

Upotreba sustava CRISPR/Cas u genomskom inženjerstvu

Stojanović, Mario

Undergraduate thesis / Završni rad

2013

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:217:210488>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

UPOTREBA SUSTAVA CRISPR/Cas U GENOMSKOM INŽENJERSTVU

USE OF CRISPR/Cas SYSTEM IN GENOME-EDITING

SEMINARSKI RAD

Mario Stojanović

Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: Doc. dr. sc. Ivana Ivančić-Baće

Zagreb, 2013.

SADRŽAJ

1. UVOD

2. CRISPR/Cas SUSTAV U GENSKOM INŽENJERINHU

2.1. Povećanje specifičnosti Cas9 produljenjem navodeće sekvence u sgRNA

2.2. Cas9 i njezine mutante

2.3. Cas9 nikaza i NHEJ

2.4. Krivo sparivanje baza unutar 20nt vodeće sekvence i ciljne DNA

2.5. Mogućnosti manipulacije genoma posredstvom Cas9 i Cas9n

3. RASPRAVA

4. ZAKLJUČAK

5. LITERATURA

5. SAŽETAK

7. SUMMARY

POPIS KRATICA

CRISPR- clustered regularly interspaced short palindromic repeats

Cas- CRISPR-associated

spacer- razmaknica

repeat- ponavljajući slijed

ZNF- zinc finger nuclease

TALEN- transcription-activator-like effector nuclease

RAMP- repeat associated mysterious proteins

PAM- protospacer adjacent motif

NHEJ- nonhomologous end joining

HDR- homology-directed repair

DN- double nicking

OT site- off-target site

sgRNA- single-guided RNA

crRNA- CRISPR RNA

tracrRNA- trans-activating CRISPR RNA

indel- insertion or deletion

1. UVOD

Bakterije, bile one patogene ili vrlo korisni organizmi u industrijskoj proizvodnji hrane i biotehnologiji, mogu se 'razboljeti' u prisustvu bakterifaga (jednostavnije faga), najučestalijih entiteta na Zemlji. Da bi se obranile od svojih prirodnih neprijatelja bakterije su razvile razne obrambene mehanizme koji utječu na različite dijelove životnog ciklusa faga kao što su blokiranje adsorpcije na bakterijske stijenke, sprječavanje unosa DNA faga i restrikcija unesene DNA.

CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) regija uz *eps* i *rps*, je jedna od hipervarijabilnih lokusa u genomu nekih bakterija. Njezina biološka funkcija nije bila jasna te se smatrala bespotrebim genetičkim materijalom (junk DNA) do 2005. kada su bioinformatičari metodama *in silico* otkrili da se sekvence razmaknica (spacer) podudaraju sa dijelovima sekvence faga i plazmida. To je bila indicija da CRISPR možda ima ulogu u imunološkom sustavu bakterija protiv strane DNA.

Danas je poznato da se regija CRISPR sastoji od identičnih ponavljajućih sljedova DNA sekvenci (ponavljanja/repeats) i visoko varijabilnih sekvenci poznatijih kao razmaknice, koje potječu od genoma faga ili plazmida, i predstavljaju prokariotima 'imunološku memoriju'. Geni *cas* (CRISPR-associated) kodiraju za proteine nukleaze, koji zajedno sa lokusima CRISPR čine sustav CRISPR/Cas odgovoran za obranu prokariotskih stanica od infekcija (Horvath and Barrangou, 2010). Općenito sustav CRISPR/Cas djeluje u tri koraka u kojima prvo nukleaze ili proteini izrezuju dio stranog genoma te ga ugrađuju u CRISPR regiju. U drugom koraku regija CRISPR se prepisuje kao duga pre-crRNA koja se cijepa na zrele crRNA. Zahvaljujući komplementarnosti crRNA i strane DNA nastaje R omča koju cijepa nukleaza te se omogućuje razgradnja strane DNA i onemogućava infekcije (Markova et al., 2011). Postoje 3 tipa sustava CRISPR/Cas sastava podijeljenih prema mehanizmu prekrajanja pre-crRNA transkripta (razmaknica-ponavljanje transkripti) i cijepanja DNA (Slika 1) (Markova et al., 2011). To su:

- CRISPR/Cas sustav tipa I

Lokus sustava CRISPR/Cas tipa I sadži gen *cas3* koji kodira za veliki protein sa odvojenom helikaznom i DNaznom aktivnošću te gene koji kodiraju za kompleks kaskadnog tipa različita sastava. Kompleks Cascade se sastoji od RAMP (repeat associated mysterious proteins) proteina sa RNA endonukleaznom aktivnošću koji kataliziraju procesiranje pre-crRNA u zrele crRNA. Kompleks Cascade-crRNA-Cas3 prepoznaju i cijepaju ciljnu DNA.

