

# Izazovi razvoja dijagnostike temeljene na sustavima CRISPR-Cas

---

Landher, Sara

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:217:901957>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-05**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Sara Landher

**Izazovi razvoja dijagnostike temeljene na  
sustavima CRISPR-Cas**

Završni rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Sara Landher

**Challenges of developing diagnostic based on  
CRISPR-Cas systems**

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. Ivana Ivančić Baće.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Završni rad

## Izazovi razvoja dijagnostike temeljene na sustavima CRISPR-Cas

Sara Landher

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Posljednjih godina sve je češća pojava novih zaraznih bolesti. Kako bi se njihovo širenje zaustavilo i zaštitilo ljudsko zdravlje, ključno je na vrijeme i ispravno dijagnosticirati ih. Istraživanjem sustava CRISPR-Cas osmišljene su nove, brže i jednostavnije dijagnostičke metode. Ove metode karakterizira visoka specifičnost, osjetljivost te brzina dobivanja uspješnih rezultata. U cilju je razviti tehnike za koje nisu potrebni dobro opremljeni laboratoriji već se mogu koristiti izvan – na terenu, u bolnici, kući, i slično. U ovom radu opisane su neke dijagnostičke metode u kojima veliku ulogu imaju sustavi CRISPR-Cas.

Ključne riječi: Cas9, Cas12, Cas13, metode CRISPR-Cas  
(25 stranica, 7 slika, 34 literaturna 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

## Challenges of developing diagnostic based on CRISPR-Cas systems

Sara Landher

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

In recent years, the appearance of new infectious diseases has become more frequent. In order to stop it from spreading and thereby protect human health, it is crucial to diagnose them in the right time and precisely. By researching CRISPR-Cas systems, new, more rapid, and simpler diagnostic methods were developed. These methods are characterized by high specificity, sensitivity, and velocity in obtaining successful results. The aim is to develop techniques that do not require well-equipped laboratories, but can be used outside of them – in the field, in the hospital (point-of-care), at home, etc. Some of the diagnostics methods in which CRISPR-Cas systems have a great role are described in this bachelor thesis.

Keywords: Cas9, Cas12, Cas13, CRISPR-Cas based methods  
(25 pages, 7 figures, 34 references, original in: Croatian)  
Thesis is deposited in Central Biological Library.

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

# Sadržaj

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. O SUSTAVIMA CRISPR-CAS.....</b>	<b>2</b>
2.1. Kratka povijest .....	2
2.2. Građa lokusa CRISPR .....	2
2.3. Podjela sustava CRISPR-Cas .....	3
2.4. Mehanizam sustava CRISPR-Cas .....	4
2.4.1. Adaptacija.....	4
2.4.2. Sazrijevanje crRNA.....	4
2.4.3. Interferencija .....	5
<b>3. DIJAGNOSTIČKE METODE TEMELJENE NA SUSTAVIMA CRISPR-CAS .....</b>	<b>7</b>
3.1. Protein Cas9 .....	7
3.1.1. Metoda NASBACC.....	7
3.1.2. Metoda CAS-EXPAR.....	8
3.1.3. Metoda FELUDA .....	8
3.2. Proteini Cas12 i Cas13 .....	10
3.2.1. Metoda DETECTR.....	12
3.2.2. Metoda SHERLOCK.....	14
3.2.3. Metoda SHERLOCKv2.....	15
3.2.4. Metoda HUDSON .....	16
3.2.5. Metoda CARMEN.....	17
3.2.6. Metoda HOLMES .....	18
3.2.7. Metoda HOLMESv2 .....	19
<b>4. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>20</b>
<b>5. LITERATURA .....</b>	<b>21</b>
<b>6. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>25</b>

# 1. UVOD

Pojava novih zaraznih bolesti te njihovo brzo širenje svijetom sve je češće i predstavlja prijetnju ljudskom zdravlju. Samo od početka 21. stoljeća svijetom su se naglo proširile bolesti poput svinjske i ptičje gripe, Zika groznice, MERS-e i ebole. Tako je, primjerice, aktualna pandemija COVID-19, uzrokovana virusom SARS-CoV-2, naglo zavladała svijetom i uvelike utjecala na zdravlje i život ljudi. Kako bi se zarazne bolesti mogle kontrolirati te zaustaviti, od ključne je važnosti da ih se pravovremeno dijagnosticira (Lou i sur., 2022). Brza i točna dijagnostika bolesti je ono što u velikoj mjeri pomaže učinkovitim liječenju te sprječava pojavu dugotrajnih posljedica bolesti (Kaminski i sur., 2021). Većinom se upotrebljavaju tradicionalne metode laboratorijske dijagnostike kao što su: uzgoj uzročnika u kulturi, metagenomski testovi i slikovne pretrage. Međutim, ovakvi načini dijagnostike često su vrlo spori, skupi i niske točnosti što otežava kontrolu širenja zaraznih bolesti (Lou i sur., 2022). S obzirom na to da se iz vrlo male količine uzoraka mogu amplificirati molekule DNA i RNA, u zadnje vrijeme zaživjela je dijagnostika visoke specifičnosti temeljena na detekciji nukleinskih kiselina. Najčešće korištena metoda je PCR (od engl. *Polymerase Chain Reaction*), međutim za njezino izvođenje potrebna je stručna osoba, profesionalna laboratorijska oprema te skupi reagensi (Kaminski i sur., 2021).

Upotreba ovih dijagnostičkih metoda ograničena je u slabo razvijenim zemljama (Wang i Cui, 2020). Kako bi nadišli taj problem, znanstvenici diljem svijeta nastoje pronaći načine kojima bi se bolesti mogle dijagnosticirati brzo, neovisno o struji, bez skupe profesionalne opreme ili bez stručnih osoba (Kaminski i sur., 2021). U cilju je dizajnirati dijagnostiku idealnu za testiranje POC (od engl. *Point-of-Care*). Ono predstavlja medicinske dijagnostičke alate koji se mogu koristiti izvan laboratorija, u blizini pacijenata (Dongen i sur., 2020). Nove metode dijagnostike temeljene na sustavima CRISPR (od engl. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) i proteinima Cas (od engl. *CRISPR-associated proteins*) pokazale su se kao dobro rješenje. Otkad je otkriven, sustav CRISPR-Cas ima veliku ulogu u znanosti. Koristi se za bilježenje događaja u stanicima, prilikom detekcije nukleinskih kiselina te u genetičkom inženjerstvu za uređivanje genoma, epigenoma i transkriptoma. Daljnja saznanja o sustavu potaknula su dizajniranje dijagnostičkih metoda temeljenih na tehnologiji CRISPR-Cas. Pomoću sustava CRISPR-Cas, dijagnostikom *in vitro* mogu se detektirati i identificirati mnogi različiti patogeni faktori kao što su virusi (adenovirus, virus humane imunodeficijencije (HIV), hepatitis B (HBV), virus ebole, gripe, itd.), bakterije, gljive (*Zygomycota*, *Chytridiomycota*, *Candida*), paraziti (*Paludism*,



*Leishmania*). Ujedno je moguća i dijagnostika tumora (tumori dojke, tiroidne žlijezde i crijeva) (Wang i Cui, 2020). Visoka specifičnost, osjetljivost, jednostavnost i praktičnost prilikom testiranja POC u dijagnostici, također, predstavljaju neke od prednosti ovog sustava (Sohail i sur., 2022).

