Uloga sustava CRISPR/Cas9 u genetičkom inženjerstvu

Lalić, Dora

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:632140

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

ULOGA SUSTAVA CRISPR/Cas9 U GENETIČKOM INJŽENJERSTVU

CRISPR/Cas9 SYSTEM IN GENETIC ENGINEERING

SEMINARSKI RAD

Dora Lalić
Preddiplomski studij biologije
(Undergraduate Study of Biology)
Mentor: prof. dr. sc. Vlatka Zoldoš

Zagreb, 2020.

SADRŽAJ

1 UVOD……1

1.1 Prethodnici sustava CRISPR/Cas u genetičkim istraživanjima……2

2 SUSTAV CRISPR/Cas9……...……4

2.1 Svojstva i uloga sustava CRISPR/Cas9 u prokariotima……4

2.2 Adaptacija sustava CRISPR/Cas9 za genetička istraživanja……6

2.2.1 Sinteza kimerne sgRNA……...6

2.2.2 Efekt nespecifičnog vezanja proteina Cas9…….....……7

2.2.3 Metode unosa sustava CRISPR/Cas9 u stanicu……8

3 PRIMJENA SUSTAVA CRISPR/Cas9..……9

3.1 Istraživanje nekodirajuće DNA……...10

3.2 Regulacija genske ekspresije……..11

3.3 Vizualizacija kromatina……..13

3.4 Ciljana mutageneza molekule DNA……...13

3.5 Dosadašnje primjene sustava CRISPR/Cas9 ……...……..15

4 BUDUĆNOST TEHNOLOGIJE CRISPR/Cas9 ……17

5 LITERATURA……...18

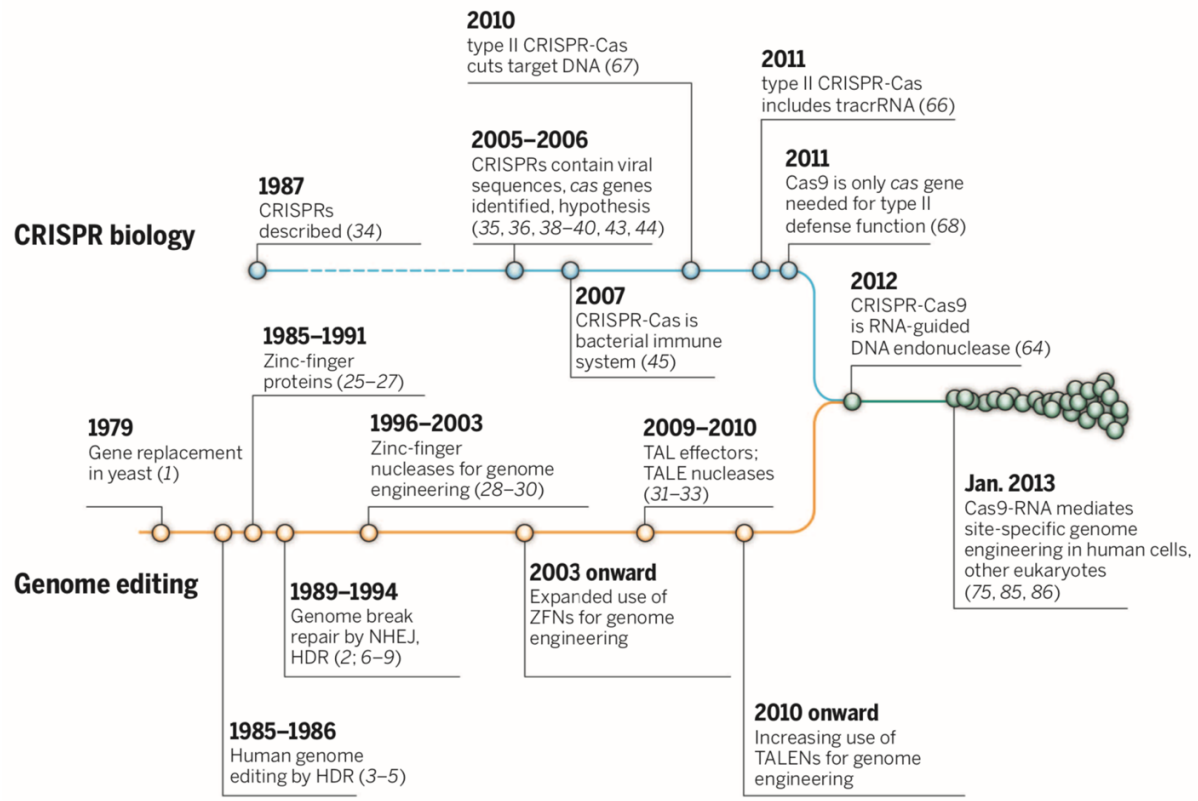
6 SAŽETAK……..20

7 SUMMARY……20

1 UVOD

Različitost svakog organizma posljedica je jedinstvene genetičke upute koju on nosi upisanu u molekulu DNA. Svaka stanica organizma sadrži određen broj DNA molekula koje odgovaraju broju kromosoma (genom). U njima se nalaze geni koji kodiraju upute za sintezu proteina, ali sadrže i nekodirajuće dijelove koji su nekada smatrani smećem u genomu, no danas je poznato da su ti dijelovi iznimno važni. Iako sve stanice organizma sadrže iste DNA molekule, u svim stanicama nisu isti geni aktivni te upravo to određuje tip stanice (Black i sur. 2016). Zbog svoje velike dužine, DNA molekula gusto je pakirana uz pomoć histonskih proteina u strukturu koja se naziva kromatin, a on može biti više ili manje kondenziran (u klasičnom smislu nazvan heterokromatin, odnosno eukromatin). Reverzibilne modifikacije histonskih proteina kao što su acetilacija, metilacija i fosforilacija, mijenjaju afinitet histona za vezanje na molekulu DNA te uzrokuju prelazak kromatina iz jednog oblika u drugi – manje opušten (heterokromatin) u više opušten (eukromatin) . Aktivni geni koji se prepisuju moraju se nalaziti u opuštenijem eukromatinu kako bi pristup transkripcijskoj mašineriji bio moguć dok se inaktivni geni nalaze u heterokromatinu. Promjene u genomu ili epigenemu (promjena u ekpresiji gena bez promjene u slijedu nukleotida), pa čak i one male, mogu uzrokovati velike promjene za organizam kao što su promjena fenotipa ili rušenje homeostaze, odnosno razvitak bolesti.

Znanstvenici već od otkrića molekule DNA i njezine strukture pokušavaju pronaći načine za njezinom manipulacijom i ciljanim uređivanjem. Mogućnost ciljane promjene DNA molekule u svrhu promjene genetičke upute organizma, smatra se genetičkim inžženjerstvom, a metodologija koja se temelji na CRISPR/Cas9 sustavu otvara mnoge mogućnosti, kako u bazičnom istraživanju i uređivanju genoma, tako i u biomedicini i biotehnologiji (Sl. 1) (Ran i sur. 2013).



Slika 1. Povijesni pregled razvitka tehnologije CRISPR/Cas i metoda uređivanja genoma. Područja se ujedinjuju 2012. godine kada je otkrivena mogućnost programiranja sustava promjenom RNA sekvence. Nakon tog otkrića, broj znanstvenih istraživanja i radova koji koriste CRISPR za manipulaciju genima eksponencijalno raste. Preuzeto iz Doudna i Charpentier, 2014.

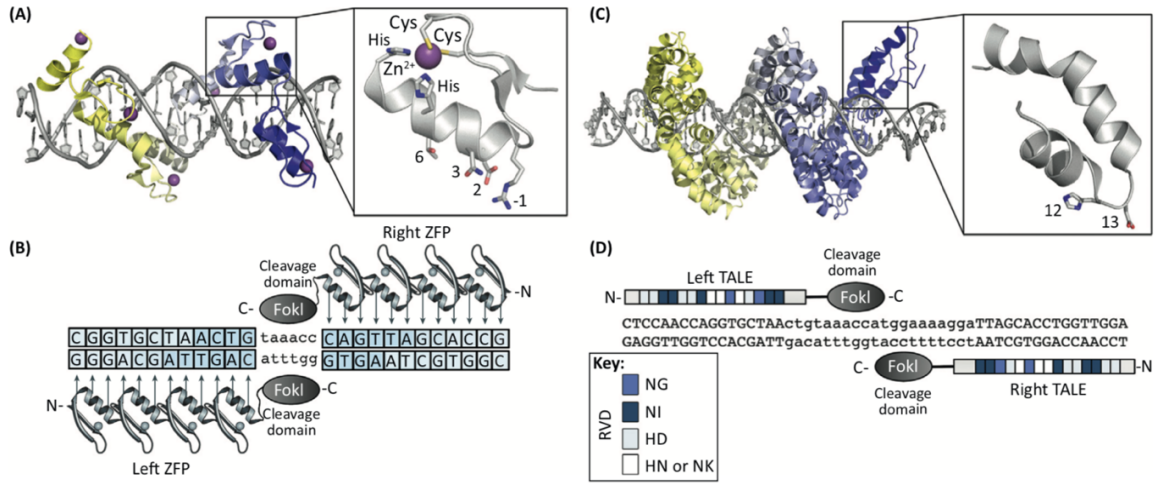
1.1 Prethodnici sustava CRISPR/Cas u genetičkim istraživanjima

Do sada se razvilo nekoliko metoda koje uključuju programibilne mjesno-specifične nukleaze kojima se može ciljati određeno mjesto u DNA molekuli. Međutim, niti jedna metoda do sada korištena u tu svrhu nije usavršena. Takvi kompleksi omogućuju istraživanje nekodirajuće i kodirajuće DNA te uvođenje mutacija uzrokovanih dvolančanim lomom ili drugim enzimskim reakcijama. Do sada su poznate nukleaze s cinkovim prstima, TALEN-ovi i sustavi CRISPR/Cas (Cong i sur. 2013).