- CRISPR/Cas sustav tipa II

Protein Cas9, kodiran genom *cas9*, sam obavlja funkciju stvaranja zrelih crRNA i cijepanja ciljne DNA. Prekrojanje pre-crRNA ide neobičnim mehanizmom koji uključuje stvaranje heterodupleksa između tracrRNA i dijela crRNA. Ovaj heterodupleks prepoznaje specifična RNaza III koja cijepanjem daje zrele crRNA, ali samo u prisutnosti Cas9 proteina. Kompleks tracrRNA-crRNA-Cas9 zatim prepoznaje i cijepa ciljnu DNA.

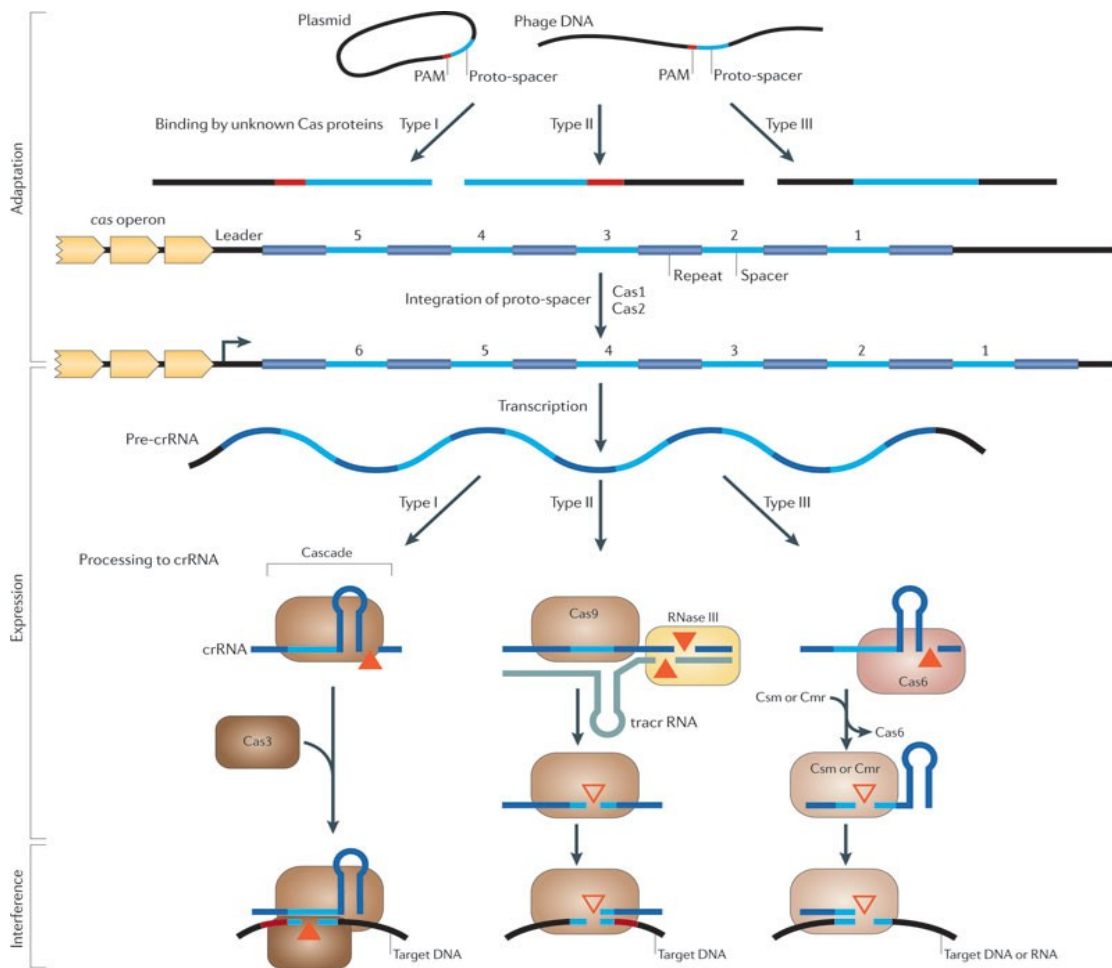
- CRISPR/Cas sustav tipa III

Sustav tipa III sadži polimeraze i RAMP module od kojih su barem neki uključeni u prekrojanje pre-crRNA transkripta u zrele crRNA, analogno kaskadnom kompleksu. Tip III je podijeljen u dva podtipa, podtip III-A i podtip III-B. Dok su ostali sustavi CRISPR/Cas su svrstani u tip U, neklasificirane tipove sustava.

Najzanimljiviji sustav za primjenu je CRISPR/Cas tip II. Princip rada nukleaze Cas9 temelji se na navođenju uz pomoć crRNA i tracrRNA do ciljnog mjesta u DNA gdje se onda vrši urezivanje.

