

SISTEM CRISPR/CAS9 IN NJEGOVA UPORABA V GENETSKEM INŽENIRSTVU

THE CRISPR/CAS9 SYSTEM AND ITS APPLICATIONS IN GENETIC ENGINEERING

AVTORICI / AUTHORS:

Anja Srpčič, mag. lab. biomed.¹
doc. dr. Nika Lovšin, univ. dipl. kem.²

¹ Univerzitetni klinični center Ljubljana,
Klinični oddelek za revmatologijo,
Vodnikova cesta 62, 1000 Ljubljana

² Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Katedra za klinično biokemijo,
Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:
E-mail: marija.nika.lovsin@ffa.uni-lj.si

1 GENETSKO UREJANJE

Genetsko urejanje je skupina tehnologij, ki temeljijo na uporabi encimov za tarčno spreminjanje nukleotidnega zapo-

POVZETEK

Sistem CRISPR/Cas9 je nedavno odkrit pridobljeni bakterijski imunski odziv proti virusom in tujim DNA, ki vstopajo v bakterijsko celico. Sistem CRISPR/Cas9 tujo DNA po vstopu v bakterijsko celico prepozna in jo razgradi. Pri tem del tuje DNA vključi v lasten genom, tako da ostane »spomin« na tujo DNA, ki omogoča hitro prepoznavo in razgradnjo pri vnovični okužbi. Bistvo sistema je prepoznavanje kratkih zaporedij tuje DNA s pomočjo vezave na komplementarno kratko zaporedje RNA in endonukleazo Cas9, ki po prepoznavi in vezavi tujo DNA razgradi. Z odkritjem tega imunskega sistema bakterij so se pojavile široke možnosti za njegovo uporabo v biotehnoške namene. V zadnjem desetletju so razvili metode za izbijanje, utišanje in aktivacijo praktično katerega koli gena v katerem koli organizmu. Sistem CRISPR/Cas9 omogoča hitro, učinkovito in specifično spreminjanje genoma. V preglednem članku predstavljamo mehanizem delovanja imunskega odziva bakterij CRISPR/Cas9 in možnosti uporabe v biotehnoške in biomedicinske namene.

KLJUČNE BESEDE:

CRISPR/Cas9, genetsko urejanje, genska terapija, izbijanje genov

ABSTRACT

The CRISPR/Cas9 system is a recently discovered bacterial adaptive immune response against viruses and foreign DNA that enters a bacterial cell. The CRISPR/Cas9 system recognises and degrades foreign DNA after entering a bacterial cell. At the same time, the system incorporates part of the foreign DNA into its own genome, so that it remains as a "memory" of the foreign DNA, which enables rapid recognition and degradation in case of repeated infections. The essence of the system is the recognition of the foreign DNA by a complementary short sequence of RNA and the endonuclease Cas9, which recognise foreign DNA, bind and degrade it. With the discovery of this bacterial immune system, wide possibilities have appeared for its use in biotechnological purposes. In the last decade, methods have been developed for knocking out, knocking down and activating any gene in any organism. The CRISPR/Cas9 system enables fast, efficient and



specific modification of the genome. In this review article, we present the mechanism of CRISPR/Cas9 immune response and the possibilities of its use in biotechnology and biomedical sciences.

KEY WORDS:

CRISPR/Cas9, gene editing, gene therapy, knock-out

redja DNA v živem organizmu. Tehnologije genetskega urejanja so se začele razvijati v 70. letih prejšnjega stoletja po odkritju encimov DNA-ligaze in DNA-polimeraze (1). Največji napredek v razvoju teh tehnologij je sledil prvemu sekvenciranju človeškega genoma (*Human Genome Project*, 2003) (2), od takrat pa se je uporaba različnih tehnik urejanja genoma razširila na področja funkcijske genomike, medicine in biotehnologije.

Do odkritja zgradbe in delovanja sistemov CRISPR/Cas9 so bile možnosti urejanja genoma omejene na uporabo modificiranih meganukleaz, nukleaz cinkovih prstov in nukleaz TAL-efektorjev (TALENs), ki pa zaradi potrebe po modifikaciji proteina niso visokozmogljive (3, 4). Za razliko od teh metod se sistem CRISPR/Cas9 zanaša samo na zaporedje kratke molekule RNA in na delovanje od RNA odvisnega encima endonukleaze Cas9. Zaradi enostavnosti načrtovanja ter široke uporabnosti je ta sistem postal nepogrešljivo biotehnoško orodje za urejanje genoma (5). Z njim lahko načrtujemo prekinitev dvojne vijačnice DNA znotraj katerega koli od 20 baznih parov dolgega zaporedja na DNA, ki leži ob zaporedju PAM (*protospacer adjacent motif*), ki je dva do šest baznih parov dolgo zaporedje DNA, ki ga prepozna encim Cas9. Najpogostejše uporabljana različica encima Cas v genskem inženirstvu je SpCas9, izolirana iz bakterije *Streptococcus pyogenes*, ki se z veliko intenziteto veže na PAM-zaporedje NGG, pri čemer je N nukleotid poljubne vrste, G pa gvaninski nukleotid. Trinukleotidno zaporedje NGG se v genomu pojavi povprečno vsakih osem nukleotidov, zato je CRISPR/Cas9 uporaben za modificiranje praktično katerega koli gena (4).

2 CRISPR

CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) je genski lokus serije visokoohranjenih, ponavljajočih se nukleotidnih zaporedij, ki jih najdemo pri nekaterih arhejah in bakterijah. Zaporedja CRISPR, ki so jih do sedaj odkrili

pri približno 40 % klasificiranih vrst bakterij in pri približno 90 % klasificiranih vrst arhej, se med vrstami razlikujejo. Pri sorodnih vrstah organizmov lahko vsebujejo določeno stopnjo homologije, pri posamezni vrsti organizma pa je stopnja variabilnosti med zaporedji CRISPR minimalna (5, 6). Večinoma se nahajajo na kromosomski DNA, lahko pa tudi na plazmidni DNA (7). Enote ponavljajočih se zaporedij CRISPR so dolge 19 do 48 baznih parov, med seboj pa so ločene z 21 do 72 baznih parov dolgimi neponavljajočimi se zaporedji, ki jih imenujemo vmesniki (slika 1) (7, 8).

