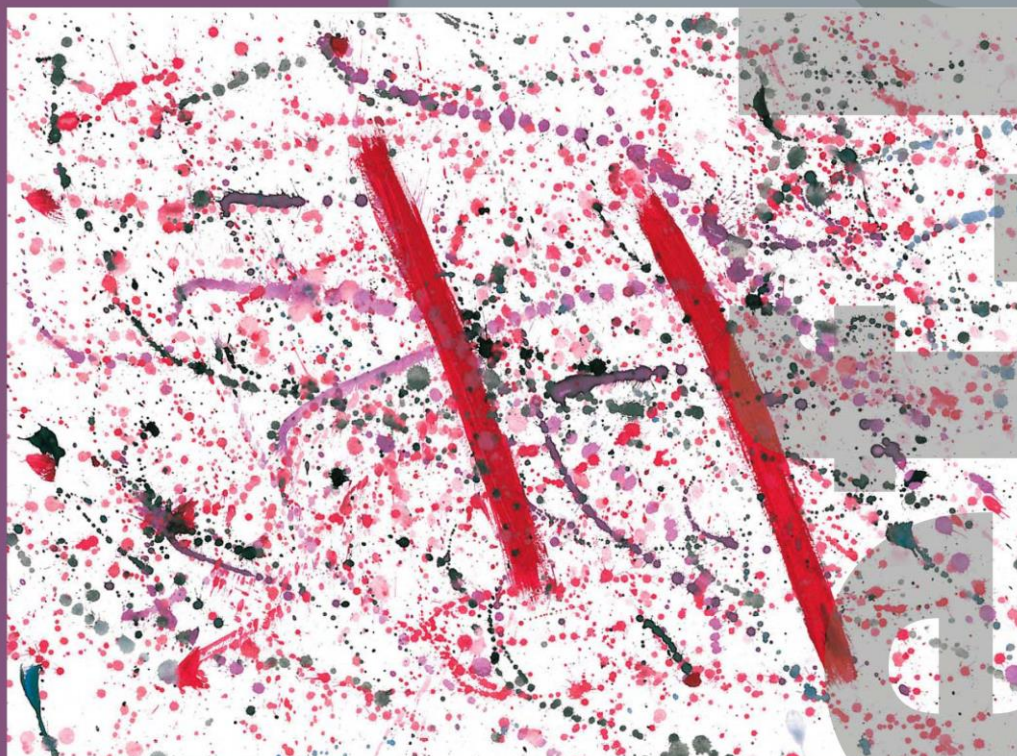


SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET
LIST MEDICINSKOG FAKULTETA
www.mef.hr
ISSN 1332-960X



Prosinac 2016 / Godina 35, br. 2

Tema broja:
***Umjetnost i sport na
Medicinskom fakultetu
Sveučilišta u Zagrebu***

Bakterijski sustav CRISPR/Cas9: oruđe precizne modifikacije genoma

Tehnologija CRISPR/Cas9 moćno je novo oruđe molekularne biologije i medicine kojim možemo modificirati gene po našim željama. Treba istaknuti da je riječ o pouzdanoj metodi koja može ciljano i vrlo precizno unijeti promjene u genom živih stanica. Stoga slobodno možemo zaključiti da je uporaba CRISPR/Cas9 sustava za izmjenu gena revolucionarizirala polje modifikacije genoma. Sam sustav baziran je na dvjema ključnim komponentama, endonukleazi Cas9 i ciljno specifičnoj RNA tzv. *target-specific RNA*, *single guide RNA* ili skraćeno *sgRNA*. Sustav je otkriven kod prokariota gdje bakterijama služi za obranu od virusnih i drugih napadajućih molekula DNA. Prokarioti su evoluirali sofisticiran adaptivni „imunološki sustav“ koji se zasniva na lokusima u bakterijskom genomu nazvanim CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat*) i na raznovrsnoj skupini gena Cas. U ovom procesu adaptivne imunosti bakterijske stanice memoriraju prethodne infekcije tako da izrežu i integriraju kratke sekvence napadajućeg virusnog genoma u svoje CRISPR lokuse.