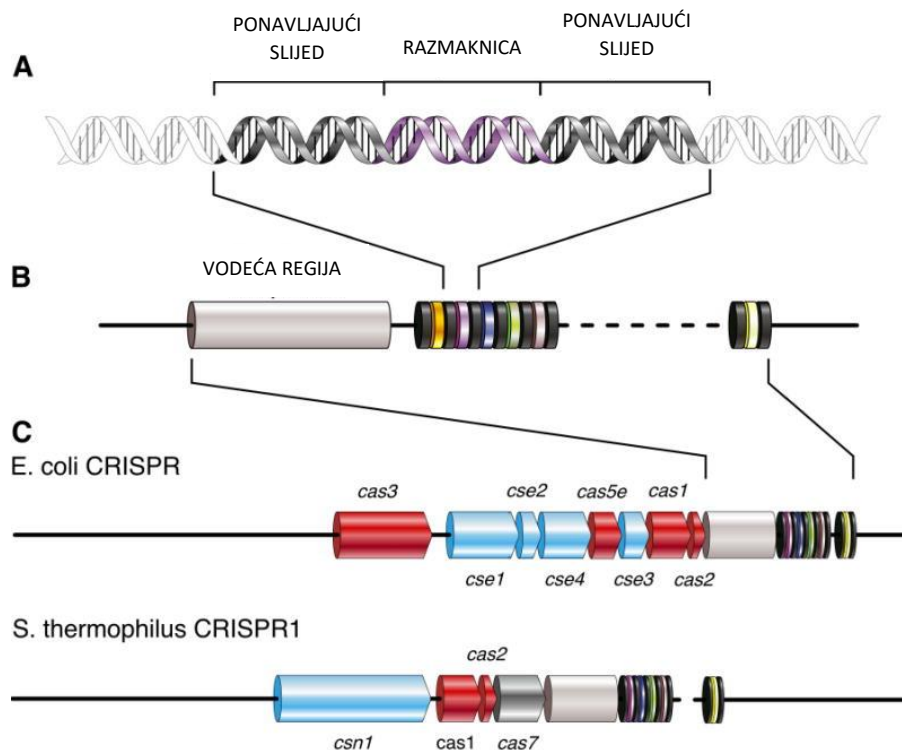
## 2. O SUSTAVIMA CRISPR-CAS

### 2.1. Kratka povijest

Japanski znanstvenici su 1987. godine istraživali gene *iap* (od engl. *isozyme of alkaline phosphatase*) prisutne u bakteriji *Escherichia coli* kada su naišli na visoko ponavljajuće homologne sljedove prekinute kratkim razmaknicama. Daljnjim istraživanjima otkrivene su slične sekvence prisutne u različitim bakterijama i arhejama. Znanstvenici Francisco Mojica i Ruud Jansen, ovim sekvencama su nadjenuli akronim CRISPR te opisali građu njihova lokusa (Karginov i Hannon, 2010). Uz ponavljajuće sljedove također se nalaze i protein kodirajući geni nazvani *cas*. Godine 2005., tri različita istraživanja dokazala su da sekvence spomenutih razmaknice dolaze od vanjskih genetičkih elemenata (Chaudhuri, Halder i Datta, 2022). Kasnije je otkriveno kako je CRISPR-Cas oblik adaptivnog imunološkog sustava prisutan u većini bakterija i arheja. Ovim sustavom mikrobnim organizmi štite se od zaraze uzrokovane virusima i ostalim stranim genetičkim elementima (Xu i Li, 2020). Prilikom zaraze, fragmenti strane DNA se ugrađuju u lokus CRISPR domaćina kao nove razmaknice.

### 2.2. Građa lokusa CRISPR

Lokus CRISPR (**Slika 1**) sastoji se od niza kratkih direktnih ponavljanja prekinutih sekvencama razmaknica. Direktna ponavljanja unutar lokusa su jednakih sekvenci i veličina, a razmaknice su samo jednake u veličini (Xu i Li, 2020). Sekvence razmaknica se razlikuju te predstavljaju jedinstvene sekvence DNA stranih genetičkih elemenata (DNA virusa ili plazmida) (Zhu i Huang, 2019). Ponavljanja kod različitih vrsta prokariota veličina su od 21 do 47 parova baza (pb), dok su razmaknice veličina od 20 do 72 pb (Xu i Li, 2020). Regija ispred prvog ponavljanja lokusa CRISPR bogata je A-T parovima baza te predstavlja vodeću regiju veoma bitnu za transkripciju samog lokusa te ugrađivanje razmaknice (Zhu i Huang, 2019).



**Slika 1.** Struktura lokusa CRISPR

**A** – direktna ponavljanja prekinuta razmaknicama, **B** – vodeći slijed ispred klastera CRISPR, **C** – lokusi CRISPR iz bakterija *E. coli* i *S. thermophilus* okruženi genima *cas*. Crveno su prikazani geni *cas* koji čine srž lokusa CRISPR, a plavom bojom geni specifični za određeni podtip (Preuzeto i prilagođeno iz rada Karginov i Hannon, 2010).

### 2.3. Podjela sustava CRISPR-Cas

Sustavi CRISPR-Cas klasificirani su u dvije klase (klasa I i klasa II) koji se dijele u šest tipova (I, II, III, IV, V i VI) i otprilike 33 podtipa. Klasa I sadrži multimerni efektorski protein te je čine tipovi I, III i IV, dok klasi II pripada monomerni multifunkcionalni efektorski protein te tipovi II, V i VI. U dijagnostici i genetičkom inženjerstvu najčešće se koriste podtipovi proteina Cas klase II – Cas9 (II), Cas12 (V) i Cas13 (VI) (Wang i Cui, 2020). Razlog tomu je što prepoznavanje i cijepanje stranih genetičkih elemenata vrši monomerni protein (Kaminski i sur., 2021).

## 2.4. Mehanizam sustava CRISPR-Cas

Prilikom ulaska stranih genetičkih elemenata u bakterijsku stanicu, lokus CRISPR djeluje poput memorije u koju se ugrađuju razmaknice – sekvence nukleinskih kiselina stranih genetičkih elemenata (Wang i Cui, 2020). Geni lokusa se prepisuju te procesiranjem nastaju zrele molekule CRISPR RNA (crRNA) od kojih svaka kodira za jedinstvenu sekvencu razmaknice. Ponovnim ulaskom istih stranih sekvenci, proteini Cas dolaze do njih i prepoznaju ih pomoću crRNA te ih utišavaju ('CRISPR Systems'). Sam obrambeni mehanizam čine tri faze: (1) adaptacija, (2) sazrijevanje crRNA te (3) interferencija (Dubey i sur., 2022).

### 2.4.1. Adaptacija

Za vrijeme faze adaptacije, nakon identifikacije stranih nukleinskih kiselina, procesira se i odabire proto-razmaknica koju karakterizira motiv PAM (od engl. *Protospacer Adjacent Motif*). Pomoću motiva PAM mogu se lako razlikovati endogene od stranih molekula DNA te tako spriječiti pojavu autoimunosti. Procesiranjem proto-razmaknice nastaje razmaknica koja se zatim ugrađuje u lokus CRISPR (Wang i Cui, 2020). Najbitniji proteini u ugradnji razmaknica su nukleaze Cas1 i Cas2 koje formiraju kompleks. U bakteriji *E. coli* taj kompleks gradi jedan dimer Cas2 povezan s dva dimera Cas1 (Rath i sur., 2015). Nakon što proteinski kompleks Cas1-Cas2 prepozna motiv PAM, on cijepa stranu DNA i skraćuje proto-razmaknicu koja će biti ugrađena u lokus CRISPR. Ugradnja se odvija odmah iza AT bogatog slijeda pomoću proteina IHF (od engl. *Integrated Host Factor*) koji savija strukturu DNA. Time Cas1-Cas2 lakše pronalazi vodeći slijed te pravilno ugrađuje razmaknicu. Kod podtipa CRISPR Cas II-A, pri ugradnji razmaknice uz Cas1-Cas2 sudjeluju i proteini Cas9, Csn2 te trans-aktivirajuća CRISPR RNA (tracrRNA) (Wang i Cui, 2020).