Večina ponavljajočih se enot je deloma palindromnih, njihovi konci pa vsebujejo določeno stopnjo simetrije in zaporedja treh ali štirih istovrstnih nukleotidov, kar skupaj vodi v stabilne sekundarne strukture elementov CRISPR (6, 7). Običajno število vmesnikov v lokusu je približno 50, pri določenih bakterijah rodu *Chloroflexus* pa so opisali večji lokus CRISPR s 375 vmesniki. V posameznem genomu se lahko pojavi en sam lokus, lahko pa jih je tudi več. Največje število lokusov CRISPR, to je 18, so identificirali v genomu arheje vrste *Methanocaldococcus jannaschii*, pri kateri elementi sistema CRISPR predstavljajo približno 1 % celotnega genoma (7). Prvič so lokus CRISPR opisali leta 1987 pri genomu bakterij *Escherichia coli* seva K12, čemur so sledila odkritja podobnih lokusov s ponavljajočimi se zaporedji v genomih nekaterih drugih vrst prokariotov (9). Leta 2000 so opisana zaporedja prvič prepoznali kot družino sorodnih lokusov, ki so jih takrat poimenovali *SRSR* (*short regularly spaced repeats*) (10). Dve leti kasneje so Jansen in sod. vpeljali akronim CRISPR in poročali o odkritju s CRISPR povezanih genov *Cas* (*CRISPR-associated genes*) (6). Pogosto opaženo sopojavljanje zaporedij CRISPR in genov *Cas* je vodilo raziskave v smer odkrivanja možnih bioloških funkcij ter natančnega opisa strukturnih elementov sistema CRISPR/Cas. Leta 2005 so v treh med seboj neodvisnih raziskavah *in silico* prepoznali visoko stopnjo homologije med nukleotidnim zaporedjem vmesnikov ter zaporedjem različnih eksogenih virov DNA, med katere uvrščamo virusno, plazmidno in bakteriofagno DNA. Dognanje o homologiji je sprožilo kasneje potrjena ugibanja, da je sistem CRISPR/Cas udeležen pri imunskem odzivu arhej in bakterij proti vdirajoči DNA iz zunanjih virov (7).

2.1 BIOLOŠKA FUNKCIJA SISTEMA CRISPR PRI BAKTERIJAH IN ARHEJAH

Danes je znano, da sistem CRISPR/Cas v gostiteljski celici prepozna tujo DNA in jo cepi, tako pa celico obrani

pred zunanjimi in invazivnimi DNA (7). Raznolikost znanih sistemov CRISPR/Cas je glede na zgradbo in funkcijo zelo široka. Glede na prisotnost različnih genov *Cas*, organizacijo lokusa CRISPR, mehanizem delovanja in tipe interakcij s tarčno nukleinsko kislino, ki je lahko RNA ali DNA, trenutno delimo CRISPR/Cas na dva razreda, šest tipov in 33 podtipov, klasifikacija pa se hitro spreminja z vse boljšim poznavanjem sistema in identifikacijo novih različic sistema (8, 11–13). Za gensko inženirstvo je ključnega pomena sistem tipa IIa oz. CRISPR/Cas9 (11). V lokusu CRISPR tipa IIa se poleg gena *Cas9* nahajajo še geni *Cas1*, *Cas2* in *Csn2*, ki vršijo različne funkcije pri imunskem odzivu (11).

Osnovno funkcijo sistema CRISPR/Cas *in vivo* razdelimo v tri ključne faze: adaptacija, izražanje in interferenca (slika 1) (8). Adaptacija je odziv sistema na prvo izpostavljenost določenemu invazivnemu nukleotidnemu zaporedju, ki ga sistem tipa II prepozna in s pomočjo nukleazne aktivnosti proteinov *Cas* fragmentira v t. i. protovmesnike. Ti se vgradijo v lokus CRISPR gostiteljske celice med ponavljajočo se zaporedja in kot novonastali vmesniki predstavljajo genetski zapis preteklih okužb gostiteljske celice (3, 11).

Adaptaciji gostiteljske celice sledi izražanje ponavljajočih se enot CRISPR ter vmesnikov, ki se s procesom transkripcije skupaj prevedejo v dolgo prekurzorsko pre-crRNA (*pre-CRISPR RNA*) (8, 14). Poleg pre-crRNA se iz lokusa CRISPR tipa II sintetizira tudi več molekul transaktivirajoče CRISPR RNA *tracrRNA* (*trans-activating crRNA*), ki zaradi komplementarnosti s ponavljajočim se zaporedjem CRISPR tvorijo duplekse RNA z novonastalo pre-crRNA (slika 1b). Iz dupleksa pre-crRNA:tracrRNA pod vplivom encima RNaza III, ki s svojo katalitično aktivnostjo cepi pre-crRNA na posamezne enote vmesnikov, nastane več zrelih RNA dupleksov crRNA:tracrRNA (slika 1c). Posamezni duplesi aktivirajo nukleazo *Cas9* in se z njo povežejo v kompleks (slika 1c) (14). Ena zrela enota crRNA v dupleksu RNA predstavlja transkript enega vmesnika. Vsak transkript vmesnika je na obeh koncih obdan s krajšima odsekoma zapisa RNA za ponavljajočo se enoto lokusa CRISPR (11). Aktiviran encim *Cas9* je osnova za tretjo fazo odziva sistema CRISPR tipa II, interferenco (slika 1d) (8). Gre za fazo, ko že aktivirani kompleksi nukleaze *Cas9* in dupleksa crRNA:tracrRNA nadzorujejo znotrajcelično okolje gostiteljske celice. Ob tem prepoznavajo in uničujejo eksogeno DNA, znotraj katere se nahajajo sekvence, identične vmesnikom, ki jih je celica v fazi adaptacije vgradila v svoj lokus CRISPR (11).