Motiv cinkovih prstiju (engl. *zinc finger*) jedan je od najčešćih proteinskih motiva koji vežu DNA u eukariotima (Sl. 2A). Pojedinačni protein sastoji se od 30-ak aminokiselina raspoređenih u dvije beta ploče i jednu alfa zavojnicu. Aminokiseline pozicionirane na kraju zavojnice interagiraju s bazama velikog utora molekule DNA s različitim afinitetima te promjena tih

aminokiselina određuje specifičnu kombinaciju od otprilike 3 nukleotida koju motiv prepoznaje i veže (Gaj i sur. 2013). Krajem prošlog stoljeća, dizajnirane su nukleaze s cinkovim prstima (engl. *zinc finger nuclease, ZFNs*) koje mogu prepoznati specifičan slijed u DNA molekuli i tamo napraviti lom. Sintezu ovakvih kompleksa omogućilo je otkriće visoko konzervirane linker sekvence (engl. *linker=poveznica*) kojom se može povezati nekoliko motiva cinkovih prstiju kako bi prepoznali sekvencu od 9-18 nukleotida. Na takav multimerni protein se nadovezuje Fok I endonukleaza koja može cijepati molekulu DNA (Sl. 2B). Ovakvi enzimi su komercijalno dostupni te se dizajniraju uz pomoć već postojećih knjižnica koje sadrže različite varijante cinkovih prstiju.

TALE (engl. *transcription activator-like effector*) proteini su izvorno pronađeni u bakterija roda *Xanthomonas* te imaju mogućnost prepoznavanja i vezanja molekule DNA. Slično kao i kod cinkovih prstiju, ulogu u prepoznavanju nukleotida imaju dvije aminokiseline, ali razlika je u tome što jedan TALE protein može prepoznati samo jedan nukleotid (Sl. 2C). Dizajniranje fuzijskih proteina ovih domena s nukleazama i drugim enzimima za modifikaciju kromatina, omogućuje ciljanu mutagenezu te regulaciju genske ekspresije (Gaj i sur. 2013, Ran i sur. 2013).



Slika 2. Struktura ZFN i TALENa. A) Motiv cinkovih prstiju u interakciji s molekulom DNA. Aminokiselinski ostaci označeni brojevima -1, 2, 3 i 6 prikazani su poput štapića te su zaslužni za prepoznavanje i interakciju s bazama DNA. Očuvani cisteini i histidini također su označeni štapićima te su pravilno orijentirani interakcijama s atomom cinka. Svaki motiv može prepoznati dvije ili tri baze. B) Shematski prikaz ZFN dimera vezanog za DNA. Proteini ZNF vežu dva mjesta na DNA međusobno udaljena nekoliko parova baza, a Fok I endonukleaza cijepa lance. C) Protein TALE u kompleksu s DNA. Aminokiselinski ostaci označeni brojevima 12 i 13 predstavljaju hipervarijabilne grupe koje prepoznaju određenu bazu. D) Shematski prikaz TALE nukleaza vezanih za DNA. Preuzeto iz Gaj i sur, 2013.

2 SUSTAV CRISPR/Cas9

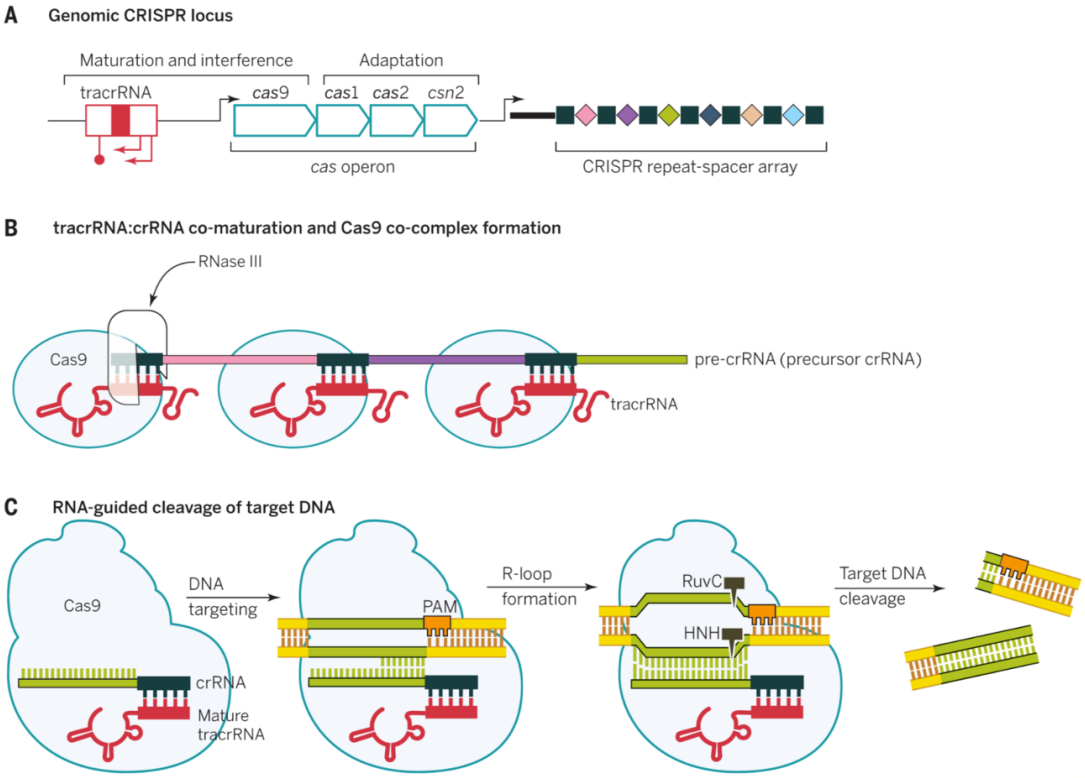
Krajem prošlog stoljeća, japanski znanstvenici primjetili su u genomu bakterije *Escherichia coli* kratke pravilno razmaknute ponavljajuće sekvence koje su kasnije primjećene i u drugim prokariotima, uključujući bakterije i arheje (Ishino i sur. 1987). Početkom 21. stoljeća počinje se istraživati funkcija tih sekvenci te dolazi do znatnog napretka kada se ustanovilo da „razmaknice" najvjerojatnije potječu od bakteriofaga i plazmida (Doudna i Charpentier, 2014).

