

# REPAIR - novi alat za mijenjanje genoma pomoću Cas13

---

Majsec, Petra

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:431661>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-28**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**PRIRODOSLOVNO - MATEMATIČKI FAKULTET**  
**BIOLOŠKI ODSJEK**

REPAIR - novi alat za mijenjanje genoma pomoću Cas13

REPAIR - new tool for RNA editing with Cas13

SEMINARSKI RAD

Petra Majsec  
Preddiplomski studij molekularne biologije  
(Undergraduate Study of Molecular Biology)  
Mentor: izv. prof. dr. sc. Ivana Ivančić Baće

Zagreb, 2018.

## Sadržaj

1. UVOD .....	3
2. CRISPR-Cas.....	4
2.1 Mehanizam djelovanja sustava CRISPR-Cas kod bakterija .....	4
2.2 Građa sustava CRISPR-Cas i njihova podjela .....	5
2.3.1 Protein Cas13.....	6
2.3.2 Usporedba proteina Cas9 i Cas13.....	7
3. UREĐIVANJE GENOMA .....	9
3.1 Uređivanje genoma cijepanjem .....	9
3.2 Prenamjena sustava CRISPR-Cas .....	10
4. Uređivanje genoma bez cijepanja .....	12
4.1 Dijelovi i uloga sustava REPAIR.....	12
4.2 Optimizacija sustava REPAIR .....	14
4.3 Rezultati istraživanja.....	15
4.4 Moguća primjena sustava REPAIR sustava.....	16
4.5 Etičko pitanje oko uređivanja transkriptoma.....	16
5. ZAKLJUČAK.....	17
6. LITERATURA.....	18
7. SAŽETAK.....	20
8. SUMMARY .....	20

# 1. UVOD

Povijest života je isprepletena neprestanim bitkama između parazita i domaćina tijekom koje obje strane razvijaju različite strategije obrane i protuobrane, stalno ih upotpunjujući. Gotovo svi stanični oblici života, osim nekih intracelularnih parazitskih bakterija, kombiniraju više antivirusnih obrambenih mehanizama <sup>[1]</sup>. Glavne obrambene strategije su: (i) urođena imunost, tj. skup mehanizama koji aktivno sprječavaju umnožavanje virusa, (ii) adaptivna imunost, tj. skup mehanizama koji uključuju prikupljanje genetičkih informacija o određenom virusu i korištenje tih informacija za učinkovito i selektivno suzbijanje umnožavanja istog te (iii) abortivna infekcija tj. programirana stanična smrt.

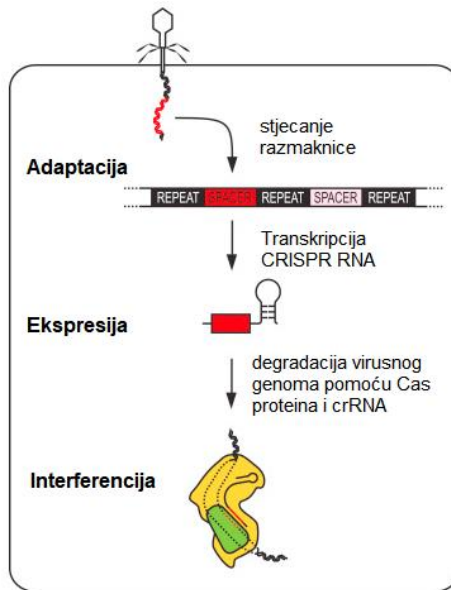
Sustav CRISPR-Cas (eng. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) predstavlja adaptivnu imunost kod bakterija gdje se RNA-vođenim nukleazama izravno cijepaju invazivne nukleinske kiseline faga ili plazmida <sup>[2]</sup>. Tehnologija CRISPR-Cas postala je aktualna u svijetu znanosti zbog prenamjene obrane u ciljano cijepanje DNA važne u uređivanju genoma.

Ovaj seminarski rad opisuje novoosmišljeni alat za uređivanje transkriptoma REPAIR (eng. *RNA Editing for Programmable A to I*). Ukratko, pomoću ovog alata moguća je zamjena baze adenzin u inozin. Uređivanje baza je relativno nova tehnika uređivanja genoma koja sadrži potencijal za ispravljanje štetnih, pojedinačnih nukleotidnih mutacija u ljudskom genomu bez cijepanja DNA. Njegovi dijelovi, način prepoznavanja i uređivanje ciljane RNA pobliže su objašnjeni u poglavljima koji slijede.

