

SUSTAV CRISPR/CAS9 – ALAT ZA PRECIZNO UREĐIVANJE GENOMA

Anja Bukovac^{1,2}, Niko Njirić^{1,2}, Barbara Tomić^{1,2}, Anja Kafka^{1,2}, Nives Pećina-Šlaus^{1,2}

¹ Zavod za biologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu;

² Laboratorij za neuroonkologiju, Hrvatski institut za istraživanje mozga, Šalata 3, HR-10000 Zagreb

Adresa za dopisivanje:

Prof. dr. sc. **Nives Pećina-Šlaus**

Zavod za biologiju,

Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Šalata 3, 10 000 Zagreb,

e-mail: nina@mef.hr, tel. 4590 201

Sažetak

Jedna od težnji današnje medicine jest mogućnost preinake genoma kao oruđa za borbu protiv bolesti. U želji da pronađu još precizniji i učinkovitiji alat za modifikaciju gena, znanstvenici su razvili mehanizam za uređivanje genoma posredovan bakterijskim nukleazama, nazvan sustavom CRISPR/Cas9. Sustav je prvotno otkriven u bakterija koje ga koriste u obrani stanice domaćina od strane DNA, primjerice prilikom borbe protiv bakteriofaga. Po infekciji, bakterijska stanica razvija „imunitet“ koji može prenijeti na stanice kćeri. Na taj je način bakteriji omogućeno pravovremeno prepoznavanje te obrana od novih infekcija analognog podrijetla, zbog čega se taj sustav smatra mehanizmom adaptabilne bakterijske imunosti. U ovom preglednom radu opisan je izvorni princip djelovanja CRISPR/Cas9 sustava u bakterija, ali i njegova primjena u viših organizama, uključujući sisavce. Uz to donosimo i prikaz njegovih prednosti u usporedbi s drugim platformama za modifikaciju genoma. Također, opisujemo i mogućnosti njegove primjene u neuroznanstvenim područjima, kao što je kreiranje modela tumora za neuro-onkološke studije, kao i njegov potencijal u liječenju poremećaja i bolesti s genetskom predispozicijom, primjerice psihijatrijskih entiteta poput shizofrenije. Naposljetku, razmatramo neke od etičkih dilema povezanih s upotrebom tog revolucionarnog alata za uređivanje genoma.

KLJUČNE RIJEČI: CRISPR/Cas9, etika, uređivanje genoma, neuroonkologija, nukleaza

Jedna od težnji današnje medicine jest mogućnost preinake genoma kao oruđa za borbu protiv bolesti. U želji da pronađu najbrži i najučinkovitiji alat kojim mogu modificirati neispravne gene, znanstvenici su razvili precizan mehanizam za uređivanje genoma korištenjem bakterijskih nukleaza nazvan CRISPR/Cas9.

Otkriće da su određeni bakterijski sojevi, kao i većina pripadnika carstva Archaea, razvili sofisticirani adaptabilni mehanizam obrane pomoću specifičnih lokusa u svom genomu nazvanih CRISPR (*engl. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat*) i genima zvanim *Cas* (skraćeno od *engl. CRISPR-associated genes*) predstavlja velik korak u smjeru modifikacije genoma.¹ Bakterije su jednostanični organizmi koji su tijekom svojeg kratkog života izloženi neprestanoj opasnosti da drugi mikroorganizmi pokušaju u njihov genom ugraditi dio svog genoma. Kako bi se obranile od te opasnosti bakterije su razvile pril-

godljiv sustav CRISPR/Cas9 koji im omogućuje stjecanje svojevrsne otpornosti na stranu DNA.² S obzirom na to da ovaj mehanizam bakterijama omogućuje prepoznavanje i obranu od budućih novih infekcija, CRISPR/Cas9 sustav može se smatrati oblikom stečene imunosti, asociirajući na stečenu imunost kompleksnijih organizama.² Treba imati na umu da se dodirna točka ove usporedbe odnosi isključivo na pojam opetovanog prepoznavanja, a ne na same molekularne i stanične mehanizme.

U ovom će preglednom radu biti opisan princip djelovanja izvornog bakterijskog sustava CRISPR/Cas9, kao i njegova primjena za genske preinake u viših organizama, uključujući sisavce.

