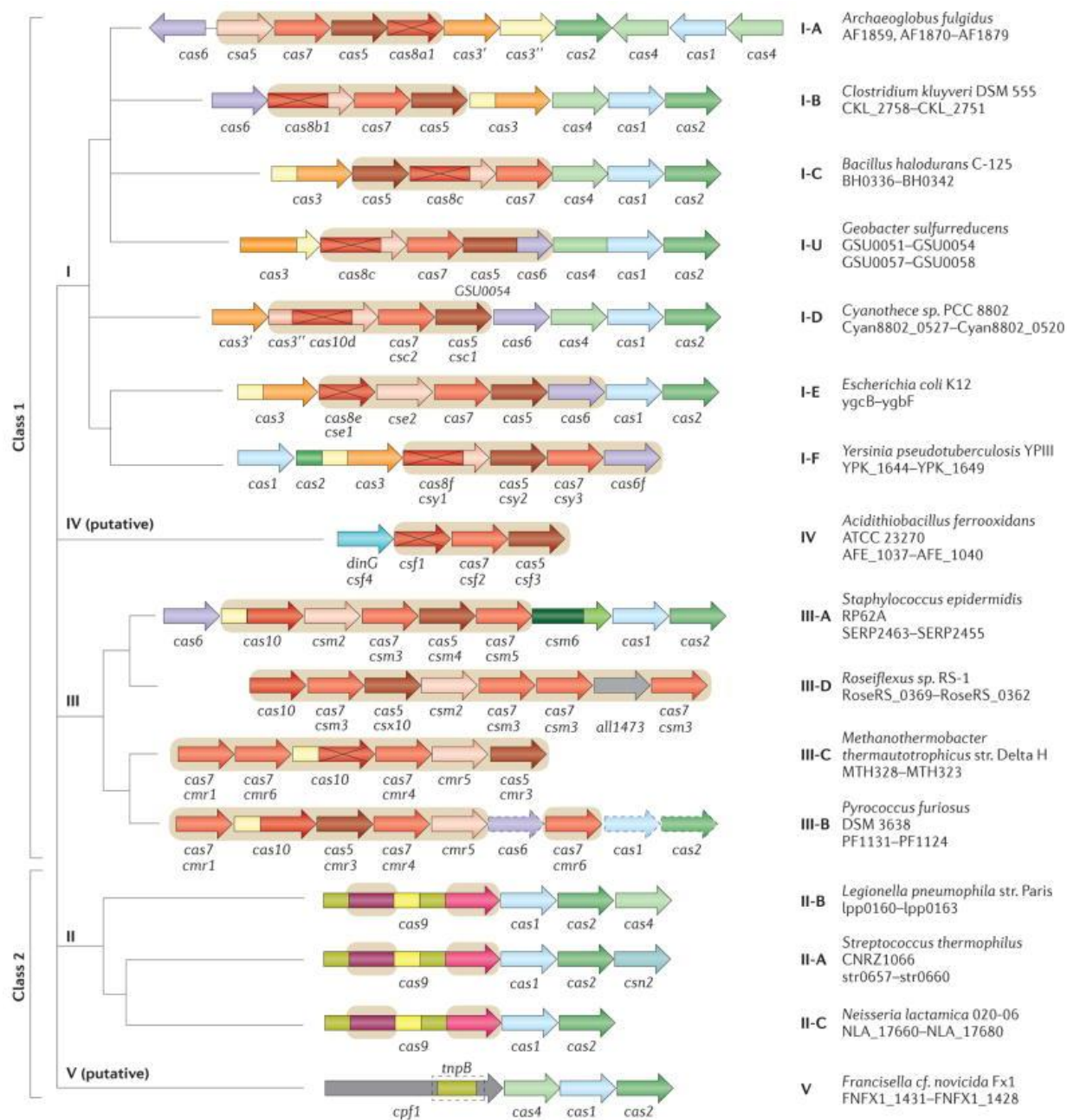
Tablica 1. Glavne obilježnja SRSR-a – broj parova baza, količina klastera u kojima se javljaju te razmak među istima (preuzeto iz Mojica i sur., 2000).

Organism	SRSR size (bp)	Spacing (bp)	Number of clusters	SRSR units per cluster	Reference
Archaea					
<i>H. volcanii</i>	30	ND	≥2	ND	Mojica <i>et al.</i> (1995) <i>Mol Microbiol</i> 9 : 13–21
<i>H. mediterranei</i>	30	33–39	3	21/ ND / ND	Mojica <i>et al.</i> (1995) <i>Mol Microbiol</i> 9 : 13–21
<i>M. jannaschii</i>	28–30	31–51	7 ^A + 6 ^B + 1 ^C	4–25	Bult <i>et al.</i> (1996) <i>Science</i> 273 : 1058–1073 and this work
<i>M. thermoautotrophicum</i>	30	34–38	2	124/47	This work
<i>A. fulgidus</i>	37 ^A /30 ^B	≈ 37	1 ^A + 2 ^B	42 ^A /48 ^B /60 ^B	This work
<i>S. solfataricus</i>	25	≈ 40	≥2	94/102	Sensen <i>et al.</i> (1998) <i>Extremophiles</i> 2 : 305–312
<i>P. abyssi</i>	29 ^A /30 ^B	26–43	1 ^A + 2 ^B	7 ^A /22 ^B /27 ^B	This work
<i>P. horikoshii</i>	29	34–58	3	18/26/66	Kawarabayasi <i>et al.</i> (1998) <i>DNA Res</i> 5 : 55–76
<i>A. permix</i>	24 ^A /23 ^B	37–52	2 ^A + 1 ^B	19 ^A /27 ^A /42 ^B	Kawarabayasi <i>et al.</i> (1999) <i>DNA Res</i> 6 : 83–101
Bacteria					
<i>T. maritima</i>	30	39–40	8	2–40	Nelson <i>et al.</i> (1999) <i>Nature</i> 399 : 323–329
<i>A. aeolicus</i>	29	36–38	1	6	This work
<i>E. coli</i>	29	32–33	3	2/7/13	Nakata <i>et al.</i> (1989) <i>J Bacteriol</i> 171 : 3553–3556 and this work
<i>S. typhi</i>	29	32	≥1	6	This work
<i>C. jejuni</i>	36	30	1	5	This work
<i>Y. pestis</i>	28	32–33	2	6/9	This work
<i>C. difficile</i>	29	36–38	4 ^A + 2 ^B	5–17	This work
<i>M. tuberculosis</i>	36	38–40	1	Variable	Hermans <i>et al.</i> (1991) <i>Infect Immun</i> 59 : 2695–705
<i>Calothrix sp.</i>	37	35–41	>1	5	Masepohl <i>et al.</i> (1996) <i>Biochim Biophys Acta</i> 1307 : 20–36
<i>Anabaena sp.</i>	37	32–43	>1	17	Masepohl <i>et al.</i> (1996) <i>Biochim Biophys Acta</i> 1307 : 20–36
Mitochondria					
<i>V. faba</i>	40	20–35	1	6	Flamand <i>et al.</i> (1992) <i>Plant Mol Biol</i> 19 : 913–923

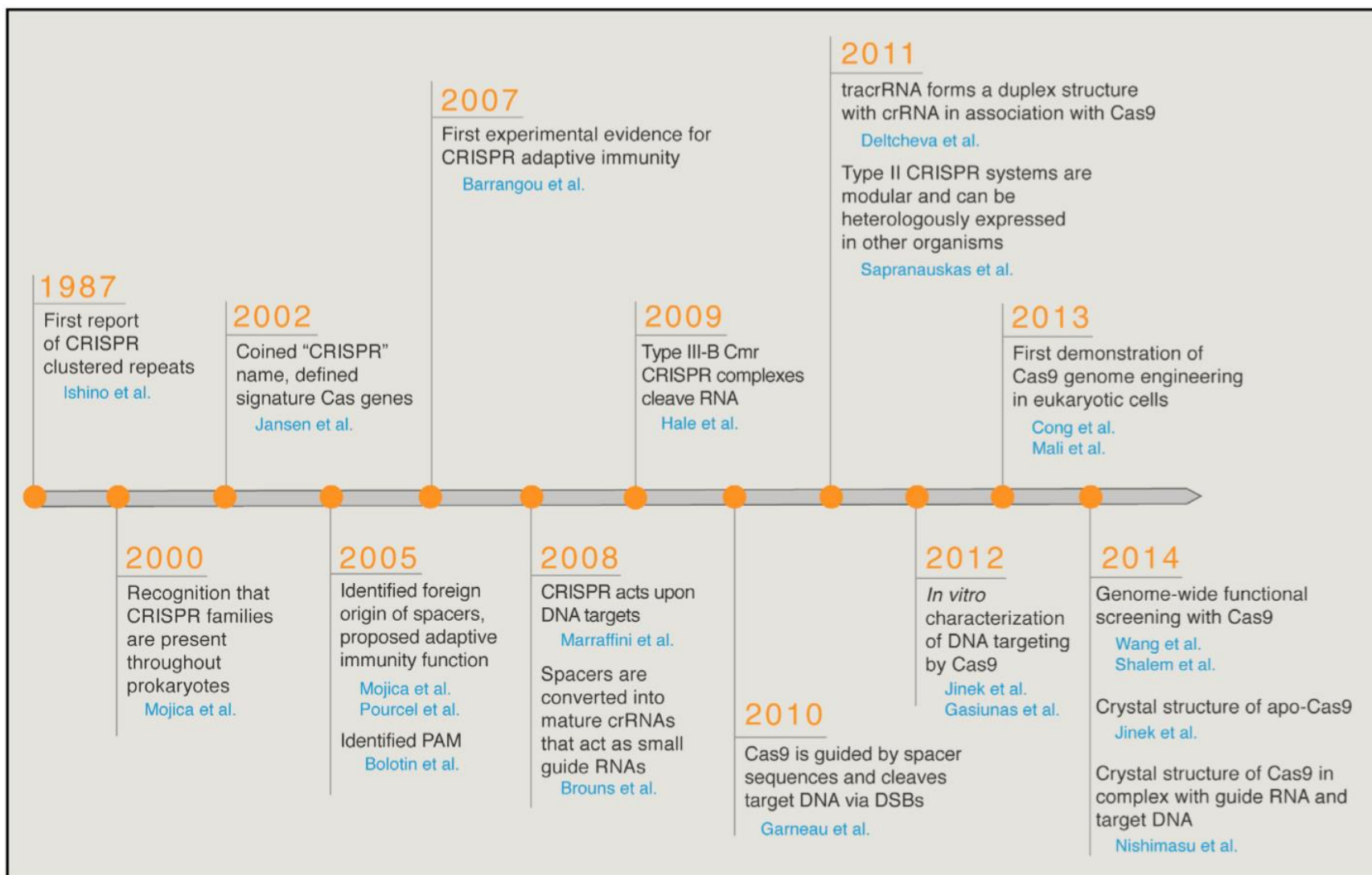
A,B, Types of SRSRs distinct (more than 3 bp differences) within the same microorganism. ND, Not determined.

Uočeno je da su sekvence i razmaci visoko konzervirani unutar vrste i da se razlikuju među različitim vrstama (Tablica 1.). Sljedove su nazvali SPIDR (engl. *Spacers Interspersed Direct Repeats*) te su tzv. SPIDR mjesta pronađena u više od 40 prokariotskih vrsta. Za otkriće je korišten program „Patscan“ koji prepoznaje obilježja poput ponavljanja, ukosnica i čvorova. Broj mjesta na kojima su pronađeni sljedovi varirao je kod različitih vrsta od samo jednog mjesta (*Mycobacterium tuberculosis*) sve do 20 različitih lokusa (*Methanococcus jannaschii*). Iste 2002. godine usuglašen je je novi naziv „Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats“ (CRISPR), koji je danas općenito prihvaćen u znanstvenoj zajednici (Jansen i sur., 2002).

Identifikacija gena „CRISPR associated“ (*cas*) koji se najčešće nalaze u neposrednoj blizini ponavljajućih elemenata (Jansen i sur., 2002) poslužila je kao temelj za klasifikaciju tri tipa CRISPR sustava: I, II i III (Haft i sur., 2005; Makarova i sur., 2011b). Dok tip II sadrži mali broj Cas proteina, tipovi I i III sadrže veći broj istih, za koje danas znamo da formiraju komplekse sa crRNA (CRISPR RNA) sa svrhom prepoznavanja i uništavanja ciljanih aminokiselina (Brouns i sur., 2008; Hale i sur., 2009). U proteklih nekoliko godina klasifikacija CRISPR sustava (Slika 2.2.) proširila se na šest tipova (Makarova i sur., 2015).



Slika 2.2. Podjela sustava CRISPR-Cas u pet tipova i arhitektura genskih lokusa. Na slici se ne nalazi šesti tip u koji su svrstani rijetki i još uvijek neklasificirani sustavi (preuzeto iz Makarova i sur., 2015).



Slika 2.3. Vremenska skala ključnih istraživanja sustava CRISPR-Cas9 (preuzeto iz Hsu i sur., 2014).

Strukture CRISPR odijeljene su jedinstvenim razmaknicama („spacer“ sekvencama) sličnih duljina. Analiza 2005. godine otkrila je kako su određene razmaknice homologne genima koji su virusnog, odnosno plazmidnog podrijetla te nije pronađena homologija razmaknica s kromosomskom DNA bakterija. Predloženo je da stvaranje struktura CRISPR uključuje degradaciju egzogene virusne ili plazmidne DNA proteinom kaspaza (*cas*). Također je predložena i moguća uloga struktura CRISPR u bakterijskom genomu: obrambena funkcija protiv invazije strane DNA. Prvi put je i spomenuta prisutnost kratke sekvence PAM – motiva susjednog proto-razmaknici (engl. *protospacer adjacent motif*), sekvence koja će se kasnije pokazati od izuzetne važnosti (Bolotin i sur., 2005).

Godine 2007. u bakterije *Streptococcus thermophilus* dobiveni su prvi eksperimentalni dokazi za ulogu sustava CRISPR tipa II kao adaptivnog imunološkog sustava (Slika 2.3.). Kada bakterija preživi napad virusa, ona spremi dio virusne DNA u 'arhivu' CRISPR. Kada virus opet napadne, geni *cas* stvaraju odgovarajuće proteine koji pretražuju stranu virusnu DNA dok ne nađu uzorak iz 'arhive', a kada se pronađe podudarnost (engl. *perfect match*) dolazi do aktivacije i rezanja virusne DNA (Barrangou i sur., 2007).

Proučavanjem lokusa CRISPR tipa I bakterije *Escherichia coli* utvrđeno je da se razmaknice prepisuju u male crRNA (crispr RNA) koje imaju funkciju vodećih („guide“) RNA (Brouns i sur., 2008). Iste godine (Slika 2.3.) pokazano je kako CRISPR surađuje u obrani od spajanja plazmida, što znači da je molekula DNA meta Cas enzimske aktivnosti, a ne RNA (Marraffini i Sontheimer, 2008).

Važnost sekvenci PAM pokazana je eksperimentima s mutacijama tih sekvenci u genomu faga, nakon čega došlo do izostanka aktivnosti CRISPR. Predloženo je kako bi sustav CRISPR-Cas mogao imati ulogu u razvoju bakterijskih kultura za fermentaciju i biotehnoške procese, koje bi bile rezistentne na viruse. Zbog velike rasprostranjenosti virusa u raznim ekosustavima pretpostavljeno je i da CRISPR igra ulogu u prokariotskoj evoluciji i ekologiji (Deveau i sur., 2008).

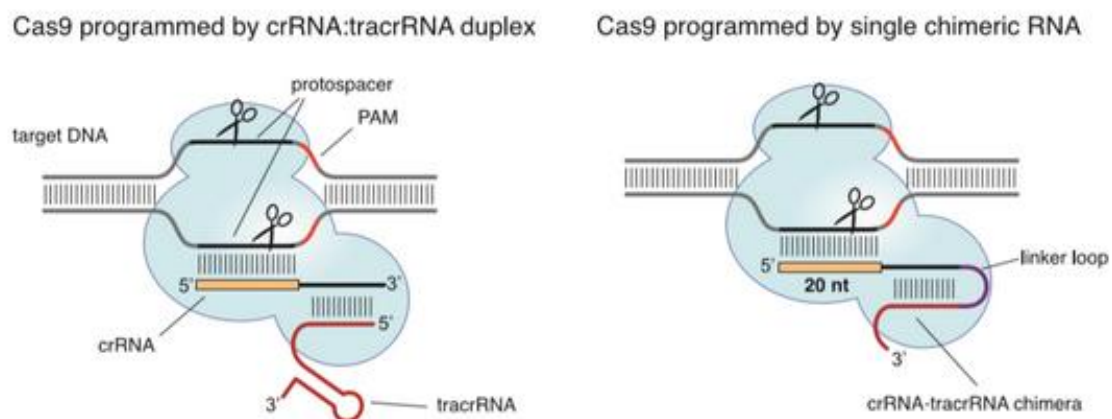
Nakon spomenutih istraživanja porastao je interes za sustav CRISPR u biotehnologiji, pretežito na području imuniteta bakterija i biotehnoških aplikacija (prvenstveno u mliječnoj kulturi), a mogućnosti genske modifikacije pojavile su se nešto kasnije.

Usljedila su dva istraživanja koja su predložila da postoje barem 3 komponente (Cas9, zrela crRNA i tracrRNA) koje su od esencijalne važnosti za tip II CRISPR nukleazni sistem (Slika 2.4.). Cas9 je jedini enzim unutar klastera *cas* gena koji posreduje u cijepanju ciljane DNA

(Garneau i sur., 2010). Nadalje je otkrivena nekodirajuća trans-aktivirajuća crRNA (tracrRNA) koja se hibridizira s crRNA da bi kaspazi 9 olakšala vođenje takve molekule RNA (Deltcheva i sur., 2011). Kako je rasla važnost programibilnih mjesno specifičnih nukleaza (baziranih na ZF i TALEs), počelo se razmišljati bi li se CRISPR-Cas9 mogao razviti u sustav za korekcije genoma (engl. *genome editing*) koji bi omogućio niz različitih primjena u modifikaciji genoma.

Uskoro je pokazano kako je tip II sustava CRISPR prenosiv među vrstama. Već prije je bila poznata uloga u imunitetu bakterije *Streptococcus thermophilus*, a kada je genetski materijal za kompleks CRISPR-Cas9 tipa II uspješno prenesen u bakteriju *Escherichia coli*, u bakteriji je bila osigurana zaštita od virusa. Potvrđeno je kako je gen *cas9* jedini gen *cas* nužan za funkciju kodiranu CRISPR-om, a činjenica da se sustav CRISPR-Cas može prenositi između udaljenih rodova i vrsta mogla bi omogućiti širenje otpornosti na viruse (Sapranauskas i sur., 2011).

Hibridizacijom crRNA i tracrRNA nastaje RNA struktura koja usmjerava protein Cas9 da napravi dvolančani lom na ciljnoj DNA, isto što rade i male sgRNA (engl. *single guide RNA*). Uspješno je dizajnirano nekoliko vodećih sekvenci sgRNA za isti sustav (preciznije za niz CRISPR) i time omogućeno ciljanje većeg broja meta istovremeno, što odražava jednostavnu programibilnost kao i potencijal široke primjene (Cong i sur., 2013).



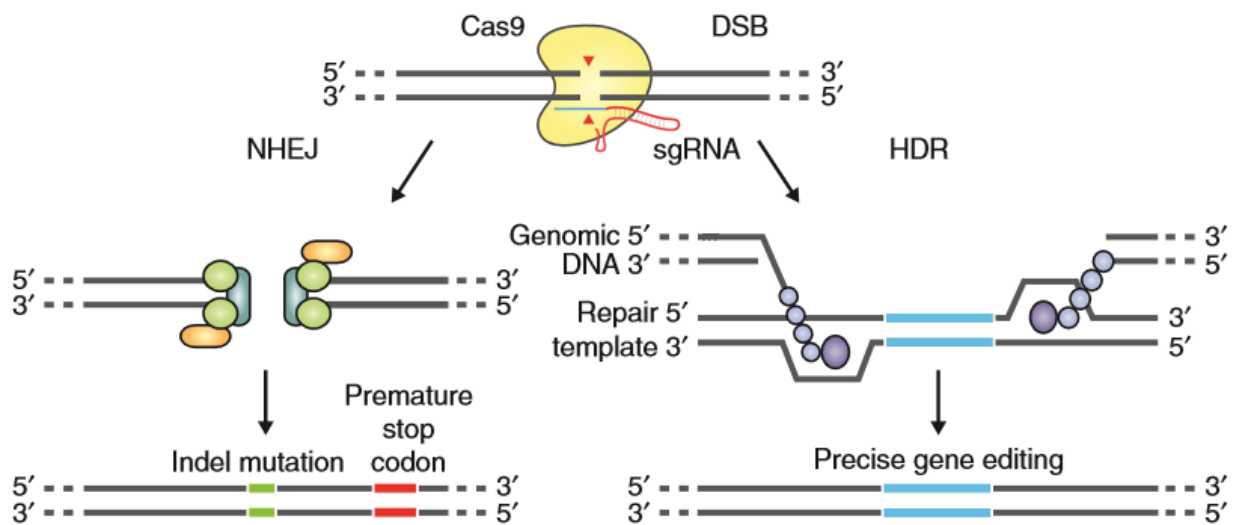
Slika 2.4. Tip II CRISPR nukleazni sistem. Lijevo: nukleaza Cas9 je vođena strukturom dviju RNA dobivenom aktivacijom tracrRNA i usmjeravanjem crRNA na ciljnu DNA. Desno: dizajnirana kimerna RNA dobivena lijepljenjem 3' kraja crRNA i 5' kraja tracrRNA (Preuzeto iz Jinek i sur., 2012).