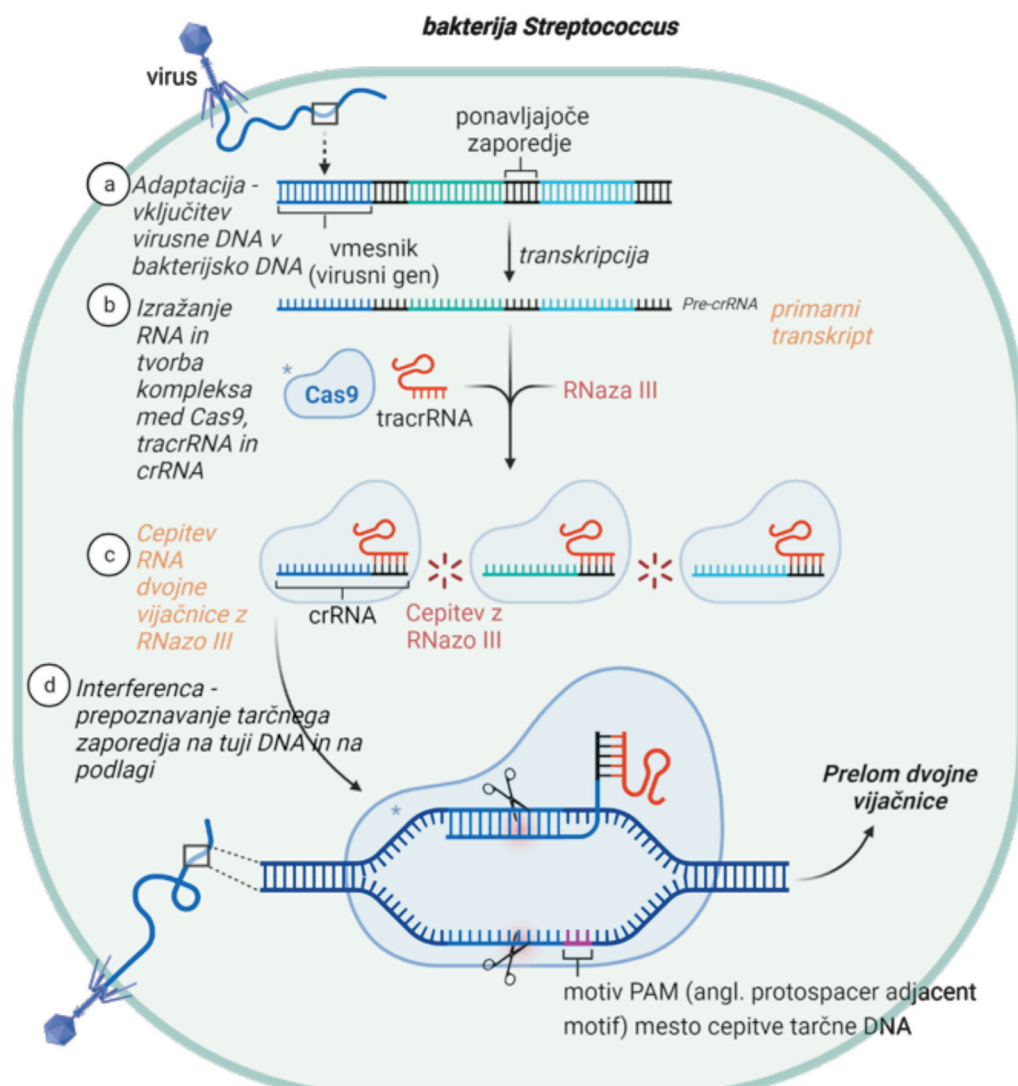
Prepoznavanje tarčnega zaporedja temelji na njegovi komplementarnosti zaporedju crRNA, cepitev DNA pa temelji

na od RNA odvisni nukleazni aktivnosti *Cas9* (5). Poleg prisotnosti protovmesnika je na tarčni nukleinski kislini za ustrezno delovanje sistema CRISPR/Cas9 potrebna tudi prisotnost zaporedja PAM (slika 1), dva do šest nukleotidov dolgega zaporedja neposredno navzdol tarčnega zaporedja DNA, ki je odvisno od različice proteina *Cas* (4, 5).

Z vezavo na *Cas9* v sistemu CRISPR tipa IIa PAM ojača jakost in podaljša čas trajanja medmolekulskih interakcij med tarčno DNA in kompleksom RNA:*Cas9*, tako pa omogoči učinkovitejšo nukleazno aktivnost proteina *Cas9*. Poleg tega gostiteljski celici omogoča razlikovanje med lastno in tujo DNA, saj lokus CRISPR gostiteljske celice ne vsebuje zaporedij PAM (11, 14). Za ustrezno delovanje sistema CRISPR/Cas9 proti tuji DNA je ključna prisotnost PAM ter komplementarnost v zaporedju prvih osmih do desetih nukleotidov, ki se nahajajo na tarčni DNA neposredno ob PAM, komplementarnost od PAM bolj oddaljenih delov tarčne DNA pa je za delovanje CRISPR/Cas9 manj pomembna (14). Pomembnost zaporedij PAM je tolikšna, da točkovne mutacije v teh zaporedjih bakteriofagom in virusom lahko omogočijo odpornost proti delovanju sistema CRISPR/Cas9 (11). CRISPR/Cas9 tako vpliva na evolucijo mutacij pri bakteriofagih in virusih (7).

Nukleaza *Cas9* spada v družino genov *Cas*, ki se nahajajo ob lokusu CRISPR in vsebujejo funkcionalne domene, značilne za nukleaze, helikaze, polimeraze in proteine, ki vežejo polinukleotide (7). Zaradi lokacije v genomu in vsebnosti omenjenih funkcionalnih skupin so se že hitro po identifikaciji elementov CRISPR pojavila ugibanja, da geni *Cas* sodelujejo pri delovanju sistema CRISPR ter da njihova funkcija temelji na interakciji z nukleinskimi kisljinami (6). Kasnejša odkritja vse večjega števila proteinov *Cas* so vodila do ugotovitve, da posamezni proteini *Cas* vršijo različne funkcije, med drugim fragmentirajo tujo DNA med adaptacijo in tako pomagajo ustvarjati zbirko vmesnikov, ter uničujejo invazivne tuje nukleinske kisline, ki vdrejo v celico (7). *Cas9* je večdomenska, od RNA odvisna endonukleaza, sestavljena iz dveh nukleaznih domen, domene za vezavo tarčne DNA in domene za vezavo RNA (4, 14, 15). Nukleazni domeni sta HNH, ki cepi tarčno verigo, komplementarno zaporedju crRNA, ter RuvC-podobna nukleazna domena, ki cepi drugo verigo tarčnega zaporedja (5). Proučili so že več izoform proteina *Cas9*, ki so velike med 900 in 1600 aminokislin. Izoforme uvrščamo v razrede IIa, IIb in IIc. Proteini *Cas9* so vezani na sistem CRISPR/Cas razreda II.