PODRIJETLO CRISPR MECHANIZMA

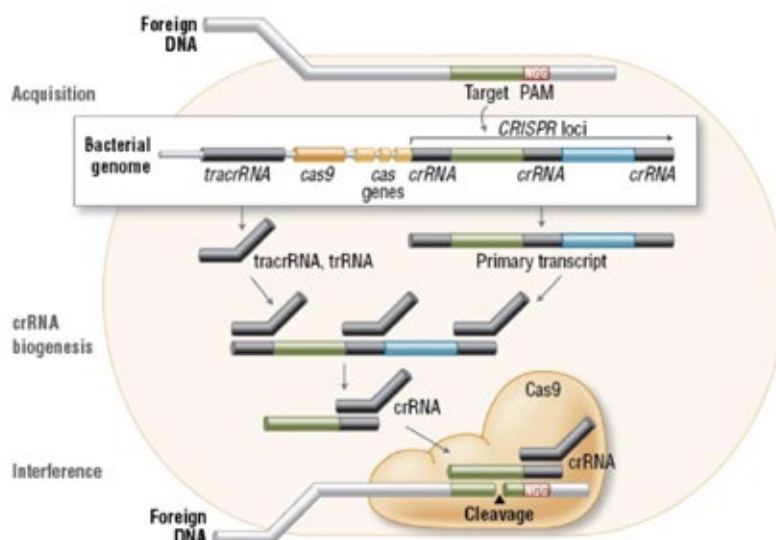
Kako bismo mogli razumjeti današnju široku primjenu sustava CRISPR/Cas9 potrebno je prvo razjasniti prirodne mehanizme koji se odvijaju u bakterijskoj stanici. Kako smo već naglasili sustav u bakterijama ima ulogu obrane stanice domaćina od virusne DNA, primjerice protiv bakteriofaga. Treba naglasiti da sustav djeluje u onih bakterija koje uspiju preživjeti virusnu infekciju. Tijekom infekcije bakterijska stanica razvija „imunost“ na način da ugradi dijelove genoma faga i pohrani ih u svojem genomu. Tako bakterija koja je preživjela infekciju stečeni „imunitet“ može prenijeti na stanice kćeri. Kako bi to ostvarila, bakterijska stanica „razbija“ DNA virusa u male fragmente koje potom inkorporira u CRISPR lokuse svojeg genoma. Na taj je način ostvarena molekularna memorija prethodnih susreta sa stranom genetičkim materijalom neprijatelja. Konačni rezultat jest da će sve stanice kćeri sadržavati ugrađeni dio genetskog materijala virusa, te kažemo da su „zaštićene“.

Kako bismo razjasnili ovaj fenomen zaštićenosti potrebno je opisati molekularne mehanizme koji se odvijaju u bakterijama. Transkripcijom cijelog lokusa CRISPR nastaje pre-crRNA (engl. *pre-CRISPR RNA*) koja uz CRISPR ponavljanja sadrži i prethodno ugrađene fragmente genoma virusa. Potom sledi cijepanje pre-crRNA na manje RNA fragmente nazvane crRNA (skraćeno od CRISPR RNA). Svaka crRNA nastala ovim cijepanjem sastoji se od CRISPR sekvenci i sekvenci virusnog genoma. Tako je osigurana specifičnost sekvenci pomoću kojih crRNA mogu selektivno prepoznati stranu DNA prilikom ponovnih virusnih infekcija. U završnoj fazi dolazi do slaganja ribonukleoproteinskog kompleksa sačinjenog od molekule crRNA i nukleaze Cas koji specifično cijepa strane nukleinske kiseline, štiteći stanicu od novih infekcija fagima s kojima su se prethodne generacije bakterija već bile susrele.

Dvije su glavne komponente lokusa CRISPR. Prva komponenta izravna su ponavljanja (engl. *direct repeats*), a drugu sačinjavaju multipli geni *Cas*. Izravna ponavljanja

su nukleotidna ponavljanja duljine od 21 do 47 parova baza, a koja su dijelom palindromska.¹ Ta su ponavljanja odvojena, tj. pravilno isprekidana, sekvencama sličnih duljina poznatima kao *razdvajajuće sekvence* (engl. *spacer sequences*). Razdvajajuće sekvence mogu vući podrijetlo od transpozona, ali su najčešće fragmenti strane DNA preuzete iz „stranih izvora“ poput plazmida ili virusa.¹ Imajući to na umu, možemo se pitati, nije li to upravo ono što je bakterijska stanica pokušala spriječiti? Trik je u tome što su *razdvajajuće sekvence* samo fragmenti genoma tog stranog „napadača“.^{1,2} Bakterijska stanica, koja je preživjela virusnu infekciju, razrezat će virusni genom u male bezopasne fragmente i tek ih potom ugraditi u svoj genom.^{2,3} Nadalje, oni neće biti inkorporirani u bakterijski genom nasumično, nego isključivo na točno određeno mjesto, CRISPR lokus.^{2,3} Tako razrezani fragmenti postaju dijelom ranije spomenutih *razdvajajućih sekvenci*. Jednom kad fragmenti virusnog genoma postanu dijelom CRISPR lokusa, oni bivaju prepisani zajedno s ostatkom CRISPR-niza kao jedinstvena mRNA molekula.¹ Takva velika prekursorska molekula mRNA, naziva se također i prekursorska CRISPR RNA ili pre-crRNA.³ Nakon njene transkripcije, pre-crRNA se obrađuje što u konačnici rezultira formiranjem mnogih manjih transkripata poznatijih kao crRNA.^{1,3} Treba spomenuti da crRNA sadržava regije komplementarne *razdvajajućim sekvencama* CRISPR-niza tzv. *protorazdvajajuće regije* (engl. *protospacer regions*) koje su također komplementarne fragmentima strane DNA. Zahvaljujući takvoj mjesno-specifičnoj komplementarnosti, protorazdvajajuće regije služe kao vodič koji prepoznaje stranu DNA tijekom nove infekcije. Pojednostavljeno, crRNA je signal koji omogućuje enzimu, nukleazi, koji uništava stranu DNA, da prepozna svoj cilj.

