CRISPR/Cas9 tehnologija: značenje i primjena

Dumančić, Ena

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:095662

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Preddiplomski sveučilišni studij Biologija

Ena Dumančić

CRISPR/Cas9 tehnologija: značenje i primjena

Završni rad

Osijek, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA **Završni rad**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za biologiju
Preddiplomski sveučilišni studij Biologija
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

CRISPR/Cas9 TEHNOLOGIJA: ZNAČENJE I PRIMJENA

Ena Dumančić

Rad je izrađen na: Zavodu za biokemiju i ekofiziologiju biljaka
Mentor: dr. sc. Rosemary Vuković, doc.

Kratak sažetak: Tehnologija CRISPR/Cas9 je alat genetičkog inženjerstva. Sam sustav je otkriven u imunosnom sustavu bakterija te je prilagođen za primjenu u biljnim i životinjskim stanicama uključujući i čovijeka. Ṣustav se sastoji od dvije domene, preoteina Cas9 koji sadrži NHN i RuvC domene za iskrivljenje ciljane DNA i gRNA koja dovodi protein Cas9 do ciljanog mjesta na DNA. Sustav izaziva dvolančane lomove na DNA koji se dalje popravlja mehanizmom prirodno urođenom stanici. Tehnologija je značajna i privlači puno pozornosti zbog svoje jednostavnosti, široke mogućnosti primjene i niske cijene. Ima širok spektar mogućih primjena kao što su mijenjanje genoma biljnih i životinjskih stanica, liječenje bolesti, istraživanja pojedinih lokusa genoma. Jedan od problema primjene tehnologije se odnosi na modifikacije ljudskih reproduktivnih stanica čije osobine se prenose kroz generacije te strah od zloupotrebe tehnologije.

Jezik izvornika: hrvatski
Ključne riječi: CRISPR/Cas9, genetsko inženjerstvo, genom

Rad je pohranjen: na mrežnim stranicama Odjela za biologiju te u Nacionalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice u Zagrebu.

BASIC DOCUMENTATION CARD **Bachelorthesis**

Josip Juraj StrossmayerUniversityof Osijek
Department of Biology
Undergraduate university study programme in Biology
ScientificArea: Natural science
ScientificField: Biology

CRISPR/CAs9 TECHNOLOGY: SIGNIFICANCE AND APPLICATION

Ena Dumančić

Thesisperformed at:

Supervisor: PhD. Rosemary Vuković, Asst. Prof.

Short abstract: CRISPR/Cas9 technology is one of the tools in genetic engineering. System is dicovered as a part of bacterial imunosystem and its developed for use in plant and animal cells including humans. System contains two parts, Cas9 protein wich contains NHN and RuvC domains for targeted DNA cleavage and gRNA wich leads Cas9 protein to the targeted DNA locus. System causes DSB wich is then repaired by native cells mechanism. The tehnology is significant and atracts a lot of attention because of its simplicity, wide possibility of uses and low price. It has wide spectrum of possible uses like a genome editing, in plant and animal cells, curing ilnesses, researching unique genom locuses. One of the issues of tehnology applications refers on the modifications of the human reproduction cells whose genetic material is transferred through generations and the fear of misuse of tehnology.

Original in: Croatian
Keywords: CRISPR/Cas9, genetic ingeenering, genome

Thesisdeposited:on the Department of Biology web site and the Croatian Digital Theses Repository of the National and University Library in Zagreb.

Sadržaj

1. UVOD 1

2. RAZVOJ TEHNOLOGIJECRISPR/Cas9 2

3. BIOLOGIJA SUSTAVA CRISPR/Cas9 4

4. SUSTAV CRISPR/Cas9 KOD UREĐIVANJA GENOMA 6

5. MODIFIKACIJE SUSTAVA CRISPR/Cas9 9

6. UNOS SUSTAVA CRISPR/Cas9 U STANICU 10

7. ZNAČENJE TEHNOLOGIJE CRISPR/Cas9 11

8. PRIMJENA TEHNOLOGIJE CRISPR/Cas9 14

8.1. PRIMJENA U AGRIKULTURI – ZELENA BIOTEHNOLOGIJA 14

8.2. POKUSNE ŽIVOTINJE, PRIMJENA U BIOMEDICINI – CRVENA BIOTEHNOLOGIJA 15

9. ZAKLJUČAK 17

10. LITERATURA 19

1. UVOD

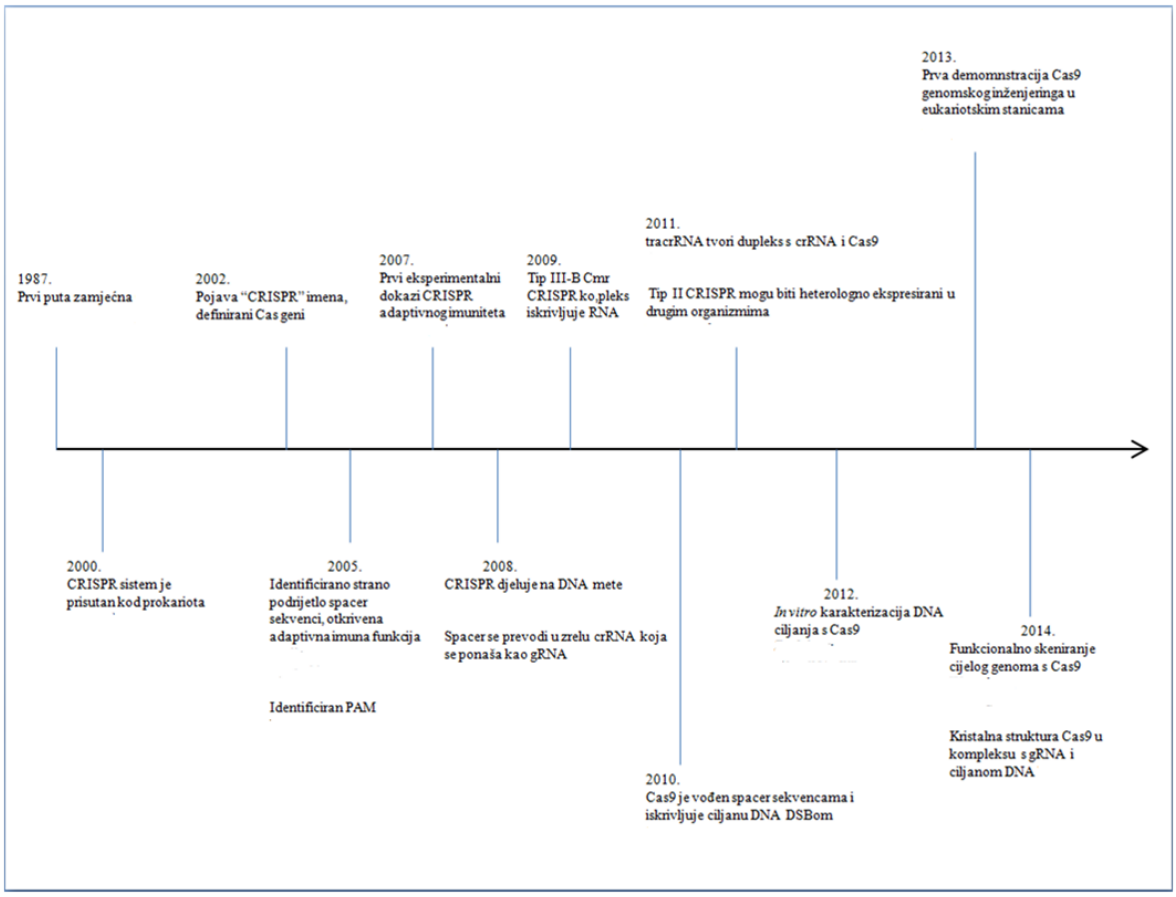
Genetičko inženjerstvo čine biotehnološki postupci kojima se omogućuje ubacivanje, izrezivanje i mijenjanje sljedova genomske DNA nekog organizma, te se takvom direktnom manipulacijom genoma oblikuju nove kombinacije nasljednog materijala, koje se mogu nasljeđivati. Organizami koji nastaju takvom manipulacijom nazivaju se genetički modificiranim organizmima (GMO). Biomedicinskim se istraživanjima dugo vremena pokušavaju otkriti metode kojima bi se učinkovito i precizno mijenjao genom stanica. Tako su istraživanjem imunološkog sustava bakterija otkriveni proteini koji prepoznaju i razgrađuju stranu DNA. Analizom tih proteina i njihove funkcije otkriveno je kako protein Cas9 razgrađuje stranu DNA uz pomoć malih molekula RNA, dugih 20-ak baza. Cijeli sustav naziva se CRISPR/Cas9 (od engl. *Clustered, Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*). Navedeni sustav u prirodi osigurava bakterijama imuni odgovor protiv virusa i bakteriofaga. U genetičkom inženjerstvu sustav se koristi za induciranje dvolančanih lomovana molekuli DNA (DSB, od engl. *double strand break*) na mjestu mutacije, nakon čega stanični mehanizam popravka DNA vrši popravak dvolančanog loma, a time i prisutnu mutaciju. Izazivanjem dvolančanih lomova u DNA moguće je u genom unijeti željene modifikacije (Mojica i Garrett 2012). Zbog svoje uloge da precizno „izreže i zalijepi“ sustav je vrlo obećavajuća tehnologija uređivanja genoma (*gen editing*). Do sada su već postojale i druge tehnologije uređivanja genoma, ZFNs (od engl. *Zink-Finger Nuclease*) i TALENs (od engl. *Transcription Activator-Like Effector Nucleases*). Poteini ZFNs se sastoje od domene cinkov prst (engl. *zinc finger*) koja veže DNA i endonukleazne domene FokI koja cijepa DNA. Domena cinkov prst prepoznaje mjesto vezanja na ciljanoj sekvenci DNA dugo 9 do 18 parova baza, dok domena Fokl prepoznaje domene cinkov prst i na tom mjestu pravi DSB. Proteini TALENs su proteini koji se sastoje od DNA vezujuće domene TALEs i endonukleazne domene Fokl. Domena TALEs se sastoji od 33 do 35 aminokiselinskih ponavljajućih sekvenci koje se razlikuju u dvije aminokiseline te omogućuju vezanje proteina na specifično mjesto ciljane DNA i aktivaciju Fokl domene. Za provedbu tehnologije ZFNs treba uložiti puno više truda i financijskih sredstava, u odnosu na tehnologiju CRISPR/Cas9. Osim toga, tehnologija ZFNs je nepreciznija u provedbi DSB na susjednim sekvencama ciljane DNA. U odnosu na tehnologiju CRISPR/Cas9, nedostatak tehnologije TALENs, između ostalog, proizlazi iz osjetljivosti proteina TALEs na metilaciju DNA. Osim toga, veličina proteina i