Budući da se Cas9 navodi samo zahvaljujući jednostavnoj komplementarnosti baza između crRNA i DNA moguće ju je pozicionirati bilo gdje u genomu te ju ta prednost čini najboljom za upotrebu u uređivanju genoma (Deltcheva et al., 2012). Navođenje nukleaza na ciljnu DNA pomoću male molekule RNA otvorilo je mogućnost primjene ovog sustava u manipuliranju genetičkim materijalom poput dodavanja i uklanjanja gena (Chang et al., 2013). Prve slične navođene nukleaze napravljene su

početkom prošlog desetljeća. To su sintetske zinc-finger (ZFN) (Miller et al., 2007) i TALEN (Boch et al., 2009) nukleaze. Ove nukleaze se sastoje od dvije domene: DNA vezujuće i nukleazne, Domena koja cijepa DNA djeluju posredstvom nukleazom Fok. One zahtijevaju izradu novih proteina pomoću kojih se vežu na DNA što je vrlo nepraktično. CRISPR/Cas sustav tipa II omogućuje još preciznije i efikasnije rezanje DNA. Kombiniranjem tracrRNA i crRNA od interesa u jednu hibridnu RNA, sgRNA (single-guide RNA), te miješanjem s proteinom Cas9 omogućilo je rezanje DNA na točno željenom mjestu samo uz izradu RNA molekula (Jinek et al., 2012) (Pennisi E., 2013)



Nature Reviews | Microbiology

Slika 1. Tipovi CRISPR/Cas sustava; preuzeto iz Markova et al., 2011.

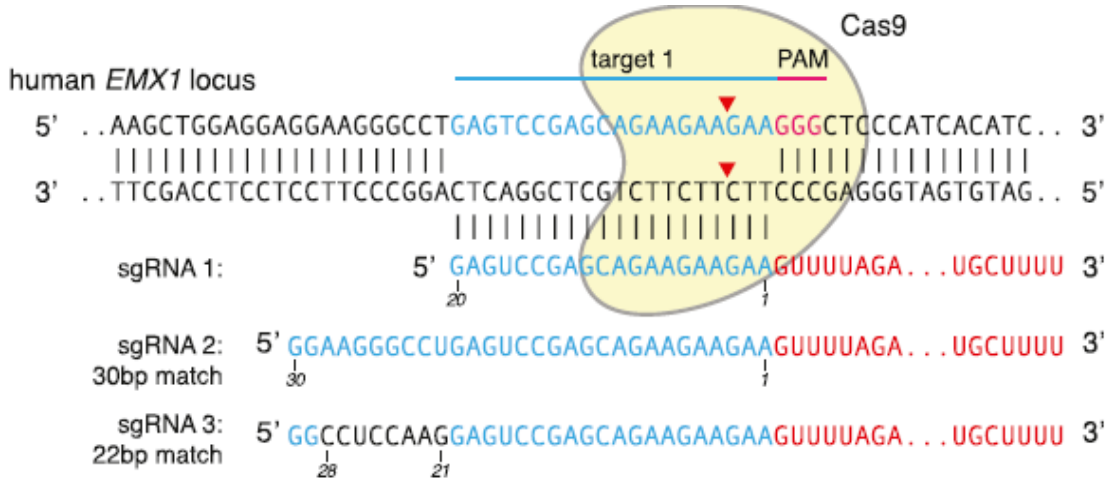
2. CRISPR/Cas SUSTAV U GENOMSKOM INŽENJERINHU

CRISPR/Cas sustav tipa II, točnije RNA navodeća Cas9 nukleaza omogućuje složeno i precizno ciljanje, rezanje i daljnju modifikaciju gena. Zbog stvaranja dvolančanih lomova u DNA, prilikom popravka DNA NHEJ (nonhomologous end-joining) ili HDR (homology-directed repair), nastaju uvjeti za uvođenje izmjena u genomu (Hsu and Zhang, 2012). Tehnika se zasniva na korištenju kimerne navodeće sgRNA koje su u 20 nt komplementarne s ciljnom DNA što omogućuje pozicioniranje Cas9 na željeno mjesto u genomu (Jinek et al., 2012). Unatoč tome što svih 20 nt sudjeluje u prepoznavanju željene sekvence i pridonose specifičnosti ipak može doći do krivog sparivanja baza koje može dovesti do urezivanja DNA na krivom mjestu i stvaranja nepoželjnih mutacija. Ova mala nesavršenost Cas9 nukleaze može umanjiti njezinu upotrebu u mijenjaju genetičkog materijala koje zahtjeva visoku razinu preciznosti. Da bi se sustav poboljšao prvo se pokušalo s produljenjem navodeće sekvence sgRNA koje bi povećala ciljnu specifičnost Cas9, a drugi način poboljšanja sustava CRISPR/Cas je stvaranje mutanata nukleaze Cas9 koji će uvoditi ureze u ciljnu DNA.