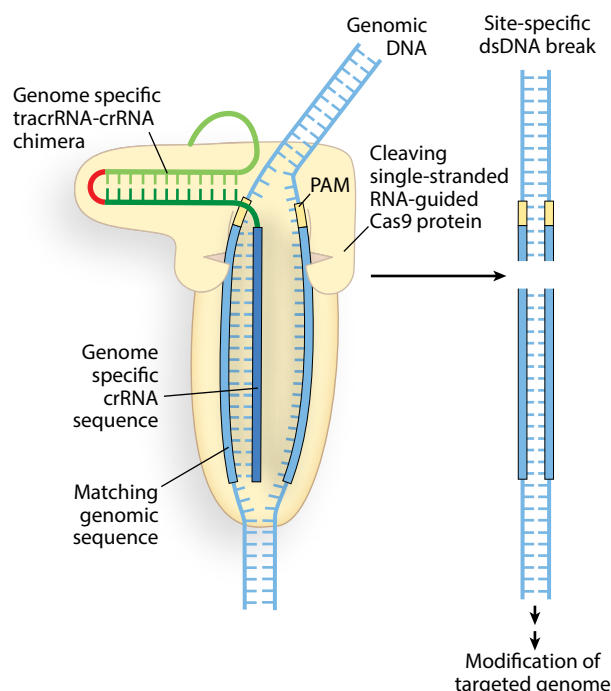
Postoji mnogo različitih enzima Cas 9, koji vuku podrijetlo iz različitih bakterija, no najčešće korištena je nukleaza SPyCas9, izolirana iz piogenog streptokoka (*Streptococcus pyogenes*). Svaki enzim Cas9 prepoznaje



Slika 1. CRISPR/Cas9 mehanizam *in vivo*.

Izvor: Reis A, Hornblower B, Robb B, Tzertzinis G. CRISPR/Cas9 and Targeted Genome Editing: A New Era in Molecular Biology. *NEB expressions*. 2014;(1):3-6. Copyright © 2014, New England Biolabs. All Rights Reserved

specifičnu sekvencu PAM (*engl. protospacer adjacent motif sequence*). Riječ je o 2 – 6 nukleotida dugačkoj regulatornoj sekvenci koja se nalazi „nizvodno“ od ciljnog mjesta prepoznavanja na DNA. Ovo prepoznavanje i komplementarno vezanje aktivira dotičnu nukleazu Cas9.⁴ Međutim, crRNA nije u mogućnosti sama usmjeriti nukleazu Cas9. Postoji dodatna molekula uključena u taj proces, koja asistira pri vezanju crRNA i nukleaze Cas. Riječ je o tzv. transaktivirajućoj RNA (tracrRNA), koja sadržava sekvencu djelomice komplementarnu odgovarajućoj crRNA.^{1,2} Na temelju tog prepoznavanja tracrRNA veže crRNA služeći kao neka vrsta mosta, tj. poveznice crRNA i Cas proteina. TracrRNA su također kodirane genskim sustavom CRISPR. Odmah po nastanku crRNA-tracrRNA-Cas kompleksa te njegovom komplementarnom prepoznavanju strane DNA, nukleaza reže oba lanaca strane DNA (Slika 1).¹



Slika 2. Ciljano (precizno usmjereno, *engl. targeted*) uređivanje genoma. Ljubaznošću H. Adama Steinberga artforscience.com.

Ukratko, *in vivo* sustavi CRISPR inkorporiraju sekvence strane DNA u CRISPR-nizove. Na temelju njih nastaju crRNA komplementarne sekvencama strane DNA. crRNA se vežu s tracrRNA i taj par molekula usmjeruje nukleazu Cas9 na ovo mjesto. Kompleks crRNA-tracrRNA-Cas9 reže i uništava stranu DNA (Slika 1). Mehanizmom CRISPR/Cas9 bakterije stvaraju neku vrstu baze podataka koja im omogućava prepoznavanje prijetnji s kojima su se već bile susrele u prošlosti. U potrazi za analogijom u našoj svakodnevnici, sustav bismo mogli usporediti s bazama podataka koje koriste antivirusni programi naših računala. Te se baze neprestano ažuriraju informacije o većini trenutno poznatih opasnih programa (virusa) te tako

omogućuju antivirusnom programu da pravovremeno prepozna njihovu aktivnost i na vrijeme poduzme nužne korake prevenirajući ozbiljnu štetu.