## 2. CRISPR-Cas

### 2.1 Mehanizam djelovanja sustava CRISPR-Cas kod bakterija

Sustav CRISPR-Cas je pronađen u većini genoma bakterija i arheja u kojima ima ulogu obrane organizma od napada virusa <sup>[3]</sup>. Obrambeni mehanizam sustava CRISPR-Cas je sačinjen od 3 faze: adaptacije, ekspresije i interferencije <sup>[4]</sup> (Slika 1). Pod fazom adaptacije se podrazumijeva ugradnja razmaknica u lokus CRISPR. Naime, bakterija koja je preživjela napad nepoznatim fagom, dio genoma faga je ugradila u vlastiti genom. Dio izrezane sekvence faga naziva se proto-razmaknica, koja se potom procesira i u obliku razmaknice ugrađuje u genom domaćina, točnije u lokus CRISPR. Kod ponovnog napada istim fagom, bakterija će biti sposobna obraniti se, mobilizirajući pritom proteine Cas (eng. CRISPR associated) koji će degradirati invazivni fag. Ovisno o klasi sustava CRISPR-Cas, jedan ili više proteina Cas procesiraju prepisanu RNA s lokusa CRISPR (pre-crRNA), u male RNA (faza ekspresije). Takva RNA naziva se crRNA (CRISPR RNA) te osigurava adaptivan imunitet protiv stranih genetskih elemenata putem mehanizma koji se temelji na interferenciji RNA <sup>[5]</sup>. Molekula crRNA je vezana ili za jedan protein Cas, npr. Cas9, ili za kompleks sačinjen od više proteina Cas, stvarajući u oba slučaja efektor:crRNA kompleks <sup>[4]</sup>. Konačno, faza interferencije obuhvaća razgradnju stranog genetičkog materijala pomoću Cas:crRNA kompleksa. Prepoznavanje strane DNA/RNA se odvija pomoću komplementarnog sparivanja između crRNA i invazivne DNA/RNA. Proto-razmaknica sadrži motiv uz proto-razmaknicu PAM (eng. *protospacer adjacent motif*), koji se ne ugrađuje u genom domaćina da proteini Cas, prilikom degradacije invazivnog genoma, ne bi degradirali i vlastiti genom <sup>[4]</sup>.



**Slika 1.** Faze obrambenog mehanizama sustava CRISPR-Cas. Preuzeto i prilagođeno iz <sup>[3]</sup>

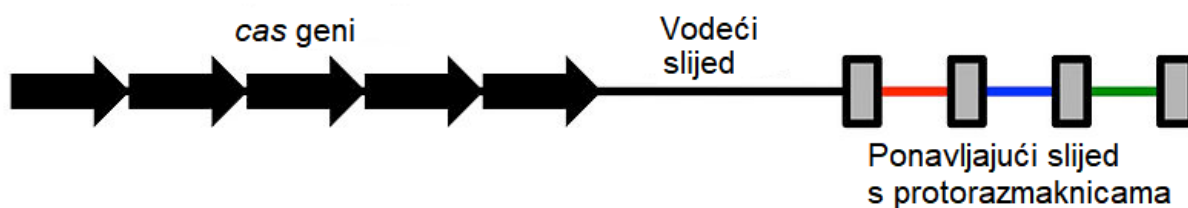
## 2.2 Građa sustava CRISPR-Cas i njihova podjela

Sustav CRISPR-Cas se sastoji od tri glavna dijela: gena *cas*, vodeće regije te ponavljajućeg slijeda s razmaknicama (Slika 2).

Sustav CRISPR-Cas se dijeli na dvije klase, klasu 1 i klasu 2. Klasa 1 se dijeli na tipove I, III i IV, a klasa 2 na tipove II, V i VI. Njihova daljnja podjela je na 19 podtipa koji obuhvaćaju 93 otkrivenih gena *cas*. Klase opisuju sastav kompleksa Cas: djeluje li kao višekomponentni sustav (klasa 1) ili kao jedan polipeptid (klasa 2) <sup>[4]</sup>.

Kod sustava CRISPR-Cas klase 1 više različitih proteina Cas čini kompleks s crRNA. Primjer je sustav CRISPR-Cas tipa I-E u bakteriji *Escherichia coli* koji se sastoji od 8 gena: *cas1*, *cas2*, *cas3* i *casA*, *casB*, *casC*, *casD* i *casE*. Proteini CasABCDE čine kompleks Cascade koji veže i procesira pre-crRNA u kratku zrelu crRNA. Nakon što kompleks Cascade identificira invazivnu DNA, uz pomoć nukleaze Cas3, ju degradira <sup>[6]</sup>.

Kod sustava CRISPR-Cas klase 2 samo jedan protein Cas čini kompleks s crRNA. Primjer je sustav CRISPR-Cas tipa II u bakteriji *Streptococcus pyogenes*. Čini ga veliki multifunkcionalni protein Cas9 koji sadrži nukleaznu domenu kao i crRNA vezujuću domenu <sup>[4]</sup>.



