

Primjena alata CRISPR-Cas9 za modificiranje mitohondrijskog genoma

Đerek, Anamaria

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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:217:565486>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-22**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Primjena alata CRISPR-Cas9 za modificiranje mitohondrijskog genoma
Application of CRISPR-Cas9 in mitochondrial genome modification

Završni rad

Anamaria Đerek
Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)
Mentor: izv. prof. dr. sc. Petra Korać

Zagreb, 2021.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod voditeljstvom izv. prof. dr. sc. Petre Korać.

Sadržaj

Uvod.....	1
1. CRISPR-Cas9 – od prokariota do uređivanja genoma	3
1.1 Sustav CRISPR-Cas kao oblik imunosti kod prokariota.....	3
1.2 Metoda CRISPR-Cas9 i primjena na eukariotskim stanicama	5
1.2.1 Metoda CRISPR-Cas9.....	5
1.2.2 Unos kompleksa sgRNA:Cas9 u eukariotsku stanicu.....	6
1.2.3 Nespecifično cijepanje	7
2. Primjena alata CRISPR-Cas9 na mitohondrijski genom.....	7
2.1 Unos proteina Cas9 obilježenog mitohondrijskim lokalizacijskim signalom	8
2.2 Unos gRNA pomoću polinukleotidne fosforilaze	9
2.3 Uređivanje genoma mitohondrija u kvascu <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
2.4 Unos FD-RNA.....	10
2.5 Insercije i delecije u mitohondrijskoj DNA.....	11
2.6 Utjecaj temperature na učinkovitost sustava CRISPR-Cas9 u mitohondrijima.....	12
3. Prednosti i mane primjene sustava CRISPR-Cas9 na mitohondrijski genom	13
Zaključak	14
Literatura	15
Sažetak.....	18
Summary	19

Uvod

Razvoj metoda za uređivanje genoma (engl. *genome editing*) u posljednjih nekoliko desetljeća uvelike je pridonio ubrzanom napretku biologije i znanosti u cjelini. Zajednička karakteristika metoda koje se koriste za uređivanje genoma obuhvaća korištenje nukleaza koje uvode dvolančane lomove u molekuli DNA. Dvolančani lomovi se potom popravljaju na jedan od dva moguća načina: 1) nehomolognim sparivanjem krajeva (NHEJ, od engl. *non-homologous end-joining*) koji dovodi do povezivanja (ligacije) prekinutih lanaca uvođenjem insercija i delecija te 2) homolognom rekombinacijom (HR, od engl. *homologous recombination*) koja omogućava točan popravak jer se koristi informacija sa sestrinske kromatide. Za uređivanje genoma posebno je bitan popravak pomoću NHEJ jer uvođenjem delecija, insercija ili supstitucija taj proces dovodi do inaktivacije, popravka ili promjene gena od interesa (Rodríguez-Rodríguez i sur. 2018).

Najpoznatije metode koje se koriste za uređivanje genoma podrazumijevaju korištenje proteina ZFN (engl. *zinc finger nucleases*), proteina TALEN (engl. *transcriptional activator-like effector nucleases*) i sustava CRISPR-Cas9 (engl. *clustered regularly interspaced short palindromic repeat* (CRISPR) - *CRISPR-associated nuclease 9* (Cas9)). Zbog svoje jednostavnosti, lakoće korištenja i efikasnosti u usporedbi s ostalim metodama, metoda CRISPR-Cas9 se od 2012. godine ubrzano razvija i unaprjeđuje pa sve češće postaje metoda od izbora budući da je za ostale spomenute tehnike potreban dugotrajan proces sinteze specifičnih proteina za svaku pojedinu sekvencu i one imaju manju specifičnost u usporedbi s metodom CRISPR-Cas9 (Manghwar i sur. 2019).

Tehnologija CRISPR-Cas9 proizašla je iz obrambenog mehanizma kojeg bakterije koriste kako bi se zaštitile od strane DNA, a sastoji se od male gRNA molekule (engl. *guide RNA*) koja se veže na specifično mjesto u genomu i usmjerava nukleazu Cas9 koja potom cijepa molekulu DNA stvarajući dvolančani lom. Dvolančani lom se zatim najčešće popravljiva već spomenutim procesom NHEJ, unošenjem insercije, delecije ili uzrokovanjem supstitucije u ciljanom genu što dovodi do inaktivacije ili ispravka mutacije toga gena (Rodríguez-Rodríguez i sur. 2018). Najčešće korišteni oblik CRISPR-Cas9 potječe iz bakterije *Streptococcus pyogenes* (Musunuru 2017).

Mitochondriji imaju važnu ulogu u funkcioniranju eukariotske stanice, prije svega zbog stvaranja energije u obliku ATP-a procesom oksidacijske fosforilacije, reguliranja procesa apoptoze, staničnog signaliziranja i skladištenja kalcija. Da bi se te važne funkcije održale vrlo je važno očuvanje integriteta mitohondrijskog genoma koji je pod stalnim rizikom od oštećenja djelovanjem reaktivnih kisikovih radikala (ROS, od engl. *reactive oxygen species*) koji nastaju procesom oksidacijske fosforilacije. Kao posljedica toga dolazi do heteroplazmije pri čemu dio mitohondrijskih DNA molekula nosi mutacije koje su vrlo često povezane s poremećajima poput Parkinsonove bolesti, Alzheimerove bolesti i dr. (Jo i sur. 2015)

Eksperimentalno je utvrđeno da se nukleaze TALEN mogu unijeti u mitohondrij i potaknuti popravak ili uklanjanje promijenjene mitohondrijske DNA. Međutim, javila se potreba za korištenjem efikasnije i specifičnije metode poput CRISPR-Cas9 koja bi omogućila točniji popravak, ali sposobnost unošenja nukleinske kiseline, odnosno gRNA predstavlja problem za takav pristup (Jo i sur. 2015).