Integrirane sekvence eksprimiraju se kao male CRISPR RNA (crRNA) koje prilikom ponovnih infekcija prepoznaju virusne sekvence po principu komplementarnosti i dovlače enzime Cas9 ciljano do njih. Cas9 (CRISPR associated 9) je nukleaza koja pravi dvolančane lomove u molekuli DNA na svim mjestima na kojima je ciljno specifična RNA dovede. Pojednostavljeno rečeno, ova će nukleaza rezati sve što joj ciljna sekvenca donese. Pri tom treba naglasiti da se genska modifikacija ostvaruje iskoristavanjem prirodnog staničnog mehanizma za popravak dvolančanih lomova u DNA, a to je mehanizam homologne rekombinacije. Radi se o tipu genetičke rekombinacije koji uključuje izmjenu homolognih sekvenci, a iniciran je lomom obiju strana molekule DNA. Genetičkom rekombinacijom dolazi do fizičke izmjene materijala između DNA dupleksa, a izmjena homolognih sekvenci DNA toliko je precizna da nijedan par baza neće biti izgubljen ni dodan. Tako su upravo ovi intrinzični stanični mehanizmi iskorišteni za preciznu modifikaciju, tj. ispravke i preinake gena, pa posljednjom i čitavih ge-

noma. Danas postoje umjetno konstruirani sustavi CRISPR/Cas9 koji se koriste fuzioniranom RNA. Takva specifična RNA konstruirana po našim željama, veže se na ciljno mjesto u genomu, dovodi Cas9, posreduje u rezanju ciljnih mjesta u DNA i aktivira mehanizam popravka homolognom rekombinacijom.

Znanstvenice Jennifer Doudna i Emmanuelle Charpentier suautorice su ključne studije objavljene 2012., koja je pokazala primjenu i tehničku snagu već otprije poznatog bakterijskog adaptivnog „imunološkog sustava“ CRISPR/Cas9 (slika 1). Zanimljivo je da je 2012. i 2013. godine ovo tehnološko otkriće osvojilo drugo mjesto natječaja *Breakthrough of the Year* poznatog časopisa Science, a 2015. tu nominaciju je i osvojilo. *Technology Review* poznatog Massachusetts Institute of Technology (MIT) proglasilo je tehnologiju CRISPR/Cas9 jednom od najpromulzivnijih tehnologija za godine 2014. i 2016. Slika 1 zorno prikazuje povećanje broja objavljenih znanstvenih radova koji se koriste ovom tehnikom (prema podatcima PubMed).

Svojstvo sustava prokariota CRISPR/Cas9 da nacijla specifične sekvence uporabom RNA koje je danas moguće sintetizirati po želji, otvorilo je nove pristupe u modificiranju genoma sa širokim rasponom primjena u stanicama i organizmima, kao i velikim potencijalom za terapijske svrhe. Modificiranje genoma s pomoću tehnologije CRISPR/Cas9 prvi je puta primijenjeno u sisavaca 2013. godine. U terapijske se svrhe CRISPR-Cas9 može primijeniti na nekoliko načina: može ispraviti kauzalne mutacije u monogenim bolestima i tako osloboditi osobu bolesnog fenotipa; može preinčiti genom patogena (npr. HIV) ili inducirati protektivnu ulogu gena u tkivima domaćina; a također je pokazao potencijalnu primjenu u genskoj terapiji karcinoma tako da ciljano inaktivira onkogene ili aktivira tumor supresorske gene. U prosincu 2015. „The International Summit on Human Gene Editing“ održan je u Washingtonu pod vodstvom Davida Baltimorea. Članovi nacionalnih akademija znanosti Amerike, Britanije i



Znanstvenice Doudna i Charpentier i prva stranica njihove studije objavljene 2012. koja je pokazala primjenu i tehničku snagu CRISPR/Cas9. Graf baze PubMed prikazuje broj navoda metode CRISPR/Cas9 u znanstvenim publikacijama od 2002. godine.