**Slika 2.** Pojednostavljeni prikaz sustava CRISPR-Cas. Preuzeto sa <https://steemit.com/introduceyourself/@jiansoo/crispr-cas9-how-does-it-work>

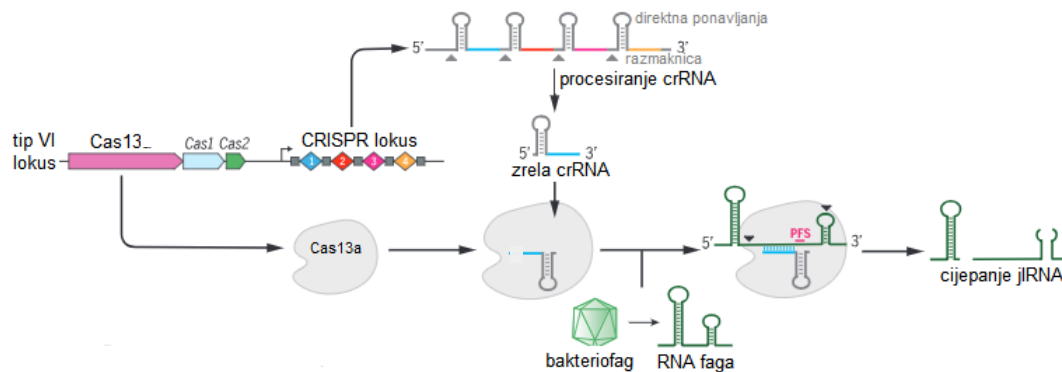
### 2.3.1 Protein Cas13

Protein Cas13 spada u sustav CRISPR-Cas tipa VI, klasu 2. Identificirana su tri proteina iz obitelji proteina Cas13: Cas13a, Cas13b i Cas13c <sup>[7]</sup>. Cas13 posjeduje jedinstvenu dvostruku ribonukleaznu aktivnost: omogućava sazrijevanje crRNA mjesno-specifičnim cijepanjem transkripta lokusa CRISPR te cijepanje invazivne RNA <sup>[8]</sup>.

Kompleks Cas13:crRNA se aktivira nakon vezanja na ciljnu RNA koju cijepa katalitičkim djelovanjem domena HEPN (eng. *higher eukaryotes and prokaryotes nucleotide-binding domains*). Domena HEPN sadrži konzerviranu sekvencu argininskih i histidinskih ostataka, što se slaže s katalitičkim mehanizmom endonukleaze HEPN <sup>[9]</sup>.

Nakon specifičnog cijepanja ciljne RNA, Cas13 cijepa nespecifično ostatak prisutnih jIRNA (jednolančana RNA) (Slika 3). Takvo "promiskuitetno" cijepanje RNA uzrokuje staničnu toksičnost, što rezultira inhibicijom stope rasta bakterije. To upućuje na ulogu Cas13 u izravnom suzbijanju RNA virusa, programiranoj staničnoj smrti te sudjelovanju u indukciji mirovanja (dormacije) potaknutom invazijom virusa. U fazi mirovanja infekcija je usporena što daje bakteriji dodatno vrijeme da se s ostatkom imunskog sustava obrani od napada virusa <sup>[10]</sup>. Koonin i Zang (2017.) smatraju tip VI sustava CRISPR-Cas krajnjom integracijom imuniteta i programirane stanične smrti. Programirana stanična smrt je suicidalan odgovor na infekciju, aktiviran u krajnjem slučaju kada ostali mehanizmi obrane zakažu.

Zanimljivo zapažanje je da nije zabilježena promiskuitetna aktivnost Cas13 u stanicama sisavca. Štoviše, cijepanje ciljnih transkripta nije utjecalo na rast stanica sisavaca koji eksprimiraju slične razine Cas13 [8].



**Slika 3.** Cas13 je crRNA-vođena RNaza koja pruža zaštitu protiv RNA faga. Vežanje Cas13-crRNA na ciljnu RNA također aktivira nespecifičnu aktivnost RNaze koja može dovesti do promiskuitetnog cijepanja RNA bez uvjeta komplementarnosti s crRNA. Preuzeto i prilagođeno iz [11]

### 2.3.2 Usporedba proteina Cas9 i Cas13

Najpoznatiji sustav CRISPR-Cas je svakako CRISPR/Cas9 koji se danas koristi kao jedna od glavnih metoda u genomskom inženjerstvu eukariota [6]. Cas9 je endonukleaza koja pomoću dvije male crRNA i tracrRNA pronalazi ciljnu DNA i cijepa ju. Prirodna (nativna) meta nukleaze Cas9 je dDNA (dvolančana DNA) – ona neće cijepati jIRNA zbog njezine strukture te nedostatka motiva uz proto-razmaknicu PAM na molekuli RNA [12]. PAM su vrlo kratke sekvence, duljine 2-6 baznih parova, na čijem se prvom mjestu nalazi bilo koja baza (N), koju slijede dva gvanina (NGG). PAM direktno prepoznaje nukleaza Cas9, a ne njemu pridružena crRNA. Zbog uvjeta da se motiv PAM mora nalaziti uz ciljno mjesto na DNA, broj potencijalnih mjesta uređivanja DNA pomoću Cas9 je smanjen [13].

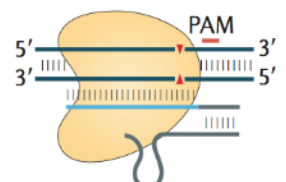
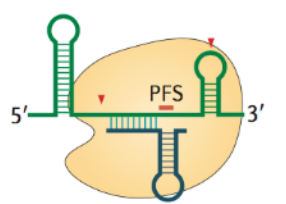
Prepoznavanje i cijepanje jIRNA pomoću Cas9 moguće je dodavanjem dodatne komponente u sustav - komplementarnog DNA oligonukleotida ili PAMmera koji osigurava stvaranje DNA:RNA hibrida. Kompleksnost održavanja takvog sustava je motiviralo znanstvenike da traže proteine Cas kojima je molekula RNA nativna meta [2].