1. CRISPR-Cas9 – od prokariota do uređivanja genoma

1.1 Sustav CRISPR-Cas kao oblik imunosti kod prokariota

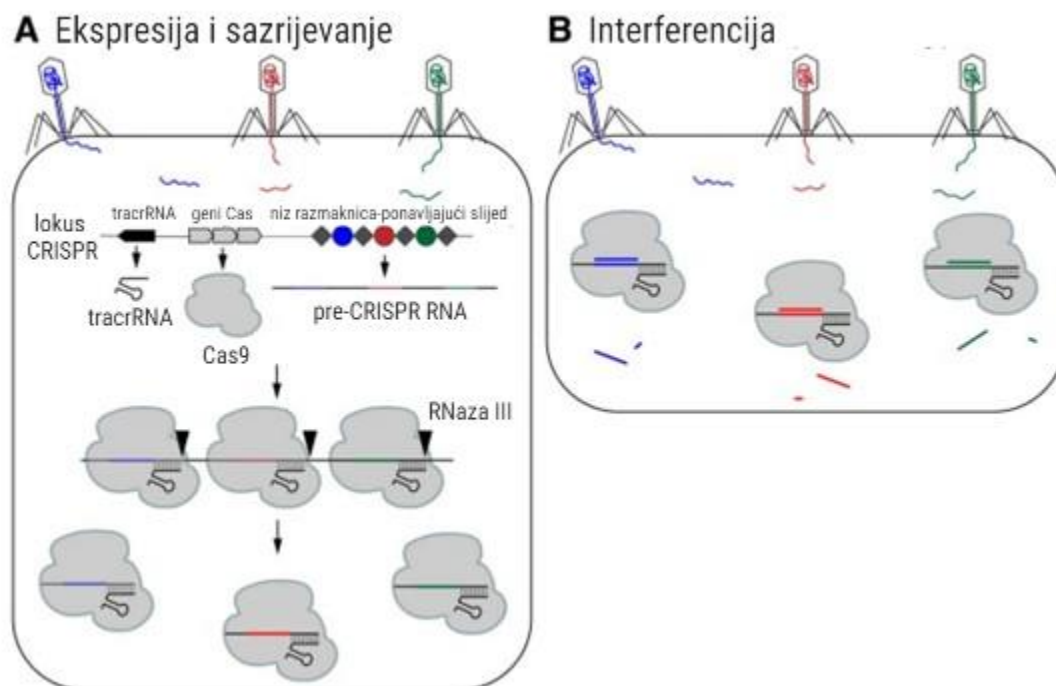
Prokariotski sustav CRISPR-Cas pronađen je u oko 50 % bakterijskih genoma i 87 % genoma arheja (Rodríguez-Rodríguez i sur. 2018)., a služi kao oblik adaptivne imunosti u borbi protiv faga i drugih stranih mobilnih genetičkih elemenata (MGE, od engl. *mobile genetic elements*) kao što su plazmidi i transpozoni. Lokus CRISPR sastoji se od višestrukih ponavljajućih sekvenci i jedinstvenih razmaknica (engl. *spacer*), a vrlo je važno bilo otkriće da sekvenca razmaknica odgovara sekvenci genoma faga (Hille i sur. 2018).

Obrana prokariota pomoću sustava CRISPR-Cas sastoji se od tri koraka: adaptacije, formiranja CRISPR-RNA i interferencije. Sustav CRISPR-Cas može se podijeliti u dvije klase, koje se potom dijele na šest podtipova. Prvu klasu CRISPR-Cas sustava karakterizira interferencija posredovana multiproteinskim kompleksom enzima Cas, dok kod sustava klase 2 interferenciju provodi jedan protein (Hille i sur. 2018). Zbog jednostavnosti, u ovom prikazu bit će govora samo o sustavu klase 2, podtipa IIA jer je taj sustav najbolje prilagođen metodama genetičkog inženjerstva i danas se najčešće upotrebljava.

U fazi adaptacije zbiva se integracija dijela genoma MGE u CRISPR-lokus u obliku razmaknice. Nakon detekcije MGE, slijedi faza odabiranja i procesiranja protorazmaknice te integracija razmaknice u genom. Budući da se time u genom ugrađuje memorija o infekciji, ona se nasljeđuje na potomstvo (Hille i sur. 2018).

Transkripcijom ugrađenih razmaknica iz CRISPR-lokusa nastaje pre-CRISPR-RNA (crRNA). Ona se potom djelomično sparuje s tracrRNA (engl. *trans-activating CRISPR RNA*) koja nastaje transkripcijom s lokusa uzvodno od CRISPR. Kompleks pre-crRNA:tracrRNA se cijepa najprije RNazom III, a zatim nepoznatom RNazom pri čemu nastaje aktivan kompleks crRNA:tracrRNA koji zajedno s proteinom Cas9 sudjeluje u interferenciji s ciljnim mjestom u genomu (Slika 1.). Ribonukleoproteinski kompleks crRNA:tracrRNA:Cas9 djeluje kao endonukleaza koju vodi RNA (engl. *RNA-guided endonuclease*) (Thurtle-Schmidt i Lo 2018).

Kompleks crRNA:tracrRNA:Cas9 pretražuje genomsku DNA tražeći motiv PAM (engl. *protospacer adjacent motif*) koji se nalazi uzvodno od proto-razmaknice, odnosno strane unesene DNA. Motiv PAM važan je u razlikovanju strane DNA i razmaknica CRISPR jer sprječava cijepanje vlastite DNA budući da se ne nalazi u razmaknicama koje su dio lokusa CRISPR. Kada se prepozna motiv PAM, razdvaja se 10-12 bp nizvodno od regije PAM i ukoliko dođe do komplementarnog sparivanja crRNA i lanca DNA, Cas9 mijenja konformaciju pri čemu se aktiviraju dvije nukleazne domene. Domena HNH, koja sadrži aminokiselinski slijed histidin-asparagin-histidin (Chen i Gonçalves 2018), cijepa prepoznati lanac DNA, dok nukleaza slična proteinu RuvC (engl. *RuvC-like nuclease*) cijepa neprepoznati lanac DNA (Lino i sur. 2018). Cas9 cijepa tri nukleotida uzvodno od PAM sekvence, uzrokujući nastanak tupih krajeva DNA (Thurtle-Schmidt i Lo 2018). Nastanak slobodnih tupih krajeva narušava integritet unesene strane DNA i uzrokuje njenu degradaciju, što dovodi do zaštite od infekcije (Thurtle-Schmidt i Lo 2018).



