

TEHNOLOŠKE ZABILJEŠKE

Uređuje: Marin Kovačić



M. Kovačić*

Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu
Zavod za polimerno inženjerstvo i organsku
kemijsku tehnologiju procesa, Savska cesta 16, 10 000 Zagreb

CRISPR revolucija na pomolu

Obrambeni mehanizam prokariota, poznat pod kraticom CRISPR-Cas, odnosno *Clusters of Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-CRISPR associated protein*, u skorašnjoj budućnosti vjerojatno će imati dalekosežan utjecaj na razvoj novih tehnika genetičkog liječenja i modifikacija ne samo biljaka i životinja već i ljudi.

Radi se o sustavu pomoću kojeg bakterije i arheje mogu steći imunitet na bakteriofage i patogene plazmide. Bakterije koje prežive infekciju pomoću CRISPR-Cas sustava spremaju fragmente patogenog DNK unutar CRISPR lokusa u vlastitom genomu. Unutar lokusa nalaze se ponavljajuće regije, tzv. palindromi, isprekidani s razmaknicama, odnosno sljedovima nukleotida preuzetih od patogena. Unutar CRISPR lokusa nalaze se i Cas geni koji kodiraju istoimene važne enzime sustava. Cas1 i Cas2 enzimi prepoznaju, obrađuju i ugrađuju nove, dotad nepoznate sljedove nukleotida u CRISPR lokus u vidu novih razmaknica, tvoreći time sustav imune memorije prokariota. U slučaju ponovne infekcije patogenom tvori se kratka molekula RNK na temelju spremljenog segmenta DNK u CRISPR imunostnoj bazi, koja čini kompleks s Cas9 enzimom. Taj kompleks zatim pretražuje DNK u bakterijskoj stanici te ukoliko naiđe na podudarajući segment, gotovo laserskom preciznošću uklanja identificiranu DNK te zaustavlja infekciju. Izvanredna je mogućnost svojevrsnog programiranja CRISPR-Cas9 sustava, pri čemu je dovoljno Cas9 proteinu pružiti željenu transkripciju RNK te injektirati sustav u stanicu. Potom stanica vlastitim mehanizmima popravljiva nehomolognom ili homolognom rekombinacijom nastali rez u DNK. Ukoliko je stanica uz Cas9 pružen i željeni gen, vjerojatno će uslijediti ugradnja tog gena u staničnu DNK te uspješna modifikacija. Ukoliko ne postoji predložak, stanica će najvjerojatnije nehomolognom rekombinacijom spojiti krajeve odrezane DNK, čime mogu nastati mutacije koje onemogućavaju djelovanje gena.¹⁻³

Povijest CRISPR-a započinje istraživačkim djelovanjem Francisca Mojice sa Sveučilišta Alicante (*Universidad de Alicante*) na ekstremnom halofitu *Haloflex mediterranei* u sklopu izrade vlastite disertacije tijekom devedesetih godina prošlog stoljeća.⁴ Mojica je svojedobno uočio neobičnu sekvencu, koju su drugi istraživači zanemarili, a pojavljivala se i u drugim arhejama.⁵ Počekom 2000-ih otkriveno je kako CRISPR služi kao sustav staničnog imuniteta bakterija, a već 2012. CRISPR-om je genetski modificirana prva stanica sisavaca.⁴ Izvanredno je što Cas9 djeluje i u eukariotima, usprkos tomu što je DNK eukariota nekoliko redova veći po broju nukleotida te ugrađen u kromatinske strukture i stanične jezgre. Postoji više tipova i podtipova prirodnih i modificiranih Cas9, čija primjena ovisi o ciljanom organizmu.

CRISPR će vjerojatno revolucionirati liječenje nasljednih bolesti i stanja. Tijekom 2019. objavljeni su preliminarni rezultati studije liječenja dvaju pacijenata oboljelih od srpaste anemije i tala-semije CRISPR-om, koji su ukazali na znatno poboljšanje krvne slike u oba slučaja nekoliko mjeseci od početka genetske terapije.⁶ CRISPR je doduše došao na loš glas u kontekstu humane medicine 2018., kad je kineski znanstvenik He Jiankui genetski modificirao tri ljudska embrija, s ciljem stvaranja imuniteta na HIV, kršeći ne samo medicinsku etiku već i zakonsku regulativu, za što je osuđen na tri godine zatvora.⁷ Usprkos tomu, mogu se očekivati nove studije koje će ispitati mogućnost prevencije ili liječenja HIV-a, HPV-a te herpesa na genetskoj razini. Međutim, tu CRISPR-u nije kraj.