Tako je iz iste obitelji proteina Cas otkriven Cas13 koji prepoznaje i cijepa ciljna mjesta na RNA, za čije prepoznavanje nije potreban PAM. Njegove dvije endonukleazne domene HEPN kod cijepanja jIRNA preferiraju ciljna mjesta s motivima PFS (eng. *protospacer flanking*



site) koji su potrebni za katalitičku aktivnost Cas13<sup>[11]</sup>. Zanimljivo je da PFS nije potreban za RNA interferenciju s Cas13<sup>[8]</sup> (Slika 4).

Cijepanje ciljne jIRNA pomoću Cas13 odvija se cijepanjem fosfodieterskih veza u regiji bogatoj uridinom. Ciljna RNA se cijepa izvan mjesta vezanja crRNA na različitim udaljenostima (ovisno o PFS), vjerojatno unutar izloženih petlja jIRNA<sup>[11]</sup>.

		Nukleazna domena	PAM	Supstrat	Obrazac cijepanja
Tip II Cas9		RuvC i HNH	3', GC bogata regija	dDNA	tupi krajevi
Tip VI-A Cas13a (C2c2)		2 HEPN domene	5', non-G PFS	jIRNA	cijepa jIRNA u regiji bogatom uracilom, kolateralna aktivnost

**Slika 4.** Usporedba Cas13 i Cas9. Razlikuju se po nukleaznim domenama, supstratu kojeg prepoznaju te obrascu cijepanja. Preuzeto i prilagođeno iz<sup>[2]</sup>.

# 3. UREĐIVANJE GENOMA

## 3.1 Uređivanje genoma cijepanjem

Uređivanje genoma je vrsta genetičkog inženjerstva koja se bavi manipulacijom molekule DNA u živoj stanici. Manipulacije su razne: dio DNA se može umetnuti, izrezati, modificirati ili zamijeniti u genomu živog organizma. Inženjerske nukleaze, nazvane i molekularnim škarama, se najčešće koriste za takvo uređivanje. Uloga tih škara je da cijepanjem DNA uvode dvolančani lom na ciljnom mjestu. Na taj način se mogu uvesti mjesno-specifične mutacije jer se stimulira “prirodni“ popravak loma DNA homolognom rekombinacijom (HDR) ili nehomolognim spajanjem krajeva (NHEJ) <sup>[14]</sup>. U popravak NHEJ su uključeni razni enzimi koji izravno spajaju krajeve DNA nastalih dvolančanim lomom, što ima mutagene posljedice. Nasuprot tome, u HDR popravku, homologna sekvenca se koristi kao predložak za popravak DNA sekvence u kojoj se dogodio lom. Najpoznatije inženjerske nukleaze koje se koriste u tu svrhu su meganukleaze, nukleaze cinkovih prstiju (ZFN), TAL efektor nukleaze (TALEN) te, unazad nekoliko godina, CRISPR-Cas nukleaze.

Meganukleaze, otkrivene krajem osamdesetih, su enzimi sa sposobnošću prepoznavanja i izrezivanja velikih sekvenci DNA (do 40 parova baza). Međutim, konstrukcija cijelog enzima specijaliziranog samo za određeni dio sekvence je skup i dugotrajan postupak <sup>[15]</sup>.

Za razliku od meganukleaza, nukleaze ZFN i TALEN su napravljene fuzijom domene koja prepoznaje željenu DNA i katalitičke domene koja nespecifično cijepa DNA (Slika 5). Te domene su ZF te TAL DNA-vezujuća domena koje se fuzioniraju s nespecifičnom nukleaznom domenom FokI. Kada se dvije domene ZF/TAL vežu na suprotne lance DNA, njihove FokI domene dimeriziraju i kataliziraju cijepanje DNA, uzrokujući dvolančani lom <sup>[14]</sup>.

Cinkovi prsti najčešća su DNA vezujuća domena pronađena u eukariotima. Obično se sastoje od ~ 30 aminokiselina koje su u interakciji s nukleotidnim tripletima. Nukleaze ZFN su dizajnirane da prepoznaju sve 64 moguće kombinacije kodona. Svaki ZFN tipično prepoznaje 3-6 nukleotidnih tripleta. TALEN umjesto prepoznavanja tripleta DNA prepoznaje jedan nukleotid. Tehnologija ZFN i TALEN je primijenjena na genomu ribe *Danio rerio*, voćnim mušicama, nematodama, štakorima, pa čak i na kraljevskim leptirima <sup>[14]</sup>.



Ograničenje uređivanja klasičnim sustavom CRISPR/Cas9 je njegovo prepoznavanje samo molekule DNA. Zato se išlo u daljnje istraživanje ostalih sustava CRISPR-Cas koji prepoznaju RNA.