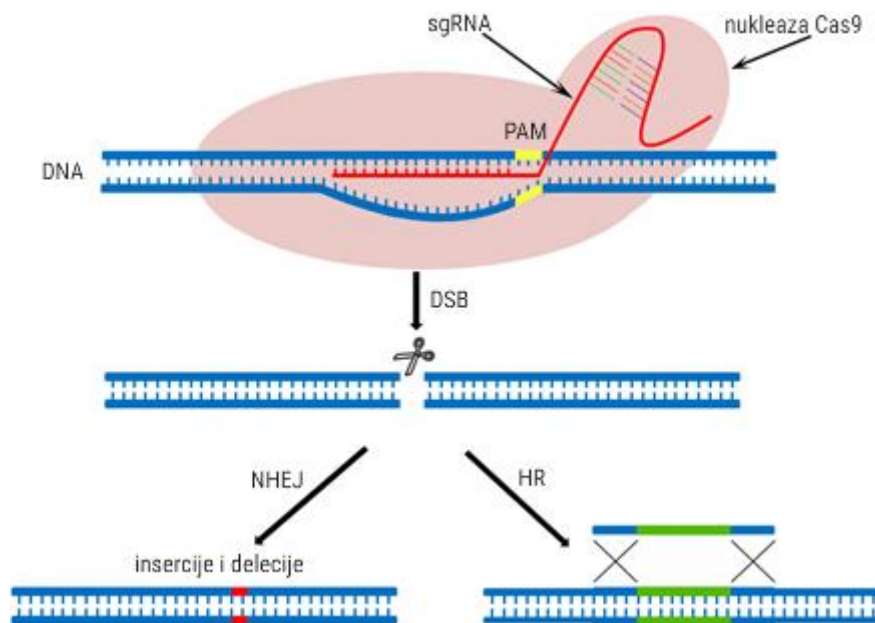
Slika 1. Sustav adaptivne imunosti CRISPR-Cas kod prokariota. Prikazana je faza ekspresije i sazrijevanja kompleksa crRNA:tracrRNA:Cas9 te interferencija (Thurtle-Schmidt i Lo 2018).

1.2 Metoda CRISPR-Cas9 i primjena na eukariotskim stanicama

1.2.1 Metoda CRISPR-Cas9

Doudna i Charpentier su 2012. godine pokazale da je moguće koristiti sustav CRISPR-Cas9 u eukariotskim stanicama i uzrokovati stvaranje dvolančanih lomova (DSB, od engl. *double-strand breaks*). Osim toga, pokazale su mogućnost stvaranja kimerne molekule RNA nazvane sgRNA (engl. *single guide RNA*), koja je analogna kompleksu crRNA:tracrRNA. Time je čitav sustav dodatno pojednostavljen jer postaje dvokomponentan – čine ga sgRNA i protein Cas9 (Lino i sur. 2018). U genetičkom inženjerstvu danas najkorišteniji oblik sustava CRISPR-Cas9 je varijanta iz bakterije *Streptococcus pyogenes* (Musunuru 2017).

sgRNA duga je oko 100 nukleotida. Na zadnjih 80 nukleotida se veže protein Cas9, a početnih 20 nukleotida se dizajniraju pomoću posebnih alata tako da budu komplementarni ciljanom mjestu DNA (Musunuru 2017). Kada se sgRNA komplementarno spari s ciljanom sekvencom DNA, Cas9 uvodi DSB pomoću nukleaznih domena HNH i nukleaze slične proteinu RuvC. Kako bi se cijepanje dogodilo, potrebno je prepoznavanje motiva PAM nizvodno od ciljane sekvence, koji u slučaju SpCas9 (*S. pyogenes* Cas9) ima slijed 5'-NGG-3', a pojavljuje se svakih osam parova baza (Lino i sur. 2018). Nastankom dvolančanog loma, stanica aktivira mehanizme popravka DNA (Slika 2.).



Slika 2. Primjena sustava CRISPR-Cas9 u genetičkom inženjerstvu. Prilagođeno prema Saber i sur. 2020.

1.2.2 Unos kompleksa sgRNA:Cas9 u eukariotsku stanicu

Stvaranje kompleksa sgRNA:Cas9 u eukariotskoj stanici može se postići na tri načina:

- 1) pomoću plazmida koji kodira sgRNA i protein Cas9
- 2) unošenjem sgRNA zajedno s mRNA koja kodira za protein Cas9
- 3) unošenjem gotovog ribonukleoproteinskog kompleksa sgRNA:Cas9.

Unošenje potrebnih komponenti u stanicu može se napraviti fizičkim unosom u stanicu (mikroinjektiranje, elektroporacija), korištenjem nevirusnih vektora (engl. *non-viral vectors*) ili korištenjem virusnih vektora (engl. *viral vectors*). Viralni vektori posebno su važni prilikom unosa kompleksa *in vivo*, a najčešće se koriste AAV (engl. *adeno-associated virus*), adenovirusi i lentivirusi. Nevirusni vektori koriste se rjeđe od virusnih, a to su najčešće lipidne ili zlatne nanočestice, CPP (engl. *cell-penetrating peptides*), DNA 'nanoclews' itd. (Lino i sur. 2018)

1.2.3 Nespecifično cijepanje

Nespecifično cijepanje (od engl. *off-target*) danas je jedan od najvećih problema metode CRISPR-Cas9. Što su sekvence PAM kraće, to je veća vjerojatnost da će u genomu postojati više takvih sekvenci, a samim time će one biti i pocijepane nukleazom Cas9, što nazivamo nespecifično cijepanje (engl. *off-target*). Do nespecifičnog cijepanja također može doći zbog nepotpune komplementarnosti sgRNA i molekule DNA. Na primjer, protein Cas9 iz *S. pyogenes* može cijepati DNA unatoč nekomplementarnom sparivanju šest parova baza između sgRNA i ciljne DNA (Rodríguez-Rodríguez i sur. 2018).