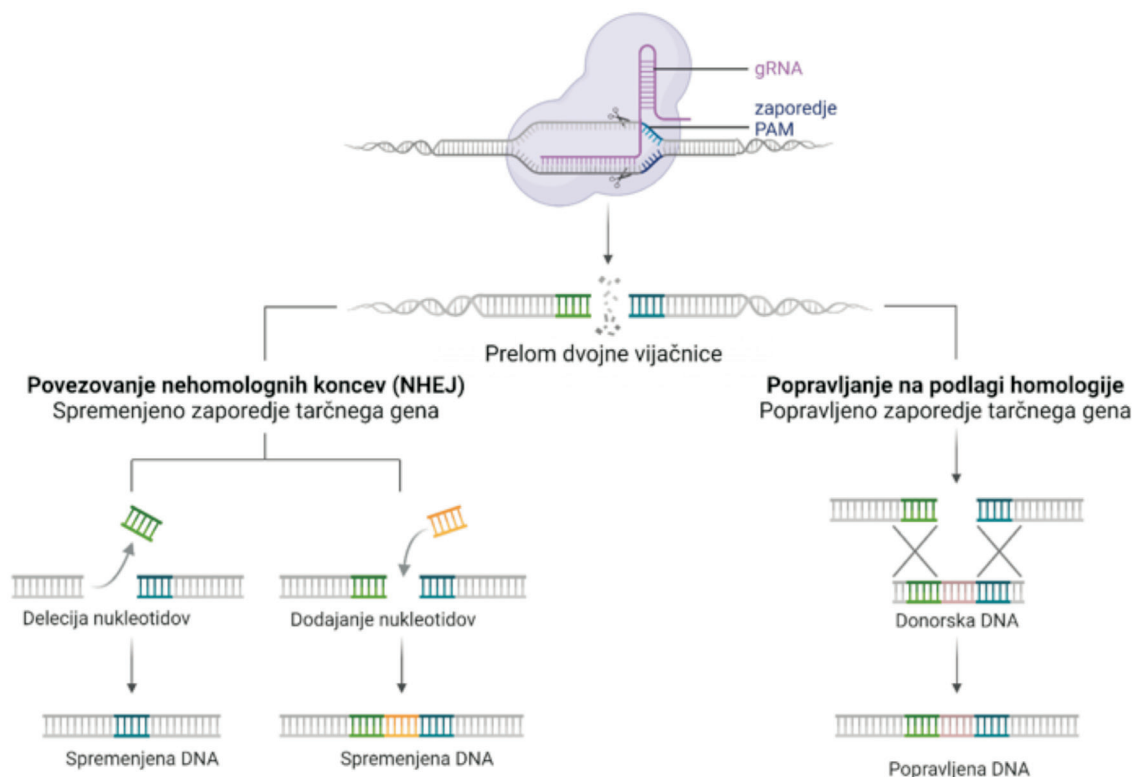
Poleg navedenih elementov, ki sestavljajo sistem CRISPR/Cas9, je za delovanje le-tega ključen še pro-



Pre-crRNA – prekursorska CRISPR RNA (*pre-CRISPR RNA*); Cas9 – s CRISPR povezana endonukleaza 9 (*CRISPR-associated endonuclease 9*); RNaza III – ribonukleaza 3; tracrRNA – transaktivirajoča CRISPR RNA (*trans-activating CRISPR RNA*); crRNA – CRISPR RNA; PAM – motiv ob protivmesniku (*protospacer adjacent motif*)

Slika 1: Shematski prikaz biološke funkcije sistema CRISPR/Cas9. (a) Sistem prepozna tujo DNA, zaporedje dela tuje DNA, ki se nahaja ob zaporedju PAM, pa vgradi v lokus CRISPR med dve ponavljajoči se enoti. (b) Ob izražanju pride do transkripcije elementov lokusa CRISPR, primarni transkript pa obdelajo ustrezne nukleaze, med drugim tudi nukleaza Cas9. (c) Med nukleazo Cas9, tracrRNA in crRNA pride do tvorbe kompleksa. (d) Med fazo interference pride do prepoznavanja tarčnega zaporedja na tuji DNA na podlagi komplementarnosti med crRNA in tarčnim zaporedjem. Prepoznavanju sledi s Cas9 posredovan prelom dvojne vijačnice, ki uniči tujo DNA in s tem zavaruje gostiteljsko celico pred njo. Slika je izrisana s programom BioRender po predlogi Brady Cress in Lucie Bardet.

Figure 1: A schematic representation of the biological function of CRISPR/Cas9. (a) The CRISPR/Cas9 system recognises foreign DNA and inserts a fragment located near PAM between two repeat units within the CRISPR locus. (b) During expression, the transcription of CRISPR elements is followed by the enzymatic digestion of the primary transcript by several nucleases, e.g. Cas9. (c) Cas9, tracrRNA and crRNA form a complex. (d) During interference, the target sequence on a foreign DNA is recognised based on its complementarity to crRNA. After the recognition, a Cas9-mediated double-strand break damages foreign DNA and thus protects the host cell. This illustration was made in BioRender based on a template by Brady Cress and Lucie Bardet.



gRNA – vodnica RNA (*guide RNA*); PAM – motiv ob protivmesniku (*protospacer adjacent motif*).

Slika 2: Genetsko urejanje s CRISPR/Cas9. Pri genetskem urejanju s CRISPR/Cas9 v celice vnesemo endonukleazo Cas9 in vodnico RNA (gRNA), v kateri sta združeni tracrRNA in crRNA. Del vodnice RNA mora biti komplementaren zaporedju, ki ga želimo spremeniti, del vodnice pa služi za vezavo na protein Cas9. Vodnica RNA mora biti načrtovana tako, da se komplementarno zaporedje nahaja v bližini motiva PAM, saj Cas9 cepi fosfodiesterne vezi le v njegovi bližini. Po cepitvi dvojne vijačnice nehomologni popravilni mehanizmi (NHEJ, non-homologous DNA end joining) popravijo cepitev tako, da pride na mestu cepitve do kratke delecije ali insercije, kar povzroči izbitje gena. V primeru homolognega popravilnega mehanizma (HDR, homology-directed repair) sistem omogoča vstavev gena z donorske DNA preko homologne rekombinacije. Slika je izrisana s programom BioRender po predlogi Esmée Dragt.

Figure 2: Gene editing using CRISPR/Cas9. The endonuclease Cas9 and guide RNA, the latter functioning as a combined tracrRNA and crRNA, are inserted into the cells. A part of guide RNA is complementary to the target sequence, and another part binds Cas9. The target sequence, complementary to the guide RNA, has to be located near a PAM to enable the phosphodiesterase activity of Cas9. The error-prone non-homologous DNA end-joining pathway repairs the double-strand break, often introducing short insertions or deletions, which may lead to gene knockout. The homologous-directed repair pathway enables a donor DNA-encoded gene insertion mediated by homologous recombination. This illustration was made in BioRender based on a template by Esmée Dragt.

motorski element, ki ga imenujemo vodilno zaporedje (*leader*). Gre za nekaj sto baznih parov dolgo zaporedje z visokim deležem adeninskih in timinskih nukleotidov in z odseki ponavljajočih se istovrstnih nukleotidov, ki se nahaja neposredno navzgor od lokusa CRISPR (6). Zaporedje ne vsebuje odprtega bralnega okvirja (*ORF*, *open reading frame*), torej ne kodira proteinov, vsebuje pa regulatorne elemente, potrebne za fazo adaptacije ter ustrezno transkripcijo elementov lokusa CRISPR (7, 8).