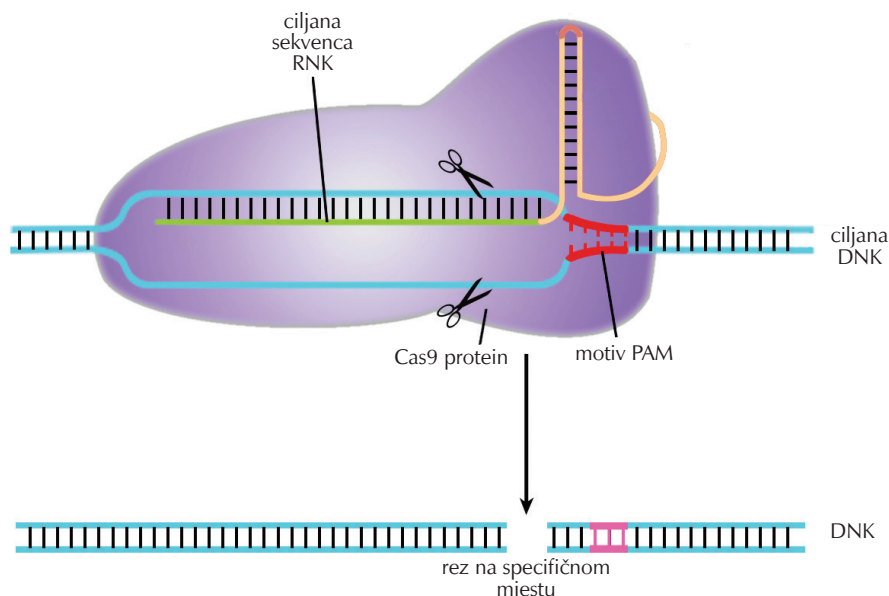
Jedna od pomalo neočekivanih primjena CRISPR-a je u pivarstvu. Potražnja za hmeljem drastično raste, primjerice samo je u SAD-u tijekom proteklog desetljeća otrostručena prodaja hmelja. Međutim, za rast hmelja potrebna je velika količina vode, stoga je upitna održivost njegova uzgoja. Linalol i geraniol su primarni spojevi odgovorni za intenzivan, hmeljasti okus piva, međutim njihova koncentracija u hmelju može znatno varirati, što ima negativan učinak na ponovljivost kvalitete piva. *Denby i sur.*⁸ CRISPR-om su genetski modificirali kvasac *Saccharomyces cerevisiae*, koji proizvodi željene monoterpene za hmeljasti okus piva. Prema provedenom slijepom ispitivanju, ispitanici su istaknuli pivo dobiveno genetski modificiranim kvascem s najistančanijom aromom hmelja.

Funkcionalnim isključivanjem gena za β -oksidaciju masnih kiselina i razgradnju lipida pomoću CRISPR-a u algama, može se povećati prinos triacilglicerola, prekursora u proizvodnji biogoriva. U polju proizvodnje biogoriva, atraktivni kandidati za genetsku modifikaciju su kvasac *Saccharomyces cerevisiae*, bakterije *Zymomonas mobilis*, *Thermoanaerobacter mathranii*, *T. ethanolicus* te druge za proizvodnju bioetanola.^{9,10}

Nadalje, CRISPR bi mogao ostaviti značajan trag i u poljoprivredi, počevši od mikrosvijeta do makrosvijeta. Genetskom modifikacijom rizobakterija s ciljem ostvarenja veće nitrofikacije i lučenja fitohormona za izravnu stimulaciju rasta kultura. Modifikacijom rizobakterija mogli bi se proizvesti sojevi koji luče antibiotike te suzbijaju bolesti korijena biljaka.¹¹ Očekuje se skoro pojava na tržištu CRISPR-om modificiranih rajčica, s poboljšanim okusom i većim udjelom šećera u odnosu na postojeće sorte, kukuruz otporan na sušu i pšenica otporna na pšeničnu pepelnicu.¹²

Mogućnosti CRISPR-a su iznimno velike te ne staju na konvencionalnoj percepciji genetske modifikacije. Jedno od neobičnih ostvarenja moguće uz CRISPR je stvaranje biološkog računala. Naime *Kim i sur.*¹³ uspjeli su genetskom modifikacijom ljudskih stanica izvesti logičke operacije pomoću staničnog genetskog sklopovlja, što će vjerojatno u skorašnjoj budućnosti uzrokovati