2.1. Svojstva i uloga sustava CRISPR/Cas9 u prokariotima

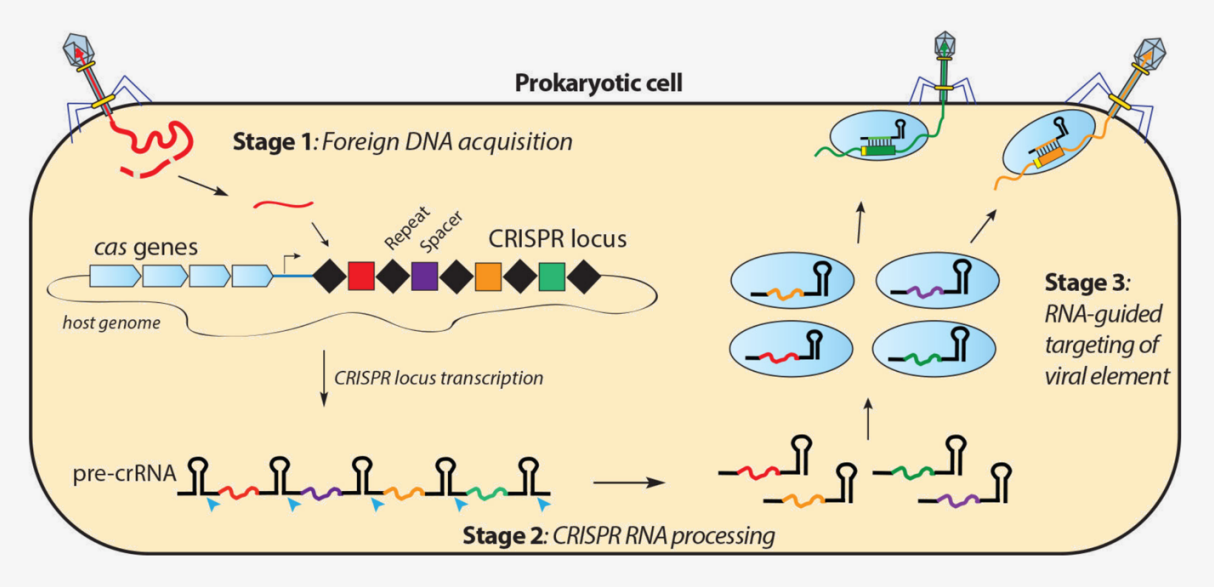
CRISPR/Cas9 predstavlja mikrobni antivirali adaptivni imunološki sustav (Mojica i sur. 2009). Naziv CRISPR (engl. *clustered regulary interspaced short palindromic repeats*) označava klaster ponavljajućih palindromskih sekvenci koje su međusobno odvojene protorazmaknicama (engl. *protospacer*). Protorazmaknice potječu od egzogene DNA, poput plazmida ili genoma bakteriofaga čiju je infekciju stanica preboljela u prošlosti te sačuvala kopiju dijela. Uz lokus CRISPR nalazi se operon *Cas* gena koji kodiraju za komponente proteina Cas (Sl. 3A). Imunološki odgovor temelji se na prepoznavanju strane nukleinske kiseline pomoću male RNA te njezinom cijepanju uz pomoć nukleaze Cas, a može se podijeliti u 3 faze (Sl. 4) (Jinek i sur. 2012). Prva faza obuhvaća integraciju strane DNA u CRISPR lokus genoma domaćina nakon preživljavanja infekcije fagom. Kada stanicu ponovno napadne isti virus, dolazi do druge faze - transkripcije CRISPR i lokusa Cas. Nastaje pre-crRNA (engl. *pre-crispr* RNA) koja se mora obraditi kako bi nastala crRNA (engl. *crispr RNA*). Sintetiziraju se proteini Cas i interagiraju s odgovarajućim crRNA koje ih u trećoj fazi dovode do invadirajuće nukleinske kiseline i cijepaju ju (Doudna i Charpentier, 2014).

S obzirom na zajednička svojstva, razlikuju se tri vrste sustava CRISPR/Cas. Proteini Cas sustava I i III imaju mogućnost samostalnog procesiranja pre-crRNA, dok proteini Cas sustava II nemaju. CRISPR/Cas9 pripada vrsti II te su mu potrebne dvije molekule RNA za navođenje proteina Cas9 do molekule DNA (Jinek i sur. 2012). Kod ovog je sustava za aktivaciju pre-crRNA potrebna tracr-RNA (engl. *trans-activating crispr RNA*) koja se komplementarno sparuje s palindromskim dijelom pre-crRNA i omogućuje cijepanje RNazom III, koja potječe od domaćina. Sekundarna struktura koja nastaje interakcijom tracrRNA sa crRNA omogućuje vezanje za protein Cas9 (Sl. 3B). Uz RNazu III, ulogu u sazrijevanju pre-crRNA ima i domena samog proteina Cas, ali njezina uloga nije posve poznata (Deltcheva i sur. 2011).

Osim komplementarnosti, za vezanje kompleksa Cas9/cr-tracrRNA na željeni dio DNA, potrebno je da ciljana DNA sadrži PAM sekvencu. PAM (engl. *protospacer adjacent motif*) sekvenca karakteristična je za različite CRISPR sustave u različitim vrstama, a sastoji se od nekoliko nukleotida ili konsenzusa sekvenci potrebnih za prepoznavanje i vezanje proteina Cas. U slučaju bakterije *Streptococcus pyogenes* nakon protorazmaknice u egzogenoj DNA mora slijediti sekvenca od tri nukleotida 5'-NGG-3' (Ran i sur. 2013). Taj mehanizam omogućuje stanici da razlikuje protorazmaknicu unutar vlastitog genoma od sekvence u stranoj DNA. Nakon prepoznavanja i komplementarnog sparivanja baza između crRNA i DNA, dolazi do cijepanja molekule DNA. Cas9 ima dvije nukleazne domene kojima cijepa lance: HNH i domenu sličnu Ruv-C (engl. *RuvC-like domain*) (Sl. 3C) (Doudna i Charpentier, 2014).



Slika 3. Shematski prikaz sustava CRISPR/Cas9 iz bakterije *Streptococcus pyogenes*. A) Shematski prikaz lokusa tracrRNA, *cas* operona i CRISPR lokusa. B) tracrRNA zajedno s Cas9 nukleazom i RNazomIII sudjeluje u sazrijevanju pre-crRNA. C) Dualna tracr-crRNA navodi Cas9 do ciljane sekvence u DNA uz koju se nalazi odgovarajuća PAM sekvenca. Cas9 svojim nukleaznim domenama radi dvolančani urez u DNA. Preuzeto iz Doudna i Charpentier, 2014.



Slika 4. Shematski prikaz imunološkog odgovora na napad bakteriofagom djelovanjem sustava CRISPR/Cas9. U prvoj fazi dolazi do infekcije virusom i integracije dijela njegove DNA u genom domaćina. U sljedećoj fazi dolazi do transkripcije CRISPR i lokusa *Cas* te sazrijevanju pre-crRNA uz pomoć kratkih tracrRNA. U zadnjoj fazi dolazi do cijepanja egzogene DNA faga uz pomoć nukleaze Cas9 vođene dualnom tracr-crRNA. Preuzeto i prilagođeno iz http://rna.berkeley.edu/crispr.html.

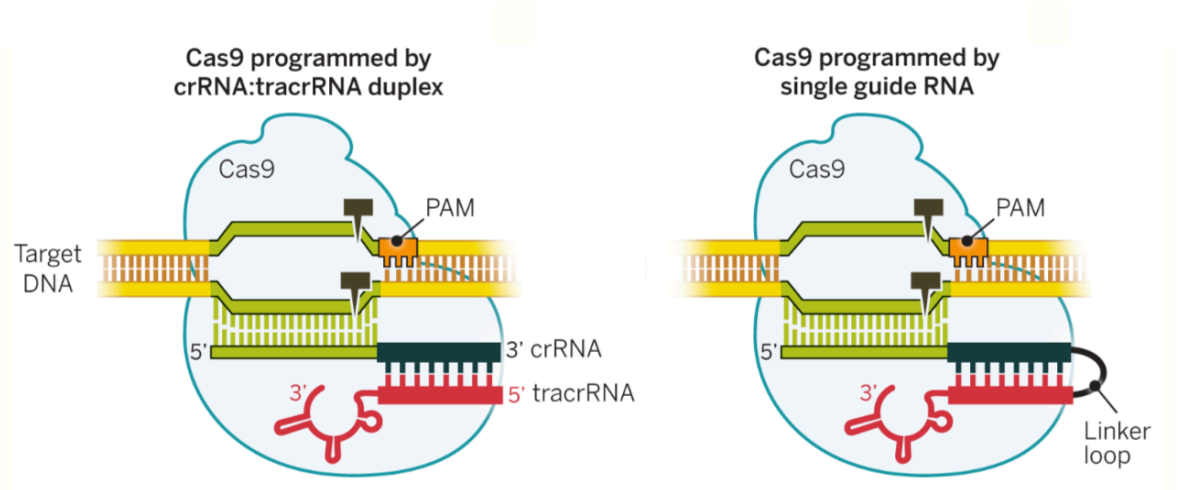
2.2 Adaptacija sustava CRISPR/Cas9 za genetička istraživanja

Sustavi preuzeti iz jednostaničnih organizama kao što su arheje i bakterije nisu direktno prenosivi i upotrebljivi u eukariotskim stanicama stoga je bilo potrebno prilagoditi sustav u nekoliko segmenata.

2.2.1 Sinteza kimerne vodeće RNA

Proučavanje strukture i funkcije dualne tracr-crRNA omogućilo je otkriće važnih komponenti ovog kompleksa za navođenje proteina Cas. Djelomično dvostruka struktura dualne RNA tvori motiv nužan za vezanje s proteinom Cas9. Uzevši u obzir potrebna obilježja, znanstvenici su uspjeli sintetizirati kimernu sgRNA (engl. *single guide RNA*) koja na 5'-kraju ima sekvencu od 20-ak nukleotida koja određuje ciljano mjesto u DNA te dvostruku strukturu na 3'-kraju koja osigurava vezanje za protein Cas9 (Sl. 5) (Doudna i Charpentier, 2014, Ran i sur. 2013). Ovakav sustav od dvije komponente (Cas9 nukleaza i sgRNA za navođenje) omogućuje ciljanje bilo kojeg

dijela DNA, uz uvjet da se uz njega nalazi PAM sekvenca, promjenom 20-nukleotidne sekvence unutar sgRNA.