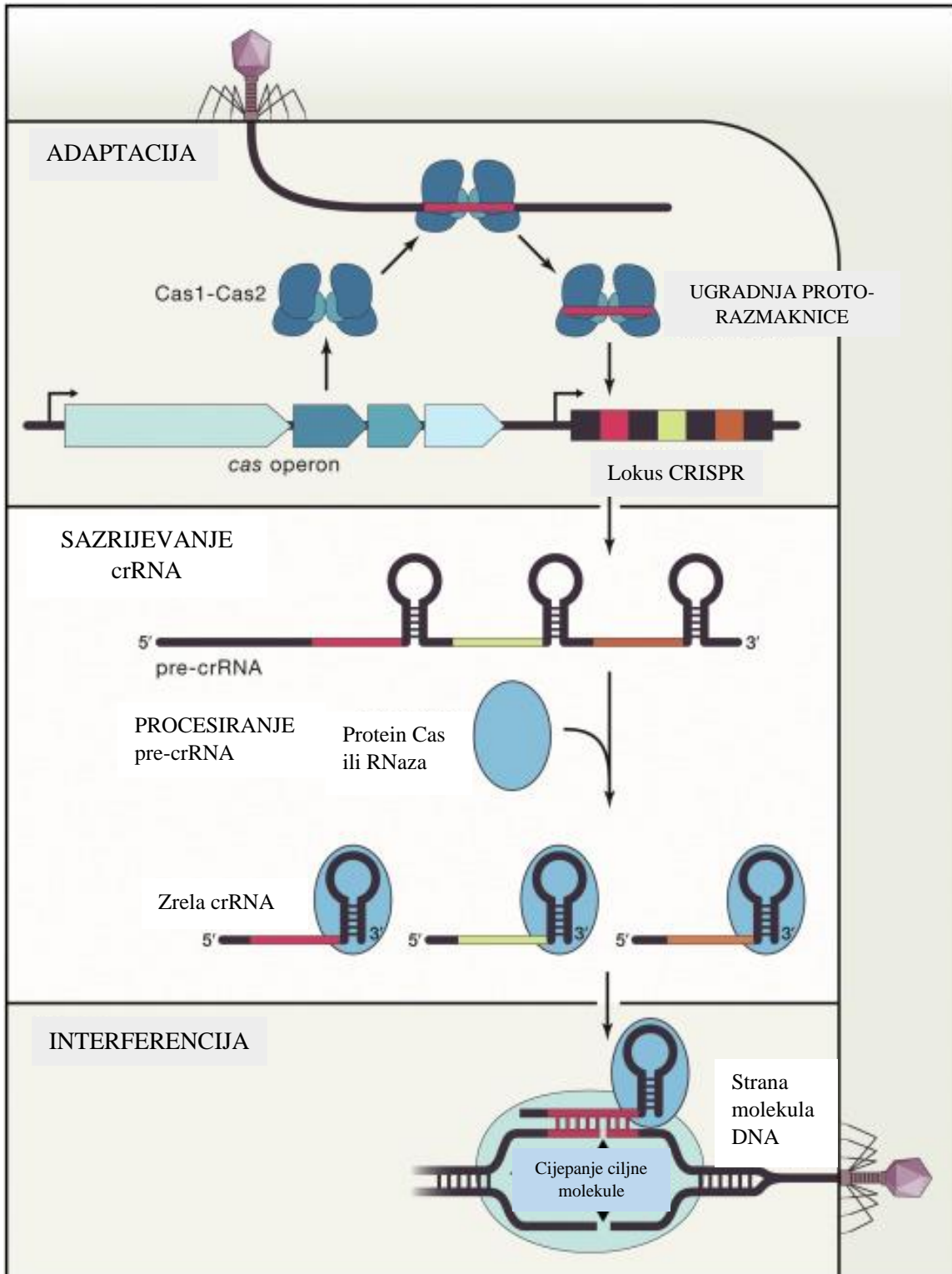
### 2.4.2. Sazrijevanje crRNA

Kada bakterija ponovno dođe u kontakt s istim stranim genetičkim elementom, započinje druga faza pri kojoj dolazi do ekspresije ostalih proteina Cas te transkripcije regije CRISPR. Nastaje dugačka molekula RNA, tj. dugačak prekursor crRNA (pre-crRNA). Kako bi prepoznali strane genetičke elemente, ponavljajući fragmenti se izrezuju u pojedinačne zrele molekule crRNA koje usmjeravaju proteine Cas (Wang i Cui, 2020). Izrezivanje zrelih vodećih crRNA obavlja jedan ili više proteina Cas koji formiraju kompleks Cascade kod tipa I (od engl. *CRISPR-associated*

*complex for antiviral defence*) (Makarova, Wolf i Koonin, 2013). Kod podtipova sustava CRISPR-Cas II-A i B, Cas9 se veže na zrele molekule crRNA i tracrRNA te je za izrezivanje ponavljajućih dijelova pre-crRNA potreban protein domaćina – RNaza III. U slučaju tipa II i podtipa sustava V-B, tracrRNA nužna je za sazrijevanje crRNA (Wang i Cui, 2020).

### 2.4.3. Interferencija

Ako u bakterijsku stanicu uđu strani genetički elementi koji sadrže proto-razmaknicu, ribonukleinski kompleks crRNA-Cas tu sekvencu prepoznaje i cijepa (Mosterd, Rousseau i Moineau, 2021). Kod tipa I sustava CRISPR-Cas ciljnu DNA prepoznaje kompleks Cascade, a za interferenciju potrebna je nukleaza/helikaza Cas3 koju dovodi Cascade. Za uspješnu interferenciju kod sustava tipa I i II, potreban je motiv PAM i savršena komplementarnost crRNA i proto-razmaknice. Upravo ovaj motiv zaslužan je za sprječavanje autoimunosti bakterija. Vezanjem crRNA na stranu nukleinsku kiselinu dolazi do istiskivanja slobodnog lanca DNA te se formira R-omča (Rath i sur., 2015). Protein Cas3 radi urez na ciljnoj DNA te ju uništava pomoću 3'-5' endonukleaze (Dubey i sur., 2022). Sve faze obrambenog mehanizma prikazane su na **Slici 2**.



**Slika 2.** Skica tri faze obrambenog mehanizma sustava CRISPR-Cas preuzeta i prilagođena iz Hille i sur., 2018.

### 3. DIJAGNOSTIČKE METODE TEMELJENE NA SUSTAVIMA CRISPR-CAS

#### 3.1. Protein Cas9

##### 3.1.1. Metoda NASBACC

Za razvoj prvih metoda dijagnostike temeljene na sustavima CRISPR-Cas, najčešće su se koristile Cas9 varijante koje prepoznaju dvolančane molekule DNA (dDNA) (Kaminski i sur., 2021). Skupina znanstvenika, Pardee i sur., primijenili su *in vitro* tehniku izotermalne amplifikacije, NASBA (od engl. *Nucleic Acid Sequence Amplification*), zajedno s CRISPR-Cas9 te tako uspješno identificirali afrički od američkog soja virusa Zika iz plazme majmuna makaka (*Macaca*) (Dubey i sur., 2022). Ova tehnika dobila je akronim **NASBACC** (od engl. *Nucleic Acid Sequence-Based Amplification-CRISPR cleavage*). Virusnu RNA su umnožili metodom NASBA te ju spojili sa sintetiziranom okidačkom („trigger“) sekvencom. (Lou i sur., 2022). Molekula sgRNA (od engl. *single-guide RNA*) dovodi protein Cas9 na ciljno mjesto pored sekvence PAM, a zatim radi urez u dDNA (Srivastava i sur., 2020). Cijepanjem molekula DNA aktiviraju se senzorske molekule koje se metodom kolorimetrije detektiraju. Senzorske molekule korištene u ovoj metodi nazivaju se „toehold switch sensors“ i predstavljaju sintetske regulatorne molekule RNA. One sadrže strukturu ukosnice koja blokira *in cis* translaciju gena odvajanjem ribosomskog veznog mjesta i startnog kodona. Nakon što se „toehold switch sensor“ vezao za komplementarnu okidačku RNA, započinje translacija gena (najčešće *lacZ*). Kako bi se kolorimetrijski mogle detektirati okidačke sekvence RNA, senzorske molekule reguliraju translaciju enzima LacZ koji pretvara žuti supstrat (klorofenol crvena- $\beta$ -D-galaktopiranozid) u ljubičasti produkt (crveni klorofenol) (Pardee i sur., 2016).

##### 3.1.1.1. Prednosti i nedostaci metode NASBACC

Ovu metodu moguće je koristiti za razlikovanje vrlo srodnih virusnih sojeva. Naime, budući da postoji šansa od 48% da mutacija stvori novo ili uništi staro mjesto PAM, nastaje više različitih mjesta PAM specifičnih za pojedini soj. Metoda NASBACC koristi sposobnost proteina Cas9 da specifično cijepa DNA samo blizu motiva PAM i tako omogućava razlikovanje sojeva (Pardee i sur., 2016). Iako protein Cas9 može poslužiti u uspješnom detektiranju i razlikovanju virusa i virusnih sojeva, za izvođenje metode NASBACC potrebne su višestruke reakcije, za

amplificiranje i rad s ampliconima. To ograničava upotrebu ove metode za testiranja POC (Freije i Sabeti, 2021).

### 3.1.2. Metoda CAS-EXPAR

Par godina kasnije, Huang i sur. 2018. godine osmislili su metodu **CAS-EXPAR** (od engl. *CAS-EXponential Amplification Reaction*) kojom je moguće detektirati jednolančane nukleinske kiseline. Za početak procesa EXPAR potrebni su kratki fragmenti jednolančane DNA (jDNA) ili RNA koji funkcioniraju poput početnica. Završetkom procesa količina umnoženih dl te jDNA toliko je velika da je osjetljivost CAS-EXPAR  $0,82 \times 10^{-18}$  mol/L (0, 82 aM). Ovaj sustav također je i visoke specifičnosti budući da može detektirati krivo-sparene baze točno na mjestu cijepanja. Krivo-sparene baze onemogućile bi vezanje početnice te se rezultati ne bi mogli očitati.