Iako je iz prethodnog opisa sustava CRISPR/Cas9 vidljivo da su bakterije i Archaea dobili bitku, rat protiv virusa se i dalje nastavlja. Određeni bakteriofagi imaju sposobnost nadilaženja CRISPR/Cas9 interferencije pomoću mehanizama, kao što su primjerice akumulacije *indel*-a u sklopu svog genoma; unosom mutacija u ciljnu sekvencu, ili rekombinacijom u slučaju istovremene paralelne infekcije različitim virusima.³ Uprkos tomu, bakterije su nam pružile vrijedan alat koji već danas primjenjujemo u mnogim područjima obrade genoma.

PRINCIPI KORIŠTENJA CRISPR/CAS9 U MODIFICIRANJU GENA

Takozvana „CRISPR-revolucija“ započela je 2012. godine, radom autorica Jennifer Doudna i Emmanuelle Charpentier. U njihovom radu je naglašen potencijal ovog bakterijskog mehanizma stečene imunosti za editiranje genoma.² CRISPR/Cas9 mehanizam se sastoji od 3 faze: adaptacije, ekspresije i interferencije. U adaptacijskoj se fazi *spacer* elementi ugrađuju u lokuse CRISPR. Za vrijeme ekspresijske faze slijedi prepisivanje u prekursorsku crRNA i rezanje u manje fragmente, nazvane crRNA. Interferencijska faza se sastoji od vezanja jednog dijela crRNA molekule na komplementarni slijed na genomskoj DNA bakterije, a drugog njenog dijela za tracrRNA, molekulu koja na sebe veže katalitički enzim Cas9.^{4,5}

Ideja korištenja CRISPR/Cas9 u editiranju gena je relativno jednostavna. Proizvodnjom crRNA molekule sa sekvencom nukleotida koja je komplementarna regiji našeg interesa te proizvodnjom njoj komplementarne tracrRNA, moguće je izvoditi precizno usmjerene lomove dvostruke uzvojnice DNA, posredovane Cas9 endonukleazom. crRNA i tracrRNA se mogu uvesti zasebno pa potom stvoriti dupleks, ili mogu pomoću povezujuće petlje (*linker loop*) unaprijed biti spojene u *single-guide* RNA (sgRNA ili gRNA). Zbog podrijetla iz dvaju različitih genskih lokusa takva se RNA molekula još naziva i kimerična RNA.⁶ Najčešće korišteni CRISPR/Cas9 sustavi koriste sgRNA, koje spajanjem s Cas9 posreduju u izrezivanju slijeda komplementarnog s 20 nukleotida 5' kraja sgRNA. Ovaj slijed smješten je uz sekvencu nazvanu PAM (*engl. protospacer adjacent motif sequence*). Korištenje tako dizajnirane RNA po želji dovodi do izrezivanja ciljnog lokusa, stvaranjem lomova dvostruke uzvojnice DNA. Nastanak tih lomova pokreće mehanizam popravka DNA putem homologne rekombinacije. Treba naglasiti da je homologna rekombinacija prirodni stanični mehanizam popravka oštećene DNA. Ovaj tip genetičke rekombinacije iniciran je dvolančanim lomovima u molekuli DNA. Dijelovi molekula DNA koji nedostaju se nadoknađuju pomoću homolognih sekvenci koje služe kao predložak za sintezu ispravnog slijeda. Ovim putem se DNA molekula s visokom preciznošću obnavlja od oštećenja, na način da ne dolazi do dodavanja ili gubitka niti jednog nukleotida. Koristeći stanični prirodni intrinzični mehanizam popravka, moguće je unositi promjene odnosno korekcije genoma (Slika 2).

Tablica 1. Primjeri organizama i tipova stanica modificiranih pomoću Cas 9.

Izvor: Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol.* 2014;32(4):347-355. doi:10.1038/nbt.2842.