Jedan od načina rješavanja problema nespecifičnog cijepanja je skraćivanje slijeda od 20 nukleotida u sgRNA kojim se ona komplementarno veže na ciljanu DNA sekvencu na duljinu od 17 ili 18 nukleotida (Fu i sur. 2014). Drugi način podrazumijeva smanjenje aktivnosti ili skraćivanje vremena života proteina Cas9 nakon obavljenog cijepanja na željenoj poziciji (Komor i sur. 2017).

2. Primjena alata CRISPR-Cas9 na mitohondrijski genom

Mitohondriji su organele eukariotskih stanica koje, među ostalim važnim funkcijama, imaju ulogu u stvaranju energije pomoću elektrokemijskog gradijenta preko unutarnje mitohondrijske membrane, služe kao stanično skladište za kalcij i reguliraju procese stanične smrti (Jo i sur. 2015). Sadrže vlastitu kružnu dvolančanu DNA koja se u matriksu nalazi u više kopija, a kod ljudi je veličine 16,5 kbp i ima vrlo malo nekodirajućih dijelova. Kodira 13 proteina koji čine komplekse I, III i IV u lancu prijenosa elektrona te ATP-sintazu, 22 tRNA i dvije rRNA (Gammage i sur. 2017). Za razliku od jezgrine DNA koja se nasljeđuje od oba roditelja, mitohondriji i njihov genom se kod sisavaca nasljeđuju isključivo majčinskom linijom tj. preko zrele jajne stanice koja može sadržavati 100 000 - 600 000 mitohondrija (Cummins 2002). Mitohondrijska DNA nalazi se u okolišu s visokom koncentracijom reaktivnih kisikovih radikala oslobođenih u procesu staničnog disanja što uzrokuje mutacije koje mogu dovesti do različitih bolesti. Do oboljenja dolazi zbog heteroplazmije koju karakterizira postojanje određenog udjela mitohondrijskih DNA u stanici koje nose mutacije (Jo i sur. 2015).

Metoda CRISPR-Cas9 omogućila je uređivanje jezgrine DNA na relativno jednostavan način. Međutim, uređivanje genoma mitohondrija nailazi na problem unosa strane RNA, sgRNA, i proteina Cas9 kroz dvije mitohondrijske membrane (Gammage i sur. 2017). Danas postoje dva pristupa u rješavanju problema unosa strane RNA u mitohondrij – djelovanjem na mitohondrijsku mašineriju za unos RNA (npr. polinukleotidna fosforilaza kod ljudi) ili promjenom strukture RNA koja pogoduje unosu u mitohondrij (Antón i sur. 2020).

2.1 Unos proteina Cas9 obilježenog mitohondrijskim lokalizacijskim signalom

Unatoč još uvijek nedovoljno istraženim mehanizmima unosa RNA u matriks mitohondrija i korištenjem proteina Cas9 bez odgovarajućih signalnih peptida, Jo i sur. su u nizu eksperimenata pokazali neke neočekivane pojave. Protein Cas9 na svom N-terminusu obilježen je oktapeptidom FLAG (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys) kako bi se olakšala njegova lokalizacija i pročišćavanje (Hopp i sur. 1988). Pojačanom ekspresijom FLAG-Cas9 koji je nosio NLS (engl. *nuclear localization sequence*) uočeno je da se FLAG-Cas9 osim u jezgri, nalazio i u citoplazmi i mitohondrijima te da je u kombinaciji sa sgRNA koja je specifična za određenu mitohondrijsku sekvencu, dovodio do cijepanja i smanjenja ekspresije ciljanog mitohondrijskog gena. Prilikom sinteze sgRNA nisu napravljene nikakve specifične modifikacije i unatoč tome nisu uočeni problemi prilikom unosa u mitohondrij (Gammage i sur. 2017).