ponavljajuće sekvence također predstavljaju problem u pripremi samog sustava i njihovog korištenja (Stephens i Barakate 2017). Entuzijazam oko korištenja tehnologije CRISPR/Cas9 proizlazi iz njegove specifičnosti, širine upotrebe i brzine. Iako se čini vrlo korisnom, ova tehnologija nailazi i na prepreke u svojoj primjeni koje se najviše odnose na etičnost i moralnost istraživanja na ljudskim spolnim stanicama i embrijima, te pronalasku puta za nadzor korištenja ove tehnologije u te svrhe. Iz tih razloga znanstvenici su 2015. godine pozvali na važeći moratorij o korištenju tehnologije CRISPR/Cas9 (Web 1). Moratorij podržava suzdržanost od istraživanja na ljudskim reproduktivnim stanicama, s obzirom na transgeneracijske opasnosti i manjak znanja o biologiji zametnih stanica i njihovoj mutagenezi izazvanoj prirodnim ili eksperimentalnim putem (Guttinger 2017). Osim primjene kod uređivanja genoma, genskoj terapiji i liječenju bolesti, tehnologija CRISPR/Cas9 ima širi potencijal primjene i u raznim drugim domenama života ljudske populacije i poboljšanju životnog standarda. Moguće ju je koristiti i u agrikulturi za povećanje prinosa kako biljaka tako i životinja, te za suzbijanja bolesti koje se prenose vektorima.

2. RAZVOJ TEHNOLOGIJECRISPR/Cas9

Početak otkrića tehnologije CRISPR/Cas9 veže se za 1987. godinu kada su identificirane regije CRISPR u genomu bakterije *Escherichia coli* (Ishino i sur. 1987). Godine 2002. Jansen i Mojica su opisali genomska CRISPR mjesta, dok je 2007. godine otkriveno da je CRISPR dio bakterijskog stečenog imuniteta (Jansen i sur. 2002; Barrangou i sur. 2007). Znanstvenice koje su otkrile sustav CRISPR/Cas9, Jennifer Doudna i Emmanuelle Charpentier, razvile su sustav koji se koristi u biotehnologiji, a obuhvaća samo protein Cas9 iz bakterije *Streptococus pyogenes* i jednu kombiniranu molekulu RNA, sgRNA (od engl. *single-guide* RNA) ili gRNA (od engl. *guide* RNA), nastale spajanjem molekula CRISPR RNA (crRNA) i transaktivirajuće CRISPR RNA (tracrRNA). Sustav omogućuje precizno izrezivanje ili ubacivanje sljedova DNA u genom što omogućuje dodavanje ili uklanjanje funkcija. Danas je tehnologija primijenjena na brojnim organizmima kao što su vinske mušice (Bassett i sur. 2014), oblići, brojne biljne vrste (Liu i sur. 2017), ribe (Li i sur. 2016), miševi (Wefers i sur. 2017), majmuni (Web 2), ljudski embriji (Schenkwein i Yla-Herttuala 2018) i dr. Tehnologija CRISPR/Cas9 ima prednosti nad ranije korištenim metodama genetičkog inženjerstva jer ugrađuje stranu

DNA na točno ciljano mjesto dok se ranijim metodama strana DNA nasumično ugrađivala u genom, uslijed čega može doći do neželjenih promjena genoma. U odnosu na druge metode uređivanja genoma (ZFNs i TALENs), tehnologija CRISPR/Cas9 je jednostavnija za korištenje jer se oslanja na sparivanje baza RNA-DNA, a ne na stvaranje interakcija između proteina i specifičnih sekvenci DNA (Gupta i Musunuru 2014). Unatoč povećanoj preciznosti u odnosu na ranije korištene metode genetičkog inženjerstva, CRISPR/Cas9 ponekad može djelovat izvan ciljnog mjesta što dovodi do neželjenih posljedica. Stoga je jedan od budućih ciljeva još više optimizirati tehnologiju CRISPR/Cas9, te dizajnirati varijante koje bi bile preciznije i sigurnije, kako bi se mogle koristiti u kliničkoj praksi i poboljšanju kvalitete ljudskih života (Gupta i Musunuru 2014). Godine 2013. je sustav CRISPR/Cas9 iz bakterije *S. pyogenes* prilagođen za stvaranje DSB u genomu sisavaca (Mali i sur. 2013). Kao i kod svakog revolucionarnog otkrića, postoje nesuglasice oko toga kome pripada pravo na patent tehnologije CRISPR/Cas9. Uz Jennifer Doudna i Emmanuelle Charpentier, kao otkrivači tehnike pojavljuju se i Zhang i suradnici (Web 3). Doudna i Charpentier su predale patent u svibnju 2012., a sedam mjeseci kasnije to je učinio i Zhang. Osim toga, postavilo se još jedno kontroverzno pitanje koje se odnosi na patentiranje sekvence DNA sustava CRISPR/Cas9 koja je produkt prirode, što je u konačnici riješeno odlikom kako sekvenca DNA ne može biti patentirana. Slučaj tehnologije CRISPR/Cas9 nešto je složeniji jer je sistem koji se primarno nalazi samo u bakterijama modificiran i naknadno unesen u druge organizme. Stavovi o tome se razlikuju od zemlje do zemlje te je odluka još na razmatranju. Značajne godine u razvoju CRISPR/Cas9 tehnologije prikazane su na Slici 1.



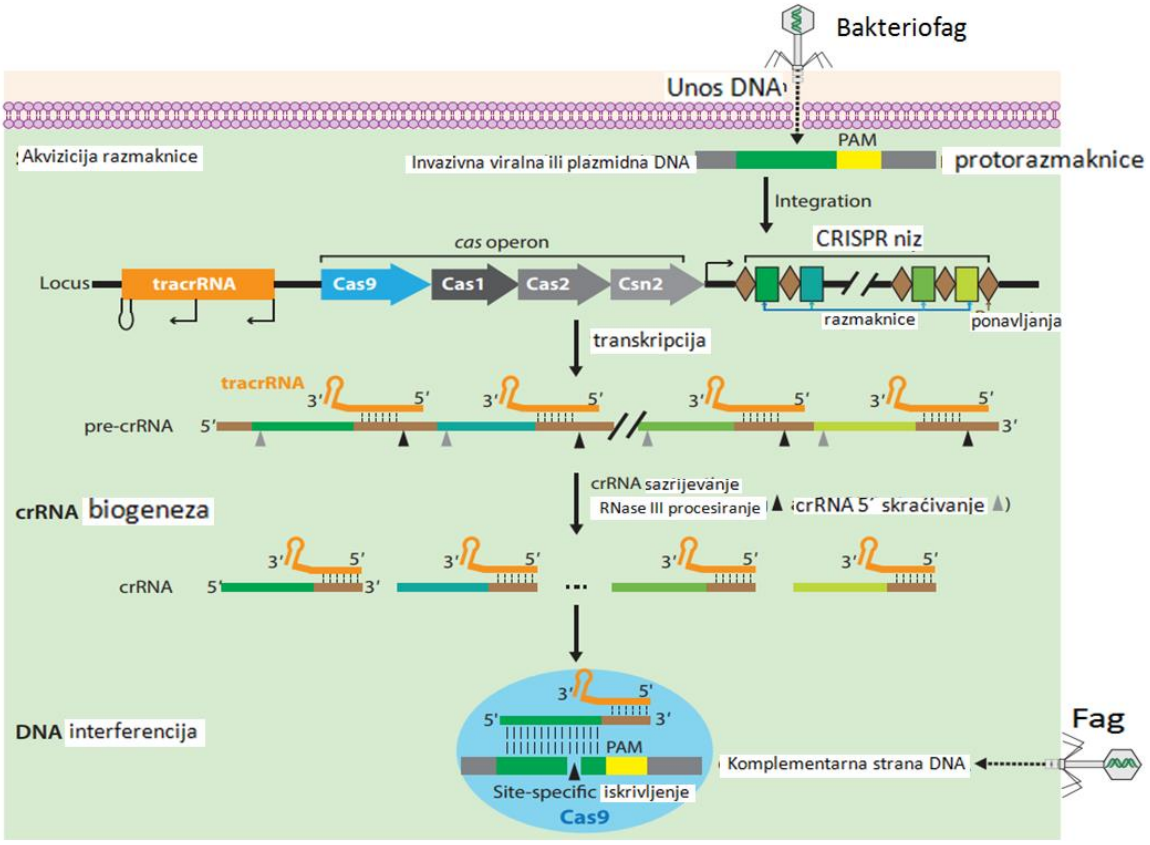
Slika 1. Vremenska linija značajnijih godine u razvoju tehnologije CRISPR/Cas9. Preuzeto i prilagođeno prema Hsu i sur. (2014).

