

Karakteristike i primjene različitih tipova alata CRISPR-Cas

Verbanac, Iva

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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:217:350291>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-04**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Iva Verbanac

**Karakteristike i primjene različitih tipova
alata CRISPR-Cas**

Završni rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Iva Verbanac

**Characteristics and applications of different
types of CRISPR-Cas tools**

Bachelor thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj završni rad je izrađen u sklopu studijskog programa molekularne biologije na Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ivane Ivančić Baće.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Završni rad

Karakteristike i primjene različitih tipova alata

CRISPR-Cas

Iva Verbanac

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Adaptivna imunost kod bakterija i arheja ili pod akronimom poznat sustav CRISPR-Cas (engl. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR associated proteins*) prenamijenjen je u trenutno najkorišteniji genetički alat. Njegova je posebnost u tome što specifično prepoznaje sekvence RNA ili DNA prema sekvenci molekule RNA koja ga vodi pa omogućava precizno djelovanje alata. U ovom su radu predstavljeni alati dizajnirani na temelju sustava CRISPR-Cas iz klase 2. Klasa 2 pogodna je za manipulaciju kod dizajna alata zbog toga što posjeduje jedan efektorski protein. Efektorski proteini unutar klase 2 su Cas9 i Cas12 koji prepoznaju dvolančanu DNA i Cas13 koji prepoznaje jednolančanu RNA. Svaki od efektorskih proteina posjeduje specifičan mehanizam djelovanja zbog kojeg je pogodniji za određen tip alata. Naravno, dizajn svakog genetičkog alata sa sobom nosi pregršt problema poput unosa u stanice i nespecifično djelovanje (*off-target*) koji su diskutirani u ovom radu.

Ključne riječi: genetičko inženjerstvo, endonukleaza, efektorski proteini, CRISPR-Cas
(24 stranica, 9 slika, 0 tablica, 47 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: izv. prof. dr. sc. Ivana Ivančić Baće

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Bachelor thesis

Characteristics and applications of different types of CRISPR-Cas tools

Iva Verbanac

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Bacterial and archaeal adaptive immunity or system more known as CRISPR-Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR associated proteins) was repurposed in currently the most used genetic tool. The system can specifically target an RNA or DNA sequence because it is guided by an RNA molecule which enables tool precision. This paper represents different tools based on class 2 CRISPR-Cas system. The class 2 is better suited as a tool because it has a single effector protein. Class 2 effector proteins are Cas9 and Cas12 which bind dsDNA and Cas13 which binds ssRNA. Each of these effector proteins has its unique mechanism of action which makes it more convenient for a specific type of a genetic tool. Moreover, designing a genetic tool brings a handful of problems such as delivery into cells and off-target activity both discussed in this paper.

Keywords: gene engineering, endonuclease, effector protein, CRISPR-Cas
(24 pages, 9 figures, 0 tables, 47 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

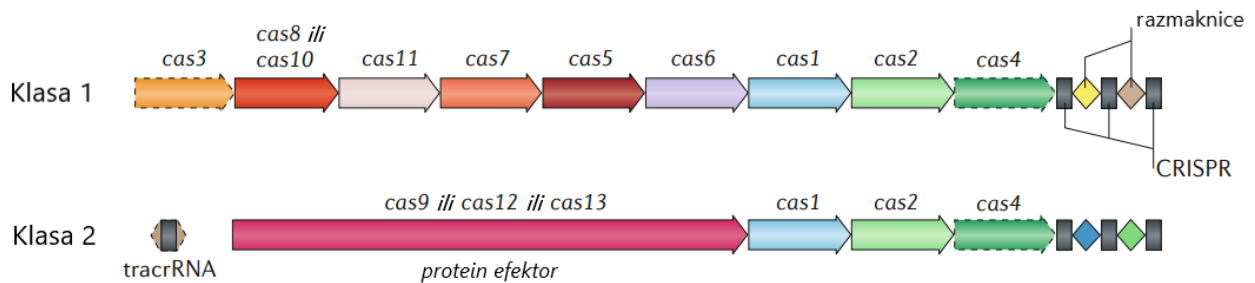
Mentor: associate prof. Ivana Ivančić Baće

SADRŽAJ

| | |
|---|-----------|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. DNA-VEZUJUĆI EFEKTORSKI PROTEINI | 3 |
| 2.1. CRISPR-Cas9 tehnologija | 3 |
| 2.2. CRISPR-Cas12 tehnologija | 10 |
| 3. RNA-VEZUJUĆI EFEKTORSKI PROTEINI | 12 |
| 3.1. CRISPR-Cas13 tehnologija | 12 |
| 4. IZAZOVI I MOGUĆNOSTI U RAZVOJU ALATA CRISPR-CAS | 15 |
| 5. ZAKLJUČAK | 17 |
| 6. LITERATURA | 18 |
| 7. ŽIVOTOPIS | 24 |

1. UVOD

CRISPR-Cas (engl. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR associated proteins*) naziv je za adaptivni imunološki sustav kod bakterija i arheja koji koristi kratke molekule RNA za specifično prepoznavanje sekvence virusa ili plazmida (Jinek i sur., 2012; Sorek i sur., 2013). Lokus CRISPR sastoji se od serije kratkih ponavljajućih sekvenci, razdvojenih razmaknicama koje su porijeklom iz specifične virusne ili plazmidne sekvence. Uz lokus CRISPR nalaze se geni *cas* (engl. *CRISPR-associated*) koji su uključeni u mehanizam obrane od strane DNA (Sorek i sur. 2013). Do danas su otkrivene dvije klase, šest tipova i 33 podtipa sustava CRISPR-Cas (Makarova i sur., 2019). Za obje je klase zajednički princip djelovanja u tri koraka. Prva je faza adaptacije u kojoj određeni proteini Cas vežu stranu DNA, često prepoznajući motiv PAM (engl. *protospacer-adjescent motif*), koju cijepaju na kratke fragmente (Makarova i sur., 2019). Potom ju umeću u lokus CRISPR gdje ona postaje nova razmaknica. Druga faza je ekspresijska u kojoj se lokus CRISPR prepisuje u pre-CRISPR RNA (pre-crRNA), a potom procesira u zrelu kratku crRNA. Naposljetku dolazi do faze interferencije u kojoj crRNA vodi CRISPR efektorske proteine da cijepaju virusnu ili plazmidnu DNA na točno određenom mjestu komplementarnom crRNA (Hu i Li, 2022). Dvije su se klase podijelile prema arhitekturi njihovih efektorskih proteina. Klasa 1 ima kompleks proteina Cas koji tvori crRNA-vezujući kompleks Cascade i kao takav procesira pre-crRNA i provodi interferenciju uz pomoć posebne endonukleaze. Klasa 2 ima multifunkcionalan crRNA-vezujući protein koji ima sve aktivnosti potrebne za interferenciju i pre-crRNA procesiranje (Makarova i sur., 2019) (Slika 1).



Slika 1. Shematski prikaz dvije klase sustava CRISPR-Cas. Kod klase 1 efektorski protein čini više različitih proteina Cas, dok je kod klase 2 efektorski protein jedan multifunkcionalni protein.

(prilagođeno prema Makarova i sur., 2019)