## 4. Uređivanje genoma bez cijepanja

### 4.1 Dijelovi i uloga sustava REPAIR

Pod vodstvom dr. sc. F. Zhanga (MIT, Cambridge), grupa znanstvenika je 2017. godine u časopisu Science objavila rad koji opisuje razvoj novog alata za uređivanje baze - sustav REPAIR. Uređivanje baze, nasuprot uvođenja dvostrukog loma kod uređivanja genoma pomoću CRISPR/Cas9, izravno pretvara jednu bazu u drugu bez rezanja nukleinske kiseline. Iz iste klase 2 proteina Cas kao Cas9, prenamijenjen je Cas13 za prepoznavanje te uređivanje molekule RNA. Alat REPAIR su konstruirali na način da su katalitički mrtvu verziju enzima Cas13b (dCas13b) spojili s enzimom ADAR (eng. *adenosine deaminase acting on RNA*). Ovaj enzim deaminira adenzin i prevodi ga u inozin.

Protein Cas13b je odabran nakon analize skupa od 43 ortologa Cas13 (21 od Cas13a, 15 od Cas13b i 7 i Cas13c) s ciljem pronalaska najuspješnijeg u cijepanju transkripta tj. utišavanju gena. Ortolog Cas13b iz bakterije *Prevotella* sp. (PspCas13b, nadalje samo Cas13b) pokazao se kao najučinkovitiji i najspecifičniji za rad na stanicama sisavaca.

Cas13b cijepa RNA pomoću HEPN nukleaznih domena koje sadrže konzervirane sljedove bazičnih aminokiselina u svojim aktivnim mjestima <sup>[16]</sup>. Da bi se postigla deaminacija adenzina na transkriptu bez cijepanja istog, potrebno je prvo deaktivirati nukleazne domene Cas13b tj. stvoriti katalitički mrtav protein. Time je zadržano svojstvo Cas13b da prepozna ciljnu RNA, a da ju pritom ne cijepa <sup>[17]</sup>. Katalitički mrtva verzija dCas13b (prefiks ~d~ od eng. *dead*) se dobije supstitucijom alanina nekom drugom aminokiselinom u aktivnom mjestu bilo koje od predviđenih domena HEPN <sup>[8]</sup>.

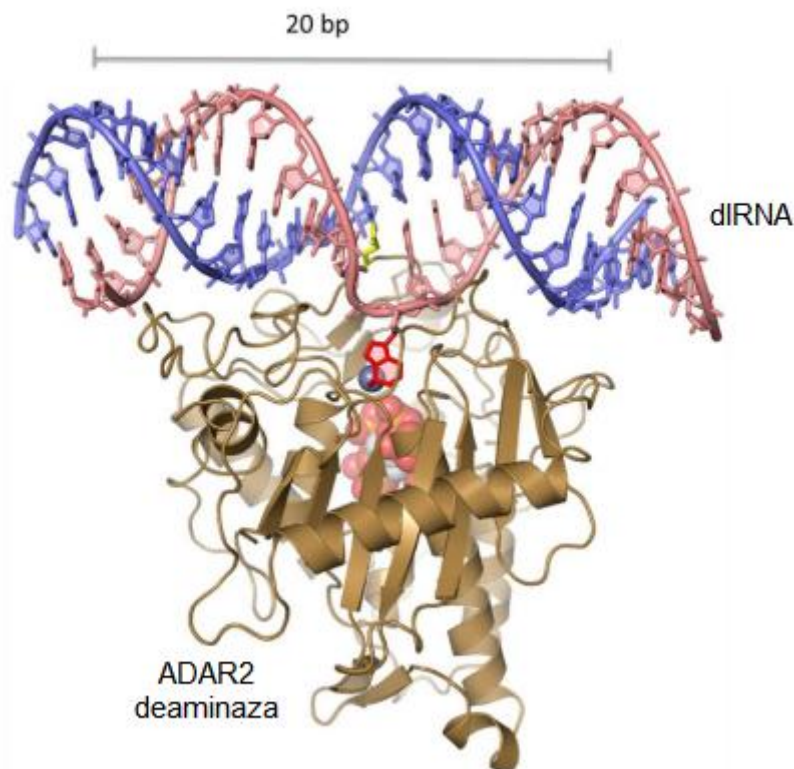
Pretvorba adenzina u inozin je posredovana s dvije adenzin deaminaze koji djeluju na RNA (ADAR): ADAR1 i ADAR2. One kataliziraju hidrolitičku deaminaciju adenzina u inozin u dvolančanim ili djelomično dvolančanim RNA (Slika 6). Tijekom translacije, ribosom inozin čita kao gvanozin, što kao posljedicu ima promjenu u aminokiselinskoj sekvenci. Također, i spliceosom čita inozin kao gvanozin te se djelovanjem ADAR-a mogu ispraviti obrasci prekrajanja <sup>[18]</sup>.