Spomenuta istraživanja potaknula su veliki broj eksperimenata u laboratorijima diljem svijeta. Tehnologija CRISPR-Cas9 usvojena je izuzetno brzo te se može kazati kako je započela „utrka“ u području genetičkog inženjerstva gdje glavnu ulogu igra Cas9.

2.2 Popravak dvolančanog loma DNA

Nakon dvolančanog loma „*in vivo*“ dolazi do popravka loma prirodnim mehanizmima stanice (Slika 2.5.). Najčešći mehanizam popravka je NHEJ (engl. *nonhomologous end joining*) koji je

sklon greškama i često uzrokuje mutacije insercija i delecija („indela“) na mjestu popravka. Mutacije u kodirajućoj regiji gena dovode do pomaka okvira čitanja (engl. *frameshift*) i preuranjenog stop kodona i time inaktivacije gena. S druge strane, homologni direktni popravak (HDR) koji omogućava umetanje informacija donorske DNA je izuzetno precizan, ali rijedak (čest je kod stanica u diobi). Međutim, moguće je potaknuti HDR popravak, na način da se unese tzv. Predložak za popravak (engl. *repair template*) u obliku jednolančanih DNA oligonukleotida (ssODNs) ili u obliku dvolančanog fragmenta DNA (Ran i sur., 2013).

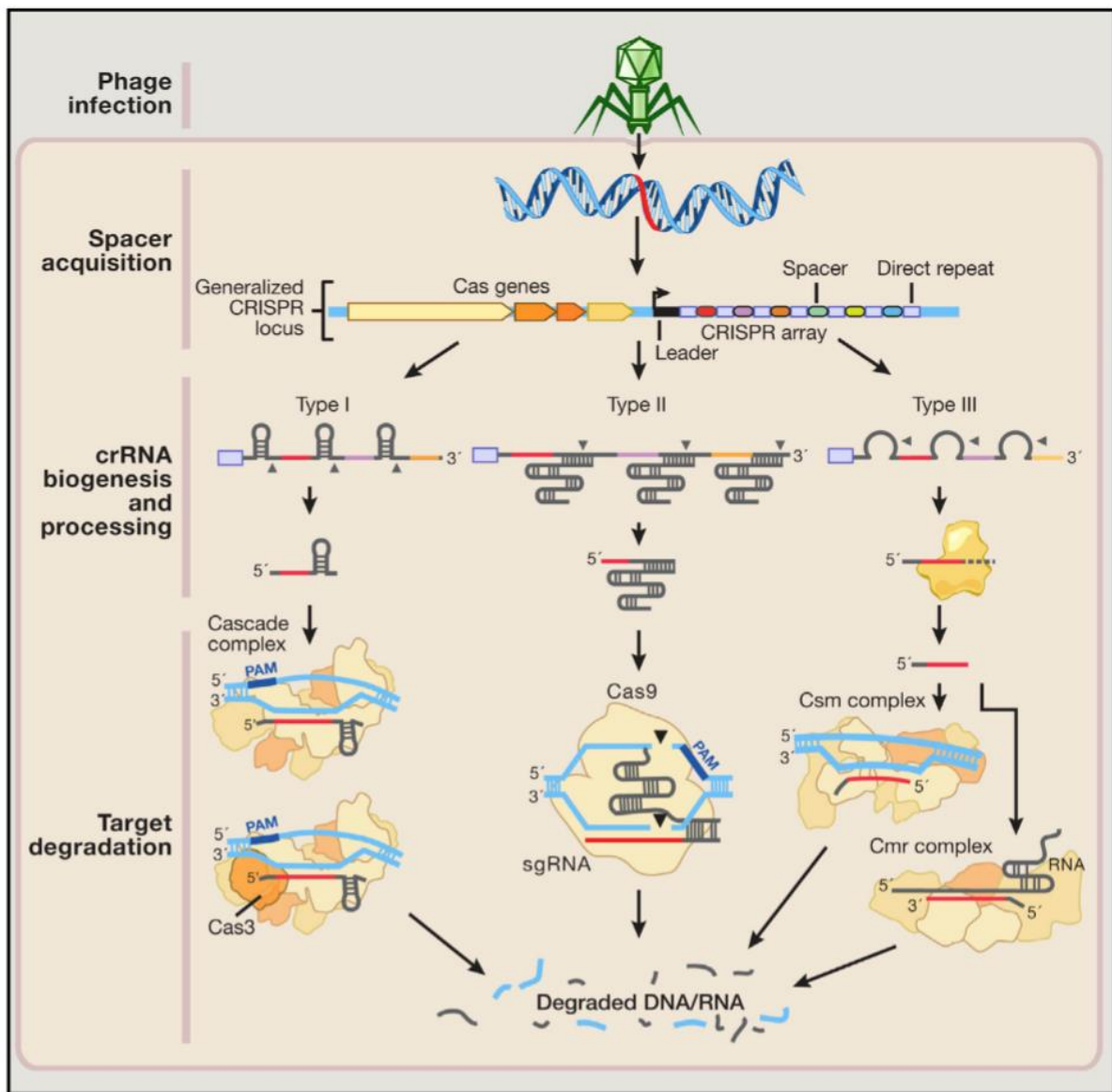


Slika 2.5. Dvolančani lom DNA uzrokovan endonukleazom Cas9 popravlja se putem jednog od dvaju mehanizama - NHEJ (engl. *non-homologous end joining*) i HDR (engl. *homology directed repair*). (Preuzeto iz Ran i sur., 2013).

2.3 Prirodni mehanizam adaptivnog imunološkog sustava kod bakterija

Prethodno spomenuta istraživanja na bakterijama *Streptococcus thermophilus* i *E. coli* dovela su do definiranja tri glavna stadija obrambenog sustava CRISPR-Cas:

1. Adaptacija – nakon napada faga bakterija ubacuje strani genom u svoju DNA
2. Ekspresija – kada virus ponovno napadne, iz sekvenci razmaknica prepisuje se crRNA
3. Interferencija – prepoznavanje i uništavanje strane DNA ili RNA (Slika 2.6.).



Slika 2.6. Prirodni mehanizam CRISPR sustava u adaptivnom imunološkom sustavu bakterija (Preuzeto iz Hsu i sur., 2014).

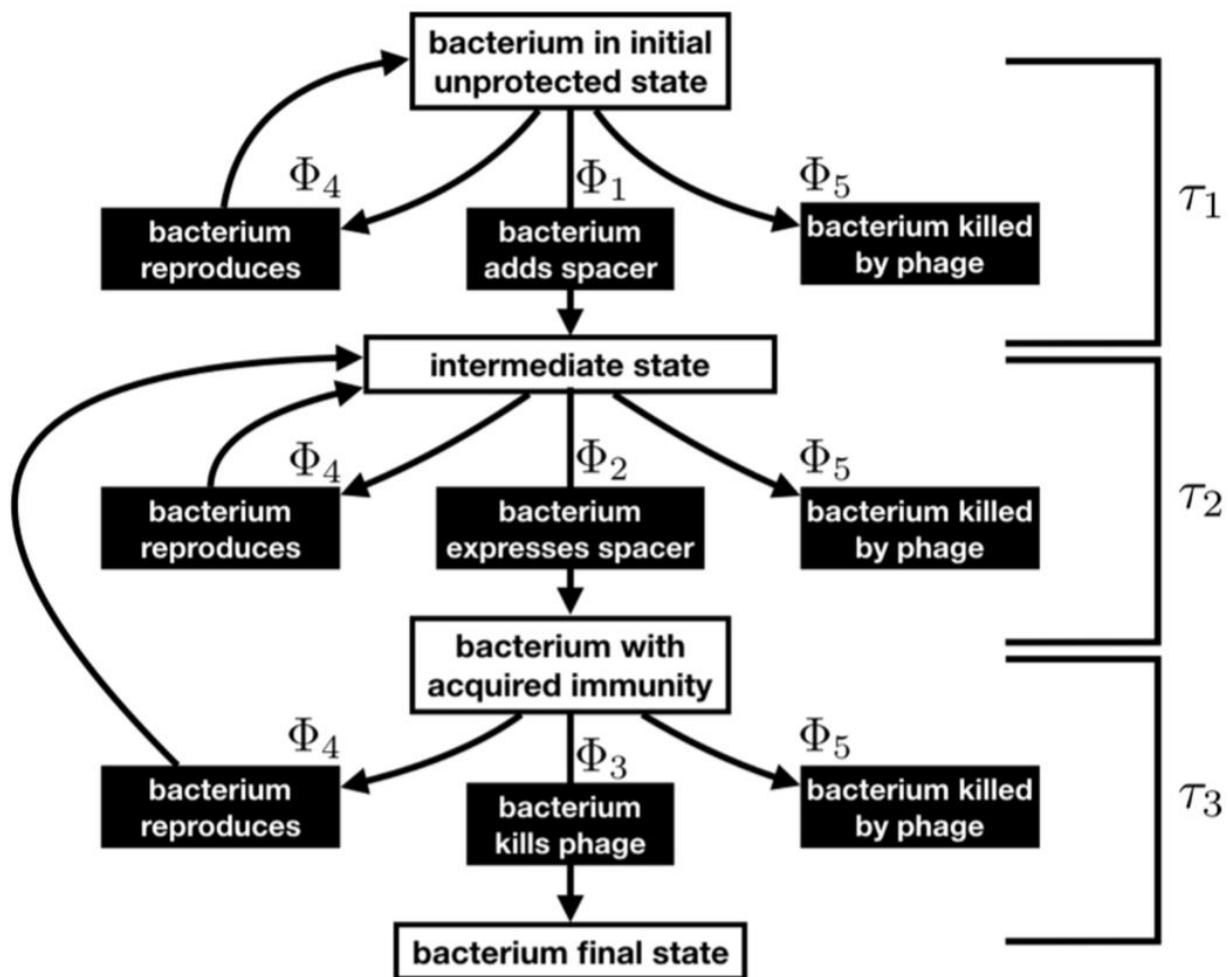
Nakon što strani genetski element (primjerice iz faga ili plazmida) napadne stanicu (faza 1 – infekcija fagom) enzimi Cas dobiju razmaknice iz egzogenih sekvenci proto-razmaknica i postavljaju ih na lokus CRISPR unutar prokariotskog genoma (faza 2 – stjecanje razmaknice, engl. *spacer acquisition*). Razmaknice odvajaju ponavljajući sljedovi (engl. *direct repeat*) što čini niz CRISPR (engl. *CRISPR array*). Svaki od tri tipa sustava ima jedinstvene puteve obrade i biogeneze. Kod tipova I i III, pre-crRNA transkript se cijepa unutar ponavljanja pomoću ribonukleaza, otpuštajući male crRNA. Tip III crRNA se obrađuje RNazom na 3' kraju da bi se stvorio zreli transkript. Zrele crRNA iz tipova I i III dolaze na kompleks proteina efektora za prepoznavanje i degradaciju mete. Kod tipa II, tracrRNA hibridizira s ponavljajućim sljedovima, stvarajući RNA dupleks koji tada cijepaju endogena RNaza III i pomoćne nukleaze.

Tipovi I i III koriste interferenciju više proteina da bi se olakšalo prepoznavanje ciljne sekvence DNA – primjerice u tipu I, kaskadni kompleks sadrži molekulu crRNA i formira kompleks koji prepoznaje ciljnu DNA te tada regrutira Cas3 nukleazu koja posreduje u degradaciji ciljne DNA. U tipu III, crRNA se udružuje s kompleksom Csm ili Cmr koji vežu i cijepaju supstrate DNA i RNA. S druge strane, kod tipa II potrebna je samo nukleaza Cas9 da bi se degradirala DNA koja odgovara njenom dupleksu RNA (Hsu i sur., 2014).

2.3.1 Fizikalni model stanja ko-evolucije bakterije i faga

Detaljan opis stanja u kojem bakterija i fag koegzistiraju daje se preko Markovog modela, odnosno Markovog lanca (Slika 2.7.). Markov lanac je stohastički model koji opisuje niz mogućih događaja pri čemu vjerojatnost svakog događaja ovisi samo o stanju dobivenom nakon prethodnog događaja.

Bakterije mogu imati međusobno različiti CRISPR sustav, a virusi mogu biti različitog podrijetla. Evolucija bakterija i faga je u međusobnom odnosu i podilazi dinamičkim promjenama. Također, bakterije sa većom sposobnošću preživljavanja imati će više generacija, a fagi sa manjim kapacitetom otpora na CRISPR sustav će se prestati reproducirati i time smanjiti broj faga određenog podrijetla (Han i sur., 2013).



Slika 2.7. Markov model za CRISPR adaptaciju, ekspresiju i interferenciju. Svaka faza označena je svojim karakterističnim vremenskim skalama τ (Preuzeto iz Bonomo i Deem, 2018).

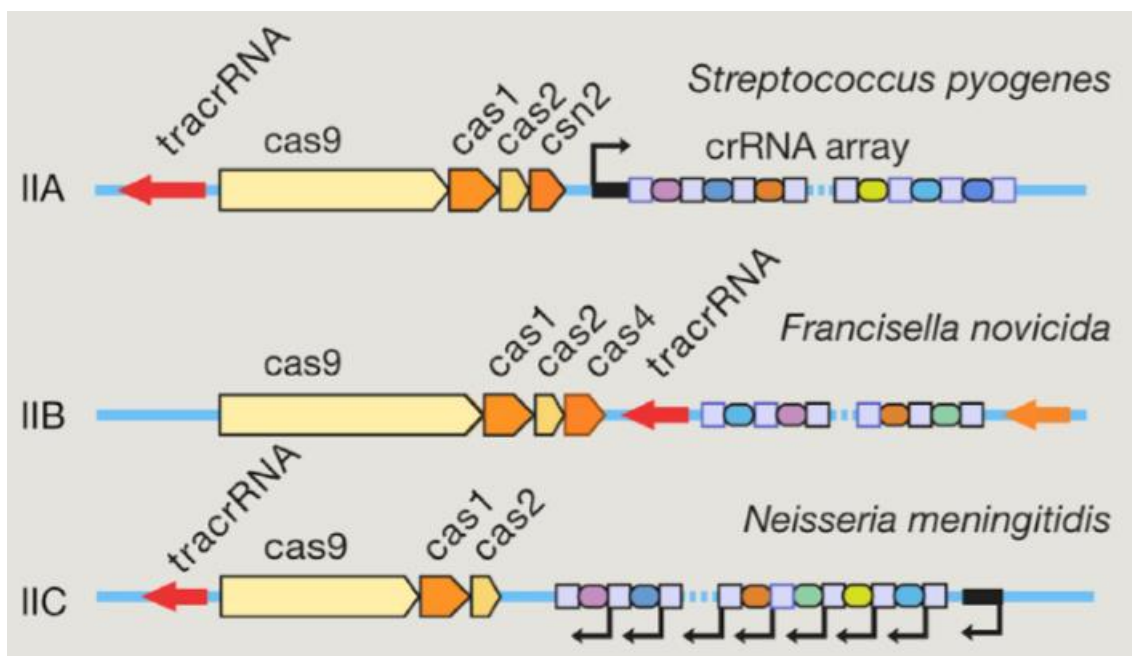
Do svakog događaja u Markovom procesu dolazi s vjerojatnošću Φ_i . U slučaju kada je bakterija u početnom stanju bez zaštite od virusa može doći do jedne od tri situacije: reprodukcija bakterije, virus uništava bakteriju ili bakterija uzima razmaknice te ih prepisuje kao crRNA. Kada virus ponovno napadne, a bakterija sada ima imunitet, još uvijek postoji vjerojatnost da će virus uništiti bakteriju, međutim postoji i vjerojatnost suprotnog događaja u kojem bakterija uništava virus (Bonomo i Deem, 2018).

3 CRISPR sustav tipa II i građa kompleksa Cas9

Proteini Cas sustava pomažu u prihvaćanju strane DNA i imunološkom odgovoru stanice domaćina na napad stranog tijela. Za funkciju CRISPR sustava tipa II i ulogu u cijepanju DNA najvažniji je protein Cas9 i stoga je bitno razumijevanje njegove strukture.

3.1 Klasifikacija CRISPR lokusa u tipu II

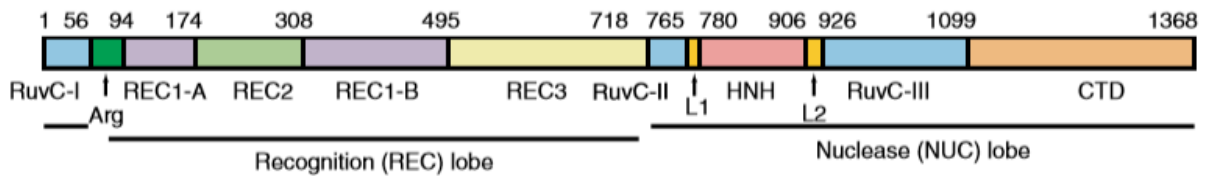
U različitim bakterija postoji više različitih gena za proteine Cas i oni se međusobno razlikuju u sekvenci i veličini. Gen za protein Cas9 povezan je isključivo sa sustavom CRISPR tipa II. CRISPR lokusi tipa II se na temelju različitosti gena *cas* dijele u tri podtipa: IIA, IIB i IIC (Slika 3.1.). Svim tipovima zajednički su geni *cas9*, *cas1* i *cas2*, niz CRISPR i *tracrRNA* (Makarova i sur., 2011a; Chylinski i sur., 2013).



Slika 3.1 Klasifikacija lokusa CRISPR u tri tipa. Uz zajedničke elemente *cas9*, *cas1* i *cas2*, niz CRISPR i *tracrRNA*, tipovi A i B sadrže dodatne gene *csn2*, odnosno *cas4* (Preuzeto iz Hsu i sur., 2014).

3.2 Građa proteina Cas9

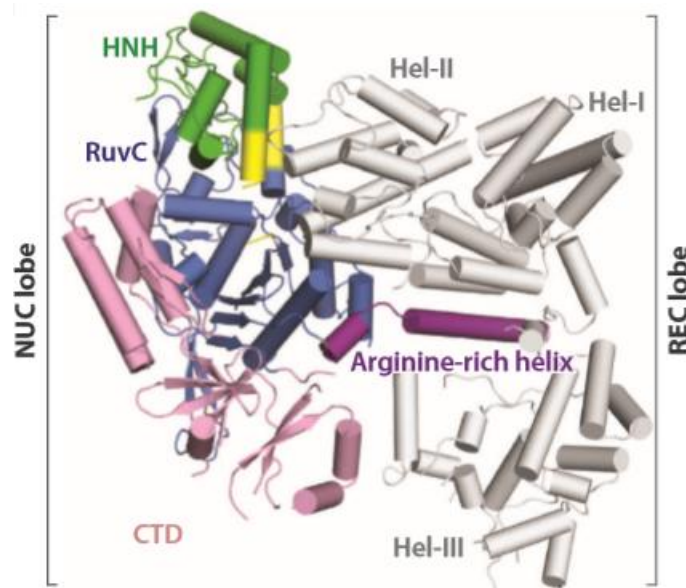
Svi proteini Cas9 imaju zajedničku strukturu koja se može podijeliti na dva izražena dijela, REC i NUC (Slika 3.2.). REC čine tri domene oblika alfa zavojnica (Hel-I, Hel-II i Hel-III, odnosno REC1, REC2 i REC3) i one nemaju sličnu strukturu ostalim poznatim proteinima. Nukleazni (NUC) dio sadrži nukleazne domene HNH i RuvC i terminalnu domenu C (CTD) na kojoj se nalazi međudjelujuće mjesto PAM (Slika 3.3.). NUC i REC povezuje most bogat argininom, tzv. struktura „most-zavojnica“ (engl. *bridge helix*) (Jiang and Doudna, 2017).