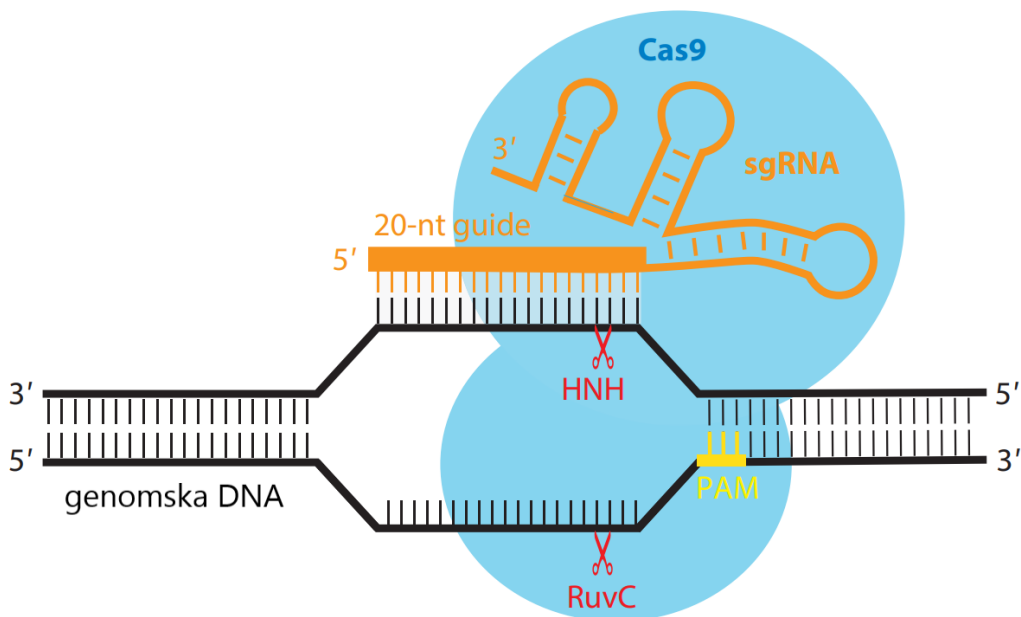
Znanstvenici su već na početku istraživanja sustava CRISPR-Cas vidjeli potencijal za prenamjenu u genetički alat. Marraffini i Sontheimer su već 2008. godine uvidjeli mogućnost modificiranja sustava CRISPR-Cas tako da cijepa željenu DNA izvan nativnog organizma što je opisano kasnije u ovom radu (strana 10). Sustav CRISPR-Cas se u prošlom desetljeću razvio u mnoge alate za uređivanje genoma. Zbog kompleksnosti sustava CRISPR-Cas klase 1 razvijeno je manje alata iz njenih tipova, dok se klasa 2 razvila u mnoge alate zbog jednostavnije arhitekture samog sustava. Klasa 2 obuhvaća tri tipa: tip II, tip V i tip VI, a odgovarajući proteini efektori su Cas9, Cas12 i Cas13 (Hu i Li, 2022). Unutar klase 2 proteini Cas9 i Cas12 ciljaju molekulu DNA, a Cas13 RNA (Hu i Li, 2022). Alati temeljeni na sustavu CRISPR-Cas omogućavaju manipulaciju DNA i RNA sekvenci u živim stanicama različitih vrsta. Primjerice, nakon lomova u DNA uzrokovanih sustavom CRISPR-Cas aktiviraju se nehomologni popravak (NHEJ od engl. *non-homologous end joining*) i/ili homologijom usmjeren popravak (HDR od engl. *homology-directed repair*) (Pickar-Oliver i Gersbach, 2019). Ovi mehanizmi popravka omogućuju knock-out (deleciju), knock-in (inserciju) ili zamjenu gena (Hu i Li, 2022). Osim toga, sustav CRISPR-Cas može se koristiti u svrhu detekcije molekula DNA ili RNA te kao alat za regulaciju ekspresije gena (Hu i Li, 2022; Wu i sur., 2021).

2. DNA-CILJAJUĆI EFEKTORSKI PROTEINI

Proteini Cas9 i Cas12 su DNA-ciljajuće nukleaze koje molekula gRNA (engl. *guide RNA*) usmjerava prema sekvenci komplementarnoj gRNA (Hu i Li, 2022).

2.1. Tehnologija CRISPR-Cas9

Endonukleaza Cas9 spada u tip II unutar klase 2 te uvodi mjesno-specifični dvolančani lom unutar ciljane DNA (Jiang i Doudna, 2017; Makarova i sur., 2020). Prepoznavanje mjesta cijepanja strogo iziskuje sekvencu PAM neposredno uz ciljno mjesto. Slijedi sparivanje crRNA i ciljane DNA posredovano proteinom Cas9 što potiče stvaranje R-omče i razdvajanje lanaca DNA (Jiang i Doudna, 2017). Osim molekule crRNA za uvođenje dvolančanog loma je potrebna i tracrRNA (engl. *trans-activating CRISPR RNA*) koja se sparuje s crRNA te kao takva usmjerava Cas9 (Jinek i sur., 2012). Važno je napomenuti da sustavi tipa II procesiraju pre-crRNA tako što tracrRNA, komplementarna ponavljajućim sekvencama u pre-crRNA, aktivira procesiranje RNazom III u prisustvu Cas9 (Jinek i sur., 2012). Korištenje sustava CRISPR-Cas9 kao alata olakšano je stvaranjem sintetske sgRNA (engl. *single-guide RNA*) koja oponaša prirodnu tracrRNA (Jiang i Doudna, 2017). Nukleazna aktivnost proteina Cas9 iz bakterije *S. pyogenes* krije se u dvije nukleazne domene. RuvC nukleazna domena koristi katalitički mehanizam s dva metalna iona te cijepa odmaknuti nekomplementarni lanac DNA. Druga je nukleazna domena HNH koja ima strukturu $\beta\beta\alpha$ -metalni ion te cijepa komplementarnu DNA (Jiang i Doudna, 2017) (Slika 2). Nakon dvolančanog loma modifikacije u genomu ostvaruju se uvođenjem malih insercija ili delecija preko popravka sklonog pogreškama NHEJ ili preko točnijeg popravka HDR (Zhang i sur., 2021).



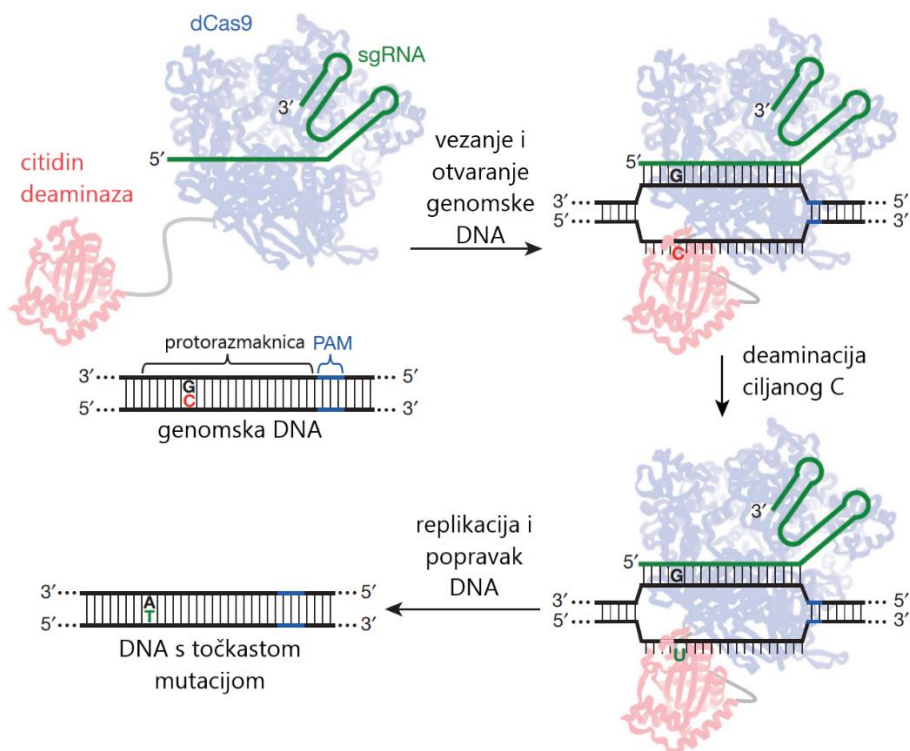
Slika 2. Protein Cas9 sa sgRNA komplementarno vezanom na ciljnu DNA sekvencu. Prikazana je i PAM sekvenca ključna za prepoznavanje mjesta cijepanja te dva nukleazna centra: HNH i RuvC.

(prilagođeno prema Jiang i Doudna, 2017)

Ideja o primjeni sustava CRISPR-Cas9 kao alata za uređivanje genoma u živim razvila se u znanstvenim krugovima u nekoliko laboratorija. Međutim, za razliku od prokariota, eukariotske stanice imaju drugačije unutarstanične uvijete i mnogo veće genome koji su uklopljeni u složenu strukturu kromatina (Lander, 2016). Značajan uspjeh u tom području napravili su Cong i sur. sada već davne 2013. godine kada su uspješno inducirali precizne dvolančane lomove u genomu ljudskih i mišjih stanica. Heterolognom su ekspresijom unijeli komponente sustava CRISPR-Cas9 u ljudske i mišje stanice. Na protein Cas9 i RNazu III dodali su NLS (engl. *nuclear localization signal*), a sgRNA eksprimirali su pod promotorom RNA polimeraze III. Nakon gotovo deset godina razvoja, uređivanje genoma uz pomoć alata temeljenih na sustavu CRISPR-Cas9 sada ima veoma široku primjenu. Zbog svoje efikasnosti alat Cas9 omogućava identifikaciju važnih gena putem genomskih pretraživanja (Hu i Li, 2022). Moguće je efikasno uvođenje ciljanih *loss-of-function* mutacija (inaktiviranje gena) korištenjem lentiviralnih vektora za istovremeni prijenos Cas9 i sgRNA u stanice željenog tipa (Shalem i sur., 2014). Mogu se dizajnirati knjižnice sgRNA koje ciljaju tisuće željenih gena, a potom se provode negativne i pozitivne selekcije ne bi li se pronašli geni čija je *loss-of-function* mutacija uključena u određene procese (Shalem i sur., 2014). Metodom

in vivo genetičkog pretraživanja pomoću sustava CRISPR-Cas9 otkriveni su važni geni za ciljanu imunoterapiju raka. Primjerice, otkriveno je da delecija tirozin fosfataze PTPN2 u tumorskim stanicama pospješuje djelovanje imunoterapije (Manguso i sur., 2017). Također, otkriveni su geni ljudskih stanica ključni za trovanje antraksom i difterijom (Zhou i sur., 2014). Ova je metoda zasjenila nekadašnju, interferirajuću RNA (RNAi) (Shalem i sur., 2014).