Copyright © 2014, Rights Managed by Nature Publishing Group

Cell type or organism	Cas9 form	Cell type	Reference numbers
Human cells	Cas9 nuclease	HEK293FT, HEK293T,	9,13–16,47,
		HEK293, K562, iPSC,	49–51,54,59,
		HUES9, HUES1,	84,85
		BJ-RiPS, HeLa, Jurkat, U2OS	
	Cas9 nickase	HEK293FT, HEK293T	13,14,47,49
	dCas9 (gene regulation)	HEK293FT, HEK293T	70–72,74,82
	dCas9 (imaging)	HEK293T, UMUC3, HeLa	81
Mouse or mouse cells	Cas9 nuclease	Embryos	14,24–26
		Embryos	47
	Cas9 nickase	Embryos	47
	dCas9 (gene regulation)	NIH3T3	74
Rat	Cas9 nuclease	Embryos	26,36
Rabbit	Cas9 nuclease	Embryos	27
Frog	Cas9 nuclease	Embryos	28
Zebrafish	Cas9 nuclease	Embryos	17,33,37,60,85
Fruit fly	Cas9 nuclease	Embryos	29,30,61
Silkworm	Cas9 nuclease	Embryos	31
Roundworm	Cas9 nuclease	Adult gonads	32,62–67
Rice	Cas9 nuclease	Protoplasts, callus cells	21,23
Wheat	Cas9 nuclease	Protoplasts	21
Sorghum	Cas9 nuclease	Embryos	23
Tobacco	Cas9 nuclease	Protoplasts, leaf tissue	19,20,23
Thale cress	Cas9 nuclease	Protoplasts, seedlings	19,23
Yeast	Cas9 nuclease	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
Bacteria	Cas9 nuclease	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>E. coli</i>	8
		<i>E. coli</i>	69,70

HEK, human embryonic kidney; iPSCs, induced pluripotent stem cells; UMUC3, human bladder cancer.

Važno je spomenuti rad objavljen u časopisu Cell u kojem je sustav CRISPR/Cas9 prvi put primjenjen u editiranju genoma majmuna.⁷ Koinjektivom Cas9 mRNA i sgRNA u jednostanične embrije *cinomolgus* majmuna postignuto je precizno ciljanje gena, čime su isključena dva gena: *Ppar-g* i *Rag-1*. 2015. godine je u časopisu Protein Cell objavljen etički kontroverzan rad, koji donosi primjenu CRISPR/Cas9 tehnologije u humanom preimplantacijskom embriju gdje je učinkovito pocijepan endogeni β -globinski gen (*HBB*).⁸

Postoje dva osnovna mehanizma popravka DNA: nehologno spajanje krajeva (*non-homologous end joining - NHEJ*) i homologni rekombinacijski popravak (*homology-directed repair - HDR*). Nehologno spajanje krajeva je mehanizam koji je sklon pogreškama i često rezultira točkastim mutacijama (insercijama ili delecijama). Nasuprot tom mehanizmu, homologni rekombinacijski popravak koristi kalup koji može biti sestrinska kromatida ili egzogena komplementarna DNA kao predložak za popravak dvostrukih lomova molekule DNA. HDR je koristan u editiranju gena budući da omogućuje „ubacivanje“ čitavih gena na mjesto dvostrukog loma. Nakon što sustav CRISPR/Cas9 svojom aktivnošću napravi lom na točno određenom mjestu u DNA, na to mjesto moguće je ubaciti željenu sekvencu nukleotida dokle god su njezini krajevi homologni s „lijevim“ i „desnim“ krajevima reza.⁹ Homologni rekombinacijski popravak je moguć tijekom G2 i S faze staničnog ciklusa, stoga neće biti učinkovit u stanicama

koje se ne dijele. Nekoliko novih eksperimentalnih pristupa pokušava nadoknaditi ovaj nedostatak.¹⁰

Unatoč svojoj visokoj specifičnosti, enzim Cas9 ponekad griješi i može djelovati izvan ciljnog mjesta, što dovodi do mutagenog učinka. Stoga se razvija nekoliko strategija s ciljem sprječavanja aktivnosti izvan ciljnog mjesta, što je nužan preduvjet za sigurnu kliničku primjenu u budućnosti. Jedna od strategija je proizvodnja enzima Cas9 s inaktivnim domenama, HNH ili RuvC, što uzrokuje nemogućnost stvaranja lomova dvostruke uzvojnice, ali je stvaranje jednolančanih lomova još uvijek održano. Ovako možemo spriječiti mutageni učinak izvan ciljnog mjesta. Drugi pristup ciljnom mjestu dodatno povećava specifičnost stvaranjem gRNA orijentiranih u oba smjera.

Otkad je publiciran prvi rad o CRISPR/Cas9 sustavu 2012. godine, veliki broj članaka je pokazao kako ovaj sustav može rezati razne molekule DNA kod različitih stanica i organizama. Uspješno je primijenjen u humanim tumorskim staničnim linijama i humanim pluripotentnim matičnim stanicama, kao i u bakterija, ribe zebrića, kvascu, duhanu, riži, pšenici, miševima, štakorima, zečevima, žabama, vinskih mušicama itd. (Tablica 1).¹¹