#### 3.1.2.1. Prednosti i nedostaci metode CAS-EXPAR

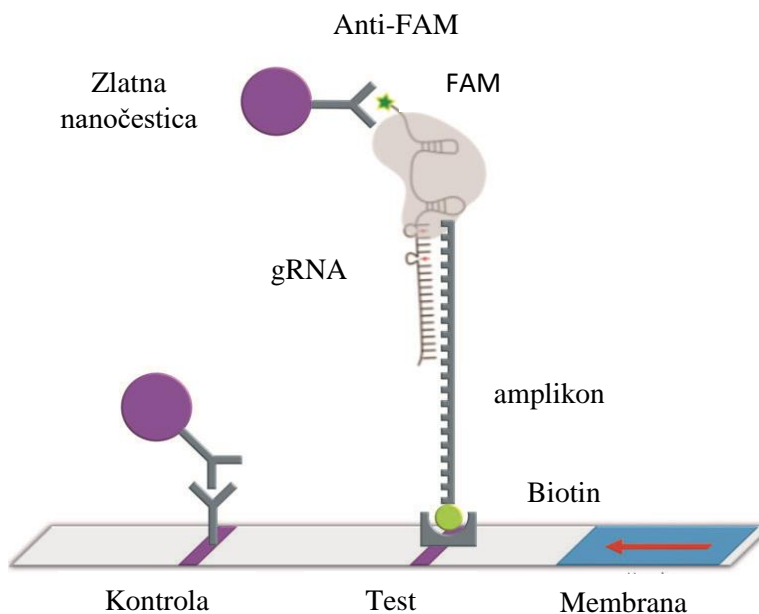
Metoda CAS-EXPAR upotrijebljena je za uspješnu detekciju molekule mRNA patogene bakterije *Listeria monocytogenes* i također za praćenje promjena u metilaciji fragmenata molekula DNA. Naime, promjene u metilaciji molekula DNA često su povezane s bolestima poput tumora. Zato njihova detekcija uvelike pomaže ranoj dijagnostici tumora (Jia i sur., 2020).

Ova metoda je vrlo osjetljiva i specifična, međutim nije pogodna za testiranje POC već je ograničena samo za laboratoriji zbog dugog trajanja izvođenja metode, upotrebe glomazne laboratorijske aparature, otežanog dizajniranja početnica za metodu PCR te upotrebe enzima osjetljivih na RNaze (Srivastava i sur., 2020).

### 3.1.3. Metoda FELUDA

Metoda **FELUDA** (od engl. *FN*Cas9* Editor-Linked Uniform Detection Assay*) je još jedna od metoda temeljena na proteinu Cas9 te služi za dijagnostiku bolesti COVID-19. Kako bi se otkrile zarazne bolesti, upotrebljava se FnCas9 (protein Cas9 izoliran iz bakterije *Francisella novicidada*), fluorescerin amidit (FAM) tracrRNA-sgRNA i anti-FAM protutijelo spojeno sa zlatnim nanočesticama (Dubey i sur., 2022). Ekstrahirana molekula RNA se pomoću metode RT-PCR (od engl. *Reverse Transcription PCR*) ili RPA (od engl. *Recombinase Polymerase Amplification*) umnoži te obilježi molekulom biotina. Obilježeni amplicon se inkubira s

kompleksom FAM tracrRNA-sgRNA i nanese na „HybriDetect dipstick“ pločicu na kojoj je imobilizirana molekula streptavidina (**Slika 3**). Ako je u testnom uzorku prisutna sekvenca virusa, kompleks supstrata se biotinom veže na streptavidin. Vizualizacija uzoraka omogućena je pomoću zlatnih nanončestica spojenih s anti-FAM protutijelima. Ova tehnika vizualizacije uzoraka naziva se *lateral flow* imunološko određivanje s označenim antigen-reporter molekulama.



**Slika 3.** Skica pozitivnog testa koristeći metodu FELUDA (Preuzeto i prilagođeno s *Feluda Test » new rapid test for the identification of COVID-19*, 2020).

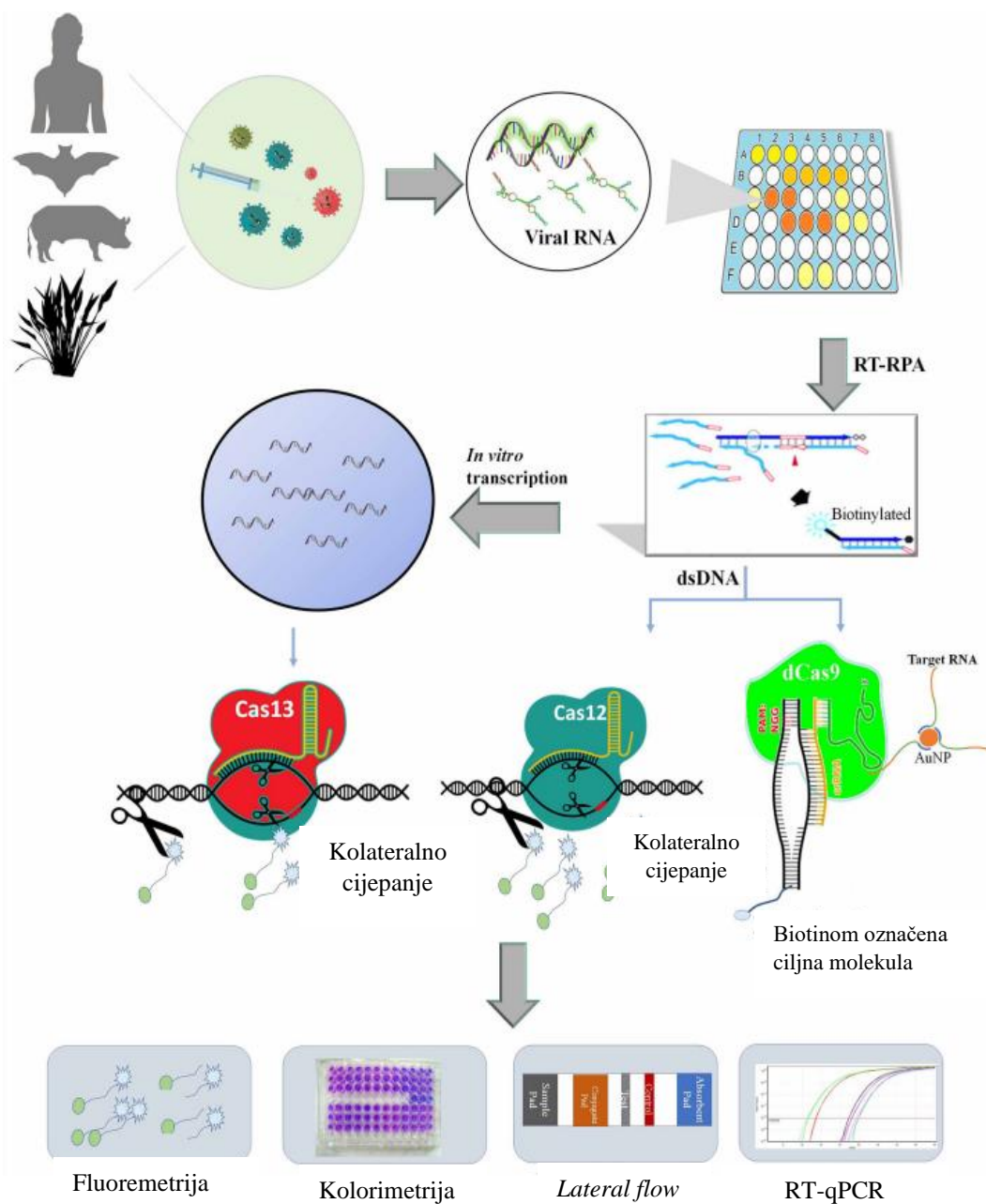
### 3.1.3.1. Prednosti i nedostaci metode FELUDA

Budući da je metoda FELUDA gotovo jednake točnosti kao i qRT-PCR u detekciji bolesti COVID-19, može se kao zamjena koristiti na područjima bez uređaja za qRT-PCR. Ujedno se može koristiti pri dijagnostici POC u kombinaciji s analizatorom fragmenata temeljenim na mikrofluidici i prijenosnim uređajima za PCR, a vrijeme izvođenja je unutar sat vremena. Za poboljšanje metode potrebo je dizajnirati snažnije parove molekula sgRNA i početnica zbog mutacija u genomu virusa SARS-CoV-2 koje bi mogle utjecati na očitavanja rezultata metodom qRT-PCR (Azhar i sur., 2021).