Slika 3.2. Organizacija domena proteina Cas9 u bakterije *S. Pyogenes* (Preuzeto iz Zhu i sur., 2019).

REC domene imaju ulogu u vezanju vodič RNA (gRNA, koja sadrži crRNA i tracrRNA) pri aktivaciji proteina Cas9. Pri tom vezanju dolazi do konformacijskih promjena u proteinu koje uzrokuju aktivaciju nukleazne aktivnosti Cas9. Moguće mutacije u domeni REC II (Hel II) mogu dovesti do smanjenja nukleazne aktivnosti, dok mutacije u domeni REC I (Hel I) u potpunosti eliminiraju aktivnost (Nishimasu i sur., 2014). Domena REC III doživljava najznačajnije konformacijske promjene prilikom vezanja gRNA (Jiang and Doudna, 2017).

Domena „most-zavojnica“ bogata je argininom te se pretpostavlja da nakon konformacijskih promjena ima ulogu u vezanju ciljne DNA, ali potencijalno i prethodno tome u vezanju vodič RNA (gRNA) (Hsu i sur., 2014). Ta pretpostavka polazi od zapažanja kako su mutacije u toj regiji bogatoj argininom u proteinu Cas9 kod bakterije *Francisella novicida* uzrokovale njegovu nefunkcionalnost (Sampson i sur., 2013).



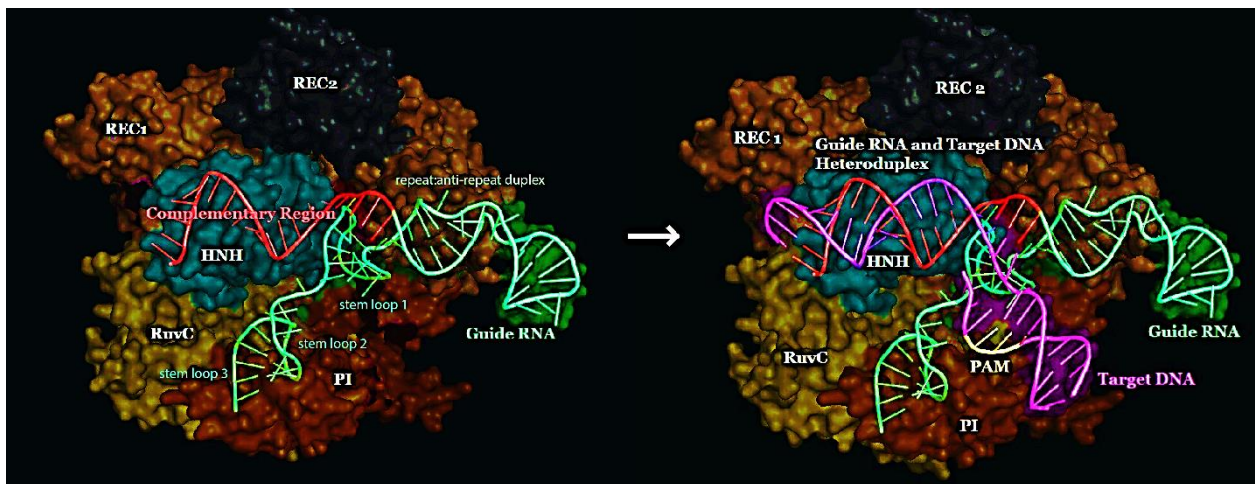
Slika 3.3. Struktura Cas9 iz bakterije *Streptococcus pyogenes* (SpyCas9) u apo stanju – bez vezane RNA (Preuzeto iz Jiang and Doudna, 2017).

Ključni element Cas9 sustava je kratka sekvenca PAM (engl. *protospacer-adjacent motif*) koja sjeda na 3' kraj ciljne molekule DNA i diktira mehanizam traženja za nukleazu Cas9, odnosno potiče se njezina nukleazna aktivnost – aktiviraju se nukleazne domene HNH i RuvC (Slika 3.4.). Domena HNH cijepa DNA lanac komplementaran vodećoj RNA sekvenci (engl.

target strand), a domena RuvC potrebna je za cijepanje nekomplementarnog lanca (engl. *non-target strand*) čime se izaziva dvolančani lom DNA (Jinek i sur., 2014).

Pri opisu nukleaza TALEN i ZFN spomenut je problem njihove specifičnosti, odnosno učinkovitosti te se isto pitanje može postaviti i za CRISPR-Cas9. Za osiguranje specifičnosti, djelotvornije su dulje gRNA, pošto svaki nukleotid povećava specifičnost nukleaze. Međutim, veća duljina lanca gRNA istovremeno smanjuje učinkovitost vezanja i sparivanja baza (Mali i sur., 2013).

Cas9 posjeduje bolju specifičnost, ali i bolju učinkovitost od ostalih nukleaza, a to duguje upravo kratkoj sekvenci PAM. Inicijalno vezanje Cas9 na sekvencu PAM dozvoljava enzimu da brzo „skenira“ moguće ciljne sekvence. Ako pronade potencijalnu ciljnu sekvencu unutar odgovarajućeg motiva PAM-a, ostatak DNA na ciljnoj DNA bit će razgrađen i potom se provjerava je li ostatak ciljne sekvence komplementaran sekvenci vodiča. Učinkovitost leži u koraku vezanja sekvence PAM upravo zato što je omogućeno skeniranje potencijalnih ciljnih sekvenci i time se izbjegava nepotrebno uništavanje ostalih („non-target“) sekvenci tijekom potrage za komplementarnom sekvencom (Sternberg i sur., 2014).



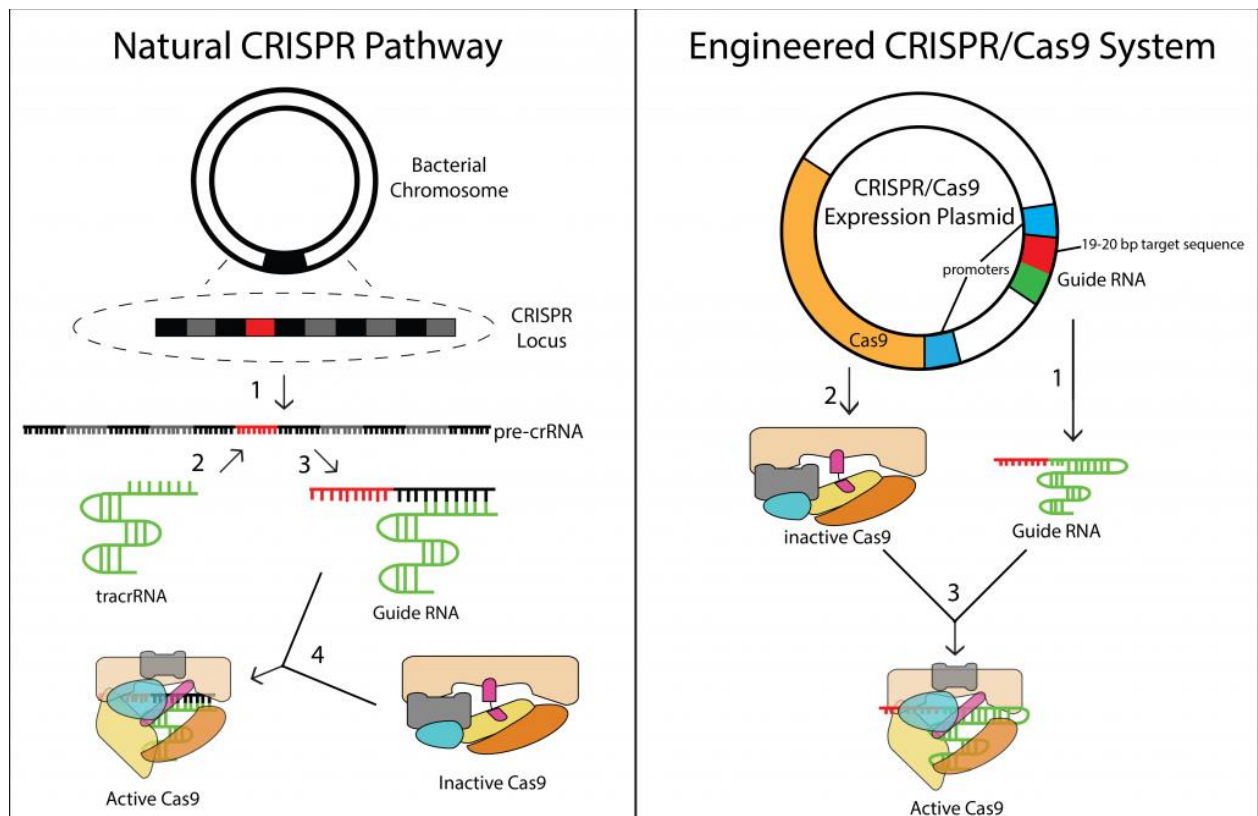
Slika 3.4. Pregled vezanja sustava CRISPR-Cas9 uz kalup DNA (Preuzeto iz Anders i sur., 2014).

4 Adaptacija sustava CRISPR-Cas9 u genetičkom inženjerstvu

Svako modificiranje genoma dovodi do trajnih promjena i stoga je preciznost korištene metode ključan faktor, posebice za kliničku primjenu i gensku terapiju. Nakon otkrića kako je sustav CRISPR-Cas9 programabilan, preostalo je samo pretvoriti ga u lako dostupan alat te je nastupilo razvijanje metodologije za uporabu na prokariotskim, ali i eukariotskim stanicama.

4.1 Programiranje sustava u laboratoriju

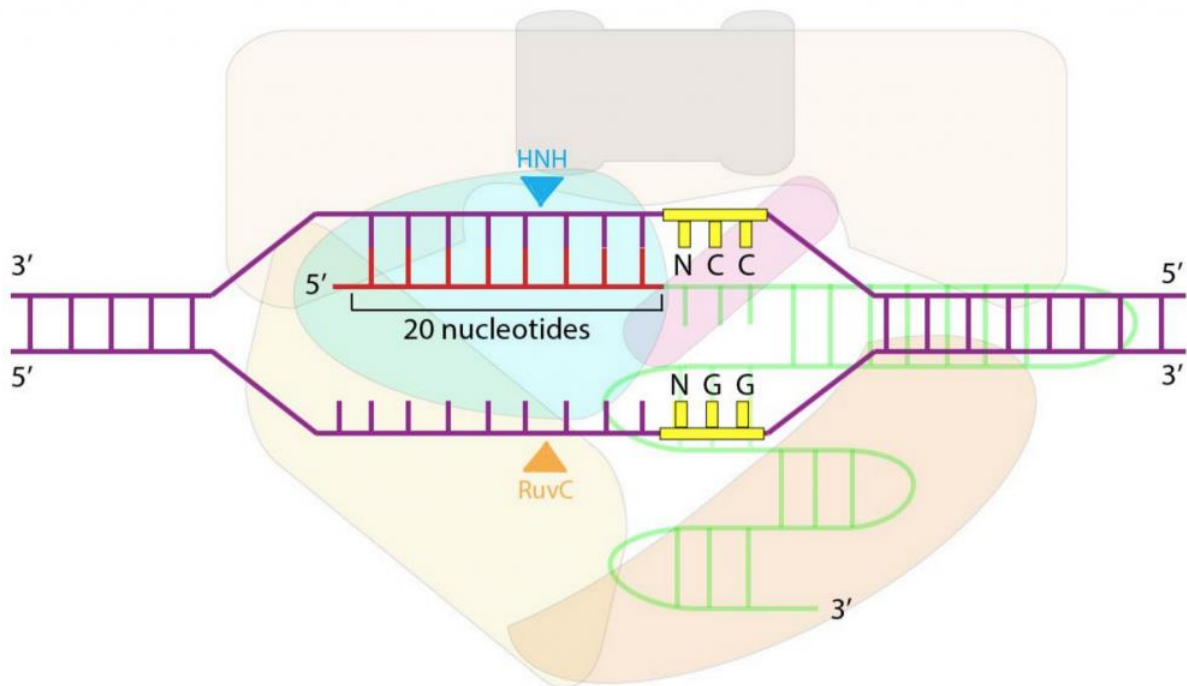
Na slici 4.1. prikazana je usporedba sustava CRISPR u bakteriji (lijevo) i sustava programiranog u laboratoriju (desno). Umjesto prirodno nastalog hibrida crRNA i tracrRNA radi se umjetna hibridizacija sgRNA (engl. *single guide RNA*) s dodanom ukosnicom, bitnom za stabilnost kompleksa Cas9-sgRNA-DNA. SgRNA dala je učinkovitije rezultate u uvjetima „*in vivo*“ (Jinek i sur., 2012).



Slika 4.1. Usporedba prirodnog CRISPR sustava tipa II (u bakteriji *Streptococcus pyogenes*) i plazmidnog (laboratorijskog) CRISPR sustava. Lijevo: 1. Transkripcija pre-crRNA i tracrRNA, 2. Vežanje tracrRNA na pre-crRNA, 3. Rezanje gRNA iz pre-crRNA, 4. Vežanje inaktivne Cas9 s gRNAi stvaranje aktivne Cas9. Desno: 1. Transkripcija jednolančane gRNA, 2. Transkripcija i translacija nukleaze Cas9, 3. Vežanje gRNA i Cas9 i aktivacija Cas9 (preuzeto s web-poveznice [3]).

Znamo kako Cas9 identificira ciljnu sekvencu DNA (Slika 4.2.) na temelju pronalaska sekvence koja prethodi mjestu PAM (NGG). Međutim, otkriće kako je moguće mutirati mjesto

PAM na proteinu da prepoznaje i druge sekvence PAM proširilo je raspon vezanja PAM (Kleinstiver i sur., 2015).



Slika 4.2. Mjesto gdje Cas9 cijepa DNA, određeno PAM-om (NGG) i gRNA komplementarnim lancem (preuzeto s web-poveznice [3]).

Osim mutacija u domeni PAM moguće je utjecati na specifičnost kompleksa i točkastim mutacijama sekvenci koje kodiraju za nukleazne domene HNH, odnosno RuvC. Tim mutacijama inaktiviraju se domene i umjesto dvolančanog loma dolazi do jednolančanog loma. Ovakav tip loma koristi se kada su dvije gRNA, odnosno dva kompleksa u blizini, pošto ih stanica onda prepoznaje kao dvolančani lom poboljšavaju specifičnost do x1500 puta u odnosu na prirodni sustav Cas9 (Ran i sur., 2013).

Da bi došlo do vezanja i stvaranja aktivnog kompleksa Cas9 te u konačnici lomova DNA potrebna je visoka komplementarnost, ali ulogu igra i nekolicina drugih faktora. Kod nedovoljno visoke komplementarnosti dolazi do situacija u kojima se gRNA djelomice spari s ciljnom DNA te se započne odmatanje DNA, ali upravo zbog manjka komplementarnosti ne dolazi do lomova (Hsu i sur., 2014).

Komplementarnost gRNA i ciljne DNA ne mora biti potpuna te se toleriraju razlike u malom broju baza, ovisno o položaju i koncentraciji proteina. Kada je protein prisutan u višim koncentracijama tolerira se više razlika u broju baza, ali preciznost opada. S druge strane, pri manjim koncentracijama enzima preciznost raste, ali ukupna učinkovitost lomova pada. Manipulacija koncentracijom enzima stoga je jedna od metoda poboljšanja preciznosti sustava.

Uz navedene faktore postoji i pretpostavka da vremensko trajanje ekspresije proteina ima ulogu u njegovoj aktivnosti (Hsu i sur., 2013).

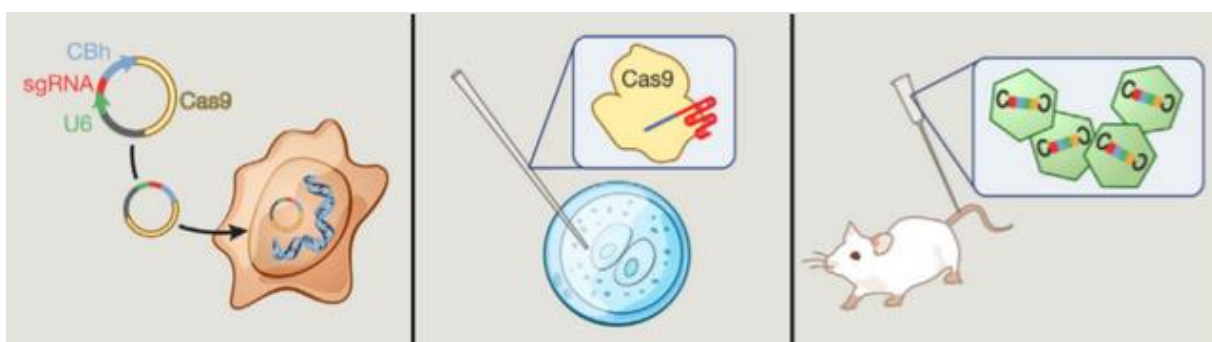
4.2 Unos kompleksa Cas9 u stanicu

Postoji više metoda unosa Cas9 kompleksa u stanicu (Slika 4.3.), a odabir metode ovisi o tipu stanica s kojima se radi, ciljnoj DNA sekvenci, željenoj učinkovitosti, metodi rada, dostupnim sredstvima itd.

Unošenje plazmidnim vektorom je često korištena metoda. Cas9 i gRNA mogu se nalaziti na istom plazmidu, ali postoji i mogućnost njihove ekspresije na različitim plazmidima. Pri korištenju različitih vektora moguće je kombiniranje Cas9 s više različitih gRNA. Korišteni vektori mogu biti i virusni (najčešće lentivirus ili retrovirus MSCV, engl. *Murine Stem Cell Virus*), a učinkovitost unosa plazmidnog vektora najviše ovisi o tipu stanica s kojima se radi.

Unos Cas9 proteina i sgRNA mikroinjekcijom u oplodene zigote koristi se u modelnih organizama sisavaca za postizanje nasljednih genskih modifikacija. Time se vrijeme dobivanja mutiranih jedinki skraćuje na samo nekoliko tjedana umjesto više od godine dana (Hsu i sur., 2014).

Pokazalo se kako je, umjesto plazmidnog vektora, veoma učinkovit unos kompleksa CRISPR kao ribonukleoproteinskog kompleksa (RNP), a sam unos se radi metodom elektroporacije – korištenja električnog polja s ciljem povećavanja propusnosti stanične membrane. Za određene tipove stanica poput embrionalnih matičnih stanica, koje su podložne toksičnosti lipida iz plazmida, takav unos je najučinkovitiji (Kim i sur., 2014).



Slika 4.3. Unos kompleksa CRISPR-Cas9 u stanicu. S lijeva na desno: plazmid koji se može izravno unijeti u stanicu od interesa, mikroinjekcija u oplodene zigote i unos u tkivo ili stanicu pomoću virusnih vektora u svrhu somatskih izmjena (preuzeto iz Hsu i sur., 2014).