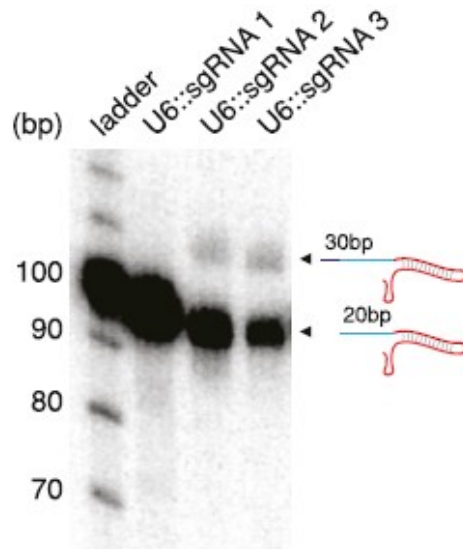
2.1. Povećanje specifičnosti Cas9 produljenjem navodeće sekvence u sgRNA

U svrhu poboljšanja mjesne specifičnosti Cas9 dizajnirane su sgRNA molekule koje su imale vodeću sekvencu duljine divljeg tipa i uvećanu za 10 nt. Sekvenca sgRNA 1 je duljine divljeg tipa (20 nt), a sgRNA 2 i 3 produljenu za 10 nt (30 nt) koje su komplementarne lokusu unutar ljudskog gena *EMX1* (Slika 2). Kako bi se vidjelo pridonosi li duža vodeća sekvenca povećanju mjesne specifičnosti, 10 nt sgRNA 2 napravljena je potpuno komplementarna produžetku gena *EMX1*, a sgRNA 3 je sadržavala 8 nasumičnih baza na položaju 21-28. U nadi da će se mjesna specifičnost povećati i umanjiti efekt krivog sparivanja baza došlo se do iznenađujućeg rezultata. sgRNA 2 i 3 pokazale su jednaku efikasnost vezanja za ciljani lokus unutar gena kao i sgRNA 1. Kako bi provjerili koji je uzrok tome daljnjom analizom tehnikom Northern blotting ustanovljeno je da je većina sgRNA 2 i 3 procesirana te skraćena na duljinu

jednaku kao sgRNA 1 (Slika 3) što je dovelo do zaključka da duljina navodeće sekvence ne utječe na mjesnu specifičnost već da isključivo ovisi samo o komplementarnosti 20 nt navodeće sekvence sgRNA i ciljne sekvence na DNA



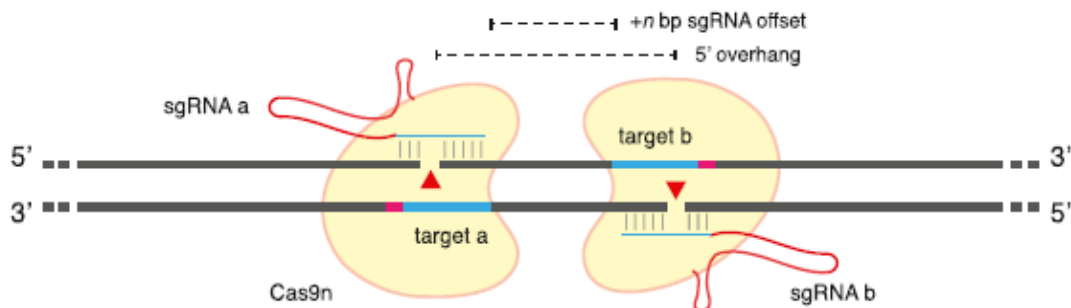
Slika 2. Prikaz ciljanog lokusa unutar ljudskog gena *EMX1* te sgRNA korištenih pri provjeri utječe li njihova duljina na povećanje mjesne specifičnosti.; preuzeto od Ann Ran *et al.*, 2013.



Slika 3. Uzorci sgRNA na gelu nakon interakcije s Cas9; preuzeto od Ann Ran *et al.*, 2013.

2.2. Cas9 i njezine mutante

Nukleaza Cas9 cijepa DNA dvostruku zavojnicu na dva mjesta zahvaljujući dvama nukleaznim centrima, HNH i RuvC (Markova et al., 2011). Jedno mjesto cijepanja specifično ovisni o crRNA, a drugo je nespecifično. Da bi se poboljšao CRISPR/Cas sustav uvedene su mutacije aminokiselina unutar nukleaznih centara Cas9 nukleaze. Zamjenom aspartata alaninom u nukleaznom centru RuvC dobiva se Cas9n mutanta, a zamjenom histidina alaninom u nukleaznom centru HNH dobiva se Cas9H840A mutanta. Ova dva mutanta uvode samo jedan urez u DNA. Ti enzimi se nazivaju nikaze (Cong et al., 2013). Pretpostavlja se da bi dvije Cas9n ili Cas9H840A nikaze vođene parom sgRNA, koji su komplementarne suprotnim lancima ciljnog lokusa u DNA, tvorile par sgRNA-Cas9n kompleksa koji može proizvesti mjesno-specifični dvolančani lom u DNA sa smanjenom mogućnošću nespecifičnog rezanja (Slika 4). Trebalo se provjeriti da li će faktori poput međusobnog razmaka para sgRNA utjecati na kooperativno urezivanje dvaju uparenih sgRNA-Cas9 kompleksa.



Slika 4. Model uparenih Cas9 enzima i mjesno-specifično rezanje; preuzeto od F. Ann Ran *et al.*, 2013.