Protein Cas9 posjeduje nukleaznu aktivnost jer uvodi dvolančane lomove u DNA te DNA-ciljajuću aktivnost jer se zbog crRNA i tracrRNA veže na specifično mjesto u DNA. Ove dvije funkcije djeluju odvojeno i mogu se mutirati. Stoga se inaktivacijom jedne od dvije nukleazne domene (RuvC ili HNH) Cas9 pretvara u nikazu (nCas9) i radi jednolančani lom, a inaktivacijom obaju nukleaznih domena nastaje deaktivirani Cas9 (dCas9) bez sposobnosti cijepanja DNA (Jinek i sur., 2012). Ovakvi se proteini Cas9 mogu fuzionirati sa različitim funkcionalnim molekulama poput deaminaza, reverznih transkriptaza i regulatora transkripcije te kao takvi poslužiti kao precizan genetički alat (Hu i Li, 2022). Dobar je primjer razvoj „uređivača baza“ (BE od engl. *base editor*) koji omogućava direktnu i ireverzibilnu konverziju samo jedne baze u DNA bez dvolančanog loma i kalupa. Konkretno, fuzioniran je dCas9 sa citidin deaminazom koji provodi C→T (što je na komplementarnom lancu G→A) supstitucije, točnije deaminira citozin u uracil koji se sparuje poput timina (Komor i sur., 2016) (Slika 3). Međutim, bila je potrebna dorada zbog djelovanja uracil DNA-glikozilaze (UDG) koja katalizira uklanjanje uracila iz molekule DNA i pokreće popravak BER (od engl. *base-excision repair*). Problem je riješen na način da je na C terminus postojećeg BE sustava fuzioniran inhibitor UDG, UGI (engl. *uracil DNA glycosylase inhibitor*) (Komor i sur., 2016).



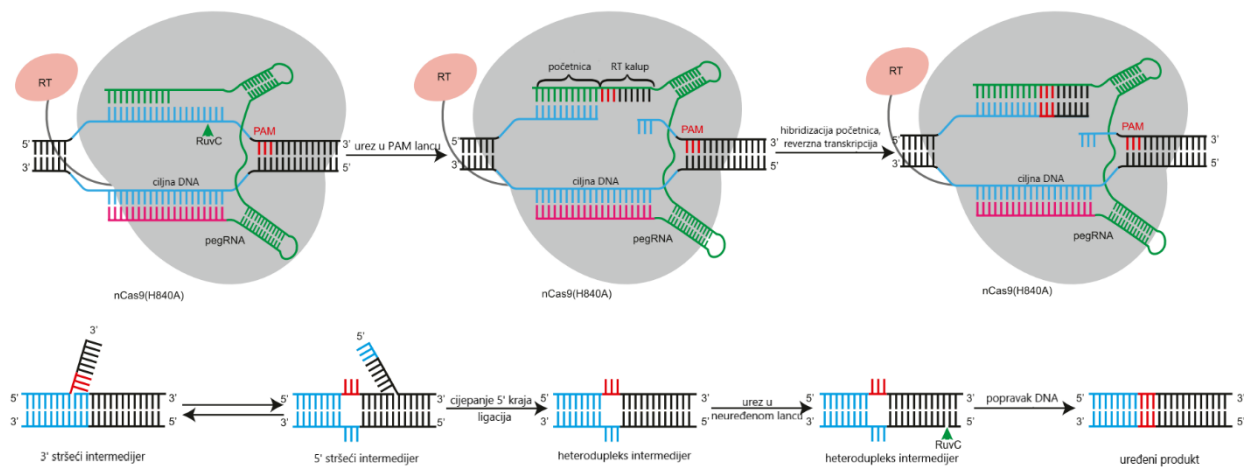
Slika 3. Mehanizam djelovanja sustava BE koji mijenja C-G par u T-A tako što citidin deaminaza deaminira citozin u uracil koji kroz replikaciju i popravak DNA prelazi u timin. Prikazano je kako je citidin deaminaza (crveno) fuzionirana na dCas9 (plavo).

(prilagođeno prema Komor i sur., 2016)

Na veoma je sličan način konstruiran alat ABE (od engl. *adenine base editor*) koji provodi deaminaciju adenina u inozin koji stvara vodikove veze poput citozina (Yasui i sur., 2008). No, konstrukcija je bila nešto kompleksnija budući da nije postojao prirodan enzim koji na DNA može deaminirati adenin. Znanstvenici su uspjeli enzim Tada iz bakterije *Escherichia coli* koji je prirodna tRNA adenin deaminaza modificirati da prepoznaje DNA. Prvo je učinjena knjižnica fuzijskog proteina Tada-Cas9 sa mutacijama u dijelu za deaminaciju adenina. Selekcijom je odabran protein sa mutacijom D108N koja omogućava proteinu Tada da deaminira adenin na DNA (Gaudelli et al., 2017). Mutacije uzrokovane BE pokazale su se kao mnogo sigurnija opcija od uobičajenog sustava Cas9 (Song i sur., 2020). Budući da su mnoge genetske bolesti uzrokovane mutacijama u jednom nukleotidu, sustavi BE obećavaju kliničku uporabu (Hu i Li, 2022). Veoma je značajan uspjeh bilo konvertiranje dominantne negativne mutacije kod Hutchinson-Gilford progerije u transgenim miševima i fibroblastima djece oboljele od progerije. Konverzija A-T para

u G-C učinjena je pomoću ranije opisanog sustava ABE. Lentiviralno se sustav unio u fibroblaste čiji su aleli ispravljani sa 87-91%-tnom uspješnošću. Također, kod *in vivo* eksperimenta sa transgenim miševima uspješno je produžen život jedinki sa 215 na 510 dana (Koblan i sur., 2021).

Osim BE znanstvenici su razvili alat temeljen na sustavu CRISPR-Cas koji može s jednolančanim urezom urediti genom bez korištenja kalupa. Alat je nazvan PE (engl. *prime editors*) i sastoji se od nCas9, fuzionirane reverzne transkriptaze, pegRNA (engl. *prime-editing guide RNA*) koja navodi sustav do željenog mjesta i kodira novu sekvencu unutar pegRNA (Anzalone i sur., 2019). Sustav prenosi promijenjenu sekvencu sa pegRNA u genomsku DNA tako što urezuje DNA. Ostaje 3' stršeći kraj kojeg koristi reverzna transkriptaza te nadopunjava dio sekvence DNA prema kalupu pegRNA. Tada razgranati intermedijer kod kojeg se 3' i 5' stršeći kraj natječe za hibridizaciju sa drugim lancem DNA, nakon koje slijedi ligacija (Anzalone i sur., 2019). Iako je 5' kraj neuređen i termodinamički je vjerojatnije da se spari za drugim lancem DNA njega će zapravo porezati endonukleaza FEN1 (engl. *flap endonuclease 1*) koja preferira 5' stršeće krajeve (Liu i sur., 2004). Slijedeći je korak dizajniran na način da se pocijepa neuređeni lanac u heterodupleksu kako bi nakon popravka DNA ostala sačuvana uređena sekvenca (Anzalone i sur., 2019) (Slika 4).