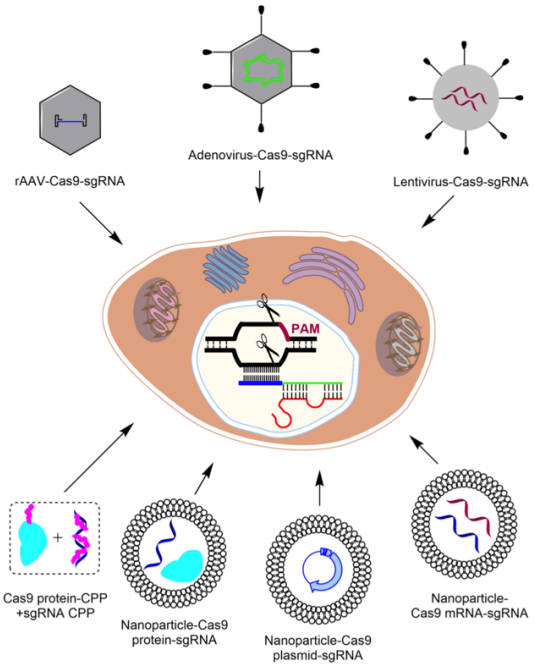
Slika 5. Shematski prikaz nukleaze Cas9 vođene dualnom tracr-crRNA *in vivo* (lijevo) i jedinstvenom sgRNA *in vitro* (desno). Sintezom umjetne RNA dodatkom vezujuće (engl. *linker*) sekvence omogućeno je programiranje sustava za ciljanje željene sekvence u DNA. Preuzeto iz Doudna i Charpentier, 2014.

2.2.2 Efekt nespecifičnog vezanja proteina Cas9 (engl. *off-targeting effect*)

S obzirom na nukleotidni sastav i veličinu molekule DNA, postoji ograničen broj kombinacija nukleotida te se neke sekvence ponavljaju više puta u genomu. To predstavlja potencijalni problem kod rada s navođenim nukleazama jer motivi koji prepoznaju DNA mogu vezati više identičnih sekvenci unutar istoga genoma (engl. *off-targeting*). Zato je kod odabira ciljanog mjesta (engl. *target site*), osim PAM sekvence, važno uzeti u obzir što manju mogućnost za nespecifično vezanje. Danas postoje programi koji analiziraju danu genomsku sekvencu i pronalaze prigodna ciljna mjesta koja zadovoljavaju tražene uvjete (Ran i sur. 2013). Za povećanje preciznosti sustava, moguće je uvesti mutaciju u jednu od nukleaznih domena proteina Cas9 čime se on pretvara u nikazu (nCas9) koja radi jednolančane DNA ureze. Za stvaranje dvolančanog loma potrebne su dvije Cas9 nikaze u neposrednoj blizini čime se smanjuje mogućnost cijepanja dlDNA (dvolančana DNA) na nepoželjnim mjestima (Ran i sur. 2013).

2.2.3 Metode unosa sustava CRISPR/Cas9 u animalne stanice

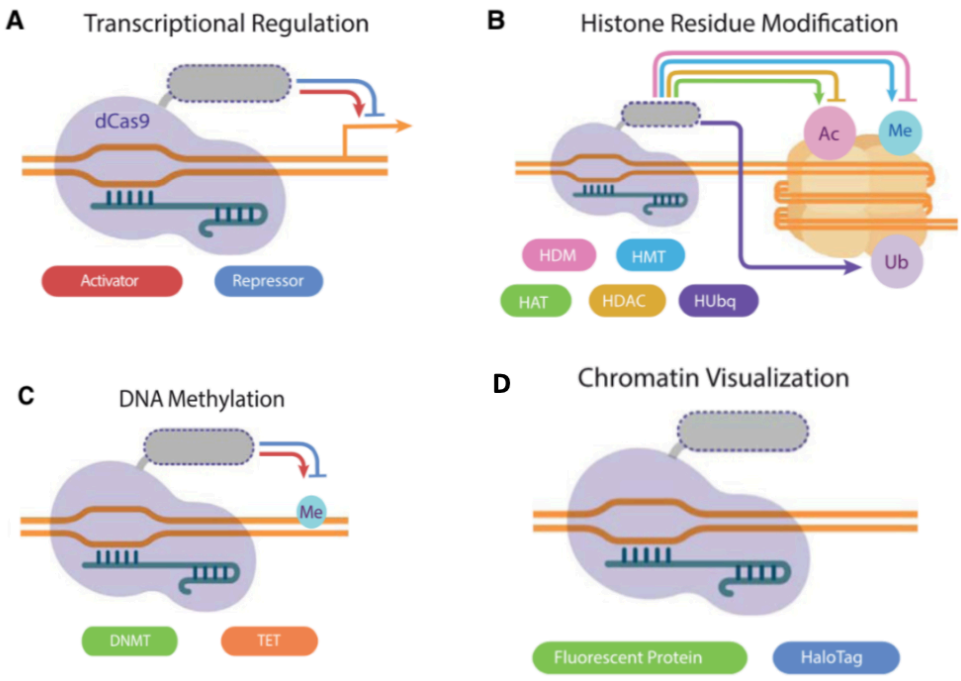
Razvijeno je nekoliko metoda kojima se sustav CRISPR/Cas9 može unijeti u stanicu, a mogu se podijeliti na virusne, nevirusne i fizičke (Sl. 6.). Virusni unos podrazumijeva infekciju stanica bakteriofagima koji nose kodiranu uputu u oblike nukleinske kiseline za sastavljanje CRISPR/Cas9 sustava. Poznati su adenovirusni (AdV), lentivirusni (LV) te adenovirusno-povezani vektori (AAVV), a razlikuju se po veličini i kapacitetu, učinkovitosti infekcije te jačini imunološkog odgovora kojeg izazivaju. Nevirusni unos podrazumijeva upotrebu kationskih vektora, CPP-a te hidrodinamične inekcije plazmida koji kodiraju za elemente sustava. Kationski vektori su pozitivno nabijene nanočestice koje u sebi sadrže komponente sustava CRISPR/Cas9 te su pogodni vektori zbog razlike naboja u odnosu na negativno nabijenu sgRNA te to pogoduje efikasnijem „izbacivanju“ sadržaja čestice. Kompleks Cas9/sgRNA može biti povezan na CPP (engl. *cell penetrating peptide*) koji ga navodi do stanice i uvodi u istu. Fizičke metode uključuju direktan unos Cas9 nukleaza i pripadajućih sgRNA mikroinjekcijom ili elektroporacijom (Chandrasekaran i sur. 2018).



Slika 6. Metode unosa sustava CRISPR/Cas9 u stanicu. Virusnim metodama moguće je unijeti Cas9 nukleazu i sgRNA u stanicu istovremeno ili odvojeno putem dva vektora. Za unos mRNA komponenti sustava, Cas9 mRNA i sgRNA se sintetiziraju *in vitro* te se unose putem nanočestica. Za unos već sintetiziranog Cas9 proteina i sgRNA također se mogu koristiti nanočestice ili fuzija Cas9 i CPP (engl. *cell penetrating peptide*). Preuzeto iz Yao i sur. 2015.

3 PRIMJENA SUSTAVA CRISPR/Cas9

Sustav CRISPR/Cas9 je zbog svoje efikasnosti, preciznosti i jednostavne upotrebe postao najkorišteniji alat za uređivanje genoma. Malom promjenom sgRNA, koja je zapravo sekvenca od svega 20 nukleotida, može se ciljati gotovo bilo koje mjesto u genomu, bez potrebe za sintezom čitavih proteina kao u slučaju metodologije ZFN i TALEN. Modifikacije sustava CRISPR/Cas9 uvelike šire područja u kojima može djelovati. Osim spomenute mutageneze jednog od nukleaznih centara proteina Cas9, moguće je inaktivirati obje nukleaze domene (dCas9 od engl. *deactivated Cas9*), pri čemu se protein Cas9 vođen sgRNA samo veže za određeno mjesto u molekuli DNA. Nadalje, moguće je fuzionirati različite enzimatske podjedinice za Cas9 u svrhu ciljane mutageneze ili epigenomskih modifikacija ili pak fluorescentne proteine za vizualizaciju lokusa interfazne jezgre (Sl. 7.).