Kine raspravljali su o metodologiji CRISPR/Cas9 i etičkim pitanjima modificiranja gena u zametnoj lozi. Na skupu je zaključeno da se bazična i klinička istraživanja dalje nastavljaju uz primjerene pravne i etičke smjernice. Istaknuta je distinkcija između kliničke uporabe metodologije CRISPR/Cas9 u somatskim stanicama, gdje su učinci popravka ograničeni na jednu osobu, nasuprot uporabi u zametnim stanicama, gdje bi popravke genoma naslijedile buduće generacije. Modificiranje i popravljivanje zametnih stanica imalo bi dalekosežne i nenamjerne posljedice na evoluciju čovjeka i s genetičkog aspekta (interakcije gena i okoliša) i s kulturološkog (socijalni darvinizam), stoga je promjena gametocita i embrija u svrhu dobivanja nasljednih promjena u ljudi, proglašena neodgovornom. Na skupu je također inicirano stvaranje međunarodnog foruma koji bi kontinuirano raspravljao o tim problemima te harmonizirao pravne regulacije u različitim zemljama.

Nives Pećina-Šlaus

Ovaj tekst bazira se na predavanju koje je održano u sklopu 3. simpozija Apoptoza i novotvorine održanog u HAZU 22. ožujka, 2016.

Literatura

- Daley JM, Kwon Y, Niu H, Sung P. Investigations of homologous recombination pathways and their regulation. *Yale J Biol Med.* 2013;86(4):453-61.;
- Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science.* 2014;346(6213):1258096. doi: 10.1126/science.1258096.;
- Eid A, Mahfouz MM. Genome editing: the road of CRISPR/Cas9 from bench to clinic. *Exp Mol Med.* 2016 Oct 14;48(10):e265. doi: 10.1038/emmm.2016.111.;
- Hille F, Charpentier E. CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2016 Nov 5;371(1707). pii: 20150496. doi: 10.1098/rstb.2015.0496.
- Hu X. CRISPR/Cas9 system and its applications in human hematopoietic cells. *Blood Cells Mol Dis.* 2016 Oct 2;62:6-12. doi: 10.1016/j.bcmd.2016.09.003.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 2012;337(6096):816-21. doi: 10.1126/science.1225829.
- Ledford H. Where in the world could the first CRISPR baby be born? *Nature.* 2015 Oct 15;526(7573):310-1. doi: 10.1038/526310a.
- Liang P, Xu Y, Zhang X, Ding C, Huang R, Zhang Z, Lv J, Xie X, Chen Y, Li Y, Sun Y, Bai Y, Songyang Z, Ma W, Zhou C, Huang J. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human triploid zygotes. *Protein Cell.* 2015;6(5):363-72. doi: 10.1007/s13238-015-0153-5.
- Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nat Rev Genet.* 2010;11(3):181-90. doi: 10.1038/nrg2749.
- Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, Dohmae N, Ishitani R, Zhang F, Nureki O. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell* 2014;156(5):935-49. doi:10.1016/j.cell.2014.02.001.
- Niu Y, Shen B, Cui Y, Chen Y, Wang J, Wang L, Kang Y, Zhao X, Si W, Li W, Xiang AP, Zhou J, Guo X, Bi Y, Si C, Hu B, Dong G, Wang H, Zhou Z, Li T, Tan T, Pu X, Wang F, Ji S, Zhou Q, Huang X, Ji W, Sha J. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell.* 2014;156(4):836-43. doi: 10.1016/j.cell.2014.01.027.
- Sánchez-Rivera FJ, Jacks T. Applications of the CRISPR-Cas9 system in cancer biology. *Nat Rev Cancer.* 2015 Jul;15(7):387-95. doi: 10.1038/nrc3950. Epub 2015 Jun 4.
- Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol.* 2014;32(4):347-55. doi: 10.1038/nbt.2842.