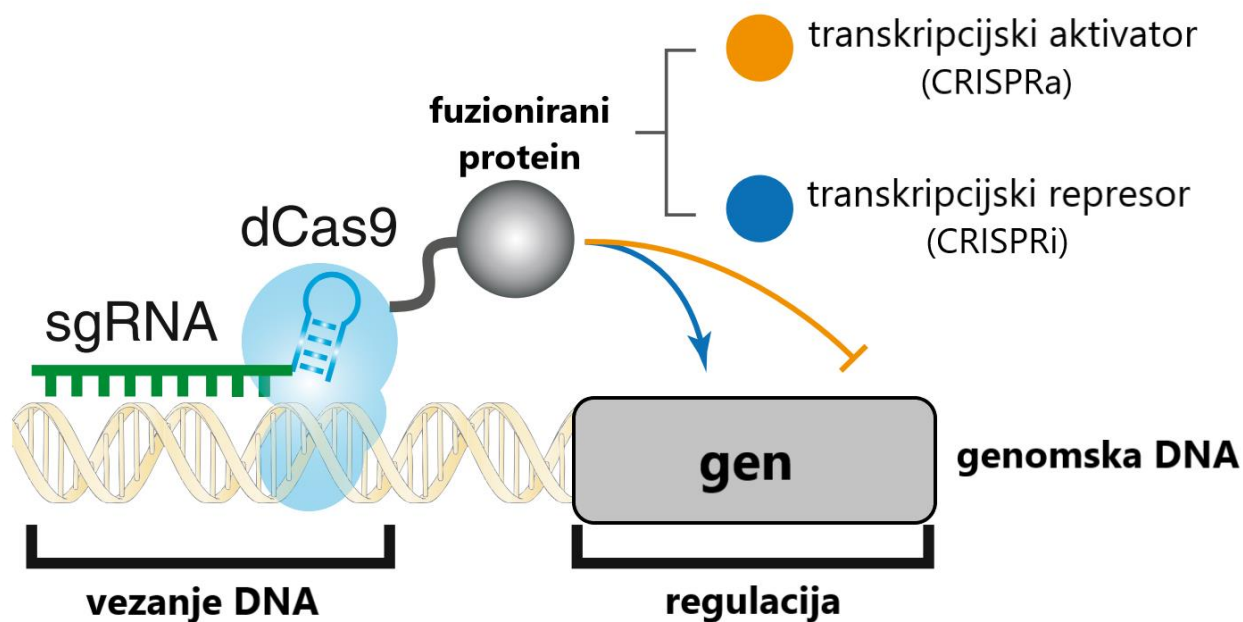


Slika 4. Mehanizam djelovanja sustava PE. Prikazano je prepoznavanje ciljne sekvence pomoću početnice pegRNA i reverzna transkripcija nakon koje slijedi natjecanje 3' i 5' stršećih krajeva za hibridizaciju te popravak DNA. Na kraju se vidi promijenjena sekvenca.

(prilagođeno prema Hu i Li, 2022)

Metoda PE pokazala se boljom u odnosu na BE kada u sekvencama koje se uređuju ima puno citozina ili adenina pa se greškom krivi C može deaminirati ili kada u blizini željene sekvence ne postoji sekvenca PAM (Anzalone i sur., 2019). Zanimljivo je kako su PE i BE korištene u ispravljanju mutacije koja uzrokuje nasljednu tirozinemiju u hepatocita. Eksperiment je izveden *ex vivo* tako što su se hepatocite koje nose mutaciju tretirale alatom ABE ili PE nakon čega se uspješno ispravio mutirani gen. Nakon toga su stanice transplatirane u miša te su zamijenile stare stanice jetre (Kim i sur., 2021).

Svaki od ovih alata može raditi grešku ili tzv. *off-target* pa se zbog toga krenulo sa razvijanjem alata koji će samo privremeno mijenjati ekspresiju određenog gena tako što se na dCas9 fuzionira transkripcijski regulator (Hu i Li, 2022). Sustav CRISPR interferencije (CRISPRi) uspješno je primijenjen na smanjenju ekspresije gena GFP (engl. *green fluorescent protein*) u stanicama HEK293 (engl. *human embryonic kidney*) tako što je na dCas9 fuzionirana kromatin modelirajuća domena KRAB (engl. *Krüppel-associated box*) (Gilbert i sur., 2013). Suprotno djelovanje od CRISPRi ima sustav CRISPR aktivacije (CRISPRa) koji cilja promotore i pojačivače kako bi se povećala ekspresija željenog gena (Gilbert i sur., 2013) (Slika 5).



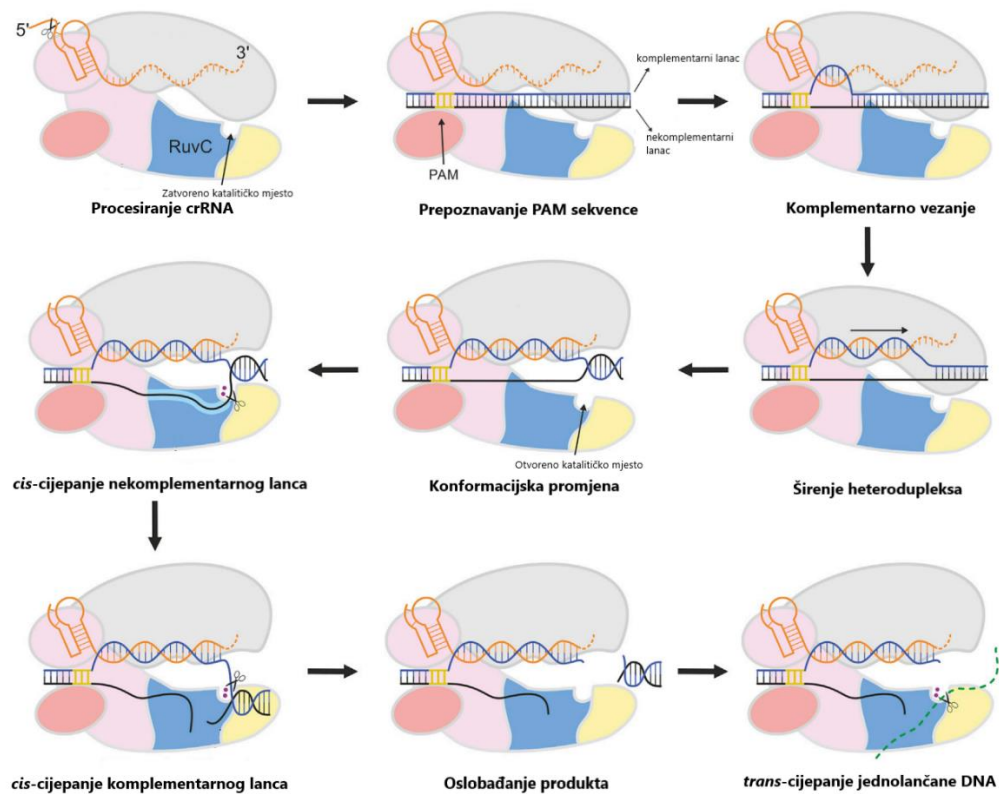
Slika 5. Shematski prikaz dizajna i djelovanja sustava CRISPRi i CRISPRa.

(prilagođeno prema Gilbert i sur., 2013)

Naposljetku, izniman je značaj dizajn alata CRISPRoff koji može trajno i nasljedno utišati gene. Alat je dizajniran tako što su se domena KRAB i dvije domene DNA metiltransferaze (DNMT) fuzionirale na dCas9. Učinkovitost alata promatrana je u stanicama HEK293 kroz jačinu ekspresije proteina GFP. Model je naknadno doraden tako što se dvije domene DNMT pozicioniralo na N terminus dCas9 kako bi domene DNMT imale bolje pristup lancu DNA. Kako bi testirali reverzibilnost alata CRISPRoff znanstvenici su uveli knock-out mutaciju ključnog enzima u održavanju DNA metilacije (DNMT1) u stanicama sisavaca. Pokazalo se da se 9 dana nakon uvođenja mutacije u DNMT1 ekspresija gena reaktivirala (Nuñez i sur., 2021).

2.2. Tehnologija CRISPR-Cas12

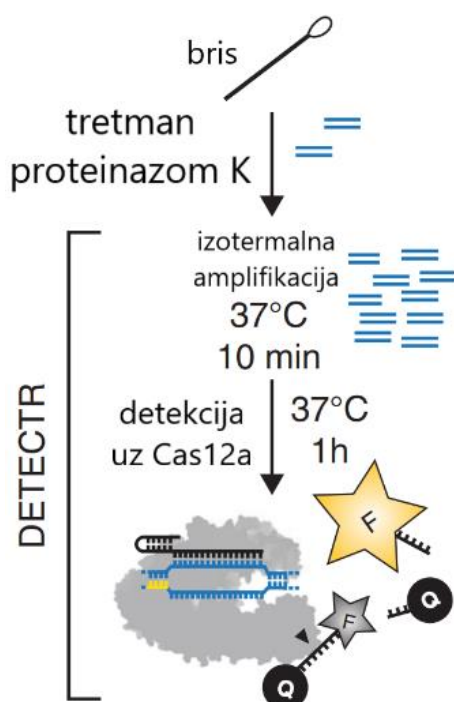
Endonukleaza Cas12 pripada klasi 2 i tipu V sustava CRISPR-Cas (Makarova i sur., 2019). Za razliku od Cas9, endonukleazu Cas12 vodi jedna molekula crRNA i veže sekvencu PAM bogatu timinom. Osim toga, protein Cas12 ostavlja stršće krajeve nakon dvolančanog loma kojeg radi s jednom nukleaznom domenom RuvC (Zetsche i sur., 2015). U istraživanjima se koristi protein Cas12 iz bakterije *Francisella novicida* koji pripada podtipu A (Cas12a) (Makarova i sur., 2019; Swarts i sur., 2019). Uz *cis* cijepanje DNA koje ovisi o komplementarnosti sa crRNA, Cas12a posjeduje dodatan način cijepanja *in trans* koji je neovisan o komplementarnoj sekvenci crRNA. Naime, Cas12a može potpuno pocijepati bilo koju jednolančanu DNA nakon što crRNA hibridizira sa ciljnom DNA (Swarts i sur., 2019) (Slika 6).