USPOREDBA EX VIVO I IN VIVO PRIMJENE SUSTAVA CRISPR/CAS9

CRISPR/Cas9 sustav je moguće primijeniti *ex vivo* i *in vivo*. Primjenom *ex vivo* je moguće stvarati životinjske modele bolesti kako bismo istraživali nepoznate funkcije pojedinih gena. Primjenom CRISPR/Cas9 u stadiju zigote, moguće je istovremeno uzrokovati više mutacija. Ta je mogućnost prije bila ostvariva samo križanjem nekoliko generacija životinja koje su posjedovale samo jednu mutaciju. Unatoč toj prednosti, nedostatak CRISPR/Cas9 metode *ex vivo* je njezina niska efikasnost i potencijalno stvaranje jedinki s mozaicizmom. Trenutno se radi na poboljšanjima kako bi se zaobišli ovi nedostaci.^{7,12} Drugi primjer korištenja *ex vivo* primjene CRISPR/Cas9 je u istraživanju na pacijentima s karcinomom pluća. Nakon što im se uzmu limfociti iz periferne krvi, CRISPR/Cas9 metodom se nokautira gen koji kodira protein programirane stanične smrti 1 (Programmed cell death protein 1). Potom se limfociti vrata u krvotok pacijenata. Ovo je prvi primjer kliničkog istraživanja u kojem se koristi CRISPR/Cas9.¹³ *Ex vivo* primjene sustava CRISPR/Cas9 za manipulaciju ljudskim genomom, pogotovo gametama, je razlog velikih etičkih dilema o kojima se vode brojne rasprave.

In vivo primjena je obećavajuća strategija liječenja mnogih genskih bolesti koje se nasljeđuju po Mendelu, ali i onih s ne-mendelovskim nasljeđivanjem. *In vivo* primjena CRISPR/Cas9 koristi virusne i ne-virusne metode dostave ispravnih gena. Virusne su pogodne zbog svoje visoke učinkovitosti, a na temelju ugradnje u DNA domaćina dijele se na integrirajuće (retrovirusi, lentivirusi) i neintegrirajuće (adenovirusi, adeno-asocirani virusi (AAV)). Ne-virusni sustavi dostave gena se koriste nanočesticama: kationskim nano-nosiocima, liposomima i polimernim materijalima. Iako su ove metode sigurnije za domaćina i lakše za proizvodnju, nedostatak im je otežan prolazak kroz membranske barijere stanice.¹⁴

Tablica 2. Sistematična usporedba ZFN, TALEN i CRISPR/Cas9 platformi za uređivanje genoma.Izvor: Eid A, Mahfouz MM. *Genome editing: the road of CRISPR/Cas9 from bench to clinic.**Exp Mol Med.* 2016;48(10):e265. doi:10.1038/emmm.2016.111.

Copyright © 2016 KSBMB (Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology)

Available under the CC BY-NC-ND 4.0 International license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

	ZFN	TALEN	CRISPR/Cas9
Construction	Protein engineering for every single target	Protein engineering for every single target	20-Nucleotide sequence of sgRNA
Targeting	Protein-DNA interaction, less predictable	Protein-DNA interaction, less predictable	DNA-RNA interactions, highly predictable
Delivery	Two ZFNs around the target sequence are required	Two TALENs around the target sequence are required	sgRNA complementary to the target sequence with Cas9 protein
Multiplexing	Challenging	Challenging	Highly feasible
Feasibility of library construction and transformation for genome-wide screens	Technically challenging	Technically challenging	Highly feasible
Affordability	Resource intensive and time consuming	Affordable but time consuming	Highly affordable

Abbreviations: CRISPR/Cas9, clustered regularly interspaced palindromic repeats/CRISPR-associated-9; sgRNA, single-guide RNA; TALEN, transcription activator-like effector nuclease; ZFN, zinc-finger nuclease.

CRISPR/CAS9 U USPOREDBI S DRUGIM TEHNIKAMA EDITIRANJA GENOMA

Otkriću CRISPR/Cas9 prethodile su dvije metode koje obje koriste programabilne nukleaze: nukleaze cinkovih prstiju (zinc finger nucleases – ZFN) i efektorske nukleaze nalik transkripcijskom aktivatoru (transcription activator like effector nucleases – TALEN). ZFN sustav se sastoji od dvije komponente: proteina s motivom cinkovih prstiju zaslužnih za vezanje na DNA te domena sa endonukleaznom aktivnošću FokI. Iako je metoda visoko specifična, proizvodnja ZFN je kompliciranija od CRISPR/Cas9 i zahtijeva znano veće tehničko znanje.¹⁴ TALEN se također sastoji od dvije komponente: od iste FokI nukleaze prisutne i kod ZFN, te od DNA-vezujuće domene koja sadrži 33-35 poddomena s ponavljajućim aminokiselinama. Iako su TALEN jednostavnije građe od ZFN, njihova veličina otežava dopremu do ciljnih stanica. Zahvaljujući svom prokariotskom podrijetlu ove nukleaze također mogu potaknuti imunološki odgovor.^{14,15} Budući da se CRISPR/Cas9 metoda bazira na interakcijama RNA i DNA, za razliku od prethodno navedenih metoda koje koriste interakcije RNA i proteina, CRISPR/Cas9 lakše cilja više lokusa odjednom korištenjem višestrukih gRNA. To je mnogo teže postići kod tehnika starijeg datuma, ZFN i TALEN. CRISPR/Cas9 je također jeftinija metoda od ZFN, a zahtijeva manje vremena za provođenje od TALEN metode (Tablica 2).¹⁶