2.3. Cas9 nikaze i NHEJ

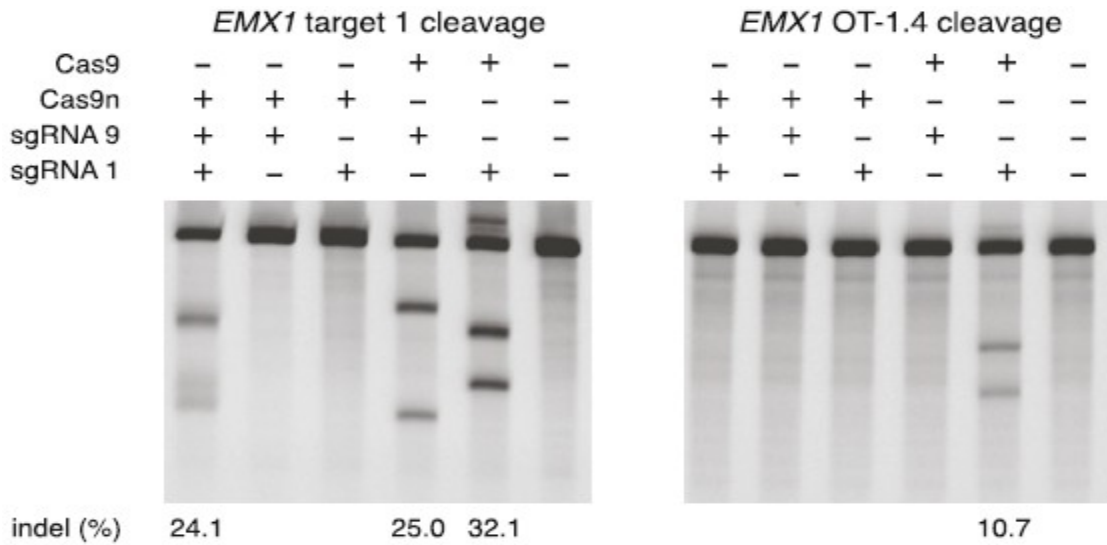
Steričke smetnje između dvije molekule Cas9 navođene parom sgRNA koji priliježu na suprotne lance istoga lokusa gena ciljne DNA mogu utjecati na kooperativno urezivanje i ne dovesti do formiranja indela (insertion and deletion) putem NHEJ-a. Zato su dizajnirani parovi sgRNA međusobno različito razmaknuti i praćena je učestalost

indela. Na temelju nastalih indela moglo se odrediti nakon kojeg razmaka se povećava njihova učestalost. U tu svrhu dizajnirani su setovi parova sgRNA koji su homologni ljudskom genu *EMXI* u rasponu od -200 do 200 pb kako bi tvorili i 5' i 3' preklapajući kraj. Uočeno je da se u parovima s razmakom od -4 do 20 pokazuju učestalost indela i do 40%, gdje -4 označava da se sekvence para poklapaju u terminalna 4 pb dok 20 označava da su krajevi sekvenci razmaknuti za 20 pb. Razmak do 100 pb pokazao je umjerenu učestalost indela. Isti eksperiment je proveden i na genima *DYRK1A* i *GRIN2B*. Rezultati su pokazali da svi parovi sgRNA kojima se sekvenca preklapa u manje od 8 baza pokazuje mjerljivu učestalost indela. Bitno je za naglasiti da su sve pojedinačne sgRNA iz para uzrokovale indele ako su navodile divlji tip Cas9 što dovodi do zaključka da je relativni razmak udaljenosti para sgRNA bitan parametar u predviđanju dvostrukog urezivanja. Nadalje, kako Cas9n i Cas9H840A režu suprotne lance korištenje istog para sgRNA rezultira stvaranju različitih kombinacija 5' i 3' kraja na različitim dijelovima lokusa. Dodatna istraživanja su potrebna kako bi se pronašla praktična upotreba ovog svojstva. Združene Cas9n mogle bi se iskoristiti za unos mutacija na željeno mjesto unutar genoma sa smanjenim nespecifičnim urezivanjem DNA.

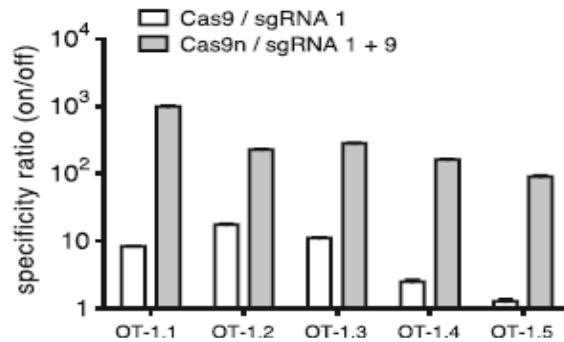
2.4. Krivo sparivanje baza unutar 20nt vodeće sekvence i ciljne DNA