3. BIOLOGIJA SUSTAVA CRISPR/Cas9

Sustav CRISPR/Cas9 je prirodni mehanizam imuniteta bakterija i arheja za obranu od virusa i drugih patogena (Leon i sur 2018). Tijekom infekcije bakterijska stanica razvija imunost tako što razgradi patogenu DNA u fragmente koje ugradi unutar lokusa CRISPR vlastitog genoma. Preživjela bakterija stečeni imunitet prenosi na potomstvo koje je na taj način zaštićeno od infekcije tim istim patogenom. Lokus CRISPR sadrži dvije komponente, ponavljajuće sljedove CRISPR (engl. *repeats*) i multiple gene Cas (od engl. *CRISPR-associated genes*), koji kodiraju proteine Cas važne za ovaj sustav. CRISPR-ponavljajući sljedovi su palindromska ponavljanja nukleotida duljine 20-50 parova baza. Ponavljajući sljedovi su razdvojeni tzv. razmaknicama (engl. *spacers*), koje čine sljedovi ugrađenih fragmenta genoma virusa (strana DNA), koji su stečeni napadom patogena. Transkripcijom lokusa CRISPR nastaje prekurzorska CRISPR RNA (pre-crRNA) koja uz

CRISPR-ponavljajuće sljedove sadrži i prethodno ugrađene fragmente strane DNA tzv. razmaknice. Zatim se pre-crRNA cijepa u manje fragmente tzv. CRISPR RNA (crRNA) koje se sastoje od ponavljajućih sljedova CRISPR i razmaknica, koje komplementarne stranoj DNA, te ju prepoznaju pri infekciji. Molekula crRNA spaja se s endonukleazom Cas9 u ribonukleoproteinsku česticu koja prepoznaje i cijepa stranu DNA, te tako štiti bakteriju od infekcije. Endonukleaza Cas9 je odgovorna za cijepanje nukleinskih kiselina , koja se sastoji od dvije nukleazne domene, domene NHN (histidin–asparagin–histidin nukleazna domena) i domene RuvC (nukleazna domena nalik RNazi H). Domena NHN iskrivljuje ciljnu molekulu DNA (protorazmaknica) komplementarnu sekvenci od 20 nukleotida na molekuli crRNA, dok domena RuvC iskrivljuje DNA lanac suprotan komplementarnom lancu. Upravo, promjene na tih 20 nukleotida na 5' kraju crRNA omogućavaju vezanje na bilo koju željenu sekvencu DNA dok god postoji susjedni slijed PAM (slijed 5'-NGG-3', motiv pridružen protorazmaknici, od engl. *protospacer adjacent motif*). Endonukleaza Cas9 prepoznaje slijed PAM veličine 2-6 nukleotida, koji se nalazi nizvodno od ciljnog mjesta cijepanja molekule DNA tzv. protorazmaknice, pri čemu aktivira (Leon i sur 2018).

Identificirana su tri tipa sustava CRISPR/Cas9 od kojih je tip II najbolje proučen (Makarova i sur. 2011; Shmakov i sur. 2015). Molekula crRNA ne može sama usmjeravati protein Cas9, već joj tome pomaže molekula tracrRNA, koja je također kodirana CRISPR genskim sustavom. Molekula tracrRNA sadrži sekvencu djelomično komplementarnu molekuli crRNA, nakon čijeg je spajanja omogućeno spajanje molekula Cas9 i crRNA. Nakon nastanka kompleksa i prepoznavanja strane DNA dolazi do stvaranja DSB. Mehanizam djelovanja sustava CRISPR/Cas9 dijeli se u tri faze: adaptacija, ekspresija i interferencija. U adaptacijskoj, imunizacijskoj ili akvizicijskoj se fazi sekvence razmaknica ugrađuju u lokuse CRISPR. U ekspresijskoj fazi se odvija sinteza pre-crRNA uz pomoć RNA-polimeraze, i obrada koja uključuje rezanje pre-crRNA u manje fragmente (crRNA) uz pomoć specifične endoribonukleaze. U interferencijskoj fazi ili fazi imuniteta, dolazi do vezanja crRNA na komplementarni slijed ciljne DNA i na tracrRNA, koja pak veže Cas9 (Slika 2).(Jiang i Doudna 2017.) Multiproteinski kompleks sa zrelom crRNA može prepoznati i formirati parove baza, koje su specifične za nadolazećeg napadača i njihovu DNA ili RNA sa savršenom ili skoro savršenom komplementarnošću. Ako postoje neslaganja između baza ciljane DNA i razmaknica, ili ako postoji mutacija u PAM sekvenci proces iskrivljenje DNA, koji prethodi cijepanju, se ne odvija. Također je važno spomenuti da se svaki stadij odvija vremenski i prostorno neovisno jedan o drugom.

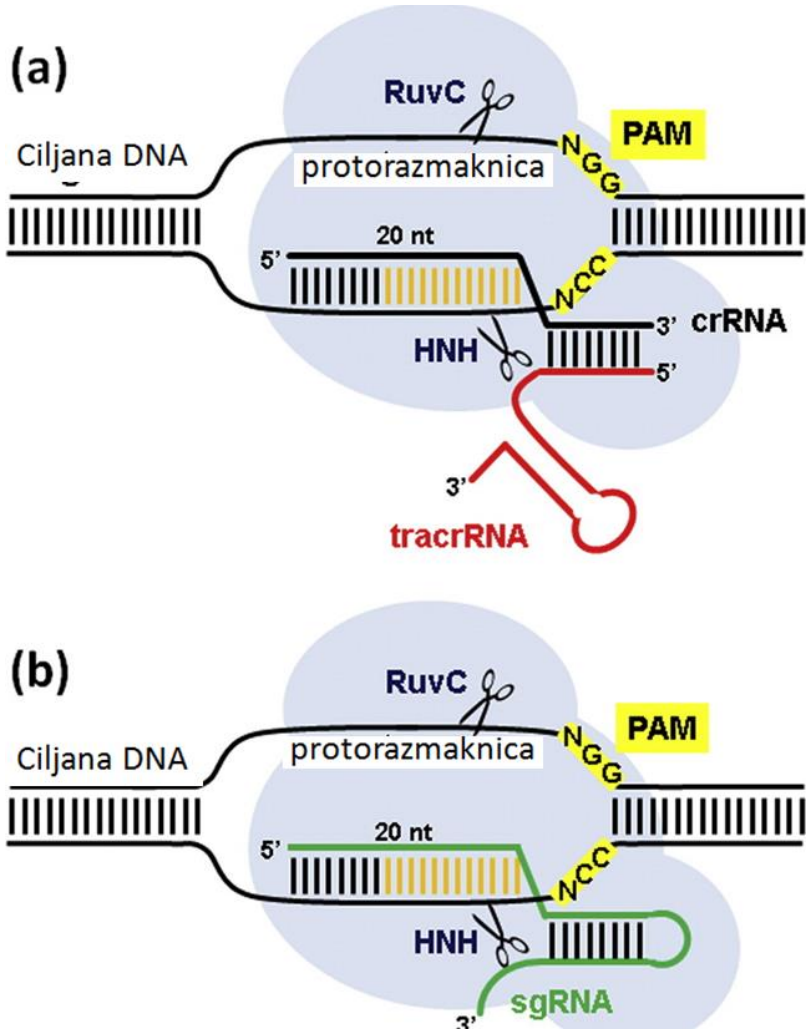


Slika 2. Mehanizam CRISPR/Cas sustava kod bakterija. Preuzeto i prilagođeno prema Jiang i Doudna 2017.