3 UPORABA SISTEMA CRISPR V GENSKEM INŽENIRSTVU

3.1 IZBITJE GENOV ALI GENSKIH LOKUSOV

Nekatere možnosti uporabe sistema CRISPR/Cas9 v genskem inženirstvu prikazuje slika 4. Ena izmed njih je upo-

raba sistema za izbitje genov, pri čemer je ključno ustrezno oblikovano zaporedje 20 do 24 nukleotidov dolge vodnice RNA (gRNA, *guide RNA*) (5). gRNA nosi vse potrebne elemente crRNA in tracrRNA, komplementarna pa je tarčnemu zaporedju odseka gena, ki ga želimo izbiti. Zaradi dolžine gRNA je delovanje ustrezno oblikovanega sistema CRISPR/Cas9 razmeroma specifično, saj je verjetnost, da bi se enako 20 nukleotidov dolgo zaporedje ponovilo več kot enkrat v genomu, zelo majhna (14). Osnova za delovanje takšnega sistema je prileganje gRNA na tarčno zaporedje, kar inducira s Cas9 posredovan prelom obeh verig tarčnega zaporedja (slika 2) (5). Prelom sproži celični odziv, ki skuša po dveh različnih mehanizmih popraviti prelomljeno DNA. Eden izmed mehanizmov je homologno popravljanje DNA (HDR, *homology-directed repair*), drugi mehanizem pa je nehomologno zlepljanje koncev DNA (NHEJ, *non-homologous end joining mediated DNA repair*) (5). HDR je bolj kompleksen in počasnejši mehanizem, ki ob prisotnosti matrične DNA z zaporedjem, homolognim prekinjeni verigi, popravi in zlepi prekinjene odseke DNA. NHEJ pa je hitrejši in od matrice neodvisen, vendar številnim napakam podvržen mehanizem ligacije prelomljenih verig, pri čemer je zelo pogost pojav mutacij indel, torej insercij ali delecij, na mestu preloma. Visok delež pojavnosti mutacij indel pri NHEJ omogoča izbitje genov z metodo CRISPR/Cas. Pri popravljanju s Cas9 prelomljenih genov te mutacije povzročijo premik bralnega okvirja, posledično pa iz takšnega zapisa ne nastane funkcionalen protein (5). Utišanje izražanja tarčnih genov je pristop urejanja genoma, uporaben na številnih področjih. Utišanje in povečano izražanje določenega gena omogočata ugotavljanje funkcij gena in posledic patološko spremenjenega nivoja izražanja, kar je osnova za odkrivanje vlog posameznih genov pri razvoju različnih bolezni.

3.2 UTIŠANJE GENOV (CRISPRi) IN AKTIVACIJA TRANSKRIPCije GENOV (CRISPRa)

Z uporabo modificiranih proteinov Cas9, na primer deaktiviranega proteina Cas9 (dCas9) brez nukleazne aktivnosti in z ohranjeno sposobnostjo vezave DNA in RNA, lahko vplivamo na izražanje genov. Že sam dCas9 deluje kot transkripcijski inhibitor, lahko pa ga uporabimo tudi za tarčno dostavljanje določenih efektivskih proteinov, s katerimi spremenimo izražanje genov (npr. transkripcijske aktivatorje pri aktivaciji s CRISPR (CRISPRa), transkripcijske inhibitorje pri interferenci s CRISPR (CRISPRi) ali epigenetske modi-

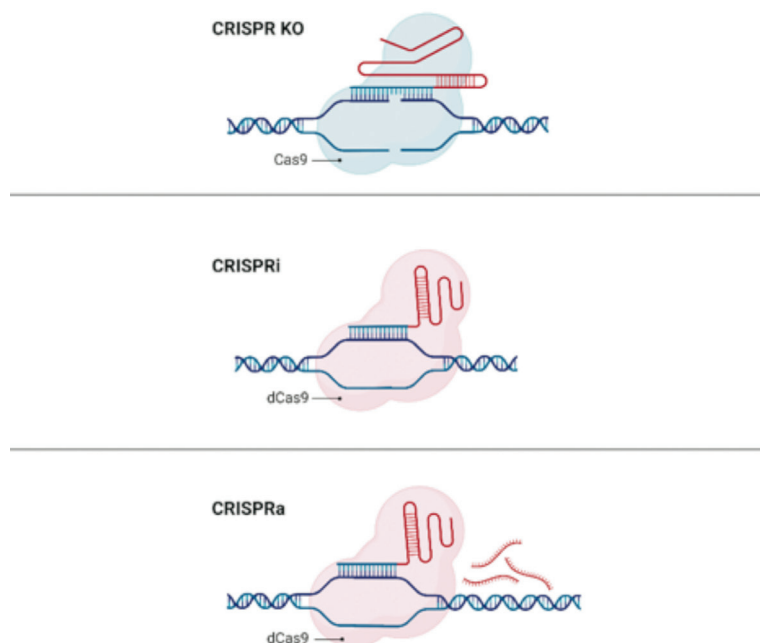
fikatorje za spremembo epigenoma) (slika 3) (4). Poleg utišanja ali aktivacije transkripcije genov lahko s CRISPRa in CRISPRi vplivamo tudi na izražanje nekodirajočih RNA, npr. dolge nekodirajoče RNA ali mikro RNA (4). Tarča za gRNA pri pristopih CRISPRa in CRISPRi je mesto vezave in delovanja aktivatorjev in inhibitorjev transkripcije, to je okoli mesta začetka transkripcije (4). Zaradi omejitev glede možnih tarč za delovanje sistemov CRISPRa in CRISPRi je specifičnost delovanja višja kot pri običajnem sistemu CRISPR/Cas9.

3.3 GENETSKO SPREMINJANJE POSAMEZNIH BAZ Z dCAS-DEAMINAZAMI

Z uporabo deaktiviranega proteina dCas9, ki ima kovalentno vezan encim deaminazo, lahko zamenjamo posamezne bazne pare v DNA. Pri tem sistemu dCas9 služi le kot molekula za specifično prepoznavanje nukleotidnega zaporedja, ki ga želimo spremeniti. Encimi, ki spreminjajo posamezne nukleotide, so DNA citidinske deaminaze, ki spremenijo citozin v timin in posledično povzročijo spremembo baznega para citozin-gvanin v bazni par timin-adenin, in DNA adeninske deaminaze, ki spremenijo adenin v gvanin in povzročijo spremembo baznega para adenin-timin v gvanin-citozin (16). Na mišjem modelu za Duchennovo mišično distrofijo, za katero je značilen okvarjen gen *Dmd*, so pokazali, da je možno z vnosom dCas-adeninskih deaminaz v mišične celice popraviti nesmiselno mutacijo v genu *Dmd*, kar kaže na terapevtsko možnost uporabe genetskega urejanja pri odraslih živalih (17).