5 Dosadašnji uspjesi i trenutne primjene

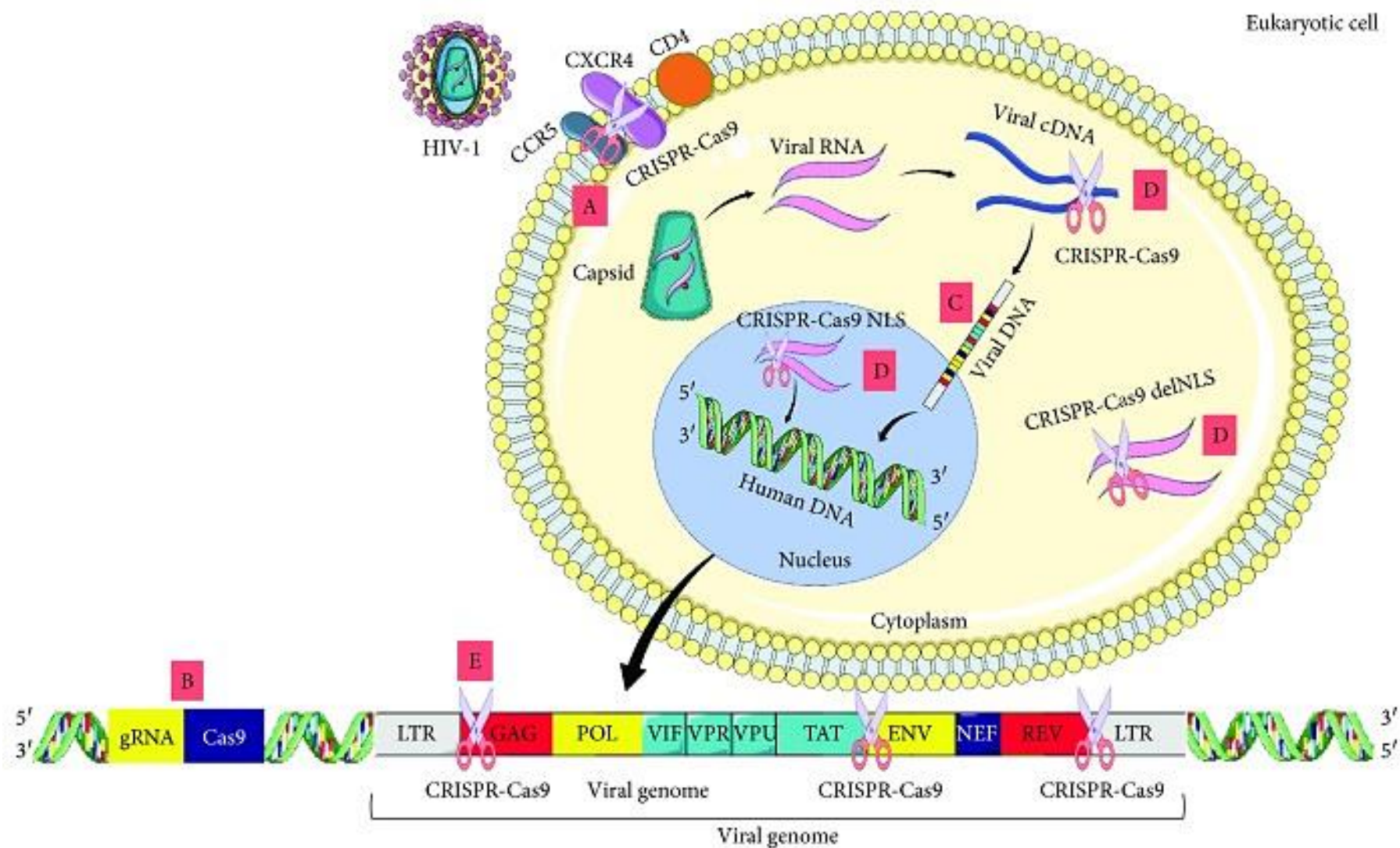
5.1 CRISPR-Cas9 i HIV

Virus humane imunodeficijencije (HIV) je veliki problem širom svijeta od prvih oboljenja početkom 80-ih godina prošlog stoljeća do danas. Prema statistici Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) na kraju 2017. godine 36.9 milijuna ljudi živjelo je s virusom HIV-a, pri čemu je novo zaraženih bilo oko 1.8 milijuna. Postoje dva tipa HIV-a, HIV-1 i HIV-2, te oba uzrokuju sindrom stečene imunodeficijencije, AIDS (Nyamweya i sur., 2013). HIV-2 posjeduje manju prenosivost i manju patogenost dok se HIV-1 smatra glavnim uzročnikom AIDS-a i glavna je meta u liječenju. Visoko aktivna antiretrovirusna terapija (HAART, engl. *highly active antiretroviral therapy*) vodeća je terapija za HIV-1 pacijente (Pallela i sur., 1998).

Pacijenti zaraženi virusom HIV-1 prolaze kroz 3 stadija zaraze: akutna infekcija HIV-om, kronična infekcija HIV-om i klinička bolest, AIDS (Sharp i Hahn, 2011). HIV-1 napada stanicu domaćina tako da veže svoj protein gp120 na receptor CD4 na membrani ciljane stanice nakon čega konformacijske promjene omogućuju vezanje s koreceptorom CCR5 (u T stanicama) ili CXCR4 (u ostalim stanicama). Jednom u stanici, HIV-1 se manifestira u dva oblika infekcije, aktivnom (u velikom broju stanica) i latentnom (u manjem broju stanica). Latentna infekcija je mirujuće stanje gdje zaražene stanice ne stvaraju nove viruse HIV-a i na taj način se virus može pritajiti u organizmu te aktivirati nakon nekoliko godina. Terapija HAART ne može eliminirati latentne viruse i to čini HIV-1 neizlječivom bolesti (Xiao i sur., 2019).

Genska terapija bazirana na CRISPR-Cas genetičkom inženjerstvu pokazala je moguću interferenciju na više stadija zaraze virusom. Na slici 5.1. prikazan je detaljan prikaz ciklusa virusa HIV-a te faze na koje je moguće primijeniti CRISPR-Cas sustav.

Prva faza (Slika 5.1.A) prikazuje vezanje za koreceptore CCR5 i CXCR4. Sustav CRISPR-Cas9 ovdje se koristi za uvođenje mutacija gubitka funkcije u koreceptorima. Tipovi virusa koji koriste koreceptore CCR5 zovu se virusi R5, dok su virusi X4 oni koji koriste koreceptore CXCR4 za ulaz u stanicu. Moguća prirodna delecija 32 para baza u genu CCR5 proizvodi stop kodon i time ne dolazi do ekspresije gena na površini stanice što rezultira otpornošću na infekciju virusom HIV-1 tipa R5 (Sanches da Silva i sur., 2019). Uvođenje takve delecije pomoću CRISPR-Cas9 sustava pristup je koji su imali znanstvenici u San Franciscu (Ye i sur., 2014), a slično istraživanje provedeno je nekoliko godina kasnije u Kini (Qi i sur., 2018). Oba istraživanja rezultirala su mutacijama u koreceptorima te je zabilježena smanjena aktivnost virusa HIV-a u odnosu na nemodificirane stanice. Nekoliko sličnih istraživanja provedeno je



Slika 5.1. Pregled mogućih mjesta utjecaja sustava CRISPR-Cas9 na ciklus zaraze virusom HIV-1 (preuzeto iz Sanches da Silva i sur., 2019).

za koreceptor CXCR4 s ciljem njegovog ranog ometanja da bi se spriječila zaraza. Korištenjem lentivirusa s Cas9 i 10 različitih gRNA usmjerenih na konzervirana mjesta na genu CXCR4 nastojale su se uvesti mutacije gubitka funkcije. Postupak je proveden u više tipova stanica, a kod sviju je zabilježena smanjena ekspresija CXCR4 (Hou i sur., 2015). Postignuto je i smanjenje ekspresije koreceptora CXCR4 za čak 60% u izoliranim ljudskim T stanicama CD4⁺ korištenjem ribonukleoproteina Cas9 za uvođenje mutacija insercije i delecije (Schumann i sur., 2015). Osim zasebnih ometanja koreceptora CCR5 i CXCR4 provedeno je i istovremeno ometanje oba koreceptora pri čemu su sve stanice pokazale smanjenu CCR5 i CXCR4 ekspresiju i otpornost na tipove R5 i X4 (Liu i sur., 2017).

Stabilnom ekspresijom Cas9 i gRNA u genomu stanice moguće je stvoriti preventivnu otpornost protiv zaraze virusom (slika 5.1., B). Liao i suradnici analizirali su infekciju virusom u ljudskim T stanicama u periodu od dva tjedna, a gRNA je bila usmjerena na više mjesta na genomu virusa HIV-1. Zabilježeno je smanjenje ekspresije virusa, a slični rezultati su dobiveni za T stanice CD4⁺ od pet različitih donora. Pomoću stabilne ekspresije proteina Cas9 uspješno su stvorene i anti-HIV ljudske pluripotentne matične stanice, pri čemu je zabilježen i važan izostanak toksičnosti (Liao i sur., 2015). U eksperimentu iz 2014. godine pokazana je imunizacija stanica koje su sadržavale Cas9 i dvije gRNA, A i B, usmjerene na LTR regiju virusa. Nakon zaraze virusom HIV-1 i replikacije stanica (vidljive pomoću ekspresije zelenog fluorescentnog proteina) pokazano je da je spriječena zaraza virusom te su stanice dobile imunitet. Rast stanica nije se razlikovao od kontrolne skupine, a nisu zapažene mutacije na pogrešnim mjestima u genomu (engl. *off-target*) kao ni toksičnost u stanici. Ti rezultati upućuju na korištenje CRISPR-Cas sustava kao potencijalnog cjepiva (Hu i sur., 2014).

Nadalje, proučavano je korištenje sustava CRISPR-Cas9 za sprječavanje replikacije virusa ciljanjem pomoću gRNA na različita mjesta na genomu virusa HIV-1 (LTR, *gag*, *pol*, *tat* i *rev*). To se može dogoditi u citoplazmi ili unutar jezgre (slika 5.1.C). Rezultati takvih istraživanja često su ovisili o kombinacijama korištenih gRNA, a većinom su zabilježena značajna smanjenja u ekspresiji ciljnih gena smanjenja replikacija virusa i zaraženih stanica (Sanches da Silva i sur., 2019).

Uz spomenute metode, napravljeni su i pokušaji da se genom virusa HIV-1 uništi prije integracije u stanicu domaćina (Slika 5.1.D). Testirano je cijepanje genetskog materijala HIV-1 u citoplazmi pomoću Cas9 u „*in vitro*“ uvjetima i time sprječavanje zaraze i integracije. Pomoću zelenog fluorescentnog proteina zapažen je veliki pad u broju pozitivnih stanica (Liao i sur., 2015).

Najveći naponi ulažu se u otkrivanje načina za liječenje latentnog oblika virusa, a do sada su se u tome istaknule dvije strategije (Slika 5.1.E). Prva za metu koristi regije LTR i istovremeno cijepa dvije regije te time uklanja unutrašnji dio provirusne DNA. Drugom metodom ciljaju se virusni geni i time modificiraju i kontroliraju njihove karakteristike (Sanches da Silva i sur., 2019). Dva istraživanja provedena prvom metodom (Hu i sur., 2014; Kunze i sur., 2018) zabilježila su nekoliko mutacija insercija i delecija, što je značilo inhibiciju reaktivacije i replikacije virusa te je postignuto i potpuno izbacivanje provirusnih fragmenata. Eksperimenti provedeni drugom metodom (Liao i sur., 2015; Wang i sur., 2018) uspoređivali su ciljanje strukturnih gena (*gag* i *env*), gena koji kodiraju za enzime (*pol*), pomoćnih gena (*vif* i *rev*) i regije LTR. Iako su dobiveni rezultati inhibicije gena pokazano je kako je ciljanje regije LTR i dalje bilo znatno učinkovitije od ciljanja gena. Još jedna metoda suzbijanja virusa HIV-1 je kombinacija antiretrovirusne terapije (ART) i genetskog inženjerstva temeljenog na CRISPR-Cas9. Naime, kako metoda ART ne može sama iskorijeniti latentne viruse, ali pokazuje učinkovitost kod aktivnih virusa, CRISPR-Cas9 tu se koristi za aktivaciju latentnih virusa HIV-1. Eksperimenti zasnovani na takvoj kombinaciji trajno su uništili viruse bez ikakvih neželjenih učinaka „off-target“ (Xiao i sur., 2019).

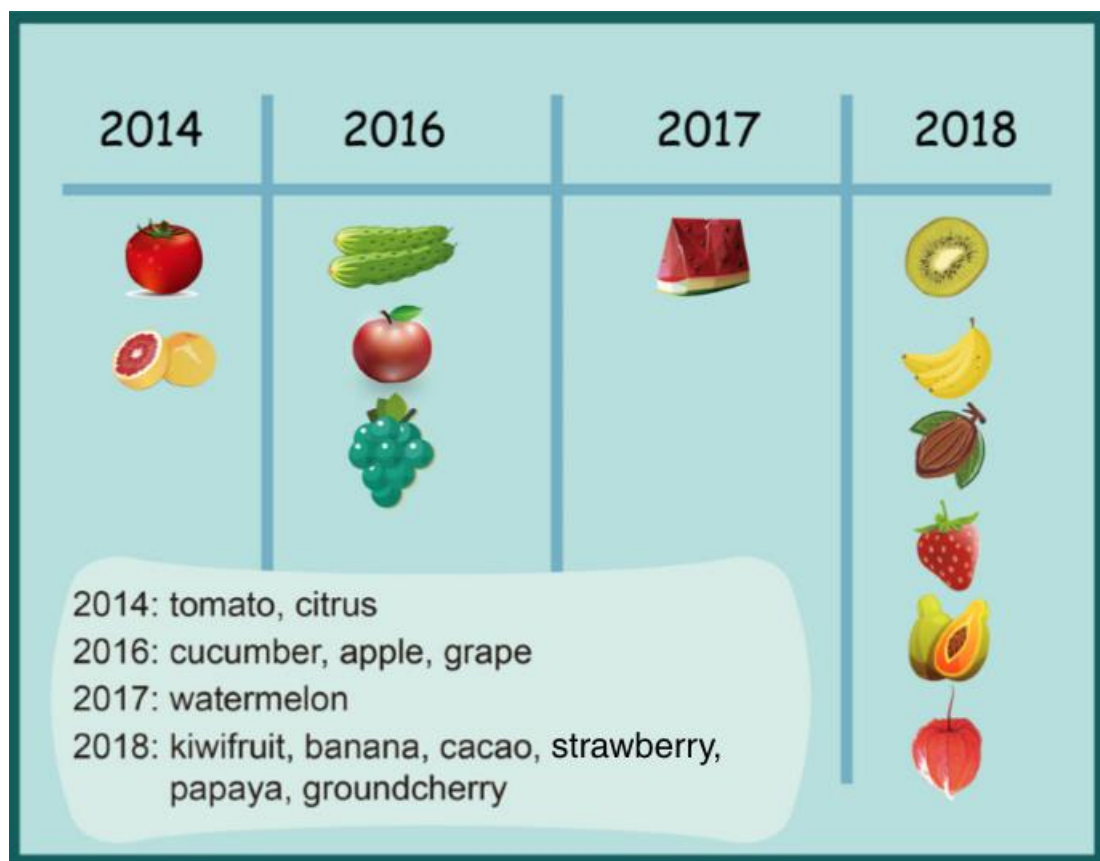
5.2 Primjene CRISPR-Cas9 u poljoprivredi na voćnim usjevima

Voće nije samo veliki izvor vlakana, minerala i vitamina, već se i u brojnim područjima smatra temeljnim namirnicama. Metoda odabira i križanja je prisutna više od stotinu godina i na njoj se temelji današnji uzgoj voća, međutim taj konvencionalni pristup ima nedostatke koje bi trebalo nadvladati. Dobivanje željenih varijacija pri križanju je ograničeno postojećim prirodnim varijacijama alela i često može doći do izostanka genetičke raznolikosti ili pada sposobnosti opstanka („fitness“). Stvaranje novih sorti i kultivara konvencionalnim metodama spor je i dugotrajan proces, koji nerijetko traje desetak godina. Za opskrbu prehrane rastuće ljudske populacij potrebno je razvijati nove tehnologije kako bi se uspostavila stalna opskrba i zadovoljile potrebe potrošača (Wang i sur., 2019).

Kroz protekla dva desetljeća nekoliko je voćnih usjeva genetski modificirano sa svrhom poboljšavanja njihovih svojstava i kvalitete. Za razliku od konvencionalnog uzgoja, tehnologija rekombinantne DNA omogućava prijenos željenih gena iz bilo kojih organizama u voćne usjeve. Uvođenje novih genotipova i fenotipova u svrhu uzgoja u konačnici dovodi do poboljšanja kvalitete voća i duljeg roka trajanja. Genetičko inženjerstvo rangirano je kao tehnologija u poljoprivredi koja se trenutačno najbrže razvija. Organizmi dobiveni tehnologijom rekombinantne DNA se označavaju kao genetski modificirani (GM, engl.

genetically modified), a prvi takav odobren za komercijalni uzgoj u SAD-u bila je rajčica „Flavr Savr“ 1994. godine. Modifikacija te rajčice omogućila je sporije sazrijevanje i spriječilo prerano mekšanje ploda nakon branja. Na razvoj novih GM usjeva utječu potrebne zakonske regulacije i odobrenja čija je uloga spriječiti moguće oštećenje ljudskog zdravlja i okoliša te izbjeći ekonomske gubitke (Wang i sur., 2019).

Jestiva gljiva modificirana sustavom CRISPR zaobišla je regulaciju genetički modificirane hrane u SAD-u 2016. godine pošto nije sadržavala stranu DNA i time nije ušla u kategoriju GM organizama (Kim i sur., 2016). Godinu dana kasnije odobreno je postavljanje na tržište modificiranog lana s povećanim udjelom ulja te soje tolerantne na sušu, obaju modificiranih sustavom CRISPR, što je pokazalo da bi CRISPR tehnologija mogla ubrzati tempo uzgoja novih usjeva (Zaidi i sur., 2018).



Slika 5.2. Prve primjene CRISPR sustava u voćnim usjevima (Preuzeto iz Wang i sur., 2019).

Prva primjena sustava CRISPR-Cas9 bila je 2014. godine na rajčici (Slika 5.2.), kada je ugašen („knockout“) gen *Argonaute 7* što je uzrokovalo promjene u listovima i izostanak peteljki (Brooks i sur., 2014). Upravo na rajčicama napravljen je značajan broj CRISPR eksperimenata. Rajčice, iako su zapravo povrtna kultura, su postale model za biologiju voća, a

provedena istraživanja mogu se svrstati u četiri kategorije: otpornost na biotički stres, otpornost na abiotički stres, poboljšanje kvalitete voća i domesticiranje (Wang i sur., 2019).

Biotički stres podrazumijeva negativan utjecaj koji mogu imati virusi, bakterije, gljivice i kukci na razvoj biljaka. Stoga se tehnologija CRISPR-Cas9 može koristiti u borbi protiv infekcija biljnih usjeva izazvanih tih agensima. Virus TYLCV (engl. *tomato yellow leaf curl virus*) jedan je od najrazornijih virusa za rajčicu, a prenose ga kukci. Pomoću sustava CRISPR-Cas9 dizajnirane su rajčice u kojima se nakupilo znatno manje virusne DNA nego u divljem tipu te su pokazale učinkovitu virusnu interferenciju – manju podložnost ponovnoj infekciji. Takav 'imunitet' rajčica opstao je kroz više generacija i ukazao na visoku korisnost sustava CRISPR-Cas9 pri uzgoju biljki otpornih na viruse (Tashkandi i sur., 2018).

U uzgoju banana jedan od glavnih izazova je virus BSV (engl. *banana streak virus*) koji uzrokuje smanjenu proizvodnju klorofila, pucanje stabljika, a u kasnijim fazama dovodi do truljenja i smrti stanica. Kada se virus BSV inaktivirao sustavom CRISPR-Cas9 pokazano je da 75% modificiranih biljaka nisu imale simptome u odnosu na kontrolu (Tripathi i sur., 2019).

Abiotički faktori uključuju suše, poplave, temperaturne ekstreme, vlagu, strukturu tla, kemijsku toksičnost, fizičke ozljede itd. Kod rajčice je promatran protein CBF1 koji štiti biljku od ozljeda uzrokovanih hladnoćom, na koju je rajčica veoma osjetljiva. Važnost gena *cbf1* za otpornost rajčice na hladnoću ustanovljena je nakon mutacija istog gena pomoću sustava CRISPR-Cas9. Mutanti su pokazali veći broj ozbiljnih simptoma uzrokovanih hladnoćom od divljeg tipa (Li i sur., 2018).

Kvaliteta voća može se definirati preko vanjskih i unutarnjih karakteristika. Vanjski faktori su oni lako primjetni golim okom; veličina, boja i tekstura. Za unutarnje faktore poput razine nutrijenata i bioaktivnih spojeva potrebna su instrumentalna mjerenja (Satpute i sur., 2016). Vanjski faktori u rajčice manipulirani su u više navrata – tako su pomoću CRISPR-Cas9 postignute velike rajčice, ali i žute, roze i ljubičaste rajčice (Wang i sur., 2019). Određene promjene u strukturi rade se s ciljem produljenja roka trajanja, međutim dosadašnja istraživanja rezultirala su lošim izgledom i okusom te smanjenom nutritivnom vrijednošću. Dvije grupe postigle su kontrolu nad mekšanjem rajčica utišavanjem enzima uključenih u truljenje, a nisu izgubile na nutritivnoj vrijednosti (Uluisik i sur., 2016; Yu i sur., 2017).