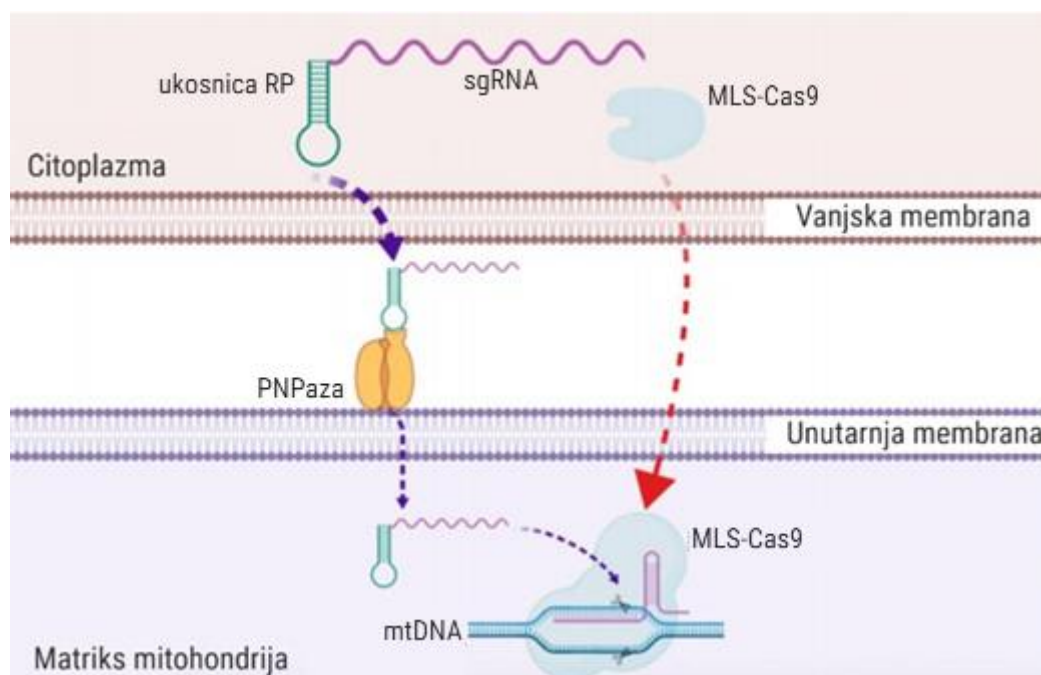
Međutim, iako se FLAG-Cas9 obilježen s NLS može nalaziti u mitohondrijima i služiti uređivanju mtDNA, potrebno je spriječiti njegovo djelovanje na genomsku DNA. Stoga su Jo i sur. u drugom eksperimentu umjesto oznaka FLAG i NLS, na protein Cas9 dodali MTS (engl. *mitochondrial targeting sequence*) omogućujući unos takvog mitoCas9 isključivo u mitohondrije. sgRNA specifična za gene *COX1* i *COX3* bila je uklonirana u lentiCRISPR-plazmide i zajedno s mitoCas9 unesena u stanice HEK-293T. Uočeno je cijepanje 90% mtDNA na lokusu *COX1* i 80% na lokusu *COX3* (Jo i sur. 2015).

Unatoč velikoj efikasnosti, uočeno je da cijepanje mtDNA uzrokuje poremećaj funkcije mitohondrija i promjene membranskog potencijala mitohondrija, a to u konačnici dovodi do smanjenja proliferacijskog kapaciteta stanica (Jo i sur. 2015).

2.2 Unos gRNA pomoću polinukleotidne fosforilaze

Hussain i sur. su 2020. godine pokazali da je moguće unijeti molekulu RNA koristeći polinukleotidnu fosforilazu (PNPaza, od engl. *polynucleotide phosphorylase*), proteinski kompleks koji služi degradaciji RNA. PNPaza koja je kodirana genom *PNPT1*, zajedno s mitohondrijskom helikazom hSUV3 specifičnom za RNA čini RNA-degradasom u matriksu mitohondrija, međutim, ukoliko se nađe u međumembranskom prostoru pomaže unosu molekule RNA u matriks (Gammage i sur. 2017).

Osim toga, uočeno je da se RNA molekule koje normalno nisu usmjerene u mitohondrije, a doda im se ukosnica (engl. *stem-loop*) jezgrine RNAze P duljine 20 nukleotida, lakše prenose u mitohondrije pomoću PNPaze. Shodno tomu, Hussain i sur. su u svom eksperimentu pokušali pomoću PNPaze unijeti sgRNA obilježenu RNAzom P, koja je specifična za regiju u genu *ND4*, i Cas9 koji je sadržavao mitohondrijski lokalizacijski signal (engl. *mitochondria localization signal*, MLS) (Slika 3.). Uočeno je specifično cijepanje mtDNA koje je dovelo do smanjenja heteroplazmije jer je došlo do smanjenja broja mtDNA koje sadrže ciljanu supstituciju A11204G i samim time smanjene ekspresije mutiranog gena *ND4*. (Hussain i sur. 2020)



Slika 3. Unos sgRNA koja sadrži ukosnicu RP u matriks mitohondrija pomoću PNPaze i lokalizacija proteina Cas9 obilježenog s MLS u matriks mitohondrija. (Hussain i sur. 2020)

2.3 Uređivanje genoma mitohondrija u kvascu *Saccharomyces cerevisiae*

Yoo i sur. su 2020. godine primijenili metodu CRISPR-Cas9 na mitohondrije kvasca *Saccharomyces cerevisiae* koristeći plazmide nazvane *Edit Plasmids*. Plazmidi *Edit Plasmids* sadržavali su dvije ekspresijske kazete - za Cas9 i gRNA, s promotorima i kodonima prilagođenim mitohondrijima te donorsku sekvencu DNA koja se trebala integrirati u genom mitohondrija na mjestu DSB-a induciranog sustavom CRISPR-Cas9. Donorska DNA na krajevima je sadržavala kratku regiju homologije s ciljanim mjestom ugradnje. Plazmidi su uneseni u stanice kvasca metodom transformacije mikroprojektilima (Yoo i sur. 2020).

Uočeno je da se donorska DNA ugradila u ciljana mjesta procesom homologne rekombinacije samo ukoliko je došlo do stvaranja dvolančanih lomova sustavom CRISPR-Cas9. Osim toga, uneseni plazmidi su se nastavili replicirati i zadržali su se u stanicama kroz nekoliko generacija. Pokazano je da je homologna rekombinacija glavni mehanizam kojim je moguće inducirati promjenu u mitohondrijskom genomu kvasca koji, za razliku od sisavaca, biparentalno nasljeđuju mitohondrije (Stein i Sia 2017; Yoo i sur. 2020).

Iako je ovaj pristup važan za nova otkrića i napredak u biotehnologiji i medicini, ne može biti primjenjiv u liječenju ljudskih bolesti povezanih s mutacijama u mtDNA jer kod sisavaca, pa tako i kod čovjeka, nije poznat značaj i mehanizam procesa popravka homolognom rekombinacijom u mitohondrijima, a mtDNA koja sadrži DSB se uglavnom degradira (Yoo i sur. 2020; Fontana i Gahlon 2020; Zinovkina 2018).