PRIMJENA SUSTAVA CRISPR/CAS9 U BOLESTIMA SREDIŠNJEG ŽIVČANOG SUSTAVA

CRISPR/Cas9 je primjenjiv u terapijske svrhe na nekoliko načina: može ispravljati mutacije koje uzrokuju monogenске bolesti, mijenjati genom patogena a time i njihovu virulenciju (npr. HIV), ili pak inducirati protektivnu ulogu

gena domaćina. Također postoji velik potencijal primjene ove tehnike u liječenju malignih bolesti bilo putem inaktivacije onkogenih ili aktivacije tumor-supresorskih gena. Potencijalna primjena sustava CRISPR/Cas9 u liječenju bolesti središnjeg živčanog sustava susreće specifične prepreke. Budući da većina neurona nije mitotski aktivna, liječenje bolesti središnjeg živčanog sustava preinakom gena putem homologne rekombinacije predstavlja izazov. Krvno-moždana barijera također otežava primjenu. Unatoč ovim preprekama, razvijaju se načini za primjenu sustava CRISPR/Cas9. Na primjerima shizofrenije i tumora mozga možemo ilustrirati u kojem se smjeru kreću trenutna istraživanja.

Shizofrenija je psihijatrijski poremećaj karakteriziran abnormalnim socijalnim ponašanjem. Između brojnih genetskih uzroka, bolest je također karakterizirana prisutnošću brojnih regulatornih nekodirajućih RNA molekula. S obzirom da je teže provoditi translaciju psihijatrijskih bolesti na životinjske modele u odnosu na neke druge genske bolesti, uporaba CRISPR/Cas9 omogućila bi preinaku nekodirajućih RNA molekula, a time i promjenu njihove aktivnosti što bi ponudilo modele bolesti, kao i razine djelovanja potencijalne terapije.¹⁷

Neuroonkologija je područje koje bi također moglo profitirati od primjene CRISPR/Cas9 tehnologije. Tumorske bolesti su karakterizirane prisutnošću brojnih mutacija, što otežava stvaranje njihovog modela. CRISPR/Cas9 omogućuje mutaciju u više gena odjednom, te time pruža mogućnosti u modeliranju tumora mozga. Zuckermann i suradnici su to pokazali na modelima glioblastoma i meduloblastoma koje su uspjeli proizvesti delecijom jednog gena (*Ptch1*) ili njih nekoliko (*Trp53*, *Pten*, *Nf1*). Time je omogućeno specifičnije istraživanje *in vitro*, a slijedom toga je i povećan potencijal za translaciju prema kliničkoj primjeni.¹⁸

ETIČKE DVOJBE

CRISPR/Cas9 je revolucionarno oruđe za editiranje genoma, s praktički neograničenim potencijalom. Stoga granice u primjeni ove metode vjerojatno neće biti vezane uz tehničku izvedbu, nego uz etičke izazove koje predstavlja. 2015. godine je u Washingtonu održan Međunarodni summit o modificiranju i preinakama humanih gena, gdje je raspravljano o primjeni CRISPR/Cas9 na ljudskim spolnim stanicama i postavljen je moratorij na takvu primjenu. Nedugo nakon toga objavljena su 2 članka o primjeni CRISPR/Cas9 na ljudskim tripronuklearnim embrijima, uzrokujući velike kontroverze.¹⁹ Na summitu je zaključeno da se primjena CRISPR/Cas9 u bazičnom i kliničkom istraživanju može

nastaviti uz poštivanje zakona i etičkih smjernica. Naglasak je stavljen na isključivu primjenu CRISPR/Cas9 u somatskim stanicama. Razlog tomu je da bi se primjenom CRISPR/Cas9 u ljudskim spolnim stanicama zadana promjena nasljeđivala u sljedećim naraštajima. Modifikacija spolnih stanica imala bi nepredvidive posljedice na ljudsku evoluciju stoga je takva vrsta primjene do daljnega zabranjena. Unatoč tomu nastavlja se rasprava mogu li potencijalna saznanja iz takvih istraživanja nadjačati moguće posljedice i moralne/etičke dileme. Unatoč svemu, CRISPR/Cas9 je zbog svojih karakteristika poželjna metoda za editiranje gena u somatskim stanicama, s velikim potencijalom za kliničku primjenu.