* Doc. dr. sc. Marin Kovačić
e-pošta: mkovacic@fkit.hr



Slika 1 – Pojednostavljeni shematski prikaz djelovanja Cas9 enzima na DNK
(izvor: <https://www.tebu-bio.com/blog/2014/05/22/crispr-cas9-specificity-taming-off-target-mutagenesis-technical-bulletin/>)

konfuziju u svezi s pojmom “genetički algoritmi”. Jedna od ekstremnijih i bizarnijih primjena CRISPR-a je za oživljavanje izumrlih vrsta. Projekt “Revive & Restore” aktivno radi na oživljavanju izumrlog sjevernoameričkog goluba *Ectopistes migratorius* pomoću tehnike CRISPR. Do danas uspjeli su dobiti transgeničnog goluba, međutim u haploidnim stanicama jedinke tek jedna od sto tisuća nosi željeni gen, što drastično smanjuje izgleda za transgeničnim

potomstvom. Međutim, radi se o napretku u ostvarenju projekta, a sadašnje projekcije očekuju izlaganje prvih novovjekovnih *Ectopistes migratorius* do 2025.¹⁴ Prema trenutačnim naznakama, možemo očekivati skorašnju revoluciju velikih razmjera pokrenutu CRISPR-om i sličnim alatima, koja bi mogla pomoći u rješavanju brojnih problema današnjice.

Literatura

1. D. Rath, L. Amlinger, A. Rath, M. Lundgren, The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications, *Biochimie* **117** (2015) 119–128, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.03.025>.
2. M. Adli, The CRISPR tool kit for genome editing and beyond, *Nat. Commun.* **9** (2018), doi: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04252-2>.
3. D. Franić, P. Dobrinić, P. Korač, Key achievements in gene therapy development and its promising progress with gene editing tools (ZFN, TALEN, CRISPR/CAS9), *Mol. Exp. Biol. Med.* **1** (2019) 1–9, doi: <https://doi.org/10.33602/mebm.2.1.1>.
4. E. S. Lander, The heroes of CRISPR, *Cell* **164** (2016) 18–28, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.041>.
5. F. J. M. Mojica, C. Ferrer, G. Juez, F. Rodríguez-Valera, Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the *Archea Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning, *Mol. Microbiol.* **17** (1995) 85–93, doi: https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_17010085.x.
6. URL: <https://investors.vrtx.com/news-releases/news-release-details/crispr-therapeutics-and-vertex-announce-positive-safety-and> (pristup 10. 2. 2020.).
7. URL: <https://www.nature.com/articles/d41586-020-00001-y> (pristup 10. 2. 2020.).
8. C. M. Denby, R. A. Li, V. T. Vu, Z. Costello, W. Lin, L. J. G. Chan, J. Williams, B. Donaldson, C. W. Bamforth, C. J. Petzold, H. V. Scheller, H. G. Martin, J. D. Keasling, Industrial brewing yeast engineered for the production of primary flavor determinants in hopped beer, *Nat. Commun.* **9** (2018) 965, doi: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03293-x>.
9. I. Ajjawi, J. Verruto, M. Aquí, L. B. Soriaga, J. Coppersmith, K. Kwok, L. Peach, E. Orchard, R. Kalb, W. Xu, T. J. Carlson, K. Francis, K. Konigsfeld, J. Bartalis, A. Schultz, W. Lambert, A. S. Schwartz, R. Brown, E. R. Moellering, Lipid production in *Nannochloropsis gaditana* is doubled by decreasing expression of a single transcriptional regulator, *Nat. Biotechnol.* **35** (2017) 647, doi: <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00382>.
10. P. K. Sharma, M. Saharia, R. Srivastava, S. Kumar, L. Sahoo, Tailoring microalgae for efficient biofuel production, *Front. Mar. Sci.* **5** (2018) 382, doi: <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00382/full>.
11. B. N. Aloo, B. A. Makumba, E. R. Mbega, The potential of Bacilli rhizobacteria for sustainable crop production and environmental sustainability, *Microbiol. Res.* **219** (2019) 26–39, doi: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.10.011>.
12. L. Arora, A. Narula, Gene editing and crop improvement using CRISPR-Cas9 system, *Front. Plant. Sci.* **8** (2017) 1932, doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01932>.
13. H. Kim, D. Bojar, M. Fussenegger, A CRISPR/Cas9-based central processing unit to program complex logic computation in human cells, *116* (15) (2019) 7214–7219, doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1821740116>.
14. URL: <https://reviverestore.org/projects/the-great-passenger-pigeon-comeback/progress-to-date/> (11. 2. 2020.).