2.4 Unos FD-RNA

Unos kvaščevih tRNA u ljudske mitohondrije pokazao se iznimno efikasan i to otkriće koristilo je za konstruiranje molekula FD-RNA. One se sastoje od F ukosnice i/ili D ruke koje potječu iz tRNA^{Lys} kvasca i sekvence komplementarne ciljanj sekvenci (Comte i sur. 2013; Tonin i sur. 2014). Iako je njihov mehanizam unosa u mitohondrije i dalje nepoznat, Loutre i sur. su 2018. godine upotrijebili FD-RNA molekule u sustavu CRISPR-Cas9 primijenjenom na ljudski mitohondrijski genom. U *in vivo* i *in vitro* eksperimentima korištene su dvije molekule FD-RNA, jedna specifična za nekodirajuću regiju mtDNA (NCR, od engl. *noncoding region*), a

druga za dio sekvence gena *CYTB*. NCR sadrži izvorište replikacije teškog lanca i promotorsku regiju za transkripciju s oba lanca. Njezina uloga je nepoznata, ali se pretpostavlja da igra ulogu u topologiji mtDNA i njezinom povezivanju s unutarnjom mitohondrijskom membranom.

Pokazano je da je vezanje kompleksa Cas9:FD-RNA na NCR nužan uvjet za uspješno cijepanje mtDNA unutar gena *CYTB*, budući da tada dolazi do poremećaja u topologiji i/ili replikaciji mtDNA čime se olakšava cijepanje u ostatku mitohondrijskog genoma.



Slika 4. Prikaz F-RNA (A) i D-RNA (B). Narančasto obilježeni linearni dio označava sekvencu komplementarnu ciljanoj sekvenci, narančaste ukosnice označavaju konzervirano mjesto vezanja proteina Cas9, a crveno i plavo označene ukosnice predstavljaju determinante F i D potrebne za unos u mitohondrij. Prilagođeno prema Loutre i sur. 2018.

2.5 Insercije i delecije u mitohondrijskoj DNA

Kao što je već spomenuto, primjenom metode CRISPR-Cas9 na genom jezgre induciraju se dvolančani lomovi koji se onda popravljaju jednim od dva puta popravka – homolognom rekombinacijom ili nehomolognim sparivanjem krajeva. Smatra se da oba puta popravka

postoje i u slučaju mitohondrijskog genoma, međutim njihov mehanizam je još uvijek nepoznat (Fontana i Gahlon 2020).

Konkretna mutageneza inducirana stvaranjem DSB kod mitohondrija nije do kraja istražena i objašnjena. Wang i sur. su 2021. godine pokazali postojanje insercija i delecija, tzv. *indel* mutacija koje nastaju na mjestu dvolančanog loma u mtDNA nakon primjene metode CRISPR-Cas9.

Uočeno je postojanje insercija i delecija veličine 2 do 25 pb u regijama mikrohomologije u ljudskoj mtDNA, a najčešće su se javljale ukoliko je dvolančani lom napravljen između regija s direktnim ponavljanjima (engl. *direct repeats*, DR). Učestalost mutacija *indel* se pojačala ukoliko je dodan inhibitor proteina PARP1 - *iniparib*. Protein PARP1 se u mitohondrijima lokalizira u slučaju oštećenja mtDNA, a sudjeluje u putu popravka MMEJ (engl. *Microhomology-Mediated End Joining*). MMEJ put popravka podrazumijeva postojanje regija mikrohomologije koje se potom sparuju i povezuju uz pojavu insercija i delecija (Sfeir i Symington 2015).

2.6 Utjecaj temperature na učinkovitost sustava CRISPR-Cas9 u mitohondrijima

Pretpostavlja se da je jedan od razloga za nisku učinkovitost metode CRISPR-Cas9 u mitohondrijima njihova značajno viša temperatura u odnosu na ostatak stanice. Vjeruje se da je funkcionalnost kompleksa gRNA:Cas9 uvelike poremećena na temperaturi od 50°C, a tome pridonosi i visok sadržaj AT-parova baza u mtDNA koje imaju nisku temperaturu taljenja ($T_m < 50^\circ\text{C}$) pa je sparivanje s gRNA otežano. Korištenje gRNA koja ima višu temperaturu taljenja ili potencijalan pronalazak temperaturno stabilnije nukleaze od Cas9 može pomoći rješavanju ovog problema (Loutre i sur. 2018).

3. Prednosti i mane primjene sustava CRISPR-Cas9 na mitohondrijski genom

Mutacije u mitohondrijskoj DNA uzrokuju 150 različitih sindroma koji pogađaju i do 4000 djece rođene u SAD-u godišnje (Science News 2020). Bolesti uzrokovane mutacijama u mitohondrijskom genomu danas su uglavnom neizlječive, a tretiraju se terapijama koje umanjuju ili ublažavaju simptome bolesti (Antón i sur. 2020). Autizam se prema Graf i sur. povezuje s mutacijom G8363A u mitohondrijskoj tRNA^{Lys}, a prema Yardeni i sur. s besmislenom (engl. *missense*) mutacijom ND6^{P25L} u genu *ND6* koji kodira podjedinicu NADH-dehidrogenaze, enzima važnog u procesu staničnog disanja. Različite mutacije u genima *ND1* i *ND4* uzrokuju Leighov sindrom, Leberovu hereditarnu optikoneuropatiju, MTLE (engl. *mesial temporal lobe epilepsy*) (Bian i sur 2019).