Slika 6. Mehanizam djelovanja endonukleaze Cas12a. Najprije se pomoću sekvence PAM prepoznaje ciljna dvolančana DNA koja se cijepa u domeni RuvC. Uslijed širenja heterodupleksa dolazi do konformacijske promjene koja omogućuje otvaranje katalitičkog mjesta za nespecifično *trans*-cijepanje jednolančane DNA.

(prilagođeno prema Swarts i sur., 2019)

Cas12a primjenu je stekao u dizajnu metode DETECTR (od engl. *DNA endonuclease-targeted CRISPR trans reporter*). Metoda DETECTR koristi sposobnost proteina Cas12a da cijepa jednolančanu DNA u kombinaciji s izotermalnom amplifikacijom (Chen i sur., 2018). Metodom DETECTR može se specifično detektirati dvolančana DNA nekog virusa, primjerice humanog papiloma virusa (HPV). Pomoću crRNA prvo se prepoznaje virusna dvolančana DNA i cijepa. Nakon specifičnog cijepanja, aktivira se sposobnost nespecifičnog cijepanja jednolančane DNA. U dizajnu metode DETECTR to je svojstvo iskorišteno na način da aktivirani Cas12a cijepa jednolančani reporter DNA-FQ. Reporter DNA-FQ je jednolančani DNA konstrukt sa oznakom „fluorophore-quencher“ koja fluorescira kada se taj konstrukt poreže. Kako bi se pojačala osjetljivost metode tj. umnožila DNA u uzorku provodi se izotermalna amplifikacija (Slika 7). Na ovaj način, uspješno su detektirani rizični tipovi HPV16 i HPV18 iz briseva pacijenata primjenom ove jednostavne metode za detekciju virusa (Chen et al., 2018).



Slika 7. Shematski prikaz metode DETECTR. Iz brisa pacijenta oslobađaju se nukleinske kiseline tretmanom sa proteinazom K. Potom se uz izotermalnu amplifikaciju umnaža sva DNA u uzorku. Konačno, crRNA dizajnirana je da prepozna virusnu DNA i aktivira *in trans* cijepanje DNA-FQ čime nastaje fluorescencija.

(prilagođeno prema Chen i sur. 2018)

3. RNA-CILJAJUĆI EFEKTORSKI PROTEINI

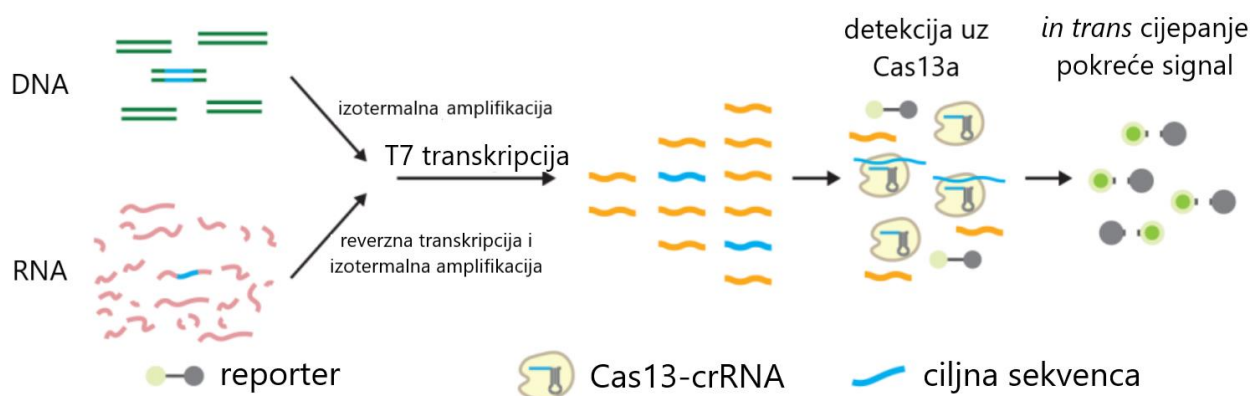
Iako većina sustava CRISPR-Cas veže i cijepa DNA, tip III iz klase 1, i tip VI iz klase 2, specifično usmjeravaju proteine efektore da cijepaju jednolančane RNA supstrate (East-seletsky i sur., 2016; Makarova i sur., 2019).

3.1. Tehnologija CRISPR-Cas13

Endonukleaza Cas13 dio je tipa VI sustava CRISPR-Cas unutar klase 2 (Makarova i sur., 2019). Kod otkrića ovog enzima uočene su dvije konzervirane sekvence koje su karakteristične za domenu HEPN (engl. *higher eucaryotes and prokaryotes nucleotide-binding*), a sama domena HEPN karakteristična je za enzime koji posjeduju RNaznu aktivnost (Anantharaman i sur., 2013). Budući da ima dvije domene HEPN ne mora dimerizirati, poput nekih endonukleaza, nego je monomerna endoRNaza (Abudayyeh i sur., 2016). Također, Cas13 sama procesira pre-crRNA i ne posjeduje tracrRNA (Shmakov i sur., 2015). Cas13 ne prepoznaje ciljne sekvence preko sekvenci PAM, ali je analizom protorazmaknica uočeno je da one nikada nemaju gvanin na 3' stršećem kraju, nego su to uvijek adenin, uracil ili citozin. Taj je dio sekvence nazvan PFS (engl. *protospacer flanking site*) te omogućava specifično prepoznavanje ciljne jednolančane RNA sekvence (Abudayyeh i sur., 2016). Osim toga, jednolančani se lom pojavljuje na mjestima bogatim uracilom te u sekundarnoj strukturi crRNA mora postojati dvolančana ukosnica duga minimalno 24 nukleotida (Abudayyeh i sur., 2016). Kao vrlo važno svojstvo ove nukleaze izdvaja se i *in trans* endonukleazna aktivnost zbog koje protein Cas13 može cijepati bilo koju jednolančanu RNA nakon što jednom pocijepa ciljnu komplementarnu sekvencu (Abudayyeh i sur., 2016; East-seletsky i sur., 2016). Nakon vezanja komplementarne sekvence Cas13 i crRNA prolaze kroz značajnu konformacijsku promjenu koja omogućava dvjema domenama HEPN da se približe i tako aktiviraju *in trans* cijepanje (Garcia-Doval i Jinek, 2017; Liu i sur., 2017). Unutar bakterijske stanice ovaj mehanizam vjerojatno omogućava indukciju dormancije ili stanične smrti kako bi se spriječilo širenje bakteriofaga (Abudayyeh i sur., 2016). Zanimljivo je kako je otkrivena mogućnost *in trans* aktivnosti endonukleaze Cas13. Znanstvenici su najprije napravili *in vivo* utišavanje gena RFP (engl. *red fluorescent protein*) pomoću crRNA koja se komplementarno veže na mRNA. Bakterije na kojima je ovaj eksperiment proveden usporile su svoj rast, pa je zaključeno da se aktivira nespecifično cijepanje RNA koje djeluje na cijeli transkriptom (Abudayyeh i sur., 2016).

Osim za promjenu ekspresije gena, znanstvenici su iskoristili svojstvo Cas13 da prepoznaje određene sekvence RNA u svrhu obrane od virusa u stanicama sisavaca. Dizajnirane su crRNA koje prepoznaju sekvence virusa limfocitnog koriomeningitisa (LCMV), virusa gripe tipa A (IAV) i virusa vezikularnog stomatitisa (VSV) koji svi posjeduju jednolančanu RNA. Kulture stanica zaražene ovim virusima tretirane su sustavom Cas13 s crRNA komplementarnoj virusnoj sekvenci te je količina virusa uspješno smanjena. Za IAV je korištena crRNA komplementarna sa virusnom mRNA, dok je kod LCMV i VSV korištena crRNA komplementarna sa virusnom sekvencom (Freije i sur., 2019). Osim kod životinja, Cas13 pokazao se učinkovit i u suzbijanju virusa u biljkama. Virus je bio obilježen proteinom GFP (engl. *green fluorescent protein*), a sustav Cas13 u biljne je stanice unesen agroinfiltracijom te je zapaženo smanjenje intenziteta fluorescencije. Točnije, uspješno je suzbijena infekcija virusom TRV (engl. *tobacco rattle virus*) u duhanu (*Nicotiana benthamiana*) (Mahas i sur., 2019).