Po strukturi su homodimeri – homodimerizacija je ključna za njihovu katalitičku aktivnost. ADAR1 i ADAR2 imaju dvije zajedničke funkcionalne domene, N-terminalnu dvolančanu RNA-vezujuću domenu i C-terminalnu katalitičku. Utvrđeno je da ADAR1 djeluje

uglavnom u ponavljajućim regijama, dok ADAR2 uglavnom cilja neponavljajuće kodirajuće regije <sup>[18]</sup>.

ADAR učinkovito deaminira specifične adenzine unutar dupleksa RNA, ostavljajući većinu adenzina nepromijenjenima <sup>[19]</sup>. Za njegovu katalitičku aktivnost nužna je dupleks regija RNA. Može deaminirati ciljnu RNA bez prisutnosti kofaktora *in vitro* <sup>[7]</sup>. Oba lanca RNA su u interakciji s enzimom. Mehanizam deaminacije adenzina započinje okretanjem reaktivne baze iz RNA dvostruke zavojnice kako bi ta baza ušla u aktivno mjesto ADAR-a <sup>[8]</sup>. Enzim okrene ciljani adenozin izvan dvostruke zavojnice RNA i veže ga u svom aktivnom mjestu gdje supstrat stupa u interakciju s nekoliko aminokiselina u aktivnom mjestu uključujući V351, T375, K376, E396 i R455. Bočni lanac E396 stvara vodikove veze s N1 i O6 adenina, te ima ulogu u posredovanju prijenosa protona na N1 supstrat. 5'-fosfodiesterški kraj adenzina stvara vodikovu vezu s karbonilnom skupinom T375 dok T375 svojim bočnim lancem stvara interakcije s 3'-fosfodiesterškim krajem adenzina <sup>[7]</sup>. R455 i K376 pomažu u pozicioniranju okrenutog nukleotida unutar aktivnog mjesta pričvršćivanjem fosfatne okosnice koja je također okrenuta. Formira se ionski par između bočnog lanca R455 i 5'-fosfodiester. Na kraju, bočni lanac V351 osigurava hidrofobnu površinu za interakciju s bazom modificiranog nukleotida <sup>[7]</sup>.

Petlja deaminaze, koja sudjeluje u okretanju baze, prilazi RNA duplesu putem manjeg utora na mjestu uređivanja. Bočni lanac E488 penetrira dvostruku zavojnicu i okupira mjesto oslobođeno okretanjem baze i stvara vodikove veze s bazom koja je ostala bez para (timinom) <sup>[7]</sup>. Reakcija uključuje formiranje hidratnog međuprodukta koji izgubi amino skupinu stvarajući inozin.



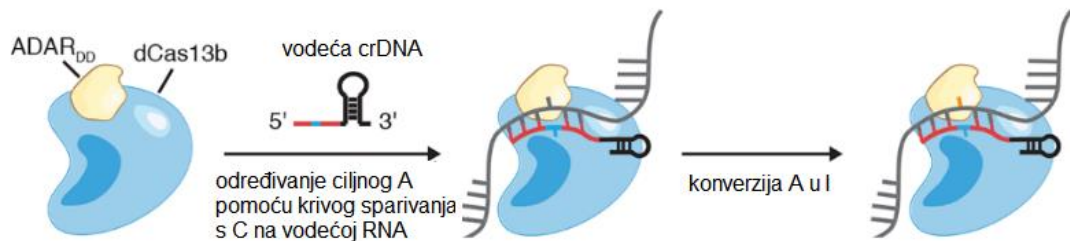
**Slika 6.** Struktura deaminaze ADAR vezane na dupleks RNA. Preuzeto i prilagođeno iz <sup>[18]</sup>.

## 4.2 Optimizacija sustava REPAIR

Postoje dvije verzije sustava REPAIR, verzija REPAIRv1 i verzija REPAIRv2. Glavna razlika između te dvije verzije je u smanjenju neciljnog uređivanja RNA kod REPAIRv2. Problem kod REPAIRv1 je bila njegova premala specifičnost - uz ciljnu RNA, deaminirao je i adenozone neciljne RNA. Zato je osmišljen REPAIRv2 u kojemu je upotrebljena prilagođena inačica enzima ADAR tj. mutant tog enzima. Mutirala se vezujuća domena na RNA. Slabijim vezanjem, kao i povećanjem lokalne koncentracije dCas13b-ADAR u stanici, smanjilo se neciljno uređivanje RNA. To nije imalo utjecaj u promjeni stope ciljnog uređivanja te je stvoren sustav s 919 puta većom specifičnošću <sup>[17]</sup>.

Da bi se još više povećale stope ciljane deaminacije adozina, uvela se dodatna modifikacija na crRNA. Vodeća crRNA omogućuje ciljano vezanje sustava REPAIR na ciljnu RNA. Na crRNA je timin, koji bi se komplementarno sparilo s adeninom na ciljnoj RNA, zamijenjen s citozinom. Time je namjerno stvoren krivo spareni bazni par u svrhu povećanja stope deaminacije. ADAR preferabilno deaminira adenozone pogrešno sparene s citidinima u dIRNA <sup>[18]</sup>, pružajući mogućnost za precizno uređivanje baza (Slika 7).