Kako je ustanovljeno da dvostruko urezivanje (DN, double nicking) posreduje visoko efikasnom NHEJ-u bilo je potrebno istražiti postoje li razlike u mjesnoj specifičnosti između mutante Cas9n i divljeg tipa Cas9 ako im se kao kalup ponude DNA sa razlikama u komplementarnosti sa sekvencom sgRNA. Mjerenjem količine nespecifičnog (off-target) rezanja na sintetskim ciljanim lokusima koji sadrže drugačiji raspored i broj promijenjenih baza, zvanim OT lokusima (off-target site) i rezanja na divljem tipu lokusa uočeno je da Cas9n na lokusu gena divljeg tipa uzrokuje stvaranje indela tek uz dodatak para sgRNA za razliku od divljeg tipa Cas9 koji i uz prisustvo samo jedne sgRNA uzrokuje mjerljive količine indela. Na različitim OT lokusima sa različitim parovima sgRNA dobiveni su rezultati pokazali da Cas9 u prisustvu samo jedne od sgRNA daje mjerljive količine indela, dok je eksperiment s Cas9n sa istim parovima sgRNA pokazao negativan rezultat na indele. Dodatna mjerenja frekvencije indela sa

uzorcima koji imaju OT lokuse pokazala su da Cas9n daje zavidne rezultate od 0% dok se frekvencija korištenjem Cas9 penje i iznad 30% (Slika 5). Gledanjem omjera on/off mjesne specifičnosti Cas9n pokazuje 100 puta veću specifičnost za razliku od Cas9. Kako bi to potvrdili isti omjer ispitan je na drugom lokusu te su rezultati dali uvid u specifičnost Cas9n od 200 do 1500 puta veću no divlji tip Cas9 (Slika 6). Analizom ovih rezultata zaključeno je da je Cas9n i više nego pogodan u genomskom inženjerstvu zbog svoje visoke specifičnosti i minimalne OT mutageneze.



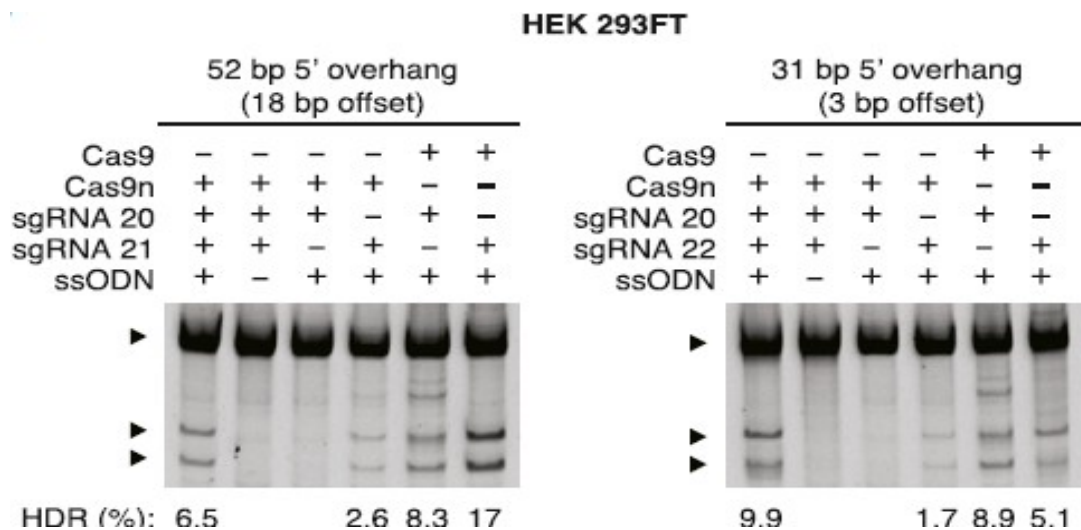
Slika 5. Gelovi kojima je potvrđeno da Cas9n ima manju tendenciju stvaranja indela nego divlji tip Cas9; preuzeto od Ann Ran *et al.*, 2013.



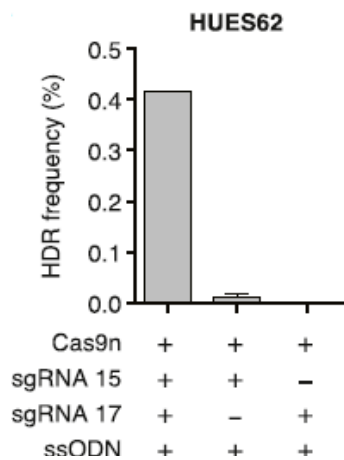
Slika 6. Rezultati dobiveni mjerenjem on/off mjesne specifičnosti Cas9 u usporedbi s Cas9n; preuzeto od Ann Ran *et al.*, 2013.