Slika 7. Metode primjene sustava CRISPR/cas9 za proučavanje i manipulaciju epigenoma. A) Fuzija Cas9 sa domenama koje regrutiraju određene komplekse i uzrokuju aktivaciju/represiju gena. B) Fuzija Cas9 s enzimima za modifikaciju histonskih repova kao što su histonske metiltransferaze (HMT), histonske demetilaze (HDM), histonske acetiltransferaze (HAT), histonske deacetilaze (HDAC) i sl. C) Fuzija Cas9 sa DNA metiltransferazama (DNMT) u svrhu DNA metilacije ili enzimima porodice TET u svrhu demetilacije DNA. D) Fuzija proteina Cas9 i proteina GFP (engl. *green flourescent protein*) za vizualizaciju kromatina. Preuzeto iz Pulecio i sur. 2017.

3.1. Istraživanje nekodirajuće DNA

Samo mali postotak DNA (geni) biti će transkribiran i translatiran u proteine, dok ostali dijelovi DNA predstavljaju nekodirajuće sekvence, koje se ponavljaju u genomu u umjerenom ili velikom broju, te obuhvaćaju transpozone, različite tipove satelitne DNA i regulatorne elemente. Regulatorni elementi utječu na ekspresiju gena tako što se na njih vežu transkripcijski faktori i uzrokuju promjenu kromatinske strukture koja omogućava ili sprječava transkripciju (Korkmaz i sur. 2016). Poznato je nekoliko vrsta regulatornih elemenata, a to su promotori (engl. *promoters*), pojačivači (engl. *enchancers*), prigušivači (engl. *silencers*) i insulatori (engl. *insulators*). Neki od njih imaju karakteristična obilježja po kojima se mogu prepoznati u različitim organizmima, dok su drugi često jedinstveni za određene gene. Promotori mogu imati konsenzus sekvence kao što je TATA box te se nalaze blizu TSS (engl. *transcription start site*). Njih je lakše odrediti u genomu nego pojačivače koji se mogu nalaziti udaljeni nekoliko kilobaza od gena kojeg reguliraju te ne moraju imati konsenzus sekvence i karakteristična obilježja pojačivača (Pulecio i sur. 2017). Mutacije u regulatornim elementima, pa čak i one male, mogu uvelike utjecati na promjenu u ekspresiji gena, što u određenim slučajevima može dovesti do promjene fenotipa ili razvoja bolesti (Liu i sur. 2018).

Identifikacija regulatornih elemenata još je uvijek zahtjevan zadatak za znanstvenike, pogotovo zbog jedinstvenosti različitih regulatora, stoga su razvili metode kojima se uz pomoć sustava CRISPR/Cas9 mogu identificirati i okarakterizirati dosada nepoznati regulatorni elementi gena. Jedan od razvijenih pristupa za ovakva istraživanja naziva se MERA (engl. *multiplex editing regulatory assays*). Ova se metoda temelji na unošenju tisuća mutacija u područje DNA duljine oko 40 kb za koje se smatra da sadrži regulatorne elemente te se koristi umetnuti protein GFP (engl. *green flourescent protein*) za identifikaciju aktivnosti gena. Mutacije se u DNA unose uz pomoć sustava CRISPR/Cas9 i knjižnica sgRNA molekula (engl. *sgRNA library*) koje ciljaju različita mjesta na DNA. Nakon što protein Cas9 napravi dvolančani lom na određenom mjestu u molekuli DNA, on se popravlja nehomolognim spajanjem krajeva pri čemu najčešće dolazi do indel (engl. *insertion-deletion*) mutacija. Mjerenjem utjecaja koji određena sgRNA ima na ekspresiju gena, mogu se odrediti važni endogeni regulatorni elementi kao i domene nužne za njihovu funkciju (Rajagopal i sur. 2016). Osim MERA-e, postoje i druge metode koje se također baziraju na sličnom principu koristeći RNA knjižnice za identifikaciju regulatora (Gilbert i sur.

2014). Ovakav napredak u istraživanju nekodirajuće DNA pruža nove mogućnosti razumijevanja razvitka nekih bolesti te načina na koji ih ispraviti.

3.2. Regulacija genske ekspresije

Osim identifikacije regulatornih elemenata, sustavom CRISPR/Cas9 moguće je aktivirati ili suprimirati ekspresiju određenih gena direktno ili pak promjenom epigenetičkih oznaka. Metilacija baza u DNA molekuli te modifikacije histonskih repova, kao što su acetilacija, metilacija, fosforilacija, ubikvinacija ili ribozilacija, predstavljaju epigenetička obilježja koja su usko povezana sa strukturom kromatina. Ukoliko su interakcije između DNA i histona jake, kromatin je gusto pakiran u obliku heterokromatina te je ekspresija gena suprimirana. Određene modifikacije N-terminalnih repova histonskih komponenti mogu uzrokovati smanjenje tih interakcija čime kromatin prelazi u više opušteno stanje te je ekspresija gena moguća. Iako ne postoje točno definirana pravila koja povezuju određene modifikacije s heterokromatinom i eukromatinom, postavljena je hipoteza histonskog koda koja uzima u obzir određene kombinacije modifikacija povezane s genskom aktivnošću (Sl. 8) (Jenuwein i Allis, 2001).

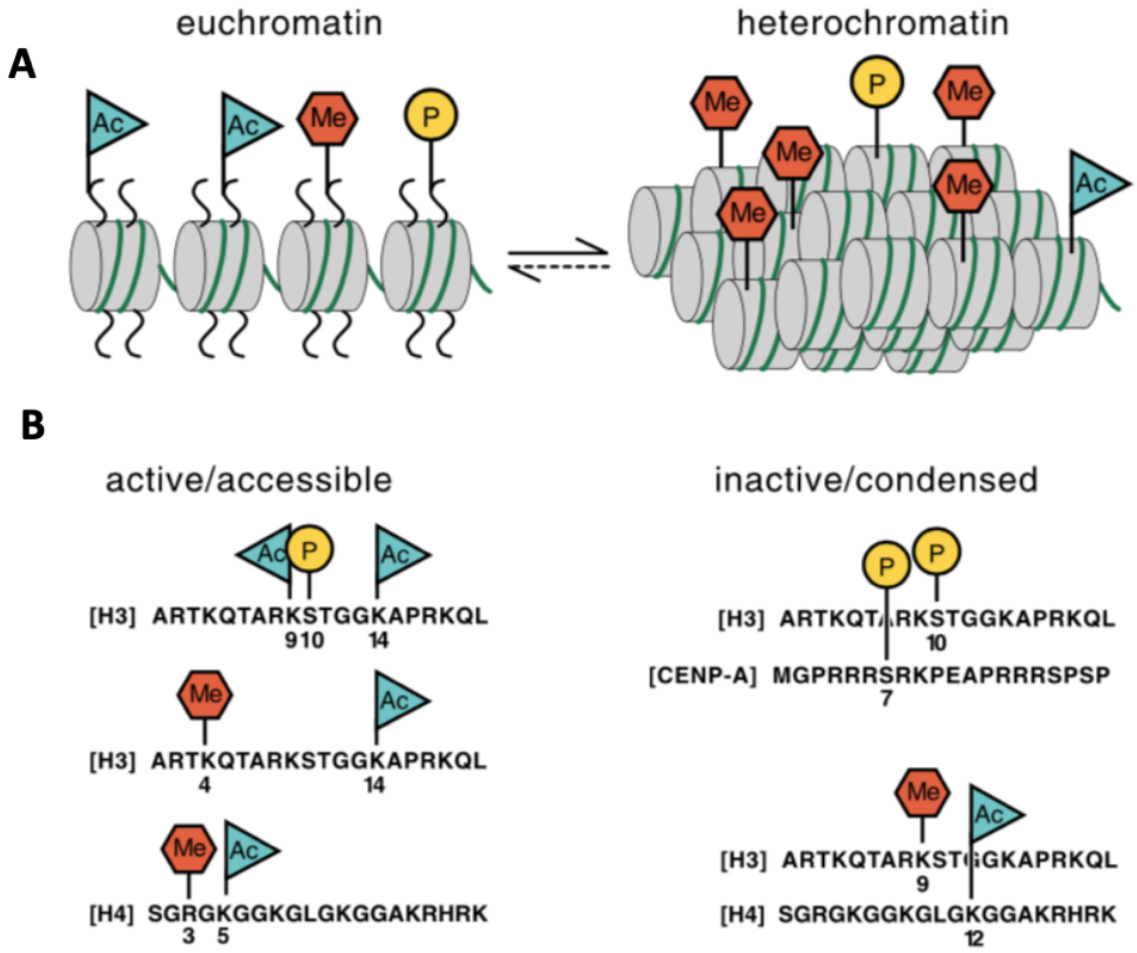
Metilirana CpG mjesta u promotorima ili u regulatornim regijama gena povezana su s represijom, odnosno utišavanjem genske aktivnosti, dok su demetilirani promotori povezani s genskom aktivacijom. Ova tvrdnja je uspostavljena na temelju korelacijskih analiza – promotori gena se analiziraju za stupanj metilacije, dok se RNA iz istih stanica koristi za analizu ekspresije gena te se dva tipa padataka uspoređuju. Međutim, nedvojbeno je utvrđeno da su određena CpG mjesta zaista uključena u regulaciju određenih gena tek kada je bilo moguće ciljano uvesti epigenetičke oznake te nakon toga analizirati njihov učinak na ekspresiju gena. Fuzijom katalitičke domene DNA metiltransferaze 3A (DNMT3A), koja je najaktivnija DNMT u humanim stanicama za metilaciju DNA *de novo,* za protein Cas9, te ciljanom metilacijom određenih CpG mjesta u promotorima kandidat gena pokazano je da ih je moguće inaktivirati (Vojta i sur. 2016). Isto tako fuzija demetilaze TET1 s proteinom Cas9 ciljana je na određene gene te je pokazano da demetilacija uzrokuje reaktivaciju ciljanih gena te posljedično i promjenu fenotipa (Choudhury i sur. 2016; Liu i sur. 2018.).