4. SUSTAV CRISPR/Cas9 KOD UREĐIVANJA GENOMA

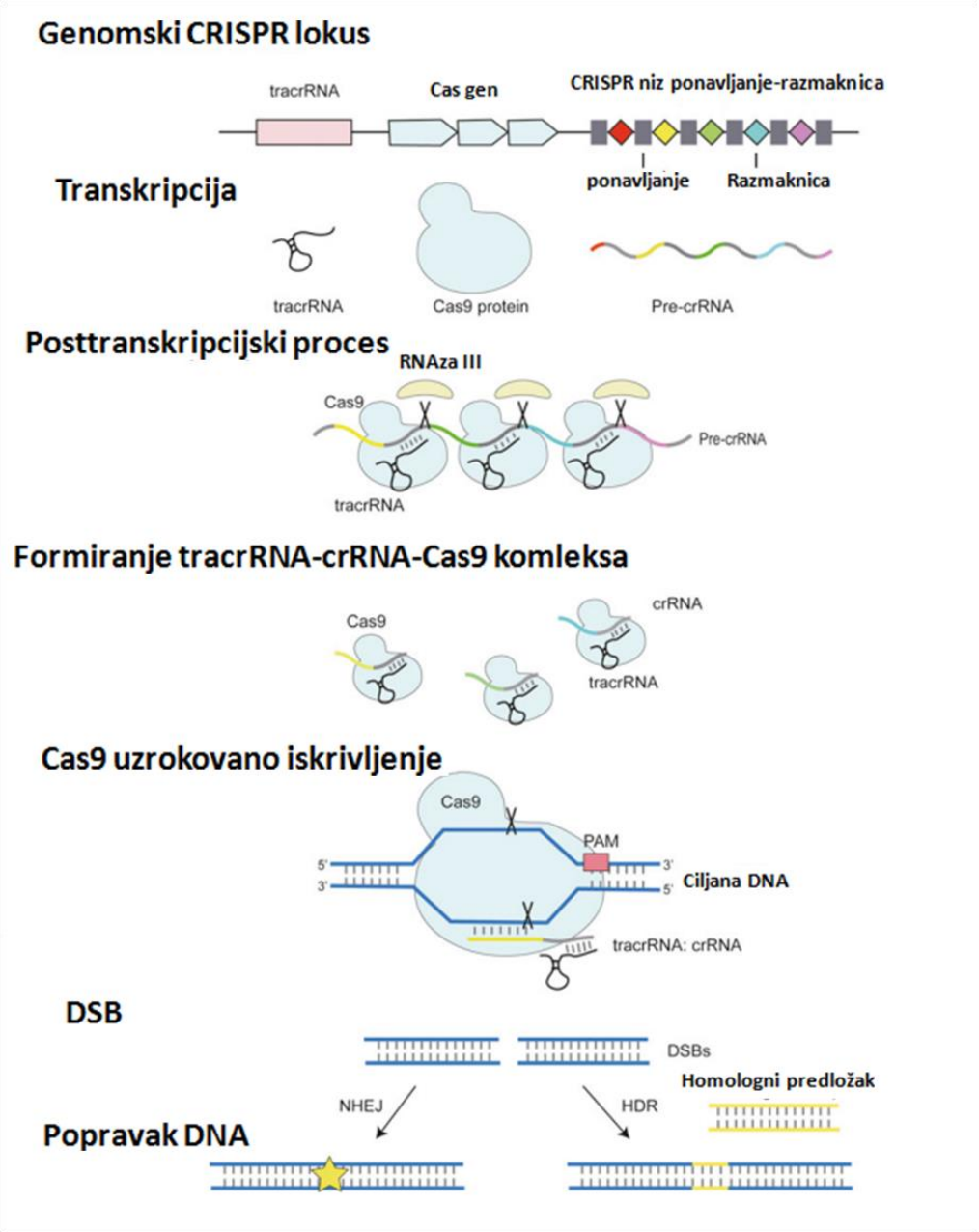
Princip korištenja sustava CRISPR/Cas9 u svrhu uređivanja genoma, temelji se na proizvodnji molekula crRNA sa sekvencom komplementarnom ciljanoj sekvenci, te proizvodnji komplementarne tracrRNA koje s proteinom Cas9 izazivaju DSB, uz pomoć dvije domene proteina Cas9 (NHN i RuvC) koje rade iskrivljenja na DNA (Slika 3a). Molekule crRNA i tracrRNA se mogu uvesti posebno u stanicu pa potom stvoriti dupleks, ili mogu biti spojene u jednu kombiniranu gen-specifičnu navodeću molekulu sgRNA (od engl. *single-guide*) ili gRNA (od engl. *guide*) (Slika 3b). Većinom se koristi kombinirana sgRNA, koja spajanjem s proteinom Cas9 posreduju u izrezivanju slijeda ciljne DNA komplementarnog s 20-ak nukleotida na 5'-kraju molekule sgRNA, a koji je smješten uz sekvencu PAM (Slika 4). (Peng i sur. 2015.) Molekula sgRNA se može lakše unijeti u stanicu i modificirati, te ju se tako može učiniti otpornijom na stanične egzonukleaze i imuni odgovor. Nastali DSB pokreće stanične mehanizme popravka DNA, koji je stanicama prirodno urođen (Slika 4). Dva su osnovna mehanizma popravka DSB-a

molekule DNA: ne-homologno spajanje krajeva (NHEJ, od engl. *non-homologous end joining*), i homologijom usmjeren popravak (HDR, od engl. *homology directed repair*). Mehanizam NHEJ je sklon pogreškama i često rezultira točkastim mutacijma (insercijama ili delecijama), uslijed čega dolazi do pomaka okvira čitanja (engl. *frameshift*) i inaktivacije (engl. *knockout*) gena, a mehanizam HDR koristi kalup, sestrinsku kromatidu ili egzogenu komplementarnu DNA, kao predložak za sintezu ispravnog slijeda nukleotida, odnosno popravak DSB. HDR omogućuje ubacivanje čitavih gena na mjesto DSB-a pa se koristi u uređivanju genoma. HDR je moguć samo tijekom G2 i S faze staničnog ciklusa te se taj nedostatak nastoji riješiti, kako bi se HDR mogao koristiti tokom cijelog ciklusa. (Hsu i sur. 2014.)



Slika 3. Komponente sustava CRISPR/Cas9, i cijepanje ciljne DNA usmjeravano molekulama (a) tracrRNA i (b) sgRNA. Preuzeto i prilagođeno prema Bortesi i Fischer

2014. PAM (od engl. *Protospacer adjacent motif),* RuvC (nukleazna domena nalik RNazi H), NHN (histidin–asparagin–histidin nukleazna domena), crRNA (CRISPR RNA), tracrRNA (transaktivirajuća CRISPR RNA



Slika 4. Djelovanje sustava CRISPR/Cas9 pri uređivanju genoma. Preuzeto i prilagođeno prema Peng i sur. (2015).

5. MODIFIKACIJE SUSTAVA CRISPR/Cas9

Isto kako se metodom CRISPR/Cas9 mogu izazvati željene promjene u genomu tako se mogu izazvati i neželjene promjene. Zbog toga su razvijeni mnogi modificirani oblici sustava CRISPR/Cas9, osobito proteina Cas9. Tako se za smanjenje učestalosti nespecifičnih (engl. *off-target*) insercija koristi se nukleaza dCas9 (dCas9 od engl. *deactivated*), sa samo jednom aktivnom domenom, NHN ili RuvC, što sprječava DSB ali ne i stvaranje jednolančanih lomova molekule DNA. Budući da se regulacija sustava CRISPR/Cas9 odvija na razini transkripcije gena *Cas* i slijeda CRISPR te na post-transkripcijskoj razini proteina Cas, protein dCas9 inhibira vezanje proteina koji su potrebni za ekspresiju gena, kao što je RNA-polimeraza, te tako djeluje kao inhibitor ekspresije. Kao aktivatori ekspresije djeluju onda kada ima se pridruže proteini koji djeluju na ekspresiju određenog gena. Također protein dCas9 može biti vezan s epigenetičkim modifikatorima koji dodaju metilne skupine na DNA ili acetilne skupine na histone, što omogućuje proučavanje kako određene modifikacije utječu na ekspresiju gena i dinamiku DNA su prilagodili protein Cas9 da ne reže DNA nego je spojen s enzimom koji pretvara baze iz jedne u drugu (Komor 2016). Tako, ukoliko se na protein Cas9 fuzionira enzim citidin-deaminaza koji uklanja amino-skupinu s citidina, sustav cilja specifično mjesto i uzrokuje konverziju citidina u uridin. Ova modifikacija bi mogla biti korisna i široko primijenjena jer većina ljudskih bolesti prouzrokovanih genetičkim promjenama posljedica je točkastih mutacija (Komor 2016).