Nakon domestifikacije biljaka, one se kroz više generacija genetski izoliraju od svojih divljih srodnika. Najveći je utjecaj tog procesa na gene koji kontroliraju morfologiju (veličinu sjemenki, mehanizam raspršivanja, izgled biljke) i fiziologiju (vrijeme klijanja, cvjetanja i

sazrijevanja). Klasično oplemenjivanje križanjem udomaćenih sorti s divljim srođnicima omogućilo bi uvođenje alela divljih rođaka u kultivirane vrste, ali pošto je to proces koji nekada traje desetak ili više godina, suvremeni oplemenjivači sve se više okreću genetičkom inženjerstvu. Izravnom manipulacijom divljih biljaka na razini gena one se udomaćuju „*de novo*“ te se iskorištava njihova prilagodba na novu okolinu. Primjerice, patuljasta rajčica bolje podnosi jake vjetrove od obične rajčice, a nasljedne patuljaste rajčice dobivene su inaktivacijom gena *GAI* (Tomlinson i sur., 2019).

Stvaranje otpornih biljaka te biljaka koje se prilagođavaju na okolinu glavni su ciljevi genetičkog inženjerstva u poljoprivredi. Do sada je unos CRISPR-Cas9 bez strane DNA napravljen u modelnoj biljci *Arabidopsis thaliana*, riži, duhanu, salati, pšenici i krumpiru. Ako se tako dobivene biljke ne svrstaju kao GM usjevi, otvorila bi se vrata za razvoj usjeva sa superiornim fenotipovima te bi postale dostupne i u državama gdje GM usjevi nisu prihvaćeni (Nagamangala i sur., 2015). Međutim, najnovije zakonske odredbe Europske unije iz 2019. godine svrstavaju i sve usjeve modificirane metodom CRISPR-Cas9 kao genetički modificirane, što će znatno otežati prihvaćanje kod farmera i potrošača.

5.3 Klinička istraživanja

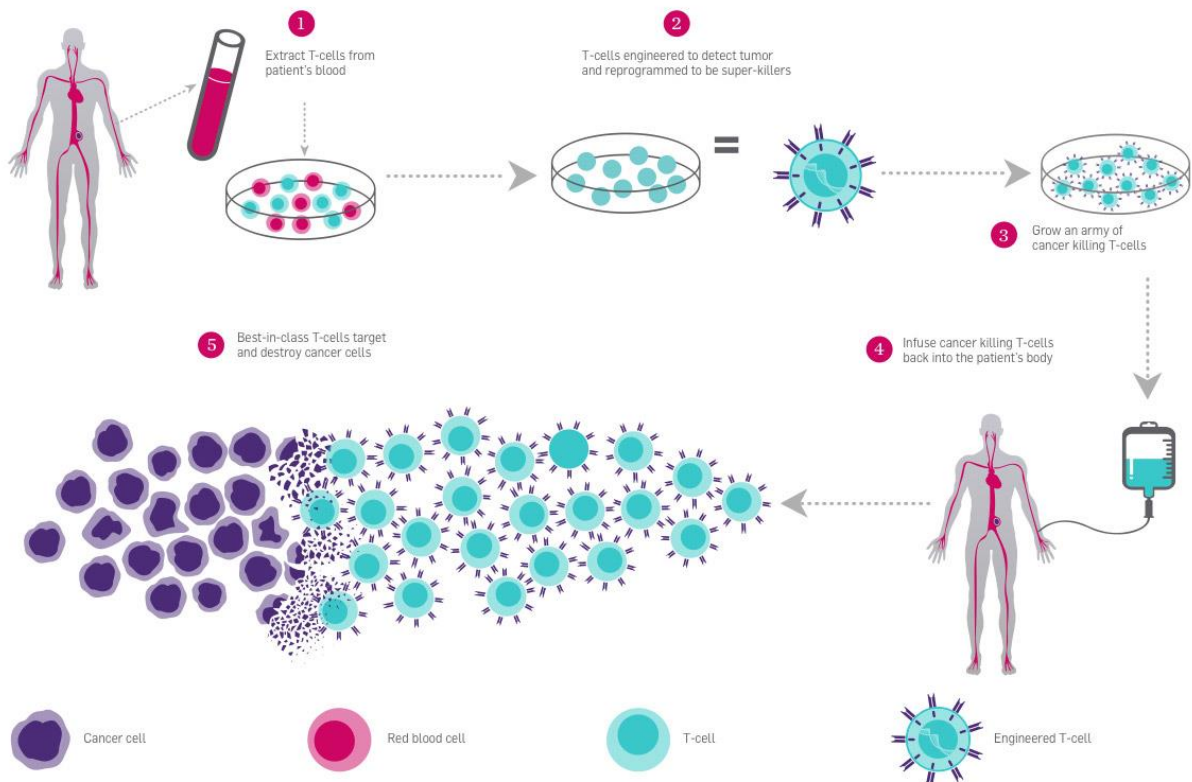
Genska terapija je oblik liječenja bolesti koji uključuje promjene na DNA ili RNA s ciljem neutraliziranja ili popravljavanja stanja uzrokovanih neispravnim genima. Iako je genska terapija rizična i još uvijek se rade brojna testiranja, ona je vrlo obećavajuća opcija za liječenje ljudskih bolesti, uključujući nasljedne bolesti, neke tipove raka i određene virusne bolesti (Naldini i sur., 2015). Genska terapija ima mogućnost izliječiti bolest u samom korijenu i stoga se tehnike modifikacije nukleinskih kiselina oslanjaju na razvoj preciznih alata za sekvenciranje i analizu patogeneze bolesti. Također, tretman bolesti je usmjeren na određivanje jedinstvenih molekularnih karakteristika individualnih pacijenata, što se danas naziva „preciznom medicinom“ (Li i sur., 2018).

Metoda CRISPR-Cas9 preokrenula je polje genske terapije zahvaljujući karakteristikama poput svoje jednostavnosti te vremenske i financijske isplativosti. Od 2013. godine i prvih potvrda funkcionalnosti tehnike CRISPR-Cas9 u ljudskim stanicama do danas sustav je primijenjen na brojnim staničnim linijama i organizmima. Do danas su pomoću te tehnike uspješno izliječene genetske bolesti u životinjskim modelima, a prva klinička istraživanja započela su 2016. godine. Istraživanja provedena na stanicama i manjim životinjama dala su potvrde o učinkovitosti terapija za popravljavanje mutacija koje uzrokuju genetske bolesti.

Uspješni primjeri popravka gena uključuju bolesti poput Duchenne mišićne distrofije (DMD), bolesti srpastih stanica (SCD, engl. *sickle cell disease*) i beta talasemije (You i sur., 2019). Za Duchenne mišićnu distrofiju dostupni su podaci s istraživanja na većim životinjama, gdje su kod pasa s tom bolešću uočena poboljšanja u svojstvima mišićnog tkiva i djelomično vraćena ekspresija proteina distrofina (Amoasii i sur., 2018).

Popis tekućih kliničkih istraživanja dan je u Tablici 5.1., međutim do danas je objavljeno jako malo rezultata. Većina kliničkih ispitivanja bazira se na tri područja – rak, poremećaje krvi i bolesti oka. Trenutna CRISPR ispitivanja imaju namjeru uvesti određene promjene u tkiva, ali bez utjecaja na spermije ili jajne stanice, odnosno bez mogućih promjena u DNA budućih generacija (preuzeto s web-poveznice [4]).

Liječenje raka primjenom tehnike CRISPR trenutno su usmjerene uglavnom na liječenje leukemija i limfoma. Bijele krvne stanice (T stanice) okružene su receptorima koji prepoznaju ostale stanice kao sigurne ili prijeteće te patroliraju tijelom, ubijajući strane ili opasne stanice. Genska imunoterapija T stanica jedna je od najviše obećavajućih strategija u liječenju raka, a uključuje terapije CAR (engl. *chimeric antigen receptor*) i TCR (engl. *T cell receptor*) (You i sur., 2019). Pri imunoterapiji CAR, genetski se programiraju pacijentove T stanice koje imaju receptor koji prepoznaje stanice raka i signalizira T stanicama da napadnu. Neki receptori T stanica funkcioniraju kao kontrolne točke koje određuju dolazi li do imunološkog odgovora. Kada receptor PD1 stupi u kontakt s molekulom PD-L1 na stanici on signalizira T stanicama da je stanica sigurna i one je zaobilaze. Neke stanice raka imaju velike količine molekule PD-L1 i tako izbjegnu napad T stanica. CRISPR tehnika ovdje se koristi za izmjenu gena *PDI* u T stanicama da bi se zaustavila proizvodnja funkcionalnih receptora PD1 i time se izbjegla prevara od strane stanica raka. Taj pristup naziva se inhibicija kontrolnih točaka i koristi se u kombinaciji s inženjerstvom CAR da bi se T stanicama omogućili što veći izgledi u uništavanju stanica raka. Stanice raka uzimaju se iz krvi pacijenta i modificiraju u laboratoriju i takvo genetičko inženjerstvo „*ex vivo*“ garantira da korišteni alat dolazi u kontakt samo s ciljnim stanicama (Slika 5.3). Dostava modificiranih T stanica u krv moguća je infuzijom i upravo zbog jednostavnosti dostave rak krvi je jedan od prvih ciljeva terapije pomoću tehnike CRISPR (web-poveznica [4]).



Slika 5.3. Pregled postupka imunoterapije (preuzeto s web-poveznice [4]).

Crvene krvne stanice koriste hemoglobin za prenošenje kisika iz pluća u ostale dijelove tijela. Mutacije u genima za hemoglobin uzrokuju dva genetska poremećaja, beta talasemiju i anemiju srpastih stanica. Oboljeli od beta talasemije ne proizvode dovoljno hemoglobina što vodi do anemije i iscrpljenosti, a kod težih slučajeva dolazi i do oštećenja organa, posebice jetre, kosti i srca. Kod anemije srpastih stanica krvne stanice poprimaju nefunkcionalne, šiljaste oblike i potom, nakupljajući se u trombove, blokiraju krvne žile te usporavaju ili zaustavljaju dotok krvi. To uzrokuje naglu i jaku bol, a komplikacije dovode do kronične boli, oštećenja organa, udara i anemije. Pacijenti oboljeli od tih bolesti unatoč mogućim tretmanima nastavljaju imati ozbiljne simptome i komplikacije te im je potrebna česta transfuzija krvi. Trenutna klinička istraživanja o mogućnostima primjene tehnike CRISPR za cilj imaju povećanje razine fetalnog hemoglobina u odraslih ljudi. Taj oblik hemoglobina fetus proizvodi tijekom embrionalnog razvoja, dok ga djeca i odrasli ne proizvode. Nije poznato zašto ljudi prelaze s jednog oblika hemoglobina na drugi, ali fetalni hemoglobin može zauzeti mjesto poremećenog hemoglobina u crvenim krvnim stanicama odraslog čovjeka. Nakon izoliranja krvnih matičnih stanica pacijenta, one se pomoću sustava CRISPR-Cas9 modificiraju za povećanu ekspresiju fetalnog hemoglobina (HbF). Vjeruje se da će se tijekom vremena stvoriti crvene krvne stanice s povećanim razinama HbF-a što bi moglo umanjiti ili eliminirati simptome kod oboljelih.

Godine 2017. CRISPR Therapeutics i Vertex Pharmaceutical započele su razvoj i komercijalizaciju te metode, a prvi konkretni rezultati očekuju se krajem 2019. godine (web-poveznica [5]).

Za razliku od spomenutih ispitivanja na bolestima raka i krvnih stanica, istraživanje koje se planira provesti kod ljudi s naslijeđenom sljepoćom uključivat će tretman „*in vivo*“. Leberova kongenitalna amauroza (LCA) je nasljedna bolest mrežnice koja uzrokuje značajan gubitak vida već u prvim mjesecima života, a najčešći tip bolesti je LCA10. Fotoreceptorske stanice u oku pretvaraju svjetlo u živčani signal koji putuje do mozga, a mutacije LCA10 u genu za fotoreceptor uzrokuju proizvodnju skraćenih i neispravnih proteina i disfunkciju stanica. Oko ljudi oboljelih od LCA10 prima svjetlost, ali disfunkcionalne fotoreceptorske stanice ne odašilju signale mozgu te bez komunikacije između očiju i mozga dolazi do manjka vida ili sljepoće. Liječenje te bolesti zasniva se na promjeni neispravnog fotoreceptorskog gena LCA10 metodom CRISPR, s ciljem stvaranja učinkovitog gena i proizvodnje potpunih funkcionalnih proteina te povratka vida. Pacijentima se daje jednokratna doza komponenti CRISPR ubrizgavanjem direktno u oko, pri čemu injekcija sadrži nepatogeni virus koji nosi Cas9 protein i gRNA. Za terapiju LCA10 virus je dizajniran tako da se promijenjeni gen aktivira samo u stanicama fotoreceptora. Najveći rizici terapije „*in vivo*“ su da vektori koji unose sustav u stanicu izazovu opasne imunološke odgovore te da enzimi CRISPR ostanu predugo u stanicama pošto to povećava izgleda da cijepaju nepoželjna mjesta na molekuli DNA. Međutim, oči imaju manju imunološku reaktivnost u usporedbi s većinom ostalih tkiva i time je rizik od opasnih imunoloških odgovora malo vjerojatan. Također, oko je relativno izolirano što otežava CRISPR enzimima da dođu u druge dijelove tijela i proizvedu nepoželjne modifikacije u genomu. Početak ovog kliničkog ispitivanja očekuje se krajem 2019. godine, a ako dođe do pozitivnih rezultata to bi bila prva demonstracija direktnog popravka genetske bolesti (web-poveznica [4]).

Unatoč znatnom napredovanju tehnologije CRISPR-Cas9, pitanje sigurnosti i učinkovitosti terapije i dalje uzrokuju zabrinutost u području kliničkih ispitivanja. Najveću prepreku čine mogući neželjeni rezultati („*off-target*“), odnosno mogućnost da Cas9 cijepa na neželjenim mjestima u genomu koja sadrže sekvence slične onima ciljanih gena. Za poboljšanje specifičnosti sustava CRISPR-Cas9 radi se na poboljšanju dizajna gRNA, proizvode se nove verzije nukleaza Cas9 i optimiziraju načini unosa sustava u stanicu. Novo dizajnirane varijante xCas9 i HypaCas9 su vrlo precizne te ne cijepaju DNA na neželjenim mjestima. Također, poboljšanja u dizajnu sekvenci gRNA smanjit će neželjene učinke tog sustava. Postoje i novi alati dizajnirani za predviđanje ishoda genetskih modifikacija i identifikaciju potencijalnih

mjesta „off-target“ (GUIDE-seq, BLESS, HTGTS i Digenome-seq). Osim stvaranja mutacija na pogrešnom mjestu u genomu („off-target“), zabrinutost uzrokuju moguće delecije i preraspodjele na molekuli DNA ciljnih stanica (You i sur., 2019). U ljudskim i mišjim staničnim linijama zabilježene su velike delecije i kompleksne genomske preraspodjele (inercije, inverzije i kombinirani oblici) u susjednim i udaljenim regijama ciljanih mjesta cijepanja (Kosicki i sur., 2018). Još jedna prepreka u optimizaciji sustava CRISPR-Cas9 je što se u dosadašnjim eksperimentima koristio standardni ljudski genom, međutim, među ljudima postoje brojne individualne genetske varijacije zbog kojih može doći do nepoželjnih modifikacija čak i s dobro programiranom gRNA (Scott i sur., 2017). Klinička uporaba tehnologije CRISPR-Cas bi zato trebala biti kombinirana s prethodnim sekvenciranjem cijelog genoma pacijenta te predviđanjima rezultata i rizika, uz neophodno naknadno praćenje pacijenta (You i sur., 2019).

Tablica 5.1. Detalji kliničkih ispitivanja koja koriste CRISPR-Cas9 sustav (preuzeto iz You i sur., 2019).

Type of Diseases	Goal	Intervention	Start/End Date	Status	Phase	Study Type	Participants	Sponsor or/and Affiliations	ClinicalTrials.gov ID
Thalassemia	to evaluate efficiency and safety of CTX001	CTX001 (CD34+ hPSCs with CRISPR-Cas9)	Sep 2018/May 2019	recruiting	1, 2	interventional	45	CRISPR Therapeutics	NCT03655678
SCD	to evaluate efficiency and safety of CTX001	CTX001	Nov 2018/May 2022	recruiting	1, 2	interventional	45	CRISPR Therapeutics	NCT03745287
Thalassemia	to evaluate efficiency and safety of HBB-corrected iHSCs	iHSCs (HBB gene correction)	Jan 2019/Jan 2021	not yet recruiting	1	interventional	12	Allife Medical Science and Technology Co., Ltd.	NCT03728322
EBV-related malignancies	to evaluate efficiency and safety of PD1-KO CTLs	Flu, CTX, IL-2, PD1-KO EBV-CTLs	Apr 2017/Mar 2019	recruiting	1, 2	interventional	20	Baorui Liu, Nanjing Drum Tower Hospital	NCT03044743
HPV-related malignancies	to evaluate efficiency and safety of TALEN and CRISPR-Cas9	TALEN and CRISPR-Cas9	Jan 2018/Jan 2019	not yet recruiting	1	interventional	60	Hu Zheng, Sun Yat-Sen University	NCT03057912
NSCLC	to evaluate efficiency and safety of PD1-KO T cells	CTX, PD1-KO T cells	Aug 2016/Dec 2018	active, not recruiting	1	interventional	12	You Lu, Sichuan University	NCT02793856
Renal cell carcinoma	to evaluate efficiency and safety of PD1-KO T cells	IL-2, CTX, PD1-KO T cells	Nov 2016/Nov 2020	not yet recruiting	1	interventional	20	Yinglu Guo, Peking University	NCT02867332
Prostate cancer	to evaluate efficiency and safety of PD1-KO T cells	IL-2, CTX, PD1-KO T cells	Nov 2016/Dec 2020	not yet recruiting	1	interventional	20	Yinglu Guo, Peking University	NCT02867345
Bladder cancer	to evaluate efficiency and safety of PD1-KO T cells	IL-2, CTX, PD1-KO T cells	Sep 2016/Sep 2019	not yet recruiting	1	interventional	20	Yinglu Guo, Peking University	NCT02863913
Esophageal cancer	to evaluate efficiency and safety of PD1-KO T cells	PD1-KO T cells	Mar 2017/Dec 2018	recruiting	2	interventional	21	Shixiu Wu, Hangzhou Cancer Hospital	NCT03081715
Tumor of CNS	to screen and identify alleviating drugs of diseases	collection of stem cells	Nov 2015/Jun 2019	recruiting	–	observational	20	Roger Packer, Children's Research Institute	NCT03332030
Pancreatic neoplasms	to demonstrate RIPK1 inhibitor amplifies Pembro. actions	CRISPR screen, GSK3145095, Pembro.	Nov 2018/Nov 2022	not yet recruiting	2	interventional	220	GlaxoSmithKline	NCT03681951
Ovarian cancer	to develop novel tests to diagnose ovarian cancer	sample collection, CRISPR duplex sequence	Sep 2018/Sep 2019	not yet recruiting	–	interventional	25	University of Washington	NCT03606486
Mesothelin-positive solid tumors	to evaluate efficiency and safety of edited anti-mesothelin CAR-T cells	PD1- and TCR-KO/only PD1-KO anti-mesothelin CAR-T cells	Mar 2018/Jun 2019/Nov 2018/May 2020	recruiting	1	interventional	10	Han Weidong, Chinese PLA General Hospital	NCT03545815
T cell malignancies	to evaluate efficiency and safety of CD7.CAR/28zeta CAR-T cells	CD7.CAR/28zeta CAR-T cells, Flu, CTX	Mar 2019/May 2038	not yet recruiting	1	interventional	21	Rayne Rouce, Baylor College of Medicine	NCT03690011
B cell malignancies	to evaluate efficiency and safety of CD19 and CD20/CD22 CAR-T cells	CD19 and CD20 or CD22 CAR-T cells	Jan 2018/May 2022	recruiting	1, 2	interventional	80	Han Weidong, Chinese PLA General Hospital	NCT03398967
B cell malignancies	to monitor GVHD of allogeneic TCR- and B2M-disrupted CD19 CAR-T cells	TCR- and B2M-disrupted CD19 CAR-T cells	Jun 2017/May 2022	recruiting	1, 2	interventional	80	Han Weidong, Chinese PLA General Hospital	NCT03166878
Myeloma, melanoma, sarcoma	to evaluate efficiency and safety of CAR-T cells	NY-ESO-1 CRISPR (TCRendo and PD1) CAR-T cells, CTX, flu	Sep 2018/Jan 2033	recruiting	1	interventional	18	University of Pennsylvania	NCT03399448

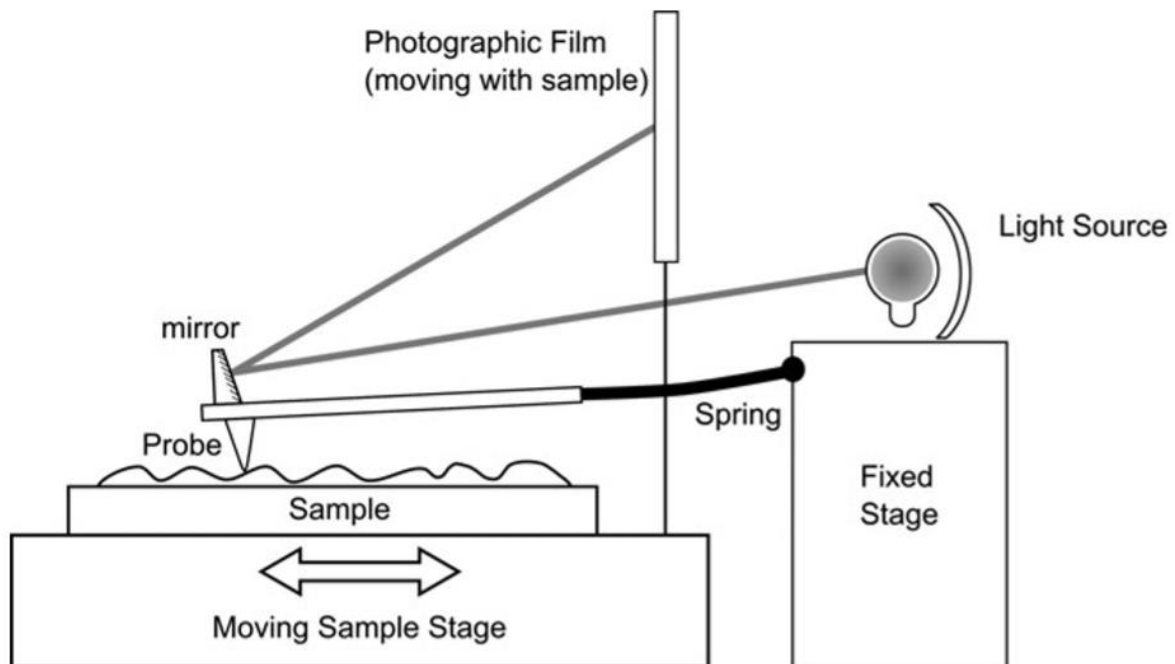
EBV, Epstein-Barr virus; NSCLC, non-small cell lung cancer; KO, knockout; CTLs, cytotoxic T lymphocytes; CTX, cyclophosphamide; Flu, fludarabine; IL-2, interleukin-2; iHSCs, induced pluripotent stem cells; GVHD, graft-versus-host disease; Pembro., pembrolizumab; HPV, human papillomavirus; TCRendo, endogenous TCR.