2.5. Mogućnosti manipulacije genoma posredstvom Cas9 i Cas9n

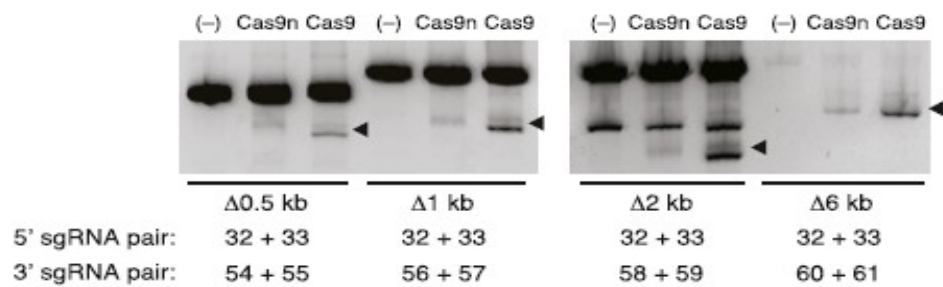
Stimulacijom HDR popravka omogućuje se visoko precizna promjenu unutar genoma nakon uvođenja dvolančanih lomova. Kako bi se ispitala ova mogućnost za Cas9 i Cas9n sastavljen je eksperiment. Cas9 i Cas9n su kombinirani sa dva seta sgRNA molekula i dodatnim jednolančanim oligodeoksioligonukleotidom (ssODN) koji je sadržavao restrikcijsko mjesto za enzim *HindIII* koji služi kao kalup za HDR popravak. Očekivano, kada su pojedini enzimi inkubirani s parom sgRNA na gelu su bile vidljive dodatne vrpce koje upućuju da se ssODN iskoristio kao kalup za HDR, no inkubacija Cas9n sa pojedinim sgRNA molekulama nije pokazala nikakve rezultate dok je Cas9 pokazao niski postotak HDR (Slika 7). U dodatnom eksperimentu na liniji ljudskih matičnih stanica Cas9n je pokazao 40% efikasnosti (Slika 8), no vrlo slabu ako su korištene pojedinačne sgRNA molekule. U ispitivanja ima li razmak sgRNA parova učinak u HDR Cas9n pokazala je efikasnost do 10% kada su korišteni parovi, dok je za pojedinačne sgRNA imala niske vrijednosti za koje je Cas9 pokazala mnogo veću efikasnost. Slijedći korak je bio ispitivanje da li će dvolančani oligodeoksinukleotid (dsODN) ugraditi u DNA. Dvolančani lomovi su uvedeni u DNA te se dvolančani oligodeoksinukleotid ugradio u posredstvom NHEJ puta popravka. Kako je dvolančani oligodeoksinukleotid imao biljege i restrikcijska mjesta, sekvencioniranjem metodom po Sangeru pokazalo je pozitivne rezultate na sve biljege i restrikcijska mjesta. Ideja o uvođenju mikrolelecija je ispitana inkubiranjem uzorka u prisutnosti jednog od dva enzima i dva para sgRNA, (četiri sgRNA po kombinaciji) koje su komplementirale lokusu gena *DYRK1A*. Pratilo se pojavljivanje kratkih DNA segmenata koji odgovaraju duljinom deletiranim dijelovima lokusa. Pokazalo se da su uspješno uvedene mikrolelecije u lokus pomoću Cas9 dok Cas9n nije pokazao pozitivne rezultate na uvođenje mikrolelecija (Slika 9).



Slika 7. Učestalost HDR prilikom korištenja Cas9 i Cas9n u kombinaciji s jednim parom sgRNA i ssODN kao kalupa za HDR; preuzeto od Ann Ran *et al.*, 2013.



Slika 8. HDR frekvencija pri korištenju Cas9n, para sgRNA i ssODN na HUES62 liniji ljudskih matičnih stanica; preuzeto od Ann Ran *et al.*, 2013.



Slika 9. Razlike u uspješnosti pri uvođenju mikrodelecija posredstvom Cas9 i Cas9n; preuzeto od Ann Ran *et al.*, 2013.

3. RASPRAVA

Sumiranjem svih dobivenih rezultata dobiva se jednostavan odgovor, Cas9 i njezina mutirana verzija Cas9n posjeduju golem potencijal za korištenje u genskom inženjeringu. Eksperimenti su pokazali da efikasnost i preciznost ovog sustava ide uz bok ZNF i TALEN sustavima za obrađivanje genoma. Sustav uvelike ovisi o odabiru sgRNA molekula, čija efikasnost ne ovisi o duljini homologne sekvence već o homologiji dvaju sekvenci, čime je smanjena mogućnost pogreške pri navođenju cijelog kompleksa na željeno mjesto i povećana mjesna specifičnost. Iako je u početku pokazivala manju točnost Cas9 spram Cas9n na kraju se pokazalo da oba sustava rade jednakom preciznošću. Cas9n ima ogroman potencijal za vrlo fino i delikatno uvođenje promjena u genom te treba pronaći u kojim granama manipulacije genoma će upravo ovo svojstvo biti od velike koristi. Kako raste interes za CRISPR/Cas sustavom već su napravljene baze sgRNA koje pokrivaju gotovo 90% ljudskog genoma te se radi na njihovom unaprjeđenju kako bi se poboljšala kvaliteta. Unatoč razlikama između Cas9 i Cas9n i jedna i druga su pronašle praktičnu upotrebu u manipulaciji genetičkim materijalom. Ova svojstva CRISPR/Cas sustava mogu se iskoristiti za rezanje neželjenih sekvenci iz genoma, te popravak istih u slučaju neželjenih mutacija te vraćanja divljeg tipa gena što uvelike može poslužiti u genskoj terapiji. Unatoč svim do sada postignutim rezultatima dodatna ispitivanja su potrebna radi unaprjeđenja sustava.