Druga modifikacija metode koristi i uvodi dvije molekule sgRNA komplementarne bliskim ciljanim sekvencama na suprotnim lancima DNA. Ova varijanta se može koristiti za ciljanje bilo koje specifične regije genoma bez iskrivljenja DNA. Nemogućnost stvaranja iskrivljenja, omogućuje upotrebu ove modificirane metode za vizualizaciju dijelova genoma (Balboa i sur. 2015).

Treći tip modifikacije povećava specifičnost ciljnog mjesta stvaranjem molekula sgRNA orijentiranih u oba smjera. Zanimljiva je upotreba tehnologije CRISPR/Cas9 u svrhu istraživanja specifičnih genomskih regija. Vizualizacija specifičnih regija DNA, radi boljeg razumijevanja njihove prostorno-vremenske organizacije, može se postići spajanjem proteina dCas9 s fluorescentnim proteinom kao što je zeleni fluorescentni protein (GFP). GFP vezan za protein dCas9 i strukturno optimizirana molekula sgRNA su korištene za prikazivanje ponavljajućih i neponavljajućih elemenata telomera i kodirajućih gena živih stanica (Sander i Joung 2014; Soda i sur. 2017). Ovaj CRISPR aspekt ima potencijal u

unaprjeđivanju trenutnih tehnologija za proučavanje konformacijske dinamike nativnih kromosoma žive stanice, posebice ako bi se razvilo višebojno prikazivanje koristeći više proteina Cas9. Funkcionalno skeniranje cijelih genoma će omogućiti karakterizaciju esencijalnih gena za regulaciju obrane domaćina od patogena.

6. UNOS SUSTAVA CRISPR/Cas9 U STANICU

Dijelovi mehanizma CRISPR u stanicu se mogu unijeti na nekoliko načina: u obliku plazmida, u obliku fragmenta RNA, ili kao ribonukleoproteini (RNP, od engl. *ribonucleoprotein*). Metoda unosa u obliku RNP-ova, poznata i kao metoda *DNA-free*, te izaziva najmanje nespecifičnih mutacija kao i najveću učinkovitost uređivanja, budući da nakon što naprave rez, podložni su brzoj proteolitičkoj razgradnji (Liang i sur. 2015). Također, kod ove metode nema opasnosti od ugrađivanja endogenih DNA elemenata u genom domaćina, stoga stječe popularnost kod korištenja u terapeutske svrhe kao i kod modificiranja poljoprivrednih usjeva. Jedan od problema unosa je veličina proteina Cas9 (4.2 kb) što otežava unos u stanicu. Za *ex vivo* dostavu, sustav treba biti dostavljen u jezgru što je problem kod stanica koje se ne dijele. Većina unosa se vrši lipofekcijom, mikroinjekcijom ili elektroporacijom. Drugi je potencijalni problem unosa slučajna integracija u genom što izaziva moguću nespecifičnu mutagenezu. Zbog toga novija istraživanja nastoje koristiti ekspresiju preko mRNA umjesto preko plazmida, ili direktnim ubacivanjem kompleksa Cas9/sgRNA. Na taj bi način uređivanje počelo brže. Tek kada se u sustavima *ex vivo* razvije pouzdan način unosa, moći će biti primijenjen u *in vivo* stanice. Glavna pitanja oko unosa su korištenje virusnih ili ne-virusnih vektora, idealan površinski naboj, kako zaobići jezgrinu barijeru i dopiranje do ciljanih mjesta. Svi do sada omogućeni unosi *in vivo* vršeni su preko virusnih vektora, najčešće adenovirusnih. *In vivo* primjena CRISPR/Cas9 koristi virusne i ne-virusne metode unosa u stanicu. Virusne suvisoko učinkovite, a s obzirom ugradnje U ciljanu DNA dijele se na integrirajuće (retrovirusi, lentivirusi) i neintegrirajuće (adenovirusi, adeno-asocirani virusi)Ne virusni sustavi dostave gena se koriste nanočesticama: kationskim nano-nosiocima, liposomima i polimernim materijalima.Ove metode su sigurnije za domaćina i lakše za proizvodnju, ali nedostatak im je otežan prolazak kroz membrane stanice (Li i sur. 2018).

7. ZNAČENJE TEHNOLOGIJE CRISPR/Cas9

Godine 2012. i 2013. tehnologija CRISPR/Cas9 osvojila je drugo mjesto na natječaju „*Breaktroughof the year*“ časopisa Science, a 2015. osvojila je tu nagradu (Travis 2015). Massachusetts Institute of Technology (MIT) proglasilo je tehnologiju CRISPR/Cas9 jednom od najnaprednijih tehnologija za godine 2014. i 2016.
Postoje nagađanja da bi izumitelji mogli dobiti i Nobelovu nagradu u nadolazećem desetljeću (Web 4).

Metoda CRISPR/Cas9 omogućuje mijenjanje DNA u živim stanicama što može pomoći u liječenju genetičkih bolesti. Ima širok potencijal primjene, od uređivanja ciljanog dijela genoma do regulacije željenog gena. Ovom je tehnologijom moguća i vizualizacija i reorganizacija molekule DNA. Metoda je već primijenjena na miševima (Wefers i sur. 2016), majmunima (Kang i sur. 2015), svinjama (Chen i sur. 2015), kozama (Liu i sur. 2018), komarcima (Kistler i sur. 2015) i vinskim mušicama, te bi se mogla primjenjivati i na ljudskim embrijima. Metoda je isprobana na ljudskim stanicama, te je testirana mogućnost primjene u svrhu uklanjanja integriranog virusa HIV-a iz inficiranih ljudskih stanica (Wang i sur. 2016). Metoda također ima potencijal upotrebe u svrhu poboljšanja nekih značajki kao što su jačina kostiju, smanjena sklonost kardiovaskularnim bolestima, mijenjanje boje očiju i visine i dr. Ovaj aspekt potencijalnog korištenja metode CRISPR/Cas9 postavlja mnoga etička pitanja koja trebaju biti razmotrena (Caplan i sur. 2015). Stoga je primjena metode na ljudskim reproduktivnim stanicama na moratoriju. Takva se odluka čini razumnom zbog trenutnog nedostatka znanja o modificiranju ljudskih reproduktivnih stanica i nedovoljno usavršenom tehnikom korištenja same metode CRISPR/Cas9 (Web 5). Zbog svoje relativne jednostavnosti, pogotovo u usporedbi s drugim metodama genetičkog inženjerstva, metoda je jako privlačna i dostupna. Metoda CRISPR/Cas9 se brzo proširila i danas ima široku primjenu. Zbog svoje jednostavnosti i mogućnosti prilagodbe dovela je do revolucije u svijetu genetičkog inženjeringa (Hsu 2014). Veliku je pažnju privukla ponajviše zbog mogućnosti uređivanja gena u živim organizmima osobito čovjeka. Omogućuje promatranje i sistematično ispitivanje genoma i njegove funkcije u endogenom kontekstu, omogućava proučavanje funkcionalne organizacije genoma i otkrivanje funkcije specifičnih gena i regulatornih elemenata, te je sve popularnija u terapeutskim tretmanima kod ljudi. Uz to, metoda je i brza, jeftina, precizna, dostupna, ne zahtjeva puno iskustva i posebne uvijete, može se primijeniti na brojnim organizmima, ima široku primjenu i može se modificirati. Iako su navedene prednosti značajan napredak u znanosti, baš zbog njih postoji zabrinutost od zlouporabe