### 3.2. Proteini Cas12 i Cas13

Suprotno sustavima tipa II (Cas9), sustavi tipa V (Cas12) i tipa VI (Cas13), imaju mogućnost kolateralnog cijepanja na mjestu prepoznavanja (Sumpor, 2021). Kompleks crRNA i efektorskog proteina (Cas12 ili Cas13) ide do ciljne sekvence i nakon komplementarnog sparivanja dolazi do enzimatskog cijepanja i ciljne sekvence i gRNA u blizini (Dongen i sur., 2020). U svrhu dijagnostike koriste se kratke jednolančane nukleinske kiseline koje predstavljaju molekule reportere te nose fluorofor i utišavač fluorescencije (od engl. *quencher*). Cijepanjem se *quencher* odvaja od molekule fluorofora te je moguća detekcija signala fluorescencije fluorometrijom (Kaminski i sur., 2021). Osim fluorometrijom i ranije spomenutim *lateral flow* imunološkim određivanjem s označenim antigen-reporter molekulama te metodom kolorimetrije, nukleinske kiseline mogu se detektirati i kvantitativno u stvarnom vremenu (RT-qPCR) (Srivastava i sur., 2020). Na **Slici 4** grafički je prikazana dijagnostika virusa kombinirajući proteine Cas9, Cas12 te Cas13 sa setovima za detekciju nukleinskih kiselina.



**Slika 4.** Grafički prikaz dijagnostike virusa pomoću proteina Cas9, Cas12 i Cas13 u kombinaciji s uobičajenim setovima za detekciju nukleinskih kiselina (Preuzeto i prilagođeno iz Srivastava i sur., 2020).

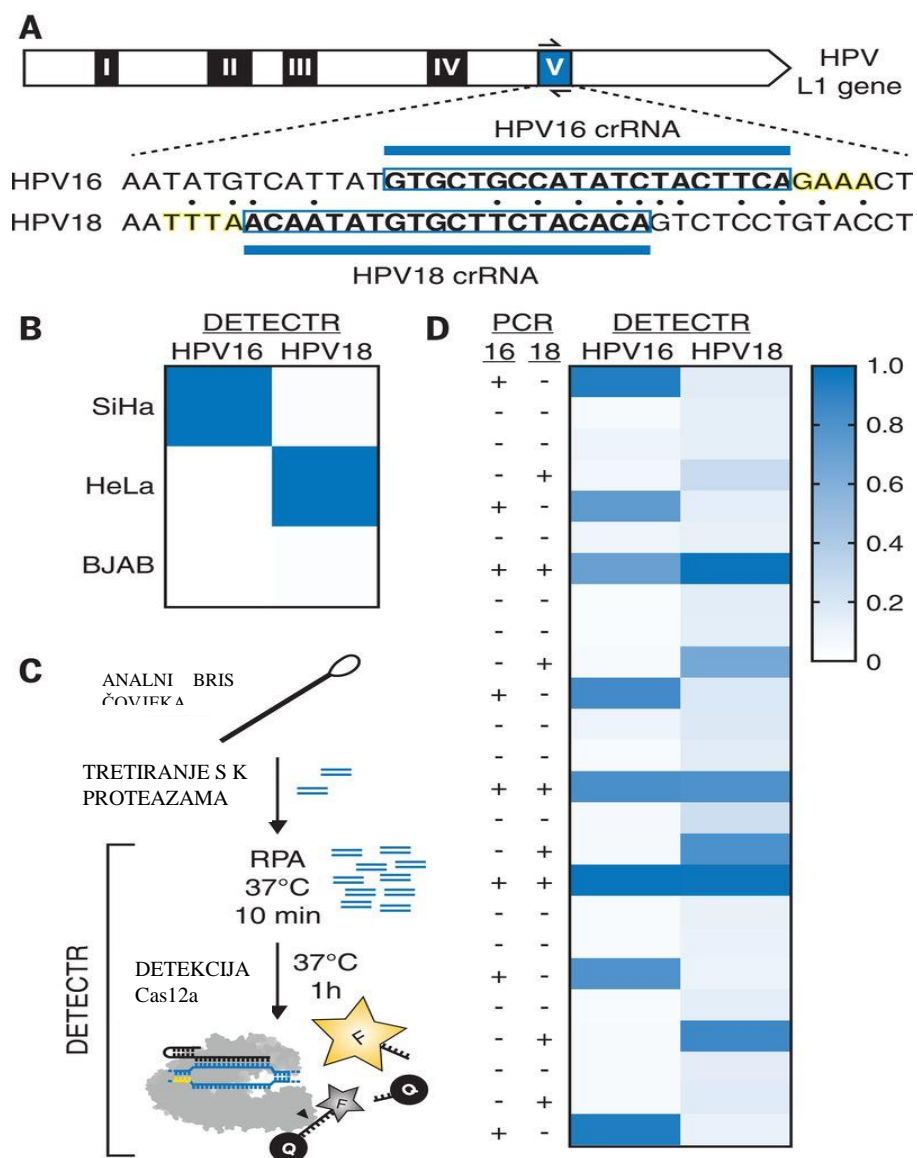
### 3.2.1. Metoda DETECTR

Metoda **DETECTR** (od engl. *DNA Endonuclease-Targeted CRISPR Trans Reporter*) je jedna od prvih osmišljenih dijagnostičkih metoda temeljena na proteinu Cas12. Protein Cas12a iz bakterije *Lachnospiraceae bacterium* (LbCas12a) pomoću komplementarne crRNA dolazi do ciljnih dijelova dDNA i vrši kolateralno cijepanje jDNA prisutnih u blizini (Kaminski i sur., 2021). U cilju obogaćivanja ciljnih sekvenci, prije izvođenja same metode DETECTR, dodan je korak izotermalne pre-amplifikacije (RPA). Uz RPA, osjetljivost dijagnostičkih testova je veća te se za izvođenje ne mora koristiti ni skupa ni profesionalna oprema (Mustafa i Makhawi, 2021).

#### 3.2.1.1. Prednosti i nedostaci metode DETECTR

Ovom metodom moguće je dijagnosticirati humani papiloma virus (HPV) te čak i razlikovati, dva visokorizična onkogeno soja, HPV16 i HPV18 (**Slika 5**). Prema istraživanju Janice Chen, u kojem je sudjelovala i Jennifer Dounda, metodom DETECTR je uspješno identificiran soj HPV16 25 puta u 25 slučajeva, a HPV18 23 puta u 25 slučajeva iz uzoraka pacijenata. Uzorci su sadržavali heterogenu smjesu sojeva HPV-a i ukupno izvođenje metode je trajalo samo jedan sat (Chen i sur., 2018). Koristeći metodu DETECTR, Broughton i sur., 2020, pokazali su uspješnu detekciju virusa SARS-CoV-2 kojom su navodno dobili bolje i brže rezultate od dijagnostike s metodom RT-PCR.

Za očitavanje rezultata, u početku se koristila tehnika *lateral flow* za čije izvođenje su potrebne skupe imuno-kromatografske trake. To je ograničavalo upotrebu metode DETECTR izvan laboratorija i za testiranja velike populacije ljudi. Korištenje fluorescencije za vizualizaciju rezultata je također kočilo široko rasprostranjeno korištenje metode, s obzirom na to da je za očitavanje potrebna profesionalna oprema koja zahtjeva struju (Misra i sur., 2022). Kako bi poboljšali te nedostatke i omogućili novi bolji način detekcije virusa SARS-CoV-2, Misra i sur., dizajnirali su prijenosni uređaj CRISPR-CUBE. Njime je moguća i amplifikacija, detekcija i vizualizacija rezultata, a kao izvor napajanja služi baterija. Za detekciju drugih zaraznih bolesti, metodu je potrebno optimizirati te u potpunosti automatizirati.



**Slika 5.** Brza identifikacija virusa HPV16 i HPV18 iz ljudskih uzoraka pomoću metode DETECTR.

A – Dijagram sekvenci HPV16 i HPV18 unutar varijabilne regije V L1 kodirajućeg gena obilježenog s proteinom Cas12a. Žuto označene sekvence predstavljaju 5' PAM sekvence

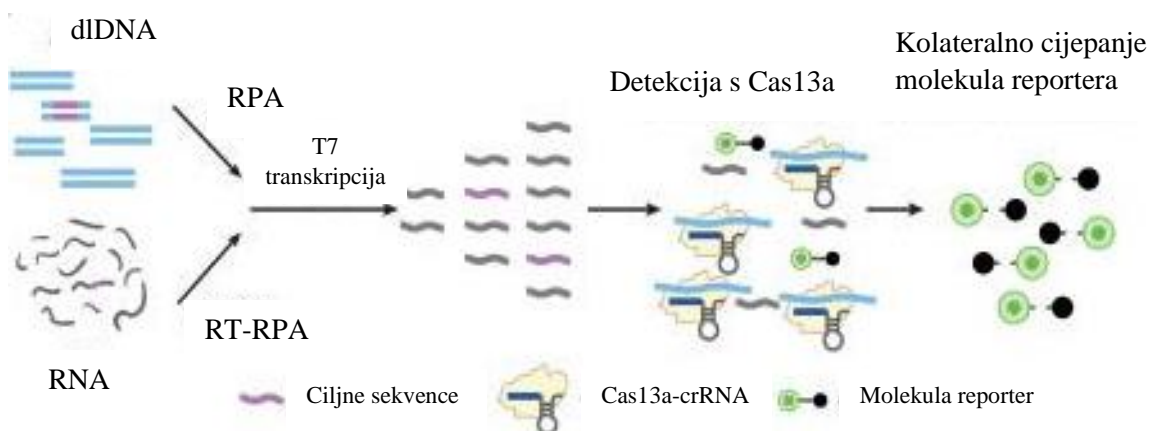
B – Toplinska mapa s normaliziranim srednjim vrijednostima fluorescencije sojeva HPV16 i HPV18 iz ljudskih stanica detektiranih metodom DETECTR

C – Shematski prikaz izvedbe eksperimenta; F – fluorofor, Q – quencher

D – Identifikacija HPV16 i HPV18 metodama PCR i DETECTR iz 25 uzoraka pacijenata (Preuzeto i prilagođeno iz rada Chen i sur., 2018).