Budući da ne postoje efikasne terapije i metode liječenja mitohondrijskih bolesti, danas je jedini način sprječavanja prijenosa mutacija u mtDNA na potomstvo tzv. metoda djeteta s tri roditelja (engl. *three-parental baby*). Ova metoda podrazumijeva unos jezgre majčine jajne stanice u donorsku stanicu koja sadrži zdrave mitohondrije te oplodnju *in vitro* pri čemu dijete dobiva genetski materijal jezgre od oca i majke te mitohondrijski genetski materijal od donora (Science News 2020). Oko spomenute metode vodile su se brojne polemike i iznijeta su mnoga etička pitanja zbog postojanja „trećeg“ roditelja. Budući da metoda CRISPR-Cas9 ne podrazumijeva korištenje donorske jajne stanice njome se zaobilaze kontroverze metode djeteta s tri roditelja. Osim toga, CRISPR-Cas9 se uglavnom primjenjuje na mtDNA prije implantacije u fazi blastociste kada je djelovanje na mali broj nediferenciranih stanica značajno učinkovitije u smanjenju mutacija u mtDNA u odnosu na rođeno dijete ili odraslu osobu. S druge strane primjena CRISPR-Cas9 na odrasle osobe je puno manje kontroverzna jer osoba može dati pristanak na takav pothvat, a često se osobe s iščekivanjem uključuju u takva istraživanja u nedostatku boljih metoda liječenja. Budući da genom mitohondrija čini manji dio ljudskog genetskog materijala u odnosu na genom jezgre, promjene u mtDNA ne bi imale toliki utjecaj na zametnu liniju u usporedbi s modifikacijama na DNA jezgre (Fogleman i sur. 2016).

Najveći problem metode CRISPR-Cas9 je nepreciznost u cijepanju koja može dovesti do promjene gena koji nisu primarni cilj. Osim toga, važno je etičko pitanje i promjena zametne linije te utjecaj takve promjene na buduće generacije. Jedan od načina sprečavanja prijenosa modificirane mtDNA na potomstvo može biti i modifikacija samo muških embrija, međutim time se zanemaruje primarna svrha ovog postupka tj. potencijalno liječenje koje bi ovime postalo ograničeno samo na jedan spol (Fogleman i sur. 2016).

Iako tehnologija CRISPR-Cas9 ima velik potencijal u liječenju mitohondrijskih bolesti, unatoč nekim tvrdnjama da su mitohondriji potpuno nedostupni *CRISPRizaciji*, daljnja istraživanja i unaprjeđenja su potrebna prije praktične primjene u klinici. Važno je unaprijediti znanje o sustavima unosa sgRNA:Cas9 u mitohondrije, razumjeti i spriječiti mehanizam nespecifičnog cijepanja, utjecaj imunskog sustava itd.

Zaključak

Primjena metode CRISPR-Cas9 na mitohondrijski genom danas je još uvijek u povojima, a velika prepreka je prijenos sgRNA kroz dvostruku mitohondrijsku membranu. Jedan od pristupa rješavanju tog problema je fuzioniranje sgRNA s molekulama RNA za koje se zna da uspješno prolaze kroz mitohondrijske membrane, kao što su ukosnica jezgrine RNaze P i D ruka odnosno F ukosnica kvaščeve tRNA^{Lys}. Dodatno, mehanizmi popravka dvolančanih lomova u mtDNA sisavaca još su uvijek neistraženi, ali se smatra da se DSB popravljaju homolognom rekombinacijom i nehomolognim sparivanjem krajeva kao u genomu jezgre.

Budući da mutacije mtDNA kod ljudi uzorkuju mnoge bolesti, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se ovi problemi riješili i kako bi se omogućilo pouzdano korištenje sustava CRISPR-Cas9 u terapijskim protokolima.

Literatura

- Antón, Z., Mullally, G., Ford, H.C., van der Kamp, M.W., Szczelkun, M.D. i Lane, J.D. (2020): Mitochondrial import, health i mtDNA copy number variability seen when using type II and type V CRISPR effectors. *Journal of Cell Science* 133(18).
- Bian, W.-P., Chen, Y.-L., Luo, J.-J., Wang, C., Xie, S.-L. i Pei, D.-S. (2019): Knock-In Strategy for Editing Human and Zebrafish Mitochondrial DNA Using Mito-CRISPR/Cas9 System. *ACS synthetic biology* 8(4): 621–632.
- Chen X., Gonçalves M. A. F. V. (2018): DNA, RNA, and Protein Tools for Editing the Genetic Information in Human Cells. *iScience* 6: 247-263.
- Comte, C., Tonin, Y., Heckel-Mager, A.-M., Boucheham, A., Smirnov, A., Auré, K., Lombès, A., Martin, R.P., Entelis, N. i Tarassov, I. (2013): Mitochondrial targeting of recombinant RNAs modulates the level of a heteroplasmic mutation in human mitochondrial DNA associated with Kearns Sayre Syndrome. *Nucleic Acids Research* 41(1): 418–433.
- Cummins, J. (2002): The role of maternal mitochondria during oogenesis, fertilization and embryogenesis. *Reproductive BioMedicine Online* 4(2): 176–182.
- Fogleman, S., Santana, C., Bishop, C., Miller, A. i Capco, D.G. (2016): CRISPR/Cas9 and mitochondrial gene replacement therapy: promising techniques and ethical considerations. *American journal of stem cells* 5(2): 39–52.
- Fontana, G.A. i Gahlon, H.L. (2020): Mechanisms of replication and repair in mitochondrial DNA deletion formation. *Nucleic Acids Research*.
- Fu, Y., Sander, J. D., Reyon, D., Cascio, V. M., i Joung, J. K. (2014): Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nature Biotechnology* 32(3): 279–284.
- Gammage, P.A., Moraes, C.T. i Minczuk, M. (2018): Mitochondrial Genome Engineering: The Revolution May Not Be CRISPR-ized. *Trends in Genetics* 34(2): 101–110.
- Graf, W., Marín-García, J., Gao, H.G., Pizzo, S., Naviaux, R., Markusic, D., Barshop, B., Courchesne, E. i Haas, R. (2000): Autism Associated With the Mitochondrial DNA G8363A Transfer RNALys Mutation. *Journal of Child Neurology* 15: 357 - 361.