Osim supresije genske aktivnosti putem mijenjanja epigenetičkih oznaka, moguće je aktivirati i utišati gene fuzijom varijanti Cas9 s različitim enzimatskim domenama. One koje se koriste u svrhu supresije genske aktivnosti najčešće su KRAB ili SID. One uzrokuju regrutaciju enzima za

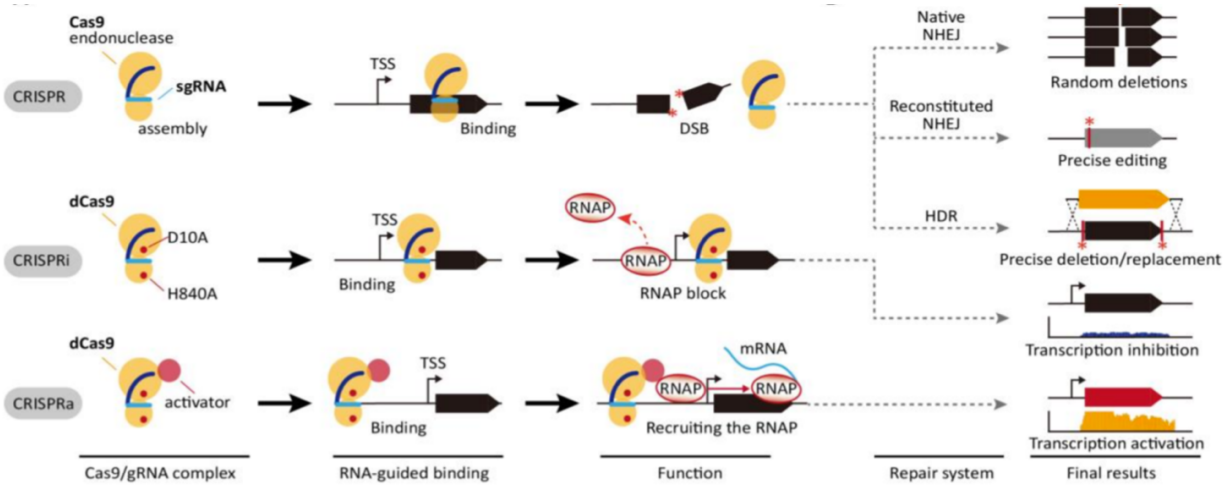
modifikaciju histona te nastanak heterokromatina. Proteini P65, HSF1, VP16, VPR, Rta i MyoD su primjeri aktivacijskih domena koje u ovakvim sustavima uzrokuju nastanak eukromatina i omogućuju direktnu reaktivaciju gena (Sl. 9A) (Pulecio i sur. 2017). Takvi sustavi za ciljano povećanje genske ekspresije nazivaju se CRISPRa (engl. *activation*). Postoje i CRISPRi (engl. *interference*) sustavi koji koriste katalitički inaktivni Cas9. Vezanjem dCas9 na DNA (interferencija), onemogućava se pristup transkripcijskoj mašineriji i na taj se način također suprimira genska ekspresija (Sl. 9) (Cho i sur. 2018, Gilbert i sur. 2014).

Nedavno je upotrijebljen modularni sustav CRISPR/Cas9 koji koristi dva ortologna proteina Cas9, jedan iz bakterije *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) i drugi iz bakterije *Staphylococcus aureus* (SaCas9). Ovakav je sustav omogućio simultano ciljanje više gena te njihovo istovremenu aktivaciju i utišavanje. Također, autori su pokazali da istovremeno ciljanje određenog genskog lokusa s dvije fuzije - VPR -dSpCas9 za direktnu gensku aktivaciju i TET1-dSaCas9 za demetilaciju promotora – rezultira puno većim efektom na promjenu ekspresije gena nego pojedinačno korištenje zasebnih fuzija (Josipović, Tadić i sur. 2019; https://doi.org/10.1093/nar/gkz709).

Osim ciljane regulacije specifičnog gena, moguće je istovremeno aktivirati/suprimirati ekspresiju više gena (engl. *multiplexing*) raspoređenih po čitavom genomu, koristeći fuziju proteina dCas9 s određenom efektorskom domenom te RNA knjižnice. RNA knjižnica kodira za sgRNA molekule koje vežu regulatorne elemente gena koji se istražuju te, ovisno o sustavu, aktivnošću svojih fuzijskih domena uzrokuju aktivaciju ili represiju tih gena. Prethodne metode za istraživanje funkcije određenog gena osnivale su se na usporedbi stanica u kojima je gen eksprimiran i one u kojima nije, dok ove metode omogućuju istraživanje važnosti *količine* određenog proteina u stanici (Cong i sur. 2013).



Slika 8. Shematski prikaz modela histonskog koda. A) Shematski prikaz strukture eukromatina i heterokromatina koji sadrži histone modificirane metilacijom (Me), acetilacijom (Ac) ili fosforilacijom (P). B) Shematski prikaz kombinacija N-terminalnih histonskih modifikacija karakterističnih za određeno stanje kromatina. Oznake slovima predstavljaju aminokiseline: A, Ala; E, Glu; G, Gly; H, His; K, Lys; L, Leu; M, Met; P, Pro; Q, Gln; R, Arg; S, Ser; T, Thr. Preuzeto iz Jenuwein i Allis, 2001.



Slika 9. Shematski prikaz sustava CRISPR, CRISPRi i CRISPRa. Sustav CRISPR sastoji se od Cas9 nukleaze i kimerne sgRNA koja ga navodi do ciljane sekvence u DNA. Tamo nukleaza radi dvolanačni lom koji se može popraviti na nekoliko načina. CRISPRi sustav sastoji se od katalitički inaktivnog dCas9 koji se vođen kimernom sgRNA veže na ciljani dio DNA i na taj način ne dozvoljava vezanje RNA polimeraze i transkripciju gena. Sustav CRISPRa također se sastoji od inaktivnog dCas9, ali su na njega fuzionirane posebne enzimatske domene koje svojom aktivnošću uzrokuju aktivaciju genske ekspresije. Preuzeto iz Cho i sur. 2018.

3.3 Vizualizacija kromatina

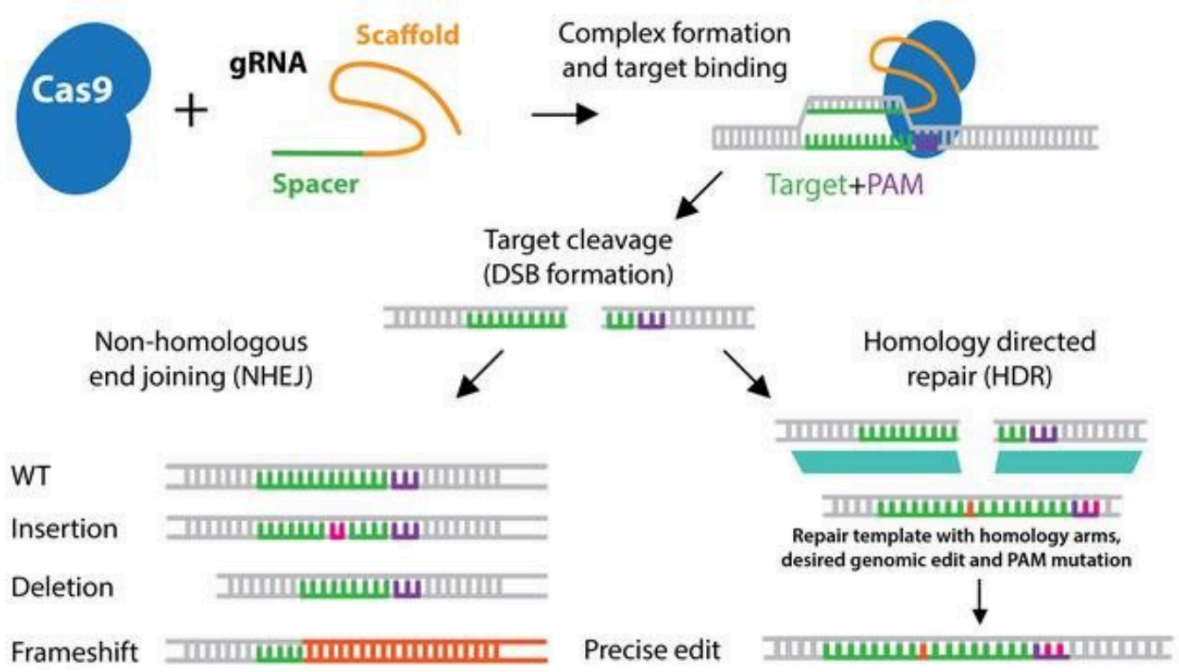
Regulacija gena višekomponentni je proces koji uključuje dinamičnu promjenu strukture cijelog kromatina. Distalni regulatori, kao što su pojačivači koji se mogu nalaziti nekoliko kilobaza od pripadajućeg gena, perturbacijom kromatinske strukture mogu doći u blizinu gena kojeg reguliraju. Važnost kromatinske dinamike također je povezana s diferencijacijom embrionalnih matičnih stanica tijekom razvoja.