metode. Budući da je jednostavna za korištenje te ne zahtijeva posebne uvijete mogla bi je teoretski koristiti i osoba koja nije znanstvenik i nema posebno opremljen laboratorij. Stoga njeno korištenje treba biti strogo kontrolirano kako se ne bi počela koristiti u krive svrhe. Modificiranja tehnologije izvode se prilagođavanjem molekula Cas9 i sgRNA na različite načine kako bi im se optimiziralo djelovanje, a time unaprijedila učinkovitost i preciznost metode, te još više proširio potencijal upotrebe. Modifikacija i optimizacija su kod metode CRISPR/Cas9-a jednostavnije nego kod drugih sličnih metoda jer ciljana DNA pronalazi i veže pomoću sgRNA, a ne pomoću proteina. Do sada je metoda prilagođena kako bi se mogla koristit za mijenjanje specifičnog genetičkog lokusa insercijom, delecijom, mutacijom, inverzijom sekvenci, modulacijom transkripcije gena, aktivacije ili represije gena pomoću katalitički inaktivne dCas9 koja se veže na DNA i tako sprječava vezanje RNA-polimeraze, obilježavanje alela. Ima mogućnost jako ubrzati naše razumijevanje biološkog svijeta oko nas uključujući način tretiranja i dijagnosticiranja bolesti. Primjena kod organizama s kratkim životnim vijekom koristi se u istraživanju bolesti povezanih sa starenjem. Brojne su prednosti ove metode omogućile proučavanje složenijih područja genetike kao što je epigenetika. U budućnosti bi ova metoda mogla omogućiti manipulaciju transkripcijske regulacije ili stanja kromatina određenog lokusa, što bi moglo otkriti kako je genetički materijal organiziran i korišten u stanici te otkriti vezu između arhitekture genoma i njegove funkcije. Glavni je problem primjene kod pacijenata mogućnost nespecifičnih mutageneza do kojih dolazi jer sparivanje baza podnosi do nekoliko neslaganja baza (5 u protorazmaknici i 1 u sekvenci PAM). Smanjenje frekvencije nespecifične mutageneze provodi se pomoću dvostrukih endonukleaza koje prave DSB samo ako obije endonukleaze naprave lom na ciljanom mjestu. Učinkovitost se time ne smanjuje, a mogućnost za nespecifičnu mutagenezu se smanjuje. Sekvenciranje čitavih genoma također pomaže smanjiti nespecifičnu mutagenezu. Stopa nespecifičnih mutageneza ne bi trebala prelaziti prirodnu stopu mutacija u stanici. Drugi način je skraćivanje sgRNA s 20 na 17-19 nukleotida, budući su kraće molekule sgRNA osjetljivije na nesparivanje baza. Ta dva načina bi mogla biti i kombinirana za još veću uspješnost. Primjena metode u raznim genetičkim ispitivanjima omogućit će širok spektar provjeravanja ciljanih meta lijekova i stvaranje životinjskih modela koji će doprinijeti farmakološkim istraživanjima i razumijevanju humanih bolesti. Ranije spomenuta etička pitanja oko metode CRISPR/Cas9 se postavljaju kada je u pitanju uređivanje reproduktivnih ljudskih stanica jer se te mutacije prenose na potomstvo, te su one zabranjene u većini svijeta. Smatra se da nije etički prihvatljivo promijeniti genom buduće

osobe jer ona ne može utjecati na tu odluku. Također postoji strah od stvaranja modificiranih ljudi i gubitka biološke raznolikosti ljudskog roda. Također je upitno i kako bi te promjene ljudske vrste utjecale na sveukupan život na zemlji. Nepredvidivo je kako bi sve moguće uporabe metode CRISPR/Cas9 u ljudskom genomu utjecale na društvo u pogledu ljudskih vrijednosti, ekonomskog statusa, individualnosti, nepravde, dostupnosti, te kakve bi posljedice imale na evoluciju čovjeka s genetičkog i kulturološkog stajališta. Postavlja se i pitanje tko bi imao pravo na zadržavanje knjižnica genoma koje bi bile korištene za modificiranje, te dali bi one bile jednako prisutne među svim slojevima društva ili samo nekolicini. Stvaranje „dizajnirane djece“ bi unijelo društvene promjene koje bi doprinijele povećanju, već dugi niz vremena sveprisutne, nejednakosti među ljudima. Upitno je i jesu li su inteligencija, boja očiju, kose, visina prikladne osobine za manipuliranje, i dali je na čovjeku da ih mijenja, te se strahuje da će se metoda početi koristiti u „krive svrhe“ kao što se npr. plastična kirurgija počela koristit u estetske svrhe a prvobitno je bila namijenjena ljudima koji su imali „unakaženo tijelo“ (Mulvihill i sur. 2017). Iako je uređivanje reproduktivnih stanica zabranjeno u većini zemalja, javnost se slaže s uređivanjem i somatskih (64 %) i reproduktivnih (65%) stanica u terapeutske svrhe, ali ne i za nepotrebno poboljšavanje fizičkih karakteristika. Pri donošenju odluke o uređivanju ljudskog genoma, važno je da bude uključena šira javnost, a ne samo znanstveni krugovi. Odluke o ovom sistemu njeguju zdrav odnos između znanosti i društva, te ohrabruju i potiču angažman javnosti u znanosti koja unaprjeđuje život. Kada bi se naglo odlučilo koristiti metodu na reproduktivnim stanicama moglo bi doći do grešaka koje bi uzrokovale nepodržavanje od strane javnosti. Sa sigurnošću se može reći da postoji puno znanja koje će ovaj alat odgonetnuti i puno kliničkih i ekoloških pitanja na koja ova tehnologija može dati odgovor. Mijenjanje genoma somatskih stanica nije toliko problematično jer je ograničeno na jednu osobu, odnosno ne prenosi se na potomstvo. Sve dok se dostignuća primjenjuju u svrhu čovjekovog boljitka, dotle je njihova svrha opravdana. Težnja za besmrtnošću ili barem produženje života je odavno želja čovjeka i donekle ima smisla ako se smrt tretira kao bolest. Autodestruktivni smisao dostignuće će dobiti onda kada se čovjek poželi miješati u ono što se do sada smatralo „Božijom ingerencijom“, kada poželi kontrolirati rađanje i stvoriti tzv. idealnog čovjeka. Jedinstvenim zakonskim regulativama u čitavom svijetu bit će neophodno kontrolirati sve načine upotrebe ove tehnologije.

Kao i kod svakog revolucionarnog otkrića uvijek postoje oni koji bi bili spremni pretjerivati i širiti lažne informacije kako bi izvukli sve veću korist i stvorili više profita od

očajnih pacijenata i njihovih obitelji. Kako CRISPR/Cas9 ne bi krišom postao čudotvoran lijek za genetske bolesti potrebno ga je pravilno razvijati i primjenjivati. Postoji opasnost da bi se CRISPR/Cas9 mogao koristiti i u opake svrhe bioterorizma i proizvodnje biološkog oružja. Široka mogućnost upotrebe i efikasnost CRISPR/Cas9 stvara zabrinutost da bi bilo tko sa prikladnom opremom mogao stvoriti virus gripe otporan na cjepivo ili neku invazivnu vrstu u vlastitom laboratoriju. Brzi napredak ima svoje nedostatke, ljudi nemaju vremena za karakterizaciju osnovnih parametara sistema. Razvijen je mentalitet koji tvrdi da dok god nešto radi, nema potrebe razumjeti kako ili zašto radi. (Ledford 2015).

Sveukupno gledajući, kako ni pretjerana sloboda uporabe, tako ni potpuna legalna zabrana CRISPR-Cas9 editiranja reproduktivnih stanica može ograničiti znanje, eksperimentiranje, i iznad svega napredak koji je proizašao iz ove tehnologije.

8. PRIMJENA TEHNOLOGIJE CRISPR/Cas9

8.1. PRIMJENA U AGRIKULTURI – ZELENA BIOTEHNOLOGIJA

Tehnologija CRISPR/Cas9 se najviše koristi u znanosti, posebice biologiji i genetici, ali ima i velik potencijal primjene u agrikulturi. Pojam zelena biotehnologija (eng. *Green biotehnology*) je naziv za primjenu biotehnoloških tehnika na biljnim organizmima s ciljem unaprjeđivanja nutritivne kvalitete, kvantitete i ekonomične proizvodnje (Islm 2018). Najnovija primjena biotehnologije u ovom području je genetička modifikacija, u koju spada i metoda CRISPR/Cas9. Genetička modifikacija omogućava veću brzinu i raspon proizvodnje hrane, koristi se za povećanje otpornosti na pesticide, reducira bolesti stoke (svinje otporne na svinjsku gripu), povećava mišićnu masu i nutritivnu vrijednost, stvara stoku bez rogova s kojom bi bilo lakše rukovati. Tehnikama uređivanja genoma mogu se dobiti rodniji usjevi, s većim nutritivnim vrijednostima, otporni na nametnike i tolerantniji na abiotički stres. Iako vrlo korisna, metoda i u agrikulturi nailazi na probleme koji se odnose namoguće posljedicena okoliš, uslijed mijenjanja genoma čitavih vrsta i izazivanja neželjenih posljedica koje bi se mogle prenijeti na potomstvo. Tehnologija CRISPR/Cas9 pruža vrlo korisnu alternativu za genetički inženjering biljaka, bez unošenja strane DNA u biljke, što biljku ne čini genetički modificiranim organizmom, te bi takve cisgene biljke trebale biti isključene iz GMO regulative (Soda i sur. 2017). Iako metoda omogućuje stvaranje korisnih agronomskih svojstava upitno je njeno prihvaćanje od strane anti-GMO organizacija. Sustav CRISPR/Cas9 programiran je i da prepoznaje i iskrivljuje

RNA te će biti posebno koristan u biljkama jer su većina biljnih virusa ima genomsku RNA. Do 2013. godine CRISPR/Cas9 metoda je korištena na 10 različitih biljnih rodova, jedan od njih je talijin uročnjak (*Arabidopsis*) (Liu i sur. 2015). Velika je pažnja je usmjerena na upotrebu metode CRISPR/Cas9 za tzv. „*gen drive*“, tehnika koja može brzo proširiti uređeni gen kroz populaciju. Ta tehnika bi mogla uništiti komarce i krpelje koji prenose bolesti, invazivne biljke, iskorijeniti nametničke biljke otporne na herbicide. Kukce (komarce, grinje) se, na primjer, može onemogućiti u prenošenju bolesti sterilizacijom putem uređivanja genoma (Tanning 2017).