Hille, F., Richter, H., Wong, S.P., Bratovič, M., Ressel, S. i Charpentier, E. (2018): The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward. *Cell* 172(6): 1239–1259.

Hopp, T., Prickett, K., Price, V., Libby R. T., March C. J., Cerretti D. P., Urdal D. L. i Conlon P. J. (1988): A Short Polypeptide Marker Sequence Useful for Recombinant Protein Identification and Purification. *Nat Biotechnol* 6: 1204–1210.

<https://www.sciencenews.org/article/mitochondria-gene-editing-bacterial-toxin-crispr>

(Pristupljeno 28.5.2021.)

Hussain, S.-R.A., Yalvac, M.E., Khoo, B., Eckardt, S. i McLaughlin, K.J. (2020): Adapting CRISPR/Cas9 System for Targeting Mitochondrial Genome.

Jo, A., Ham, S., Lee, G.H., Lee, Y.-I., Kim, S., Lee, Y.-S., Shin, J.-H. i Lee, Y. (2015): Efficient Mitochondrial Genome Editing by CRISPR/Cas9. *BioMed Research International*

Komor, A.C., Badran, A.H. i Liu, D.R. (2017): CRISPR-Based Technologies for the Manipulation of Eukaryotic Genomes. *Cell* 168(1-2): 20–36.

Lino, C.A., Harper, J.C., Carney, J.P. i Timlin, J.A. (2018): Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. *Drug Delivery* 25(1): 1234–1257.

Loutre, R., Heckel, A.-M., Smirnova, A., Entelis, N. i Tarassov, I. (2018): Can Mitochondrial DNA be CRISPRized: Pro and Contra. *IUBMB Life* 70(12): 1233–1239.

Manghwar, H., Lindsey, K., Zhang, X. i Jin, S. (2019): CRISPR/Cas System: Recent Advances and Future Prospects for Genome Editing. *Trends in Plant Science* 24(12): 1102-1125.

Musunuru, K. (2017): The Hope and Hype of CRISPR-Cas9 Genome Editing. *JAMA Cardiology* 2(8): 914-919.

Rodríguez-Rodríguez, D., Ramírez-Solís, R., Garza-Elizondo, M., Garza-Rodríguez, M. and Barrera-Saldaña, H. (2019): Genome editing: A perspective on the application of CRISPR/Cas9 to study human diseases (Review). *International Journal of Molecular Medicine* 43 (4): 1559-1574.

Saber, A., Liu, B., Ebrahimi, P. i Haisma, H.J. (2019): CRISPR/Cas9 for overcoming drug resistance in solid tumors. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*.

Sfeir, A. i Symington, L.S. (2015): Microhomology-Mediated End Joining: A Back-up Survival Mechanism or Dedicated Pathway? *Trends in Biochemical Sciences* 40(11): 701–714.

Stein, A. i Sia, E. A. (2017): Mitochondrial DNA repair and damage tolerance. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)* 22: 920–943.

Thurtle-Schmidt, D.M. i Lo, T. - W. (2018): Molecular biology at the cutting edge: A review on CRISPR/CAS9 gene editing for undergraduates. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 46(2): 195–205.

Tonin, Y., Heckel, A.-M., Vysokikh, M., Dovydenko, I., Meschaninova, M., Rötig, A., Munnich, A., Venyaminova, A., Tarassov, I. i Entelis, N. (2014): Modeling of antigenomic therapy of mitochondrial diseases by mitochondrially addressed RNA targeting a pathogenic point mutation in mitochondrial DNA. *The Journal of Biological Chemistry* 289(19): 13323–13334.

Wang, B., Lv, X., Wang, Y., Wang, Z., Liu, Q., Lu, B., Liu, Y. i Gu, F. (2021): CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis at microhomologous regions of human mitochondrial genome. *Science China Life Sciences*.

Yardeni, T., Cristancho, A. G., McCoy, A. J., Schaefer, P. M., McManus, M. J., Marsh, E. D. i Wallace, D. C. (2021): An mtDNA mutant mouse demonstrates that mitochondrial deficiency can result in autism endophenotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 118(6).

Yoo, B.-C., Yadav, N.S., Orozco, E.M. i Sakai, H. (2020): Cas9/gRNA-mediated genome editing of yeast mitochondria and *Chlamydomonas* chloroplasts. *PeerJ*.

Zinovkina LA. Mechanisms of Mitochondrial DNA Repair in Mammals. (2018): *Biochemistry (Mosc)*. 83(3): 233-249.

Sažetak

Metoda CRISPR-Cas9 značajno je unaprijedila pristup uređivanju genoma. Iako je njezina primjena na genom jezgre danas iscrpno istražena, primjena na mitohondrijski genom i dalje predstavlja izazov. Glavni problem je unos strane, sgRNA molekule u matriks mitohondrija kroz dvije mitohondrijske membrane. Iako su mehanizmi prijenosa sgRNA i dalje nepoznati, u ovom radu predstavljeni su pristupi koji su rezultirali relativno uspješnim uređivanjem genoma mitohondrija. Daljnje unaprjeđenje i usavršavanje metoda za uređivanje mtDNA može pridonijeti potencijalnom liječenju mitohondrijskih bolesti te sprečavanju njihova prijenosa na potomstvo.

Ključne riječi: mitohondriji, CRISPR-Cas9, uređivanje genoma

Summary

CRISPR-Cas9 method brought a significant progress to the genome editing. Although its application to the nuclear genome has been extensively studied, its application to the mitochondrial genome remains a challenge. The main problem is the entry of foreign, sgRNA molecules into the mitochondrial matrix across two mitochondrial membranes. Although the mechanisms of sgRNA transfer are still unknown, this manuscript presents approaches that have resulted in relatively successful mitochondrial genome editing. Further improvement of the application of CRISPR-Cas9 on mtDNA can greatly contribute to the treatment of mitochondrial diseases and prevent their transmission to offspring .

Key words: mitochondria, CRISPR-Cas9, genome editing