### 3.2.2. Metoda SHERLOCK

Metoda **SHERLOCK** (od engl. *Specific High-Sensitivity Enzymatic Reporter UnLOCKing*), prikazana na **Slici 6**, je metoda kojom je moguće detektirati pojedine molekule RNA i DNA putem izotermalne pre-amplifikacije u kombinaciji s proteinom Cas13. Prvotno se amplificiraju ili molekule dDNA metodom RPA ili molekule RNA metodom RT-RPA (od engl. *Reverse Transcription RPA*). Prilikom amplifikacije koriste se dizajnirane početnice s T7 promotorom kako bi, u idućem koraku, RNA polimeraza putem T7 transkripcije prepisala DNA u molekule RNA. Nastale molekule RNA detektiraju pomoću kompleksa Cas13-crRNA koji kolateralno cijepa molekule senzore (Kellner i sur., 2019). Za razliku od proteina Cas12a koji cijepa DNA (DETECTR), protein Cas13 specifično prepoznaje i cijepa samo molekule RNA. Kao i kod DETECTR, prisutnost ciljnih molekula uočava se signalima fluorescencije gdje je intenzitet proporcionalan količini (Mustafa i Makhawi, 2021).



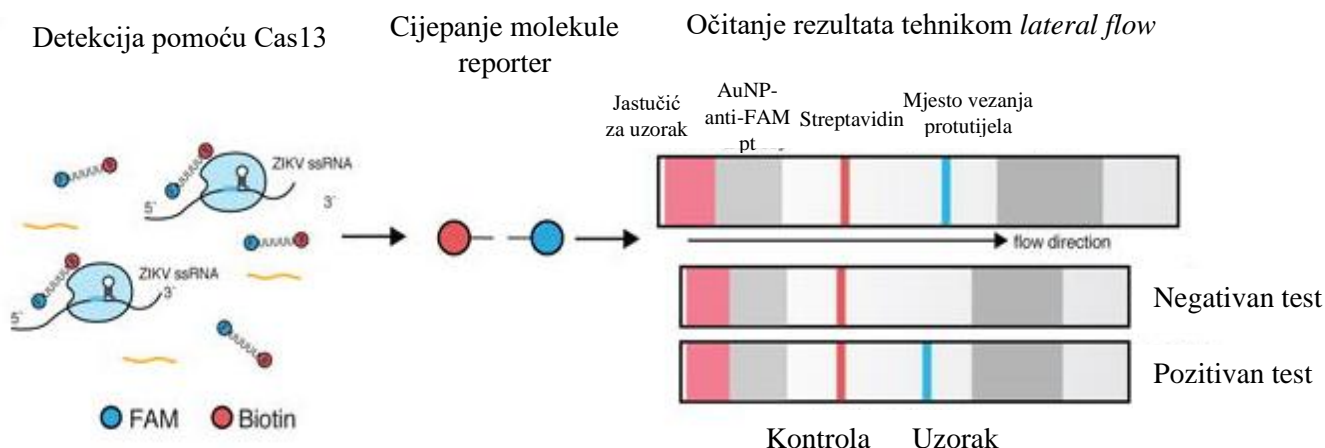
**Slika 6.** Skica mehanizma metode SHERLOCK. Uzorci DNA ili RNA se amplificiraju metodama RPA ili RT-RPA. Amplikoni se prepisuju u molekule RNA putem T7 transkripcije, a zatim ih prepoznaju kompleksi Cas13-crRNA nakon čega dolazi do kolateralnog cijepanja molekula RNA na kojima se nalaze molekule reporter (Preuzeto i prilagođeno iz Kellner i sur., 2019).

### 3.2.2.1. Prednosti i nedostaci metode SHERLOCK

Ova metoda korištena je u detekciji prisutnosti raznih patogenih bakterija, SNP-ova (od engl. *Single Nucleotide Polymorphism*) (Mustafa i Makhawi, 2021), virusa denga (DENG), virusa Zika te SARS-CoV-2 (Lou i sur., 2022). Proteinom Cas13 moguće je detektiranje molekula RNA koncentracije do  $50 \times 10^{-15}$  mol/L (50 fM), što otprilike iznosi 600 000 molekula. Međutim, detektiranje pojedinačnih molekula nije moguće, stoga to predstavlja problem za klinička ispitivanja (Kellner i sur., 2019). Sustav SHERLOCK ima još nedostataka, budući da je za očitavanje dobivenih rezultata potrebna skupa oprema za detekciju fluorescencije (Gootenberg i sur., 2018) te da se radi o kvalitativnoj, a ne kvantitativnoj metodi (Kaminski i sur., 2021).

### 3.2.3. Metoda SHERLOCKv2

Kako bi se ispravili ti nedostaci, godinu dana kasnije smišljena je poboljšana verzija sustava nazvana **SHERLOCKv2**. Nastojalo se razviti sustav kojem nije potrebna nikakva dodatna oprema za očitavanje rezultata. Prva ideja, u kojoj se koristila tehnika kolorimetrije temeljena na cijepanju kompleksa ciljnih nukleinskih kiselina i zlatnih nanočestica (AuNP) pomoću RNaze, nije bila uspješna. Naime, zlatne nanočestice s ciljnom nukleinskom kiselinom tvore agregate koji se očitavaju kao ljubičasto obojenje. Cijepanjem agregata RNazom rezultati su vidljivi kao promjena ljubičaste boje u crvenu (Zhao i sur., 2008). Protein Cas13 nije mogao doseći potrebu razinu kolateralne aktivnosti. Međutim, tehnikom *lateral flow* temeljenoj na cijepanju FAM-biotin molekula reporter bila je moguća dijagnostika jednonančanih molekula RNA virusa Zika te DENV na komercijalno dostupnim *lateral flow* trakama. Na prvoj liniji trake nakuplja se velika količina kompleksa anti-FAM protutijelo-zlatne nanočestice. Ako protein Cas13 detektira ciljnu nukleinsku kiselinu, dolazi do kolateralnog cijepanja molekula reportera te do pojave signala na drugoj liniji (**Slika 7**).



**Slika 7.** Shematski prikaz detekcije *lateral flow* pomoću metode SHERLOCKv2 (Preuzeto i prilagođeno iz Gootenberg i sur., 2018).

### 3.2.3.1. Prednosti i nedostaci metode SHERLOCKv2

Dijagnostika virusa Zika i DENV je ovim sustavom uspješno izvedena u manje od 90 minuta s osjetljivosti od 2 aM. Osim toga, ovom tehnikom moguće je brzo genotipizirati ljudsku genomsku DNA ekstrahiranu iz sline bez pročišćavanja. Očitavanje rezultata moguće je ispod 23 minute koristeći fluorescenciju za očitavanje rezultata, a tehnikom *lateral flow* dva sata (Mustafa i Makhawi, 2021). Ovom metodom moguća je dijagnostika nukleinskih kiselina visoke specifičnosti i osjetljivost. Međutim, nedostatak metode SHERLOCKv2, kao i metode SHERLOCK, je što sadrže korak pripreme i ispitivanja reakcijskih komponenti, za što je potrebna je stručna osoba koja zna pročišćavati proteine. Također, potrebne reakcijske smjese i RNA/DNA oligonukleotidi nisu komercijalno dostupni (Mustafa i Makhawi, 2021).

### 3.2.4. Metoda HUDSON

Kao što je ranije navedeno, jedan od ciljeva razvijanja novih dijagnostičkih tehnika temeljenih na sustavima CRISPR-Cas je što jednostavnija upotreba. Iako je tehnika SHERLOCK uspješna u brznoj dijagnostici, bilo je potrebno osmisliti metodu koja bi se mogla izvoditi na terenu.