6 Dobijanje slika proteina u akciji

6.1 Mikroskopija atomskih sila

Mikroskopija atomskih sila (AFM, od atomic force microscopy) je tehnologija koja omogućava pregled i mjerenje površinskih struktura s izuzetnom rezolucijom i preciznošću. Temeljna razlika AFM-a u odnosu na druge mikroskopske tehnike je u tome što ne koristi princip fokusiranja svjetla (optički mikroskop) ili elektrona (elektronski mikroskop) na površinu. Pomoću oštре probe AFM „osjeća“ uzorak, odnosno njegovu površinu i time dobija informacije o visini uzorka – za takvu informaciju bi kod tradicionalnih mikroskopa trebali rotirati uzorak.

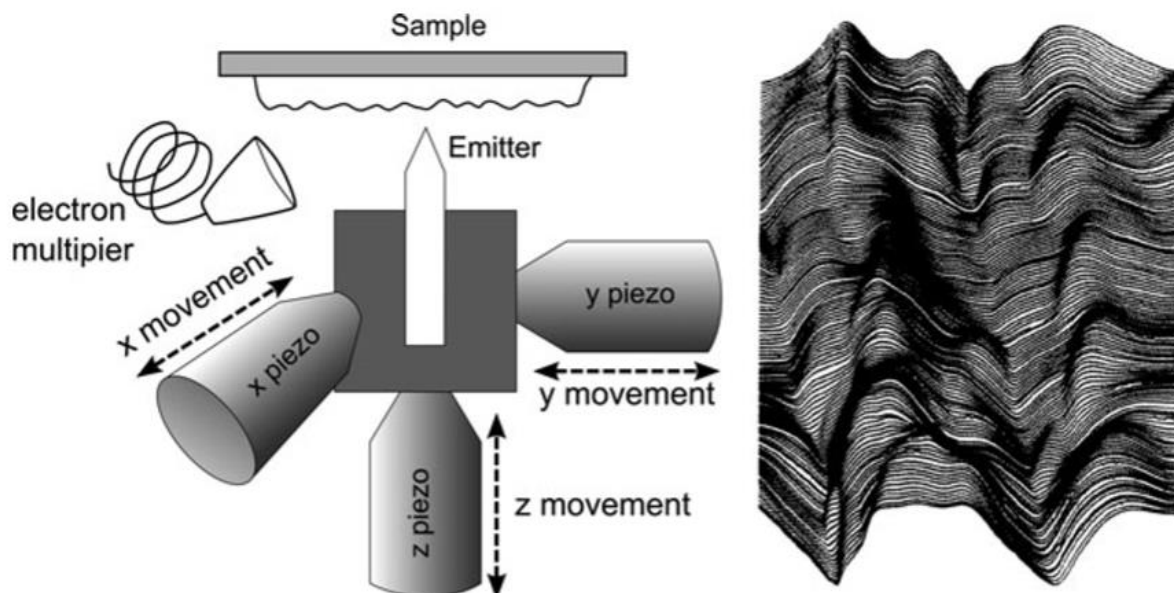
Preteča mikroskopa atomskih sila bio je „stylus profiler“, opisan 1929. godine, čija se mala poluga s vrškom na kraju pomicala preko površine uzorka i tako pravila mapu visine uzorka (slika 6.1). Ovakav tip mikroskopa rezultirao je slikama s uvećanjem većim od 1000 puta. Problem kod stylus profilera bio je moguće savijanje probe pri sudaru s površinom uzorka, što bi u konačnici dovodilo do mogućeg oštećenja probe i uzorka te smanjenja dosljednosti slike.



Slika 6.1. Shema principa rada ranih modela profilera iz 1920-ih godina (preuzeto s web-izvora [2]).

Beskontaktni tip stylus profilera, nazvan topografiner demonstriran je 1971. godine (Young i sur., 1972). Young je koristio činjenicu da emisija struje elektronskog polja između metalne probe i površine znatno ovisi o udaljenosti probe kod električki vodljivih uzoraka. Kod topografinera proba je postavljena direktno na piezoelektrični keramički element koji je potom

pomicao probu u smjeru okomitom na površinu (z-smjeru). Za pomicanje u x i y-smjerovima korišteni su dodatni piezoelektrični elementi (Slika 6.2). Rezolucija topografinera bila je uvelike ograničena zbog vibracija instrumenta.



Slika 6.2. Shema Youngovog topografinera i jedna od prvih slika dobivena instrumentom (preutezo [2]).

Deset godina kasnije osmišljen je prvi skenirajući tunelirajući mikroskop, STM, koji je imao manje poteškoća uzrokovanih vibracijama, a za čiji su izum 1986. godine Gerd Binnig i Heinrich Rohrer dobili Nobelovu nagradu za fiziku (Binnig i sur., 1982). Skenirajući tunelirajući mikroskop bazira se na konceptu kvantnog tuneliranja – kada se proba nalazi u blizini ciljane površine, razlika potencijala između probe i površine omogućuje tuneliranje elektrona među njima. Superiornost skenirajućeg tunelirajućeg mikroskopa nad topografinerom leži u tome što je tuneliranje elektrona mnogo osjetljivije od emisije elektronskog polja na udaljenost probe i uzorka. Tim mikroskopom uočeni su pojedinačni atomi silicija na površini, a time je došlo do mogućnosti direktnog promatranja atomske strukture bez difrakcijskih uzoraka (poveznica [2]).

Skenirajući tunelirajući mikroskop i danas ima široku primjenu pri karakterizaciji atomskih struktura, unatoč prilično velikom ograničenju na samo električki provodljive uzorke. Zbog te mane, od samog početka se razmatrala opcija novog instrumenta kojim bi se promatrali električni izolatori. 1986. godine objavljen je članak pod nazivom „Atomic Force Microscope“ u kojem je opisana zamjena dotadašnje poluge i probe lijepljenjem malog dijamanta na kraj opruge napravljene od tanke trake zlata (Binnig i sur., 1986). Unatoč tome što prvi mikroskopi atomskih sila nisu imali rezoluciju poput skenirajućih tunelirajućih mikroskopa, došlo je do

ogromne potražnje, a time i njihovog brzog razvoja, tako da je kombinacija zlata i dijamanta brzo zamijenjena silikonskim materijalima.

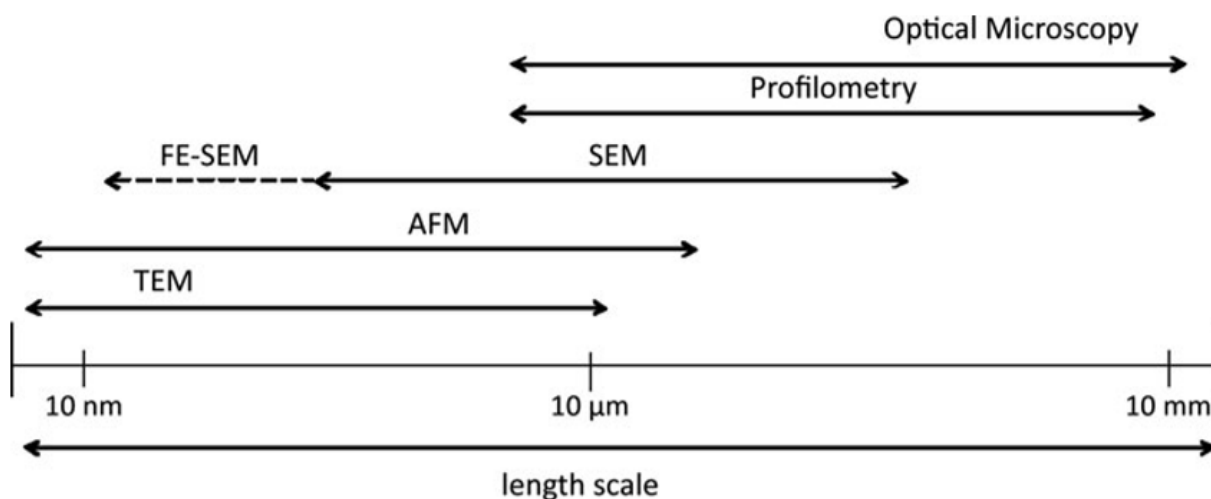
Mikroskop atomskih sila kakav se danas koristi često se uspoređuje s tunelirajućim elektronskim mikroskopom (TEM-om) i skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM-om). Zbog mogućnosti analize električnih izolatora, priprema uzoraka za mikroskop atomskih sila je minimalna, dok se za SEM i TEM električni izolatori moraju dodatno prekriti metalnim slojem te je za njih potrebno uspostaviti vakuumsku sredinu (tablica 6.1). Iako za AFM nema ograničenja za veličinu uzorka, dobijanje slike zahtijeva barem dvostruko više vremena nego kod SEM-a i TEM-a, tako da razlika u brzini može biti značajna već i kod malih uzoraka.

Tablica 6.1. Usporedba mikroskopa atomskih sila sa skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM) i tunelirajućim elektronskim mikroskopom (TEM). Preuzeto s web-poveznice [2].

	AFM	SEM	TEM
Sample preparation	little or none	from little to a lot	from little to a lot
Resolution	0.1 nm	5 nm	0.1 nm
Relative cost	low	medium	high
Sample environment	any	vacuum(SEM) or gas (environmental SEM)	vacuum
Depth of field	poor	good	poor
Sample type	Conductive or insulating	conductive	conductive
Time for image	2–5 minutes	0.1–1 minute	0.1–1 minute
Maximum field of view	100 μm	1 mm	100 nm
Maximum sample size	unlimited	30 mm	2 mm
Measurements	3 dimensional	2 dimensional	2 dimensional

U praksi je česta kombinacija optičkog mikroskopa s mikroskopom atomskih sila, zahvaljujući dobrom preklapanju dimenzija promatranog objekta (Slika 6.3). Optičkim mikroskopom odabire se područje od interesa koje se potom skenira AFM-om, a kombinacija AFM-a i fluorescentne mikroskopije ima velike prednosti u biologiji.

Velika prednost mikroskopa atomskih sila u biologiji proizlazi iz njegove sposobnosti da radi u fiziološkim uvjetima. Većina bioloških procesa odvija se u tekućem okruženju i često ovisi o prisutnosti određenih soli i temperaturi otopine. Za AFM nije potrebno isušivati uzorke pošto se oni mogu promatrati u puferu, stoga uzorci nemaju promjene u strukturi. Promatranje nukleinskih kiselina mikroskopom atomskih sila može se odvijati u tekućoj i suhoj okolini, a najčešće se otopina postavlja na mica podlogu. Pošto su obje mica i DNA negativnog naboja njihovo spajanje potpomaže se dodavanjem kationa (npr. Mg^{2+}) u pufer (poveznica [2]).

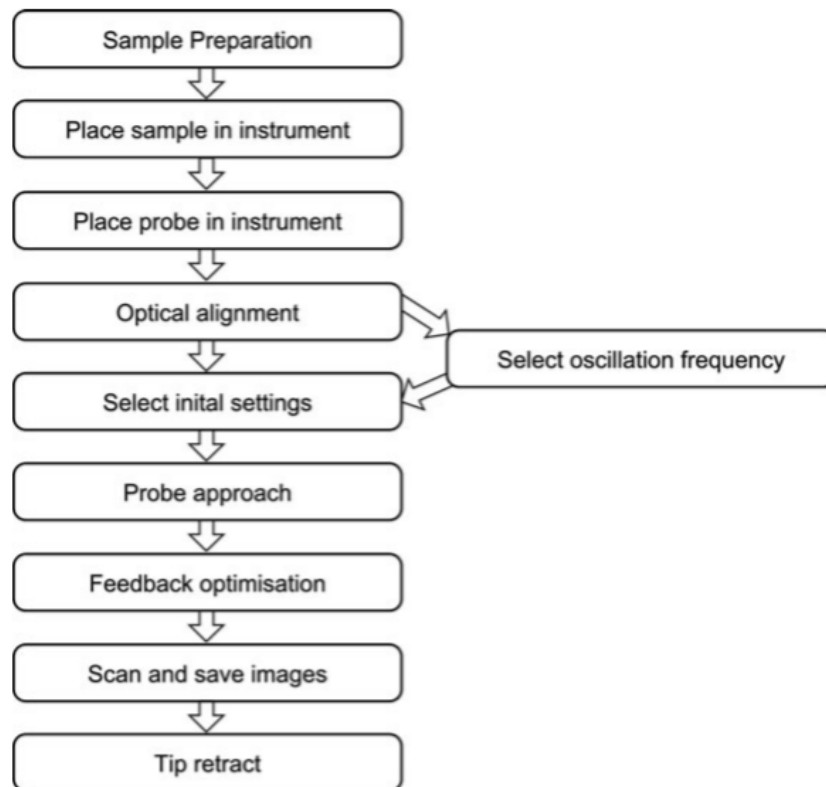


Slika 6.3. Usporedba skale duljina za različite mikroskope (preuzeto s web-poveznice [2]).

6.1.1 Rad s mikroskopom atomskih sila

Rad s mikroskopom atomskih sila generalno se smatra prilično jednostavnim te dobijanje slika, uključujući pripremu uzorka, može potrajati samo nekoliko sati. Priprema uzoraka za AFM najčešće ne zahtijeva poseban pristup kao priprema za ostale mikroskope (primjerice SEM), a za neke uzorke, poput tankih filmova, nije potrebna nikakva dodatna priprema. Općenito, pri pripremi uzorka potrebno je obratiti najviše pažnje na nekoliko faktora: fiksiranje uzorka uz podlogu, čistoću uzorka, veličinu uzorka i čvrsto montiranje uzorka na postolje. Uzorci za AFM zahtijevaju dodavanje supstrata, a ako fiksiranje uz podlogu nije dovoljno dobro može doći do pomicanja materijala na podlozi od strane AFM probe. Takvo pomicanje, osim rezultiranja lošim slikama, može i trajno kontaminirati probu. Druga mjera protiv kontaminacije je osiguranje čistoće uzorka. Veliki broj uzoraka prekriva se tekućim slojem koji je često kombinacija vode i ugljikovodika, tzv. „kontaminacijski sloj“. Pri korištenju takvog tankog sloja (nekoliko nanometara) učinkovitost vizualizacije ispod sloja ne opada. Nadalje, većina mikroskopa atomskih sila je dizajnirana za male uzorke, gdje je najčešća konfiguracija s maksimalnim rasponom od $100\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$ u smjerovima x i y te $10\mu\text{m}$ u z smjeru.

Naposljetku, uzorak mora biti čvrsto montiran na postolje AFM-a kako se ne bi pomicao tijekom skeniranja. Za montažu se često koriste diskovi napravljeni od nehrđajućeg čelika s magnetskih svojstvima. Disk se postavlja u držač uzorka u čijoj se sredini nalazi magnet te takva organizacija čini uzorak vrlo stabilnim.



Slika 6.4. Glavni koraci pri dobijanju AFM slika. Odabir oscilacijske frekvencije potreban je samo kod rada s beskontaktnim AFM-om ili AFM-om s naizmjeničnim kontaktom [2].

Nakon postavljanja uzorka i probe (koja može biti i prethodno postavljena) u uređaj radi se poravnanje optičke poluge. Prvo se pomoću vijaka laser pomiče paralelno i okomito s osi nosača, a potom se poravnava s fotodetektorom. Kada su uspostavljena sva poravnanja može se započeti s pristupom probe uzorku. Automatsko pristupanje probe razlikuje se među mikroskopima te je kod sporih probi česta kombinacija ručnog i automatskog pristupa. Optimizacija parametara skeniranja najčešće se radi na način da se krene od „standardnih“ parametara koji se potom postepeno mijenjaju. Kada se uspostave željeni uvjeti uzorak se skenira te dobivaju slike uzorka, a na kraju korištenja proba se povlači na početni položaj (poveznica [2]).

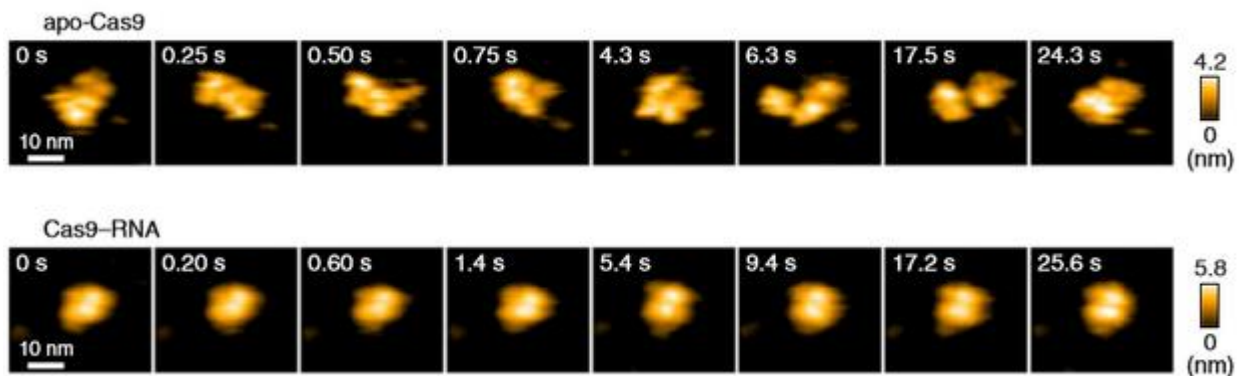
6.1.2 Vizualizacija dinamike CRISPR-Cas9 mikroskopijom atomskih sila velikih brzina

Brzina kojom se dobijaju slike klasičnim AFM-om jedna je od rijetkih mana te tehnologije, a kroz proteklih nekoliko godina uloženi su naponi da se taj proces ubrza, što je veoma značajno za biološke znanosti. Jedan od glavnih čimbenika je vrijeme potrebno da se dobije informacija na računalu nakon interakcije probe i uzorka, pošto ta informacija putuje kroz petlju koju čini više uređaja. Redukcija vremena potrebnog da ti uređaji odgovore, kao i prigušivanje vibracija uzrokovanih pomicanjem skenera omogućili su razvoj mikroskopa atomskih sila velikih brzina

(high-speed AFM) (Ando i sur., 2013). Današnji takvi mikroskopi mogu raditi brzinom od otprilike 10-20 fps (slika po sekundi, „frames per second“) za manje uzorke (tipično 2mm visine i promjera od 2mm), što je dovoljno za stvaranje filma ponašanja uzorka (npr. makromolekula) u realnom prostoru i vremenu (Ando, 2018).