Sustav CRISPR/Cas9 uspješno je modificiran i korišten u svrhu vizualizacije interakcija različitih lokusa u DNA. Fuzijom katalitički inaktivnog proteina Cas9 s proteinom GFP (engl. *green flourescent protein*), moguće je ciljati i vizualizirati lokuse bez narušavanja kromatinske strukture. Iako su u slične svrhe dosad korištene metode ZFN i TALENa, sustav CRISPR/Cas9 ima prednost nad njima jer omogućava višestruko djelovanje koristeći nekoliko molekula sgRNA koje ciljaju različite lokuse (Pulecio i sur. 2017).

3.4 Ciljana mutageneza molekule DNA

Uz uvođenje epigenetičkih promjena, sustav CRISPR/Cas9 koristi se za uvođenje mutacija u samoj molekuli DNA. Dovođenje Cas9 nukleaze uz pomoć sgRNA do ciljnog mjesta rezultira nastankom dvolančanog loma u DNA koji se može popraviti nehomolognim spajanjem krajeva (engl. *NHEJ-nonhomologous end joining*) ili homolognim popravkom (engl. *HDR-homology directed repair*) (Sl. 10).

U slučaju NHEJ, endogena mašinerija stanice obrađuje krajeve molekule DNA koji se nalaze na mjestu loma i spaja ih, pri čemu nastaju nasumične mutacije. Najčešće se radi o indel mutacijama u kojima je kratki segment insertiran ili deletiran. Posljedice toga često su mutacije koje uzrokuju pomak u okviru čitanja (engl. *frameshift)* i rezultiraju nastankom preuranjenog stop kodona te samim time inaktivacijom gena (engl. *gene knockout*). Za uvođenje većih delecija rade se dva dvolančana loma kojima se direktno izrezuje segment između njih. Homologni popravak koristi DNA kalup u obliku plazmida ili jednolančanog oligodeoksiribonukleotida (engl. *ssODN*) s kojeg se prekopira informacija o nukleotidnoj sekvenci (Rann i sur. 2013, Pickar-Oliver and Gersbach, 2019). Sintezom kalupa koji sadrži određenu mutaciju ili gen od interesa te homologne dijelove (engl. *homology arms*), moguće je uvesti željenu mutaciju ili čitavi gen u genom.



Slika 10. Shematski prikaz popravka dvolančanog loma DNA nehomolognim spajanjem krajeva (NHEJ) i direktnim homolognim popravkom (HDR). Preuzeto iz Adhikari i Poudel, 2020.

3.5 Dosadašnje primjene sustava CRISPR/Cas9

Sustav CRISPR/Cas9 ima raznoliku primjenu te je omogućio razvitak novih tehnologija za istraživanje i uređivanje genoma i epigenoma, kao i za proučavanje bolesti. Provedena su mnoga istraživanja u kojima je moguće prevesti jednu vrstu stanice u drugu, uključujući diferencijaciju matičnih stanica u određeni tip. Pomoću sustava CRISPR/Cas9 moguće je napraviti stanične linije mutanata koji imaju „bolesni“ fenotip te istraživati kako ispraviti mutacije i vratiti poremećenu homeostazu (bolesno stanje) u početno zdravo stanje. Znanstvenici su uz pomoć sustava CRISPR/Cas9 uspjeli promijeniti fenotip primarne embrijske stanice fibroblasta miša (engl. *primary mouse embryonic fibroblast PMEF)* u diferencirani tip neurona, samo uz pomoć promjena epigenetičkih modifikacija koje su rezultirale ekspresijom gena *Myod1,* koji je tipično eksprimiran u živčanim stanicama (Black i sur. 2016). Uvođenjem ili brisanjem epigenetičkih modifikacija može se ispitivati uzročnost metilacije određenih dijelova molekule DNA za razvoj određenih bolesti. Ova metoda ima veliki potencijal u liječenju fragilnog kromosoma X (engl. *fragile X syndrom FXS*), česte bolesti u muškoj populaciji koja se javlja kada je gen *FMR1*, koji ima ulogu

u pravilnom prijenosu živčanih signala, utišan. Demetilacijom dijela DNA uspješno je aktivirana ekspresija gena *FMR1* u FXS pluripotentnim matičnim stanicama (engl. *induced pluripotent stem cells iPSCs*) te u živčanim stanicama *in vitro.* Induciranom ekspresijom gena *FMR1*, djelomično se povratio normalan fenotip FXS neurona. Takvi neuroni presađeni su u mišji mozak te se ekspresija gena održala *in vivo* (Liu i sur. 2018). Smatra se da su različite epigenetičke modifikacije, koje rezultiraju utišavanjem gena, odgovorne za razvitak mnogih kancerogenih bolesti u ljudi te da sustav CRISPR/Cas9 ima veliki potencijal u budućnosti u svrhu epigenetičke terapije u liječenju takvih bolesti (Yao i sur. 2015). Nadalje, otvorene su mogućnosti istraživanja gena esencijalnih za preživljavanje stanica i organizama te gena potrebnih za rezistenciju na određene supstance (Rajagopal i sur. 2016).

Sustav CRISPR/Cas9 korišten je u istraživanjima rezistencije na virus HIVa, RNA-virus s jednom od najvećih stopa mutacije. Ideja jednog istraživanja bila je oponašati imunološki odgovor kao što se javlja u bakterijskoj stanici pri infekciji bakteriofagom. Korištenjem jedne molekule sgRNA uvodi se dvolančani lom u egzogene RNA faga što ih uglavnom inaktivira. Virus HIV-a često je u mogućnosti popraviti taj lom te pri spajanju krajeva na mjestu loma nastaju mutacije koje čine virus neprepoznatljivim od strane sgRNA. Na taj način HIV uspijeva „pobjeći“ od sgRNA (engl. *viral escape*) te se ugrađuje u genom stanice i nastavlja se reproducirati. Kombinatornim pristupom u kojemu se koriste dvije molekule sgRNA, uvode se dvolančani lomovi na različitim mjestima u genomu HIV-a. Takve lomove je teže popraviti te se gotovo sve molekule RNA uspješno inaktiviraju i sprječava se „viralni bijeg“ (Lebbink i sur. 2017).

Iako obećavajuće, mnoge metode sustava CRISPR/Cas9 nisu još prilagođene za rad s humanim stanicama. Dugoročno gledajući, nije poznato bi li sustav CRISPR/Cas9 imao kakav neželjeni učinak na genom čovjeka. Za daljnja istraživanja potrebna su ispitivanja na ljudima, ali, zbog kontroverznih etičkih pitanja, vjerojatnosti za tako nešto u bliskoj budućnosti su male. Kontraverzno istraživanje tog tipa nedavno je proveo kineski znanstvenik He Jiankui. Njegov cilj bio je, pomoću sustava CRISPR/Cas9, modificirati humane embrije koji potječu od HIV negativnih majki i HIV pozitivnih očeva, što bi omogućilo takvim parovima da imaju djecu koja su imuna na infekciju HIV-om. Naime, kod rijetkih pojedinaca uočena je mutacija, točnije delecija dijela gena *CCR5* koji se nalazi na trećem kromosomu. Taj gen kodira za receptore na T-stanicama koji omogućavaju infekciju virusom. Znanstvenik He se nadao da će ciljanom mutagenezom uz pomoć sustava CRISPR/Cas9 uspješno deletirati 32 nukleotida u genu *CCR5*, što bi njegov

produkt učinilo nefunkcionalnim, kao što to biva u stanicama spomenutih pojedinaca koji nose istu mutaciju. Takvi modificirani embriji implantirani su u maternice pet ispitanica od kojih su dvije začele, pri čemu je jedna nosila dvojajčane blizanke. Blizanke su rođene 2018. godine te je kasnijim ispitivanjem utvrđeno da je jedna od njih heterozigot za gen *CCR5*, što znači da je sustavom CRISPR/Cas9 modificirana kopija sa samo jednog kromosoma. Obje blizanke bile su „mozaici", što znači da jedan dio stanica njihovog organizma ima malo drugačiju DNA od ostatka organizma. Razlog tomu vjerojatno je primjena sustava u prekasnoj fazi embrionalnog razvoja pri čemu je došlo do modifikacije samo određenog broja stanica. Nadalje, niti u jednoj od blizanki gen *CCR5* nije modificiran onako kako je planirano, već se dogodila drugačija mutacija koja je, srećom, rezultirala željenim fenotipom, a to je proizvodnja nefunkcionalnih proteina CCR5 koji onemogućuju infekciju stanice HIV-om. S obzirom na neočekivani ishod ciljane mutageneze uz brojna etička pitanja koja se nameću, Heov eksperiment nije prihvaćen kao uspjeh te se istraživanja nisu smjela nastaviti (Greely 2019).