Naime, većina virusa dijagnosticira se iz uzoraka sline, urina ili nekih drugih tjelesnih tekućina. Kako bi se izbjegao korak izolacije nukleinskih kiselina iz tjelesnih tekućina u svrhu

dijagnostike, osmišljena je metoda **HUDSON** (od engl. *Heating Unextracted Diagnostic Samples to Obliterate Nuclease*). Kemijskom redukcijom i zagrijavanjem uzoraka tjelesnih tekućina, čestice virusa se liziraju te se visoke količine ribonukleaza inaktiviraju.

#### 3.2.4.1. Prednosti i nedostaci metode HUDSON

Ova metoda je u velikoj prednosti jer se uzorci tretirani metodom HUDSON mogu direktno dodati u RPA reakcijsku smjesu te tako neće naštetiti ni umnažanju ni detekciji nukleinskih kiselina. Također, kombiniranjem metoda HUDSON i SHERLOCK povećana je osjetljivost detekcije slobodnih nukleinskih kiselina virusa dodanih u krv, plazmu, serum, slinu ili urin (Myhrvold i sur., 2018). Kako bi oponašali pravu infekciju virusom Zika, Myhrvold i sur., dodali su zarazne čestice virusa u uzorke tjelesnih tekućina. Ponovnim kombiniranjem dviju metoda, HUDSON i SHERLOCK, detekcija molekula RNA virusa Zika bila je moguća već pri koncentraciji od 90 aM iz uzoraka krvi ili seruma, 0,9 aM u slini i 20 aM u urinu.

Ovom tehnikom dizajnirana je dijagnostička metoda prikladna za testiranja POC zbog odličnih rezultata korištenjem minimalne količine opreme. Ujedno je i dovoljno specifična i osjetljiva kao i metode koje zahtijevaju korak amplifikacije ciljnih nukleinskih kiselina. Smatra se da će, u budućnosti, dijagnostika temeljena na proteinu Cas13 omogućiti brzu i učinkovitu detekciju virusnih infekcija te upravo zato biti korištena svugdje u svijetu.

#### 3.2.5. Metoda CARMEN

Još jedna dijagnostička metoda koja koristi protein Cas13 je metoda **CARMEN** (od engl. *Combinatorial Arrayed Reactions for Multiplexed Evaluation of Nucleic acids*). Njome je uspješno detektirano SARS-CoV-2 i 168 drugih ljudskih virusa uključujući i sojeve virusa ptičje gripe, mutacija HIV-a otpornih na lijekove te podtipove SARS-CoV-2 (Srivastava i sur., 2020). Metoda je temeljena na kemiji metode SHERLOCK, a za reakciju se, za razliku od ostalih metoda, koriste minimalizirani volumeni. Izolirane nukleinske kiseline umnože se metodom PCR te se pripreme detekcijske smjese LwaCas13 (protein Cas13a iz bakterije *Leptotrichia wadeii*) i različitih crRNA (Sumpor, 2021, Kaminski i sur., 2021). Reakcijske i detekcijske smjese pomiješaju se s fluorescentno označenim molekulama reporterima te se spoje u nanolitarske kapljice čineći jednu reakcijsku tubicu. Ovakvim miješanjem svih uzoraka i detekcijskih smjesa dobiva se puno različitih kombinacija od kojih se po dvije kapljice nasumično stavljaju na mikrotitarski čip.



Upotrebom vanjskog električnog polja, dolazi do spajanja kapljica u jednu te tako do spajanja kompleksa LwaCas13a-crRNA s nukleinskim kiselinama iz uzorka. Tamo gdje je došlo do kolateralnog cijepanja molekula reportera, vidljiv je fluorescencijski signal koji se očitava pomoću fluorescencijskog mikroskopa (Sumpor, 2021).

#### 3.2.5.1. Prednosti i nedostaci metode CARMEN

Ova metoda omogućava brzo, detaljno i financijski prihvatljivo dijagnosticiranje patogena. Također, budući da se koriste veoma mali volumeni, smanjena je potrošnja reagensa te je potrebno manje uzoraka (Kaminski i sur., 2021). Metoda je vrlo specifična i osjetljiva te je njome moguće detektiranje sekvenci virusa Zika pri atomolarnoj koncentraciji. Također, jedna mikrotitarska pločica može se koristiti za tisuću testova (Ackerman i sur., 2020).

Međutim, nedostaci metode CARMEN su što je za izvođenje potreban korak pre-amplifikacije, a za analiziranje rezultata profesionalniji mikroskop koji se češće nalazi u dobro opremljenim laboratorijima (Kaminski i sur., 2021).

#### 3.2.6. Metoda HOLMES

Metode bazirane na kolateralnom djelovanju proteina Cas13a pokazuju visoku osjetljivost i specifičnost pri detekciji ciljnih molekula RNA. Međutim, kao što je navedeno ranije, za detekciju ciljnih sekvenci potrebna je T7 transkripcija (Li i sur., 2018). Kako bi se izbjegao taj korak, osmišljena je nova dijagnostička metoda koja se temelji na proteinu Cas12a. Radi se o metodi **HOLMES** (od engl. *one-Hour Low-cost Multipurpose highly Efficient System*) pri kojoj se kao proba koristi fluorescentna jIDNA (Li i sur., 2018). Kao što i samo ime kaže, cijela metoda izvodi se unutar sat vremena, a kao korak pre-amplifikacije koristi se metoda PCR (Kaminski i sur., 2021). U slučaju prisutnosti ciljnih molekula DNA, Cas12a-crRNA formira kompleks s njima. Takav trinarni kompleks zatim in *trans*-cijepa probu jIDNA te se detektira signal fluorescencije (Li i sur., 2018). Za razvoj što preciznije metode HOLMES, trebalo je pronaći najprikladniji protein Cas12a.

### 3.2.6.1. Prednosti i nedostaci metode HOLMES

Najniža koncentracija ciljnih molekula DNA koju kompleks Cas12a-crRNA može detektirati iznosi otprilike 0,1 nmol/L, međutim koristeći metodu PCR kao korak pre-amplifikacije, osjetljivost metode je bolja te doseže  $10^{-6}$  nmol/L (10aM) što je usporedivo sustavu SHERLOCK. Iako oba sustava dosežu atomolarnu osjetljivost i služe u detekciji i RNA i DNA, istraživanja su pokazala da je metoda HOLMES bolja za detekciju molekula DNA, dok metoda SHERLOCK za detekciju RNA (Li i sur., 2018).

Kao i kod sustava DETECTR, kod metode HOLMES nedostatak je što su procesi amplifikacije i detekcije ciljnih molekula odvojeni. Osim što nije praktično za izvođenje, također postoji i šansa kontaminacije uzoraka (Li i sur., 2019).

### 3.2.7. Metoda HOLMESv2

Kako bi spojili ta dva koraka, Li i sur., umjesto proteina Cas12a, koristili su protein Cas12b. Ova poboljšana verzija sustava HOLMES naziva se **HOLMESv2**. Umjesto metode PCR, za amplifikaciju ciljnih molekula koristi se metoda LAMP (od engl. *Loop-mediated isothermal AMPLification*). Budući da se i amplifikacija i detekcija odvijaju u širokom temperaturnom rasponu, Li i sur., testirali su uspješnost sustava od 48 °C do 60 °C da bi otkrili idealnu temperaturu. Sustav HOLMESv2 s ova dva koraka spojena u jedan najbolje funkcionira pri temperaturi od 55 °C.

#### 3.2.7.1. Prednosti i nedostaci metode HOLMESv2

Osim DNA, moguća je detekcija i RNA. Međutim, za razliku od ostalih sustava (SHERLOCK, SHERLOCKv2, HOLMES te DETECTR), potrebno je manje enzima. Zbog visoke točnosti i brzine, metoda HOLMESv2 može poslužiti kao platforma za učinkovito detektiranje stupnja metilacije DNA, kao i za karakteriziranje SNP-ova. U kombinaciji s bilo kojom tehnikom amplificiranja nukleinskih kiselina, metodi HOLMESv2 povećava se osjetljivost. (Li i sur., 2019). Međutim, kao što je ranije navedeno, ova metoda koristi metodu LAMP kao korak amplifikacije. Iako je vrlo učinkovita, za izvođenje metode potrebni su dobro opremljeni laboratoriji sa skupom opremom, stoga metoda nije pogodna za testiranja POC (Keikha, 2018).