Literatura:

1. Chelliah J. CRISPR/Cas9 : Why Is It Suddenly Everywhere? | eScience Info.
2. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012;337(6096):816-821. doi:10.1126/science.1225829.
3. Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nat Rev Genet*. 2010;11(3):181-190. doi:10.1038/nrg2749.
4. Pellagatti A, Dolatshad H, Valletta S, Boultonwood J. Application of CRISPR/Cas9 genome editing to the study and treatment of disease. *Arch Toxicol*. 2015;89(7):1023-1034. doi:10.1007/s00204-015-1504-y.
5. Lundgren M, Charpentier E, Fineran PC, eds. *CRISPR: Methods and Protocols*. 1st ed. New York: Humana Press; Springer NY; 2015.
6. Gibson GJ, Yang M. What rheumatologists need to know about CRISPR/Cas9. *Nat Rev Rheumatol*. 2017;13(4):205-216. doi:10.1038/nrrheum.2017.6.
7. Niu Y, Shen B, Cui Y, et al. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell*. 2014;156(4):836-843. doi:10.1016/j.cell.2014.01.027.
8. Liang P, Xu Y, Zhang X, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell*. 2015;6(5):363-372. doi:10.1007/s13238-015-0153-5.
9. Zhang J-P, Li X-L, Li G-H, et al. Efficient precise knockin with a double cut HDR donor after CRISPR/Cas9-mediated double-stranded DNA cleavage. *Genome Biol*. 2017;18(1):35. doi:10.1186/s13059-017-1164-8.
10. Fellmann C, Gowen BG, Lin P-C, Doudna JA, Corn JE. Cornerstones of CRISPR-Cas in drug discovery and therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2017;16(2):89-100. doi:10.1038/nrd.2016.238.
11. Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol*. 2014;32(4):347-355. doi:10.1038/nbt.2842.
12. Fellmann C, Gowen BG, Lin P-C, Doudna JA, Corn JE. Cornerstones of CRISPR-Cas in drug discovery and therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2017;16(2):89-100. doi:10.1038/nrd.2016.238.
13. Cyranoski D. Chinese scientists to pioneer first human CRISPR trial. *Nature*. 2016;535(7613):476-477. doi:10.1038/nature.2016.20302.
14. Moreno AM, Mali P. Therapeutic genome engineering via CRISPR-Cas systems. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2017;9(4). doi:10.1002/wsbm.1380.
15. Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol*. 2013;31(7):397-405. doi:10.1016/j.tibtech.2013.04.004.
16. Eid A, Mahfouz MM. Genome editing: the road of CRISPR/Cas9 from bench to clinic. *Exp Mol Med*. 2016;48(10):e265. doi:10.1038/emmm.2016.111.
17. Zhuo C, Hou W, Hu L, Lin C, Chen C, Lin X. Genomic Editing of Non-Coding RNA Genes with CRISPR/Cas9 Ushers in a Potential Novel Approach to Study and Treat Schizophrenia. *Front Mol Neurosci*. 2017;10:28. doi:10.3389/fnmol.2017.00028.
18. Zuckermann M, Hovestadt V, Knobbe-Thomsen CB, et al. Somatic CRISPR/Cas9-mediated tumour suppressor disruption enables versatile brain tumour modelling. *Nat Commun*. 2015;6:7391. doi:10.1038/ncomms8391.
19. Plaza Reyes A, Lanner F. Towards a CRISPR view of early human development: applications, limitations and ethical concerns of genome editing in human embryos. *Development*. 2017;144(1):3-7. doi:10.1242/dev.139683.

CRISPR/CAS9 SYSTEM – A TOOL FOR PRECISE GENOME EDITING

Abstract

One of the aims of modern medicine is to fight diseases via genome editing. In order to find an even more precise and effective way to modify specific genes, scientists have developed a mechanism mediated by bacterial nucleases called the CRISPR/Cas9 system. This system was first discovered in bacteria where it is used to defend the host cell from foreign DNA, i.e. a type of defense against bacteriophages. After the infection, bacteria can develop “immunity” that can be transmitted to bacterial daughter cells via vertical gene transfer. Since it helps bacteria to recognize and fight new infections of analogous origin, the system was characterized as adaptable bacterial immunity. In this review article we describe the original mechanisms of the bacterial CRISPR/Cas9 system, as well as its applications in higher organisms, including mammals, and discuss its advantages in comparison to other genome-engineering platforms. We also present its possible applications in neuroscientific fields, such as creating brain tumour models for neurooncologic studies, as well as its therapeutic potential in treating diseases with a genetic basis, especially psychiatric ones like schizophrenia. In the end, we discuss the ethical dilemmas associated with the usage of this revolutionary genome editing tool.

KEYWORDS: CRISPR/Cas9, ethics, genome editing, neurooncology, nuclease

Received November 17, 2016.

Accepted April 24, 2017.

FIND OUT MORE:

YouTube

<https://www.youtube.com/watch?v=1G7q3PC1sUo>