Svojstvo cijepanja *in trans* ili kolateralnog cijepanja iskorišteno je kod dizajna sustava SHERLOCK (od engl. *Specific High Sensitivity Enzymatic Reporter UnLOCKing*) za detekciju, koji po mnogočemu nalikuje sustavu DETECTR. Glavna je razlika u tome što SHERLOCK može koristiti uzorke DNA i RNA. Najprije se provodi izotermalna amplifikacija spregnuta sa reverznom transkripcijom kroz koju će se RNA prepisati u DNA. Potom se provodi transkripcija u kojoj T7 RNA polimeraza prepisuje amplificiranu DNA u RNA koju tada Cas13 sa određenom crRNA može detektirati. Kada se aktivira *in trans* cijepanje Cas13 počinje cijepati jednolančane RNA „fluorophore-quencher“ reportere (Gootenberg i sur., 2017) (Slika 8).



Slika 8. Shematski prikaz sustava SHERLOCK.

(prilagođeno prema Gootenberg i sur., 2017)

Izrazito je zanimljiva ideja o primjeni sustava CRISPR-Cas13 u prekrajanju RNA. Naime, otkriven je protein Cas13d iz bakterije *Ruminococcus flavefaciens* koji je dovoljno mali da njegova sekvenca stane u adenovirusni vektor (AVV) te se tako prenese u željenu stanicu. Također, važno je naglasiti da je u eksperimentu korišten katalitički neaktivan Cas13 na kojeg je fuzioniran hnRNPa1, protein koji veže samo pre-mRNA. Ova je endonukleaza unutar AVV potom transducirana u kulturu neurona pacijenta oboljelog od frontotemporalne demencije (FTD) (Koner mann i sur., 2018). FTD je autosomalna dominantna neurodegenerativna bolest uzrokovana različitim mutacijama u genu *MAPT*, koji kodira za protein TAU. TAU postoji u dvije izoforme, 4R i 3R, koje se razlikuju po posjedovanju egzona 10. Omjer ove dvije izoforme poremećen je u oboljelih od demencije FTD (Boeve i Hutton, 2008). U eksperimentu je crRNA dizajnirana da prepoznaje egzon 10 te je vezanjem Cas13 inducirano njegovo prekrajanje što je rezultiralo smanjenjem poremećenog omjera 4R/3R (Koner mann i sur., 2018).

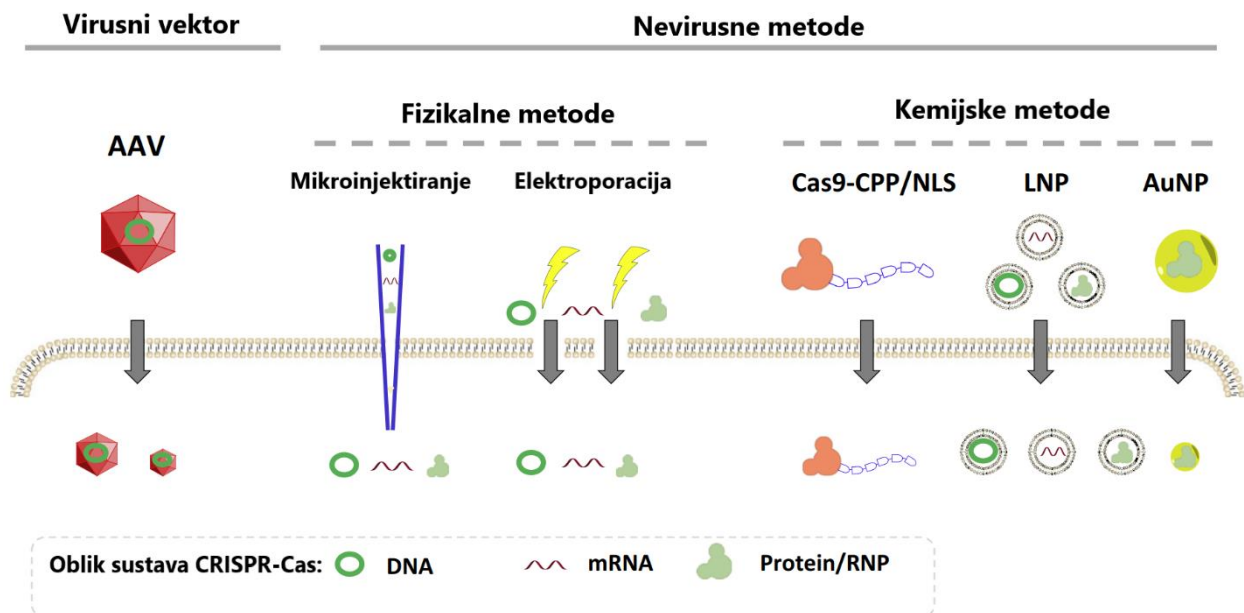
Sustav CRISPR-Cas13 upotrijebljen je i pri dizajniranju „uređivača baza“ ili sustava BE u molekulama RNA u stanicama sisavaca. Sustav je nazvan REPAIR (engl. *RNA Editing for Programmable A to I Replacement*) te omogućava ciljanu deaminaciju adenozina u inozin. Na katalitički neaktivan Cas13 fuzionirana je deaminaza ADAR (engl. *adenosine deaminase acting on RNA*) koja deaminira transkripte hidrolitičkom deaminacijom te mijenja adenozin u inozin koji je ekvivalentan gvanozinu u translaciji i prekrajanju. Osim toga, kako bi sustav bio učinkovitiji dizajnirana je crRNA koja ima citozin nasuprot adenina koji se deaminira te je u ADAR uvedena mutacija koja deaminazu čini katalitički aktivnijom (Cox i sur., 2017). Veoma je sličan i sustav RESCUE (engl. *RNA Editing for Specific C to U Exchange*) koji provodi deaminaciju citidina u uridin. Sustav je dizajniran na načina da je deaminaza ADAR mutirana tako da deaminira citidin. Zanimljivo je da je RESCUE primijenjen kod uređivanja transkripta β -katenina tako što je uspješno promijenjen dio koji se fosforilira. Na taj je način aktivirana signalizacija Wnt/ β -katenin i povećan rast stanica u kulturi (Abudayyeh i sur., 2019).

4. IZAZOVI I MOGUĆNOSTI U RAZVOJU ALATA CRISPR-CAS

Kod bilo kojeg alata za uređivanje genoma mora se uzeti u obzir nekoliko faktora. Primjerice, koliko dobro prepoznaje ciljnu sekvencu, kako dizajnirati crRNA, kakva je aktivnost sustava CRISPR-Cas u eksperimentalnim uvjetima, koja je najbolja metoda prijenosa sustava CRISPR-Cas u stanice i koliko se često događa nespecifično ciljanje ili *off-target* (Gohil i sur., 2021). Znanstvenici su kroz godine osmislili mnoge metode za detekciju *off-target*. Jedna od novijih metoda je DISCOVER-seq (engl. *discovery of in situ Cas off-targets and verification by sequencing*) koja se temelji na metodi ChIP-seq (engl. *chromatin immunoprecipitation followed by sequencing*). Imunoprecipitacijom se cilja protein MRE11 uključen u popravak DNA tako što se veže blizu dvolančanog loma kojeg je CRISPR-Cas9 uzrokovao. Potom se sekvenciranjem uzorka dobiva uvid u *off-target* mjesta u genomu. Metoda se može koristiti u kulturi stanica i *in situ* (Wienert i sur., 2020).