## 4. ZAKLJUČAK

Bakterijski obrambeni sustav CRISPR-Cas pruža mogućnost razvitka širokog spektra novih dijagnostičkih metoda kojima je moguće brzo detektirati tumore te bolesti uzrokovane virusima i patogenim bakterijama. Prednosti dijagnostike temeljene na sustavima CRISPR-Cas su što omogućuje brže dobivanje rezultata od uobičajenih tehnika, jednostavnija je te za rad obično nije potrebna skupa oprema. Također, ove metode dijagnostike pokazuju vrlo visoku specifičnost. Međutim, za valjane rezultate, korak amplifikacije nukleinskih kiselina iz uzoraka i dalje prethodi samom dijagnosticiranju. S vremenom se sve više novih metoda razvija, a kako bi se razvila uspješna dijagnostika potrebno je pronaći prikladan protein Cas, način detekcije rezultata te dizajnirati dobru sgRNA. Iako je pandemija uzrokovana virusom SARS-CoV-2 naštetila očuvanju ljudskog zdravlja, također je i pridonijela razvijanju raznih novih dijagnostičkih metoda temeljenih na sustavima CRISPR-Cas. Napredaka u ovom području ima vrlo puno te je potrebno mnogo eksperimenta i kombiniranja već postojećih tehnika.

## 5. LITERATURA

Ackerman, C.M. i sur. (2020) 'Massively multiplexed nucleic acid detection with Cas13', *Nature*, 582(7811), pp. 277–282.

Azhar, Mohd. i sur. (2021) 'Rapid and accurate nucleobase detection using FnCas9 and its application in COVID-19 diagnosis', *Biosensors and Bioelectronics*, 183, p. 113207.

Chaudhuri, A., Halder, K. i Datta, A. (2022) 'Classification of CRISPR/Cas system and its application in tomato breeding', *Theoretical and Applied Genetics*, 135(2), pp. 367–387.

Chen, J.S. i sur. (2018) 'CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity', *Science*, 360(6387), pp. 436–439.

'CRISPR Systems' *Doudna Lab.* [https://doudnalab.org/research\\_areas/crispr-systems/](https://doudnalab.org/research_areas/crispr-systems/) (Pristupljeno: 13.08.2022).

Dongen, J.E. van i sur. (2020) 'Point-of-care CRISPR/Cas nucleic acid detection: Recent advances, challenges and opportunities', *Biosensors & Bioelectronics*, 166, p. 112445.

Dubey, A.K. i sur. (2022) 'Exploring nano-enabled CRISPR-Cas-powered strategies for efficient diagnostics and treatment of infectious diseases', *Journal of Nanostructure in Chemistry*, pp. 1–32.

*Feluda Test » new rapid test for the identification of COVID-19* (2020). <https://www.milenia-biotec.com/en/feluda-test-rapid-covid-detection/> (Pristupljeno: 05.09.2022).

Freije, C.A. i Sabeti, P.C. (2021) 'Detect and destroy: CRISPR-based technologies for the response against viruses', *Cell Host & Microbe*, 29(5), pp. 689–703.

Gootenberg, J.S. i sur. (2018) 'Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6', *Science (New York, N.Y.)*, 360(6387), pp. 439–444.

Hille, F. i sur. (2018) 'The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward', *Cell*, 172(6), pp. 1239–1259.

- Jia, F. i sur. (2020) 'The expanded development and application of CRISPR system for sensitive nucleotide detection', *Protein & Cell*, 11(9), pp. 624–629.
- Kaminski, M.M. i sur. (2021) 'CRISPR-based diagnostics', *Nature Biomedical Engineering*, 5(7), pp. 643–656.
- Karginov, F.V. i Hannon, G.J. (2010) 'The CRISPR system: small RNA-guided defense in bacteria and archaea', *Molecular cell*, 37(1), p. 7.
- Keikha, M. (2018) 'LAMP Method as One of the Best Candidates for Replacing with PCR Method', *The Malaysian Journal of Medical Sciences : MJMS*, 25(1), pp. 121–123.
- Kellner, M.J. i sur. (2019) 'SHERLOCK: Nucleic acid detection with CRISPR nucleases', *Nature protocols*, 14(10), pp. 2986–3012.
- Li, L. i sur. (2019) 'HOLMESv2: A CRISPR-Cas12b-Assisted Platform for Nucleic Acid Detection and DNA Methylation Quantitation', *ACS synthetic biology*, 8(10), pp. 2228–2237.
- Li, S.-Y. i sur. (2018) 'CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection', *Cell Discovery*, 4(1), pp. 1–4.
- Lou, J. i sur. (2022) 'The CRISPR-Cas system as a tool for diagnosing and treating infectious diseases', *Molecular Biology Reports*, pp. 1–11.
- Makarova, K.S., Wolf, Y.I. i Koonin, E.V. (2013) 'The basic building blocks and evolution of CRISPR-CAS systems', *Biochemical Society Transactions*, 41(6), pp. 1392–1400.
- Misra, C.S. i sur. (2022) 'An improved, simple and field-deployable CRISPR-Cas12a assay for the detection of SARS-CoV-2', *Journal of Applied Microbiology*, pp 1–10.
- Mosterd, C., Rousseau, G.M. i Moineau, S. (2021) 'A short overview of the CRISPR-Cas adaptation stage', *Canadian Journal of Microbiology*, 67(1), pp. 1–12.
- Mustafa, M.I. i Makhawi, A.M. (2021) 'SHERLOCK and DETECTR: CRISPR-Cas Systems as Potential Rapid Diagnostic Tools for Emerging Infectious Diseases', *Journal of Clinical Microbiology*, 59(3), pp. e00745-20.

Myhrvold, C. i sur. (2018) 'Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13', *Science*, 360, pp. 444–448.

Pardee, K. i sur. (2016) 'Rapid, Low-Cost Detection of Zika Virus Using Programmable Biomolecular Components', *Cell*, 165(5), pp. 1255–1266.

Rath, D. i sur. (2015) 'The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications', *Biochimie*, 117, pp. 119–128.

Sohail, M. i sur. (2022) 'Molecular reporters for CRISPR/Cas: From design principles to engineering for bioanalytical and diagnostic applications', *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 149, p. 116539.

Srivastava, S., Upadhyay, D.J. i Srivastava, A. (2020) 'Next-Generation Molecular Diagnostics Development by CRISPR/Cas Tool: Rapid Detection and Surveillance of Viral Disease Outbreaks', *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7, <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2020.582499> (Pristupljeno: 13.08.2022).

Sumpor, D. (2021): Metodologija CRISPR/Cas i njezina primjena u dijagnostici, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb

Wang, R. i sur. (2020) 'Rolling Circular Amplification (RCA)-Assisted CRISPR/Cas9 Cleavage (RACE) for Highly Specific Detection of Multiple Extracellular Vesicle MicroRNAs', *Analytical Chemistry*, 92(2), pp. 2176–2185.

Wang, Z. i Cui, W. (2020) 'CRISPR-Cas system for biomedical diagnostic platforms', *VIEW*, 1(3), p. 20200008.

Xu, Y. i Li, Z. (2020) 'CRISPR-Cas systems: Overview, innovations and applications in human disease research and gene therapy', *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, pp. 2401–2415.

Zhao, W. i sur. (2008) 'Enzymatic Cleavage of Nucleic Acids on Gold Nanoparticles: A Generic Platform for Facile Colorimetric Biosensors', *Small*, 4(6), pp. 810–816.

Zhu, Y. i Huang, Z. (2019) ‘Recent advances in structural studies of the CRISPR-Cas-mediated genome editing tools’, *National Science Review*, 6(3), pp. 438–451.

## 6. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 15. studenog 1999. godine u Zagrebu gdje sam nakon završene Osnovne škole Petar Zrinski upisala Drugu gimnaziju. Srednju školu završavam 2018. godine te potom upisujem preddiplomski studij Znanosti o okolišu na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Nakon prve godine ispisujem se, a zatim, na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, upisujem preddiplomski studij Molekularne biologije koji i završavam 2022. godine. Tijekom studija, 2019. godine, sudjelujem u promociji znanosti na Noći biologije u sklopu manifestacije Dan i noć na PMF-u. Iste godine sudjelujem na 25. Smotri Sveučilišta u Zagrebu predstavljajući Biološki odsjek. Godina 2019. i 2021. kao volonter pomažem u organizaciji događaja Brainhack Zagreb, a 2022. sudjelujem u organizaciji Znanstveno-popularnog festivala Women in Science. Iste godine volontiram u udruzi Bioteka u okviru promocije znanosti među djecom.

Od 2019. godine članica sam Studentske sekcije za neuroznanost Medicinskog fakulteta te Mikrobiološke sekcije udruge BIUS. U sklopu Mikrobiološke sekcije 2022., kao koautorica rada Isolation of Bacillus species from caves in the Žumberak nature park, posjećujem 7. Hrvatski mikrobiološki kongres u Sv. Martinu na Muri. Ujedno pišem i za studentski časopis In vivo (brojevi 26 i 27).