Iako je moguće da ADAR može deaminirati adenozijske baze na lancu DNA u heterodupleksima RNA-DNA <sup>[20]</sup>, malo je vjerojatno da će se to dogoditi jer Cas13b ne veže učinkovito DNA i zato što je REPAIR lokaliziran u citoplazmi.



**Slika 7.** Shematski prikaz RNA uređivanja pomoću dCas13b-ADAR<sub>DD</sub> fuzijskog proteina. Katalitički mrtav dCas13b fuzioniran je s deaminaznom domenom ADAR<sub>DD</sub>, koja deaminira adenozine u inozine. Preuzeto i prilagođeno iz <sup>[17]</sup>.

### 4.3 Rezultati istraživanja

Sustav REPAIR, nastao fuzijom katalitički mrtvog dPspCas13b i ADAR deaminazne domene (ADAR<sub>DD</sub>) transfeciran je u ljudske stanice. Korištene je stanice soja HEK293FT (humane embrionalne stanice bubrega) u kojima je meta sustava REPAIR bio transkript gena *PPIB* (peptidil propil izomeraza B). Transkript *PPIB* su sustavom REPAIRv1 uspjeli urediti s 28%-tnom efikasnošću.

Kako bi nadalje demonstrirali široku primjenjivost sustava REPAIR u uređivanju transkripta ljudskih stanica, ispravili su dvije mutacije koje u ljudi uzrokuju bolest. Ponovno su radili na stanicama HEK293FT te revertirali mutacije: 878G> A (AVPR2 W293X) gdje ta mutacija izaziva X-vezani nefrogeni dijabetes insipidus i 1517G> A (FANCC W506X) gdje ta mutacija izaziva Fanconi anemiju. Transfecirala se cDNA sa spomenutim mutacijama u stanice HEK293FT, koje su već sadržavale sustav REPAIR transfekcijom adeno asociranim virusnim vektorima, te se testirala stopa revertiranja mutacija pomoću sustava REPAIR, tj. testiralo se s kolikim se uspjehom ispravljaju te mutacije. Postignuta je 35%-tna korekcija mutacije za AVPR2 i 23%-tna korekcija za FANCC.



## 4.4 Moguća primjena sustava REPAIR sustava

Sustav REPAIR posjeduje veliki potencijal. Njegova tehnologija bi se mogla primijeniti kod liječenja genskom terapijom za privremenu korekciju mutacije. U svrhu terapije, REPAIR konstrukti bi se mogli pakirati u adeno-asocirane virusne vektore (AAV) ili lipidne nanočestice te unositi u pacijente. Na razini molekule RNA, moguće je povratiti funkcionalnost proteina uređivanjem cijelog transkripta koji sadrži patogenu mutaciju. Tako bi korištenje sustava REPAIR omogućilo liječenje Alzheimerove bolesti te ostalih multiplih neurodegenerativnih bolesti vršeći rekodiranje aminokiselina serin, treonin i tirozin na transkriptu <sup>[21]</sup>.

REPAIR izravno deaminira ciljane adenzine te je neovisan o endogenim putevima popravaka. Stoga, njegova primjena bi mogla biti u postmitotskim stanicama (npr. neuronima). REPAIR se može koristiti za funkcionalno imitiranje alela *IFIH1* koji štiti od autoimunih poremećaja kao što je dijabetes tipa I, deficijencija imunoglobulina A, psorijaza i sistemski lupus erythomatosus <sup>[22]</sup>.

RNA biolog M. O'Connell je za časopis *The Scientist* (2017.) prokomentirao moguću primjenu sustava REPAIR prilikom transplantacije organa. Kod transplantacije, postoji vjerojatnost odbacivanja organa koja bi se smanjila primjenom sustava kratkoročno tvoreći fazu prevencije od odbacivanja. Tako bi se smanjila upala, što je nužno za uspješno presađen organ.

## 4.5 Etičko pitanje oko uređivanja transkriptoma

Za razliku od uređivanja genoma pomoću sustava CRISPR/Cas9, sustav REPAIR unosi promjene samo na razini RNA. Uređivanjem RNA umjesto DNA, mogle bi se omogućiti privremene, a ne trajne genomske izmjene. To bi omogućilo izbjegavanje etičkih problema koji se javljaju oko uređivanja genoma. Za liječenje nekih genetskih bolesti, trajno poništenje mutacije bilo bi poželjnije, ali je RNA uređivanje bolje u situacijama koje zahtijeva kratkoročne promjene u ekspresiji gena.

## 5. ZAKLJUČAK

Dokazane su programabilne sposobnosti enzima Cas13b, jedne od komponenti sustava REPAIR, za učinkovito prepoznavanje ciljane RNA. Također, pokazala se uspješnim deaminacija ciljnih adenzina pomoću ADAR-a, druge komponente sustava REPAIR. Deaminacijom adenzina nastaje inozin koji je funkcionalni ekvivalent gvanozinu u translaciji i prekrajanju <sup>[17]</sup>. Uvođenje specifičnih promjena slijeda u RNA molekuli moglo bi istraživačima dati odgovore na pitanja o alternativnim mehanizmima prekrajanja i translaciji. REPAIR predstavlja obećavajuću platformu za uređivanje RNA sa širokom primjenljivošću u istraživanjima, genskoj terapiji i biotehnologiji.