Možda jedan od najvećih problema u dizajnu novih alata predstavlja osmišljavanje načina unosa u željene stanice. Razlog tome je prevelik protein Cas ili vrlo negativno nabijena sgrRNA koji ne mogu prijeći staničnu ili jezgrinu membranu (Gohil i sur., 2021). Primjerice, u kulturu stanica sustav CRISPR-Cas može se unijeti putem lentivirusa koji nosi mRNA za Cas9 i crRNA ili se ove molekule RNA mogu unijeti elektroporacijom. Naravno, ove metode nisu primjenjive u *in vivo* eksperimentu ili kod terapija (Gohil i sur., 2021). Oblik u kojem se prenosi CRISPR-Cas sustav može varirati od plazmida s potrebnim genima, mRNA spremne za direktnu sintezu proteina Cas do čitavog ribonukleoproteina (RNP) (Gohil i sur., 2021). Kada se odredi oblik sustava, potrebno je odabrati metodu unosa. Sustavi za unos odvojeni su na virusne vektore i nevirusne metode (Hu i Li, 2022) (Slika 9). Od virusnih vektora najkorišteniji je adenovirusni (AVV) koji se može dizajnirati tako da veoma specifično prepoznaje ciljne stanice. Međutim, njegov je kapacitet 4.7 kB, dok veličina gena *cas* varira od 4 do 7 kB pa to često ograničava izvedbu eksperimenta ili terapije (Gohil i sur., 2021). Nevirusne se metode dijele na fizikalne i kemijske. Kod fizikalnih metoda razlikujemo mikroinjektiranje i elektroporaciju koji su dovedeni do razine da minimalno oštećuju stanice i uspješno se primjenjuju u laboratorijima (Gohil i sur., 2021). Kemijske se metode dijele na direktnu primjenu i enkapsulirane čestice. Direktna primjena podrazumijeva inkubaciju stanica sa RNP što je primjenjivo u laboratoriju (Staahl i sur., 2017). Enkapsulacija se može napraviti sa lipidima, koji su organske amfipatske molekule koje prirodno tvore lipidni dvosloj.

Takve lipidne nanočestice (LNP) koriste se u farmaciji za dostavu različitih lijekova (Allen i Cullis, 2013). Osim toga, nanočestice koje unose sustav CRISPR-Cas mogu biti i anorganskog podrijetla, poput zlata (Ju i sur., 2019).



Slika 9. Prikaz virusnih vektora i nevirusnih metoda unosa sustava CRISPR-Cas u stanicu.

(prilagođeno prema Gohil i sur., 2021)

Od izazova u tehnologiji CRISPR-Cas preostaje kako genetički modificirati veće sekvence (>100 bp) (Hu i Li, 2022). Međutim, nedavno otkriveni sustavi CRISPR-Cas kojima nedostaje nukleaza mogli bi riješiti ovaj problem. Naime, ti su sustavi kodirani uz Tn7-like transpozone te mogu vezati komplementarnu DNA, ali ju neće pocijepati. U blizini ciljne sekvence ugradit će se transpozon. Ovaj sustav otvara mogućnost razvoja efektivnih knock-in metoda (Klompe i sur., 2019). Uz daljnje istraživanja različitih sustava CRISPR-Cas moguć je razvoj efikasnih terapija i preciznih alata u molekularnoj biologiji (Hu i Li, 2022).

5. ZAKLJUČAK

Znanstvenici koji su prije više od 30 godina uočili neobične sekvence u *E. coli* nisu mogli ni sanjati o kakvom je otkriću riječ. Zahvaljujući kreativnosti znanstvenika diljem svijeta, sustav CRISPR-Cas od svog je otkrića do danas uspješno prenamjenjen u razne genetičke alate. Unutar klase 2, u kojoj postoji jedan efektorski protein, modificirani su proteini Cas9, Cas12 i Cas13 u dizajnu novih alata. Sustav CRISPR-Cas temeljen na proteinu Cas9 najkorišteniji je od navedenih proteina, budući da vrlo specifično prepoznaje dvolančanu DNA te kao takav može uvoditi trajne mutacije u željene stanice. Sustavi Cas12 i Cas13 poslužili su u razvoju alata za detekciju virusa zbog svojstva kolateralnog cijepanja. Međutim Cas12 specifično prepoznaje dvolančanu DNA i kolateralno cijepa jednolančanu DNA, dok Cas13 specifično prepoznaje i kolateralno cijepa jednolančanu RNA. Daljnjim istraživanjima moguće je otkriti nove tipove sustava CRISPR-Cas te ih modificirati u korisne genetičke alate. Svakako je potrebno dorađivati postojeće alate kako bi postali posve pouzdani u eksperimentima te sigurni za terapijsku primjenu.

6. LITERATURA

- Abudayyeh, O O, Abudayyeh, O. O., Gootenberg, J. S., Franklin, B., Koob, J., Kellner, M. J., Joung, J., Kirchgatterer, P., Cox, D. B. T., & Zhang, F. (2019): A cytosine deaminase for programmable single-base RNA editing. *Science*. 7063: 1–9.
- Abudayyeh, Omar O, Gootenberg, J. S., Konermann, S., Joung, J., Slaymaker, I. M., Cox, D. B. T., Shmakov, S., Makarova, K. S., Semenova, E., Minakhin, L., Severinov, K., Regev, A., Lander, E. S., Koonin, E. V., & Zhang, F. (2016): C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science*. 353: aaf5573.
- Allen, T. M., & Cullis, P. R. (2013): Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 65: 36–48.
- 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. *Biology Direct*. 8: 15.
- Anzalone, A. V, Randolph, P. B., Davis, J. R., Sousa, A. A., Koblan, L. W., Levy, J. M., Chen, P. J., Wilson, C., Newby, G. A., Raguram, A., & Liu, D. R. (2019): Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*. 576: 149–157.
- Boeve, B. F., & Hutton, M. (2008): Refining Frontotemporal Dementia With Parkinsonism Linked to Chromosome 17. *American Medical Association*. 65: 460–464.
- Chen, J. S., Ma, E., Harrington, L. B., Costa, M. Da, Tian, X., Palefsky, J. M., & Doudna, J. A. (2018): CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science*. 360: 436–439.
- Cong L., Ann Ran F., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P. D., Wu X., Jiang W., Marraffini A. L., Zhang F. (2013): Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas Systems. *Science*. 339: 819-823.
- Cox, D. B. T., Cox, D. B. T., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Franklin, B., & Kellner, M. J. (2017): RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science*. 0180: 1–15.
- East-seletsky, A., Connell, M. R. O., Knight, S. C., Burstein, D., Cate, J. H. D., Tjian, R., &

- Doudna, J. A. (2016): Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2 enable guide-RNA processing and RNA detection. *Nature Publishing Group*. 538: 270–273.
- Freije, C. A., Myhrvold, C., Boehm, C. K., Yozwiak, N. L., Zhang, F., Sabeti, P. C., Freije, C. A., Myhrvold, C., Boehm, C. K., Lin, A. E., Welch, N. L., & Carter, A. (2019): Programmable Inhibition and Detection of RNA Viruses Using Cas13. *Molecular Cell*. 76: 1–12.
- Garcia-doal, C., & Jinek, M. (2017): Molecular architectures and mechanisms of Class 2 CRISPR-associated nucleases. *Current Opinion in Structural Biology*. 47: 157–166.
- Gaudelli, N. M., Komor, A. C., Rees, H. A., Packer, M. S., Badran, A. H., Bryson, D. I., & Liu, D. R. (2017): Programmable base editing of A • T to G • C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature Publishing Group*. 551: 464–471.
- Gilbert, L. A., Larson, M. H., Morsut, L., Liu, Z., Brar, G. A., Torres, S. E., Stern-ginossar, N., Brandman, O., Whitehead, E. H., Doudna, J. A., Lim, W. A., Weissman, J. S., & Qi, L. S. (2013): CRISPR-Mediated Modular RNA-Guided Regulation of Transcription in Eukaryotes. *Cell*. 154: 1–10.
- Gohil, N., Bhattacharjee, G., Lam, N. L., Perli, S. D., & Singh, V. (2021): CRISPR-Cas systems: Challenges and future prospects. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 180: 141–151.
- Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Lee, J. W., Essletzbichler, P., Dy, A. J., Joung, J., Verdine, V., Donghia, N., Daringer, N. M., Catherine, A., Myhrvold, C., Bhattacharyya, R. P., Livny, J., Regev, A., & Koonin, E. V. (2017); Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a / C2c2. *Science*. 9321.
- Hu, Y., & Li, W. (2022): Development and Application of CRISPR-Cas Based Tools. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 10: 1–11.
- Jiang, F., & Doudna, J. A. (2017): CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. *Annual Review of Biophysics*. 46: 505–529.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012): A Programmable Dual-RNA – Guided. *Science*. 337: 816–822.