Tehnologije uređivanja genoma imaju veliki potencijal u rješavanju rastuće potražnje za namirnicama, koju će u skoroj budućnosti diktirati rast populacije i klimatske promjene.

8.2. POKUSNE ŽIVOTINJE, PRIMJENA U BIOMEDICINI – CRVENA BIOTEHNOLOGIJA

Znanstvenici su se dugo koristili miševima i vinskim mušicama kao modelnim organizmima jer su imali dovoljno jednostavan genom za manipulaciju. Metoda CRISPR/Cas9 će omogućiti modifikaciju organizama sa složenijim genomom uključujući i čovjeka. Ideje o upotrebi metode CRISPR/Cas9 su već došle do točke gdje se razmišlja o mogućnosti oživljavanja izumrlih vrsta životinja npr. mamuta, mijenjanjem genoma indijskog slona. Mutacija bi izazvala rast dlaka na slonu, te bi takva vrsta bila puštena na slobodu i život u Sibiru gdje bi se mogla razmnožiti (Web 6.)

Sustav CRISPR/Cas9 se može primjenjivati *ex vivo* i *in vivo*. Primjena *ex vivo* mogućuje životinjskih bolestišto omogućuje njihovo pomnije istraživnje i osmišljanje načina njihove prevencije i liječenja (Web 7). Metoda bi se mogla koristiti i za sekvenciranje i istraživanje nepoznate funkcije pojedinih gena, te razjašnjavanje do sada nepoznatih funkcija nekih dijelova genoma. Kada se primjeni u stadiju zigote CRISPR/Cas9 tehnologija može uzrokovati više od jedne mutacije što je do sada bilo moguće samo križanjem niza generacija jedinki sa samo jednom mutacijom. Iako je to prednost CRISPR/Cas9 tehnologije, postoji i nedostatak pri ex vivo korištenju u vidu niske efikasnosti. Daljnim istraživanjima taj nedostatak se nastoji ispraviti. Jedna od trenutno aktualnih ideja je i primjena metode za mijenjanje genoma u životinjama kako bi se u njima uzgojili ljudski oblici organa za transplantaciju. Kada se *ex vivo* istraživanja dovedu do željene granice uspješnosti, mogla bi se početi provoditi istraživanja *in vivo*, koja bi omogućila primjenu svih istraženih metoda u živim organizmima s krajnjim ciljem

upotrebe u ljudskom organizmu. *In vivo* primjena bi mogla omogućiti liječenje genetskih bolesti koje se nasljeđuju i ne nasljeđuju prema Mendelovim zakonima nasljeđivanja(Dow 2015). *Ex vivo* primjena tehnologije CRISPR/Cas9 u istraživanju na pacijentima s karcinomom pluća je prvi primjer kliničkog istraživanja u kojem se metoda primijenila (Cyranoski 2016). Nakon što im se uzmu limfociti iz periferne krvi, sustavom CRISPR/Cas9 na koji je vezan enzim za inaktivaciju gena, u laboratoriju se inaktivira gen koji kodira protein odgovoran za programiranu staničnu smrt. Potom se limfociti vrate u krvotok pacijenata.

Crvena tehnologija (engl. *red biotehnology*) je proces koji unaprjeđuje brigu o zdravstvu i pomaže organizmima da se bore protiv bolesti. To je grana moderne biotehnologije koja se najviše koristi u polju medicine i farmacije s ciljem ublaživanja ljudske patnje i unaprjeđivanja kvalitete života. Metoda CRISPR/Cas9 je jedna od metoda koja se primijenjuje u tim postupcima. Provođenje istraživanja na ljudskim embrijima je za sada dozvoljeno samo na triplonuklearnim zigotama s jednom oocitom i dva spermija koje nastaju tijekom oplodnje *in vitro*. Oni mogu stvarati blastociste u uvijetima *in vitro*, ali se ne mogu razvijati u uvjetima *in vivo*. Uređivanje reproduktivnih stanica u nekim slučajevima je jedini mogući način dobivanja zdravog potomstva, što ide u prilog korištenju metode CRISPR/Cas9 na reproduktivnim stanicama. U terapeutske svrhe, metoda bi se mogla koristiti na nekoliko načina: ispravljanje mutacije koje uzrokuju monogenske bolesti i tako osloboditi osobu „bolesnog“ fenotipa, mijenjati genom patogena, a time i njegovu virulenciju (npr. HIV), induciranje zaštitne uloge genoma domaćina. Tehnika ima potencijal u liječenju malignih bolesti putem inaktivacije onkogena ili aktivacije tumor-supresorskih gena. Najveća mogućnost za manipuliranje genomom u embrijima koji su zdravi i biti će rođeni, je u zemljama s visokom stopom oplodnje *in vitro* i manje strogom zabranom uređivanja genoma embrija kao što su Japan i Indija, dok će Velika Britanija najvjerojatnije dozvoliti uređivanje genoma zigote do 14. dana života, odnosno do početka gastrulacije (Motoko i Tetsuya 2015). Veliki potencijalni cilj razvijanja tehnologije CRISPR/Cas9 je njena primjena u prevenciji ili liječenju bolesti ili mana. Postoje dokazi da korištenje CRISPR/Cas9 na ciljani dio genoma virusa kao što su hepatitis B i HIV, može kontrolirati i izliječiti pacijenta. Tako, nova tehnologija cilja na ometanje provirusa što je privlačan pristup za eliminaciju viralnih genoma iz zaraženih pojedinaca, a time i liječenja viralnih infekcija. CRISPR/Cas9 je uspješno iskrivio i mutirao duga terminalna ponavljanja virusa HIV-1, i uklonio unutarnje viralne gene iz kromosoma inficirane stanice Saayman i sur. 2015). U posljednje vrijeme pokušava se

modificirati imuni sustav kako bi napao virus HIV-a. Ti pokušaji stječu popularnost kao obećavajuća terapeutska primjena genetičkog modificiranja. Slične strategije se razvijaju i za liječenje leukemije (Brabetz i sur. 2017) i drugih krvnih karcinoma. Genska terapija može služiti za liječenje genskih humanih bolesti popravkom mutacija koje uzrokuju bolesti. Nedavno je provedeno revolucionarno istraživanje u kome su znanstvenici pomoću tehnologije CRISPR/Cas9 popravili lokus za regulator transmembranske struje u fibrozi (CFTR-protein) homolognom rekombinacijom u kulturi matičnih stanica crijeva (Shabbir Abu Bakr i sur. 2016). Ovo istraživanje je otkrilo da postoji mogućnost liječenja pacijenata s monogenskim nasljednim poremećajima ispravkom gena u matičnim stanicama. U osnovi, postoje tri različita aspekta koja se trebaju razmotriti kako bi se predvidjela izvodljivost kliničke primjene genomskog uređivanja pomoću CRISPR/Cas9: 1) etička izvodljivost modifikacije genoma, 2) znanje o sekvencama genoma koje izazivaju bolesti, i 3) sposobnost za diagnosticiranje genetski bolesti. Tehnički aspekt modificiranja genoma je učinkovitost koja uključuje stopu uspješnosti (razmjer stanica embrija koje su modificirane), i preciznost (osiguravanje da samo ciljane sekvence budu modificirane). S obzirom na trenutno stanje navedenih osobina, najrealnija upotreba uređivanja reproduktivnih stanica je prevencija genskih bolesti koja je već prisutna kod jednog ili oba roditelja i koja bi definitivno bila prenesena na potomstvo kada ne bi bilo medicinske intervencije. U slučaju autosomalnih recesivnih bolesti (cistična fibroza, fenilketonurija) gdje su oba roditelja homozigoti ili autosomalnih dominantnih bolesti (Huntingtonova bolest, obiteljska adenomatska polipoza) gdje je barem jedan roditelj homozigot, uređivanje germinativnih stanica bi bio jedini način za dobivanje zdravog djeteta koje je biološki njihovo. Općenito govoreći, svaka nova zdravstvena tehnologija ili terapeutska supstanca uvijek ima određeni opseg nepredvidivih rizika i stupnjeva nesigurnosti oko potencijalno štetnih neželjenih učinaka. To ne znači da se nove metode trebaju odbaciti nego ih suprotno treba usavršiti i nakon toga koristiti.