4. ZAKLJUČAK

CRISPR/Cas je vrlo jednostavan sustav koji bakterije koriste kao sredstvo za obranu od infektivnih čestica, otvorio je nove mogućnosti u manipulaciji genoma. Zbog specifičnog načina uvođenja ureza u DNA našao je široku upotrebu od biotehnologije do stvaranja lijekova za liječenje bolesti na razini genoma. Kako je ovo novina u svijetu genetičke manipulacije potrebno je još mnogo rada da bi se sustav usavršio i radio na još višoj razini no sada. Male modifikacije ovog sustava mogu učiniti značajne razlike u točnosti i efikasnosti. Kako i ostale sintetske nukleaze tako i ova će nailaziti na probleme prilikom rezanja i dovoditi do neželjenih mutacija, ali zahvaljujući modifikacijama već je sada reducirana ta mogućnost za nekoliko redova veličine. Korištenjem različitih sgRNA moguće je pristupiti skoro svakom dijelu genoma na jednostavan način. Sustav pokazuje potencijal u uređivanju genoma prokariota te se može očekivati da će jednake rezultate pokazivati i pri uređivanju genoma svih sisavaca pogotovo onih kod kojih nije moguće dobiti matične stanice. Ovaj sustav je jedinstvena platforma koja može poslužiti za stvaranje još boljih i efikasnijih oruđa za manipulaciju genetičkim materijalom koja će imati primjenu u širokom rasponu znanstvenih disciplina.

5. LITERATURA

- Barrangou, R.; Fremaux, C.; Deveau, H.; Richards, M.; Boyaval, P.; Moineau, S.; Romero, D. A.; Horvath, P.; *Science*, (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in Prokaryotes, 315, 1709
- Markova, K. S.; Hatt, D. H.; Barrangou, R.; Browns, S. J. J.; Charpentier, E.; Horvath, P.; Moineau, S.; Mojica, F. J. M.; Wolf, Y. I.; Yakunin, A. F.; van der Oost, J.; Koonin, E. V.; *Nat. Rev. Microbiol.*, (2011) Evolution and classification of the CRISPR/Cas system
- Ran, A. F.; Hsu, P. D.; Lin, C.-Y.; Gootenberg, J. S.; Konermann, S.; Trevino, A. E.; Scott, D. A.; Inoue, A.; Matoba, S.; Zhang, Y.; Zhang, F.; *Cell*, (2013) Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity, 154, 1380-1389
- Yang, H.; Wang, H.; Shivalila, C. S.; Cheng, A. W.; Shi, L.; Jaenisch, R.; *Cell* (2013) One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering, 154, 1370-1379
- Horvath, P.; Barrangou, R.; *Science*, (2010) CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea, 328, p. 167-170
- Pennisi E., *Science*, (2013) The CRISPR craze, 341, 833-836

6. SAŽETAK

CRISPR/Cas sustav u prokariota i arheja igra važnu ulogu u obrani od infektivnih čestica. Izučavanjem principa rada CRISPR/Cas sustava ustanovljeno je da se može iskoristiti u uređivanju kako prokariotskog tako i eukariotskog genoma. Budući da je još uvijek novitet u znanosti veliki broj znanstvenika pokazuje interes za izučavanje i poboljšanje ovog sustava. Svi dosadašnji rezultati upućuju na svijetlu budućnost u primjeni CRISPR/Cas sustava u svim granama znanosti

U ovom radu opisano je na koji način se sustav CRISPR/Cas pokušalo prilagoditi da bude što efikasniji i precizniji te koje su prednosti divljeg tipa CRISPR/Cas sustava spram mutiranog. Nadalje je opisana na koji način se mogu iskoristiti svojstva divljeg tipa i mutiranog tipa Cas9 nukleaze te njegova praktična primjena u mijenjanju genoma.

7. SUMMARY

CRISPR/Cas system plays important role in defence from infective particles in Prokaryotes and Arhaea. The mechanism of CRISPR/Cas system can be used in genome-editing not only in Prokaryotes but also in Eukaryotes. Because its a novelty, a great number of scientists show interest in studying and possible improvement of this system. To date all results indicates show that in the near future the use of this system will be inevitable in various disciplines of science.

This paper describes recent results of the use of CRISPR/Cas system. It also shows how it can be modified to improve its efficiency and precision and which are the advantages of then wilde type CRISPR/Cas in contrast to mutant form. Further more it is described the practical use of wild type and mutated type of Cas9 nuclease and how it can be used in genome editing