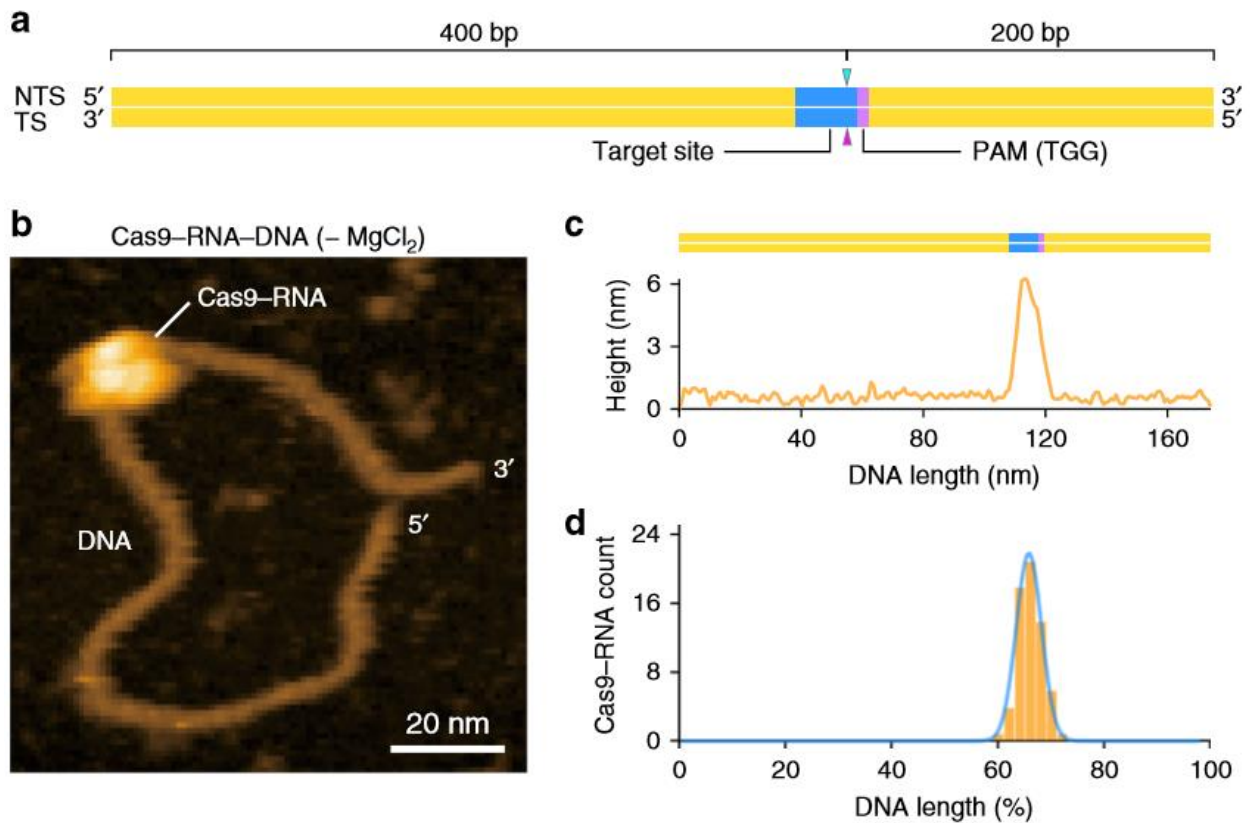
Grupa japanskih znanstvenika 2017. godine objavila je rad u kojem su korištenjem mikroskopa atomskih sila velikih brzina vizualizirali CRISPR-Cas9 mehanizam u realnom prostoru i vremenu (Shibata i sur., 2017).

Na slici 6.5 nalaze se usporedbe samog proteina Cas9 bez gRNA (apo-Cas9) i proteina Cas9 s dodanom gRNA (Cas9-RNA) kakav se koristi u genetičkom inženjerstvu. Vidljivo je da apo-Cas9 poprima više različitih konformacija u vremenu, dok se oblik Cas9-RNA značajno ne mijenja. Taj rezultat naglašava ulogu vodeće RNA u održavanju stabilnosti kompleksa.



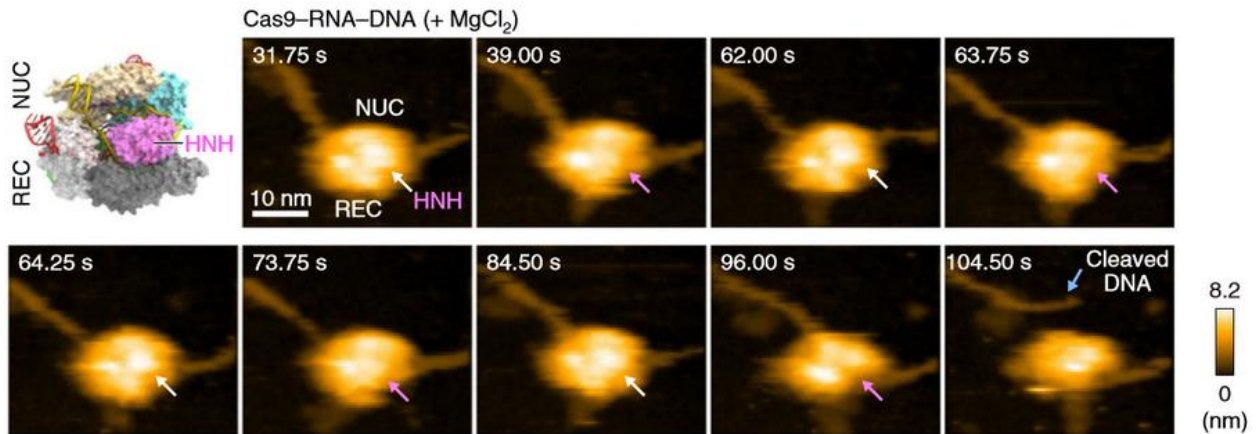
Slika 6.5. Promatranje apo-Cas9 (gore) i Cas9-RNA (dolje) mikroskopom atomskih sila velikih brzina. Bojom je označena visina u nanometrima (preuzeto iz Shibata i sur., 2017).

U idućem dijelu eksperimenta promatrano je vezanje nukleaze Cas9 na ciljnu DNA sekvencu i cijepanje DNA te njihova ovisnost o prisutnosti, odnosno odsutnosti $MgCl_2$. Slika 6.5 pokazuje stvaranje Cas9-RNA-DNA kompleksa. Korištena DNA sekvencu sadrži 600 parova baza te je označeno mjesto od 20 nukleotida pokraj kojeg je TGG PAM sekvencu (Slika 6.6a). Na Slikama 6.6b i 6.6c vidljivo je da je Cas9-RNA uspješno sjela na očekivano mjesto određeno sekvencu PAM.



Slika 6.6. Sjedanje Cas9 na ciljnu sekvencu DNA određeno PAM-om. A: shema korištene DNA, ciljno mjesto je obojano plavo, a sekvenca PAM ljubičasto. Trokutima su označena mjesta koja cijepaju nukleazne domene RuvC (gore, „non target strand“) i HNH (dolje, „target strand“). B: HS-AFM slika kompleksa Cas9-RNA-DNA u odsutnosti MgCl₂. C: Uzdužni prikaz DNA nakon spajanja Cas9-RNA. D: razdioba visine očitane mikroskopom atomskih sila (preuzeto iz Shibata i sur., 2017).

Cijepanje ciljne sekvence DNA potpomognuto je dodavanjem MgCl₂ (Slika 6.7). Ovdje su uočena dva stanja nukleazne domene HNH: inaktivno stanje („high-height“) i aktivno stanje („low-height“). Bijele strelice na slici upućuju na inaktivno stanje, a ljubičaste na aktivno stanje domene HNH. Vidljivo je kako domena HNH fluktuirala između dva stanja, odnosno zadobiva više konformacija dok ne dođe na mjesto cijepanja DNA. Prethodno je zabilježeno da postoje tri glavne konformacije koje poprima domena HNH: R, I i D, pri čemu su konformacije R i I u skladu s postojećim kristalnim strukturama kompleksa, dok struktura konformacije D još nije određena. (Sternberg i sur., 2015; Dagdas i sur., 2017).



Slika 6.7. Promatranje cijepanja ciljne sekvence DNA mikroskopom atomskih sila velikih brzina u prisutnosti MgCl_2 . Aktivna i inaktivna stanja nukleazne domene HNH naznačena su ljubičastim, odnosno bijelim strelicama. Bojom je označena visina u nanometrima (preuzeto iz Shibata i sur., 2017).

Dio molekula iz kompleksa Cas9-RNA ostaje čvrsto vezan za dio otpuštene cijepane DNA udaljen od sekvence PAM. Međutim, u ovom istraživanju došlo je do njihovog odvajanja, a pretpostavlja se da je odvajanje potpomognuto kontaktom s AFM probom. Za promatranje pomicanja Cas9-RNA na molekuli DNA bilo je potrebno koristiti lipidni dvosloj kao podlogu, pošto on ne pokazuje jako međudjelovanje s kompleksom (Shibata i sur., 2017).

7 Budućnost metode CRISPR-Cas9 i etička pitanja

Nagli razvoj genetičkog inženjerstva potaknut razvojem sustava CRISPR-Cas9 do sada je rezultirao veoma povoljnim ishodima u prirodnim znanostima i medicini. Razvijeni alati omogućuju precizne izmjene gena, regulaciju transkripcije i epigenetičke modifikacije s visokom preciznošću i jednostavnošću. Sustavi CRISPR pokazali su potencijal svoje uloge u revoluciji genetike i medicine, a tehnologije razvijene na bazi sustava CRISPR pomažu u razumijevanju funkcija gena i tako omogućuju dobar pristup u personaliziranom liječenju bolesti (You i sur., 2019).

Mogućnosti korištenja tehnologije CRISPR su mnogobrojne, a one se kreću od već spomenutih liječenja ozbiljnih bolesti pa sve do gotovo apstraktnih aplikacija, poput proizvodnje biogoriva ili čak vraćanja izumrlih vrsta.

Kineski znanstvenici do sada su uspješno povećali otpornost miševa na virus HIV-a, inducirajući mutacije koje stimuliraju otpornost na HIV. Takve mutacije prirodno se događaju kod malog broja ljudi, a njihovo uvođenje u ljudske matične stanice moglo bi povećati rezistenciju na virus HIV-a. Još jedno istraživanje u Kini započelo je 2018. godine, s ciljem ometanja gena humanog papiloma virusa (HPV), virusa koji uzrokuje rak grlića maternice (web-poveznica [6]).

Mnogo potencijalnih primjena javlja se i na području prehrambene tehnologije. Jedan od primjera je proizvodnja nisko alergene hrane (engl. *allergy-free*), na čemu radi tim australskih znanstvenika. U bjelanjku jaja nalaze se četiri proteina koji uzrokuju alergije, a modifikacijom točno određenih regija gena mogu se dobiti jaja koja neće izazivati alergije (web-poveznica [7]). Sličan pristup imaju i nizozemski znanstvenici koji koriste CRISPR-Cas9 za postizanje izmjena na glutenu pšenice. Time bi se oboljelima od celijakije omogućilo konzumiranje takve pšenice, umjesto skupih namirnica bez glutena (engl. *gluten-free*) koje često imaju nisku kvalitetu zbog manjka svojstava koje donosi gluten (web-poveznica [8]). Zanimljiva primjena CRISPR tehnologije dogodila se i pri proizvodnji zrna kave bez kofeina. Stvorena su genetski modificirana zrna bezkofeinske kave, što se inače postiže skupim procesom koji je ujedno i agresivan na zrna. Od genetički modificiranih zrna očekuje se da će imati pozitivan utjecaj na okus, nutritivnost, ali i cijenu bezkofeinske kave (web-poveznica [9]). Znanstvenici u Brazilu i Irskoj rade na stvaranju prvih prirodno ljutih rajčica. Paprike su jedine biljke koji proizvode tzv. „ljute molekule“, kapsaicinoide, ali one su jedna od zahtjevnijih vrsta po pitanju kultivacije. Rajčice su daleki srodnik paprikama te one također imaju sposobnost proizvodnje

kapsaicinoida, međutim geni potrebni za to nisu aktivni. Pomoću tehnologije CRISPR-Cas9 radi se na aktivaciji gena koji će potom proizvoditi kapsaicinonoide (web-poveznica [10]).

Kao i kod ljudi, postoje ideje za iskorjenjivanje bolesti kod nekih životinja. Primjerice, psi dalmatinci često nose genetsku mutaciju koja ih čini podložnima bubrežnim kamencima te se u SAD-u planira popravak tih mutacija. S druge strane, u Kini su već nekoliko godina popularne tzv. „mikro-svinje“, prvotno osmišljene kao model za proučavanje ljudskih bolesti. Takve svinje su dobile veliki publicitet te su se uskoro počele prodavati kao kućni ljubimci, što je izazvalo razne reakcije u znanstvenoj zajednici (web-poveznica [11]). Pomoću tehnike CRISPR jedna je argetinska firma izmijenila gene kod konja koji kodiraju za miostatin, protein ključan u razvoju mišića. Prvi takvi konji biti će rođeni krajem 2019. godine, a oni bi se trebali razlikovati od ostalih konja po brzini, jačini i sposobnosti boljeg skakanja. Pošto u jahačkim sportovima ne postoji zabrana natjecanja za klonirane konje, takve genetičke izmjene zasigurno će igrati ulogu u konjskim utrkama (web-poveznica [12]).

Godine 2018. britanski znanstvenici pokazali su kako se tehnologija CRISPR može koristiti u borbi protiv vrste komaraca koji su odgovorni za širenje malarije. Uveli su gen koji sprječava ženke da liježu jajašca u slučaju kada oba roditelja nose taj gen. U provedenom eksperimentu populacija je u potpunosti izumrla nakon sedam generacija komaraca. Slična se testiranja planiraju na invazivnim štakorima koji uništavaju ekosustave na otocima s ugroženim vrstama (web-poveznica [12]). Međutim, uplitanje čovjeka u ekosustavu nosi velike rizike u narušavanju njegove ravnoteže. Čak i eliminacija vrsta koje naizgled nemaju veliku ekološku vrijednost mogla bi imati katastrofalne posljedice, od poremećaja u hranidbenom lancu pa do mogućnosti da se bolesti poput malarije počnu širiti preko drugih vrsta (web-poveznica [6]).

Prije dvije godine, grupa znanstvenika s Harvarda objavila je kako rade na razvoju embrija za hibridnu vrstu između slona i mamuta. Oni se nadaju kako bi povratak izumrlog vunastog mamuta mogao doprinijeti borbi protiv globalnog zatopljenja. Kretanjem i udaranjem po snijegu, mamuti bi pomogli kruženju hladnog zraka i time umanjili otapanje tundre. U ovom istraživanju slonovi koji se koriste su ugrožena vrsta azijskog slona, što je nepraktično, ali u mnogim očima i neetički. Znanstvenici se nadaju da će fetuse moći razvijati u laboratoriju, bez potrebe za živućim surogatima (web-poveznica[13]).

Genetičko inženjerstvo pobuđuje važna etička pitanja te je za donošenje bilo kakvih odluka važno uzeti u obzir cjelokupni spektar mogućih ishoda, kao i njihove vjerojatnosti. Etička pitanja oko genetičkog inženjerstva temeljenog na metodi CRISPR mogu se grupirati oko tri značajnije točke: pogreški tijekom postupka izmjenjivanja gena („off-target“, nepotpunost,

nepreciznost), nasljeđivanja modificiranih gena i povezanosti između genetske informacije i biološkog fenotipa. Mnoga biološka svojstva određena su kompleksnom aktivnosti brojnih gena, te je prilično teško dizajnirati fenotip na razini cijelog organizma. Razumijevanje kada i u kojoj mjeri izmjene na određenom genu mijenjaju željeni fenotip od izuzetne je važnosti pri donošenju rizičnih odluka (Brokowski i Adli, 2019).

Jedno od najkontroverznijih pitanja o tehnologiji CRISPR proizlazi iz mogućih primjena te tehnike na modifikacije ljudskih embrija. No tu krivnju snosi i nedostatak definicije ljudskog embrija, pri čemu dio znanstvene zajednice smatra da bi trebalo biti nedopustivo eksperimentirati na embrijima starijim od 14 dana, dok druga krajnost embrij priznaje tek kada posjeduje određenu „osobnost“. Postoje strahovi koji proizlaze iz ideja mijenjanja embrionalnih stanica, među kojima se ističe strah od mijenjanja ljudske rase sa svrhom dobivanja poželjnih nasljednih karakteristika (Brokowski i Adli, 2019).

Prve genetski modificirane bebe pomoću tehnike CRISPR su blizanke rođene u Kini 2018. godine što i danas izaziva veliku buru u javnosti. Blizankama su uvedene genetske mutacije s namjerom da se smanji podložnost infekciji virusom HIV-a. Javnost i znanstvena zajednica osudile su takvu intervenciju, ne samo zato što se smatra nepotrebnom, već prvenstveno jer se protivila uspostavljenim konsenzusima i etičkim normama (Li i sur., 2019).

Korištenje genetičkog inženjerstva u prehrambenoj industriji različito je regulirano u različitim dijelovima svijeta, što često predstavlja problem brojnim projektima. Europska Unija trenutačno ima vrlo stroge regulacije po pitanju upotrebe genetičkog inženjerstva metodom CRISPR i istraživanja poput prethodno spomenutih nisko alergenijskih jaja mogla bi dugo čekati na odobrenje, bar na području Europe (web-poveznica [12]). Podaci iz 2016. godine govori kako je 795 milijuna ljudi na svijetu pothranjeno, a čak dvije milijarde ljudi nema pristup ključnim nutrijentima poput željeza i vitamina A. CRISPR ima potencijal popraviti nedostatak glavnih nutrijenata i proširiti dostupnost hrane visoke kvalitete.

Zanimljiva je i rasprava o granicama između medicinskih potreba i „poboljšavanja ljudske rase“, gdje se često gubi linija između pojmova terapija i unaprjeđenje. Jedan od primjera je genetska modifikacija za smanjenje količine lošeg kolesterola, koje vodi zdravijem načinu života. Dugoročno to koristi i pojedincu i društvu, ali i dalje stoji pitanje je li takvo nešto medicinska potreba ili samo poboljšanje kvalitete života (Brokowski i Adli, 2019).

8 Zaključak

Otkriće sekvenci CRISPR i razumijevanje njihove uloge u obrani bakterija od virusa bili su prvi koraci prema razvoju sustava CRISPR kao nove metode u genetičkom inženjerstvu. Sposobnost proteina kaspaze 9 (Cas9), povezanog sa sustavom CRISPR da, navođen molekulom RNA (gRNA), cijepa molekulu DNA na željenim mjestima i prvi eksperimentalni rezultati rezanja virusne DNA ukazali su na potencijal koji posjeduje sustav CRISPR-Cas9. Prenosivost sustava među vrstama i njegova programibilnost u laboratoriju potaknule su veliki broj istraživanja diljem svijeta zahvaljujući kojima je genetičko inženjerstvo jedna od tehnologija koje se trenutačno najbrže razvijaju.