9. ZAKLJUČAK

Tehnologija CRISPR/Cas9 predstavlja revolucionaran alat za uređivanje genoma, sa skoro neograničenim potencijalom. Zahvaljujući svojoj jednostavnosti, pouzdanosti, i fleksibilnosti, tehnologija CRISPR/Cas9 se brzo razvija, stoga granice u primjeni ove metode vjerojatno neće biti vezane uz tehničku izvedbu, nego uz etičke izazove koje predstavlja. Unatoč tomu, nastavlja se rasprava mogu li potencijalna saznanja iz trenutno

zabranjenih istraživanja nadjačati moguće posljedice i moralne/etičke dileme. Etički izazovi tehnologije CRISPR/Cas9 uvelike sumiraju one genetičkog inženjerstva i njegove kliničke primjene, i one genske terapije. Eventualna upotreba takve tehnologije u onkologiji, neurologiji, farmakologiji i farmaciji kao i u agrikulturi i životinjskoj industriji izazivaju opravdano visoka očekivanja, ali u nekom dužem vremenskom periodu. U kliničkoj upotrebi, takav alat bi omogućio gensku terapiju za popravak štete u genomu, dok bi se u laboratoriju koristio za selektivnu manipulaciju genomskih elemenata i proučavanja njihove funkcije. U životinjskom i biljnom svijetu došlo bi do povećanja prinosa i sprječavanja širenja bolesti. Jednom kada se točno utvrdi kako sustav CRISPR/Cas9 radi, mogao bi se primjenjivati u molekularnoj biologiji i genetici na načine koji prije nisu mogli niti biti zamišljeni. Konačno, budućnost CRISPR/Cas9 i sličnih tehnologija za uređivanje genoma, od kojih neke tek trebaju biti otkrivene, je sada u rukama znanstvenika. Jednostavnost metode CRISPR/Cas9 obećava demokratiziranu, personaliziranu i dostupnu eru uređivanja genoma ali ako bude angažirana, budućnost čovječanstva mogla bi biti sjajnija nego ikad.

10. LITERATURA

Balboa, D., Weltner j., Eurola, S., Trokovic, R., Wartiowaara, K., Otonkoski, T.. (2015) Conditionally stabilized dCas9 activator for controlling gene expression in human cell reprogramming and differentiation. Steem cell reports 5: 448-459.

Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D.A., Horvath, P. (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. Science 315: 1709–1712.

Bassett, R. A., Liu, J. L. (2014) CRISPR/Cas9 and genome editing in drosophila. Journal of genetics and genomics 41: 7-19.

Bortesi, L., Fischer, R. (2014) The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond

Caplan, L. A., Parent, B., Shen, M., Plunkett, C.(2015) No time to waste—the ethical challenges created by CRISPR

Chen, F., Wang, Y., Yuan, Y., Zhang W., Ren, Z., Jin, Y., Liu, X., Xiong, Q., Chen, Q., Zhang, M., Li, X., Zhao, L., Li, Z., Wu, Z., Zhang, Y., Hu, F., Huang, J., Li, R., Dai, Y. (2015) Generation of B cell-deficient pigs by highly efficient CRISPR/Cas9-mediated gene targeting

Cyranoski, D. (2016) Chinese scientists to pioneer first human CRISPR trial. Nature 535: 476-477.

Gupta, R. M., Musunuru, K. (2014) Expanding the genetic editing tool kit: ZFNs, TALENs, and CRISPR-Cas9

Guttinger, S. (2017) Trust in science: CRISPR-Cas9 and the ban on human germline editing

Hsu, D. P., Lander, E. S., Zhang, F.(2014) Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering

Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino K., Amemura M., Nakata, A. (1987) Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product. J. Bacteriol. Journal of bacteriology 169: 5429–5433.

Jansen, R., Embden, J. D., Gaastra, W., Schouls, L. M. (2002) Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. Molecular microbiology. 43: 1565–1575.

Jiang F., Doudna A. J. (2017) CRISPR-Cas9 Structures and mechanisms

Kang, Y., Zheng, B., Shen, B., Chen, Y., Wang. L., Wang, L., Niu, Y., Cui, Y., Zhou, J., Wang, H., Guo, X., Hu, B., Zhou, Q., Sha, J., Ji, W., Huang, X. (2015) CRISPR/Cas9-mediated *Dax1* knockout in the monkey recapitulates human AHC-HH

Kistler, E. K., Vosshall, L. B., Matthews, B. J. (2015) Genome engineering with CRISPR-Cas9 in the mosquito Aedes aegypti. Cell reports 11: 51-60.

Komor, C. A., Kim, Y.B., Packer, M. S., Zuris, J. A., Liu, D. R. (2016) CRISPR Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. Nature 533: 420-426.

Ledford, H. (2015) CRISPR, the disruptor. Nature 522: 20-24

Liang, X., Liang, X., Potter, J., Kumar, S., Zou, Y., Quintanilla, R., Sridharan, M., Carte, J., Chen, W., Roark, N., Ranganathan, S., Ravinder, N., Chesnut, J. D. (2015) Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. J biotechnology208:44-53.

Liu, X., Wu, S., Xu, J., Sui, C., Wei, J. (2017) Application of CRISPR/Cas9 in plant biology. Acta pharmaceutica sinica B 7: 292-302.

Makarova, S. K., Haft, D. H., Barrangou, R., Brouns, J. J. S., Charpentier, E., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, J. M. F., Wolf, I. J., Yakunin, F. A., van der Ost, J., Koonin, V. E. (2011) Evolution and classification oft he CRISPR-Cas systems

Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarli, J. E., Church, G. M.(2013) RNA-guided human genome engineering via Cas9. Science 339: 823–826.

Mojica, F. J. M. i Garrett, R. A. (2012) Discovery and seminal developments in the CRISPR field. U: Barrangou, R., van der Oost, J. (ur.) CRISPR-Cas systems. Heildeberg, Berlin, str. 1–31.

Motoko, A. i Tetsuya, I. (2015) International regulatory landscape and integration of corrective genome editing into in vitro fertilization. Nature 526: 310-311.

Mulvihill, J. J., Capps, B., Joly, Y., Lysaght, T., Zwart, H. A. E., Chadwick, R. (2017) Ethical issues of CRISPR technology and gene editing through the lens of solidarity

Peng, R. Lin, G., Li, J.(2015) Potential pitfalls of CRISPR/Cas9-mediated genome editing

Saayman, M. S., Lazar, D. C., Scott, T. A., Hart, J. R., Takahashi, M., Burnett, J. C., Planelles, V., Morris, K. V., Weinberg, M. S. (2015) Potent and targeted activation of latent HIV-1 using the CRISPR/dCas9 activator complex. Molecular therapy 24: 488-498.

Sander, D. J. i Joung, K. J. (2014) CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes

Schenkwein, D. i Yla-Herttuala, S. (2018) Gene editing of human embryos with CRISPR/Cas9: great promise coupled with important caveats. molecular therapy 26: 1-2.

Shmakov, S., Abudayyeh, O. O., Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Gootenberg, J. S., Soda, N., Verma, L., Giri, J. (2017) CRISPR/Cas9 based plant genome editing: Significance, opportunities and recent advances

Stephens, J. i Barakate, A. (2017) Gene Editing Technologies – ZFNs, TALENs, and CRISPR/Cas9

Tanning, T. N. C. (2017) CRISPR/Cas9 in insects: Applications, best practices and biosafety concerns. Journal of insect physiology 98: 245-257.

Travis, J. (2015) Making the cut CRISPR genome-editing technology shows its power. Science 350: 1456-1457.

Wang, G., Zhao, N., Berkhout, B., Das, A. T. (2016) A combinatorial CRISPR-Cas9 attack on HIV-1 DNA extinguishes all infectious provirus in infected T cell cultures. Cell reports 17: 2819-2826.

Wefers, B., Bashir, S., Rossius, J., Wurst, W., Kuhn, R. (2017) Gene editing in mouse zygotes using the CRISPR/Cas9 system. Methods 121-122: 55-67.

Web 1.The Guardian: Human genetic engineering demands more than a moratorium .https://www.theguardian.com/science/political-science/2015/apr/07/human-genetic-engineering-demands-more-than-a-moratorium (6.7.2018.)

Web 2. Fast Company: The Ethics Of CRISPR. https://www.fastcompany.com/40426601/the-ethics-of-crispr (6.72018.)

Web 3. Nature: CRISPR: Pursuit of profit poisons colaboration. https://www.nature.com/news/crispr-pursuit-of-profit-poisons-collaboration-1.19717 (6.7.2018.)

Web 4. Fast Company: Is CRISPR the favorite to win this year´s Nobel Prize? Maybe https://www.fastcompany.com/40472532/is-crispr-the-favorite-to-win-this-years-nobel-prize-maybe (6.7.2018.)

Web 5. The New York Times: Scientists Seek Ban on Method of Editing the Human Genome https://www.nytimes.com/2015/03/20/science/biologists-call-for-halt-to-gene-editing-technique-in-humans.html?_r=0 (6.7.2018.)

Web 6. Science: Woolly mammoth will be back from extinction within two years, say Harvard Scientists https://www.telegraph.co.uk/science/2017/02/16/harvard-scientists-pledge-bring-back-woolly-mammoth-extinction/ (6.7.2018.)

Web 7. Fast Company: We Are Getting Closer To Transplating Pig Organs Directly Into People https://www.fastcompany.com/40558795/we-are-getting-closer-to-transplanting-pig-organs-directly-into-people (6.7.2018.)