4 BUDUĆNOST TEHNOLOGIJE CRISPR/Cas

Raznovrsnost sustava CRISPR/Cas u prokariota još nije u potpunosti istražena te se i dalje traga za manjim, kompaktnijim i efektivnijim sustavima kojima bi se mogao istraživati i uređivati genom. Znanstvenici sa Sveučilišta Berkeley u Kaliforniji nedavno su pronašli sustav CRISPR/Cas u velikim bakteriofagima. Ovo je prvi put da je sustav CRISPR/Cas uočen u organizmima osim bakterija i arheja. Protein CasΦ (Phi) veličine od 70 do 80 kDa, upola je manji protein od proteina Cas9, te u početku nije bilo sigurno funkcionira li kao ostali proteini Cas sustava CRISPR. Provedeno istraživanje potvrdilo je hipotezu da je CRISPR/CasΦ funkcionalan sustav koji vjerojatno služi virusima za obranu od drugih bakteriofaga te je lako programibilan promjenom sekvence sgRNA. Uz to, uočeno je da CasΦ koristi jedinstvenu domenu za procesiranje pre-crRNA i cijepanje lanaca što predstavlja još jedan primjer reduciranosti ovog sustava. Upravo zbog navedenih razloga, sustav CRISPR/CasΦ zajedno s bakteriofagima ima veliki potencijal u budućim istraživanjima (Pausch i sur. 2020).

5 LITERATURA

Adhikari, Prabin, and Mousami Poudel. "CRISPR-Cas9 in agriculture: Approaches, applications, future perspectives, and associated challenges." *Malaysian Journal of Halal Research* 3.1 (2020): 6-16.

Black, Joshua B., et al. "Targeted epigenetic remodeling of endogenous loci by CRISPR/Cas9-based transcriptional activators directly converts fibroblasts to neuronal cells." *Cell stem cell* 19.3 (2016): 406-414.

Chandrasekaran, Arun Pandian, et al. "Different methods of delivering CRISPR/Cas9 into cells." *Progress in molecular biology and translational science*. Vol. 159. Academic Press, 2018. 157-176.

Cho, Suhyung, Jongoh Shin, and Byung-Kwan Cho. "Applications of CRISPR/Cas system to bacterial metabolic engineering." *International journal of molecular sciences* 19.4 (2018): 1089.

Choudhury, Samrat Roy, et al. "CRISPR-dCas9 mediated TET1 targeting for selective DNA demethylation at BRCA1 promoter." *Oncotarget* 7.29 (2016): 46545.

Cong, Le, et al. "Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems." *Science* 339.6121 (2013): 819-823.

Deltcheva, Elitza, et al. "CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III." *Nature* 471.7340 (2011): 602-607.

Doudna, Jennifer A., and Emmanuelle Charpentier. "The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9." *Science*346.6213 (2014).

Gaj, Thomas, Charles A. Gersbach, and Carlos F. Barbas III. "ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering." *Trends in biotechnology* 31.7 (2013): 397-405.

Gilbert, Luke A., et al. "Genome-scale CRISPR-mediated control of gene repression and activation." *Cell* 159.3 (2014): 647-661.

Greely, Henry T. "CRISPR'd babies: human germline genome editing in the 'He Jiankui affair'." *Journal of Law and the Biosciences* 6.1 (2019): 111-183.

Ishino, Yoshizumi, et al. "Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product." *Journal of bacteriology* 169.12 (1987): 5429-5433.

Jenuwein, Thomas, and C. David Allis. "Translating the histone code." *Science* 293.5532 (2001): 1074-1080.

Jinek, Martin, et al. "A programmable dual-RNA–guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity." *science* 337.6096 (2012): 816-821.

Josipović, Goran, et al. "Antagonistic and synergistic epigenetic modulation using orthologous CRISPR/dCas9-based modular system." *Nucleic acids research* 47.18 (2019): 9637-9657.

Korkmaz, Gozde, et al. "Functional genetic screens for enhancer elements in the human genome using CRISPR-Cas9." *Nature biotechnology* 34.2 (2016): 192-198.

Lebbink, Robert Jan, et al. "A combinational CRISPR/Cas9 gene-editing approach can halt HIV replication and prevent viral escape." *Scientific reports* 7 (2017): 41968.

Liao, Hsin-Kai, et al. "In vivo target gene activation via CRISPR/Cas9-mediated trans-epigenetic modulation." *Cell*171.7 (2017): 1495-1507.

Liu, X. Shawn, et al. "Rescue of fragile X syndrome neurons by DNA methylation editing of the FMR1 gene." *Cell* 172.5 (2018): 979-992.

Mojica, Francisco JM, et al. "Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system." *Microbiology* 155.3 (2009): 733-740.

Pausch, Patrick, et al. "CRISPR-CasΦ from huge phages is a hypercompact genome editor." *Science* 369.6501 (2020): 333-337.

Pickar-Oliver, Adrian, and Charles A. Gersbach. "The next generation of CRISPR–Cas technologies and applications." *Nature reviews Molecular cell biology* 20.8 (2019): 490-507.

Pulecio, Julian, et al. "CRISPR/Cas9-based engineering of the epigenome." *Cell Stem Cell* 21.4 (2017): 431-447.

Rajagopal, Nisha, et al. "High-throughput mapping of regulatory DNA." *Nature biotechnology* 34.2 (2016): 167-174.

Ran, F. Ann, et al. "Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system." *Nature protocols* 8.11 (2013): 2281-2308.

Vojta, Aleksandar, et al. "Repurposing the CRISPR-Cas9 system for targeted DNA methylation." *Nucleic acids research* 44.12 (2016): 5615-5628.

Yao, Shaohua, Zhiyao He, and Chong Chen. "CRISPR/Cas9-mediated genome editing of epigenetic factors for cancer therapy." *Human gene therapy* 26.7 (2015): 463-471.

http://rna.berkeley.edu/crispr.html

6 SAŽETAK

Promjene u nukleotidnoj sekvenci DNA, kao i epigenetičke promjene koje rezultiraju perturbacijom kromatinske strukture, mogu dovesti do razvitka mnogih bolesti u ljudi i životinja. Otkriće sustava CRISPR/Cas9 koji potječe od prokariotskih organizama u kojima ima ulogu imunosnog sustava, omogućilo je determinaciju i istraživanje kodirajuće i nekodirajuće DNA, aktivaciju ili represiju genske aktivnosti te uvođenje mjesno-specifičnih mutacija u sve tri domene života. Sustav CRISPR/Cas9 predstavlja precizan i efikasan alat za ciljano uređivanje genoma i manipulaciju genske ekspresije. Lakoća programibilnosti ovog dvokomponentnog sustava promjenom kratke nukleotidne sekvence u molekuli RNA da prepoznaje virtualno bilo koje mjesto unutar genoma, daje ovoj tehnologiji veliki potencijal za primjenu u genetičkom injženjerstvu, biotehnologiji te istraživanju, liječenju i prevenciji bolesti uzrokovanih genetičkim ili epigenetičkim promjenama.

7 SUMMARY

Changes in the nucleotide sequence of DNA, as well as epigenetic changes which result in chromatin perturbation, can lead to development od many diseases in both animals and humans. Discovery of CRISPR/Cas9 system derived from prokaryotes, in which it serves as an adaptive immune system, enables determination and investigation od both coding and noncoding DNA, activation or repression of certain genes and introduction of site-specific mutations in all three domains of life. CRISPR/Cas9 system is a precise and efficient tool for targeted genome editing and manipulation of gene expression. Because this two-component system is so easily programmable by altering short nucleotide sequence of an RNA molecule to target virtually any locus within the genome, it holds great potential for application in genetic engineering, biotechnology and investigation, treatment and prevention of diseases caused by genetic or epigenetic changes.