- Ju, E., Li, T., Ramos Da Silva, S., & Gao, S. J. (2019): Gold Nanocluster-Mediated Efficient Delivery of Cas9 Protein through pH-Induced Assembly-Disassembly for Inactivation of Virus Oncogenes. *ACS Applied Materials and Interfaces*. 11: 34717–34724.
- Kim, Y., Hong, S., Yu, J., Jeong, J., Kim, Y., Hong, S., Yu, J., Eom, J., Jang, K., Yoon, S., & Hong, D. H. (2021): Adenine base editing and prime editing of chemically derived hepatic progenitors rescue genetic liver disease Short Article Adenine base editing and prime editing of chemically derived hepatic progenitors rescue genetic liver disease. *Cell Stem Cell*. 28: 1–11.
- Klompe, S. E., Vo, P. L. H., Halpin-Healy, T. S., & Sternberg, S. H. (2019): Transposon-encoded CRISPR–Cas systems direct RNA-guided DNA integration. *Nature*. 571: 219–225.
- Koblan, L. W., Erdos, M. R., Wilson, C., Cabral, W. A., Levy, J. M., Xiong, Z., Tavarez, U. L., Davison, L. M., Gete, Y. G., Mao, X., Newby, G. A., Doherty, S. P., Narisu, N., Sheng, Q., Krilow, C., Lin, C. Y., Gordon, L. B., & Cao, K. (2021): In vivo base editing rescues Hutchinson – Gilford progeria syndrome in mice. *Nature*. 589: 608–614.
- Komor, A. C., Kim, Y. B., Packer, M. S., Zuris, J. A., & Liu, D. R. (2016): Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*. 533: 420–424.
- Konermann, S., Lotfy, P., Brideau, N. J., Oki, J., Shokhirev, M. N., Hsu, P. D., Effectors, T. V. C., Konermann, S., Lotfy, P., Brideau, N. J., Oki, J., Shokhirev, M. N., & Hsu, P. D. (2018): Transcriptome Engineering with RNA-Targeting Type VI-D CRISPR Effectors. *Cell*. 173: 1–12.
- Lander, E. S. (2016): The Heroes of CRISPR. *Cell*. 164: 18–28.
- Le Cong, Feng Zhang, Luciano A. Marraffini, Wenyan Jiang, Xuebing Wu, Patrick D. Hsu, Naomi Habib, Robert Barretto, Shuailiang Lin, David Cox, & Ran, F. A. (2013): Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science*. 339: 816–819.
- Liu, L., Li, X., Ma, J., Wang, M., Zhang, X., Wang, Y., Liu, L., Li, X., Ma, J., Li, Z., You, L., Wang, J., Wang, M., & Zhang, X. (2017): The Molecular Architecture for RNA-Guided RNA Cleavage by Cas13a The Molecular Architecture for RNA-Guided RNA Cleavage by

- Cas13a. *Cell*. 76: 1–13.
- Liu, Y., Kao, H., & Bambara, R. A. (2004): FLAP ENDONUCLEASE 1 : A Central Component of DNA Metabolism. *Annual Review of Biochemistry*. 73:589–615.
- Mahas, A., Aman, R., & Mahfouz, M. (2019): CRISPR-Cas13d mediates robust RNA virus interference in plants. *Genome Biology*. 20: 1–16.
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Iranzo, J., Shmakov, S. A., Alkhnbashi, O. S., Brouns, S. J. J., Charpentier, E., Cheng, D., Haft, D. H., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F. J. M., Scott, D., Shah, S. A., Siksnyš, V., Terns, M. P., Venclovas, Č., White, M. F., Yakunin, A. F., ... Koonin, E. V. (2019): Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nature Reviews Microbiology*. 18: 67–83.
- Manguso, R. T., Pope, H. W., Zimmer, M. D., Brown, F. D., Yates, K. B., Miller, B. C., Collins, N. B., Bi, K., La Fleur, M. W., Juneja, V. R., Weiss, S. A., Lo, J., Fisher, D. E., Miao, D., Van Allen, E., Root, D. E., Sharpe, A. H., Doench, J. G., & Haining, W. N. (2017): In vivo CRISPR screening identifies Ptpn2 as a cancer immunotherapy target. *Nature*. 574: 413–418.
- Marraffini, L. A., & Sontheimer, E. J. (2008): CRISPR Interference Limits Horizontal Targeting DNA. *Science*, 322: 1843–1845.
- Nuñez, J. K., Chen, J., Pommier, G. C., Hovestadt, V., Gilbert, L. A., & Weissman, J. S. (2021): Genome-wide programmable transcriptional memory by CRISPR-based epigenome editing. *Cell*. 184: 2503–2519.
- Pickar-Oliver, A., & Gersbach, C. A. (2019): The next generation of CRISPR–Cas technologies and applications. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 20: 490–507.
- Shalem O., Sanjana N. E., Hartenian E., Shi X., Scott D. A., Mikkelsen T. S., Heckl D., Ebert B. L., Root D. E., Doench J. G., Zhang F. (2014): Genome-Scale CRISPR-Cas9 Knockout Screening in Human Cells. *Science*. 343: 84–87.
- Shmakov, S., Abudayyeh, O. O., Makarova, K. S., Severinov, K., Zhang, F., Koonin, E. V., Shmakov, S., Abudayyeh, O. O., Makarova, K. S., Wolf, Y. I., & Gootenberg, J. S. (2015): Discovery and Functional Characterization of Article Discovery and Functional

- Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems. *Molecular Cell*. 60: 1–13.
- Song, Y., Liu, Z., Zhang, Y., Chen, M., Sui, T., Lai, L., & Li, Z. (2020): Large-Fragment Deletions Induced by Cas9 Cleavage while Not in the BEs System. *Molecular Therapy: Nucleic Acid*. 21: 523–526.
- Sorek, R., Lawrence, C. M., & Wiedenheft, B. (2013): CRISPR-mediated adaptive immune systems in bacteria and archaea. *Annual Review of Biochemistry*. 82: 237–266.
- Staahl, B. T., Benekareddy, M., Coulon-Bainier, C., Banfal, A. A., Floor, S. N., Sabo, J. K., Urnes, C., Munares, G. A., Ghosh, A., & Doudna, J. A. (2017): Efficient genome editing in the mouse brain by local delivery of engineered Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nature Biotechnology*. 35: 431–434.
- Swarts, D. C., Jinek, M., Swarts, D. C., & Jinek, M. (2019): Mechanistic Insights into the cis- and trans-Acting DNase Activities of Cas12a Mechanistic Insights DNase Activities of Cas12a. *Molecular Cell*. 73: 589–600.
- Wienert, B., Wyman, S. K., Yeh, C. D., Conklin, B. R., & Corn, J. E. (2020): CRISPR off-target detection with DISCOVER-seq. *Nature Protocols*. 15: 1775–1799.
- Wu, H., Chen, X., Zhang, M., Wang, X., Chen, Y., Qian, C., Wu, J., & Xu, J. (2021): Versatile detection with CRISPR/Cas system from applications to challenges. *Trends in Analytical Chemistry*. 135: 116150.
- Yasui, M., Suenaga, E., Koyama, N., Masutani, C., Hanaoka, F., Gruz, P., Shibutani, S., Nohmi, T., Hayashi, M., & Honma, M. (2008): Miscoding Properties of 2'-Deoxyinosine, a Nitric Oxide-Derived DNA Adduct, during Translesion Synthesis Catalyzed by Human DNA Polymerases. *Journal of Molecular Biology*. 2: 1015–1023.
- Zetsche, B., System, C. C., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Regev, A., Koonin, E. V., Zhang, F., Pam, T., Zetsche, B., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., & Slaymaker, I. M. (2015): Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System. *Cell*. 163: 1–13.
- Zhang, H., Qin, C., An, C., Zheng, X., Wen, S., Chen, W., Liu, X., Lv, Z., Yang, P., Xu, W., Gao, W., & Wu, Y. (2021): Application of the CRISPR/Cas9-based gene editing technique

in basic research, diagnosis, and therapy of cancer. *Molecular Cancer*. 20: 1–22.

Zhou, Y., Zhu, S., Cai, C., Yuan, P., Li, C., Huang, Y., & Wei, W. (2014): High-throughput screening of a CRISPR/Cas9 library for functional genomics in human cells. *Nature*. 509: 487–491.

7. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 7.11.2000. u Puli. Osnovnu sam školu završila u OŠ Jure Filipovića u Barbanu, a srednjoškolsko obrazovanje nastavila u Gimnaziji Pula s prirodoslovno-matematičkim usmjerenjem. U srednjoj sam školi sudjelovala na državnim natjecanjima iz biologije. Studij molekularne biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu započela sam 2019. godine. Za vrijeme studiranja volontirala sam na noći muzeja 2020. godine u Prirodoslovnom muzeju u Zagrebu te sam odlazila na terene sa udrugom BIUS. Početkom 2021. godine bila sam na praksi u Laboratoriju za molekularnu ekotoksikologiju na Institutu Ruđer Bošković. Već 6 godina sudjelujem u osmišljavanju i izvedbi znanstvenih kampova u Znanstveno-edukacijskom centru Višnjan.