3.4 UPORABA GENETSKEGA UREJANJA CRISPR V TERAPEVTSKE NAMENE

Urejanje genoma z metodo CRISPR/Cas9 ima velik potencial kot terapevtski pristop v obliki genskih in celičnih terapij za zdravljenje nekaterih genetsko pogojenih bolezni. V primeru monogenih bolezni lahko s sistemom CRISPR/Cas9 deloma ali popolnoma popravimo patološko mutacijo. Raziskave *in vitro* ter raziskave na živalskih modelih kažejo na možnost uspeha pri uporabi več različnih pristopov genetskega urejanja za zdravljenje Duchennove mišične distrofije (DMD) (17). To je živčno-mišična bolezen, ki nastane zaradi mutacije v genu za 427 kDa velik protein distrofin, pomemben za vzdrževanje strukturne integritete in normalne funkcije prečnoprogastih mišic (18). Duchenn-



CRISPR KO – izbitje genov s CRISPR (*CRISPR knockout*); CRISPRa – aktivacija genov s CRISPR (*CRISPR activation*); CRISPRi – utišanje genov s CRISPR (*CRISPR interference*); Cas9 – s CRISPR povezana endonukleaza 9 (*CRISPR-associated endonuclease 9*); dCas9 – deaktiviran protein Cas9 (*deactivated Cas9*).

Slika 3: Primerjava med različnimi možnostmi uporabe CRISPR/Cas9. CRISPR KO – uporaba CRISPR/Cas za izbijanje gena. Sistem uporabi aktivno endonukleazo Cas9, ki cepi dvojno vijačnico, pri popravilu s popravljivim mehanizmom NHEJ pa pride do vnosa mutacij indel in posledično izbitje gena. CRISPRi – utišanje izražanja gena temelji na uporabi neaktivne nukleaze (dCas9, deactivated Cas9), ki ne cepi dvojne vijačnice, pač pa je nanjo vezan transkripcijski inhibitor KRAB (Kruppel-associated box domain) (dCas9-KRAB), ki povzroči utišanje gena. CRISPRa – aktivacija izražanja gena temelji na uporabi neaktivne nukleaze dCas9, na katero je vezan aktivator transkripcije, npr. VP16, ki povzroči povišano izražanje tarčnega gena. Slika je izrisana s programom BioRender.

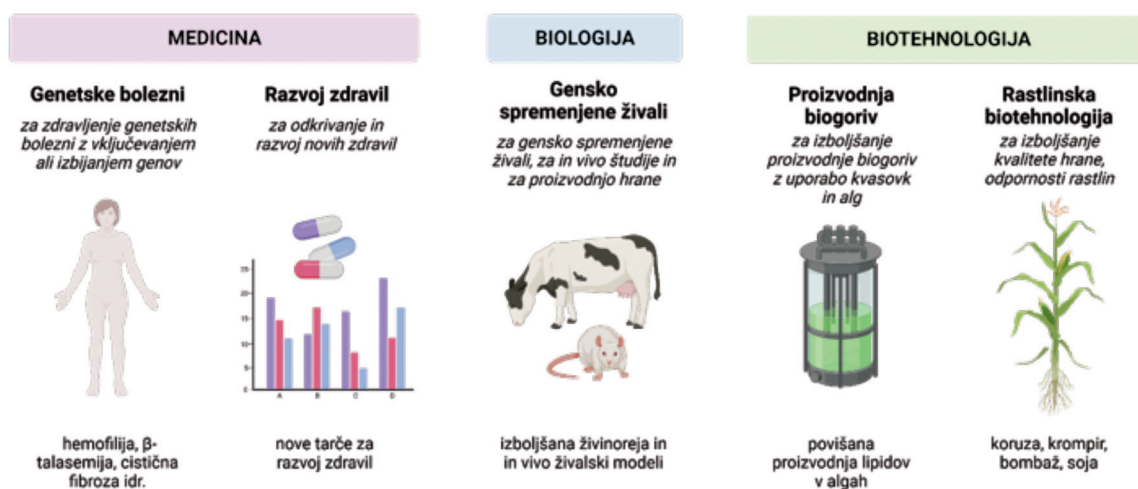
Figure 3: A comparison of various CRISPR/Cas9 applications. CRISPR KO – gene knockout. The system induces a Cas9-mediated double-strand break, followed by an NHEJ-generated indel and subsequent gene knockout. CRISPRi – gene silencing is composed of a transcription inhibitor KRAB, which silences the target gene and is bound on a deactivated Cas9, which lacks its enzymatic activity and does not induce a double-strand break. CRISPRa – gene activation allows gene overexpression using a deactivated Cas9 bound to a transcription activator, e.g. VP16. This illustration was made in BioRender.

nova mišična distrofija je genetsko zelo heterogena bolezen, znanih je namreč že več kot 3000 različnih mutacij, ki povzročajo različno težke oblike bolezni. Večinoma gre za točkovne mutacije, ki spremenijo bralni okvir, posledično pa pride do sinteze skrajšane oblike proteina.

Pri zdravljenju Duchennove mišične distrofije s sistemom CRISPR/Cas9 bi bilo možnih več različnih pristopov, s katerimi bi popravili bralni okvir. To sta npr. izrez eksona, ki vsebuje mutacijo, ali insercija oz. delecija ustreznega števila nukleotidov z mehanizmom NHEJ po prelomu DNA v okolici mutacije (18). Omenjena pristopa bi vodila v sintezo bolj funkcionalne, a še vedno skrajšane oblike proteina ter posledično v milejšo obliko bolezni. Z uporabo ustrezne matrične DNA pa bi lahko s homolognim popravljanjem

DNA po prelomu dvojne vijačnice s CRISPR/Cas9 dosegli popolno popravilo gena in ozdravitev bolezni. Pomanjkljivost takšnega sistema je, da bi deloval zgolj na delečih se celicah. Dodatne težave v praksi so omejena dolžina matrične DNA, velikost gena cas9 ter velikost proteina Cas9, ki jih je mogoče vstaviti v celico skupaj s sistemom CRISPR/Cas9 (18).

Poleg ciljanja patološke mutacije lahko določene bolezni pozdravimo tudi z urejanjem normalno delujočih genov. Anemija srpastih celic je hemoglobinopatija, ki nastane zaradi točkovne mutacije v genu za hemoglobin A (HbA), ki je prevladujoča oblika hemoglobina pri odraslih. Mutirana oblika hemoglobina lahko polimerizira in spremeni obliko eritrocitov, ki manj učinkovito prehajajo kapilare in so bolj



Slika 4: Uporaba sistema CRISPR/Cas9. Sistem CRISPR/Cas9 se uporablja v genetskem inženirstvu v medicini, biologiji in biotehnologiji. Slika je izrisana s programom BioRender.