## 6. LITERATURA

1. Makarova, K. S., Wolf, Y. I. & Koonin, E. V. (2013). Comparative genomics of defense systems in archaea and bacteria. *Nucleic Acids Res.* 41, pp.4360–4377
2. Seletsky, A. E. (2017). Molecular mechanisms and applications of RNA targeting CRISPR endonucleases (Doctoral dissertation, UC Berkeley).
3. Rath, D., Amlinger, L., Rath, A. & Lundgren, M. (2015). The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. *Biochimie* 117, pp.119–128
4. Makarova, K. S. *et al.* (2015). An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, pp.722–736
5. Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. a & Horvath, P. (2007). Against Viruses in Prokaryotes. *Science (80- )*. 315, pp.1709–1712
6. Ivančić Baće, I. (2017.). Upute za laboratorijske vježbe.
7. Shmakov, S. *et al.* (2017). Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 15, pp.169–182
8. Abudayyeh, O. O. *et al.* (2017). RNA targeting with CRISPR-Cas13. *Nature* 550, pp.280–284
9. Anantharaman, V., Makarova, K. S., Burroughs, A. M., Koonin, E. V. & Aravind, L. (2013). Comprehensive analysis of the HEPN superfamily: Identification of novel roles in intra-genomic conflicts, defense, pathogenesis and RNA processing. *Biol. Direct* 8, pp.1
10. Koonin, E. V. & Zhang, F. (2017). Coupling immunity and programmed cell suicide in prokaryotes: Life-or-death choices. *BioEssays* 39, pp.1–9
11. Abudayyeh, O. O. *et al.* (2016). C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science (80- )*. 353,
12. Hsu, P. D., Lander, E. S. & Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* 157, pp.1262–1278
13. Kim, Y. B. *et al.* (2017). Increasing the genome-targeting scope and precision of base editing with engineered Cas9-cytidine deaminase fusions. *Nat. Biotechnol.* 35, pp.371–376
14. Esvelt, K. M. & Wang, H. H. (2013). Genome-scale engineering for systems and synthetic biology. *Mol. Syst. Biol.* 9, pp.1–17
15. Stoddard, B. L. (2005). Homing endonuclease structure and function. *Q. Rev. Biophys.* 38, pp.49–95
16. Tamulaitis, G. *et al.* (2014). Programmable RNA Shredding by the Type III-A CRISPR-Cas System of *Streptococcus thermophilus*. *Mol. Cell* 56, pp.506–517
17. Cox, D. B. T. *et al.* (2017). RNA editing with CRISPR-Cas13 David. *Science (80- )*. 0180, pp.1–15
18. Wong, S. K. *et al.* (2001). Substrate recognition by ADAR1 and ADAR2 . Substrate

recognition by ADAR1 and ADAR2. pp.846–858

19. Eggington, J. M., Greene, T. & Bass, B. L. (2011). Predicting sites of ADAR editing in double-stranded RNA. *Nat. Commun.* 2, pp.319
20. Bass, B. L. & Weintraub, H. (1988). An unwinding activity that covalently modifies its double-stranded RNA substrate. *Cell* 55, pp.1089–1098
21. Gott, J. M. & Emeson, R. B. (2000). F m rna e. pp.499–531
22. Ferreira, R. C. *et al.* (2010). Association of IFIH1 and other autoimmunity risk alleles with selective IgA deficiency. *Nat. Genet.* 42, pp.777–782

<https://www.xenbase.org/other/static/CRISPR.jsp> 07.08.2018.

<https://steemit.com/introduceyourself/@jiansoo/crispr-cas9-how-does-it-work> 07.08.2018.

## 7. SAŽETAK

Istraživači su nedavno razvili alat REPAIR koji se sastoji od spojene katalitičke domene deaminaze ADAR i katalitički mrtvog Cas13b, iz obitelji proteina Cas13. Tako napravljen enzim ima mogućnost specifičnog uređivanja molekule RNA od interesa u ljudskim stanicama. Enzim ADAR, adenzin deaminaza djelujuća na RNA, pretvara adenzin u inozin - nukleotid koji je funkcionalni ekvivalent gvanozinu. Alat je uspješno korišten za revertiranje dviju mutacija G-u-A povezanih nastankom bolesti na mRNA – jedna mutacija uzrokuje X-vezani nefrogeni dijabetes, a druga uzrokuje Fanconi anemiju.

## 8. SUMMARY

Researchers have created a fusion protein between the catalytic domain of deaminase ADAR and a catalytically inert Cas13b, member of Cas13 protein family, with the ability to target any RNA of interest in human cells creating REPAIR system. Enzyme ADAR, which is adenosine deaminases acting on RNA converts adenosine into inosine - a nucleotide that is functionally equivalent to guanosine. They used it to revert two disease-associated G-to-A mutations, one that causes a form of diabetes, and another that causes Fanconi anemia, in two separate messenger RNAs.