Vodič ili guide RNA (gRNA) je kratka molekula RNA koja usmjerava protein Cas9 da izazove dvolančani lom na molekuli DNA na mjestu komplementarnog sparivanja gRNA i ciljne DNA. Vodič RNA se lako dizajnira u laboratoriju hibridizacijom varijabilne crRNA, odgovorne za sparivanje s ciljnom DNA i nevarijabilne tracrRNA, odgovorne za povezivanje s kaspazom 9. Danas je česta metoda istovremeno ciljanje većeg broja meta u molekuli DNA pomoću nekoliko gRNA, što doprinosi jednostavnosti i učinkovitosti tehnologije CRISPR-Cas9. Nakon izazvanog dvolančanog loma moguće je potaknuti precizan homologni direktni popravak (HDR) dodavanjem tzv. predloška popravka (engl. *repair template*) ili pustiti da dođe do nepreciznog popravka mehanizmom nehomolognog povezivanja krajeva DNA (engl. *non-homologous end-joining*, NHEJ) koji uzrokuje mutacije pomaka okvira čitanja i zaustavlja stvaranje funkcionalnih proteina. Mutacijama u nukleaznim domenama sustava Cas9 i u domeni PAM može se utjecati na poboljšanje specifičnosti tog enzima u odnosu na prirodni protein Cas9. Unos kompleksa Cas9 u stanicu također ima ulogu u konačnom ishodu tehnike CRISPR-Cas9, pošto je važno maksimalno smanjiti mogući toksični utjecaj na stanicu koji se može pojaviti tijekom unosa plazmida. Za neke stanice stoga se umjesto unosa plazmida preporučuje unos kompleksa CRISPR kao ribonukleoproteinskog kompleksa metodom elektroporacije.

Razvoj i napredak prirodnih, biomedicinskih i biotehničkih znanosti biti će ključni faktor u budućnosti genetičkog inženjerstva. Danas postoje mogućnosti vizualizacije sustava CRISPR-Cas9 u akciji, što omogućava poboljšana tehnika mikroskopije atomskih sila (AFM). Vizualizacija sjedanja proteina na ciljnu sekvencu i proučavanje konformacija njegovih domeni od velike su važnosti za daljnje korake u razvijanju tehnike CRISPR-Cas9.

Tehnologija CRISPR-Cas9 do sada je uspješno primijenjena u poljoprivredi te testirana na nekim ljudskim bolestima, ponajviše na virusu HIV-a. Rezultati postignuti korištenjem tehnike CRISPR-Cas9 su obećavajući, a pogledi su usmjereni na što više potencijalnih kliničkih ispitivanja. Pošto tehnologija CRISPR-Cas9 još uvijek nije usavršena (najveći problem čine moguća cijepanja na neželjenim mjestima), njezino daljnje razvijanje i primjena moraju se odvijati u sigurnim i kontroliranim uvjetima.

9 Literatura

Hsu, P.D., Lander, E.S., and Zhang, F. (2014). Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell* 157, 1262-1278.

Bonomo, M.E., and Deem, M.W. (2018). The physicist's guide to one of biotechnology's hottest new topics: CRISPR-Cas. *Phys. Biol.* 15.

Bessman, M. J., Lehman, I. R., Simms, E. S. and Kornberg, A. (1958). Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid: II. General properties of the reaction. *Biol. Chem.* 233: 171-7.

Shimomura, O., Johnson, F. H., and Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology.* 59.

Shuman, S. (2009). DNA Ligases: Progress and Prospects. *Journal of Biological Chemistry*, 284(26), 17365-17369.

Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., Boyer, H. W. and Helling, R. B. (1973). Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids *In Vitro*. *Proc. Nat. Acad. Sci*, 70, 3240-3244.

Bibikova, M., Carroll, D., Segal, D.J., Trautman, J.K., Smith, J., Kim, Y.G., and Chandrasegaran, S. (2001). Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases. *Mol. Cell. Biol.* 21, 289-297.

Bibikova, M., Golic, M., Golic, K.G., and Carroll, D. (2002). Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics* 161, 1169-1175.

Bibikova, M., Beumer, K., Trautman, J.K., and Carroll, D. (2003). Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Science* 300, 764.

Smith, J., Grizot, S., Arnould, S., Duclert, A., Epinat, J.C., Chames, P., Prieto, J., Redondo, P., Blanco, F.J., Bravo, J., et al. (2006). A combinatorial approach to create artificial homing endonucleases cleaving chosen sequences. *Nucleic Acids Res.* 34, e149.

Urnov, F. D., Miller, J. C., Lee, Y. L., Beausejour, C. M., Rock, J. M., Augustus, S., Jamieson, A. C., Porteus, M. H., Gregory, P. D., and Holmes, M. C. (2005). Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc.finger nucleases. *Nature* 435, 646-651.

Miller, J. C., Holmes, M. C., Wang, J., Guschin, D.Y., Lee, Y. L., Rupniewski, I., Beausejour, C. M., Waite, A. J., Wang, N. S., Kim, K. A., et al. (2007). An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nat. Biotechnol.* 25, 778-785.

Christian, M., Cermak, T., Doyle, E. L., Schmidt, C., F., Hummel, A., Bogdanove, A. J., and Voytas, D.F. (2010). Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* 186, 757-761.

Miller, J. C., Tan, S., Qiao, G., Barlow, K. A., Wang, J., Xia, D. F., Meng, X., Paschon, D. E., Leung, E., Hinkley, S. J., et al. (2011). A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat. Biotechnol.* 29, 143-148.

Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A., and Bonas, U. (2009). Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* 326, 1509-1512.

Moscou, M. J., and Bogdanove, A.J. (2009). A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science* 326, 1501.

Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., and Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339, 819-823.

Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E., Norville, J.E., and Church, G.M. (2013a). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339, 823-826.

Maeder, M.L. Thibodeau-Beganny, S., Osiaik, A., Wright, D.A., Anthony, R.M., Eichtinger, M., Jiang, T., Foley, J.E., Winfrey, R.J., Townsend, J.A., et al. (2008). Rapid „open-source“ engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification. *Mol. Cell* 31, 294-301.

Juillerat, A., Dubois, G., Valton, J., Thomas, S., Stella, S., Marechal, A., Langevin, S., Benomari, N., Bertonati, C., Silva, G.H., et al. (2014). Comprehensive analysis of the specificity of transcription activator-like effector nucleases. *Nucleic Acids Res.* 42, 5390-5402.

Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., and Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J. Bacteriol.* 169, 5429 – 5433.

Mojica, F.J., Diez-Villasenor, C., Soria, E., and Juez, G. (2000). Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol. Microbiol.* 36, 244-246.

Jansen, R., Embden, J.D., Gaastra, W., and Schouls, L.M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol. Micro-biol.* 43, 1565-1575.

Haft, D.H., Selengut, J., Mongodin, E.F., and Nelson, K.E. (2005). A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PloS Comput. Biol.* 1, e60.

Makarova, K.S., Grishin, N.V., Shabalina, S.A., Wolf, Y.I., and Koonin, E.V. (2006). A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol. Direct* 1, 7.

Brouns, S.J., Jore, M.M, Lundgren, M., Westra, E.R., Slijkhuis, R.J., Snijders, A.P., Dickman, M.J., Makarova, K.S., Koonin, E.V., and van der Oost, J. (2008). Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science* 321, 960-964.

Hale, C.R., Zhao, P., Olson, S., Duff, M.O., Graveley, B.R., Wells, L., Terns, R.M., and Terns, M.P. (2009). RNA-guided RNA cleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex. *Cell* 139, 945-956.

Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A., and Ehrlich, S.D. (2005). Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology* 151, 2551-2561.

Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D.A., and Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315, 1709-1712.

Marraffini, L.A., and Sontheimer, E.J. (2008). CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science* 322, 1843-1845.

Deveau, H., Barrangou, R., Garneau, J.E., Labonte, J., Fremaux, C., Boyaval, P., Romero, D.A., Horvath, P., and Moineau, S. (2008). Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *J. Bacteriol.* 190, 1390-1400.

Garneau, J.E., Dupuis, M.E., Vilion, M., Romero, D.A. Barrangou, R., Boyaval, P., Fremaux, C., Horvath, P., Magadan, A.H., and Moineau, . (2010). The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature* 468, 67-71.

Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C.M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z.A., Eckert, M.R., Vogel, J., and Charpentier, E. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor Rnase III. *Nature* 471, 602-607.

Sapranaukas, R., Gasiunas, G., Fremaux, C., Barrangou, R., Horvath, P., and Siksnys, V. (2011). The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 39, 9275-9282.

Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barreto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., and Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339, 819-823.

Han, P., Niestemski, L. R., Barrick, J. E. and Deem, M. W. (2013). Physical model of the immune response of bacteria against bacteriophage through the adaptive CRISPR-Cas immune system *Phys. Biol.* 10 025004

Makarova, K.S., Aravind, L., Wolf, Y.I., Koonin, E. V. (2011). Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR-Cas systems. *Biol. Direct* 6, 38.

Chylinski, K., Le Rhuh, A., Charpentier, E. (2013). The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems. *RNA biol.* 10, 726-737.

Nishimasu, H., Ran, F. A., Hsu, P. D., Konermann, S., Shehata, S. I., Dohmae, N., Ishitani, R., Zhang, F. and Neureki, O. (2014). Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DN. *Cell* 156, 935-949.

Sampson, T.R., Saroj, S.D., Llewellyn, A. C., Tzeng, Y.-L., Weiss, D. S. (2013). A CRISPR/Cas system mediates bacterial innate immune evasion and virulence. *Nature* 497, 254-257.

Anders, C. Niewoehner O., DuerstA. and Martin Jinek (2014). Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature* 513, 569-573.

Kleinstiver, B. P., Prew, M. S., Tsai, S. Q., Topkar, V. V., Nguyen, N. T., Zheng, Z., Gonzales, A. P. W., Li, Z.; Peterson, R. T., Yeh, J.-R. J.; et al. (2015). Engineered CRISPR-Cas9 Nucleases with Altered PAM Specificities. *Nature*, 523 (7561), 481-485. 10

Kleinstiver, B. P., Prew, M. S.; Tsai, S. Q., Nguyen, N. T.; Topkar, V. V., Zheng, Z., Joung, J. K. (2015). Broadening the Targeting Range of *Staphylococcus aureus* CRISPR-Cas9 by Modifying PAM Recognition. *Nat. Biotech.* 33 (12), 1293-1298.

Hsu, D., Scott, A. D., Weinstein, J. A., Rann, F. A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E. J., Wu, X., Shalem, O., Cradick, T. J., Maraffini, L. A., Bao, G. and Zhang, F. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat. Biotechnol.* 31, 827-832.

Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A. and Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* 8(11), 2281-2308.

Young, R., Ward, J., Scire, F. (1972). The topografiner: an instrument for measuring surface microtopography. *Review of Scientific Instruments.* 43 (7), 999-1011.

Binnig, G., Rohrer, H., Gerber, C., Weibel, E. (1982). Surface studies by scanning tunneling microscopy. *Physical Review Letters*, 49 (1), 57-61.

Binnig, G., Quate, C. F., Gerber, C. (1986). Atomic force microscope. *Physical Review Letters*, 56 (9), 930–33.

Ando, T., Uchihashi, T., Kodera, N. (2013). High-speed AFM and applications to biomolecular systems. *Annu. Rev. Biophys.* 42, 393-414.

Ando, T. (2018). High-speed atomic force microscopy and its future prospects. *Biophys Rev.* 10 (2), 285-292.

Shibata, M., Nishimasu, H., Kodera, N., Hirano, S., Ando, T., Uchihashi T., Nureki, O. (2017). Real-space and real-time dynamics of CRISPR-Cas9 visualized by high-speed atomic force microscopy. *Nature Communications*. 8, 1430.

Sternberg, S. H., LaFrance, B., Kaplan, M. & Doudna, J. A. (2015). Conformational control of DNA target cleavage by CRISPR-Cas9. *Nature* 527, 110–113.

Dagdas, Y. S., Chen, J. S., Sternberg, S. H., Doudna, J. A. & Yildiz, A. (2017). A conformational checkpoint between DNA binding and cleavage by CRISPRCas9. *Sci. Adv.* 3.

Wang, T., Zhang, H., Zhu., H. (2019). CRISPR technology is revolutionizing the improvement of tomato and other fruit crops. *Horticulture research* 6, 77.

Kim, J. and Kim, J. (2016). Bypassing GMO regulations with CRISPR gene editing. *Nat. Biotechnol.* 34, 1014-1015.

Zaidi, S., S., Mukhtar, M. S. and Mansoor, S. Genome editing: targeting susceptibility genes for plant disease resistance (2018). *Trends Biotechnol.* 36, 898-906.

Brooks, C., Nekrasov, V., Lippman, Z. B. & Van Eck, J. (2014). Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated9 system. *Plant Physiol.* 166, 1292–1297.

Tashkandi, M., Ali, Z., Aljedaani, F., Shami, A. & Mahfouz, M. M. (2018). Engineering resistance against Tomato yellow leaf curl virus via the CRISPR/Cas9 system in tomato. *Plant Signal. Behav.* 13, e1525996.

Tripathi, J. N. et al. (2019). CRISPR/Cas9 editing of endogenous banana streak virus in the B genome of *Musa* spp. overcomes a major challenge in banana breeding. *Commun. Biol.* 2, 46.

Li, R. et al. (2018). Reduction of tomato-plant chilling tolerance by CRISPR-Cas9 mediated SICBF1 mutagenesis. *J. Agric. Food Chem.* 66, 9042 –9051.

Satpute, M. R. & Jagdale, S. M. (2016). Color, size, volume, shape and texture feature extraction techniques for fruits: a review. *Int. Res. J. Engin. Technol.* 4, 703–708.

Uluşik, S. et al. (2016). Erratum: Corrigendum: genetic improvement of tomato by targeted control of fruit softening. *Nat. Biotechnol.* 34, 1072.

Yu, Q. et al. (2017). CRISPR/Cas9-induced targeted mutagenesis and gene replacement to generate long-shelf life tomato lines. *Sci. Rep.* 7, 11874.

Tomlinson, L. et al. (2019). Using CRISPR/Cas9 genome editing in tomato to create a gibberellin-responsive dominant dwarf DELLA allele. *Plant Biotechnol. J.* 17, 132–140.

Nagamangala Kanchiswamy, C., Sargent, D. J., Velasco, R., Maffei, M. E. & Malnoy, M. (2015). Looking forward to genetically edited fruit crops. *Trends Biotechnol.* 33, 62 –64.

Jiang, F. and Doudna, J. A. (2017). CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. *Annu. Rev. Biophys.* 46:505-29.

Zhu, X., Clarke, R., Puppala, A. K., Chittori, S., Merk, A., Merrill, B. J., Simonović, M., Subramaniam, S. (2019). Cryo-EM structures reveal coordinated domain motions that govern DNA cleavage by Cas9. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 26(8):679-685.

Hauschild-Quintern, J., Petersen, B., Cost, G. J., Niemann, H. (2012). Gene knockout and knockin by zinc-finger nucleases: current status and perspectives. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(16), 2969-2983.

Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Alkhnbashi, O. S., Costa, F., Shah, S. A., Saunders, S. J., Barrangou, R. I., Brouns, S. J., Charpentier, E., Haft, D. H., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F. J., Terns, R. M., Terns, M. P., White, M. F., Akunin, A., F., Garret, R. A., van der Oost, J., Backofen, R., Koonin, E. V. (2015). An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 13(11): 722-736.

Nyamweya, S., Hegedus, A., Jaye, A., Rowland-Jones, S., Flanagan, K. L., and Macallan, D. C. (2013). Comparing HIV-1 and HIV-2 infection: lessons for viral immunopathogenesis. *Rev. Med. Virol.* 23, 221–240.

Palella, F. J. Jr., Delaney, K. M., Moorman, A. C., Loveless, M. O., Fuhrer, J., Satten, G. A., et al. (1998). Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV outpatient study investigators. *N. Engl. J. Med.* 338, 853–860.

Sharp, P. M., and Hahn, B. H. (2011). Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*

Xiao, Q., Guo, D. and Chen, S. (2019). Application of CRISPR/Cas9-Based Gene Editing in HIV-1/AIDS Therapy. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9:69.

Sanches-da-Silva, G., Medeiros, L. F. S. and Lima, F. M. (2019). The potential use of the CRISPR-Cas system for HIV-1 Gene Therapy. *Intern. Journal of Genomics.*

Ye, L., Wang, J., Beyer, A. I. et al. (2014). Seamless modification of wild-type induced pluripotent stem cells to the natural CCR5 Δ 32 mutation confers resistance to HIV infection. *PNAS USA*, 111, 9591-9596.

Qi, C., Li, D., Jiang, X. et al. (2018). Inducing CCR5 Δ 32/ Δ 32 homozygotes in the human Jurkat CD4⁺ cell line and primary CD4⁺ cells by CRISPR-Cas9 genome editing technology. *Mol. Therapy – Nucl. Acids*, 12, 267-274.

Hou, P., Chen, S., Wang, S. et al. (2015). Genome editing of CXCR4 by CRISPR/Cas9 confers cells resistant to HIV-1 infection. *Scient. Reports*, 5, 1-12.

Schumann, K., Lin, S., Boyer, E. et al. (2015). Generation of knock-in primary human T cells using Cas9 ribonucleoproteins. *PNAS USA*, 112, 33, 10437-10442.

Liu, Z., Chen, S., Jin, X. et al. (2017). Genome editing of the HIV coreceptors CCR5 and CXCR4 by CRISPR-Cas9 protects CD4⁺ T cells from HIV-1 infection. *Cell & Bioscience*, 7, 2-15.

Liao, H. K., Gu, Y., Diaz, A. et al. (2015). Use of the CRISPR/Cas9 system as an intracellular defense against HIV-1 infection in human cells. *Nature Comm.* 6, 1-10.

Hu, W., Kaminski, R., Yang, F. et al. (2014). RNA-directed gene editing specifically eradicates latent and prevents new HIV-1 infection. *PNAS USA*, 111, 11461-11466.

Kunze, C., Borner, K., Kienle, E., et al. (2018). Synthetic AAV/CRISPR vectors for blocking HIV-1 expression in persistently infected astrocytes. *Glia*, 66, 413-427.

Wang, Q., Liu, S., Liu, Z., et al. (2018). Genome scale screening identification of SaCas9/gRNAs for targeting HIV-1 provirus and suppression of HIV-1 infection. *Virus Research*, 250, 21-30.

Naldini, L. (2015). Gene therapy returns to centre stage. *Nature* 526, 351-360.

Li, W. (2018). Precision medicine: to cure and relieve more. *Precision Clinical Medicine*, 1, 3-4.

You, L., Tong, R., Li, M., Liu, Y., Xue, J. And Lu, Y. (2019). Advancements and obstacles of CRISPR-Cas9 technology in translational research. *Mol. Ther. – Meth. Clin. D.* 13, 359-370.

Amoasii, L., Hildyard, J. C. W., Li, H., Sanchez-Ortiz, E., Mireault, A., Caballero, D., Harron, R., Stathopoulou, T. R., Massey, C., Shelton, J. M., et al. (2018). Gene editing restores dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy. *Science* 362, 86-91.

Kosicki, M., Tomberg, K. and Bradley, A. (2018). Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. *Nat. Biotechnol.* 36, 765-771.

Scott, D. A. and Zhang, F. (2017). Implications of human genetic variation in CRISPR-based therapeutic genome editing. *Nat. Med.* 23, 1095-1101.

Brokowski, C. and Adli, M. (2019). CRISPR Ethics: Moral Considerations for Applications of a Powerful Tool. *J. Mol. Biol.* 431, 88-101.

Li, J., Walker, S., Nie, J. and Zhang, X. (2019). Experiments that led to the first gene-edited babies: the ethical failings and the urgent need for better governance. *JZUS B*, 20, 32-38.

Poveznice i knjige:

- [1] <https://www.synthego.com/learn/genome-engineering-history>
- [2] Eaton, P. and West, P: Atomic Force Microscopy, Oxford University Press, 2010.
- [3] Cavanagh & Garrity, "CRISPR Mechanism", CRISPR/Cas9, Tufts University, 2014. <https://sites.tufts.edu/crispr/> (19.9.2019)
- [4] <https://innovativegenomics.org/blog/clinical-trials-2019/>
- [5] <http://www.crisprtx.com/programs/hemoglobinopathies>
- [6] <https://futurism.com/crispr-genetic-engineering-change-world>
- [7] <https://www.abc.net.au/catalyst/gene-editing-made-simple/11016800>
- [8] <https://www.labiotech.eu/food/crispr-wageningen-gluten-celiac/>
- [9] <https://www.fastcompany.com/40584260/this-startup-wants-to-save-the-banana-by-editing-its-genes>
- [10] <https://www.fastcompany.com/90289713/scientists-want-to-use-crispr-to-make-one-spicy-tomato>
- [11] <https://www.nature.com/news/gene-edited-micropigs-to-be-sold-as-pets-at-chinese-institute-1.18448>
- [12] <https://www.labiotech.eu/tops/crispr-applications-gene-editing/>
- [13] <https://www.newscientist.com/article/2121503-can-we-grow-woolly-mammoths-in-the-lab-george-church-hopes-so/>