Figure 4: Various applications of CRISPR/Cas9. It is used in genetic engineering in medicine, biology and biotechnology. This illustration was made in BioRender.

podvrženi hemolizi. Pri zdravljenju anemije srpastih celic lahko s sistemom CRISPR/Cas9 v krvotvornih matičnih celicah izbijemo gen *BCL11A*, s čimer reaktiviramo sintezo fetalnega hemoglobina (HbF) pri odraslih bolnikih (19). Proteinski produkt gena *BCL11A* namreč kot regulator izražanja hemoglobina v neonatalnem obdobju omogoči preklap iz sinteze HbF v sintezo HbA. Pri anemiji srpastih celic struktura fetalnega hemoglobina ni okvarjena, zato lahko ob zadostnem izražanju gena za HbF ta prevzame funkcije okvarjenega HbA.

Prvo klinično raziskavo uporabe sistema CRISPR/Cas9 v terapevtske namene so opravili z namenom ugotavljanja učinkovitosti in varnosti zdravljenja drobnoceličnega pljučnega raka s T-celično terapijo v kombinaciji z izbitjem gena *PD-1* (20). Produkt tega gena je protein programirane celične smrti, to je receptor na celicah T, ki inhibira njihovo aktivacijo in tako vzpostavlja imunsko toleranco (21). Ob pretirani aktivaciji receptorja lahko pride do nezadostnega imunskega odziva na maligno spremenjene celice. V uporabi je že terapija z monoklonskimi protitelesi, usmerjenimi proti proteinu PD-1 ali njegovemu ligandu PD-L1, s čimer se zmanjša aktivacija PD-1 in posledično poveča aktivnost celic T. S sistemom CRISPR/Cas9 pa lahko celicam T *ex vivo* izbijemo gen *PD-1* in tako povečamo njihovo aktivnost pri bolnikih z nekaterimi oblikami raka.

Od marca 2019 je v teku klinična raziskava za zdravljenje Leberjeve kongenitalne amavroze s sistemom CRISPR/Cas9. Gre za dedno obliko slepote, ki nastane

zaradi okvare v mrežnici. Ena izmed pogostejših mutacij v ozadju te bolezni je točkovna mutacija v genu *CEP290*. Proteinski produkt tega gena je pomemben za prenos signala v fotoreceptorjih mrežnice. Najpogostejša mutacija je točkovna mutacija, ki z uvedbo novega izrezovalnega mesta na molekuli mRNA spremeni način izrezovanja in spajanja eksonov. Zaradi te spremembe se v zaporedje uvede nov stop kodon, posledično pa se iz takšne molekule mRNA prepiše skrajšan, nefunkcionalen protein. Pri terapiji s CRISPR lahko v mrežnico z adeno-asociacijskim virusnim vektorjem tipa 5 (AAV5) vstavimo sistem CRISPR/Cas9 z dvema molekulama gRNA, ki izreže ekson s stop kodonom. Posledično se v takšnih celicah ob uspešnem delovanju vstavljenega sistema sintetizira funkcionalen protein, za klinične izboljšave pa zadostuje sinteza funkcionalnega proteina že v približno 10 % fotoreceptorskih celic (22).

Tarča za delovanje sistema CRISPR/Cas9 pa je lahko tudi genom virusov ali bakterij pri infekcijskih boleznih. S sistemom CRISPR/Cas9 lahko npr. tarčno uničimo genom virusa HIV in ga tako inaktiviramo. Možen je tudi pristop s posegi v genom bolnika, ki imajo zaščitni učinek. Virus HIV vstopi v celice T CD4+ preko interakcije s kemokinskim receptorjem CCR5. V primeru s CRISPR/Cas9 povzročene mutacije v genu za protein CCR5 so lahko strukturne spremembe na kemokinskem receptorju zadostne, da virus HIV ne more več vstopiti v celice T CD4+, s tem pa lahko dosežemo odpornost na okužbo z virusom HIV (23).

3.5 POMANJKLJIVOSTI SISTEMA CRISPR/CAS9

Kljub prednostim, ki jih ponuja sistem CRISPR/Cas9 kot orodje za urejanje genoma, pa obstajajo tudi omejitve, ki zaenkrat otežujejo uporabo v klinični praksi. Ena izmed večjih težav je možnost delovanja sistema CRISPR/Cas izven želene tarče (*off target effects*) (5). Z dobro načrtovanim zaporedjem gRNA lahko dosežemo razmeroma visoko specifičnost in delovanje, omejeno na tarčni gen. Ker pa sistem za delovanje ne potrebuje popolne homologije med gRNA in tarčnim genom, so na velikih genomih možni učinki izven tarče. V primeru genskih terapij bi takšni učinki lahko vodili v resne posledice, saj gre pri tem sistemu za ireverzibilne spremembe na nivoju DNA. Varnejši pristop za utišanje genov brez ireverzibilnega poseganja v genom je interferenca s CRISPR (CRISPRi) (slika 3) (4, 5). Dodaten izziv lahko predstavlja dejstvo, da smo pri uporabi CRISPR/Cas9 omejeni na delovanje na tarčnih zaporedjih, ki se nahajajo neposredno ob zaporedjih PAM (24). To sicer po eni strani pomaga pri doseganju višje specifičnosti sistema, po drugi strani pa omejuje uporabnost na določene tarče na DNA. Poleg oblikovanja gRNA in izbora primerne tarče je pomemben tudi način vnosa sistema CRISPR/Cas9 v organizem, saj je uspešnost delovanja močno odvisna od načina dostave (5).

Običajna oblika dostavnega sistema je plazmidni vektor DNA z zapisom za izbrano gRNA in genom za protein Cas9. Možna pa je tudi dostava v obliki gRNA in RNA za Cas9 ali v obliki že delujočega kompleksa proteina Cas9 in molekule gRNA, vendar sta takšna sistema zaradi manjše stabilnosti uporabljenih proteinskih molekul ter molekul RNA bolj kratkoživa od plazmidnega vektorja. V tem primeru je lahko zato učinkovitost sistema nezadostna (3, 5). Načini vnosa sistema v celico *ex vivo* so elektroporacija, transfekcija, direktno mikroinjiciranje, z lipidi posredovana transfekcija ali vnos z virusnimi vektorji. Vnos v celice *in vivo* pa je lahko precej težaven zaradi možne imunogenosti sestavin sistema (24). Najobičajnejši način vnosa v organizem je z virusnim vektorjem AAV, veliko obetov pa kažejo dostavni sistemi z nanodelci (4).

3.6 PRIHODNOST GENETSKEGA UREJANJA IN ETIČNI VIDIKI

CRISPR/Cas9 ima velik potencial za uporabo na različnih področjih. Prostor za izboljšave obstaja predvsem pri doseganju dovolj visokih specifičnosti in učinkovitosti delovanja, na kar lahko med drugim vplivamo z modifikacijami

in uporabo različnih ortologov proteina Cas9 ter s časovno-prostorskim omejevanjem delovanja sistema v organizmu (4). Dodatne izboljšave bodo za večjo klinično uporabnost verjetno nujne tudi pri zagotavljanju čim večje varnosti pri dostavljanju sistema v organizem.

Poleg tehničnega razvoja metode pa je pri vsakršnem poseganju v genom različnih organizmov zelo pomemben etični vidik genskega inženirstva, ki mora biti podlaga za ustrezno zakonodajo, ta pa mora biti zaradi bliskovitega razvoja metod in številnih možnosti uporabe usmerjena v varovanje dobrobiti posameznikov. Poleg zapletenih odločitev o tem, pod kakšnimi pogoji, če sploh, je utemeljeno posegati v človeški genom, je pomembna tudi učinkovita zakonodaja na področju gensko spremenjenih organizmov v kmetijstvu in industriji ter na različnih raziskovalnih področjih. CRISPR/Cas9 in ostale metode urejanja genoma nam omogočajo medsebojno kombiniranje fragmentov DNA, ki se v preteklosti niso pojavljali v naravi. S takšno možnostjo poseganja v obstoječe ekosisteme pa je za doseganje varnosti na tem področju nujno odgovorno ravnanje in varna uporaba dostopnih metod.

4 SKLEP

Odkritje sistema CRISPR/Cas9 je eno najpomembnejših biotehnoloških odkritij v tem stoletju. Njegova uporaba se je z neverjetno naglico razširila po laboratorijih po vsem svetu, le nekaj let po samem odkritju pa sta dr. Doudna in dr. Charpentier prejeli Nobelovo nagrado za kemijo za leto 2020. Zaradi enostavne in hitre možnosti za spreminjanje genov v različnih celičnih, živalskih in rastlinskih sistemih je metoda izredno uporabna v raziskovalne, medicinske in biotehnološke namene. CRISPR/Cas9 omogoča poljubno tarčno spreminjanje katerih koli celic, tudi spolnih ali matičnih celic, kar omogoča pripravo genetsko spremenjenih organizmov. Poleg razvoja čim bolj specifičnega sistema za spreminjanje genoma, je pri širitvi uporabe sistema CRISPR/Cas9 v terapevtske namene pomemben tudi strog nadzor klinične uporabe.

5 LITERATURA

1. Gibson DG, Young L, Chuang RY, Venter JC, Hutchison CA, 3rd, Smith HO. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods*. 2009;6(5):343-5.

2. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science*. 2001;291(5507):1304-51.
3. Ma Y, Zhang L, Huang X. Genome modification by CRISPR/Cas9. *FEBS J*. 2014;281(23):5186-93.
4. Wang H, La Russa M, Qi LS. CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond. *Annu Rev Biochem*. 2016;85:227-64.
5. Zhang F, Wen Y, Guo X. CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. *Hum Mol Genet*. 2014;23(R1):R40-6.
6. Jansen R, Embden JD, Gaastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol*. 2002;43(6):1565-75.
7. Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*. 2010;327(5962):167-70.
8. Alkhnbashi OS, Shah SA, Garrett RA, Saunders SJ, Costa F, Backofen R. Characterizing leader sequences of CRISPR loci. *Bioinformatics*. 2016;32(17):i576-i85.
9. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol*. 1987;169(12):5429-33.
10. Mojica FJ, Diez-Villasenor C, Soria E, Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol Microbiol*. 2000;36(1):244-6.
11. Jiang F, Doudna JA. The structural biology of CRISPR-Cas systems. *Curr Opin Struct Biol*. 2015;30:100-11.
12. Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*. 2015;13(11):722-36.
13. Makarova KS, Wolf YI, Iranzo J, Shmakov SA, Alkhnbashi OS, Brouns SJJ, et al. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nat Rev Microbiol*. 2020;18(2):67-83.
14. Murugan K, Babu K, Sundaresan R, Rajan R, Sashital DG. The Revolution Continues: Newly Discovered Systems Expand the CRISPR-Cas Toolkit. *Mol Cell*. 2017;68(1):15-25.
15. Charpentier E, Richter H, van der Oost J, White MF. Biogenesis pathways of RNA guides in archaeal and bacterial CRISPR-Cas adaptive immunity. *FEMS Microbiol Rev*. 2015;39(3):428-41.
16. Anzalone AV, Koblan LW, Liu DR. Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. *Nat Biotechnol*. 2020;38(7):824-44.
17. Ryu SM, Koo T, Kim K, Lim K, Baek G, Kim ST, et al. Adenine base editing in mouse embryos and an adult mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Nat Biotechnol*. 2018;36(6):536-9.
18. Min YL, Bassel-Duby R, Olson EN. CRISPR Correction of Duchenne Muscular Dystrophy. *Annu Rev Med*. 2019;70:239-55.
19. Khosravi MA, Abbasalipour M, Concordet JP, Berg JV, Zeinali S, Arashkia A, et al. Targeted deletion of BCL11A gene by CRISPR-Cas9 system for fetal hemoglobin reactivation: A promising approach for gene therapy of beta thalassemia disease. *Eur J Pharmacol*. 2019;854:398-405.
20. Lu Y, Xue J, Deng T, Zhou X, Yu K, Deng L, et al. Safety and feasibility of CRISPR-edited T cells in patients with refractory non-small-cell lung cancer. *Nat Med*. 2020;26(5):732-40.
21. Xiao Q, Guo D, Chen S. Application of CRISPR/Cas9-Based Gene Editing in HIV-1/AIDS Therapy. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019;9:69.
22. Maeder ML, Stefanidakis M, Wilson CJ, Baral R, Barrera LA, Bounoutas GS, et al. Development of a gene-editing approach to restore vision loss in Leber congenital amaurosis type 10. *Nat Med*. 2019;25(2):229-33.
23. Rautela I, Uniyal P, Thapliyal P, Chauhan N, Bhushan Sinha V, Dev Sharma M. An extensive review to facilitate understanding of CRISPR technology as a gene editing possibility for enhanced therapeutic applications. *Gene*. 2021;785:145615.
24. Knott GJ, Doudna JA. CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering. *Science*. 2018;361(6405):866-9.